



Institut für Biotechnologie

Chemoenzymatische Synthese α,β -propargylierender Alkohole

Thomas Schubert

***Chemoenzymatische Synthese
 α,β -propargylischer Alkohole***

Thomas Schubert

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3983
ISSN 0944-2952
Institut für Festkörperforschung Jül-3983
D 5 (Diss., Bonn, 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

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Einsatz von Oxidoreduktasen für die Reduktion propargylicher Ketone. In dieser ersten umfassenden Untersuchung der enzymatischen Reduktion von Alkinonen wurden insgesamt über 50 Substrate dargestellt und getestet. (*R*)- und (*S*)-Methyl-Ethynyl-Carbinole konnten mit unterschiedlichsten Resten an der Dreifachbindung über *recLB*-ADH und *CPCR* nahezu allgemeingültig enantiomerenrein zugänglich gemacht werden. Die Reduktion propargylicher Ketone mit einer terminalen Dreifachbindung mittels *recLB*-ADH führte zu einer Konfigurationsumkehr bei den erhaltenen Alkoholen. α -chlorierte und α -bromierte Alkinone wurden über die Enzyme *recLB*-ADH, *HL*-ADH und *TB*-ADH mit hohen Aktivitäten zu den entsprechenden halogenierten Alkoholen reduziert. Am Beispiel der multifunktionellen chlorierten C4-Bausteine wurde eine Optimierung der enzymatischen Reduktion durchgeführt. Die Substrate konnten im mmol-Maßstab mit Cofaktor-TTNs von bis zu 20.000 quantitativ reduziert werden. Abschließend wurde die vielseitige Folgechemie der halogenierten propargylichen Alkohole durch die Überführung in Epoxide, Nitrile und Olefine demonstriert.

Abstract

This study describes the use of oxidoreductases for the reduction of propargylic ketones. In this first comprehensive investigation of the enzymatic reduction of alkynones a total of more than 50 substrates were prepared and tested. It was possible to make enantiomerically pure (*R*)- and (*S*)-methyl-ethynyl-carbinols with widely differing residues at the triple bond almost universally accessible via *recLB*-ADH and *CPCR*. The reduction of propargylic ketones with a terminal triple bond by means of *recLB*-ADH led to an inversion of the configuration of the alcohols obtained. α -chlorinated and α -brominated alkynones were reduced to the corresponding halogenated alcohols via the enzymes *recLB*-ADH, *HL*-ADH and *TB*-ADH with high activities. The enzymatic reduction was optimized for the multifunctional chlorinated C4 constituents. The substrates were quantitatively reduced on the mmole scale with cofactor TTNs of up to 20,000. In conclusion, the versatile consecutive chemistry of the halogenated propargylic alcohols was demonstrated by transforming them into epoxides, nitriles and olefins.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Enantiomerenangereicherte propargylische Alkohole	1
1.1.1	Enantioselektive Synthese propargylischer Alkohole: Stand der Technik..	1
1.1.2	Anwendung propargylischer Alkohole	7
1.2	Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen	11
1.2.1	Die Enzyme.....	11
1.2.2	Cofaktorregenerierung	14
1.3	Zielsetzung.....	18
2	Spezieller Teil	19
2.1	Die Substrate.....	19
2.1.1	Synthese der propargylischen Ketone	19
2.1.2	Synthese der olefinischen Substrate.....	26
2.1.3	Synthese der racemischen Alkohole	27
2.2	Enzym-Screening	30
2.3	Substratspektrum und Charakterisierung der Produkte.....	34
2.3.1	Aromatische Alkinone	34
2.3.2	Aliphatische Alkinone	37
2.3.3	Alkinone mit terminaler Dreifachbindung.....	43
2.3.4	α -Substituierte Alkinone	46
2.4	α -Halogenierte Alkinone.....	48
2.4.1	Reduktion α -halogenerter Alkinone mit <i>recLB</i> -ADH und <i>CPCR</i>	48
2.4.2	Enzym-Screening mit halogenierten Alkinonen.....	51
2.4.3	1-Chlor- und 1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (28a und 29a).....	55
2.4.4	1-Chlor-4- <i>t</i> -butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (50a)	57
2.4.5	1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (30a)	59
2.5	Olefinische Ketone	59
2.5.1	Enzym-Screening olefinischer Substrate	60
2.6	Optimierung der enzymatischen Reduktionen.....	64
2.6.1	Lösungsmittelverträglichkeit der Enzyme.....	64
2.6.2	Optimierung der Konzentrationen in den enzymatischen Ansätzen.....	67
2.6.3	Wasser als Medium	69
2.6.4	Scale-Up der optimierten Reduktionen	70
2.7	Folgechemie.....	73
2.7.1	Reaktionen an C1 und C2.....	73
2.7.2	Reaktionen an C3 und C4.....	79
3	Zusammenfassung und Ausblick.....	82

4	Experimenteller Teil	86
4.1	Analytik.....	86
4.2	Synthese der Substrate	89
4.3	Synthese der racemischen Alkohole	116
4.4	Enzym- und Substrat-Screening.....	132
4.5	Enzymatische Reduktionen im analytischen Maßstab	134
4.6	Enzymatische Reduktionen im präparativen Maßstab	138
4.7	Folgechemie.....	154
5	Literatur und Anmerkungen.....	165
6	Anhang.....	171
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	171
6.2	Screening weiterer Alkinone.....	174

1 Einleitung

1.1 Enantiomerenangereicherte propargylische Alkohole

1.1.1 Enantioselektive Synthese propargylischer Alkohole: Stand der Technik

Asymmetrische Synthesen bieten einen wichtigen Zugang zu chiralen Alkoholen. Die Vielzahl bekannter asymmetrischer Synthesen wird fortlaufend durch neue Veröffentlichungen ergänzt und erweitert. Ein Großteil dieser Publikationen beschäftigt sich mit der chemischen enantioselektiven Reduktion der entsprechenden Ketone, welche sowohl katalytisch als auch mit stöchiometrischen Reagenzien durchgeführt werden kann.^[1] Die Diversifikation dieser Methoden ermöglicht einen breiten Zugang zu unterschiedlichst substituierten enantiomerenangereicherten Alkoholen.

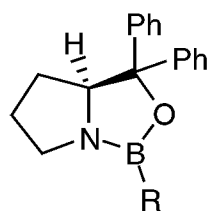
Zu nicht racemischen chiralen propargylischen Alkoholen wurde bislang kein allgemeingültiger Zugang entwickelt. Die bekannten Synthesewege sind entweder auf ein begrenztes Substratspektrum beschränkt oder sie erreichen lediglich für einen Teil der Produkte einen hohen Enantiomerenüberschuß.^[1] Die beschriebenen Synthesen nicht racemischer chiraler propargylischer Alkohole verlaufen zu einem großen Teil über eine enantioselektive Reduktion der entsprechenden prochiralen Ketone:

i) Chemische Methoden

Reduktionen mit Boranen

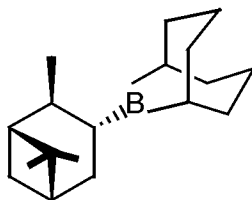
Die umfangreichen Arbeiten zu diesem Thema stellen eine große Anzahl unterschiedlich substituierter Borane für die Reduktion propargylischer Ketone zur Verfügung.^[2] Für die Anwendung ist es hierbei von Vorteil, daß viele dieser Verbindungen kommerziell erhältlich sind. Zu den bekanntesten Reagenzien zählen die von Corey et al. entwickelten CBS-Borane,^[2d,3] welche katalytisch eingesetzt werden können, sowie Alpine-Boran und DIP-Chlorid als stöchiometrisch einzusetzende Reagenzien (Abb. 1-1).^[4,5]

[1] An dieser Stelle soll lediglich eine Übersicht über die enantioselektiven Synthesemethoden gegeben werden. Detaillierte Angaben zu Enantiomerenüberschüssen und Ausbeuten bei propargylischen Alkoholen werden im speziellen Teil jeweils bei den unterschiedlichen Substrat-Klassen angegeben und den eigenen Ergebnissen vorangestellt.

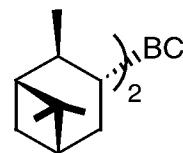


R = Alkyl, Aryl

**CBS-Katalysator
(Oxazaborolidin)**



ALPINE-BORAN



DIP-CHLORID

Abb. 1-1: Boran-Reagenzien

Da jeweils beide Enantiomere der Borane zugänglich sind, können durch die Umsetzung sowohl die (*S*)- als auch die entsprechenden (*R*)-Alkohole erhalten werden (Abb. 1-2). Die bei der Reduktion erzielbaren Enantiomerenüberschüsse hängen stark von den Substituenten des Borans ab. Vor der Umsetzung eines neuen Substrats ist hierdurch ein Screening erforderlich, mit dem ein für die Reduktion geeignetes Boran identifiziert werden kann.

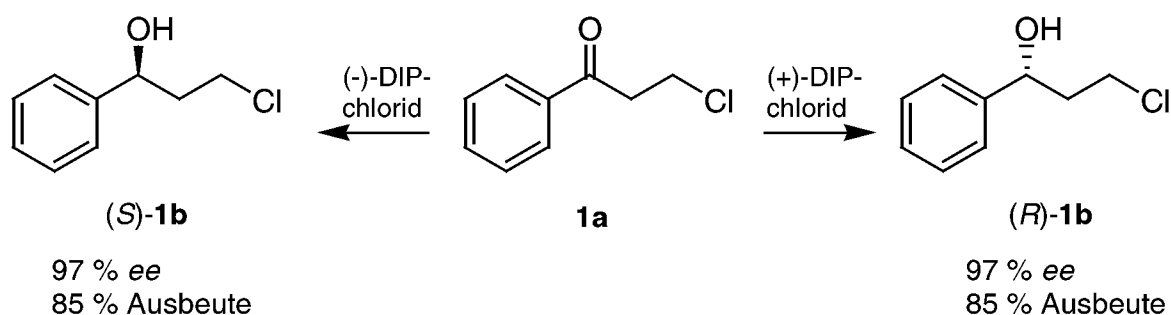


Abb. 1-2: Beispiel einer enantioselektiven Keton-Reduktion über ein Boran.^[6]

Reduktionen mit komplexen Aluminium-Hydriden

Brinkmeyer et al. gelang 1977 die erste asymmetrische Reduktion nicht-aromatischer Ketone mit Enantiomerenüberschüssen von 62 - 82 %.^[7] Hierbei konnten insgesamt 7 propargylische Ketone in Anwesenheit eines chiralen Aminoalkohols mit LiAlH_4 reduziert werden. In der Folgezeit wurden weitere chirale Zusätze bei der Reduktion propargylischer Ketone mit komplexen Hydriden eingesetzt.^[8] Noyori et al. entwickelten erstmals enantiomerenangereicherte Aluminium-Hydride wie BINAL-H (Abb. 1-3), welche keine weiteren Zusätze zur chiralen Induktion benötigen.^[9]

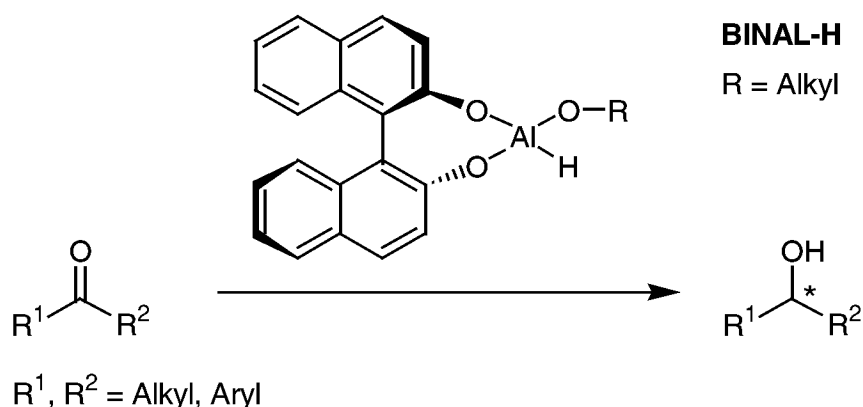


Abb. 1-3: Keton-Reduktion mit BINAL-H.^[9]

Aldehyd-Additionen

Eine weitere Methode zur Synthese propargylierischer Alkohole ist die enantioselective Addition von Acetylenen an Aldehyde. Erstere werden zumeist als Organo-Zink-, vereinzelt auch als Organo-Zinn- oder Titan-Verbindungen eingesetzt (Abb. 1-4).^[10] Die chirale Induktion erfolgt durch die Zugabe katalytischer Mengen enantiomerenreiner Liganden. Während bei der Verwendung sterisch anspruchsvoller Aldehyde häufig die entsprechenden Alkohole hoch enantioselectiv erhalten werden, ist die Einführung einfacher Substituenten wie "Methyl" ($R^1 = CH_3$) oder "Chlormethyl" ($R^1 = CH_2Cl$) aufgrund der Instabilität der entsprechenden Aldehyde unter diesen Reaktionsbedingungen nicht möglich.^[11]

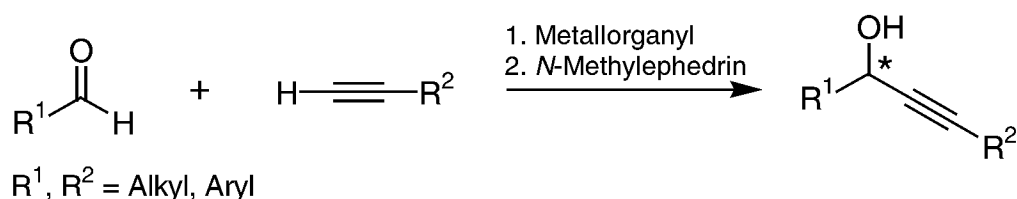


Abb. 1-4: Aldehyd-Addition an Organo-Metall-Verbindungen.^[10e]

Sonstige chemische Synthesen

Ein alternativer enantioselectiver Zugang zu Alkinolen ist die asymmetrische Transferhydrierung der entsprechenden Ketone mittels eines von Noyori et al. entwickelten Ruthenium-Katalysators.^[12] Neben hohen Enantiomerenüberschüssen werden die Produkte in teils quantitativen Ausbeuten erhalten. Außer der TMS-Gruppe als Alkin-Substituent wurden bisher keine weiteren funktionalisierten Substrate für diese che-

mische Reduktion eingesetzt. Die Substrate müssen für die Hydrierung sorgfältigst gereinigt werden, da der Katalysator bereits durch Spuren terminaler Acetylene inhibiert wird.^[12]

ii) Enzymatische Methoden

Enantiomerentrennung mit hydrolytischen Enzymen

Die Anwendung von Lipasen ist der am besten untersuchte enzymatische Zugang zu chiralen propargylischen Alkoholen (Abb. 1-5).^[13] Er kann sowohl mit isolierten Enzymen als auch als Ganzzellbiotransformation durchgeführt werden. Die Vielzahl zur Verfügung stehender Lipasen ermöglicht es hierbei, unterschiedlichst funktionalisierte Alkinole mit hohen Enantiomerenüberschüssen zu erhalten. Die Substratspektren der einzelnen Lipasen unterscheiden sich stark voneinander und sind isoliert betrachtet häufig auf wenige Alkinole beschränkt. Die Umsetzung eines noch nicht getesteten Substrats erfordert somit meist ein neues Enzym-Screening.

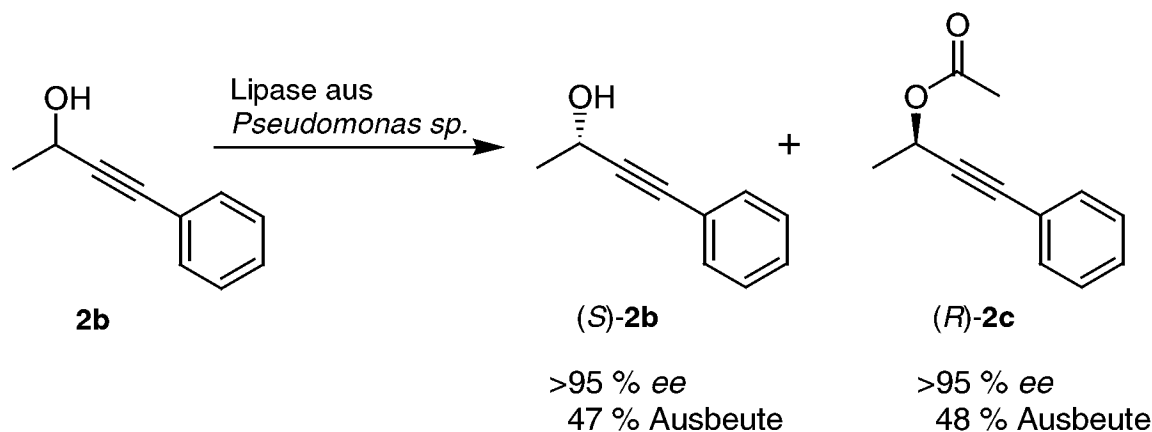


Abb. 1-5: Synthese des propargylischen Alkohols (S)-**2b** mit einer Lipase aus *Pseudomonas* sp.^[13a] – Vinylacetat, Hexan, 25°C.

Da es sich bei der Alkohol-Synthese mit Lipasen um eine Racematspaltung handelt, liegt die maximale Ausbeute bei 50 %. Eine Lösung dieses Problems ergibt sich durch eine Racemisierung des nicht umgesetzten Enantiomers.^[14] Die Durchführbarkeit dieser Racemisierung für propargylische Alkohole wurde bislang noch nicht gezeigt.

Reduktion mit Oxidoreduktasen

Das enzymatische Pendant zur chemischen Reduktion ist für Alkinone bisher nur wenig untersucht worden.^[15] Im Rahmen umfassender Substrat-Screenings mit Oxidoreduktasen wurden vereinzelt propargylische Ketone getestet, wobei die erzielten Ergebnisse in Abhängigkeit der Substrat-Struktur stark variieren. Da die getesteten Alkinone von den verwendeten Enzymen überwiegend als Substrat akzeptiert worden sind, sollte eine umfassendere Untersuchung dieser Umsetzungen einen interessanten neuen Zugang zu propargylischen Alkoholen eröffnen können. Diese Annahme wird durch die Arbeiten von Phillips et al., die bis dato ausführlichsten Veröffentlichungen über die Umsetzung von Alkinonen mit Oxidoreduktasen, bestätigt (Abb. 1-6).^[15g] In diesen Arbeiten wird gezeigt, daß Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TE-ADH) eine Vielzahl von Ketonen und Ketoestern mit einer terminalen Dreifachbindung zu den entsprechenden Alkoholen reduziert.

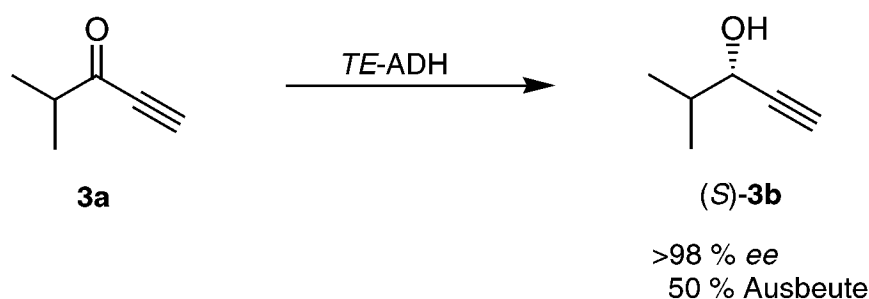


Abb. 1-6: Synthese des propargylischen Alkohols **(S)-3b** über Reduktion mit Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus*.^[15g] – NADP⁺, 2-Propanol, Tris-Puffer (pH = 8), 50°C.

Sonstige enzymatische Methoden

Eine weiterer enzymatischer Zugang zu propargylischen Alkoholen wurde durch den Einsatz von Chloroperoxidasen eröffnet (Abb. 1-7).^[16]

Mikroorganismen erwiesen sich als ungeeignet, da die alkinonischen Substrate eine toxische Wirkung auf die eingesetzten Mikroorganismen haben.^[17]

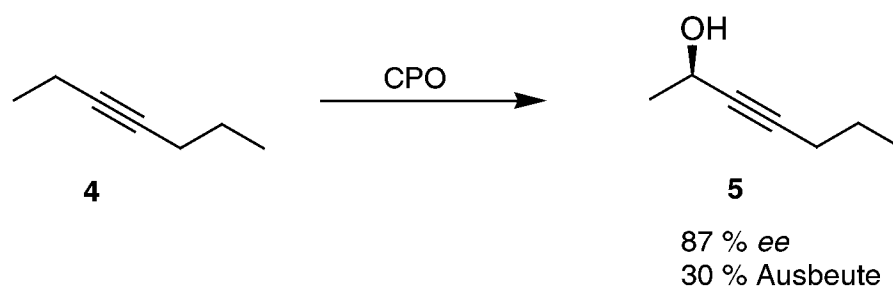


Abb. 1-7: Synthese des propargylischen Alkohols **5** mit Chloroperoxidase (CPO).^[16] – *t*-BuOOH, Na-Citrat-Puffer (10 mM, pH = 5.5), RT.

1.1.2 Anwendung propargylierischer Alkohole

Die vielseitige Chemie, die an Acetylenen durchgeführt werden kann,^[18] macht enantiomerenangereicherte propargylierische Alkohole zu multifunktionellen Trägern chiraler Information. Durch bekannte Modifizierungen der Dreifachbindung (Abb. 1-8) sowie der Hydroxy-Funktion eignen sich Alkinole auch als Bausteine für die Synthese von Verbindungen, die keine α,β -dreifach-ungesättigten Carbinoleinheiten enthalten. In der Vergangenheit fanden propargylierische Alkohole Einsatz als Intermediate in der Synthese von Alkaloiden, Pheromonen, Prostaglandinen, Steroiden, Antibiotika, Vitaminen sowie Sequiterpenen.^[19]

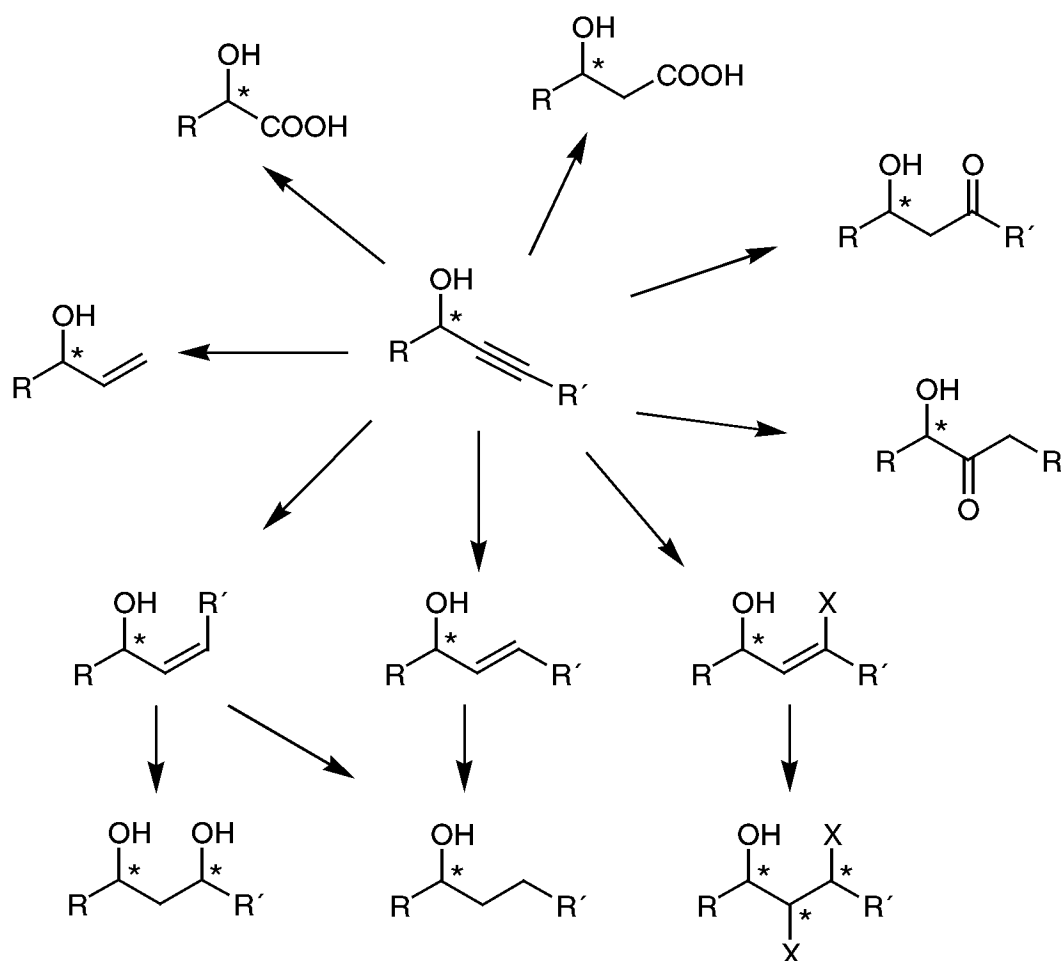


Abb. 1-8: Überführung der Dreifachbindung in andere funktionelle Gruppen

Enantiomerenangereicherte α,β -ungesättigte Carbinoleinheiten finden sich auch direkt in einer Vielzahl von Natur- und Wirkstoffen wieder. Bei der Synthese dieser Verbindungen können propargylische Alkohole vorteilhafterweise effizient als Synthese-Bausteine eingesetzt werden:

Leukotriene

Leukotriene sind biologisch hochaktive Substanzen, welche an Entzündungsprozessen im menschlichen Organismus beteiligt sind.^[20] Hierdurch können eine Reihe chronischer Erkrankungen wie Asthma, Rheuma oder Allergien ausgelöst werden. Während die Biosynthese über die Arachidonsäure verläuft, wurden chemische Synthesen dieser Verbindungen auf unterschiedlichen Wegen mittels propargylischer Alkohole realisiert.^[20] So ist beispielsweise der abschließende Schritt der von Naso et al. entwickelten Synthese des Leukotrien B₃ Methylesters (**8**) eine Kreuz-Kupplung^[21] des TBS-geschützten propargylischen Alkohols **6** mit dem bromierten Olefin **7** (Abb. 1-9).^[20b]

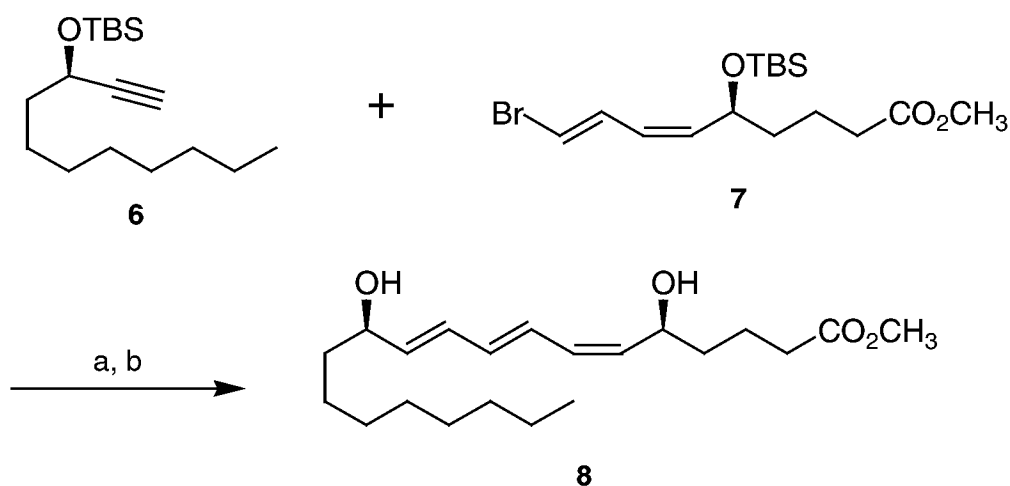


Abb. 1-9: Synthese von Leukotrien B₃ Methylester (**8**).^[20b] – a) Catecholboran, Pd(Ph₃)₄, NaOH, RT (57 %). – b) Al₂O₃ (neutral), Hexan, RT (41 %).

5-Lipoxygenase-Inhibitoren

Der erste Schritt der Biosynthese der oben erwähnten Leukotriene wird durch das Enzym 5-Lipoxygenase katalysiert. Die Wirkstoffgruppe der 5-Lipoxygenase-Inhibitoren kann somit die durch Leukotriene ausgelösten Krankheiten durch Blockierung

der Leukotrien-Biosynthese wirkungsvoll verhindern.^[22] 5-Lipoxygenase-Inhibitoren, die einen aromatisch substituierten *N*-Hydroxy-*N*-(3-buten-2-yl)-harnstoff (**11**) als gemeinsames Strukturelement besitzen, werden chemisch durch eine Kupplung des Harnstoff-Derivates **11** mit einem halogenierten Aromaten **12** erhalten (Abb. 1-10).^[22b] Das Harnstoff-Derivat **11** wird in zwei Reaktionsschritten aus (*S*)-3-Butin-2-ol [(*S*)-**9a**] dargestellt.^[22a]

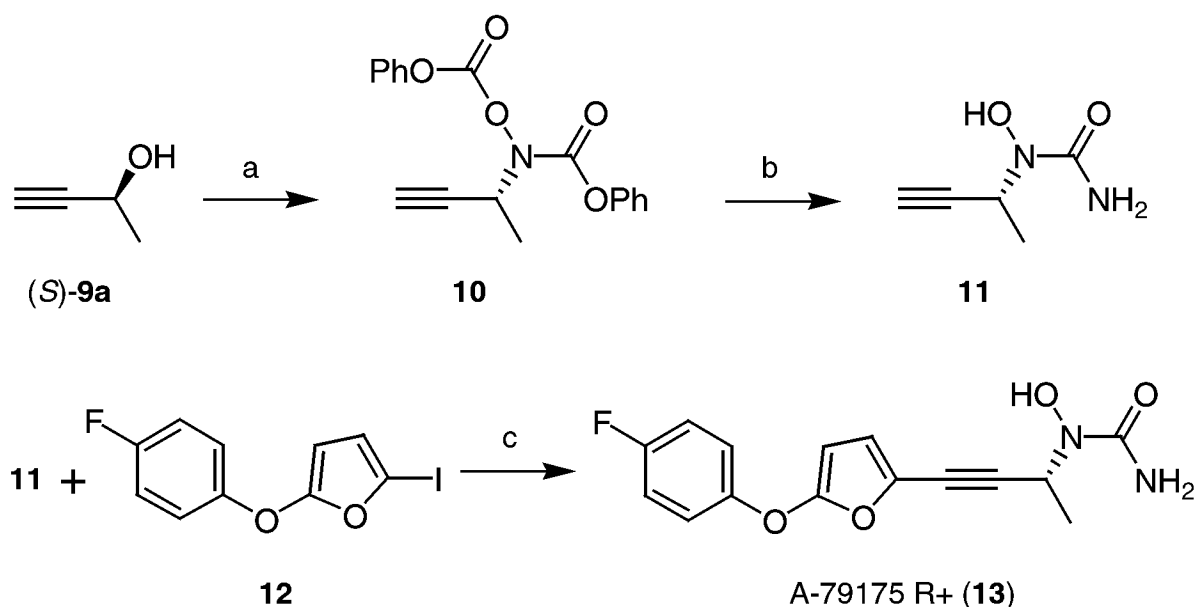


Abb. 1-10: Synthese des 5-Lipoxygenase-Inhibitors A-79175 R+ (**13**).^[22a,b] –
a) $\text{PhO}_2\text{CNHOCO}_2\text{Ph}$, $(\text{Ph})_3\text{P}$, DEAD, THF, RT. – b) NH_4OH , MeOH, RT. –
c) $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$, Ph_3P , CuI, Et_2NH , EE, RT.

Polyacetylene aus marinen Organismen

In den vergangenen zwei Dekaden gelang die Isolierung und Charakterisierung einer Vielzahl acetylenischer Verbindungen aus marinen Schwämmen.^[23] Bei den Verbindungen handelt es sich häufig um unverzweigte ungesättigte C30-Alkane, welche mit Hydroxy- oder Ketogruppen funktionalisiert sind. Daneben konnten auch acetylenische Alkohole anderer Kettenlängen mit teilweise weiteren funktionellen Gruppen isoliert werden. Viele dieser Alkine besitzen interessante bioaktive Eigenschaften. Petrosynol (**14**) inhibiert die reverse Transkriptase und könnte somit eine wichtige Aufgabe bei der Behandlung von HIV-Infektionen übernehmen (Abb. 1-11).^[23c] Duryne (**15**) ist eine der vielen acetylenischen Verbindungen aus marinen Schwämmen, welche eine ausgeprägte Antitumor-Aktivität aufweisen.^[23a]

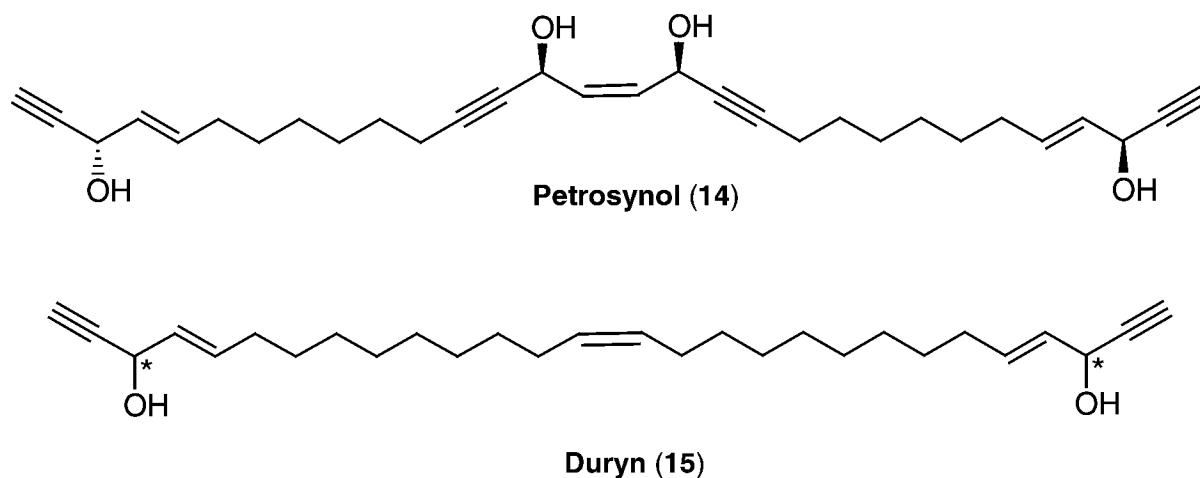


Abb. 1-11: Alkinol-Metabolite aus marinen Schwämmen.^[23a,c]

Polyacetylene in der Ginseng-Wurzel

Die Ginseng-Wurzel ist im asiatischen Raum traditionell als Heilpflanze bekannt. Seit der Entdeckung ihrer Antitumor-Aktivität wurden eine Vielzahl ihrer Inhaltsstoffe isoliert und identifiziert (Abb. 1-12).^[24] Hierunter befinden sich auch eine Reihe polyacetylenischer Alkohole, denen teilweise die Antitumor-Aktivität zugeordnet werden konnte.

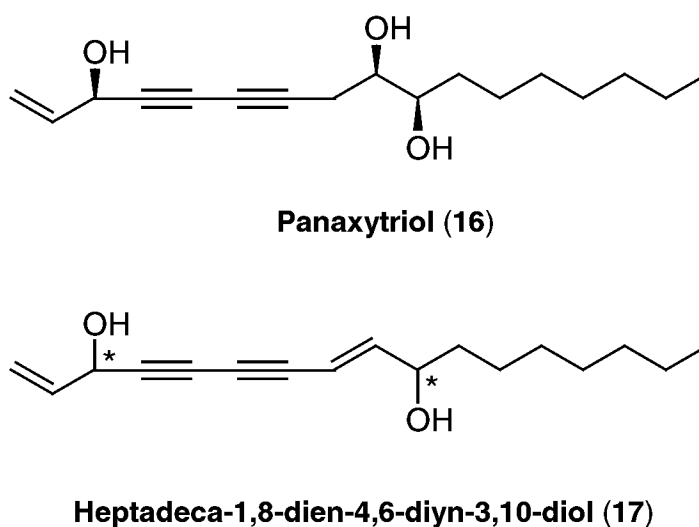


Abb. 1-12: Acetylenische Inhaltsstoffe der Ginseng-Wurzel.^[24]

1.2 Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen

Der weltweite Bedarf enantiomerenreiner Wirkstoffe hat zu einer besonderen Bedeutung der katalytischen asymmetrischen Synthese als Teilgebiet der organischen Chemie geführt.^[1b] Die stetige Suche nach neuen Zugängen zu enantiomerenangereicherten Verbindungen hat neben der Entwicklung einer Vielzahl chemischer Reagenzien auch den Biokatalysatoren steigende Aufmerksamkeit zukommen lassen.^[25] Bei den enzymatischen Alkoholsynthesen standen Hydrolasen und Lyasen lange Zeit im Vordergrund, da sie leicht zu handhaben sind und es darüber hinaus keiner Cofaktorregenerierung bedarf.^[26] In den vergangenen Jahren konnten zahlreiche Arbeiten auf dem Gebiet der Ketonreduktion mit Oxidoreduktasen die gute Eignung auch dieser Enzyme für die enantioselektive Synthese aufzeigen.^[27] Hierbei ist es von Vorteil, daß die theoretische Ausbeute 100 % beträgt, während bei hydrolytischen Enzymen für gewöhnlich lediglich 50 % erzielt werden können. Die hohe Chemo- und Stereospezifität der Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen in Verbindung mit wichtigen Fortschritten bei der Cofaktorregenerierung eröffnen somit neue Zugänge zu nicht racemischen, chiralen Alkoholen.

1.2.1 Die Enzyme

Die Alkoholdehydrogenasen Pferdeleber-ADH (HL-ADH), Hefe-ADH (Y-ADH) und *Thermoanaerobium brockii*-ADH (TB-ADH) sind nicht zuletzt durch ihre kommerzielle Verfügbarkeit bereits seit längerer Zeit eingehend untersucht und beschrieben worden (Tab. 1-1).^[27] Ergänzend haben sich neuere Arbeiten erfolgreich mit der Isolierung und Charakterisierung weiterer Oxidoreduktasen beschäftigt (Tab. 1-1).^[27a] Infolgedessen stehen der organischen Synthese nun Biokatalysatoren zur Verfügung, deren unterschiedliche Spezifitäten einen breiten Zugang zu enantiomerenangereicherten Alkoholen ermöglichen.

Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase

Die HL-ADH (EC 1.1.1.1) ist wahrscheinlich die am besten untersuchte Oxidoreduktase überhaupt.^[25,27,28] HL-ADH besitzt eine dimere Struktur bestehend aus zwei nahezu identischen Untereinheiten, welche jeweils zwei Zink-Ionen enthalten. Es han-

delt sich um ein (*S*)-spezifisches^[II], NAD(H) abhängiges Enzym mit einer pH-Stabilität von pH 5-10 und einer guten Verträglichkeit für organische Lösungsmittel. HL-ADH akzeptiert ein breites Substratspektrum, wobei mono-, bi- und polycyclische Ketone unterschiedlichster sterischer Ansprüche am besten als Substrate umgesetzt werden können.^[27a]

Thermoanaerobium brockii-Alkoholdehydrogenase

Das NADP(H) abhängige Enzym wurde 1981 von Lamed und Zeikus aus dem thermophilen Bakterium *Thermoanaerobium brockii* isoliert.^[29] TB-ADH (EC 1.1.1.2) besitzt eine außerordentlich hohe Temperaturstabilität von bis zu 65°C. Die pH-Stabilität liegt im Bereich pH 7-9. Das Enzym zeigt eine interessante Umkehr der Stereospezifität bei Ketonen einer Größe von C₄ und C₅, welche mit moderater Enantioselektivität zu (*R*)-Alkoholen umgesetzt werden, während 2-Alkanone ab einer Länge von C₆ mit hoher Selektivität zu (*S*)-Alkoholen reduziert werden (Abb. 1-13). Generell werden lineare Ketone am besten als Substrate akzeptiert.^[27a]

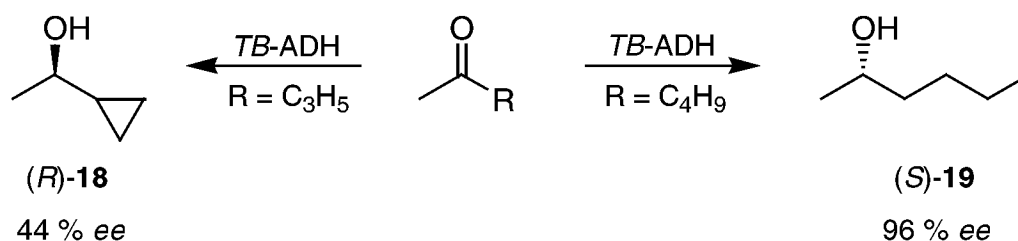


Abb. 1-13: Umkehr der Stereospezifität bei der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii*.^[27a]

Thermanaerobacter ethanolicus-Alkoholdehydrogenase

Die Oxidoreduktase TE-ADH (EC 1.1.1.2) ist zu 99.1 % sequenz-identisch mit der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii*, wodurch die Eigenschaften der beiden Enzyme sich nahezu entsprechen.^[30] Zeikus et al. gelang die Klonierung und Expression von TE-ADH in *E. coli*, so daß das Enzym kostengünstig zugänglich ist.^[30]

[II] Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird in der vorliegenden Arbeit ein *Re*-Seiten Angriff auf das Carbonyl als (*S*)-spezifisch (Prelog-Konfiguration) und ein *Si*-Seiten Angriff auf das Carbonyl als (*R*)-spezifisch bezeichnet (Anti-Prelog).^[25a]

Hefe-Alkoholdehydrogenase

Y-ADH (EC 1.1.1.1) wird aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen und ist die erste Alkoholdehydrogenase, die in kristallisierter Form isoliert werden konnte.^[31] Obwohl sich die primäre Struktur des NAD(H) abhängigen Enzyms von der Aminosäuresequenz der HL-ADH deutlich unterscheidet, besitzen beide ADHs eine ähnliche Tertiärstruktur.^[27a] Y-ADH besitzt eine gute Stabilität im Bereich pH 6.6-9.5 und bei Temperaturen zwischen 10 und 25°C. Das Substratspektrum der (S)-spezifischen Y-ADH ist mit Methyl- sowie ungesättigten Ketonen stark eingeschränkt.

Lactobacillus Alkoholdehydrogenasen

Die aus *Lactobacillus kefir* isolierte Alkoholdehydrogenase LK-ADH (EC 1.1.1.2) ist im Gegensatz zu den bereits aufgeführten ADHs eine (R)-spezifische Oxidoreduktase. Das Enzym, dessen pH Stabilität bei pH 4.5-8.5 liegt, akzeptiert ein breites Spektrum an Substraten. Aliphatische, cyclische und aromatische Ketone können in hoher Aktivität und guten Enantiomerenüberschüssen zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden.^[27a,32]

Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH; EC 1.1.1.2) besitzt ein dem der LK-ADH sehr ähnliches Substratspektrum.^[32] Ein wichtiger Vorteil ist die gute Verfügbarkeit der *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase, da diese durch Expression in *E. coli* in großer Menge in rekombinanter Form erhalten werden kann (recLB-ADH).^[32]

Candida parapsilosis Carbonylreduktase

Die aus der Hefe *Candida parapsilosis* isolierte Carbonylreduktase (CPCR; EC 1.1.1.1) ist ein NAD(H) abhängiges Enzym mit einem Stabilitätsbereich von pH 6-8 und 25°C.^[27a,33] CPCR besitzt ein breites Substratspektrum, das sich von aliphatischen, cyclischen und aromatischen Ketonen über Diketone bis hin zu Oxo-Ketonestern erstreckt. Aufgrund der vielseitigen Reduktionseigenschaften wurde dieses (S)-spezifische Enzym bereits in einer Reihe von Synthesen chiraler Bausteine eingesetzt.^[34]

Tab. 1-1: Biochemische Charakteristika der eingesetzten Oxidoreduktasen.^[27a,32]

Enzym	HL-ADH	TB-ADH	Y-ADH	LK-ADH	LB-ADH	CPCR
Standard-Substrat	Cyclohexanon	2-Butanon	2-Butanon	5-Oxohexansäureethylester	5-Oxohexansäureethylester	5-Oxohexansäureethylester
Spezifität der Reduktion	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>R</i>	<i>S</i>
Spezifische Aktivität für Red. (U/mg)	2.7	8	>300	99	30	1800
Temperatur-optimum (°C) [Reduktion]	37	50	30	30-45	50	36-40
Temperatur-stabilität (°C) [Reduktion]	25	< 65	10-25	< 50	< 65	25
pH-Optimum der Reduktion	7.0	7.5-8.0	7.1	6.5	6.5	7.0-8.5
pH-Stabilität des Enzyms	5.0-10.0	7.0-9.0	6.6-9.5	4.5-8.5	5.0-9.0	6.0-8.0
Benötigter Redox-Cofaktor	NAD(H)	NADP(H)	NAD(H)	NADP(H)	NADP(H)	NAD(H)

1.2.2 Cofaktorregenerierung

Die Wirtschaftlichkeit eines enzymatischen Reduktionsprozesses wird zu großen Teilen durch den Substratpreis sowie die Enzym- und Cofaktorkosten bestimmt. Da die Substratmenge naturgemäß vorgegeben ist, kann eine Senkung dieser Kosten nur über das verwendete Enzym oder den Cofaktor erzielt werden. Die Verringerung der Enzym-Dosis resultiert in einer Verlängerung der Reaktionszeit, welche sich besonders bei instabilen Substraten negativ auf die erzielte Ausbeute auswirken würde. Hierdurch kommt der Verwendung von rekombinanten Enzymen eine wichtige Bedeutung zu, da diese für gewöhnlich kostengünstig in großer Menge zur Verfügung stehen. Eine zusätzliche Reduzierung der Kosten ergibt sich durch das Absenken

des Cofaktor-Anteils. Um eine stöchiometrische Zugabe dieser Verbindung zu vermeiden, muß der Cofaktor während der enzymatischen Synthese möglichst effektiv *in situ* regeneriert werden. Bei den unter Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen handelt es sich um Enzyme, welche 1,4-Dihydronicotinamidadenindinukleotid [NAD(H)] bzw. 1,4-Dihydronicotinamidadenindinukleotidphosphat [NADP(H)] als Redox-Cofaktor benötigen (Abb. 1-15).^[27a]

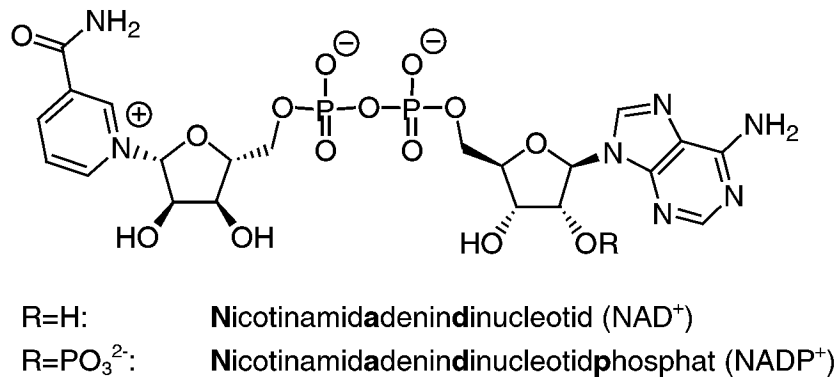


Abb. 1-14: Strukturformeln von NAD⁺ und NADP⁺

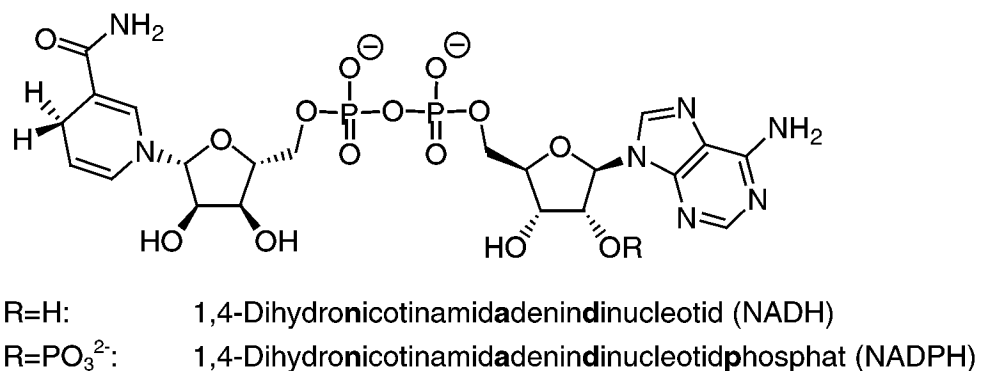


Abb. 1-15: Strukturformeln von NADH und NADPH

Cofaktorregenerierung mittels gekoppelter Substratmethode^[35]

Bei dieser Methode wird die eingesetzte Alkoholdehydrogenase neben der eigentlichen Substratumsetzung gleichzeitig auch zur Regenerierung des Cofaktors verwendet (Abb. 1-16). Zu dem Enzymansatz wird die reduzierte Form eines zweiten Substrats im Überschuß zugegeben, welches ebenfalls vom Enzym akzeptiert wird.

Bei dessen Oxidation wird der Cofaktor wieder in seine reduzierte Form überführt und steht erneut zur Reduktion des eigentlichen Substrats zur Verfügung.

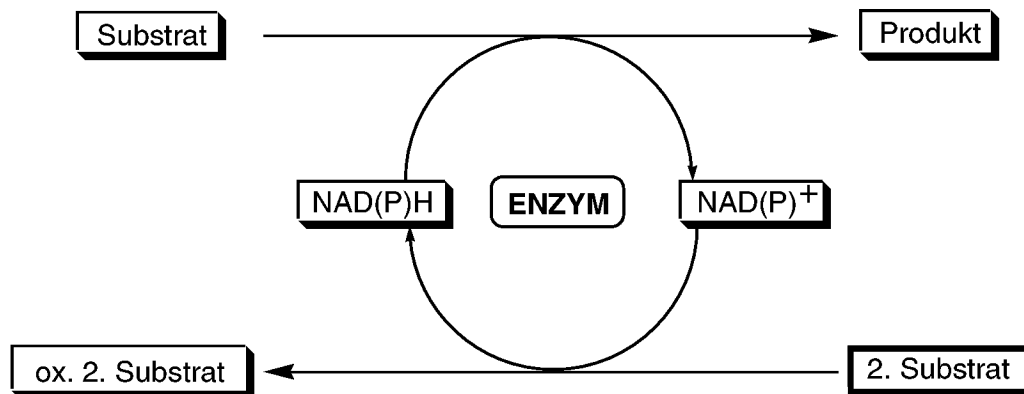


Abb. 1-16: Gekoppelte Substratmethode.^[35]

Der Überschuß des zweiten Substrats muß so gewählt werden, daß dieses nicht inhibierend auf das Enzym wirkt. Ein Nachteil dieser Methode liegt in der Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit bezogen auf das gewünschte Produkt, da das zweite Substrat an dasselbe aktive Zentrum des Enzyms bindet. Weiterhin ist eine Desaktivierung des Enzyms auch durch die oxidierte Form des zweiten Substrats möglich. In der Praxis hat sich die Durchführung der gekoppelten Substratmethode mittels 2-Propanol bewährt, da es von vielen Oxidoreduktasen als Substrat akzeptiert wird. Darüber hinaus kann das Gleichgewicht der enzymatischen Reduktion durch Abtrennung des entstehenden Acetons zu den gewünschten Produkten hin verschoben werden.

Cofaktorregenerierung mittels gekoppelter Enzymmethode^[36]

Bei dieser Methode wird ein zweites Enzym benötigt, welches den Cofaktor durch Oxidation eines zweiten Substrats wieder in die reduzierte Form überführt (Abb. 1-17). Das System muß so gewählt werden, daß die beiden Enzyme möglichst nicht um die unterschiedlichen Substrate konkurrieren, um eine erneute Oxidation des Produkts zu verhindern.

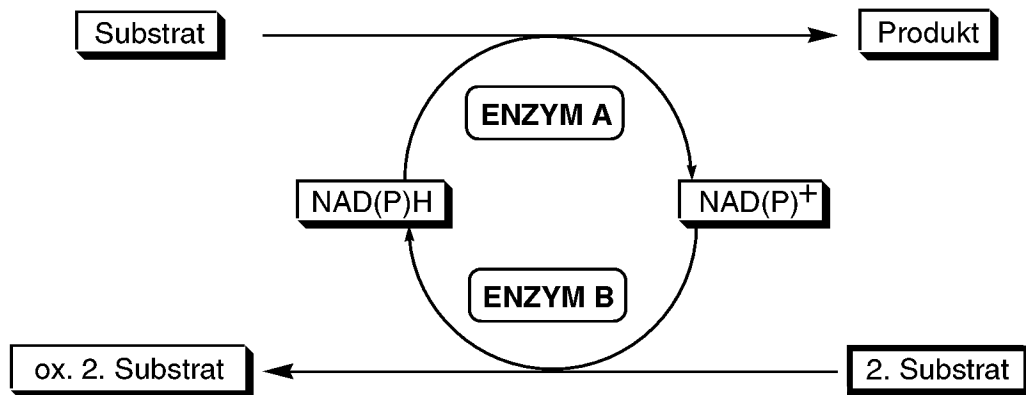


Abb. 1-17: Gekoppelte Enzymmethode.^[36]

Besonders vorteilhaft kann die katalytische Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid mittels einer NAD(P)^+ abhängigen Formiatdehydrogenase (FDH) ausgenutzt werden.^[37] Hierdurch wird NAD(P)H für die eigentliche Substratreduktion zur Verfügung gestellt. Da das Kohlendioxid gasförmig entweicht, ist die Rückreaktion ausgeschlossen. Weiterhin ist die Verwendung von Glucose-6-phosphatdehydrogenase als zweites Enzym möglich, welche die Oxidation von Glucose-6-phosphat (G6P) katalysiert.^[38] Neben den hohen Kosten für G6P liegt ein weiteres Manko dieser Variante in der erschwerten Isolierung des gewünschten Produkts. Eine interessante Alternative ist der Einsatz von molekularem Wasserstoff. Die Übertragung auf den Cofaktor kann mittels Hydrogenasen durchgeführt werden. Die Nachteile der gekoppelten Enzymmethode liegen in den höheren Kosten bedingt durch das zweite Enzym sowie der komplexeren Kinetik des Gesamtsystems. Weiterhin können die Temperatur- und pH-Stabilitäten der Enzyme differieren, wodurch der Einsatz unter gleichen Bedingungen erschwert wird.

Neben den zwei aufgeführten Vorgehensweisen gibt es noch weitere Möglichkeiten, wie z. B. den Einsatz elektrochemischer Methoden,^[39] um den Cofaktor zu regenerieren.

1.3 Zielsetzung

Enantiomerenreine propargyliche Alkohole sind wichtige Intermediate in der Natur- und Wirkstoffsynthese. Entsprechend dieser Bedeutung wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl unterschiedlichster Alkinol-Synthesen veröffentlicht (s. Abschnitt 1.1.1). Keine dieser Synthesen bietet jedoch einen allgemeinen Zugang zu enantiomerenreinen propargylichen Alkoholen. Die Einsatzmöglichkeiten von Oxidoreduktasen bei der Darstellung dieser Verbindungen sind bisher nur wenig untersucht worden. Bei der Reduktion anderer Ketone haben sich die Substratspektren dieser Enzyme aber bereits als sehr umfassend erwiesen,^[27a] so daß Oxidoreduktasen den gesuchten allgemeinen Zugang zu chiralen Alkinolen bieten könnten.

Ziel der Arbeit ist es, die Eignung von Alkoholdehydrogenasen und Carbonylreduktasen bezüglich der Reduktion propargylicher Ketone zu untersuchen. Die Enzyme sollen durch ein umfangreiches Substrat-Screening soweit charakterisiert werden, daß ihre Reduktionseigenschaften auch für neue Alkinone weitestgehend vorhergesagt werden können. Weiterhin ist es für den Einsatz der Alkinole als Bausteine in der organischen Synthese vorteilhaft, jeweils beide Enantiomere der Alkohole mit höchsten Enantiomerenüberschüssen zugänglich zu machen (Abb. 1-18).



Abb. 1-18: Enzymatischer Zugang zu propargylichen Alkoholen

Die Ergebnisse sollen anschließend in den präparativen Maßstab umgesetzt werden, wobei sowohl literaturbekannte als auch neue Alkinole enantioselektiv dargestellt werden sollen. Hierbei gilt es zu untersuchen, welche Reaktionsführung sich zur Erzielung hoher Umsatzraten und guter Ausbeuten am besten erweist. Nach erfolgreicher Optimierung der enzymatischen Umsetzungen soll die vielseitige Verwendbarkeit der propargylichen Alkohole durch Synthesen zur Folgechemie gezeigt werden.

2 Spezieller Teil

2.1 Die Substrate

Grundlage für die Charakterisierung der zu untersuchenden Oxidoreduktasen ist ein umfangreiches Substrat-Screening. Da nur wenige interessante alkinonische Substrate kommerziell erhältlich sind und diese neben der Alkinfunktion meist keine weiteren funktionellen Gruppen enthalten (Abb. 2-1), wurden zu Beginn der Arbeiten literaturbekannte Synthesestrategien getestet und verglichen, um einen effizienten Zugang zu den benötigten und überwiegend noch nicht beschriebenen Ketonen zu ermöglichen. Diese Synthesen sollen möglichst allgemein anwendbar sein, um ein breites Spektrum unterschiedlich substituierter Substrate auf wenigen Syntheserouten zugänglich zu machen.

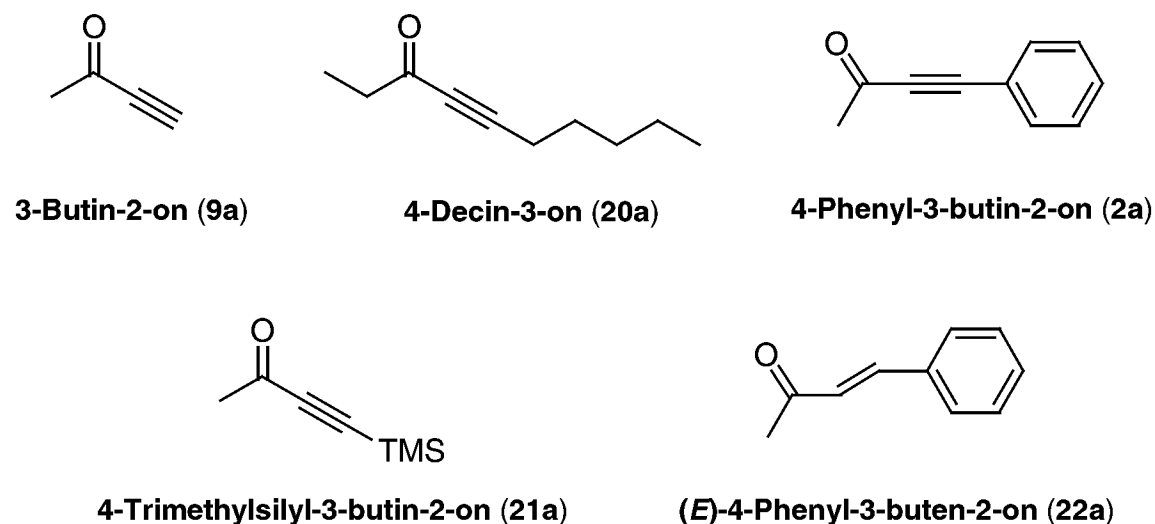


Abb. 2-1: Kommerziell erhältliche α,β -ungesättigte Substrate

2.1.1 Synthese der propargylischen Ketone

Synthese über Säurechloride

Propargylische Ketone werden vorteilhafterweise in Zweikomponenten-Reaktionen dargestellt, bei denen einer der Reaktanden die Ketofunktion und der andere die Dreifachbindung in das Substrat einbringt. Zum Einführen der Ketofunktion haben

sich insbesondere Carbonsäurechloride bewährt, da diese durch ihre Stabilität leicht zu handhaben sind. Weiterhin stehen diese meist kostengünstigen Verbindungen in großer Vielfalt kommerziell zur Verfügung, so daß Ketone mit unterschiedlichsten Resten in α -Position auf diesem Weg zugänglich sind. In den beschriebenen Synthesen wird das Säurechlorid meist mit hochreaktiven Metall-organischen Verbindungen gekuppelt.^[40] Hierfür haben sich Kupfer- oder Palladiumacetylide als geeignete Reagenzien erwiesen, welche teilweise *in situ* generiert werden können.^[41] Die Instabilität der Metall-Actetylide verhindert häufig eine längere Lagerung dieser Reagenzien, so daß diese für jede Synthese neu dargestellt werden müssen. Weiterhin sind die Substanzen sehr hydrolyseempfindlich, wodurch bereits geringe Mengen Feuchtigkeit im Reaktionsansatz zu schlechten Produktausbeuten führen.

Eine präparativ wertvolle Alternative zu den Kupfer- und Palladium-Verbindungen ergibt sich durch den Einsatz von Silicium-Acetyliden. Diese sind wesentlich stabiler und können somit drastischeren Reaktionsbedingungen ausgesetzt werden. Weiterhin sind Silicium-Acetylide mit unterschiedlichsten Resten kommerziell erhältlich und können in der Regel problemlos gelagert werden. Die Anwendung bedingt eine Aktivierung der Säurechloride. Diese gelingt durch die Zugabe von 1.1 - 3 Äquivalenten der Lewis-Säure AlCl_3 (Abb. 2-2).^[42] Die propargylischen Ketone wurden auf diesem Weg überwiegend in Ausbeuten zwischen 50 und 90 % erhalten (Tab. 2-1).

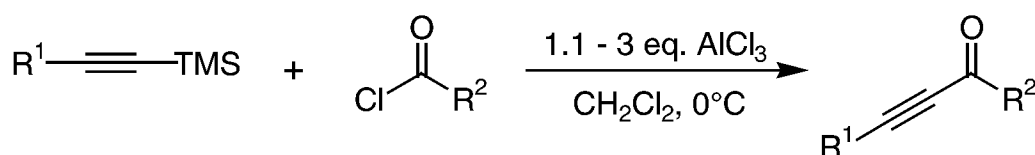
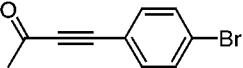
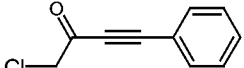
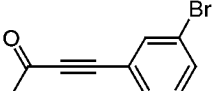
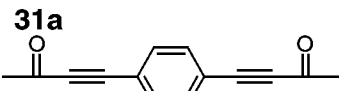
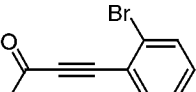
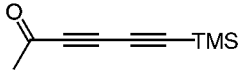
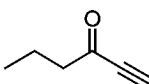
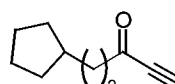
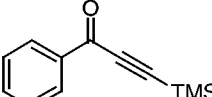
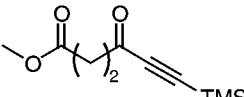
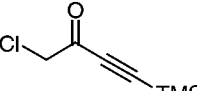
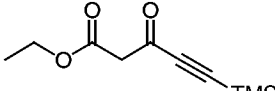
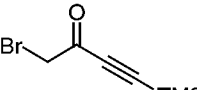
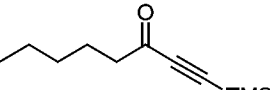


Abb. 2-2: Synthese propargylischer Ketone über Carbonsäurechloride.^[42]

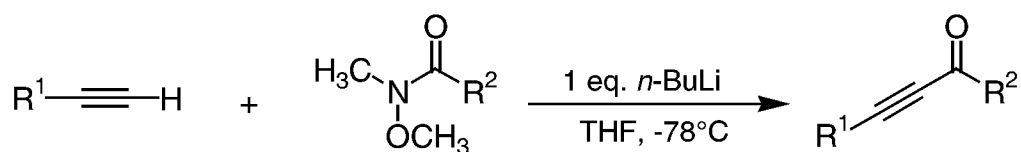
Als Carbonsäurechloride wurden in den durchgeführten Arbeiten eine Reihe unterschiedlicher aliphatischer und aromatischer Derivate eingesetzt (Tab. 2-1). Als Rest R^1 konnte neben einer Vielzahl aromatischer Substituenten auch eine zweite Trimethylsilylgruppe eingesetzt werden ($\text{R}^1 = \text{TMS}$). Da die TMS-Gruppen des Edukts Bis(trimethylsilyl)acetylen eine höhere Reaktivität als die des gebildeten propargylischen Ketons besitzen, wurde hierbei die Addition eines zweiten Säurechlorides weitestgehend unterdrückt. Interessanterweise konnte die beschriebene Synthese auch mit Trimethylsilylacetylen ($\text{R}^1 = \text{H}$) zur Darstellung der Ketone **26a** und **33a** mit einer terminalen Dreifachbindung angewendet werden (Tab. 2-1). Hierbei wurden jedoch lediglich Reaktionsausbeuten von 41 bzw. 26 % erzielt.^[43]

Tab. 2-1: Synthese propargylier Ketone über Säurechloride

Produkt	Ausbeute	Produkt	Ausbeute
23a 	86 %	30a 	51 %
24a 	89 %	31a 	71 %
25a 	64 %	32a 	75 %
26a 	41 %	33a 	26 %
27a 	70 %	34a 	77 %
28a 	76 %	35a 	< 1 %
29a 	76 %	36a 	84 %

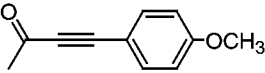
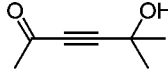
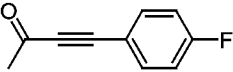
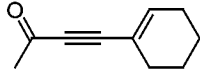
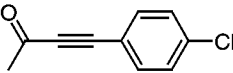
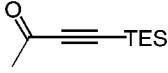
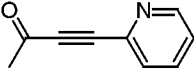
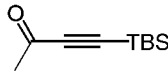
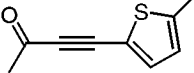
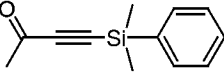
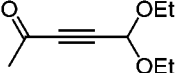
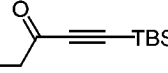
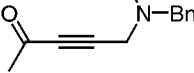
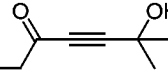
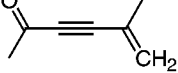
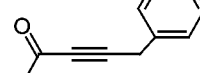
Synthese über Weinreb-Amide

Eine Alternative zur Einführung der Ketofunktion ist durch den Einsatz von *N*-Methoxy-*N*-methyramid gegeben.^[44] Diese sogenannten Weinreb-Amide sind auf verschiedenen Wegen über die entsprechenden Säuren, Säurechloride oder Ester zugänglich.^[45] Zur Synthese propargylier Ketone wird das Weinreb-Amid mit einem Lithium-Acetylid umgesetzt (Abb. 2-3).^[46]

Abb. 2-3: Synthese propargylier Ketone über Weinreb-Amide.^[46]

Ein Vorteil dieser Synthese ist die große Akzeptanz gegenüber funktionellen Gruppen. So gelang auf diesem Weg unter anderem die Einführung von Aromaten, Aminen, Olefinen, Acetalen und Silylen als Rest R^1 (Tab. 2-2).

Tab. 2-2: Synthese propargylierter Ketone über Weinrebamide

Produkt	Ausbeute	Produkt	Ausbeute
37a 	82 %	45a 	55 %
38a 	73 %	46a 	67 %
39a 	69 %	47a 	69 %
40a 	36 %	48a 	65 %
41a 	73 %	49a 	57 %
42a 	73 %	50a 	83 %
43a 	17 %	51a 	26 %
44a 	70 %	52a 	71 %

Die Synthese eines α -cyano-substituierten Alkinons ($R^2 = \text{CH}_2\text{CN}$) wurde ebenfalls unter den beschriebenen Bedingungen versucht. Das entsprechende Weinreb-Reagenz, welches über Cyanoessigsäure zugänglich war,^[47] führte bei der Umsetzung mit dem Acetylid ausschließlich zu Zersetzungsprodukten. In der Literatur wurde bislang nur ein einziges α -cyano-substituiertes Alkinon ($R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{CH}_2\text{CN}$) beschrieben, welches als sehr instabil charakterisiert wurde.^[48] In Kombination mit

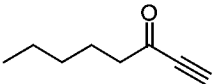
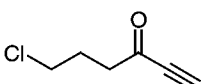
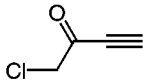
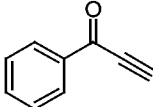
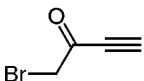
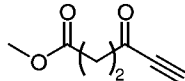
den eigenen Syntheseversuchen liegt die Schlußfolgerung nahe, daß alle α -cyano-substituierten Alkinone unter den verwendeten Bedingungen instabil sind, wodurch sich diese Verbindungen für Oxidoreduktasen als ungeeignete Substrate darstellen würden.

Synthese über Silyl-Abspaltung

Die oben beschriebenen Wege eignen sich in erster Linie für die Synthese von propargylischen Ketonen mit substituierten Dreifachbindungen. Die Darstellung von Ketonen mit terminaler Dreifachbindung erfordert bei diesen Methoden entweder den Einsatz von Trimethylsilylacetylen, welches nur mit moderaten Ausbeuten umgesetzt wurde (Tab. 2-1), oder die Verwendung von Li-Acetylid, welches überhaupt nicht zu den gewünschten Produkten geführt hat. Dieses Problem konnte über die Synthese trimethylsilyl-substituierter Alkinone umgangen werden, welche durch die Kupplung von Bis(trimethylsilylacetylen) mit einem Säurechlorid leicht zugänglich sind (s. Synthese über Säurechloride). Anschließend wurde die Silyl-Gruppe mit wäßriger Borax-Lösung in Methanol quantitativ abgespalten (Abb. 2-4).^[42b]

Die terminalen Acetylene konnten jedoch auch auf diesem Weg in vielen Fällen in nur geringer Ausbeute erhalten werden (Tab. 2-3). Dies ist neben auftretenden Zersetzungsprozessen während der Silyl-Spaltung auch auf die Flüchtigkeit der Produkte zurückzuführen, welche Verluste bei der Aufarbeitung und Isolierung mit sich bringt.

Tab. 2-3: Synthese propargylischer Ketone mit terminaler Dreifachbindung über Silyl-Spaltung

Produkt	Ausbeute	Produkt	Ausbeute
53a 	20 %	56a 	60 %
54a 	< 1 %	57a 	67 %
55a 	< 1 %	58a 	84 %

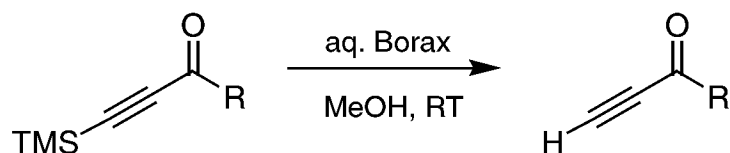


Abb. 2-4: Synthese terminaler propargylicher Ketone über Silyl-Spaltung.^[42b]

Sonstige Synthesen

Für die Synthese von 1-Pentin-3-on (**59a**), welches über die oben beschriebenen Wege nur schwer zugänglich ist, stand der entsprechende Alkohol **59b** in racemischer Form kommerziell zur Verfügung. Dieser wurde mittels Braunstein zu dem gewünschten Substrat oxidiert (Abb. 2-5).^[49] Hierbei wurden auch unter drastischen Bedingungen nur Umsätze von bis zu 80 % erreicht. In der anschließenden Destillation konnte aufgrund der ähnlichen Siedepunkte von Edukt **59b** und Produkt **59a** keine vollständige Trennung erzielt werden. Hierdurch ist ein wesentlicher Nachteil dieser Synthese gegeben, da bereits kleinste Mengen nicht abgetrennter racemischer Alkohol zu einer Verschlechterung des Enantiomerenüberschusses nach erfolgter enzymatischer Reduktion führen. Darüber hinaus führte die Destillation zu einer unbefriedigenden Ausbeute von nur 15 %.

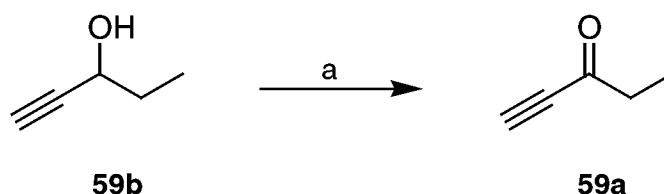


Abb. 2-5: 1-Pentin-3-on (**59a**) Synthese über Oxidation.^[49] – a) MnO_2 , CH_2Cl_2 , RT (15 %).

In anderen Fällen verhinderte die Anwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen die Anwendung der oben beschriebenen Synthesewege. So konnte 1-Methoxy-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**62a**) nicht über das Säurechlorid dargestellt werden, da Methoxy-Essigsäurechlorid (**60**) in der vorgelegten AlCl_3 -Suspension nicht stabil ist. Die Synthese von **62a** gelang schließlich über die mildere Umsetzung mit einem acetylenischen Cuprat in 62 % Ausbeute (Abb. 2-6).^[50]

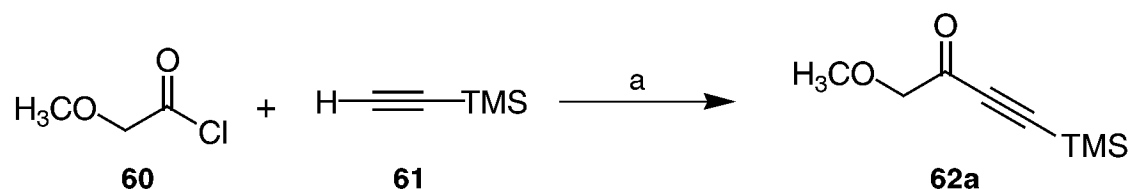


Abb. 2-6: Synthese von 1-Methoxy-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**62a**).^[50] – a) $n\text{-BuLi}$, CuBr , LiBr , THF, 0°C (62 %).

Die Einführung einer Ester-substituierten Dreifachbindung wurde mittels einer Silberorganischen Verbindung realisiert (Abb. 2-7).^[51] In der zweistufigen Synthese wurde der Propargylsäureester **63** mit Silbernitrat in das entsprechende Argentat **64** überführt, welches als silbrig-brauner Feststoff isoliert werden konnte. In der zweiten Stufe wurde dieser dann mit Acetylchlorid zu **65a** umgesetzt. Nach Destillation wurde das reine Produkt in einer Gesamtausbeute von 53 % erhalten.

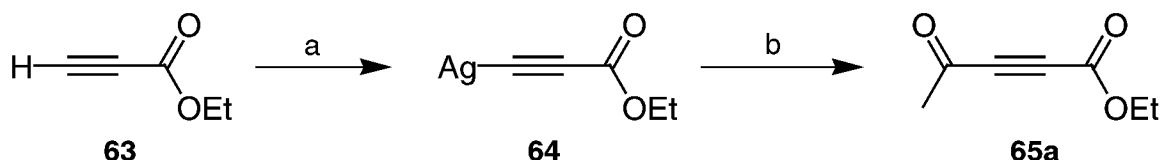


Abb. 2-7: Synthese von 4-Oxo-2-pentinsäureethylester (**65a**).^[51] – a) AgNO_3 , MeOH , RT (80 %).
– b) Acetylchlorid, CH_2Cl_2 , RT (66 %).

Die Synthese der α -substituierten Substrate 1-Cyano-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**69**) (s. Synthese über Weinreb-Amide) und 1,1,1-Trifluor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**70**) gelang nicht nach den oben beschriebenen Syntheserouten. Das vermutlich instabile Cyano-Derivat **69** konnte auch über einen Br/CN-Austausch nicht zugänglich gemacht werden (Abb. 2-8).^[52] Ebenso führten unterschiedliche Ansätze zur Synthese von **70** in keinem der Fälle zu dem gewünschten Produkt (Abb. 2-8).^[53]

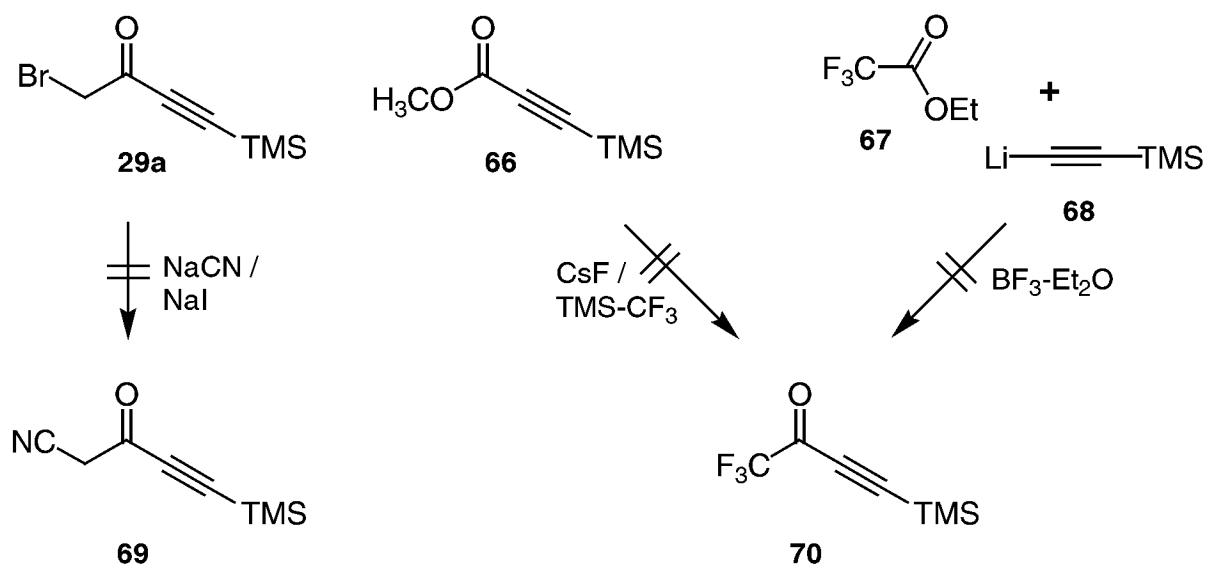


Abb. 2-8: Syntheseversuche der Cyano- und Trifluorderivate **69** und **70**.^[52,53]

2.1.2 Synthese der olefinischen Substrate

Neben dem umfassenden Screening von Ketonen mit einer α - β -Dreifachbindung sollte auch untersucht werden, ob Ketone mit einer α - β -Zweifachbindung prinzipiell für enzymatische Reduktionen geeignet sind. Aufgrund der guten Zugänglichkeit der aromatisch substituierten Verbindungen wurde 4-Phenyl-3-buten-2-on sowie das entsprechende α -chlorierte Derivat für das Substrat-Screening ausgewählt. Beide Ketone wurden jeweils als (*E*)- und als (*Z*)-Isomer eingesetzt. Hierdurch sollte sich ein Rückschluß über die Auswirkungen der unterschiedlichen sterischen Ansprüche der beiden Stereoisomere auf die enzymatische Umsetzung treffen lassen.

Die in 2.1.1 beschriebenen Synthesen sind nicht auf olefinische Ketone übertragbar, da die elektronischen Eigenschaften olefinischer Reagenzien stark von denen propargylier Analogie abweichen. Die Darstellung der Alkenone gelang in kurzen ein- bis zweistufigen Synthesen, welche jedoch in nur geringen Ausbeuten zu den gewünschten Produkten führten. Ausgehend von 4-Phenyl-3-buten-2-on (**2a**) ergab die Reduktion mit Wasserstoff in Anwesenheit eines Lindlar-Katalysators (*Z*)-4-Phenyl-3-buten-2-on (**71a**) in einer Ausbeute von 29 % (Abb. 2-9).^[54] Dieses wurde dann ebenso wie das kommerziell erhältliche (*E*)-Isomer **22a** mit *N*-Chlorsuccinimid in Ausbeuten von jeweils 20 % in die α -Chlor-substituierten Derivate **72a** bzw. **73a** überführt.^[55]

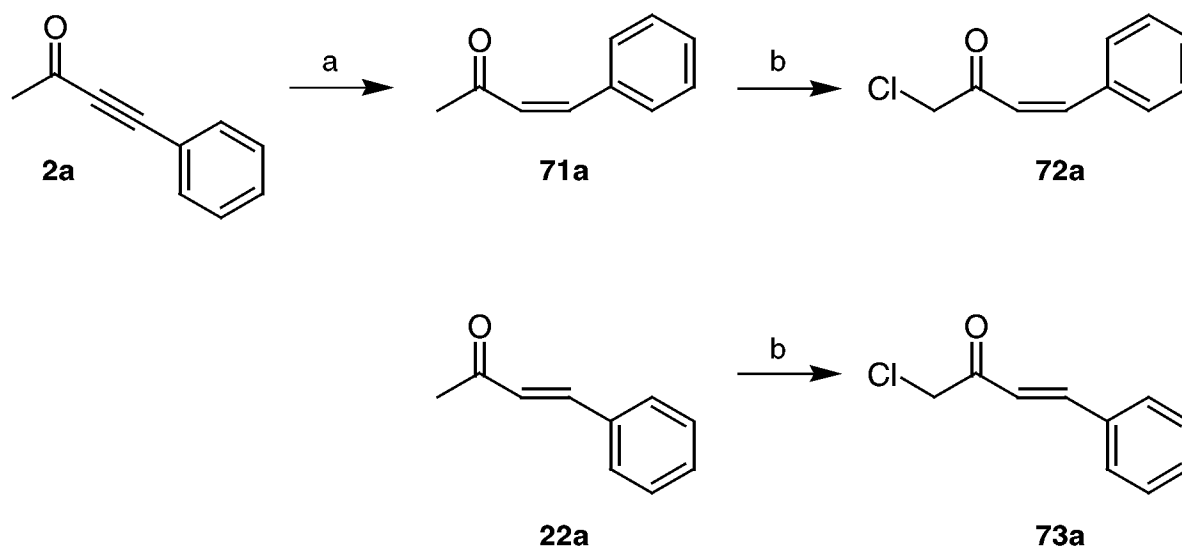


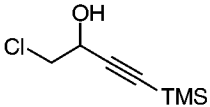
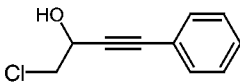
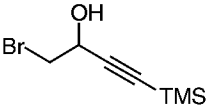
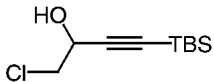
Abb. 2-9: Synthese olefinischer Substrate.^[54,55] – a) H₂, Lindlar-Katalysator, Pentan, RT (29 %).
– b) *n*-BuLi, Diisopropylamin, *N*-Chlorsuccinimid, THF, –70°C (20 %).

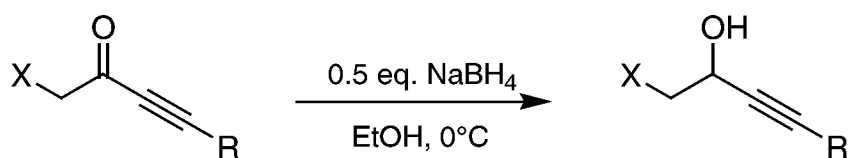
2.1.3 Synthese der racemischen Alkohole

Ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Qualität der enzymatischen Reduktionen ist der Enantiomerenüberschuß der Produkte. Die notwendige Bestimmung erfolgte entweder mittels HPLC bzw. GC an chiralen Phasen oder über die entsprechenden Mosher-Ester (s. Abschnitt 2.4.3). Zur Etablierung einer geeigneten Analytik dienten die racemischen Alkohole als Referenzsubstanzen. Die racemischen Alkohole waren über die Reduktion mit NaBH_4 in Ethanol oder 2-Propanol gut zugänglich.^[56] Im analytischen Maßstab (10 μmol) konnten die Produkte bei quantitativen Umsetzungen nach Extraktion mit Ethylacetat ohne weitere Aufarbeitung zur Enantiomerentrennung über HPLC oder GC eingesetzt werden.

Die Folgechemie der α -halogenierten Alkinole wurde zunächst ebenfalls an den racemischen Alkoholen durchgeführt. Hierfür mußten die hochfunktionalisierten, α -halogenierten propargylischen Ketone möglichst frei von Nebenprodukten reduziert werden. Die racemischen Alkohole wurden über NaBH_4 in guten Ausbeuten erhalten (Tab. 2-4, Abb. 2-10).^[56]

Tab. 2-4: Synthese racemischer propargylischer Alkohole über NaBH_4

Alkohol	Ausbeute	Alkohol	Ausbeute
28b 	42 %	30b 	71 %
29b 	53 %	50b 	94 %



X = Cl, Br

R = TMS; TBS; Ph

Abb. 2-10: Synthese racemischer Alkohole mit NaBH_4 .^[56]

Zusätzlich wurde an dem Keton **29a** auch die Reduktion mit DIBAL-H getestet (Abb. 2-11).^[57] Diese Reaktion führte bei einer vergleichbaren Ausbeute von 55 % ebenfalls zu dem Alkohol **29b**, so daß zwei alternative Reduktionsmethoden zur Verfügung standen.

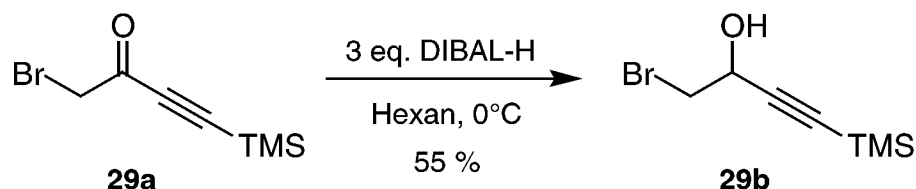


Abb. 2-11: Synthese des racemischer Alkohols **29b** mit DIBAL-H.^[57]

Verbindung **45b**, formal ein Addukt aus Aceton und 3-Butin-2-ol (**9b**), konnte aufgrund starker Nebenproduktbildung als einziger Alkohol nicht über die Reduktion des Ketons **45a** zugänglich gemacht werden. Die racemische Verbindung **45b** wurde somit über die Addition des Acetylens **74** an Acetaldehyd (**75**) dargestellt (Abb. 2-12).^[58]

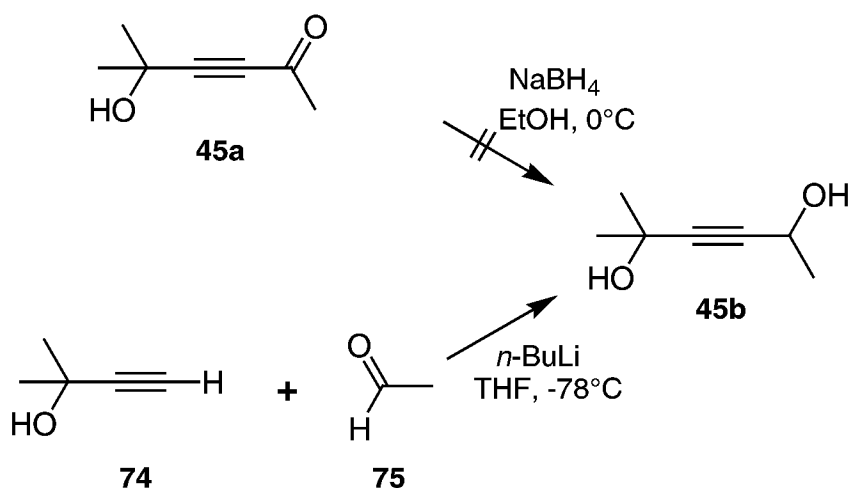


Abb. 2-12: Synthese der racemischen Dihydroxyverbindung **45b**.^[58]

Bei der Reduktion von 4-Oxo-2-pentinsäureethylester (**65a**) bildeten sich ca. 50 % eines Nebenprodukts, welches nicht isoliert werden konnte. Der Vergleich der GCMS-Spektren mit dem Produkt zeigt eine Massendifferenz von +2 sowie eine ähnliche Retentionszeit. Dies deutet daraufhin, daß bei dem Edukt neben der Reduktion der Ketofunktion teilweise auch eine Reduktion der Estergruppe stattgefunden hat (Abb. 2-13).

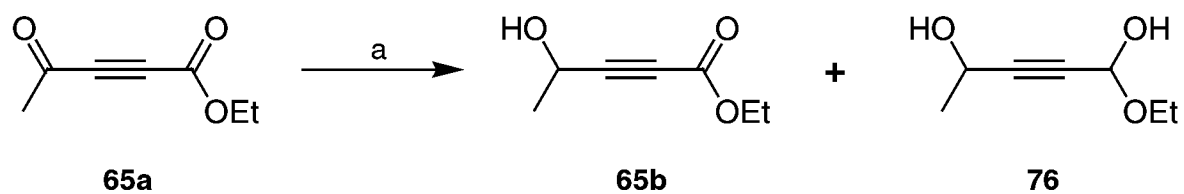


Abb. 2-13: Chemische Reduktion von 4-Oxo-2-pentinsäureethylester (**65a**). – a) NaBH_4 , EtOH, 0°C .

2.2 Enzym-Screening

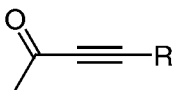
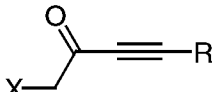
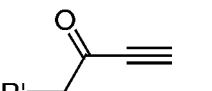
Zu Beginn der Arbeiten mußten geeignete Oxidoreduktasen für die enzymatische Reduktion propargylicher Ketone identifiziert werden. Die in Abschnitt 1.2.1 aufgeführten Enzyme wurden hierfür in einem UV-Assay auf ihre Reduktionseigenschaften bezüglich dieser Substrate getestet. Bei den Aktivitätstests wurde die Abnahme der NAD(P)H-Konzentration als Funktion der Zeit photometrisch aufgezeichnet. Als Parameter diente die Änderung der Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 340 nm, dem Absorptionsmaximum von NAD(P)H. Da mit jedem Molekül Cofaktor, welches oxidiert wird, gleichzeitig ein Molekül Substrat reduziert wird und die Extinktion nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz mit der Konzentration korreliert ist,^[59] ist so ein indirekter Nachweis der enzymatischen Aktivität möglich. Die Ergebnisse werden relativ zu einem Standard angegeben. Als Standardaktivität, die willkürlich als 100 % definiert wird, dient die enzymatische Aktivität eines bereits literaturbekannten und gut akzeptierten Substrats.

Da es sich um einen indirekten Nachweis handelt, ist es vorab wichtig, mögliche Fehlerquellen auszuschließen. Das häufigste Problem ist eine nicht enzymatisch bedingte Zersetzung der Substrate unter den Assay-Bedingungen. Wenn Edukte und Produkte hierbei andere Absorptionskurven aufweisen, kommt es zu einer Änderung der Extinktion der Lösung, welche fälschlicherweise als Aktivität gedeutet werden könnte. Zur Überprüfung der Stabilität der propargylichen Ketone wurden diese in einer Konzentration von 10 mmol/L über einen Zeitraum von 16 h in verschiedenen wäßrigen Systemen gerührt (Tab. 2-5). Anschließend wurden die Substrate mit Ethylacetat extrahiert und der Zersetzungsgrad mittels GCMS überprüft.

Als Ergebnisse zeigten sich eine Reihe von Stabilitätstendenzen (Tab. 2-5). Die propargylichen Methyl-Ketone waren stabiler als die entsprechenden α -halogenierten Substrate, bei denen bereits eine leichte Zersetzung stattgefunden hatte. Die Ketone mit einer terminalen Dreifachbindung erwiesen sich als sehr instabil: Nach 16 h konnten in Puffer nur noch Zersetzungsprodukte detektiert werden. Weiterhin waren alle Substrate bei Raumtemperatur stabiler als bei 38°C, und Wasser erwies sich als unkritischer als TEA-Puffer. Die ebenso getesteten propargylichen Alkohole waren unter allen Bedingungen nahezu gleichbleibend stabil. Wichtigste Aussage aus Sicht der durchzuführenden Aktivitätsmessungen war, daß sich in vorab genommenen Proben keines der Substrate innerhalb des für den UV-Assay relevanten Zeitraums von 60 Sekunden nennenswert zersetzt hat. Weiterhin zeigten UV-Messungen von

Substraten in Puffer, daß deren Zersetzung nur einen geringen Einfluß auf die in dem Assay vermessene Extinktion bei 340 nm hat.

Tab. 2-5: Stabilität propargylier Substrate in wäßrigen Systemen

Substrat	TEA-Puffer pH 6.5 / RT	TEA-Puffer pH 7.0 / RT	TEA-Puffer pH 7 / 38°C	Wasser pH 7 / RT
	++	++	+	++
	-	+	-	+
	--	--	--	+
Propargylierische Alkohole	++	++	++	++

c = 10 mmol/L; t = 16 h

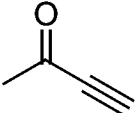
++ = 0 % Zersetzung
 + = 1 –20 % Zersetzung
 – = 21 –50 % Zersetzung
 -- = 100 % Zersetzung

X = Cl, Br
 R = TMS, TBS, Ph
 R' = H, Me, Et, Bu

Als Testsubstrat für das Enzymscreening nach geeigneten Oxidoreduktasen wurde 3-Butin-2-on (**9a**) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um das einfachste denkbare propargylierische Keton. Neben der Methylgruppe und der terminalen Dreifachbindung sind keine weiteren funktionellen Gruppen oder Substituenten vorhanden, welche die enzymatische Aktivität beeinflussen könnten. Hieraus ergibt sich eine gute Aussicht für die Annahme, daß ein Enzym, welches 3-Butin-2-on (**9a**) als Substrat akzeptiert, auch höher substituierte Alkinone umsetzen kann. Voraussetzung für diese Annahme ist, daß die Substituenten dieser Alkinone keinen negativen Einfluß auf die enzymatische Aktivität besitzen. Eine wichtige Zielsetzung der Arbeit ist es, in allen Fällen beide Enantiomere der propargylierischen Alkohole zugänglich zu machen. Somit sollten in dem Enzym-Screening (*S*)- und (*R*)-spezifische Oxidoreduktasen berücksichtigt werden. Die Enzyme *CPCR* und *recLB-ADH* stellten sich für die Reduktion von

3-Butin-2-on (**9a**) als geeignet heraus, da sie das Substrat mit sehr guter Aktivität reduzierten (Tab. 2-6). Von den anderen Alkoholdehydrogenasen zeigte lediglich *TB*-ADH im UV-Assay eine auch für präparative Zwecke ausreichende Aktivität. Diese war jedoch deutlich geringer als die der ebenfalls (*S*)-spezifischen *CPCR*. Weiterhin handelt es sich bei *TB*-ADH um ein Enzym aus einem thermophilen Organismus. Die optimale Reaktionstemperatur liegt hierdurch oberhalb 40°C, was bei den Alkinon-Reduktionen zu einer stärkeren Zersetzung der Substrate führen würde (s. Tab. 2-5). Die weiteren Arbeiten zur enzymatischen Reduktion propargylierter Ketone wurden aufgrund dieser Ergebnisse zunächst auf die Enzyme *CPCR* und *recLB*-ADH beschränkt.

Tab. 2-6: Identifizierung geeigneter Enzyme für die Reduktion von Alkinonen

	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH	<i>TB</i> -ADH	<i>HL</i> -ADH	<i>Y</i> -ADH
Standard (= 100%)	5-Oxohexan- säureethyl- ester	5-Oxohexan- säureethyl- ester	2-Butanon	Cyclo- hexanon	2-Butanon
 3-Butin-2-on (9a)	52 <i>ee</i> = 49 %	66 <i>ee</i> = 60 %	11 <i>ee</i> = 86 % ^[15a]	0	0

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat, 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT (*TB*-ADH: 38°C). Die Enzymaktivitäten wurden über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm relativ zu den jeweiligen Standards bestimmt.

Die spezifische Enzymaktivität U_S lässt sich anhand der Aktivitätstests über die Änderung der Extinktion pro Minute berechnen. U_S wird sowohl für den Vergleich der einzelnen Substrate bezogen auf das Enzym als auch für den späteren Einsatz des Enzyms in präparativen Umsetzungen herangezogen.

Enzymaktivität U bezogen auf Substrat S:

$$\frac{U_S}{V_{\text{Enzymlg.}}} = \frac{\Delta E}{\text{min}} \cdot \frac{1}{\epsilon_{\text{NAD(P)H}}} \cdot \frac{1}{d} \cdot f_{\text{Vd}} \cdot f_{\text{Küv}}$$

U_S :	spezifische Enzymaktivität [$\mu\text{mol/min}$]
$V_{\text{Enzymlg.}}$:	Volumen der Enzymlösung [mL]
ΔE :	Änderung der Extinktion
$\epsilon_{\text{NAD(P)H}}$:	molarer Extinktionskoeffizient von NAD(P)H [$6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$]
d :	Schichtdicke der Küvette [cm]
f_{Vd} :	Vorverdünnungsfaktor der Enzymlösung
$f_{\text{Küv}}$:	Verdünnung der Enzymlösung in der Küvette

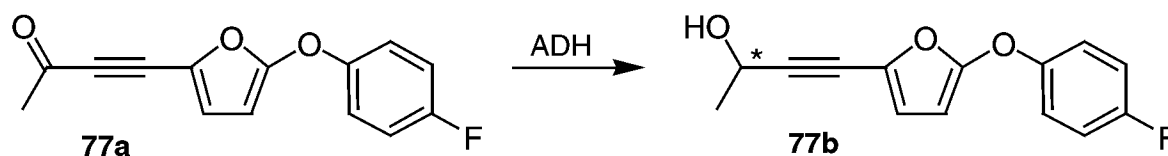
2.3 Substratspektrum und Charakterisierung der Produkte

Um möglichst detaillierte Aussagen über die Reduktionseigenschaften der Enzyme *CPCR* und *recLB*-ADH bezüglich propargylicher Ketone treffen zu können, wurden die Substrate in verschiedene Unterklassen eingeteilt. Hierbei war es das Ziel, systematische Einflüsse von Substituenten erkennen zu können. Durch die umfassende Untersuchung der möglichen Substitutionsmuster unter Einbeziehung unterschiedlicher Funktionalitäten sollten die Enzyme bezüglich propargylicher Ketone vollständig charakterisiert werden. Zukünftig sollte hierdurch allein anhand der Struktur von Alkinonen vorhergesagt werden können, ob und wie gut diese von den Enzymen umgesetzt werden.

2.3.1 Aromatische Alkinone

i) Einleitung

Bei diesem Substrat-Screening wurden propargyliche Ketone mit aromatisch substituierten Dreifachbindungen getestet. Als zweiter Rest des Ketons wurde jeweils eine Methyl-Gruppe gewählt. 4-Aryl-3-buten-2-on-Derivate können mit kommerziell erhältlichen Reagenzien wie CBS-Katalysatoren, Alpine-Boran und DIP-Chlorid mit Enantiomerenüberschüssen von 21 - 87 % reduziert werden.^[3c,5] Die von Noyori et al. entwickelten chiralen Ruthenium(II)-Komplexe erzielen 98 % *ee*.^[12] Ähnliche Ergebnisse sind durch die Anwendung von Lipasen erhalten worden.^[13a,c] Oxidoreduktasen wurden in diesem Zusammenhang bislang nur bei der Synthese von 5-Lipoxygenaseninhibitoren eingesetzt (s. Abschnitt 1.1.2).^[15e,f] Hierbei wurden mit *LK*-ADH, *HL*-ADH und *TB*-ADH hohe Enantiomerenüberschüsse von 96 bis >99 % erreicht, wobei die isolierten Ausbeuten auf moderate 10 bis 60 % beschränkt blieben (Abb. 2-14).



ADH	Ausbeute	ee	Konfig.
LK-ADH	60 %	> 98 %	<i>R</i>
HL-ADH	10 %	96 %	<i>S</i>
TB-ADH	18 %	> 99 %	<i>S</i>

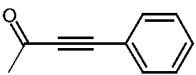
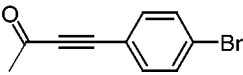
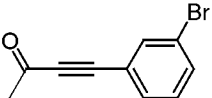
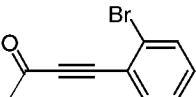
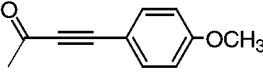
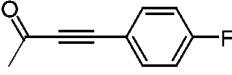
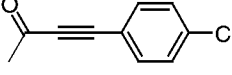
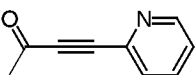
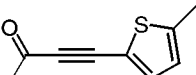
Abb. 2-14: Enzymatische Synthese von Vorstufen für 5-Lipoxygenaseinhibitoren.^[15e,f]

ii) Ergebnisse

Substrat-Screening

4-Phenyl-3-buten-2-on (**2a**) wurde von den Enzymen *CPCR* und *recLB*-ADH mit hoher Aktivität reduziert (Tab. 2-7). Bei der Bestimmung der *ee*-Werte mittels HPLC an chiraler Phase konnte im Vergleich zum basisliniengetrennten Racemat jeweils nur ein Enantiomer detektiert werden, woraus sich ein Enantiomerenüberschuß von größer als 99 % ergibt. Die absoluten Konfigurationen wurden über die Bestimmung der Drehwerte und anschließendem Vergleich mit den Literaturdaten zugeordnet.^[13c] Ein weiteres untersuchtes Kriterium ist der Einfluß elektronenarmer und elektronenreicher Aromaten unterschiedlicher sterischer Ansprüche. Die Substrate **37a–39a** und **23a** wurden von den Enzymen mit gleichbleibend guter Aktivität und wiederum ausgezeichnetem *ee* von größer als 99 % umgesetzt. Darüber hinaus wurde der sterisch anspruchsvolle Brom-Substituent in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position toleriert, so daß die Verbindungen **24a+25a** ebenfalls zu den enantiomerenreinen Alkoholen **24b+25b** umgesetzt werden konnten. Die absolute Konfiguration von (*R*)-**37b** wurde wie oben beschrieben über den Drehwert,^[13c] die von **38b** über die entsprechenden Mosher-Ester bestimmt.^[60] Alle weiteren Konfigurationen wurden unter Bezug auf mechanistische Aspekte der Enzym-Katalyse zugeordnet.^[32,33] Als weitere Substrate wurden die Alkinone **40a+41a** mit heteroaromatischem Substituenten getestet. Auch diese Verbindungen wurden sehr gut als Substrate von den Enzymen *CPCR* und *recLB*-ADH akzeptiert.

Tab. 2-7: Screening aromatischer Alkinone

Substrate	% Aktivität (% Umsatz) ^a		% ee (abs. Konfig.) ^b	
	CPCR	recLB-ADH	CPCR	recLB-ADH
2a 	41 (80)	142 (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)
23a 	51 (20)	107 (85)	> 99 (S)	> 99 (R)
24a 	150 (55)	117 (75)	> 99 (S)	> 99 (R)
25a 	110 (20)	132 (70)	> 99 (S)	> 99 (R)
37a 	89 (30)	10 (70)	> 99 (S)	> 99 (R)
38a 	128 (60)	138 (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)
39a 	71 (> 99)	114 (85)	> 99 (S)	> 99 (R)
40a 	94 (40)	85 (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)
41a 	nb ^c (60)	nb ^c (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)

Assay-Bedingungen: 2 mM Substrat, 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT. – a) Enzymaktivität wurde über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zum Standard 5-Oxohexansäureethylester bestimmt; Umsatzbestimmung erfolgte über GCMS nach 16 h (Regenerierung des Cofaktors über FDH/Formiat [CPCR] bzw. 2-Propanol [recLB-ADH]). – b) Die absoluten Konfigurationen der Alkohole **2b** und (*R*)-**37b** wurden über Vergleich der Drehwerte mit Literaturdaten,^[13c] die von **38b** über die entsprechenden Mosher-Ester bestimmt.^[60] Die absoluten Konfigurationen von **23b-25b** und **39b-41b** wurden über Vergleich mit **2b** und (*R*)-**37b** unter Bezug auf mechanistische Aspekte der Enzymkatalyse bestimmt.^[32,33] – c) Nicht bestimmt aufgrund hoher UV-Absorption des Substrates bei 340 nm.

Batch-Ansätze

Um die präparative Anwendbarkeit der enzymatischen Reduktionen zu überprüfen, wurden je 1 mmol der Substrate **2a** und **37a** mit recLB-ADH sowie 1 mmol **2a** mit CPCR in Batch-Ansätzen umgesetzt. Bei den nicht optimierten Reaktionen wurden die Alkinone in 100 mL TEA-Puffer vorgelegt (Optimierung s. Abschnitt 2.6). Anschließend erfolgte die Zugabe des Cofaktors sowie 50 U recLB-ADH bzw. 6 U CPCR. In den recLB-ADH-Ansätzen wurde der Cofaktor NADPH mittels der gekoppelten Substratmethode (Abschnitt 1.2.2) mit 2-Propanol als Cosubstrat regeneriert. Die Cofaktorregenerierung bei den CPCR-Ansätzen wurde nach der gekoppelten Enzymmethode (Abschnitt 1.2.2) mit Formiatdehydrogenase (FDH) und Natriumformiat durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h wurden die Reaktionsansätze extrahiert und die Produkte säulenchromatographisch aufgereinigt. Die enantiomerenreinen propargylischen Alkohole **2b** und **37b** wurden in Ausbeuten von 66 % [(S)-**2b**], 86 % [(R)-**2b**] und 64 % [(R)-**37b**] erhalten.

Zusammenfassend können die verwendeten Oxidoreduktasen als hoch effektive Katalysatoren für die Reduktion einer großen Vielfalt aromatischer Alkinone bezeichnet werden. Hervorzuheben ist hierbei, daß jeweils beide Enantiomere aller aromatischen Alkohole enantiomerenrein erhalten werden.

2.3.2 Aliphatische Alkinone

i) Einleitung

Wie bereits bei den aromatischen Ketonen wurden auch die Untersuchungen der aliphatischen Alkinone zunächst mit Methyl-Ketonen durchgeführt (s. auch Abschnitt 2.3.4). Von der Vielzahl der denkbaren propargylischen Ketone mit aliphatischem Substituenten an der Dreifachbindung sind bisher nur wenige Beispiele enantioselektiv reduziert worden. Midland et al. erhielten bei der Umsetzung eines *t*-Butyl-substituierten Alkinons sowie des Ketons **65a** (Tab. 2-8) mit Alpine-Boran die entsprechenden Alkohole in 60 % Ausbeute und einem ee um 75 %.^[4a] Das enantiomerenreine Produkt (S)-**65b** wurde 1997 von Trost in einer vierstufigen Synthese aus (S)-Milchsäureester (**78**) dargestellt und in der Synthese des Antitumor-Wirkstoffs (+)-Parviflorin eingesetzt (Abb. 2-15).^[61] Weiterhin konnte Verbindung **42b** (Tab. 2-8) als Zwischenstufe im Rahmen der Synthese eines bioaktiven Hydroxyalkenals durch die BINAL-H Reduktion von **42a** in 74 % Ausbeute und 85 % ee erhalten werden.^[62]

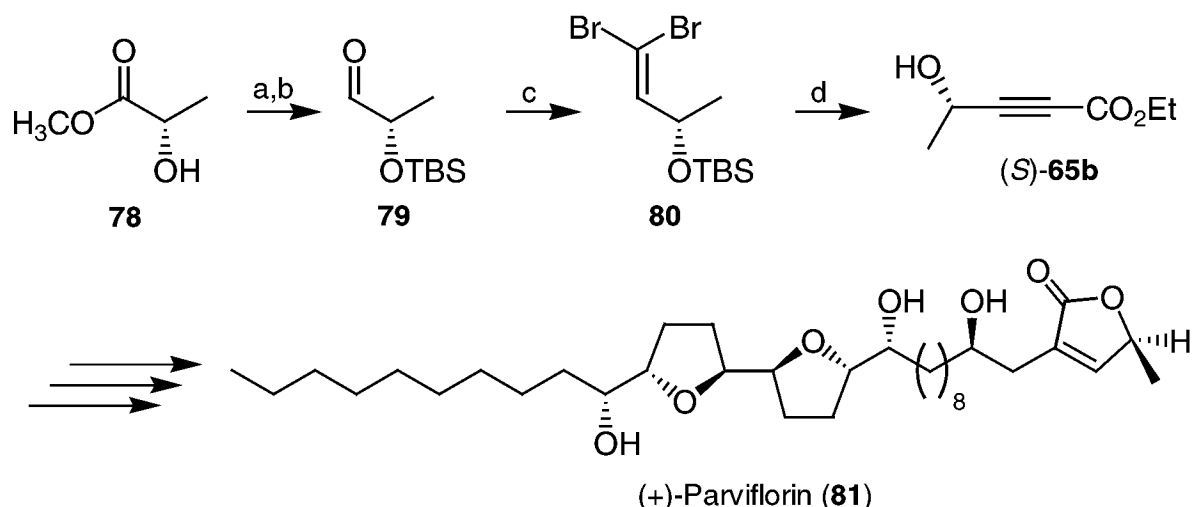


Abb. 2-15: Synthese des Antitumor-Wirkstoffs (+)-Parviflorin (**81**).^[61] – a) TBSCl, Et₃N, DMAP, THF, RT. – b) DIBAL-H, Hexan, –78°C (72 %). – c) Ph₃P, CBr₄, CH₂Cl₂, –78°C (75 %). – d) *n*-BuLi, ClCO₂C₂H₅, THF, –78°C (80 %).

Biokatalytisch konnte (*R*)-3-Pentin-2-ol [(*R*)-**82b**] über Stereoinversion von racemischem **82b** durch den Mikroorganismus *Nocardia fusca* AKU 2123 zugänglich gemacht werden. Shimizu et al. erhielten (*R*)-**82b** auf diesem Weg in 70 % Ausbeute und einem ee von 98.7 %.^[63]

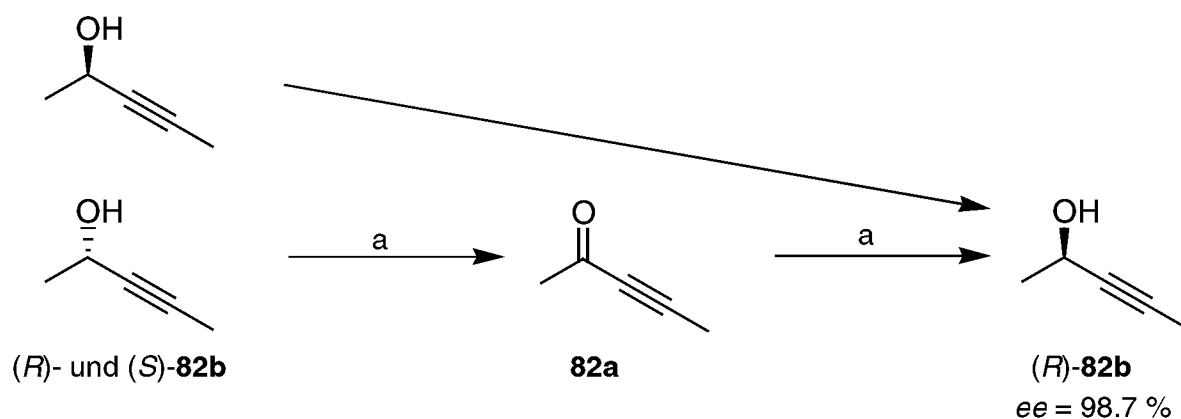


Abb. 2-16: Synthese von (*R*)-3-Pentin-2-ol [(*R*)-**82b**].^[63] – a) *Nocardia fusca* AKU 2123, 0.35 M Phosphat-Puffer, 30°C (70 %).

ii) Ergebnisse

Substrat-Screening

Die Aktivitätsmessungen zeigen, daß die aliphatischen Alkinone ebenso gut wie die aromatischen Verbindungen als Substrat akzeptiert werden (Tab. 2-8). *CPCR* und *recLB*-ADH katalysieren die Reduktion sowohl gesättigter, olefinischer als auch Sau-

erstoff oder Stickstoff heterosubstituierter aliphatischer propargylicher Ketone. Die Alkohole wurden in allen mittels HPLC bzw. GC an chiraler Phase untersuchten Fällen enantiomerenrein erhalten. Die absoluten Konfigurationen von **42b** wurden über die entsprechenden Mosher-Ester bestimmt.^[60] Die absoluten Konfigurationen der anderen Alkohole wurden unter Bezug auf mechanistische Aspekte der Enzymkatalyse zugeordnet.^[32,33]

Tab. 2-8: Screening aliphatischer Alkinone

Substrate	% Aktivität (% Umsatz) ^a		% ee (abs. Konfig.) ^b	
	CPCR	recLB-ADH	CPCR	recLB-ADH
42a	135 (> 99)	37 (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)
43a	76 (nb) ^c	79 (nb) ^c	nb ^c	nb ^c
44a	38 (> 99)	104 (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)
45a	44 (> 99)	87 (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)
46a	54 (25)	91 (95)	> 99 (S)	> 99 (R)
65a	49 (> 99)	86 (> 99)	> 99 (S)	> 99 (R)
83a	62 (nb) ^c	126 (nb) ^c	nb ^c	nb ^c

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat, 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT. – a) Enzymaktivität wurde über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zum Standard 5-Oxohexansäureethylester bestimmt; Umsatzbestimmung erfolgte über GCMS nach 16 h (Regenerierung des Cofaktors über FDH/Formiat [CPCR] bzw. 2-Propanol [recLB-ADH]). – b) Die absoluten Konfigurationen von **42b** wurden über die entsprechenden Mosher-Ester bestimmt.^[60] Die absoluten Konfigurationen der anderen Alkohole wurden unter Bezug auf mechanistische Aspekte der Enzymkatalyse zugeordnet.^[32,33] – c) Nicht bestimmt.

Enantiomerenreines 3-Butin-2-ol (**9b**)

i) Einleitung

3-Butin-2-ol (**9b**) ist ein wichtiges Intermediat in der Natur- und Wirkstoffsynthese (s. Abschnitt 1.1.2).^[22] Aufgrund der ähnlichen sterischen Ansprüche der Substituenten "Methyl" und "Ethynyl" ist eine Differenzierung zwischen den beiden Resten des entsprechenden Ketons **9a** sehr schwierig.^[64] Die enantioselective Reduktion von **9a** führt dementsprechend nur zu unbefriedigenden Enantiomerenüberschüssen. Der chemisch mittels Alpine-Boran erzielbare *ee* von 77 % kann auch auf enzymatischem Weg nicht wesentlich übertroffen werden.^[5] Der durch *TB*-ADH erzeugte *ee* von 86 % stellt gleichzeitig den bisher höchsten durch Reduktion von **9a** erzielten Enantiomerenüberschuß bei 3-Butin-2-ol (**9b**) dar.^[15a] Infolgedessen sind in den vergangenen Jahren eine Reihe mehrstufiger Synthesen zu enantiomerenreinem **9b** entwickelt worden.^[22a,65] Im Rahmen der Synthese von 5-Lipoxygenase-Inhibitoren gelang Kolas et al. 1996 eine elegante dreistufige Darstellung von (*S*)-**9b** ausgehend von einer Oxidation des Crotylalkohols (**84**) unter Sharpless-Bedingungen (Abb. 2-17).^[22a] Nach Einführung einer Tosyl-Schutzgruppe wurde (*S*)-**9b** durch Einwirkung eines 6-fachen *n*-BuLi Überschusses erhalten. Da das Produkt (*S*)-**9b** anschließend nicht isoliert wurde, sind keine Angaben über die Gesamtausbeute und den Enantiomerenüberschuß gemacht worden. Alternativ haben Nakamura et al. einen Lipase-Zugang zu (*S*)-**9b** in 98 % *ee* beschrieben, bei dem jedoch eine Ausbeute von lediglich 11 % erzielt wurde.^[13c]

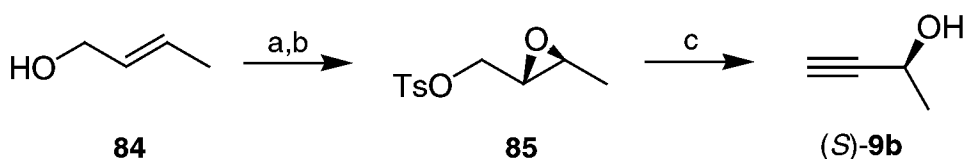


Abb. 2-17: 3-Butin-2-ol (**9b**) über Sharpless-Epoxidierung.^[22a] – a) L-(+)-DIPT, *t*-BuOOH, Ti(OiPr)₄, CH₂Cl₂, –20°C. – b) TsCl, Et₃N, –20 bis –10°C (22 %). – c) *n*-BuLi, THF, –72°C.

Die Oxidoreduktasen *CPCR* und *recLB*-ADH reduzierten **9a** erwartungsgemäß mit unbefriedigenden *ee*-Werten von 49 bzw. 60 % (Tab. 2-9). Die Ergebnisse der vorangegangenen Substrat-Screenings zeigten, daß ein sterisch anspruchsvollerer Rest an der Dreifachbindung zu einer höheren Selektivität der Reduktion führt. Hierauf aufbauend sollte bei Keton **9a** eine funktionelle Gruppe anstelle des terminalen Protons eingeführt werden. Eine wichtige Anforderung hierbei war, daß diese nach

erfolgter Reduktion leicht wieder abgespalten werden kann. Silyl-Gruppen sind hierfür besonders geeignet, da sie die gewünschten Anforderungen erfüllen und darüber hinaus mit unterschiedlichen sterischen Ansprüchen kommerziell erhältlich sind.^[42b,66]

CPCR und *recLB*-ADH wurden somit auf ihre Eigenschaften bei der Reduktion von 4-Silyl-3-buten-2-onen untersucht. Chemisch führt die Reduktion der einfachsten Silyl-Verbindung 4-Trimethylsilyl-3-buten-2-on (**21a**) mittels CBS-Boranen oder einem Ruthenium-Katalysator zu den besten Ergebnissen.^[3b,12] **21b** kann so in 87 bzw. 98 % *ee* bei einer Ausbeute von jeweils größer 90 % erhalten werden. Enzymatisch ist (*S*)-**21b** über eine Racematspaltung mittels einer Lipase aus *Pseudomonas* mit >95 % *ee* (27 % Ausbeute) zugänglich.^[13a] (*R*)-**21b** wurde über eine enzymatische Reduktion katalysiert durch *LK*-ADH mit 94 % *ee* (25 % Ausbeute) erhalten.^[15c]

ii) Ergebnisse

In den vorliegenden Arbeiten zeigten beide Oxidoreduktasen gute Aktivitäten bei den Silyl-substituierten Butinonen **21a** und **47a–49a** (Tab. 2-9). Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse und der Konfiguration der Produkte **21b** und **47b–49b** wurde nach Abspaltung der Silyl-Gruppe durchgeführt. Diese erfolgte mittels einer 200 mM *n*-Tetrabutylammoniumfluorid-Lösung in THF bei RT.^[67] Die Alkohole **21b** und **47b–49b** wurden hierbei in einer Reaktionszeit von 1 h quantitativ desilyliert. Die Analyse ergab, daß bei der Reduktion mit *recLB*-ADH der sterische Anspruch der TMS-Gruppe bereits ausreicht um enantiomerenreines Produkt zu erhalten. Die Reduktion mit *CPCR* führte selbst mit den sterisch anspruchsvollen TES- bzw. TBS-substituierten Alkinonen nicht zu Produkten mit einem *ee* von >99 %. Enantiomerenreines (*S*)-**9b** wurde schließlich über die Einführung einer Silyl-Gruppe mit einem aromatischen Substituenten (**49a**) erhalten. Durch die Reduktion der Silyl-Verbindung mit anschließender Abspaltung der *ee*-steigernden Schutzgruppe können die Alkohole (*S*)- und (*R*)-**9b** nun mit einem Enantiomerenüberschuß von größer 99 % in einer zweistufigen Synthese erhalten werden (Abb. 2-18).

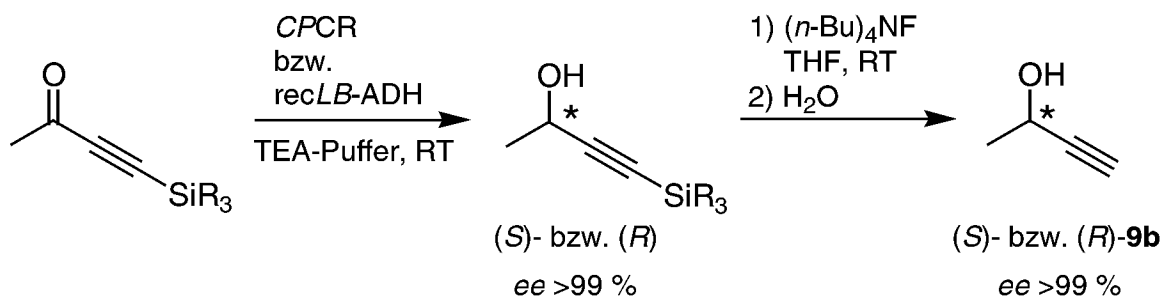
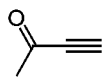
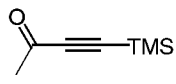
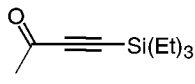
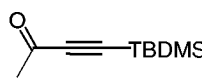
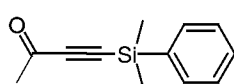


Abb. 2-18: Synthese von enantiomerenreinem 3-Butin-2-ol (**9b**).

Zur Belegung der präparativen Anwendbarkeit der enzymatischen Reduktion wurde 1 mmol **21a** mit *CPCR* wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben umgesetzt. Weiterhin wurden 7 mmol **21a** mit 200 U *recLB*-ADH reduziert. Nach Extraktion mit CH_2Cl_2 und Aufreinigung über Flashchromatographie [(*S*)-**21b**] bzw. Destillation [(*R*)-**21b**] werden die reinen Produkte (*S*)- und (*R*)-**21b** (GCMS, NMR) in Ausbeuten von 78 bzw. 73 % erhalten. Die Enantiomerenüberschüsse der Alkohole betragen 57 % [(*S*)-**21b**] sowie >99 % [(*R*)-**21b**].

Tab. 2-9: Screening silylierter Alkinone

Substrate	% Aktivität (% Umsatz) ^a		% ee (abs. Konfig.) ^b	
	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH
9a 	52 (> 99)	66 (> 99)	49 (<i>S</i>)	60 (<i>R</i>)
21a 	48 (> 99)	46 (> 99)	57 (<i>S</i>)	> 99 (<i>R</i>)
47a 	33 (65)	27 (90)	91.5 (<i>S</i>)	> 99 (<i>R</i>)
48a 	41 (40)	34 (40)	98.6 (<i>S</i>)	> 99 (<i>R</i>)
49a 	44 (80)	38 (60)	> 99 (<i>S</i>)	> 99 (<i>R</i>)

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat (**49a**: 2 mM), 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl_2 , 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT. – a) Enzymaktivität wurde über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zum Standard 5-Oxohexansäureethylester bestimmt; Umsatzbestimmung erfolgte über GC (**9a**) oder GCMS (**21a**, **47a**, **49a**) nach jeweils 16 h (Regenerierung des Cofaktors über FDH/Formiat [*CPCR*] bzw. 2-Propanol [*recLB*-ADH]). – b) Die absoluten Konfigurationen wurden nach Silyl-Spaltung über Vergleich der Retentionszeiten mit der von kommerziell erhältlichem (*S*)-**9b** bestimmt (GC an chiraler Phase).

Ein weiterer Zugang zu enantiomerenreinem 3-Butin-2-ol (**9b**) wird durch Substrat **45a** eröffnet (Tab. 2-8). Hierbei handelt es sich formal um ein Addukt aus Aceton und 3-Butin-2-on (**9a**). **45a** wurde sowohl von *recLB*-ADH als auch von *CPCR* mit einem ee von größer 99 % zu dem (*R*)- bzw. (*S*)-Alkohol **45b** reduziert. Die erhaltenen Pro-

dukte **45b** sollten durch Abspalten von Aceton mittels K_2CO_3 ebenfalls in enantiomerenreines 3-Butin-2-ol (**9b**) überführt werden können.^[10c]

2.3.3 Alkinone mit terminaler Dreifachbindung

i) Einleitung

Propargylische Alkohole mit einer terminalen Dreifachbindung sind vielseitig in der organischen Synthese einsetzbar (s. auch Abschnitt 1.1.2).^[19a,c] In der Vergangenheit wurden eine Reihe unterschiedlicher enantioselektiver Zugänge entwickelt. Da die Reduktion von 1-Octin-3-on (**53a**) mit Alpine-Boran oder BINAL-H nur zu *ee*-Werten von bis zu 92 % führte,^[9,68] testeten Brown et al. weitere Borane. Hierbei gelang die Synthese von (*S*)-**53b** mit 99 % *ee*.^[69] Alternativ wurden (*S*)- und (*R*)-**53b** über die Trennung von Diastereomeren sowie eine 3 Stufen-Synthese über die Sharpless-Oxidation eines Allyl-Alkohols zugänglich gemacht.^[70,71] Der Enantiomerenüberschuß des Produkts **53b** betrug in beiden Fällen 88 %.

In einer Reihe von biokatalytischen Synthesen wurden propargylische Alkohole mit terminaler Dreifachbindung über hydrolytische Enzyme dargestellt.^[13a,72] Die Alkohole wurden überwiegend mit *ee*-Werten von deutlich unter 90 % erhalten. In einigen Beispielen konnte jedoch eine gute Eignung von Lipasen aufgezeigt werden (Abb. 2-19).^[72c]

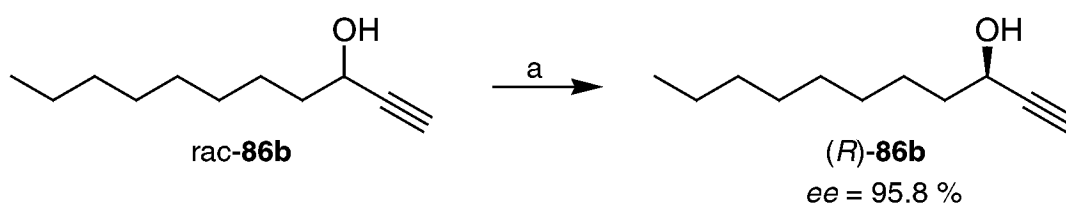


Abb. 2-19: Synthese von (*R*)-**86b** über die *Candida antarctica* Lipase B.^[72c] – a) *Candida antarctica* Lipase B, S-Ethyl-thiooctansäureester, 39°C.

Enzymatische Reduktionen sind bisher nur mit der Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium ethanolicus* (TE-ADH) beschrieben.^[15g] Hierbei wurden eine Reihe von Ketonen und Ketoestern umgesetzt, die neben der terminalen Dreifachbindung keine weiteren funktionellen Gruppen enthielten. Die erzielten Enantiomerenüberschüsse liegen zwischen 42 und >98 %. Interessanterweise tritt bei den Reduktionen eine Umkehr der bevorzugten Stereoselektivität des Enzyms auf.

TE-ADH reduziert 1-Hexin-3-on (**26a**) in 51 % *ee* zu (*S*)-**26b**, während 1-Heptin-3-on mit 42 % *ee* zu dem entsprechenden (*R*)-Alkohol umgesetzt wird. Eine weitere Konfigurationsumkehr wurde bei der Ganzzellbiotransformation der Verbindungen **87a** und **88a** mit Bäckerhefe beobachtet (Abb. 2-20).^[73] Das silylierte Keton **87a** wurde zu (*R*)-**87b** reduziert, während man bei Einsatz von **88a** das (*S*)-Enantiomer des Alkohols **88b** erhalten hatte. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß Bäckerhefe eine Vielzahl unterschiedlicher Alkoholdehydrogenasen enthält. Es ist somit sehr wahrscheinlich, daß es sich nicht um die Umkehr der Stereospezifität eines einzelnen Enzyms handelt, sondern daß die beiden Substrate von zwei unterschiedlichen Oxidoreduktasen reduziert worden sind.

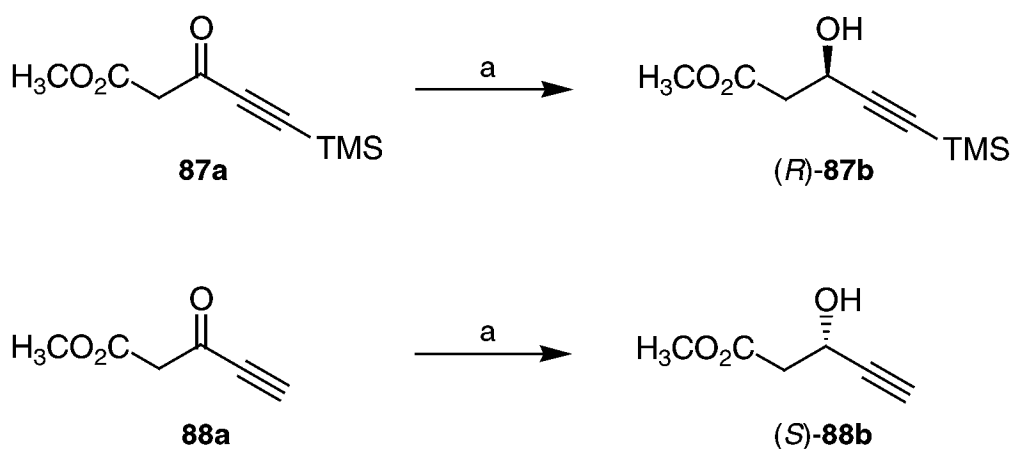


Abb. 2-20: Konfigurationsumkehr bei der Reduktion mit Bäckerhefe.^[73] – a) Bäckerhefe, D-Glucose, EtOH, Wasser, 30°C [(*R*)-**87b**: 82 % *ee* (48 %); (*S*)-**88b**: 80 % *ee* (46 %)].

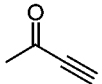
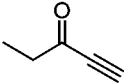
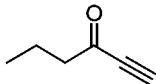
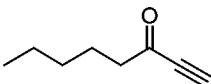
ii) Ergebnisse

Substrat-Screening

Die Untersuchung der von den Oxidoreduktasen *CPCR* und *recLB*-ADH katalysierten Reduktion der terminalen Alkinone ergab ebenfalls eine Umkehr der bevorzugten Stereoselektivität in Abhängigkeit von der Größe des Alkyl-Restes der Substrate. Bei der Umsetzung mit *recLB*-ADH, welche bei der Reduktion von **9a** den (*R*)-Alkohol [(*R*)-**9b**] ergibt, wurde bereits das Substrat 1-Pentin-3-on (**59a**) zu dem entsprechenden (*S*)-Alkohol (*S*)-**59b** reduziert (Tab. 2-10). Die höheren Homologe **26a** und **53a** wurden von dem Enzym sogar zu den enantiomerenreinen Produkten (*S*)-**26b** und (*S*)-**53b** umgesetzt. Gleichzeitig stieg die Aktivität bei den Substraten mit längerer

Alkyl-Kette stark an. Auf der anderen Seite konnte *CPCR* bei keinem der terminalen Alkohole einen *ee*-Wert von größer als 76 % erreichen. Zusätzlich fällt die Aktivität hier bei den höheren Homologen sehr stark ab. Nichtsdestotrotz wechselt auch die Stereoselektivität der *CPCR* katalysierten Reduktion mit steigender Kettenlänge. Infolgedessen wird **53a** mit 62 % *ee* zu dem (*R*)-Alkohol (*R*)-**53b** umgesetzt. Es ist wahrscheinlich, daß beide Enzyme ab einer bestimmten Alkyl-Kettenlänge diesen Teil als den größeren Rest des Substrats erkennen. Hierdurch kommt es dann zu der Umkehr der bevorzugten Konfiguration der Produkte.

Tab. 2-10: Screening terminaler Alkinone

Substrate	% Aktivität (% Umsatz) ^a		% <i>ee</i> (abs. Konfig.) ^b	
	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH
9a 	52 (> 99)	66 (> 99)	49 (<i>S</i>)	60 (<i>R</i>)
59a 	34 (90)	41 (90)	67 (<i>S</i>)	34 (<i>S</i>)
26a 	13 (65)	28 (> 99)	76 (<i>S</i>)	> 99 (<i>S</i>)
53a 	sn ^c (< 5)	85 (> 99)	62 (<i>R</i>)	> 99 (<i>S</i>)

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat, 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT. – a) Enzymaktivität wurde über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zum Standard 5-Oxohexansäureethylester bestimmt; Umsatzbestimmung erfolgte über GC (**9a**+**59a**) bzw. GCMS (**26a**+**53a**) nach jeweils 16 h (Regenerierung des Cofaktors über FDH/Formiat [*CPCR*] bzw. 2-Propanol [*recLB*-ADH]). – b) Die absoluten Konfigurationen von **9b** und **53b** wurden durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von kommerziell erhältlichen Alkoholen (GC an chiraler Phase), die von **59b** und **26b** durch Vergleich der Drehwerte mit Literaturdaten bestimmt.^[74,75] – c) Sehr niedrig.

Batch-Ansätze

Das Problem bei der präparativen Umsetzung der terminalen Alkinone ist deren hohe Instabilität in wäßrigen Systemen (Tab. 2-5), über die bereits von Phillips et al. be-

richtet wurde.^[15g] Die Substrate, die vermutlich eine vinyloge Addition eingehen, besitzen in TEA-Puffer (pH = 7) eine Halbwertszeit von lediglich 6 - 12 h. Die Reduktion von je 1 mmol **59a** und **26a** konnte zwar, wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, durchgeführt werden. Bei Umsätzen von größer 90 % gelang es aufgrund von Nebenreaktionen jedoch nicht, reines Produkt **59b** und **26b** zu isolieren. Zur Verbesserung der Ausbeute könnte eine deutlich erhöhte Enzymmenge eingesetzt werden. Da hierdurch die Reaktionszeit verkürzt würde, sollte sich die Bildung von Nebenprodukten maßgeblich verringern. Alternativ ist auch eine Fed-Batch-Strategie denkbar, bei der die zur Verfügung stehende Substratmenge stets gering gehalten wird und somit schnell umgesetzt werden kann. In den durchgeführten Arbeiten konnte die Zersetzung der Substrate durch den Austausch des Puffers verhindert werden. Da die Nebenreaktion vermutlich durch den Stickstoff des TEA-Puffers nucleophil katalysiert wird, führte der Austausch des TEA-Puffers gegen einen Phosphat-Puffer zu deutlich verbesserten Ergebnissen. Auf diesem Weg gelang die Reduktion von 15.6 mmol **26a** mit 750 U recLB-ADH. Alkohol (*S*)-**26b** wurde nach Extraktion und Destillation in 69 % Ausbeute frei von Nebenprodukten erhalten. Die höheren Homologe terminaler (*S*)-Alkinole sind somit durch enzymatische Reduktion enantiomerenrein in guten Ausbeuten zugänglich.

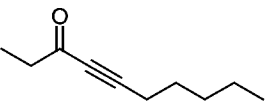
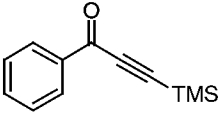
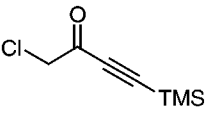
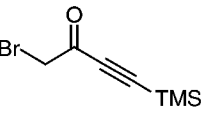
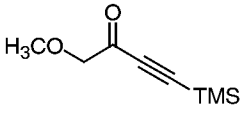
2.3.4 α -Substituierte Alkinone

Neben den Ketonen mit terminaler Dreifachbindung wurden bislang ausschließlich propargylische Methyl-Ketone als Substrate umgesetzt, da die Anwesenheit eines kleinen Restes an der Carbonyl-Funktion in der Regel für eine gute enzymatische Aktivität und hohe Enantioselektivität erforderlich ist.

Aus Sicht des organisch-präparativen Chemikers sind enantiomerenreine Alkinole mit einer Methylgruppe häufig nicht ausreichend funktionalisiert. Die Durchführung von Folgechemie an diesem Rest ist kaum möglich. Demzufolge wäre ein an der Methylgruppe funktionalisierter Alkohol von großem Interesse. Es wurden daher eine Reihe α -substituierter propargylischer Ketone synthetisiert. In einem Substrat-Screening wurde überprüft, welche Substituenten von den Enzymen akzeptiert werden (Tab. 2-11). Hierbei zeigte sich, daß eine Verlängerung der Methylgruppe um ein Kohlenstoffatom (**20a**) bereits zu einem vollständigen Verlust der Aktivität der verwendeten Enzyme führt. Somit konnte auch das Alkinon **27a** mit dem noch größeren Phenylsubstituenten in α -Stellung nicht umgesetzt werden. Das α -Methoxy-funktionalisierte Substrat **62a** zeigte im UV-Assay eine ausreichende Aktivität. Die

Verbindung stellte sich jedoch unter den Batch-Bedingungen als nicht stabil heraus, so daß eine präparative enzymatische Umsetzung nicht möglich war. Als weitere Substrate wurden die halogenierten Ketone **28a** und **29a** getestet. *recLB*-ADH akzeptierte beide Verbindungen mit guter Aktivität, wobei die entsprechenden Alkohole (*S*)-**28b** und (*S*)-**29b** mit Enantiomerenüberschüssen von größer 99 % bzw. 98.6 % gebildet wurden. *CPCR* reduzierte **28a** und **29a** mit einem *ee* von größer 99 %. Die niedrige Aktivität der *CPCR* ist jedoch für präparative Umsetzungen kaum ausreichend.

Tab. 2-11: Screening α -substituierter Alkinone

Substrate	% Aktivität (% Umsatz) ^a		% <i>ee</i> (abs. Konfig.) ^b	
	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH
20a 	0 (–)	0 (–)		
27a 	0 (–)	0 (–)		
28a 	sn ^c (30)	28 (95)	> 99 (<i>R</i>) ^d	> 99 (<i>S</i>) ^d
29a 	sn ^c (10)	18 (95)	> 99 (<i>R</i>) ^d	98.6 (<i>S</i>) ^d
62a 	10 (–) ^e	28 (–) ^e	—	—

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat (**27a**: 2mM), 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT.

a) Enzymaktivität wurde über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zum Standard 5-Oxohexansäureethylester bestimmt; Umsatzbestimmung erfolgte über GCMS nach 16 h (Regenerierung des Cofaktors über FDH/Formiat [*CPCR*] bzw. 2-Propanol [*recLB*-ADH]).

b) Die absoluten Konfigurationen der Alkohole **28b** und **29b** wurden über deren Mosher-Ester bestimmt.^[60]

c) Sehr niedrig.

d) Formale Konfigurationsumkehr aufgrund der CIP-Nomenklatur.

e) Nicht stabil unter Batch-Bedingungen.

2.4 α -Halogenierte Alkinone

Die Chlor- und Bromverbindungen **28a** und **29a** haben sich als geeignete Substrate für die Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* erwiesen (s. Abschnitt 2.3.4). Diese enzymatischen Umsetzungen bieten somit einen Zugang zu hoch funktionalisierten C4-Bausteinen, die eine vielseitige Folgechemie ermöglichen. Der Halogensubstituent aktiviert neben den bereits funktionalisierten Kohlenstoffatomen der Dreifachbindung und der Hydroxygruppe auch das vierte Kohlenstoffatom des Butinol-Grundgerüsts, wodurch sich umfassende Einsatzmöglichkeiten dieser Verbindungen in der organischen Synthese ergeben. In der Literatur wurde nur ein einziges enantiomerenangereichertes α -Chlor- bzw. Brom-substituiertes Alkinol beschrieben.^[3b] 1-Chlor-4-triisopropylsilyl-3-butin-2-on (**89a**) wurde von Corey et al. mittels eines CBS-Katalysators und Catecholboran in 95 % ee und mit einer Ausbeute von 97 % reduziert (Abb. 2-21). Die sterisch anspruchsvolle Triisopropylsilylgruppe ist hierbei notwendig, da anhand der nicht chlorierten Substrate gezeigt werden konnte, daß ein Austausch gegen die kleinere TMS-Gruppe eine deutliche Verschlechterung des ee-Wertes zur Folge hat.^[3b]

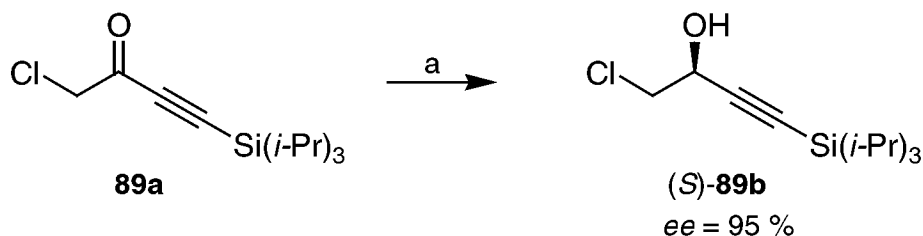


Abb. 2-21: Synthese von (S)-**89b** über CBS-katalysierte Reduktion.^[3b] a) Oxazaborolidin, 1.2 eq. Catecholboran, Toluol, -78°C (97 %).

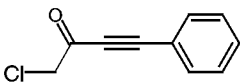
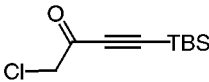
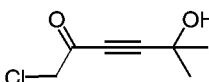
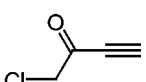
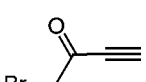
In den Arbeiten von Wong et al. mit Oxidoreduktasen aus *Pseudomonas* sp. und *Lactobacillus kefir* werden für die Ketone **28a** und **54a** Aktivitäten von 52 % bzw. 2 % angegeben.^[15b,c] Diese wurden nicht über einen analytischen Nachweis der gebildeten Produkte bestätigt (s. Abschnitt 2.4.2).

2.4.1 Reduktion α -halogener Alkinone mit recLB-ADH und CPCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bisher die TMS-Derivate **28a** und **29a** als halogenierte Substrate bei den Aktivitätsmessungen eingesetzt. In einem weiteren Screening wurde nun getestet, mit welchen Aktivitäten und Enantiomerenüber-

schüssen andere halogenierte Alkinone umgesetzt werden können. *recLB*-ADH hat sich für die Reduktion von halogenierten Alkinonen als besonders geeignet erwiesen. Die chlorierten Verbindungen mit einer sterisch anspruchsvolleren Silylgruppe **50a** oder aliphatischer Substitution **51a** wurden ebenso wie das aromatische Alkinon **30a** von diesem Enzym mit guter Aktivität akzeptiert (Tab. 2-12). *CPCR* zeigte bei allen Substraten eine für präparative Zwecke zu niedrige Aktivität.

Tab. 2-12: Screening weiterer halogenierter Alkinone

Substrate	% Aktivität (% Umsatz) ^a		% ee (abs. Konfig.) ^b	
	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH
30a 	sn ^c (45)	70 (> 99)	90 (<i>R</i>)	> 99 (<i>S</i>)
50a 	sn ^c (9)	37 (15)	> 99 (<i>R</i>)	> 99 (<i>S</i>)
51a 	sn ^c (0)	41 (> 99)	nb ^d	nb ^d
54a 	sn ^c (90) ^e	28 (80) ^e	30 (<i>R</i>)	> 99 (<i>R</i>)
55a 	sn ^c (85) ^e	18 (75) ^e	20 (<i>R</i>)	> 99 (<i>R</i>)

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat (**30a**: 2 mM), 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT.

a) Enzymaktivität wurde über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zum Standard 5-Oxohexansäureethylester bestimmt; Umsatzbestimmung erfolgte über GC (**54a**+**55a**) bzw. GCMS (**30a**, **50a**, **51a**) nach jeweils 16 h (Regenerierung des Cofaktors über FDH/Formiat [*CPCR*] bzw. 2-Propanol [*recLB*-ADH]).

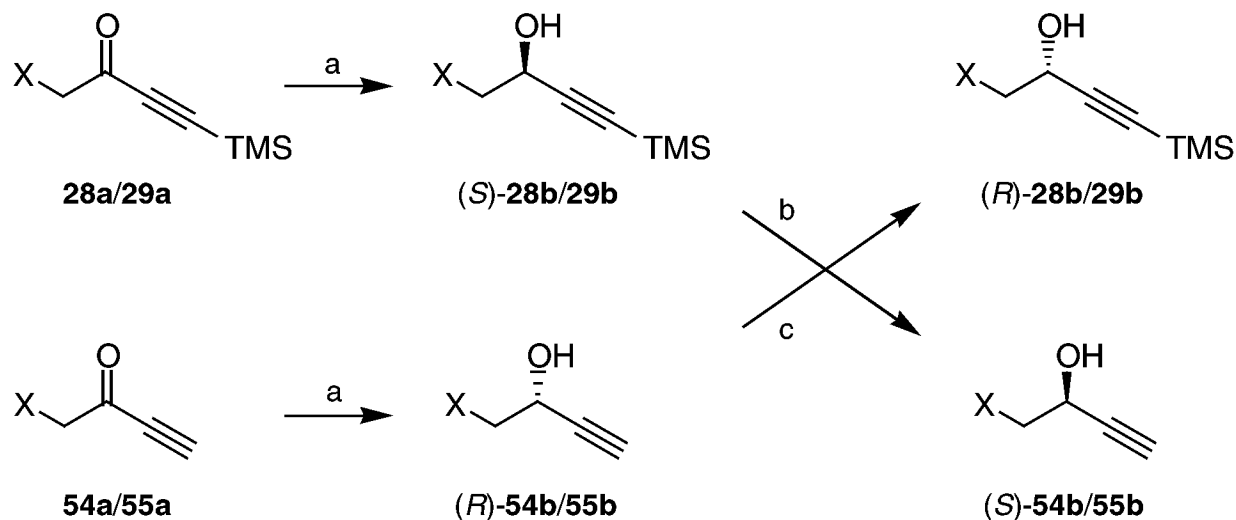
b) Die absoluten Konfigurationen von **30b**+**50b** wurden durch Überführung in die entsprechenden Epoxide (s. Abschnitt 2.7.1) und Vergleich der Drehwerte mit Literaturdaten bestimmt.^[76] Die absoluten Konfigurationen von **54b**+**55b** wurden durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen von "(*S*)-**28b** nach Silylspaltung" (s. Abschnitt 2.1.1) mit wässriger Borax-Lösung bestimmt.

c) Sehr niedrig.

d) Nicht bestimmt.

e) 10-fache Enzymmenge eingesetzt.

Die Aktivitäten bei den Ketonen **54a** und **55a** mit terminalen Dreifachbindungen entsprechen in etwa den Werten bei den nicht-terminalen Alkinonen **28a** und **29a** (Tab. 2-12). Das Enzym *CPCR* kann jedoch bei gleichbleibend schwachen Aktivitäten zwischen den Resten "Halomethyl" und "Ethinyl" bei den Substraten **54a** und **55a** nicht mehr hinreichend unterscheiden. Infolgedessen sinken die *ee*-Werte bis auf 20 % ab. *recLB*-ADH setzte auch diese Substrate mit hohen Enantiomerenüberschüssen um. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgte durch Vergleich der GC-Retentionszeiten mit (*S*)-**54b** und (*S*)-**55b**, welche durch *recLB*-ADH-katalysierte Reduktion von **28a** und **29a** mit anschließender Silylspaltung erhalten worden sind. Das Ergebnis zeigt, daß die Umsetzung mit *recLB*-ADH wie schon bei den nicht halogenierten Substraten mit einer terminalen Dreifachbindung [**26a**, **53a** und **59a** (s. Abschnitt 2.3.3)] zu einem Wechsel der Stereospezifität der enzymatischen Reduktion führt. Im Gegensatz zu der Reduktion der entsprechenden TMS-Derivate **28a** und **29a**, welche zu den enantiomerenreinen (*S*)-Produkten (*S*)-**28b** und (*S*)-**29b** führt, werden hier die ebenfalls enantiomerenreinen (*R*)-Alkohole (*R*)-**54b** und (*R*)-**55b** erhalten. Da Silyl-Gruppen an terminale Acetylene substituiert und auch abgespalten werden können,^[42b,66a] ergibt sich ein neuer hoch enantioselektiver Zugang zu Enantiomerenpaaren über dieselbe Oxidoreduktase (Abb. 2-22).



X = Cl, Br

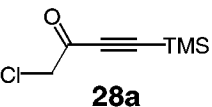
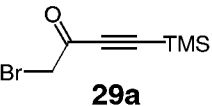
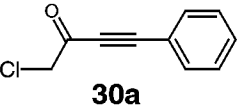
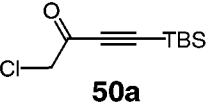
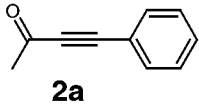
Für alle Alkohole:
***ee* >99 %**

Abb. 2-22: Synthese von Enantiomerenpaaren über *recLB*-ADH.^[42b,66a] – a) *recLB*-ADH, TEA-Puffer, RT. – b) Borax, MeOH, RT. – c) *n*-BuLi, TMSCl, THF, –78°C.

2.4.2 Enzym-Screening mit halogenierten Alkinonen

Ein Ziel der durchgeführten Arbeiten war es, jeweils beide Enantiomere aller propargylischen Alkohole durch enzymatische Reduktion zugänglich zu machen. Dieses ist von großer Bedeutung für den Einsatz der Alkinole als Intermediate in der Naturstoff und Wirkstoffsynthese, da hier häufig die Darstellung des (*S*)- und des (*R*)-Produktes erwünscht ist. Da Oxidoreduktasen im Gegensatz zu chemischen Reagenzien nicht als Bild und Spiegelbild erhältlich sind, müssen zwei unterschiedliche Enzyme für die Reduktion eingesetzt werden. Im Fall der propargylischen Methyl-Ketone konnte dieses über *recLB*-ADH und *CPCR* erreicht werden. Bei den in α -Position halogenierten Alkinonen zeigt *CPCR* keine ausreichende Aktivität, so daß die entsprechenden (*R*)-Alkohole nicht erhalten werden konnten. Auch die aufgezeigte Möglichkeit diese Alkohole über *recLB*-ADH zugänglich zu machen (Abb. 2-22) ist keine hinreichende Lösung dieses Problems, da sich zum einen die Substrate **54a** und **55a** als nur schwer zugänglich erwiesen haben und das nachträgliche Einführen eines Substituenten zum anderen eine zusätzliche Synthesestufe bedeutet. Zur Lösung des Problems wurde ein erneutes Enzym-Screening durchgeführt. Hierbei wurden neben den mit 3-Butin-2-on (**9a**) bereits getesteten und kommerziell erhältlichen Enzymen HL-ADH, *TB*-ADH und Y-ADH (s. Abschnitt 2.2) die Alkoholdehydrogenasen aus *Candida boidinii* (*CB*-ADH) und *Thermoanaerobium ethanolicus* (*TE*-ADH) getestet.^[30,77] Im Ergebnis zeigten die Oxidoreduktasen *TB*-ADH, *TE*-ADH und HL-ADH gute Aktivitäten mit den halogenierten Substraten (Tab. 2-13). Während *TB*-ADH und *TE*-ADH, deren Sequenzen zu 99.1 % identisch sind,^[78] bei dem Methyl-Keton **2a** bereits ähnlich hohe Aktivitäten gezeigt hatten, war **2a** von HL-ADH nur mäßig umgesetzt worden. Im Gegensatz zur *CPCR* also, welche von Methyl-Alkinonen hin zu Halomethyl-Alkinonen einen starken Abfall der Aktivitäten aufweist, findet bei HL-ADH bei den α -halogenierten Substraten ein deutlicher Anstieg der Aktivitäten statt. Da *TB*-ADH, *TE*-ADH und HL-ADH dieselbe Spezifität wie *CPCR* besitzen, konnten die fehlenden (*R*)-Enantiomere über diese Enzyme zugänglich gemacht werden. Die hierbei erzielbaren Enantiomerenüberschüsse wurden bei der nachfolgenden eingehenderen Untersuchung der Substrat-Spektren bestimmt (Kapitel 2.4.3–2.4.5).

Tab. 2-13: Enzym-Screening mit α -halogenierten Alkinonen

Substrate	Aktivitäten ^a						
	LB-ADH	CPCR	HL-ADH	CB-ADH	Y-ADH	TB-ADH	TE-ADH
 28a	28	sn ^b	15	sn ^b	0	74	37
 29a	18	sn ^b	35	sn ^b	0	4	5
 30a	70	sn ^b	32	sn ^b	0	53	67
 50a	37	sn ^b	24	sn ^b	0	51	32
 2a	142	41	6	0	0	47	51

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat (**2a** und **30a**: 2 mM), 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT (TB-ADH und TE-ADH: 38°C).

a) Enzymaktivitäten wurden über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zu den jeweiligen Standards bestimmt (LB-ADH, CPCR = 5-Oxohexansäureethylester; HL-ADH = Cyclohexanon; CB-ADH = Aceton; Y-ADH, TB-ADH, TE-ADH = 2-Butanon).

b) Sehr niedrig.

Diskussion über die enzymatische Reduktion von α -Halogenketonen

Generell ist bei den Aktivitätsmessungen zu beachten, daß es sich um eine indirekte Methode handelt, bei der lediglich die Abnahme der Extinktion bei 340 nm verfolgt wird. Da die Abnahme der Extinktion auch andere Ursachen haben könnte ist es wichtig, die gemessenen Werte stets mit Batch-Ansätzen zu bestätigen. Dieses gilt besonders für α -halogenierte Ketone, da hier bereits über mögliche Nebenreaktionen berichtet wurde (Abb. 2-23).^[79] Hierbei konnte gezeigt werden, daß bei der Umsetzung halogener Substrate mit Oxidoreduktasen über einen Radikalmechanismus auch die Bildung der entsprechenden dehalogenierten Ketone möglich ist. Auch bei

dieser Reaktion wird NAD(P)H verbraucht und damit Aktivität im UV-Assay gemessen.

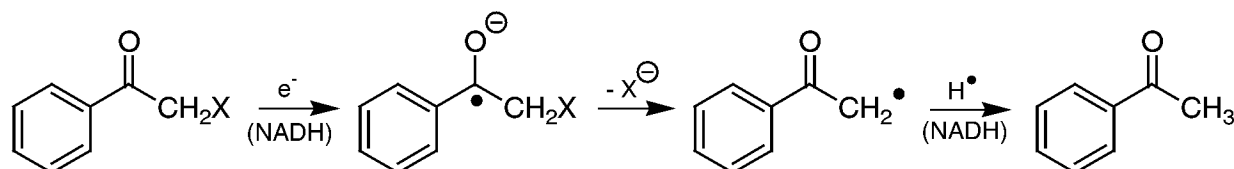


Abb. 2-23: Dehalogenierung von α -Haloacetophenon durch NADH.^[79]

Wong et al. berichten als einzige über die enzymatische Reduktion α -halogener Alkinone (**28a** + **54a**).^[15b,c] Da in den Arbeiten ausschließlich die Aktivitäten bestimmt wurden, ist die tatsächliche Bildung der Alkohole **28b** und **54b** nicht eindeutig nachgewiesen worden.

Interessanterweise weist der Verlauf der Aktivitäten bei den propargylichen Substraten zwei unterschiedliche Tendenzen auf. Während die enzymatische Aktivität bei den getesteten α -Chlor- und α -Brom-Alkinonen im Vergleich zu den Methyl-Alkinonen bei *recLB*-ADH und *CPCR* deutlich abnimmt, wurde für die HL-ADH ein starker Anstieg gemessen. In der Literatur finden sich nur wenige Vergleiche zwischen der enzymatischen Umsetzung von α -halogenierten sowie den entsprechenden nicht halogenierten Ketonen. Bei dem überwiegenden Teil dieser Substrate handelt es sich um β -Keto-Ester. Die Tendenzen bei den Aktivitäten für die Reduktion der β -Ketoester sind ebenfalls sehr uneinheitlich. So setzen Y-ADH und CB-ADH 4-Chloracetessigsäureethylester mehr als vier mal so gut um wie Acetessigsäureethylester.^[77,80] Die Carbonylreduktase aus *Rhodococcus erythropolis* (*RECR*) verliert in diesem Vergleich mehr als 70 % ihrer Aktivität,^[77] während *recLB*-ADH, *CPCR* und die Glyceroldehydrogenase aus *Geotrichum candidum* beide Substrate ähnlich gut akzeptieren.^[32,33,81] Die Ergebnisse sind nur bedingt mit denen der Alkinone vergleichbar, da β -Ketoester meist eine Sonderstellung in den Substrat-Spektren von Oxidoreduktasen einnehmen. Während ein kleiner Rest bei anderen Ketonen in der Regel die Voraussetzung für eine gute Aktivität ist, werden β -Ketoester mit zwei sterisch anspruchsvollen Resten häufig sehr gut als Substrat akzeptiert.^[32,33,77] Eine Erklärung hierfür könnte ein durch die Keto-Enol-Tautomerie der β -Ketoester verursachter veränderter enzymatischer Reduktionsmechanismus sein.

Weitere direkte Vergleiche zwischen der enzymatischen Umsetzung von α -halogenierten und nicht halogenierten Substraten sind nur für Acetophenon beschrieben

worden.^[33,77,82] In allen 3 beschriebenen Fällen nimmt hier die Aktivität zu Chloracetophenon hin ab. Bei *CPCR* sinkt sie von 34 auf 0 %, bei *RECR* von 5 auf 2 % und bei der Phenylacetaldehyd Reduktase aus *Corynebacterium* sp. ST-10 von 100 auf 23 %. Hierdurch wird die These bestätigt, daß eine Vergrößerung des kleinen Restes des Ketons zu einem Rückgang der Aktivität führt. Daneben wurden eine Reihe von Ganzzellbiotransformationen halogenierter Verbindungen beschrieben.^[83] Die Umsatzraten können hierbei jedoch nicht mit denen der halogenfreien Ketone verglichen werden, da die jeweiligen Reduktionen bei Ganzzellbiotransformationen von unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden können.

Für die HL-ADH sind eine Reihe von Modellen aufgestellt worden, um die Umsetzungen von Substraten vorhersagbar zu machen.^[84] Die Modelle beschäftigen sich primär mit der Vorhersage der zu erwartenden Konfigurationen der Alkohole. Zusätzlich wurde anhand der Struktur des Enzyms berechnet, in welchen Positionen des Ketons sich Substituenten befinden dürfen (Abb. 2-24).^[84c] Besitzt die eingesetzte Verbindung Reste in den sogenannten verbotenen Bereichen, wird sie von dem Enzym nicht als Substrat akzeptiert. Allen Modellen gemein ist, daß sie für cyclische Ketone entwickelt worden sind, da diese von HL-ADH am besten umgesetzt werden können. Eine Übertragung auf aliphatische Ketone ist somit nur bedingt möglich. Beispielsweise ist das von Johnson et al. entwickelte Substratmodell (Abb. 2-24) nur schwer auf Alkinone anwendbar,^[84c] da die gestreckte lineare Form der Dreifachbindung kaum in das cyclische Modell eingepaßt werden kann. Somit steht der Aktivitätsanstieg bei den halogenierten Alkinonen dann auch im Widerspruch zu dem Modell, da alle für den Chlor-Substituenten möglichen Positionen gehindert oder gar verboten sind.

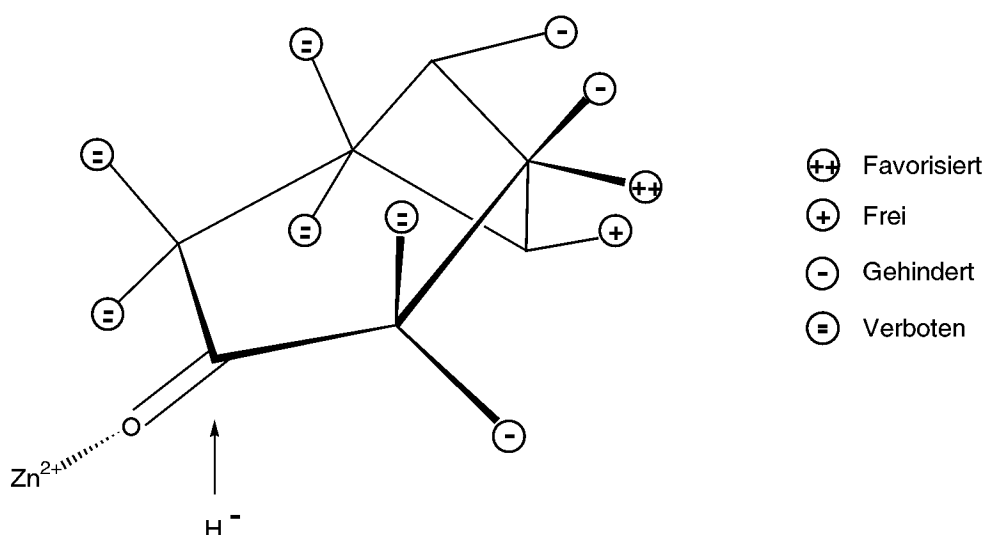


Abb. 2-24: Modell zur Bestimmung möglicher HL-ADH-Substrate nach Johnson.^[84c]

α -Halogenierte Alkinone nehmen somit eine interessante Sonderstellung im Substrat-Spektrum der HL-ADH ein, nicht zuletzt da bislang angenommen wurde, daß dieses Enzym aliphatische Verbindungen nur schlecht als Substrat akzeptiert.^[25b,27a] Ein vollständiges Modell für HL-ADH müsste neben den sterischen Effekten auch die elektronischen Eigenschaften der potentiellen Substrate berücksichtigen. In den Arbeiten von Kawai et al. wird eine Erklärung für die gute Aktivität bei der Y-ADH katalysierten Reduktion von 4-Chloracetessigsäureethylester angegeben.^[80] Hier wird die gegenüber Acetessigsäureethylester gesteigerte Aktivität mit einem Induktionseffekt des Chlor-Substituenten begründet, welcher zu einer positiven polaren Wechselwirkung mit dem Active-Site des Enzyms führt. Eine genauere Aufklärung des Enzym-Substrat-Komplexes könnte über die Methode des "molecular modeling" ermöglicht werden.

2.4.3 1-Chlor- und 1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (28a und 29a)

Die Substrate **28a** und **29a** bieten aufgrund ihres TMS-Substituenten erweiterte Möglichkeiten für die Folgechemie. Präparativ wurden mit recLB-ADH, HL-ADH sowie TB-ADH jeweils 0.5 – 1 mmol dieser Substrate reduziert. Trotz Umsätzen von bis zu 95 % wurden die Alkohole **28b** und **29b** nach Extraktion in überwiegend moderaten Ausbeuten zwischen 34 und 84 % erhalten. Die anschließende Aufreinigung der Rohprodukte über präparative Dünnschichtchromatographie führte zu einer weiteren Erniedrigung der Ausbeute. Die Alkohole **28b** und **29b** konnten somit über recLB-ADH und HL-ADH nur in isolierten Ausbeuten von 10 – 43 % erhalten werden. Im Fall der TB-ADH wurden sogar nur 2 (**28b**) bzw. 6 % (**29b**) Ausbeute erzielt. Die schlechten Ergebnisse sind auf eine Zersetzung der Substrate **28a** und **29a** im wässrigen Medium zurückzuführen. Da die TB-ADH katalysierten Reduktionen bei einer Temperatur von 38°C durchgeführt wurden, kam es hierbei zu noch stärkerer Bildung von Nebenprodukten, so daß kaum noch gewünschter Alkohol erhalten werden konnte. Hinzu kamen weitere Verluste bei der Aufreinigung durch Zersetzungsprozesse an Kieselgel. Wie bereits gezeigt wurde sind die jeweiligen Alkohole unter den Reaktionsbedingungen deutlich stabiler als die entsprechenden Ketone (Tab. 2-5). Somit könnte eine Fed-Batch-Strategie, welche zu einer verringerten Substratkonzentration in den Ansätzen führt, verbesserte Ausbeuten ermöglichen.

Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses sowie der absoluten Konfiguration der Alkohole **28b** und **29b** erfolgte durch Überführung in die entsprechenden (S)-Mosher-Ester.^[60] Diese wurden durch Reaktion von **28b** und **29b** mit (R)- α -Me-

thoxy- α -trifluormethylphenylacetylchlorid [(*R*)-MTPA-Cl] in Pyridin in guten Ausbeuten erhalten. Durch gaschromatographische Trennung wurde auf diesem Weg bei der Reduktion von **28a** und **29a** mit den Enzymen *recLB*-ADH, HL-ADH und *TB*-ADH in nahezu allen Fällen ein *ee* von größer 99 % bestimmt. Lediglich die Reduktion von **29a** mit *recLB*-ADH führte zu einem leicht erniedrigten *ee* von 98.6 %. Die aufgrund der jeweiligen Enzym-Spezifitäten angenommenen Konfigurationen konnten über die Methode von Mosher bestätigt werden (Abb. 2-25).^[60] Hierbei werden die Substituenten des Alkohols nach ihren sterischen Ansprüchen in einen kleinen und einen großen Rest eingeteilt. Die Wechselwirkungen der Reste mit der Phenyl- bzw. der Methoxygruppe des MTPA führt dann zu einer entsprechenden relativen Hoch- oder Tieffeld Verschiebung der ¹³C-NMR-Signale. Über die Feldverschiebungen können dann die Konfigurationen der Produkte zugeordnet werden. Nach Mosher entspricht somit im vorliegenden Beispiel die Tieffeld Verschiebung des größeren Restes TMS-Acetylen einem (*S*)-Alkohol.

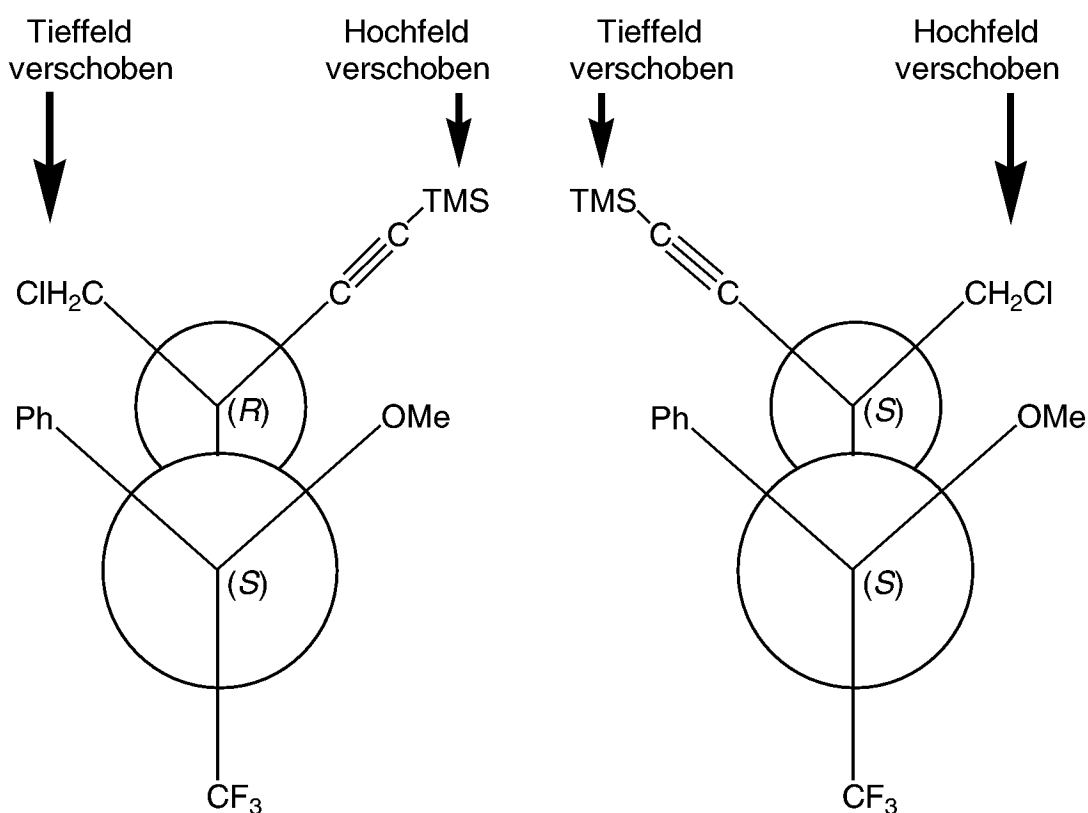


Abb. 2-25: Zuordnung der absoluten Konfiguration von **28b** über die relativen Verschiebungen der ¹³C-NMR-Signale.^[60]

2.4.4 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (50a)

In Abschnitt 2.4.3 wurde beschrieben, daß die TMS-Derivate **28a** und **29a** zwar mit guten Umsätze enzymatisch reduziert werden konnten, die Ausbeuten jedoch gering sind. Da dieses auf den TMS-Substituenten zurückgeführt wurde, sollte als nächstes ein Substrat mit einer stabileren Silyl-Gruppe getestet werden. Hierfür wurde das Alkinon **50a** ausgewählt, da es chemisch gut zugänglich ist und die TBS-Gruppe im Vergleich zur TMS-Funktion der stabilere Substituent ist.^[85]

Zur Bestätigung der gemessenen Aktivitäten wurde ein semipräparativer Batch-Ansatz durchgeführt. Hierbei wurden 3 mg **50a** mit 0.5 U recLB-ADH in 1 mL TEA-Puffer reduziert, wobei der Cofaktor mit 15 µL 2-Propanol als Cosubstrat regeneriert wurde. Der mittels GCMS nach 16 h ermittelte Umsatz betrug 15 %. Um höhere Umsätze zu erzielen wurden die zugegebenen Mengen an Substrat, Enzym, Cofaktor und Cosubstrat vielfältig variiert. Im Ergebnis führten geringe Substratkonzentrationen und hohe recLB-ADH Zugaben zu einer Verbesserung des Umsatzes. Auch durch eine Erhöhung der Cosubstrat Menge bis auf 80 µL konnte der Umsatz weiter gesteigert werden. Die Zugabe einer größeren Dosis Cofaktor ergab keine Verbesserung. Insgesamt konnten Umsätze von über 50 % jedoch nur über lange Reaktionszeiten mit sukzessiver Zugabe größerer Enzymmengen erreicht werden. Ein Batch-Ansatz mit 3 mg **50a** ergab nach 6 Tagen, in denen insgesamt 4 mal 0.5 U recLB-ADH zudosiert worden sind, einen Umsatz von 96 %. Der anschließende Scale-Up der Reaktion um den Faktor 50 führte dann jedoch nur zu einem Umsatz von 75 %. Die isolierte Ausbeute von 45 % deutet daraufhin, daß sich aufgrund der langen Reaktionszeit ein Teil des Substrats **50a** zersetzt hat.

Da die Reduktion durch Variieren der Konzentrationen der einzelnen Komponenten nicht ausreichend optimiert werden konnte, wurden alternative Reaktionsführungen getestet:

a) Durch die Zugabe von MTBE zu einem semipräparativen recLB-ADH-Ansatz wurde ein 2-Phasen-System erzeugt, wodurch eine geringe Substrat-Konzentration in der wäßrigen Phase erreicht werden sollte.^[86] Dieses sollte für den Fall einer Substrat-Inhibierung des Enzyms zu verbesserten Umsätzen führen. Nach 2 Tagen hatten sich trotz zweifacher Zugabe von 0.5 U recLB-ADH jedoch lediglich 4 % Produkt gebildet.

b) In einem zweiten Versuch sollte durch "strippen" eine eventuelle Coprodukt-Inhibierung beseitigt werden. Zu diesem Zweck wurde in einem Ansatz von 50 mg **50a** jeweils nach 2 h Reaktionszeit über einen Zeitraum von 30 min Stickstoff durch die Lösung geleitet, um das gebildete Aceton auszutreiben. Da durch den Vorgang auch das benötigte Cosubstrat entfernt oder das Enzym in der Lösung beschädigt werden kann, erfolgte nach dem "Strippen" jeweils eine erneute Zugabe von 2-Propanol, recLB-ADH und NADP⁺. Nach zweimaliger Zugabe und einer Reaktionszeit von 7 h zeigt eine GCMS-Probe, daß sich 65 % Produkt gebildet hatten. Durch weiteres "Strippen" nach jeweils 1 Tag und über einen Zeitraum von 2 h wurde nach einer Reaktionsdauer von 6 Tagen ein Umsatz von 79 % erzielt. Die isolierte Ausbeute betrug jedoch nur 25 %, was auf eine Substrat-Zersetzung aufgrund der langen Reaktionszeit zurückgeführt wurde.

c) Alternativ wurde die Methode der Cofaktorregenerierung geändert. Der Cofaktor NADP⁺ wurde in einem Ansatz von 3 mg **50a** mit dem System Natriumformiat / Formiatdehydrogenase (FDH) recyclet.^[37] Nach 16 h ergab sich ein Umsatz von 90 %. Die Reaktion erwies sich jedoch als schlecht reproduzierbar, da in weiteren identischen Ansätzen lediglich 20 % Produktbildung erzielt werden konnte.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses und der absoluten Konfiguration wurden präparative Batch-Ansätze durchgeführt. Hierfür wurden 1.9 g **50a** mit recLB-ADH sowie 100 und 200 mg **50a** mit HL-ADH bzw. TB-ADH umgesetzt, wobei das jeweilige Enzym mehrfach nachdosiert wurde. Bei isolierten Ausbeuten von 21 % (recLB-ADH), 24 % (HL-ADH) und 9 % (TB-ADH) wurde jeweils ein ee von größer 99 % erhalten. Die Konfiguration wurde nach der Methode von Mosher (s. Abschnitt 2.4.3) zugeordnet. Zusätzlich wurde der (*R*)-Alkohol (*R*)-**50b** in das entsprechende Epoxid überführt (s. Abschnitt 2.7.1) und dessen Drehwert gemessen. Der Vergleich mit dem Literaturwert bestätigte die (*R*)-Konfiguration.^[76a,b]

Zusammenfassend stellt sich die enzymatische Reduktion von **50a** trotz guter Aktivitätswerte als problematisch dar. Hohe Umsätze konnten nur durch die mehrmalige Zugabe größerer Enzymmengen und lange Reaktionszeiten erzwungen werden. Die Instabilität des Substrats in wäßrigen Lösungen führte zu geringen isolierten Ausbeuten.

2.4.5 1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on (**30a**)

Als weiteres Substrat wurde die aromatische Verbindung **30a** getestet. Das Keton **30a**, dessen Isolierung von Birkofer et al. als nicht möglich beschrieben wurde,^[42a] erwies sich über die Kupplung von Chloressigsäurechlorid und Phenyltrimethylsilylacetylen als gut zugänglich (s. Abschnitt 2.1.1). Die Synthese wurde im Dekagramm-Maßstab in 86 %iger Ausbeute durchgeführt. Der erhaltene Feststoff enthielt noch Spuren olefinischer Verunreinigungen, die weder durch Säulenchromatographie noch durch Umkristallisation vollständig abgetrennt werden konnten.

Durch den aromatischen Substituenten ist Verbindung **30a** in wäßriger Phase schwer löslich. In den semipräparativen Ansätzen blieb ein Großteil des Substrats **30a** trotz einer Vergrößerung des Puffer-Volumens um den Faktor 10 ($c_{30a} = 2.8 \text{ mM/L}$ [berechnet]) somit ungelöst. Da ein kaum gelöstes Substrat nur schwer umgesetzt werden kann, wurden größere Mengen von *recLB*-ADH (200 U), HL-ADH (40 U) bzw. *TB*-ADH (62 U) und NAD(P)⁺ (60 μmol) eingesetzt. Hierdurch wurden nach 16 h jeweils quantitative Umsätze erreicht. Die Enantiomerenüberschüsse der Produkte wurden mittels HPLC an chiraler Phase in allen drei Fällen als größer 99 % bestimmt. Zur Aufklärung der absoluten Konfiguration wurde 1 mmol **30a** mit *recLB*-ADH reduziert. Nach 24 h wurde **30b** bei 100 % Umsatz in einer Ausbeute von 85 % isoliert. Der Alkohol **30b** wurde in das Epoxid überführt (s. Abschnitt 2.7.1) und dessen Drehwert mit dem Literaturwert verglichen.^[76c] Wie erwartet hatte der Alkohol **30b** eine (*S*)-Konfiguration, wodurch den Produkten **30b** der HL- und *TB*-ADH katalysierten Reduktion über Vergleich der Retentionszeiten (HPLC) die (*R*)-Konfiguration zugeordnet wurde.

2.5 Olefinische Ketone

Die α - β -ungesättigten Alkinone haben sich als besonders geeignete Substrate für die enzymatische Reduktion herausgestellt (s. Abschnitte 2.3 und 2.4). Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob α - β -ungesättigte Alkenone ebenso gut von Oxidoreduktasen umgesetzt werden können. Wie bereits für die propargylischen Ketone erläutert (s. Abschnitt 2.3.4), wurde auch das Screening der olefinischen Substrate auf Methyl- und Halomethyl-Ketone beschränkt. Die enantioselektive Reduktion dieser Alkenone wurde chemisch bereits mit unterschiedlichen Reagenzien durchgeführt. Wie bei den Alkinonen (s. Abschnitt 1.1.1) wurden hierfür in der Mehrzahl der Synthesen Borane, komplexe Aluminiumhydride oder Rutheniumkatalysatoren eingesetzt.^[87,88,89]

Die chemischen Reduktionen konnten teilweise hoch enantioselektiv bei sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden. Überraschenderweise wurde bislang keine Reduktion eines (*Z*)-Methyl-Alkenons beschrieben. Bei den enantiomerenangereicherten Halomethyl-Alkoholen findet sich darüber hinaus keine einzige enantioselektive Synthese in der Literatur. In den beschriebenen Zugängen werden ausschließlich bereits nicht racemische, chirale Verbindungen modifiziert.^[90] Hierfür wurde entweder die Olefin- oder die Halogenfunktion in den bereits dargestellten enantiomerenangereicherten Alkohol eingeführt.

Biochemische Reduktionen der Alkenone wurden mit einer Reihe von Mikroorganismen getestet.^[91] Bis auf eine Umsetzung mit Bäckerhefe, die in 18 %iger Ausbeute zu dem gewünschten olefinischen Alkohol in 95 %iger Reinheit führte (Abb. 2-26),^[92] wurden hierbei ausschließlich Nebenprodukte wie das gesättigte Keton oder der gesättigte Alkohol erhalten. Die Reduktion mit einem isoliertem Enzym wurde bisher nur mit der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* beschrieben.^[93] (*S*)-(*E*)-4-Phenyl-3-buten-2-ol [(*S*)-**22b**] wurde enantiomerenrein in einer Ausbeute von 77 % erhalten.

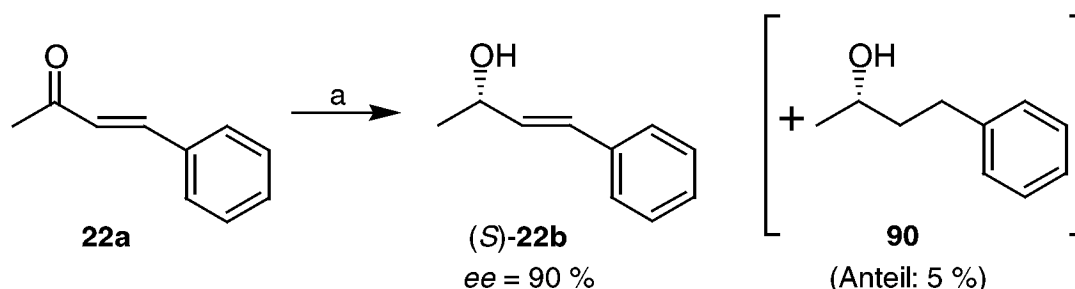


Abb. 2-26: Synthese des olefinischen Alkohols (*S*)-**22b** über Bäckerhefe.^[92] – a) Bäckerhefe, Phosphat-Puffer, D-Glucose, EtOH, RT (18 %).

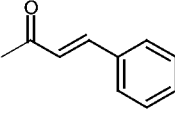
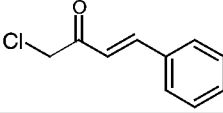
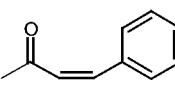
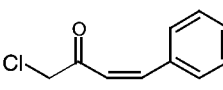
2.5.1 Enzym-Screening olefinischer Substrate

Als Test-Substrate wurden die aromatisch substituierten Olefine 4-Phenyl-3-buten-2-on sowie 1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on ausgewählt. Der Vergleich eines Methyl- sowie eines Chlormethyl-Alkenons sollte Aufschluß über die Akzeptanz eines α -Substituenten geben. In beiden Fällen ist es wichtig, jeweils die (*E*)- und (*Z*)-Alkenone zu testen, da die beiden Stereoisomere aufgrund verschiedenartiger sterischer Ansprüche unterschiedlich von den Enzymen akzeptiert werden können.

In dem Substrat-Screening ergaben die (*Z*)-Alkenone **71a** und **72a** niedrige Aktivitäten (Tab. 2-14). **72a** wurde zwar von allen vier eingesetzten Oxidoreduktasen als

Substrat akzeptiert. Die Aktivitäten waren jedoch in drei Fällen mit Werten zwischen 3 und 5 % sehr gering. Darüber hinaus wurde bei **72a** mit keinem der Enzyme ein Enantiomerenüberschuß von größer 95 % erzielt. Das (*Z*)-Olefin **71a** wurde kaum als Substrat akzeptiert. Aufgrund maximaler Aktivitätswerte von 2 % wurde hier auf die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses verzichtet. Das entsprechende (*E*)-Isomer **22a** konnte von dem Enzym *recLB*-ADH und, wie bereits beschrieben, von dem Enzym *CPCR* gut umgesetzt werden.^[93] Olefin **73a** wurde von allen 4 Oxi-doreduktasen zu dem enantiomerenreinen Alkohol **73b** reduziert. Hierbei erreichte lediglich *recLB*-ADH mit 47 % eine hohe Aktivität, während die anderen Enzyme moderate Aktivitätswerte von 5 – 16 % ergaben.

Tab. 2-14: Substrat-Screening olefinischer Ketone

Substrat	% Aktivität (% Umsatz) ^a			
	<i>recLB</i> -ADH	HL-ADH	<i>TB</i> -ADH	<i>CPCR</i>
22a 	39 (90)	sn ^b (5)	sn ^b (10)	12 (> 99)
73a 	47 (80) <i>ee</i> >99 % (<i>S</i>) ^c	5 (80) <i>ee</i> >99 % (<i>R</i>) ^c	16 (30) <i>ee</i> >99 % (<i>R</i>) ^c	9 (70) <i>ee</i> >99 % (<i>R</i>) ^c
71a 	0 (–)	0 (–)	sn ^b (5)	2 (10)
72a 	31 (80) <i>ee</i> = 86 % (<i>S</i>) ^c	3 (20) <i>ee</i> = 6 % (<i>R</i>) ^c	5 (70) <i>ee</i> = 95 % (<i>R</i>) ^c	3 (60) <i>ee</i> = 86 % (<i>R</i>) ^c

Assay-Bedingungen: 2 mM Substrat, 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5, RT (*TB*-ADH: 38°C).

a) Enzymaktivitäten wurden über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm (Anfangsgeschwindigkeit) relativ zu den jeweiligen Standards bestimmt (*LB*-ADH, *CPCR* = 5-Oxohexansäureethylester; HL-ADH = Cyclohexanon; *TB*-ADH = 2-Butanon); Umsatzbestimmung erfolgte über GCMS nach 16 h (Regenerierung des Cofaktors über FDH/Formiat [*CPCR*] bzw. 2-Propanol [*recLB*-ADH]).

b) Sehr niedrig.

c) Die absoluten Konfigurationen wurden über Vergleich der Retentionszeiten mit denen der Alkohole (*S*)-**72b** und (*S*)-**73b**, welche aus (*S*)-**30b** erhalten wurden (s. Abschnitt 2.7.2), bestimmt.

Interessanterweise zeigen in fast allen untersuchten Beispielen die chlorierten Alkenone bei den jeweiligen Enzymen bessere Aktivitäten als die entsprechenden Methyl-Alkenone. Lediglich das Screening mit *CPCR* ergab einen leichten Abfall der Aktivitätswerte bei dem chlorierten Keton **73a**.

Die gemessenen Aktivitäten wurden über Batch-Ansätze bestätigt. Die Durchführung erfolgte wie bereits für die aromatischen propargylischen Ketone beschrieben (s. Abschnitt 2.4.5). Die ermittelten Umsätze waren in allen Fällen mit den angegebenen Aktivitäten konform. *TB*-ADH erwies sich für die Reduktion der halogenierten Substrate **72a** und **73a** als ungeeignet, da die Umsetzungen aufgrund der höheren Reaktionstemperatur von 38°C zu einer Reihe von Nebenprodukten führten. Die hierbei primär entstandenen dechlorierten Ketone **22a** und **71a** wurden ihren Aktivitätswerten entsprechend von der *TB*-ADH kaum weiter enzymatisch umgesetzt. Bei dieser Dehalogenierung handelt es sich um eine nicht enzymatische Nebenreaktion, da, wie mittels einer Blindprobe gezeigt werden konnte, die Batch-Ansätze bei einer Reaktionstemperatur von 38°C auch ohne die Zugabe von Enzym zu der Bildung der Ketone **22a** und **71a** führen. Die Batch-Ansätze der *CPCR* ergaben bei den Substraten **22a** und **71a–73a** die Bildung von jeweils 40 – 50 % des gesättigten Alkohols (s. auch Abb. 2-26). Kula et al. haben bei der Reduktion von **22a** mittels *CPCR* bereits über die Bildung von 5 % des gesättigten Produkts berichtet.^[93] Diese wurde über eine Verunreinigung des Substrats **22a** mit 5 % des gesättigten Ketons erklärt. Weiterhin wurde in der Literatur über eine Reihe von Mikroorganismen berichtet, die Alkenone zu den gesättigten Alkoholen umsetzen können.^[91] Da es sich bei der *Candida parapsilosis* Carbonylreduktase um ein Wildtyp-Enzym handelt, welches mit anderen Enzymen verunreinigt sein kann, liegt die Vermutung nahe, daß die Reduktion der Doppelbindung durch eine zweite Dehydrogenase ausgeführt wurde. Zur Überprüfung dieser These wurde eine chromatographisch weiter aufgereinigte *CPCR*-Charge in einem zweiten Batch-Ansatz mit dem Substrat **22a** eingesetzt. Durch die Aufreinigung sollte zumindest ein Teil des vermuteten zweiten Enzyms abgetrennt worden sein. Tatsächlich führte diese Umsetzung zu einer verminderten Bildung des gesättigten Alkohols von 25 %. Eine vollständige Abtrennung der störenden Nebenaktivität sollte somit ausschließlich zu dem gewünschten olefinischen Produkt führen. Alternativ sollte der Einsatz der von Kula et al. beschriebenen *CPCR* in rekombinanter Form ebenfalls keine Nebenaktivität zeigen.^[94]

Zur Demonstration der präparativen Anwendbarkeit der enzymatischen Alkenonreduktion wurden 67 µmol **73a** mit 200 U rec*LB*-ADH umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 16 h wurde der Batch-Ansatz mit Ethylacetat extrahiert und mittels prä-

parativer Dünnschichtchromatographie aufgearbeitet. Der enantiomerenreine Alkohol (*S*)-**73b** wurde in 57 % Ausbeute und mit einer Reinheit von 95 % (GCMS, NMR) erhalten. Die absolute Konfiguration wurde über Vergleich der Retentionszeit mit der des Alkohols (*S*)-**73b**, welcher aus (*S*)-**30b** erhalten wurden (s. Abschnitt 2.7.2), bestimmt.

Zusammenfassend haben sich aromatische Alkenone als weniger gut geeignete Substrate für die enzymatische Reduktion mit den ausgewählten Oxidoreduktasen erwiesen. Nur in wenigen Fällen wie der präparativ durchgeführten Umsetzung von **73a** mit recLB-ADH waren die Produkte in guten Umsätzen und hohen Enantiomereüberschüssen zugänglich.

2.6 Optimierung der enzymatischen Reduktionen

Die bisher beschriebenen enzymatischen Reduktionen wurden unter dem Aspekt der Erzielung möglichst hoher Umsätze durchgeführt. Während hierbei in den semipräparativen Ansätzen primär die enzymatische Aktivität bestätigt wurde, konnten bei den präparativen Reduktionen die erzielbaren Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde in der Regel eine größere Menge an Enzym und Cofaktor zugegeben. Die so verwendeten Bedingungen sind bei einem Scale-Up nicht einsetzbar, da der Enzym- und Cofaktor-Bedarf zu hoch wäre. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Parameter der Reduktionen optimiert. Hierfür wurde 1-Chlor-4-phenyl-3-butan-2-on (**30a**) als Testsubstrat ausgesucht, da es sich trotz seiner hohen Funktionalisierung in Puffer als sehr stabil erwiesen hat und mit guten Umsätzen enzymatisch reduziert wurde (s. Abschnitt 2.4.5). Darüber hinaus stellt der bislang nicht beschriebene enantiomerenreine Alkohol **30b** einen interessanten Baustein dar, an dem die Folgechemie der propargylischen Alkohole etabliert werden kann.

2.6.1 Lösungsmittelverträglichkeit der Enzyme

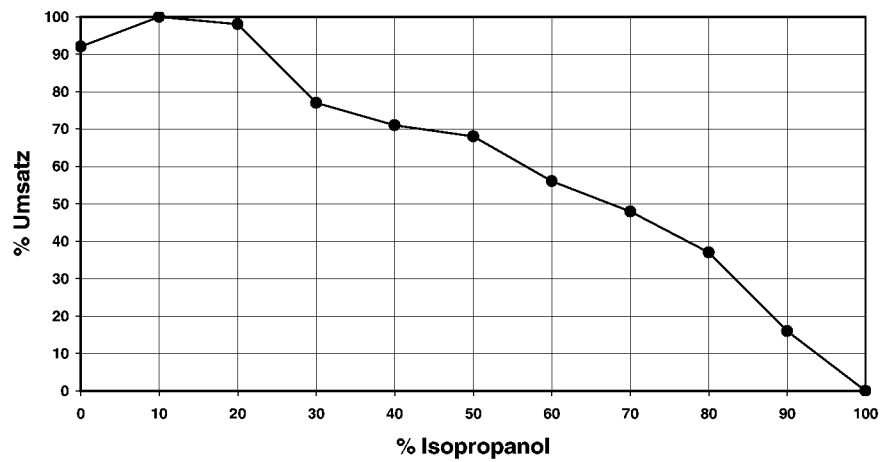
Bei der Verbindung **30a** handelt es sich um einen in Wasser schwer löslichen Feststoff. Da hierdurch die enzymatische Umsetzung erschwert wird, sollte eine Erhöhung der Löslichkeit zu einer deutlich verbesserten Produktbildung führen. Die Erhöhung der Löslichkeit kann durch Zugabe organischer Lösungsmittel erreicht werden. Für den Einsatz bei der enzymatischen Reduktion bieten sich 2-Propanol bzw. Ethanol an, da es sich hierbei um mögliche Cosubstrate der Oxidoreduktasen *recLB*-ADH, HL-ADH und *TB*-ADH handelt. Als positiver Nebeneffekt sollte durch die erhöhte Konzentration dieser Alkohole eine Verschiebung des chemischen Gleichgewichts in Lösung hin zu den gewünschten Produkten bewirkt werden.

Zur Überprüfung der Stabilität der Enzyme in Gegenwart erhöhter Alkoholkonzentration wurden 2 U *recLB*-ADH, 2 U HL-ADH oder 5 U *TB*-ADH in je 10 mL von TEA-Puffer- / Alkohol-Gemischen unterschiedlicher Verhältnisse gegeben. Nach 16 h wurden 0.03 μmol NAD(P)⁺ sowie 50 μmol **30a** hinzugefügt. Nach weiteren 5 h wurde dann eine Probe mit Ethylacetat extrahiert und die Umsätze per GCMS überprüft. Im Ergebnis zeigten die drei Enzyme sehr unterschiedliche Eigenschaften (Abb. 2-27). *recLB*-ADH besaß eine überraschend hohe und in dieser Form für das Enzym noch nicht beschriebene Lösungsmittelstabilität. Erst ab 20 % 2-Propanol wurde ein Rück-

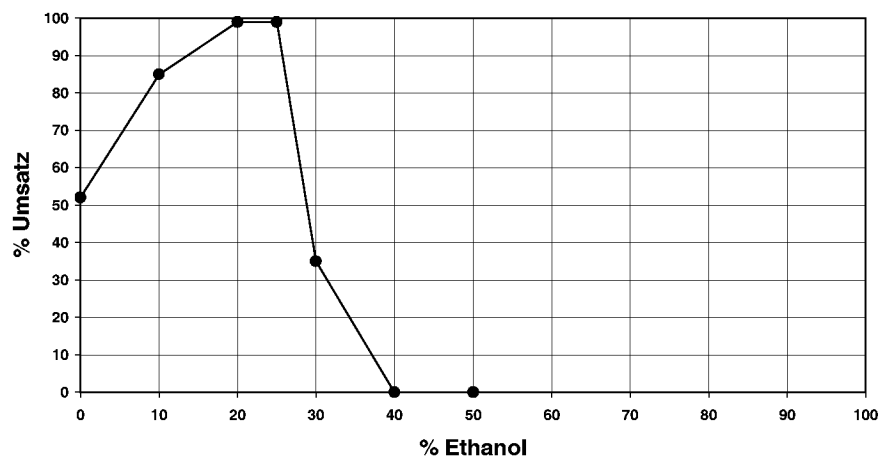
gang des Umsatzes registriert. Selbst bei 50 % Lösungsmittelanteil lag der Umsatz bei 70 %. Ab diesem Punkt nahmen die Werte dann nahezu linear ab. Sogar bei einem Anteil von 90 % 2-Propanol konnte noch eine Restaktivität von 16 % registriert werden. Die Umsätze der HL-ADH zeigten ein deutliches Maximum. Die zu Beginn beobachtete Erhöhung der Umsätze mit steigenden Lösungsmittelanteilen, die in abgeschwächter Form auch bei der *recLB*-ADH verzeichnet wurde, ist vermutlich auf die verbesserte Löslichkeit des Substrats zurückzuführen. Mit HL-ADH wurde bis zu einem Ethanolanteil von 25 % einen quantitativer Umsatz erzielt, der bei der weiteren Erhöhung des organischen Lösungsmittelanteils deutlich zurückging. Bei einem Anteil von 40 % Ethanol konnte kein Produkt mehr nachgewiesen werden. Die Kurve der *TB*-ADH besitzt einen monoton fallenden Verlauf. Die Umsätze gingen bei 0 – 40 % 2-Propanol in etwa linear bis auf einen Wert von 12 % zurück. Der Umsatz fiel anschließend im Bereich von 40 – 70 % Alkohol weiter bis auf Null ab.

recLB-ADH und HL-ADH haben sich für enzymatische Umsetzungen in Puffer mit einem Alkoholanteil von 20 – 30 % als sehr stabil erwiesen, wodurch nahezu quantitative Umsätze erzielt wurden. *TB*-ADH war in diesem Bereich weniger gut geeignet, da die Umsätze bei Zugabe von 30 % 2-Propanol bereits bis auf unter 40 % abgefallen waren.

Umsatzverlauf der recLB-ADH



Umsatzverlauf der HL-ADH



Umsatzverlauf der TB-ADH

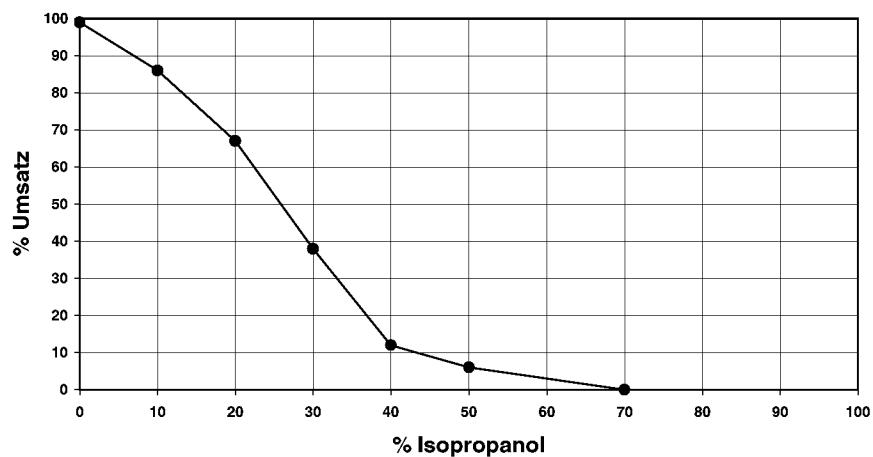


Abb. 2-27: Abhängigkeit der enzymatischen Umsätze vom Alkoholanteil des Mediums. – 2 U (recLB-ADH, HL-ADH) bzw. 5 U (TB-ADH) wurden 16 h in je 10 mL Puffer/Alkohol vorgelegt. Die verbliebene Aktivität wurde anschließend über den Umsatz von **30a** nach einem Zeitraum von 5 h bestimmt.

2.6.2 Optimierung der Konzentrationen in den enzymatischen Ansätzen

Für die weiteren Optimierungen wurden mit *recLB*-ADH und HL-ADH je ein (*R*)- und ein (*S*)-spezifisches Enzym ausgewählt. Auf den Einsatz von *TB*-ADH wurde verzichtet, da das Enzym die gleiche Spezifität wie HL-ADH besitzt, sich aber bezüglich der Lösungsmittelverträglichkeit als ungeeigneter erwiesen hat (s. Abschnitt 2.6.1). Darüber hinaus würde die höhere Reaktionstemperatur bei der *TB*-ADH katalysierten Reduktion zu einer erhöhten Instabilität der Substrate führen (s. Abschnitt 2.2; Tab. 2-5). Ziel der Optimierung war primär die Verminderung der eingesetzten Cofaktor- und Enzymmenge, da diese Faktoren maßgeblich zu den Gesamtkosten der enzymatischen Umsetzung beitragen. Zusätzlich wurde untersucht, welche Substratkonzentrationen bei den Enzymen ohne merkliche Einbußen bei den Umsätzen eingesetzt werden können.

Als Reaktionsführung wurde eine Fed-Batch-Strategie verwendet, bei der ein Teil des eingesetzten 2-Propanols bzw. Ethanol in Lösung vorgelegt wurde. In dem restlichen Alkohol wurde das Substrat **30a** gelöst und in mehreren Portionen im stündlichen Abstand zu dem Enzym-Ansatz hinzugegeben.

Cofaktor-Konzentration

Die zugegebene NAD(P)⁺-Menge wurde stufenweise reduziert. Als entscheidende Zielgröße wurde hierbei der Umsatz beobachtet. Solange eine quantitative Umsetzung des Substrats **30a** stattfand, wurde die eingesetzte Cofaktor-Konzentration in dem nächsten Fed-Batch verringert. Hierdurch konnten in den Ansätzen Nr. 4 und Nr. 8 TTNs von 20.000 bzw. 15.000 erzielt werden (Tab. 2-15, 2-16). Finanziell trägt der Cofaktor ab einer TTN von 1000 kaum noch zu den Gesamtkosten bei.^[95] Da dieser Wert sowohl für *recLB*-ADH als auch für HL-ADH bereits um eine Zehner-Potenz übertroffen werden konnte, wurde an dieser Stelle auf eine weitere Reduzierung der Cofaktor-Konzentration verzichtet.

Tab. 2-15: *recLB*-ADH katalysierte Reduktionen

Ansatz	1	2	3	4	5	6
Medium	TEA	TEA	TEA	TEA	H ₂ O	TEA
Volumen (Medium)	20 mL	20 mL	10 mL	20 mL	20 mL	20 mL
2-Propanol	4 mL	4 mL	2 mL	4 mL	4 mL	4 mL
Substrat (30a) (in x mL 2-Propanol)	10 mg (0.4 mL)	10 mg (0.4 mL)	200 mg (2 mL)	200 mg (4 mL)	200 mg (4 mL)	200 mg (4 mL)
Substratendkonz. ^a	2.8 mmol/L	2.8 mmol/L	112 mmol/L	56 mmol/L	56 mmol/L	56 mmol/L
Zugabezeit	1 h	1 h	30 h	20 h	10 h	10 h
Reaktionszeit	1 h	1 h	96 h	40 h	48 h	48 h
<i>recLB</i> -ADH-Konz. ^a	250 U/L	1000 U/L	1000 U/L	1000 U/L	1000 U/L	1000 U/L
NADP ⁺ -Konz. ^a	28 µmol/L	28 µmol/L	2.8 µmol/L	2.8 µmol/L	2.8 µmol/L	2.8 µmol/L
TTN ^b	100	100	40.000	20.000	20.000	20.000
Umsatz	20 %	> 99 %	85 %	> 99 %	80 %	85 %

a) bezogen auf das Volumen des Mediums

b) berechnet für 100 % Umsatz

Tab. 2-16: *HL*-ADH katalysierte Reduktionen

Ansatz	7	8	9	10	11
Medium	TEA	TEA	TEA	H ₂ O	TEA
Volumen (Medium)	10 mL	10 mL	20 mL	20 mL	20 mL
Ethanol	1.5 mL	1.5 mL	4 mL	4 mL	4 mL
Substrat (30a) (in x mL 2-Propanol)	30 mg (0.9 mL)	30 mg (0.9 mL)	200 mg (4 mL)	200 mg (4 mL)	200 mg (4 mL)
Substratendkonz. ^a	17 mmol/L	17 mmol/L	56 mmol/L	56 mmol/L	56 mmol/L
Zugabezeit	3 h	3 h	20 h	10 h	10 h
Reaktionszeit	24 h	24 h	46 h	30 h	48 h
<i>HL</i> -ADH-Konz. ^a	200 U/L	500 U/L	1000 U/L	250 U/L	250 U/L
NAD ⁺ -Konz. ^a	4.7 µmol/L	1.1 µmol/L	2.8 µmol/L	2.8 µmol/L	2.8 µmol/L
TTN ^b	3.600	15.000	20.000	20.000	20.000
Umsatz	65 %	> 99 %	50 %	50 %	55 %

a) bezogen auf das Volumen des Mediums

b) berechnet für 100 % Umsatz

Enzym-Konzentration

Die Verringerung der eingesetzten Enzym-Menge ist bei der HL-ADH besonders wichtig, da das Enzym nicht rekombinant verfügbar ist. Die Kosten pro Unit Enzym fallen dementsprechend höher aus als bei der rekombinanten Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*. Letztere kann in einer 10 Liter Fermentation in einer Ausbeute von 600.000 Units gewonnen werden, wodurch recLB-ADH bei der wirtschaftlichen Betrachtung der Fed-Batch-Ansätze nur geringe Bedeutung zukommt.^[32] Im Ergebnis wurde die Enzym-Konzentration bei weiterhin quantitativen Umsätzen für recLB-ADH bis auf 1000 U/L und für HL-ADH bis auf 500 U/L abgesenkt (Tab. 2-15, 2-16; Ansätze 2 + 8). Eine weitere Reduzierung der eingesetzten Enzym-Menge führte zu einem deutlichen Rückgang der erzielten Umsätze (Ansätze 1 + 7).

Substrat-Konzentration

Da enzymatische Prozesse häufig bei niedrigen Substrat-Konzentrationen stattfinden, resultieren größere Produktmengen oft in einem großen Reaktionsvolumen. Als dritte Zielgröße wurde somit die Substrat-Konzentration solange erhöht, bis ein Einbruch der erzielten Umsätze registriert wurde. Hierbei haben sich 56 mmol/L **30a** für recLB-ADH und 17 mmol/L **30a** für HL-ADH als Grenzwerte ergeben, bei denen das Substrat **30a** gerade noch vollständig umgesetzt wurde (Tab. 2-15, 2-16; Ansätze 3+4 bzw. 8+9).

2.6.3 Wasser als Medium

Es wurden je zwei nahezu identische Fed-Batch-Ansätze mit den Enzymen recLB-ADH und HL-ADH durchgeführt (Tab. 2-15, 2-16; Ansätze 5+6 bzw. 10+11), in denen TEA-Puffer und entionisiertes Wasser als Reaktionsmedium verglichen wurden. Voraussetzung für die Quantifizierung einer möglichen Umsatz-Differenz war, daß bei keinem dieser Ansätze das Substrat vollständig reduziert wird. Im Ergebnis wurden bei der Reduktion in Wasser annähernd die gleichen Werte wie in Puffer erhalten. Die Ansätze in Wasser erfordern eine externe Regulierung des pH-Wertes, da dieser gegen Ende der enzymatischen Umsetzung bis auf einen Wert von unter 4 abgefallen war. Die leichte Verschlechterung der Umsätze in Wasser von jeweils 5 % kann somit auf eine verlangsamte enzymatische Reduktion im sauren pH-Bereich sowie eine Denaturierung des Enzyms in dem sauren Milieu zurückgeführt werden.

Ein aus Vergleichsgründen durchgeführter Austausch des Puffers gegen entionisiertes Wasser bei Fed-Batch-Ansätzen mit *TB*-ADH führte zu einem Umsatz-Rückgang von über 70 %. Ungepuffertes Wasser als Lösungsmittel kann dementsprechend nicht beliebig bei Alkoholdehydrogenasen eingesetzt werden. In den durchgeführten Arbeiten mit *recLB*-ADH und HL-ADH ergibt sich durch ungepuffertes Wasser als Reaktionsmedium eine interessante Möglichkeit, die Reaktionskosten weiter zu senken und die Aufarbeitung zu erleichtern.

2.6.4 Scale-Up der optimierten Reduktionen

Die in den Abschnitten 2.6.1 – 2.6.3 optimierten Reaktionsbedingungen wurden in den präparativen Maßstab übertragen. Zu diesem Zweck wurden je 8.8 mmol **30a** mit den Enzymen *recLB*-ADH bzw. HL-ADH reduziert. Die einzelnen Komponenten wurden entsprechend den Ergebnissen der Optimierungen eingesetzt (Abb. 2-28). Hieraus ergaben sich für den *recLB*-ADH-Ansatz Konzentrationen von 44 mmol/L **30a** und 20 $\mu\text{mol/L}$ NADP^+ bei einem Reaktionsvolumen von 200 mL. Die HL-ADH-katalysierte Reduktion wurde mit Konzentrationen von 17.6 mmol/L **30a** und 16 $\mu\text{mol/L}$ NAD^+ in einem Reaktionsvolumen von 500 mL durchgeführt.

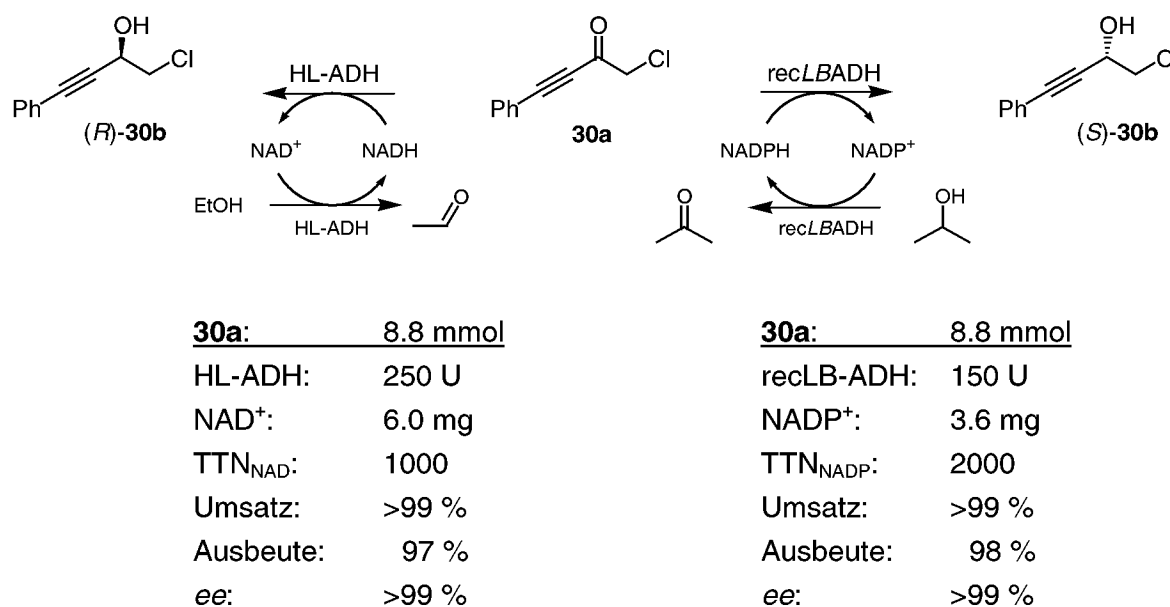


Abb. 2-28: Enzymatische Reduktionen von 1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on (**30a**)

Um auf eine Regulierung des pH-Wertes verzichten zu können, wurde TEA-Puffer als Lösungsmittel verwendet. Im Fall der *recLB*-ADH wurde das Substrat **30a** gelöst in 2-Propanol mittels einer Hamilton-Pumpe über einen Zeitraum von 20 h kontinuier-

lich bei RT zudosiert und weitere 28 h gerührt. Bei der HL-ADH-katalysierten Reduktion wurde **30a** bei RT in Ethanol gelöst und in drei Portionen mit je 1 h Abstand zugegeben. Hier betrug die gesamte Reaktionsdauer 36 h. In beiden Ansätzen wurde das reine Produkt (GCMS, NMR) durch Extraktion ohne weitere Aufarbeitung in einer Ausbeute von größer 97 % isoliert. Der Enantiomerenüberschuß der Alkohole (*S*)- und (*R*)-**30b** betrug auch in den präparativen Umsetzungen größer 99 %.

Das aromatische Methyl-Keton **2a** wurde ebenfalls mit dem Enzym recLB-ADH mit den bei der Umsetzung der Verbindung **30a** bereits bewährten Reaktionsbedingungen reduziert. Zusätzlich zur Übertragbarkeit auf andere Verbindungen wurde hierbei auch gezeigt, daß der Austausch von Puffer gegen nicht gepuffertes Wasser auch im präparativen Maßstab möglich ist (s. Abschnitt 2.6.3). Es wurden 13.9 mmol **2a** in einem Fed-Batch mit 250 U recLB-ADH und 6 mg NADP⁺ in 250 mL entionisiertem Wasser reduziert. Nach einer Reaktionszeit von 30 h wurde ein Umsatz von größer 99 % festgestellt. Eine Verschlechterung des Umsatzes aufgrund des während der Reaktion bis auf einen Wert von 4.5 gesunkenen pH-Wertes wurde somit unter diesen Bedingungen nicht beobachtet. Das reine Produkt (*R*)-**2b** (GCMS, NMR) wurde nach Extraktion mit Ethylacetat ohne weitere Aufarbeitung in einer Ausbeute von 94 % erhalten werden.

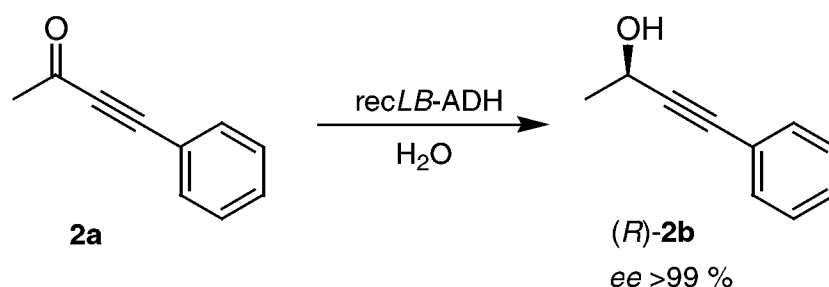


Abb. 2-29: recLB-ADH katalysierte Reduktion von 4-Phenyl-3-buten-2-on (**2a**). – **2a** (2.08 g), NADP⁺ (6.0 mg; TTN = 2000), recLB-ADH (250 U), Wasser (1 mM MgCl₂; 250 mL), RT (94 %).

Zusammenfassend hat sich durch die Optimierung der enzymatischen Reduktionen ein kostengünstiges Verfahren ergeben. Die benötigten Mengen an Enzym und Co-faktor konnten soweit reduziert werden, daß eine kostengünstige Synthese propargylierter Alkohole ermöglicht wurde. Hierbei stellt die Möglichkeit ungepuffertes Wasser als Reaktionsmedium zu verwenden gerade aus technischer Sicht einen weiteren interessanten Vorteil dar. Die Aufarbeitung durch Extraktion ohne zusätzliche Reinigungsschritte ermöglicht eine einfache Isolierung der gewünschten Produkte. Die nahezu quantitativen Ausbeuten der enantiomerenreinen Alkohole und die hohen

TTNs der Cofaktoren sind ein wichtiger Beleg für die hohe Effizienz dieser enzymatischen Synthese.

2.7 Folgechemie

2.7.1 Reaktionen an C1 und C2

*i) Folgechemie der TMS-substituierten Alkohole **28b** und **29b***

Die Anwendungsmöglichkeiten der enantiomerenreinen Alkohole **28b** und **29b** sollten nachfolgend durch Beispiele belegt werden. Die Reaktionen wurden an racemischem **28b** und **29b** getestet und sollten anschließend mit den Alkoholen (*S*)- und (*R*)-**28b** sowie (*S*)- und (*R*)-**29b** wiederholt werden. Die TMS-Verbindungen erwiesen sich jedoch für die Folgechemie als nur mäßig geeignet. Die Umsetzungen mit KCN oder NaN₃, mit denen das Halogenid gegen Cyanid bzw. Azid substituiert werden sollte, ergaben eine Vielzahl von Nebenprodukten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die TMS-Gruppe unter den angewandten Reaktionsbedingungen leicht abgespalten wird. Um Reaktionen ohne die Bildung von Nebenprodukten durchzuführen, wurde die TMS-Gruppe daher quantitativ entfernt. Zur besseren Handhabung der flüchtigen Produkte wurden die Alkohole vor der TMS-Spaltung mit einer TBS-Schutzgruppe versehen. Die Einführung der TBS-Schutzgruppe wurde für die Alkohole **28b** und **29b** in jeweils über 90 % Ausbeute mit *t*-Butyldimethylsilyltriflat durchgeführt (Abb. 2-30).^[96] Die Abspaltung der TMS-Gruppe gelang mittels KCN in Ethanol / Wasser (4:1) in 70 % (**93**) bzw. 84 % (**94**) Ausbeute, wobei die reinen Produkte (GCMS, NMR) ohne weitere Aufarbeitung durch Extraktion erhalten wurden.

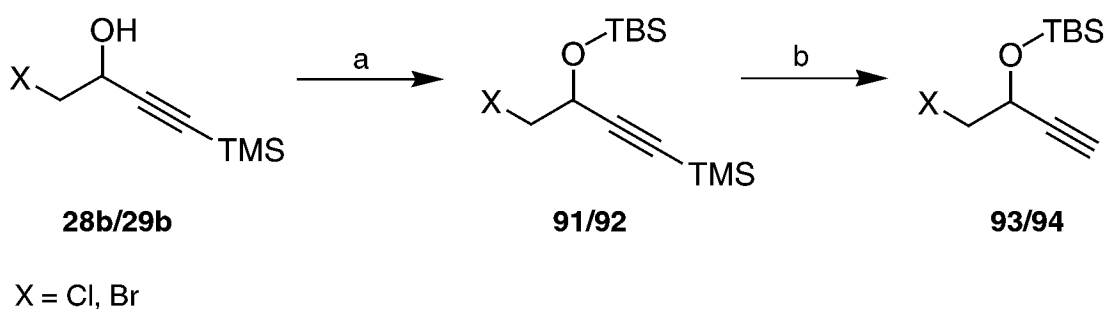


Abb. 2-30: Folgechemie der TMS-Alkinole. – a) *t*-Butyldimethylsilyltriflat, Triethylamin, CH₂Cl₂, 0°C (**91**: 90% / **92**: 94 %).^[96] – b) KCN, EtOH / H₂O (4:1), 50°C (**93**: 70 % / **94**: 84 %).

ii) Folgechemie der Alkohole **30b** und **50b**

Die vielseitige Verwendbarkeit der α -halogenierten propargylischen Alkohole, die bereits ausführlich für Methyl-Alkinole beschrieben worden ist (s. Abschnitt 1.1.2), wurde nun für die α -halogenierten Produkte demonstriert. Als Test-Substrat wurde die Verbindung **30b** ausgewählt. Daneben wurde die Übertragbarkeit der Synthesen in einigen Beispielen anhand des silylierten Alkohols **50b** demonstriert. Die Folgechemie wurde zunächst an racemischem Alkinolen getestet und anschließend auf die enantiomerenreinen Produkte übertragen.

Epoxid-Synthese

Einleitung

Synthesen terminaler propargylischer Epoxide in enantiomerenangereicherter Form wurden auf zwei mehrstufigen Wegen beschrieben (Abb. 2-31).^[76] In der Synthese von Kanger et al. wird das Weinsäurederivat **95** in sechs Syntheseschritten in das TBS-substituierte Epoxid **96** überführt (Weg I). Das enantiomerenreine Produkt **96** wird in einer Gesamtausbeute von 20 % erhalten. Die universelle Übertragbarkeit des Verfahrens auf andere Verbindungen wurde noch nicht demonstriert. Die zweite beschriebene Synthese geht von chiralen β -Ketosulfoxiden aus, die ihrerseits in zwei Stufen dargestellt werden (Weg II). Die Ketofunktion wird diastereoselektiv *syn* bzw. *anti* reduziert. Abschließend wird die Sulfoxid-Gruppe über das Sulfid in das Epoxid überführt. Nachteilig bei dieser fünfstufigen Synthese sind die niedrigen Enantiomerenüberschüsse der Produkte von 66 – 88 % ee.

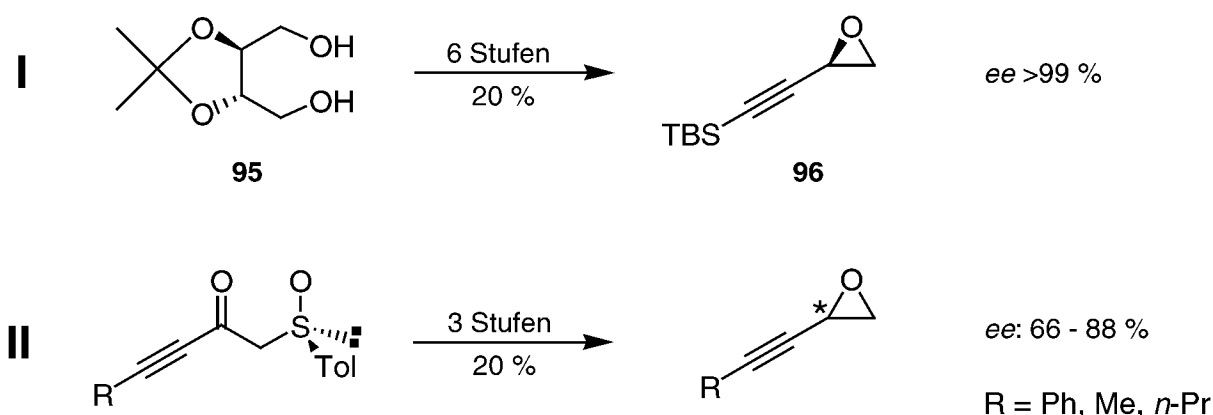


Abb. 2-31: Bekannte Zugänge zu enantiomerenangereicherten, terminalen propargylischen Epoxiden.^[76]

Ergebnisse

In den durchgeführten Arbeiten mußte zunächst eine Base für die Überführung der α -Chlor-Alkinole in die Epoxide gefunden werden. Die Basen KOH, K_2CO_3 und NaH erwiesen sich bei den Alkoholen **30b** und **50b** als ungeeignet, da die entsprechenden Epoxide in Ausbeuten von maximal 30 % erhalten wurden.^[97] Alternativ wurde die Base DBU in CH_2Cl_2 getestet. Chemla et al. wendeten diese Bedingungen bereits erfolgreich bei der Synthese eines internen propargylischen Epoxids an.^[98] In den vorliegenden Arbeiten konnte auf diesem Weg nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen ein Umsatz von 58 % erzielt werden. Zur Erhöhung des Umsatzes wurde eine Mischung aus Ethanol / Wasser (4:1) als Lösungsmittel getestet, da in diesem Medium bereits die Substitution des Broms eines α -Bromo-Alkohols gegen einen Nitrilsubstituenten in guter Ausbeute beschrieben wurde.^[99] Da diese Reaktion über die *in situ* Bildung eines Epoxids verläuft, sollten die Bedingungen auch bei der Epoxid-Bildung aus dem halogenierten Alkohol **30b** zu hohen Umsätzen führen. Der Alkohol **30b** wurde bei RT durch den Einsatz von 3 Äquivalenten DBU in Ethanol / Wasser (4:1) in 90 min quantitativ zu dem propargylischen Epoxid **97** umgesetzt (Abb. 2-32). Um das Produkt besser extrahieren zu können, wurde das Ethanol im Vakuum eingeeengt. Hierbei kam es zu einer Zersetzung der Verbindung **97**. Demzufolge wurde der Reaktionsansatz bei einem zweiten Versuch vor der Extraktion mit dem fünffachen Volumen an Wasser verdünnt und das Epoxid **97** anschließend mit Ethylacetat extrahiert. In einem Ansatz von 16.7 mmol racemischem **30b** fiel das Produkt **97** auf diesem Weg in 90 % Ausbeute rein (GCMS, NMR) als orangenes Öl an. Durch säulenchromatographische Aufreinigung wurde das Epoxid **97** in 82 % Ausbeute als farbloses Öl erhalten.

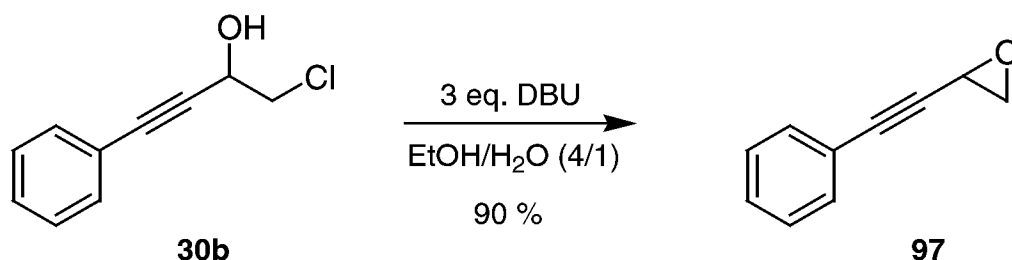


Abb. 2-32: Synthese des propargylischen Epoxids **97**

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses wurden anschließend 3.3 mmol (*R*)-**30b** in das Epoxid **97** überführt. Da die Enantiomere des racemischen Epoxids **97** mittels HPLC oder GC an chiraler Phase nicht getrennt werden konnten, wurde **97** mit KCN zu dem Nitril **100** geöffnet (Abb. 2-34). Über HPLC an chiraler Phase wurde

nun ein Enantiomerenüberschuß von größer 99 % ermittelt. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration von **97** erfolgte über einen Vergleich des Drehwertes mit Literaturdaten.^[76c] Der Vergleich ergab, daß (*R*)-**30b** zu dem (*R*)-Enantiomer des Epoxides **97** umgesetzt worden war.

Der TBS-substituierte Alkohol (*S*)-**50b** wurde mit einer Ausbeute von 76 % in das entsprechende Epoxid (*S*)-**96** überführt, wodurch die Übertragbarkeit der Reaktion auf andere chlorierte Alkinole gezeigt wurde.

Durch die aufgezeigte Synthese sind enantiomerenreine, terminale propargylische Epoxide erstmals allgemein zugänglich gemacht worden. Wie schon bei den α -halogenierten Alkoholen handelt es sich auch hier um hochfunktionalisierte C4-Bausteine, die ihrerseits einer vielseitigen Folgechemie unterzogen werden können. Die meisten dieser Reaktionen, wie z. B. nucleophile Substitutionen an C1 und C2, wurden bislang ausschließlich an racemischen propargylischen Epoxiden durchgeführt.^[100] Das große Potential der enantiomerenreinen Epoxide für die Natur- und Wirkstoffsynthese wurde in der Darstellung von HMG-CoA Reduktase Inhibitoren bereits erfolgreich unter Beweis gestellt (Abb. 2-33).^[101]

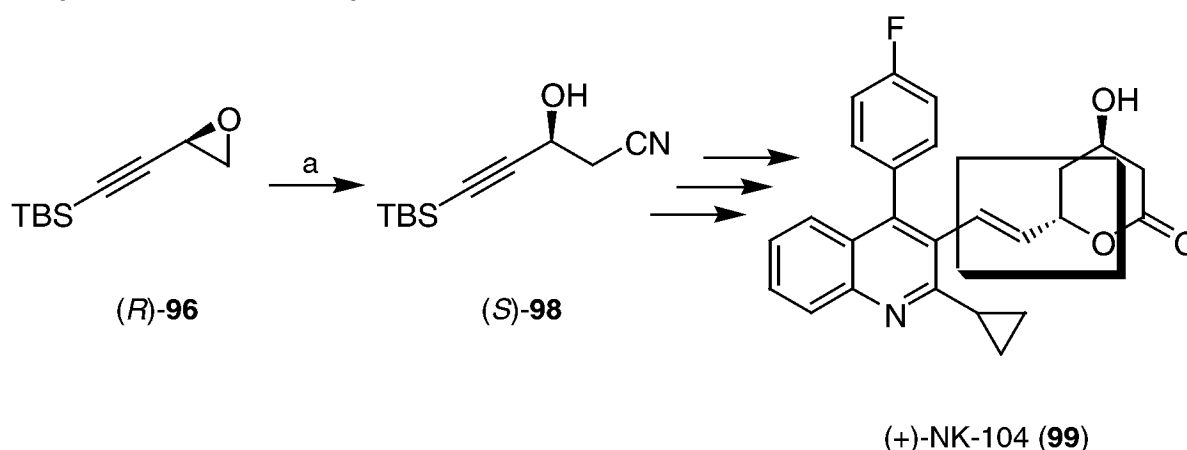


Abb. 2-33: Synthese des HMG-CoA Reduktase Inhibitors (+)-NK-104 (**99**).^[101] – a) KCN (2 eq.), EtOH, Phosphat-Puffer (pH = 7), RT (58 %).

Nitril-Synthese

Propargylische α -cyano-Alkohole können nicht durch enantioselektive Reduktion des entsprechenden Ketons dargestellt werden, da die Ketone instabil und somit nicht isolierbar sind (s. Abschnitt 2.1.1).^[48] Im Rahmen der Synthese des HMG-CoA-Reduktase Inhibitors (+)-NK-104 (**99**) (Abb. 2-33) wurde die bislang einzige Synthese

enantiomerenangereicherter, propargylicher α -cyano-Alkohole beschrieben.^[101] Hierbei wurde Epoxid (*R*)-**96** mit 2 Äquivalenten KCN in einem Ethanol / Puffer-Gemisch bei Raumtemperatur in 58 % Ausbeute in das propargyliche Nitril (*S*)-**98** überführt.

Da die Umsetzung der Alkohole **30b** und **50b** unter diesen Reaktionsbedingungen sehr langsam verlief, wurden **30b** und **50b** mit einem dreifachen Überschuß KCN bei einer Temperatur von 50°C umgesetzt (Abb. 2-34). Als Lösungsmittel erwies sich wiederum Ethanol / Wasser (4:1) als geeignet. Die Reaktion verlief in diesem Gemisch ohne die Bildung von Nebenprodukten (s. auch Epoxid-Synthese). Der Verlauf der Reaktion über die Zwischenstufe des Epoxids konnte durch Nachweis des Epoxids **97** mittels GCMS belegt werden. Hiyama et al. hatten gezeigt, daß die Öffnung des Epoxids unter Retention verläuft,^[101] wodurch die jeweilige absolute Konfiguration der Nitrile über die Epoxide zugeordnet werden konnte (Abb. 2-34). Der über HPLC an chiraler Phase bestimmte Enantiomerenüberschuß der Nitrile beträgt größer 99 %.

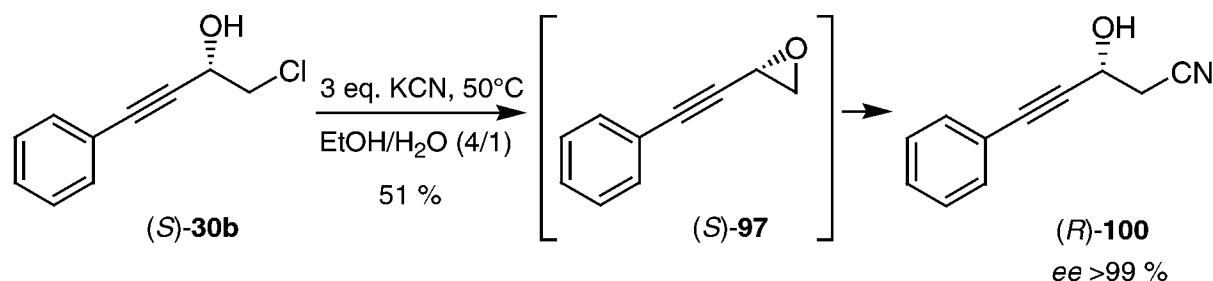


Abb. 2-34: Synthese des propargylichen Nitrils (*R*)-**100**

Das Cyanid **100** wurde unterschiedlichen sowohl sauren als auch basischen Bedingungen ausgesetzt. Im Ergebnis führten alle Reaktionen neben der gewünschten Verseifung der Nitril-Funktion auch zu einer Elimination der Hydroxy-Gruppe. Hierbei wurde mit der Ausbildung des konjugierten Systems auch die Chiralität der Verbindungen zerstört.

Eine mögliche Anwendung des Nitrils **100** besteht in der Synthese des Naturstoffs Kawain, der eine gefäßerweiternde und spannungslösende Wirkung auf den menschlichen Organismus besitzt.^[102] Über eine Blaise-Reaktion mit einem Brom-Ester könnte hierfür das Kohlenstoffgerüst aufgebaut und anschließend entsprechend modifiziert werden (Abb. 2-35).^[103]

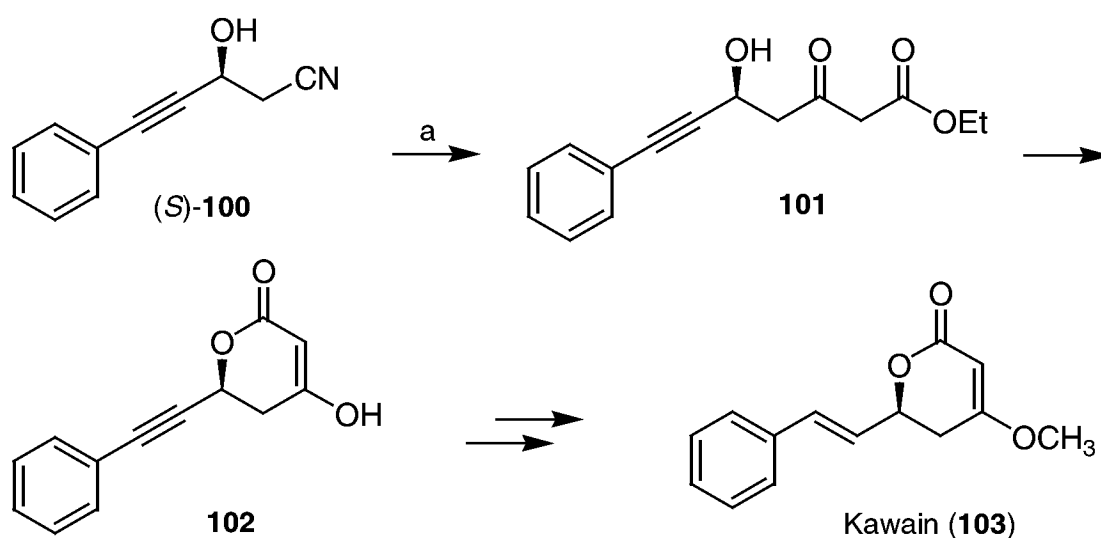


Abb. 2-35: Mögliche Synthese des Wirkstoffs Kawain (103). – a) aktiviertes Zn, $\text{BrCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, THF, Ultraschall, 30°C .^[103]

Weitere Synthesen

Das Azid **104** konnte nicht durch direkte Umsetzung des Alkohols **30b** mit NaN_3 erhalten werden, da die Reaktion in Ethanol / Wasser (4:1) ausschließlich die Bildung diverser Nebenprodukte ergab. Die erste Synthese eines nicht racemischen, chiralen Alkinols mit einem α -Azid-Substituenten gelang durch Öffnung des Epoxids (S)-**97** mit NaN_3 in DMF bei 80°C , wobei das Azid (S)-**104** nach säulenchromatographischer Aufreinigung in einer Ausbeute von 17 % erhalten wurde (Abb. 2-36).^[104] Die Reaktion verlief nicht streng stereoselektiv: Der mittels HPLC an chiraler Phase bestimmte Enantiomerenüberschuß des Produkts (S)-**104** betrug 96 %.

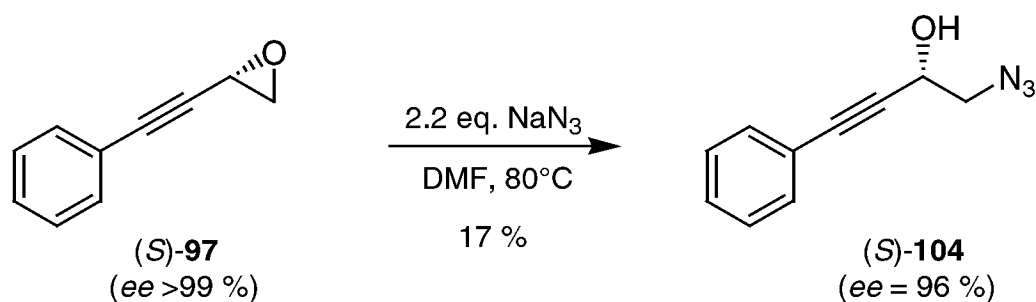


Abb. 2-36: Synthese des Azids (S)-104

Während die basische Hydrolyse von (S)-**97** nur zu Nebenprodukten führte, verliefen die neutrale und saure Hydrolyse im analytischen Maßstab mit einem Umsatz von

größer 90 % zum Diol **105** (Abb. 2-37). Die Analyse des Diols **105** mittels HPLC an chiraler Phase ergab, daß alle Reaktionen unter starker Racemisierung verlaufen waren, so daß auf eine präparative Synthese des Diols **105** verzichtet wurde.

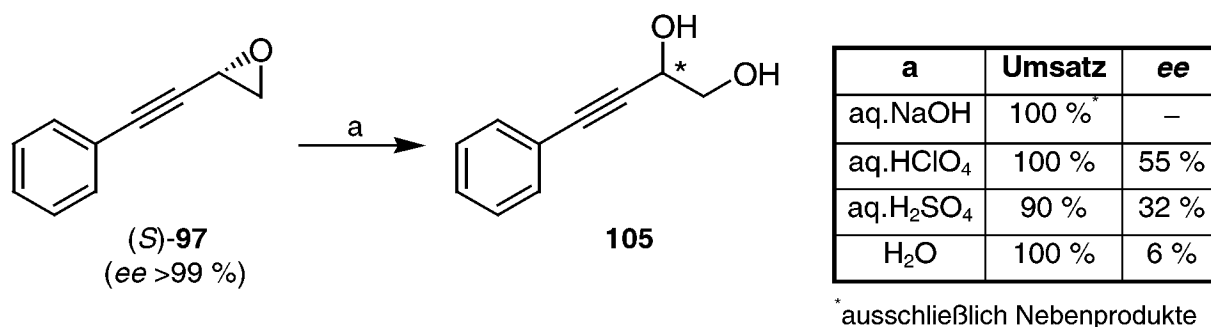


Abb. 2-37: Synthese des Diols **105**

2.7.2 Reaktionen an C3 und C4

In Abschnitt 2.5 wurde die enzymatische Reduktion olefinischer Ketone untersucht. Die erzielten Umsätze und Enantiomerenüberschüsse waren in den meisten Fällen nicht befriedigend. Alternativ wurden nun die gut zugänglichen propargylischen Alkohole zu den (*E*)- und (*Z*)-Olefinen umgesetzt. Wie schon die Folgechemie an C1 und C2 (Abschnitt 2.7.1) wurden auch diese Reaktionen an dem hochfunktionalisierten halogenierten Alkinol **30b** etabliert.

(E)-Olefine

Für die Überführung von Dreifachbindungen zu (*E*)-Doppel-Bindungen hat sich Red-Al als preisgünstiges und effektives Reagenz bewährt.^[105] Bei der Umsetzung von **30b** mit 1.6 Äquivalenten Red-Al bei Raumtemperatur wurde nach einem Zeitraum von 4 min mittels GCMS ein quantitativer Umsatz registriert. Hierbei entstanden 17 % des dehalogenierten (*E*)-Alkohols als Nebenprodukt. Nach 15 min war dieser Anteil durch fortschreitende Dehalogenierung des Produkts auf 21 % angestiegen. Der Versuch wurde bei 0°C wiederholt, um die bei Raumtemperatur schnell verlaufende Reduktion der Dreifachbindung zu verlangsamen. Im Ergebnis blieb die Reaktionsdauer unverändert. Der Anteil des dehalogenierten Alkohols wurde durch die Temperatursenkung auf etwa 10 % reduziert. Die isolierte Ausbeute des (*E*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ols (**73b**) betrug nach chromatographischer Aufreinigung 77 % (Abb. 2-38). Das Olefin wurde durch die Reduktion mit Red-Al ausschließlich als

(*E*)-Isomer erhalten. Der *ee* des Produkts (*S*)-**73b** wurde mittels HPLC an chiraler Phase zu größer 99 % bestimmt.

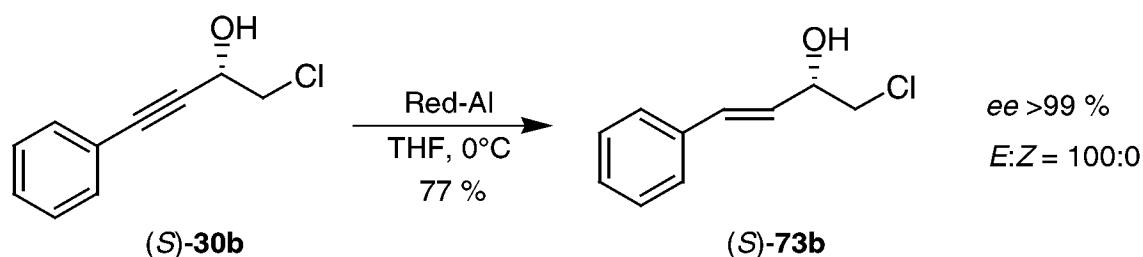


Abb. 2-38: Synthese des (*E*)-Olefins (*S*)-**73b**

(Z)-Olefine

Ein geeignetes Reagenz für die Synthese von (*Z*)-Olefinen über acetylenische Ausgangsverbindungen ist der Lindlar-Katalysator.^[106] Hierbei handelt es sich um einen mit Blei vergifteten Palladium-Katalysator. Die Reduktion der Dreifachbindung geschieht mit molekularem Wasserstoff in Anwesenheit einer Aminbase. Die Durchführung der Reduktion bei atmosphärischem Druck ermöglicht eine einfache Reaktionsführung. Die Reduktion von (*S*)-**30b** wurde in DMF in Anwesenheit von Ethylendiamin durchgeführt (Abb. 2-39). Nach 75 min war die Verbindung quantitativ umgesetzt. Neben 5 % des unerwünschten (*E*)-Isomers führte die Reaktion auch zu ca. 10 % des gesättigten Alkohols. Die chromatographische Aufarbeitung erwies sich als schwierig, so daß das in 72 % Ausbeute isolierte Produkt (*S*)-**72b** noch 5 % nicht identifizierter Verunreinigungen enthielt. (*S*)-**72b** wurde über die Reduktion von (*S*)-**30b** in einem *E/Z*-Verhältnis von 5:95 und enantiomerenrein erhalten.

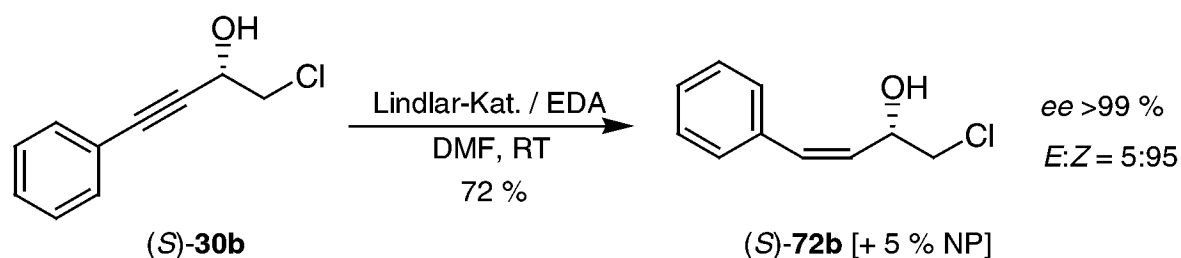


Abb. 2-39: Synthese des (*Z*)-Olefins (*S*)-**72b**

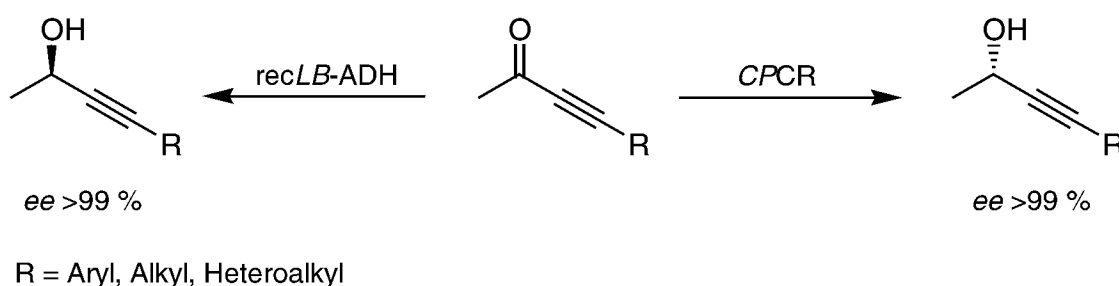
Im Vergleich mit der enzymatischen Reduktion der Ketone **72a** und **73a** (Tab. 2-14) erweist sich die Synthese von **72b** und **73b** über den propargylichen Alkohol (*S*)-**30b** als überlegen. Das (*Z*)-Olefin **72b** wurde über den Einsatz der Oxidoreduktasen lediglich mit *ee*-Werten von 6 – 95 % erhalten. Zusätzlich waren die Aktivitäten

der Enzyme bei diesem Substrat überwiegend gering. Die Reduktion der Dreifachbindung mittels eines Lindlar-Katalysators führte hingegen in guter Ausbeute zu dem enantiomerenreinen (*Z*)-Olefin (*S*)-**72b**. Das (*E*)-Olefin **73b** konnte enzymatisch wie chemisch mit einem *ee* von größer als 99 % zugänglich gemacht werden. Enzymatisch zeigt jedoch nur das Enzym recLB-ADH eine für präparative Zwecke ausreichende Aktivität. Chemisch ist auch bei dem (*E*)-Olefin **73b** die Synthese beider Enantiomere in guter Ausbeute möglich. Ein weiterer großer Vorteil der Darstellung der Olefine aus den Alkinolen liegt in der potentiellen Übertragbarkeit der Reduktion auf die Methyl-Derivate **22b** und **71b**. Diese sollten über Red-Al bzw. Lindlar-Katalysator sogar besser zugänglich sein als die halogenierten Alkohole **72b** und **73b**, da Nebenreaktionen wie die Dehalogenierung nicht mehr möglich sind. Enzymatisch wurden diese Verbindungen nur teilweise als Substrate akzeptiert, so daß die Anwendung hier auf die Reduktion des (*E*)-Methyl-Ketons **22a** mit recLB-ADH und *CPCR* beschränkt bleibt (Tab. 2-14).

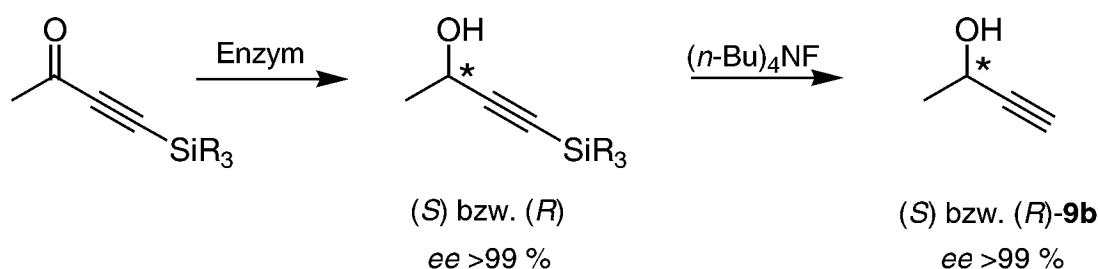
3 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Einsatz von Oxidoreduktasen für die Reduktion propargylierter Ketone. In dieser ersten umfassenden Untersuchung der enzymatischen Reduktion von Alkinonen wurden insgesamt über 50 Substrate dargestellt und getestet. Hierbei wurden jeweils beide Enantiomere einer Vielzahl propargylierter Alkohole enantiomerenrein erhalten. Nach der Optimierung der enzymatischen Umsetzung wurde die vielseitige Verwendbarkeit der Produkte durch Arbeiten zur Folgechemie demonstriert.

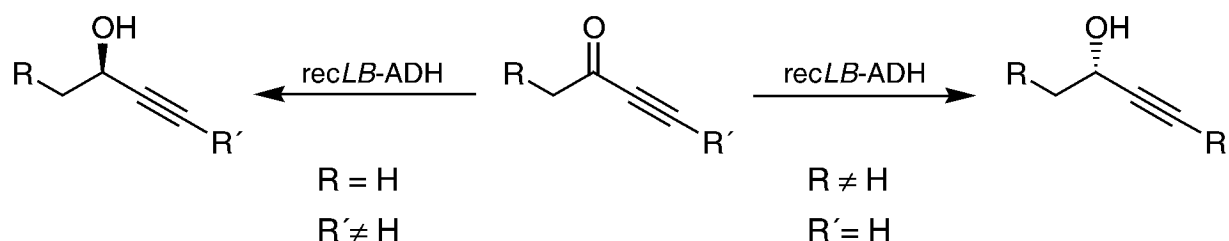
Enantiomerenreine Methyl-Ethynyl-Carbinole wurden mit unterschiedlichsten Resten an der Dreifachbindung über *recLB*-ADH und *CPCR* nahezu allgemeingültig zugänglich gemacht. Aromatische Methyl-Alkinone wurden hierbei mit verschiedenen Substituenten und mit unterschiedlichen Substitutionsmustern in guten Ausbeuten umgesetzt. Weiterhin wurden aliphatische Methyl-Alkinone mit gesättigten, olefinischen und heterosubstituierten Resten mit hohen Enzym-Aktivitäten reduziert.



Die gute Eignung der Oxidoreduktasen bei der Reduktion von Methyl-Ethynyl-Carbinolen wurde in der Synthese von enantiomerenreinem (*R*)- und (*S*)-3-Butin-2-ol (**9b**) angewendet. Durch die Einführung einer Silyl-Funktion als *ee*-steigernde Schutzgruppe, welche nach der enzymatischen Reduktion abgespalten wurde, gelang die bislang kürzeste Synthesesequenz zu enantiomerenreinem (*S*)- bzw. (*R*)-**9b**.

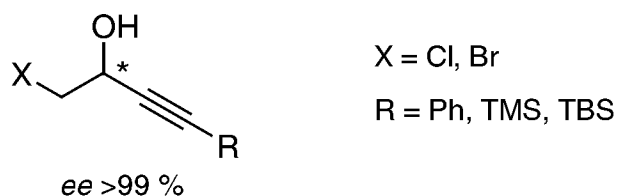


Die Reduktion propargylierter Ketone mit einer terminalen Dreifachbindung mittels *recLB*-ADH führte zu einer interessanten Konfigurationsumkehr. Wenn hierbei der zweite Rest des Substrats größer als eine Ethylgruppe war, wurden die Produkte mit einem *ee* von größer 99 % erhalten. Die gute präparative Anwendbarkeit der Reduktion wurde durch die Darstellung von (*S*)-1-Hexin-3-ol [(*S*)-**26b**] belegt, daß im g-Maßstab umgesetzt wurde. Zum ersten Mal gelang hierdurch die Synthese von enantiomerenreinen Alkoholen mit entgegengesetzter Konfiguration über dieselbe Oxidoreduktase.

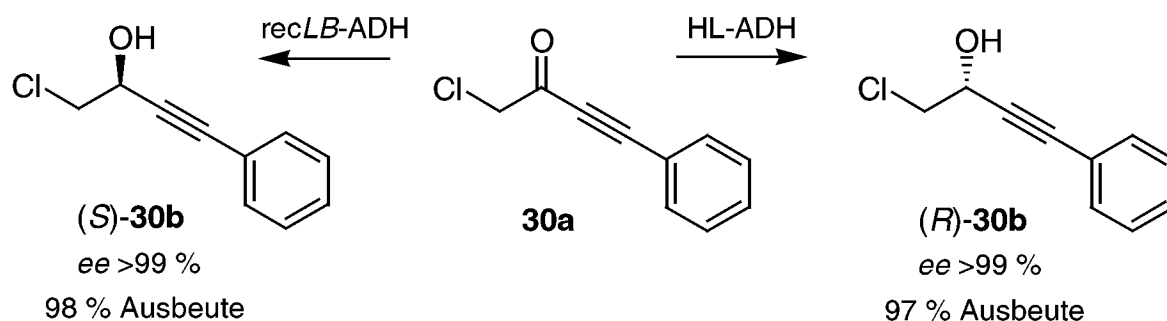


Da *CPCR* Ketone mit einer terminalen Dreifachbindung nur mit moderater Enantioselektivität reduziert, bietet sich für nachfolgende Arbeiten die Identifizierung einer Alkoholdehydrogenase an, die einen besseren Zugang zu (*R*)-Alkinolen mit einer terminalen Dreifachbindung eröffnet.

Als funktionelle Aktivierung für die Methyl-Gruppe wurden eine Reihe von Ketonen mit unterschiedlichen Substituenten in α -Position einem Enzym-Screening unterzogen. Hierbei wurden α -chlorierte sowie α -bromierte Alkinone über die Enzyme *recLB*-ADH, *HL*-ADH und *TB*-ADH mit hohen Aktivitäten zu den halogenierten Alkoholen reduziert. Diese für die Anwendung in der Natur- und Wirkstoffsynthese hochinteressanten Produkte wurden hierdurch erstmals enantiomerenrein erhalten.

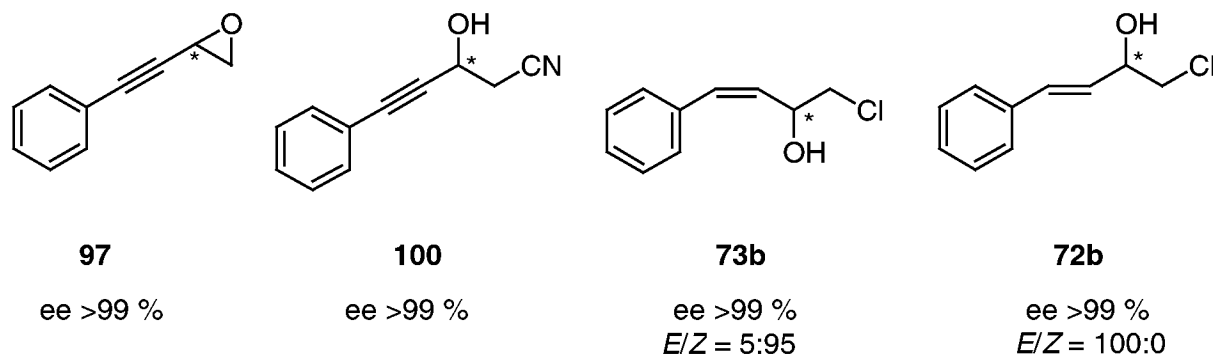


Anhand der multifunktionellen chlorierten C4-Bausteine wurde eine Optimierung der enzymatischen Reduktion durchgeführt. Im Ergebnis wurde 1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on (**30a**) selektiv zu beiden Enantiomeren des entsprechenden Alkohols **30b** im mmol-Maßstab mit Cofaktor-TTNs von bis zu 20.000 quantitativ reduziert. Präparativ wurde **30a** mit *recLB*-ADH sowie *HL*-ADH umgesetzt. Die reinen Alkohole (*S*)- und (*R*)-**30b** wurden nach Extraktion ohne Aufreinigung nahezu quantitativ und enantiomerenrein erhalten.



Alkinone mit einem Ethylrest wurden bis auf 1-Pentin-3-on (**59a**) aufgrund der Größe des Ethyl-Substituenten nicht mehr als Substrat akzeptiert. Als weiterführende Arbeit bietet sich hier ein Screening nach Oxidoreduktasen an, mit denen auch sterisch anspruchsvollere Reste in α -Position umgesetzt werden können.

Die vielseitige Folgechemie der halogenierten propargylischen Alkohole wurde anhand einiger ausgesuchter Beispiele demonstriert. Hierbei wurden die enantiomerenreinen Verbindungen Epoxid **97** und Nitril **100** in einstufigen Synthesen in guten Ausbeuten erhalten. Weiterhin erwiesen sich die Olefine **72b** und **73b** über die Reduktion der Dreifachbindung von **30b** als gut zugänglich. Auch diese Verbindungen wurden mit einem ee von größer 99 % sowie hervorragenden (E/Z)-Verhältnissen dargestellt.



Die enzymatische Reduktion der entsprechenden olefinischen Ketone **72a** und **73a** verlief mit überwiegend schlechten Aktivitäten und Enantiomerenüberschüssen, so daß die getesteten aromatischen Alkenone **22a** und **71a-73a** als weniger gut geeignete Substrate für die enzymatische Reduktion mit den getesteten Enzymen identifiziert wurden. Eine detailliertere Aussage über die Umsetzungsmöglichkeiten von olefinischen Ketonen mit Oxidoreduktasen könnte erst durch die Synthese und das Screening einer größeren Anzahl von Alkenonen getroffen werden.

Für zukünftige Arbeiten bietet sich eine umfassendere Untersuchung zur Folgechemie der halogenierten Alkohole an. Insbesondere die Dreifachbindung könnte in eine Vielzahl weiterer funktioneller Gruppen überführt werden. Darüber hinaus könnten diese Reaktionen auch bei dem propargylischen Epoxid angewendet werden. Hierbei erscheint besonders die Überführung in die (*E*)- und (*Z*)-olefinischen Epoxide als interessanter Weg zu weiteren neuen Verbindungsklassen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Analytik

NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer AMX 300 der Fa. Bruker aufgenommen (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75.5 MHz; $T = 20^\circ\text{C}$). Als interner Standard diente der undeuterte Anteil (^1H -NMR) bzw. das ^{13}C -Signal (^{13}C -NMR) des verwendeten Lösungsmittels. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden unter ^1H -Breitband-Entkopplung gemessen (WALTZ16). Zur Unterstützung der Signalzuordnungen wurden zusätzlich DEPT135-Experimente durchgeführt. Angegeben werden die chemischen Verschiebungen δ in ppm sowie Kopplungskonstanten in Hz. Multiplizitäten: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), hex (Hextett), m (Multiplett).

GCMS-Spektren wurden mit dem HP 6890 Series GC-System sowie dem HP 5973 Mass Selective Detector der Fa. Hewlett Packard aufgenommen. Es wurde die Säule HP-5MS (5% Phenyl Methyl Siloxan / Kapillare 30.0 m $\times$ 250 μm) der Fa. Hewlett Packard verwendet; Trägergas Helium (1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$, konstanter Fluß), Injektor im Split-Modus (50:1, 250°C), T_{GC} (Injektor) = 250°C, T_{MS} (Ionenquelle) = 230°C, Temperaturprogramm A: $T_{0 \text{ min}} = 60^\circ\text{C}$, $T_{3 \text{ min}} = 60^\circ\text{C}$, $T_{14 \text{ min}} = 280^\circ\text{C}$ (Aufheizrate: 20°C/min), $T_{19 \text{ min}} = 280^\circ\text{C}$; Temperaturprogramm B: $T_{0 \text{ min}} = 40^\circ\text{C}$, $T_{5 \text{ min}} = 40^\circ\text{C}$, $T_{29 \text{ min}} = 280^\circ\text{C}$ (Aufheizrate: 10°C/min), $T_{34 \text{ min}} = 280^\circ\text{C}$. MS-Parameter: EI (70 eV), Ionenquelle 230°C, Quadrupol 106°C, Transfer Line 300°C, detektierter Massenbereich 50-550 amu. Bei MS-Signalen mit Isotopenmuster wird jeweils das Isotopensignal mit der stärksten Intensität angegeben.

Gaschromatogramme wurden mit dem Gaschromatographen CP 9002 der Fa. Chrompack aufgenommen. Es wurden die chiralen Säulen HP FS-Cyclodex-beta-I/P (50.0 m $\times$ 320 μm) der Fa. Hewlett Packard sowie Lipodex E (25.0 m $\times$ 250 μm) der Fa. Macherey & Nagel verwendet; FID-Detector = 250°C, T (Injektor) = 200°C.

HPLC-Trennungen wurden mit dem HP Series 1100 Chromatographiesystem der Fa. Hewlett Packard durchgeführt, das mit einem UV-Diodenarraydetektor versehen war. Es wurden die chiralen Phasen Chiracel OB und Chiralpak AD (je 250 $\times$ 4 mm ausgestattet mit einer Vorsäule, 80 $\times$ 4 mm; Fa. Daicel Chem. Ind.) verwendet.

IR-Spektren wurden mit dem Avatar 360 FT-Infrarot-Spektrometer der Fa. Nicolet aufgenommen. Die Substanzen wurden als Film vermessen. Angegeben werden die Wellenzahlen in cm^{-1} ; die Intensitäten als ss (sehr stark), s (stark), m (mittel), w (schwach).

Elementaranalysen und hochauflösende Massenspektrometrie wurden in der zentralen analytischen Abteilung des "KEKULÉ Institut für Organische Chemie und Biochemie" der Universität Bonn durchgeführt [Elementaranalysen ("Vario EL", Fa. Heraeus); massenspektroskopische Analysen (EI, 70 eV, "AEI MS50", Fa. Kratos)].

pH-Werte wurden mit dem pH-Meter pH 526 Multi Cal der Fa. WTW GmbH gemessen.

Kinetik-Messungen der Aktivitätstests wurden mit dem Ultrospec 2000 Spektrophotometer der Fa. Pharmacia Biotech durchgeführt. Gemessen wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktapparatur B-540 der Fa. Büchi gemessen.

Optische Drehwerte wurden mit dem Polarimeter P241 der Fa. Perkin-Elmer bestimmt; angegeben werden neben den Drehwerten Konzentration und Lösungsmittel. Alle Werte wurden mit der D-Linie der Na-Lampe gemessen.

Analytische Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. Merck.

Präparative Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Glasplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (2.0 mm) der Fa. Merck.

Säulenchromatographie (Flashchromatographie) erfolgte an Kieselgel der Fa. Merck, Korngröße 0.04 – 0.063 mm.

Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Fluka, Merck, TCI (Japan) und Lancaster bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und falls angegeben nach den literaturüblichen Methoden getrocknet. Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii* (TB-ADH), Pferdeleber (HL-ADH) und *Saccharomyces cerevisiae* (Y-ADH) wurden von SIGMA bezogen.

Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* (CPCR) wurde freundlicherweise von der Firma Jülich Fine Chemicals (Dr. T. Daussmann) überlassen. Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Hummel (Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf) sei an dieser Stelle ganz herzlich für die Bereitstellung der *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase (recLB-ADH) gedankt.

4.2 Synthese der Substrate

Synthese von Alkinonen über Carbonsäurechloride

AAV I: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von Carbonsäurechloriden mit Trimethylsilyl-Acetylenen.^[42a] AlCl_3 (1.15 g, 8.6 mmol) wird unter starkem Rühren bei 0°C zu einer Lösung eines Trimethylsilylacetylens (3.0 mmol) und Carbonsäurechlorid (2.8 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (50 mL) gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wird die Suspension auf RT erwärmt und weitere 30 min gerührt. Es wird mit 2 M aq. HCl (50 mL) hydrolysiert und die Lösung mit CH_2Cl_2 (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt.

4-(4'-Bromphenyl)-3-buten-2-on (23a). Synthese nach AAV I, ausgehend von (4-Bromphenylethynyl)trimethylsilan (760 mg, 3.0 mmol) und Acetylchlorid (224 mg, 2.8 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **23a** als hellbrauner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 64 – 65°C erhalten. Ausbeute: 537 mg (2.4 mmol, 86 %).

R_f : 0.21 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.45 (s, 3H, CH_3), 7.43 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ar-H), 7.53 (d, J = 8.6 Hz, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 32.9 (CH_3), 89.0, 89.1 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 118.9, 125.7, 132.2, 134.5 (ar-C), 184.6 (CO).

GCMS: R_t = 9.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 222 (22) [M^+], 207 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 179 (2) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 128 (16) [$\text{M}^+ - \text{Br} - \text{CH}_3$], 100 (14) [$\text{M}^+ - \text{Br} - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrO}$ 223.07

4-(3'-Bromphenyl)-3-butin-2-on (24a). Synthese nach AAV I, ausgehend von (3-Bromphenylethynyl)trimethylsilan (760 mg, 3.0 mmol) und Acetylchlorid (224 mg, 2.8 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **24a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 556 mg (2.5 mmol, 89 %).

R_f : 0.28 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.45 (s, 3H, CH_3), 7.26 (t, J = 7.8 Hz, 1H, ar-H), 7.51 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ar-H), 7.59 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ar-H), 7.71 (s, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 32.9 (CH_3), 88.1, 88.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 122.0, 122.6, 130.3, 131.7, 134.0, 135.7 (ar-C), 184.5 (CO).

GCMS: R_t = 9.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 222 (22) [M^+], 207 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 128 (24) [$\text{M}^+ - \text{Br} - \text{CH}_3$], 115 (9), 100 (14) [$\text{M}^+ - \text{Br} - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrO}$ 223.07

4-(2'-Bromphenyl)-3-butin-2-on (25a). Synthese nach AAV I, ausgehend von (2-Bromphenylethynyl)trimethylsilan (760 mg, 3.0 mmol) und Acetylchlorid (224 mg, 2.8 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **25a** als braunes Öl erhalten. Ausbeute: 400 mg (2.2 mmol, 64 %).

R_f : 0.29 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.42 (s, 3H, CH_3), 7.15-7.36 (m, 2H, ar-H), 7.22-7.44 (m, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 33.0 (CH_3), 88.5, 91.6 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 122.5, 127.0, 127.5, 132.0, 132.9, 135.0 (ar-C), 184.6 (CO).

GCMS: R_t = 9.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 222 (34) [M^+], 207 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 128 (25) [$\text{M}^+ - \text{Br} - \text{CH}_3$], 115 (11), 100 (21) [$\text{M}^+ - \text{Br} - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrO}$ 223.07

1-Hexin-3-on (26a). AlCl_3 (17.84 g, 133.4 mmol) wurde über einen Zeitraum von 60 min unter starkem Rühren bei 0°C zu einer Lösung aus Trimethylsilylacetylen (12.00 g, 122.4 mmol) und Buttersäurechlorid (12.2 g, 114.2 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (400 mL) gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 min wurde die Suspension auf RT erwärmt und weitere 4 h gerührt. Anschließend wurde mit eisgekühlter 2 M aq. HCl (100 mL) hydrolisiert und die Lösung mit CH_2Cl_2 (3×100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Destillation (30 mbar/ 63°C) wurde **26a** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 4.50 g (46.8 mmol, 41 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.94$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.72 ('hex', $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 2.58 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 3.21 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 13.6$ (CH_3), 17.5 (CH_2), 47.4 (CH_2), 78.5, 81.6 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 187.7 (CO).

GCMS: $R_t = 3.3$ min (Temperaturprogramm B)
 m/z (%) = 95 (42) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 81 (36) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 68 (97) [$\text{M}^+ - \text{C}_2\text{H}_4$], 53 (100) [$\text{M}^+ - \text{C}_3\text{H}_7$].

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$ 96.13

1-Phenyl-3-trimethylsilyl-2-propin-1-on (27a). Benzoylchlorid (2.00 g, 14.2 mmol) wurde in CH_2Cl_2 (10 mL) gelöst und über einen Zeitraum von 30 min bei 0°C zu einer Suspension von AlCl_3 (2.85 g, 21.4 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (20 mL) zugetropft. Die leicht bräunliche Mischung wurde für weitere 30 min gerührt. Anschließend wurde der Ansatz abdekantiert und durch Glaswolle filtriert. Das Filtrat wurde über einen Zeitraum von 45 min bei 0°C zu einer Vorlage von Bis(trimethylsilyl)acetylen (2.43 g, 14.2 mmol) in CH_2Cl_2 (20 mL) zugegeben und 2 h gerührt. Abschließend wurde mit eisgekühlter 2 M aq. HCl (50 mL) hydrolisiert, die wäßrige Phase mit Diethylether (50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einengen im Vakuum und Aufreinigung durch Flashchromatographie wurde **27a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 2.01 g (9.9 mmol, 70 %).

R_f : 0.29 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.15$ (s, 9H, CH_3), 7.29 – 7.37 (m, 3H, ar-H), 7.96 – 8.03 (m, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -0.5$ (SiCH_3), 100.8, 101.0 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 128.8, 129.9, 134.4, 136.6, (ar-C), 177.9 (CO).

GCMS: $R_t = 9.2$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 202 (11) [M^+], 187 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 159 (12) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 105 (14).

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{OSi}$ 202.33

1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-buten-2-on (28a). Chloracetylchlorid (10.00 g, 88.5 mmol) und Bis(trimethylsilyl)acetylen (15.04 g, 88.5 mmol) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (250 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann wurde AlCl_3 (12.98 g, 97.4 mmol) über einen Zeitraum von 30 min in 4 Portionen zugegeben, wobei sich die Suspension orange-braun färbte. Der Ansatz wurde für 3.5 h bei RT gerührt und erneut auf 0°C gekühlt, bevor mit 2 M aq. HCl (150 mL) hydrolisiert und mit Diethylether (3×100 mL) extrahiert wurde. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wurden die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingeeengt. Nach Destillation (0.06 mbar/ 34°C) wurde **28a** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 11.68 g (67.1 mmol, 76 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.27$ (s, 9H, SiCH_3), 4.25 (s, 2H, CH_2Cl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -0.8$ (SiCH_3), 49.7 (CH_2Cl), 99.2, 103.6 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 178.5 (CO).

IR: 2963 (w), 2154 (w), 1696 (s), 1677 (s), 1252 (s), 1101 (ss), 863 (ss), 843 (ss), 760 (s).

GCMS: $R_t = 6.2$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 174 (1) [M^+], 159 (14) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 125 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl}$], 103 (54), 97 (47).

HRMS ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$): ber.: 159.0033
gef.: 159.0033

$\text{C}_7\text{H}_{11}\text{ClOSi}$ 174.74

1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (29a). Bromacetylchlorid (17.40 g, 110.6 mmol) und Bis(trimethylsilyl)acetylen (18.80 g, 110.6 mmol) wurden in trockenem CH₂Cl₂ (250 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann wurde AlCl₃ (16.20 g, 121.6 mmol) über einen Zeitraum von 30 min in 4 Portionen zugegeben, wobei sich die Suspension dunkelrot färbte. Der Ansatz wurde für 3.5 h bei RT gerührt und erneut auf 0°C gekühlt, bevor mit 2 M aq. HCl (150 mL) hydrolisiert und mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) extrahiert wurde. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurden die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingeeengt. Nach Destillation (0.13 mbar/42°C) wurde **29a** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 18.29 g (83.5 mmol, 76 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.26 (s, 9H, SiCH₃), 4.05 (s, 2H, CH₂Br).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -0.7 (SiCH₃), 35.9 (CH₂Br), 99.3, 103.1 (C≡C), 177.9 (CO).

IR: 2962 (w), 2157 (w), 1672 (s), 1252 (s), 1084 (s), 841 (ss), 760 (s), 617 (s).

GCMS: R_t = 6.7 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 219 (1) [M⁺ - H], 203 (8) [M⁺ - CH₃], 149 (17), 125 (100) [M⁺ - CH₂Br], 97 (19).

HRMS (M⁺ - CH₃): ber.: 202.9528
gef.: 202.9536

C₇H₁₁BrOSi 219.19

1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (30a). Chloracetylchlorid (6.50 g, 57.4 mmol) und Phenylethynyltrimethylsilan (10.00 g, 57.4 mmol) wurden in trockenem CH₂Cl₂ (150 mL) gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann wurde AlCl₃ (8.40 g, 63.1 mmol) über einen Zeitraum von 30 min in 4 Portionen zugegeben, wobei sich die Suspension dunkelbraun färbte. Der Ansatz wurde für 2 h bei RT gerührt und erneut auf 0°C gekühlt, bevor mit 2 M aq. HCl (150 mL) hydrolisiert und mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) extrahiert wurde. Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ wurden die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingeeengt. Nach Filtrieren über Kieselgel mit Isohexan:Ethylacetat (40:1) wurde **30a** als dunkelrotes Öl in 90 % Reinheit (GCMS) erhalten. **30a** kristallisierte langsam in braun-gelben Nadeln aus. Ausbeute: 8.78 g (49.3 mmol, 86 %).

Durch Umkristallisation aus Isohexan:Ethylacetat wird das Alkinon **30a** in weißgelben Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 37 – 39°C erhalten. Ausbeute: 5.21 g (29.3 mmol, 51 %).

R_f : 0.13 (Isohexan:Ethylacetat = 40:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 4.33 (s, 2H, CH_2), 7.39 – 7.51 (m, 3H, ar-H), 7.60 – 7.64 (m, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 49.7 (CH_2), 85.6, 95.5 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 119.3, 128.9, 131.6, 133.5 (ar-C), 178.5 (CO).

IR: 3442 (m), 2935 (w), 2206 (m), 1698 (s), 1587 (s), 1395 (m), 1075 (ss), 791 (m), 753 (s), 685 (s).

GCMS: R_t = 9.9 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 178 (9) [M^+], 129 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl}$], 101 (14) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO}$], 75 (19).

HRMS (M^+): ber.: 178.0185
 gef.: 178.0185

$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClO}$	178.62		
berechnet (%):	C 67.24	H 3.95	
gefunden (%):	C 66.92	H 3.99	

1,4-Bis(1-butin-3-on)-benzen (**31a**). 1,4-Bis(trimethylsilylethynyl)-benzen (540 mg, 2.0 mmol) und Acetylchlorid (360 mg, 4.5 mmol) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (20 mL) gelöst und bei 0°C über einen Zeitraum von 30 min zu einer Suspension von AlCl_3 (1.82 g, 13.7 mmol) in CH_2Cl_2 (30 mL) gegeben. Anschließend wurde auf RT erwärmt und die Mischung für 3 h gerührt, bevor der Ansatz mit 1 M aq. HCl (40 mL) hydrolysiert und mit CH_2Cl_2 (3 × 20 mL) extrahiert wurde. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen im Vakuum wird **31a** nach Flashchromatographie als hellgelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 122 – 124°C (Lit.: 122 – 123°C)^[107] erhalten. Ausbeute: 298 mg (1.42 mmol, 71 %).

R_f : 0.30 (Isohexan:Ethylacetat = 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.46 (s, 6H, CH_3), 7.57 (s, 4H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 32.9 (CH_3), 88.5, 90.3 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 122.3, 133.1 (ar-C), 184.5 (CO).

GCMS: R_t = 11.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 210 (32) [M^+], 195 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 180 (8) [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3$], 167 (15) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 153 (27), [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2$ 210.23

6-Trimethylsilyl-3,5-hexadiin-2-on (32a). Synthese nach AAV I, ausgehend von 1,4-Bis(trimethylsilyl)-butadiin (577 mg, 3.0 mmol) und Acetylchlorid (224 mg, 2.8 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **32a** als braunes Öl erhalten. Ausbeute: 344 mg (2.1 mmol, 75 %).

R_f : 0.21 (Isohexan: CH_2Cl_2 = 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.24 (s, 9H, SiCH_3), 2.37 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = -0.6 (SiCH_3), 32.8 (CH_3), 73.7, 75.0, 85.8, 97.7 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 183.6 (CO).

GCMS: R_t = 7.5 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 164 (10) [M^+], 149 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 134 (3) [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3$], 121 (54) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 107 (31) [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{OSi}$ 164.28

5-Cyclopentyl-1-pentin-3-on (33a). Synthese nach AAV I, ausgehend von Trimethylsilylacetylen (196 mg, 3.0 mmol) und 3-Cyclopentylpropionylchlorid (450 mg, 2.8 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **33a** als rotes Öl erhalten. Ausbeute: 109 mg (0.7 mmol, 26 %).

R_f : 0.30 (Isohexan:Ethylacetat = 50:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.49 – 1.77 (m, 11H), 2.60 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 3.22 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 25.3, 30.1, 32.6 (CH_2), 39.6 (CH), 45.0 (CH_2), 78.6 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 81.7 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 188.0 (CO).

GCMS: R_t = 7.9 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 149 (12) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 135 (18) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 122 (31), 107 (36) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 82 (69) [$\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_7$], 67 (100) [C_5H_7^+], 53 (74).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$ 150.22

4-Oxo-6-trimethylsilyl-5-hexinsäuremethylester (34a). Bis(trimethylsilyl)acetylen (3.00 g, 17.6 mmol) und Succinsäuremethylesterchlorid (2.53 g, 16.8 mmol) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (50 mL) gelöst und bei 0°C über einen Zeitraum von 30 min zu einer Suspension von AlCl_3 (6.72 g, 50.5 mmol) in CH_2Cl_2 (80 mL) gegeben. Anschließend wurde auf RT erwärmt und die Mischung für 1.5 h gerührt. Der Ansatz wurde mit 2 M aq. HCl (80 mL) hydrolysiert und mit CH_2Cl_2 (3 × 50 mL) extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen im Vakuum wird **34a** nach Destillation (30 mbar/76°C) als klare Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 2.74 g (12.9 mmol, 77 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.24 (s, 9H, SiCH_3), 2.64 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2), 2.92 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH_2), 3.69 (s, 3H, OCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = -0.4 (SiCH_3), 28.0, 40.2 (CH_2), 52.4 (OCH_3), 99.1, 101.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 172.9 (CO_2R), 185.7 (CO).

GCMS: $R_t = 8.4$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 212 (1) $[M^+]$, 197 (32) $[M^+ - CH_3]$, 181 (8) $[M^+ - CH_3O]$,
169 (12) $[M^+ - CH_3 - CO]$, 125 (100), $[M^+ - C_4H_7O_2]$.

$C_{10}H_{16}O_3Si$ 212.32

3-Oxo-5-trimethylsilyl-4-pentinsäureethylester (35a). Synthese nach AAV I, ausgehend von Bis(trimethylsilyl)acetylen (510 mg, 3.0 mmol) und Malonsäureethylesterchlorid (422 mg, 2.8 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **35a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 4 mg (19 μ mol, < 1 %).

R_f : 0.48 (Isohexan:Ethylacetat = 5:1).

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.24$ (s, 9H, $SiCH_3$), 1.31 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 3.58 (s, 2H, CH_2), 4.23 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): $\delta = -0.5$ ($SiCH_3$), 14.4 (CH_3), 60.8, 61.8 (CH_2), 97.8, 101.2 ($C\equiv C$), 166.1 (CO_2R), 178.8 (CO).

GCMS: $R_t = 8.5$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 212 (3) $[M^+]$, 197 (16) $[M^+ - CH_3]$, 183 (7) $[M^+ - C_2H_5]$,
151 (16), 125 (100) $[M^+ - C_4H_7O_2]$, 115 (29).

$C_{10}H_{16}O_3Si$ 212.32

1-Trimethylsilyl-1-octin-3-on (36a). Synthese nach AAV I, ausgehend von Bis(trimethylsilyl)acetylen (510 mg, 3.0 mmol) und Hexansäurechlorid (376 mg, 2.8 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **36a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 460 mg (2.3 mmol, 84 %).

R_f : 0.39 (Isohexan:Ethylacetat = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.25$ (s, 9H, TMS), 0.91 (t, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.31 – 1.33 (m, 4H, CH_2), 1.65 – 1.70 (m, 2H, CH_2), 2.56 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -0.6$ (TMS), 14.0 (CH_3), 22.5, 23.8, 31.3, 45.4 (CH_2), 97.7, 102.2 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 188.3 (CO).

GCMS: $R_t = 7.7$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 195 (3) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 181 (12) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 153 (8) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 140 (52), 125 (100), 97 (29).

$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{OSi}$ 196.26

6-Chlor-1-trimethylsilyl-1-hexin-3-on (**106a**). Bis(trimethylsilyl)acetylen (3.00 g, 17.5 mmol) und 4-Chlorbuttersäurechlorid (2.37 g, 16.8 mmol) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (40 mL) gelöst und bei 0°C über einen Zeitraum von 30 min zu einer Suspension von AlCl_3 (6.70 g, 50.4 mmol) in CH_2Cl_2 (50 mL) gegeben. Anschließend wurde auf RT erwärmt und die Mischung für 1 h gerührt. Der Ansatz wurde mit 1 M aq. HCl (50 mL) hydrolysiert und mit CH_2Cl_2 (3×40 mL) extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen im Vakuum wurde **106a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 2.76 g (13.6 mmol, 81 %). **106a** wurde ohne weitere Aufreinigung zu **56a** umgesetzt.

GCMS: $R_t = 8.0$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 201 (1) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 187 (3) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 145 (30), 125 (100), 97 (14).

$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{ClOSi}$ 202.76

Synthese von Alkinonen über Weinreb-Amide

AAV II: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von Weinreb-Amiden mit terminalen Acetylenen (Variante 1).^[46] *n*-BuLi (1.9 mL, 3.0 mmol, 1.6 M in Hexan) wird bei 0°C zu einer Lösung des terminalen Acetylens (3 mmol) in trockenem THF (50 mL) gegeben. Nach 15 min wird die Lösung auf –78°C abgekühlt und das Weinrebamid (3.5 mmol) zugegeben. Nachdem der Ansatz für 30 min gerührt wurde, wird auf RT erwärmt und weitere 2 h gerührt. Die Mischung wird mit 2 M aq. HCl (50 mL) hydrolysiert und mit CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

AAV III: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Kupplung von Weinreb-Amiden mit terminalen Acetylenen (Variante 2).^[108] *n*-BuLi (5.1 mL, 8.2 mmol, 1.6 M in Hexan) wird bei –78°C zu einer Lösung des terminalen Acetylens (7.8 mmol) in trockenem THF (30 mL) gegeben. Nach 30 min wird das Weinreb-Amid (7.1 mmol) zugetropft und der Ansatz für 30 min bei –78°C gerührt. Anschließend wird auf 0°C erwärmt, die Mischung mit eisgekühlter 2 M aq. HCl (50 mL) hydrolysiert und mit CH₂Cl₂ (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

4-(4'-Methoxyphenyl)-3-buten-2-on (37a). Synthese nach AAV II, ausgehend von 1-Ethynyl-4-methoxybenzen (396 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **37a** als gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 45 – 46°C erhalten. Ausbeute: 429 mg (2.5 mmol, 82 %).

R_f: 0.12 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, ar-H), 7.51 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, ar-H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 32.8 (CH₃), 55.6 (OCH₃), 88.4, 91.7 (C≡C), 111.7, 114.5, 135.3, 161.8 (ar-C), 184.9 (CO).

GCMS: *R_t* = 10.1 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 174 (33) [M⁺], 159 (100) [M⁺ – CH₃], 144 (13) [M⁺ – 2CH₃], 131 (5) [M⁺ – CH₃ – CO], 116 (8) [M⁺ – 2CH₃ – CO].

C₁₁H₁₀O₂ 174.20

4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-on (38a). Synthese nach AAV II, ausgehend von 1-Ethynyl-4-fluorbenzen (360 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **38a** als leicht gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 355 mg (2.2 mmol, 73 %).

R_f : 0.23 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.42 (s, 3H, CH_3), 6.95-7.12 (m, 2H, ar-H), 7.45-7.62 (m, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 32.8 (CH_3), 88.3, 89.2 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 115.7, 116.2 (d, J = 23 Hz), 135.4 (d, J = 9 Hz), 164.5 (d, J = 257 Hz), (ar-C), 184.6 (CO).

GCMS: R_t = 7.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 162 (20) [M^+], 147 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 119 (6) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{FO}$ 162.16

4-(4'-Chlorphenyl)-3-butin-2-on (39a). Synthese nach AAV II, ausgehend von 1-Ethynyl-4-chlorbenzen (408 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **39a** als leicht gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 53 – 54°C (Lit.: 54°C)^[109] erhalten. Ausbeute: 370 mg (2.1 mmol, 69 %).

R_f : 0.28 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.46 (s, 3H, CH_3), 7.38 (d, J = 6.6 Hz, 2H, ar-H), 7.51 (d, J = 6.6 Hz, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 32.9 (CH_3), 89.0, 89.1 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 118.5, 129.3, 134.4, 137.4 (ar-C), 184.7 (CO).

GCMS: R_t = 9.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 178 (19) [M^+], 163 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 135 (5) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 128 (1) [$\text{M}^+ - \text{Cl} - \text{CH}_3$].

$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClO}$ 178.62

4-(2-Pyridinyl)-3-butin-2-on (40a). Synthese nach AAV II, ausgehend von 2-Ethynylpyridin (309 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **40a** als rotes Öl erhalten. Ausbeute: 157 mg (1.1 mmol, 36 %).

R_f : 0.32 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.45 (s, 3H, CH_3), 7.28-7.37 (m, 1H, ar-H), 7.55 (d, J = 7.8 Hz, 1H, ar-H), 7.60-7.77 (m, 1H, ar-H), 8.62 (d, J = 4.3 Hz, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 32.9 (CH_3), 86.1, 87.7 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 124.8, 128.9, 136.6, 140.8, 150.7 (ar-C), 184.5 (CO).

GCMS: R_t = 8.4 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 145 (23) [M^+], 130 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 102 (3) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 78 (15).

$\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$ 145.16

4-(3'-Methyl-2-thienyl)-3-butin-2-on (41a). Synthese nach AAV II, ausgehend von 2-Ethynyl-5-methylthiophen^[110] (366 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **41a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 361 mg (2.2 mmol, 73 %).

R_f : 0.23 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.41 (s, 3H, CH_3), 2.51 (s, 3H, CH_3), 6.74 (d, J = 3.8 Hz, 1H, ar-H), 7.30 (d, J = 3.8 Hz, 1H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 15.9 (CH_3), 32.6 (CH_3), 85.6, 93.0 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 117.3, 126.5, 137.7, 147.7 (ar-C), 184.4 (CO).

GCMS: R_t = 9.0 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 164 (44) [M^+], 149 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 121 (24) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_9\text{H}_8\text{OS}$ 164.22

5,5-Diethoxy-3-pentin-2-on (42a). Synthese nach AAV III, ausgehend von 1,1-Diethoxypropin (1.00 g, 7.8 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (730 mg, 7.1 mmol). Nach Destillation (0.08 mbar/50°C) wurde **42a** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 966 mg (5.7 mmol, 73 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.24$ (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 2.37 (s, 3H, CH_3), 3.58 – 3.77 (m, 4H, CH_2), 5.38 (s, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 15.2$ (CH_2CH_3), 32.9 (CH_3), 61.7 (CH_2), 83.1, 84.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 91.2 (CH), 184.1 (CO).

GCMS: $R_t = 7.6$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 169 (4) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 155 (1) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 141 (3) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_3$], 125 (100) [$\text{M}^+ - \text{OCH}_2\text{CH}_3$], 97 (91) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_3 - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3$ 170.20

N-Benzyl-N-methyl-5-amino-3-pentin-2-on (43a). Synthese nach AAV III, ausgehend von *N*-Benzyl-*N*-methyl-propargylamin (1.24 g, 7.8 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (730 mg, 7.1 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **43a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 254 mg (1.3 mmol, 17 %).

R_f : 0.46 (Isohexan:Ethylacetat = 2:1; 1% Triethylamin).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.31$ (s, 3H, CH_3), 2.32 (s, 3H, CH_3), 3.40 (s, 2H, CH_2), 3.52 (s, 2H, CH_2), 7.23 – 7.27 (m, 5H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 33.2$, 42.2 (CH_3), 45.3, 60.4 (CH_2), 86.0, 87.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 127.7, 128.6, 129.3 (ar-CH), 138.4 (ar- C_q), 184.6 (CO).

GCMS: $R_t = 7.6$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 201 (14) [M^+], 184 (4) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 158 (13) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 124 (58) [$\text{M}^+ - \text{C}_6\text{H}_5$], 91 (100) [C_7H_7].

$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}$ 201.27

5-Methyl-5-hexen-3-in-2-on (44a). Synthese nach AAV III, ausgehend von 2-Methyl-1-buten-3-in (1.03 g, 7.8 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (730 mg, 7.1 mmol). Nach Destillation (18 mbar/57°C) wurde **44a** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 595 mg (5.5 mmol, 70 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.94 (s, 3H, CH_3), 2.37 (s, 3H, CH_3), 5.52 (s, 1H, CH_2), 5.58 (s, 1H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 22.6 (CH_3), 32.9 (CH_3), 87.1, 91.3 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 124.9, 127.9 (C_q , CH_2), 184.9 (CO).

GCMS: R_t = 3.7 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 108 (38) [M^+], 93 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 77 (9) [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3$], 65 (31) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ 108.14

5-Hydroxy-5-methyl-3-hexin-2-on (45a). Synthese nach AAV III, ausgehend von 2-Methyl-3-buten-2-ol (678 mg, 7.8 mmol), *n*-BuLi (10.8 mL, 17.2 mmol, 1.6 M in Hexan) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (730 mg, 7.1 mmol). Nach Flash-chromatographie wurde **45a** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 490 mg (3.9 mmol, 55 %).

R_f : 0.21 (Isohexan:Ethylacetat = 5:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.54 (s, 6H, CH_3), 2.33 (s, 3H, CH_3), 3.11 (s, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 30.7 ($\text{C}[\text{CH}_3]_2$), 32.8 (CH_3), 65.1 (C_q), 81.5, 95.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 185.2 (CO).

GCMS: R_t = 5.9 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 126 (1) [M^+], 111 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 93 (6) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$], 83 (17) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 69 (72) [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_2$ 126.16

4-(1-Cyclohexen)-3-butin-2-on (46a). Synthese nach AAV II, ausgehend von 1-Ethynyl-1-cyclohexen (317 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **46a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 296 mg (2.0 mmol, 67 %).

R_f : 0.14 (Isohexan:Ethylacetat = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.58 – 1.66 (m, 4H, CH_2), 2.13 – 2.18 (m, 4H, CH_2), 2.35 (s, 3H, CH_3), 6.43 – 6.46 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 21.2, 22.1, 26.3, 28.4 (CH_2), 32.9 (CH_3), 86.8, 93.1 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 119.0 ($\text{C}=\text{CH}$), 142.7 ($\text{C}=\text{CH}$), 185.1 (CO).

GCMS: R_t = 8.2 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 148 (51) [M^+], 133 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 105 (42) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$ 148.21

4-(Triethylsilyl)-3-butin-2-on (47a). Synthese nach AAV II, ausgehend von Triethylsilylacetylen (420 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **47a** als klare Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 377 mg (2.1 mmol, 69 %).

R_f : 0.34 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.69 (q, J = 7.8 Hz, 6H, CH_2), 1.20 (t, J = 7.8 Hz, 9H, CH_3), 2.37 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3.9 (SiCH_2), 7.5 (SiCH_2CH_3), 32.9 (CH_3), 95.9, 103.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 184.6 (CO).

GCMS: R_t = 7.3 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 182 (1) [M^+], 167 (3) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 153 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_3$], 125 (52).

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{OSi}$ 182.34

4-(t-Butyldimethylsilyl)-3-butin-2-on (48a). Synthese nach AAV II, ausgehend von *t*-Butyldimethylsilylacetylen (420 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **48a** als klare Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 355 mg (2.0 mmol, 65 %).

R_f : 0.32 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.17 (s, 6H, CH_3), 0.95 (s, 9H, *t*-Bu), 2.33 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = - 4.9 (SiCH_3), 16.7 (SiC_q), 26.1 ($\text{C}[\text{CH}_3]$), 32.8 (CH_3), 96.4, 103.3 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 184.5 (CO).

GCMS: R_t = 6.5 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 182 (5) [M^+], 167 (17) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 125 (100) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{OSi}$ 182.34

4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-on (49a). Synthese nach AAV II, ausgehend von Dimethylphenylsilylacetylen^[111] (480 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **49a** als klare Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 345 mg (1.7 mmol, 57 %).

R_f : 0.24 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.49 (s, 6H, SiCH_3), 2.37 (s, 3H, CH_3), 7.32-7.70 (m, 5H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = - 1.7 (SiCH_3), 32.6 (CH_3), 96.8, 102.7 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 128.1, 130.0, 133.7, 134.2 (ar-C), 184.5 (CO).

GCMS: R_t = 8.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 201 (23) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 187 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 159 (86) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 145 (58) [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3 - \text{CO}$].

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{OSi}$ 202.33

4-t-Butyldimethylsilyl-1-chlor-3-butin-2-on (50a). *n*-BuLi (55.2 mL, 88.3 mmol, 1.6 M in Hexan) wurde bei -78°C über einen Zeitraum von 30 min in eine Lösung von *t*-Butyldimethylsilylacetylen (11.27 g, 80.3 mmol) in trockenem THF (500 mL) zuge tropft. Nach weiteren 90 min wurde 2-Chlor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (9.92 g, 72.2 mmol) gelöst in THF (75 mL) bei -78°C zugegeben und der Ansatz erneut für 90 min bei dieser Temperatur gerührt. Anschließend wurde auf 0°C erwärmt, die Mischung mit eisgekühlter 1 M aq. HCl (100 mL) hydrolysiert und mit CH_2Cl_2 (3×150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Destillation (0.02 mbar/ 26°C) wurde **50a** als leicht gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 13.00 g (60.0 mmol, 83 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 0.20$ (s, 6H, SiCH_3), 0.98 (s, 9H, *t*-Bu), 4.23 (s, 2H, CH_2Cl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = -5.1$ (SiCH_3), 16.8 (SiC_q), 26.1 ($\text{C}[\text{CH}_3]$), 49.7 (CH_2Cl), 100.0 , 102.7 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 178.6 (CO).

IR: 2953 (w), 2931 (w), 2859 (w), 2154 (w), 1698 (m), 1677 (m), 1252 (m), 1101 (s), 837 (ss), 778 (ss).

GCMS: $R_t = 8.5$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 216 (9) [M^+], 201 (7) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 167 (90) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl}$], 160 (52) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu}$], 145 (73) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu} - \text{CH}_3$], 103 (100).

HRMS (M^+): ber.: 216.0737
 gef.: 216.0733

$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{ClOSi}$ 216.79

1-Chlor-5-hydroxy-5-methyl-3-hexin-2-on (51a). Synthese nach AAV III, ausgehend von 2-Methyl-3-butin-2-ol (678 mg, 7.8 mmol), *n*-BuLi (10.8 mL, 17.2 mmol, 1.6 M in Hexan) und 2-Chlor-*N*-methoxy-*N*-methylacetamid (974 mg, 7.1 mmol) gelöst in THF (10 mL). Nach Flashchromatographie wurde **51a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 293 mg (1.8 mmol, 26 %).

R_f : 0.37 (Isohexan:Ethylacetat = 3:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.59$ (s, 6H, CH_3), 4.23 (s, 2H, CH_2Cl).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 30.6$ (CH_3), 49.7 (CH_2Cl), 65.3 (C_q), 78.7, 100.4 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 179.1 (CO).

IR: 3393 (w), 2984 (w), 2213 (m), 1698 (s), 1677 (s), 1374 (m), 1167 (s), 1112 (s), 966 (s), 786 (m).

GCMS: $R_t = 7.6$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 160 (1) [M^+], 145 (61) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 111 (76) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl}$], 53 (100).

HRMS ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$): ber.: 145.0055
gef.: 145.0060

$\text{C}_7\text{H}_9\text{ClO}_2$ 160.60

5-Phenyl-3-pentin-2-on (52a). Synthese nach AAV II, ausgehend von 3-Phenyl-1-propin (349 mg, 3.0 mmol) und *N*-Methoxy-*N*-methylacetamid (362 mg, 3.5 mmol). Nach Flashchromatographie wurde **52a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 337 mg (2.1 mmol, 71 %).

R_f : 0.33 (Isohexan:Ethylacetat = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.27$ (s, 3H, CH_3), 3.68 (s, 2H, CH_2), 7.19-7.27 (m, 5H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 25.4$ (CH_3), 33.0 (CH_2), 82.9, 90.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 127.4, 128.1, 129.0, 134.5 (ar-C), 185.0 (CO).

GCMS: $R_t = 9.3$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 158 (84) [M^+], 143 (13) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 115 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 89 (21).

$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}$ 158.20

Silylspaltung mit Borax-Lösung^[42b]

1-Octin-3-on (53a). Wäßrige Borax-Lösung (0.01 M, 3.2 mL, 37 μ mol) wurde zu einer Lösung aus 1-Trimethylsilyl-1-octin-3-on (**36a**) (400 mg, 2.0 mmol) in Methanol (80 mL) gegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung orange. Nach 2 h wurde mit eisgekühlter 2 M aq. HCl hydrolisiert und mit Isohexan (3 $\times$ 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Flashchromatographie wurde **53a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 49 mg (0.4 mmol, 20 %).

R_f : 0.32 (Isohexan:Ethylacetat = 10:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.83 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.20 – 1.30 (m, 4H, CH₂), 1.56 – 1.66 (m, 2H, CH₂), 2.51 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 3.16 (s, 1H, CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 14.0 (CH₃), 22.5, 23.6, 31.2, 45.6 (CH₂), 78.5, 81.6 (C $\equiv$ C), 187.8 (CO).

GCMS: R_t = 5.5 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 123 (9) [M^+ – H], 109 (15) [M^+ – CH₃], 95 (8) [M^+ – C₂H₅], 81 (18), 68 (100), 53 (42).

C₈H₁₂O 124.18

1-Chlor-3-butin-2-on (54a). Wäßrige Borax-Lösung (0.01 M, 4.2 mL, 48 μ mol) wurde über einen Zeitraum von 10 min zu einer Lösung von 1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**28a**) (1.05 g, 6.0 mmol) in Methanol / THF (10:1; 65 mL) gegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung leicht gelb. Nach 1 h wurde mit eisgekühlter 2 M aq. HCl (100 mL) hydrolisiert und mit CH₂Cl₂ (3 $\times$ 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Destillation (4.6 mbar/26°C) wurde **54a** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 4 mg (39 μ mol, < 1 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3.46 (s, 1H, CH), 4.26 (s, 2H, CH₂Cl).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 49.6$ (CH_2Cl), 78.9, 82.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 178.6 (CO).

GCMS: $R_t = 3.3$ min (Temperaturprogramm B)
 m/z (%) = 102 (22) [M^+], 88 (25), 73 (31), 70 (68), 61 (83), 57 (100).

$\text{C}_4\text{H}_3\text{ClO}$ 102.52

1-Brom-3-butin-2-on (55a). Wässrige Borax-Lösung (0.01 M, 3.0 mL, 35 μmol) wurde über einen Zeitraum von 10 min zu einer Lösung von 1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**29a**) (900 mg, 4.1 mmol) in Methanol / THF (10:1; 60 mL) gegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung leicht gelb. Nach 1 h wurde mit eiskühler 2 M aq. HCl (100 mL) hydrolysiert und mit CH_2Cl_2 (3×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Nach Destillation (4.6 mbar/50°C) wurde **55a** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 6 mg (40 μmol , < 1 %).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 3.43$ (s, 1H, CH), 4.06 (s, 2H, CH_2Br).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 35.4$ (CH_2Br), 79.1, 82.5 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 177.7 (CO).

GCMS: $R_t = 7.5$ min (Temperaturprogramm B)
 m/z (%) = 146 (6) [M^+], 118 (21), 93 (5) [CH_2Br^+], 79 (3) [Br^+], 53 (100).

$\text{C}_4\text{H}_3\text{BrO}$ 146.97

6-Chlor-1-hexin-3-on (56a). Wässrige Borax-Lösung (0.01 M, 25.0 mL, 288 μmol) wurde zu einer Lösung aus 6-Chlor-1-trimethylsilyl-1-hexin-3-on (**106a**) (2.76 g, 13.6 mmol) in Methanol (80 mL) gegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung gelb. Nach 45 min wurde mit eiskühler 1 M aq. HCl hydrolysiert und mit Diethylether (3×50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Nach Flashchromatographie wurde **56a** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.06 g (8.1 mmol, 60 %).

R_f : 0.26 (Isohexan:Ethylacetat = 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.10 ('q', J = 6.7 Hz, 2H, CH_2), 2.79 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2), 3.29 (s, 1H, CH), 3.56 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 26.3, 42.4, 43.9 (CH_2), 79.3, 81.3 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 186.0 (CO).

GCMS: R_t = 5.1 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 129 (2) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 95 (9) [$\text{M}^+ - \text{Cl}$], 81 (4) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl}$], 68 (100), 53 (87) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO}$].

$\text{C}_6\text{H}_7\text{ClO}$ 130.58

1-Phenyl-2-propin-1-on (**57a**). Wäßrige Borax-Lösung (0.01 M, 9.0 mL, 104 μmol) wurde zu einer Lösung von 1-Phenyl-3-trimethylsilyl-2-propin-1-on (**27a**) (1.16 g, 5.7 mmol) in Methanol (70 mL) gegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung orange. Nach 10 min wurde mit eisgekühlter 2 M aq. HCl (100 mL) hydrolysiert und mit Isohexan (3 $\times$ 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie wurde **57a** als weiß-gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 52°C (Lit.: 51°C)^[42b] erhalten. Ausbeute: 500 mg (3.8 mmol, 67 %).

R_f : 0.32 (Isohexan:Ethylacetat = 4:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 3.60 (s, 1H, CH), 7.50 – 7.69 (m, 3H, ar-H), 8.18 – 8.22 (m, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 80.6, 81.7 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 129.1, 130.1, 135.0, 136.5 (ar-C), 177.9 (CO).

GCMS: R_t = 7.4 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 130 (72) [M^+], 102 (100), 77 (18) [C_6H_5^+], 51 (18) [C_4H_3^+].

$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}$ 130.15

4-Oxo-5-hexinsäuremethylester (58a). Wässrige Borax-Lösung (0.01 M, 3.0 mL, 35 μ mol) wurde über einen Zeitraum von 10 min zu einer Lösung von 4-Oxo-6-trimethylsilyl-5-hexinsäuremethylester (**34a**) (900 mg, 4.2 mmol) in Methanol / THF-Lösung (10:1; 50 mL) gegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung gelb. Nach 25 min wurde mit 2 M aq. HCl (50 mL) hydrolysiert und mit CH₂Cl₂ (3 $\times$ 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Destillation (100 mbar/64°C) wurde **58a** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 496 mg (3.5 mmol, 84 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.65 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 2.94 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CH₂), 3.27 (s, 1H, CH), 3.69 (s, 3H, OCH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 27.6, 40.2 (CH₂), 52.2 (OCH₃), 79.4, 81.1 (C $\equiv$ C), 172.9 (CO₂), 185.2 (CO).

GCMS: R_t = 6.3 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 140 (1) [M⁺], 125 (11) [M⁺ – CH₃], 109 (59) [M⁺ – CH₃O], 81 (33) [M⁺ – C₂H₃O₂], 53 (100) [M⁺ – C₄H₇O₂].

C₇H₈O₃ 140.14

Sonstige Substrat-Synthesen

1-Pentin-3-on (59a).^[49] 1-Pentin-3-ol (**59b**) (1.34 g, 15.9 mmol) und aktiviertes MnO₂ (13.1 g, 150.9 mmol) wurden in CH₂Cl₂ (30 mL) suspendiert und bei RT gerührt. Nach 45 min wurde eine weitere Portion aktiviertes MnO₂ (13.1 g, 150.9 mmol) zugegeben und die Mischung weitere 90 min gerührt. Anschließend wurde das MnO₂ abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingeeengt. Durch Kugelrohrdestillation wurde **59a** als klare Flüssigkeit erhalten. Das Produkt **59a** war durch 10 % 1-Pentin-3-ol (**59b**) verunreinigt. Ausbeute: 196 mg (2.4 mmol, 15 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.15 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 2.62 (q, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.22 (s, 1H, CH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 7.9$ (CH_3), 39.0 (CH_2), 78.6 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 81.5 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 188.2 (CO).

$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}$ 82.10

1-Methoxy-4-trimethylsilyl-3-buten-2-on (62a). Zu einer Lösung von Trimethylsilylacetilen (1.63 g, 16.6 mmol) in trockenem THF (20 mL) wurde bei 0°C *n*-BuLi (10.4 mL, 16.4 mmol, 1.6 M in Hexan) zugetropft und die Reaktionslösung 15 min bei 0°C gerührt. Der Ansatz wurde bei 0°C zu einer Suspension aus CuBr (2.39 g, 16.6 mmol) und LiBr (2.89 g, 33.3 mmol) in THF (100 mL) gegeben und weitere 20 min gerührt. Hierbei änderte die Mischung ihre Färbung von grün nach gelb. Anschließend wurde Methoxyessigsäurechlorid (1.64 g, 15.1 mmol) in trockenem THF (20 mL) über einen Zeitraum von 20 min zugegeben, wobei sich die Lösung bräunlich färbte. Nach weiteren 30 min wurde mit gesättigter NH_4Cl -Lösung (100 mL) hydrolisiert und mit Diethylether (3×30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie wurde **62a** als hellrotes Öl erhalten. Ausbeute: 1.59 g (9.4 mmol, 62 %).

R_f : 0.18 (Isohexan:Ethylacetat = 20:1).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 0.24$ (s, 9H, $\text{Si}[\text{CH}_3]_3$), 3.45 (s, 3H, OCH_3), 4.18 (s, 2H, CH_2).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = -0.7$ ($\text{Si}[\text{CH}_3]_3$), 59.7 (CH_2), 99.7 , 101.5 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 184.7 (CO).

GCMS: $R_t = 6.3$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 170 (1) [M^+], 155 (6) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 140 (16) [$\text{M}^+ - 2\text{CH}_3$], 125 (100), 97 (84) [$\text{M}^+ - \text{Si}(\text{CH}_3)_3$], 73 (47).

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Si}$ 170.29

4-Oxo-2-pentinsäureethylester (65a).^[51] Gesättigte wässrige NH_4OH -Lösung wurde solange zu einer Suspension von AgNO_3 (6.83 g, 40.8 mmol) in Wasser / Methanol (1:2; 240 mL) getropft bis sich der Niederschlag gerade gelöst hatte. Nach einer weiteren Zugabe der NH_4OH -Lösung (1 mL) wurde zu dieser Lösung Propargylsäure-

reethylester (4.00 g, 40.8 mmol) gelöst in Methanol (10 mL) über einen Zeitraum von 30 min bei RT zugegeben. Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt und anschließend mit CHCl_3 / CCl_4 (1:1; 3×70 mL) extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Einengen im Vakuum wurde das Produkt im Vakuum getrocknet, wobei Propargylsäureethylester-Argentat als silbrig-brauner Feststoff erhalten wurde. Ausbeute: 6.70 g (32.6 mmol, 80 %). Anschließend wurde das Argentat in trockenem CH_2Cl_2 (75 mL) suspendiert und Acetylchlorid (2.56 g, 32.6 mmol) gelöst in CH_2Cl_2 (10 mL) bei RT zugegeben. Der Ansatz wurde 8 h gerührt, wobei sich ein lila-brauner Niederschlag bildete. Die Lösung wurde zentrifugiert (10.000 U/min) und vom Niederschlag abdekantiert. Nach Einengen im Vakuum wurde **65a** durch Destillation (0.1 mbar/44°C) als klare Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 3.02 g (21.6 mmol, 66 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.33 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH_3), 2.42 (s, 3H, CH_3), 4.29 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH_2).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 14.1$, 32.6 (CH_3), 63.2 (CH_2), 78.1, 80.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 152.3 (CO_2), 182.7 (CO).

GCMS: $R_t = 5.6$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 140 (4) [M^+], 125 (85) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 95 (64) [$\text{M}^+ - \text{OCH}_2\text{CH}_3$], 80 (14) [$\text{M}^+ - \text{OCH}_2\text{CH}_3 - \text{CH}_3$], 53 (100).

$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3$ 140.14

(*Z*)-4-Phenyl-3-buten-2-on (**71a**). Eine Lösung von 4-Phenyl-3-buten-2-on (**2a**) (500 mg, 3.5 mmol) in Pentan (5 mL) wurde an Lindlar-Katalysator (35 mg) unter Normaldruck und Rühren über 5.5 h mit Wasserstoff hydriert. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingengt. Nach Flashchromatographie wurde **71a** als klare Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 147 mg (1.0 mmol, 29 %).

R_f : 0.30 (Isohexan:Ethylacetat = 20:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 2.17$ (s, 3H, CH_3), 6.20 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.92 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 7.26 – 7.43 (m, 3H, ar-H), 7.40 – 7.56 (m, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 31.3$ (CH_3), 128.8, 129.6, 129.7, 129.8, 135.8, 140.6 (ar-C, $\text{C}=\text{C}$), 201.5 (CO).

GCMS: $R_t = 8.4$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 145 (96) [$M^+ - H$], 131 (100) [$M^+ - CH_3$], 103 (98) [$M^+ - CH_3 - CO$], 77 (31).

$C_{10}H_{10}O$ 146.19

(*Z*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on (**72a**).^[55] Zu einer Lösung von Diisopropylamin (107 mg, 1.1 mmol) in trockenem THF (7 mL) wurde bei 0°C *n*-BuLi (550 µl, 0.9 mmol, 1.6 M in Hexan) zugegeben und die Lösung 15 min gerührt. Anschließend wurde (*Z*)-4-Phenyl-3-buten-2-on (**71a**) (107 mg, 0.7 mmol) in trockenem THF (4 mL) gelöst über einen Zeitraum von 25 min bei 0°C zu der Reaktionsmischung getropft. Nach weiteren 30 min wurde die Mischung auf –70°C gekühlt und *N*-Chlorsuccinimid (127 mg, 1.0 mmol) in trockenem THF (7 mL) schnell zugegeben. Nach 2 min Rühren bei –70°C wurde die Lösung mit ges. $NaHCO_3$ / NaCl-Lösung (1:1; 15 mL) hydrolysiert und auf 0°C erwärmt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige Phase mit Diethylether (2 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie wurde **72a** als gelbes Öl erhalten. Das Produkt enthielt noch 20 % Edukt sowie 10 % (*E*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on (**73a**) (GCMS), welche nicht abgetrennt werden konnten. Ausbeute: 25 mg (0.1 mmol, 19 %).

R_f : 0.17 (Isohexan:Ethylacetat = 5:1)

1H -NMR ($CDCl_3$): δ = 4.05 (s, 2H, CH_2), 6.23 (d, J = 12.7 Hz, 1H, $C=CH$), 6.97 (d, J = 12.7 Hz, 1H, $C=CH$), 7.21 – 7.38 (m, 3H, ar-H), 7.29 – 7.45 (m, 2H, ar-H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ = 49.2 (CH_2), 124.5, 128.7, 130.0, 130.2, 134.8, 144.0 (ar-C, $C=C$), 193.3 (CO).

GCMS: $R_t = 9.9$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 180 (12) [M^+], 131 (100) [$M^+ - CH_2Cl$], 103 (54) [$M^+ - CH_2Cl - CO$], 77 (26).

$C_{10}H_9ClO$ 180.64

(*E*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on (**73a**).^[55] Zu einer Lösung von Diisopropylamin (146 mg, 1.4 mmol) in trockenem THF (10 mL) wurde bei 0°C *n*-BuLi (750 µl, 1.2 mmol, 1.6 M in Hexan) zugegeben und die Lösung 15 min gerührt. Anschließend wurde (*E*)-4-Phenyl-3-buten-2-on (146 mg, 1.0 mmol) in trockenem THF (5 mL) gelöst über einen Zeitraum von 30 min bei 0°C zu der Reaktionsmischung getropft. Nach weiteren 30 min wurde die Mischung auf –70°C gekühlt und *N*-Chlorsuccinimid (174 mg, 1.3 mmol) in trockenem THF (10 mL) schnell zugegeben. Nach 2 min Rühren bei –70°C wurde die Lösung mit ges. NaHCO₃ / NaCl-Lösung (1:1; 20 mL) hydrolysiert und auf 0°C erwärmt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige Phase mit Diethylether (2 × 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie wurde **73a** als farbloser Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 55 – 56°C (Lit.: 56 – 57°C)^[112] erhalten. Ausbeute: 36 mg (0.2 mmol, 20 %).

*R*_f: 0.35 (Isohexan:Diethylether = 9:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 4.32 (s, 2H, CH₂Cl), 6.99 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, C=CH), 7.36 – 7.48 (m, 3H, ar-H), 7.52 – 7.66 (m, 2H, ar-H), 7.72 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H, C=CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 47.7 (CH₂Cl), 121.8, 128.8, 129.2, 131.4, 134.1, 145.4 (ar-C, C=C), 191.5 (CO).

GCMS: *R*_t = 10.4 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 180 (8) [M⁺], 131 (100) [M⁺ – CH₂Cl], 103 (51) [M⁺ – CH₂Cl – CO], 77 (20).

C₁₀H₉ClO 180.64

4.3 Synthese der racemischen Alkohole

Analytische Racemat-Synthese und Trennung der Enantiomere

AAV IV: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reduktion von Alkinonen mit NaBH_4 (Analytischer Maßstab).^[56] Das Alkinon (10 μmol) wird zu einer Lösung von NaBH_4 (0.2 mg, 5 μmol) in Ethanol (1 mL) gegeben und für 1 h bei 0°C gerührt. Anschließend wird die Mischung mit 1 M aq. HCl (1 mL) hydrolysiert, gesättigte NaCl-Lösung (1 mL) zugegeben und mit CH_2Cl_2 (1 mL) extrahiert.

AAV V: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Desilylierung von Alkinolen mit $(n\text{-Bu})_4\text{NF}$ (Analytischer Maßstab).^[52] Das Silyl-Alkinol (5 μmol) und $(n\text{-Bu})_4\text{NF}$ (0.5 mL, 1 M in THF) werden in THF (2 mL) für 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Mischung mit gesättigter NaCl-Lösung (8 mL) und Wasser (8 mL) hydrolysiert, und mit CH_2Cl_2 (400 μL) extrahiert.

4-Phenyl-3-butin-2-ol (2b). Synthese ausgehend von 4-Phenyl-3-butin-2-on (**2a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 95:5), $R_t = 24.3$ min (*R*) + 31.9 min (*S*). – GCMS: $R_t = 8.0$ min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 146 (50) [M^+], 131 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 103 (61) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 77 (35) [C_6H_5^+].

3-Butin-2-ol (9b). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Cyclo-dex- β Säule ($T = 35^\circ\text{C}$), $R_t = 13.9$ min (*R*) + 15.5 min (*S*).

4-Trimethylsilyl-3-butin-2-ol (21b). Trennung der Enantiomere nach Desilylierung gemäß AAV V; Umsatz 100 %. Die Trennung der Enantiomere des 3-Butin-2-ols (**9b**) erfolgte wie beschrieben.

4-(4'-Bromphenyl)-3-butin-2-ol (23b). Synthese ausgehend von 4-(4'-Bromphenyl)-3-butin-2-on (**23a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralpak AD Säule (Isohexan:2-Propanol = 99:1), $R_t = 54.4$ min (*S*) + 60.6 min (*R*). – GCMS: $R_t = 10.4$ min (Temperaturpro-

gramm A); m/z (%) = 224 (33) [M^+], 209 (100) [$M^+ - CH_3$], 181 (22) [$M^+ - CH_3 - CO$], 145 (26) [$M^+ - Br$], 102 (75) [$M^+ - Br - CH_3 - CO$].

4-(3'-Bromphenyl)-3-butin-2-ol (24b). Synthese ausgehend von *4-(3'-Bromphenyl)-3-butin-2-on (24a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 98:2), R_t = 63.8 min (*S*) + 69.2 min (*R*). – GCMS: R_t = 10.2 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 224 (16) [M^+], 209 (33) [$M^+ - CH_3$], 181 (17) [$M^+ - CH_3 - CO$], 145 (100) [$M^+ - Br$], 102 (62) [$M^+ - Br - CH_3 - CO$].

4-(2'-Bromphenyl)-3-butin-2-ol (25b). Synthese ausgehend von *4-(2'-Bromphenyl)-3-butin-2-on (25a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 95:5), R_t = 26.2 min (*R*) + 35.1 min (*S*). – GCMS: R_t = 10.4 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 224 (27) [M^+], 209 (100) [$M^+ - CH_3$], 181 (19) [$M^+ - CH_3 - CO$], 145 (35) [$M^+ - Br$], 102 (62) [$M^+ - Br - CH_3 - CO$].

1-Hexin-3-ol (26b). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Cyclodex- β Säule ($T = 60^\circ C$), R_t = 26.3 min (*S*) + 28.4 min (*R*).

4-(4'-Methoxyphenyl)-3-butin-2-ol (37b). Synthese ausgehend von *4-(4'-Methoxyphenyl)-3-butin-2-on (37a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 95:5), R_t = 39.2 min (*R*) + 53.0 min (*S*). – GCMS: R_t = 10.3 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 176 (40) [M^+], 161 (100) [$M^+ - CH_3$], 145 (5) [$M^+ - OCH_3$], 133 (26) [$M^+ - CH_3 - CO$], 118 (14) [$M^+ - 2CH_3 - CO$].

4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-ol (38b). Synthese ausgehend von *4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-on (38a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralpak AD Säule (Isohexan:2-Propanol = 99:1), R_t = 45.5 min (*S*) + 47.8 min (*R*). – GCMS: R_t = 8.5 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 164 (33) [M^+], 149 (100) [$M^+ - CH_3$], 121 (43) [$M^+ - CH_3 - CO$], 101 (47) [$M^+ - CH_3 - CO - F$].

4-(4'-Chlorphenyl)-3-butin-2-ol (39b). Synthese ausgehend von *4-(4'-Chlorphenyl)-3-butin-2-on (39a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralpak AD Säule (Isohexan:2-Propanol = 99:1), R_t = 49.4 min (*S*) + 54.4 min (*R*). – GCMS: R_t = 9.8 min (Temperaturprogramm

A); m/z (%) = 180 (29) [M^+], 165 (100) [$M^+ - CH_3$], 145 (11) [$M^+ - Cl$], 137 (16) [$M^+ - CH_3 - CO$], 102 (14) [$M^+ - CH_3 - CO - Cl$].

4-(2-Pyridinyl)-3-butin-2-ol (40b). Synthese ausgehend von *4-(2-Pyridinyl)-3-butin-2-on (40a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 98:2), R_t = 61.9 min (*R*) + 68.1 min (*S*). – GCMS: R_t = 9.2 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 147 (8) [M^+], 132 (15) [$M^+ - CH_3$], 104 (100) [$M^+ - CH_3 - CO$], 78 (24).

4-(3'-Methyl-2-thienyl)-3-butin-2-ol (41b). Synthese ausgehend von *4-(3'-Methyl-2-thienyl)-3-butin-2-on (41a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 95:5), R_t = 33.6 min (*R*) + 38.6 min (*S*). – GCMS: R_t = 8.8 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 166 (44) [M^+], 151 (100) [$M^+ - CH_3$], 134 (10) [$M^+ - S$], 123 (32) [$M^+ - CH_3 - CO$].

5-Methyl-5-hexen-3-in-2-ol (44b). Synthese ausgehend von *5-Methyl-5-hexen-3-in-2-on (44a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Cyclodex- β Säule ($T = 60^\circ C$), R_t = 47.6 min (*R*) + 51.1 min (*S*). – GCMS: R_t = 3.9 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 109 (17) [$M^+ - H$], 95 (100) [$M^+ - CH_3$], 77 (14), 67 (41).

5-Methyl-3-hexin-2,5-diol (45b).^[58] Zu einer Lösung von *2-Methyl-3-butin-2-ol* (126 mg, 1.5 mmol) in trockenem THF (1.5 mL) wurde bei $-78^\circ C$ über einen Zeitraum von 15 min *n*-BuLi (1.9 mL, 3 mmol, 1.6 M in Hexan) zugetropft und der Ansatz weitere 60 min bei $-78^\circ C$ gerührt. Anschließend wurde Acetaldehyd (440 mg, 1 mmol) bei $-78^\circ C$ zugegeben und weitere 2 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und mit Wasser (8 mL) hydrolysiert. Nach Einengen der Lösung im Vakuum wurde die Reaktionsmischung mit CH_2Cl_2 extrahiert und über Na_2SO_4 getrocknet. Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Cyclodex- β Säule ($T = 100^\circ C$), R_t = 37.9 min (*R*) + 40.0 min (*S*). – GCMS: R_t = 5.8 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 113 (98) [$M^+ - CH_3$], 95 (100) [$M^+ - CH_3 - H_2O$], 85 (10) [$M^+ - CH_3 - CO$], 67 (92).

4-(1-Cyclohexen)-3-butin-2-ol (46b). Synthese ausgehend von *4-(1-Cyclohexen)-3-butin-2-on (46a)* nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 99.5:0.5), R_t = 37.0 min (*S*) + 42.7 min (*R*). – GCMS: R_t = 8.1 min (Temperaturpro-

gramm A); m/z (%) = 150 (65) [M^+], 135 (53) [$M^+ - CH_3$], 121 (100) [$M^+ - C_2H_5$], 107 (42) [$M^+ - CH_3 - CO$], 91 (74), 79 (82).

4-Triethylsilyl-3-butin-2-ol (47b). Synthese ausgehend von 4-Triethylsilyl-3-butin-2-on (**47a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. – GCMS: R_t = 7.4 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 184 (3) [M^+], 169 (1) [$M^+ - CH_3$], 155 (22) [$M^+ - CH_2CH_3$], 127 (100) [$M^+ - CH_2CH_3 - CO$], 113 (34), 99 (57). – Trennung der Enantiomere nach Desilylierung gemäß AAV V; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere des 3-Butin-2-ols (**9b**) erfolgte wie beschrieben.

*4-(*t*-Butyldimethylsilyl)-3-butin-2-ol (48b)*. Synthese ausgehend von 4-(*t*-Butyldimethylsilyl)-3-butin-2-on (**48a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. – GCMS: R_t = 6.6 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 184 (5) [M^+], 169 (1) [$M^+ - CH_3$], 127 (7) [$M^+ - t\text{-Bu}$], 109 (5) [$M^+ - t\text{-Bu} - H_2O$], 99 (100) [$M^+ - t\text{-Bu} - CO$]. – Trennung der Enantiomere nach Desilylierung gemäß AAV V; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere des 3-Butin-2-ols (**9b**) erfolgte wie beschrieben.

4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-ol (49b). Synthese ausgehend von 4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-on (**49a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. – GCMS: R_t = 9.7 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 189 (3) [$M^+ - CH_3$], 161 (100) [$M^+ - CH_3 - CO$], 75 (28). – Trennung der Enantiomere durch Desilylierung nach AAV V; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere des 3-Butin-2-ols (**9b**) erfolgte wie beschrieben.

1-Octin-3-ol (53b). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Cyclodex- β Säule ($T = 80^\circ\text{C}$), R_t = 41.8 min (*S*) + 44.9 min (*R*).

1-Chlor-3-butin-2-ol (54b). Synthese ausgehend von 1-Chlor-3-butin-2-on (**54a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 95 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Lipodex E Säule ($T = 60^\circ\text{C}$), R_t = 42.1 min (*S*) + 45.3 min (*R*). – GCMS: R_t = 4.7 min (Temperaturprogramm B); m/z (%) = 103 (6) [$M^+ - H$], 87 (2), 75 (3), 69 (8) [$M^+ - Cl$], 55 (100) [$M^+ - CH_2Cl$], 51 (15).

1-Brom-3-butin-2-ol (55b). Synthese ausgehend von 1-Brom-3-butin-2-on (**55a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Lipodex E Säule ($T = 70^\circ\text{C}$), R_t = 56.4 min (*S*) + 61.3 min (*R*). – GCMS: R_t = 4.5 min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 147 (9) [$M^+ - H$], 121 (4), 93 (5), 69 (21) [$M^+ - Br$], 55 (100) [$M^+ - CH_2Br$], 51 (16).

6-Chlor-1-hexin-3-ol (56b). Synthese ausgehend von 6-Chlor-1-hexin-3-on (**56a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Cyclodex β Säule ($T = 95^\circ\text{C}$), $R_t = 51.4$ min (*S*) + 53.5 min (*R*). – GCMS: $R_t = 6.5$ min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 131 (1) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 104 (14), 79 (10) [$\text{M}^+ - \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}$], 70 (24), 55 (100).

1-Pentin-3-ol (59b). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC auf einer Lipodex E Säule ($T = 35^\circ\text{C}$), $R_t = 30.5$ min (*S*) + 32.0 min (*R*).

4-Hydroxy-2-pentinsäureethylester (65b). Synthese ausgehend von 4-Oxo-2-pentinsäureethylester (**65a**) nach AAV IV; Umsatz (GCMS): 100 % (ca. 10 % Nebenprodukt; s. Abschnitt 2.1.3). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 98:2), $R_t = 30.3$ min (*S*) + 34.3 min (*R*). – GCMS: $R_t = 6.7$ min (Temperaturprogramm A); m/z (%) = 141 (1) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 127 (22) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 99 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 81 (29), 71 (52).

Präparative Racemat-Synthese und Trennung der Enantiomere

AAV VI: *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Reduktion von Alkinonen mit NaBH_4 (Präparativer Maßstab).*^[56] Zu einer Lösung von Alkinon (175 μmol) in 2-Propanol (1.5 mL) wird NaBH_4 (13 mg, 350 μmol) gegeben und die Reaktionsmischung für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 2 M aq. HCl (1 mL) hydrolysiert und mit CH_2Cl_2 (1 mL) extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Der racemische Alkohol wird ohne weitere Aufarbeitung in einer Reinheit von größer 90 % erhalten.

AAV VII: *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Synthese von (*S*)-MTPA-Estern aus Alkinolen.*^[113] Das Alkinol (50 μmol) und (*R*)-(-)- α -Methoxy- α -trifluor-phenylessigsäurechlorid (43 mg, 170 μmol) werden in Pyridin (500 μL) gelöst und über einen Zeitraum von 90 min gerührt. Dann wird mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung (2 mL) hydrolysiert und der Ansatz weitere 30 min gerührt. Anschließend wird mit CHCl_3 (1 mL) extrahiert und die organische Phase mit Wasser (1 mL), gesättigter $\text{NH}_4\text{-Cl}$ -Lösung (1 mL) und gesättigter NaCl -Lösung (1 mL) gewaschen. Nach Einengen im Vakuum wird der Ester ohne weitere Aufarbeitung in einer Reinheit von größer 90 % erhalten. Bei den NMR-Daten werden ausschließlich die zur Bestimmung der absoluten

ten Konfiguration relevanten Verschiebungen angeben (s. Abschnitt 2.4.3). Die GC-Trennungen wurden auf einer Cyclodex- β Säule durchgeführt. Die angegebenen (*S*)- und (*R*)-Zuordnungen beziehen sich auf die Konfiguration des jeweiligen Alkinol-Enantiomers.

(*S*)-MTPA-21b. Die Trennung der Enantiomere von 4-Trimethylsilyl-3-butin-2-ol (**21b**) erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **21b** (7 mg, 50 μ mol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 9 mg (27 μ mol, 53 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.51 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3 [*S*]), 1.57 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3 [*R*]), 3.57 (s, 3H, OCH_3 [*R*]), 3.60 (s, 3H, OCH_3 [*S*]).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 21.1 (*S*), 21.2 (*R*) (CH_3), 91.1 (*R*), 91.3 (*S*), 102.0 (*R*), 102.3 (*S*) ($\text{C}\equiv\text{C}$).

GCMS: R_t = 11.00 min (*S*) + 11.05 min (*R*), (Temperaturprogramm A).

GC: 180°C; 10.2 min (*S*) + 10.8 min (*R*).

$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{O}_3\text{Si}$ 358.44

(*S*)-MTPA-26b. Die Trennung der Enantiomere von 1-Hexin-3-ol (**26b**) erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **26b** (5 mg, 50 μ mol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 8 mg (27 μ mol, 54 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.36-1.46 (m, 2H, CH_2 [*S*]), 1.48-1.57 (m, 2H, CH_2 [*R*]), 3.57 (s, 3H, OCH_3 [*R*]), 3.60 (s, 3H, OCH_3 [*S*]).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 18.2 (*S*), 18.4 (*R*) (CH_2), 36.46 (*S*), 36.49 (*R*) (CH_2), 74.85 (*R*), 74.93 (*S*), 79.9 (*R*), 80.1 (*S*) ($\text{C}\equiv\text{C}$).

GCMS: R_t = 10.55 min (*S*) + 10.63 min (*R*), (Temperaturprogramm A).

GC: 180°C; 8.9 min (*S*) + 9.6 min (*R*).

$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{O}_3$ 314.31

1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (28b). Zu einer Lösung von 1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**28a**) (23.60 g, 135.6 mmol) in trockenem Ethanol (600 mL) wurde bei 0°C über einen Zeitraum von 30 min NaBH₄ (2.58 g, 67.8 mmol) in 5 Portionen zugegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung braun. Nach 45 min wurde 5 %ige Essigsäure (300 mL) zugegeben und die Lösung im Vakuum auf 400 mL eingengt. Abschließend wurde der Ansatz mit Wasser (200 mL) verdünnt, mit CH₂Cl₂ (3 × 200 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Destillation (0.93 mbar/73°C) wurde **28b** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 10.09 g (57.1 mmol, 42 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.20 (s, 9H, SiCH₃), 2.35 (s, 1H, OH), 3.62-3.79 (m, 2H, CH₂), 4.58 (dd, *J* = 6.9 Hz, 4.0 Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -0.1 (SiCH₃), 49.0 (CH₂), 63.1 (CHOH), 91.9, 102.4 (C≡C).

IR: 3355 (w), 2960 (w), 2177 (w), 1250 (s), 1042 (s), 838 (ss), 758 (ss).

GCMS: *R*_t = 7.2 min (Temperaturprogramm A)
m/z (%) = 175 (1) [M⁺ – H], 161 (4) [M⁺ – CH₃], 127 (100) [M⁺ – CH₂Cl], 95 (97), 75 (46).

HRMS (M⁺ – CH₃): ber.: 161.0194
 gef.: 161.0189

C ₇ H ₁₃ ClOSi	176.76		
berechnet (%):	C 47.58	H 7.41	
gefunden (%):	C 47.18	H 7.31	

(S)-MTPA-28b. Die Trennung der Enantiomere von 1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (**28b**) erfolgte über den entsprechenden (S)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **28b** (9 mg, 50 μmol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 11 mg (28 μmol, 55 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3.61 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H, OCH₃ [*R*]), 3.65 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H, OCH₃ [*S*]), 3.71-3.76 (m, 2H, CH₂Cl [*R*]), 3.77-3.83 (m, 2H, CH₂Cl [*S*]).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 44.44$ (*R*), 44.47 (*S*) (CH_3), 94.3 (*S*), 94.5 (*R*), 97.1 (*S*), 97.6 (*R*) ($\text{C}\equiv\text{C}$).

GCMS: $R_t = 10.02$ min, (Temperaturprogramm A).

GC: 160°C ; 54.9 min (*R*) + 56.0 min (*S*).

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{ClF}_3\text{O}_3\text{Si}$ 392.91

1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (**29b**) – Variante 1. Zu einer Lösung von *1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on* (**29a**) (14.00 g, 63.9 mmol) in trockenem Ethanol (280 mL) wurde bei 0°C über einen Zeitraum von 30 min NaBH_4 (1.20 g, 32.0 mmol) in 5 Portionen zugegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung braun. Nach weiteren 45 min wurde 5 %ige Essigsäure (110 mL) zugegeben und die Lösung im Vakuum auf 150 mL eingengt. Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser (150 mL) verdünnt, mit CH_2Cl_2 (3×150 mL) extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Destillation (0.17 mbar/ 55°C) wurde **29b** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 7.41 g (33.5 mmol, 53 %).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 0.19$ (s, 9H, SiCH_3), 2.32 (s, 1H, OH), 3.45-3.62 (m, 2H, CH_2), 4.59 (dd, $J = 6.8$ Hz, 4.1 Hz, 1H, CH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = -0.1$ (SiCH_3), 38.0 (CH_2), 62.6 (CHOH), 91.8, 102.6 ($\text{C}\equiv\text{C}$).

IR: 3312 (w), 2960 (w), 2174 (w), 1250 (s), 1025 (s), 837 (ss), 759 (ss).

GCMS: $R_t = 7.1$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 221 (1) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 205 (4) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 139 (64) [$\text{M}^+ - \text{Br}$], 127 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Br}$], 99 (36), 75 (14).

HRMS ($\text{M}^+ - \text{CH}_3$): ber.: 206.9664
gef.: 206.9681

$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{BrOSi}$ 221.21
berechnet (%): C 38.01 H 5.92
gefunden (%): C 38.14 H 5.87

1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (29b) – Variante 2. Zu einer Lösung von DIBAL-H (41.1 mL, 41.1 mmol, 1 M in Hexan) wurde bei 0°C innerhalb von 1 min eine Lösung von *1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (29a)* (3.00 g, 13.6 mmol) in Hexan (30 mL) gegeben. Nach 10 min wurde mit gesättigter NaCl-Lösung (60 mL) hydrolisiert und anschließend 15 %ige Essigsäure (35 mL) zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde über eine Glasfritte abfiltriert. Anschließend wurde der Ansatz mit Diethylether (3 × 100 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt **29b** wurde ohne weitere Aufarbeitung als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1.65 g (7.5 mmol, 55 %).

Die analytischen Daten stimmen mit denen der Verbindung **29b**, die nach Variante 1 erhalten wurde, überein.

(S)-MTPA-29b. Die Trennung der Enantiomere von *1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (29b)* erfolgte über den entsprechenden (S)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **29b** (11 mg, 50 µmol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 20 mg (45 µmol, 91 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 3.61 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H, OCH₃ [*R*]), 3.66 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H, OCH₃ [*S*]), 3.53-3.58 (m, 2H, CH₂Br [*R*]), 3.58-3.63 (m, 2H, CH₂Br [*S*]).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 31.18 (*R*), 31.23 (*S*) (CH₃), 94.1 (*S*), 94.3 (*R*), 97.7 (*S*), 98.1 (*R*) (C≡C).

GCMS: *R*_t = 12.41 min, (Temperaturprogramm A).

GC: 160°C; 77.8 min (*R*) + 80.8 min (*S*).

C₁₇H₂₀BrF₃O₃Si 437.36

1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol (30b). Zu einer Lösung von *1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (30a)* (6.00 g, 33.6 mmol) in trockenem Ethanol (150 mL) wurde bei 0°C über einen Zeitraum von 30 min NaBH₄ (640 mg, 16.8 mmol) in 5 Portionen zugegeben. Nach einigen Minuten färbte sich die Reaktionsmischung dunkelrot. Nach weiteren 30 min wurde 5 %ige Essigsäure-Lösung (50 mL) zugegeben und die Lösung im Va-

kuum auf 80 mL eingengt. Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser (70 mL) verdünnt, mit CH₂Cl₂ (3 × 70 mL) extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Nach Flashchromatographie wurde **30b** als dunkelrotes Öl erhalten. Ausbeute: 4.31 g (23.9 mmol, 71 %). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 95:5), R_t = 39.0 min (*S*) + 44.7 min (*R*).

R_f : 0.23 (Isohexan:CH₂Cl₂ = 2:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.61 (s, 1H, OH), 3.74-3.88 (m, 2H, CH₂), 4.84 (dd, J = 6.3 Hz, 4.2 Hz, 1H, CH), 7.26-7.44 (m, 3H, ar-H), 7.40-7.53 (m, 2H, ar-H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 49.3 (CH₂), 63.2 (CHOH), 86.1, 86.6 (C≡C), 122.0, 128.6, 129.1, 132.0 (ar-C).

IR: 3353 (w), 2180 (w), 1489 (m), 1031 (s), 753 (ss), 688 (ss).

GCMS: R_t = 10.1 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 180 (15) [M⁺], 131 (100) [M⁺ – CH₂Cl], 115 (11), 103 (29) [M⁺ – CH₂Cl – CO], 77 (30) [C₆H₅⁺].

HRMS (M⁺ – CH₃): ber.: 180.0342
gef.: 180.0344

C₁₀H₉ClO 180.64

4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-ol (**38b**). Synthese nach AAV VI, ausgehend von 4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-on (**38a**) (28 mg, 175 μ mol) wurde **38b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 22 mg (137 μ mol, 78 %).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 1.55 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.85 (s, 1H, OH), 4.75 (q, J = 6.6 Hz, 1H, CH) 6.92-7.11 (m, 2H, ar-H), 7.32-7.51 (m, 2H, ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 24.6$ (CH_3), 59.0 (CHOH), 83.2 , 90.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 115.7 (d, $J = 22.0$ Hz, ar-CH), 118.9 (ar- C_q), 133.8 (d, $J = 8.4$ Hz, ar-CH), 162.7 (d, $J = 249.6$ Hz, ar-CF).

GCMS: $R_t = 8.5$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 164 (33) [M^+], 149 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 121 (43) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO}$], 101 (47) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{CO} - \text{F}$].

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{FO}$ 164.18

(*S*)-MTPA-**38b**. Die Trennung der Enantiomere von **38b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **38b** (8 mg, 50 μmol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 9 mg (24 μmol , 47 %).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.62$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 [*S*]), 1.67 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 [*R*]), 3.60 (s, 3H, OCH_3 [*R*]), 3.62 (s, 3H, OCH_3 [*S*]).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 21.2$ (*S*), 21.3 (*R*) (CH_3), 84.9 (*R*), 85.0 (*S*), 85.8 (*R*), 86.6 (*S*) ($\text{C}\equiv\text{C}$).

GCMS: $R_t = 13.18$ min (*S*) + 13.23 min (*R*), (Temperaturprogramm A).

GC: 210°C ; 20.7 min (*S*) + 21.9 min (*R*).

$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{F}_4\text{O}_3$ 380.33

5,5-Diethoxy-3-pentin-2-ol (**42b**). Synthese nach AAV VI, ausgehend von 5,5-Diethoxy-3-pentin-2-on (**42a**) (30 mg, 175 μmol) wurde **42b** als leicht gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 17 mg (99 μmol , 57 %).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.22$ (t, $J = 7.0$ Hz, 6H, CH_2CH_3), 1.45 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 2.36 (s, 1H, OH), $3.54 - 3.75$ (m, 4H, CH_2), 4.57 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, CH), 5.28 (s, 1H, CH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 15.2$ (CH_2CH_3), 24.2 (CH_3), 58.4 , 61.0 (CH_2 , CHOH), 79.5 , 87.4 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 91.4 (CHO_2).

GCMS: $R_t = 7.9$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 171 (4) [$M^+ - H$], 143 (1) [$M^+ - C_2H_5$], 127 (100) [$M^+ - OC_2H_5$], 99 (21) [$M^+ - C_2H_5 - CH_3 - CO$], 71 (56).

$C_9H_{16}O_3$ 172.22

(*S*)-MTPA-**42b**. Die Trennung der Enantiomere von **42b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **42b** (9 mg, 50 μ mol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 9 mg (24 μ mol, 47 %).

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 1.54$ (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 [*S*]), 1.60 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 [*R*]), 3.56 (s, 3H, OCH_3 [*R*]), 3.58 (s, 3H, OCH_3 [*S*]).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 20.9$ (*S*), 21.0 (*R*) (CH_3), 81.5 (*R*), 81.6 (*S*), 82.2 (*R*), 82.4 (*S*) ($C\equiv C$).

GCMS: $R_t = 12.43$ min, (Temperaturprogramm A).

GC: 210°C; 11.7 min (*S*) + 12.5 min (*R*).

$C_{19}H_{23}F_3O_5$ 388.37

4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-ol (**49b**). Synthese nach AAV VI, ausgehend von 4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-on (**49a**) (36 mg, 175 μ mol) wurde **49b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 26 mg (126 μ mol, 72 %).

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.43$ (s, 6H, CH_3), 1.49 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.87 (s, 1H, OH), 4.57 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, CH) 7.30-7.48 (m, 3H, ar-H), 7.55-7.70 (m, 2H, ar-H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): $\delta = -0.8$ ($SiCH_3$), 24.4 (CH_3), 59.0 (CHOH), 86.7, 109.5 ($C\equiv C$), 128.1, 129.7, 133.9, 136.9 (ar-C).

GCMS: $R_t = 9.7$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 189 (3) [$M^+ - CH_3$], 161 (100) [$M^+ - CH_3 - CO$], 75 (28).

$C_{12}H_{16}OSi$ 204.35

(*S*)-MTPA-**49b**. Die Trennung der Enantiomere von **49b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **49b** (10 mg, 50 μ mol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 10 mg (24 μ mol, 47 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 1.55 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH_3 [*S*]), 1.61 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH_3 [*R*]), 3.56 (s, 3H, OCH_3 [*R*]), 3.58 (s, 3H, OCH_3 [*S*]).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 21.0 (*S*), 21.2 (*R*) (CH_3), 89.2 (*R*), 89.4 (*S*), 103.7 (*R*), 104.0 (*S*) ($\text{C}\equiv\text{C}$).

GCMS: R_t = 13.70 min (*S*) + 13.75 min (*R*), (Temperaturprogramm A).

GC: 190°C; 58.3 min (*S*) + 62.8 min (*R*).

$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{O}_3\text{Si}$ 420.50

4-*t*-Butyldimethylsilyl-1-chlor-3-butin-2-ol (**50b**). Zu einer Lösung von 4-*t*-Butyldimethylsilyl-1-chlor-3-butin-2-on (**50a**) (4.00 g, 18.5 mmol) in trockenem Ethanol (130 mL) wurde bei 0°C über einen Zeitraum von 30 min NaBH_4 (350 mg, 9.3 mmol) in 3 Portionen zugegeben. Nach weiteren 30 min wurde 5 %ige Essigsäure (40 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung im Vakuum auf 60 mL eingeeengt. Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser (50 mL) verdünnt, mit CH_2Cl_2 (3 $\times$ 70 mL) extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt **50b** wurde ohne weitere Aufarbeitung als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 3.79 g (17.4 mmol, 94 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.12 (s, 6H, SiCH_3), 0.93 (s, 9H, $\text{SiC}[\text{CH}_3]_3$), 2.49 (s, 1H, OH), 3.60-3.75 (m, 2H, CH_2), 4.59 (dd, J = 6.4 Hz, 4.1 Hz, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = -4.6 (SiCH_3), 16.6 ($\text{SiC}[\text{CH}_3]_3$), 26.2 ($\text{SiC}[\text{CH}_3]_3$), 49.3 (CH_2), 63.1 (CHOH), 90.2, 103.0 ($\text{C}\equiv\text{C}$).

IR: 3347 (w), 2954 (w), 2929 (w), 2857 (w), 2176 (w), 1250 (s), 1042 (s), 837 (ss), 775 (ss).

GCMS: $R_t = 8.7$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 218 (8) $[M^+]$, 203 (1) $[M^+ - CH_3]$, 169 (4) $[M^+ - CH_2Cl]$,
161 (22) $[M^+ - t-Bu]$, 95 (100), 75 (46).

HRMS (M^+): ber.: 218.0894
gef.: 218.0898

$C_{10}H_{19}ClOSi$ 218.84
berechnet (%): C 54.90 H 8.75
gefunden (%): C 54.67 H 8.73

(*S*)-MTPA-**50b**. Die Trennung der Enantiomere von 4-*t*-Butyldimethylsilyl-1-chlor-3-butin-2-ol (**50b**) erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von **50b** (11 mg, 50 μ mol) als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 19 mg (42 μ mol, 85 %).

1H -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.61$ (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, OCH_3 [*R*]), 3.64 (d, $J = 1.5$ Hz, 3H, OCH_3 [*S*]), 3.72-3.75 (m, 2H, CH_2Cl [*R*]), 3.77-3.80 (m, 2H, CH_2Cl [*S*]).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): $\delta = 44.561$ (*R*), 44.564 (*S*) (CH_3), 92.8 (*S*), 92.9 (*R*), 97.9 (*S*), 98.3 (*R*) ($C\equiv C$).

GCMS: $R_t = 13.16$ min, (Temperaturprogramm A).

GC: 170°C; 84.3 min (*R*) + 86.2 min (*S*).

$C_{20}H_{26}ClF_3O_3Si$ 334.99

(*Z*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ol (**72b**).^[114] Eine Lösung von 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol (**30b**) (150 mg, 833 μ mol) und Ethylendiamin (90.2 mg, 1.5 mmol) in DMF (20 mL) wurde an Lindlar-Katalysator (210 mg) unter Normaldruck und Rühren über 75 min mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, mit Wasser (100 mL) verdünnt und der Ansatz mit Ethylacetat (2 $\times$ 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 0.5 M aq. HCl, gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und im

Vakuum eingengt. Nach Flashchromatographie wurde **72b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 114 mg (626 μ mol, 75 %). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralpak AD Säule (Isohexan:2-Propanol = 98:2), R_t = 23.6 min (*R*) + 29.1 min (*S*).

R_f : 0.26 (CH₂Cl₂:Ethylacetat = 20:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 2.40 (s, 1H, OH), 3.62-3.76 (m, 2H, CH₂), 4.72-4.89 (m, CHOH), 5.76 (dd, J = 11.7 Hz, 9.0 Hz, C=CH), 6.76 (d, J = 11.7 Hz, C=CH), 7.27 – 7.44 (m, 5H, ar-H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 49.9 (CH₂), 68.0 (CHOH), 128.0, 128.8, 128.9, 129.3, 134.3, 136.2 (ar-C, C=C).

GCMS: R_t = 9.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 182 (6) [M^+], 133 (100) [$M^+ - CH_2Cl$], 115 (41), 105 (32) [$M^+ - CH_2Cl - CO$], 91 (18), 77 (20) [C₆H₅⁺].

HRMS (M^+): ber.: 182.0498
 gef.: 182.0500

C₁₀H₁₁ClO 182.66

(*E*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ol (**73b**).^[105] Zu einer Lösung von 1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ol (**30b**) (277 mg, 1.5 mmol) in trockenem THF (12 mL) wurde bei 0°C Red-Al (703 μ L, 2.46 mmol, 3.5 M in Toluol) gegeben und für 15 min gerührt. Anschließend wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung (2 mL) zugetropft, mit Wasser verdünnt (25 mL) und mit Ethylacetat (2 $\times$ 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Die Nebenprodukte wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie von **73b** (70 mg, 385 μ mol) entfernt, wobei ein hellgelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 46 - 47°C erhalten wurde. Ausbeute: 56 mg (308 μ mol, 80 %). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 99.5:0.5), R_t = 76.1 min (*S*) + 86.2 min (*R*).

R_f : 0.34 (Isohexan:Ethylacetat = 40:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.44 (s, 1H, OH), 3.65-3.80 (m, 2H, CH_2), 4.55 (dd, J = 10.0 Hz, 6.1 Hz, 1H, CHOH), 6.22 (dd, J = 16.0 Hz, 6.1 Hz, C=CH), 6.74 (d, J = 16.0 Hz, C=CH), 7.27 – 7.40 (m, 5H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 49.9 (CH_2), 72.5 (CHOH), 126.8, 127.4, 128.4, 128.9, 133.0, 136.2 (ar-C, C=C).

GCMS: R_t = 10.2 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 182 (16) [M^+], 133 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl}$], 115 (31), 105 (22) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO}$], 77 (22) [C_6H_5^+].

HRMS (M^+): ber.: 182.0498
gef.: 182.0503

$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}$	182.66		
berechnet (%):	C 65.76	H 6.07	
gefunden (%):	C 65.42	H 6.03	

4.4 Enzym- und Substrat-Screening

Untersuchung der Stabilität der propargylischen Substrate in wäßrigen Systemen

In einem Rundkolben wurde das Alkinon (10 mmol/L) unter den jeweiligen in Tab. 2-5 angegebenen Bedingungen (je 5 mL Lösungsmittel) gerührt. Nach 60 sek wurde jeweils eine Probe (1 mL) mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mittels GCMS analysiert. In keiner der Proben wurde nach 60 sek eine Zersetzung der Substrate nachgewiesen. Nach 16 h wurden die Ansätze mit Ethylacetat (5 mL) extrahiert und die organische Phase wiederum mittels GCMS analysiert. Untersucht wurden die Stabilitäten folgender Substrate: **2a**, **9a**, **21a**, **26a**, **28a**, **29a**, **30a**, **48a**, **50a**, **53a** und **59a**. Die Ergebnisse sind Tab. 2-5 zu entnehmen.

Photometrische Enzymassays

Bei den Aktivitätsmessungen wird die Abnahme an NAD(P)H photometrisch über die Änderung der Extinktion pro Minute bei einer Wellenlänge von 340 nm ($\epsilon_{\text{NAD(P)H}} = 6.22 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$) verfolgt. Die Konzentration der eingesetzten Substrat-Lösungen beträgt 5 mM (2 mM bei aromatischen Alkinonen). Die Vorverdünnung der Enzymlösung wird so gewählt, daß die Abnahme der Extinktion bei 340 nm in der ersten Minute linear verläuft. In einer Halbmikro-Plastikküvette werden die Substratlösung (970 μl), NAD(P)H-Lösung (20 μl , 12.5 mM) sowie die Enzymlösung (10 μl) gegeben und mit einem Plastikspatel durchmischt. Für jedes Enzym wird parallel die Abnahme der Extinktion mit einem Standardsubstrat bestimmt. Die Meßergebnisse der Proben werden dann prozentual bezogen auf den Standard angegeben. Die Ergebnisse sind den Tab. 2-7 – Tab. 2-14 sowie Abschnitt 6.2 zu entnehmen. Über die Änderung der Extinktion kann die spezifische Enzymaktivität U_s berechnet werden (s. Abschnitt 2.2). 1 U ist definiert als die Menge Enzym, die unter den Meßbedingungen die Reduktion von einem Mikromol Substrat pro Minute katalysiert. Die bei den enzymatischen Umsetzungen angegebenen Enzymmengen U beziehen sich stets auf die Reduktion der Standardsubstrate.

recLB-ADH: Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei RT in TEA-Puffer (pH 6.5, 100 mM, 1 mM MgCl_2) mit NADPH als Cofaktor. Als Standardsubstrat wurde 5-Oxohexansäureethylester verwendet.

CPCR, *HL-ADH*, *Y-ADH*, *CB-ADH*: Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei RT in TEA-Puffer (pH 7.0, 100 mM) mit NADH als Cofaktor. Als Standardsubstrate wurden 5-Oxohexansäureethylester (*CPCR*), Cyclohexanon (*HL-ADH*), Aceton (*Y-ADH*) und 2-Butanon (*CB-ADH*) verwendet.

TB-ADH, *TE-ADH*: Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei 38°C in TEA-Puffer (pH 7.0, 100 mM) mit NADPH als Cofaktor. Als Standardsubstrat wurde 2-Butanon verwendet.

Untersuchung der Lösungsmittelverträglichkeit der Enzyme

Zur Bestimmung der Stabilität der Oxidoreduktasen in Anwesenheit organischer Lösungsmittel wurden die Enzyme unterschiedlichen Alkoholkonzentrationen ausgesetzt. Hierbei wurden *recLB-ADH* (2 U), *HL-ADH* (2 U) bzw. *TB-ADH* (5 U) in TEA-Puffer- / Alkohol-Gemischen (10 mL) mit Volumenverhältnissen von 10:0 (9:1, 8:2 etc.) bis 0:10 gerührt. Als Alkohole wurden 2-Propanol (*recLB-ADH*, *TB-ADH*) und Ethanol (*HL-ADH*) verwendet. Nach 16 h wurden NADP⁺ (*recLB-ADH*, *TB-ADH*) bzw. NAD⁺ (*HL-ADH*) (0.03 µmol) sowie 1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-on **30a** (9 mg, 50 µmol) als Substrat zugegeben. Nach weiteren 5 h wurden die Ansätze mit Ethylacetat extrahiert und die Umsätze des Substrats **30a** per GCMS ermittelt. Die Ergebnisse können Abb. 2-27 entnommen werden.

4.5 Enzymatische Reduktionen im analytischen Maßstab

CPCR katalysierte Reduktionen im analytischen Maßstab

AAV VIII: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die CPCR katalysierte Reduktion von Ketonen (analytischer Maßstab). Das Substrat (10 μmol) wird zu einer Lösung aus NAD^+ (0.45 mg, 0.6 μmol), Natriumformiat (68 mg, 1 mmol), FDH (2 U) und CPCR (0.5 U) in TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) gegeben. Nach 16 h bei RT wird der Ansatz mit CH_2Cl_2 (200 μL) extrahiert. Die GCMS- sowie die HPLC- bzw. GC-Daten stimmen in allen Fällen mit den bei den racemischen Alkoholen bestimmten Daten überein. Die Umsätze und Enantiomerenüberschüsse werden in den Tab. 2-7 – Tab. 2-14 angegeben.

Nach AAV VIII wurden folgende Substrate enzymatisch umgesetzt:

2a

9a (teilweise Zersetzung des Substrats)

21a

22a (Bildung von 50 % des gesättigten Alkohols; Wiederholung des Ansatzes mit säulenchromatographisch weiter aufgereinigter CPCR führte zu 25 % des gesättigten Alkohols)

23a-25a

26a (teilweise Zersetzung des Substrats)

28a, 29a, 50a (*ee* und absolute Konfiguration wurden nach Einengen im Vakuum über die entsprechenden Mosherester bestimmt. Die Synthese erfolgte nach AAV VII mit *R*-(-)- α -Methoxy- α -trifluor-phenylethylsäurechlorid (9 mg, 34 μmol). Umsatz: jeweils 100 %. Die GCMS- und GC-Daten stimmen mit den für die racemischen (*S*)-MTPA-(**28b**, **29b**, **50b**) bestimmten Daten überein)

30a (5 mg Substrat [28 μmol], 4.5 mg NAD^+ [60 μmol], 680 mg Natriumformiat [10 mmol], 20 U FDH, 5 U CPCR, 10 mL TEA-Puffer)

37a - 41a

44a - 46a

47a - 49a (*ee*-Bestimmung durch Überführung der Produkte in **9b** nach AAV V)

51a (Umsetzung führte ausschließlich zu Nebenprodukten)

53a	(teilweise Zersetzung des Substrats)
54a,55a	(10-fache Enzymmenge eingesetzt [20 U FDH, 5 U <i>CPCR</i>])
59a	(teilweise Zersetzung des Substrats)
65a	(starke Zersetzung des Substrats)
71a,72a	(Bildung von 40 % des gesättigten Alkohols).
73a	(Bildung von 50 % des gesättigten Alkohols)

recLB-ADH katalysierte Reduktionen im analytischen Maßstab

AAV IX: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die *recLB-ADH* katalysierte Reduktion von Ketonen (*analytischer Maßstab*). Das Substrat (10 μmol) wird zu einer Lösung aus NADP^+ (0.50 mg, 0.6 μmol), 2-Propanol (15 μL) und *recLB-ADH* (0.5 U) in TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl_2 ; pH 6.5) gegeben. Nach 16 h bei RT wird der Ansatz mit CH_2Cl_2 (200 μL) extrahiert. Die GCMS- sowie die HPLC- bzw. GC-Daten stimmen in allen Fällen mit den bei den racemischen Alkoholen bestimmten Daten überein. Die Umsätze und Enantiomerenüberschüsse werden in den Tab. 2-7 – Tab. 2-14 angegeben.

Nach AAV IX wurden folgende Substrate enzymatisch umgesetzt:

2a	
9a	(teilweise Zersetzung des Substrats)
21a - 25a	
26a	(teilweise Zersetzung des Substrats)
28a,29a	
30a	(5 mg Substrat [28 μmol], 5.0 mg NADP^+ [60 μmol], 2 mL 2-Propanol, 200 U <i>recLB-ADH</i> , 10 mL TEA-Puffer)
37a - 41a	
44a - 46a	
47a - 49a	(<i>ee</i> -Bestimmung durch Überführung der Produkte in 9b nach AAV V)
50a,51a	
53a	(teilweise Zersetzung des Substrats)
54a,55a	(10-fache Enzymmenge eingesetzt [5 U <i>recLB-ADH</i>])
56a.	
59a	(teilweise Zersetzung des Substrats)
65a	
71a - 73a	

HL-ADH katalysierte Reduktionen im analytischen Maßstab

AAV X: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die HL-ADH katalysierte Reduktion von Ketonen (analytischer Maßstab). Das Substrat (10 μmol) wird zu einer Lösung aus NAD^+ (2.50 mg, 3.3 μmol), Ethanol (500 μL) und HL-ADH (40 U) in TEA/NaOH-Puffer (5 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) gegeben. Nach 16 h bei RT wird der Ansatz mit CH_2Cl_2 (5 mL) extrahiert. Die GCMS- sowie die HPLC- bzw. GC-Daten stimmen in allen Fällen mit den bei den racemischen Alkoholen bestimmten Daten überein. Die Umsätze und Enantiomerenüberschüsse der olefinischen Alkohole werden in der Tab. 2-14 angegeben.

Nach AAV X wurden folgende Substrate enzymatisch umgesetzt:

2a (95 % Umsatz, >99 % ee)

22a

30a (5 mg Substrat [28 μmol], 4.5 mg NAD^+ [60 μmol], 1.5 mL Ethanol, 40 U HL-ADH, 10 mL TEA-Puffer; 100 % Umsatz; ee >99 %)

71a – 73a

TB-ADH katalysierte Reduktionen im analytischen Maßstab

AAV XI: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die TB-ADH katalysierte Reduktion von Ketonen (analytischer Maßstab). Das Substrat (10 μmol) wird zu einer Lösung aus NADP^+ (2.50 mg, 3.0 μmol), 2-Propanol (500 μL) und TB-ADH (30 U) in TEA/NaOH-Puffer (5 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) gegeben. Nach 16 h bei 38°C wird der Ansatz mit CH_2Cl_2 (5 mL) extrahiert. Die GCMS- sowie die HPLC- bzw. GC-Daten stimmen in allen Fällen mit den bei den racemischen Alkoholen bestimmten Daten überein. Die Umsätze und Enantiomerenüberschüsse der olefinischen Alkohole werden in der Tab. 2-14 angegeben.

Nach AAV XI wurden folgende Substrate enzymatisch umgesetzt:

2a	(100 % Umsatz, >99 % <i>ee</i>)
22a	(Bildung von 20 % des dehalogenierten Ketons)
30a	(5 mg Substrat [28 μmol], 5.0 mg NADP ⁺ [60 μmol], 2 mL 2-Propanol, 62 U <i>TB</i> -ADH, 10 mL TEA-Puffer); 100 % Umsatz, >99 % <i>ee</i>)
71a, 72a	(Bildung von 40 % des dehalogenierten Ketons)
73a	(Bildung von 20 % des dehalogenierten Ketons)

4.6 Enzymatische Reduktionen im präparativen Maßstab

CPCR katalysierte Reduktionen im präparativen Maßstab

AAV XII: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die CPCR katalysierte Reduktion von Ketonen (Präparativer Maßstab). Das Substrat (250 μmol) wird zu einer Lösung aus NAD^+ (11 mg, 15 μmol), Natriumformiat (1.70 g, 25 mmol), FDH (25 U) und CPCR (2 U) in TEA/NaOH-Puffer (25 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) gegeben. Nach 16 h bei RT wird der Ansatz mit CH_2Cl_2 (2×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und GCMS-Daten stimmen in allen Fällen mit den bei dem Racemat angegebenen Werten überein. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses der Alkohole erfolgte falls nicht anders angegeben über den entsprechenden (S)-MTPA-Ester, der nach AAV VII dargestellt wurde. Die ^{13}C -NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen in allen Fällen mit denen des (S,S)-Diastereomers des (S)-MTPA-Esters überein.

(S)-4-Phenyl-3-butin-2-ol [(S)-**2b**]. 4-Phenyl-3-butin-2-on (**2a**) (144 mg, 1.0 mmol) wurde zu einer Lösung aus NAD^+ (45 mg, 60 μmol), Natriumformiat (6.80 g, 100 mmol), FDH (24 U) und CPCR (6 U) in TEA/NaOH-Puffer (100 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) gegeben. Nach 16 h bei RT wurde der Ansatz mit CH_2Cl_2 (3×40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie wurde (S)-**2b** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 96 mg (660 μmol , 66 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -46.8$ ($c = 1.0$, Et_2O) [Lit.: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -44.8$ ($c = 1.0$, Et_2O ; $ee = 97\%$)]^[13c] – $ee > 99\%$ (HPLC).

Die GCMS- und HPLC-Daten stimmen mit den bei racemischem **2b** angegebenen Daten überein.

R_f : 0.22 (Isohexan:Ethylacetat = 10:1).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.55$ (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 2.13 (s, 1H, OH), 4.75 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, CH), 7.31–7.42 (m, 5H, ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 24.3$ (CH_3), 58.7 (CH), 83.9 , 90.9 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 122.5 , 128.2 , 128.3 , 131.6 (ar-C).

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}$ 146.19

(*S*)-4-Trimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**21b**]. 4-Trimethylsilyl-3-butin-2-on (**21a**) (140 mg, 1.0 mmol) wurde zu einer Lösung aus NAD^+ (45 mg, 60 μmol), Natriumformiat (6.80 g, 100 mmol), FDH (24 U) und *CPCR* (6 U) in TEA/NaOH-Puffer (100 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) gegeben. Nach 16 h bei RT wurde der Ansatz mit CH_2Cl_2 (3×40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie wurde (*S*)-**21b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 111 mg (780 μmol , 78 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -15.8$ ($c = 0.75$, CHCl_3) [Lit.: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -25.9$ ($c = 3.1$, CHCl_3 ; $ee > 95\%$)].^[13e] – $ee = 57\%$ (GC nach Überführung von (*S*)-**21b** in (*S*)-**9b** nach AAV V).

Die GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **21b** angegebenen Daten überein.

R_f 0.20 (Pentan: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1:1$).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 0.17$ (s, 9H, SiCH_3), 1.45 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, CH_3), 2.01 (s, 1H, OH), 4.52 (q, $J = 6.6$ Hz, 1H, CH).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 0.0$ (SiCH_3), 24.4 (CH_3), 58.9 (CH), 88.6 , 107.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$).

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{OSi}$ 142.28

(*S*)-4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-ol [(*S*)-**38b**]. Synthese nach AAV XII, ausgehend von 4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-on (**38a**) (40 mg, 250 μmol) wurde (*S*)-**38b** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 32 mg (195 μmol , 78 %). – (*S*)-MTPA-(*S*)-**38b**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von (*S*)-**38b** (8 mg, 50 μmol) wurde (*S*)-MTPA-(*S*)-**38b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 10 mg (26 μmol , 51 %), $ee > 99\%$ (GC).

(*S*)-5,5-Diethoxy-3-pentin-2-ol [(*S*)-**42b**]. Synthese nach AAV XII, ausgehend von 5,5-Diethoxy-3-pentin-2-on (**42a**) (42 mg, 250 μ mol) wurde (*S*)-**42b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 24 mg (144 μ mol, 58 %). – (*S*)-MTPA-(*S*)-**42b**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von (*S*)-**42b** (9 mg, 50 μ mol) wurde (*S*)-MTPA-(*S*)-**42b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 10 mg (27 μ mol, 53 %), *ee* >99 % (GC).

(*S*)-4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-ol [(*S*)-**49b**]. Synthese nach AAV XII, ausgehend von 4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-on (**49a**) (51 mg, 250 μ mol) wurde (*S*)-**49b** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 33 mg (165 μ mol, 66 %). – (*S*)-MTPA-(*S*)-**49b**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von (*S*)-**49b** (10 mg, 50 μ mol) wurde (*S*)-MTPA-(*S*)-**49b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 10 mg (24 μ mol, 48 %), *ee* >99 % (GC).

recLB-ADH katalysierte Reduktionen im präparativen Maßstab

AAV XIII: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die *recLB-ADH* katalysierte Reduktion von Ketonen (Präparativer Maßstab). Das Substrat (250 μ mol) wird zu einer Lösung aus NADP⁺ (12 mg, 15 μ mol), 2-Propanol (370 μ L) und *recLB-ADH* (100 U) in TEA/NaOH-Puffer (25 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl₂; pH 6.6) gegeben. Nach 16 h bei RT wird der Ansatz mit CH₂Cl₂ (2 $\times$ 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Die ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und GCMS-Daten stimmen in allen Fällen mit den bei dem Racemat angegebenen Werten überein. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses der Alkohole erfolgte falls nicht anders angegeben über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII dargestellt wurde. Die ¹³C-NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen in allen Fällen mit denen des entsprechenden Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters überein.

(*R*)-4-Phenyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**2b**]. 4-Phenyl-3-butin-2-on (**2a**) (2.08 g, 14.4 mmol) wurde bei RT über eine Hamilton-Pumpe innerhalb von 20 h kontinuierlich zu einer Lösung aus NADP⁺ (6.0 mg, 7 μ mol, 0.05 mol %, TTN = 2000), 2-Propanol (50 mL) und *recLB-ADH* (250 U) in entionisiertem Wasser (250 mL, 1 mM MgCl₂; pH 6.6,

HCl) gegeben. Nach weiteren 4 h wurde mittels GCMS und NMR ein Umsatz von 98 % bestimmt. Nach einer gesamten Reaktionszeit von 30 h betrug der Umsatz größer 99 %. Der Ansatz wurde mit Ethylacetat (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt, wobei (*R*)-**2b** als hellgelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 1.98 g (13.5 mmol, 94 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +47.5$ ($c = 1.1$, Et₂O) [Lit.: (*S*)-**2b**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -44.8$ ($c = 1.0$, Et₂O; $ee = 97\%$)].^[13c] – $ee > 99\%$ (HPLC).

Die GCMS- und HPLC-Daten stimmen mit den bei racemischem **2b** angegebenen Daten überein. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit den Daten für (*S*)-**2b**.

(*R*)-4-Trimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**21b**]. 4-Trimethylsilyl-3-butin-2-on (**21a**) (1.00 g, 7.1 mmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP⁺ (58 mg, 68 μmol), 2-Propanol (15 mL) und recLB-ADH (200 U) in TEA/NaOH-Puffer (150 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl₂; pH 6.5) gegeben. Nach 24 h wurde mittels GCMS ein Umsatz von 68 % bestimmt. Daraufhin wurden NADP⁺ (58 mg, 68 μmol) und recLB-ADH (200 U) zugegeben und weitere 24 h gerührt (GCMS: 90 % Umsatz). Der Ansatz wurde mit CH₂Cl₂ (3 × 70 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Destillation (0.52 mbar/50°C) wurde (*R*)-**21b** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 740 mg (5.2 mmol, 73 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +26.8$ ($c = 1.2$, CHCl₃) [Lit.: (*S*)-**21b**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -25.9$ ($c = 3.1$, CHCl₃; $ee > 95\%$)].^[13e] – $ee > 99\%$ (GC nach Überführung von (*R*)-**21b** in (*R*)-**9b** nach AAV V).

Die GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **21b** angegebenen Daten überein. Die ¹H- und ¹³C-NMR-Daten sind in Übereinstimmung mit den Daten für (*S*)-**21b**.

(*S*)-MTPA-(*R*)-**21b**. Eine zweite Bestimmung des ee von (*R*)-**21b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*R*)-**21b** (7 mg, 50 μmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 9 mg (27 μmol, 53 %); $ee > 99\%$ (GC).

Die ¹³C-NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,R*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **21b** überein.

(*S*)-1-Hexin-3-ol [(*S*)-**26b**]. 1-Hexin-3-on (**26a**) (1.50 g, 15.6 mmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP⁺ (115 mg, 138 μmol), 2-Propanol (30 mL) und recLB-ADH (750 U) in Phosphat-Puffer (1000 mL, 50 mM Phosphat, 1 mM MgCl₂; pH 7.0) gegeben. Nach 16 h wurde der Ansatz mit Et₂O (3 × 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Destillation (100 mbar/92°C) wurde (*S*)-**26b** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 1.06 g (10.8 mmol, 69 %). – [α]_D²¹ = –33.8 (*c* = 1.2, Et₂O) [Lit.: [α]_D²² = –24.0 (*c* = 2.4, Et₂O; *ee* = 68 %)].^[75] – *ee* >99 % (GC).

Die GC-Daten stimmen mit den bei racemischem **26b** angegebenen Daten überein.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 1.46-1.54 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.68-1.75 (m, 2H, CH₂), 2.48 (s, 1H, C≡CH), 4.39 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, CHOH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 13.8 (CH₃), 18.4 (CH₂CH₃), 39.8 (CH₂), 62.2 (CHOH), 72.9 (C≡CH), 85.3 (C≡CH).

IR: 3311 (m), 2965 (s), 2935 (m), 2874 (m), 1591 (ss), 1381 (m), 1119 (s), 951 (s), 817 (m).

GCMS: *R*_t = 5.7 min (Temperaturprogramm B)
m/z (%) = 97 (5) [M⁺ – H], 83 (33) [M⁺ – CH₃], 70 (17) [M⁺ – H₂O], 55 (100) [M⁺ – CH₃ – CO].

C₆H₁₀O 98.15

(*S*)-MTPA-(*S*)-**26b**. Eine zweite Bestimmung des *ee* von (*S*)-**26b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*S*)-**26b** (5 mg, 50 μmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 9 mg (30 μmol, 61 %); *ee* >99 % (GC).

Die ¹³C-NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,S*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **26b** überein.

(*S*)-1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**28b**]. 1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**28a**) (87 mg, 500 μmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP⁺ (21 mg,

25 μmol), 2-Propanol (2 mL) und *recLB*-ADH (25 U) in TEA/NaOH-Puffer (20 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl_2 ; pH 6.5) gegeben. Nach 17 h wurde mittels GCMS ein Umsatz von 65 % bestimmt. Daraufhin wurden NADP^+ (21 mg, 25 μmol) und *recLB*-ADH (25 U) zugegeben und weitere 24 h gerührt (GCMS: 95 % Umsatz). Dann wurde der Ansatz mit CH_2Cl_2 (3×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Ausbeute: 74 mg (420 μmol , 84 %; Reinheit 90 % [GCMS, ^1H -NMR]). Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 30:1; R_f = 0.27) wurde (*S*)-**28b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 38 mg (216 μmol , 43 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +26.5$ (c = 1.1, CDCl_3).

Die GCMS-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **28b** angegebenen Daten überein.

(*S*)-MTPA-(*S*)-**28b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von (*S*)-**28b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*S*)-**28b** (9 mg, 50 μmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 12 mg (31 μmol , 62 %); *ee* >99 % (GC).

Die ^{13}C -NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,S*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **28b** überein.

(*S*)-1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**29b**]. 1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**29a**) (109 mg, 500 μmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP^+ (21 mg, 25 μmol), 2-Propanol (2 mL) und *recLB*-ADH (50 U) in TEA/NaOH-Puffer (20 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl_2 ; pH 6.5) gegeben. Nach 16 h wurde mittels GCMS ein Umsatz von 30 % bestimmt. Daraufhin wurden NADP^+ (10 mg, 12 μmol) und *recLB*-ADH (50 U) zugegeben und weitere 6 h gerührt (GCMS: 55 % Umsatz). Nach erneuter Zugabe von NADP^+ (10 mg, 12 μmol) und *recLB*-ADH (100 U) wurde der Ansatz über 26 h gerührt (GCMS: 90 % Umsatz). Anschließend wurde mit CH_2Cl_2 (3×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Ausbeute: 70 mg (317 μmol , 63 %; Reinheit 80 % [GCMS, ^1H -NMR]). Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 30:1; R_f = 0.31) wurde (*S*)-**29b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 12 mg (54 μmol , 11 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +24.2$ (c = 0.6, CDCl_3).

Die GCMS-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **29b** angegebenen Daten überein.

(S)-MTPA-(*S*)-**29b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von (*S*)-**29b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*S*)-**29b** (11 mg, 50 μmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 17 mg (38 μmol , 76 %); *ee* = 98.6 % (GC).

Die ^{13}C -NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,S*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **29b** überein.

(S)-1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**30b**]. Synthese nach AAV XIII, ausgehend von 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (**30a**) (45 mg, 250 μmol) wurde (*S*)-**30b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 38 mg (213 μmol , 85 %).

Versuche zur Optimierung der recLB-ADH katalysierten Reduktion von 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (30a). Die Fed-Batch-Ansätze wurden wie in Tab. 2-15, Ansätze 1 – 6, aufgeführt angesetzt. Das Substrat 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (**30a**) gelöst in 2-Propanol wurde in jeweils gleichen Portionen stündlich zugegeben. Nach Ablauf der angegebenen Reaktionszeiten wurde eine Probe (200 μL) mit Ethylacetat (200 μL) extrahiert und der Umsatz mittels GCMS kontrolliert. Die Ergebnisse können Tab. 2-15 entnommen werden.

(S)-1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**30b**] – Optimierter Ansatz. 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (**30a**) (1.56 g, 8.8 mmol) gelöst in 2-Propanol (30 mL) wurde bei RT über eine Hamilton-Pumpe innerhalb von 20 h kontinuierlich zu einer Lösung aus NADP^+ (3.6 mg, 4 μmol , 0.05 mol %, TTN = 2000), 2-Propanol (30 mL) und recLB-ADH (150 U) in TEA/NaOH-Puffer (200 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl_2 ; pH 6.5) gegeben. Nach weiteren 28 h wurde entionisiertes Wasser (600 mL) hinzugegeben und der Ansatz mit CH_2Cl_2 (3 $\times$ 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt, wobei (*S*)-**30b** ohne weitere Aufarbeitung als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 1.55 g (8.6 mmol, 98 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +25.4$ ($c = 1.4$, CHCl_3) – *ee* > 99 % (HPLC).

Die GCMS-, HPLC-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **30b** angegebenen Daten überein. Die absolute Konfiguration von (*S*)-**30** wurde durch Überführung in das Epoxid (*S*)-**97** und anschließendem Vergleich des Drehwertes von (*S*)-**97** mit dem Literaturdrehwert zugeordnet (s. Epoxid-Synthesen).

(*R*)-4-(4'-Methoxyphenyl)-3-butin-2-ol [(*R*)-**37b**]. 4-(4'-Methoxyphenyl)-3-butin-2-on (**37a**) (174 mg, 1.0 mmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP⁺ (50 mg, 60 μmol), 2-Propanol (1.5 mL) und recLB-ADH (50 U) in TEA/NaOH-Puffer (100 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl_2 ; pH 6.5) gegeben. Nach 16 h wurde der Ansatz mit CH_2Cl_2 (3 $\times$ 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie wurde (*R*)-**37b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 113 mg (640 μmol , 64 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +39.9$ ($c = 1.4$, Et_2O) [Lit.: (*S*)-**37b**: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -35.1$ ($c = 1.0$, Et_2O ; $ee = 97\%$)].^[13c] – $ee > 99\%$ (HPLC).

Die GCMS- und HPLC-Daten stimmen mit den bei racemischem **37b** angegebenen Daten überein.

R_f : 0.17 (Isohexan:Ethylacetat = 10:1).

^1H -NMR (CDCl_3): $\delta = 1.55$ (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3), 1.90 (s, 1H, OH), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 4.75 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H, CHOH), 6.82 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, ar-H), 7.37 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, ar-H).

^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 24.7$ (CH_3), 55.5 (OCH_3), 59.1 (CH), 84.1, 89.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 114.1, 114.8, 133.3, 159.8 (ar-C).

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$ 176.21

(*R*)-4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-ol [(*R*)-**38b**]. Synthese nach AAV XIII, ausgehend von 4-(4'-Fluorphenyl)-3-butin-2-on (**38a**) (40 mg, 250 μmol) wurde (*R*)-**38b** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 31 mg (189 μmol , 75 %). – (*S*)-MTPA-(*R*)-**38b**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von (*R*)-**38b** (8 mg, 50 μmol) wurde (*S*)-MTPA-(*R*)-**38b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 9 mg (23 μmol , 47 %), $ee > 99\%$ (GC).

(*R*)-5,5-Diethoxy-3-pentin-2-ol [(*R*)-**42b**]. Synthese nach AAV XIII, ausgehend von 5,5-Diethoxy-3-pentin-2-on (**42a**) (42 mg, 250 μ mol) wurde (*R*)-**42b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 28 mg (165 μ mol, 66 %). – (*S*)-MTPA-(*R*)-**42b**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von (*R*)-**42b** (9 mg, 50 μ mol) wurde (*S*)-MTPA-(*R*)-**42b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 13 mg (35 μ mol, 68 %), *ee* >99 % (GC).

(*R*)-4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-ol [(*R*)-**49b**]. Synthese nach AAV XIII, ausgehend von 4-(Dimethylphenylsilyl)-3-butin-2-on (**49a**) (51 mg, 250 μ mol) wurde (*R*)-**49b** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 33 mg (165 μ mol, 66 %). – (*S*)-MTPA-(*R*)-**49b**. Synthese nach AAV VII, ausgehend von (*R*)-**49b** (10 mg, 50 μ mol) wurde (*S*)-MTPA-(*R*)-**49b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 10 mg (23 μ mol, 46 %), *ee* >99 % (GC).

(*S*)-1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**50b**]. 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (**50a**) (1.90 g, 8.8 mmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP⁺ (30 mg, 35 μ mol), 2-Propanol (30 mL) und recLB-ADH (360 U) in TEA/NaOH-Puffer (200 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl₂; pH 6.5) gegeben. Nach 72 h wurde mittels GCMS ein Umsatz von 25 % bestimmt. Dann wurde der Ansatz mit CH₂Cl₂ (3 $\times$ 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 30:1; *R_f* = 0.30) wurde (*S*)-**50b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 402 mg (1.8 mmol, 21 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +23.5$ (*c* = 1.6, CH₂Cl₂).

Die GCMS-, ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **50b** angegebenen Daten überein.

(*S*)-MTPA-(*S*)-**50b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von (*S*)-**50b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*S*)-**50b** (11 mg, 50 μ mol) dargestellt wurde. Ausbeute: 11 mg (25 μ mol, 50 %); *ee* >99 % (GC).

Die ¹³C-NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,S*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **50b** überein.

*Versuche zur Optimierung der recLB-ADH katalysierten Reduktion von (S)-1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (50a).*

a) 2-Phasen-System:^[86] 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (**50a**) (2 mg, 10 μ mol), NADP⁺ (0.45 mg, 0.6 μ mol), 2-Propanol (50 μ L) und recLB-ADH (0.5 U) wurden in einer Lösung aus TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl₂; pH 6.5) und MTBE (1 mL) gelöst. Nach 24 h wurde eine Probe (200 μ L) mit Ethylacetat (200 μ L) extrahiert. Mittels GCMS wurde ein Umsatz von 1 % ermittelt. Nach erneuter Zugabe von recLB-ADH (0.5 U) wurde weitere 24 h gerührt. Der nun wie oben bestimmte Umsatz betrug 4 %.

b) "Strippen": 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (**50a**) (50 mg, 230 μ mol), NADP⁺ (10 mg, 13 μ mol), 2-Propanol (1.5 mL) und recLB-ADH (50 U) wurden in TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl₂; pH 6.5) bei RT über 2 h gerührt. Dann wurde über einen Zeitraum von 30 min mit Wasser gesättigter Stickstoff über eine Pipette in den Ansatz eingeblasen. Anschließend wurde 2-Propanol (750 μ L), NADP⁺ (5 mg, 7 μ mol) und recLB-ADH (50 U) nachdosiert. Nach weiteren 2 h Reaktionszeit wurden erneut wie beschrieben Stickstoff eingeleitet und Komponenten nachdosiert. Nach einer Reaktionszeit von 7 h wurde eine Probe (200 μ L) mit Ethylacetat (200 μ L) extrahiert. Hierbei konnte mittels GCMS ein Umsatz von 65 % ermittelt werden. Der Ansatz wurde weiter gerührt, wobei täglich über einen Zeitraum von 2 h Stickstoff eingeleitet wurde sowie die oben aufgeführten Komponenten nachdosiert wurden. Nach einer Gesamtzeit von 6 Tagen betrug der wie oben bestimmte Umsatz 79 %. Ausbeute: 13 mg (60 μ mol, 25 %; nicht aufgereinigt).

c) Cofaktorregenerierung über FDH: 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (**50a**) (2 mg, 0.6 μ mol), NADP⁺ (0.45 mg, 60 μ mol), Natrium-Formiat (68 mg, 1 mmol), FDH (5 U) und recLB-ADH (20 U) wurden in TEA/NaOH-Puffer (1 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl₂; pH 6.5) gelöst. Nach 16 h wurde eine Probe (200 μ L) mit Ethylacetat (200 μ L) extrahiert. Es wurde mittels GCMS ein Umsatz von 90 % ermittelt. In 2 nachfolgend identisch durchgeführten Ansätzen konnten nur Umsätze von jeweils 20 % erzielt werden.

(S)-1-Pentin-3-ol [(S)-59b]. 1-Pentin-3-on (**59a**) (82 mg, 1.0 mmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP⁺ (50 mg, 60 μ mol), 2-Propanol (1.5 mL) und recLB-ADH (50 U) in TEA/NaOH-Puffer (100 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl₂; pH 6.5) gegeben.

Nach 16 h wurde der Ansatz mit CH_2Cl_2 (3×40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Das Rohprodukt (*S*)-**59b** wurde aufgrund seiner Flüchtigkeit nicht aufgereinigt. Umsatz (GC): 90 %. $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -8.4$ ($c = 0.5$, Et_2O) [Lit.: (*R*)-**59b**: $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +34.0$ ($c = 2.2$, Et_2O ; $ee > 97\%$)].^[73] – $ee = 34\%$ (GC).

Die GC-Daten stimmen mit den bei racemischem **59b** angegebenen Daten überein.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 1.01$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.68-1.75 (m, 2H, CH_2), 2.45 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.32 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, CHOH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 9.4$ (CH_3), 30.9 (CH_2), 63.6 (CHOH), 72.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 84.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$).

IR: 3292 (m), 2973 (w), 2938 (w), 2881 (w), 2091 (w), 1705 (ss), 1362 (m), 1226 (m), 975 (s), 650 (ss).

$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$ 84.12

(*S*)-(E)-4-Phenyl-3-buten-2-ol [(*S*)-**73b**]. (E)-4-Phenyl-3-buten-2-on (**73a**) (12 mg, 67 μmol) wurde bei RT zu einer Lösung aus NADP^+ (15 mg, 18 μmol), 2-Propanol (3 mL) und recLB-ADH (200 U) in TEA/NaOH-Puffer (30 mL, 100 mM TEA, 1 mM MgCl_2 ; pH 6.5) gegeben. Nach 17 h wurde der Ansatz mit Ethylacetat (4×20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingedunstet. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (CH_2Cl_2 :Ethylacetat = 20:1) wurde (*S*)-**73b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 7 mg (38 μmol , 57 %; Reinheit: 95 %). $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +3.1$ ($c = 0.4$, CHCl_3) – $ee > 99\%$ (HPLC).

Die GCMS-, HPLC-, $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten stimmen mit den bei racemischem **73b** angegebenen Daten überein.

HL-ADH katalysierte Reduktionen im präparativen Maßstab

(*R*)-1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**28b**]. Zu einer Lösung aus NAD⁺ (60 mg, 75 µmol), Ethanol (4 mL) und HL-ADH (60 U) in TEA/NaOH-Puffer (80 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) wurde 1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**28a**) (174 mg, 1 mmol) gelöst in Ethanol (4 mL) innerhalb von 4 h in 3 Portionen bei RT zugegeben. Nach weiteren 12 h wurde der Ansatz mit CH₂Cl₂ (3 × 100 mL) extrahiert (GCMS: 100 % Umsatz). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Ausbeute: 60 mg (340 µmol, 34 %; Reinheit 90 % [GCMS, ¹H-NMR]). Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 30:1; *R*_f = 0.27) wurde (*R*)-**28b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 17 mg (97 µmol, 10 %). – [α]_D²² = –26.0 (*c* = 0.8, CDCl₃).

Die GCMS-, ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **28b** angegebenen Daten überein.

(*S*)-MTPA-(*R*)-**28b**. Die Bestimmung des ee und der absoluten Konfiguration von (*R*)-**28b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*R*)-**28b** (9 mg, 50 µmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 11 mg (28 µmol, 56 %); ee >99 % (GC).

Die ¹³C-NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,R*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **28b** überein.

(*R*)-1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**29b**]. Zu einer Lösung aus NAD⁺ (30 mg, 37 µmol), Ethanol (2 mL) und HL-ADH (30 U) in TEA/NaOH-Puffer (80 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) wurde 1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**29a**) (109 mg, 500 µmol) gelöst in Ethanol (2 mL) innerhalb von 4 h in 3 Portionen bei RT zugegeben. Nach weiteren 12 h wurde der Ansatz mit Ethylacetat (3 × 50 mL) extrahiert (GCMS: 100 % Umsatz). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Ausbeute: 50 mg (226 µmol, 45 %; Reinheit 90 % [GCMS, ¹H-NMR]). Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 30:1; *R*_f = 0.31) wurde (*R*)-**29b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 11 mg (50 µmol, 10 %). – [α]_D²⁰ = –27.5 (*c* = 0.5, CDCl₃).

Die GCMS-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **29b** angegebenen Daten überein.

(S)-MTPA-*(R)*-**29b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von *(R)*-**29b** erfolgte über den entsprechenden *(S)*-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von *(R)*-**29b** (9 mg, 50 μmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 13 mg (30 μmol , 59 %); *ee* >99 % (GC).

Die ^{13}C -NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des *(S,R)*-Diastereomers des *(S)*-MTPA-Esters von **29b** überein.

Versuche zur Optimierung der HL-ADH katalysierten Reduktion von 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (30a). Die Batch-Ansätze wurden wie in Tab. 2-16, Ansätze 7 – 11, aufgeführt angesetzt. Das Substrat 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (**30a**) gelöst in Ethanol wurde in jeweils gleichen Portionen stündlich zugegeben. Nach Ablauf der angegebenen Reaktionszeiten wurde eine Probe (200 μL) mit Ethylacetat (200 μL) extrahiert und der Umsatz mittels GCMS kontrolliert. Die Ergebnisse können Tab. 2-16 entnommen werden.

(R)-1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol [*(R)*-**30b**] – Optimierter Ansatz. 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-on (**30a**) (1.56 g, 8.8 mmol) gelöst in Ethanol (45 mL) wurde bei RT innerhalb von 2 h in 3 Portionen zu einer Lösung aus NAD^+ (6.0 mg, 8 μmol , 0.10 mol %, TTN = 1000), Ethanol (75 mL) und HL-ADH (250 U) in TEA/NaOH-Puffer (500 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) gegeben. Nach weiteren 34 h wurde entionisiertes Wasser (1000 mL) hinzugegeben und der Ansatz mit CH_2Cl_2 (3 $\times$ 300 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt, wobei *(R)*-**30b** ohne weitere Aufarbeitung als gelbes Öl erhalten wurde. Ausbeute: 1.53 g (8.5 mmol, 97 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -25.2$ ($c = 1.3$, CHCl_3) – *ee* >99 % (HPLC).

Die GCMS-, HPLC-, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **30b** angegebenen Daten überein. Die absolute Konfiguration von *(R)*-**30** wurde durch Überführung in das Epoxid *(R)*-**97** und anschließendem Vergleich des Drehwertes von *(R)*-**97** mit dem Literaturdrehwert zugeordnet (s. Epoxid-Synthesen).

(R)-1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**50b**]. Zu einer Lösung aus NAD⁺ (8 mg, 10 µmol), Ethanol (2.5 mL) und HL-ADH (10 U) in TEA/NaOH-Puffer (17 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) wurde 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (**50a**) (100 mg, 460 µmol) gelöst in Ethanol (2.5 mL) innerhalb von 10 h in 10 Portionen bei RT zugegeben. Nach weiteren 12 h wurde erneut HL-ADH (6 U) zugegeben. Der Ansatz wurde weitere 24 h gerührt und anschließend mit CH₂Cl₂ (3 × 30 mL) extrahiert (GCMS: 25 % Umsatz). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie (Isohexan:Ethanol = 50:1; *R*_f = 0.18) wurde (*R*)-**50b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 25 mg (114 µmol, 24 %). – [α]_D²⁰ = –23.9 (*c* = 1.0, CDCl₃).

Die GCMS-, ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **50b** angegebenen Daten überein.

(S)-MTPA-(*R*)-**50b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von (*R*)-**50b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*R*)-**50b** (11 mg, 50 µmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 11 mg (25 µmol, 50 %); *ee* >99 % (GC).

Die ¹³C-NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,R*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **50b** überein.

TB-ADH katalysierte Reduktionen im präparativen Maßstab

(R)-1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**28b**]. Zu einer Lösung aus NADP⁺ (40 mg, 48 µmol), 2-Propanol (750 µL) und TB-ADH (35 U) in TEA/NaOH-Puffer (100 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) wurde 1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (**28a**) (163 mg, 937 µmol) gelöst in 2-Propanol (750 µL) innerhalb von 4 h in 3 Portionen bei 38°C zugegeben. Nach weiteren 3 und 9 h wurde jeweils TB-ADH (30 U) zudosiert. Nach einer gesamten Reaktionszeit von 30 h wurde der Ansatz mit CH₂Cl₂ (3 × 75 mL) extrahiert (GCMS: 100 % Umsatz). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 30:1; *R*_f = 0.27) wurde (*R*)-**28b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 3 mg (17 µmol, 2 %).

Die GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **28b** angegebenen Daten überein.

(S)-MTPA-*(R)*-**28b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von *(R)*-**28b** erfolgte über den entsprechenden *(S)*-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von *(R)*-**28b** (3 mg, 17 μ mol) dargestellt wurde. Ausbeute: 2 mg (5 μ mol, 30 %); *ee* >99 % (GC).

Die GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des *(S,R)*-Diastereomers des *(S)*-MTPA-Esters von **28b** überein.

(R)-1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol [*(R)*-**29b**]. Zu einer Lösung aus NADP⁺ (40 mg, 48 μ mol), 2-Propanol (750 μ L) und *TB*-ADH (37 U) in TEA/NaOH-Puffer (100 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) wurde 1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-on (**29a**) (205 mg, 928 μ mol) gelöst in 2-Propanol (750 μ L) innerhalb von 4 h in 3 Portionen bei 38°C zugegeben. Nach weiteren 3 und 9 h wurde jeweils *TB*-ADH (30 U) zudosiert. Nach einer gesamten Reaktionszeit von 30 h wurde der Ansatz mit CH₂Cl₂ (3 $\times$ 75 mL) extrahiert (GCMS: 65 % Umsatz). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 30:1; *R_f* = 0.31) wurde *(R)*-**29b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 12 mg (54 μ mol, 6 %).

Die GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **29b** angegebenen Daten überein.

(S)-MTPA-*(R)*-**29b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von *(R)*-**29b** erfolgte über den entsprechenden *(S)*-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von *(R)*-**29b** (11 mg, 50 μ mol) dargestellt wurde. Ausbeute: 11 mg (26 μ mol, 52 %); *ee* >99 % (GC).

Die GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des *(S,R)*-Diastereomers des *(S)*-MTPA-Esters von **29b** überein.

(R)-1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**50b**]. Zu einer Lösung aus NADP⁺ (40 mg, 48 μmol), 2-Propanol (750 μL) und *TB*-ADH (36 U) in TEA/NaOH-Puffer (100 mL, 100 mM TEA; pH 7.0) wurde 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-on (**50a**) (200 mg, 926 μmol) gelöst in 2-Propanol (750 μL) innerhalb von 8 h in 8 Portionen bei 38°C zugegeben. Nach der fünften sowie der letzten Substrat-Zugabe wurde jeweils *TB*-ADH (35 U) zudosiert. Nach einer gesamten Reaktionszeit von 30 h wurde der Ansatz mit CH₂Cl₂ (3 × 75 mL) extrahiert (GCMS: 15 % Umsatz). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie (Isohexan:Ethanol = 50:1; *R_f* = 0.18) wurde (*R*)-**50b** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 19 mg (87 μmol, 9 %).

Die GCMS-, ¹H-NMR-Daten stimmen mit den bei racemischem **50b** angegebenen Daten überein.

(S)-MTPA-(*R*)-**50b**. Die Bestimmung des *ee* und der absoluten Konfiguration von (*R*)-**50b** erfolgte über den entsprechenden (*S*)-MTPA-Ester, der nach AAV VII, ausgehend von (*R*)-**50b** (11 mg, 50 μmol) dargestellt wurde. Ausbeute: 13 mg (30 μmol, 60 %); *ee* >99 % (GC).

Die ¹³C-NMR-, GCMS- und GC-Daten stimmen mit denen des (*S,R*)-Diastereomers des (*S*)-MTPA-Esters von **50b** überein.

4.7 Folgechemie

Schützen der Hydroxy-Gruppe und Abspalten der Trimethylsilyl-Funktion

1-Chlor-4-trimethylsilyl-2-*t*-butyldimethylsiloxy-3-butin (91). Zu einer Lösung aus 1-Chlor-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (**28b**) (1.00 g, 5.7 mmol) und Triethylamin (860 mg, 8.5 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (15 mL) wurde bei 0°C *t*-Butyldimethylsilyltriflat (2.20 g, 8.5 mmol) gegeben, woraufhin der Ansatz sich gelb färbte. Nach 2 h wurde CH₂Cl₂ (50 mL) zugegeben und die Lösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (50 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie wurde **91** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1.48 g (5.1 mmol, 90 %).

R_f : 0.18 (Isohexan:Ethylacetat = 50:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.15 (s, 3H, SiCH₃), 0.16 (s, 3H, SiCH₃), 0.17 (s, 9H, Si[CH₃]₃), 0.93 (s, 9H, C[CH₃]₃), 3.52-3.69 (m, 2H, CH₂), 4.49 (dd, J = 7.6 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -4.7, -4.5 (SiCH₃), -0.1 (Si[CH₃]₃), 18.5 (C[CH₃]₃), 25.9 (C[CH₃]₃), 48.7 (CH₂), 64.4 (CH), 91.0, 103.9 (C≡C).

GCMS: R_t = 9.4 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 289 (1) [M⁺ - H], 275 (2) [M⁺ - CH₃], 241 (9) [M⁺ - CH₂Cl], 233 (14) [M⁺ - *t*-Bu], 147 (100), 125 (84), 73 (87) [C₃H₉Si⁺].

C₁₃H₂₇ClOSi₂ 290.98

1-Brom-4-trimethylsilyl-2-*t*-butyldimethylsiloxy-3-butin (92). Zu einer Lösung aus 1-Brom-4-trimethylsilyl-3-butin-2-ol (**29b**) (1.00 g, 4.5 mmol) und Triethylamin (690 mg, 6.8 mmol) in trockenem CH₂Cl₂ (15 mL) wurde bei 0°C *t*-Butyldimethylsilyltriflat (1.79 g, 6.8 mmol) gegeben, woraufhin der Ansatz sich gelb färbte. Nach 2 h wurde CH₂Cl₂ (50 mL) zugegeben und die Lösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und im

Vakuum eingeeengt. Nach Flashchromatographie wurde **92** als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.41 g (4.2 mmol, 94 %).

R_f : 0.20 (Isohexan:Ethylacetat = 50:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.16 (s, 3H, SiCH_3), 0.18 (s, 3H, SiCH_3), 0.19 (s, 9H, $\text{Si}[\text{CH}_3]_3$), 0.93 (s, 9H, $\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 3.42-3.50 (m, 2H, CH_2), 4.52 (dd, J = 7.8 Hz, 4.8 Hz, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = -4.7, -4.4 (SiCH_3), -0.1 ($\text{Si}[\text{CH}_3]_3$), 18.5 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 25.9 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 36.9 (CH_2), 64.0 (CH), 90.9, 104.2 ($\text{C}\equiv\text{C}$).

GCMS: R_t = 9.9 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 335 (1) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 320 (1) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 278 (10) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu}$], 241 (7) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Br}$], 147 (98), 125 (100), 73 (95) [$\text{C}_3\text{H}_9\text{Si}^+$].

$\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{BrOSi}_2$ 335.43

1-Chlor-2-*t*-butyldimethylsiloxy-3-butin (93). Zu einer Lösung aus 1-Chlor-4-trimethylsilyl-2-*t*-butyldimethylsiloxy-3-butin (**91**) (200 mg, 688 μmol) in Ethanol / Wasser (40 mL; 4:1) wurde KCN (56 mg, 861 μmol) gegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei 50°C gerührt. Der Ansatz wurde mit Wasser (100 mL) verdünnt und mit Ethylacetat (3 $\times$ 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. **93** wurde ohne weitere Aufarbeitung als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 105 mg (481 μmol , 70 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.16 (s, 3H, SiCH_3), 0.17 (s, 3H, SiCH_3), 0.93 (s, 9H, $\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 2.48 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.53-3.65 (m, 2H, CH_2), 4.46-4.54 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = -4.9 (SiCH_3), -4.5 (SiCH_3), 18.4 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 25.9 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 48.5 (CH_2), 63.8 (CH), 73.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 82.4 ($\text{C}\equiv\text{CH}$).

GCMS: R_t = 7.6 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 217 (1) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 203 (1) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 169 (7) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Cl}$], 161 (9) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu}$], 125 (8), 93 (100).

$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{ClOSi}$ 218.80

*1-Brom-2-*t*-butyldimethylsiloxy-3-butin* (**94**). Zu einer Lösung aus *1-Brom-4-trimethylsilyl-2-*t*-butyldimethylsiloxy-3-butin* (**92**) (35 mg, 104 μmol) in Ethanol / Wasser (6 mL; 4:1) wurde KCN (9 mg, 131 μmol) gegeben und die Reaktionsmischung 2 h bei 50°C gerührt. Der Ansatz wurde mit Wasser (15 mL) verdünnt und mit Ethylacetat (3 $\times$ 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. **94** wurde ohne weitere Aufarbeitung als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 23 mg (87 μmol , 84 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.17 (s, 3H, SiCH_3), 0.19 (s, 3H, SiCH_3), 0.93 (s, 9H, $\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 2.49 (s, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 3.43-3.51 (m, 2H, CH_2), 4.50-4.58 (m, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = -4.8 (SiCH_3), -4.5 (SiCH_3), 18.4 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 25.9 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 36.6 (CH_2), 63.4 (CH), 73.9 ($\text{C}\equiv\text{CH}$), 82.7 ($\text{C}\equiv\text{CH}$).

GCMS: R_t = 8.2 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 263 (1) [$\text{M}^+ - \text{H}$], 247 (1) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 207 (10) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu}$], 169 (14) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{Br}$], 139 (100), 125 (17).

$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{BrOSi}$ 263.25

Epoxid-Synthesen

AAV XIV: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese propargylierter Epoxide. Der halogenierte Alkohol wird zu einer Lösung von DBU in Ethanol / Wasser (4:1) gegeben. Der Ansatz wird 90 min bei RT gerührt. Anschließend wird auf das 5-fache Volumen mit Wasser verdünnt und mit Ethylacetat (3 $\times$ 200 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt.

(S)-1-*t*-Butyldimethylsilyl-3,4-epoxy-1-butin [(*S*)-**96**]. (*S*)-4-*t*-Butyldimethylsilyl-1-chlor-3-butin-2-on [(*S*)-**50b**] (151 mg, 694 μmol) und DBU (310 μL , 2.1 mmol) in Ethanol / Wasser (5 mL; 4:1) wurden nach AAV XIV umgesetzt. Ausbeute (nach Flashchromatographie): 96 mg (530 μmol , 76 %) – $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +71.8$ ($c = 1.2$, CH_2Cl_2) [Lit.: (*R*)-**96**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -72.3$ ($c = 5.6$, CH_2Cl_2 ; ee >99 %)].^[76b]

R_f :	0.22 (Pentan:CH ₂ Cl ₂ = 5:1).
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 0.11 (s, 6H, Si[CH ₃] ₂), 0.93 (s, 9H, C[CH ₃] ₃), 2.91 (d, J = 2.7 Hz, 2H, CH ₂), 3.36 (t, J = 2.7 Hz, 1H, CH).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = -4.6 (Si[CH ₃] ₂), 16.6 (C[CH ₃] ₃), 26.2 (C[CH ₃] ₃), 40.1 (CH), 49.2 (CH ₂), 87.7, 102.7 (C≡C).
IR:	2954 (m), 2929 (m), 2857 (m), 2179 (w), 1471 (m), 1249 (s), 1086 (s), 937 (s), 832 (ss), 774 (ss).
GCMS:	R_t = 7.5 min (Temperaturprogramm A) m/z (%) = 182 (8) [M ⁺], 167 (5) [M ⁺ - CH ₃], 125 (100) [M ⁺ - <i>t</i> -Bu], 109 (64), 97 (67) [M ⁺ - <i>t</i> -Bu - CO].
C ₁₀ H ₁₈ OSi	182.34

1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin (**97**). 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol (**30b**) (3.00 g, 16.7 mmol) und DBU (7.5 mL, 50.0 mmol) in Ethanol / Wasser (120 mL; 4:1) wurden nach AAV XIV umgesetzt. **97** wurde als oranges Öl analytisch rein (GCMS, NMR) erhalten. Ausbeute: 2.16 g (15.0 mmol, 90 %). Durch Aufreinigung über Flashchromatographie wurde **97** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1.96 g (13.6 mmol, 82 %).

R_f :	0.17 (Isohexan:Ethylacetat = 30:1).
¹ H-NMR (CDCl ₃):	δ = 3.02 (d, J = 3.3 Hz, 2H, CH ₂), 3.60 (t, J = 3.3 Hz, 1H, CH), 7.24-7.44 (m, 3H, ar-H), 7.37-7.54 (m, 2H, ar-H).
¹³ C-NMR (CDCl ₃):	δ = 40.4 (CH), 49.3 (CH ₂), 83.6, 85.9 (C≡C), 122.1, 128.5, 129.0, 132.1 (ar-C).
IR:	2956 (w), 2932 (w), 2175 (w), 1490 (m), 1375 (m), 926 (s), 834 (ss), 754 (ss), 689 (ss).

GCMS: $R_t = 8.8$ min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 144 (31) [M^+], 114 (100) [$M^+ - CH_2O$], 88 (24), 63 (15).

$C_{10}H_8O$ 144.17

(*R*)-1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin [(*R*)-**97**]. (*R*)-1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**30b**] (588 mg, 3.3 mmol) und DBU (1.5 mL, 10.0 mmol) in Ethanol / Wasser (20 mL; 4:1) wurden nach AAV XIV umgesetzt. Ausbeute nach Extraktion: 441 mg (3.1 mmol, 93 %). Ausbeute (nach Flashchromatographie): 376 mg (2.6 mmol, 80 %) – $[\alpha]_D^{20} = -47.0$ ($c = 1.3$, Aceton) [Lit.: $[\alpha]_D^{20} = -42$ ($c = 2.0$, Aceton; $ee = 78$ %)].^[76c] – $ee > 99$ %.

1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **97** angegebenen Daten überein. Die Bestimmung des ee erfolgte mittels HPLC an chiraler Phase nach Überführung von (*R*)-**97** in das Nitril (*S*)-**100** (Versuchsbeschreibung: s. Synthese von **100**).

(*S*)-1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin [(*S*)-**97**]. (*S*)-1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**30b**] (150 mg, 833 μ mol) und DBU (376 μ L, 2.5 mmol) in Ethanol / Wasser (6 mL; 4:1) wurden nach AAV XIV umgesetzt. Ausbeute (nach Flashchromatographie): 73 mg (507 μ mol, 61 %) – $[\alpha]_D^{22} = +45.7$ ($c = 1.6$, Aceton) [Lit.: $[\alpha]_D^{20} = +41$ ($c = 2.0$, Aceton; $ee = 76$ %)].^[76c] – $ee > 99$ % (HPLC nach Überführung von (*S*)-**97** in (*R*)-**100** [Versuchsbeschreibung: s. Synthese von **100**]).

1H -NMR-, ^{13}C -NMR- und GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **97** angegebenen Daten überein.

Nitril-Synthesen

AAV XV: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese propargylicher Nitrile. Der halogenierte Alkohol wird zu einer Lösung von KCN in Ethanol / Wasser (4:1) gegeben. Der Ansatz wird 16 h bei 50°C gerührt. Anschließend wird die Lösung im Vakuum eingeeengt und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

1-Cyano-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-ol (98). 1-Chlor-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-ol (**50b**) (196 mg, 900 µmol) und KCN (173 mg, 2.7 mmol) in Ethanol / Wasser (40 mL; 4:1) wurden nach AAV XV umgesetzt. Durch Aufreinigung über Flashchromatographie wurde **98** als gelbe Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 32 – 34°C erhalten. Ausbeute: 85 mg (405 µmol, 45 %).

R_f : 0.35 (Isohexan:Ethylacetat = 5:1).

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 0.13 (s, 6H, Si[CH₃]₂), 0.95 (s, 9H, C[CH₃]₃), 2.77 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H, CH₂), 4.67 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, CH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = -4.7 (Si[CH₃]₂), 16.6 (C[CH₃]₃), 26.1 (C[CH₃]₃), 27.6 (CH₂), 58.9 (CHOH), 91.1, 103.2 (C≡C), 116.5 (CN).

GCMS: R_t = 9.5 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 191 (1) [M⁺ – H₂O], 152 (57) [M⁺ – *t*-Bu], 134 (19) [M⁺ – *t*-Bu – H₂O], 111 (100) [M⁺ – *t*-Bu – CH₂CN], 83 (10).

C₁₁H₁₉NOSi 209.37

1-Cyano-4-phenyl-3-butin-2-ol (100). 1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol (**30b**) (3.00 g, 16.7 mmol) und KCN (3.20 g, 50.0 mmol) in Ethanol / Wasser (400 mL; 4:1) wurden nach AAV XV umgesetzt. Nach Aufreinigung durch Flashchromatographie wurde **100** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1.13 g (6.6 mmol, 40 %). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 95:5), R_t = 69.8 min (*R*) + 78.9 min (*S*).

R_f :	0.27 (Isohexan:Ethylacetat = 5:1).
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):	δ = 2.94 (d, J = 5.7 Hz, 2H, CH_2), 4.92 (t, J = 5.7 Hz, 1H, CH), 7.25-7.45 (m, 3H), 7.38-7.56 (m, 2H, ar-H).
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):	δ = 27.6 (CH_2), 59.1 (CHOH), 86.2, 87.3 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 116.6 (CN), 121.5, 128.6, 129.4, 132.1 (ar-C).
IR:	3413 (m), 2360 (w), 2341 (w), 2236 (w), 1598 (w), 1490 (s), 1052 (ss), 755 (ss), 689 (ss).
GCMS:	R_t = 10.8 min (Temperaturprogramm A) m/z (%) = 171 (17) [M^+], 153 (5) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 131 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CN}$], 103 (34), 77 (32) [C_6H_5^+].
$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}$	171.20

(*R*)-1-Cyano-4-phenyl-3-butin-2-ol [(*R*)-**100**]. (*S*)-1-Chlor-4-phenyl-3-butin-2-ol [(*S*)-**30b**] (150 mg, 833 μmol) und KCN (160 mg, 2.5 mmol) in Ethanol / Wasser (20 mL; 4:1) wurden nach AAV XV umgesetzt. Durch Aufreinigung über Flashchromatographie wurde (*R*)-**100** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 73 mg (426 μmol , 51 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +46.5$ (c = 1.4, CHCl_3) – $ee > 99\%$ (HPLC).

$^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - und GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **100** angegebenen Daten überein.

Azid-Synthesen

AAV XVI: Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Synthese propargylierter Azide. Das propargylierende Epoxid wird zu einer Lösung von NaN_3 in DMF gegeben. Der Ansatz wird 16 h bei 80°C gerührt. Anschließend wird die Lösung auf das 8-fache Volumen mit H_2O verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingedunstet.

1-Azido-4-phenyl-3-butin-2-ol (**104**). 1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin (**97**) (250 mg, 1.7 mmol) und NaN_3 (250 mg, 3.8 mmol) in DMF (25 mL) wurden nach AAV XVI umgesetzt. Durch Aufreinigung über Flashchromatographie wurde **67** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 63 mg (340 μmol , 20 %). Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 90:10), R_t = 30.9 min (*R*) + 38.5 min (*S*).

R_f : 0.24 (Isohexan:Ethylacetat = 10:1).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 2.39 (d, J = 5.8 Hz, 1H, OH), 3.52-3.60 (m, 2H, CH_2), 4.71-4.86 (m, 1H, CH), 7.23-7.45 (m, 3H), 7.37-7.54 (m, 2H, ar-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = 56.6 (CH_2), 62.7 (CHOH), 86.5, 86.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 121.9, 128.6, 129.1, 132.0 (ar-C).

IR: 3420 (w), 2360 (w), 2341 (w), 2095 (ss), 1489 (m), 1260 (s), 1069 (s), 917 (s), 754 (ss), 688 (ss).

GCMS: R_t = 10.8 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 187 (1) [M^+], 131 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{N}_3$], 102 (46), 77 (27) [C_6H_5^+].

$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$ 187.20

(*S*)-*1-Azido-4-phenyl-3-butin-2-ol* [(*S*)-**104**]. (*S*)-1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin [(*S*)-**97**; *ee* >99 %] (264 mg, 1.8 mmol) und NaN_3 (265 mg, 4.1 mmol) in DMF (30 mL) wurden nach AAV XVI umgesetzt. Durch Aufreinigung über Flashchromatographie wurde (*S*)-**104** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 57 mg (305 μmol , 17 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +84.5$ (c = 1.0, CHCl_3) – *ee* = 97 % (HPLC).

$^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - und GCMS-Daten stimmen mit den bei racemischem **104** angegebenen Daten überein.

*1-Azido-4-*t*-butyldimethylsilyl-3-butin-2-ol* (**107**). 1-*t*-Butyldimethylsilyl-3,4-epoxy-1-butin (**96**) (20 mg, 92 μmol) und NaN_3 (18 mg, 275 μmol) in DMF (1 mL) wurden nach AAV XVI umgesetzt. **107** wurde ohne weitere Aufreinigung als hellgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 10 mg (44 μmol , 48 %).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ = 0.12 (s, 6H, $\text{Si}[\text{CH}_3]_2$), 0.92 (s, 9H, $\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 3.40-3.48 (m, 2H, CH_2), 4.52 (t, J = 5.4 Hz, 1H, CH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ = -4.6 ($\text{Si}[\text{CH}_3]_2$), 16.6 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 26.2 ($\text{C}[\text{CH}_3]_3$), 56.6 (CH_2), 62.4 (CHOH), 90.8, 103.8 ($\text{C}\equiv\text{C}$).

GCMS: R_t = 9.5 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 197 (1) [$\text{M}^+ - \text{N}_2$], 168 (47) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu}$], 153 (6) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu} - \text{CH}_3$], 112 (100) [$\text{M}^+ - t\text{-Bu} - \text{CH}_2\text{N}_3$], 99 (26), 83 (45).

$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{OSi}$ 225.37

Diol-Synthesen

4-Phenyl-3-butin-1,2-diol (**105**). Methode A: Zu einer Lösung von 1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin (**97**) (5 mg, 35 μmol) in DMSO / H_2O (500 μL ; 2:1) wurde aq. HClO_4 (2 μL , 60 %ig) gegeben. Nach 3 h bei 75°C wurde mit Ethylacetat (500 μL) extrahiert und die Probe mittels GCMS analysiert. Der ermittelte Umsatz betrug 100 %. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels HPLC auf einer Chiralcel OB Säule (Isohexan:2-Propanol = 95:5), R_t = 31.3 min + 55.1 min. – (*S*)-**97** (*ee* >99 %) wurde nach Methode A zu dem Diol **105** mit einem *ee* von 55 % (HPLC) umgesetzt.

GCMS: R_t = 10.1 min (Temperaturprogramm A)
 m/z (%) = 162 (8) [M^+], 144 (3) [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$], 131 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$], 103 (30), 77 (32) [C_6H_5^+].

$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$ 162.19

4-Phenyl-3-butin-1,2-diol (**105**). Methode B: Zu einer Lösung von (*S*)-1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin [(*S*)-**97**; *ee* >99 %] (5 mg, 35 μ mol) in Dioxan (2 mL) wurde aq. H₂SO₄ (1 mL, 3 %ig) gegeben. Nach 5 min bei 50°C wurde mit Ethylacetat (2 mL) extrahiert und die Probe mittels GCMS analysiert. Umsatz: 90 %. – *ee* = 32 % (HPLC).

4-Phenyl-3-butin-1,2-diol (**105**). Methode C: (*S*)-1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin [(*S*)-**97**; *ee* >99 %] (5 mg, 35 μ mol) wurde in entionisiertes H₂O (pH = 7; 3 mL) gegeben. Nach 6 h bei 100°C wurde mit Ethylacetat (1 mL) extrahiert und die Probe mittels GCMS (s. Methode A) analysiert. Umsatz: 100 %. – *ee* = 6 % (HPLC).

4-Phenyl-3-butin-1,2-diol (**105**). Methode D: (*S*)-1-Phenyl-3,4-epoxy-1-butin [(*S*)-**97**; *ee* >99 %] (5 mg, 35 μ mol) wurde in aq. NaOH-Lösung (500 μ L; 2M) gegeben. Nach 1 h bei 60°C wurde mit Ethylacetat (1 mL) extrahiert und die Probe mittels GCMS (s. Methode A) analysiert. Umsatz: 100 % (ausschließlich Nebenprodukte).

Olefin-Synthesen

(*S*)-(Z)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ol [(*S*)-**72b**].^[114] Eine Lösung von (*S*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ol [(*S*)-**30b**] (40 mg, 222 μ mol) und Ethylendiamin (24.3 mg, 404 μ mol) in DMF (5 mL) wurde an Lindlar-Katalysator (162 mg) unter Normaldruck und Rühren über 25 min mit Wasserstoff hydriert. Anschließend wurde der Katalysator abfiltriert, mit Wasser (20 mL) verdünnt und mit Ethylacetat (2 $\times$ 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 0.5 M aq. HCl (20 mL), gesättigter NaHCO₃-Lösung (20 mL) und mit gesättigter NaCl-Lösung (20 mL) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach präparativer Dünnschichtchromatographie (CH₂Cl₂: Ethylacetat = 20:1) wurde (*S*)-**72b** als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 29 mg (159 μ mol, 72 %; Reinheit: 95 %). – $[\alpha]_D^{21} = -27.0$ (*c* = 0.4, CHCl₃) – *ee* >99 % (HPLC).

¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, GCMS- und HPLC-Daten stimmen mit den bei racemischem **72b** angegebenen Daten überein.

(S)-(E)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ol [(*S*)-**73b**].^[105] Zu einer Lösung von (*S*)-1-Chlor-4-phenyl-3-buten-2-ol [(*S*)-**30b**] (60 mg, 333 μ mol) in trockenem THF (3 mL) wurde bei 0°C Red-Al (153 μ L, 533 μ mol, 3.5 M in Toluol) gegeben und für 4 min gerührt. Anschließend wurde gesättigte NH₄Cl-Lösung (2 mL) zugetropft, mit Wasser verdünnt (10 mL) und mit Ethylacetat (2 $\times$ 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach Aufreinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie (Isohexan:Ethylacetat = 40:1) wurde (*S*)-**73b** als hellgelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 46 - 47°C erhalten. Ausbeute: 47 mg (258 μ mol, 77 %). – $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +5.4$ ($c = 1.1$, CHCl₃) – *ee* >99 % (HPLC).

¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, GCMS- und HPLC-Daten stimmen mit den bei racemischem **73b** angegebenen Daten überein.

5 Literatur und Anmerkungen

- 1 Übersichtsartikel.: a) V. K. Singh, *Synthesis* **1992**, 605-617; b) H. Takaya, T. Ohta, R. Noyori in: *Catalytic Asymmetric Synthesis* (Hrsg.: I. Ojima), Wiley-VCH, New York, **2000**, S. 34-83; c) M. M. Midland, L. A. Morrel in: *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry* (Hrsg.: G. Helmchen, R. W. Hoffmann, J. Mulzer, E. Schaumann), Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**, Vol. E21d, S. 4049-4066; d) E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto, *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Volume I – III, Springer, Berlin, **1999**.
- 2 a) M. M. Midland, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1553-1561; b) L. Deloux, M. Srebnik, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 763-784; c) R. K. Dhar, *Aldrichimica Acta* **1994**, *27*, 43-51; d) E. J. Corey, C. J. Helal, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2093-2118.
- 3 a) J. Bach, R. Berenguer, J. Garcia, T. Loscertales, J. Vilarrasa, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9021-9025; b) C. J. H. Helal, P. A. Magriotis, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10938-10939; c) K. A. Parker, M. W. Ledebor, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3214-3217.
- 4 a) M. M. Midland, A. Tramontano, A. Kazubski, R. S. Graham, D. J. S. Tsai, D. B. Cardin, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1371-1380; b) M. M. Midland, R. S. Graham, *Org. Synthesis* **1984**, *63*, 57-65.
- 5 P. V. Ramachandran, A. V. Teodorovic, M. V. Rangaishenvi, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2379-2386.
- 6 M. Srebnik, P. V. Ramachandran, H. C. Brown, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2916-2920.
- 7 R. S. Brinkmeyer, V. M. Kapoor, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8338-8341.
- 8 a) N. Cohen, R. J. Lopresti, C. Neukom, G. Saucy, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 582-588; b) K. Ishihara, A. Mori, I. Arai, H. Yamamoto, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *26*, 983-986.
- 9 R. Noyori, I. Tomino, M. Yamada, M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6717-6725.
- 10 a) R. A. Singer, M. S. Shepard, E. M. Carreira, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 7025-7032; b) D. E. Frantz, R. Fässler, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1806-1807; c) D. Boyall, F. López, H. Sasaki, D. Frantz, E. M. Carreira, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4233-4236; d) L. Pu, H.-B. Yu, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 757-824; e) N. K. Anand, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9687-9688.
- 11 Persönliche Mitteilung E. M. Carreira.
- 12 K. Matsumura, S. Hashiguchi, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8738-8739.
- 13 a) K. Burgess, L. D. Jennings, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6129-6139; b) C. Waldinger, M. Schneider, M. Botta, F. Corelli, V. Summa, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1485-1488; c) K. Nakamura, K. Takenaka, A. Ohno, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 4429-4439; d) Sheng-Xue Xie, J. Ogawa, S. Shimizu, *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20*, 935-938; e) M. Kurihara, K. Ishii, Y. Kasahara, N. Miyata, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3183-3184.
- 14 B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. L. Ray, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645-1650.
- 15 a) M. De Amici, C. De Micheli, G. Carrea, S. Spezia, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2646-2650; b) C. W. Bradshaw, H. Fu, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526-1532; c) C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532-1536; d) C. Zheng, V. T. Pham, R. S. Phillips, *Catal. Today* **1994**, *22*, 607-620; e) J.-M. Fang, C.-H. Lin, C. W. Bradshaw, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 967-978; f) T. Kolasa, A. O. Stewart, C. D. W.

- Brooks, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 729-736; g) C. Heiss, R. S. Phillips, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 2821-2825.
- 16 S. Hu, L. P. Hager, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 872-873.
- 17 J. Reisch, W. Spitzner, K. E. Schulte, *Arzneimittel-Forschung* **1967**, 17, 816-825.
- 18 L. Brandsma, *Preparative Acetylenic Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, **1988**; P. J. Stang, F. Diederich, *Modern Acetylene Chemistry*, Wiley-VCH, New York, **1995**.
- 19 a) L. E. Overman, K. L. Bell, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 1851-1853; b) R. Noyori, I. Tomino, M. Yamada, M. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 106, 6717-6719; c) J. Fried, J. C. Sih, *Tetrahedron Lett.* **1973**, 14, 3899-3902; d) W. S. Johnson, R. S. Brinkmeyer, V. M. Kapoor, T. M. Yarnell, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 8341-8343; e) D. Vourloumis, K. D. Kim, J. L. Peterson, P. A. Magriotis, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 4848-4852; f) N. Cohen, G. Saucy, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 582-588; g) R. A. Gibbs, W. H. Okamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4062-4063.
- 20 a) M. Treilhou, A. Fauve, J.-R. Pougny, J.-C. Promé, H. Veschambre, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3203-3208; b) F. Babudri, V. Fiandanese, O. Hassan, A. Punzi, F. Naso, *Tetrahedron* **1998**, 54, 4327-4336.
- 21 N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457-2483.
- 22 a) T. Kolasa, A. O. Stewart, C. D. W. Brooks, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 729-736; b) E. J. Stoner, B. A. Roden, S. Chemburkar, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4981-4984; c) A. O. Stewart, P. A. Bhatia, J. G. Martin, J. B. Summers, K. E. Rodriques, M. B. Martin, J. H. Holms, J. L. Moore, R. A. Craig, T. Kolasa, J. D. Ratajczyk, H. Mazdiyasni, F. A. J. Kerdesky, S. L. DeNinno, R. G. Maki, J. B. Bouska, P. R. Young, C. Lanni, R. L. Bell, G. W. Carter, C. D. W. Brooks, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1955-1968.
- 23 a) A. E. Wright, O. J. McConnel, S. Kohmoto, M. S. Lui, W. Thompson, K. M. Snader, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1377-1380; b) S. P. Gunasekera, G. T. Faircloth, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 6223-6225; c) S. Isaacs, Y. Kashman, *Tetrahedron* **1993**, 49, 10435-10438.
- 24 a) S. C. Shim, S.-K. Chang, C. W. Hur, C. K. Kim, *Phytochemistry* **1987**, 26, 2849-2850; b) Y. Fujimoto, M. Satoh, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, 36, 4206-4208; c) H. Matsanuga, M. Katano, H. Yamamoto, M. Mori, K. Takata, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 1279-1281; d) M. K. Gurjar, W. S. Kumar, B. V. Rao, *Tetrahedron* **1999**, 55, 12563-12576.
- 25 a) F. Theil, *Enzyme in der Organischen Synthese*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1997**; b) K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Verlag, Heidelberg, **2000**; c) C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, **1994**; und zit. Lit.
- 26 F. Theil, *Tetrahedron* **2000**, 56, 2905-2919.
- 27 a) J. Peters in: *Biotechnology*, 2nd ed., Vol. 8a (Hrsg.: H.-J. Rehm, G. Reed), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 391-474; b) M. Gottwald in: *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry* (Hrsg.: G. Helmchen, R. W. Hoffmann, J. Mulzer, E. Schaumann), Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**, Vol. E21d, S. 4143-4197 und zit. Lit.
- 28 J. B. Jones, *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, Wiley, New York, **1976**, 260-319 und zit. Lit.
- 29 R. J. Lamed, J. G. Zeikus, *Biochem. J.* **1981**, 195, 183-190.
- 30 D. S. Burdette, C. Vieille, J. G. Zeikus, *Biochem. J.* **1996**, 316, 115-122.
- 31 H. Sund, H. Theorell in: *The Enzymes*, Academic Press (Hrsg.: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback), New York, **1963**, 25-83.
- 32 B. Riebel, *Dissertation*, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, **1996**.

- 33 a) J. Peters, *Dissertation*, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, **1993**; b) J. Peters, T. Minuth, M.-R. Kula, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 950-958.
- 34 a) J. Peters, H. P. Brockamp, M. Grothus, T. Minuth, M.-R. Kula, L. Elling, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1173-1182; b) J. Peters, T. Minuth, M.-R. Kula, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1683-1692.
- 35 a) J. v. Eys, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 1531-1533; b) N. K. Gupta, W. G. Robinson, *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *118*, 431-434; c) H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, *14*, 147-197.
- 36 a) H. R. Levy, F. A. Loewus, B. Vennesland, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2949-2953; b) H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Biotechnol. Gen. Engin.* **1988**, *6*, 221-225.
- 37 a) M.-R. Kula, C. Wandrey, *Methods Enzymol.* **1987**, *136*, 9-21; b) K. Seelbach, B. Riebel, W. Hummel, M.-R. Kula, V. I. Tishkov, E. M. Egorov, C. Wandrey, U. Kragl, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1377-1380.
- 38 C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890-4899.
- 39 B. Brielbeck, M. Frede, E. Steckhan, *Biocatalysis* **1994**, *10*, 49-64.
- 40 R. K. Dieter, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4177-4236.
- 41 a) Y. Thoda, K. Sonogashira, N. Hagihara, *Synthesis* **1977**, 777-778; b) G. T. Crisp, A. I. O'Donoghue, *Synth. Comm.* **1989**, *19*, 1745-1758; c) A. R. Katritzky, J. Yao, M. Qi, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8201-8204; d) C. Chowdhury, N. G. Kundu, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7011-7016.
- 42 a) L. Birkofer, A. Ritter, H. Uhlenbrauck, *Chem. Ber.* **1963**, *96*, 3280-3288; b) D. R. M. Walton, F. Waugh, *J. Organometal. Chem.* **1972**, *37*, 45-56.
- 43 R. D. Miller, O. Reiser, *J. Heterocycl. Chem.* **1993**, *30*, 755-763.
- 44 S. Nahm, S. M. Weinreb, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815-3818.
- 45 J. Singh, N. Satyamurthi, I. S. Aidhen, *J. Prakt. Chem.* **2000**, *342*, 340-347.
- 46 B. M. Trost, T. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2301-2303.
- 47 M. Braun, D. Waldmüller, *Synthesis* **1989**, 856-858.
- 48 P. A. Jacobi, H. L. Brielmann, R. O. Cann, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5305-5316.
- 49 M. Barelle, R. Glenat, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1967**, 453-458.
- 50 R. Faust, C. Weber, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14655-14670.
- 51 L. V. Yerino, M. E. Osborn, P. S. Mariano, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 1579-1591.
- 52 H. G. O. Becker, *Organikum*, 19. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin **1993**, S. 224.
- 53 a) R. J. Linderman, M. S. Lonikar, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 6013-6022; b) R. P. Singh, G. Cao, R. L. Kirchmeier, J. M. Shreeve, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2873-2876.
- 54 G. P. Boldrini, M. Bortolotti, F. Mancani, E. Tagliavini, C. Trombini, A. Umani-Ronchi, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5820-5826.
- 55 A. D. N. Vaz, G. Schoelmann, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1286-1288.
- 56 H. G. O. Becker, *Organikum*, 19. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin **1993**, S. 512-513.
- 57 N. M. Yoon, Y. S. Gyoung, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2433-2450.
- 58 H. Saimoto, T. Hiyama, H. Nozaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1983**, *56*, 3078-3087.
- 59 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 4. Auflage, Thieme, Stuttgart, **1991**, S. 4.
- 60 G. R. Sullivan, J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2143-2147.

- 61 a) B. M. Trost, T. J. J. Müller, J. Martinez, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1888-1899; b) B. M. Trost, T. L. Calkins, C. G. Bochet, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2746-2748.
- 62 G. Bringmann, M. Gassen, R. Lardy, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10245-10252.
- 63 S.-X. Xie, J. Ogawa, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *52*, 327-331.
- 64 D. P. White, J. C. Anthony, A. O. Oyefeso, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7707-7716.
- 65 Y.-Y. Ku, R. R. Patel, E. M. Elisseou, D. P. Sawick, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2733-2736.
- 66 a) P. J. Stang, V. Dixit, *Synthesis* **1985**, 962-963; b) G. Look, *Silylating Agents*, Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz), **1995**.
- 67 J. A. Marshall, J. C. Peterson, L. Lebioda, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6006-6015.
- 68 a) M. M. Midland, D. C. McDowell, R. L. Hatch, A. Tramonto, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 867-869.
- 69 H. C. Brown, P. V. Ramachandran, S. A. Weismann, S. Swaminathan, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6328-6333.
- 70 S. Takano, K. Samizu, T. Sugihara, K. Ogasawara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1344-1345.
- 71 V. Michelet, I. Besnier, S. Tanier, A. M. Touzin, J. P. Genet, J. P. Demoute, *Synthesis* **1995**, 165-167.
- 72 a) K. Mori, H. Akao, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 91-96; b) R. Pontikis, L. R. Randianasolo, Y. L. Merrer, N. H. Nam, R. Azerad, J.-C. Depezay, *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 2240-2242; c) C. Orrenius, N. Öhrner, D. Rotticci, A. Mattson, K. Hult, T. Norin, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1217-1220.
- 73 M. H. Ansari, T. Kusumoto, T. Hiyama, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8271-8273.
- 74 O. Steiner, C. Tamm, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6729-6732.
- 75 K. Mori, H. Akao, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 91-96.
- 76 a) M. Lopp, T. Kanger, A. Müraus, T. Pehk, Ü. Lille, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 943-944; b) T. Kanger, P. Niidas, A.-M. Müürisepp, T. Pehk, M. Lopp, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2499-2508; c) R. Sánchez-Obregón, B. Ortiz, F. Walls, F. Yuste, J. L. García Ruano, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 947-955.
- 77 T. Zelinsky, *Dissertation*, Heinrich Heine Universität Düsseldorf **1995**.
- 78 C. Heiss, M. Laivenieks, J. G. Zeikus, R. S. Phillips, *Bioorg. & Med. Chem.* **2001**, *9*, 1659-1666.
- 79 a) D. D. Tanner, A. R. Stein, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1642-1646; b) L. M. Aleixo, M. de Carvalho, P. J. S. Moran, J. A. R. Rodrigues, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1637-1642.
- 80 Y. Kawai, M. Tsujimoto, S. Kondo, K. Takanobe, K. Nakamura, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 524-528.
- 81 K. Nakamura, T. Yoneda, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2453-2454.
- 82 N. Itoh, N. Mizuguchi, M. Mabuchi, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 41-50.
- 83 a) A. Trincone, B. Nicolaus, L. Lama, F. Marsiglia, A. Gambacorta, *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 31-34; b) C. Barbieri, E. Caruso, P. D'Arrigo, G. P. Fantoni, S. Servi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3931-3937; c) M. Kataoka, K. Yamamoto, H. Kawabata, M. Wada, K. Kita, H. Yanese, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 486-490; d) F. Molinari, R. Gandolfi, R. Villa, E. G. Occhiato, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3515-3520.
- 84 a) V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130; b) M. Nakazaki, H. Chikamatsu, K. Naemura, M. Asao, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4432-4440; c) G. L. Lemièrre, T. A. Van Osselaer, J. A. Lepoivre, F. C. Alderweireldt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* **1982**, 1123-1128; d) J. B. Jones, I. J.

- Jakovac, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 19-28; e) E. Horjales, C.-I. Bränden, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 15445-15451.
- 85 Y. Rubin, C. B. Knobler, F. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1607-1617.
- 86 M. Villela, *geplante Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn.
- 87 a) H. C. Brown, M. Srebnik, P. V. Ramachandran, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1577-1583; b) J. Bach, R. Berenguer, J. Garcia, M. Lopez, J. Manzanal, J. Vilarrasa, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 14947-14962; c) A. J. Souers, J. A. Ellmann, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1222-1224.
- 88 a) S. Terashima, N. Tanno, K. Kago, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 1026-1027; b) T. Sato, Y. Gotoh, Y. Wakabayashi, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4123-4126; c) H. C. Brown, W. S. Park, T. Byung, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5406-5412.
- 89 a) T. Ohkuma, H. Ooka, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10417-10418; b) T. Ohkuma, M. Koizumi, H. Doucet, T. Pham, M. Kozawa, K. Murata, E. Katayama, T. Yokozawa, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13529-13530; c) T. Ohkuma, M. Koizumi, M. Yoshida, R. Noyori, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1749-1752.
- 90 a) M. Isobe, Y. Ichikawa, Y. Funabashi, S. Mio, T. Goto, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 2863-2872; b) Y. Hanzawa, K.-I. Kawagoe, M. Ito, Y. Kobayashi, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 1633-1636; c) S. Tsuboi, J. Sakamoto, T. Kawano, M. Utaka, A. Takeda, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 7177-7179; d) C. Morin, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5095-5096; e) M. Miyazawa, N. Ishibashi, S. Ohnuma, M. Miyashita, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3419-3422.
- 91 a) A. Arnone, R. Bernadi, F. Blasco, R. Cardillo, G. Resnati, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2809-2818; b) A. Hage, D. G. I. Petra, J. A. Field, D. Schipper, J. B. P. A. Wijnberg, P. C. J. Kamer, J. N. H. Reek, P. W. N. M. van Leeuwen, R. Wever, H. E. Schoemaker, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1025-1034.
- 92 C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, F. Spreafico, C. Zirotti, *J. Chem. Res. Miniprint* **1984**, *4*, 976-984.
- 93 T. Zelinski, A. Liese, C. Wandrey, M.-R. Kula, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1681-1687.
- 94 M. Bönitz, *Dissertation*, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, **2000**.
- 95 M.-R. Kula, U. Kragl, *Stereoselective Biocatalysis* (Hrsg.: R. N. Patel), Marcel Dekker, New York, **2000**, S. 841-843.
- 96 L. N. Mander, S. P. Sethi, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5953-5956.
- 97 M. R. Lespiau, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1928**, *43*, 657-662.
- 98 F. Chemla, N. Bernard, J. F. Normant, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 75-78.
- 99 G. Wang, R. I. Hollingsworth, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1895-1901.
- 100 a) A. A. Petrov, *Zh. Obshch. Khim., Engl. Transl.* **1954**, *24*, 805-808; b) F. Bohlmann, J. Ziesche, *Phytochemistry* **1980**, *19*, 692-696; c) M. Takasugi, S. Kawashima, N. Katsui, A. Shirata, *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2957-2958; d) N. Krause, D. Seebach, *Chem. Ber.* **1988**, *121*, 1315-1320; e) J. J. Eisch, E. J. Galle, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4835-4840.
- 101 K. Takahashi, T. Minami, Y. Ohara, T. Hiyama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 2649-2656.
- 102 *Römpp Chemie Lexikon*, 9. Auflage, Thieme, Stuttgart **1995**, S. 2814.
- 103 K. Narkunan, B.-J. Uang, *Synthesis* **1998**, 1713-1714.
- 104 E. Fernández-Megía, J. M. Iglesias-Pintos, F. J. Sardina, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4770-4779.
- 105 C. Agami, F. Couty, G. Evano, H. Mathieu, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 367-376.
- 106 a) H. Lindlar, *Helv. Chim. Acta* **1952**, *35*, 446-450; b) H. Lindlar, R. Dubuis, *Org. Synth.* **1966**, *46*, 89-92.

- 107 L. I. Vereshchagin, L. P. Kirillova, S. R. Buzilova, R. L. Bol'shedvorskaya, G. V. Chernysheva, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1975**, *11*, 527-532.
- 108 D. Obrecht, B. Weiss, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 117-122.
- 109 V. V. Takhistov, E. M. Auvinen, A. D. Misharey, D. B. Bolotin, I. A. Favorskaya, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* **1974**, *10*, 426-430.
- 110 E. Negishi, C. Xu, Z. Tan, M. Kitora, *Heterocycles* **1997**, *46*, 209-214.
- 111 M. Ishikawa, H. Sugisawa, K. Yamamoto, M. Kumada, *J. Organomet. Chem.* **1979**, *179*, 377-390.
- 112 T. Shono, N. Kise, A. Yamazaki, H. Ohmizu, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1609-1612.
- 113 L. de Napoli, A. Messere, D. Palomba, V. Piccialli, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3432-3442.
- 114 S. Chackalamannil, R. J. Davies, Y. Wang, T. Asberom, D. Doller, J. Wong, D. Leone, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1932-1940.

6 Anhang

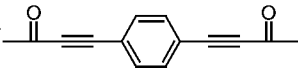
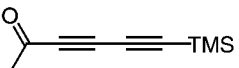
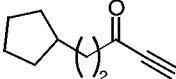
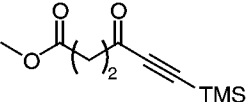
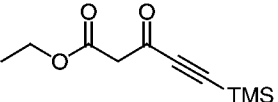
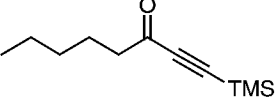
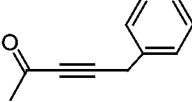
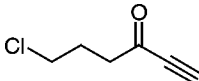
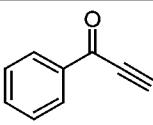
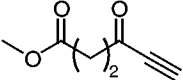
6.1 Abkürzungsverzeichnis

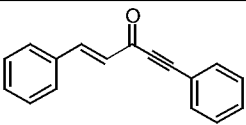
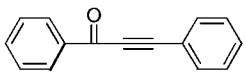
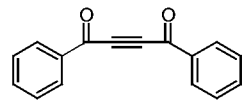
Abb.	Abbildung
abs. Konfig.	absolute Konfiguration
aq.	wässrig (aqueous)
ar	Arylrest
BINAL-H	Binaphtol modifiziertes Aluminiumhydrid
BINAP	2,2'-Bis-(diphenylphosphanyl)-1,1'-binaphtyl
Bn	Benzyl
Bu	Butyl
<i>c</i>	Konzentration in mol · L ⁻¹ (M), mmol · L ⁻¹ (mM) oder g · (100mL) ⁻¹ ; letzteres nur in Verbindung mit der Angabe der spezifischen Drehung [α] _λ ^T
CB-ADH	<i>Candida boidinii</i> Alkoholdehydrogenase
CBS	Corey-Bakshi-Shibata
CPCR	<i>Candida parapsilosis</i> Carbonylreduktase
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (NMR-Meßtechnik)
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIP	Diisopinocampheylboran
DIPT	Diisopropyltartrat
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Enzymklassifizierung (Enzyme Classification)
EDA	Ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Ethylacetat
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuß (enantiomeric excess)
EI	Elektronenstoß Ionisation (Electron Impact)
eq	Äquivalente (equivalents)
Et	Ethyl

FDH	Formiatdehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GCMS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung
HL-ADH	Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (Horse Liver Alcohol Dehydrogenase)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	Hochauflösende Massenspektrometrie (High Resolution Mass Spectrometry)
IR	Infrarot
J	Kopplungskonstante (Hz)
LB-ADH	<i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase
LDA	Lithiumdiisopropylamid
Lit.	Literatur
LK-ADH	<i>Lactobacillus kefir</i> Alkoholdehydrogenase
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>t</i> -butylether
MTPA	α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetyl
m/z	Masse/Ladung-Verhältnis
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	1,4-Dihydronicotinamidadenindinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	1,4-Dihydronicotinamidadenindinucleotidphosphat
nb	nicht bestimmt
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMR	Kernmagnetische Resonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NP	Nebenprodukt
ox.	oxidiert
Ph	Phenyl
Pr	Propyl
recLB-ADH	in <i>E. coli</i> überproduzierte LB-ADH
RECR	<i>Rhodococcus erythropolis</i> Carbonylreduktase
R_f	Retentionsfaktor
RT	Raumtemperatur
R_t	Retentionszeit (min)
sn	sehr niedrig
t	Zeit (time)

Tab.	Tabelle
TB-ADH	<i>Thermoanaerobium Brockii</i> Alkoholdehydrogenase
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEA	Triethanolamin
TE-ADH	<i>Thermoanaerobium ethanolicus</i> Alkoholdehydrogenase
TES	Triethylsilyl
THF	Tetrahydrofuran
Tol	Tolyl
TMS	Trimethylsilyl
Ts	Tosyl
TTN	Umsatzzahl (Total turnover number)
UV	Ultraviolett
Y-ADH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Alkoholdehydrogenase (Yeast Alcohol Dehydrogenase)
zit. Lit.	zitierte Literatur
$[\alpha]_{\lambda}^T$	Spezifische Drehung ($10 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) bei Temperatur T ($^{\circ}\text{C}$) und Wellenlänge λ (nm)
δ	Chemische Verschiebung (ppm)
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient ($\text{cm}^2 \cdot \mu\text{mol}^{-1}$)

6.2 Screening weiterer Alkinone

Substrate	% Aktivität ^a	
	CPCR	recLB-ADH
31a 	66	46
32a 	58	115
33a 	sn ^b	68
34a 	0	7
35a 	sn ^b	sn ^b
36a 	0	0
52a 	157	118
56a 	sn ^b	62 ee >99 %
57a 	sn ^b	sn ^b
58a 	sn ^b	4

Substrate	% Aktivität ^a	
	<i>CPCR</i>	<i>recLB</i> -ADH
108a 	0	0
109a 	0	0
110a 	0	0

Assay-Bedingungen: 5 mM Substrat (aromatische Substrate: 2 mM), 0.25 mM NAD(P)H, 1 mM MgCl₂, 100 mM TEA/NaOH-Puffer, pH = 6.5.

a) Enzymaktivität wurde über die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion bei 340 nm relativ zum Standard 5-Oxohexansäureethylester bestimmt.

b) Sehr niedrig.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 1998 bis Januar 2002 am Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich GmbH, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Wandrey durchgeführt und von Herrn Dr. M. Müller fachlich betreut.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Wamhoff bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Wandrey für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die stete Unterstützung während der gesamten Zeit in Jülich (insbesondere bei der Organisation meines Praktikums in Japan) und die Übernahme des Referats.

Mein Dank gilt weiterhin

- Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Hummel (Institut für Enzymtechnologie) sowie seinen Mitarbeiterinnen Frau B. Weitz und Frau V. Ophoven für die fruchtbaren Gespräche und die großzügige Versorgung mit *Lactobacillus brevis* Alkoholdehydrogenase,
- Frau Prof. Dr. R.-M. Kula (Institut für Enzymtechnologie) sowie ihrer Mitarbeiterin Frau M. Bönitz für die freundliche Bereitstellung von *Candida parapsilosis* Carbonylreduktase,
- Frau L. Walter für den äußerst engagierten Arbeitseinsatz im Labor und die nette Zusammenarbeit,
- meiner studentischen Hilfskraft Herrn Dipl.-Chem. P. Dünkelfmann für die Unterstützung bei den Substrat-Synthesen,
- Frau L. Kraus und Herrn K. Wertz für die freundliche Hilfe bei vielen organisatorischen Dingen,
- all meinen anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe "Bioorganische Chemie", besonders meinen Bürokollegen Herrn Dr. M. Wolberg, Herrn Dr. T. Dünwald, Herrn Dipl.-Chem. D. Franke und Herrn Dipl.-Chem. P. Dünkelfmann für die kurzweilige und unvergessene Zeit bei mancher Tasse Kaffee und das Korrekturlesen der Arbeit (T. Dünwald, M. Wolberg),
- den Mitarbeitern der Infrastruktur des IBT, besonders Frau Marianne Heß für ihre stets hilfsbereite und freundliche Unterstützung,
- den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen des Kekulé Institut für Organische Chemie und Biochemie (Universität Bonn),
- der DFG (SFB 380) für die Finanzierung der Arbeiten,
- meinen Eltern und Julia für die private Unterstützung während der Promotion.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Müller für die interessante Themenstellung und für die Freizügigkeit, die er mir bei der Bearbeitung des Themas gewährte, bedanken. Die intensive und ausgezeichnete Betreuung in allen Phasen der Promotion hat maßgeblich zu dem Erfolg der durchgeführten Arbeiten beigetragen.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-3983
Mai 2002
ISSN 0944-2952