



Institut für Biotechnologie

***Chemoenzymatische Synthese optisch
aktiver β,δ -Dihydroxyester***

Michael Wolberg

Chemoenzymatische Synthese optisch aktiver β,δ -Dihydroxyester

Michael Wolberg

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3988
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3988
D 715 (Diss., Oldenburg, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Chemoenzymatische Synthese optisch aktiver β,δ -Dihydroxyester

Kurzreferat

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen neuen enantiokomplementären Zugang zu optisch aktiven β,δ -Dihydroxyestern und δ -Hydroxy- β -ketoestern. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um wertvolle Intermediate für die Synthese von wichtigen Natur- und Wirkstoffen, wie z. B. den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren des Mevinsäuretyps. Die Synthesestrategie basiert auf einer neuen, hoch regio- und enantioselektiven biokatalytischen Reduktion von achiralen β,δ -Diketoestern. In einem Screening wurden zwei enantiokomplementäre Biokatalysatoren als besonders geeignet für diesen Zweck ausfindig gemacht. So wurde durch Reduktion des β,δ -Diketoesters 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit NADP(H)-abhängiger Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* der enantiomerenreine δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester in einer Ausbeute von 72-84 % d. Th. erhalten (>99.5 % *ee*). Das Enzym ist in Form eines Zellrohextrakts aus einem rekombinanten *E. coli* Stamm leicht erhältlich (reLBADH). Für die einstufige Substratsynthese und die enzymatische Reduktion wurde ein Scale-up durchgeführt (140 g bzw. 70 g Reaktionsmaßstab, substratgekoppelte NADPH-Regenerierung). Der enantiomere δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester wurde durch Reduktion von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) erhalten. Eine detaillierte Untersuchung der Reaktionsparameter dieser Ganzzelltransformation führte zur Anwendung eines zweiphasigen Systems, wodurch der Enantiomerenüberschuß von 48 % *ee* auf 94 % *ee* erhöht werden konnte (Ausbeute: 50 % d. Th.). Die β -Ketogruppe der beiden so erhaltenen Enantiomere wurde mittels *syn*- und *anti*-selektiver Borhydrid-Reduktionsmethoden reduziert. Durch Kombination der Reduktionsmethoden wurden alle vier Stereoisomere des kristallinen β,δ -Dihydroxyesters 6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester erhalten (jeweils >99 % *ee* und *dr* > 200:1, 52-70 % d. Th.). Das *syn*-(3*R*,5*S*)-Isomer dieses bekannten Synthesebausteins wurde alternativ in einem Schritt durch Reduktion von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester mit Zellen von *L. kefir* erhalten. Aus *syn*-(3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester wurden sowohl ein Iodid als auch ein Epoxid dargestellt, welche beide für C-C-Bindungsknüpfung in Position C-6 geeignet sind. reLBADH akzeptiert ein breites Spektrum von β,δ -Diketoestern als Substrat, was photometrisch ermittelt wurde. Die β,δ -Diketoester 3,5-Dioxohexansäure-*tert*-butylester und 3,5-Dioxoheptansäure-*tert*-butylester wurden mit 99.4 % *ee* bzw. 98.1 % *ee* zu den entsprechenden (*R*)- δ -Hydroxy- β -ketoestern reduziert (1-10 mmol Reaktionsmaßstab, 61-77 % d. Th.). Die Reduktion des verzweigten β,δ -Diketoesters *rac*-4-Methyl-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester verläuft über eine dynamische kinetische Racematspaltung, wobei der entsprechende *syn*-(4*S*,5*R*)- δ -Hydroxy- β -ketoester mit 66 % d. Th. erhalten wurde (99.2 % *ee*, *dr* = 35:1). Um die Anwendbarkeit der praktisch enantiomerenreinen enzymatischen Produkte zu unterstreichen, wurden diese in mehreren neuen Naturstoffsynthesen als Ausgangsmaterialien eingesetzt. Weiterhin wurde ein bequemer Prozeß zur Trennung nichtkristallisierender diastereomerer *syn*- und *anti*-1,3-Diole entwickelt. Der entscheidende Schritt dieser neuen Methode basiert auf einer diastereomer-differenzierenden Hydrolyse der entsprechenden Acetonide.

Chemoenzymatic Synthesis of Optically Active β,δ -Dihydroxy Esters

Abstract

A new access to optically active β,δ -dihydroxy esters and δ -hydroxy- β -keto esters is presented. These compounds are valuable intermediates for the synthesis of important natural products and pharmaceuticals, e. g. HMG-CoA reductase inhibitors of the mevinic acid type. The synthesis strategy is based on an unprecedented highly regio- and enantioselective biocatalytic reduction of achiral β,δ -diketo esters. In a screening, two enantiocomplementary biocatalysts were found to be particularly suitable for this purpose. Thus, the β,δ -diketo ester *tert*-butyl 6-chloro-3,5-dioxohexanoate was reduced by NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase of *Lactobacillus brevis* to afford enantiomerically pure δ -hydroxy- β -keto ester *tert*-butyl (*S*)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoate in a 72-84 % isolated yield (>99.5 % *ee*). The enzyme is readily available in the form of a crude cell extract from a recombinant *E. coli* strain (recLBADH). A scale-up of the one-step substrate synthesis (140 g scale) and of the enzymatic reduction (70 g scale, substrate-coupled NADPH-regeneration) was established. The enantiomeric δ -hydroxy- β -keto ester *tert*-butyl (*R*)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoate was obtained by reduction of *tert*-butyl 6-chloro-3,5-dioxohexanoate with baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). A detailed investigation of the reaction parameters of this whole-cell transformation led to the application of a biphasic system by which the enantiomeric excess could be raised from 48 % *ee* to 94 % *ee* (50 % isolated yield). The β -keto group of both enantiomers thus obtained was reduced by *syn*- and *anti*-selective borohydride reductions. Combination of the reduction methods afforded all four stereoisomers of the crystalline β,δ -dihydroxy ester *tert*-butyl 6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate (>99 % *ee* and *dr* > 200:1 each, 52-70 % isolated yield). Alternatively, the *syn*-(3*R*,5*S*)-isomer of this known building block was obtained in one step and with high stereoisomeric purity by reduction of *tert*-butyl 6-chloro-3,5-dioxohexanoate with whole cells of *Lactobacillus kefir*. An iodide and an epoxide suitable for C-C-bond formation at C-6 were derived from *tert*-butyl *syn*-(3*R*,5*S*)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanoate. recLBADH accepts a variety of β,δ -diketo esters as was determined in a photometric assay. The β,δ -diketo esters *tert*-butyl 3,5-dioxohexanoate and *tert*-butyl 3,5-dioxoheptanoate were reduced on a 1-10 mmol scale to afford the corresponding (*R*)- δ -hydroxy- β -keto esters with 99.4 % *ee* and 98.1 % *ee*, respectively (61-77 % isolated yield). The reduction of the branched β,δ -diketo ester *tert*-butyl *rac*-4-methyl-3,5-dioxohexanoate proceeds via a dynamic kinetic resolution which resulted in a 66 % isolated yield of the corresponding *syn*-(4*S*,5*R*)- δ -hydroxy- β -keto ester (99.2% *ee*, *dr* = 35:1). To underline the applicability of the virtually enantiopure enzymatic products, they were used as starting materials for several new natural product syntheses. Furthermore, a convenient process for the large-scale separation of noncrystallising diastereomeric *syn*- and *anti*-1,3-diols was developed. The crucial step of this new method is a diastereomer-differentiating hydrolysis of the respective acetonides.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1998 bis Juli 2001 am Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christian WANDREY durchgeführt und von Herrn Dr. Michael MÜLLER fachlich betreut.

Herrn Prof. Dr. Jürgen MARTENS, Abteilung Organische Chemie, Universität Oldenburg, danke ich herzlich für die Übernahme des Hauptreferats, die regelmäßigen Beratungsgespräche und die solide stereochemische Ausbildung, die mir die Bearbeitung dieses Themas erheblich erleichtert hat. Bei Herrn Prof. Dr. Peter KÖLL bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian WANDREY für die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen, die fachliche und persönliche Unterstützung und die Übernahme des zweiten Korreferats.

Mein Dank gilt weiterhin

- Herrn Priv.-Doz. Dr. Werner HUMMEL (Institut für Enzymtechnologie) sowie seinen Mitarbeiterinnen Frau Bea WEITZ und Frau Vera OPHOVEN für die großzügige Bereitstellung von Enzympräparaten und die vielen aufschlußreichen Fachgespräche,
- Herrn Dipl.-Ing. Ralf FELDMANN, Frau Silke BODE und Frau Petra GEILENKIRCHEN für die engagierte Mitarbeit im Labor und die tatkräftige Hilfe beim Scale-up,
- unserem Gastwissenschaftler Herrn Dr. Aiguo Ji (Abteilung für Pharmazie, Shandong Universität, China) sowie meinen studentischen Hilfskräften Herrn David ALCANTARA (IAESTE-Praktikant) und Herrn Dipl.-Chem. Daniel DROCHNER,
- Frau Loni KRAUS und Herrn Klaus WERTZ, die mir bei vielen technischen Angelegenheiten den Rücken freihielten,
- all meinen anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe "Bioorganische Chemie", besonders meinen Bürokollegen Herrn Dipl.-Chem. Thomas SCHUBERT, Herrn Dr. Thomas DÜNNWALD und Herrn Dipl.-Chem. Dirk FRANKE für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre, die unterhaltsamen Pausen und das Korrekturlesen (T.S.),
- den Mitarbeitern der Infrastruktur des IBT, besonders Frau Marianne Heß,
- den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen des Kekulé Institut für Organische Chemie und Biochemie (Universität Bonn),

- den Kollegen aus der Arbeitsgruppe "Enzymatische Biotransformationen" für den Gedanken- und besonders auch den Materialaustausch,
- Herrn Dr. Peter FEY, Herrn Dr. Rolf ANGERBAUER (Bayer AG, Geschäftsbereich Pharma, Wuppertal-Elberfeld) sowie allen anderen Mitarbeitern der Abteilung "Chemische Entwicklung", die mich während meines Forschungsaufenthalts bei der Bayer AG unterstützt haben,
- der DFG (SFB 380) und der GDCh für die finanzielle Unterstützung und ein Reisestipendium.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael MÜLLER für die Formulierung der interessanten Themenstellung, die anregenden Diskussionen und die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Projekts bedanken. Durch die stete freundschaftliche Unterstützung und die ausgezeichnete fachliche Betreuung war es mir möglich, viele Stolpersteine rechtzeitig zu erkennen und zu umgehen.

Publikationen aus dieser Arbeit

M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, "Highly Regio- and Enantioselective Reduction of 3,5-Dioxocarboxylates", *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4476-4478; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306-4308.

A. Ji, M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, "Dynamic Kinetic Resolution of *tert*-Butyl 4-Methyl-3,5-dioxohexanoate Through Enzymatic Reduction", *Chem. Commun.* **2001**, 57-58.

M. Wolberg, A. Ji, W. Hummel, M. Müller, "Enzymatic Reduction of Hydrophobic β,δ -Diketo Esters", *Synthesis* **2001**, 937-942.

M. Wolberg, W. Hummel, M. Müller, "Biocatalytic Reduction of β,δ -Diketo Esters: A Highly Stereoselective Approach to All Four Stereoisomers of a Chlorinated β,δ -Dihydroxy Hexanoate", *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4562-4571.

A. Job, M. Wolberg, M. Müller, D. Enders, "Total Synthesis of *S*-(+)-Argentilactone and *S*-(-)-Goniothalamine", *Synlett* **2001**, 1796-1798.

S. Bode, M. Müller, M. Wolberg, "Diastereomer-Differentiating Hydrolysis of 1,3-Diol-Acetonides: A Simplified Procedure for the Separation of *syn*- and *anti*-1,3-Diols", *Org. Lett.* **2002**, *4*, 619-621.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit erfolgten drei Patentanmeldungen:

DE 198 57 302 (14.12.1998, erteilt 26.10.2000)

DE 199 37 825 (11.08.1999)

DE 101 47 030 (25.09.2001)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	β,δ -Dihydroxyester: Bausteine für die Natur- und Wirkstoffsynthese	1
1.2	Enantioselektive Reduktion von β,δ -Diketoestern: Stand der Technik	4
	<i>Hydrierung mit chiralen Rutheniumkatalysatoren</i>	4
	<i>Biokatalytische Methoden</i>	6
	<i>Diastereoselektive Reduktion chiraler β,δ-Diketoester</i>	8
1.3	Vorüberlegung und Zielsetzung	9
2	DIE SUBSTRATE: β,δ-DIKETOESTER	11
2.1	Einleitung	11
2.2	Synthese	12
2.3	Scale-up	15
2.4	Untersuchungen zur Stabilität von β,δ -Diketoestern	19
3	DER SCHLÜSSELSCHRITT: ENZYMATISCHE REDUKTION	21
3.1	Reduktion mit <i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase (reclBADH)	21
	<i>Einleitung</i>	21
	<i>Photometrische Enzymassays</i>	23
	<i>Präparative Umsetzungen</i>	25
	<i>Scale-up (Fed-Batch)</i>	28
	<i>Einsatz eines zweiphasigen Systems</i>	30
	<i>Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (Synthese optisch aktiver δ-Lactone)</i>	31
	<i>Dynamische kinetische Racematspaltung</i>	35
	<i>Fazit</i>	40
3.2	Ganzzelltransformationen mit <i>Lactobacillus spec.</i>	41
	<i>Einleitung</i>	41
	<i>Reduktion des chlorierten β,δ-Diketoesters 3q</i>	41
	<i>Reduktion des Benzyloxy-substituierten δ-Hydroxy-β-ketoesters (S)-28</i>	43
3.3	Ganzzelltransformationen mit Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	44
	<i>Einleitung</i>	44
	<i>Reduktion mit Feuchtzellmasse ("Frischhefe") in wässriger Suspension</i>	46
	<i>Reduktion mit Feuchtzellmasse in einem Zweiphasensystem</i>	49
	<i>Reduktion mit immobilisierter Feuchtzellmasse und Einfluß von Inhibitoren</i>	51
	<i>Reduktion mit lyophilisierter Bäckerhefe ("Trockenhefe")</i>	53
	<i>Einsatz eines Adsorberharzes (Amberlite XAD-7)</i>	57
	<i>Fazit</i>	59

4	DIE FOLGECHEMIE: β,δ-DIHYDROXYESTER	61
4.1	Einleitung	61
4.2	Diastereoselektive Reduktion.....	63
4.3	Diastereomerentrennung durch diastereomerdifferenzierende Acetonid-Hydrolyse	66
4.4	Nucleophile Substitution.....	70
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	73
6	EXPERIMENTELLER TEIL	77
6.1	Allgemeines	77
	<i>Methoden und Material</i>	77
	<i>Verzeichnis der allgemeinen Arbeitsvorschriften (AAV)</i>	81
	<i>Verzeichnis der aufgeführten Verbindungen</i>	82
6.2	Synthese von β,δ -Diketoestern.....	84
	<i>Alkoholyse und Decarboxylierung acetoacetylierter Meldrumsäure</i>	84
	<i>C-Acylierung von β-Ketoester-Bisenolaten</i>	85
	<i>Untersuchungen zur Stabilität von β,δ-Diketoestern</i>	98
6.3	Synthese von δ -Hydroxy- β -ketoestern.....	101
	<i>Enzymatische Reduktion von β,δ-Diketoestern (zellfreie Umsetzungen)</i>	101
	<i>Reduktion des β,δ-Diketoesters 3q mit <i>L. kefir</i> (Ganzzelltransformation)</i>	108
	<i>Reduktion des β,δ-Diketoesters 3q mit Bäckerhefe (Ganzzelltransformation)</i>	108
	<i>Synthese von δ-Lactonen und Bestimmung des Enantiomerenüberschusses</i>	112
	<i>Chemische Synthesen racemischer und optisch aktiver δ-Hydroxy-β-ketoester</i>	116
6.4	Synthese von β,δ -Dihydroxyestern	121
	<i>Diastereoselektive Reduktion des chlorierten δ-Hydroxy-β-ketoesters 2c</i>	121
	<i>Diastereomerentrennung durch diastereomerdifferenzierende Acetonid-Hydrolyse</i>	123
	<i>Synthese von 1,3-Diol-Acetoniden</i>	126
	<i>Synthese des Epoxids <i>syn</i>-(3<i>R</i>,5<i>S</i>)-40 durch Chlorwasserstoffeliminierung</i>	129
7	LITERATURVERZEICHNIS UND ANMERKUNGEN	131

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

$[\alpha]_{\lambda}^T$	Spezifische Drehung ($10 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{g}^{-1}$) bei Temperatur T ($^{\circ}\text{C}$) und Wellenlänge λ (nm)
Abb.	Abbildung
aq.	wässrig (aqueous)
Äq.	Moläquivalent
Ar	Arylrest
Ausb.	Ausbeute nach Aufarbeitung (% der Theorie)
BINAP	2,2'-Bis-(diphenylphosphanyl)-1,1'-binaphtyl
Bn	Benzyl
Bz	Benzoyl
c	Konzentration in $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (M), $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (mM) oder $\text{g}\cdot(100 \text{ mL})^{-1}$; letzteres nur in Verbindung mit der Angabe der spezifischen Drehung $[\alpha]_{\lambda}^T$
CPCR	<i>Candida parapsilosis</i> Carbonylreduktase
CSA	Camphersulfonsäure
CSP-GC	Gaschromatographie an chiraler stationärer Phase
CSP-HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie an chiraler stationärer Phase
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (NMR-Meßtechnik)
DIBAL	Diisobutylaluminiumhydrid
DMSO	Dimethylsulfoxid
$dr_{s:a}$ (bzw. $dr_{a:s}$)	Diastereomerenverhältnis <i>syn</i> / <i>anti</i> (bzw. <i>anti</i> / <i>syn</i>); Definition:

$$dr_{s:a} = x(\text{syn}) / x(\text{anti})$$

mit $x(\text{syn})$, $x(\text{anti})$ = Stoffmengenanteil der *syn*- bzw. *anti*-konfigurierten Stereoisomere

EC	Enzymklassifizierung (Enzyme Classification)
ee	Enantiomerenüberschuß (%); Definition:

$$ee (\%) = 100 \cdot [x(R) - x(S)] / [x(R) + x(S)]$$

mit $x(R)$, $x(S)$ = Stoffmengenanteil des (*R*)- bzw. (*S*)-Enantiomers

ef	Enolform
EI	Elektronenstoß (Electron Impact)
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung
ges.	gesättigt
hf	Halbketalform
HLADH	Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (Horse Liver Alcohol Dehydrogenase)

HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (High Resolution Mass Spectrometry)
<i>J</i>	Kopplungskonstante (Hz)
kat.	katalytisch
kf	Ketoform
Konf.	Konfiguration
LBADH	<i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lit.	Literatur
LKADH	<i>Lactobacillus kefir</i> Alkoholdehydrogenase
<i>m/z</i>	Masse/Ladung-Verhältnis
MeO-BIPHEP	6,6'-Dimethoxy-2,2'-bis(diphenylphosphanyl)-1,1'-biphenyl
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidin-2-on
NMR	Kernmagnetische Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
PEEK	Polyetheretherketon
PCC	Pyridiniumchlorochromat
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
PTFE	Polytetrafluorethylen
quant.	quantitativ
READH	<i>Rhodococcus erythropolis</i> Alkoholdehydrogenase
recLBADH	in <i>E. coli</i> überproduzierte LBADH
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
spec.	Art (species)
<i>t</i>	Reaktionszeit in Minuten (min), Stunden (h) oder Tagen (d)
<i>Tab.</i>	Tabelle
TBAA	Tetrabutylammoniumacetat
TBADH	<i>Thermoanaerobium brockii</i> Alkoholdehydrogenase
T-BINAP	2,2'-Bis(di- <i>p</i> -tolylphosphanyl)-1,1'-binaphtyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
<i>T</i>	Reaktionstemperatur (°C)
<i>T</i> _{max}	Maximale Reaktionstemperatur bei Reagenzienzugabe (°C)
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TMS	Trimethylsilyl
<i>t</i> _R	Retentionszeit (min)
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure

TTN	total turnover number, maximale Zykluszahl
t_{VI}	Inkubationszeit vor Substratzugabe (h)
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
YADH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Alkoholdehydrogenase (Yeast Alcohol Dehydrogenase)
zit. Lit.	zitierte Literatur
Δ	Erhitzen unter Rückfluß
δ	Chemische Verschiebung (ppm)
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)

1 Einleitung

1.1 β,δ -Dihydroxyester: Bausteine für die Natur- und Wirkstoffsynthese

Die 1,3-Diol-Einheit ist ein charakteristisches Strukturmerkmal der Produkte des Polyketid-Biosynthesewegs. Polyketide werden im Sekundärstoffwechsel der niederen Tiere und Pflanzen, vor allem aber auch der Einzeller, durch Polykondensation kurzkettiger Carbonsäurederivate synthetisiert.^[1] Reduktiv modifizierte Polyketide weisen daher oftmals ausgedehnte 1,3-Polyol-Substrukturen auf.^[2] Viele dieser Naturstoffe sind biologisch aktiv und von pharmakologischer Relevanz.^[3]

Optisch aktive β,δ -Dihydroxyester haben sich vielfach als 1,3-Diol-Bausteine in der Synthese polyketider Strukturen bewährt. Beispielhaft seien hier Arbeiten zur Synthese der Makrolactone Amphotericin B und Bryostatin 2 genannt (Abb. 1-1).^[4] An diesen beiden strukturell anspruchsvollen Verbindungen wird bereits deutlich, daß 1,3-Diol-Bausteine nicht nur in hoher optischer Reinheit sondern auch in konfigurativer Vielfalt benötigt werden. Flexible Methoden zur Darstellung optisch aktiver β,δ -Dihydroxyester sind daher von großem Interesse.

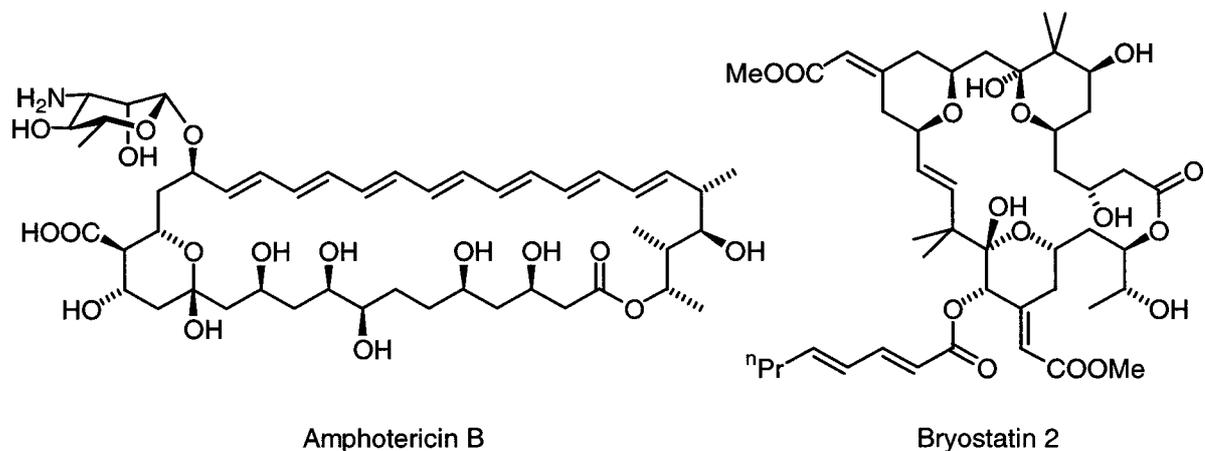


Abb. 1-1 Struktur der Makrolactone Amphotericin B und Bryostatin 2.

Eine besondere Bedeutung kommt β,δ -Dihydroxyestern im Zusammenhang mit den cholesterolsenkenden HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren des Mevinsäuretyps – den sogenannten Vastatinen – zu. Diese Wirkstoffe haben in der medikamentösen Therapie von Hyperlipidämien und der damit korrelierten Atherosklerose, insbesondere der Koronarsklerose, eine Schlüsselstellung erlangt.^[5] Neueren Untersuchungen zufolge zeigen Vastatine überdies prophylaktische Wirkung gegenüber Osteoporose und Alzheimer Demenz sowie einen immun-

suppressiven Effekt bei Organverpflanzungen.^[6] Auf die polyketide Herkunft der mikrobiell produzierten Mevinsäuren weist ein β -Hydroxy- δ -lacton-Rest hin,^[7] der in vivo zum pharmakologisch aktiven *syn*- β,δ -Dihydroxycarboxylat geöffnet wird (Abb. 1-2).^[8]

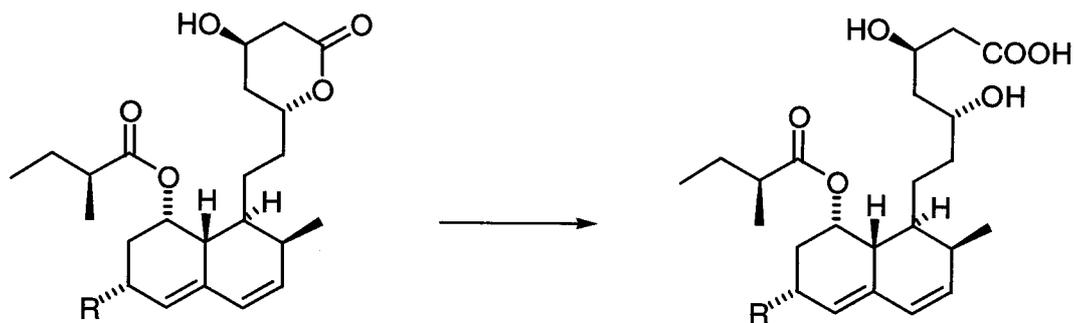


Abb. 1-2 Struktur der natürlichen Mevinsäuren Compactin (alias Mevastatin, R = H), Mevinolin (alias Lovastatin, R = Me) und der pharmakologisch aktiven Form.

Während die β,δ -Dihydroxycarboxylat-Substruktur für die cholesterolsenkende Wirkung unerlässlich ist, kann das chirale bicyclische Ringsystem vorteilhafterweise gegen strukturell einfachere Reste ausgetauscht werden. Dies hat zur Entwicklung vollsynthetischer Surrogate geführt, die teilweise erheblich niedriger dosiert werden können als die natürlichen Mevinsäuren (Abb. 1-3). Entscheidend für die Wirkung ist die *syn*-(*R,R*)-Konfiguration der chiralen Seitenkette.^[9] Der Suche nach effizienten Methoden zur Synthese geeigneter nichtracemischer Intermediate wird daher viel Aufmerksamkeit entgegengebracht.^[10]

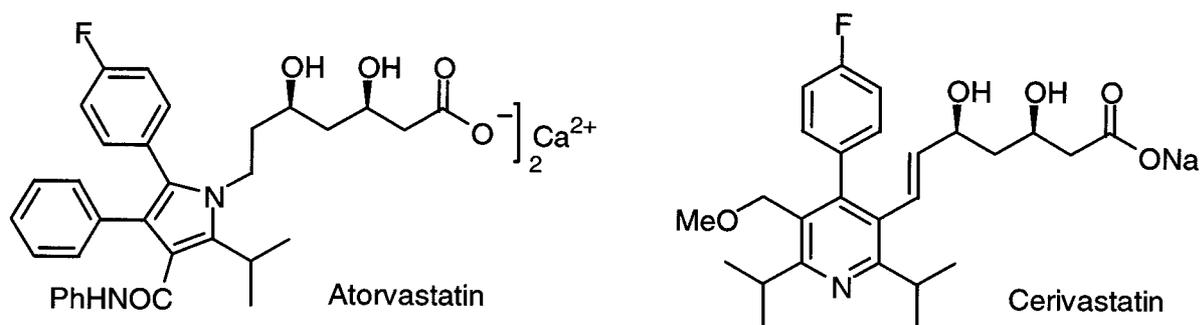


Abb. 1-3 Zwei vollsynthetische HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren.^[11, 12]

Eine häufig verfolgte Strategie in der Synthese optisch aktiver β,δ -Dihydroxyester **1** ist die diastereoselektive Reduktion von δ -Hydroxy- β -ketoestern **2** (Abb. 1-4). Dieser Ansatz ist besonders flexibel, da sowohl *syn*- als auch *anti*-selektive Protokolle bekannt sind.^[2a] Optisch aktive δ -Hydroxy- β -ketoester **2** wiederum werden vor allem durch Kettenverlängerung von

nichtracemischen β -Hydroxyestern^[13] und durch stereoselektive Aldoladdition^[14] erhalten. Als alternative Methode bietet sich hier eine regio- und enantioselective Reduktion von β,δ -Diketoestern **3** an. Die Chiralität wird in diesem Fall auf der Stufe eines Moleküls mit vorgefertigtem Kohlenstoffgerüst eingeführt. Alle vier Stereoisomere eines β,δ -Dihydroxyesters **1** können so von einem gemeinsamen achiralen Vorläufer abgeleitet werden (Abb. 1-4).

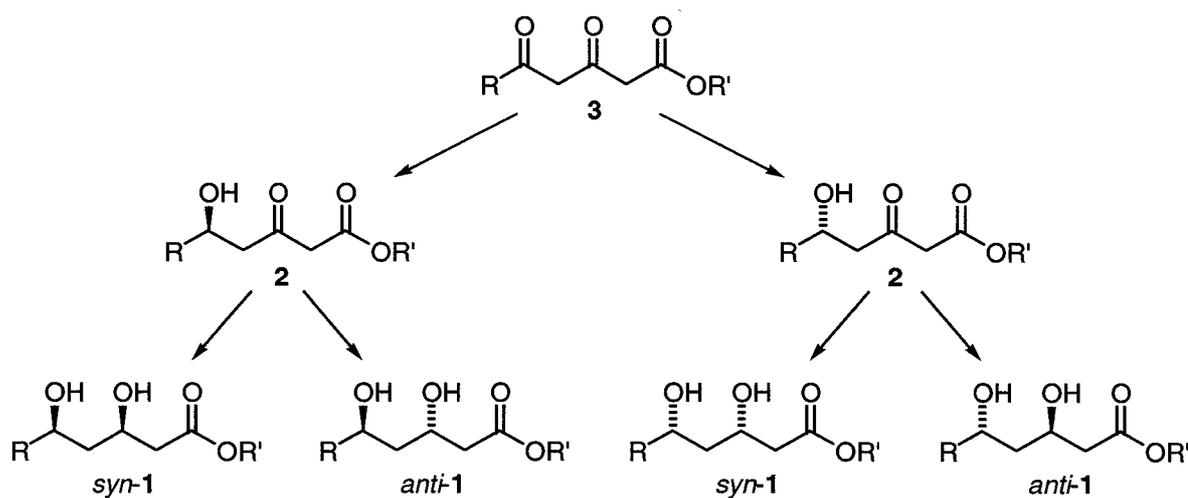


Abb. 1-4 Stereodivergente Strategie zur Synthese von optisch aktiven β,δ -Dihydroxyestern **1**.

Die enantioselective Reduktion von β,δ -Diketoestern **3** wurde in der Vergangenheit von mehreren Arbeitsgruppen untersucht, wobei sowohl chemische als auch mikrobiologische Methoden zum Einsatz kamen. Im folgenden Kapitel wird eine Übersicht gegeben.

1.2 Enantioselective Reduktion von β,δ -Diketoestern: Stand der Technik

Hydrierung mit chiralen Rutheniumkatalysatoren

In einer Patentanmeldung der TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION wird die enantioselective Hydrierung des β,δ -Diketoesters **3a** beansprucht.^[15] Als Produkt wird ein *syn/anti*-Diastereomerengemisch der entsprechenden β,δ -Dihydroxyester **1a** beschrieben, wobei für jedes Diastereomer ein hoher Enantiomerenüberschuß angegeben wird (Abb. 1-5). Die absolute Konfiguration der Produkte und eine Methode zur Trennung der Diastereomere werden in der Patentanmeldung nicht beschrieben.

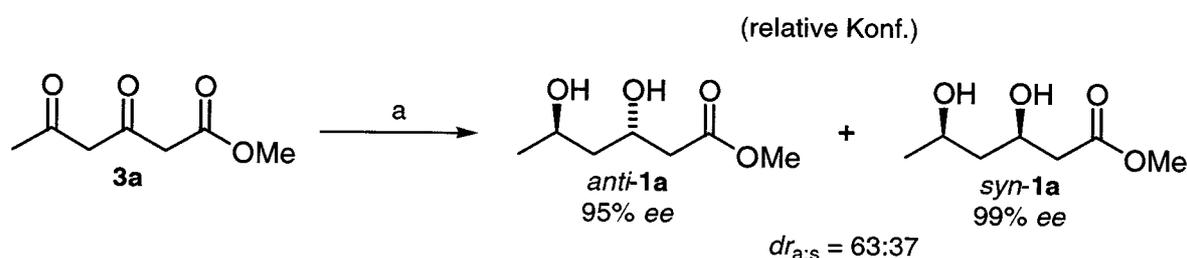


Abb. 1-5 Enantioselective Hydrierung des β,δ -Diketoesters **3a**. — a) H_2 , kat. $\{Ru[(+)-T-BINAP]\}(BF_4)_2$, MeOH, 30°C, 22 h (78 %).

SHAO et al. erhielten in dieser Reaktion mit einem ähnlichen Katalysator ebenfalls einen Überschuß des β,δ -Dihydroxyesters *anti-1a*.^[16] Ein nicht näher bestimmter Teil des Produkts fiel dabei als β -Hydroxy- δ -lacton an (Abb. 1-6). Der Enantiomerenüberschuß der Produkte wurde in dieser Arbeit summarisch für das Stereozentrum C-5 erfaßt.

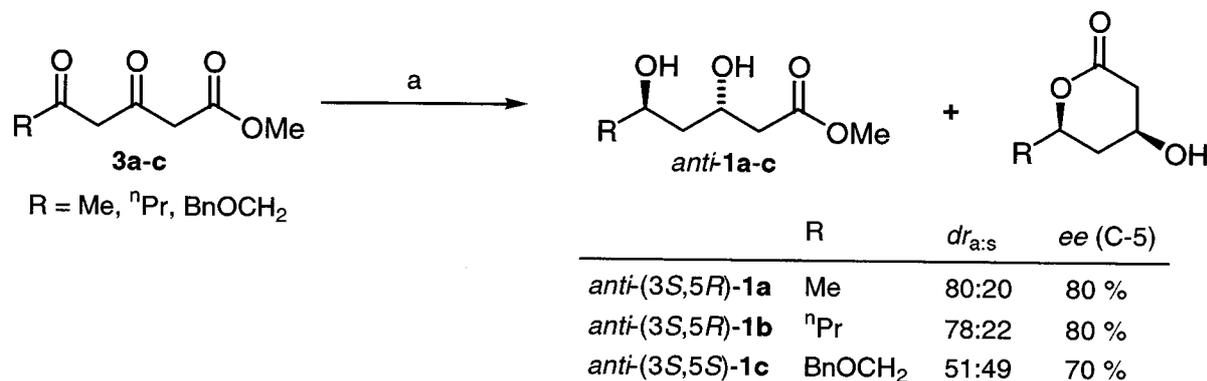


Abb. 1-6 Enantioselective Hydrierung der β,δ -Diketoester **3a-c** (Bn = Benzyl). — a) H_2 , kat. Ru_2Cl_4 -[(*R*)-BINAP]₂(NEt₃), MeOH, 50°C, 48 h [quant. (GC)].

Während bei der Reduktion des 3,5-Dioxooctanoats **3b** ebenfalls das *anti*-konfigurierte Produkt im Überschuß entsteht (*anti-1b*), resultiert die Reduktion des Benzyloxy-substituierten Derivats **3c** in einem praktisch äquimolaren *syn*-/*anti*-Diastereomergemisch **1c**.

In der Arbeitsgruppe um MORTREUX wurde die enantioselective Hydrierung des β,δ -Diketoesters **3a** detailliert untersucht.^[17] Zwar ließ sich mit einem Ru-MeO-BIPHEP-Katalysator das Diastereomerenverhältnis $dr_{a:s}$ des Hauptprodukts *anti-1a* weiter steigern [$dr_{a:s} = 89:11$, 95 % *ee* (*anti*), 78 % *ee* (*syn*)], allerdings fällt auch hier das Produkt als Gemisch mit den entsprechenden β -Hydroxy- δ -lactonen an. Durch gaschromatographische Reaktionskontrolle und Austausch des Lösungsmittels Methanol gegen Dichlormethan konnte mit einem Ru-BINAP-Katalysator eine regioselective Reduktion der β -Ketogruppe erzielt werden. Im präparativen Maßstab (26 mmol) wurde der β -Hydroxy- δ -ketoester (*S*)-**4a** nach Chromatographie in 45%iger Ausbeute und mit moderater Enantioselectivität erhalten (*Abb. 1-7*). Der Anteil der Doppelreduktionsprodukte am Rohprodukt wird mit 16 mol% angegeben.

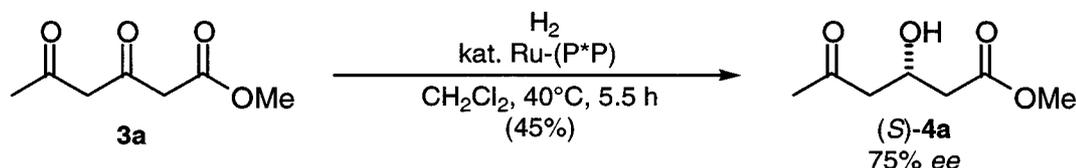


Abb. 1-7 Enantio- und regioselective Reduktion des β,δ -Diketoesters **3a**. — Ru(P*P) = {Ru[(*R*)-T-BINAP]}Br₂.

Rutheniumkatalysatoren mit chiralen Amidophosphan-Phosphinit-Liganden führen wiederum zum β,δ -Dihydroxyester **1a** als Hauptprodukt, wobei der Enantiomerenüberschuß niedrig ausfällt [$dr_{a:s} = 4:96$ bis $90:10$, 5-40 % *ee* (*syn*), 10-70 % *ee* (*anti*)].^[17]

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß β,δ -Diketoester problematische Substrate für Ruthenium-basierte Hydrierkatalysatoren sind. Die Reduktion resultiert hauptsächlich in Produktgemischen, und nur in vereinzelt Fällen werden Gemischkomponenten mit mehr als 95 % *ee* gebildet. Durch die 1,3,5-Tricarbonylstruktur können mehrere Koordinierungsmodi zwischen Substrat und Katalysator auftreten, so daß die Wahrscheinlichkeit für ein konstitutionell und konfigurativ einheitliches Reduktionsprodukt sinkt. Dieses Problem verschärft sich, wenn im Rest R ein Heteroatom-Substituent mit Donor-Eigenschaften lokalisiert ist (siehe *Abb. 1-6*, Seite 4). Eine hoch regio- und enantioselective Reduktion von β,δ -Diketoestern kann mit diesen Katalysatoren nicht realisiert werden.^[15-17]

Biokatalytische Methoden

Einer japanischen Patentanmeldung liegt die enantioselective Reduktion der β,δ -Diketoester **3** mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zugrunde.^[18] In Abhängigkeit von den Resten R und R' werden Gemische der isomeren Hydroxyketoester **2** und **4** erhalten, wobei das Regioisomer **4** stets im Überschuß anfällt (Abb. 1-8). Für die präparative Umsetzung von 3,5-Dioxohexansäuremethylester (**3a**) wird eine Ausbeute von 32 % angegeben. Aufgrund der Produktverteilung und der *ee*-Werte kann gefolgert werden, daß mehrere (*R*)- und (*S*)-selektive Alkoholdehydrogenasen der Hefe um das β,δ -Diketoester-Substrat konkurrieren.

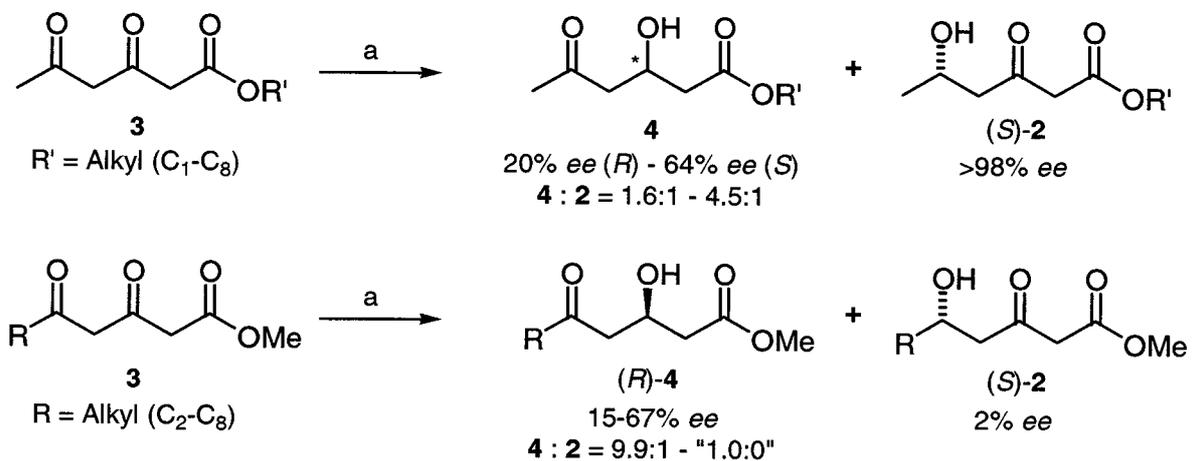


Abb. 1-8 Enantioselective Reduktion von β,δ -Diketoestern mit Bäckerhefe. — a) Bäckerhefe, Glucose, H₂O, EtOH.

Dieses Problem tritt offensichtlich auch bei der Hefe-Reduktion der maskierten β,δ -Diketoester **5** auf (Abb. 1-9).^[19] Insbesondere die Heteroatom-substituierten Substrate werden zu Alkoholen **6** mit niedrigem, bestenfalls moderatem, *ee*-Wert umgesetzt. Das Problem der Regioselectivität wird hier durch die fixierte Enolisierung der β -Ketogruppe umgangen.

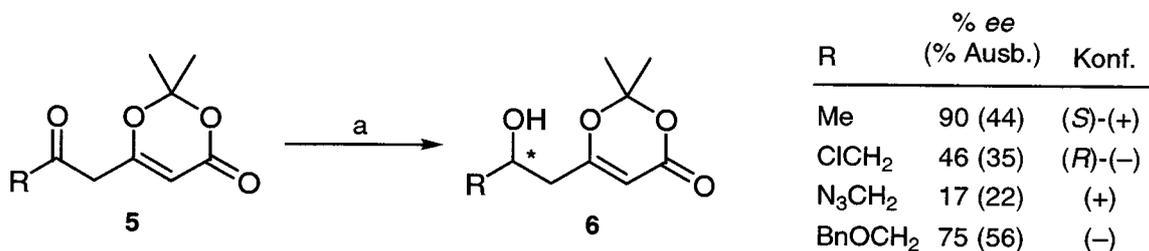


Abb. 1-9 Enantioselective Reduktion von maskierten β,δ -Diketoestern mit Bäckerhefe (absolute Konfiguration teilweise nicht aufgeklärt). — a) Bäckerhefe, Saccharose, H₂O.

Die acetoacetylierten Meldrumsäurederivate **7** können ebenfalls als maskierte β,δ -Diketoester aufgefaßt werden. Ähnlich wie im vorhergehenden Beispiel schützt eine vollständige Enolisierung, die in diesem Fall nicht durch die Bildung eines Enolethers erzwungen werden muß, die β -Ketogruppe vor Reduktion durch Alkoholdehydrogenasen. Die Produkte (*S*)-**8** werden bei der Bäckerhefe-Reduktion mit sehr hohem Enantiomerenüberschuß erhalten (Abb. 1-10).^[20]

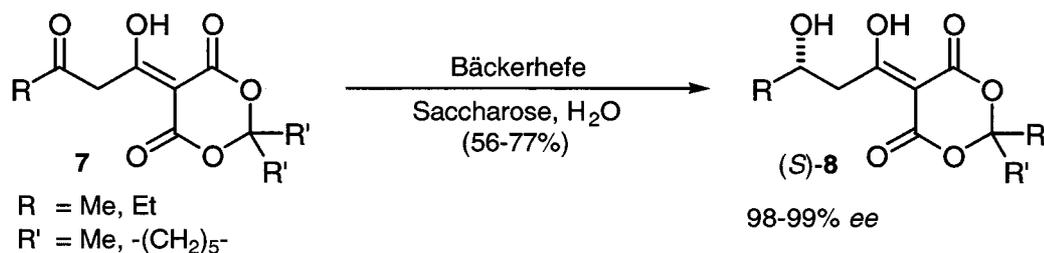


Abb. 1-10 Enantioselective Reduktion von acetoacetylierten Meldrumsäurederivaten mit Bäckerhefe.

In der Arbeitsgruppe um PATEL wurde die biokatalytische Reduktion des Benzyloxy-substituierten β,δ -Diketoethylesters **3d** intensiv untersucht.^[21] Bei einem Screening wurden diverse Mikroorganismen identifiziert, die dieses Substrat zum entsprechenden β,δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**1d** umsetzen. Mit Zellen von *Acinetobacter calcoaceticus* wurde selektiv der Ethylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**1d** erhalten (97% ee, 6% *anti*-Diastereomer). Bei zellfreien Umsetzungen mit Rohextrakt aus *A. calcoaceticus* konnte nachgewiesen werden, daß die Reaktion über ein Gemisch der isomeren Hydroxyketoester verläuft (Abb. 1-11).

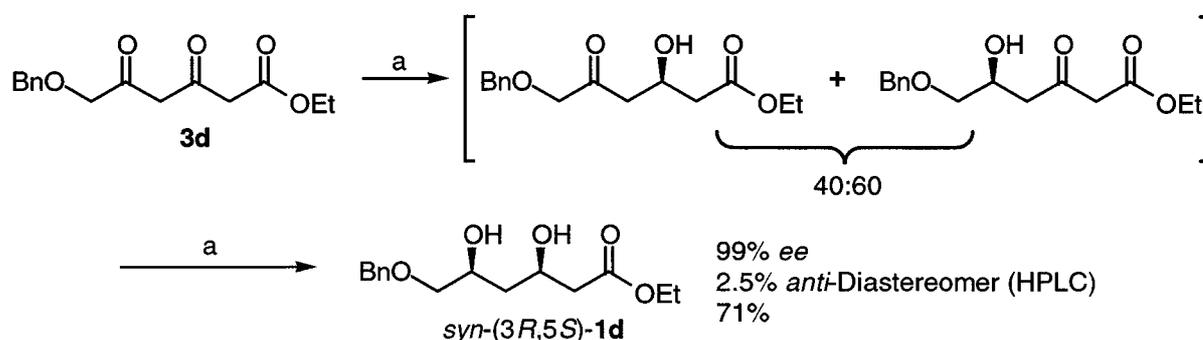


Abb. 1-11 Reduktion eines β,δ -Diketoesters mit Zellrohextrakt aus *A. calcoaceticus*. — a) Zellrohextrakt, NAD (2 mol%), Glucose, Glucosedehydrogenase, Puffer (71%).

Aus dem Zellrohextrakt wurde eine NAD(H)-abhängige Alkoholdehydrogenase isoliert, die das stereoisomerenreine Doppelreduktionsprodukt *syn*-(3*R*,5*S*)-**1d** liefert.^[21]

Diastereoselektive Reduktion chiraler β,δ -Diketoester

SOLLADIÉ et al. beschreiben eine hoch regio- und diastereoselektive Reduktion des chiralen β,δ -Diketoesters **9** mit DIBAL (Abb. 1-12, relative Konfiguration abgebildet).^[22] Der resultierende δ -Hydroxy- β -ketoester **10** wurde in einer Reihe von Naturstoffsynthesen verwendet.^[23]

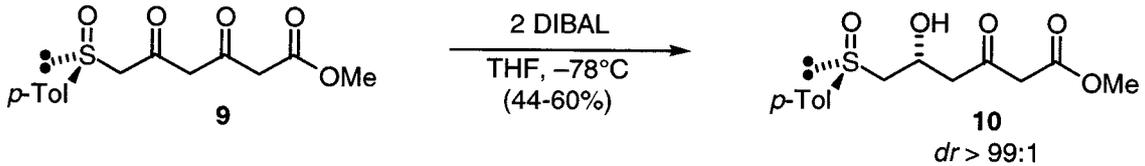


Abb. 1-12 Diastereoselektive Reduktion des chiralen β,δ -Diketoesters **9** mit DIBAL (Diisobutylaluminiumhydrid).

HIYAMA et al. verfolgten im Zusammenhang mit der Synthese von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren eine ähnliche Strategie und konnten zeigen, daß die chiralen β,δ -Diketoester **11** und **12** durch DIBAL hoch regio- und diastereoselektiv in β -Position reduziert werden (Abb. 1-13).^[24]

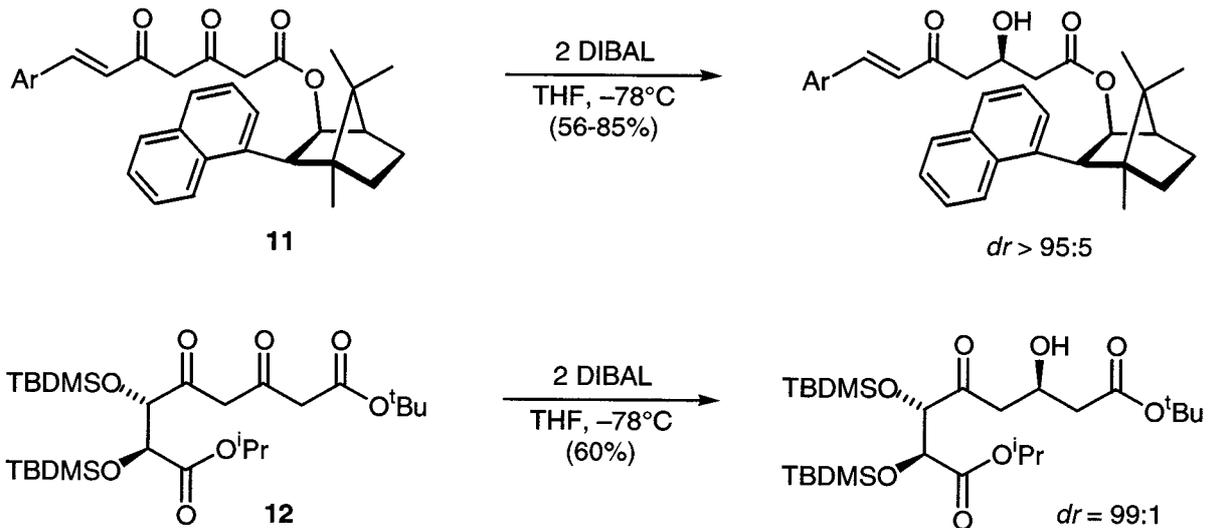


Abb. 1-13 Diastereoselektive Reduktion chiraler β,δ -Diketoester.

Nachteilig wirkt sich bei diesen Methoden der zusätzliche Syntheseaufwand für die Einführung der chiralen Hilfsgruppen aus. Weiterhin werden die DIBAL-Reduktionen bei sehr tiefen Temperaturen durchgeführt.

1.3 Vorüberlegung und Zielsetzung

Das Problem der enantioselektiven Reduktion von β,δ -Diketoestern wurde bisher nicht zufriedenstellend gelöst. Die Mehrzahl der Methoden resultiert in Produktgemischen, und nur in vereinzelten Fällen wird ein Enantiomerenüberschuß von $>95\%$ erzielt. Für eine regio- und enantioselektive Reduktion acyclischer β,δ -Diketoester in δ -Position existieren keine Methoden; lediglich ein diastereoselektives Beispiel wird diesbezüglich beschrieben. Die Ergebnisse der biokatalytischen Umsetzungen weisen daraufhin, daß der Einsatz von isolierten Alkoholdehydrogenasen für diese problematische Reaktion die besten Aussichten auf Erfolg verspricht.

Es ist das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen neuen, flexiblen Zugang zu optisch aktiven β,δ -Dihydroxyestern **1** zu schaffen. Dazu sollen in einem Screening Biokatalysatoren ausfindig gemacht werden, mit denen sich eine enantioselektive Reduktion von β,δ -Diketoestern **3** realisieren läßt. Insbesondere soll die Frage geklärt werden, ob auf diesem Wege optisch aktive δ -Hydroxy- β -ketoester **2** regioselektiv zugänglich sind (Abb. 1-14).

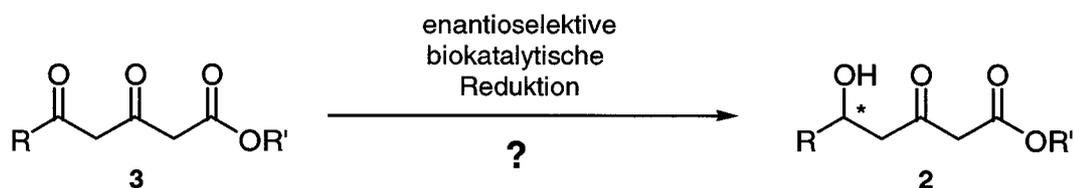


Abb. 1-14 Zentrale Fragestellung der Arbeit.

Durch eine Vergrößerung des Reaktionsmaßstabs und Verwendung der Produkte in der Synthese von Naturstoffen soll der präparative Nutzen der enzymatischen Reduktionen unter Beweis gestellt werden. Die Anwendungsbreite soll durch systematische Variation des β,δ -Diketoester-Substrats **3** nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es, von einem β,δ -Dihydroxyester **1** alle vier möglichen Stereoisomere selektiv darzustellen. Dabei soll der Schwerpunkt auf der Synthese von C-6-funktionalisierten *syn*- β,δ -Dihydroxyestern liegen, die aufgrund ihrer absoluten Konfiguration als mögliche Bausteine für Vastatine in Frage kommen.

2 Die Substrate: β,δ -Diketoester

2.1 Einleitung

Da β,δ -Diketoester nicht kommerziell erhältlich sind, war es anfangs notwendig, sich mit der Synthese dieser Substanzen zu befassen. Eine flexible Strategie zur Darstellung von β,δ -Diketoestern ist die C-Acylierung von β -Ketoester-Bisenolaten (Abb. 2-1).^[24, 25] Als Acylierungsreagenzien haben sich bei dieser Reaktion besonders *N*-Methoxy-*N*-methyamide bewährt (sogenannte Weinreb-Amide).^[26, 27] Bis(trimethylsilyl)enolate von β -Ketoestern lassen sich im gleichen Sinne mit Carbonsäurechloriden acylieren.^[28, 29] Beide Varianten gelingen auch mit verzweigten Bisenolaten.

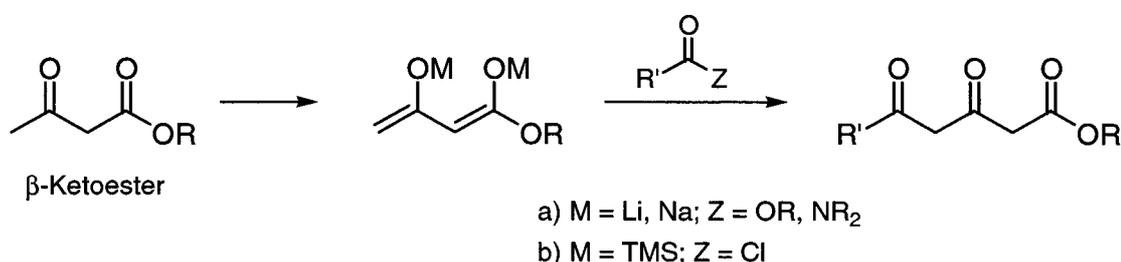


Abb. 2-1 β,δ -Diketoester durch C-Acylierung von Bisenolaten.

Ein konzeptionell anderer Zugang basiert auf der Acetoacetylierung von Meldrumsäure mit Diketen.^[30] Das resultierende Derivat **7** lässt sich in einem Schritt alkoholysieren und decarboxylieren, wobei auch sterisch gehinderte Alkohole wie zum Beispiel *tert*-Butanol eingesetzt werden können (Abb. 2-2).^[31]

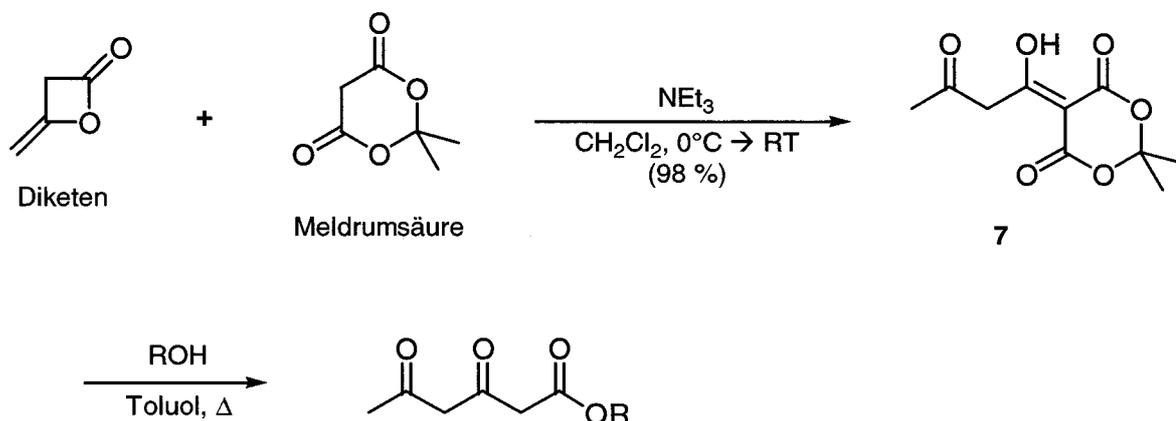


Abb. 2-2 Synthese von β,δ -Diketoestern aus Meldrumsäure und Diketen.

Nach BATELAAN wird kommerziell erhältliche Dehydracetsäure unter Einwirkung von Magnesiumalkoholaten in einer Eintopfreaktion deacetyliert und alkoholysiert. Die Methode ist auf die Magnesiumalkoholate primärer Alkohole beschränkt (Abb. 2-3).^[32]

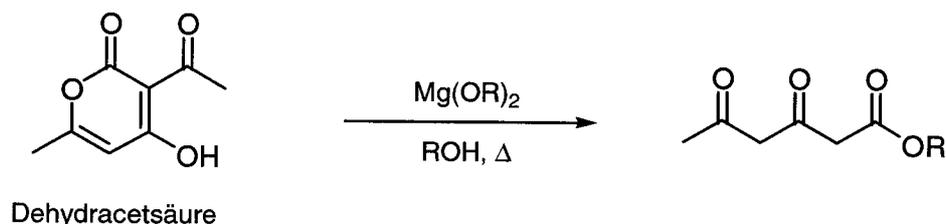


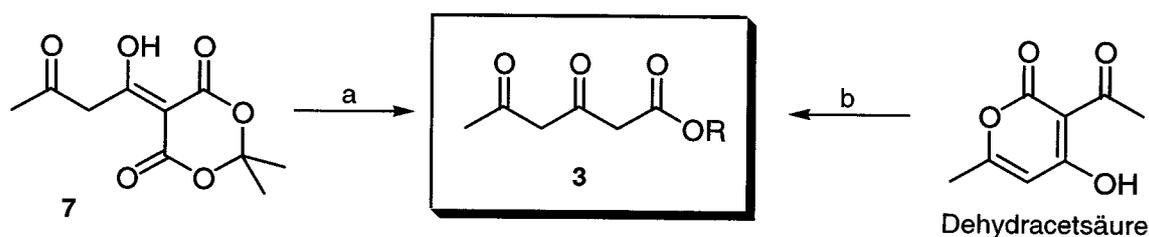
Abb. 2-3 Synthese von β,δ -Diketoestern aus Dehydracetsäure.

Eigene Ergebnisse und Diskussion

2.2 Synthese

Die unsubstituierten 3,5-Dioxohexansäureester **3a** und **3e** wurden nach BATELAAN aus Dehydracetsäure dargestellt,^[32] die Ester **3f-k** nach YUSTE et al. aus acetoacetylierter Meldrumsäure **7** (Tab. 2-1).^[31] Alle Produkte **3** wurden durch Kugelrohrdestillation und Säulenchromatographie an säuregewaschenem Kieselgel^[26a] gereinigt. Die Ester **3f** und **3h** wurden bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Tab. 2-1 Synthese der unsubstituierten 3,5-Dioxohexansäureester **3a** und **3e-k**.

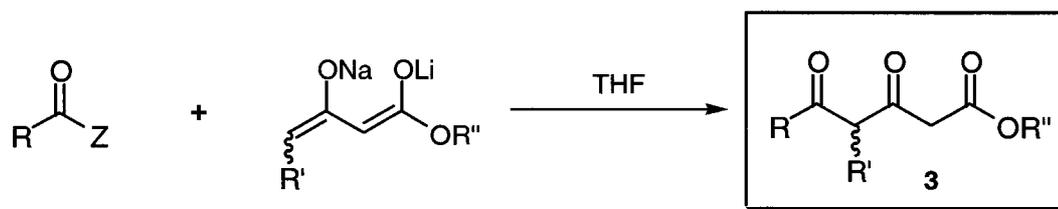


	R	Ausbeute (%)	Methode ^[a]		R	Ausbeute (%)	Methode ^[a]
3a	Me	69	b)	3h	Hex	52	a)
3e	Et	65	b)	3i	ⁱ Pr	51	a)
3f	ⁿ Pr	48	a)	3j	^t Bu	54	a)
3g	Allyl	48	a)	3k	Bn	51	a)

[a] a) ROH, Toluol, Δ ; b) $Mg(OR)_2$, ROH, Δ .

Aus Bisenolaten und Weinreb-Amiden bzw. α -Oxy-substituierten Estern wurden die β,δ -Diketoester **3l-y** synthetisiert (Tab. 2-2). Abgesehen von **3n**^[26b] und **3x**^[16b] handelt es sich um neue Verbindungen. Die Reaktionsbedingungen wurden von analogen literaturbekannten Synthesen übernommen und im Einzelfall aufgrund eigener Überlegungen modifiziert.

Tab. 2-2 Synthese der β,δ -Diketoester **3l-y** durch C-Acylierung von β -Ketoester-Bisenolaten.



	R	R'	R''	Z	T (°C)	Bisenolat (Äq.)	Ausbeute (%)
3l	Et	H	^t Bu	N(OMe)Me	-10 → RT	1.0	73
3m	ⁿ Pr	H	^t Bu	N(OMe)Me	-10 → RT	1.0	70
3n	(<i>E</i>)-PhCH=CHCH ₂	H	^t Bu	N(OMe)Me	-78 → -30	3.0	42
3o	Me	Me	^t Bu	N(OMe)Me	-10 → RT	1.0	62
3p	FCH ₂	H	^t Bu	OEt	-75 → -55	1.1 ^[a]	58
3q	ClCH ₂	H	^t Bu	N(OMe)Me	-75 → -30	1.0	58
3r	Cl ₂ CH	H	^t Bu	N(OMe)Me	-75 → -30	1.1	61
3s	HOCH ₂	H	^t Bu	OEt	-75 → RT	4.0	44
3t	MeOCH ₂	H	^t Bu	OMe	-75 → 0	2.0	79
3u	MeOCH ₂	H	Me	OMe	-75 → 0	2.0	25
3v	PhOCH ₂	H	Me	OMe	-15 → 0	2.5	54
3w	BnOCH ₂	H	^t Bu	OMe	-75 → 0	1.5	46
3x ^[b]	BnOCH ₂	H	Me	OMe	-75 → 0	1.5	34
3y	(MeO) ₂ CH	H	^t Bu	OMe	-75 → 0	1.5	68

[a] Das Li,Li-Bisenolat wurde verwendet und TMEDA als Additiv zugesetzt.^[25c] — [b] Diese Verbindung (= **3c**) erhält an dieser Stelle der Übersichtlichkeit halber eine neue Nummerierung.

Die Produkte wurden hauptsächlich durch Säulenchromatographie an säuregewaschenem Kieselgel gereinigt. Kugelrohrdestillation führte in den meisten Fällen zu signifikanten Verlusten durch Verharzung. Bei der Reinigung wurde verstärkt auf eine vollständige Abtrennung der Edukte geachtet, da β -Ketoester gute Substrate für viele Alkoholdehydrogenasen sind. Kontaminationen mit diesen Verbindungen hätten somit die photometrischen Enzymaktivitäts-Assays verfälschen können.

Gemäß NMR-Analyse liegen die β,δ -Diketoester **3** in CDCl_3 -Lösung zu 80-90 % enolisiert vor; **3n** ist vollständig enolisiert (CDCl_3 , 20°C). Bei dem γ -Methylderivat **3o** treten neben der Diketoform zwei Enol-Tautomere auf. Im Fall des hydroxylierten β,δ -Diketoesters **3s** werden die NMR-Spektren zusätzlich zur Keto-Enol-Tautomerie durch das Auftreten einer cyclischen Halbketalform kompliziert (Abb. 2-4). Die Halbketalform kann hier durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der tertiären Hydroxylgruppe und der Estergruppe stabilisiert werden. Dieses Verhalten ist von den homologen 7-Hydroxy-3,5-dioxocarbonsäureestern bekannt.^[33]

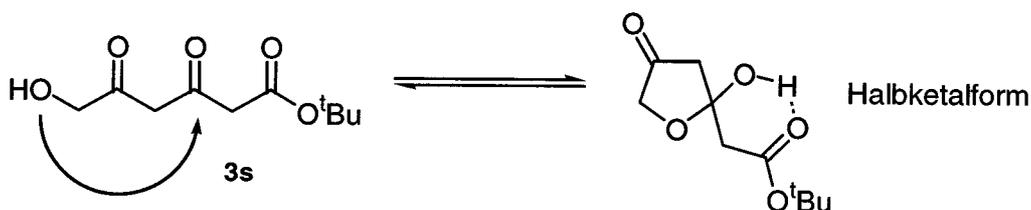


Abb. 2-4 Reversible Halbketalbildung des β,δ -Diketoesters **3s**.

Charakteristisch für die Massenspektren (EI, 70 eV) der hier beschriebenen β,δ -Diketoester **3** ist eine α -Spaltung der $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ -Bindung. Der Molekülpeak $[M]^+$ der β,δ -Diketoester **3j** und **3l-y** fällt unter den angewendeten Ionisierungsbedingungen extrem intensitätsschwach aus, da die *tert*-Butylgruppe und die terminalen Heteroatomsubstituenten Fragmentierungen begünstigen.

2.3 Scale-up

Der chlorierte β,δ -Diketoester **3q** wurde im Verlauf der Untersuchungen im Hektogramm-Maßstab benötigt. Die Synthese über das Weinreb-Amid der Chloressigsäure (siehe Tab. 2-2) wurde aufgrund des hohen Preises dieser Verbindung nicht in Betracht gezogen. Stattdessen sollte das Amid durch den erheblich preisgünstigeren Chloressigsäuremethylester ersetzt werden. Die Prozedur nach HUCKIN und WEILER, bei der mit unsubstituierten Carbonsäureestern unter Anwendung einer besonderen Reaktionsführung acyliert wird (alternierende Zugabe von Base und Ester),^[25a,b] resultierte in diesem Fall jedoch in einem komplexen Produktgemisch. YAMAGUCHI et al. beschreiben die Darstellung von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäuremethylester durch C-Acylierung von Methylacetoacetat-Na,Li-Bisenolat mit Chloressigsäuremethylester in Anwesenheit von Bortrifluorid (43 % Ausbeute).^[25f] Gemäß Vorschrift wird ein dreifacher Überschuß des Bisenolats benötigt. Dieses Vorgehen ist daher im größeren Maßstab nicht praktikabel. Parallel zu den eigenen Untersuchungen wurde interessanterweise von LANGER et al. berichtet, daß die C-Acylierung von Ethylacetoacetat-Bisenolat weder mit Chloressigsäureethylester noch mit dem entsprechenden Weinreb-Amid möglich sei.^[29]

Tatsächlich verläuft die Reaktion zwischen Bisenolat **13** und Chloressigsäuremethylester problemlos, wenn letzterer bei maximal -65°C bis -60°C zu einer Lösung von **13** in THF gegeben wird (Abb. 2-5).

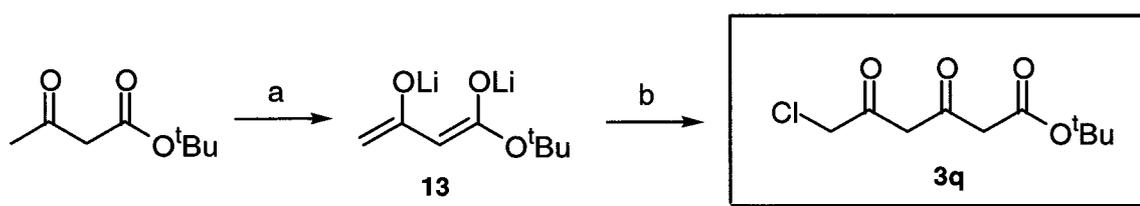


Abb. 2-5 Synthese des β,δ -Diketoesters **3q**. — a) 1. LiH, THF, Δ , 30 min; 2. *n*-BuLi, 0°C , 15 min. — b) 1. ClCH2COOMe (1.0 Äq.), -60°C , 45 min; 2. aq. HCl (74 %).

Die Reaktion wurde mehrmals im Hektogramm-Maßstab durchgeführt. Obwohl kein Bisenolat-Überschuß eingesetzt wird, liegt der Umsatz gemäß $^1\text{H-NMR}$ -Analyse des Rohprodukts bei über 90 %. Das Produkt **3q** läßt sich durch eine Hochvakuum-Fallfilmdestillation reinigen, jedoch kommt es dabei zu starken Verlusten durch Zersetzung, so daß die isolierte Ausbeute auf 52 % sinkt. Für die enzymatischen Umsetzungen im Dekagramm-Maßstab wurde daher das Rohprodukt verwendet (nach Abtrennung der nicht abreagierten Edukte im Vakuum).

Die Destillationssümpfe der Fallfilmdestillation enthalten erhebliche Mengen einer Verbindung, deren NMR- und MS-Analyse mit den Aromaten **14** bzw. **14'** in Einklang stehen. Dieser Aromat entsteht offensichtlich während der Destillation aus zwei Molekülen **3q** durch doppelte Kondensation (Abb. 2-6).

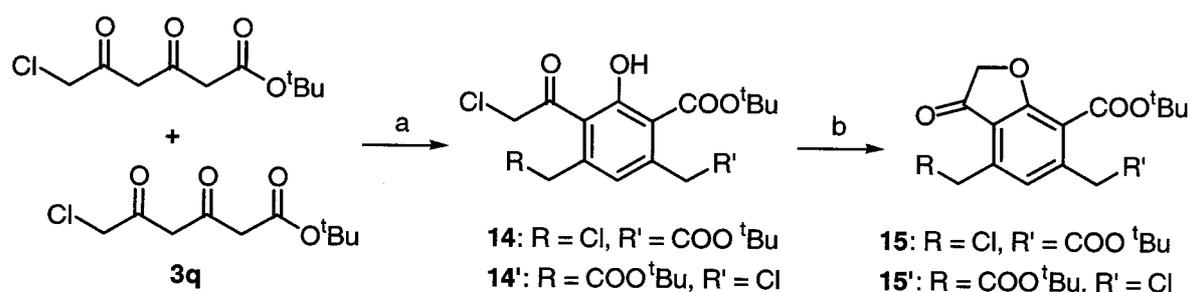


Abb. 2-6 Nebenproduktbildung bei Synthese und Destillation des β,δ -Diketoesters **3q**. — a) $-2\text{H}_2\text{O}$. — b) $-\text{HCl}$.

Eine ähnliche Verbindung tritt bei der Synthese als Nebenprodukt auf, wenn höhere Bisenolatkonzentrationen angewendet werden [$c(\mathbf{13}) > 0.5\text{ M}$]. Aufgrund der NMR- und MS-Daten ist diesem Kondensationsprodukt, das auch aus **14** bzw. **14'** durch Behandeln mit DBU generiert werden kann, die Struktur des Benzofuranons **15** bzw. **15'** zuzuweisen (Abb. 2-6). Das exakte Substitutionsmuster wurde nicht ermittelt.

Die Acylierungsreaktion ist unabhängig von den verwendeten Basen. Sowohl das Na,Li-Bisenolat (erzeugt mit NaH/*n*-BuLi) als auch das Li,Li-Bisenolat (erzeugt mit LDA oder LiH/*n*-BuLi) geben die Reaktion. Höhere Reaktionstemperaturen resultieren hingegen in einem komplexen Produktgemisch. Interessanterweise wurden bei Versuchen, das Bisenolat **13** unter identischen Bedingungen mit Buttersäure- und Propionsäuremethylester umzusetzen, die β,δ -Diketoester **3m** und **3l** in weniger als 25 % Ausbeute erhalten. Die Rohprodukte waren in diesem Fall mit erheblichen Mengen nicht umgesetztem *tert*-Butylacetoacetat kontaminiert.

Weinreb-Amide sind Carbonsäureestern in der C-Acylierung von Carbanionen prinzipiell überlegen.^[27] Die Ursache hierfür ist hauptsächlich einem stabilisierenden Effekt der N-Methoxygruppe auf das tetraedrale Additionsintermediat zuzuschreiben. So wird beispielsweise bei der C-Acylierung von Alkalimetall-Enolaten mit Weinreb-Amiden das β -Dicarbonylprodukt erst bei der wäßrigen Aufarbeitung freigesetzt, wodurch Überaddition und unerwünschter Protonentransfer vom C-H-aciden Produkt zum Enolat-Edukt verhindert werden (Abb. 2-7). Letztgenanntes Problem tritt bei der C-Acylierung von Enolaten mit Estern häufig auf und muß für gewöhnlich durch den Einsatz eines hohen Enolat- oder Basen-Überschusses umgangen werden.^[34]

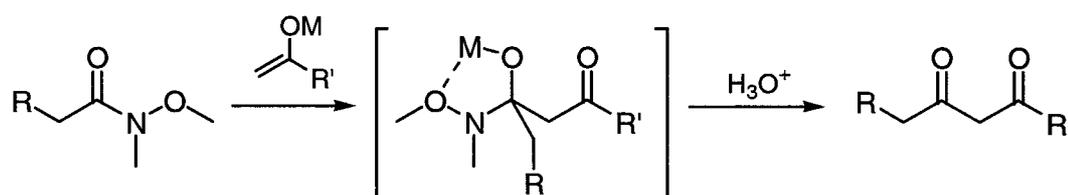


Abb. 2-7 Mechanismus der C-Acylierung von Enolaten mit Weinreb-Amiden.

Bei der Acylierung von Alkyllithium- und Grignard-Verbindungen mit α -Oxy-substituierten Amiden übernimmt der α -ständige Sauerstoff die stabilisierende Funktion. Auf den Einsatz von Weinreb-Amiden kann in diesen Fällen verzichtet werden.^[35] Vermutlich ist bei den Synthesen der Oxy-substituierten β,δ -Diketoester **3s-y** ein ähnlicher Mechanismus wirksam (Abb. 2-8).

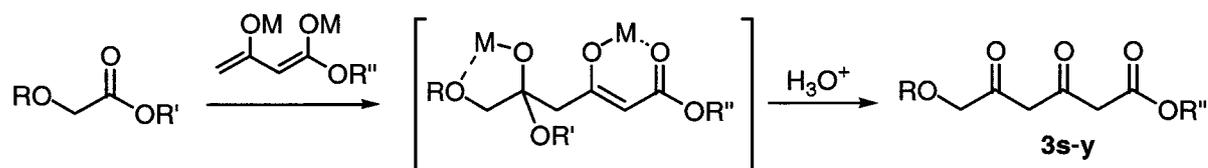


Abb. 2-8 Postulierter Mechanismus der C-Acylierung von Bisenolaten mit α -Oxy-substituierten Estern.

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen, kann auch mit Chloressigsäuremethylester ein β -Ketoester-Bisenolat bei hohem Umsatz acyliert werden, ohne daß ein Bisenolat-Überschuß eingesetzt werden muß. Notwendig ist bei der hier beschriebenen Reaktionsführung allerdings eine strenge Kontrolle der Reaktionstemperatur. Aufgrund dieses Befundes ist ein schwacher stabilisierender Effekt des α -Chlorsubstituenten auf das tetraedrale Additionsintermediat denkbar, wie er für α -Oxy-Substituenten geschildert wurde (Abb. 2-9).

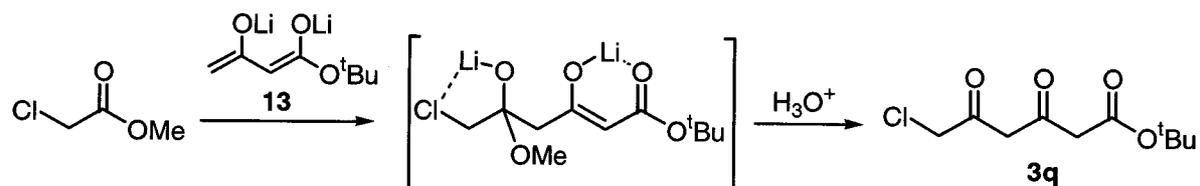


Abb. 2-9 Postulierter Mechanismus der C-Acylierung eines Bisenolats mit Chloressigsäuremethylester.

Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß die Acylierung mit Buttersäure- und Propionsäuremethylester, die keinen koordinierenden α -ständigen Heteroatomsubstituenten tragen, unter identischen Bedingungen einen schlechten Umsatz gibt (siehe oben). Hier kommt es vermutlich zu einem vorzeitigen Zerfall des Additionsintermediats, so daß das Bisenolat **13** durch den sich bildenden C-H-aciden β,δ -Diketoester neutralisiert wird.

Die Hektogramm-Synthese des β,δ -Diketoesters **3q** kann problemlos unter Verwendung von Standardapparaturen durchgeführt werden (2 L Kolben, Kühlung mit Trockeneis). Eine weitere Maßstabsvergrößerung sollte ebenfalls möglich sein. Das Rohprodukt fällt nach Abdestillieren flüchtiger Komponenten mit einer Reinheit von ca. 90 % an ($^1\text{H-NMR}$ -Analyse; Benzofuranon **15/15'** als Hauptverunreinigung).

2.4 Untersuchungen zur Stabilität von β,δ -Diketoestern

β,δ -Diketoester sind multifunktionelle Moleküle mit alternierenden elektrophilen und nucleophilen Zentren. Die von den β -Polyketoverbindungen bekannte Instabilität dieser Anordnung macht sich bei β,δ -Diketoestern bereits bemerkbar.^[36] So berichten CHAN und STÖSSEL von einer intermolekularen Selbstkondensation des 3,5-Dioxohexansäuremethylesters **3a** bei dessen Lagerung im verunreinigten Zustand.^[37] WEILER et al. und auch BATELAAN weisen auf Zersetzung dieser Verbindung bei Destillation hin.^[25a, 32a] ϵ -Halogen-substituierte β,δ -Diketoester cyclisieren in Anwesenheit von Base durch intramolekulare Alkylierung zu Furanonen, wie YAMAGUCHI et al. und später auch LANGER et al. gezeigt haben.^[25f, 29] In erstgenannter Arbeit wird außerdem über den Einfluß des pH-Werts auf die Selbstkondensation (Aromatisierung) verbrückter β,δ -Diketoester berichtet. Bemerkenswerterweise findet diese Reaktion bevorzugt im neutralen Milieu in Anwesenheit zweiwertiger Metallkationen statt. Es war daher notwendig, die Stabilität von β,δ -Diketoestern unter den Bedingungen einer enzymatischen Reduktion zu ermitteln. Dazu wurde der Einfluß von Phosphat-Puffer auf die 3,5-Dioxohexansäureester **3a**, **3e**, **3j** und **3q** in Anwesenheit von 2-Propanol und Magnesiumchlorid untersucht.

Gepufferte wäßrige Lösungen von 3,5-Dioxohexansäureestern wurden bei Raumtemperatur gerührt und Proben der Lösungen mit Dichlormethan extrahiert. Wie die GC-MS-Analyse der Extrakte zeigte, kondensieren der Methylester **3a** und der Ethylester **3e** unter diesen Bedingungen zu Gemischen der aromatischen Produkte **16/16'** bzw. **17/17'** (Abb. 2-10).

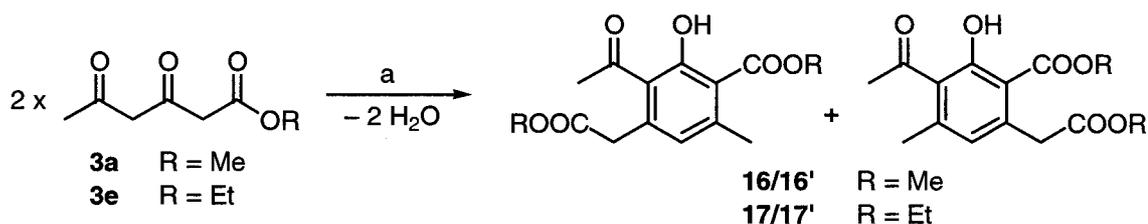
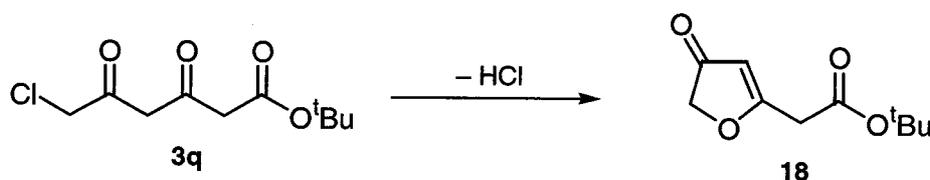


Abb. 2-10 Kondensation der β,δ -Diketoester **3a** und **3e** in Natriumphosphat-Puffer. — a) **3a** bzw. **3e** (10 mM), Puffer (100 mM, pH 7.2), 2-Propanol (100 mM), MgCl_2 (1.0 mM), RT.

Nach 53 h sind auf diese Weise 76 % des Methylesters **3a** und 27 % des Ethylesters **3e** abreagiert, während der *tert*-Butylester **3j** unverändert bleibt. Offensichtlich behindert die sperrige *tert*-Butylgruppe eine gegenseitige Annäherung zweier Moleküle **3j**.

Der chlorierte β,δ -Diketoester **3q** bildet höchstwahrscheinlich aus demselben Grund in gepufferter wäßriger Lösung ebenfalls kein aromatisches Kondensationsprodukt. Diese Verbindung cyclisiert jedoch bei pH 6.5 unter dem Einfluß des Puffers durch intramolekulare Alkylierung in weniger als 12 h vollständig zum Furanon **18** (Tab. 2-3, Nr. 1). Die Reaktion kann präparativ durchgeführt werden und verläuft gemäß $^1\text{H-NMR}$ -Analyse des Rohprodukts **18** nahezu nebenproduktfrei.

Tab. 2-3 Intramolekulare Cyclisierung des β,δ -Diketoesters **3q** in gepufferter wäßriger Lösung.



Nr.	$c(\mathbf{3q})$ (mM)	Puffer ^[a]	pH	$c(\text{MgCl}_2)$ (mM)	t (h)	Umsatz ^[b] (%)
1	20	A	6.5	1	12	100
2	20	B	5.5	1	12	84
3	20	B	5.5	20	12	81
4	10	(H ₂ O)	ca. 4	30	23	5

[a] A: Natriumphosphat-Puffer (250 mM); B: Phosphat-Citrat-Puffer: Dinatriumhydrogenphosphat (250 mM) + Zitronensäure (125 mM); $c(2\text{-Propanol})$: 150 mM. — [b] Umsatz bei Raumtemperatur ($^1\text{H-NMR}$ -Analyse).

Durch Verringerung des pH-Werts auf pH 5.5 läßt sich die Cyclisierung zurückdrängen; von der Magnesiumionen-Konzentration geht dabei kein signifikanter Einfluß aus (Tab. 2-3, Nr. 2-3). In Abwesenheit von Puffersubstanzen beträgt der pH-Wert einer zehn millimolaren Lösung des β,δ -Diketoesters **3q** ca. pH 4. Unter diesen Bedingungen bleibt die Bildung des Furanons **18** fast vollständig aus (Tab. 2-3, Nr. 4).

Wie die Untersuchungen zeigen, neigen β,δ -Diketoester unter den typischen Bedingungen einer enzymatischen Reduktion zu Zersetzung. In gepufferter wäßriger Lösung wird eine Selbstkondensation begünstigt, die sich durch Anwendung einer sperrigen Estergruppe jedoch effektiv verhindern läßt. Im Fall des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** müssen zur Vermeidung nichtenzymatischer Nebenreaktionen weiterführende Maßnahmen getroffen werden. Eine Absenkung des pH-Werts wirkt der intramolekularen Alkylierung dieser Verbindung entgegen, wobei jedoch im Einzelfall zu prüfen ist, inwiefern diese Maßnahme mit einem potentiellen Biokatalysator kompatibel ist.

3 Der Schlüsselschritt: Enzymatische Reduktion

3.1 Reduktion mit *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase (recLBADH)

Einleitung

NAD(P)-abhängige Alkoholdehydrogenasen (EC 1.1.1.) finden zunehmend Anwendung in der enantioselektiven Ketonreduktion.^[38, 39] Diese Biokatalysatoren sind in der Regel hoch chemo-, regio- und enantioselektiv und gestatten Umsetzungen mit hohen Geschwindigkeiten sowie hohen maximalen Zykluszahlen (total turnover numbers, TTN) bei sehr milden Bedingungen (20-40°C, pH 5-8, Normaldruck). Unerwünschte Nebenreaktionen labiler Substrate und Schutzgruppentechniken können so umgangen werden. Unter ökologischen Gesichtspunkten ist hervorzuheben, daß Alkoholdehydrogenasen biologisch leicht abbaubar und durch Fermentation aus erneuerbaren Ressourcen zugänglich sind. Für die Coenzym-Regenerierung wurden in der Vergangenheit effektive Verfahren entwickelt, so daß diese Substanzen in substöchiometrischen Mengen eingesetzt werden können.^[40] Der Fortschritt in der Reaktions-technik enzymatischer Prozesse hat bereits zu einem industriellen Syntheseverfahren geführt, das auf einer reduktiven Aminierung mit einer NAD-abhängigen Dehydrogenase beruht [(S)-tert-Leucin-Synthese, DEGUSSA].^[41]

Die Anzahl bekannter Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen, die ein breites Spektrum auch unnatürlicher Substrate umzusetzen im Stande sind, hat sich in den vergangenen Jahren erhöht.^[42] Durch die Entwicklung gentechnischer Methoden werden diese Enzyme zunehmend leichter zugänglich. RIEBEL isolierte 1996 eine neue NADP-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LBADH, EC 1.1.1.2).^[43] Das Enzym – ein magnesiumhaltiges Tetramer mit einer relativen molaren Masse von ca. 105 kDa – zeigt starke Homologie zu einer bekannten Alkoholdehydrogenase aus *L. kefir* (LKADH, EC 1.1.1.2),^[42-44] ist aber unter zellfreien Bedingungen stabiler als diese, so daß sich LBADH besonders gut für präparative Umsetzungen eignet. Beide Enzyme sind mittlerweile kommerziell erhältlich.^[45] Nach Klonierung konnte LBADH in *Escherichia coli* effektiv überproduziert werden (recLBADH); aus einer 10 L Fermentation wurden so 650 kU recLBADH gewonnen.^[43] Für präparative Anwendungen bietet sich die Verwendung eines leicht herstellbaren Zellrohextrakts an.

Das Enzym LKADH gehört zu den wenigen bisher charakterisierten Alkoholdehydrogenasen mit (*R*)-Selektivität.^[38d, 42] Durch Markierungsexperimente konnte gezeigt werden, daß LKADH das *pro*-(4*R*)-Hydrid des Coenzym NADPH überträgt.^[44] Da bei der Reaktion (*R*)-konfigurierte Alkohole erhalten werden, muß der Hydridtransfer aus Richtung der *Si*-Seite der prostereogenen Carbonylgruppe erfolgen (Abb. 3-1).

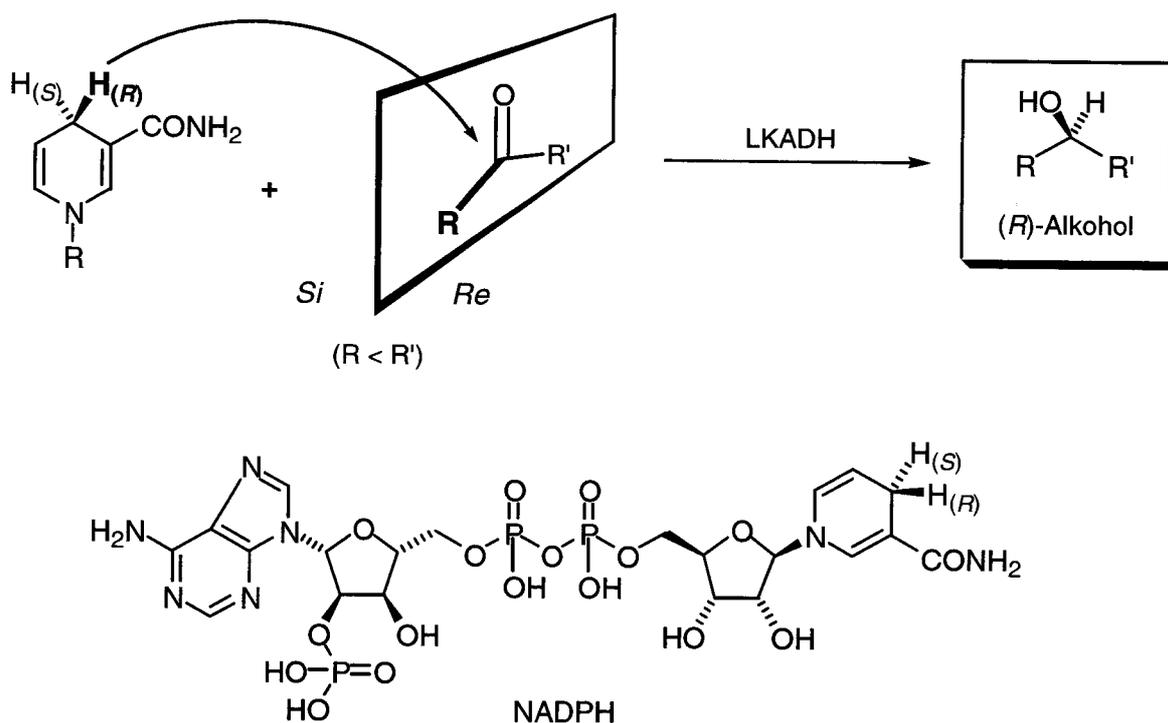


Abb. 3-1 Stereochemische Aspekte der Ketonreduktion mit LKADH und Struktur von NADPH.

Aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft zwischen LBADH und LKADH sollte sich der stereochemische Verlauf des Hydridtransfers bei beiden Enzymen gleichen.^[46] Tatsächlich werden auch mit LBADH (*R*)-konfigurierte Alkohole erhalten.^[43]

Ein wichtiger Aspekt mit Blick auf präparative Anwendungen ist die Fähigkeit beider Enzyme, durch Oxidation von 2-Propanol effektiv NADPH regenerieren zu können (Substratgekoppelte Coenzym-Regenerierung). Der Alkohol 2-Propanol ist eine überaus billige und leicht handhabbare Hydridquelle und erhöht gleichzeitig die Löslichkeit lipophiler Substrate im wässrigen Reaktionsmedium. Ein zweites Enzym zur Cofaktor-Regenerierung ist nicht notwendig, wodurch sich die Reaktionsführung sehr einfach gestaltet.

Eigene Ergebnisse und Diskussion

Photometrische Enzymassays

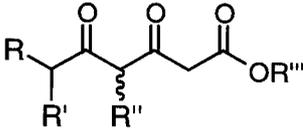
In einem photometrischen Aktivitätstest wurde der NAD(P)H-Verbrauch verschiedener Alkoholdehydrogenasen in Anwesenheit der β,δ -Diketoester **3j** und **3q** bestimmt. Alkoholdehydrogenasen^[38d, 42] aus *Saccharomyces cerevisiae* (YADH, EC 1.1.1.1), *Thermoanaerobium brockii* (TBADH, EC 1.1.1.2), *Rhodococcus erythropolis* (READH, EC 1.1.1.1)^[43] und Pferdeleber (HLADH, EC 1.1.1.1) sowie eine Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR, EC 1.1.1.1)^[47] zeigten in den photometrischen Tests keine Aktivität. Im Gegensatz dazu kam es mit recLBADH (Zellrohextrakt) zu einem deutlichen Verbrauch des reduzierten Coenzym, woraufhin das Substratspektrum dieses Enzyms systematisch untersucht wurde (Tab. 3-1).

Unsubstituierte 3,5-Dioxohexansäureester werden von recLBADH mit guter Aktivität umgesetzt (Nr. 1-8). Der Einfluß der Estergruppe auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist dabei gering; für 3,5-Dioxohexansäureester mit lipophiler Estergruppe besteht eine leichte Präferenz. Der Einbruch im Fall des Hexylesters **3h** (Nr. 5) ist vermutlich auf die sehr geringe Löslichkeit dieser Verbindung zurückzuführen.

Bei Verlängerung der Kohlenstoffkette in Position C-6 nimmt die Enzymaktivität rapide ab (Nr. 9-11). So wird der 3,5-Dioxoheptansäureester **3l** (Nr. 9) bereits nur noch mit einem Fünftel der Geschwindigkeit reduziert, die für den um eine Methylengruppe kürzeren 3,5-Dioxohexansäureester **3j** (Nr. 7) ermittelt wurde. Durch Verlängerung um eine weitere Methylengruppe wird die Aktivität abermals gefünftelt (Nr. 10). Eine Verzweigung in Position C-4 (**3o**) wird von dem Enzym hingegen toleriert (Nr. 12).

Die halogenierten β,δ -Diketoester **3p** und **3q** werden von recLBADH ebenfalls mit guter Aktivität umgesetzt (Nr. 13-14). Der doppelt chlorierte β,δ -Diketoester **3r** ist demgegenüber kein Substrat (Nr. 15). Auch Alkoxy-Substituenten in Position C-6 werden von dem Enzym nicht akzeptiert (Nr. 17-22). Für den hydroxylierten β,δ -Diketoester **3s** besteht wiederum eine geringe Aktivität (Nr. 16).

Tab. 3-1 Relative Aktivität der recLBADH für β,δ -Diketoester (Photometer-Test, 340 nm).

Nr.	Substrat					<i>c</i> (mM)	relative Aktivität (%)
		R	R'	R''	R'''		
1	3a	H	H	H	Me	10	64
2	3e	H	H	H	Et	10	74
3	3f	H	H	H	ⁿ Pr	10	99
4	3g	H	H	H	Allyl	10	93
5	3h	H	H	H	Hex	0.5 ^[a]	54
6	3i	H	H	H	ⁱ Pr	10	69
7	3j	H	H	H	^t Bu	10	86
8	3k	H	H	H	Bn	2	106
9	3l	Me	H	H	^t Bu	10 ^[a]	18
10	3m	Et	H	H	^t Bu	10 ^[a]	4
11	3n	(<i>E</i>)-PhCH=		H	^t Bu	0.5 ^[a]	0
12	3o	H	H	Me	^t Bu	10	70
13	3p	F	H	H	^t Bu	10	92
14	3q	Cl	H	H	^t Bu	2 ^[b]	77
15	3r	Cl	Cl	H	^t Bu	0.5 ^[b]	0
16	3s	HO	H	H	^t Bu	5 ^[b]	11
17	3t	MeO	H	H	^t Bu	10	0
18	3u	MeO	H	H	Me	10	0
19	3v	PhO	H	H	Me	2	0
20	3w	BnO	H	H	^t Bu	0.5 ^[a]	0
21	3x	BnO	H	H	Me	5	0
22	3y	MeO	MeO	H	^t Bu	10	0
23	Acetophenon (Standard-Substrat)					10	100 ^[c]

[a] Substrat nicht vollständig gelöst. — [b] Höhere Substratkonzentrationen stören den Assay durch Absorption bei 340 nm. — [c] 100 % = 1.1 kU·mL⁻¹ (Zellrohextrakt).

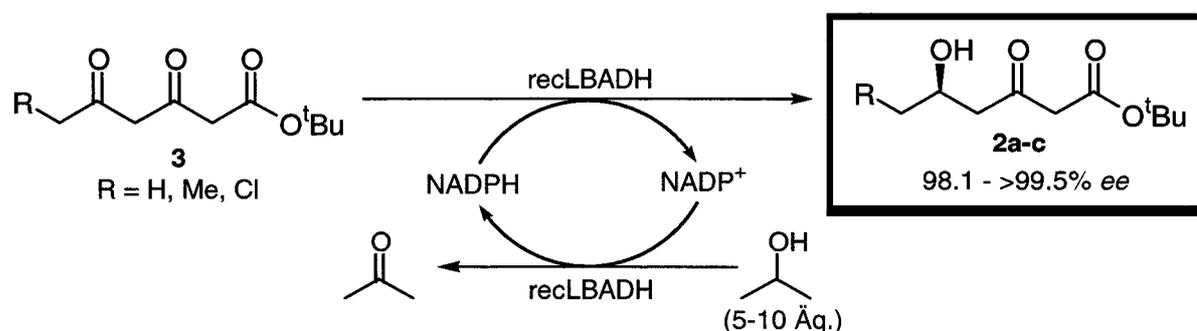
Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß recLBADH β,δ -Diketoester mit sterisch wenig anspruchsvollen Substituenten in Position C-6 bevorzugt. Variationen in der β -Ketoester-Substruktur zeigen demgegenüber kaum Auswirkung auf die Enzymaktivität. Da die Struktur eines ternären Enzym-Coenzym-Substrat-Komplexes mit recLBADH noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt wurde, kann an dieser Stelle keine mechanistische Deutung auf molekularer Ebene erfolgen.

Präparative Umsetzungen

Mit Umsetzungen im präparativen Maßstab (1-10 mmol) wurde die enzymatische Reduktion näher untersucht. Dazu wurden Lösungen bzw. Emulsionen der β,δ -Diketoester **3j**, **3l** und **3q** in Puffer mit einem fünf- bis zehnfachen Überschuß 2-Propanol als Hydridquelle sowie katalytischen Mengen NADP und recLBADH versetzt und bei Raumtemperatur gerührt, bis sich durch GC-MS-Analyse kein weiterer Reaktionsfortschritt mehr erkennen ließ. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend isoliert und charakterisiert (Tab. 3-2).

Die β,δ -Diketoester **3j**, **3l** und **3q** werden durch recLBADH hoch regio- und enantioselektiv in δ -Position zu den δ -Hydroxy- β -ketoestern **2a-c** reduziert. In den Rohprodukten konnten weder mit NMR noch mit GC-MS Regioisomere oder Doppelreduktionsprodukte detektiert werden.

Tab. 3-2 Enantio- und regioselektive Reduktion von β,δ -Diketoestern mit recLBADH.



R	$ee^{[a]}$ (%)	$[\alpha]_D^{25}$	Lit. $[\alpha]_D$ (% ee)	Ausb. (%)	ADH (U·mL ⁻¹)	NADP [mM (mol%)]	$c(\mathbf{3})$ (mM)	pH	t (h)	
(<i>R</i>)- 2a	H	99.4	-40.1	-39.6 (99) ^[48a]	77	0.6	0.10 (0.3)	30	7.0	24
(<i>R</i>)- 2b	Me	98.1	-36.0	-35.6 (99) ^[48b]	61	4.4	1.25 (6.3)	20 ^[b]	6.5	96
(<i>S</i>)- 2c ^[c]	Cl	>99.5	-24.9	-23.0 (>97)	72	2.6	0.20 (1.0)	20 ^[b]	5.5	14

[a] Bestimmt auf Stufe der α,β -ungesättigten δ -Lactone **19a-c** durch CSP-HPLC (siehe S. 31). — [b] Substrat nicht vollständig gelöst. — [c] Deskriptorwechsel aufgrund des Chlor-Substituenten.

Treibende Kraft der Reaktion ist vermutlich der 2-Propanol-Überschuß. In allen drei Fällen konnte innerhalb von 14-96 h gemäß ¹H-NMR-Analyse der Rohprodukte ein Umsatz von über 90 % erzielt werden. Die Produkte **2a-c** fielen nach Säulenchromatographie an Kieselgel analysenrein in 61-77 % Ausbeute an. Ein Vergleich der analytischen Daten (NMR, Drehwert) mit Literaturwerten bestätigt die getroffene Strukturzuordnung (Tab. 3-2). Im Fall des

chlorierten δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**2c** erfolgt der Vergleich anhand einer authentischen Probe, die auf unabhängigem Wege synthetisiert wurde. Dazu wurde nach THOTTATHIL et al. *tert*-Butylacetat-Lithiumenolat mit kommerziell erhältlichem (*S*)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester acyliert ($>97\%$ ee, Abb. 3-2).^[13k] Die analytischen Daten des so erhaltenen δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**2c** sind in Übereinstimmung mit den Daten des enzymatischen Produkts (*S*)-**2c**.

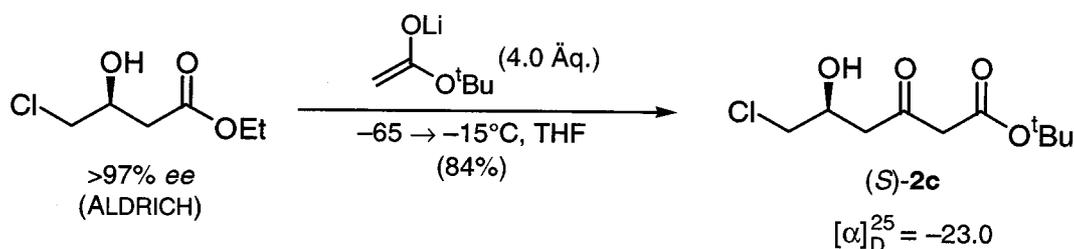


Abb. 3-2 Synthese einer authentischen Probe des δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**2c**.

Der chlorierte β,δ -Diketoester **3q** wurde bei pH 5.5 umgesetzt, da sich in einem Vorversuch gezeigt hatte, daß bereits bei pH 6.5 neben dem enzymatischen Produkt (*S*)-**2c** in nahezu äquimolarer Menge das Furanon **18** gebildet wird (siehe Seite 20). In ungepufferter wäßriger Lösung (pH 4) bleibt diese intramolekulare Alkylierung aus, jedoch konnte hier mit recLBADH kein nennenswerter Umsatz erzielt werden, so daß ein Kompromiß zwischen Enzymaktivität einerseits und Substratstabilität andererseits geschlossen werden mußte. Nach RIEBEL weist recLBADH für die Reduktion von Acetophenon bei pH 6.5 ein Aktivitätsmaximum auf. Bei pH 5.5 beträgt die Enzymaktivität 54 % des Maximalwerts. Für die Oxidationsreaktion, die hier die wichtige Funktion der Coenzym-Regenerierung erfüllt, wurden bei pH 5.5 noch 30 % der maximalen Aktivität gemessen.^[43] Die pH-bedingten Aktivitätseinbußen bei der Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** wurden daher durch eine erhöhte Enzymkonzentration ausgeglichen (Tab. 3-2). Unter diesen Bedingungen beträgt der Anteil des Furanons **18** am Rohprodukt 10 mol% (¹H-NMR-Analyse).

Mit den δ -Hydroxy- β -ketoestern (*R*)-**2a** und (*S*)-**2c** wurden photometrische Enzymaktivitätstest durchgeführt. Dabei konnte in Anwesenheit von recLBADH kein NADPH-Verbrauch detektiert werden. Hinsichtlich einer Reduktion der β -Ketogruppe sind diese Verbindungen demnach keine Substrate für das Enzym. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Beobachtung, daß bei der enzymatischen Reduktion keine Doppelreduktionsprodukte gebildet werden.

Die enzymatischen Produkte (*R*)-**2a** und (*R*)-**2b** sind bekannte chirale Intermediate aus verschiedenen Naturstoffsynthesen (Abb. 3-3). So berichten beispielsweise TABUCHI et al. über die Verwendung des δ -Hydroxy- β -ketoesters (*R*)-**2a** in der Totalsynthese eines Phyttoxins aus *Alternaria solani*.^[49] In der Arbeitsgruppe um JACOT-GUILLARMOD wurden aus (*R*)-**2a** und (*R*)-**2b** bicyclische Pheromone synthetisiert.^[48] Für eine Totalsynthese des monomeren Prä-anthrachinons (*R*)-*semi*-Vioxanthin wurde das enzymatische Produkt (*R*)-**2a** innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.^[50]

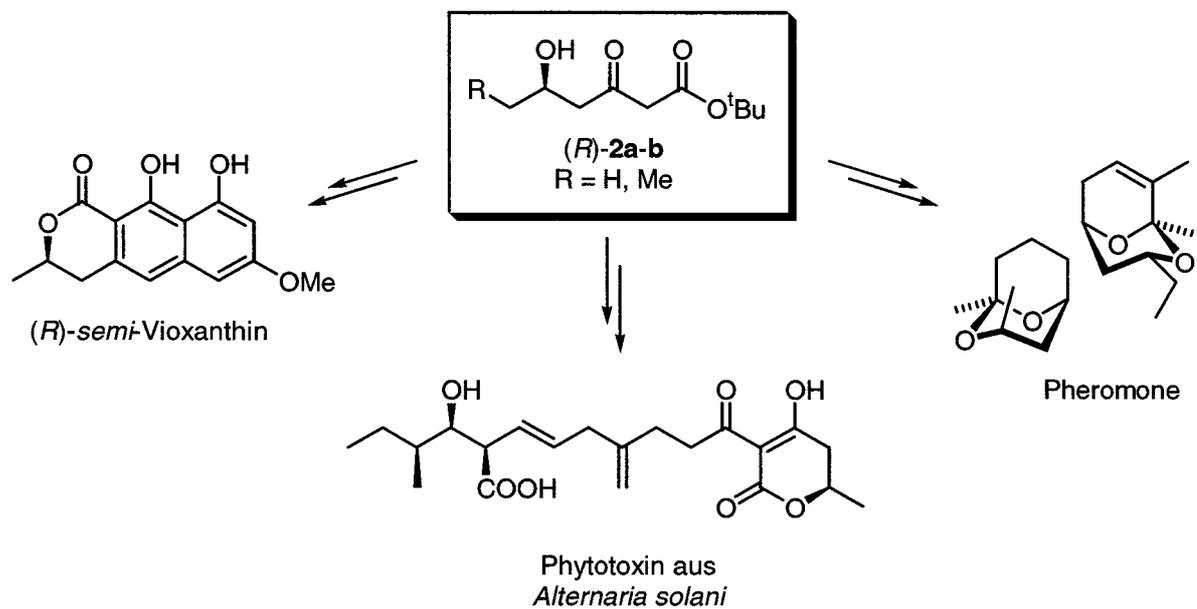


Abb. 3-3 Verwendung der δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2a** und (*R*)-**2b** in Naturstoffsynthesen.

Bei dem chlorierten δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** handelt es sich um einen universellen Baustein für HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren des Mevinsäuretyps, worauf in Kapitel 4 näher eingegangen wird.

Scale-up (Fed-Batch)

Die enzymatische Reduktion des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** wurde in einen 8 L-Maßstab übertragen. Als Reaktionsgefäß diente eine Glasflasche, die mit einem Flügelrührer versehen war (Abb. 3-4). Das Substrat **3q** (ca. 90 % Reinheit, Rohprodukt) wurde als Lösung in 2-Propanol kontinuierlich in den Schlauch eines schnell gepumpten Umlaufs injiziert, wodurch eine feine Verteilung im Reaktionsmedium sichergestellt wurde. Die Dosierung wurde dabei über einen Zeitraum von neun Stunden und bis zu einer Endkonzentration von $9.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ aufrechterhalten (entspricht 34.4 mM reines Substrat **3q**).

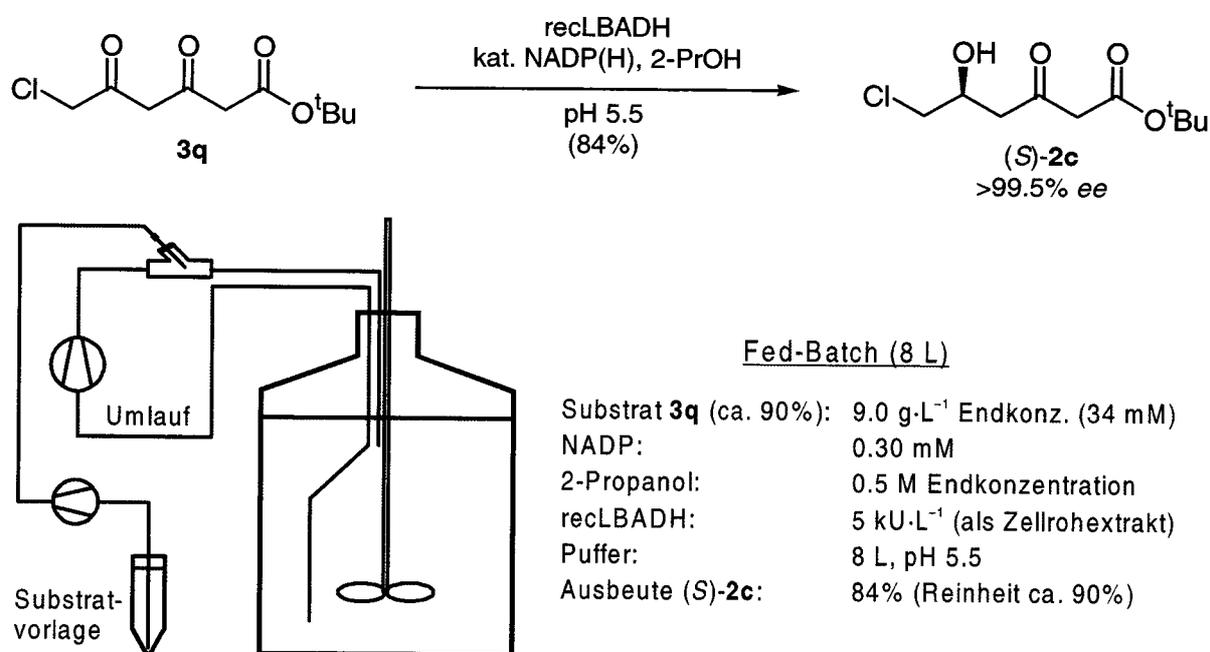


Abb. 3-4 Enzymatische Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** im 8 L-Maßstab.

Durch Ultrafiltration konnten nach beendeter Umsetzung 40% der Enzymaktivität zurückgewonnen werden. Das Produkt **(S)-2c** fiel nach Extraktion des Ultrafiltrats in 84% iger Ausbeute und ca. 90% iger Reinheit an, wobei der Anteil des Furanons **18** $6 \text{ mol}\%$ betrug ($^1\text{H-NMR}$ -Analyse). Die nichtenzymatische Bildung dieses Nebenprodukts wird somit erwartungsgemäß durch die Dosierstrategie und die erhöhte Katalysatorkonzentration zurückgedrängt. Da das Substrat **3q** unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen vollständig abreagiert, kann das enzymatische Produkt **(S)-2c** ohne weitere Aufarbeitung in die diastereoselektive Borhydrid-Reduktion eingesetzt werden (siehe Kapitel 4).

Nach RIEBEL beträgt die spezifische Aktivität der bis zur Homogenität gereinigten recLBADH $347 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$.^[43] Unter Berücksichtigung der relativen molaren Masse des aktiven Tetramers (ca. 105 kD) sowie der Produktausbeute läßt sich für das Enzym und das Coenzym NADP(H) die maximale Zykluszahl (TTN) wie folgt berechnen:

Enzymkonzentration im Reaktor:

$$c(\text{recLBADH}) = \frac{5 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}}{0.347 \text{ kU} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 1.05 \cdot 10^5 \text{ mg} \cdot \text{mmol}^{-1}} = 1.37 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Maximale Zykluszahl (TTN) Enzym:ⁱ

$$\text{TTN}(\text{recLBADH}) = \frac{34.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 84 \% \text{ Ausbeute}}{1.37 \cdot 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}} \approx \mathbf{210000} (\cong 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol}\%)$$

Maximale Zykluszahl (TTN) NADP(H):ⁱ

$$\text{TTN}[\text{NADP(H)}] = \frac{34.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 84 \% \text{ Ausbeute}}{0.30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}} = \mathbf{96} (\cong 1.0 \text{ mol}\%)$$

Der Enzymbedarf beträgt bei dieser Reaktionsführung 439 kU pro Kilogramm reines Produkt (S)-**2c**, wobei die Enzymrückgewinnung mitbeachtet wurde. Mit der Enzymausbeute einer 10 L-Fermentation (650 kU) können demnach rechnerisch 1.5 kg Produkt (S)-**2c** produziert werden. Der Coenzymbedarf (als NADP · 4H₂O) liegt bei 36.6 g pro Kilogramm (S)-**2c**. Durch eine Optimierung der Coenzym- und 2-Propanol-Konzentration und durch den Einsatz von Immobilisierungstechniken^[51] sollten sich die maximalen Zykluszahlen für das Enzym und das Coenzym sowie die Produktivität noch weiter steigern lassen. Untersuchungen hierzu wurden bereits aufgenommen.^[52]

ⁱ Für diese Berechnungen wird vereinfachend angenommen, daß die durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmte Substrat- und Produktreinheit mit der Reinheit in Gewichtsprozent übereinstimmt.

Einsatz eines zweiphasigen Systems

Der 3,5-Dioxoheptansäureester **3l** ist in wäßrigem Puffer nur schwer löslich (<10 mM). Obwohl diese Verbindung prinzipiell in Emulsion mit recLBADH reduziert werden kann (siehe Tab. 3-2, Seite 25), sollte geprüft werden, ob sich auch ein zweiphasiges Medium für die Reaktion heranziehen läßt. Sowohl organische Lösungsmittel als auch Adsorberharze fanden diesbezüglich bereits erfolgreich Anwendung in biokatalytischen Ketonreduktionen.^[53, 54] Die organische Phase bildet dabei ein Reservoir, aus dem durch das Verteilungsgleichgewicht das Substrat mit Fortschreiten der Reaktion kontinuierlich in die wäßrige Phase abgegeben wird. Das sich bildende Produkt steht ebenfalls in einem Verteilungsgleichgewicht zwischen den Phasen und wird zunehmend durch die organische Phase extrahiert. Auf diese Weise können unter anderem Löslichkeits- und Inhibierungsprobleme umgangen werden.^[55]

Nach Übersichten eines Reaktionsansatzes mit *n*-Hexan kam es zu einer frühzeitigen Stagnierung der enzymatischen Reduktion des β,δ -Diketoesters **3l**, vermutlich durch Denaturierung der recLBADH an der Phasengrenzfläche. Im Gegensatz dazu erwies sich das Enzym als kompatibel mit dem schwach polaren Adsorberharz "Amberlite XAD-7". Bei Anwendung dieser festen organischen Phase wurde das Produkt (*R*)-**2b** nach Säulenchromatographie mit 66 % Ausbeute erhalten (Abb. 3-5). Durch Ultrafiltration konnten überdies 63 % der Enzymaktivität zurückgewonnen werden.

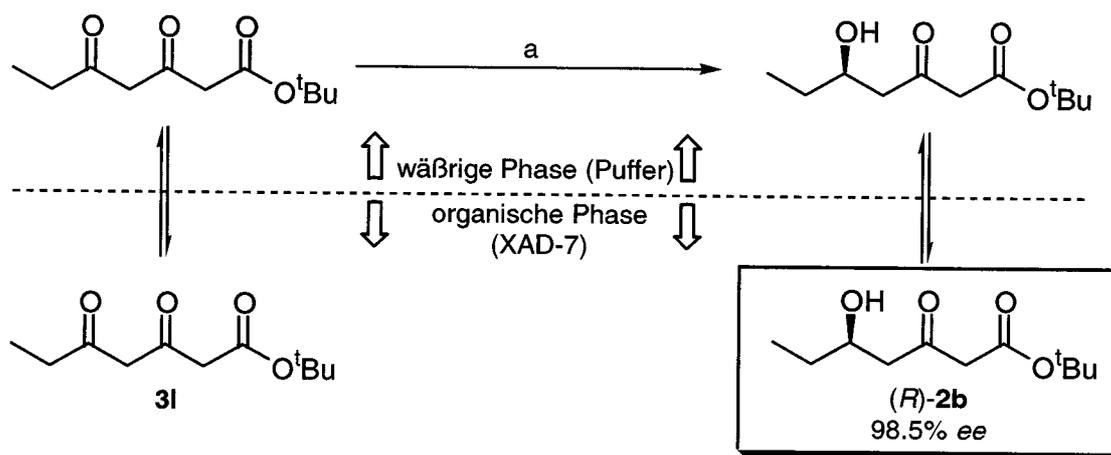


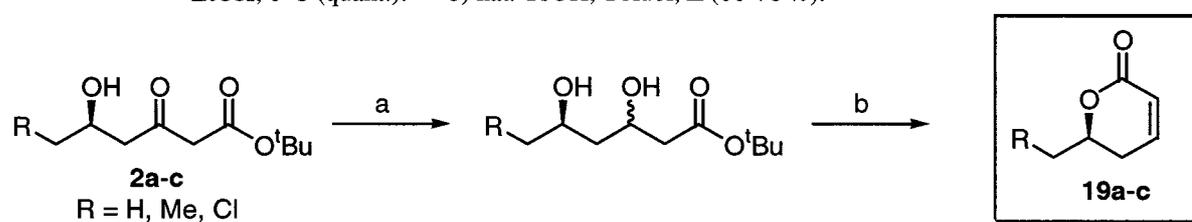
Abb. 3-5 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3l** mit recLBADH in einem zweiphasigen System. — a) **3l** (30 mM, 37%ig auf XAD-7), recLBADH (13.7 U·mL⁻¹), NADP (0.28 mM, 0.9 mol%), 2-Propanol (0.2 M), Puffer (pH 6.5), 25°C, 96 h (66 %)

Es konnte somit gezeigt werden, daß sich mit recLBADH in einem zweiphasigen System auch schwerlösliche Substrate umsetzen lassen.

Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (Synthese optisch aktiver δ -Lactone)

Die enzymatischen Produkte **2** wurden durch Natriumborhydrid-Reduktion und anschließende Lactonisierung/Dehydratisierung der resultierenden β,δ -Dihydroxyester in die optisch aktiven δ -Lactone (5,6-Dihydropyran-2-one) **19** überführt. Die Enantiomere dieser konformativ rigiden Heterocyclen können sehr gut mittels CSP-HPLC getrennt werden, was mit den jeweiligen Racematen überprüft wurde (Tab. 3-3).

Tab. 3-3 Synthese α,β -ungesättigter δ -Lactone und analytische Enantiomerentrennung. — a) NaBH_4 , EtOH, 0°C (quant.). — b) kat. TsOH, Toluol, Δ (60-70 %).



Produkt	R	$ee^{[a]}$ (%)	$[\alpha]_D^{25}$	Lit. $[\alpha]_D$ (% ee)	Ausb. (%)	t_R (<i>R</i>)- 19 ^[a] (min)	t_R (<i>S</i>)- 19 ^[a] (min)
(<i>R</i>)- 19a	H	99.4	-- ^[b]	--	70	23.8	17.6
(<i>R</i>)- 19b	Me	98.5	-169.8	-- ^[c]	61	29.1	18.7
(<i>S</i>)- 19c	Cl	>99.5	-158.6	-144.8 (>98) ^[56]	60	20.9	24.3

[a] Bestimmt durch CSP-HPLC (DAICEL Chiralcel OB). — [b] Rohprodukt; Drehwert nicht bestimmt. — [c] Drehwert nicht bekannt.

Aus dem chlorierten δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** wurde weiterhin das bekannte β -Keto- δ -lacton (*S*)-**20**^[56, 57] dargestellt, das gemäß NMR-Analyse in DMSO-Lösung enolisiert vorliegt. In Chloroform liegt das Gleichgewicht hingegen vollständig auf der Seite der Ketoform (Abb. 3-6).

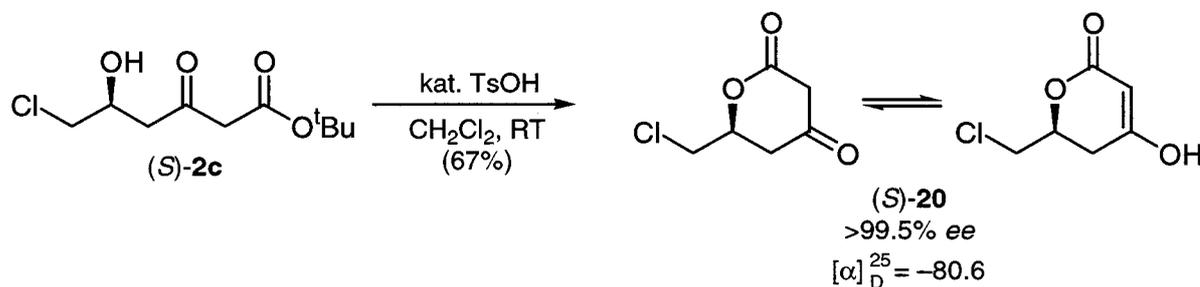


Abb. 3-6 Synthese und Keto-Enol-Tautomerie des optisch aktiven β -Keto- δ -lactons (*S*)-**20**.

Ein Vergleich des Drehwerts mit dem Literaturwert ($[\alpha]_D^{25} = -83.4$, 98 % *ee*)^[56] bestätigt die (*S*)-Konfiguration. Da sich die Enantiomere des δ -Lactons **20** ebenfalls durch CSP-HPLC trennen lassen (MERCK ChiraSpher NT), und die Lactonisierung innerhalb kurzer Zeit mit Trifluoressigsäure herbeigeführt werden kann (CH_2Cl_2 , 40°C, 2 h), steht eine bequeme Methode zur Verfügung, den *ee*-Wert des δ -Hydroxy- β -ketoesters **2c** zu ermitteln.

α,β -Ungesättigte δ -Lactone fanden in der Vergangenheit breite Anwendung in der stereoselektiven Synthese, da diese Verbindungen hoch diastereoselektive Additionen an die konjugierte Doppelbindung ermöglichen.^[58] Die Suche nach effektiven Synthesemethoden für nichtracemische α,β -ungesättigte δ -Lactone ist daher nachwievor ein Forschungsgebiet von aktuellem Interesse.^[59] Der 5,6-Dihydropyran-2-on-Ring ist überdies das charakteristische Strukturmerkmal einer Reihe phytogener Naturstoffe mit vielfältigen physiologischen Wirkungen.^[60] Bei dem δ -Lacton (*R*)-**19a** handelt es sich um das Enantiomer des einfachsten Vertreters dieser Naturstoffklasse, der (*S*)-Parasorbinsäure. Das Homologe (*R*)-**19b** ist ein Spurenbestandteil des Labdanum-Harzes und weist einen interessanten Cumarin-artigen Geruch auf.^[61] Während mehrere Synthesen für das Racemat bekannt sind,^[62] wurde eine enantioselektive Synthese dieses Riechstoffs bisher nicht in der Literatur beschrieben. Für einen olfaktorischen Vergleich wurde ausgehend von dem kommerziell erhältlichen (*S*)-3-Hydroxyvaleriansäuremethylester auch das Enantiomer (*S*)-**19b** synthetisiert (Abb. 3-7). Enttäuschenderweise konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Geruch beider Isomere festgestellt werden.

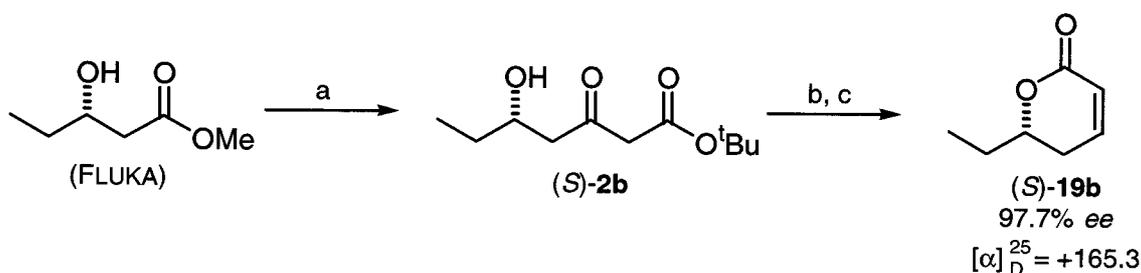


Abb. 3-7 Synthese des optisch aktiven α,β -ungesättigten δ -Lactons (*S*)-**19b**. — a) $\text{CH}_2=\text{C}(\text{OLi})\text{O}^t\text{Bu}$ (4.0 Äq.), THF, $-40^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ (59 %). — b-c) siehe Tab. 3-3, Seite 31.

Das chlorierte δ -Lacton (*S*)-**19c** wurde im Rahmen einer Kooperation für die Totalsynthese der 6-Alkenyl-substituierten δ -Lactone (*S*)-Argentilacton und (*S*)-Goniothalamine bereitgestellt (Abb. 3-8).^[63] Hierbei handelt es sich um die nichtnatürlichen Enantiomere dieser beiden Naturstoffe. Nach zweistufigem Cl/OH-Austausch auf der Stufe des geschützten Acetals (*S,S*)-**21**

wurde der resultierende Alkohol (*S,S*)-**22** zum Aldehyd oxidiert (Swern-Oxidation) und dieser unter (*Z*)- bzw. (*E*)-selektiven Bedingungen mit Hexyltriphenylphosphoniumbromid bzw. Benzyltributylphosphoniumbromid olefiniert. Durch Oxidation der Olefinierungsprodukte mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) wurden die Zielverbindungen (*S*)-Argentilacton und (*S*)-Goniothalamin erhalten.

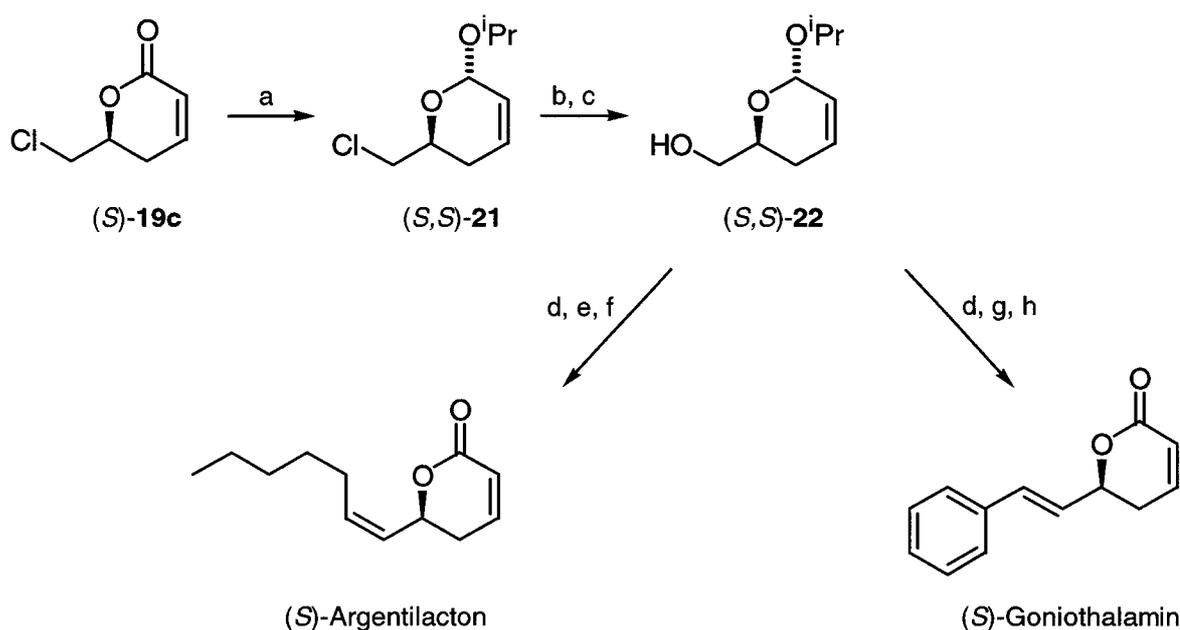


Abb. 3-8 Anwendung des δ -Lactons (*S,S*)-**19c**.^[63] — a) 1. DIBAL, CH_2Cl_2 , -78°C ; 2. 2-PrOH, PPTS, C_6H_6 , 80°C (79 %). — b) TBAA, NMP, 85°C (95 %). — c) K_2CO_3 , MeOH, RT (97 %). — d) $(\text{COCl})_2$, DMSO, dann **22**, $\text{Et}_3\text{N}^+\text{Pr}_2$, CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$. — e) HexPPh₃Br, *n*BuLi, THF, 0°C , dann Aldehyd aus d) (77 %). — f) PCC, CH_2Cl_2 , RT (52 %). — g) BnBr, Bu₃P, MeCN, RT, dann Aldehyd aus d), ^tBuOK, 0°C (81 %). — h) PCC, CH_2Cl_2 , RT (41 %).

Die racemischen Lactone *rac*-**19a** und *rac*-**19b** wurden aus den δ -Hydroxy- β -ketoestern *rac*-**2a** und *rac*-**2b** dargestellt (Abb. 3-9). Letztere wiederum wurden nach der Methode von WEILER^[64] aus *tert*-Butylacetoacetat und Acetaldehyd bzw. Propionaldehyd erhalten.

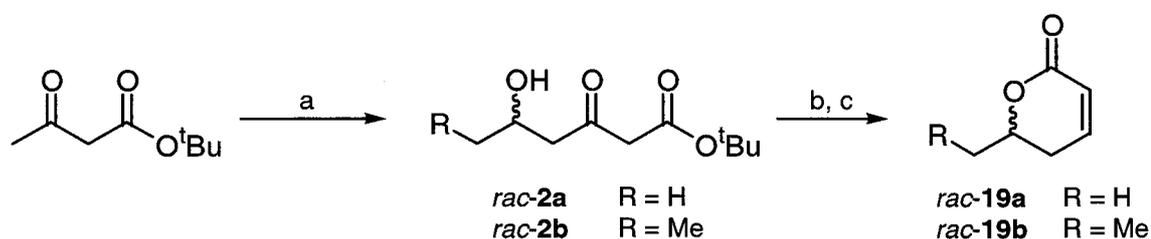


Abb. 3-9 Synthese der racemischen δ -Lactone *rac*-**2a** und *rac*-**2b**. — a) 1. NaH, THF, 0°C ; 2. ⁿBuLi, THF, 0°C ; 3. RCH₂CHO, THF, 0°C (60-63 %). — b-c) siehe Tab. 3-3, Seite 31.

Da die Präparation von wasserfreiem 2-Chloracetaldehyd problematisch ist,^[65] wurde das chlorierte Derivat *rac-2c* zweistufig nach der bereits erwähnten Methode von THOTTATHIL et al. synthetisiert (siehe Seite 26). Der dafür benötigte racemische Hydroxybuttersäureester *rac-24*^[66] ist durch Natriumborhydrid-Reduktion des kommerziell erhältlichen β -Ketoesters **23** zugänglich (Abb. 3-10).

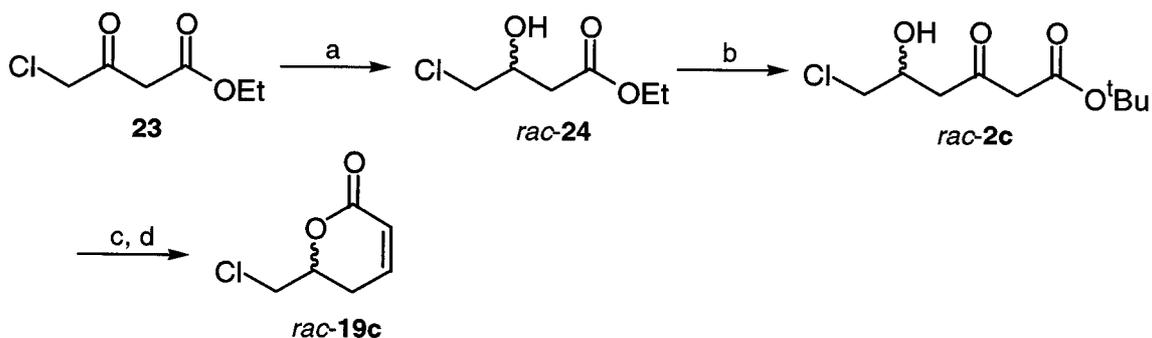


Abb. 3-10 Synthese des racemischen δ -Lactons *rac-19c*. — a) NaBH₄, EtOH, 0°C (84%). — b) siehe Abb. 3-2, Seite 26. — c-d) siehe Tab. 3-3, Seite 31.

Dynamische kinetische Racematspaltung

Die biokatalytische Reduktion enolisierbarer α -Alkyl- β -ketoester ist eine elegante Methode, um optisch aktive β -Hydroxyester mit zwei stereogenen Zentren definierter Konfiguration darzustellen.^[38b] Unter der Voraussetzung, daß erstens die Racemisierung über die Enolform schneller erfolgt als die Reduktion, und zweitens eines der Enantiomere des Substrats bevorzugt umgesetzt wird, kommt es dabei zu einer dynamischen kinetischen Racematspaltung (Abb. 3-11).^[67] Aus einem racemischen Precursor kann so in nur einem Schritt und bei einer theoretischen Ausbeute von 100 % ein optisch aktives Produkt mit zwei stereogenen Zentren gewonnen werden. In Abhängigkeit von der Substratstruktur und dem verwendeten Biokatalysator wird entweder das *syn*- oder das *anti*-konfigurierte Produkt im Überschuß erhalten.

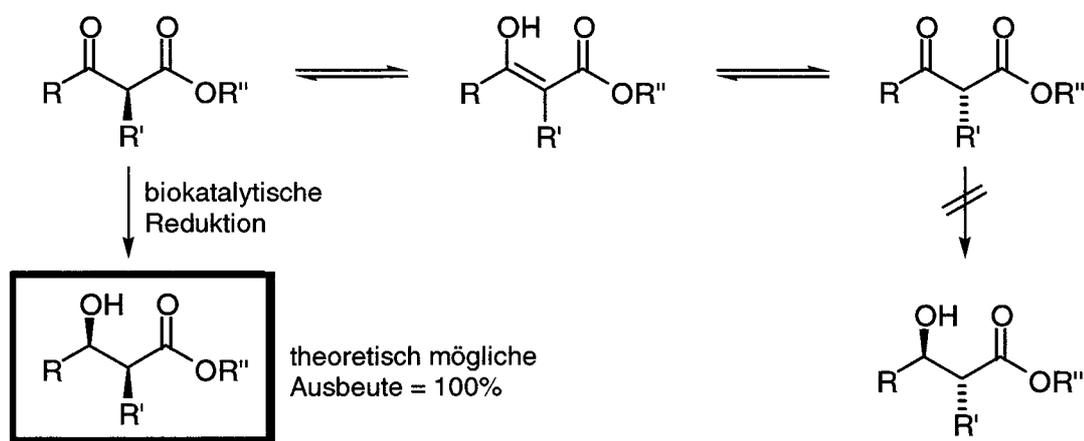


Abb. 3-11 Dynamische kinetische Racematspaltung von α -Alkyl- β -ketoestern durch biokatalytische Reduktion.

Diese Methode wurde bisher nur selten auf unsymmetrisch substituierte α -Alkyl- β -diketone übertragen.^[68] Lediglich für einige wenige cyclische Vertreter können diesbezüglich Beispiele in der Literatur gefunden werden.^[69]

Der methylierte β,δ -Diketoester *rac*-**30** kann durch Keto-Enol-Tautomerie ebenfalls racemisieren. Es war daher von Interesse festzustellen, ob sich durch die enzymatische Reduktion eine dynamische kinetische Racematspaltung realisieren läßt. Dazu wurde β,δ -Diketoester *rac*-**30** im präparativen Maßstab (2.5 mmol) mit recLBADH umgesetzt wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben.

Erwartungsgemäß wird auch dieser Diketoester durch recLBADH exklusiv in δ -Position reduziert. Hinweise auf die Bildung des β -Hydroxy-Regioisomers oder eines Doppelreduktionsprodukts konnten weder mit NMR noch mit GC-MS gefunden werden. Das Produkt *syn*-(4*S*,5*R*)-**2d** – ein neuer Polyketid-Baustein mit einer Propionat- und zwei Acetat-Einheiten – wird dabei mit hoher Enantio- und Diastereoselektivität gebildet (Abb. 3-12).

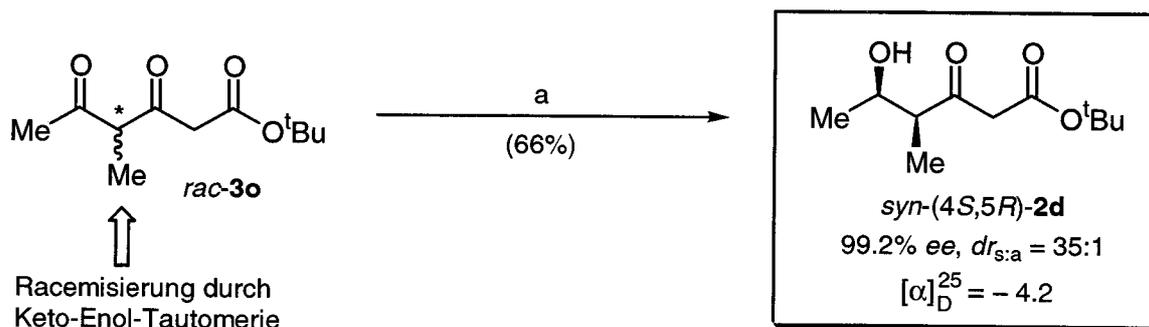


Abb. 3-12 Dynamische kinetische Racematspaltung durch enzymatische Reduktion mit recLBADH. — a) *rac*-**3o** (20 mM, Emulsion), recLBADH (3.0 U·mL⁻¹), NADP (0.98 mM, 4.9 mol%), 2-Propanol (0.2 M), Puffer (pH 6.5), 25°C, 23 h.

Da die Ausbeute des *syn*-(4*S*,5*R*)-Stereoisomers nach Säulenchromatographie deutlich über 50 % liegt, verläuft die Reaktion nachweislich über eine dynamische kinetische Racematspaltung. Das Diastereomenverhältnis *syn*/*anti* des Rohprodukts betrug 33:1 (¹³C-NMR-Analyse), d. h. durch die Chromatographie an Kieselgel kam es nicht zu einer nennenswerten Änderung des Diastereomenverhältnisses.

Die Konfigurationszuordnung konnte durch einen Vergleich der analytischen Daten (NMR, Drehwert) mit denen des Enantiomers *syn*-(4*R*,5*S*)-**2d** verifiziert werden. Letzteres wurde auf unabhängigem Wege aus dem Hydroxybutyrat *syn*-(2*R*,3*S*)-**25** dargestellt (Abb. 3-13). Hydroxybutyrat *syn*-(2*R*,3*S*)-**25** wiederum ist durch bekannte Bäckerhefe-Reduktion des kommerziell erhältlichen β -Ketoesters *rac*-**26** zugänglich.^[70]

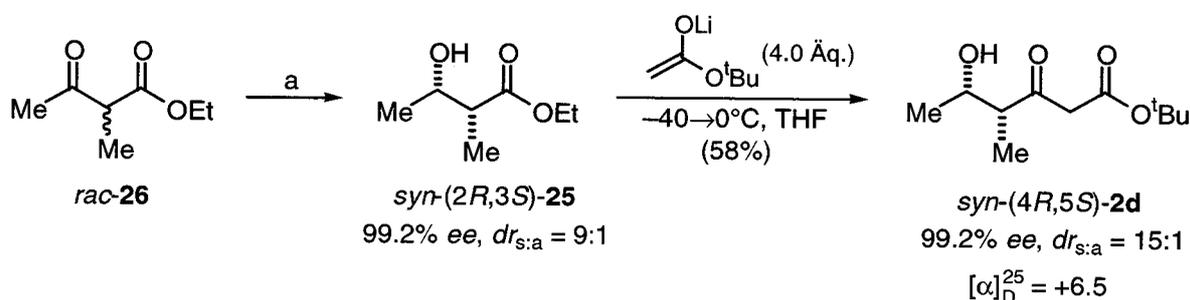


Abb. 3-13 Synthese des δ -Hydroxy- β -ketoesters *syn*-(4*R*,5*S*)-**2d**. — a) *S. cerevisiae*, H₂O (36 %).

NAKATA et al. beschreiben die Verwendung des δ -Lactons *syn*-(5*R*,6*R*)-**19d** als Baustein in der Totalsynthese des hoch toxischen Polyketids (+)-Pederin (Abb. 3-16).^[71] Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten NMR-Daten des δ -Lactons *syn*-**19d** sind in Übereinstimmung mit den Literaturdaten, wodurch die *syn*-Konfiguration zusätzlich bestätigt wird.

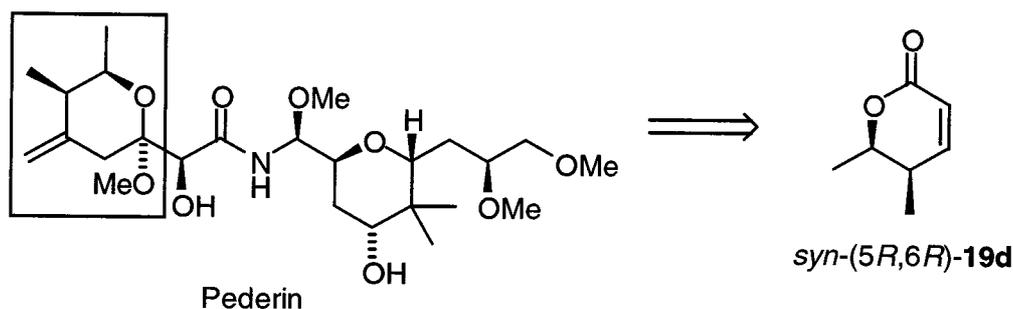


Abb. 3-16 δ -Lacton *syn*-(5*R*,6*R*)-**19d** als Baustein für (+)-Pederin.

Die NMR-Daten des diastereomeren δ -Lactons *anti*-**19d** wurden dem racemischen Diastereomergemisch *rac*-(5*RS*,6*RS*)-**19d** entnommen, das auf der gleichen Route wie die nichtracemischen Derivate erhalten wurde (Abb. 3-17).

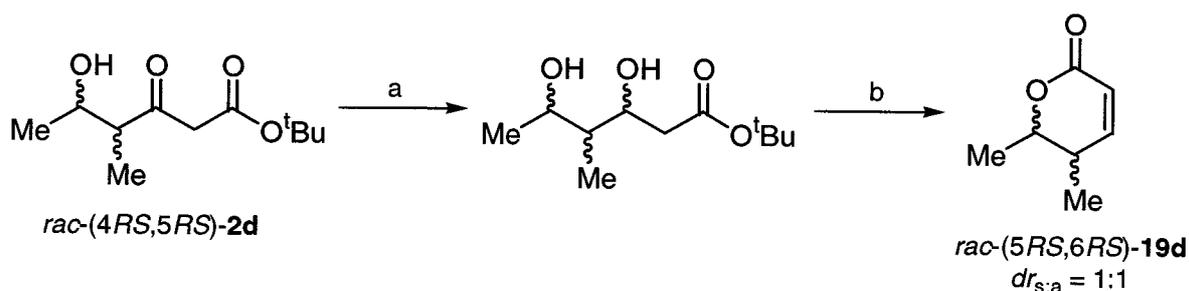


Abb. 3-17 Synthese des racemischen Diastereomergemisches *rac*-(5*RS*,6*RS*)-**19d**. — a-b) siehe Abb. 3-15.

Die Kopplungskonstante $^3J(\text{H-5},\text{H-6})$ des *syn*-Diastereomers (3.6 Hz) ist erwartungsgemäß kleiner als die entsprechende Kopplungskonstante des *anti*-Diastereomers (10.0 Hz, Abb. 3-18). Beide liegen in den von DAVIES-COLEMAN et al. für diese Verbindungsklasse angegebenen Bereichen von 3-6 Hz für $^3J(\text{H-5}_{\text{eq}},\text{H-6})$ und 9-12 Hz für $^3J(\text{H-5}_{\text{ax}},\text{H-6})$.^[60]

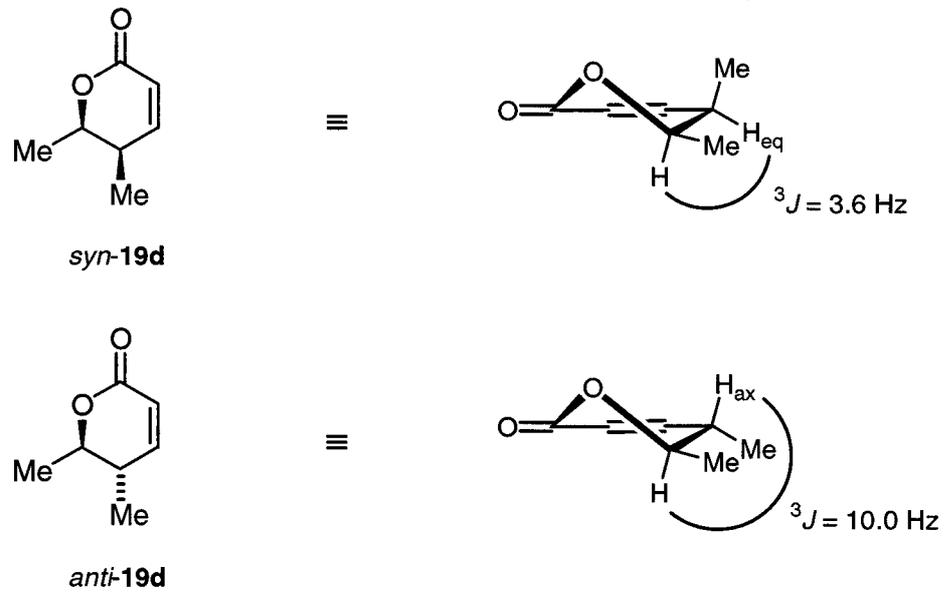


Abb. 3-18 Kopplungskonstanten $^3J(\text{H-5}, \text{H-6})$ der diastereomeren δ -Lactone **19d**.

Fazit

Bei der beschriebenen enzymatischen Reduktion handelt es sich um das erste bekannte Beispiel für eine Synthese optisch aktiver δ -Hydroxy- β -ketoester durch hoch regio- und enantio-selektive Reduktion acyclischer β,δ -Diketoester. Die Methode ist breit anwendbar und kann bei geringem technischen Aufwand und unter milden Bedingungen in einem attraktiven Maßstab durchgeführt werden. Die Produkte werden dabei in exzellenter optischer Reinheit und guter Ausbeute erhalten.

recLBADH ist in Form eines für die Synthese geeigneten Zellrohextrakts im Megaunit-Maßstab zugänglich. Das Enzym ist überdies unter Synthesebedingungen robust und läßt sich nach erfolgter Umsetzung durch Ultrafiltration effektiv recyclieren. Die Regenerierung des reduzierten Coenzym erfolgt durch enzymatische Oxidation von 2-Propanol, wobei kein zweites Enzym in den Prozeß einbezogen werden muß. Ökologisch bedenkliche Nebenprodukte fallen bei der Synthese nicht an.

Die Umsetzung des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** im 8 L-Maßstab widerlegt das häufig zitierte Argument, NADP(H)-abhängige Reaktionen seien aus Kostengründen nicht in der präparativen Synthese einsetzbar. Tatsächlich liegt der durch das Coenzym verursachte Finanzbedarf mit DM 80.- im Rahmen der typischerweise bei einer Umsetzung dieser Größenordnung anzutreffenden Kosten für Laborchemikalien.ⁱ

Die Anwendungsbreite dieser enzymatischen Reaktion wird durch die dynamische kinetische Racematspaltung des methylierten β,δ -Diketoesters **3o** und durch die Kompatibilität des Enzyms mit einem zweiphasigen Reaktionsmedium unterstrichen. Wie sich anhand der fünfstelligen maximalen Zykluszahl (TTN) zeigt, die bei der Reduktion des potentiell alkylierend wirkenden β,δ -Diketoesters **3q** im Fed-Batch-Verfahren erzielt wurde, wird die Enzymaktivität auch durch reaktive Substrate und hohe 2-Propanol-Konzentrationen nicht beeinträchtigt.

ⁱ NADP · 4 H₂O wurde im 100 g-Maßstab für 40 DM · g⁻¹ bezogen (APPLICHEM).

3.2 Ganzzelltransformationen mit *Lactobacillus spec.*

Einleitung

Obwohl sich das für die recLBADH-Reduktion benötigte Coenzym NADP(H) effektiv regenerieren und deshalb in katalytischen Mengen einsetzen läßt, wäre es unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten vorteilhaft, wenn dieses Additiv völlig umgangen werden könnte. Es sollte daher geprüft werden, ob die Reduktion des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** auch mit intakten Zellen von *Lactobacillus spec.* möglich ist. Dieses Bakterium fand bisher nur vergleichsweise selten Anwendung im Sinne einer Ganzzelltransformation prochiraler Ketone. ARAGOZZINI et al. beschreiben die enantioselektive Reduktion von β -Ketoestern mit *Lactobacillus spec.*, TIDSWELL et al. die Reduktion von Sulcaton mit *L. brevis*.^[72] In einer aktuellen Arbeit wird die Reduktion von 2,5-Hexandion mit *L. kefir* untersucht.^[73] Das reduzierte Coenzym wird bei diesen Umsetzungen zellintern bereitgestellt und durch Metabolisierung einer Kohlenstoffquelle regeneriert.

Eigene Ergebnisse und Diskussion

Reduktion des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q**

Der chlorierte β,δ -Diketoester **3q** wurde in Anwesenheit von Glucose mit ganzen Zellen von *L. kefir* umgesetzt und die Reaktion durch GC-MS verfolgt. Überraschenderweise zeigte sich, daß nach anfänglich regioselektiver Reduktion der δ -Ketogruppe auch die β -Ketogruppe angegriffen wird. Durch vorzeitigen Abbruch der Reaktion wurde ein Gemisch aus δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** und β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** erhalten (GC-MS-Analyse). Das Doppelreduktionsprodukt *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** wird bei dieser Umsetzung mit hoher Enantio- und Diastereoselektivität gebildet (Abb. 3-19).

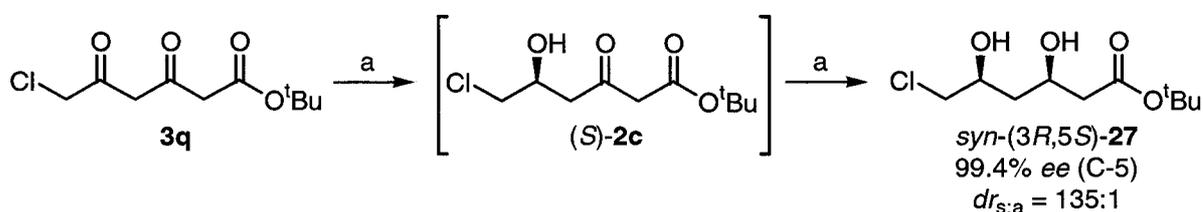


Abb. 3-19 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit *L. kefir* (intakte Zellen). — a) *L. kefir*, Glucose, Puffer (pH 5.5).

Die Zuordnung der relativen Konfiguration für β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** erfolgt anhand der diagnostischen ^{13}C -Kernresonanzen der Carbinol-Kohlenstoffatome C-3 und C-5 ($\delta = 68.4$ ppm bzw. 71.6 ppm; siehe Kapitel 4, Seite 64). Natriumborhydrid-Reduktion des Produktgemisches und anschließende Lactonisierung/Dehydratisierung ergaben das α,β -unge-sättigte δ -Lacton (*S*)-**19c** (Abb. 3-20), dessen Enantiomerenüberschuß durch CSP-HPLC be-stimmt wurde, wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben. Über die Retentionszeit konnte die erwartete (*S*)-Konfiguration bestätigt werden.

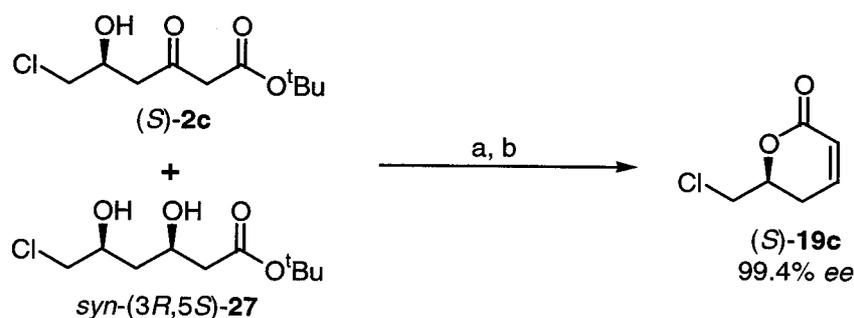


Abb. 3-20 Überführung des Produktgemisches der *L. kefir*-Ganzzelltransformation in das α,β -ungesättigte δ -Lacton (*S*)-**19c**. — a) NaBH_4 , EtOH, 0°C . — b) kat. TsOH, Toluol, Δ .

In zwei Patentanmeldungen wird die mikrobiologische diastereoselektive Reduktion von δ -Hydroxy- β -ketoestern – unter anderem von (*S*)-**2c** – beansprucht.^[13q, 74] *Lactobacillus spec.* wird in der Reihe der dort verwendeten Mikroorganismen nicht aufgeführt.

Der chlorierte δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** ist hinsichtlich einer Reduktion der β -Keto-gruppe kein Substrat für recLBADH (siehe Seite 26). Aufgrund der ausgeprägten Homologie mit LKADH und der dementsprechend übereinstimmenden Substratspektren beider Enzyme ist daher die Annahme berechtigt, daß der zweite Reduktionsschritt hier durch eine bisher unbekannte (*R*)-selektive *L. kefir*- bzw. *L. brevis*-Alkoholdehydrogenase katalysiert wird. Diese hypothetische "zweite" Alkoholdehydrogenase ist derzeit Gegenstand weiterer Unter-suchungen am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf.^[75] Die Anwendung von *Lactobacillus spec.* für die Ganzzelltransformation des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** im technischen Maßstab wird ebenfalls in einer weiterführenden Arbeit untersucht.^[76]

Reduktion des Benzyloxy-substituierten δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**28**

Im Rahmen einer Industriekooperation wurde die Umsetzung des Benzyloxy-substituierten δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**28** mit Zellen von *L. brevis* untersucht. Der exakte Enantiomerenüberschuß der zur Verfügung gestellten Charge war nicht bekannt, lag aber nach Aussage des Kooperationspartners bei über 90 % *ee*. Wie die GC-MS-Analyse des Produkts ergab, reduziert *L. brevis* dieses Substrat diastereoselektiv zum entsprechenden β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**29** (Abb. 3-21). Die Reduktion von δ -Hydroxy- β -ketoestern mit *L. brevis* (bzw. *L. kefir*) ist somit nicht auf den chlorierten δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** beschränkt.

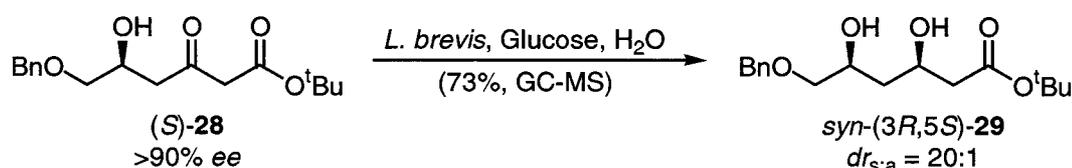


Abb. 3-21 Reduktion des Hydroxyketoesters (*S*)-**28** mit *L. brevis* (intakte Zellen).

Durch einen Vergleich mit einer authentischen Probe, die ebenfalls vom Kooperationspartner zur Verfügung gestellt wurde, konnte die relative *syn*-Konfiguration bestätigt werden. Die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgt hier mit Vorbehalt, da das Produkt diesbezüglich nicht charakterisiert wurde. Andererseits ist eine Racemisierung oder Konfigurationsumkehr an C-5 wenig wahrscheinlich, so daß der Strukturvorschlag mit der beobachteten *syn*-Selektivität im Einklang ist.

Der Anteil des diastereomeren Produkts *anti*-**29** deckt sich mit dem Anteil des (*R*)-Enantiomers am Substrat (*S*)-**28**. Dies kann als Hinweis darauf verstanden werden, daß die Reduktion der β -Ketogruppe unter hoher Stereokontrolle des Biokatalysators verläuft (d. h. unabhängig vom bereits vorhandenen stereogenen Zentrum), und die Bildung des Diastereomers *anti*-**29** hauptsächlich auf die (*R*)-selektive Reduktion des ebenfalls als Substrat akzeptierten Unterschüßenantiomers (*R*)-**28** zurückzuführen ist.

3.3 Ganzzelltransformationen mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Einleitung

Der mit Abstand am häufigsten genutzte Mikroorganismus für die mikrobiologische enantio-selektive Reduktion von Ketonen ist Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*).^[38b, 39b, 77] Diese Hefe ist zu einem konkurrenzlos günstigen Preis im großen Maßstab zugänglich, und die Anwendung erfordert keine besonderen mikrobiologischen Techniken. Bäckerhefe produziert eine große Anzahl NAD(P)(H)-abhängiger Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen, die in der Summe ein breites Substratspektrum abdecken.^[78] Die Wahrscheinlichkeit, daß ein gegebenes Keton von einem dieser Enzyme als Substrat akzeptiert wird, ist dementsprechend hoch. Auf einen Zusatz von Coenzymen kann bei präparativen Umsetzungen verzichtet werden, da diese Substanzen von der Hefe zellintern zur Verfügung gestellt und durch Metabolisierung von Kohlenstoffquellen regeneriert werden. Die "Bäckerhefe-Reduktion" eines prochiralen Ketons gehört somit zu den seltenen Fällen einer enantioselektiven Synthese, deren Reagenzien in einem Lebensmittelgeschäft erworben werden können. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit berichten CROCQ et al. über eine hoch chemo-, regio-, und stereoselektive Ketonreduktion mit Bäckerhefe im industriellen Maßstab (Trimegeston-Synthese, ROUSSEL UCLAF).^[79]

Wie die in Kapitel 1.2 vorgestellte Bäckerhefe-Reduktion acyclischer β,δ -Diketoester beispielhaft verdeutlicht, wird die Enzymvielfalt und der Vorteil der zellinternen Coenzym-Regenerierung nicht selten auf Kosten der Selektivität erkaufte. UKO et al. erhielten bei dieser Reaktion Gemische der regioisomeren Hydroxyketoester, wobei der *ee*-Wert in Abhängigkeit von der Substratstruktur variiert (Abb. 1-8, Seite 6).^[18] Interessanterweise werden die mit den β,δ -Diketoestern strukturverwandten Alkan-2,4-dione **30** demgegenüber von Bäckerhefe exklusiv in Position C-2 reduziert (Abb. 3-22). Die Hydroxyketone (*S*)-**31** fallen dabei mit hohem *ee*-Wert an.^[68b, 80]

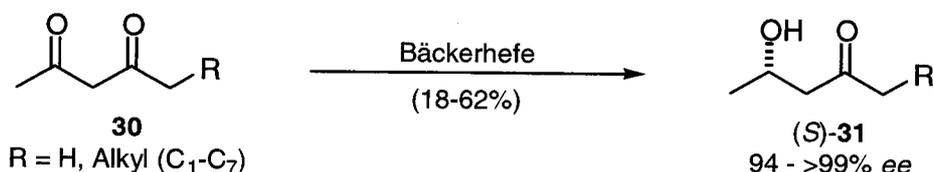


Abb. 3-22

Regio- und enantioselective Reduktion der Alkan-2,4-dione **30** mit Bäckerhefe.

Bei Einführung eines α' -Chlor-Substituenten (**32**) bleibt die Regioselektivität erhalten, wie von CUI et al. gezeigt wurde.^[81] Im Gegensatz zu den vorhergehenden Beispielen ist die Enantioselektivität und die Konfiguration der Produkte **33** in diesem Fall stark abhängig von der Natur des Alkylrests R (Abb. 3-23).

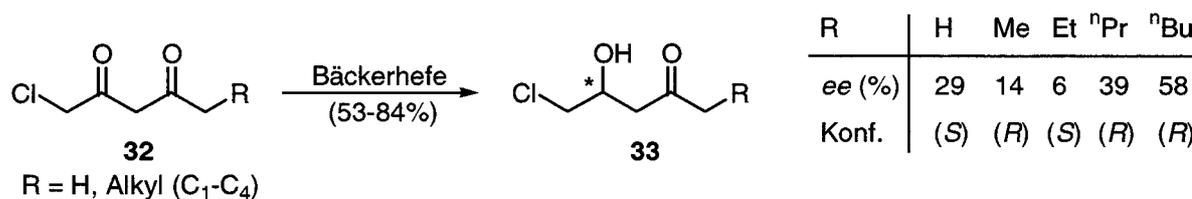


Abb. 3-23 Regio- und enantioselektive Reduktion von 1-Chloralkan-2,4-dionen mit Bäckerhefe.

Der Chlor-Substituent hat einen deutlich beschleunigenden Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit. So werden die chlorierten Alkan-2,4-dione **32** bei vergleichbarem Hefe/Substrat-Verhältnis innerhalb kürzester Zeit komplett umgesetzt (60-150 min), während für die vollständige Reduktion der unchlorierten Derivate **30** Reaktionszeiten von drei bis sechs Tagen notwendig sind.^[80] Dieses Phänomen kann auch bei der Bäckerhefe-Reduktion anderer α -Chlorketone beobachtet werden.^[82]

Es sollte die Frage geklärt werden, ob es bei der Umsetzung des β,δ -Diketoesters **3q** mit Bäckerhefe unter dem Einfluß des Chlor-Substituenten zu einer regioselektiven Reduktion der δ -Ketogruppe kommt. Aufgrund der von UKO et al. beobachteten (S)-Selektivität bei der Reduktion in δ -Position (Abb. 1-8, Seite 6) und der von CUI et al. beobachteten (R)-Selektivität bei der Reduktion langkettiger Alkan-2,4-dione **32** (Abb. 3-23) wurde für das potentielle Produkt **2c** ebenfalls eine (R)-Konfiguration erwartet (Abb. 3-24).

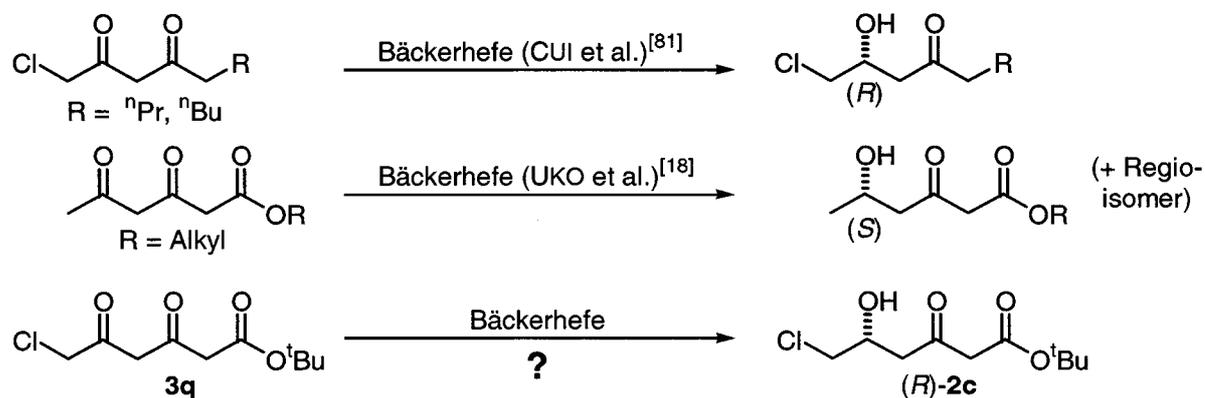


Abb. 3-24 Erwarteter stereochemischer Verlauf der Bäckerhefe-Reduktion des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q**.

Für eine zellfreie enzymatische Synthese des δ -Hydroxy- β -ketoesters (*R*)-**2c** konnte bei dem in Kapitel 3.1 beschriebenen Enzym-Screening keine geeignete Alkoholdehydrogenase gefunden werden.

Eigene Ergebnisse und Diskussion

Reduktion mit Feuchtzellmasse ("Frischhefe") in wässriger Suspension

In einem analytischen Reaktionsansatz (80 μ mol, 20 mM) wurde die Reduktion des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** mit handelsüblicher Frischhefe untersucht ("Vital Gold", DEUTSCHE HEFEWERKE GmbH, Saccharose als Kohlenstoffquelle). Als Hauptprodukt wurde der δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2c** erhalten (Abb. 3-25).

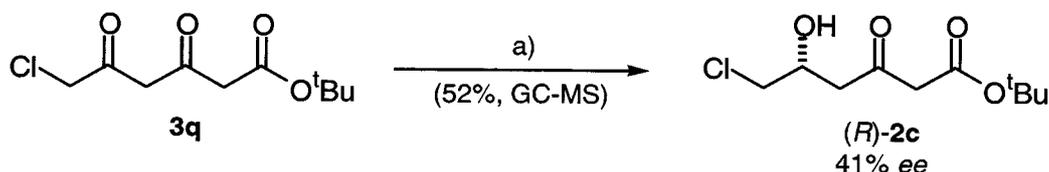


Abb. 3-25 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Frischhefe (*S. cerevisiae*) in Anwesenheit von Saccharose. — a) **3q** (20 mM), Frischhefe (12 g / mmol **3q**), Saccharose (200 g·L⁻¹), H₂O, 26 h, RT.

Die Doppelreduktionsprodukte *syn/anti*-**27** und das β -Hydroxy- δ -keto-Regioisomer **34** werden bei dieser Reaktion nur in Spuren gebildet. Nicht umgesetztes Edukt reagiert durch intramolekulare Alkylierung nahezu vollständig zum Furanon **18** ab (Abb. 3-26).

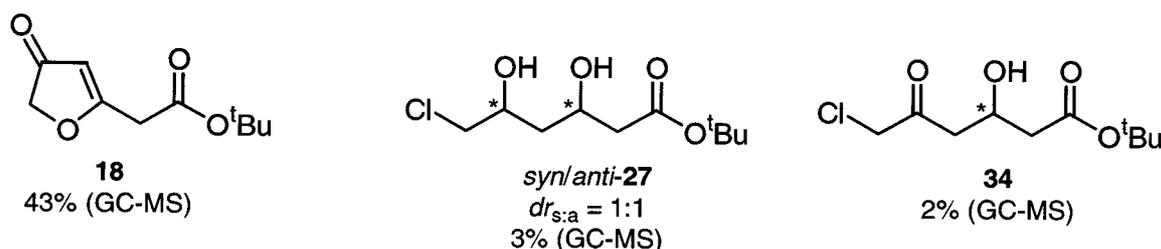


Abb. 3-26 Nebenprodukte der Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Frischhefe (*S. cerevisiae*) in Anwesenheit von Saccharose.

Die Analyse der Produktzusammensetzung erfolgte gaschromatographisch (GC-MS) nach Dichlormethan-Extraktion und Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid. Leicht enolisierbare Ketogruppen werden durch diese Derivatisierungsprozedur ebenfalls acyliert, was im

Fall der Verbindungen **3q** und **2c** zur Bildung von *Z/E*-Isomeren führt. Anhand der Massenspektren können die Signale jedoch zweifelsfrei zugeordnet und summiert werden. Der Enantiomerenüberschuß und die Konfiguration des Hauptprodukts (*R*)-**2c** wurden nach Derivatisierung zum δ -Lacton (*R*)-**20** mittels CSP-HPLC bestimmt, wie auf Seite 32 beschrieben.

Die Regioselektivität dieser Hefe-Reduktion ist unerwartet hoch. Eine räumliche Abschirmung der β -Ketogruppe durch die sperrige *tert*-Butylgruppe kann hierfür nicht verantwortlich gemacht werden, da nach UKO et al. auch der *tert*-Butylester **3j** – ebenso wie die anderen von dieser Arbeitsgruppe untersuchten 3,5-Dioxohexansäureester – bevorzugt in β -Position reduziert wird.^[18] In einem Kontrollexperiment konnte außerdem gezeigt werden, daß dies auch für den β,δ -Diketoester **3l** gilt (GC-MS-Analyse; Abb. 3-27).

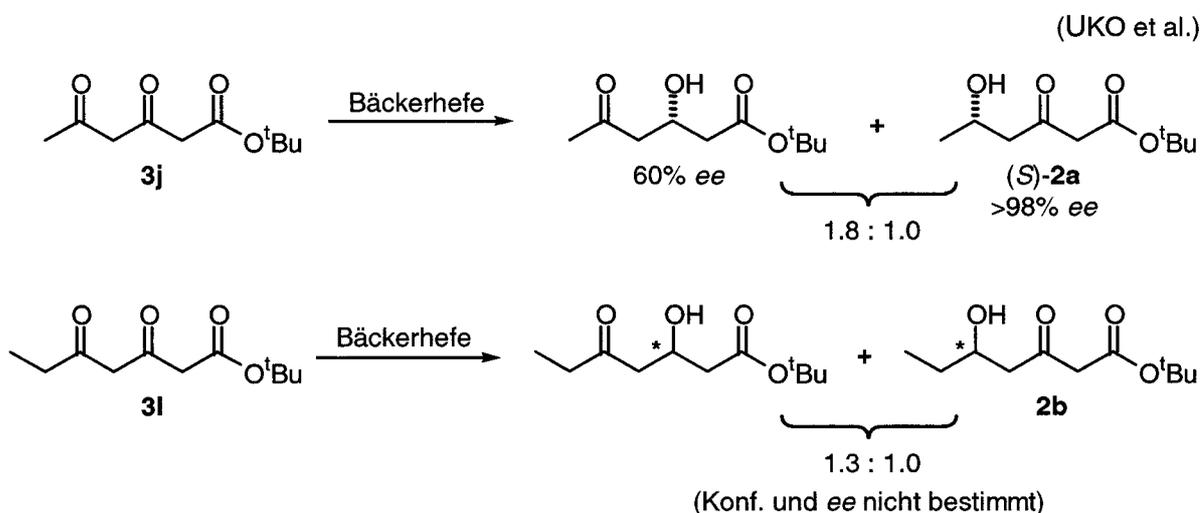


Abb. 3-27 Reduktion von 3,5-Dioxocarbonsäure-*tert*-butylestern mit Bäckerhefe.

Die hohe Regioselektivität im Fall des β,δ -Diketoesters **3q** ist somit auf einen Einfluß des Chlor-Substituenten zurückzuführen. Neben einer potentiellen Steigerung der Carbonylaktivität in δ -Position, die den Hydridtransfer zu dieser Ketogruppe erleichtern sollte, läßt sich als Ursache eine substitutionsbedingte Änderung der Affinität des β,δ -Diketoester-Substrats zu den an der Reduktion beteiligten Enzymen diskutieren. Möglich ist auch eine selektive Inhibierung der unerwünschten Enzymaktivität durch das Substrat **3q**, das als α -Chlorketon ein gewisses Alkylierungspotential aufweist. Für eine experimentelle Aufklärung wäre die Isolierung und Charakterisierung aller an der Reduktion beteiligten Enzyme notwendig.

Der unbefriedigende *ee*-Wert des Produkts (*R*)-**2c** (41 % *ee*) weist darauf hin, daß das Substrat **3q** sowohl von (*R*)- als auch von (*S*)-selektiven Alkoholdehydrogenasen bzw. Carbonylre-

duktasen der Bäckerhefe akzeptiert wird. Da dies ein häufig auftretendes Problem bei der enantioselektiven Ketonreduktion mit Bäckerhefe ist, wurden in der Vergangenheit verschiedene Techniken entwickelt, mit denen sich der stereochemische Verlauf dieser Reaktion beeinflussen läßt.^[77, 78b, 83] Mit diesen Maßnahmen wird entweder direkt in das Enzym- und/oder Coenzymangebot der Zelle eingegriffen, oder es werden die unterschiedlichen Kinetiken der beteiligten Enzyme ausgenutzt. Letzteres läßt sich unter anderem durch eine Kontrolle der Substratkonzentration realisieren. So konnte beispielsweise bei der Bäckerhefe-Reduktion der chlorierten Alkan-2,4-dione **32** gezeigt werden, daß die (*R*)-Selektivität mit Verringerung der Substratkonzentration zunimmt.^[81] Diese Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit als Ausgangspunkt für eine ausführliche Optimierung der Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** gewählt.

Reduktion mit Feuchtzellmasse in einem Zweiphasensystem

Um die Produktivität der Reaktion nicht durch eine hohe Verdünnung zu begrenzen, erfolgte die Kontrolle der Substratkonzentration über eine Verteilung in einem Zweiphasensystem (Alkan/Wasser). Die Hefezellen sind bei diesem System in der wäßrigen Phase lokalisiert. Auf einen Einsatz von Saccharose oder Glucose als Kohlenstoffquelle wurde verzichtet, da beobachtet wurde, daß die Fermentation dieser Kohlenhydrate in Anwesenheit des β,δ -Diketoesters **3q** ausbleibt (keine CO₂-Bildung) und ohne Zuckerzusatz ein höherer Umsatz erzielt wird (Tab. 3-4, Nr. 1; vgl. Abb. 3-25, Seite 46). Es ist bekannt, daß *S. cerevisiae* auch ohne externe Kohlenstoffquelle über einen begrenzten Zeitraum reduziertes Coenzym regenerieren kann.^[78b, 84] Bei allen im Folgenden beschriebenen Umsetzungen wurde durch die Verwendung eines Wattebausches oder eines perforierten Gefäßverschlusses Sauerstoffzutritt zum Reaktionsgemisch ermöglicht.

Tab. 3-4 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** (40-80 μ mol) mit Frischhefe in einem Zweiphasensystem (Bäckerhefe, 12 g / mmol **3q**, ohne externe Kohlenstoffquelle).

Nr.	$c(\mathbf{3q})^{[a]}$ (mM)	W:A ^[b] (v/v)	Alkan	t (h)	(<i>R</i>)- 2c ^[c] (%)	$ee^{[d]}$ (%)
1	20	100:0	--	24	72	48
2	18	90:10	nC ₆	22	76	63
3	18	50:50	nC ₆	22	45	73
4	18	25:75	nC ₆	22	38	78
5	17 ^[e]	86:14	iC ₆	14+2 ^[f]	69	68
6	18	90:10	iC ₆	24	75	61
7	18	90:10	nC ₇	22	71	61

[a] Berechnet für Gesamtvolumen. — [b] VE-Wasser/Alkan. — [c] Umsatz (GC-MS-Analyse). — [d] CSP-HPLC-Analyse nach Lactonisierung mit TFA. — [e] Endkonzentration. — [f] 14 h Feed.

Bei der Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** in dem Zweiphasensystem *n*-Hexan/Wasser kommt es zu einer deutlichen Verbesserung der Enantioselektivität (Nr. 2-4). Da der ee -Wert mit zunehmendem Anteil der organischen Phase steigt, ist ein Effekt durch eine verteilungsbedingte Verringerung der Substratkonzentration in der wäßrigen Phase wahrscheinlich. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, daß der Anteil des Furanons **18** am *nicht* umgesetzten Substrat, das ausschließlich in der wäßrigen Phase cyclisiert, von 100 % im rein wäßrigen System (Nr. 1) auf bis zu 16 % im Zweiphasensystem zurückgedrängt wird (Nr. 4, GC-MS-Analyse). Nachteilig wirkt sich die Abnahme des Umsatzes in Gegenwart

größerer Mengen *n*-Hexan aus (Nr. 3-4). Bei Limitierung der Substratkonzentration durch kontinuierliche Zugabe einer Lösung des Substrats **3q** in *iso*-Hexan wird gegenüber dem rein wäßrigen System ebenfalls eine deutliche Steigerung des *ee*-Werts erzielt (Nr. 5). Die Natur des Alkans hat keinen nennenswerten Einfluß auf die Enantioselektivität (Nr. 6-7).

Reduktion mit immobilisierter Feuchtzellmasse und Einfluß von Inhibitoren

Durch eine Immobilisierung der Hefe in Calciumalginat^[85] sollte der schädliche Einfluß der organischen Phase auf die Zellen verhindert und somit der Umsatz gesteigert werden. Wie sich herausstellte, bringt dieser Ansatz keine signifikanten Vorteile (Tab. 3-5, Nr. 1-3). Die Anwendung von Saccharose und D-(+)-Gluconolacton zur Unterstützung der zellinternen Coenzym-Regenerierung resultiert nicht in einem höheren Umsatz; stattdessen wird ein gegenteiliger Effekt beobachtet (Nr. 4-5). Eine Wiederverwendung der abfiltrierten und gewaschenen Immobilisate für die Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** war trotz mehrstündiger Regenerierung in Glucose-Lösung – bei der keine CO₂-Bildung beobachtet werden konnte – nicht möglich (<10 % Umsatz). Dies deutet auf eine irreversible Schädigung essentieller Enzymaktivität durch das Substrat **3q** hin.

Tab. 3-5 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** (0.25-0.5 mmol) mit immobilisierter Frischhefe [Bäckerhefe, 12 g / mmol **3q**; 30 % Feuchtzellmasse in Alginat-Perlen (1-3 mm Durchmesser)].

Nr.	$c(\mathbf{3q})^{[a]}$ (mM)	W:A ^[b] (v/v)	Alkan	Additiv (g·L ⁻¹)	$t_{VI}^{[c]}$ (h)	t (h)	(<i>R</i>)- 2c ^[d] (%)	$ee^{[e]}$ (%)
1	20	100:0	--	--	--	6.5	74	49
2	18	90:10	iC ₆	--	--	29	84	61
3	20	0:100	iC ₆	--	--	78	40	75
4	20	100:0	--	Gluconolacton (20)	2	22	49	59
5	18	90:10	iC ₆	Saccharose (100)	0.5	29	66	57
6	18	90:10	iC ₆	ClCH ₂ COOMe (0.7)	1	15	50	66
7	18	90:10	iC ₆	ClCH ₂ COOH (0.7)	1	15	40	72
8	18	90:10	iC ₆	Crotonsäure (3.0)	1	15	53	69
9	18	90:10	iC ₆	Allylbromid (4.0)	3	15	47	57

[a-b] Siehe Tab. 3-4. — [c] Inkubationszeit vor Substratzugabe. — [d] Umsatz (GC-MS-Analyse). — [e] CSP-HPLC-Analyse nach Lactonisierung mit TFA.

Mit der immobilisierten Hefe wurde der Einfluß von Additiven untersucht, für die eine gezielte Inhibierung (*R*)-selektiver Alkoholdehydrogenasen von *S. cerevisiae* in der Literatur beschrieben ist (β -Ketoester-Reduktion; Deskriptorwechsel beachten).^[86] Durch Zusatz von Chloressigsäure, Chloressigsäuremethylester und Crotonsäure kann eine leichte Erhöhung der Enantioselektivität erzielt werden, allerdings kommt es dabei zu deutlichen Umsatzeinbußen (Nr. 6-8). Die Anwendung von Allylbromid ergibt einen schlechteren ee -Wert und wirkt sich überdies negativ auf den Umsatz aus (Nr. 9).

Bei der letztgenannten Reaktion wurden 22 % eines Nebenprodukts gebildet, dem anhand der GC-MS-Analyse die Struktur **35** zugeordnet wurde (Abb. 3-28). Dieses Furanon ließ sich bei allen anderen Ansätzen allenfalls in Spuren nachweisen.

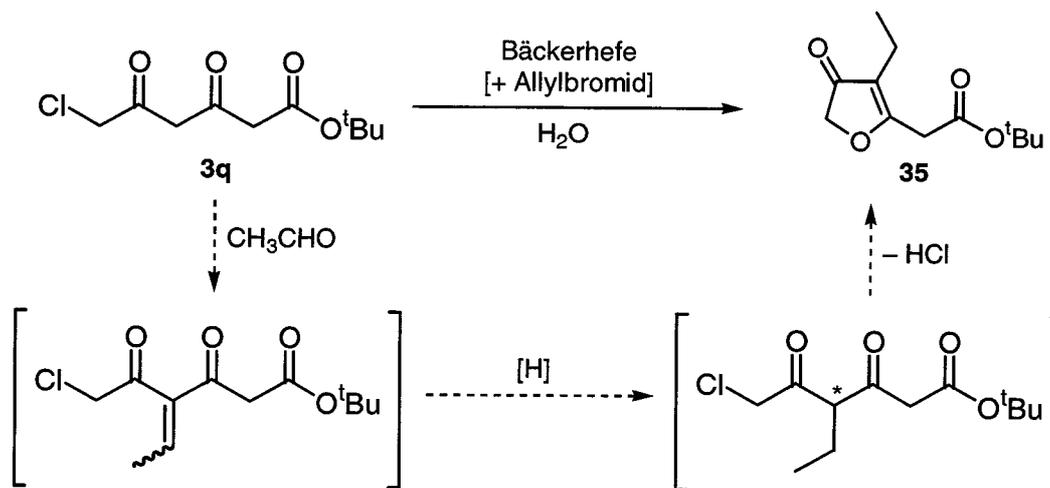


Abb. 3-28 Nebenreaktion bei der Bäckerhefe-Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** in Gegenwart von Allylbromid.

Vermutlich kommt es in Gegenwart von Allylbromid zu einer zellinternen Anreicherung von Acetaldehyd, welcher mit dem C-H-aciden Substrat **3q** im Sinne einer Knoevenagel-Reaktion kondensiert. Die Doppelbindung wird anschließend von der Hefe reduziert, und der so alkylierte β,δ -Diketoester cyclisiert zum Furanon **35** (Abb. 3-28). Sowohl die Bäckerhefe-Reduktion α,β -ungesättigter Carbonylverbindungen als auch die Kondensation von Acetaldehyd mit (cyclischen) β -Diketonen bei versuchter Reduktion mit Bäckerhefe sind bekannt.^[39b, 77] Die abgebildete Alkylierungs-Sequenz (bis zur Cyclisierung) konnte auch bei der Bäckerhefe-Reduktion von α -Cyanoketonen als Nebenreaktion beobachtet werden.^[87]

Reduktion mit lyophilisierter Bäckerhefe ("Trockenhefe")

Lyophilisierte Mikroorganismen haben gegenüber Feuchtzell-Präparationen den praktischen Vorteil, daß sie ohne Aufwand über lange Zeiträume gelagert und leichter gehandhabt werden können. Mehrere Arbeitsgruppen beschreiben außerdem eine Steigerung der Enantioselektivität bei der Reduktion von β -Ketoestern mit minimal rehydratisierter Trockenhefe in organischen Lösungsmitteln.^[88]

Im Vergleich zur Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Frischhefe ergibt eine handelsübliche Trockenhefe ("Windhager", BIO-ZENTRALE GmbH) höhere *ee*-Werte für das Produkt (*R*)-**2c**, auch bei verlängerter Rehydratisierungszeit vor Substratzugabe (Tab. 3-6, Nr. 1-3). Eine Verbesserung des Umsatzes kann nicht beobachtet werden, wobei die angewendeten Hefe/Substrat-Verhältnisse von 5 g/mmol **3q** (Trockenhefe) bzw. 12 g/mmol **3q** (Frischhefe) gemäß Herstellerangaben vergleichbar sind.

Tab. 3-6 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** (40-80 μ mol) mit Trockenhefe (Bäckerhefe).

Nr.	$c(\mathbf{3q})^{[a]}$ (mM)	H:S ^[b]	W:H ^[c]	W:nC ₆ ^[d] (v/v)	Additiv (g·L ⁻¹)	$t_{VI}^{[e]}$ (h)	t (h)	(<i>R</i>)- 2c ^[f] (%)	<i>ee</i> ^[g] (%)
1	20	5	10	100:0	--	--	19	79	69
2	20	5	10	100:0	--	2	19	73	74
3	20	5	10	100:0	--	4	19	72	71
4	20	5	10	100:0	Glucose (100)	2	19	63	74
5	20	10	5	100:0	--	--	19	90 (8)	89

[a] Siehe Tab. 3-4. — [b] Hefe/Substrat-Verhältnis (g/mmol **3q**). — [c] Wasser/Hefe-Verhältnis (mL/g Trockenhefe). — [d] Wasser/*n*-Hexan. — [e] Inkubationszeit vor Substratzugabe. — [f] Umsatz (GC-MS-Analyse); Wert in Klammern: β,δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**27** ($dr_{s:a} \approx 1:1$). — [g] CSP-HPLC-Analyse nach Lactonisierung mit TFA.

Da der Zusatz einer externen Kohlenstoffquelle ebenfalls keinen höheren Umsatz ergibt (Tab. 3-6, Nr. 4), wurde das Hefe/Substrat-Verhältnis verdoppelt. Neben der erwarteten Erhöhung des Umsatzes, der unter diesen Bedingungen quantitativ ist (2 % Furanon **18**), kommt es zu einer deutlichen Steigerung des *ee*-Werts auf 89 % (Nr. 5). Ein Effekt des Hefe/Substrat-Verhältnisses auf die Enantioselektivität der Ketonreduktion wurde bisher nur selten in der Literatur beschrieben.^[69a, 89] Nachteilig wirkt sich der erhöhte Anteil des Doppelreduktionsprodukts *syn/anti*-**27** aus.

Durch Anwendung des Zweiphasensystems *n*-Hexan/Wasser kann der *ee*-Wert nicht weiter erhöht werden (Tab. 3-7, Nr. 1-4), was im Widerspruch zu den Beobachtungen steht, die bei den entsprechenden Umsetzungen mit Frischhefe gemacht wurden. Die Ergebnisse zeigen außerdem, daß die Trockenhefe für eine Aktivierung der maximalen Reduktionskapazität (d. h. für die Erzielung eines maximalen Umsatzes) mit wenigstens 2.5 mL Wasser pro Gramm Trockenhefe rehydratisiert werden muß (vgl. Umsatz Nr. 1-2 mit Umsatz Nr. 3-4). Das Wasser/Hefeverhältnis (2.5 mL·g⁻¹) wurde daher ebenso wie das Hefe/Substratverhältnis (10 g·mmol⁻¹) bei den weiteren Versuchen konstant gehalten. Da das Verhältnis *n*-Hexan/Wasser unter diesen Voraussetzungen nicht mehr beliebig variiert werden kann, mußte für eine weitergehende Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration die eingesetzte Substrat- und Hefemenge bei konstantem Gesamtvolumen des Ansatzes verringert bzw. das Volumen der Hexan-Phase bei konstanter Substrat- und Hefemenge vergrößert werden. Diese Maßnahme sollte außerdem eine potentielle Extraktion des Substrats **3q** durch Adsorption an der Biomasse kompensieren. Tatsächlich läßt sich so die Enantioselektivität weiter erhöhen, allerdings kommt es trotz konstantem Hefe/Substratverhältnis erneut zu einem Absinken des Umsatzes (Nr. 5-6).

Tab. 3-7 Reduktion des β,δ-Diketoesters **3q** (40-80 μmol) mit Trockenhefe (Bäckerhefe) in einem Zweiphasensystem.

Nr.	<i>c</i> (3q) ^[a] (mM)	H:S ^[b]	W:H ^[c]	W:nC ₆ ^[d] (v/v)	Additiv (g·L ⁻¹)	<i>t</i> _{VI} ^[e] (h)	<i>t</i> (h)	(<i>R</i>)- 2c ^[f] (%)	<i>ee</i> ^[g] (%)
1	20	10	4.5	90:10	--	--	19	89 (8)	80
2	20	10	2.5	50:50	--	--	21	89 (10)	89
3	20	10	1.8	35:65	--	--	19	78 (4)	88
4	20	10	1.0	20:80	--	--	21	72	88
5	10	10	2.5	25:75	--	--	19	67	92.0
6	5	10	2.5	13:87	--	--	19	62	93.0
7	20	10	2.5	50:50	Crotonsäure (3.0)	--	21	92 (6)	90.0
8	20	10	2.5	50:50	Crotonsäure (3.0)	1	19	90	90.0
9	20	10	2.5	50:50	Crotonsäure (3.0)	2	24	90	89
10	20	10	2.5	50:50	Crotonsäure (4.5)	1	18	80	90.0
11	20	10	2.5	50:50	Crotonsäure (6.0)	1	18	74	90.5
12	20	10	2.5	50:50	ClCH ₂ COOH (0.7)	1	24	77	89

[a-g] Siehe Tab. 3-6.

Es wurde daher versucht, nicht über die Substratkonzentration, sondern durch Anwendung von Inhibitoren eine Steigerung der Enantioselektivität zu erzielen. Ein Zusatz von Crotonsäure und Chloressigsäure ergibt diesbezüglich jedoch keine nennenswerte Verbesserung (Tab. 3-7, Nr. 7-12). Wie schon bei den Umsetzungen mit immobilisierter Frischhefe beobachtet wurde, wirken sich diese Additive außerdem negativ auf den Umsatz aus.

Die Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Trockenhefen anderer Anbieter resultiert allgemein in niedrigerer Enantioselektivität und geringerem Umsatz (Tab. 3-8, Nr. 1-6). Auffällig ist der hohe Anteil des Doppelreduktionsprodukts *syn/anti-27* bei Verwendung des Lyophilisats der Firma ICN (Nr. 5-6).

Tab. 3-8 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** (40 μ mol, 20 mM) mit Trockenhefe (*S. cerevisiae*).

Nr.	Hefe	H:S ^[a] (g·mmol ⁻¹)	W:H ^[b] (mL·g ⁻¹)	W:nC ₆ ^[c] (v/v)	<i>t</i> (h)	(<i>R</i>)- 2c ^[d] (%)	<i>ee</i> ^[e] (%)
1	Sigma ("Type 2")	5	10	100:0	19	52	51
2		10	2.5	50:50	19	84 (11)	72
3		10	1.0	20:80	19	72 (7)	77
4	ICN ("dried active")	5	10	100:0	22	69	44
5		10	2.5	50:50	22	69 (30)	78
6		10	1.0	20:80	22	70 (17)	78

[a] Hefe/Substrat-Verhältnis (g / mmol **3q**). — [b] Wasser/Hefe-Verhältnis (mL / g Trockenhefe). — [c] Wasser/*n*-Hexan. — [d] Umsatz (GC-MS-Analyse); Werte in Klammern: β,δ -Dihydroxyester *syn/anti-27* ($dr_{sa} \approx 1:1$). — [e] CSP-HPLC-Analyse nach Lactonisierung mit TFA.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei der Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Trockenhefe die Anwendung des Zweiphasensystems *n*-Hexan/Wasser gegenüber dem rein wäßrigen Medium keinen praktischen Vorteil bringt. Zwar kann die Enantioselektivität durch Verringerung der Substratkonzentration von 89 % auf 93 % *ee* gesteigert werden, jedoch wird dieser Vorteil unter praktischen Gesichtspunkten durch die Verringerung der Produktivität überkompensiert.

Die Substratkonzentration wurde daher in einer weiteren Versuchsreihe nicht durch eine Verteilung in einem Zweiphasensystem, sondern durch eine Dosierstrategie kontrolliert. Dazu wurde das Substrat **3q** über einen Zeitraum von sechs Stunden in 24 Einzelportionen zu einer wäßrigen Zellsuspension pipettiert. Mit dieser Methode gelingt es, bei quantitativem Umsatz einen *ee*-Wert von 92 % zu erzielen (Tab. 3-9, Nr. 1).

Tab. 3-9 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** (0.25 mmol, kontinuierliche Dosierung) mit Trockenhefe (*S. cerevisiae*).

Nr.	$c(\mathbf{3q})^{[a]}$ (mM)	H:S ^[b] (g·mmol ⁻¹)	W:H ^[c] (mL·g ⁻¹)	W:nC ₆ ^[d] (v/v)	Feed ^[e] ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)	t (h)	(<i>R</i>)- 2c ^[f] (%)	ee ^[g] (%)
1	20	10	5	100:0	16.7	6+16	88 (10)	92.0
2	20	10	2.5	50:50	16.7	6+1	79 (7)	92.5
3	20	10	2.5	50:50	7.3	14+2	59 (6)	94.0

[a] Endkonzentration. — [b-d] siehe Tab. 3-6. — [e] Mikromol Substrat **3q** pro Stunde und Gramm Trockenhefe. — [f-g] siehe Tab. 3-6.

Während der Dosierung konnte beobachtet werden, daß sich das Substrat nur zögerlich auflöste, obwohl der Umsatz in Lösung zu jedem Zeitpunkt größer als 90 % war (GC-MS-Analyse). Nach anfänglich hoher Enantioselektivität (95.0 % ee , 3 h) sank der ee -Wert im weiteren Verlauf merklich ab (93.0 % ee , 8 h; 92.0 % ee , 22 h). Dieses Phänomen kann eventuell auf eine enantiomerdifferenzierende enzymatische Reduktion des Produkts (*R*)-**2c** zum β,δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**27** zurückgeführt werden. Tatsächlich ist die kinetische Racematspaltung von δ -Hydroxy- β -ketoestern und δ -Alkoxy- β -ketoestern durch enantiomerdifferenzierende Reduktion mit Bäckerhefe aus der Literatur bekannt.^[90]

Durch Anwendung einer Hexan-Phase sollte der Übergang des Substrats **3q** in die wäßrige Phase zusätzlich verzögert und die potentielle enzymatische Folgereaktion durch Extraktion des Produkts (*R*)-**2c** zurückgedrängt werden. Dieser Ansatz führt nicht zu einer signifikanten Erhöhung des ee -Werts (Tab. 3-9, Nr. 2). Erst durch Verringerung der Dosierrate kann eine Steigerung auf 94 % ee erzielt werden, wobei sich der Umsatz allerdings erneut verschlechtert (Nr. 3). MEDSON et al. berichteten nach Abschluß der eigenen Untersuchungen, daß bei der β -Ketoester-Reduktion mit minimal rehydratisierter Trockenhefe in *n*-Hexan ein Zeitfenster von zwölf Stunden eingehalten werden muß, außerhalb dessen die Hefezellen keine Reduktionskapazität mehr aufweisen.^[91] Die Substratdosierung kann daher ohne eine Optimierung der Überlebensbedingungen der Hefezellen (Katalysatorstandzeit) nicht beliebig langsam gewählt werden.

Einsatz eines Adsorberharzes (Amberlite XAD-7)

In einer abschließenden Untersuchung zur Optimierung der Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Bäckerhefe wurde geprüft, ob sich eine effektive Kontrolle der Substratkonzentration durch Anwendung einer festen organischen Phase realisieren läßt. Dazu wurde das Substrat **3q** an das schwach polare Adsorberharz Amberlite XAD-7 adsorbiert und das beladene Harz in einem Schüttelkolben zu einer wäßrigen Zellsuspension gegeben. Der δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2c** wird unter diesen Bedingungen mit 94.0 % *ee* gebildet, wobei der Umsatz nahezu quantitativ ist (Abb. 3-29).

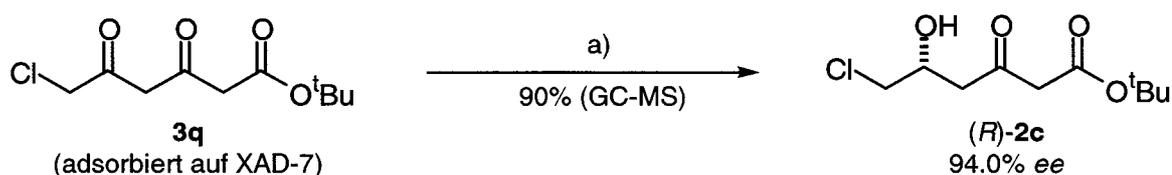


Abb. 3-29 Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Trockenhefe (*S. cerevisiae*) in dem Zweiphasensystem XAD-7 / Wasser. — a) **3q** (20 mM, 18%ig auf XAD-7), Trockenhefe (10 g / mmol **3q**), H₂O, 20 h, 20°C.

Die Anteile der Nebenprodukte *syn/anti*-**27** (Doppelreduktionsprodukt) und **18** (Furanon) am Rohprodukt fallen mit 6 % bzw. 2 % niedrig aus. Bei einem präparativen Reaktionsansatz (8.5 mmol) wurde das Produkt (*R*)-**2c** nach Extraktion des Adsorberharzes und Chromatographie an Kieselgel in einer Ausbeute von 50 % erhalten (94.0 % *ee*). Durch Extraktion der Zellen und der wäßrigen Phase ließ sich die Ausbeute nicht weiter steigern.

Die Anwendung der festen organischen Phase gestattet eine einfache Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, da sich Adsorberharz und Hefezellen aufgrund des Größenunterschieds der Partikel leicht durch Filtration trennen lassen. Das Produkt (*R*)-**2c** wird unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen kaum durch Zellbestandteile kontaminiert.

Bei präparativen Umsetzungen des β,δ -Diketoesters **3q** (2-22 mmol) im zweiphasigen Reaktionsmedium *n*-Hexan/Wasser (Ansatz nach Tab. 3-9, Nr. 2) kam es demgegenüber durch Emulsionsbildung zu erheblichen Aufarbeitungsproblemen, so daß die isolierte Ausbeute auf 21-34 % beschränkt blieb. Das organische Lösungsmittel setzt aus den Zellmembranen der Hefe große Mengen langkettiger Fettsäuren frei, die die Produktisolierung erschweren. Der erzielte Enantiomerenüberschuß lag mit 90.0-91.5 % *ee* außerdem unter dem Wert des entsprechenden Ansatzes im analytischen Maßstab (92.5 % *ee*; Tab. 3-9, Nr. 2). Diese Reaktions-

führung ist für Umsetzungen im Gramm-Maßstab daher weniger gut geeignet. Der Einsatz des Adsorberharzes Amberlite XAD-7 weist somit gegenüber dem Zweiphasensystem *n*-Hexan/Wasser eine Reihe bemerkenswerter Vorteile auf: Die Enantioselektivität bleibt bei der Maßstabsvergrößerung reproduzierbar hoch, die vereinfachte Aufarbeitung resultiert in einer höheren Ausbeute, und das Rohprodukt fällt mit höherer Reinheit an.

Der δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2c** wurde nach Natriumborhydrid-Reduktion in das α,β -ungesättigte δ -Lacton (*R*)-**19c** überführt. Von diesem Lacton wurden im Rahmen einer Kooperation Gramm-Mengen für eine geplante Synthese des zytotoxischen Polyketids Callystatin A bereitgestellt (Abb. 3-30).^[92]

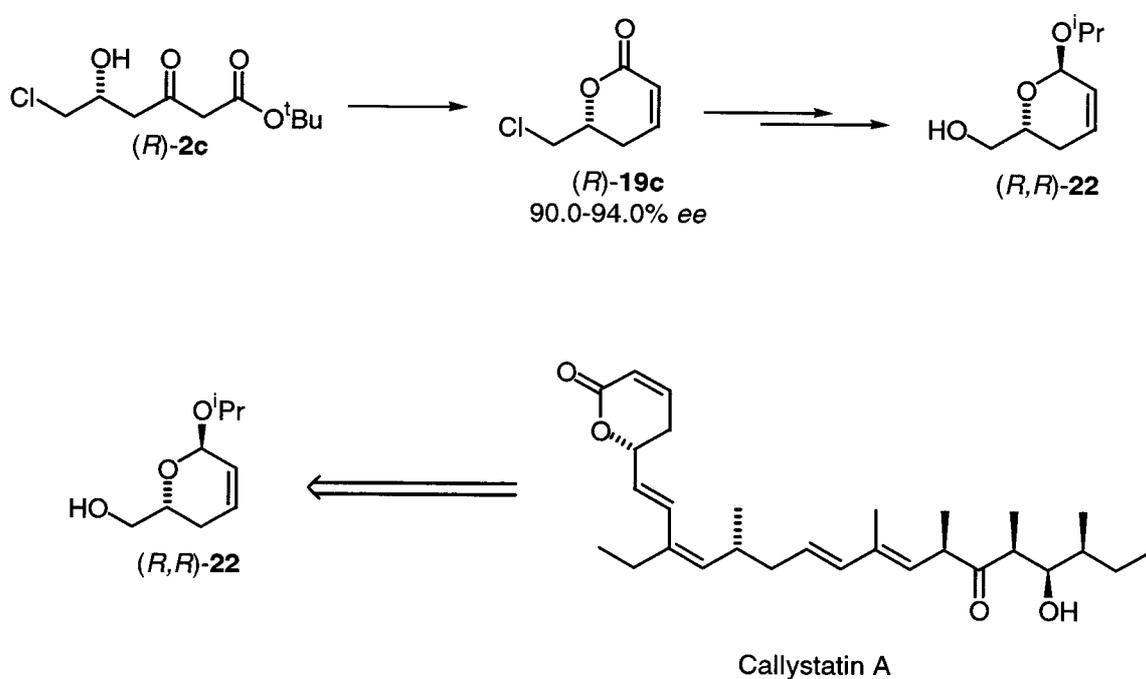


Abb. 3-30 δ -Lacton (*R*)-**19c** als Baustein für eine geplante Synthese von Callystatin A (siehe auch Abb. 3-8, Seite 33, und Tab. 3-3, Seite 31).

Fazit

Der chlorierte β,δ -Diketoester **3q** wird durch Bäckerhefe regio- und enantioselektiv zum δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2c** reduziert. Die Enantioselektivität dieser Ganzzelltransformation ist in hohem Maße von der Reaktionsführung abhängig, wobei vor allem die Substratkonzentration und das Hefe/Substrat-Verhältnis kritische Parameter sind. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte der Enantiomerenüberschuß des Produkts (*R*)-**2c** von 41 % auf 94 % *ee* erhöht werden, was einer Steigerung des Enantiomerenverhältnisses um den Faktor 13.5 entspricht. Besonders vorteilhaft ist bei dieser Reaktion die Anwendung eines Adsorbharzes als feste organische Phase in einem Zweiphasensystem. Neben einer effektiven Kontrolle der Substratkonzentration wird so die Produktisolierung erheblich vereinfacht. Die Reaktion kann bei niedrigem technischen Aufwand und unter milden Bedingungen in einem präparativ wertvollen Maßstab durchgeführt werden. Bei einer weiteren Optimierung dieses Systems sollte eine Erhöhung der Reduktionskapazität der Hefezellen im Vordergrund stehen (Erhaltung der Katalysatoraktivität).

Der deutliche Einfluß der Substratkonzentration auf die Enantioselektivität dieser Reduktion weist auf die Beteiligung mehrerer Enzyme der Bäckerhefe mit Aktivität für die δ -Keto-Gruppe des β,δ -Diketoesters **3q** hin. Um den Komplikationen einer solchen Multienzym-Ganzzelltransformation aus dem Wege zu gehen, bietet es sich an, diese Enzyme zu identifizieren und durch gentechnische Methoden im großen Maßstab verfügbar zu machen. Tatsächlich sind viele Alkoholdehydrogenasen der Bäckerhefe unter zellfreien Bedingungen stabil genug für präparative Umsetzungen.^[78] RODRÍGUEZ et al. berichteten unlängst über die Expression zweier *S. cerevisiae*-Reduktase-Gene in *E. coli*.^[93] Für Anwendungen in der organischen Synthese ist jedoch die außerordentlich günstige und in großen Mengen erhältliche Zellmasse dieser Hefe zur Zeit noch die Quelle der Wahl.

4 Die Folgechemie: β,δ -Dihydroxyester

4.1 Einleitung

Chirale β -Hydroxyketone sind gut geeignete Ausgangsverbindungen für die Synthese optisch aktiver 1,3-Diole. Durch hoch diastereoselektive Reduktion der Ketogruppe (1,3-Induktion) sind sowohl *syn*- als auch *anti*-konfigurierte 1,3-Diole zugänglich.^[2a] Eine häufig verfolgte Strategie für die *syn*-selektive Reduktion besteht in der vorgelagerten Ausbildung eines Chelatkomplexes, der durch intermolekularen Hydridtransfer von der weniger gehinderten Seite angegriffen wird (Abb. 4-1, Gl. 1).^[94] Nach NARASAKA und PAI läßt sich die Chelatisierung effektiv mit Alkylboranen herbeiführen. Die Reduktion erfolgt anschließend mit Natriumborhydrid.^[94a]

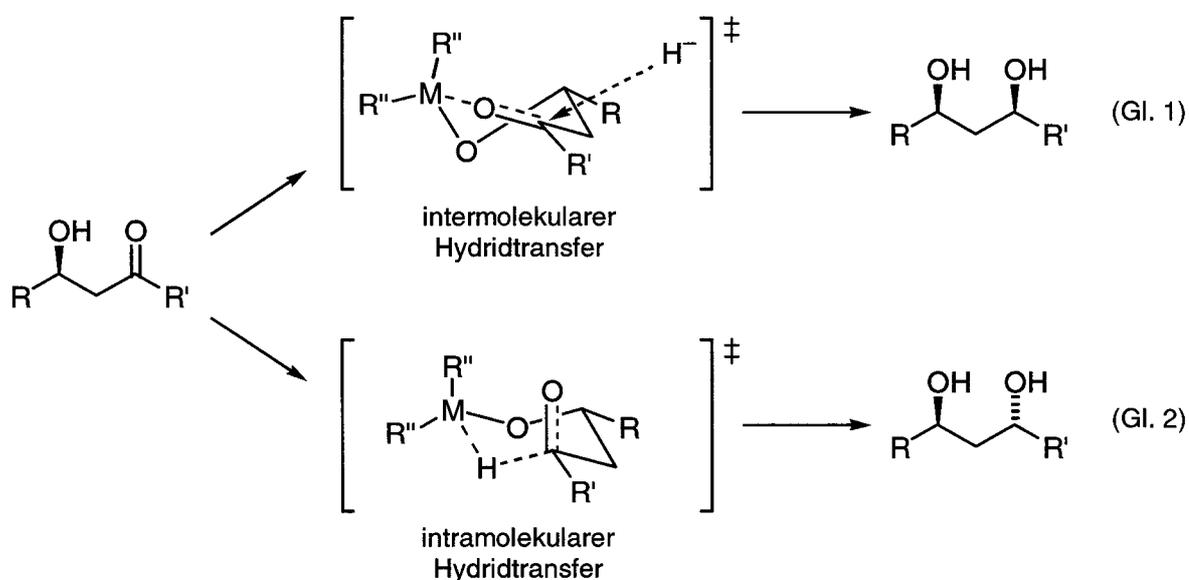


Abb. 4-1 Diastereoselektive Reduktion von β -Hydroxyketonen.

Durch einen intramolekularen Hydridtransfer werden hingegen *anti*-konfigurierte 1,3-Diole diastereoselektiv erhalten (Abb. 4-1, Gl. 2).^[95] Entscheidend dabei ist, daß das Hydridübertragende Reagenz erst durch Bindung an die Hydroxylgruppe des Substrats aktiviert wird. Wie SAKSENA et al. und parallel dazu auch GRIBBLE und Mitarbeiter zeigen konnten, bietet das System Natriumborhydrid/Essigsäure hierfür die geeigneten Voraussetzungen.^[96] EVANS et al. charakterisierten später Triacetoxyborhydride als reaktive Spezies dieser Reduktion und nutzten die Methode zur *anti*-selektiven Reduktion acyclischer β -Hydroxyketone.^[95a,b]

Ausgehend von den enzymatisch produzierten δ -Hydroxy- β -ketoestern (*S*)-**2c** und (*R*)-**2c** sollten durch diastereoselektive Borhydrid-Reduktionen alle vier Stereoisomere des entsprechenden β,δ -Dihydroxyesters *syn/anti*-**27** dargestellt werden. Die *syn*-selektive Reduktion des chlorierten δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**2c** war zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits aus der Patentliteratur bekannt.^[13k] Präzise Angaben über die Diastereoselektivität können dem Patent nicht entnommen werden, da das Rohprodukt diesbezüglich nicht analysiert wurde. Auch das kristallisierte Produkt, β,δ -Dihydroxyester *syn*-(*3R,5S*)-**27**, wurde nur spärlich charakterisiert (Schmelzpunkt).

Der β,δ -Dihydroxyester *syn*-(*3R,5S*)-**27** ist ein wertvolles chirales Intermediat in der Synthese von Vastatinen. Nach zweistufigem Cl/OH-Austausch auf Stufe des Acetonids läßt sich der resultierende primäre Alkohol zum Aldehyd *syn*-(*3R,5S*)-**36**ⁱ oxidieren, welcher anschließend olefiniert werden kann (Abb. 4-2).^[13e,k,q, 24c, 97]

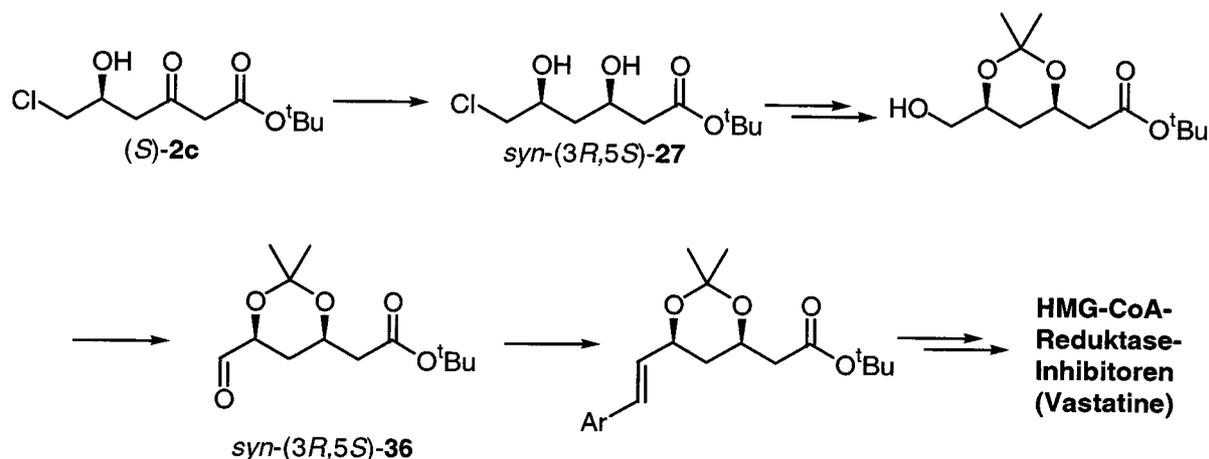


Abb. 4-2 Synthesestrategie für HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren nach SQUIBB & SONS Inc. und HOECHST AG (Ar = Aryl).^[13e,k]

ⁱ Der Übersichtlichkeit halber werden bei den hier und im Folgenden beschriebenen Acetoniden sowohl die Nummerierung der Kohlenstoffatome als auch die *syn/anti*-Deskriptoren der entsprechenden acyclischen β,δ -Dihydroxyester übernommen.

Eigene Ergebnisse und Diskussion

4.2 Diastereoselektive Reduktion

Durch *syn*-selektive Natriumborhydrid-Reduktion wurden die chlorierten δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** und (*R*)-**2c** in die enantiomeren β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** und *syn*-(3*S*,5*R*)-**27** überführt (Abb. 4-3, Tab. 4-1). Die vorgelagerte Chelatisierung erfolgte nach PRASAD et al. mit Methoxydiethylboran.^[94c] Um eine hohe Diastereoselektivität zu gewährleisten, ist bei der Zugabe des Reduktionsmittels auf eine möglichst tiefe Reaktionstemperatur zu achten. Die Reduktion mit Natriumborhydrid ist exotherm, so daß besonders größere Ansätze intensiv gekühlt werden müssen. Nach oxidativer Aufarbeitung mit Wasserstoffperoxid fielen die Produkte *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** und *syn*-(3*S*,5*R*)-**27** in quantitativer Ausbeute und mit hohem Diastereomerenüberschuß an ($dr_{s:a} = 28:1$ bis 45:1).

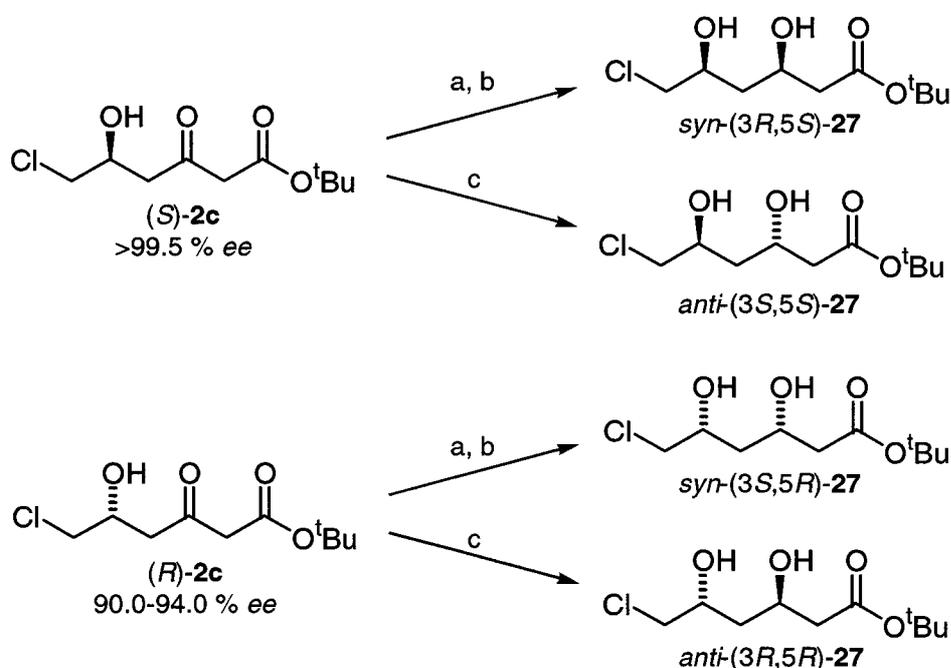


Abb. 4-3 Diastereoselektive Reduktion der δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** und (*R*)-**2c**. — a) 1. B(OMe)Et₂, THF/MeOH, -78°C, 20 min; 2. NaBH₄, -78°C, 3 h. — b) 1. H₂O₂, THF/H₂O, 0°C→RT, 30 min; 2. Kristallisation. — c) 1. Me₄NB(OAc)₃H, MeCN/AcOH, -25°C, 5 h; 2. Kristallisation

Die Reduktion mit kommerziell erhältlichem Tetramethylammoniumtriacetoxylborhydrid in Acetonitril/Essigsäure ergab erwartungsgemäß die *anti*-konfigurierten β,δ -Dihydroxyester *anti*-(3*S*,5*S*)-**27** und *anti*-(3*R*,5*R*)-**27** (Abb. 4-3, Tab. 4-1). Obwohl die empfohlene Reaktionstemperatur von -40°C^[95a,b] nicht eingehalten werden konnte (das Reaktionsgemisch erstarrte

bereits bei -25°C), wurden die Produkte *anti*-(3*S*,5*S*)-**27** und *anti*-(3*R*,5*R*)-**27** mit hohem Diastereomerenüberschuß erhalten ($dr_{\text{a:s}} = 14:1$ bis $18:1$).

Tab. 4-1 Diastereoselektive Borhydrid-Reduktionen der Hydroxyketoester (*S*)-**2c** und (*R*)-**2c**.

Produkt	Ansatz (mmol)	$dr_{\text{s:a}}$ ^[a]	ee ^[a] (%)	Ausb. ^[b] (%)	$\delta(\text{C})$ in ppm	
					$\text{C}_{\beta}, \text{C}_{\delta}$	$\text{C}(\text{Me})_2$ ^[c]
<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 27	86-217	205:1 (28:1)	>99.5	62	68.4, 71.6	99.2, 19.7, 29.8
<i>syn</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 27	3-12	187:1 (45:1) ^[d]	98.0 (90.5) ^[d]	52		
<i>anti</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)- 27	3	1:211 (1:14)	>99.5	70		
<i>anti</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 27	1-4	1:316 (1:18)	99.3 (94.0)	68	65.5, 68.9	101.1, 24.6, 24.7

[a] Bestimmt durch CSP-GC auf Stufe der Acetonide *syn/anti*-**37**; Werte in Klammern: Rohprodukt. — [b] Nach Kristallisation. — [c] NMR-Daten der Acetonide *syn/anti*-**37**. — [d] $Ee >99.5\%$ und $dr_{\text{s:a}} >400:1$ nach erneuter Kristallisation.

Bei den β,δ -Dihydroxyestern *syn*-**27** und *anti*-**27** handelt es sich um Feststoffe. Nach einmaliger Kristallisation aus *n*-Hexan/Ethylacetat erhöhte sich das Diastereomerenverhältnis $dr_{\text{s:a}}$ bzw. $dr_{\text{a:s}}$ auf $\geq 187:1$. Vorteilhafterweise werden durch diese Prozedur nicht nur die unerwünschten Diastereomere sondern auch die Unterschußenantimere abgetrennt, so daß die Zielverbindungen praktisch stereoisomerenrein anfallen (Tab. 4-1).

Die relative Konfiguration der Produkte wurde durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestätigt. Diastereomere 1,3-Diole weisen aufgrund unterschiedlicher Vorzugskonformationen bekannte diagnostische Kernresonanz-Phänomene auf. So resonieren die Carbinol-Kohlenstoffkerne *syn*-konfigurierter 1,3-Diole prinzipiell bei tieferem Feld als die entsprechenden Kerne der *anti*-Diastereomere. ^[94b,c, 98] Dieser Trend kann auch bei den hier beschriebenen β,δ -Dihydroxyestern *syn/anti*-**27** beobachtet werden (Tab. 4-1). Ebenfalls von diagnostischen Wert sind die ^{13}C -Kernresonanzen der entsprechenden Acetonide *syn/anti*-**37**. Die für die Isopropylidengruppe beobachteten Verschiebungen stimmen mit den erwarteten Werten von 20 ppm, 30 ppm, <100 ppm (*syn*-1,3-Diol-Acetonide) bzw. 25 ppm, 25 ppm, >100 ppm (*anti*-1,3-Diol-Acetonide) überein. ^[99]

Die Bestimmung der Stereoisomerenzusammensetzung erfolgte nach Überführung analytischer Proben *syn/anti*-**27** in die Acetonide *syn/anti*-**37** (Abb. 4-4). Durch Gaschromatographie an chiraler Phase lassen sich alle vier Stereoisomere dieser Verbindung in einem Lauf trennen

(FS-Cyclodex beta-1/P). Die so bestimmten *ee*-Werte der Rohprodukte *syn/anti*-**27** (siehe *Tab. 4-1*) stimmen sehr gut mit den Daten überein, die für die Hydroxyketoester (*S*)-**2c** und (*R*)-**2c** durch CSP-HPLC auf der Stufe des δ -Lactons **19c** ermittelt wurden.

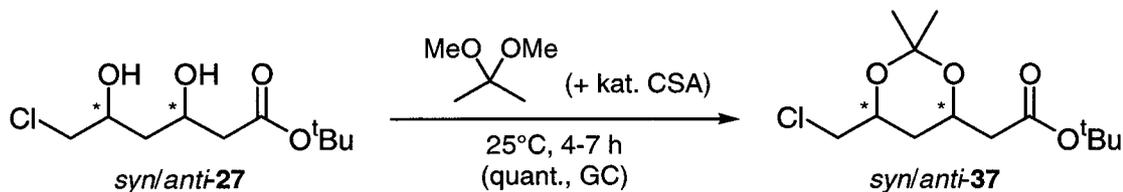


Abb. 4-4 Derivatisierung der β,δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**27** zur Bestimmung der Stereoisomerenzusammensetzung mittels CSP-GC.

Durch Kombination der enantiokomplementären enzymatischen Reduktionen mit den hier beschriebenen diastereoselektiven Borhydrid-Reduktionen sind somit alle vier Stereoisomere des chlorierten β,δ -Dihydroxyesters *syn/anti*-**27** stereoselektiv und in nur zwei Schritten aus dem achiralen β,δ -Diketoester **3q** erhältlich.

4.3 Diastereomerentrennung durch diastereomerdifferenzierende Acetonid-Hydrolyse

Die Mutterlaugen aus der Kristallisation des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** enthalten typischerweise noch beachtliche Mengen ebendieser Verbindung mit hohem Diastereomerenüberschuß (Epimerengemisch, $dr_{s:a}$ bis zu 9:1). Diese Chargen sind aufgrund der angereicherten Verunreinigungen nur schwierig erneut zur Kristallisation zu bringen. Andererseits konnten (*5R*)-Stereoisomere des β,δ -Dihydroxyesters *syn/anti*-**27** trotz einer möglichen Anreicherung durch die Kristallisation nicht nachgewiesen werden, so daß es sich bei diesen Rückständen um einen wertvollen optisch aktiven Rohstoff handelt [$>99.5\%$ ee (C-5)]. Eine mögliche Verwendung besteht in der Synthese des chlorierten α,β -ungesättigten δ -Lactons (*R*)-**19c** (siehe Abb. 3-8, Seite 33), das auf diesem Wege für eine Kooperation im Gramm-Maßstab bereitgestellt wurde. Die präparative chromatographische Trennung der Diastereomere *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** und *anti*-(3*S*,5*S*)-**27** ist demgegenüber aufgrund der nahezu identischen R_f -Werte nicht praktikabel. Auch nach Überführung in die entsprechenden Acetonide *syn/anti*-**37** konnte keine effektive Trennung durch Chromatographie erreicht werden.

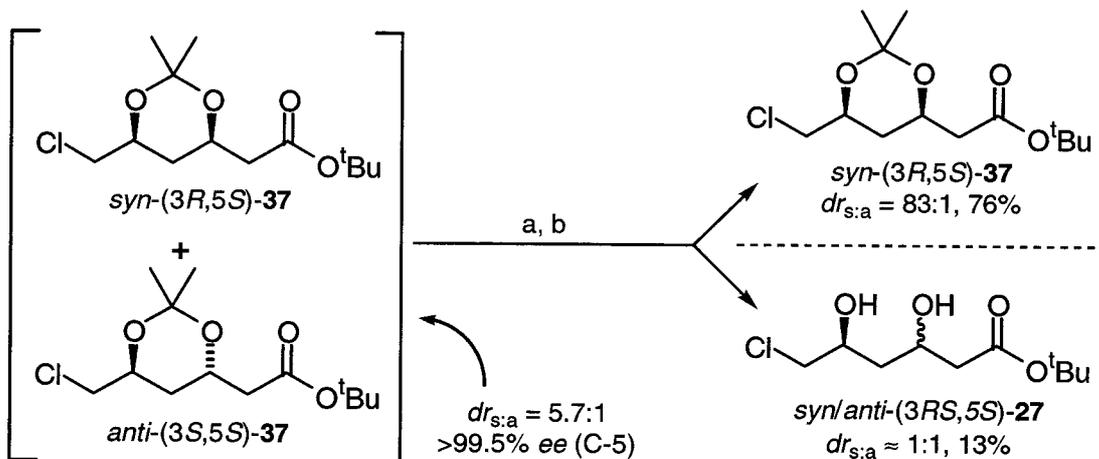


Abb. 4-5 Trennung der Diastereomere *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** und *anti*-(3*S*,5*S*)-**37**. — a) kat. HCl , CH_2Cl_2 , 20°C , 4 h. — b) Flashchromatographie (SiO_2).

Bei der katalytischen Abspaltung der Acetonid-Schutzgruppe in einem zweiphasigen System Dichlormethan/Salzsäure konnte beobachtet werden, daß das Acetonid *anti*-(3*S*,5*S*)-**37** erheblich schneller abreagiert als das Diastereomer *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** (GC-MS-Analyse). Durch vorzeitigen Abbruch der Reaktion wird auf diese Weise ein Produktgemisch erhalten, das aus

dem β,δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**27** (Epimerengemisch) und dem angereicherten *syn*-Stereoisomer des Acetonids **37** besteht (Abb. 4-5). Der große Polaritätsunterschied erlaubt eine einfache Trennung durch Flashchromatographie an Kieselgel. So ließen sich mit einer vergleichsweise kleinen Trennsäule (6 cm Ø, 0,27 kg SiO₂) 24,9 g des Substanzgemisches ohne Mischfraktion auftrennen. Die Ausbeute für das Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** betrug in diesem Fall 76 %. Wird bei der Berechnung der Ausbeute nur der Anteil des *syn*-Diastereomers am Edukt berücksichtigt, ergibt sich ein Wert von 90 %. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Verfahren zur reaktiven Aufarbeitung der nicht kristallisierbaren Mutterlaugen-Rückstände aus der *syn*-selektiven Reduktion des δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**2c** entwickelt (Abb. 4-6).

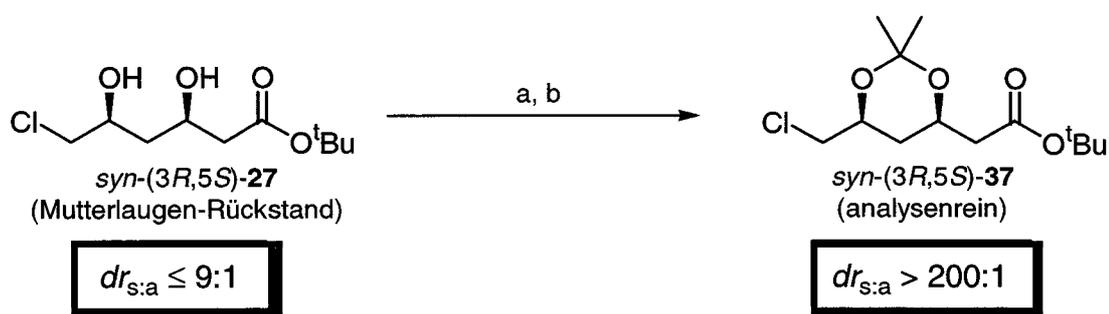


Abb. 4-6 Reaktive Aufarbeitung der Mutterlaugen-Rückstände aus der Synthese des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27**. — a) 1. 2,2-Dimethoxypropan, kat. CSA, Aceton, 20°C, 1,5 h; 2. kat. HCl, CH₂Cl₂, 20°C, gaschromatographische Reaktionskontrolle. — b) Filtration durch SiO₂.

Dazu werden diese mit 2,2-Dimethoxypropan behandelt und nach Einengen der Reaktionslösung der diastereomerdifferenzierenden Acetonid-Hydrolyse unterworfen. Die Reaktion wird gaschromatographisch verfolgt und zum geeigneten Zeitpunkt durch Neutralisation des Katalysators abgebrochen (Ausschütteln mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung). Die Abtrennung des angereicherten Acetonids erfolgt durch Flashchromatographie oder einfache Filtration durch Kieselgel, wobei gleichzeitig die polaren Verunreinigungen aus der Borhydrid-Reduktion entfernt werden. Die Ausbeute liegt typischerweise bei 60-80 %, das Diastereomenverhältnis *syn/anti* bei >200:1. Diese Werte sind abhängig von der Qualität des Ausgangsmaterials und von der Reaktionsdauer.

Mit dem beschriebenen Verfahren kann somit aus den nicht kristallisierenden Mutterlaugenrückständen der *syn*-selektiven Borhydrid-Reduktion ein Großteil des Produktes *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** in Form des Acetonids *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** abgetrennt werden. Eine chromatographische Diastereomerentrennung ist nicht notwendig, so daß sich das Verfahren bequem im De-

kogramm-Maßstab ausführen läßt. Die Methode ist überdies auf den Benzyloxy-substituierten β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**29** übertragbar. Nach Ketalisierung, diastereomerendifferenzierender Hydrolyse und Flashchromatographie an Kieselgel wurde das Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**38** mit 77 % Ausbeute und einem Diastereomerenverhältnis $dr_{s:a}$ von größer als 400:1 erhalten (Abb. 4-7). Bezogen auf den Anteil an eingesetztem *syn*-Diastereomer beträgt die Ausbeute 88 %.

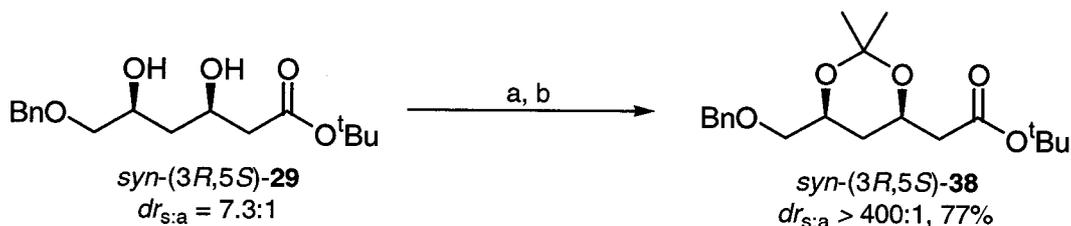


Abb. 4-7 Diastereomerentrennung durch selektive Acetonid-Hydrolyse. — a) siehe Abb. 4-6. — b) Flashchromatographie (SiO₂).

1,3-Diol-Acetonide (1,3-Dioxane) nehmen in Abhängigkeit von der relativen Konfiguration der Carbinol-Kohlenstoffatome unterschiedliche Vorzugskonformationen ein (Abb. 4-8).^[99] Ursache hierfür ist das Bestreben der Substituenten R und R' äquatoriale Positionen zu besetzen, um 1,3-diaxialen Wechselwirkungen mit den Ketal-Methylgruppen aus dem Wege zu gehen. Nur im Fall der *syn*-1,3-Diol-Acetonide läßt sich dieses Bestreben mit der günstigen Sessel-Konformation (**A**) vereinbaren, während die Acetonide *anti*-konfigurierter 1,3-Diole in eine thermodynamisch benachteiligte Twist-Konformation (**B**) gezwungen werden. Die bereits erwähnten ¹³C-Kernresonanz-Phänomene der Ketal-Methylgruppen beruhen auf der unterschiedlichen Symmetrie dieser beiden Konformationen.^[99a,c]

Der Einfluß der unterschiedlichen Ringgeometrien auf die erhöhte Reaktivität des *anti*-Diastereomers geht hier jedoch eventuell über einen alleinigen Ringspannungseffekt hinaus, da die Hydrolysegeschwindigkeit von konformativ fixierten Acetalen/Ketalen auch von stereoelektronischen Effekten abhängt.^[100, 101] Tatsächlich steht in der Sessel-Konformation (**A**) – im Gegensatz zur Twist-Konformation (**B**) – je ein freies Elektronenpaar beider Ring-Sauerstoffatome antiperiplanar zur jeweils gegenüberliegenden C–O-Ketalbindung, so daß hier eine zweifache Stabilisierung durch (n_O → σ*_{C–O})-Wechselwirkung möglich ist (Abb. 4-8).^[100]

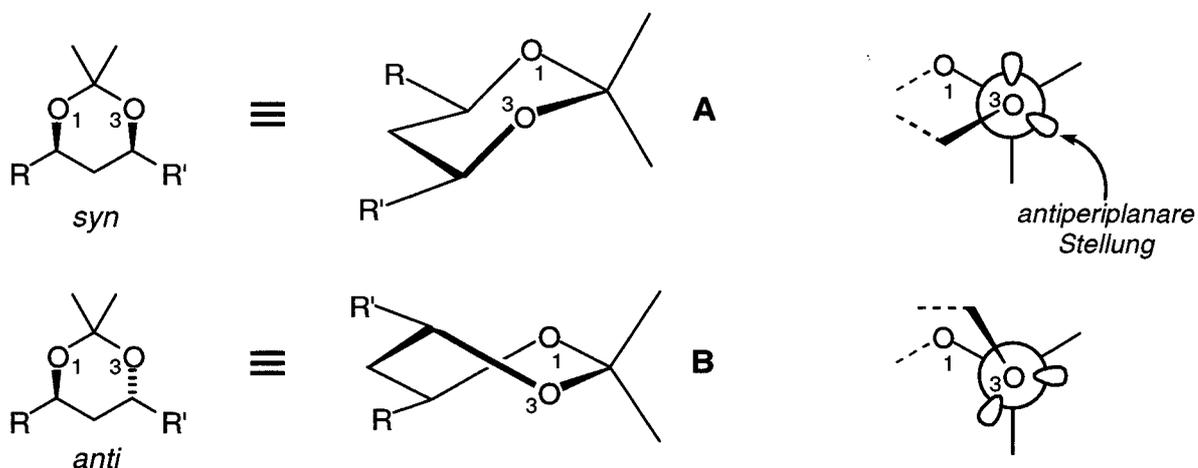


Abb. 4-8 Vorzugskonformationen von *syn*- und *anti*-1,3-Diol-Acetoniden (A: Sessel-Konformation, B: Twist-Konformation). Rechts: Newman-Projektion entlang einer C-O-Ketalbindung.

In der Literatur lassen sich mehrere Hinweise auf die unterschiedliche Reaktivität diastereomerer 1,3-Diole bzw. der entsprechenden Ketale und Acetale finden.^[23e, 48b, 102] So ist beispielsweise bekannt, daß das Acetonid des *anti*-2,4-Pentandiols in verdünnter Salzsäure 26fach schneller hydrolysiert als das Acetonid des *syn*-2,4-Pentandiols.^[102a] Eine Methode zur Trennung von *syn*- und *anti*-1,3-Diolen aus Gemischen derselben, die auf der unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeit der entsprechenden Ketale oder Acetale beruht, wurde bisher nicht beschrieben.

4.4 Nucleophile Substitution

In konvergenten Naturstoffsynthesen finden häufig 1,3-Diol-Bausteine mit terminaler Iod- oder Epoxidfunktion Anwendung, da sich diese gut mit Kohlenstoff-Nucleophilen unter C-C-Bindungsknüpfung umsetzen lassen.^[2] Es wurde daher am Beispiel des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** untersucht, ob sich die Chlorfunktion diesbezüglich manipulieren und das Anwendungsspektrum der chemoenzymatisch dargestellten β,δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**27** auf diese Weise verbreitern läßt.

Nach Überführung des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** in das Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** wurde ein Halogenaustausch unter forcierten Finkelstein-Bedingungen^[103] durchgeführt (Abb. 4-9). Trotz des sehr hohen Kaliumiodid-Überschusses (25 Äq.) konnte dabei kein vollständiger Umsatz erzielt werden. Das nicht umgesetzte Ausgangsmaterial (14 mol%, ¹H-NMR-Analyse) ließ sich überdies von dem Produkt *syn*-(3*R*,5*S*)-**39** durch Flashchromatographie an Kieselgel nicht abtrennen (Coelution). Die Reaktion muß unter striktem Sauerstoffausschluß durchgeführt werden, da es ansonsten zu Zersetzung kommt.

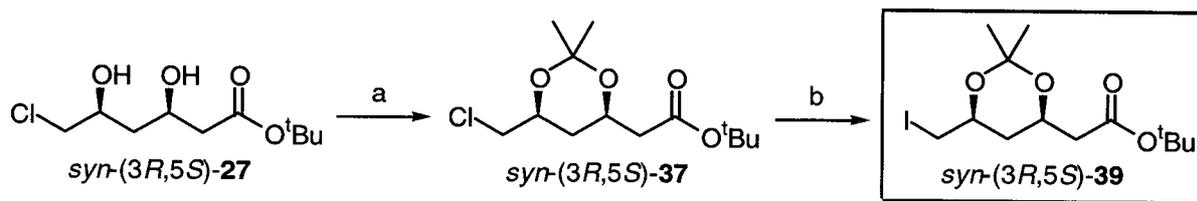


Abb. 4-9 Synthese des iodierten Acetonids *syn*-(3*R*,5*S*)-**39**. — a) 2,2-Dimethoxypropan, kat. CSA, Aceton, 25°C, 1.5 h (98 %). — b) KI (25 Äq.), 18-Krone-6, Toluol, Δ , 4 d (52 %).

Als zuverlässiger erwies sich der Weg über das Epoxid *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** (Abb. 4-10). Durch regioselektive Ringöffnung mit Lithiumiodid auf Kieselgel^[104] und unmittelbar anschließende Ketalisierung wird das iodierte Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**39** in 58%iger Ausbeute erhalten. Das Epoxid *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** kann leicht aus dem β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** durch HCl-Eliminierung mit DBU oder Kaliumhydroxid gewonnen werden (66 % bzw. 46 % Ausbeute). Der Anteil des 5-*exo-tet*-Ringschlußprodukts *trans*-(2*R*,4*S*)-**41** am Rohprodukt bleibt dabei gering (10-13 mol%, ¹H-NMR-Analyse).

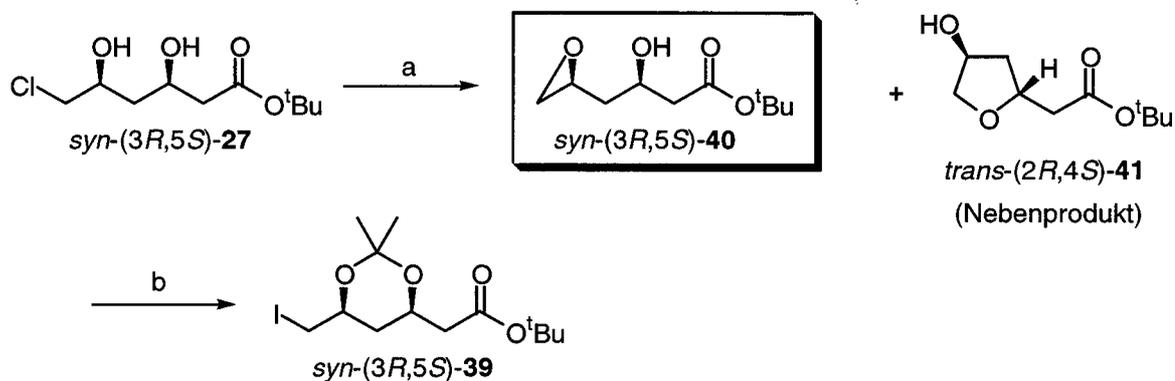
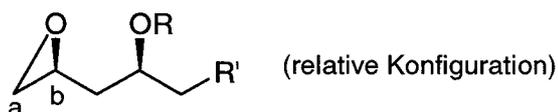


Abb. 4-10 Synthese des Epoxids *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** und regioselektive Ringöffnung. — a) DBU, CH₂Cl₂, Δ, 24 h (66 %). Alternativ: KOH, Et₂O, 0°C, 1 h, (46 %). — b) 1. LiI, SiO₂, RT, 1 h; 2. 2,2-Dimethoxypropan, kat. CSA, RT, 24 h (58 %).

Die Unterscheidung der beiden Isomere *syn*-**40** und *trans*-**41** erfolgt durch Korrelation der NMR-Daten mit Literaturdaten strukturanaloger Verbindungen.^[105, 106] So zeigen die Resonanzen der Kerne H_a, H_{a'}, H_b, C_a und C_b bei den Epoxiden eine deutliche Hochfeldverschiebung gegenüber den entsprechenden Resonanzen der isomeren Hydroxytetrahydrofurane (Tab. 4-2, Tab. 4-3). Diagnostisch ist außerdem die Kopplungskonstante $^2J(\text{H}_{\text{a}}, \text{H}_{\text{a}'})$, die bei den Epoxiden typischerweise 5 Hz beträgt, während die entsprechenden Protonenresonanzen der Hydroxytetrahydrofurane um ca. 10 Hz aufspalten.

Tab. 4-2 NMR-Daten von β-Oxy-substituierten Epoxiden.

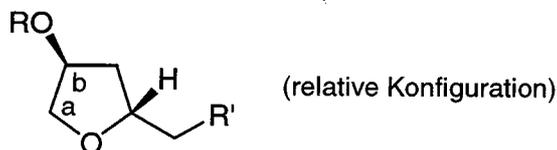


Nr.	R	R'	$\delta(\text{H}_{\text{a}}), \delta(\text{H}_{\text{a}'})$ (ppm)	$^2J(\text{H}_{\text{a}}, \text{H}_{\text{a}'})$ (Hz)	$\delta(\text{H}_{\text{b}})$ (ppm)	$\delta(\text{C}_{\text{a}})$ (ppm)	$\delta(\text{C}_{\text{b}})$ (ppm)	Lit.
1	H	COO ^t Bu	2.50, 2.77	5.0	3.09	39.0-46.8 ^[a]	49.7	d. A. ^[b]
2	TBDMS	COOMe	2.47, 2.77	5.0	3.08	--	--	[105a]
3	TMS	OTBDPS	2.42, 2.74	5.0	2.99	--	--	[105b]
4	H	OTBDPS	2.52, 2.80	5.0	3.12	46.6	49.9	[105b]
5	Bn	H	2.4, 2.7	--	3.0	46.6	49.5	[105c]
6	TBDPS	H	2.37, 2.68	5.1	3.04	--	--	[105d]

[a] Zuordnung nicht eindeutig. — [b] Diese Arbeit.

Tab. 4-3

NMR-Daten von 4-Oxy-substituierten Tetrahydrofuranen.



Nr	R	R'	$\delta(H_a), \delta(H_a')$ (ppm)	$^2J(H_a, H_a')$ (Hz)	$\delta(H_b)$ (ppm)	$\delta(C_a)$ (ppm)	$\delta(C_b)$ (ppm)	Lit.
1	H	COO ^t Bu	3.72, 4.00	9.9	4.46-4.53 ^[a]	75.6	72.7-74.6 ^[a]	d. A. ^[b]
2	TBDPS	COOEt	3.72, 3.84	9.4	4.48	--	--	[106a]
3	H	OH	3.78, 3.94	9.8	4.30-4.52 ^[a]	72.6-78.4 ^[a]		[106b]
4	H	CH ₂ OBz	3.69, 3.99	9.9	4.23-4.73 ^[a]	--	--	[106c]
5	H	CH ₂ Ar ^[c]	3.72, 4.03	10.0	4.52	75.2	72.5	[106d]
6	H	I	3.84, 4.08	9.9	4.22-4.57 ^[a]	72.8-77.0 ^[a]		[106e]

[a] Zuordnung nicht eindeutig. — [b] Diese Arbeit. — [c] Ar = 2,4-Dichlorphenyl.

Derivate des Epoxids *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** und auch das iodierte Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**39** wurden in der Vergangenheit häufig für die Synthese von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren herangezogen.^[107, 108] Die Epoxide des Typs *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** sind äußerst vielseitige Synthesebausteine, da mit einer großen Anzahl verschiedener Nucleophile eine regioselektive Ringöffnung realisiert werden kann.^[2, 105, 109] KISHI et al. nutzten diese chiralen Intermediate ausgiebig in der Totalsynthese des Spongipyrans Altohyrtin A (Abb. 4-11).^[110]

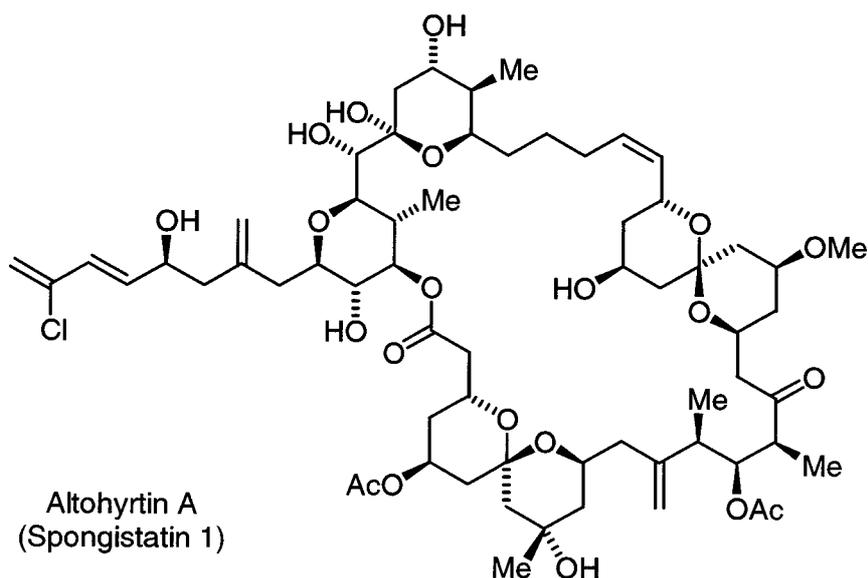
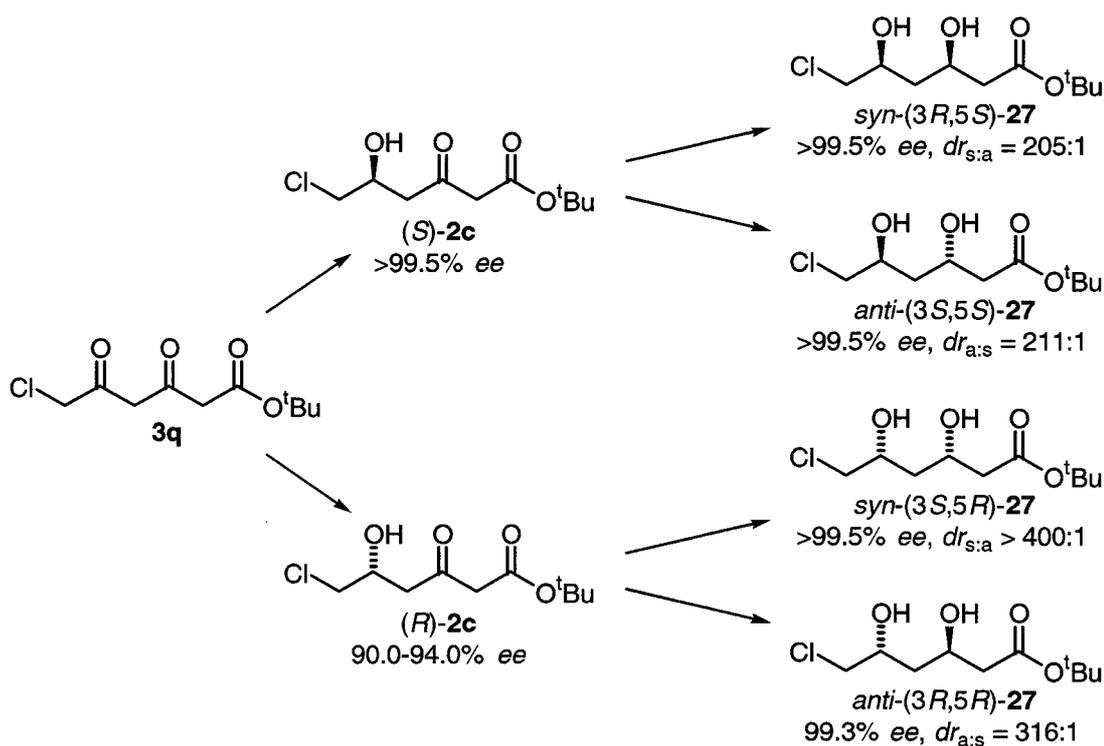


Abb. 4-11

Struktur des Spongipyrans Altohyrtin A.

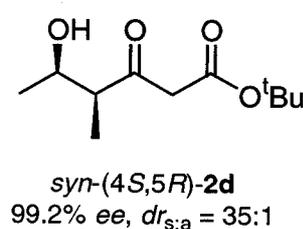
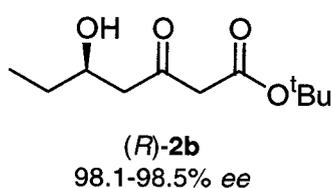
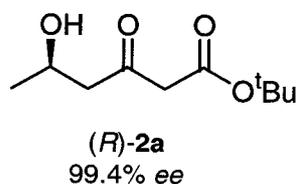
5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt einen neuen enantio- und diastereoselektiven Zugang zu allen vier Stereoisomeren des chlorierten β,δ -Dihydroxyesters *syn/anti*-27.



Der Schlüsselschritt der Synthesesequenz ist eine enantio- und regioselective Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit zwei enantiokomplementären Biokatalysatoren. Durch Reduktion mit NADP-abhängiger Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (recLBADH) wurde in 72%iger Ausbeute der enantiomerenreine δ -Hydroxy- β -ketoester **(S)-2c** erhalten. Die Reduktion mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) in einem zweiphasigen System ergab enantioselectiv das **(R)**-Enantiomer **(R)-2c** mit 90-94 % ee und 50 % Ausbeute. Beide Biokatalysatoren sind im großen Maßstab zugänglich; die Synthesen wurden im Gramm-Maßstab durchgeführt. Durch Kombination mit zwei komplementär diastereoselektiven Borhydrid-Reduktionen wurden alle vier Stereoisomere des β,δ -Dihydroxyesters *syn/anti*-27 dargestellt. Hierbei handelt es sich um Feststoffe, die nach Kristallisation praktisch stereoisomerenrein anfallen (52-70 %).

Das Enzym recLBADH akzeptiert ein breites Spektrum von β,δ -Diketoestern. 3,5-Diohexansäure-*tert*-butylester (**3j**) und der homologe 3,5-Dioheptansäure-*tert*-butylester (**3l**) wurden mit 99.4 % bzw. 98.1 % *ee* zu den δ -Hydroxy- β -ketoestern (*R*)-**2a** und (*R*)-**2b** reduziert (61-77 %). Die Reduktion des methylierten β,δ -Diketoesters *rac*-**3o** verläuft über eine dynamische kinetische Racematspaltung. Der resultierende δ -Hydroxy- β -ketoester *syn*-(4*S*,5*R*)-**2d** wurde in 66%iger Ausbeute und mit hoher Enantioselektivität erhalten (99.2 % *ee*, $dr_{s:a} = 35:1$). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß recLBADH mit dem Adsorberharz Amberlite XAD-7 kompatibel ist, und daß sich so Umsetzungen schwerlöslicher Substrate in einem zweiphasigen System realisieren lassen. Mit dieser Methode wurde der δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2b** in 66%iger Ausbeute erhalten (98.5 % *ee*).

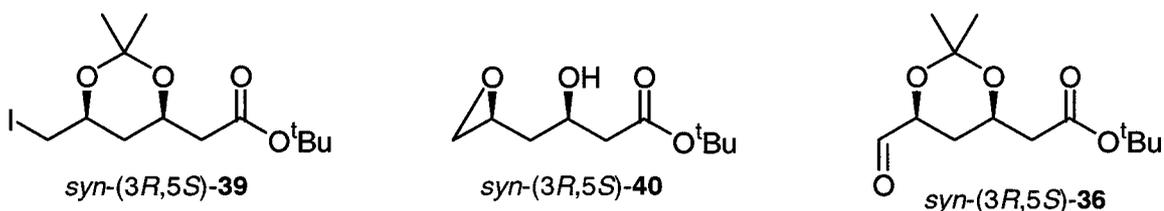


Bei den beschriebenen enzymatischen Umsetzungen handelt es sich um das erste bekannte Beispiel für eine Synthese optisch aktiver δ -Hydroxy- β -ketoester durch hoch regio- und enantioselektive Reduktion acyclischer β,δ -Diketoester. Die Reduktion des methylierten β,δ -Diketoesters *rac*-**3o** mit recLBADH ist überdies das erste Beispiel für eine dynamische kinetische Racematspaltung eines acyclischen α -Alkyl- β -diketons. Die Synthesen lassen sich in einer präparativ attraktiven Größenordnung durchführen, wobei die erforderlichen Reaktionsbedingungen bemerkenswert einfach und mild sind: alle Reaktionen werden bei Raumtemperatur und in wäßriger Lösung ausgeführt. Die enzymatisch dargestellten δ -Hydroxy- β -ketoester **2a-c** wurden unter anderem in die Naturstoffe (*S*)-Goniothalamine, (*S*)-Argentilacton, (*R*)-*semi*-Viocanthin und (*R*)-Parasorbinsäure überführt.

Für die Synthese des β,δ -Diketoesters **3q** und die enzymatische Reduktion mit recLBADH sowie die *syn*-selektive Borhydrid-Reduktion erfolgte eine Maßstabsvergrößerung in den Dekagramm- bis Hektogramm-Bereich. Im enzymatischen Reduktionsschritt wurde bei einer Ansatzgröße von acht Litern und kontinuierlicher Substratdosierung bis zu einer Konzentration von $9.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (34 mM) der enantiomerenreine δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** in 84%iger Ausbeute und mit ca. 90%iger Reinheit erhalten. Das Coenzym NADP(H) wurde dabei substöchiometrisch eingesetzt (1.0 mol%) und Substrat-gekoppelt mit 2-Propanol regeneriert. Zur weiteren

Produktivitätssteigerung besteht die Option, den Einsatz bekannter reaktionstechnischer Methoden der enzymatischen Synthese zu untersuchen, wie z. B. Membranverfahren oder Enzym-Immobilisierung. Die Kristallisation des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** ist der einzige Reinigungsschritt innerhalb der Gesamtsequenz. Für die nicht kristallisierenden Mutterlaugenrückstände wurde eine vereinfachte Prozedur zur Diastereomerentrennung entwickelt, die auf einer diastereomerendifferenzierenden Hydrolyse der entsprechenden Acetonide beruht.

Der chlorierte β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** wurde über das Epoxid *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** (66 %) in das iodierte Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**39** überführt (58 %). Eine Derivatisierung zum Aldehyd *syn*-(3*R*,5*S*)-**36** ist in der Literatur beschrieben. Diese drei Verbindungen sind bekannte chirale Synthesebausteine für die pharmakologisch bedeutsamen HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren des Mevinsäuretyps (Vastatine). An dem β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** besteht daher auch kommerzielles Interesse. Die vorliegende Arbeit kann als Grundstein für die Entwicklung eines neuen technischen Produktionsprozesses dieses chiralen Intermediats verstanden werden.



Im Gegensatz zur zellfreien Umsetzung führt die Reduktion des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** mit ganzen Zellen von *Lactobacillus spec.* direkt zum β,δ -Dihydroxyester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** (≥ 99.4 % *ee*, $dr_{s:a} = 135:1$). Es wurde daher auf die Existenz einer weiteren, bisher unbekanntenen Alkoholdehydrogenase-Aktivität in *Lactobacillus spec.* geschlossen. Wie gezeigt werden konnte, reduziert diese ADH hoch diastereoselektiv die β -Ketogruppe von δ -Hydroxy- β -ketoestern. Untersuchungen zur Charakterisierung und Klonierung dieses neuen Enzyms wurden bereits aufgenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Reduktion des chlorierten β,δ -Diketoesters **3q** mit Bäckerhefe ausführlich untersucht. Wie die Ergebnisse zeigen, produziert diese Hefe aller Wahrscheinlichkeit nach wenigstens zwei enantiokomplementäre Enzyme mit Aktivität für die δ -Ketogruppe des Substrats **3q**. Als weiterführende Arbeit bietet sich die Isolierung und Identifizierung dieser Enzyme an, so daß zellfreie Umsetzungen realisiert werden können.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

Methoden und Material

NMR-Spektroskopie

¹H-NMR-Spektren wurden bei 20°C und einer Meßfrequenz von 300 MHz aufgenommen (AMX-300-Spektrometer, BRUKER AG). Als interner Standard diente der undeuterte Anteil des verwendeten Lösungsmittels (CHCl₃: δ_{H} 7.27 ppm, d₅-DMSO: δ_{H} 2.50 ppm). ¹³C-NMR-Spektren wurden bei 20°C und einer Meßfrequenz von 75.5 MHz aufgenommen (AMX-300-Spektrometer, BRUKER AG). Als interner Standard diente das verwendete Lösungsmittel (CDCl₃: δ_{C} 77.2 ppm, d₆-DMSO: δ_{C} 39.5 ppm). Die ¹³C-NMR-Spektren wurden unter ¹H-Breitband-Entkopplung gemessen (WALTZ16). Zur Unterstützung der Signalzuordnungen wurden zusätzlich DEPT135-Experimente durchgeführt. ¹³C-Resonanzen von tautomeren Nebenformen werden nur dann explizit aufgeführt, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis eine eindeutige Aussage zuläßt.

GC-MS-Analyse

GC-MS-Analysen wurden mit einem Gaschromatographen "HP 6890" (HEWLETT-PACKARD) durchgeführt, welcher mit einem Quadrupol-Massendetektor "HP 5973" (HEWLETT-PACKARD) gekoppelt war. GC-Parameter: Kapillarsäule "HP-5MS" (HEWLETT-PACKARD, 30 m × 0.25 mm ID), Trägergas Helium (1.0 mL·min⁻¹, konstanter Fluß), Injektor im Split-Modus (50:1, 250°C), Temperaturprogramm A: 60°C (0.0-1.0 min), 60-280°C (1.0-14.7 min, 15.0°C·min⁻¹), 280°C (14.7-20.0 min) oder alternativ Temperaturprogramm B: 120°C isotherm. MS-Parameter: EI (70 eV), Ionenquelle 230°C, Quadrupol 106°C, Transfer Line 300°C, detektierter Massenbereich 50-550 amu. Bei Bedarf wurden Alkohole unmittelbar vor der Analyse derivatisiert. Hierzu wurde in einem Mikroial eine Lösung des Analyten in Dichlormethan (200 µL, 1-5 mM) mit Trifluoressigsäureanhydrid (7 µL) und Pyridin (5 µL) versetzt. Das Vial wurde verschlossen und 10 min bei 40°C in einem Wasserbad erwärmt. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere Aufarbeitung injiziert.

GC-und HPLC-Analyse mit chiraler stationärer Phase (CSP-GC, CSP-HPLC)

HPLC-Analysen an chiraler stationärer Phase wurden mit einem Chromatographiesystem "HP 1100" (HEWLETT PACKARD) durchgeführt, das mit einem UV-Diodenarraydetektor versehen war. GC-Analysen an chiraler stationärer Phase wurden mit einem Gaschromatographen "CP 9002" (CHROMPACK) durchgeführt, der mit einem Flammenionisationsdetektor (250°C) versehen war. Bei Bedarf wurden die Analyten unmittelbar vor der Messung derivatisiert wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Weitere Einzelheiten zu den Messungen sind bei den jeweiligen Verbindungen beschrieben. Der relative Fehler bei der Ermittlung von Signalflächen wird für die in dieser Arbeit verwendeten chromatographischen Methoden auf durchschnittlich 1.0 % abgeschätzt. Diese Schätzung basiert auf Messungen von Racematen. Die *ee*-Werte werden daher mit der folgenden gemittelten Genauigkeit angegeben: 0-85 % *ee*: gerundet auf ganze Zahl, 90-95 % *ee*: gerundet auf nächste 0.5, ab 95 % *ee*: gerundet auf nächste 0.1.

Elementaranalyse und Massenspektrometrie

Elementaranalysen ("Vario EL", HERAEUS) und massenspektroskopische Analysen (EI, 70 eV, "AEI MS50", KRATOS) wurden in der Analysenabteilung des "KEKULÉ Institut für Organische Chemie und Biochemie" der Universität Bonn durchgeführt. Bei der Angabe der Massenspektren werden Fragmente mit einer relativen Intensität von weniger als 10 % nicht aufgeführt, es sei denn es handelt sich um den Molekülpeak oder um ein anderes aufschlußreiches Fragment.

Polarimetrie

Spezifische Drehungen $[\alpha]_{\lambda}^T$ wurden mit einem Polarimeter "PE341" (PERKIN-ELMER) in einer 1 dm Küvette bestimmt. Die Wellenlänge "D" bezieht sich auf die Natrium D-Linie (589 nm). Die Konzentration *c* der Meßlösung wird in $\text{g} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$ angegeben.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunktbestimmungen erfolgten in Glasskapillaren mit einer Apparatur "B-540" der Firma BÜCHI. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

Photometrie

Photometrische Enzymaktivitätsmessungen wurden in Halbmikro-Plastikküvetten (Schichtdicke 1 cm, BRANDT) mit einem Spektrophotometer "Ultrospec 2000" der Firma PHARMACIA durchgeführt.

Säulen- und Dünnschichtchromatographie^[111]

Präparative Trennungen durch Säulenchromatographie wurden an neutralem Kieselgel 60 (40-63 μm , MERCK) vorgenommen, wobei die Methode der "Flashchromatographie"^[112] zum Einsatz kam. β,δ -Diketoester wurden an säuregewaschenem^[113] Kieselgel chromatographiert. Analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Fertigfolien der Firma MERCK durchgeführt (Kieselgel 60 F₂₅₄). Die Visualisierung der Analyten erfolgte durch Fluoreszenzlöschung (254 nm), Bedampfen mit Jod, und/oder Eintauchen der Folie in eine Lösung von a) *p*-Anisaldehyd (1 mL) in Essigsäure [100 mL + konz. H₂SO₄ (2 mL)] oder b) KMnO₄ (3 g) + K₂CO₃ (20 g) in Wasser (300 mL) und anschließendem Erhitzen mit einer Heißluftpistole.

Destillation

Kugelrohrdestillationen wurden mit einer Apparatur "B-580" der Firma BÜCHI durchgeführt. Fallfilmdestillationen wurden mit einer Apparatur nach ALDRICH Nr. Z22,011-6 durchgeführt, welche in der Glaswerkstatt der FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH maßstabsvergrößert nachgebaut wurde (Wendel 2.5 \times 20 cm).

Synthesen unter Schutzgas

Luft- und feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden unter einer Stickstoffatmosphäre in ausgeheizten Glasapparaturen durchgeführt. Reagenzien wurden durch Septen oder im Schutzgas-Gegenstrom zugegeben. Die bei Tieftemperaturreaktionen angegebenen Temperaturen beziehen sich auf die Reaktionsmischung, nicht auf das Kältebad (Innenthermometer). Der Wert " T_{max} " bezieht sich auf die bei kontrollierter Reagenzienzugabe eingehaltene maximale Temperatur.

Lösungsmittel

Lösungsmittel wurden von FLUKA, ALDRICH, RIEDEL-DE HAËN und MERCK bezogen und waren von "HPLC"- oder "z. A."-Qualität. Für feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden wasserfreie Lösungsmittel in septumverschlossenen Flaschen bezogen, oder die Lösungsmittel wurden unmittelbar vor der Reaktion von Restwasser befreit: THF wurde mehrere Stunden mit Natriumspänen unter Rückfluß erhitzt und dann direkt in die Reaktionsapparatur destilliert (Benzophenon als Indikator). Methanol und Dichlormethan wurden mindestens 24 h über frisch aktiviertem Molekularsieb (4 Å) aufbewahrt und unmittelbar vor der Reaktion dekantiert. Acetonitril wurde mehrere Stunden mit Calciumhydrid unter Rückfluß erhitzt und dann destilliert. Essigsäure wurde mehrere Stunden mit Acetanhydrid (3 %) unter Rückfluß erhitzt und dann über eine Vigreux-Kolonne destilliert.

Chemikalien und biologisches Material

Chemikalien wurden von FLUKA, ALDRICH oder MERCK bezogen und in die Reaktionen eingesetzt wie geliefert. Diketen wurde vor der Verwendung destilliert. Größere Mengen NADP (100 g) wurden von APPLICHEM geliefert. *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid wurde von TCI (Japan) bezogen. Literaturbekannte Verbindungen, die nicht kommerziell erhältlich waren, wurden nach den entsprechenden Vorschriften dargestellt. Bei signifikanten Abweichungen von der Literaturvorschrift wird die Synthese hier erneut aufgeführt. Alkoholdehydrogenase aus *T. brockii* (TBADH), Pferdeleber (HLADH) und *S. cerevisiae* (YADH) wurde von SIGMA bezogen. Carbonylreduktase aus *C. parapsilosis* (CPCR)^[47] wurde freundlicherweise von der Firma JÜLICH FINE CHEMICALS (Dr. T. Daussmann) gespendet. Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Hummel sei an dieser Stelle noch einmal ganz herzlich für die Bereitstellung von ADH aus *R. erythropolis* (READH)^[43] sowie Feuchtzellmasse des *L. kefir* Wildtypstamms und Feuchtzellmasse des rekombinanten *E. coli* Stamms recADH-HB101+ gedankt. Aus letzterem wurde recLBADH gewonnen (siehe unten). Lyophilisate ("Trockenhefe") von *S. cerevisiae* wurden von SIGMA ("Type II"), ICN ("active dried") und BIO-ZENTRALE GmbH ("Windhager") bezogen. Feuchtzellmasse von *S. cerevisiae* wurde von DEUTSCHE HEFEWERKE GmbH ("Vital Gold") bezogen ("Frischhefe").

Verzeichnis der allgemeinen Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV I: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Alkoholyse und Decarboxylierung von acetoacetylierter Meldrumsäure.....	84
AAV II: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Weinreb-Amiden.....	85
AAV III: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur C-Acylierung von β -Ketoester-Na,Li-Bisenolaten.....	87
AAV IV: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Untersuchung der Stabilität von 3,5-Dioxohexansäureestern in wäßrigem Puffer.....	98
AAV V: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur photometrischen Bestimmung von Enzymaktivität... ..	101
AAV VI: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Produktanalytik (Bäckerhefe-Reduktion; CSP-HPLC und GC-MS).....	109
AAV VII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von α,β -ungesättigten δ -Lactonen aus δ -Hydroxy- β -ketoestern.....	112
AAV VIII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von α,β -ungesättigten δ -Lactonen (CSP-HPLC).....	113
AAV IX: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Addition von tert-Butylacetoacetat-Na,Li-Bisenolat an Aldehyde.....	116
AAV X: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur C-Acylierung von tert-Butylacetat-Lithiumenolat mit β -Hydroxyestern.....	117
AAV XI: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses und des Enantiomerenüberschusses (β,δ -Dihydroxyester syn/anti-27; CSP-GC).....	123
AAV XII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses von β,δ -Dihydroxyestern und den entsprechenden Acetoniden (GC-MS).....	125

Verzeichnis der aufgeführten Verbindungen

<i>(R)</i> -5-Hydroxy-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (<i>R</i>)- 2a	103
<i>rac</i> -5-Hydroxy-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>rac</i> - 2a	117
<i>(R)</i> -5-Hydroxy-3-oxoheptansäure- <i>tert</i> -butylester (<i>R</i>)- 2b	103
<i>(S)</i> -5-Hydroxy-3-oxoheptansäure- <i>tert</i> -butylester (<i>S</i>)- 2b	118
<i>rac</i> -5-Hydroxy-3-oxoheptansäure- <i>tert</i> -butylester <i>rac</i> - 2b	117
<i>(S)</i> -6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (<i>S</i>)- 2c	105
<i>(R)</i> -6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester (<i>R</i>)- 2c	111
<i>rac</i> -6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>rac</i> - 2c	118
<i>syn</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-5-Hydroxy-4-methyl-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 2d	107
<i>syn</i> -(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-Hydroxy-4-methyl-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 2d	118
<i>rac</i> -(4 <i>RS</i> ,5 <i>RS</i>)-5-Hydroxy-4-methyl-3-oxohexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>rac</i> -(4 <i>RS</i> ,5 <i>RS</i>)- 2d	119
3,5-Dioxohexansäure- <i>n</i> -propylester 3f	84
3,5-Dioxohexansäure- <i>n</i> -hexylester 3h	84
3,5-Dioxoheptansäure- <i>tert</i> -butylester 3l	87
3,5-Dioxooctansäure- <i>tert</i> -butylester 3m	88
<i>rac</i> -4-Methyl-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>rac</i> - 3o	89
6-Fluor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester 3p	89
6-Chlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester 3q	90
6,6-Dichlor-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester 3r	93
6-Hydroxy-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester 3s	94
6-Methoxy-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester 3t	95
6-Methoxy-3,5-dioxohexansäuremethylester 3u	95
6-Phenyloxy-3,5-dioxohexansäuremethylester 3v	96
6-Benzylloxy-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester 3w	97
6,6-Dimethoxy-3,5-dioxohexansäure- <i>tert</i> -butylester 3y	97
Aromat 14/14'	92
Benzofuranon 15/15'	93
Aromat 16 und 16'	98
Aromat 17 und 17'	99
Furanon 18	99
<i>(R)</i> -6-Methyl-5,6-dihydropyran-2-on (<i>R</i>)- 19a	113
<i>(R)</i> -6-Ethyl-5,6-dihydropyran-2-on (<i>R</i>)- 19b	113

<i>(S)</i> -6-Ethyl-5,6-dihydropyran-2-on (<i>S</i>)- 19b	114
<i>(S)</i> -6-Chlormethyl-5,6-dihydropyran-2-on (<i>S</i>)- 19c	114
<i>(R)</i> -6-Chlormethyl-5,6-dihydropyran-2-on (<i>R</i>)- 19c	114
<i>syn</i> -(5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-5,6-Dimethyl-5,6-dihydropyran-2-on <i>syn</i> -(5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)- 19d	115
<i>syn</i> -(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-5,6-Dimethyl-5,6-dihydropyran-2-on <i>syn</i> -(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 19d	115
<i>rac</i> -(5 <i>RS</i> ,6 <i>RS</i>)-5,6-Dimethyl-5,6-dihydropyran-2-on <i>rac</i> -(5 <i>RS</i> ,6 <i>RS</i>)- 19d	115
<i>(S)</i> -6-Chlormethyl-5,6-dihydropyran-2,4-dion (<i>S</i>)- 20	116
<i>rac</i> -4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester <i>rac</i> - 24	119
<i>syn</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2-Methyl-3-hydroxybuttersäureethylester <i>syn</i> -(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- 25	120
<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 27	121
<i>syn</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)- 27	122
<i>anti</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>anti</i> -(3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)- 27	122
<i>anti</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>anti</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)- 27	123
β -Hydroxy- δ -ketoester 34	111
Ethylfuranon 35	111
<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-6-Chlor-3,5-(isopropylidendioxy)-hexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 37 ..	126
<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-6-Benzoyloxy-3,5-(isopropylidendioxy)-hexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 38	125
<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-6-Iod-3,5-(isopropylidendioxy)-hexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 39	127
<i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5,6-Epoxy-3-hydroxyhexansäure- <i>tert</i> -butylester <i>syn</i> -(3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)- 40	129
Hydroxytetrahydrofuran <i>trans</i> -(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)- 41	129
<i>N</i> -Methoxy- <i>N</i> -methylpropionamid.....	85
<i>N</i> -Methoxy- <i>N</i> -methylbutyramid.....	86
2,2-Dichlor- <i>N</i> -methoxy- <i>N</i> -methylacetamid.....	86

6.2 Synthese von β,δ -Diketoestern

Alkoholyse und Decarboxylierung acetoacetylierter Meldrumsäure

AAV I: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Alkoholyse und Decarboxylierung von acetoacetylierter Meldrumsäure.^[31] Eine Lösung von acetoacetylierter Meldrumsäure **7**^[30] (1.14 g, 5.0 mmol) und Alkohol (15.0 mmol) in Toluol (10 mL) wird für 3 h unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird anschließend im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in Dichlormethan suspendiert. Nach Filtration wird erneut im Vakuum eingeeengt und der Rückstand gereinigt wie in den einzelnen Beispielen angegeben.

3,5-Dioxohexansäure-*n*-propylester 3f. Synthese gemäß AAV I, ausgehend von 1-Propanol (0.90 g, 15.0 mmol). Nach Kugelrohrdestillation (0.1 mbar, 70°C) und Flashchromatographie des Destillats an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 20:80 v/v) wurde das Produkt **3f** als schwach gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.45 g (48 %).

¹H-NMR (CDCl₃): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 89:11; δ = 0.93 (t, J = 7.4 Hz, 3 H_{ef+kf}, CH₂CH₃), 1.66 (m, 2 H_{ef+kf}, CH₂CH₃), 2.07 (s, 3 H_{ef}, H-6), 2.25 (s, 3 H_{kf}, H-6), 3.33 (s, 2 H_{ef}, H-2), 3.55 (s, 2 H_{kf}, H-2), 3.74 (s, 2 H_{kf}, H-4), 4.08 (t, J = 6.7 Hz, 2 H_{kf}, OCH₂) überlagert mit 4.09 (t, J = 6.7 Hz, 2 H_{ef}, OCH₂), 5.61 (s, 1 H_{ef}, H-4), 15.11 (br s, 1 H_{ef}, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): Enolform: δ = 10.4 (CH₂CH₃), 22.0 (CH₂CH₃), 24.5 (C-6), 45.3 (C-2), 67.3 (OCH₂), 100.7 (C-4), 167.8 (C-1), 187.4, 190.3 (C-3, C-5).

MS (EI), m/z (%): 186 (21) [M]⁺, 144 (27), 129 (19), 127 (29) [$M - O^nPr$]⁺, 126 (43), 111 (15), 102 (13), 98 (32), 85 (100) [$M - CH_2COO^nPr$]⁺, 84 (16), 69 (13).

HRMS (EI): berechnet für [M]⁺: 186.0892, gefunden: 186.0902.

C₉H₁₄O₄ (186.3).

3,5-Dioxohexansäure-*n*-hexylester 3h. Synthese gemäß AAV I, ausgehend von 1-Hexanol (1.53 g, 15.0 mmol). Nach Kugelrohrdestillation (10⁻³ mbar, 120°C) und Flashchromatographie des Destillats an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 20:80 v/v) wurde das Produkt **3h** als schwach gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.59 g (52 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 83:17; $\delta = 0.87$ (br t, $J = 6.9$ Hz, 3 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, CH_2CH_3), 1.23-1.39 (m, 6 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.58-1.68 (m, 2 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, CH_2CH_3), 2.06 (s, 3 H_{ef} , H-6), 2.25 (s, 3 H_{kf} , H-6), 3.32 (s, 2 H_{ef} , H-2), 3.54 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.74 (s, 2 H_{kf} , H-4), 4.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 2 H_{kf} , OCH_2) überlagert mit 4.12 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H_{ef} , OCH_2), 5.60 (s, 1 H_{ef} , H-4), 15.10 (br s, 1 H_{ef} , OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Enolform: $\delta = 14.1$ (CH_2CH_3), 22.7 (CH_2CH_3), 24.5 (C-6), 25.6, 28.5, 31.5 ($(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_3$), 45.3 (C-2), 65.8 (OCH_2), 100.7 (C-4), 167.8 (C-1), 187.4, 190.3 (C-3, C-5).

MS (EI), m/z (%): 228 (23) $[M]^+$, 186 (10), 145 (35), 129 (24), 127 (54) $[M - \text{OHex}]^+$, 126 (67), 111 (10), 103 (18), 102 (15), 98 (27), 85 (100) $[M - \text{CH}_2\text{COOHex}]^+$, 84 (13), 56 (10), 55 (10).

HRMS (EI): berechnet für $[M]^+$: 228.1362, gefunden: 228.1370.

$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (228.3).

C-Acylierung von β -Ketoester-Bisenolaten

Weinreb-Amide durch Aminolyse von Carbonsäurechloriden

AAV II: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von Weinreb-Amiden. Zu einer eisgekühlten Lösung von *O,N*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (1.02 g, 10.5 mmol) und Carbonsäurechlorid (10.0 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (50 mL) wird tropfenweise Pyridin (1.69 mL, 21 mmol) gegeben ($T_{\text{max}} = 10^\circ\text{C}$). Die Lösung wird für 3.5 h bei Raumtemperatur gerührt, zweimal mit verdünnter Salzsäure (0.5 M) gewaschen und im Vakuum auf die Hälfte des Volumens eingengt. Nach Zugabe von Diethylether (30 mL) wird mit NaHCO_3 -Lösung (5 %) und ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt.

N-Methoxy-*N*-methylpropionamid: Synthese nach AAV II, ausgehend von Propionylchlorid (0.93 g, 10.0 mmol). Das leichtflüchtige Produkt, *N*-Methoxy-*N*-methylpropionamid, fiel als farbloses Öl an, das ohne Aufreinigung weiterverarbeitet wurde. Ausbeute: 1.04 g (89 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.09$ (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H, H-3), 2.40 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, H-2), 3.13

(s, 3 H, NCH₃), 3.64 (s, 3 H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 8.8 (C-3), 25.3 (C-2), 32.3 (NCH₃), 61.2 (OCH₃), 174.9 (C-1).

MS (EI), *m/z* (%): 117 (17) [M]⁺, 87 (10), 61 (100) [NH(OMe)Me]⁺, 57 (97).

C₅H₁₁NO₂ (117.2) Die NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[114]

N-Methoxy-*N*-methylbutyramid: Synthese nach AAV II, ausgehend von Butyrylchlorid (1.07 g, 10.0 mmol). Das leichtflüchtige Produkt, *N*-Methoxy-*N*-methylbutyramid, fiel als farbloses Öl an, das ohne Aufreinigung weiterverarbeitet wurde. Ausbeute: 1.17 g (89 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H, H-4), 1.64 (sext, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-3), 2.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-2), 3.16 (s, 3 H, NCH₃), 3.66 (s, 3 H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 14.0 (C-4), 18.2 (C-3), 32.2 (NCH₃), 33.9 (C-2), 61.3 (OCH₃), 174.7 (C-1).

MS (EI), *m/z* (%): 131 (20) [M]⁺, 71 (98), 61 (100) [NH(OMe)Me]⁺.

C₆H₁₃NO₂ (131.2).

2,2-Dichlor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid: Zu einer eisgekühlten Lösung von *O,N*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (1.07 g, 11.0 mmol) und 2,2-Dichloracetylchlorid (1.47 g, 10.0 mmol) in wasserfreiem Dichlormethan (80 mL) wurde tropfenweise Pyridin (0.89 mL, 11.0 mmol) gegeben (*T*_{max} = 5°C). Die Lösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit Diethylether (80 mL) versetzt und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wäßrige Phase wurde zweimal mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt, 2,2-Dichlor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid, fiel nach Kugelrohrdestillation (120°C, 5.0 mbar) als farbloses Öl an. Ausbeute: 1.12 g (65 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3.27 (s, 3 H, NCH₃), 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 6.53 (s, 1 H, CHCl₂).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 33.0 (NCH₃), 62.1, 63.0 (OCH₃, CHCl₂), 164.5 (C-1).

MS (EI), *m/z* (%): 171/173/175 (23/14/2) [M]⁺, 108 (12), 88 (87), 83/85/87 (82/55/10), 79 (10), 78 (10), 76 (31), 61 (100) [NH(OMe)Me]⁺, 60 (84), 59 (12), 58

(86), 56 (12).

 $C_4H_7Cl_2NO_2$ (172.0).*Acylierung von β -Ketoester-Bisenolaten*

AAV III: *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur C-Acylierung von β -Ketoester-Na,Li-Bisenolaten.*^[115] Zu einer eisgekühlten Suspension von Natriumhydrid (60 % in Mineralöl) in wasserfreiem THF wird unter Schutzgas und Temperaturkontrolle ($T_{\max} = 10^\circ\text{C}$) der β -Ketoester getropft. Das Reaktionsgemisch wird nach beendeter Zugabe 10 min gerührt und dann auf -10°C gekühlt. Die nun klare Lösung wird tropfenweise mit *n*-Butyllithium (1.6 M in *n*-Hexan, $T_{\max} = 0^\circ\text{C}$) versetzt und nach beendeter Zugabe weitere 10 min gerührt. Anschließend wird die Acylierungsreaktion ausgeführt wie in den jeweiligen Beispielen beschrieben. Zur Hydrolyse wird die Reaktionslösung auf eine intensiv gerührte, eisgekühlte Mischung (50:50 v/v) aus Ethylacetat und verdünnter Salzsäure gekippt (2 M, 4-6 Äq. HCl bezogen auf das Bisenolat). Die Phasen werden getrennt, und die wäßrige Phase wird zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaHCO_3 -Lösung (5 %), Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird gereinigt wie in den jeweiligen Beispielen angegeben.

3,5-Dioxoheptansäure-*tert*-butylester 31. Aus *tert*-Butylacetoacetat (0.79 g, 5.0 mmol), Natriumhydrid (0.20 g, 60 % in Mineralöl, 5.0 mmol) und *n*-Butyllithium (3.1 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 5.0 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (20 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. *N*-Methoxy-*N*-methylpropionamid (0.59 g, 5.0 mmol) wurde bei -10°C in einer Portion zugegeben und die Lösung 15 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 30 min gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Nicht abreagiertes *tert*-Butylacetoacetat wurde durch Kugelrohrdestillation weitestgehend entfernt (0.2 mbar, 40°C). Flashchromatographie des Rückstandes an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 15:85 v/v) ergab das Produkt **31** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 0.78 g (73 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 82:18; $\delta = 1.07$ (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H_{kf} , H-7), 1.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H_{ef} , H-7), 1.47 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.35 (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H_{ef} , H-6), 2.55 (q, $J = 7.3$ Hz, 2 H_{kf} , H-6), 3.25 (s,

2 H_{ef}, H-2), 3.48 (s, 2 H_{kf}, H-2), 3.73 (s, 2 H_{kf}, H-4), 5.60 (s, 1 H_{ef}, H-4), 15.15 (br s, 1 H_{ef}, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): Enolform: δ = 9.7 (C-7), 28.1 (C(CH₃)₃), 31.2 (C-6), 46.4 (C-2), 82.1 (C(CH₃)₃), 99.2 (C-4), 167.0 (C-1), 187.4, 194.7 (C-3, C-5).

MS (EI), *m/z* (%): 214 (2) [M]⁺, 159 (12), 158 (29), 141 (36) [M – O^tBu]⁺, 140 (17), 129 (40), 111 (13), 99 (52) [M – CH₂COO^tBu]⁺, 85 (14), 84 (10), 57 (100) [C₄H₉]⁺.

C₁₁H₁₈O₄ (214.3).

3,5-Dioxooctansäure-tert-butylester 3m. Aus *tert*-Butylacetoacetat (0.63 g, 4.0 mmol), Natriumhydrid (0.18 g, 60 % in Mineralöl, 4.5 mmol) und *n*-Butyllithium (2.6 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 4.2 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (30 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. *N*-Methoxy-*N*-methylbutyramid (0.54 g, 4.1 mmol) wurde bei –10°C in einer Portion zugegeben, und die Lösung wurde 15 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 60 min gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Nach Kugelrohrdestillation (4·10⁻² mbar, 80°C) wurde das Produkt **3m** als schwach gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.64 g (70 %).

¹H-NMR (CDCl₃): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 86:14; δ = 0.91 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H_{kf}, H-8) überlagert mit 0.94 (t, *J* = 7.4 Hz, 3 H_{ef}, H-8), 1.46 (s, 9 H_{ef+kf}, C(CH₃)₃), 1.61 (m, 2 H_{ef+kf}, H-7), 2.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H_{ef}, H-6), 2.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H_{kf}, H-6), 3.24 (s, 2 H_{ef}, H-2), 3.46 (s, 2 H_{kf}, H-2), 3.70 (s, 2 H_{kf}, H-4), 5.58 (s, 1 H_{ef}, H-4), 15.18 (br s, 1 H_{ef}, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): Enolform: δ = 13.8 (C-8), 19.3 (C-7), 28.1 (C(CH₃)₃), 39.8 (C-6), 46.7 (C-2), 82.0 (C(CH₃)₃), 99.9 (C-4), 167.0 (C-1), 188.2, 193.1 (C-3, C-5).

MS (EI), *m/z* (%): 228 (1) [M]⁺, 173 (11), 172 (32), 155 (43) [M – O^tBu]⁺, 154 (19), 144 (41), 129 (64), 113 (78) [M – CH₂COO^tBu]⁺, 111 (21), 85 (10), 84 (17), 71 (42), 69 (11), 57 (100) [C₄H₉]⁺.

C₁₂H₂₀O₄ (228.3).

rac-4-Methyl-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester **rac-3o**. Aus 3-Oxovaleriansäure-*tert*-butylester^[116] (0.86 g, 5.0 mmol), Natriumhydrid (0.20 g, 60 % in Mineralöl, 5.0 mmol) und *n*-Butyllithium (3.1 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 5.0 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (20 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (0.52 g, 5.0 mmol) wurde bei -10°C in einer Portion zugegeben, und die Lösung wurde 15 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 30 min gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Nicht abreagiertes Edukt wurde durch Kugelrohrdestillation weitestgehend entfernt (0.1 mbar, 60°C). Flashchromatographie des Rückstandes an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 30:70 v/v) ergab das Produkt **rac-3o** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 0.66 g (62 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform 1 (ef1)/Enolform 2 (ef2)/Ketoform (kf) = 32:14:54; δ = 1.27 (d, J = 7.0 Hz, 3 $\text{H}_{\text{ef}2}$, CHCH_3), 1.33 (d, J = 7.1 Hz, 3 H_{kf} , CHCH_3), 1.46 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef}1+\text{kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.49 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef}2}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.83 (s, 3 $\text{H}_{\text{ef}1}$, $\text{C}_{\gamma}\text{CH}_3$), 2.14 (s, 3 $\text{H}_{\text{ef}1}$, H-6), 2.21 (s, 3 H_{kf} , H-6), 2.23 (s, 3 $\text{H}_{\text{ef}2}$, H-6), 3.23 (q, J = 7.0 Hz, 1 $\text{H}_{\text{ef}2}$, H-4), 3.36 (s, 2 $\text{H}_{\text{ef}1}$, H-2), 3.43 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.85 (q, J = 7.1 Hz, 1 H_{kf} , H-4), 5.00 (s, 1 $\text{H}_{\text{ef}2}$, H-2), 12.31 (s, 1 $\text{H}_{\text{ef}2}$, OH), 16.20 (s, 1 $\text{H}_{\text{ef}1}$, OH).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 32:68; δ = 1.17 (d, J = 7.1 Hz, 3 H_{kf} , CHCH_3), 1.40 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef}1+\text{kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.77 (s, 3 $\text{H}_{\text{ef}1}$, $\text{C}_{\gamma}\text{CH}_3$), 2.13 (s, 3 $\text{H}_{\text{ef}1}$, H-6), 2.16 (s, 3 H_{kf} , H-6), 3.47 (s, 2 $\text{H}_{\text{ef}1}$, H-2), 3.56 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.96 (q, J = 7.1 Hz, 1 H_{kf} , H-4), 16.13 (s, 1 $\text{H}_{\text{ef}1}$, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{d}_6\text{-DMSO}$): Ketoform: δ = 12.1 (CHCH_3), 27.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.1 (C-6), 49.4 (C-2), 59.5 (C-4), 81.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 166.2 (C-1), 201.5, 205.2 (C-3, C-5).

MS (EI), m/z (%): 214 (1) $[\text{M}]^+$, 158 (25), 141 (56) $[\text{M} - \text{O}^t\text{Bu}]^+$, 140 (12), 116 (67), 112 (11), 99 (60) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}]^+$, 98 (41), 72 (20), 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 56 (14).

$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_4$ (214.3).

6-Fluor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester **3p**. Unter Schutzgas wurde durch tropfenweise Zugabe von *n*-Butyllithium (2.7 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 4.3 mmol) zu einer eisgekühlten Lösung von Diisopropylamin (0.62 mL, 4.4 mmol) in wasserfreiem THF (20 mL) LDA erzeugt.

Die Lösung wurde nach beendeter Zugabe 10 min gerührt, auf -10°C gekühlt, tropfenweise mit *tert*-Butylacetoacetat (0.35 g, 2.2 mmol) versetzt ($T_{\text{max}} = -5^{\circ}\text{C}$), für weitere 10 min gerührt und anschließend auf -75°C gekühlt. Fluoressigsäureethylester (0.21 g, 2.0 mmol) und TMEDA (0.26 g, 2.2 mmol) wurden nacheinander in jeweils einer Portion zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 5 min gerührt, über einen Zeitraum von 30 min auf -55°C erwärmt, für weitere 10 min bei dieser Temperatur gerührt und wieder auf -75°C abgekühlt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Überschüssiges *tert*-Butylacetoacetat wurde durch Kugelrohrdestillation weitestgehend entfernt (0.2 mbar, 40°C). Flashchromatographie des Rückstandes an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 10:90 v/v) ergab das Produkt **3p** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 0.25 g (58 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 90:10; $\delta = 1.47$ (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.31 (s, 2 H_{ef} , H-2), 3.48 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.86 (d, $^4J(\text{H},\text{F}) = 3.8$ Hz, 2 H_{kf} , H-4), 4.86 (d, $^2J(\text{H},\text{F}) = 46.8$ Hz, 2 H_{ef} , H-6), 4.88 (d, $^2J(\text{H},\text{F}) = 47.3$ Hz, 2 H_{kf} , H-6), 5.93 (d, $^4J(\text{H},\text{F}) = 3.0$ Hz, 1 H_{ef} , H-4), 14.80 (br s, 1 H_{ef} , OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Enolform: $\delta = 28.1$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45.9 (C-2), 81.3 (d, $^1J(\text{C},\text{F}) = 183.1$ Hz, C-6), 82.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 97.0 (d, $^3J(\text{C},\text{F}) = 5.4$ Hz, C-4), 166.5 (C-1), 186.7 (C-3), 189.8 (d, $^2J(\text{C},\text{F}) = 21.3$ Hz, C-5).

MS (EI), m/z (%): 218 (1) $[\text{M}]^+$, 163 (17), 145 (37) $[\text{M} - \text{O}^t\text{Bu}]^+$, 129 (15), 125 (12), 103 (48) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}]^+$, 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{FO}_4$ (218.2).

6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester 3q. Methode A: Acylierung von tert-Butylacetoacetat-Na,Li-Bisenolat mit 2-Chlor-N-methoxy-N-methylacetamid. Aus *tert*-Butylacetoacetat (0.79 g, 5.0 mmol), Natriumhydrid (0.20 g, 60 % in Mineralöl, 5.0 mmol) und *n*-Butyllithium (3.1 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 5.0 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (15 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. Die Lösung wurde auf -75°C gekühlt, und eine Lösung von 2-Chlor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (0.69 g, 5.0 mmol) in wasserfreiem THF (4 mL) wurde zugetropft ($T_{\text{max}} = -60^{\circ}\text{C}$). Das Reaktionsgemisch wurde 45 min gerührt, über einen Zeitraum von 30 min auf -30°C erwärmt, weitere 15 min bei dieser Temperatur gerührt und wieder auf -75°C gekühlt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Nach Flashchromatographie an säuregewaschenem Kie-

selgel (Ethylacetat / *n*-Hexan 20:80 v/v) wurde das Produkt **3q** als schwach gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.68 g (58 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform (ef) / Ketoform (kf) = 88:12; δ = 1.48 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.31 (s, 2 H_{ef} , H-2), 3.49 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.92 (s, 2 H_{kf} , H-4), 4.06 (s, 2 H_{ef} , H-6), 4.21 (s, 2 H_{kf} , H-6), 5.97 (s, 1 H_{ef} , H-4), 14.76 (br s, 1 H_{ef} , OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Enolform: δ = 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 44.4, 46.0 (C-2, C-6), 82.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 98.9 (C-4), 166.5 (C-1), 187.0, 187.3 (C-3, C-5).

MS (EI), m/z (%): 234 (1) $[M]^+$, 198 (6) $[M - \text{HCl}]^+$, 179 (10), 161/163 (30/10) $[M - \text{O}^t\text{Bu}]^+$, 129 (26), 119/121 (34/11) $[M - \text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}]^+$, 103 (15), 85 (11), 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{ClO}_4$ (234.7).

6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester 3q. Methode B: Acylierung von tert-Butylacetoacetat-Li,Li-Bisenolat mit Chloressigsäuremethylester. Unter Schutzgas wurde durch tropfenweise Zugabe von *n*-Butyllithium (64 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 102 mmol) zu einer eisgekühlten Lösung von Diisopropylamin (14.8 mL, 105 mmol) in wasserfreiem THF (0.3 L) LDA erzeugt. Die Lösung wurde nach beendeter Zugabe 10 min gerührt, auf -15°C gekühlt, tropfenweise mit *tert*-Butylacetoacetat (7.9 g, 50 mmol) versetzt ($T_{\text{max}} = -5^\circ\text{C}$), für weitere 10 min gerührt und anschließend auf -75°C gekühlt. Chloressigsäuremethylester (5.4 g, 50 mmol) wurde tropfenweise zugegeben ($T_{\text{max}} = -65^\circ\text{C}$) und die Lösung nach beendeter Zugabe 25 min gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Das resultierende Rohprodukt **3q** (11.0 g gelbes Öl, 89 %) fiel gemäß $^1\text{H-NMR}$ -Analyse mit ca. 95 % Reinheit an.

6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester 3q. Methode C: Acylierung von tert-Butylacetoacetat-Li,Li-Bisenolat (aminfrei) mit Chloressigsäuremethylester im Hektogramm-Maßstab. In einem Dreihalskolben (2 L) mit Innenthermometer, Rückflußkühler und Tropftrichter wurde bei Raumtemperatur und unter Schutzgas zu einer gut gerührten Suspension von Lithiumhydrid (6.5 g, 0.79 mol, 97 %) in wasserfreiem THF (1.5 L) *tert*-Butylacetoacetat (118.7 g, 0.75 mol) getropft. Nach beendeter Zugabe wurde der Tropftrichter mit wenig was-

serfreiem THF gespült, und die Reaktionslösung wurde für 30 min unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde auf -20°C gekühlt, und *n*-Butyllithium (76 mL, 10 M in *n*-Hexan, 0.76 mol) wurde tropfenweise zugesetzt ($T_{\text{max}} = 0^{\circ}\text{C}$). Der Tropftrichter wurde erneut gespült, und es wurde weitere 15 min gerührt. Die Lösung wurde auf -70°C gekühlt, und Chloressigsäuremethylester (80.3 g, 0.74 mol) wurde tropfenweise zugegeben ($T_{\text{max}} = -60^{\circ}\text{C}$). Nach beendeter Zugabe wurde 45 min bei -65°C gerührt und dann durch zügige Zugabe von eisgekühlter 25%iger Salzsäure (205 mL, 1.58 mol) hydrolysiert. Die Reaktionsmischung wurde anschließend in einem Scheidetrichter intensiv durchmischt, die Phasen getrennt, und die organische Phase zweimal mit Wasser (je 0.15 L) gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden einmal mit 0.1 L Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden im Vakuum auf ein Volumen von 0.5 L eingengt, woraufhin sich erneut Wasser abscheidete, welches abgetrennt wurde. Nach Waschen mit ges. NaCl-Lösung (0.1 L) und Trocknen über Na_2SO_4 (2 x) wurde im Vakuum vollständig eingengt. Nicht umgesetzte Edukte wurden anschließend in einem Rotationsverdampfer mit Trockeneiskühler bei 2 mbar und 65°C soweit wie möglich abdestilliert. Das resultierende Rohprodukt **3q** [144 g (75 %), gelbes Öl] fiel gemäß $^1\text{H-NMR}$ -Analyse mit einer Reinheit von ca. 90 % an. Durch Fallfilmdestillation (78°C , $2 \cdot 10^{-2}$ mbar) wurde ein farbloses Öl erhalten, welches sich jedoch noch während der Destillation wieder gelb färbte. Ausbeute: 90 g (52 %).

Aromat 14/14'. Diese Verbindung wurde aus einem Destillationssumpf der in vorherstehender Arbeitsvorschrift beschriebenen Fallfilmdestillation erhalten. Filtration durch Kieselgel mit Dichlormethan und anschließende Kristallisation aus *n*-Hexan ergab Aromat **14/14'** in Form farbloser Kristalle (Smp. $83.4\text{--}86.3^{\circ}\text{C}$).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.44$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.68 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.65 (s, 2 H, $\text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 4.81 (s, 2 H, CH_2Cl), 4.84 (s, 2 H, CH_2Cl), 6.84 (s, 1 H, ArH), 12.3 (s, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 28.2$ ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$, isochron), 40.0 , 45.9 , 50.3 ($2 \times \text{CH}_2\text{Cl}$, $\text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$), 82.1 , 86.1 ($2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 112.1 (Ar- C_q), 125.7 (Ar- C_p), 128.1 , 140.2 , 141.5 , 161.2 (Ar- C_q), 169.7 , 169.8 ($2 \times \text{COO}^t\text{Bu}$), 196.7 (CO).

MS (EI), m/z (%): 432 (1) $[M]^+$, $376/378$ (8/5) $[M - \text{C}_4\text{H}_8]^+$, $303/305$ (20/12), $271/273$ (64/22), $253/255$ (36/12), 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

HRMS (EI): berechnet für $[M - C_4H_8]^+$: 376.0480, gefunden: 376.0477.

$C_{20}H_{26}Cl_2O_6$ (433.3).

Benzofuranon 15/15': Diese Verbindung wurde als Nebenkomponente aus einem nach vorherstehender Arbeitsvorschrift (Methode C) erhaltenen Rohprodukt des β,δ -Diketoesters **3q** durch Flashchromatographie abgetrennt (Ethylacetat / *iso*-Hexan 10:90 v/v). Alternativ wurde Benzofuranon **15/15'** durch HCl-Eliminierung aus Aromat **14/14'** erhalten: Eine Lösung des Aromaten **14/14'** (100 mg, 231 μ mol) in Dichlormethan (5 mL) wurde mit DBU (37 μ L, 243 μ mol) versetzt, 20 h bei 20°C gerührt und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über $MgSO_4$ und Einengen im Vakuum fiel das Produkt **15/15'** als schwach gelbes Öl an. Ausbeute: 82 mg (89 %).

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 1.44 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1.61 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 3.93 (s, 2 H, CH_2COO^tBu), 4.68 (s, 2 H, CH_2Cl oder CH_2OAr), 4.78 (s, 2 H, CH_2Cl oder CH_2OAr), 6.99 (s, 1 H, ArH).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ = 28.1, 28.2 ($2 \times C(CH_3)_3$), 37.7, 43.3 (CH_2Cl , CH_2COO^tBu), 75.5 (CH_2OAr), 81.9, 83.6 ($2 \times C(CH_3)_3$), 118.8, 120.4 ($Ar-C_q$), 125.7 ($Ar-C_p$), 137.5, 145.4, 163.3 ($Ar-C_q$), 169.2, 172.3 ($2 \times COO^tBu$), 199.0 (CO).

MS (EI), m/z (%): 396 (1) $[M]^+$, 340 (4) $[M - C_4H_8]^+$, 323 (8), 240 (10), 187 (40), 179/181 (33/11), 169 (11), 143 (12), 103 (37), 102 (12), 101 (31), 85 (33), 69 (13), 59 (15), 58 (14), 57 (100) $[C_4H_9]^+$, 56 (13), 55 (14).

$C_{20}H_{25}ClO_6$ (396.9).

6,6-Dichlor-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester 3r. Aus *tert*-Butylacetoacetat (1.13 g, 7.1 mmol), Natriumhydrid (0.29 g, 60 % in Mineralöl, 7.3 mmol) und *n*-Butyllithium (4.5 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 7.2 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (50 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. 2,2-Dichlor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (1.12 g, 6.5 mmol) wurde bei -75°C in einer Portion zugegeben, und die Lösung wurde innerhalb von 1 h auf -30°C erwärmt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Flashchromatographie an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat / *n*-Hexan 20:80 v/v) ergab das Produkt **3r** als gelbes Öl. Ausbeute: 1.07 g (61 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Verhältnis Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 91:9; δ = 1.48 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.34 (s, 2 H_{ef} , H-2), 3.50 (s, 2 H_{kf} , H-2), 4.11 (s, 2 H_{kf} , H-4), 5.91 (s, 1 H_{ef} , H-4 oder H-6), 6.02 (s, 1 H_{kf} , H-6), 6.09 (s, 1 H_{ef} , H-4 oder H-6), 14.05 (br s, 1 H_{ef} , OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Enolform: δ = 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 44.9 (C-2), 68.3 (C-6), 82.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 96.6 (C-4), 166.1 (C-1), 187.0 (C-3, C-5, isochron).

MS (EI), m/z (%): 268 (1) $[M]^+$, 232 (2) $[M - \text{HCl}]^+$, 195/197/199 (18/11/2) $[M - \text{O}^t\text{Bu}]^+$, 153/155/157 (13/8/2) $[M - \text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}]^+$, 129 (30), 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_4$ (269.1).

6-Hydroxy-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester **3s**. Aus *tert*-Butylacetoacetat (1.27 g, 8.0 mmol), Natriumhydrid (0.32 g, 60 % in Mineralöl, 8.0 mmol) und *n*-Butyllithium (5.0 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 8.0 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (30 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. Glycolsäureethylester (0.21 g, 2.0 mmol) wurde bei -75°C zugetropft ($T_{\text{max}} = -60^\circ\text{C}$), und die Lösung wurde innerhalb von 30 min auf 0°C erwärmt. Nach weiteren 2 h wurde das Eisbad entfernt, und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Vor der Hydrolyse (siehe AAV III) wurde auf -30°C gekühlt. Die Aufarbeitung erfolgte wie in AAV III beschrieben. Überschüssiges *tert*-Butylacetoacetat wurde durch Kugelrohrdestillation weitestgehend entfernt (0.2 mbar, 40°C). Flashchromatographie des Rückstandes an säuregewaschenem Kieselgel ergab das Produkt **3s** als schwach gelbes Öl (Ethylacetat / *iso*-Hexan 40:60 v/v). Ausbeute: 0.19 g (44 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Halbketalform (hf)/Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 65:25:10; δ = 1.47 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.51 (s, 9 H_{hf} , $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.42 (d, $J = 17.7$ Hz, 1 H_{hf} , H-4), 2.58 (d, $J = 17.7$ Hz, 1 H_{hf} , H-4), 2.79 (d, $J = 15.9$ Hz, 1 H_{hf} , H-2), 2.86 (d, $J = 15.9$ Hz, 1 H_{hf} , H-2), 3.24 (s, 2 H_{ef} , H-2), 3.50 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.77 (s, 2 H_{kf} , H-4), 4.06 (d, $J = 16.6$ Hz, 1 H_{hf} , H-6), 4.22 (d, $J = 16.6$ Hz, 1 H_{hf} , H-6), 4.28 (s, 2 H_{ef} , H-6), 4.35 (s, 2 H_{kf} , H-6), 5.32 (br s, 1 H_{hf} , OH), 5.68 (s, 1 H_{ef} , H-4), 14.20 (br s, 1 H_{ef} , OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Halbketalform: δ = 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 43.7 (C-2), 48.1 (C-4), 70.1 (C-6), 82.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 103.0 (C-3), 170.8 (C-1), 212.9 (C-5).

Enolform: δ = 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 43.9 (C-2), 65.4 (C-6), 82.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 97.4 (C-4), 166.8 (C-1), 179.7, 198.0 (C-3, C-5).

MS (EI), m/z (%): 185 (3) $[M - \text{CH}_2\text{OH}]^+$, 143 (15) $[M - \text{O}^t\text{Bu}]$, 129 (26), 111 (11), 102 (23), 101 (23) $[M - \text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}]^+$, 84 (11), 59 (44), 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 56 (12).

$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_5$ (216.2).

6-Methoxy-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester 3t. Aus *tert*-Butylacetoacetat (1.58 g, 10.0 mmol), Natriumhydrid (0.40 g, 60 % in Mineralöl, 10.0 mmol) und *n*-Butyllithium (6.3 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 10.1 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (30 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. Die Lösung wurde auf -75°C abgekühlt, und Methoxyessigsäuremethylester (0.52 g, 5.0 mmol) wurde in einer Portion zugesetzt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 45 min auf 0°C erwärmt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Nach Kugelrohrdestillation ($7 \cdot 10^{-3}$ mbar, 85°C) und anschließender Flashchromatographie des Destillats an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 20:80 v/v) wurde das Produkt **3t** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.91 g (79 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 85:15; δ = 1.47 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.28 (s, 2 H_{ef} , H-2), 3.41 (s, 3 H_{kf} , OCH_3), 3.43 (s, 3 H_{ef} , OCH_3), 3.48 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.76 (s, 2 H_{kf} , H-4), 4.01 (s, 2 H_{ef} , H-6), 4.04 (s, 2 H_{kf} , H-6), 5.89 (s, 1 H_{ef} , H-4), 15.03 (br s, 1 H_{ef} , OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Enolform: δ = 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 46.3 (C-2), 59.6 (OCH_3), 73.5 (C-6), 82.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 97.7 (C-4), 166.8 (C-1), 187.3, 191.2 (C-3, C-5).

MS (EI), m/z (%): 230 (1) $[M]^+$, 185 (18), 157 (21) $[M - \text{O}^t\text{Bu}]^+$, 144 (16), 129 (100), 115 (45) $[M - \text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}]^+$, 111 (27), 84 (10), 57 (65) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

$\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_5$ (230.3).

6-Methoxy-3,5-dioxohexansäuremethylester 3u. Aus Methylacetoacetat (0.70 g, 6.0 mmol), Natriumhydrid (0.24 g, 60 % in Mineralöl, 6.0 mmol) und *n*-Butyllithium (3.8 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 6.1 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (30 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. Die Lösung wurde auf -75°C abgekühlt, und Methoxyessigsäuremethylester (0.31 g, 3.0 mmol) wurde in einer Portion zugesetzt. Anschließend wurde auf 0°C erwärmt und 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie

in AAV III beschrieben. Nach Kugelrohrdestillation (0.1 mbar, 75°C) und anschließender Flashchromatographie des Destillats an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 30:70 v/v) wurde das Produkt **3u** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.14 g (25 %).

¹H-NMR (CDCl₃): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 85:15; δ = 3.38 (s, 2 H_{ef}, H-2), 3.39 (s, 3 H_{kf}, CH₂OCH₃), 3.41 (s, 3 H_{ef}, CH₂OCH₃), 3.58 (s, 2 H_{kf}, H-2), 3.73 (s, 3 H_{ef+kf}, COOCH₃), 3.76 (s, 2 H_{kf}, H-4), 4.00 (s, 2 H_{ef}, H-6), 4.02 (s, 2 H_{kf}, H-6), 5.88 (s, 1 H_{ef}, H-4), 14.95 (br s, 1 H_{ef}, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): Enolform: δ = 44.8 (C-2), 52.6 (COOCH₃), 59.5 (CH₂OCH₃), 73.3 (C-6), 97.8 (C-4), 168.0 (C-1), 186.7, 191.0 (C-3, C-5).

MS (EI), *m/z* (%): 188 (2) [M]⁺, 158 (10), 143 (100) [M - CH₂OCH₃]⁺, 115 (24) [M - CH₂COOMe]⁺, 111 (15), 101 (63), 69 (31), 59 (13).

C₈H₁₂O₅ (188.2).

6-Phenyloxy-3,5-dioxohexansäuremethylester **3v**. Aus Methylacetoacetat (0.58 g, 5.0 mmol), Natriumhydrid (0.20 g, 60 % in Mineralöl, 5.0 mmol) und *n*-Butyllithium (3.1 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 5.0 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (30 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. Die Lösung wurde auf -15°C abgekühlt, und Phenyloxyessigsäuremethylester (0.33 g, 2.0 mmol) wurde in einer Portion zugesetzt. Anschließend wurde auf 0°C erwärmt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Überschüssiges Methylacetoacetat wurde durch Kugelrohrdestillation entfernt (50°C, 3.0 mbar). Nach Flashchromatographie des Rückstandes an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 30:70 v/v) wurde das Produkt **3v** als schwach gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.27 g (54 %).

¹H-NMR (CDCl₃): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 90:10; δ = 3.39 (s, 2 H_{ef}, H-2), 3.60 (s, 2 H_{kf}, H-2), 3.73 (s, 3 H_{kf+ef}, COOCH₃), 3.93 (s, 2 H_{kf}, H-4), 4.62 (s, 2 H_{ef+kf}, H-6), 6.02 (s, 1 H_{ef}, H-4), 6.92 (m, 2 H_{kf+ef}, ArH), 7.02 (m, 1 H_{kf+ef}, ArH), 7.30 (m, 2 H_{kf+ef}, ArH), 14.95 (br s, 1 H_{ef}, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): Enolform: δ = 44.6 (C-2), 52.7 (COOCH₃), 68.5 (C-6), 98.1 (C-4), 114.8, 122.0, 129.9 (Ar-C_p), 157.8 (Ar-C_q), 167.9 (C-1), 186.3, 190.4 (C-3, C-5).

C₁₃H₁₄O₅ (250.3).

6-Benzoyloxy-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester 3w. Aus *tert*-Butylacetoacetat (1.53 g, 9.7 mmol), Natriumhydrid (0.39 g, 60 % in Mineralöl, 9.7 mmol) und *n*-Butyllithium (6.1 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 9.8 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (40 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. Die Lösung wurde auf -75°C abgekühlt, und Benzoyloxyessigsäuremethylester (1.16 g, 6.4 mmol) wurde in einer Portion zugesetzt. Anschließend wurde auf 0°C erwärmt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Nicht abreagierte Edukte werden durch Kugelrohrdestillation ($5 \cdot 10^{-2}$ mbar, 85°C) entfernt und der Rückstand durch Flashchromatographie an säuregewaschenem Kieselgel gereinigt (Diethylether/*n*-Hexan 30:70 v/v). Das Produkt **3w** fiel als schwach gelbes Öl an. Ausbeute: 0.90 g (46 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 86:14; δ = 1.47 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.29 (s, 2 H_{ef} , H-2), 3.46 (s, 2 H_{kf} , H-2), 3.78 (s, 2 H_{kf} , H-4), 4.10 (s, 2 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, H-6), 4.58 (s, 2 H_{kf} , ArCH_2), 4.60 (s, 2 H_{ef} , ArCH_2), 5.97 (s, 1 H_{ef} , H-4), 7.33-7.38 (m, 5 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, ArH), 14.93 (br s, 1 H_{ef} , OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): Enolform: δ = 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 46.3 (C-2), 70.8 (ArCH_2), 73.5 (C-6), 82.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 97.8 (C-4), 128.0, 128.2, 128.7 (Ar-C_p), 137.2 (Ar-C_q), 166.9 (C-1), 187.4, 191.2 (C-3, C-5).

MS (EI), m/z (%): 233 (6) [$M - \text{O}^t\text{Bu}$] $^+$, 191 (11) [$M - \text{CH}_2\text{COO}^t\text{Bu}$] $^+$, 144 (70), 129 (31), 126 (14), 111 (12), 107 (15), 92 (12), 91 (100) [Bn] $^+$, 57 (47) [C_4H_9] $^+$.

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_5$ (306.3).

6,6-Dimethoxy-3,5-dioxohexansäure-tert-butylester 3y. Aus *tert*-Butylacetoacetat (1.19 g, 7.5 mmol), Natriumhydrid (0.30 g, 60 % in Mineralöl, 7.5 mmol) und *n*-Butyllithium (4.7 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 7.5 mmol) wurde eine Bisenolat-Lösung in THF (30 mL) dargestellt wie in AAV III beschrieben. Die Lösung wurde auf -75°C abgekühlt, und Dimethoxyessigsäuremethylester (0.67 g, 5.0 mmol) wurde in einer Portion zugesetzt. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 1 h auf 0°C erwärmt und 1 h bei dieser Temperatur gerührt. Zur Hydrolyse und Aufarbeitung wurde verfahren wie in AAV III beschrieben. Nach Kugelrohrdestillation (80°C , 10^{-2} mbar,) und anschließender Flashchromatographie des Destillats an säuregewaschenem Kieselgel (Ethylacetat/*n*-Hexan 20:80 v/v) wurde das Produkt **3y** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 0.89 g (68 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Enolform (ef)/Ketoform (kf) = 90:10; δ = 1.46 (s, 9 $\text{H}_{\text{ef+kf}}$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$),

3.30 (s, 2 H_{ef}, H-2), 3.38 (s, 6 H_{ef}, CH(OCH₃)₂), 3.40 (s, 6 H_{kf}, CH(OCH₃)₂), 3.46 (s, 2 H_{kf}, H-2), 3.80 (s, 2 H_{kf}, H-4), 4.51 (s, 1 H_{kf}, H-6), 4.76 (s, 1 H_{ef}, H-6), 5.97 (s, 1 H_{ef}, H-4), 14.52 (br s, 1 H_{ef}, OH).

¹³C-NMR (CDCl₃): Enolform: δ = 28.1 (C(CH₃)₃), 46.9 (C-2), 53.8 (CH(OCH₃)₂), 82.3 (C(CH₃)₃), 98.8 (C-4), 100.7 (C-6), 166.5 (C-1), 185.3, 189.6 (C-3, C-5).

MS (EI), *m/z* (%): 260 (1) [M]⁺, 187 (4) [M – O^tBu]⁺, 145 (12) [M – CH₂COO^tBu]⁺, 75 (100) [CH(OMe)₂]⁺, 57 (28) [C₄H₉]⁺.

C₁₂H₂₀O₆ (260.3).

Untersuchungen zur Stabilität von β,δ-Diketoestern

β,δ-Diketoester 3a, 3e und 3j

AAV IV: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Untersuchung der Stabilität von 3,5-Dioxohexansäureestern in wässrigem Puffer. In einem Rundkolben wird ein 3,5-Dioxohexansäureester (0.1 mmol) mit Phosphat-Puffer (10.0 mL, pH 7.2, 100 mM, 1.0 mM MgCl₂) und 2-Propanol (77 μL, 1.0 mmol) versetzt, und die Lösung wird bei Raumtemperatur gerührt. Proben der Lösung (0.5 mL) werden mit Dichlormethan (0.5 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit Dichlormethan (0.5 mL) verdünnt und anschließend mittels GC-MS analysiert (Temperaturprogramm A).

3,5-Dioxohexansäuremethylester 3a wurde behandelt wie in AAV IV beschrieben. Nach 53 h wurden mit GC-MS die drei Substanzen 3a, 16 und 16' im Verhältnis von 24:46:30 detektiert.

β,δ-Diketoester 3a: *t_R* = 5.7 min; *m/z* (%): 158 (14) [M]⁺, 143 (9), 127 (12) [M – OMe]⁺, 126 (34), 116 (24), 101 (24), 98 (19), 85 (100) [M – CH₂COOMe]⁺, 84 (12), 69 (34), 59 (21), 55 (11).

Aromat 16: *t_R* = 12.7 min; *m/z* (%): 280 (22) [M]⁺, 248 (34), 233 (29), 220 (58), 217 (30), 205 (85), 201 (100), 188 (73).

Aromat 16': *t_R* = 13.0 min; *m/z* (%): 280 (19) [M]⁺, 248 (26), 233 (24), 220 (100), 217 (24), 201 (77), 189 (21), 188 (44), 161 (21), 160 (26).

3,5-Dioxohexansäureethylester 3e wurde behandelt wie in AAV IV beschrieben. Nach 53 h wurden mit GC-MS die drei Substanzen **3e**, **17** und **17'** im Verhältnis von 73:21:6 detektiert detektiert.

β,δ -Diketoester **3e**: $t_R = 6.4$ min; m/z (%): 172 (16) $[M]^+$, 130 (31), 127 (21) $[M - OEt]^+$, 126 (40), 115 (56), 111 (10), 98 (31), 85 (100) $[M - CH_2COOEt]^+$, 84 (19), 69 (27), 60 (10), 55 (10).

Aromat **17**: $t_R = 13.4$ min; m/z (%): 308 (23) $[M]^+$, 263 (22), 262 (31), 247 (23), 234 (60), 219 (19), 217 (32), 206 (35), 205 (84), 201 (100), 189 (40), 188 (99), 162 (59), 91 (20), 77 (20).

Aromat **17'**: $t_R = 13.8$ min; m/z (%): 308 (11) $[M]^+$, 263 (20), 262 (22), 234 (100), 217 (29), 201 (47), 189 (23), 188 (52), 161 (20), 160 (21).

3,5-Dioxohexansäure-tert-butylester 3j wurde behandelt wie in AAV IV beschrieben. Nach 53 h wurde mit GC-MS lediglich β,δ -Diketoester **3j** detektiert: $t_R = 6.9$ min; m/z (%): 200 (2) $[M]^+$, 145 (24), 144 (27), 127 (53) $[M - O^tBu]^+$, 126 (33), 85 (82) $[M - CH_2COO^tBu]^+$, 57 (100) $[C_4H_9]^+$.

β,δ -Diketoester **3q**

Arbeitsvorschrift zur Untersuchung der Bildung von Furanon 18 aus β,δ -Diketoester 3q in wässrigem Puffer: In einem Rundkolben wurde β,δ -Diketoester **3q** (0.1 mmol) mit Puffer und 2-Propanol versetzt, und die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt (siehe Tab. 2-3, Seite 20, für Konzentrationsangaben). Eine Probe der Lösung (1.0 mL) wurde mit $CDCl_3$ (0.8 mL) extrahiert und die organische Phase mittels 1H -NMR analysiert. Der Umsatz zum Furanon **18** wurde durch Integration der Signale bei 4.53 ppm (Furanon **18**) und 3.31 ppm (β,δ -Diketoester **3q**, Enolform) bestimmt. Die Keto-Enol-Tautomerie des β,δ -Diketoesters **3q** wurde durch eine rechnerische Korrektur berücksichtigt (Enolform / Ketoform = 88:12).

Furanon 18. Präparativer Ansatz: Zu einer Lösung des β,δ -Diketoesters **3q** (234 mg, 1.0 mmol) in Ethanol (10 mL) wurde Phosphat-Puffer (20 mL, pH 7.0, 250 mM) gegeben, und die Lösung wurde für 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und verdünnte Salzsäure (5 mL, 2 M) zugesetzt. Die Mi-

schung wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaHCO_3 -Lösung (5 %) und ges. NaCl -Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand durch Flashchromatographie an Kieselgel gereinigt (Ethylacetat/*iso*-Hexan 40:60 v/v). Das Produkt **18** fiel als schwach gelbes Öl an, das bei 4°C langsam erstarrte. Ausbeute: 157 mg (79 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):ⁱ $\delta = 1.47$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.48 (s, 2 H, H-2), 4.53 (s, 2 H, H-6), 5.68 (s, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):ⁱ $\delta = 28.1$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 38.3 (C-2), 75.5 (C-6), 82.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 106.4 (C-4), 165.9 (C-1), 187.0 (C-3), 202.7 (C-5).

MS (EI), m/z (%): 198 (11) $[\text{M}]^+$, 125 (77) $[\text{M} - \text{O}^t\text{Bu}]^+$, 97 (25), 98 (10), 67 (20), 59 (13), 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (198.2).

ⁱ β,δ -Diketoester-Nummerierung

6.3 Synthese von δ -Hydroxy- β -ketoestern

Enzymatische Reduktion von β,δ -Diketoestern (zellfreie Umsetzungen)

Präparation von recLBADH (Zellrohextrakt)

Methode A: *Naßvermahlung von E. coli recADH-HB101+ mit Glasperlen.*^[117] Eine 20%ige Zellsuspension (5 mL) in Phosphat-Puffer (pH 7.5, 100 mM, 10 Tropfen·L⁻¹ Polypropylenglycol-Antischaum "Ucoloub", 1.0 mM MgCl₂) wurde gleichmäßig auf acht Einwegreaktionsgefäße ("Eppendorf Cups", 1.5 mL) verteilt und Glasperlen (je 1.2 g, 0.2 mm Durchmesser) wurden zugegeben. Die Gefäße wurden mit Eis gekühlt und unter Zuhilfenahme eines vorgekühlten Zylinders in eine Schwingmühle "MM2" (RETSCH) eingespannt. Der Aufschluß erfolgte bei 100 % Leistung in zwei Intervallen zu je 5 min mit zwischenzeitlicher Kühlung. Anschließend wurde zentrifugiert, und die Überstände wurden vereinigt. Ausbeute: 3 mL, 1.1 kU·mL⁻¹ (Aktivität bezogen auf die Reduktion von Acetophenon, siehe AAV V).

Methode B: *Ultraschall-Aufschluß von E. coli recADH-HB101+.* Eine 30%ige Zellsuspension (15 mL) in Phosphat-Puffer (pH 7.0, 50 mM, 1.0 mM MgCl₂) wurde bei 0°C viermal für jeweils 5 min in einem "Sonifier 250" der Firma BRANSON beschallt (Duty Cycle 50 %, Power 5, Output ca. 40 %, zwischen den Intervallen jeweils 5 min Kühlung in Eis). Anschließend wurde 20 min bei 4°C zentrifugiert (BECKMANN Avanti 30, Rotor F1010, 2.0·10⁴ rpm). Ausbeute: 14 mL, 2.4 kU·mL⁻¹ (Aktivität bezogen auf die Reduktion von Acetophenon, siehe AAV V).

Photometrische Enzymassays

AAV V: *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur photometrischen Bestimmung von Enzymaktivität.* Enzymlösung (10 μ L) geeigneter Verdünnung wird in einer Halbmikro-Plastikküvette zu 990 μ L einer temperierten Lösung von Keton und NAD(P)H (0.25 mM) in dem jeweils angegebenen Puffer pipettiert, und die Lösung wird mit einem Plastikspatel durchmischt. Die Oxidation des Cofaktors wird über eine Minute bei 340 nm ($\epsilon_{\text{NAD(P)H}} = 6.22 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) photometrisch verfolgt. Eine Einheit Enzymaktivität (U) ist definiert als die Menge Enzym, die unter den Meßbedingungen die Oxidation von einem Mikromol NAD(P)H pro Minute katalysiert. Die Berechnung erfolgt nach dem Lambert-Beer-Boguer-Gesetz.^[118] Bei Ausbleiben der

Reaktion wird der Assay durch Zugabe einer geringen Menge eines Referenzsubstrates auf seine Funktionsfähigkeit überprüft. Lösungen von β,δ -Diketoestern müssen frisch angesetzt und nach spätestens zehn Minuten verwendet werden, da es bei längerer Lagerung häufig zu einer Trübung kommt. Bei diesen Substraten muß außerdem kontrolliert werden, ob es vor der Enzymzugabe bereits durch nichtenzymatische Nebenreaktionen zu einer Extinktionsänderung kommt. Trifft dies zu, wird die Extinktionsänderung über eine Minute verfolgt und bei Ermittlung der Enzymaktivität rechnerisch berücksichtigt.

recLBADH. Die Bestimmung erfolgte nach AAV V bei 25°C in Phosphat-Puffer (pH 6.5, 100 mM, 1.0 mM MgCl₂) mit NADPH als Cofaktor. Die Berechnung der relativen Reaktionsrate für die Reduktion eines β,δ -Diketoesters erfolgte durch Vergleich mit dem Wert für das Referenzsubstrat Acetophenon, welcher willkürlich auf 100 % gesetzt wurde. Substratkonzentrationen und Meßergebnisse sind in *Tab. 3-1* angegeben. Die Angabe von Enzymaktivitäten in U bzw. kU bezieht sich stets auf die Reduktion von Acetophenon unter den hier angegebenen Bedingungen.

CPCR, READH, HLADH, YADH. Die Bestimmung erfolgte nach AAV V bei 25°C in Phosphat-Puffer (pH 6.5, 100 mM) mit NADH als Cofaktor. Als Referenzsubstrate dienten Ethylacetoacetat (CPCR, READH), Cyclohexanon (HLADH) und Aceton (YADH) in einer Konzentration von jeweils 10 mM. In Anwesenheit von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester (**3q**, 2 mM) und 3,5-Dioxohexansäure-*tert*-butylester (**3j**, 10 mM) konnte nach Enzymzugabe keine Oxidation des Cofaktors detektiert werden.

TBADH. Die Bestimmung erfolgte nach AAV V in TRIS-Puffer (pH 7.8, 50 mM) mit NADPH als Cofaktor bei 37°C. Als Referenzsubstrat diente Butanon (10 mM). In Anwesenheit von 6-Chlor-3,5-dioxohexansäure-*tert*-butylester (**3q**, 2 mM) und 3,5-Dioxohexansäure-*tert*-butylester (**3j**, 10 mM) konnte nach Enzymzugabe keine Oxidation des Cofaktors detektiert werden.

Reduktion von β,δ -Diketoestern mit recLBADH

(R)-5-Hydroxy-3-oxohexansäure-tert-butylester (*R*)-**2a**. In einem Rundkolben wurde bei 20°C zu Triethanolamin-Puffer (330 mL, pH 7.0, 250 mM, 1.0 mM MgCl₂) eine Lösung des β,δ -Diketoesters **3j** (1.98 g, 9.9 mmol) in 2-Propanol (5.1 mL, 66 mmol) gegeben, und die Mischung wurde 10 min intensiv gerührt. Die Rührergeschwindigkeit wurde auf 60 rpm reduziert, und NADP (28 mg, 33 μ mol, 90 %) und recLBADH (330 U) wurden zugesetzt. Nach 24 h wurde die Lösung mit NaCl gesättigt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / *iso*-Hexan 40:60 v/v) ergab das Produkt (*R*)-**2a** als farbloses Öl. Ausbeute: 1.54 g (77 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -40.1$ ($c = 1.9$, CHCl₃); Lit.: $[\alpha]_{\text{D}}^{26} = -39.6$ ($c = 2$, CHCl₃), 99 % *ee*.^[48a]

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.21$ (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, H-6), 1.48 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.64 (dd, $J = 17.7, 8.5$ Hz, 1 H, H-4), 2.74 (dd, $J = 17.7, 3.2$ Hz, 1 H, H-4), 2.91 (br s, 1 H, OH), 3.38 (s, 2 H, H-2), 4.27 (m, 1 H, H-5). In dem ¹H-NMR-Spektrum ist eine schwache Enolisierung der Verbindung zu erkennen (ca. 5 %): 1.25 (d, $J = 6.4$ Hz), 1.49 (s), 4.96 (s), 12.35 (s).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 22.6$ (C-6), 28.1 (C(CH₃)₃), 51.2, 51.3 (C-2, C-4), 63.9 (C-5), 82.4 (C(CH₃)₃), 166.4 (C-1), 204.4 (C-3).

C₁₀H₁₈O₄ (202.2) Das ¹H-NMR-Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[48a]

(R)-5-Hydroxy-3-oxoheptansäure-tert-butylester (*R*)-**2b**. Methode A: Umsetzung im einphasigen Reaktionsmedium. In einem Rundkolben wurde bei 20°C zu Phosphat-Puffer (35 mL, pH 6.5, 250 mM, 1.0 mM MgCl₂) β,δ -Diketoester **3l** (150 mg, 0.7 mmol) und 2-Propanol (0.5 mL, 108 mmol) gegeben, und die Mischung wurde 10 min intensiv gerührt. Die Rührergeschwindigkeit wurde auf 60 rpm reduziert, und NADP (15 mg, 18 μ mol, 90 %) und recLBADH (54 U) wurden zugesetzt. Nach 24 h und 48 h wurden NADP (jeweils 10 mg, 13 μ mol) und recLBADH (jeweils 50 U) nachdosiert. Nach weiteren 48 h wurde die Lösung mit NaCl gesättigt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit NaHCO₃-Lösung (5 %), Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / *iso*-Hexan 30:70

v/v) ergab das Produkt (*R*)-**2b** als farbloses Öl. Ausbeute: 92 mg (61 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -36.0$ ($c = 1.0$, CHCl_3); Lit.: $[\alpha]_{\text{D}} = -35.6$ ($c = 1$, CHCl_3), 99 % *ee*.^[48b]

¹H-NMR (CDCl_3): $\delta = 0.94$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, H-7), 1.43-1.56 (m, 2 H, H-6) überlagert mit 1.46 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.61 (dd, $J = 17.5, 8.9$ Hz, 1 H, H-4), 2.73 (dd, $J = 17.5, 3.0$ Hz, 1 H, H-4), 2.90 (br s, 1 H, OH), 3.38 (s, 2 H, H-2), 3.99 (m, 1H, H-5). In dem ¹H-NMR-Spektrum ist eine schwache Enolisierung der Verbindung zu erkennen (ca. 5 %): 0.95 (t, $J = 7.4$ Hz), 1.48 (s), 4.95 (s), 12.38 (s).

¹³C-NMR (CDCl_3): $\delta = 10.0$ (C-7), 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.4 (C-6), 49.2, 51.4 (C-2, C-4), 69.0 (C-5), 82.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 166.4 (C-1), 204.6 (C-3).

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (216.3) Das ¹H-NMR-Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[48b]

(R)-5-Hydroxy-3-oxoheptansäure-*tert*-butylester (*R*)-**2b**. Methode B: Umsetzung im zweiphasigen Reaktionsmedium. Amberlite XAD-7 Adsorberharz wurde vor der Reaktion mit Wasser, Aceton und Ethylacetat gewaschen und bei 40°C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. In einem Rundkolben wurde zu einer Lösung des β,δ -Diketoesters **3l** (0.94 g, 4.4 mmol) in Ethylacetat das gewaschene Adsorberharz (1.6 g) gegeben, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Phosphat-Puffer (145 mL, pH 6.5, 250 mM, 1.0 mM MgCl_2), 2-Propanol (2.3 mL, 29.4 mmol), NADP (25 mg, 29 μmol , 90 %) und recLBADH (2.0 kU) wurden zugesetzt, und das Gemisch wurde bei 25°C gerührt (60 rpm). Nach 48 h wurde NADP (10 mg, 12 μmol) nachdosiert. Nach weiteren 48 h wurde das Adsorberharz abfiltriert (Glasfilternutsche, Porengröße 0) und das Filtrat bis auf ein Retentatvolumen von ca. 6 mL ultrafiltriert (AMICON, 50 mL-Zelle, YM-10-Membran). Adsorberharz und Filtrat wurden mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO_4 wurde im Vakuum eingeeengt. Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 30:70 v/v) ergab das Produkt (*R*)-**2b** als farbloses Öl. Ausbeute: 0.63 g (66 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -36.9$ ($c = 1.0$, CHCl_3).

Das Retentat der Ultrafiltration wurde mit einer Pipette aus der Rührzelle entfernt, und Membran und Rührzelle wurden zweimal mit Phosphat-Puffer (je 4 mL, pH 6.5, 250 mM, 1.0 mM MgCl_2) nachgewaschen. Wiederfindung: 1.25 kU (63 %).

(*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester (*S*)-**2c**. Methode A: Umsetzung im 10 mmol Maßstab. In einem Rundkolben wurde bei 20°C zu Phosphat-Citrat-Puffer (530 mL, pH 5.5, 250 mM Na₂HPO₄, 125 mM Citronensäure, 1.0 mM MgCl₂) eine Lösung des β,δ-Di-ketoesters **3q** (2.53 g, 10.8 mmol) in 2-Propanol (8.3 mL, 108 mmol) gegeben, und die Mischung wurde 5 min intensiv gerührt. Die Rührergeschwindigkeit wurde auf 60 rpm reduziert, und NADP (92 mg, 108 μmol, 90 %) und recLBADH (1.4 kU) wurden zugesetzt. Nach 14 h wurde die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert, mit NaCl gesättigt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 40:60 v/v) wurde das Produkt (*S*)-**2c** als schwach gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.84 g (72 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -24.9$ ($c = 1.4$, CHCl₃); Authentische Probe (siehe Seite 118): $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -23.0$ ($c = 1.5$, CHCl₃), >97 % *ee*.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.47 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.83 (dd, $J = 17.5, 7.3$ Hz, 1 H, H-4), 2.90 (dd, $J = 17.5, 5.0$ Hz, 1 H, H-4), 3.10 (br s, 1 H, OH), 3.41 (s, 2 H, H-2), 3.57 (dd, $J = 11.2, 5.0$ Hz, 1 H, H-6), 3.62 (dd, $J = 11.2, 5.1$ Hz, 1 H, H-6), 4.31 (m, 1 H, H-5). In dem ¹H-NMR-Spektrum ist eine schwache Enolisierung der Verbindung zu erkennen (ca. 5 %): 1.48 (s), 4.99 (s), 12.37 (s).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 28.1 (C(CH₃)₃), 46.6, 48.4, 51.3 (C-2, C-4, C-6), 67.6 (C-5), 82.7 (C(CH₃)₃), 166.2 (C-1), 202.9 (C-3).

MS (EI), m/z (%): 236 (1) [M]⁺, 163/165 (27/9) [M – O^tBu], 144 (11), 131 (41), 121/123 (20/6) [M – CH₂COO^tBu]⁺, 102 (13), 85 (10), 59 (18), 57 (100) [C₄H₉]⁺.

C ₁₀ H ₁₇ ClO ₄ (236.7)	berechnet (%):	C 50.74	H 7.24
	gefunden (%):	C 50.81	H 7.29

(*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester (*S*)-**2c**. Methode B: Umsetzung im 300 mmol Maßstab mit kontinuierlicher Substratdosierung. Die Reaktion wurde bei 22°C in einer Apparatur durchgeführt, wie sie in der folgenden Abbildung skizziert ist (Abb. 6-1):

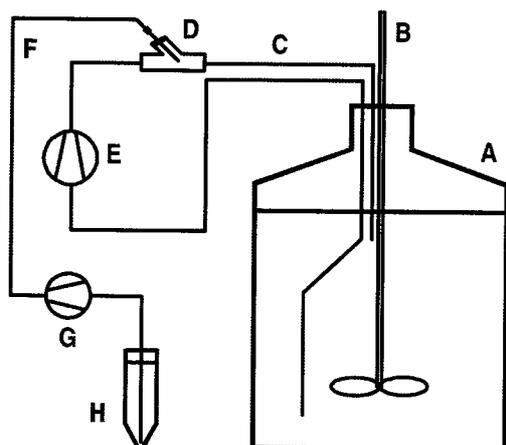


Abb. 6-1. Schematische Darstellung der Apparatur zur enzymatischen Reduktion von β,δ -Diketoester **3q**. — A: Glasflasche (SCHOTT, 10 L) — B: Flügelrührer (PTFE) — C: PTFE-Schlauch (4 mm ID, 6 mm AD) — D: Y-Stück (Glas) mit Septum — E: Schlauchpumpe (VERDER 504U) — F: PTFE-Schlauch (2 mm ID, 3 mm AD), terminiert mit medizin. Einwegkanüle (1 mm ID) — G: Schlauchpumpe (WATSON-MARLOW 101U) — H: Substratvorlage.

Eine Lösung von 2-Propanol (180 mL, 2.4 mol), NADP·4H₂O (2.00 g, 2.4 mmol) und recLBADH (40 kU) in Phosphat-Citrat-Puffer (8 L, pH 5.5, 150 mM Na₂HPO₄, 75 mM Citronensäure, 1.0 mM MgCl₂) wurde mit 0.3 L·min⁻¹ im Kreis gepumpt. Zu dieser Lösung wurde über einen Zeitraum von 9 h kontinuierlich eine Lösung des β,δ -Diketoesters **3q** (71.6 g, 0.27 mol, ca. 90 %) in 2-Propanol (100 mL, 1.3 mol) gepumpt. Nach beendeter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für weitere 14 h gerührt und anschließend vakuumlos durch einen Papierrundfilter filtriert ("Schwarzband", 185 mm Ø, Büchnertrichter). Das Filtrat wurde einer Ultrafiltration unterworfen ["Minisette" (FILTRON), drei Kassetten "Omega 10 k"], wobei mit dem Retentat (80 mL) 16 kU recLBADH zurückgewonnen wurden (40 % Wiederfindung). Das proteinfreie Filtrat wurde viermal mit Ethylacetat (je 0.5 L) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Das Produkt (*S*)-**2c** fiel gemäß ¹H-NMR-Analyse mit ca. 90 % Reinheit an und wurde ohne weitere Reinigung weiterverarbeitet (6 mol% Furanon **18** als Hauptverunreinigung). Ausbeute: 60.8 g (84 %), gelbes Öl.

syn-(4*S*,5*R*)-5-Hydroxy-4-methyl-3-oxohexansäure-*tert*-butylester *syn*-(4*S*,5*R*)-**2d**. In einem Rundkolben wurde zu Phosphat-Puffer (120 mL, pH 6.5, 100 mM, 1.0 mM MgSO₄) eine Lösung des β,δ -Diketoesters **3o** (0.53 g, 2.5 mmol) in 2-Propanol (1.9 mL, 25 mmol) gegeben, und die Mischung wurde 1 min im Ultraschallbad homogenisiert. NADP (105 mg, 120 μ mol, 90 %) und recLBADH (360 U) wurden zugesetzt, und es wurde bei 25°C langsam gerührt (60 rpm). Nach 23 h wurde NaCl (20 g) zugelöst, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeignet (Rohprodukt: $dr_{s:a} = 33:1$, ¹³C-NMR, siehe unten). Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 40:60 v/v) ergab das Produkt *syn*-(4*S*,5*R*)-**2d** als farbloses Öl. Ausbeute: 0.35 g (65 %). — $[\alpha]_D^{25} = -4.2$ ($c = 3.3$, CHCl₃), $dr_{s:a} = 35:1$; Authentische Probe [(4*R*,5*S*)-Enantiomer]: $[\alpha]_D^{25} = +6.5$ ($c = 1.6$, CHCl₃), 99.2 % *ee*, $dr_{s:a} = 15:1$.

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.15$ (d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, C₇CH₃), 1.17 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, H-6), 1.46 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 2.15 (br s, 1 H, OH), 2.70 (dq, $J = 3.3, 7.2$ Hz, 1 H, H-4), 3.42 (d, $J = 15.0$ Hz, 1 H, H-2), 3.48 (d, $J = 15.0$ Hz, 1 H, H-2), 4.15 (dq, $J = 3.3, 6.4$ Hz, 1 H, H-5). In dem ¹H-NMR-Spektrum ist eine schwache Enolisierung der Verbindung zu erkennen (ca. 8 %): 1.48 (s), 4.93 (s), 12.44 (s).

¹³C-NMR (CDCl₃): Ketoform: $\delta = 10.3$ (C₇CH₃), 20.0 (C-6), 27.8 (C(CH₃)₃), 49.9 (C-2), 52.2 (C-4), 67.5 (C-5), 81.8 (C(CH₃)₃), 166.7 (C-1), 207.4 (C-3).
Enolform: $\delta = 12.7$ (C₇CH₃), 20.7 (C-6), 28.0 (C(CH₃)₃), 46.5 (C-4), 69.0 (C-5), 80.8 (C(CH₃)₃), 90.7 (C-2), 172.6 (C-1), 179.5 (C-3).

MS (EI), m/z (%): 143 (10) [$M - O^tBu$]⁺, 125 (10), 116 (60), 98 (23), 87 (10), 83 (14), 59 (22), 57 (100) [C₄H₉]⁺, 56 (31), 55 (14).

C ₁₁ H ₂₀ O ₄ (216.3)	berechnet (%):	C 61.09	H 9.32
	gefunden (%):	C 60.82	H 9.30.

Das Diastereomerenverhältnis $dr_{s:a}$ wurde durch ¹³C-NMR-Spektroskopie bestimmt, wobei die Resonanzen δ (C-2), δ (C-4) und δ (C-5) zur Berechnung herangezogen wurden und der Mittelwert gebildet wurde (max. Abweichung ± 8 %; Meßbedingungen: $c = 0.3$ g·mL⁻¹, 8192 Scans).

Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit *L. kefir* (Ganzzelltransformation)

(*S*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester (*S*)-**2c** und *syn*-(3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27**. Feuchtzellmasse von *L. kefir* (0.6 g, angezogen auf glucosehaltigem Medium)^[43] wurde in Phosphat-Citrat-Puffer (0.5 mL, pH 5.5, 250 mM Na₂HPO₄, 125 mM Citronensäure, 1.0 mM MgCl₂) suspendiert und 0.9 mL dieser Zellsuspension mit wäßriger Glucose-Lösung (1.0 mL, 5 M), Phosphat-Citrat-Puffer (8.0 mL) und β,δ -Diketoester **3q** (59 mg, 0.25 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 12.5 h bei 22°C gerührt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Einengen im Vakuum wurde ein gelbes Öl erhalten (44 mg), das aus den Reduktionsprodukten (*S*)-**2c** und *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** sowie dem Furanon **18** bestand. GC-MS (AAV VIb, AAV XII): 34 % Dihydroxyester *syn*-**27** ($dr_{s:a} = 135:1$), 61 % δ -Hydroxy- β -ketoester **2c**, 5 % Furanon **18**. Das Produktgemisch wurde nach AAV VII in das α,β -ungesättigte δ -Lacton (*S*)-**19c** überführt. CSP-HPLC (AAV VIII): (*S*)-Konfiguration ($t_R = 24.3$ min), 99.4 % *ee*.

Reduktion des β,δ -Diketoesters **3q** mit Bäckerhefe (Ganzzelltransformation)

Umsetzungen im analytischen Maßstab; Optimierung der Reaktionsbedingungen

Arbeitsvorschrift zur Reduktion mit nichtimmobilisierter Hefe. Maßstab: 40-80 μ mol; siehe Tab. 3-4, Tab. 3-6, Tab. 3-7 und Tab. 3-8 für Konzentrationsangaben. Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) wird in ein Rollrandgläschen eingewogen und mit einem Spatel im Reaktionsmedium verrührt. Das Substrat **3q** wird mit einer Pipette zugegeben und das Rollrandgläschen mit einem mehrfach perforierten Plastikdeckel verschlossen. Es wird 1 min bei voller Leistung gerührt (Magnetrührer) und der Rührer anschließend auf 100 rpm eingestellt. Bei Verwendung von Additiven werden diese vor der Reaktion zur wäßrigen Zellsuspension gegeben. Das Substrat (und ggf. das organische Lösungsmittel) wird in diesem Fall erst nach Ablauf der Vorinkubationszeit zugesetzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird mit Dichlormethan extrahiert, und ca. 2 mL der resultierenden Mischung werden zentrifugiert. Die organische Phase wird mit einer Pipette abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird im Luftstrom eingengt und der Rückstand nach AAV VI analysiert.

Arbeitsvorschrift zur Reduktion mit immobilisierter Frischhefe. Maßstab: 0.25-0.5 mmol, siehe Tab. 3-5 für Konzentrationsangaben). Bäckerhefe (*S. cerevisiae*, Feuchtzellmasse) wird

nach einer Literaturvorschrift in Calciumalginat immobilisiert, so daß Alginat-Perlen mit 1-3 mm Durchmesser und einem Hefeanteil von 30 % erhalten werden.^[85] Das Immobilisat wird bei 4°C in 4%iger CaCl₂-Lösung aufbewahrt und innerhalb von zwei Wochen verwendet. Die Alginat-Perlen werden vor der Reduktion abfiltriert, mit einem Papiertuch trockengeputzt und in einen Erlenmeyerkolben eingewogen. Reaktionsmedium und β,δ -Diketoester **3q** werden zugesetzt, und das Gemisch wird 1 min bei voller Leistung gerührt. Die Rührergeschwindigkeit wird anschließend auf 60 rpm eingestellt und die Kolbenöffnung mit Aluminiumfolie lose abgedeckt. Bei Verwendung von Additiven werden diese vor der Reaktion zu einer Suspension des Immobilisats in Wasser gegeben. Das Substrat (und ggf. das organische Lösungsmittel) wird in diesem Fall erst nach Ablauf der Vorinkubationszeit zugesetzt. Experimente mit D-(+)-Gluconolacton als Kohlenstoffquelle werden in offenen Kolben durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Immobilisat abfiltriert und das Filtrat mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wird nach AAV VI analysiert.

Arbeitsvorschrift zur Reduktion mit kontinuierlicher Substratdosierung. (Maßstab: 0.25 mmol, siehe Tab. 3-4 und Tab. 3-9 für Konzentrationsangaben). β,δ -Diketoester **3q** wird als Lösung in *n*-Hexan (125 mM) kontinuierlich zu einer gerührten (60 rpm) Zellsuspension der Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) gepumpt ("Dispenser 500B", HAMILTON; PEEK-Kapillare). Alternativ wird das Substrat mit einer Eppendorf-Pipette in 24 Einzelportionen zugegeben. Als Reaktionsgefäß dient ein 50 mL Erlenmeyerkolben, der mit einem Wattebausch verschlossen ist. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird mit Dichlormethan extrahiert, und ca. 2 mL der resultierenden Mischung werden zentrifugiert. Die organische Phase wird mit einer Pipette abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird im Luftstrom eingeeengt und der Rückstand nach AAV VI analysiert.

AAV VI: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Produktanalytik (Bäckerhefe-Reduktion; CSP-HPLC und GC-MS). Der zu analysierende Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, so daß eine Lösung mit einer Konzentration von 5 mg·mL⁻¹ erhalten wird. a) Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (CSP-HPLC): In einem Mikroial werden 200 μ L der Produktlösung mit Trifluoressigsäure (50 μ L) versetzt. Das Vial wird verschlossen und für 2 h bei 40°C im Wasserbad erwärmt. Der Enantiomerenüberschuß des resultierenden β -Keto- δ -lactons

(*R*)-**20** wird anschließend durch CSP-HPLC bestimmt. Parameter: Säule MERCK ChiraSpher NT (250 × 4 mm) mit Vorsäule LiChrospher 100 DIOL (4 × 4 mm); Temperatur 40°C; Detektorwellenlänge 235 nm; Injektionsvolumen 5 µL; Laufmittel MTBE/Methanol 98:2 (v/v); Fluß 0.15 mL·min⁻¹. Retentionszeiten: (*R*)-**20** $t_R = 78.2$ min, (*S*)-**20** $t_R = 84.0$ min. b) Bestimmung des Umsatzes (GC-MS): Eine Probe der Produktlösung (50 µL) wird mit Dichlormethan (100 µL) verdünnt und mit Trifluoressigsäureanhydrid derivatisiert wie auf Seite 77 beschrieben. Die Produktzusammensetzung wird anschließend durch GC-MS bestimmt (Temperaturprogramm A).

δ -Hydroxy- β -ketoester **2c**: $t_R = 8.3$ min + 7.8 min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat, zwei Isomere).

MS (EI), m/z (%): Hauptisomer: 355/357 (28/9) [$M - O^tBu$]⁺, 241/243 (43/15) [$M - O^tBu - CF_3COOH$]⁺, 69 (36), 57 (100) [C_4H_9]⁺, 56 (15).
Nebenisomer: 355/357 (13/5), 241/243 (28/9), 69 (33), 57 (100), 56 (24).

β, δ -Dihydroxyester *syn*-**27**: $t_R = 8.1$ min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat).

MS (EI), m/z (%): 357/359 (7/3) [$M - O^tBu$]⁺, 243/245 (21/7) [$M - O^tBu - CF_3COOH$]⁺, 129/131 (34/12) [$M - O^tBu - 2 \times CF_3COOH$]⁺, 97 (10), 69 (23), 57 (100) [C_4H_9]⁺, 56 (40).

β, δ -Dihydroxyester *anti*-**27**: $t_R = 8.2$ min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat).

MS (EI), m/z (%): 357/359 (20/5) [$M - O^tBu$]⁺, 243/245 (41/14) [$M - O^tBu - CF_3COOH$]⁺, 129/131 (51/17) [$M - O^tBu - 2 \times CF_3COOH$]⁺, 97 (11), 69 (24), 57 (100) [C_4H_9]⁺, 56 (24).

Furanon **18**: $t_R = 6.9$ min (Trifluoracetyl-Derivat).

MS (EI), m/z (%): 294 (7) [M]⁺, 221 (28) [$M - O^tBu$]⁺, 194 (12), 193 (66) [$M - COO^tBu$]⁺, 69 (16), 57 (100) [C_4H_9]⁺.

β, δ -Diketoester **3q**: $t_R = 8.8$ min + 8.0 min + 8.15 min + 8.25 min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat, vier Isomere).

MS (EI), m/z (%): Hauptisomer: 353/355 (20/7) [$M - O^tBu$]⁺, 257 (12), 207 (7), 193 (5), 69 (34), 57 (100) [C_4H_9]⁺, 56 (17).
Nebenisomer 1: 353/355 (52/17), 335 (22), 321 (12), 259 (34), 258 (28), 257 (100), 256 (57), 228 (12), 221 (15), 207 (58), 193 (18), 143 (10), 111 (12), 69 (64), 57 (96), 56 (15).

Nebenisomer 2: 353/355 (100/34), 325 (15), 259 (12), 258 (10), 257 (38), 256 (21), 207 (15), 193 (12), 69 (34), 57 (80), 56 (15).
 Nebenisomer 3: 353/355 (58/20), 335 (18), 259 (14), 258 (17), 257 (44), 256 (45), 221 (12), 207 (23), 193 (12), 97 (10), 69 (56), 57 (100), 56 (10).

Ethylfuranon **35**: $t_R = 7.7$ min (Trifluoracetyl-Derivat).
 MS (EI), m/z (%): 322 (5) $[M]^+$, 249 (5) $[M - O^tBu]^+$, 222 (12), 221 (47) $[M - COO^tBu]^+$, 69 (10), 57 (100) $[C_4H_9]^+$.

β -Hydroxy- δ -ketoester **34**: $t_R = 8.5$ min (Trifluoracetyl-Derivat).
 MS (EI), m/z (%): 259/261 (10/3) $[M - O^tBu]^+$, 145/147 (79/25) $[M - O^tBu - CF_3COOH]^+$, 113 (10), 69 (18), 57 (100) $[C_4H_9]^+$.

Umsetzungen mit Bäckerhefe im präparativen Maßstab

(R)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-tert-butylester (*R*)-**2c**. Method A: Umsetzung im zweiphasigen System Wasser/XAD-7. Amberlite XAD-7 Adsorberharz wurde vor Gebrauch mit Wasser, Aceton und Ethylacetat gewaschen und im Vakuum bei 40°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. In einem Rundkolben wurde gewaschenes Adsorberharz (9.0 g) zu einer Lösung des β,δ -Diketoesters **3q** (2.00 g, 8.5 mmol) in Ethylacetat (70 mL) gegeben, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum restlos entfernt. Das beladene Adsorberharz wurde zu einer Suspension von *S. cerevisiae* (85 g, "Windhager") in Wasser (400 mL) gegeben und die Mischung bei 20°C horizontal geschüttelt (130 rpm, 1 L Schüttelkolben, offen, vier Schikanen). Nach 15 h wurde das Adsorberharz mit einer gesinterten Glasfilternutsche (Porengröße 0) abfiltriert, mit wenig Wasser zellfrei gewaschen und mit Aceton (4 \times 50 mL) und Ethylacetat (50 mL) extrahiert. Der Extrakt wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde mit NaHCO₃-Lösung (5 %) und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt (*R*)-**2c** fiel nach Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / *iso*-Hexan 40:60 v/v) als schwach gelbes Öl an. Ausbeute: 1.01 g (50 %). — $[\alpha]_D^{25} = +22.8$ ($c = 1.6$, CHCl₃), 94.0 % *ee* [CSP-HPLC (AAV VII + AAV VIII; AAV VIa)].

NMR: siehe Seite 105.

(*R*)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester (*R*)-2c. Methode B: Umsetzung im zweiphasigen System Wasser/*n*-Hexan (kontinuierliche Substratdosierung). In einem 2 L Erlenmeyerkolben wurde eine Suspension von *S. cerevisiae* (220 g, "Windhager") in Wasser (550 mL) mit *n*-Hexan (374 mL) überschichtet und die Mischung mit 100 rpm gerührt (Magnetrührer). Zu diesem Gemisch wurde bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 6 h eine Lösung von β,δ -Diketoester **3q** (5.16 g, 22.0 mmol) in *n*-Hexan (176 mL, 125 mM) gepumpt (HAMILTON "Dispenser 500B", PEEK-Kapillare). Nach beendeter Zugabe wurde noch 15 h gerührt und anschließend das *n*-Hexan im Vakuum abdestilliert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in Wasser (0.5 L) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit verdünnter Salzsäure (2 M) auf pH 3.0-3.5 eingestellt, und Celite 535 (0.3 kg) wurde unter Rühren zugesetzt. Die resultierende Suspension wurde filtriert und das Filtrat zweimal mit Ethylacetat extrahiert (Emulsionsbildung). Die vereinigten Extrakte wurden mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, wobei es erneut zur Bildung von Emulsionen kam. Nach Trocknen der organischen Phase über MgSO₄ und Einengen im Vakuum wurde der verbleibende Rückstand an Kieselgel chromatographiert (Ethylacetat/*iso*-Hexan 30:70 v/v). Das Produkt (*R*)-2c fiel als schwach gelbes Öl an. Ausbeute: 1.09 g (21 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +21.9$ ($c = 1.6$, CHCl₃), 90.0 % *ee* [CSP-HPLC (AAV VIa)].

NMR: siehe Seite 105.

Synthese von δ -Lactonen und Bestimmung des Enantiomerenüberschusses

AAV VII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von α,β -ungesättigten δ -Lactonen aus δ -Hydroxy- β -ketoestern. a) Natriumborhydrid-Reduktion: Zu einer eisgekühlten Lösung eines δ -Hydroxy- β -ketoesters (1.0 mmol) in Ethanol (10 mL) wird über einen Zeitraum von 10 min portionsweise Natriumborhydrid (0.6 mmol) gegeben. Die Reaktionsmischung wird nach beendeter Zugabe 30 min gerührt und anschließend tropfenweise mit Essigsäure (2.4 mmol) versetzt. Nach weiteren 5 min wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in Ethylacetat aufgenommen und die resultierende Lösung mit NaHCO₃-Lösung (5 %) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ wird im Vakuum eingengt. b) Lactonisierung und Dehydratisierung: Eine Lösung des so erhaltenen β,δ -Dihydroxyesters in Toluol (10 mL) wird mit einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat versetzt und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen wird Ethylacetat zugesetzt und die Lösung mit NaHCO₃-Lösung (5 %) und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase

wird über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Zur Reinigung des resultierenden Rohproduktes wird verfahren wie bei den jeweiligen Beispielen angegeben.

AAV VIII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von α,β -ungesättigten δ -Lactonen (CSP-HPLC). Eine Lösung des δ -Lactons ($2\text{--}3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) in *iso*-Hexan / 2-Propanol wird mittels CSP-HPLC analysiert. Parameter: Säule DAICEL Chiralcel OB ($250 \times 4.6\text{ mm}$) mit Vorsäule ($50 \times 4.6\text{ mm}$); Temperatur $25\text{ }^\circ\text{C}$; Detektorwellenlänge 215 nm ; Injektionsvolumen $5\text{ }\mu\text{L}$; Fluß $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Retentionszeiten und Laufmittel: (*S*)-**19a** $t_{\text{R}} = 17.6\text{ min}$, (*R*)-**19a** $t_{\text{R}} = 23.8\text{ min}$ (*iso*-Hexan / 2-Propanol 80:20 v/v). — (*S*)-**19b** $t_{\text{R}} = 18.7\text{ min}$, (*R*)-**19b** $t_{\text{R}} = 29.1\text{ min}$ (*iso*-Hexan / 2-Propanol 85:15 v/v). — (*R*)-**19c** $t_{\text{R}} = 20.9\text{ min}$, (*S*)-**19c** $t_{\text{R}} = 24.3\text{ min}$ (*iso*-Hexan / 2-Propanol 80:20 v/v). — *syn*-(5*S*,6*S*)-**19d** $t_{\text{R}} = 15.1\text{ min}$, *anti*-(5*S*,6*R*)-**19d** / *anti*-(5*R*,6*S*)-**19d** $t_{\text{R}} = 18.2 / 19.0\text{ min}$ (nicht vollständig getrennt), *syn*-(5*R*,6*R*)-**19d** $t_{\text{R}} = 36.8\text{ min}$ (*iso*-Hexan / 2-Propanol 80:20 v/v).

(*R*)-6-Methyl-5,6-dihydropyran-2-on (*R*)-**19a**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2a** (205 mg, 1.0 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht weiter aufgereinigt. Ausbeute: 79 mg (70 %). — CSP-HPLC (AAV VIII): 99.4 % *ee*.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.37$ (d, $J = 6.4\text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 2.17-2.39 (m, 2 H, H-5), 4.51 (m, 1 H, H-6), 5.93 (ddd, $J = 9.8, 2.5, 1.2\text{ Hz}$, 1 H, H-3), 6.83 (ddd, $J = 9.8, 5.8, 2.7\text{ Hz}$, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 20.7$ (CH_3), 31.0 (C-5), 74.4 (C-6), 121.1 (C-3), 145.3 (C-4), 164.6 (C-2).

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ (112.1) Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[16b]

(*R*)-6-Ethyl-5,6-dihydropyran-2-on (*R*)-**19b**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2b** (548 mg, 2.5 mmol). Nach Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / *iso*-Hexan 40:60 v/v) wurde das Produkt (*R*)-**19b** als schwach gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 194 mg (61 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -169.8$ ($c = 0.8$, CHCl_3), 98.5 % *ee* [CSP-HPLC (AAV VIII)].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.98$ (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 3 H, CH_3), 1.60-1.85 (m, 2 H, CH_2CH_3), 2.20-

2.39 (m, 2 H, H-5), 4.32 (m, 1 H, H-6), 5.96 (ddd, $J = 9.8, 2.4, 1.4$ Hz, 1 H, H-3), 6.86 (m, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9.3$ (CH_3), 27.9, 28.9 (C-5, CH_2CH_3), 79.3 (C-6), 121.3 (C-3), 145.4 (C-4), 164.8 (C-2).

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$ (126.2) Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[62]

(*S*)-6-Ethyl-5,6-dihydropyran-2-on (*S*)-**19b** wurde nach der gleichen Methode aus δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2b** (siehe Seite 118) erhalten. — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +165.3$ ($c = 0.8$, CHCl_3), 97.7 % *ee* [CSP-HPLC (AAV VIII)].

(*S*)-6-Chlormethyl-5,6-dihydropyran-2-on (*S*)-**19c**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** (270 mg, 1.1 mmol). Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / *iso*-Hexan 50:50 v/v) ergab das Produkt (*S*)-**19c** als nahezu farbloses Öl. Ausbeute: 100 mg (60 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -158.6$ ($c = 0.5$, CHCl_3), >99.5 % *ee* [CSP-HPLC (AAV VIII)]; Lit.: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -144.8$ ($c = 3.09$, CHCl_3), ≥ 98 % *ee*.^[56]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.50$ - 2.65 (m, 2 H, H-5), 3.71 (dd, $J = 11.7, 6.0$ Hz, 1 H aus CH_2Cl), 3.76 (dd, $J = 11.7, 4.8$ Hz, 1 H aus CH_2Cl), 4.67 (m, 1 H, H-6), 6.07 (dt, $J = 9.9, 1.9$ Hz, 1 H, H-3), 6.93 (m, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 26.9$ (C-5), 44.9 (CH_2Cl), 76.5 (C-6), 121.3 (C-3), 144.7 (C-4), 163.2 (C-2).

$\text{C}_6\text{H}_7\text{ClO}_2$ (146.6) Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[19b]

(*R*)-6-Chlormethyl-5,6-dihydropyran-2-on (*R*)-**19c**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2c** (2.32 g, 9.8 mmol). Abweichend von AAV VII wurde zur Lactonisierung/Dehydratisierung erst 14 h bei Raumtemperatur gerührt und dann für 4 h auf 90°C erhitzt (Ölbadtemperatur). Unlösliche Bestandteile wurden vor der Aufarbeitung durch Dekantieren der abgekühlten Reaktionslösung abgetrennt. Das Rohprodukt (*R*)-**19c** (orange-rotes Öl) fiel gemäß ^1H - und ^{13}C -NMR-Analyse mit ca. 95 % Reinheit an und wurde nicht

weiter aufgereinigt. Ausbeute: 1.12 g (78 %). — CSP-HPLC (AAV VIII): 90.0 % *ee*.

syn-(5*R*,6*R*)-5,6-Dimethyl-5,6-dihydropyran-2-on *syn*-(5*R*,6*R*)-**19d**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester *syn*-(4*S*,5*R*)-**2d** (84 mg, 0.4 mmol). Das Rohprodukt wurde nicht weiter aufgereinigt. Ausbeute: 36 mg (73 %). — CSP-HPLC (AAV VIII): 99.2 % *ee*, $dr_{s:a} = 33:1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.04$ (d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, C_7CH_3), 1.35 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, C_8CH_3), 2.31-2.42 (m, 1 H, H-5), 4.62 (dq, $J = 3.6, 6.7$ Hz, 1 H, H-6), 5.95 (dd, $J = 9.7, 0.9$ Hz, 1 H, H-3), 6.93 (dd, $J = 9.7, 5.9$ Hz, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 11.4, 17.3$ ($\text{C}_7\text{CH}_3, \text{C}_8\text{CH}_3$), 33.1 (C-5), 76.5 (C-6), 119.9 (C-3), 151.8 (C-4), 164.9 (C-2).

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$ (126.2) Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[71b,c]

syn-(5*S*,6*S*)-5,6-Dimethyl-5,6-dihydropyran-2-on *syn*-(5*S*,6*S*)-**19d** wurde nach der gleichen Methode aus δ -Hydroxy- β -ketoester *syn*-(4*R*,5*S*)-**2d** (siehe Seite 118) erhalten. Das Rohprodukt wurde nicht weiter aufgereinigt. — CSP-HPLC (AAV VIII): 99.2 % *ee*, $dr_{s:a} = 14:1$.

rac-(5*RS*,6*RS*)-5,6-Dimethyl-5,6-dihydropyran-2-on *rac*-(5*RS*,6*RS*)-**19d**. Synthese wie im vorhergehenden Beispiel, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester *rac*-(4*RS*,5*RS*)-**2d** (siehe Seite 119). Ein Vergleich der NMR-Spektren mit denen des *syn*-Diastereomers ergibt für das *anti*-Diastereomer die folgenden Werte:

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.12$ (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H, C_7CH_3), 1.42 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, C_8CH_3), 2.31-2.42 (überlagert mit Signal des *syn*-Lactons; vermutlich m, 1 H, H-5), 4.18 (dq, $J = 10.0, 6.3$ Hz, 1 H, H-6), 5.96 (überlagert mit Signal des *syn*-Lactons vermutlich: dd, $J = 9.8, 3.0$ Hz, 1 H, H-3), 6.63 (dd, $J = 9.7, 2.4$ Hz, 1 H, H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 16.3, 19.2$ ($\text{C}_7\text{CH}_3, \text{C}_8\text{CH}_3$), 35.2 (C-5), 80.2 (C-6), 120.2 (C-3), 151.7 (C-4), 164.4 (C-2).

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$ (126.2).

(*S*)-6-Chlormethyl-5,6-dihydropyran-2,4-dion (*S*)-**20**. Eine Lösung des δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**2c** (240 mg, 1.0 mmol) in Dichlormethan (15 mL) wurde mit einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäuremonohydrat versetzt, 4 d bei Raumtemperatur gerührt und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt (*S*)-**20** wurde nach Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/Diethylether/Essigsäure 45:55:0.1 v/v) in Form eines weißen Feststoffs erhalten. Ausbeute: 110 mg (67 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -80.6$ ($c = 1.1$, MeOH), >99.5 % *ee* [CSP-HPLC (AAV VIa)]; Lit.: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -83.4$ ($c = 1.07$, MeOH), ≥ 98 % *ee*.^[56]

¹H-NMR (CDCl₃): Ketoform; $\delta = 2.72$ (dd, $J = 18.2, 11.1$ Hz, 1 H, H-5), 2.89 (dd, $J = 18.2$ Hz, 3.2 Hz, 1 H, H-5), 3.51 (d, $J = 19.1$ Hz, 1 H, H-3), 3.61 (d, $J = 19.1$ Hz, 1 H, H-3), 3.82 (d, $J = 4.9$ Hz, 2 H, CH₂Cl), 4.90 (m, 1 H, H-6).

¹H-NMR (d₆-DMSO): Enolform; $\delta = 2.41$ (dd, $J = 17.3, 4.2$ Hz, 1 H, H-5), 2.61 (ddd, $J = 17.3, 11.8, 1.3$ Hz, 1 H, H-5), 3.82 (dd, $J = 11.9, 5.4$ Hz, 1 H aus CH₂Cl), 3.90 (dd, $J = 11.9, 3.8$ Hz, 1 H aus CH₂Cl), 4.60 (m, 1 H, H-6), 4.96 (d, $J = 1.3$ Hz, 1 H, H-3), 11.65 (br s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (d₆-DMSO): Enolform; $\delta = 29.9$ (C-5), 45.9 (CH₂Cl), 74.0 (C-6), 90.4 (C-3), 166.3, 172.4 (C-2, C-4).

C₆H₇ClO₃ (162.6) Das ¹H-NMR-Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[57]

Chemische Synthesen racemischer und optisch aktiver δ -Hydroxy- β -ketoester

Addition von *tert*-Butylacetoacetat-Na,Li-Bisenolat an Aldehyde

AAV IX: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Addition von *tert*-Butylacetoacetat-Na,Li-Bisenolat an Aldehyde.^[119] Gemäß AAV III wird aus *tert*-Butylacetoacetat (1.58 g, 10.0 mmol), Natriumhydrid (0.42 g, 60 % in Mineralöl, 10.5 mmol) und *n*-Butyllithium (6.5 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 10.4 mmol) eine Bisenolat-Lösung in THF (40 mL) dargestellt, zu der bei 0°C frisch destillierter Aldehyd (10.5 mmol) in einer Portion zugesetzt wird. Nach 5 min wird tropfenweise Essigsäure (600 μ L, 10.5 mmol) zugegeben ($T_{\text{max}} = 5^{\circ}\text{C}$) und anschließend eisgekühlte verdünnte Salzsäure (20 mL, 1 M). Die Phasen werden getrennt, und die wäßrige

Phase wird zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaHCO₃-Lösung (5 %) und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird gereinigt wie in den jeweiligen Beispielen angegeben.

rac-5-Hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester **rac-2a**. Synthese nach AAV IX, ausgehend von Acetaldehyd (0.46 g, 10.5 mmol). Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 40:60 v/v) ergab das Produkt **rac-2a** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 1.21 g (60 %).

NMR: siehe Seite 103.

rac-5-Hydroxy-3-oxoheptansäure-*tert*-butylester **rac-2b**. Synthese nach AAV IX, ausgehend von Propanal (0.61 g, 10.5 mmol). Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 30:70 v/v) ergab das Produkt **rac-2b** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 1.36 g (63 %).

NMR: siehe Seite 104.

C-Acylierung von *tert*-Butylacetat-Lithiumenolat mit β -Hydroxyestern

AAV X: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur *C*-Acylierung von *tert*-Butylacetat-Lithiumenolat mit β -Hydroxyestern.^[13, 120] Unter Schutzgas wird durch tropfenweise Zugabe von *n*-Butyllithium (1.6 M in *n*-Hexan) zu einer eisgekühlten Lösung von Diisopropylamin in wasserfreiem THF Lithiumdiisopropylamid erzeugt. Die Lösung wird nach beendeter Zugabe noch 10 min gerührt, auf -40°C gekühlt, tropfenweise mit Essigsäure-*tert*-butylester versetzt ($T_{\max} = -30^{\circ}\text{C}$) und für weitere 30 min gerührt. Anschließend wird die Acylierungsreaktion durchgeführt wie in den jeweiligen Beispielen angegeben. Zur Hydrolyse wird die Reaktionslösung auf eine intensiv gerührte, eisgekühlte Mischung (50:50 v/v) aus Ethylacetat und verdünnter Salzsäure (2 M, 3-4 Äq. HCl bezogen auf das Enolat) gekippt. Die Phasen werden getrennt, und die wäßrige Phase wird zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaHCO₃-Lösung (5 %) und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wird gereinigt wie in den jeweiligen Beispielen angegeben.

(S)-5-Hydroxy-3-oxoheptansäure-*tert*-butylester (*S*)-**2b**. Aus Essigsäure-*tert*-butylester (2.03 g, 17.5 mmol), *n*-Butyllithium (11.7 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 18.7 mmol) und Diisopropylamin (2.7 mL, 19.3 mmol) wurde eine Enolat-Lösung in THF (30 mL) dargestellt wie in AAV X beschrieben. Die Lösung wurde auf -40°C gekühlt, und (*S*)-3-Hydroxyvaleriansäuremethylester (0.66 g, 5.0 mmol, FLUKA Nr. 56657) wurde tropfenweise zugegeben ($T_{\text{max}} = -35^{\circ}\text{C}$). Nach beendeter Zugabe wurde 1.5 h bei -40°C bis -30°C gerührt und dann über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Hydrolyse wurde wieder auf 0°C gekühlt und verfahren wie in AAV X beschrieben. Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 30:70 v/v) ergab das Produkt (*S*)-**2b** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 0.64 g (59 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +36.2$ ($c = 1.1$, CHCl_3).

NMR: siehe Seite 104.

(S)-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester (*S*)-**2c**. Aus Essigsäure-*tert*-butylester (1.39 g, 12.0 mmol), *n*-Butyllithium (7.5 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 12.0 mmol) und Diisopropylamin (1.7 mL, 12.0 mmol) wurde eine Enolat-Lösung in THF (20 mL) dargestellt wie in AAV X beschrieben. Die Lösung wurde auf -65°C gekühlt, und (*S*)-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester [0.50 g, 3.0 mmol, >97 % *ee* (ALDRICH)] wurde tropfenweise zugegeben ($T_{\text{max}} = -55^{\circ}\text{C}$). Nach beendeter Zugabe wurde 1 h bei -50°C gerührt, dann auf -15°C erwärmt und weitere 30 min gerührt. Zur Hydrolyse wurde wieder auf -50°C gekühlt und verfahren wie in AAV X beschrieben. Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 30:70 v/v) ergab das Produkt (*S*)-**2c** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 0.60 g (84 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -23.0$ ($c = 1.5$, CHCl_3).

NMR: siehe Seite 105.

rac-6-Chlor-5-hydroxy-3-oxohexansäure-*tert*-butylester *rac*-**2c** wurde nach der gleichen Methode aus β -Hydroxyester *rac*-**24** (siehe Seite 119) erhalten.

syn-(4*R*,5*S*)-5-Hydroxy-4-methyl-3-oxohexansäure-*tert*-butylester *syn*-(4*R*,5*S*)-**2d**. Aus Essigsäure-*tert*-butylester (1.67 g, 14.4 mmol), *n*-Butyllithium (9.3 mL, 1.6 M in *n*-Hexan, 14.9 mmol) und Diisopropylamin (2.1 mL, 14.9 mmol) wurde eine Enolat-Lösung in THF (40 mL) dargestellt wie in AAV X beschrieben. Die Lösung wurde auf -40°C gekühlt, und

β -Hydroxyester *syn*-(2*R*,3*S*)-**25** (0.53 g, 3.6 mmol, 99.2 % *ee*, $dr_{s:a} = 9:1$, siehe Seite 120) wurde tropfenweise zugegeben ($T_{\max} = -30^{\circ}\text{C}$). Nach beendeter Zugabe wurde 60 min bei -40°C bis -30°C gerührt, dann auf 0°C erwärmt und weitere 30 min gerührt. Abweichend von AAV X wurde durch tropfenweise Zugabe von Essigsäure (865 μL , 15.1 mmol) neutralisiert und einmal mit Wasser gewaschen. Die weitere Aufarbeitung der organischen Phase erfolgte wie bei AAV X angegeben. Nicht abreagierte Edukte und *tert*-Butylacetoacetat (Nebenprodukt) wurden durch Kugelrohrdestillation entfernt (0.1 mbar, 60°C). Flashchromatographie des Rückstandes an Kieselgel (Ethylacetat / *iso*-Hexan 40:60 v/v) ergab das Produkt *syn*-(4*R*,5*S*)-**2d** als farbloses Öl. Das *anti*-Diastereomer wurde während der Reaktion oder während der Aufarbeitung abgereichert. Ausbeute: 0.45 g (58 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +6.5$ ($c = 1.6$, CHCl_3), $dr_{s:a} = 15:1$ (^{13}C -NMR).

NMR: siehe Seite 107.

rac-(4*RS*,5*RS*)-5-Hydroxy-4-methyl-3-oxohexansäure-*tert*-butylester *rac*-(4*RS*,5*RS*)-**2d**. Synthese wie im vorhergehenden Beispiel, ausgehend von β -Hydroxyester *rac*-(2*RS*,3*RS*)-**25** ($dr_{s:a} = 1:1$). Das Rohprodukt (53 % Ausbeute) wurde ohne weitere Reinigung NMR-spektroskopisch untersucht. Durch Vergleich mit dem ^{13}C -NMR-Spektrum des *syn*-Diastereomers wurden für das *anti*-Diastereomer die folgenden Daten erhalten.

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 13.0$ ($\text{C}_\gamma\text{CH}_3$), 20.8 (C-6), 27.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 50.5 (C-2), 53.5 (C-4), 69.4 (C-5), 81.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 166.7 (C-1), 207.8 (C-3).

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (216.3).

Reduktion von β -Ketoestern

rac-4-Chlor-3-hydroxybuttersäureethylester *rac*-**24**. Synthese nach AAV VIIa, ausgehend von 4-Chlor-3-oxobuttersäureethylester (3.29 g, 20 mmol). Das Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung weiterverarbeitet. Ausbeute: 2.81 g (84 %).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.27$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H, OCH_2CH_3), 2.58 (dd, $J = 4.7, 17.1$ Hz, 1 H, H-2), 2.67 (dd, $J = 2.4, 17.1$ Hz, 1 H, H-2), 3.29 (br s, 1 H, OH), 3.58 (dd, $J = 5.3, 13.5$ Hz, 1 H, H-4), 3.62 (dd, $J = 5.6, 13.5$ Hz, 1 H, H-4), 4.17 (q, $J = 7.1$ Hz, 2 H, OCH_2CH_3), 4.25 (m, 1 H, H-3).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 14.3$ (OCH_2CH_3), 38.6 (C-2), 48.3 (C-4), 61.2 (OCH_2CH_3), 68.1

(C-3), 172.0 (C-1).

$C_6H_{11}ClO_3$ (166.6) Die NMR-Spektren sind in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[66]

syn-(2*R*,3*S*)-2-Methyl-3-hydroxybuttersäureethylester *syn*-(2*R*,3*S*)-**25**. In einem 1 L Schüttelkolben mit vier Schikanen wurde zu einer Suspension von *S. cerevisiae* "Type 2" (SIGMA, 59.6 g Trockenzellmasse) in Leitungswasser (0.5 L) *rac*-2-Methyl-3-oxobuttersäureethylester (1.6 g, 10.0 mmol, 90 %) gegeben, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur geschüttelt (130 rpm, horizontal). Nach 23 h wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingengt. Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 40:60 v/v) ergab das Produkt *syn*-(2*R*,3*S*)-**25** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 0.53 g (36 %). — $[\alpha]_D^{25} = +6.2$ ($c = 2.2$, $CHCl_3$), 99.2 % *ee*, $dr_{s:a} = 9:1$ (CSP-GC); Lit.: $[\alpha]_D^{23} = +6.15$ ($c = 2.42$, $CHCl_3$), 98 % *ee*, $dr_{s:a} = 91:9$.^[70c]

¹H-NMR ($CDCl_3$): $\delta = 1.14$ (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, H-4) überlagert mit 1.15 (d, $J = 7.2$ Hz, 3 H, $C_\alpha CH_3$), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 3 H, CH_2CH_3), 2.48 (dq, $J = 3.8$, 7.2 Hz, 1 H, H-2), 4.03 (dq, $J = 3.8$, 6.4 Hz, 1 H, H-3), 4.13 (q, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2CH_3).

¹³C-NMR ($CDCl_3$): $\delta = 11.2$, 14.4, 19.9 ($C_\alpha CH_3$, CH_2CH_3 , C-4), 45.6 (C-2), 60.8 (CH_2CH_3), 68.1 (C-3), 176.3 (C-1). — $C_7H_{14}O_3$ (146.2).

$C_7H_{14}O_3$ (146.2) Die NMR-Spektren sind in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[70]

Die Bestimmung der Stereoisomerenzusammensetzung erfolgte nach Derivatisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (siehe Seite 77) durch CSP-GC. Parameter: Kapillarsäule "FS-Cyclodex beta-1/P" (CS, 50 m \times 0.32 mm ID), Split-Injektor (1:20, 250°C), Trägergas Wasserstoff (0.95 bar, konstanter Druck), Temperaturprogramm: 75°C isotherm. Retentionszeiten: *syn*-(2*S*,3*R*)-**25** $t_R = 18.3$ min, *syn*-(2*R*,3*S*)-**25** $t_R = 19.1$ min, *anti*-(2*S*,3*S*)-**25** $t_R = 19.7$ min, *anti*-(2*R*,3*R*)-**25** $t_R = 20.4$ min.

6.4 Synthese von β,δ -Dihydroxyestern

Diastereoselektive Reduktion des chlorierten δ -Hydroxy- β -ketoesters **2c**

syn-(3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**27**. Synthese nach Literaturvorschrift:^[13k] Zu einer Lösung des δ -Hydroxy- β -ketoesters (*S*)-**2c** (21.5 g, 86 mmol, ca. 95 %) in wasserfreiem THF (620 mL) und Methanol (180 mL) wurde bei -75°C Methoxydiethylboran (100 mL, 1.0 M in THF, 0.1 mol) getropft. Die Lösung wurde nach beendeter Zugabe 20 min gerührt, portionsweise ($T_{\text{max}} = -70^\circ\text{C}$) mit Natriumborhydrid (3.8 g, 0.1 mol) versetzt und für weitere 3 h bei -70°C gerührt. Nach Hydrolyse mit ges. NH_4Cl -Lösung (100 mL) wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt, mit Ethylacetat (0.7 L) verdünnt und jeweils zweimal mit halbgesättigter NaCl -Lösung und ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit ges. NaCl -Lösung gewaschen und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in THF (140 mL) und Wasser (50 mL) aufgenommen und der pH-Wert mit verdünnter Natronlauge (1 M) auf pH 9 eingestellt. Zu dieser Lösung wurde unter Eiskühlung H_2O_2 (6.6 mL, 30 % in H_2O , 65 mmol) getropft ($T_{\text{max}} = 30^\circ\text{C}$). Nach beendeter Zugabe wurde 30 min bei Raumtemperatur gerührt, mit Ethylacetat (0.1 L) verdünnt und mit ges. NaHCO_3 -Lösung und 20%iger NaHSO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit ges. NaHCO_3 -Lösung, halbgesättigter NaCl -Lösung und ges. NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt [22.2 g, >99.5 % *ee*, $dr_{\text{s:a}} = 28:1$; CSP-GC (AAV XI)] wurde in *iso*-Hexan/Ethylacetat (93:7 v/v, 75 mL) gelöst und die Lösung für 12 h bei 4°C gelagert. Die resultierenden schwach gelben Kristalle [*syn*-(3*R*,5*S*)-**27**] wurden abfiltriert, mit eisgekühltem *iso*-Hexan/Ethylacetat (99:1 v/v) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute: 12.8 g (62 %). — Smp. $50.8\text{--}53.0^\circ\text{C}$, Lit. $50\text{--}52^\circ\text{C}$ (Hexan/Ethylacetat).^[13k] — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -27.0$ ($c = 1.4$, CHCl_3), >99.5 % *ee*, $dr_{\text{s:a}} = 205:1$.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.45$ (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.59-1.79 (m, 2 H, H-4), 2.42 (d, $J = 6.2$ Hz, 2 H, H-2), 3.51 (dd, $J = 11.1, 5.3$ Hz, 1 H, H-6), 3.55 (dd, $J = 11.1, 5.5$ Hz, 1 H, H-6), 3.71 (br s, 1 H, OH), 3.81 (br s, 1 H, OH), 4.08 (m, 1 H, H-5), 4.24 (m, 1 H, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 28.1$ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.3, 42.3, 49.0 (C-2, C-4, C-6), 68.2, 71.4 (C-3, C-5), 81.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 172.0 (C-1).

MS (EI), m/z (%): 182/184 (9/3) [$M - C_4H_8$]⁺, 165/167 (49/16) [$M - O^tBu$]⁺, 147 (19), 145 (14), 133 (36), 129 (15), 127 (11), 123 (18), 115 (50), 105 (12), 97 (14), 89 (20), 87 (17), 59 (13), 57 (100) [C_4H_9]⁺, 56 (11).

$C_{10}H_{19}ClO_4$ (238.7)	berechnet (%):	C 50.32	H 8.02
	gefunden (%):	C 50.20	H 8.35.

syn-(3*S*,5*R*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*S*,5*R*)-**27**. Synthese wie im vorhergehenden Beispiel, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2c** (2.89 g, 12.2 mmol). Das Rohprodukt fiel in quantitativer Ausbeute an [90.5 % *ee*, $dr_{s:a} = 45:1$; CSP-GC (AAV XI)]. Nach Kristallisation aus *iso*-Hexan/Ethylacetat (93:7 v/v) wurde das Produkt *syn*-(3*S*,5*R*)-**27** in Form orangefarbener Kristalle erhalten (98.0 % *ee*, $dr_{s:a} = 187:1$). Ausbeute: 1.50 g (52 %). Eine analytische Probe wurde erneut kristallisiert, wodurch farblose Kristalle erhalten wurden. — Smp. 51.7-52.7°C. — $[\alpha]_D^{25} = +27.6$ ($c = 1.3$, $CHCl_3$), >99.5 % *ee*, $dr_{s:a} > 400:1$.

anti-(3*S*,5*S*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester *anti*-(3*S*,5*S*)-**27**. Zu einer Lösung von Tetramethylammoniumtriacetoxylborhydrid (6.74 g, 25.6 mmol) und Essigsäure (15 mL) in wasserfreiem Acetonitril (15 mL) wurde bei -25°C δ -Hydroxy- β -ketoester (*S*)-**2c** gegeben (0.76 g, 3.2 mmol, gelöst in 5 mL Acetonitril), und die Lösung wurde 5 h gerührt. Nach Hydrolyse mit wässriger Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung (35 mL, 0.5 M) wurde auf Raumtemperatur erwärmt, mit ges. Na_2CO_3 -Lösung (70 mL) verdünnt und viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. Na_2CO_3 -Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt fiel in quantitativer Ausbeute an [>99.5 % *ee*, $dr_{a:s} = 14:1$; CSP-GC (AAV XI)]. Nach Kristallisation aus *iso*-Hexan/Ethylacetat (90:10 v/v) wurde das Produkt *anti*-(3*S*,5*S*)-**27** in Form farbloser Kristalle erhalten. Ausbeute: 0.54 g (70 %). — Smp. 73.3-75.0°C. — $[\alpha]_D^{25} = +7.2$ ($c = 1.4$, $CHCl_3$), >99.5 % *ee*, $dr_{a:s} = 211:1$.

¹H-NMR ($CDCl_3$): $\delta = 1.46$ (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1.66-1.71 (m, 2 H, H-4), 2.42 (d, $J = 6.3$ Hz, 2 H, H-2), 3.05 (br s, 1 H, OH), 3.60 (br s, 1 H, OH) überlagert mit 3.53 (dd, $J = 11.0, 6.5$ Hz, 1 H, H-6), 3.62 (dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, 1 H, H-6), 4.12 (m, 1 H, H-5), 4.30 (m, 1 H, H-3).

¹³C-NMR ($CDCl_3$): $\delta = 28.2$ ($C(CH_3)_3$), 39.2, 42.1, 49.4 (C-2, C-4, C-6), 65.2, 68.6 (C-3,

C-5), 81.7 (C(CH₃)₃), 172.4 (C-1).

MS (EI), *m/z* (%): 182/184 (9/3) [*M* – C₄H₈]⁺, 165/167 (48/16) [*M* – O^tBu]⁺, 147 (16), 145 (11), 133 (30), 129 (15), 127 (11), 123 (19), 115 (45), 105 (10), 97 (13), 89 (21), 87 (12), 59 (12), 57 (100) [C₄H₉]⁺, 56 (11).

C ₁₀ H ₁₉ ClO ₄ (238.7)	berechnet (%)	C 50.32	H 8.02
	gefunden (%)	C 49.92	H 7.95.

anti-(3*R*,5*R*)-6-Chlor-3,5-dihydroxyhexansäure-*tert*-butylester *anti*-(3*R*,5*R*)-**27**. Synthese wie im vorhergehenden Beispiel, ausgehend von δ -Hydroxy- β -ketoester (*R*)-**2c** (1.00 g, 4.2 mmol). Das Rohprodukt fiel in quantitativer Ausbeute an [94.0 % *ee*, *dr*_{a:s} = 18:1; CSP-GC (AAV XI)]. Nach Kristallisation aus *iso*-Hexan/Ethylacetat (90:10 v/v) wurde das Produkt *anti*-(3*R*,5*R*)-**27** in Form farbloser Kristalle erhalten. Ausbeute: 0.69 g (68%). — Smp. 74.5–76.0°C. — [α]_D²⁵ = –6.7 (*c* = 1.3, CHCl₃), 99.3 % *ee*, *dr*_{a:s} = 316:1.

AAV XI: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses und des Enantiomerenüberschusses (β , δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**27**; CSP-GC). Zu einer Lösung des β , δ -Dihydroxyesters *syn/anti*-**27** (10 mg, 42 μ mol) in 2,2-Dimethoxypropan (1 mL) wird eine katalytische Menge (+)-Camphersulfonsäure gegeben, und die Lösung wird bei 25°C solange gerührt, bis sich durch GC-MS-Analyse (AAV XII) kein β , δ -Dihydroxyester *syn/anti*-**27** mehr nachweisen läßt (4–7 h). Anschließend wird die Reaktionslösung mittels CSP-GC analysiert. Parameter: Kapillarsäule "FS-Cyclodex beta-1/P" (CS, 50 m \times 0.32 mm ID), Split-Injektor (1:20, 250°C), Trägergas Wasserstoff (0.95 bar, konstanter Druck), Temperaturprogramm: 135°C isotherm. Retentionszeiten: *anti*-(3*R*,5*R*)-**37** *t*_R = 48.8 min, *anti*-(3*S*,5*S*)-**37** *t*_R = 50.2 min, *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** *t*_R = 52.1 min, *syn*-(3*S*,5*R*)-**37** *t*_R = 53.8 min.

Diastereomerentrennung durch diastereomerdifferenzierende Acetonid-Hydrolyse

syn-(3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-(*isopropylidendioxy*)-hexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**37**. Eine Lösung des Acetonids *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** (26.4 g, 94.7 mmol, *dr*_{s:a} = 5.7:1) in Dichlormethan (475 mL) wurde mit verdünnter Salzsäure versetzt (4.8 mmol, 2.4 mL, 2 M) und bei 20°C intensiv gerührt. Von der Reaktionslösung wurden stündlich Proben entnommen und nach AAV XII analysiert. Nach 4 h wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. NaHCO₃-

Lösung abgebrochen, und die Phasen wurden getrennt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Flashchromatographie an Kieselgel ergab analysenreines (NMR, GC-MS) Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** als schwach gelbes Öl (Ethylacetat/*iso*-Hexan 33:67 v/v, Säule 6 cm Ø, 0.27 kg SiO_2). Ausbeute: 20.2 g (76 %; 90 % bezogen auf eingesetztes *syn*-Diastereomer). — $dr_{s:a} = 83:1$ [GC-MS (AAV XII)].

NMR: siehe Seite 127.

Durch fortgesetzte Elution wurde der polarere β,δ -Dihydroxyester *syn/anti*-(3*R*,5*S*)-**27** als schwach gelbes, langsam erstarrendes Öl erhalten. Ausbeute: 3.0 g (13 %). — $dr_{s:a} \approx 1:1$ [GC-MS (AAV XII)].

*Arbeitsvorschrift zur Aufarbeitung des Mutterlaugen-Rückstands aus der Synthese des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27**.* Eine Lösung des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** ($dr_{s:a}$ typischerweise 4.5:1 bis 9:1) in Aceton/2,2-Dimethoxypropan (6 mL/g **27**, 50:50 v/v) wird mit einer katalytischen Menge (+)-Camphersulfonsäure versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Flüchtige Komponenten werden anschließend im Vakuum entfernt, und das resultierende Öl wird in Dichlormethan gelöst (18 mL/g Öl). Die Lösung wird mit verdünnter Salzsäure (2 M, 90 μL /g Öl) versetzt und bei 20°C intensiv gerührt. Aus der organischen Phase werden regelmäßig Proben entnommen und nach AAV XII analysiert. Sobald das Diastereomerenverhältnis des Acetonids *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** den gewünschten Wert erreicht hat (typischerweise 2-4 h für $dr_{s:a} > 200:1$) wird die Lösung mit ges. NaHCO_3 -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in Ethylacetat/*iso*-Hexan (10:90 v/v) aufgenommen und durch Kieselgel filtriert.

Anwendungsbeispiel: Eine Charge vereinigter Mutterlaugen-Rückstände (34.5 g, $dr_{s:a} = 9:1$, ca. 85 %) aus der Kristallisation des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** wurde behandelt wie vorherstehend beschrieben. Das Produkt, Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**37**, wurde nach Filtration durch Kieselgel als schwach gelbes Öl erhalten und war gemäß $^1\text{H-NMR}$ - und GC-MS-Analyse frei von Verunreinigungen. Ausbeute: 23.2 g (ca. 67 %; bezogen auf eingesetztes *syn*-Diastereomer ca. 75 %). — $dr_{s:a} = 221:1$ [GC-MS (AAV XII)].

syn-(3*R*,5*S*)-6-Benzoyloxy-3,5-(isopropylidendioxy)-hexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**38**. Eine Lösung des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**29** (200 mg, 644 μ mol, $dr_{s:a} = 7.3:1$) in 2,2-Dimethoxypropan (3.0 mL) wurde mit einer katalytischen Menge (+)-Campher-sulfonsäure versetzt und 17 h bei 20°C gerührt. Flüchtige Komponenten wurden anschließend im Vakuum entfernt, der verbleibende Rückstand in Dichlormethan (15 mL) gelöst und die Lösung mit verdünnter Salzsäure (340 μ mol, 170 μ L, 2 M) versetzt. Das Gemisch wurde bei 20°C intensiv gerührt. Aus der organischen Phase wurden halbstündlich Proben entnommen und nach AAV XII analysiert. Nach 2 h wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. NaHCO₃-Lösung abgebrochen, und die Phasen wurden getrennt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat / *iso*-Hexan 33:67 v/v) ergab Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**38** als schwach gelbes Öl. Ausbeute: 173 mg (77 %; 88 % bezogen auf eingesetztes *syn*-Diastereomer). — $dr_{s:a} > 400:1$ [GC-MS (AAV XII)].

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.25$ (m, 1 H, H-4), 1.39 (s, 3 H, CH₃), 1.44 (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.47 (s, 3 H, CH₃), 1.61 (dt, $J = 12.4, 2.5$ Hz, 1 H, H-4), 2.30 (dd, $J = 15.2, 6.0$ Hz, 1 H, H-2), 2.43 (dd, $J = 15.2, 7.1$ Hz, 1 H, H-2), 3.39 (dd, $J = 10.0, 4.7$ Hz, 1 H, H-6), 3.51 (dd, $J = 10.0, 5.8$ Hz, 1 H, H-6), 4.13 (m, 1 H, H-5), 4.30 (m, 1 H, H-3), 4.53 (d, $J = 12.2$ Hz, 1 H aus OCH₂Ph), 4.60 (d, $J = 12.2$ Hz, 1 H aus OCH₂Ph), 7.25-7.39 (m, 5 H, Ar).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 19.7$ (CH₃), 28.1 (C(CH₃)₃), 30.1 (CH₃), 33.3, 42.8, (C-4, C-2), 66.0, 68.5 (C-3, C-5), 73.5, 73.6 (C-6, OCH₂Ph), 80.8 (C(CH₃)₃), 99.0 (C(CH₃)₂), 127.8, 127.9, 128.5 (Ar-C_p), 138.3 (Ar-C_q), 170.0 (C-1).

C₂₀H₃₀O₅ (350.5) Das ¹H-NMR-Spektrum ist in Übereinstimmung mit den Literaturdaten dieser Verbindung.^[13m]

AAV XII: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses von β,δ -Dihydroxyestern und den entsprechenden Acetoniden (GC-MS). Proben der Reaktionslösungen bzw. der Produkte werden mit Trifluoressigsäureanhydrid derivatisiert wie auf Seite 77 beschrieben. Die Bestimmung erfolgt anschließend durch GC-MS (β,δ -Dihydroxyester **27** und Acetonid **37** mit Temperaturprogramm B, β,δ -Dihydroxyester **29** und Acetonid **38** mit Temperaturprogramm A).

β,δ -Dihydroxyester *syn*-**27**: $t_R = 13.2$ min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat).

- MS (EI), m/z (%): siehe AAV VIb.
- β,δ -Dihydroxyester *anti*-**27**: $t_R = 13.4$ min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat).
- MS (EI), m/z (%): siehe AAV VIb.
- Acetonid *anti*-**37**: $t_R = 14.4$ min
- MS (EI), m/z (%): 263/265 (20/7) [$M - CH_3$]⁺, 207/209 (88/29), 205 (13), 165 (26), 163 (12), 147/149 (48/16), 129 (24), 111 (13), 105/107 (20/7), 59 (55), 57 (100) [C_4H_9]⁺.
- Acetonid *syn*-**37**: $t_R = 14.5$ min
- MS (EI), m/z (%): 263/265 (46/16) [$M - CH_3$]⁺, 207/209 (96/33), 208 (10), 205 (10), 173 (11), 165 (18), 163 (13), 147/149 (77/26), 129 (26), 115 (11), 111 (13), 105/107 (23/7), 59 (55), 57 (100) [C_4H_9]⁺.
- β,δ -Dihydroxyester *syn*-**29**: $t_R = 12.6$ min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat)
- MS (EI), m/z (%): 445 (14) [$M - C_4H_9$]⁺, 339 (9), 225 (18), 107 (10), 92 (10), 91 (100), 69 (6), 57 (30) [C_4H_9]⁺.
- β,δ -Dihydroxyester *anti*-**29**: $t_R = 12.7$ min (Bis-Trifluoracetyl-Derivat)
- MS (EI), m/z (%): 445 (19) [$M - C_4H_9$]⁺, 339 (5), 225 (26), 107 (10), 92 (10), 91 (100), 69 (9), 57 (26) [C_4H_9]⁺.
- Acetonid *anti*-**38**: $t_R = 14.1$ min
- MS (EI), m/z (%): 335 (10) [$M - CH_3$]⁺, 235 (10), 176 (13), 173 (26), 115 (16), 92 (10), 91 (100), 59 (13), 57 (19) [C_4H_9]⁺.
- Acetonid *syn*-**38**: $t_R = 14.3$ min
- MS (EI), m/z (%): 335 (10) [$M - CH_3$]⁺, 235 (9), 176 (17), 173 (29), 115 (19), 92 (10), 91 (100), 59 (16), 57 (25) [C_4H_9]⁺.

Synthese von 1,3-Diol-Acetoniden

syn-(3*R*,5*S*)-6-Chlor-3,5-(isopropylidendioxy)-hexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**37**.
 Eine Lösung des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** (5.10 g, 21.4 mmol, >99.5 % *ee*, $dr_{s:a} = 205:1$) in Aceton (17 mL) und 2,2-Dimethoxypropan (26 mL, 214 mmol) wurde mit einer katalytischen Menge (+)-Camphersulfonsäure versetzt, 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (60 mL) gelöst und die resultie-

rende Lösung mit ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ und Einengen im Vakuum wurde das Produkt *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** als farbloses Öl erhalten, das bei 4°C langsam erstarrte. Ausbeute: 5.83 g (98 %). — $[\alpha]_D^{25} = +3.1$ ($c = 1.3$, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.24$ (m, 1 H, H-4), 1.39 (s, 3 H, CH₃), 1.45 (s, 9 H, C(CH₃)₃) überlagert mit 1.46 (s, 3 H, CH₃), 1.76 (dt, $J = 12.6, 2.5$ Hz, 1 H, H-4), 2.33 (dd, $J = 15.2, 6.1$ Hz, 1 H, H-2), 2.45 (dd, $J = 15.2, 7.1$ Hz, 1 H, H-2), 3.40 (dd, $J = 11.0, 5.8$ Hz, 1 H, H-6), 3.51 (dd, $J = 11.0, 5.6$ Hz, 1 H, H-6), 4.06 (m, 1 H, H-5), 4.28 (m, 1 H, H-3).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 19.7$ (CH₃), 28.1 (C(CH₃)₃), 29.8 (CH₃), 33.9, 42.5, 47.1 (C-4, C-2, C-6), 65.9, 69.2 (C-3, C-5), 80.7 (C(CH₃)₃), 99.2 (C(CH₃)₂), 170.0 (C-1).

MS (EI), m/z (%): 263/265 (37/12) [$M - \text{CH}_3$]⁺, 207/209 (70/24), 165 (12), 147/149 (61/18), 129 (18), 115 (11), 111 (12), 105/107 (17/5), 59 (53), 57 (100) [C₄H₉]⁺.

HRMS (EI): berechnet für [$M - \text{CH}_3$]⁺: 263.1050, gefunden: 263.1037.

C ₁₃ H ₂₃ ClO ₄ (278.8)	berechnet (%):	C 56.01	H 8.32
	gefunden (%):	C 56.06	H 8.33.

syn-(3*R*,5*S*)-6-Iod-3,5-(isopropylidendioxy)-hexansäure-tert-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**39**. Methode A: Halogenaustausch. Durch eine Mischung aus Acetonid *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** (2.01 g, 7.2 mmol), 18-Krone-6 (2.85 g, 10.8 mmol), sorgfältig gemörsertem Kaliumiodid (23.7 g, 143 mmol) und Xylol (50 mL, Isomeregemisch) wurde 15 min ein Stickstoffstrom geleitet, und das Gemisch wurde für 3 d unter Rückfluß erhitzt. Kaliumiodid (5.98 g, 36 mmol) und 18-Krone-6 (0.95 g, 3.6 mmol) wurden nachdosiert, und es wurde für weitere 18 h erhitzt. Die abgekühlte Mischung wurde mit Wasser (50 mL) versetzt, filtriert, und die Phasen wurden getrennt. Die wäßrige Phase wurde mit Ethylacetat extrahiert, und die organischen Phasen wurden vereinigt. Nach Waschen mit 20%iger NaHSO₃-Lösung, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Durch Flashchromatographie an Kieselgel (Ethylacetat/*iso*-Hexan 20:80 v/v) wurde ein gelbes Öl erhalten, das gemäß ¹H-NMR-Analyse aus dem Produkt *syn*-(3*R*,5*S*)-**39** (86 mol%) und dem Edukt *syn*-(3*R*,5*S*)-**37** (14 mol%) bestand. Ausbeute: 1.61 g (52 %).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.16$ (dt, $J = 12.5, 11.5$ Hz, 1 H, H-4), 1.40 (s, 3 H, CH_3), 1.45 (s, 12 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ und CH_3), 1.87 (dt, $J = 12.5, 2.4$ Hz, 1 H, H-4), 2.33 (dd, $J = 15.1, 6.1$ Hz, 1 H, H-2), 2.46 (dd, $J = 15.2, 7.0$ Hz, 1 H, H-2), 3.10 (dd, $J = 10.1, 6.1$ Hz, 1 H, H-6), 3.17 (dd, $J = 10.1, 5.7$ Hz, 1 H, H-6), 3.88 (m, 1 H, H-5), 4.27 (m, 1 H, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9.4$ (C-6), 19.8 (CH_3), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.9 (CH_3), 36.3, 42.5 (C-4, C-2), 66.2, 69.1 (C-3, C-5), 80.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 99.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 170.1 (C-1).

MS (EI), m/z (%): 355 (50) [$M - \text{CH}_3$] $^+$, 299 (28), 239 (100), 197 (31), 129 (13), 111 (15), 59 (23), 57 (77) [C_4H_9] $^+$.

HRMS (EI): berechnet für [$M - \text{CH}_3$] $^+$: 355.0406, gefunden: 355.0397.

$\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{IO}_4$ (370.2).

syn-(3*R*,5*S*)-6-Iod-3,5-(isopropylidendioxy)-hexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**39**. Methode B: Epoxidöffnung und Ketalisierung. Wasserfreies Lithiumiodid (3.33 g, 24.9 mmol) und Kieselgel (2.08 g) wurden in einer Lösung des Epoxids *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** (1.69 g, 7.3 mmol, 87 %) in Dichlormethan suspendiert, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert. Das beladene Kieselgel wurde 1 h bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt wurde im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in 2,2-Dimethoxypropan (20 mL, 165 mmol) aufgenommen, und eine katalytische Menge (+)-Camphersulfonsäure wurde zugesetzt. Die Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wurde mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (5 %), ges. NaHCO_3 -Lösung und halbgesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie an Kieselgel wurde das Produkt *syn*-(3*R*,5*S*)-**39** als gelbes Öl erhalten (Ethylacetat / *iso*-Hexan 20:80 v/v). Ausbeute: 1.55 g (58 %). — $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +11.2$ ($c = 2.3$, CHCl_3).

Synthese des Epoxids *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** durch Chlorwasserstoffeliminierung

syn-(3*R*,5*S*)-5,6-Epoxy-3-hydroxyhexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**40**. Methode A: Chlorwasserstoffeliminierung mit DBU. Eine Lösung des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** (3.00 g, 12.6 mmol, >99.5 % *ee*, $dr_{s:a} = 205:1$) in Dichlormethan (130 mL) wurde mit DBU (3.83 g, 25.1 mmol) versetzt und 24 h unter Rückfluß erhitzt. Die Lösung wurde anschließend mit ges. NH₄Cl-Lösung, halbgesättigter NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Es wurde ein gelbes Öl erhalten, das gemäß ¹H-NMR-Analyse aus dem Produkt *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** (87 mol%) und dem Hydroxytetrahydrofuran *trans*-(2*R*,4*S*)-**41** (13 mol%) bestand. Ausbeute: 1.94 g (66 %). Eine analytische Probe wurde durch Flashchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (Ethylacetat/*iso*-Hexan 50:50 v/v). $[\alpha]_D^{25} = -30.1$ ($c = 1.7$, CHCl₃).

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.45$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.63-1.78 (m, 2 H, H-4), 2.45 (d, $J = 6.2$ Hz, 2 H, H-2), 2.50 (dd, $J = 5.0, 2.7$ Hz, 1 H, H-6), 2.77 (br t, $J \approx 4.5$ -5.0 Hz, 1 H, H-6), 3.09 (m, 1 H, H-5), 3.33 (d, $J = 3.31$ Hz, 1 H, OH), 4.19 (m, 1 H, H-3).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 28.3$ (C(CH₃)₃), 39.0, 42.1, 46.8 (C-2, C-4, C-6), 49.7 (C-5), 66.4 (C-3), 81.7 (C(CH₃)₃), 172.4 (C-1).

MS (EI), m/z (%): 146 (5) [$M - C_4H_8$]⁺, 145 (14), 129 (21) [$M - O^tBu$]⁺, 127 (18), 111 (21), 110 (13), 89 (20), 87 (49) [$M - CH_2COO^tBu$]⁺, 71 (11), 69 (15), 59 (15), 57 (100) [C₄H₉]⁺.

C₁₀H₁₈O₄ (202.3).

Durch fortgesetzte Elution wurde das polarere Hydroxytetrahydrofuran *trans*-(2*R*,4*S*)-**41** erhalten (farbloses Öl):

¹H-NMR (CDCl₃): $\delta = 1.45$ (s, 9 H, C(CH₃)₃), 1.74 (ddd, $J = 13.4, 9.5, 5.5$ Hz, 1 H, H-3), 2.00 (br s, 1 H, OH) überlagert mit 2.08 (dd, $J = 13.4, 5.9$ Hz, 1 H, H-3), 2.40 (dd, $J = 15.3, 6.3$ Hz, 1 H aus CH₂COO^tBu), 2.55 (dd, $J = 15.3, 6.8$ Hz, 1 H aus CH₂COO^tBu), 3.72 (br d, $J = 9.9$ Hz, 1 H, H-5), 4.00 (dd, $J = 9.9, 4.5$ Hz, 1 H, H-5), 4.46-4.53 (m, 2 H, H-2 und H-4).

¹³C-NMR (CDCl₃): $\delta = 28.3$ (C(CH₃)₃), 41.5, 41.7 (C-3, CH₂COO^tBu), 72.7, 74.6 (C-2, C-4), 75.6 (C-5), 81.0 (C(CH₃)₃), 170.6 (C-1).

MS (EI), m/z (%): 146 (37) $[M - C_4H_8]^+$, 145 (13), 129 (37) $[M - O^tBu]^+$, 128 (29), 127 (48), 102 (27), 98 (15), 97 (10), 87 (100) $[M - CH_2COO^tBu]^+$, 81 (10), 69 (14), 57 (46) $[C_4H_9]^+$.

HRMS (EI): berechnet für $[M - C_4H_8]^+$: 146.0579, gefunden: 146.0575.

$C_{10}H_{18}O_4$ (202.3).

syn-(3*R*,5*S*)-5,6-Epoxy-3-hydroxyhexansäure-*tert*-butylester *syn*-(3*R*,5*S*)-**40**. Methode B: Chlorwasserstoffeliminierung mit KOH. Eine Lösung des β,δ -Dihydroxyesters *syn*-(3*R*,5*S*)-**27** (240 mg, 1.0 mmol, >99.5 % *ee*, $dr_{s:a} = 205:1$) in Diethylether (10 mL) wurde bei 0°C mit gemörsertem Kaliumhydroxid (364 mg, 6.5 mmol) versetzt und 1 h gerührt. Nach Filtrieren durch $MgSO_4$ und Einengen im Vakuum wurde ein schwach gelbes Öl erhalten, das gemäß 1H -NMR-Analyse aus dem Produkt *syn*-(3*R*,5*S*)-**40** (90 mol%) und dem Hydroxytetrahydrofuran *trans*-(2*R*,4*S*)-**41** (10 mol%) bestand. Ausbeute: 103 mg (46 %).

7 Literaturverzeichnis und Anmerkungen

- ¹ a) B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, W. Steglich (Hrsg.), *Römpp-Lexikon Naturstoffe*, Thieme, Stuttgart, **1997**; b) B. J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 190-227 und zit. Lit.
- ² a) T. Oishi, T. Nakata, *Synthesis* **1990**, 635-645; b) S. D. Rychnovsky, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2021-2040; c) C. Schneider, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1445-1448; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1375-1378.
- ³ D. J. Newmann, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *17*, 215-234.
- ⁴ a) D. A. Evans, J. A. Gauchet-Prunet, E. M. Carreira, A. B. Charette, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 741-750; b) J. Krüger, E. M. Carreira, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7013-7016; c) D. A. Evans, P. H. Carter, E. M. Carreira, A. B. Charette, J. A. Prunet, M. Lautens, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2526-2530; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2354-2359.
- ⁵ D. Manns, *Pharm. Unserer Zeit* **1999**, *28*, 147-152.
- ⁶ a) B. Kwak, F. Mulhaupt, S. Myit, F. Mach, *Nature Med.* **2000**, *18*, 1399-1402; b) W. Palinski, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2001**, *21*, 3-5; c) R. W. Haley, J. M. Dietschy, *Arch. Neurol.* **2000**, *57*, 1410-1412.
- ⁷ A. Endo, K. Hasumi in: *Fungal Biotechnology* (Hrsg.: T. Anke), Chapman & Hall, Weinheim, **1997**, 162-172.
- ⁸ N. Zöllner, C. Keller, G. Wolfram in: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Hrsg.: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke), 6. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, **1996**, 503-511.
- ⁹ a) F. G. Kathawala, *Med. Res. Rev.* **1991**, *11*, 121-146; b) A. Endo, K. Hasumi, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 541-550.
- ¹⁰ Übersichtsartikel: a) T. Rosen, C. H. Heathcock, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 4909-4951; b) J. Mulzer, H.-J. Altenbach, M. Braun, K. Krohn, H.-U. Reissig, *Organic Synthesis Highlights*, VCH, Weinheim, **1991**, 309-322; c) Y. Chapleur in: *Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products* (Hrsg.: G. Lukacs), Vol. 2, Springer, Berlin, **1993**, 830-937; d) V. K. Yadav, K. K. Kapoor, *Indian J. Chem.* **1996**, *35B*, 1125-1143; e) T. Hiyama, *Pure & Appl. Chem.* **1996**, *68*, 609-612. Siehe auch: f) F. Burkamp, *Dissertation*, RWTH Aachen, **1995**.
- ¹¹ Atorvastatin: K. L. Baumann, D. E. Butler, C. F. Deering, K. E. Mennen, A. Millar, T. N. Nanninga, C. W. Palmer, B. D. Roth, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2283-2284.
- ¹² Cerivastatin: G. L. Plosker, C. I. Dunn, D. P. Figitt, *Drugs* **2000**, *60*, 1179-1206.
- ¹³ a) J. E. Lynch, R. P. Volante, R. V. Wattley, I. Shinakai, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1385-1388; b) M. Christen, D. H. G. Crout, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 264-266; c) P.-F. Deschenaux, T. Kallimopoulos, H. Stoeckli-Evans, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 731-737; d) S. Cardani, C. Scolastico, R. Villa, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7283-7288; e) G. Wess, K. Kessler, E. Baader, W. Bartmann, G. Beck, A. Bergmann, H. Jendralla, K. Bock, G. Holzstein, H. Kleine, M. Schnierer, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2545-2548; f) K. Prasad, K.-M. Chen, O. Repic, G. E. Hardtmann, *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, *1*, 307-310; g) P. L. Brower, D. E. Butler, C. F. Deering, T. V. Le, A. Millar, T. N. Nanninga, B. D. Roth, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2279-2282; h) C. Chen, D. Crich, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 7943-7954; i) M. H. Ansari, T. Kusumoto, T. Hiyama, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8271-8274; j) H. Tabuchi, T. Hamamoto, S. Miki, T. Tejima, A. Ichihara, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4749-4759; k) J. K. Thottathil, Y. Pendri, W. S. Li, D. R. Kronenthal (Squibb & Sons, Inc.), US 5 278 313, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 217700j]; l) T. Nakata, T. Komatsu, K. Nagasawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2403-2405; m)

- G. Beck, H. Jendralla, K. Kessler, *Synthesis* **1995**, 1014-1017; n) C. Spino, N. Mayes, H. Desfossés, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6503-6506; o) O. Tempkin, S. Abel, C.-P. Chen, R. Underwood, K. Prasad, K.-M. Chen, O. Repič, T. J. Blacklock, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 10659-19670; p) M. Shimizu, K. Ishii, T. Fujisawa, *Chem. Lett.* **1997**, 765-766; q) N. Kizaki, Y. Yamada, Y. Yasohara, A. Nishiyama, M. Miyazaki, M. Mitsuda, T. Kondo, N. Ueyama, K. Inoue (Kaneka Corp.), EP-A 1 024 139, **2000** [*Chem. Abstr.* **2000**, *132*, 166230u].
- ¹⁴ a) W. S. Johnson, A. B. Kelson, J. D. Elliott, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3757-3760; b) D. Enders, F. Burkamp, J. Runsink, *Chem. Commun.* **1996**, 609-610; c) N. Oguni, K. Tanaka, H. Ishida, *Synlett* **1998**, 601-602; d) D. A. Evans, M. C. Kozlowski, J. A. Murry, C. S. Burgey, K. R. Campos, B. T. Connell, R. J. Staples, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 669-685; e) M. Abu Hena, C. S. Kim, M. Horiike, S. Kiyooka, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1161-1164.
- ¹⁵ N. Sayo, T. Saito, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, R. Noyori, H. Takaya (Takasago International Corp.), EP-A 297 752, **1989** [*Chem. Abstr.* **1989**, *111*, 114745n].
- ¹⁶ a) L. Shao, T. Seki, H. Kawano, M. Saburi, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7699-7702; b) L. Shao, H. Kawano, M. Saburi, Y. Uchida, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1997-2010.
- ¹⁷ V. Blandin, J.-F. Carpentier, A. Mortreux, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3421-3427.
- ¹⁸ M. Uko, H. Azuma, T. Sakai, S. Tsuboi (Mitsubishi Kasei Corp.), JP-Kokai 03-48641, **1991** [*Chem. Abstr.* **1991**, *115*, 28713b].
- ¹⁹ a) J. Sakaki, Y. Sugita, M. Sato, C. Kaneko, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 6197-6214; b) C. Kaneko, M. Sato (Chisso Corp.), US 5 292 891, **1994** [*Chem. Abstr.* **1994**, *121*, 83351].
- ²⁰ a) M. Sato, J. Sakaki, Y. Sugita, T. Nakano, C. Kaneko, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7463-7466; b) C. Kaneko, M. Sato (Chisso K. K.), JP-Kokai 04-84893, **1992** [*Chem. Abstr.* **1992**, *117*, 149486e].
- ²¹ a) R. N. Patel, A. Banerjee, C. G. McNamee, D. Brzozowski, R. L. Hanson, L. J. Szarka, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1014-1021; b) R. N. Patel, C. G. McNamee, A. Banerjee, L. J. Szarka (Squibb & Sons, Inc.), EP-A 569 998, **1993** [*Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 52826q].
- ²² G. Solladié, N. Ghiatou, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1605-1608.
- ²³ a) G. Solladié, C. Bauder, L. Rossi, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7774-7777; b) G. Solladié, N. Huser, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2679-2682; c) G. Solladié, L. Gressot-Kempf, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2371-2379; d) G. Solladié, F. Colobert, D. Denni, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 3081-3094; e) G. Solladié, N. Wilb, C. Bauder, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3021-3026; f) G. Solladié, L. Gressot, F. Colobert, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 357-364.
- ²⁴ a) G. B. Reddy, T. Minami, T. Hanamoto, T. Hiyama, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5752-5754; b) T. Hiyama, G. B. Reddy, T. Minami, T. Hanamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 350-363; c) T. Hiyama, T. Minami, K. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 364-372.
- ²⁵ a) S. N. Huckin, L. Weiler, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *23*, 2405-2408; b) S. N. Huckin, L. Weiler, *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 1343-1351; c) N. S. Narasimhan, R. K. Ammanamanchi, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3945-3947; d) S. Brandänge, B. Rodriguez, *Acta Chem. Scand. (Ser. B)* **1987**, *41*, 740-744; e) M. Yamaguchi, K. Shibato, I. Hirao, *Chem. Lett.* **1985**, 1145-1148; f) M. Yamaguchi, K. Shibato, H. Nakashima, T. Minami, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4767-4775; g) B. Lygo, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 12859-12868. Siehe auch Lit. [16] und; h) K. Utimoto, T. Takai, T. Matsui, S. Matsubara, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1997**, *134*, 365-369; i) A. G. M. Barret, T. M. Morris, D. H. R. Barton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1980**, 2272-2277.

- ²⁶ a) S. G. Gilbreath, C. M. Harris, T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6172-6179; b) T. Hanamoto, T. Hiyama, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6467-6470. Siehe auch Lit. [95b].
- ²⁷ a) S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *39*, 3815-3818. Übersichtsartikel zu Weinreb-Amiden: b) J. Singh, N. Satyamurthi, I. Singh Aidhen, *J. Prakt. Chem.* **2000**, *342*, 340-347; c) M. Mentzel, H. M. R. Hoffmann, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 517-524; d) M. P. Sibi, *Org. Prep. Proc. Int.* **1993**, *25*, 15-40.
- ²⁸ P. Brownbridge, T. H. Chan, M. A. Brook, G. J. Kang, *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 688-693.
- ²⁹ a) P. Langer, T. Krummel, *Chem. Commun.* **2000**, 967-968; b) P. Langer, T. Krummel, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1720-1727.
- ³⁰ a) J. Häusler, *Monatsh. Chem.* **1982**, *113*, 1213-1216; b) J. Kang, Y. H. Kim, M. Park, C. H. Lee, W.-J. Kim, *Synth. Commun.* **1984**, *14*, 265-269.
- ³¹ F. Yuste, F. K. Breña, H. Barrios, R. Sánchez-Obregón, B. Ortiz, F. Walls, *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 735-739.
- ³² a) J. G. Batelaan, *Synth. Commun.* **1976**, *6*, 81-83. Siehe auch: b) L. Crombie, D. E. Games, A. W. G. James, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1996**, 2715-2724.
- ³³ a) C. Bonini, G. Righi, L. Rossi, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9801-9808; b) B. Loubinoux, A. C. O'Sullivan, J.-C. Sinnes, T. Winkler, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2047-2054. Siehe auch Lit. [95b].
- ³⁴ B. R. Davis, P. J. Garratt in *Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 2* (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon, Oxford, **1991**, 795-863.
- ³⁵ R. Martín, O. Pascual, P. Romea, R. Rovira, F. Urpí, J. Vilarrasa, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1633-1636.
- ³⁶ a) T. M. Harris, C. M. Harris, *Tetrahedron* **1977**, *33*, 2159-2185; b) T. M. Harris, C. M. Harris, *Pure & Appl. Chem.* **1986**, *58*, 283-294.
- ³⁷ T. H. Chan, D. Stössel, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2423-2428.
- ³⁸ a) C. J. Sih, C.-S. Chen, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 556-565; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 570-578; b) M. Gottwald, *Methods of Organic Chemistry (Houben-Weyl) 4th ed., Vol. E21d*, **1995**, 4143-4197; c) J.-M. Fang, C.-H. Lin, C. W. Bradshaw, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 967-978; d) J. Peters in *Biotechnology, 2nd ed., Vol. 8a* (Hrsg.: H.-J. Rehm, G. Reed), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 391-474; e) W. Hummel, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 487-492; f) M.-R. Kula, U. Kragl in *Stereoselective Biocatalysis* (Hrsg.: R. N. Patel), Marcel Dekker, New York, **2000**, 839-866; g) J. D. Stewart, *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2001**, *5*, 120-129.
- ³⁹ Übersichtsarbeiten zur Biokatalyse allgemein: a) R. Azerad, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, *132*, 17-51; b) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, **1997**; c) A. Zaks, D. R. Dodds, *Drug Discov. Today* **1997**, *2*, 513-531; d) R. N. Patel, *Adv. Appl. Microbiol.* **1997**, *43*, 91-140; e) J. D. Rozzell, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2253-2261; f) A. Liese, M. Villela Filho, *Curr. Opinion Biotechnol.* **1999**, *10*, 595-603.
- ⁴⁰ R. Devaux-Basseguy, A. Bergel, M. Comtat, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 248-258 und zit. Lit.
- ⁴¹ a) A. S. Bommarius, K. Drauz, W. Hummel, M.-R. Kula, C. Wandrey, *Biocatalysis* **1994**, *10*, 37-47; b) A. S. Bommarius, M. Schwarm, K. Drauz, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1998**, *5*, 1-11.
- ⁴² W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng. / Biotechnol.* **1997**, *58*, 145-184.
- ⁴³ B. Riebel, *Dissertation*, Universität Düsseldorf, **1996**.
- ⁴⁴ C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532-1536.
- ⁴⁵ LBADH: a) JUELICH FINE CHEMICALS Nr. 05.11, b) ROCHE DIAGNOSTICS; LKADH: FLUKA Nr. 05643.
- ⁴⁶ K. A. Reynolds, K. O. Holland, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 337-343.

- ⁴⁷ J. Peters, T. Zelinski, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 334-340.
- ⁴⁸ a) C. Masoni, P.-F. Deschenaux, T. Kallimopoulos, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1284-1287; b) T. Kallimopoulos, P.-F. Deschenaux, A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 1233-1235.
- ⁴⁹ a) H. Tabuchi, T. Hamamoto, S. Miki, T. Tejima, A. Ichihara, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2327-2330; b) H. Tabuchi, T. Hamamoto, S. Miki, T. Tejima, A. Ichihara, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4749-4759.
- ⁵⁰ D. Drochner, M. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 211-215.
- ⁵¹ a) R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Bückmann, M.-R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.* **1981**, *23*, 2789-2802; b) K. D. Kulbe, M. W. Howaldt, K. Schmidt, T. R. Röthig, H. Chmiel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1990**, *613*, 820-826; c) A. Liese, T. Zelinski, M.-R. Kula, H. Kierkels, M. Karutz, U. Kragl, C. Wandrey, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **1998**, *4*, 91-99; d) V. Sotolongo, D. V. Johnson, D. Wahnnon, I. W. Wainer, *Chirality* **1999**, *11*, 39-45; e) N. St. Clair, Y.-F. Wang, A. L. Margolin, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 388-391; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 380-383.
- ⁵² M. Villela Filho, *geplante Dissertation*, Universität Bonn.
- ⁵³ a) D. G. Drueckhammer, S. K. Sadozai, C.-H. Wong, S. M. Roberts, *Enzyme Microb. Technol.* **1987**, *9*, 564-570; b) Y. Yasohara, N. Kizaki, J. Hasegawa, S. Takahashi, M. Wada, M. Kataoka, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 847-851; c) Å. Jönsson, E. Wehtje, P. Adlerkretz, B. Mattiasson, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1430*, 313-322.
- ⁵⁴ a) J. T. Vicenzi, M. J. Zmijewski, M. R. Reinhard, B. E. Landen, W. L. Muth, P. G. Marler, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 494-499; b) P. D'Arrigo, G. P. Fantoni, S. Servi, A. Strini, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2375-2379; c) K. Nakamura, M. Fujii, Y. Ida, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3205-3211.
- ⁵⁵ M. H. Vermuë, J. Tramper, *Pure & Appl. Chem.* **1995**, *67*, 345-373.
- ⁵⁶ J. Sakaki, H. Sakoda, Y. Sugita, M. Sato, C. Kaneko, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 343-346.
- ⁵⁷ M. Sato, J. Sakaki, Y. Sugita, S. Yasuda, H. Sakoda, C. Kaneko, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 5689-5708.
- ⁵⁸ a) W. Bartmann, G. Beck, E. Granzer, H. Jendralla, B. von Kerekjarto, G. Wess, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4709-4712; b) G. E. Stokker, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3179-3182; c) S. Takano, Y. Shimazaki, M. Moriya, K. Ogasawara, *Chem. Lett.* **1990**, 1177-1180; d) S. Schabbert, R. Tiedemann, E. Schaumann, *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 879-880; e) A. K. Ghosh, H. Lei, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4779-4781.
- ⁵⁹ a) G. E. Keck, X.-Y. Li, C. E. Knutson, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 411-414; b) P. V. Ramachandran, M. V. R. Reddy, H. C. Brown, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 583-586.
- ⁶⁰ a) M. T. Davies-Coleman, D. E. A. Rivett, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1989**, *55*, 1-35; b) L. A. Collett, M. T. Davies-Coleman, D. E. A. Rivett, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1998**, *75*, 181-209.
- ⁶¹ G. Ohloff, *Scent and Fragrances*, Springer, Berlin, **1994**, 182-183 [*Riechstoffe und Geruchssinn*, Springer, Berlin, **1990**].
- ⁶² a) R. M. Carlson, A. R. Oyler, J. R. Peterson, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1610-1616; b) Y. N. Ogibin, É. I. Troyanskii, V. I. Kadentsev, E. D. Lubuzh, O. S. Chizhov, G. I. Nikishin, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* **1981**, *30*, 830-834.
- ⁶³ Die Synthesen dieser beiden Naturstoffe (Abb. 3-8) wurden von Herrn Dr. Andreas JOB an der RWTH Aachen durchgeführt. Siehe auch Lit. [92].
- ⁶⁴ S. N. Huckin, L. Weiler, *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 2157-2164.
- ⁶⁵ K. Maruoka, A. B. Concepcion, N. Murase, M. Oishi, N. Hirayama, H. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3943-3949.

- ⁶⁶ a) E. Santaniello, R. Casati, F. Milani, *J. Chem. Res. (S)* **1984**, 132-133; b) Y. Konda, H. Takahashi, M. Onda, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 1083-1087; c) C. E. Song, J. K. Lee, S. H. Lee, S. Lee, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1063-1066; d) B. H. Hoff, T. Anthonsen, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 1401-1412.
- ⁶⁷ M. Reggelin, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1997**, 45, 789-793 und zit. Lit.
- ⁶⁸ Bei der biokatalytischen Reduktion *symmetrisch* substituierter α -Alkyl- β -diketone handelt es sich nicht um eine dynamische Stereoisomeren-Differenzierung, sondern um eine Differenzierung der enantiotopen Ketogruppen. a) A. Fauve, H. Veschambre, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5037-5040; b) A. Fauve, H. Veschambre, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5215-5219.
- ⁶⁹ a) S. Tsuboi, E. Nishiyama, H. Furutani, M. Utaka, A. Takeda, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 1359-1362; b) T. Fujisawa, B. I. Mobele, M. Shimizu, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5567-5570. Siehe auch: c) T. Zelinski, A. Liese, C. Wandrey, M.-R. Kula, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 1681-1687.
- ⁷⁰ a) G. Fräter, U. Müller, W. Günther, *Tetrahedron* **1984**, 40, 1269-1277 und zit. Lit.; b) K. Nakamura, T. Miyai, A. Nagar, S. Oka, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 1179-1186; c) W.-R. Shieh, C. J. Sih, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 1259-1269; d) S. Geresh, T. J. Valiyaveetil, Y. Lavie, A. Shani, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 89-96; e) H. J. Bestmann, B. Liepold, A. Kress, A. Hofmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2984-2989.
- ⁷¹ a) T. Nakata, S. Nagao, T. Oishi, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 6465-6468. Siehe auch: b) M. A. Adams, A. J. Duggan, J. Smolanoff, J. Meinwald, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5364-5370; c) T. M. Willson, P. Kocienski, K. Jarowicki, K. Isaac, A. Faller, S. F. Campbell, J. Bordner, *Tetrahedron* **1990**, 46, 1757-1766.
- ⁷² a) E. Maconi, F. Aragozzini, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, 31, 29-31; b) F. Aragozzini, M. Valenti, E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, *Biocatalysis* **1992**, 5, 325-332; c) E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, F. Aragozzini, E. Maconi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 601-605. d) E. C. Tidswell, G. J. Salter, D. B. Kell, J. G. Morris, *Enzyme Microb. Techn.* **1997**, 21, 143-147. Siehe auch: e) P. Besse, T. Sokoltchik, H. Veschambre, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 4441-4457.
- ⁷³ J. Haberland, *geplante Dissertation*, Universität Bonn.
- ⁷⁴ C. D. Reeve (Zeneca Ltd.), WO-A 97/00968, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, 126, 143384j].
- ⁷⁵ A. Weckbecker, *geplante Dissertation*, Universität Düsseldorf.
- ⁷⁶ M. Amidjojo, *geplante Dissertation*, Technische Universität München.
- ⁷⁷ a) S. Servi, *Synthesis* **1990**, 1-25; b) R. Csuk, B. I. Glänzer, *Chem. Rev.* **1991**, 91, 49-97; c) E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, A. Manzocchi, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1071-1140; d) N. Hoffmann, *Chem. Unserer Zeit* **1996**, 30, 201-213.
- ⁷⁸ a) O. P. Ward, C. S. Young, *Enzyme Microb. Technol.* **1990**, 12, 482-493; b) W. F. H. Sybesma, A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, J. T. Pronk, J. J. Heijnen, *Biocatalysis Biotransform.* **1998**, 16, 95-134.
- ⁷⁹ V. Crocq, C. Masson, J. Winter, C. Richard, G. Lemaitre, J. Lenay, M. Vivat, J. Buendia, D. Prat, *Org. Process Res. Dev.* **1997**, 1, 2-13.
- ⁸⁰ a) J. Bolte, J.-G. Gourcy, H. Veschambre, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 565-568; b) H. Ohta, K. Ozaki, G. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 2499-2502; c) H. Ohta, K. Ozaki, G. Tsuchihashi, *Chem. Lett.* **1987**, 2225-2226; d) G. Dauphin, A. Fauve, H. Veschambre, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2238-2242.
- ⁸¹ a) J.-N. Cui, R. Teraoka, T. Ema, T. Sakai, M. Utaka, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3021-3024; b) J.-N. Cui, T. Ema, T. Sakai, M. Utaka, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 2681-2692.

- ⁸² a) M. Carvalho, M. T. Okamoto, P. J. S. Moran, J. A. R. Rodrigues, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2073-2080; b) S. Tsuboi, J. Sakamoto, T. Kawano, M. Utaka, A. Takeda, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7177-7179.
- ⁸³ a) A. C. Dahl, J. Ø. Madsen, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 4395-4417; b) D. H. Dao, Y. Kawai, K. Hida, S. Hornes, K. Nakamura, A. Ohno, M. Okamura, T. Akasaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 425-432; c) M. Lindström, H.-E. Högberg, S. Servi, G. Pedrocchi-Fantoni, *Acta Chem. Scand.* **1999**, *53*, 378-380; d) R. Hayakawa, K. Nozawa, K. Kimura, M. Shimizu, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7519-7528; e) A. C. Dahl, M. Fjeldberg, J. Ø. Madsen, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 551-559.
- ⁸⁴ R. S. Pereira, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1995**, *55*, 123-132.
- ⁸⁵ K. Buchholz, V. Kasche, *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, VCH, Weinheim, **1997**, 227.
- ⁸⁶ a) K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajima, A. Ohne, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4778-4783; b) K. Ushio, K. Ebara, T. Yamashita, *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 834-838; c) K. Ushio, J. Hada, Y. Tanaka, K. Ebara, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 222-228.
- ⁸⁷ P. Florey, A. J. Smallridge, A. Ten, M. A. Trewhalla, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1879-1880 und zit. Lit.
- ⁸⁸ a) P. North, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1699-1702; b) O. Rotthaus, D. Krüger, M. Demuth, K. Schaffner, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 935-938; c) C. Medson, A. J. Smallridge, M. A. Trewhalla, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1049-1054.
- ⁸⁹ A. Manzocchi, R. Casati, A. Fiecchi, E. Santaniello, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 2753-2757.
- ⁹⁰ a) M. Eh, M. Kalesse, *Synlett* **1995**, 837-838; b) M. Kalesse, M. Eh, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1767-1770; c) N. J. Turner, S. M. Roberts in *Advances in Asymmetric Synthesis, Vol. 2* (Hrsg.: A. Hassner), JAI Press, Greenwich (CT), **1997**, 297-298.
- ⁹¹ C. Medson, A. J. Smallridge, M. A. Trewhalla, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2001**, *11*, 879-903.
- ⁹² A. Job, *Dissertation*, RWTH Aachen, **2001**.
- ⁹³ S. Rodríguez, K. T. Schroeder, M. M. Kayser, J. D. Stewart, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2586-2587.
- ⁹⁴ a) K. Narasaka, F.-C. Pai, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 2233-2238; b) F. G. Kathawala, B. Prager, K. Prasad, O. Repič, M. J. Shapiro, R. S. Stabler, L. Widler, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 803-805; c) K.-M. Chen, G. E. Hardtmann, K. Prasad, O. Repič, M. J. Shapiro, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 155-158; d) D. A. Evans, A. H. Hoveyda, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *55*, 5190-5192; e) L. Patrick, M. Viviane, R. Xavier (Rhone-Poulenc Sante), FR 2 670 206, **1992** [*Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 80499n]; f) C. R. Sarko, S. E. Collibee, A. L. Knorr, M. DiMare, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 868-873.
- ⁹⁵ a) D. A. Evans, K. T. Chapman, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5939-3942; b) D. A. Evans, K. T. Chapman, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3560-3578; c) S. Anwar, P. Davis, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 831-832; d) S. Anwar, P. Davis, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 3761-3770.
- ⁹⁶ a) A. K. Saksena, P. Mangiaracina, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 273-276; b) C. F. Nutaitis, G. W. Gribble, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4287-4290.
- ⁹⁷ a) G. T. Lee, J. Linder, K.-M. Chen, K. Prasad, O. Repič, G. E. Hardtmann, *Synlett* **1990**, 508; b) C. F. Jewell Jr., J. R. Wareing (Sandoz Corp.), US-P 4 650 890, **1987** [*Chem. Abstr.* **1987**, *107*, 96420p].
- ⁹⁸ a) M. T. Reetz, A. Jung, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4833-4835; b) R. W. Hoffmann, U. Weidmann, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 3980-3992.
- ⁹⁹ a) S. D. Rychnovsky, D. J. Skalitzky, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 945-948; b) D. A. Evans, D. L. Rieger, J. R. Gage, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7099-7100; c) S. D. Rychnovsky, B. N. Rogers, T. I. Richardson, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 9-17.

- ¹⁰⁰ a) C. L. Perrin, R. E. Engler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 585-591 und zit. Lit.; b) P. Deslongchamps, Y. L. Dory, S. Li, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3533-3537; c) P. Deslongchamps, P. G. Jones, S. Li, A. J. Kirby, S. Kuusula, Y. Ma, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 2621-2626.
- ¹⁰¹ Acetalhydrolyse-Mechanismen: a) E. H. Cordes, H. G. Bull, *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 581-603; b) D. P. N. Satchell, R. S. Satchell, *Chem. Soc. Rev.* **1990**, *19*, 55-81.
- ¹⁰² a) K. Pihlaja, *Ann. Univers. Turkuensis Ser. A1* **1967**, *114* [*Chem. Abstr.* **1968**, *69*, 76439v]; b) Y. Tamaru, M. Hojo, S. Kawamura, S. Sawada, Z. Yoshida, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4062-4072; c) J. Mulzer, H. M. Kirstein, J. Buschmann, C. Lehmann, P. Luger, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 910-923; d) G. Caron, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 657-664; e) P. Cieplak, A. E. Howard, J. P. Powers, S. D. Rychnovsky, P. A. Kollman, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3662-3668; f) T. Trieselmann, R. W. Hoffmann, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1209-1212.
- ¹⁰³ a) T. I. Richardson, S. D. Rychnovsky, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4219-4231; b) S. D. Rychnovsky, G. Griesgraber, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1559-1563.
- ¹⁰⁴ H. Kotsuki, T. Shimanouchi, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1845-1848.
- ¹⁰⁵ β -Oxy-substituierte Epoxide: a) F. Bennett, D. W. Knight, G. Fenton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1991**, 133-140; b) B. Achmatowicz, J. Wicha, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 399-410; c) L. Rösslein, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 47-56; d) Y. Mori, M. Suzuki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 1809-1812.
- ¹⁰⁶ 4-Oxy-substituierte Tetrahydrofurane: a) M. A. Bernstein, H. M. Morton, Y. Guindon, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1986**, 1155-1163; b) M. E. Jung, O. Kretschik, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2975-2981; c) P. Boldon, T. S. Jahnke, V. Nair, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10443-10452; d) G. Hodosi, G. Galambos, B. Podányi, J. Kuzmann, *Carbohydr. Res.* **1992**, *225*, 269-278; e) Y. Díaz, F. Bravo, S. Castellón, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6508-6511.
- ¹⁰⁷ a) Y. Guindon, C. Yoakim, M. A. Bernstein, H. E. Morton, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 1185-1188; b) B. D. Roth, W. H. Roark, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 1255-1258.
- ¹⁰⁸ H. Jendralla, E. Granzer, B. v. Kerekjarto, R. Krause, U. Schacht, E. Baader, W. Bartmann, G. Beck, A. Bergmann, K. Kessler, G. Wess, L.-J. Chen, S. Granata, J. Herchen, H. Kleine, H. Schüssler, K. Wagner, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2962-2983.
- ¹⁰⁹ a) S. D. Rychnovsky, G. Griesgraber, S. Zeller, D. J. Skalitzky, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5161-5169; b) B. M. Trost, P. R. Hanson, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8119-8122; c) D. Muñoz-Torrero, R. Brückner, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1031-1043.
- ¹¹⁰ J. Guo, K. J. Duffy, K. L. Stevens, P. I. Dalko, R. M. Roth, M. M. Hayward, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 198-202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 187-190.
- ¹¹¹ Für diesen und die folgenden Abschnitte siehe auch: a) J. Leonard, B. Lygo, G. Procter, *Advanced Practical Organic Chemistry*, 2nd Ed., Chapman and Hall, London, **1995**; b) H. J. E. Loewenthal, E. Zass, *Der clevere Organiker: Leitfaden zum Erfolg in der Synthese*, Barth, Leipzig, **1993**.
- ¹¹² W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- ¹¹³ Waschvorschrift nach Lit. [26a]. Abweichend von dieser Vorschrift wurde eine stärker verdünnte Salzsäure verwendet (2 mol-L⁻¹), und das gewaschene Kieselgel wurde vor Verwendung für mindestens 24 h in einem Trockenschrank bei 105°C getrocknet.
- ¹¹⁴ R. Bel-Rhliid, M. F. Renard, H. Veschambre, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**, *133*, 1011-1021; P. Stanetty, B. Krumpak, I. K. Rodler, *J. Chem. Res. (M)* **1995**, 2110-2118.

- ¹¹⁵ Erzeugung der Bisenolate nach: L. Weiler, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6702-6704.
- ¹¹⁶ J.-F. Lavallée, C. Spino, R. Ruel, K. T. Hogan, P. Deslongchamps, *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 1406-1426.
- ¹¹⁷ Vorschrift in Anlehnung an Lit. [43]. Siehe auch: W. Hummel, M.-R. Kula, *J. Microbiol. Meth.* **1989**, *9*, 201-209.
- ¹¹⁸ M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **1991**, S. 4.
- ¹¹⁹ Vorschrift in Anlehnung an: S. N. Huckin, L. Weiler, *Can. J. Chem.* **1974**, *52*, 2157-2164.
- ¹²⁰ Siehe auch: S. Ohta, A. Shimabayashi, S. Hayakawa, M. Sumino, M. Okamoto, *Synthesis* **1985**, 45-47.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-3988
Juni 2002
ISSN 0944-2952