

**Carba-analoge Glyceride und Phospholipide :
Synthesen und mechanistische Studien**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
angefertigt im Fachbereich 9, Naturwissenschaften II
der Bergischen Universität - GH - Wuppertal
(D - 468)

von
Bernd Jakob
aus Hagen

Tag der mündlichen Prüfung: 06.08.1999

1. Gutachter: Prof. Dr. M. P. Schneider

2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Altenbach

Meinen Eltern

Die experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Februar 1993 bis Februar 1998 am Institut für Organische Chemie der Bergischen Universität-GH-Wuppertal unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. P. Schneider durchgeführt, dem ich hiermit für seine freundliche Unterstützung danke.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und so wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Meinen Laborkollegen Herrn Dr. M. Berger, Herrn Dr. U. Ader, Frau Dr. C. Waldinger, Herrn Dr. M. Lobell, Herrn Dr. J. Herrmann, Herrn Dr. B. Haase, Herrn Dipl.-Chem. H. Peters, Herrn Dipl.-Chem. B. Aha, Herrn Dipl.-Chem. R. Schiefer, Herrn Dipl.-Chem. O. Keil, Herrn Dipl.-Chem. S. Müller und Herrn Dipl.-Chem. G. Machmüller danke ich für manche Diskussion und Anregung.

Frau I. Moeller und Herrn Dr. C. M. Weisshuhn danke ich für die Aufnahme von Hochfeld-NMR Spektren.

Summary

Lipases [E.C.3.1.1.3] are ubiquitous in nature where their role *in vivo* is the enzymatic hydrolysis of triglycerides. In these transformations lipases display a high degree of regio- and enantioselectivity, properties which are of great interest for the use of these enzymes *in vitro*. The experimental determination of these selectivities is somewhat problematic due to the fact that the primary products of hydrolysis are notoriously instable due to rapid acyl group migrations especially under protic conditions and at elevated temperatures. These are also substrates of lipases and therefore their optical purity can be strongly conversion dependent. Thus, one prerequisite for the successful determination of the enantioselectivities are extremely small conversions (<2-6%) and a rapid derivatisation of the primary reaction products prior to analysis. Moreover, the method is only of analytical value, the resulting products are not suitable for further synthetic use such as for the preparation of phospholipids. In view of this situation we felt that isosteric mimics of natural lipids would be an attractive alternative for a system and medium independent determination of these important enzyme parameters, as well as for the synthesis of novel carba-analogues of lipids and phospholipids. The systematic replacement of sp^3 -oxygen by sp^3 -carbon atoms in triglycerides leads to such mimics with minimal deviation of bond angles and bond distances. Their behaviour should be identically - with the exception of hydrolytic cleavage in the modified position - towards biological systems. In order to test this hypothesis synthetic routes for the synthesis of carba- analogues of triglycerides were developed. Carba-analogues of tricaprylin **11**, trilaurin **25** and tripalmitin **26** with modification of the *sn*-2 position were prepared starting from the corresponding fatty acid chlorides as well as racemic carba-analogues of triacetin **39** and trilaurin **40** with modification of the *sn*-1(3) position. The synthesis of triglycerides modified in the *sn*-1,2(2,3) positions - like the triacetin analogues (\pm)-**56** and (*S*)-**56** - were realised *via* Diels-Alder reaction of 2,3-dimethylbutadiene with the acrylic acid esters of D-pantolactone **42** as the key reaction step. This cycloaddition with **42** in presence of catalytic amounts of titaniumtetrachloride gives the cyclohexene derivative **50** with very high diastereoselectivity. Reduction with $LiAlH_4$ to the alcohol (*S*)-**53** ($\geq 99\%$ ee) proceeds without racemisation and acetylation followed by oxidative cleavage of the C=C-double bound gives the triacetin-analogue (*S*)-**56**. One triglyceride-analogue modified in the *sn*-1,3-positions **64** was synthesized starting from levulinic acid ethyl ester.

This general approach also allows the synthesis of novel carba-analogous phospholipids of high enantiomeric purity with a) modification of the *sn*-2 position such as (*S*)-**79** and b)

modification of the *sn*-1,2(2,3) positions like (*S*)-**82**. Such analogues of phospholipids could have interesting biological activities, e.g. as inhibitors of phospholipase A₂.

Using the above carba-analogues of triglycerides their activities and enantioselectivities towards 44 commercially available lipases was studied in comparison with the corresponding triglycerides.

The results - obtained with tricaprylin and its carba-analogue **11** (modification in the *sn*-2 position) - showed considerable differences between these two substrates towards the studied lipases both regarding their specific activities and enantioselectivities.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LIPASEN (ESTERASEN) - EIGENSCHAFTEN	2
3	PHOSPHOLIPIDE - EIGENSCHAFTEN	15
4	CARBA-ANALOGUE TRIGLYCERIDE - SYNTHESESTRATEGIEN	19
4.1	Einleitung	19
4.2	Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der <i>sn</i>-2 Position.....	20
4.2.1	Via Mannich-Reaktion	20
4.2.2	Via Diazoketon- und Wittig Reaktion.....	22
4.2.3	Via Diazoketone - Ketale	25
4.2.4	Via Allylmalonester.....	29
4.3	Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der <i>sn</i>-1(3) Position	31
4.4	Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der <i>sn</i>-1,2(2,3) Positionen.....	33
4.5	Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der <i>sn</i>-1,3 Positionen	46
4.6	Zusammenfassung - Ausblick	52
5	SELEKTIVITÄTEN VON LIPASEN - MODELLSTUDIEN.....	53
5.1	Regio- und Enantioselektivität gegenüber Triglyceriden	53
5.1.1	Einleitung	53
5.1.2	Nachweis der Isomeren (1,2- <i>sn</i> ; 2,3- <i>sn</i> ; 1,3- <i>sn</i>)-Dicaprylin.....	60
5.1.3	Bestimmung der Regio- und Enantioselektivität von Lipasen gegenüber Tricaprylin	63
5.1.4	Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten	77
5.2	Regio- und Enantioselektivität von Lipasen gegenüber isosteren Triglyceriden	78
5.2.1	Einleitung	78
5.2.2	Nachweis der carba-analogen Diglyceride	81
5.2.3	Bestimmung der Aktivität und Enantioselektivität von Lipasen gegenüber dem Triglyceridanaloga 11	83
5.2.4	Bestimmung der Enantioselektivität von Lipasen gegenüber dem Modellglycerid 11	88
5.3	Vergleich der Enantioselektivitäten von Lipasen gegenüber Tricaprylin und dem Modellglycerid 11.....	93

5.4	Zusammenfassung - Ausblick	98
6	CARBA-ANALOGE PHOSPHOLIPIDE - SYNTHESESTRATEGIEN	99
6.1	Einleitung	99
6.2	Modifikation in der <i>sn</i>-2 Position	102
6.2.1	Einleitung	102
6.2.2	Synthese von carba-analogenem Phosphatidylcholin.....	103
6.3	Modifikation in den <i>sn</i>-1,2(2,3) Positionen	118
6.3.1	Einleitung	118
6.3.2	Synthese von di-carba-analogenem Phosphatidylcholin	119
6.4	Zusammenfassung - Ausblick	124
7	BESTIMMUNG DER ABSOLUTEN KONFIGURATIONEN	125
7.1	Von (<i>R</i>)-75	125
7.2	Von carba-analogenem Dicaprylin.....	128
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	130
9	EXPERIMENTELLER TEIL.....	135
9.1	Allgemeines.....	135
9.1.1	Verwendete Geräte und Chemikalien.....	135
9.1.2	Liste der verwendeten Enzyme.....	137
9.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV's).....	139
9.2.1	Diazomethan AAV 1.....	139
9.2.2	α -Brommethylketone AAV 2.....	139
9.2.3	Alkylierung von Malonsäuredimethylester mit α -Brommethylketonen AAV 3 a	139
9.2.4	Alkylierung von Malonsäurediethylester mit α -Brommethylketonen AAV 3 b	140
9.2.5	1,3-dioxolangeschützte γ -Ketomalonate AAV 4.....	140
9.2.6	Reduktion von Malonestern mit Lithiumaluminiumhydrid AAV 5.....	140
9.2.7	Diacylierung von Diolen AAV 6 a.....	141
9.2.8	Monoacylierung von Diolen AAV 6 b	141
9.2.9	Entschützen der 1,3-Dioxolanschutzgruppe AAV 7.....	142
9.2.10	Acetylierung von Alkoholen AAV 8.....	142
9.2.11	Oxidative Spaltung von Methylengruppen mit Natriummetaperiodat und Ruthenium-trichloridhydrat AAV 9	142
9.2.12	Derivatisierung von Alkoholen mit 3,5-Dinitrophenylisocyanat AAV 10 a-b.	142
9.2.13	Derivatisierung von Alkoholen mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat AAV 11 a-b	143
9.3	Synthese carba-analoger Triglyceride modifiziert in der <i>sn</i>-2 Position	143
9.3.1	1-Brom-nonan-2-on 1	143

9.3.2	1-Brom-tridecan-2-on 2	144
9.3.3	1-Brom-heptadecan-2-on 3	145
9.3.4	(2-Oxo-tridecyl)-malonsäuredimethylester 4	145
9.3.5	(2-Oxo-heptadecyl)-malonsäuredimethylester 5	146
9.3.6	(2-Methylen-tridecyl)-malonsäuredimethylester 6	147
9.3.7	(2-Methylen-heptadecyl)-malonsäuredimethylester 7	148
9.3.8	2-(2-Methylen-tridecyl)-propan-1,3-diol 8	149
9.3.9	2-(2-Methylen-heptadecyl)-propan-1,3-diol 9	149
9.3.10	2-(2-Methylen-nonyl)-propan-1,3-dioldicaprylat 10	150
9.3.11	2-(2-Oxo-nonyl)-propan-1,3-dioldicaprylat 11	151
9.3.12	(2-Oxo-nonyl)-malonsäurediethylester 12	152
9.3.13	(2-Oxo-tridecyl)-malonsäurediethylester 13	153
9.3.14	(2-Oxo-heptadecyl)-malonsäurediethylester 14	154
9.3.15	1,2-Bis-(trimethylsiloxo)-ethan 15	154
9.3.16	(2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-malonsäurediethylester 16	155
9.3.17	(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-malonsäurediethylester 17	155
9.3.18	(2-Pentadecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-malonsäurediethylester 18	156
9.3.19	2-(2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diol 19	157
9.3.20	2-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diol 20	157
9.3.21	2-(2-Pentadecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diol 21	158
9.3.22	2-(2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-dioldicaprylat 22	159
9.3.23	2-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-dioldilaurat 23	159
9.3.24	2-(2-Pentadecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-dioldipalmitat 24	160
9.3.25	2-(2-Oxo-tridecyl)-propan-1,3-dioldilaurat 25	160
9.3.26	2-(2-Oxo-heptadecyl)-propan-1,3-dioldipalmitat 26	161
9.3.27	2-(2-Propen)-propan-1,3-dioldicaprylat 27	161
9.3.28	2-(2-Oxo-ethyl)-propan-1,3-dioldicaprylat 28	162
9.3.29	2-(2-Hydroxy-nonyl)-propan-1,3-dioldicaprylat 29	163
9.4	Synthese carba-analoger Triglyceride modifiziert in der <i>sn</i>-1(3) Position... 164	
9.4.1	Allylmalonsäuremonoethylester 30	164
9.4.2	1-Hexadecen-5-on-4-carbonsäureethylester 31	164
9.4.3	1-Hexadecen-5-on 32	165
9.4.4	2-But-3-enyl-2-methyl-[1,3]-dioxolan 33	166
9.4.5	2-But-3-enyl-2-undecyl-[1,3]-dioxolan 34	166
9.4.6	4-(2-Methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-diol 35	167
9.4.7	4-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-diol 36	168
9.4.8	4-(2-Methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-dioldiacetat 37	168
9.4.9	4-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-dioldilaurat 38	169
9.4.10	1,2-Diacetoxy-hexan-5-on 39	170
9.4.11	Hexadecan-5-on-1,2-dioldilaurat 40	170
9.5	Synthese di-carba-analoger Triglyceride modifiziert in den <i>sn</i>-1,2(2,3) Positionen	171
9.5.1	(<i>S</i>)- α -Acryloxy-milchsäureethylester 41	171
9.5.2	(<i>R</i>)- α -Acryloxy- β,β -dimethyl- γ -butyrolacton 42	172
9.5.3	9-Hydroxy-hexadecan-8-on 43	172
9.5.4	13-Hydroxy-tetracosan-12-on 44	173
9.5.5	Hexadecan-8,9-dion 45	174

9.5.6	Tetracosan-12,13-dion 46	175
9.5.7	2,3-Diheptyl-buta-1,3-dien 47	176
9.5.8	2,3-Diundecyl-buta-1,3-dien 48	177
9.5.9	3,4-Dimethyl-cyclohex-3-en-yl-carbonsäureethylester 49	178
9.5.10	(<i>S</i>)-3,4-Dimethyl-cyclohex-3-en-yl-(<i>R</i>)- α -carboxy- β,β -dimethyl- γ -butyrolacton 50	179
9.5.11	(<i>S</i>)-3,4-Diundecyl-cyclohex-3-en-yl-(<i>R</i>)- α -carboxy- β,β -dimethyl- γ -butyrolacton 51	180
9.5.12	(<i>R</i>)-3,4-Diundecyl-cyclohex-3-en-yl-carbonsäure-1-(<i>S</i>)-ethoxycarbonyl-ethylester 52	181
9.5.13	(\pm)-3,4-Dimethyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (\pm)- 53	181
9.5.14	(<i>S</i>)-3,4-Dimethyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (<i>S</i>)- 53	182
9.5.15	(<i>S</i>)-3,4-Diundecyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (<i>S</i>)- 54	183
9.5.16	(<i>R</i>)-3,4-Diundecyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (<i>R</i>)- 54	183
9.5.17	(\pm)-3,4-Dimethyl-1-acetoxymethyl-cyclohex-3-en (\pm)- 55	184
9.5.18	(<i>S</i>)-3,4-Dimethyl-1-acetoxymethyl-cyclohex-3-en (<i>S</i>)- 55	184
9.5.19	(\pm)-4-Acetoxymethyl-octa-2,7-dion (\pm)- 56	185
9.5.20	(<i>S</i>)- 4-Acetoxymethyl-octa-2,7-dion (<i>S</i>)- 56	185
9.6	Synthese di-carba-analoger Triglyceride modifiziert in den	
	<i>sn</i>-1,3 Positionen.....	186
9.6.1	57 ; Reaktion von Laevulinsäureethylester mit 15	186
9.6.2	58 ; Versuche zur Claisenkondensation mit 57	186
9.6.3	(2-Methylenpropyl)-essigsäureethylester 59	187
9.6.4	2,8-Dimethylnona-1,8-dien-5-on-4-carbonsäureethylester 60	188
9.6.5	2,8-Dimethylnona-1,8-dien-5-on 61	189
9.6.6	2,8-Dimethyl-nona-1,8-dien-5-ol 62	189
9.6.7	5-Acetoxy-2,8-dimethyl-nona-1,8-dien 63	190
9.6.8	5-Acetoxy-nona-2,8-dion 64	191
9.7	Untersuchungen zur Enantioselektivität und Aktivität von Lipasen und	
	Esterasen gegenüber einem natürlichen- und einem carba-analogen	
	Triglycerid	191
9.7.1	Derivatisierung von 1,2- <i>rac</i> -Dilaurin mit 3,5-Dinitrophenylisocyanat (\pm)- 65	191
9.7.2	Derivatisierung von 1,2- <i>sn</i> -Dilaurin mit 3,5-Dinitrophenylisocyanat 1,2- <i>sn</i> - 65	192
9.7.3	Herstellung und Derivatisierung einer Mischung aus 1,3- und <i>rac</i> -Dilaurin	
	Dilaurin 1,3- 65 / (\pm)- 65	192
9.7.4	2-(2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diolmonocaprylat 66	192
9.7.5	2-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diolmonolaurat 67	193
9.7.6	Derivatisierung von 66 mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat 68	193
9.7.7	Derivatisierung von 67 mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat 69	194
9.7.8	Entschützen von 68 mit Aceton / TFA 70	194
9.7.9	Entschützen von 69 mit Aceton / TFA 71	195
9.7.10	Reinheit der eingesetzten Reagentien.....	195
9.7.11	Bestimmung der Responsefaktoren	196

9.7.12	Bestimmung der Aktivität mikrobieller Lipasen und Esterasen gegenüber Tricaprylin	196
9.7.13	Vergleich der Enzymaktivitäten von Tricaprylin und 11	197
9.7.14	Bestimmung der Enantioselektivität mikrobieller Lipasen gegenüber Tricaprylin	197
9.7.15	Bestimmung der Enantioselektivität mikrobieller Lipasen gegenüber 11	197
9.7.16	Carba-analoges Dicaprylin (<i>R</i>)- 72	198
9.8	Synthese carba-analoger Phospholipide modifiziert in der <i>sn</i>-2 Position	198
9.8.1	(2-Methylen-propyl)-malonsäurediethylester 73	198
9.8.2	2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diol 74	199
9.8.3	(<i>R</i>)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolaurat (<i>R</i>)- 75	200
9.8.4	(±)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolaurat (±)- 75	200
9.8.5	Phosphorsäure-2-bromethylester-dichlorid 76	201
9.8.6	(<i>S</i>)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-2-bromethyl-methylphosphat (<i>S</i>)- 77	201
9.8.7	(±)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-2-bromethyl-methylphosphat (±)- 77	203
9.8.8	(<i>S</i>)-2-(2-Oxo-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-2-bromethyl-methylphosphat (<i>S</i>)- 78	203
9.8.9	(<i>S</i>)-2-(2-Oxo-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-phosphorylcholin (<i>S</i>)- 79 .	204
9.9	Synthese carba-analoger Phospholipide modifiziert in den <i>sn</i>-1,2(2,3) Positionen	205
9.9.1	(<i>S</i>)-3,4-Diundecyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-enyl-2-bromethyl-methylphosphat (<i>S</i>)- 80	205
9.9.2	(<i>S</i>)-Octacosan-12,17-dion-14-hydroxymethyl-2-bromethyl-methyl-phosphat (<i>S</i>)- 81	206
9.9.3	(<i>S</i>)-Octacosan-12,17-dion-14-hydroxymethyl-phosphorylcholin (<i>S</i>)- 82	207
9.10	Bestimmung der absoluten Konfiguration	208
9.10.1	(<i>S</i>)-2-(2-Methylen-propyl)-1-lauroyl-3-tosyl-propan-1,3-diol (<i>S</i>)- 83	208
9.10.2	(<i>S</i>)-2-(2-Methylen)-4-lauroylmethyl-5-iod-pentan (<i>S</i>)- 84	209
9.10.3	(<i>S</i>)-2-(2-Methylen)-4-lauroylmethyl-pentan (<i>S</i>)- 85	210
9.10.4	(2 <i>S</i>)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol (<i>S</i>)- 86	211
10	LITERATURLISTE.....	212

1 Einleitung

Triglyceride und Phospholipide sind ubiquitär vorkommende Naturstoffe. Beide Substanzgruppen dienen als Energiespeicher, wobei Phospholipide zusätzlich den Hauptbestandteil der Zellmembran bilden und dort für deren Stabilität und Flexibilität sorgen. Von fundamentaler Bedeutung bei der Signalübertragung sind darüber hinaus spezielle Phospholipide, wie z. B. der platelet aggregation factor (PAF) und das 1-Acyl-2-arachidonoyl-*sn*-phosphatidyl-inositol-3,5-diphosphat (PIP₂).

Triglyceride werden in Organismen von Lipasen abgebaut, diese spalten hydrolytisch die Glycerinfettsäureesterbindungen. Bei diesem Reaktionsschritt entscheidet die Regio- bzw. Enantioselektivität der Lipase welche Primärhydrolysate (1,2-*sn*-; 2,3-*sn*- ;1,3-*sn*-Diglyceride) gebildet werden. Die Bestimmung der Regio- und insbesondere der Enantioselektivität kommerziell verfügbarer Lipasen ist daher von fundamentalem Interesse. Dafür sind Triglyceride - deren natürliche Substrate - nur bedingt geeignet, da die gebildeten Hydrolysate unter protischen Bedingungen nicht stabil sind und leicht unter Acylgruppenwanderung racemisieren bzw. isomerisieren. Für die Bestimmung der Regio- und Enantioselektivität werden daher geeignete Modellglyceride benötigt, deren Strukturen und Eigenschaften mit den natürlichen Substraten weitgehend übereinstimmen sollten. Sie sollten darüber hinaus racemisierungs- und isomerisierungsstabile Hydrolysate liefern. Derartige, geeignete Verbindungen könnten Triglyceridanaloga sein, in denen jeweils einzelne der sp³-hybridisierten Sauerstoffatome des GlycerinGrundgerüsts durch Methylengruppen ersetzt sind. Derartige C-analoga Glyceride standen für entsprechende Untersuchungen bislang nicht zur Verfügung. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war daher die Synthese von C-analogen Triglyceriden. Durch enzymatische Umsetzungen sollte weiter geklärt werden, inwieweit derart modifizierte Verbindungen bei lipasekatalysierten Hydrolysen ein den natürlichen Triglyceriden analoges Substratverhalten aufweisen.

Ein weiteres Ziel war die Synthese der entsprechenden C-analogen Phospholipide. Diese Substanzen sind von Interesse als potentielle pharmazeutische Wirkstoffe, z.B. in Form von Phospholipase A₂-Inhibitoren.

2 Lipasen (Esterasen) - Eigenschaften

Lipasen (Esterasen) (E.C. 3.1.1.3) sind in der Natur weit verbreitet. Man findet sie in Säugetieren (z.B. in der Bauchspeicheldrüse oder Leber), in Pflanzen sowie in Mikroben, wie Pilzen und Bakterien. Ihre Aufgabe in der Natur ist die Hydrolyse von Triglyceriden. Von besonderem Interesse sind mikrobielle Lipasen:

- Mikrobielle Lipasen werden meist extrazellulär ausgeschieden und sind recht leicht zu isolieren
- Sie stehen vielfach kommerziell zur Verfügung
- Sie sind stabil in zahlreichen organischen Lösungsmitteln, haben dort eine hohe Aktivität (Klibanov A. M. 1986) und können leicht vom Reaktionsgemisch abtrennt und wiederverwendet werden.
- Sie können in entsprechend immobilisierter Form auch in wässrigen Systemen abgetrennt und wiederverwendet werden.
- Auch nicht natürliche Substrate können umgesetzt werden, wobei hinsichtlich Regioselektivität, Enantioselektivität und Substratspezifität ein breiter synthetischer Spielraum existiert (Santaniello E. 1992).

Aufgrund dieser zahlreichen, herausragenden Eigenschaften haben sich die Enzyme in der organischen Synthese vielfach bewährt (Crout D. H. C. 1989, Theil F. 1997), wie z.B. bei der Herstellung von enantiomerenreinen chiralen Synthesebausteinen (Laumen K. 1988, Goergens U. 1991, Andersch P., Jakob B. 1997 b), pharmazeutischen Wirkstoffen (Ader U. 1992 I-III, Schneider M. P. 1992), Emulgatoren für den Kosmetik- und Lebensmittelbereich (Berger M., Jakob B. 1993) und auch in der Schutzgruppenchemie (Waldmann H. J. 1991).

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Lipasen und Esterasen. Lipasen hydrolysieren wasserunlösliche Ester, die Esterasen hingegen wasserlösliche Substrate (Sarda L. 1958). Die Lipasen benötigen für ihre Aktivität eine hydrophobe Grenzfläche (Desnuelle P. 1972), wie man sie in Emulsionen, Micellen oder auch in monomolekularen Filmen (Ransac S. 1991) findet. Die Ursache für dieses Verhalten konnte in den letzten Jahren durch Röntgenstrukturanalyse unterschiedlicher Lipasen in Verbindung mit „molecular modeling“ aufgeklärt werden (Brady L. 1990, Winkler F.K. 1990, Noble M. 1994, Jaeger K.E. 1994 a).

Das aktive Zentrum von Lipasen ist mit einer hydrophoben Helix verschlossen, die als „lid“ bezeichnet wird (Martinez C. 1992). Bei der Wechselwirkung mit einer hydrophoben Phase wird das aktive Zentrum freigesetzt und die enzymatischen Umsetzungen finden statt (van Tilbeurgh H. 1993). In organischen Lösungsmitteln ist das „lid“ hingegen stets geöffnet. Hierdurch gelingt in vielen Fällen auch die Estersynthese aus Alkoholen und Carbonsäuren. Esterasen besitzen kein „lid“, so daß wasserlösliche Ester ungehindert ins aktive Zentrum gelangen und dort umgesetzt werden können. Neueren Untersuchungen zufolge existieren auch Lipasen ohne „lid“, z.B. eine Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger K.E. 1994 b) und aus *Candida antarctica* B (Martinelle M. 1995), sie stellen damit Verbindungsglieder zwischen Lipasen und Esterasen dar. Daher wurde empfohlen (Villeneuve P. 1997) Lipasen als Esterasen zu klassifizieren, die langkettige Triacylglyceride hydrolysieren können.

Bei den meisten Lipasen und Esterasen beruht die Hydrolyse im aktiven Zentrum auf dem Zusammenwirken der drei Aminosäuren Serin, Histidin und Asparaginsäure (Gololobov M.Y. 1988; Abb. 1).

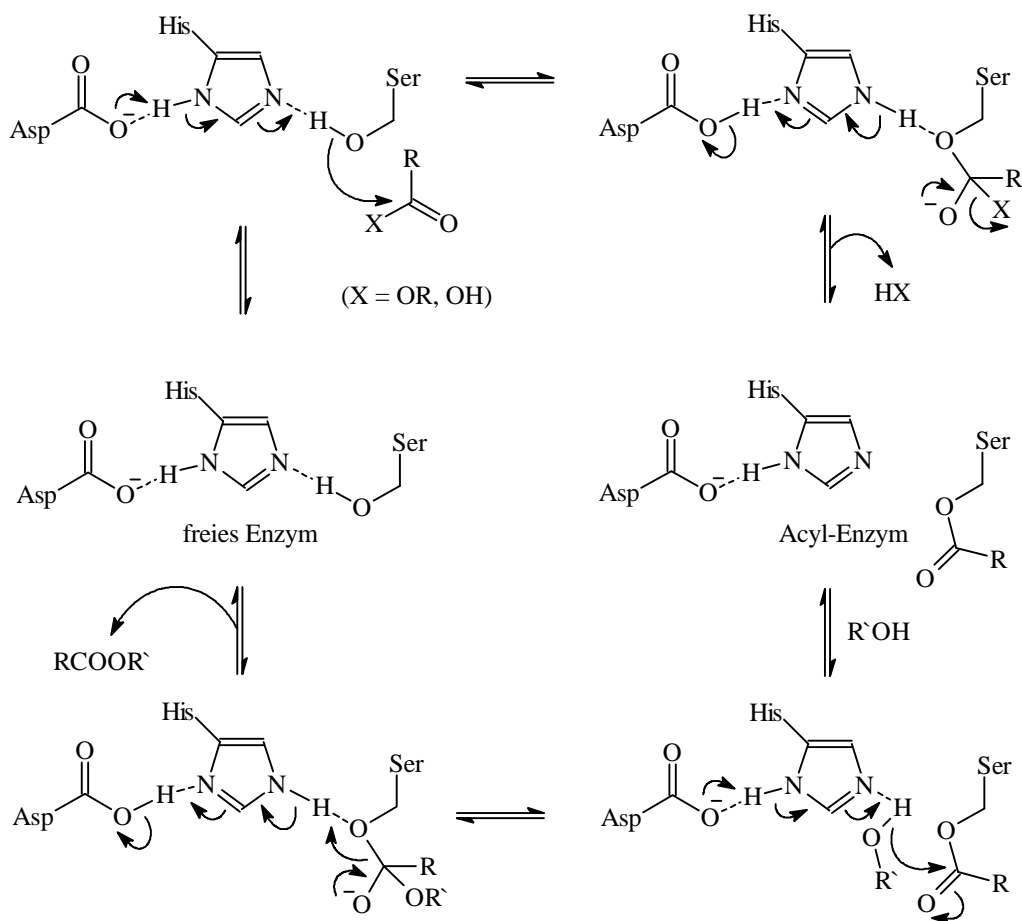


Abb. 1: Katalyse-Zyklus der Acylierung

Das Zusammenwirken der sog. katalytischen Triade erhöht a) die Nucleophilie der OH-Gruppe am Serin b) stabilisiert den sp^3 -Übergangszustand im sog. „Oxianion hole“. Durch den nucleophilen Angriff am Carboxylkohlenstoffatom der Estergruppe und Eliminierung der Abgangsgruppe entsteht das sog. Acyl-Enzym bei dem die Acylgruppe kovalent am Serin gebunden ist. Dieses Acyl-Enzym kann durch Wasser oder in organischen Lösungsmitteln auch durch andere Nucleophile wie Alkohole, Amine, etc. gespalten werden, wodurch Carbonsäuren, Ester oder Amide gebildet werden.

Triglyceride, die natürlichen Substrate von Lipasen, sind bei ungleicher Fettsäureverteilung ($R \neq R' \neq R''$, bzw. allgemein bei asymmetrischer Substitution) aufgrund der Chiralität am *sn*-2 Kohlenstoffatom optisch aktiv. Zur einfachen Kennzeichnung dieser und anderer vom Glycerin abgeleiteten Verbindungen hat sich neben der *R,S*-Nomenklatur vor allem die sogenannte „*sn*-Nomenklatur“ etabliert, in der die Kohlenstoffatome des Glycerins zunächst in der Fischer-Projektion angeordnet und dann von 1-3 durchnummeriert werden. Dabei ist festgelegt, daß das Wasserstoffatom in der 2-Position nach rechts weist (Abb. 2 a)-b)).

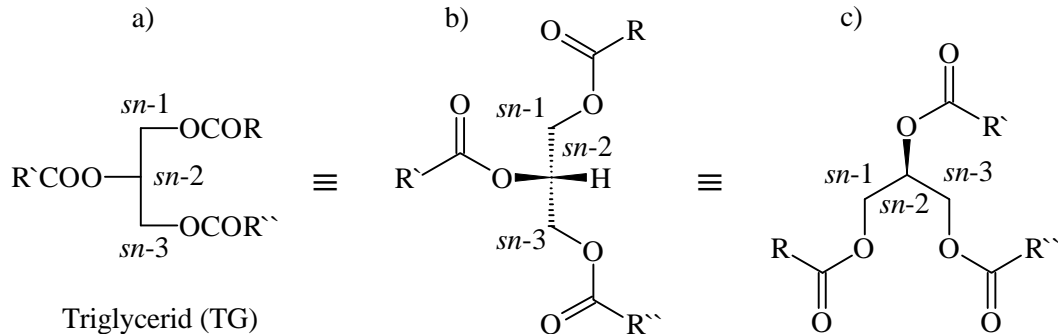


Abb. 2: Triglyceride - *sn*-Nomenklatur

Lipasekatalysierte Transformationen

Bei lipasekatalysierten Umsetzungen werden sechs Reaktionsformen unterschieden (Abb. 3).

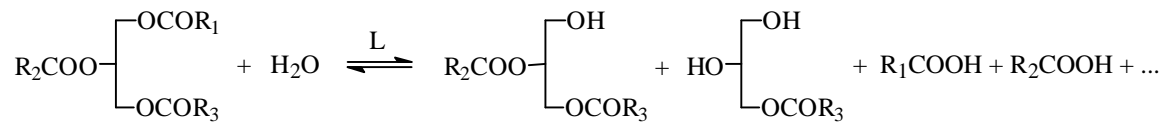
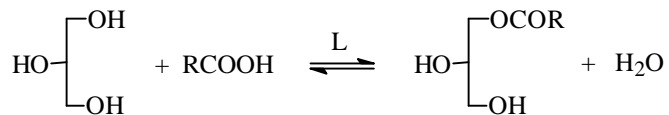
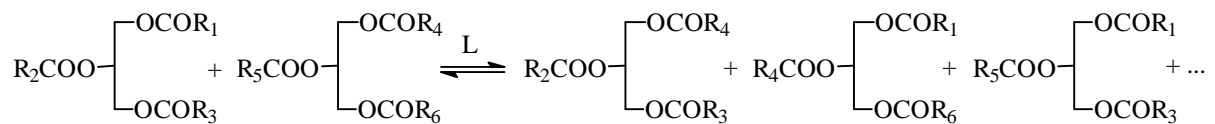
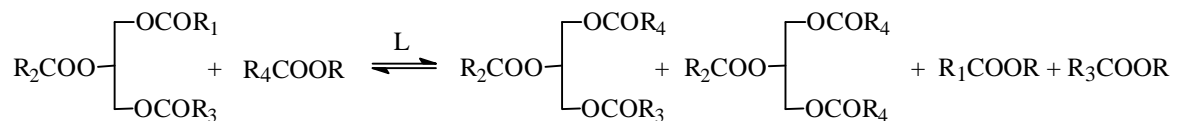
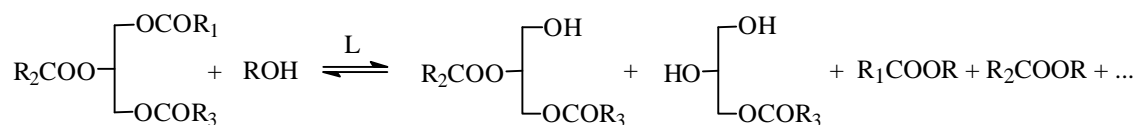
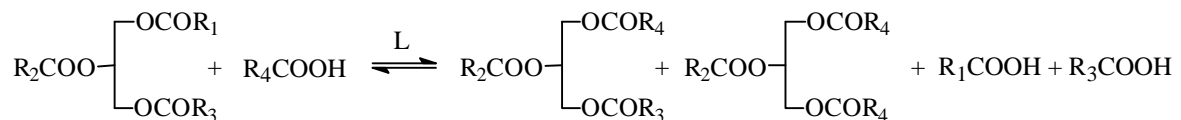
I. Hydrolyse :**II. Veresterung****III. Interesterifizierung****IV. Transesterifizierung****V. Alkoholyse****VI. Acidolyse**

Abb. 3: Triglyceride (Glycerin): Lipasekatalysierte Transformationen

I. Hydrolyse

Lipasen katalysieren unter physiologischen Bedingungen ($pH \cong 7$) in wässrigen Medien die Hydrolyse von Triglyceriden zu Glycerin und freien Fettsäuren. Durch den normalerweise vorhandenen Überschuß an Wasser wird das Gleichgewicht der Reaktion fast vollständig auf

die Seite der Hydrolyseprodukte verschoben. Die gebildete freie Fettsäure kann zudem an einem pH-Staten durch Zugabe von NaOH neutralisiert werden, wodurch die Rückreaktion ausgeschlossen wird. Dies ist auch deswegen sinnvoll, weil größere Mengen an freier Fettsäure oft zu einer Inhibierung des Enzyms führen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse ist stark von der Emulgierbarkeit des Esters im wässrigen Medium abhängig. Zu festen Estern wie Tripalmitin oder Tristearin müssen daher Emulgatoren oder organische Lösungsmittel zugesetzt werden (Khor H.T. 1986). Bewährt hat sich darüberhinaus die Hydrolyse von Triglyceriden in Mikroemulsionen (Österberg E. 1988).

II. Veresterung

Ausgehend von Fettsäuren und Alkoholen können Lipasen auch Ester bilden. Gute Ausbeuten werden jedoch nur erzielt, wenn das gebildete Reaktionswasser aus dem Reaktionsgemisch entfernt wird. Dies kann durch Zugabe von Molekularsieb geschehen oder durch Reaktionsführung unter vermindertem Druck, sofern die anderen Komponenten einen hohen Siedepunkt haben (Ergan F. 1988,1990).

Bei der direkten Veresterung kann die Lipase durch die Acidität der freien Säure denaturieren. Desweiteren können unter aciden Bedingungen bei empfindlichen Verbindungen Umlagerungen (z.B. bei Di- und Monoglyceriden) und Nebenreaktionen nicht ausgeschlossen werden. Daher wird bevorzugt die Alkoholyse und die Transesterifizierung eingesetzt, die unter weitgehend neutralen Bedingungen ablaufen.

III. Interesterifizierung

Bei der Interesterifizierung - einem Spezialfall der Transesterifizierung - werden Triglyceride miteinander umgesetzt. Auf diese Weise können Öle mit bestimmten Eigenschaften hergestellt werden, ohne daß weitere Nebenprodukte anfallen.

IV. Transesterifizierung

Die Transesterifizierung ermöglicht den gezielten Austausch der Acylgruppen eines Triglycerids durch Umsetzung mit Fettsäuremethyl- oder -ethylestern in Gegenwart regio- oder stereospezifischer Lipasen. Dies wird z.B. bei der Herstellung von speziellen Triglyceriden wie Diätfetten oder Kakaobutter genutzt (Macrae A.R. 1983).

V. Alkoholyse

Bei der Alkoholyse wird die Acylgruppe eines Esters auf einen anderen Alkohol übertragen. Im Falle von Triglyceriden als Acyldonor können unter Verwendung fettsäurespezifischer Lipasen Fettsäureester (-methyl oder -ethylester) bestimmter Fettsäuren (Eruca-, Öl-, Linol-, und Linolensäure, ω -3-ungesättigte- und polyungesättigte Fettsäuren PUFA) in hoher Reinheit gewonnen werden. Ausgangsmaterialien sind Triglyceride, die die gewünschten Fettsäuren in ausreichender Menge enthalten.

Nachteil der Alkoholyse ist die Reversibilität der Reaktion, so daß quantitative Umsätze nur erzielt werden können, wenn eine Reaktionskomponente im großen Überschuß eingesetzt wird.

Das Problem wurde z.B. durch Verwendung von aktivierten Estern, wie Estern von Trihalogenalkoholen (Kirchner G. 1985), Oximester (Ghorage A. 1989; Mischitz M. 1991) sowie Vinyl- oder Isopropenylester als Acyldonatoren (Wong C.H. 1986), gelöst. Die freigesetzten Alkohole sind entweder von sehr geringer Nucleophilie oder lagern sich - wie z.B. Vinylalkohol - in die entsprechenden Aldehyde oder Ketone um (Abb. 4).

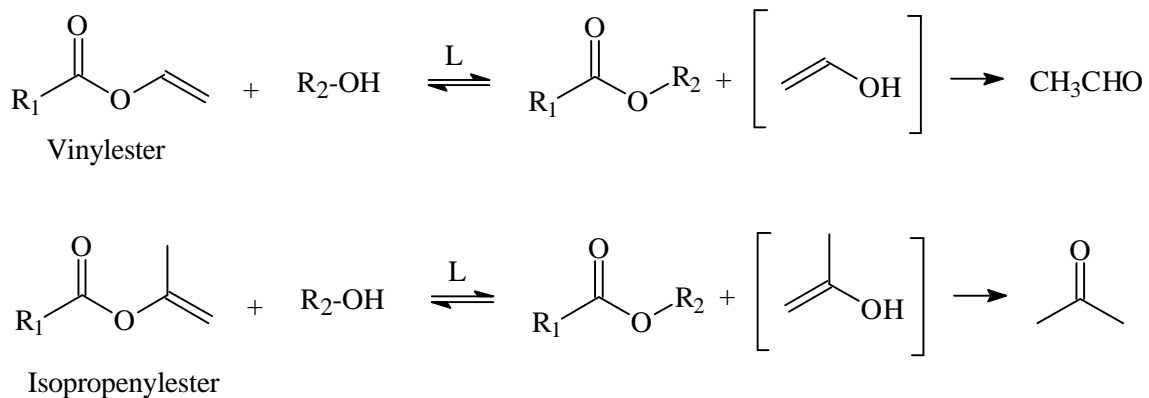


Abb. 4: Lipasekatalysierter irreversibler Acyltransfer

Diese Methode des irreversiblen Acyltransfers hat sich in der organischen Synthese fest etabliert, da unter schonenden Reaktionsbedingungen oft exzellente Ausbeuten erhalten werden. Die benötigten Vinylester können durch Acidolyse von Vinylacetat mit der entsprechenden Carbonsäure in Gegenwart von Palladium-(II)-acetat gewonnen werden (Lobell M. 1993).

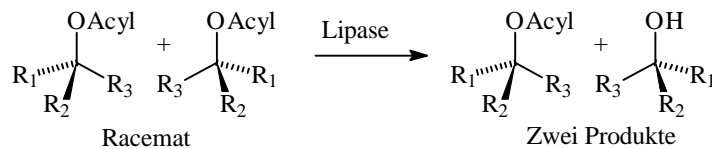
VI. Acidolyse

Bei der Acidolyse wird die Acylgruppe eines Esters mit einer freien Carbonsäure umgesetzt und durch diese ersetzt. Bei der Acidolyse ist wie auch bei der direkten Veresterung die Acidität der freien Säure ein wesentlicher Nachteil, denn die Lipase kann dabei denaturiert werden. Der synthetische Nutzen der Acidolyse ist daher begrenzt.

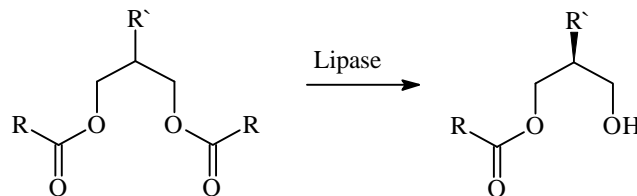
Lipasen: Stereoselektive Transformationen

Lipasen ermöglichen - neben den zuvor beschriebenen Transformationen an Triglyceriden - die Differenzierung zwischen den Enantiomeren racemischer Alkohole oder Carbonsäuren durch enantioselective Hydrolysen bzw. Veresterungen (Racematspaltung). Auch die Differenzierung enantiotoper Gruppen in *meso*-Substraten oder in achiralen Verbindungen mit prochiralen Zentren wird synthetisch genutzt (Abb. 5 I-III).

I. Racematspaltung



II. Achirales Substrat mit prochiralem Zentrum



III. *meso*-Verbindung

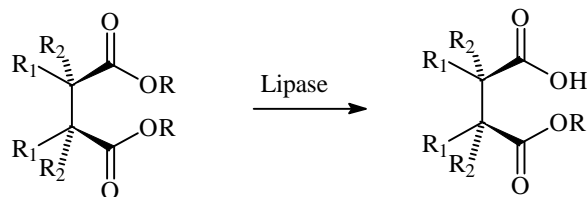


Abb. 5: Lipasekatalysierte enantioselective Transformationen

Die lipasekatalysierte Acylierung (Abb. 6 a) und die entsprechende Hydrolyse (Abb. 6 b) liefern dabei im Idealfalle die Enantiomeren mit jeweils entgegengesetzten absoluten Konfigurationen.

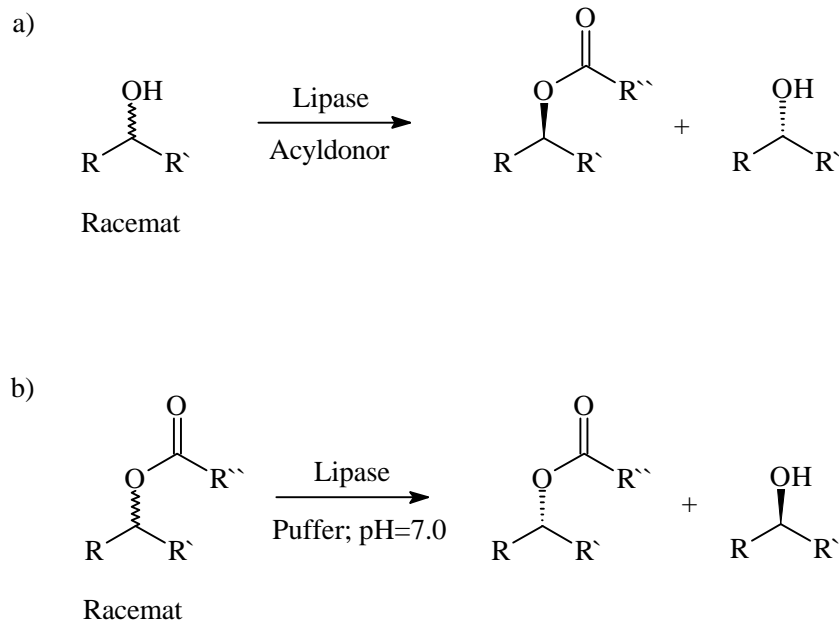


Abb. 6: Enantiomere der entgegengesetzten absoluten Konfiguration durch lipasekatalysierte a) Veresterung bzw. b) Hydrolyse

Die lipasekatalysierte Differenzierung enantiotoper Gruppen in achiralen Verbindungen mit prochiralem Zentrum (Abb. 5 II) oder in *meso*-Verbindungen (Abb. 5 III) liefert theoretisch nur ein Enantiomeres bzw. Diastereomeres (100% chemische u. optische Ausbeute). Bei der Racematspaltung kann dagegen das gewünschte Enantiomer nur mit maximal 50% Ausbeute erhalten werden.

Aus ökonomischen Gründen muß das unerwünschte Enantiomere racemisiert bzw. isomerisiert werden. Dies gelingt am besten bei chiralen Carbonsäuren und deren Estern, sofern die Chiralität α -ständig zur Carboxylgruppe lokalisiert ist und zudem enolisiert werden kann (Abb. 7).

Neuerdings wurden Katalysatoren auf Rutheniumbasis entwickelt, mit denen auch chirale Alkohole (Hydroxylgruppe am chiralen C-Atom gebunden) racemisiert werden können (Abb. 7, Larsson A.L.E. 1997)

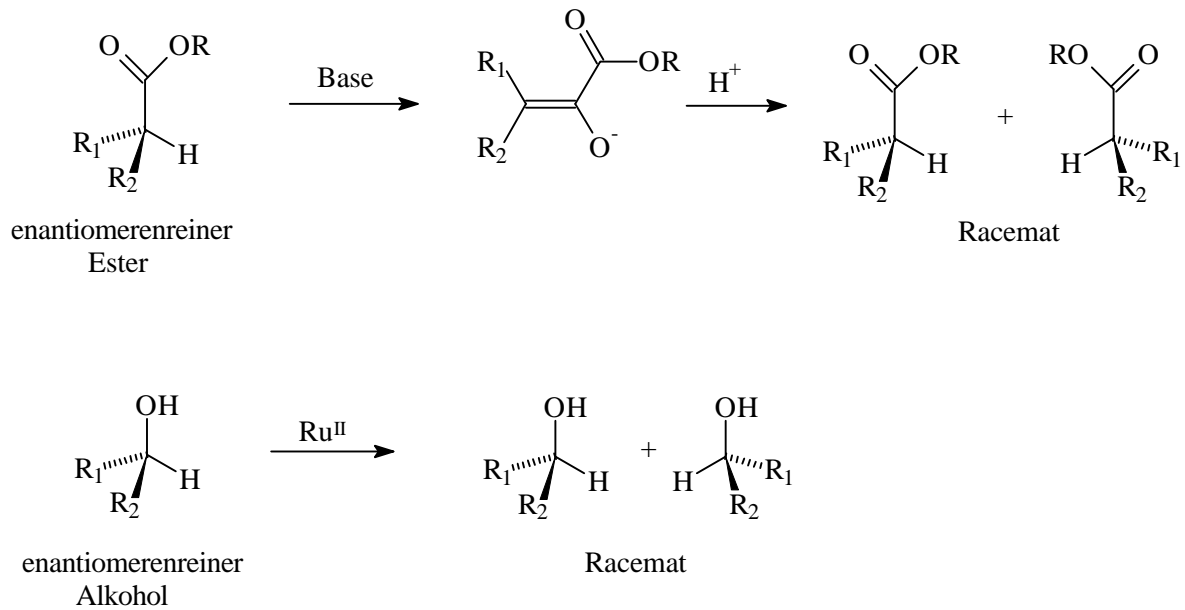


Abb. 7: Racemisierung enantiomerenreiner Ester und Alkohole

Lipasen - selektive Transformationen an Triglyceriden

Die stereoselektive Differenzierung spielt auch bei Umsetzungen mit Triglyceriden eine wichtige Rolle, denn Lipasen unterscheiden zwischen den Fettsäureesterbindungen in den Positionen *sn*-1, *sn*-2 und *sn*-3. Lipasen tolerieren zudem nicht jede Fettsäure, sondern differenzieren z.B. zwischen einzelnen Fettsäurekettenlängen. Anhand dieser Merkmale werden Lipasen in fünf Kategorien eingeordnet:

- Regioselektiv
- Stereoselektiv
- Unspezifisch
- Fettsäure spezifisch
- Substrat spezifisch

Die positionsspezifischen Differenzierungsmöglichkeiten von Lipasen sind in Abb. 8 dargestellt.

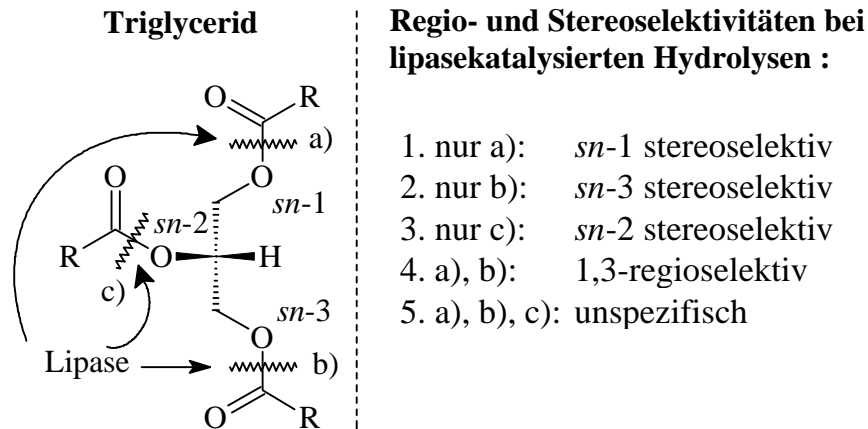


Abb. 8: Regio- und Stereoselektivitäten von Lipasen

Regioselektive Lipasen

Einige Lipasen, wie z.B. solche aus *Rhizopus niveus*, *Rhizopus arrhizus* und *Aspergillus niger*, zeigen eine ausgesprochene Selektivität gegenüber primären Acylgruppen. Sie sind somit 1,3-regioselektiv (Berger M. 1993). Eine Bevorzugung der sekundären Acylgruppe (*sn*-2-regioselektiv) wurde bislang nur bei einem Enzym beobachtet, der Lipase aus *Candida antartica A* (Rogalska E. 1993).

Die Regioselektivität kann auf einfache Weise nach einem von M. Berger entwickelten Verfahren gaschromatographisch bestimmt werden (Berger M. 1991a).

Stereoselektive Lipasen

Stereospezifische Lipasen hydrolysieren in Triglyceriden nur eine der primären Acylgruppen. Demzufolge gibt es *sn*-1 spezifische Lipasen, z.B. die Lipase aus *Humicola lanuginosa* und *Pseudomonas fluorescens*, sowie *sn*-3 spezifische Lipasen, wie z.B. die Lipasen aus Hundemagen oder aus *Candida antartica B* (Rogalska E. 1993).

Bei der Bestimmung der Stereoselektivität von Lipasen wurden bislang zwei Strategien verfolgt:

1) Symmetrisch substituierte Triglyceride wurden enzymatisch hydrolysiert. Die Enantio- und Regioisomerenreinheit der gebildeten Diglyceride wurde bestimmt, indem die Hydrolysate derivatisiert und mittels HPLC getrennt wurden (Takagi T. 1987, Rogalska E. 1993).

2) Enantiomerenreine asymmetrisch substituierte Triglyceride wurden enzymatisch hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren wurden gaschromatographisch untersucht (Jensen R.G. 1982). In einer Variante hiervon wurde neben dem enantiomerenreinen Triglycerid (ein Enantiomer nicht zwei !) auch die racemische Verbindung eingesetzt (Villeneuve P. 1995). Die erforderlichen enantiomerenreinen Triglyceride müssen jedoch erst synthetisch hergestellt werden.

Unspezifische Lipasen

Zahlreiche Lipasen hydrolysieren die Acylgruppen in Triglyceriden, ohne daß eine bestimmte Position (*sn*-1, *sn*-2, *sn*-3) bevorzugt wird. Werden zudem die Fettsäuren unabhängig von der Kettenlänge und des Grades der Sättigung vergleichbar schnell abgespalten, so handelt es sich um unspezifische Lipasen. Beispiele hierfür sind Lipasen aus *Penicillium expansum* (Stocklein W. 1993) und *Aspergillus sp.* (Fu X. 1995).

Fettsäure-spezifische Lipasen

Einige Lipasen sind selektiv hinsichtlich bestimmter Fettsäurekettenlängen, oder aber sie differenzieren zwischen gesättigten und ungesättigten Fettsäuren.

Beispiele dafür sind Lipasen aus:

- *Geotrichum candidum*: cis-9-ungesättigte Fettsäuren (Jensen R.G. 1983)
- *Penicillium roquenforti*: kurzkettige Fettsäuren (Mase T. 1995)
- *Botrytis cinerea*: langkettige, ungesättigte Fettsäuren (Commenil P. 1995)

Das Fettsäureprofil von Lipasen kann gaschromatographisch nach einem von M. Berger entwickelten Verfahren bestimmt werden (Berger M. 1991 b)).

Substrat-spezifische Lipasen

Gewöhnlich hydrolysieren Lipasen Triglyceride, darüber hinaus aber auch Di- und Monoglyceride sowie Phospholipide. Spezifische Lipasen akzeptieren demgegenüber nur einzelne dieser Verbindungsklassen als Substrat, z.B. nur Triglyceride. Beispiele dafür sind die Lipasen aus:

- Rat adipose tissue: Monoglyceride (Tornquist H. 1976)
- *Penicillium camembertii* : Mono- und Diglyceride (Yamagushi S. 1991)
- *Penicillium sp.* : Triglyceride (Gulomova K. 1996)

Die zuvor beschriebenen Lipaseeigenschaften beziehen sich auf Umsetzungen mit Triglyceriden. Die enzymkatalysierte Hydrolyse liefert hierbei Diglyceride, die jedoch leicht durch Acylgruppenwanderungen racemisieren (s. Kap. 5.1.1). Dies spielt bei der Ermittlung der Substrat- und Fettsäurespezifität keine Rolle, kann aber leicht zu fehlerhaften Resultaten bei der Bestimmung der Regio- und Enantioselektivität führen. Die Racemisierung der Diglyceride findet in protischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur bereits langsam, bei höheren Temperaturen oder unter sauren bzw. basischen Bedingungen, jedoch rasch statt (Berger M 1993).

Durch den Einsatz geeigneter, strukturverwandter Substrate könnte das Problem der Acylgruppenwanderung bei der Bestimmung der Regio- und Enantioselektivitäten prinzipiell umgangen werden. Die bislang eingesetzten Verbindungen, wie z.B. Etherglyceride (Paltauf F. 1984), unterscheiden sich jedoch deutlich von den natürlichen Triglyceriden, so daß diese Ergebnisse nicht mit den Umsetzungen von Triglyceriden zu vergleichen sind.

Die gezielte Substitution der einzelnen sp^3 -hybridisierten Sauerstoffatome des Glycerinringgrundgerüsts durch Methylengruppen führt hingegen zu Verbindungen mit einer den Triglyceriden analogen Struktur. M. Berger konnte zudem zeigen, daß carba-analoges Tributyrin (modifiziert in der *sn*-2 Position sowie in den *sn*-1,3-Positionen) im Gegensatz zu den entsprechenden Etherglyceriden eine vergleichbare Lipaseaffinität gegenüber der Lipase aus Schweinepankreas aufweist (Berger M. 1994).

Die carba-analogen Triglyceride entsprechen somit nicht nur strukturell den natürlichen Glyceriden, sondern sie weisen auch vergleichbare physikalische Wechselwirkungen mit diesen Enzymen auf. Die Analyse der enzymkatalysierten Hydrolysate sollte beim Einsatz carba-analoger Glyceride gegenüber den natürlichen Glyceriden prinzipiell Vorteile aufweisen, denn:

- a) die Zahl der Hydrolyseprodukte ist limitiert und
- b) die Hydrolyseprodukte racemisieren nicht.

Demzufolge sollten carba-analoge Triglyceride ideale Modellverbindungen zum Studium von Lipaseeigenschaften darstellen und zwar:

- als isostere Triglyceride
- als „in situ-Sonden“ für das aktive Zentrum von Lipasen
- als Substrate für die Bestimmung der Regio- und Enantioselektivität dieser Enzyme.

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war somit die Synthese strukturanaloger Triglyceride, in denen die sp^3 -hybridisierten Sauerstoffatome des Glyceringrundgerüsts systematisch durch Methylengruppen ersetzt sind. Aus einem natürlichen, symmetrischen Triglycerid lassen sich demzufolge vier Klassen von carba-analogen Derivaten herleiten (Abb. 9), deren Synthese im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

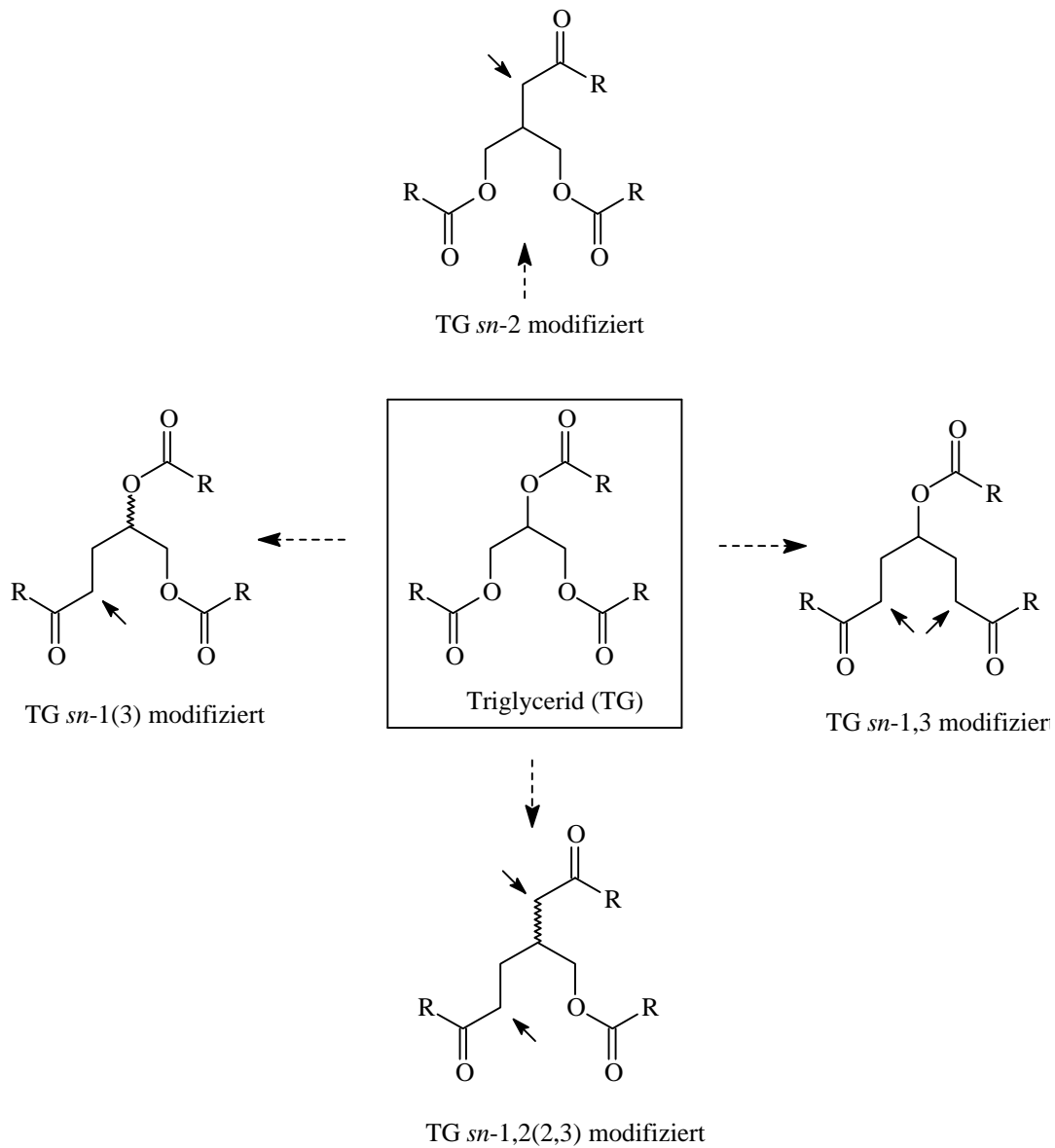


Abb. 9: Carba-analoge Triglyceride

3 Phospholipide - Eigenschaften

Zellen müssen sich von ihrer Umgebung abgrenzen und besitzen hierzu eine aus Phospholipiden bestehende Membran. Die Phospholipide sorgen als deren Hauptbestandteil für Stabilität und Flexibilität. Die Funktion der Phospholipide liegt in ihrer amphiphilen Doppelnatur begründet. Da sie sowohl hydrophob - aufgrund der langkettigen Fettsäureester - als auch hydrophil - aufgrund der polaren Kopfgruppe (z.B. Phosphocholin) - sind, bilden sie in

wässrigen Systemen durch Selbstorganisation spontan Lipid-Doppelschichten aus (Ringsdorf H. 1988; Abb. 10).

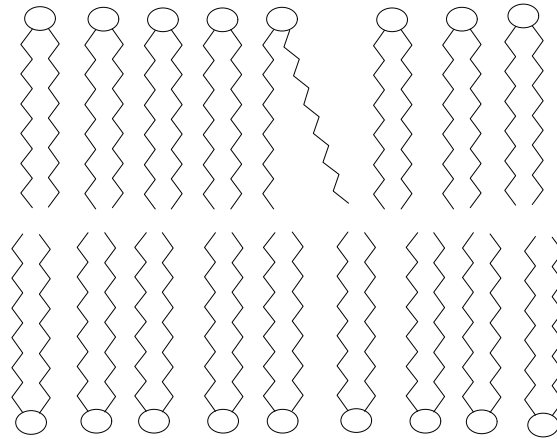


Abb. 10: Bildung einer Lipid-Doppelschicht (Membran)

Die Zellmembran besteht ebenfalls aus dieser Lipid-Doppelschicht. In die Zellmembran sind zudem speziellen Proteine integriert, die folgende biologische Funktionen haben (Ringsdorf H. 1988):

- Kompartimentierung
- Energieumwandlung
- Signalvermittlung
- Informationsspeicherung
- Transportprozesse

Die Lipid-Doppelschicht selbst fungiert als hochselektive Permeabilitätsschranke, die leicht von Wasser und kleinen unpolaren Molekülen, jedoch kaum von polaren Ionen passiert wird (Stryer L. 1991 a). Einen großen Einfluß auf die physikalischen Eigenschaften der Lipid-Doppelschicht haben die in den Lipiden gebundenen Fettsäuren hinsichtlich Kettenlänge und Sättigungsgrad (Stryer L. 1991 b). Die Lipide sind darüberhinaus auch Energiespeicher und in bestimmten Fällen, wie z.B. beim Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PIP₂) und beim 1-Hexadecyl-2-acetyl-phosphatidyl-cholin (platelet aggregation factor PAF) bei der Signalübertragung von Bedeutung (Billington D.C. 1993, Chao W. 1993).

Die Phospholipide unterteilen sich in a) Phosphoglyceride (GlycerinGrundgerüst) und b) Sphingomyelin (SphingosinGrundgerüst). In den Phosphoglyceriden sind zwei Fettsäuren durch Esterbindungen in den *sn*-1,2 Positionen mit dem Glycerin verbunden. In der *sn*-3 Position befindet sich die Phosphatestergruppe, die mit einem weiteren, polaren Alkohol, wie z.B. Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol verknüpft ist (Abb. 11).

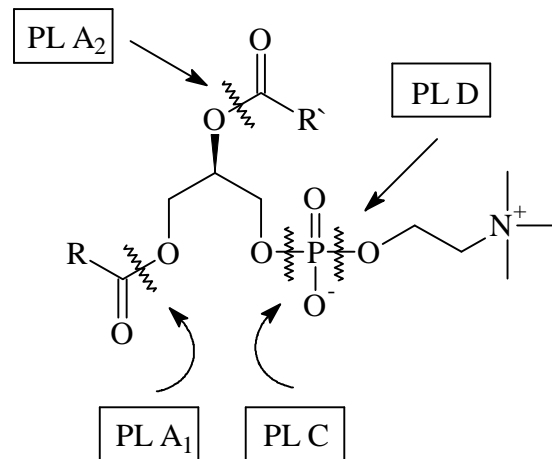


Abb. 11: Hydrolyse eines Phospholipids durch Phospholipase A₁, A₂, C und D

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren befinden sich in der *sn*-2 Position und werden durch Hydrolyse mittels Phospholipase A₂ freigesetzt. Eine besondere Rolle nimmt hier die Arachidonsäure, eine vierfach ungesättigte C₂₀-Carbonsäure ein. Sie ist eine Vorstufe der Eicosanoidhormone (Leukotriene, Thromboxane und Prostaglandine). Die Wirkungen dieser Hormone ist vielfältig. Sie reichen von der Auslösung von Entzündungen, der Regulation der Blutzirkulation in bestimmten Organen, der Kontrolle des Ionentransportes durch die Membran, der Thrombozytenaggregation bis hin zur Modulation der synaptischen Übertragung (Smith W.L. 1985). Phospholipasen A₂ sind Bestandteil einiger Gifte - z.B. Schlangen- oder Bienengift - und können Auslöser von Entzündungsreaktionen nach Biß- oder Stechverletzungen sein. Inhibitoren der Phospholipase A₂ könnten bei der Behandlung somit eine wirkungsvolle Gegenmaßnahme darstellen, indem sie die Freisetzung der Arachidonsäure unterdrücken.

Die Phospholipase C ist in der Regel ein hochspezifisches, membrangebundenes Enzym und hydrolysiert von den Phospholipiden nur das Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PIP₂). Das Enzym wird durch externe Signale (Hormone, Mediatoren) aktiviert und löst eine interne Signalkaskade aus (Stryer L. 1991 c). Hierbei wird zunächst ein G-Protein aktiviert und

Phosphatidylinositol (IP) daraufhin in das Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PIP₂) überführt. Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat wird von der Phospholipase C in zwei „second messenger“ Moleküle gespalten (Berridge M.J. 1987). Es entsteht Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,3,5-trisphosphat (IP₃). Das Diacylglycerin aktiviert die Proteinkinase C, die durch Proteinphosphorylierung zum Abbruch der Glykogensynthese in Leberzellen führt. Eine permanente Stimulierung der Proteinkinase C (z.B. durch Phorbol ester) unterstützt jedoch nachweislich die Tumorbildung (Tumorpromotoren, Stryer L. 1991 c).

Das Inositol-1,3,5-trisphosphat fungiert als zweites Spaltmolekül der Hydrolyse ebenfalls als „second messenger“. Es setzt intrazellulär Ca²⁺-Ionen frei und führt so unter anderem zur Kontraktion der glatten Muskulatur (Stryer L. 1991 c).

Die Phospholipase D spaltet die „endständige“ Phosphoresterbindung und liefert somit Diacylglycerophosphat und einen Alkohol (Cholin, Ethanolamin, Inositol, Serin). Die Phospholipase D ist zur Modifikation von Phospholipiden auch von präparativen Interesse. Wird der Phospholipase neben dem Lipid (vorzugsweise Cholinderivate) und Wasser ein anderer Alkohol - z.B. arsenanalogenes Cholin angeboten - so tritt die Alkoholyse in Konkurrenzreaktion zur Hydrolyse (Ulbrich-Hofmann R. 1998). Der Alkohol Cholin wird somit durch einen anderen Alkohol substituiert (z.B. arsenanalogenes Cholin, Glycol, Polyethylenglycole, Inositol, etc.). Auf diese Weise können Phospholipide relativ leicht in ihren physikalischen und biologischen Eigenschaften modifiziert werden.

Aufgrund der vielseitigen biologischen Eigenschaften wurden zahlreiche natürliche und nichtnatürliche Phospholipide sowie Phospholipidanaloga synthetisiert und untersucht.

Einige Phospholipidanaloga zeigen nur bei Tumorzellen eine toxische Wirkung (Berdel W.E. 1994), wie z.B. Hexadecylphosphocholin (HePC; Berkovic D. 1995) und das 1-*O*-Octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycerophosphocholin (ET-18-OCH₃; Berggren M.I. 1993).

Die blutdrucksenkenden Eigenschaften zahlreicher 1-*O*-Octadecyl-etherphospholipidanaloga wurden ebenfalls untersucht (Ohno M. 1986).

Anti-HIV Aktivität zeigte das 1,2-Dilauroyl-*rac*-diamidanalogenes Phosphatidylcholin gegenüber HIV-1 infizierten C8166 T Lymphoblasten (Jia C. 1993).

G. Ostermann (1991) untersuchte 30 Phospholipidanaloga auf ihre Wirkung zur Inhibierung der Blutplättchenaggregation (Wirkung als PAF-Antagonist).

Ferner wurden Phospholipidanaloga - und hierzu zählen auch racemische in der *sn*-2 Position modifizierte carba-analoga Diacylphospholipidanaloga (Gelb M.H. 1986, Yuan W. 1987) und 1-*O*-Alkyl-2-acylphospholipidanaloga (Golec J.M.C. 1992) als Phospholipase A₂-Inhibitoren entwickelt.

Es bot sich daher an, nicht nur carba-analoga Triglyceride sondern auch die entsprechenden Phospholipidanaloga herzustellen. Derartige Verbindungen könnten sich generell als Phospholipaseinhibitoren (insbesondere als Inhibitor der Phospholipase A₂) eignen. Die entsprechenden Phospholipidanaloga könnten auch antivirale Eigenschaften aufweisen, wie z.B. anti HIV Aktivität.

4 Carba-analoga Triglyceride - Synthesestrategien

4.1 Einleitung

Der formale Ersatz der Sauerstoffatome im Triglyceridgrundgerüst durch maximal zwei Methylengruppen führt zu vier möglichen carba-analogen Derivaten (Abb. 12).

Carba-analoga Triglyceride

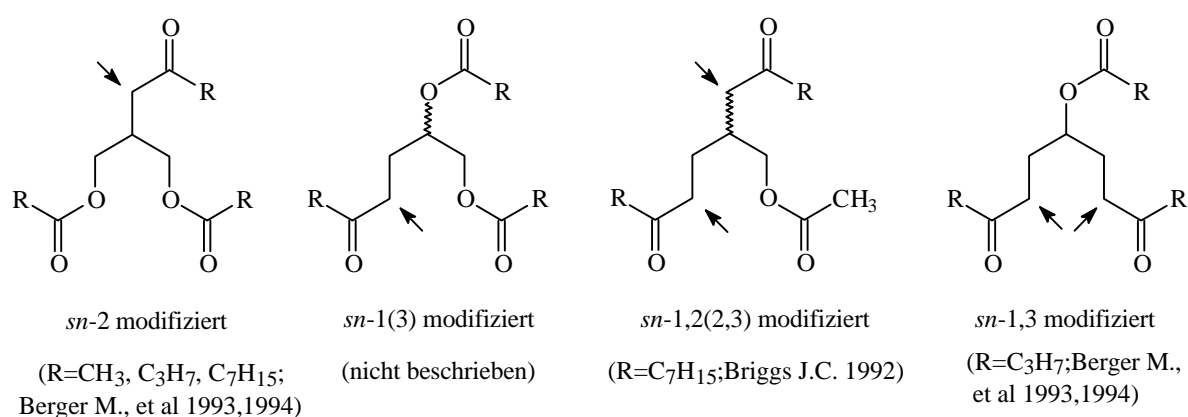


Abb. 12: Carba-analoga Triglyceride - Überblick

Die Synthese derartiger, in den *sn*-2 und *sn*-1,3-Positionen modifizierter, Triglyceride wurde erstmalig in unserem Arbeitskreis durch Berger beschrieben (Berger M. et al. 1993, 1994). Ein

entsprechend in den *sn*-1,2(2,3) Positionen modifiziertes Derivat wurde von Briggs synthetisiert (Briggs J. C. 1992).

Wir waren an der Herstellung solcher carba-analoger Triglyceride sehr interessiert, denn es sind wichtige Vergleichssubstanzen zur Untersuchung der Lipaseeigenschaften (Regio- bzw. Enantioselektivität) und zudem eine Ausgangsbasis für die Synthese entsprechender Phospholipidanaloga.

Vor diesem Hintergrund haben wir uns entschlossen, geeignete Syntheseverfahren zur Darstellung dieser in Abb. 12 aufgeführten Verbindungsklassen zu entwickeln.

4.2 Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der *sn*-2 Position

4.2.1 Via Mannich-Reaktion

Berger et. al. entwickelte eine Methode zur Herstellung von carba-analogen Triglyceriden, die in der *sn*-2 Position modifiziert sind (Berger M., et. al. 1993, 1994; Abb. 13).

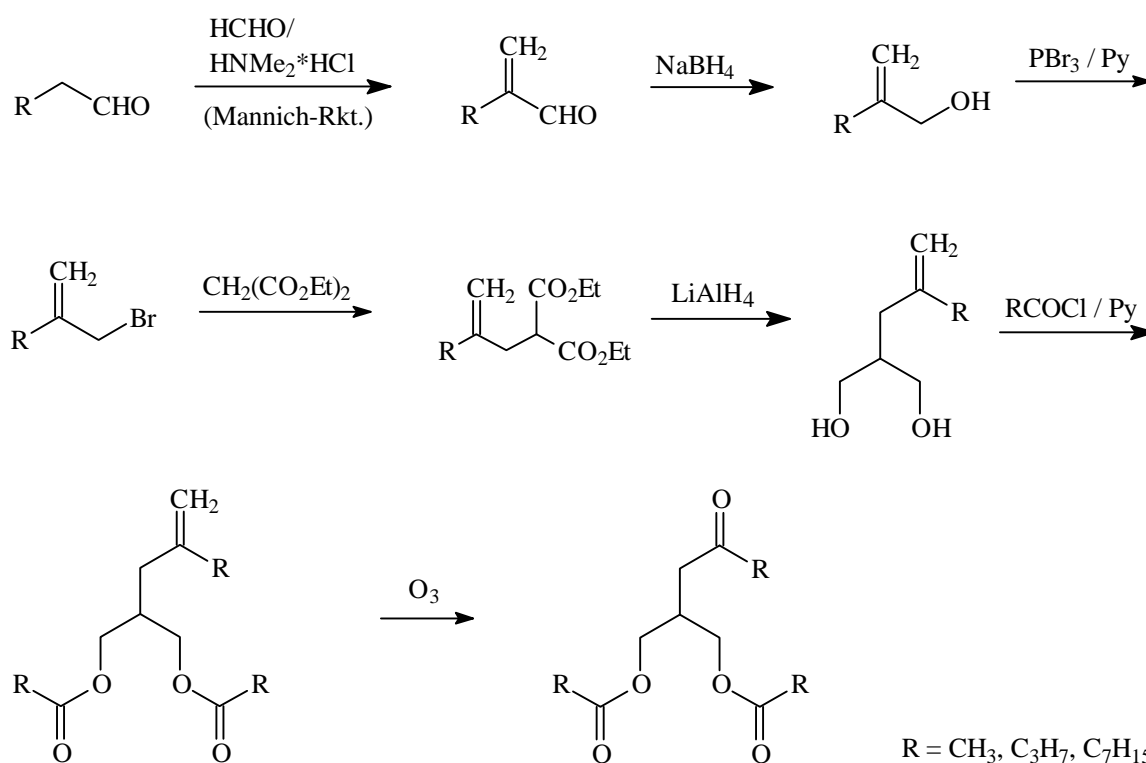


Abb. 13: Synthese carba-analoger Triglyceride - Mannich Route nach M. Berger et. al. (1993, 1994)

Dabei wird ein aliphatischer Aldehyd mit α -ständiger CH_2 - Gruppe im Sinne einer Mannich Reaktion durch Umsetzung mit Dimethylaminhydrochlorid und Formaldehydlösung in die entsprechende α,β - ungesättigte Carbonylverbindung überführt. Diese wird mittels Natriumborhydrid zum Alkohol reduziert und durch Bromierung mit Phosphortribromid / Pyridin in ein 2- alkylsubstituiertes Allylbromid überführt. Malonestersynthese und anschließende Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid liefert das entsprechende 2- alkenylsubstituierte Propan-1,3-diol. Durch Acylierung der Hydroxygruppen und oxidativer Spaltung der olefinischen Doppelbindung wird das entsprechende carba-analoge Triglycerid erhalten.

Nach diesem Verfahren wurde als Standardmaterial für die späteren Untersuchungen das carba-analoge Tricaprylin (**11**) hergestellt (Abb. 14).

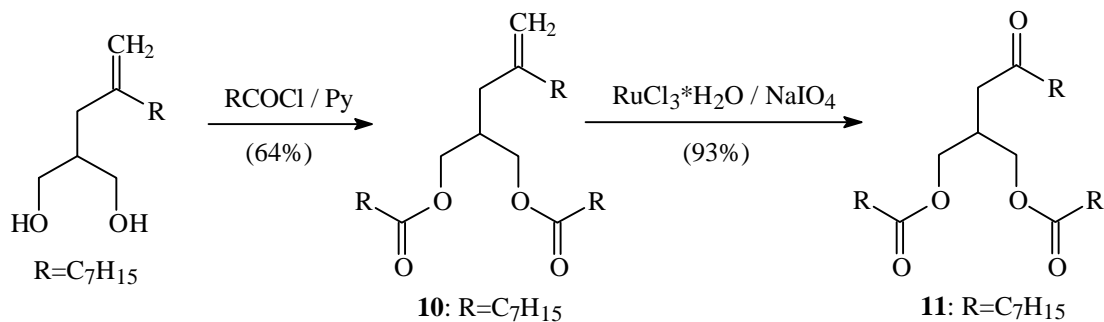


Abb. 14: Carba-analoges Tricaprylin nach der Route von M. Berger (1993)

Als einfache Alternative zur Ozonolyse wurde ein Verfahren mit Rutheniumtrichlorid / Natriumperiodat entwickelt. Dabei erfolgt zunächst die Dihydroxylierung der $\text{C}=\text{C}$ -Doppelbindung (Shing T. K. M. 1994) zu dem *vic* Diol, welches danach oxidativ gespalten wird (Carlsen P. H. J. 1981). Bei der Ozonolyse treten leicht Nebenreaktionen auf, die bei dem Verfahren mit $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$ nicht beobachtet wurden.

Die Methode nach M. Berger (Abb. 13) eignet sich nur zur Darstellung der Triglyceridanaloga mit kurzer bis mittlerer Alkylkettenlänge ($\text{R} = \text{C}_1\text{-C}_7$), da nur hier die entsprechenden Aldehyde als Ausgangsverbindung zur Verfügung stehen.

Daher wurde nach alternativen Methoden zur Synthese carba-analoger Triglyceride mit längeren Alkylkettenlängen $\text{R} > \text{C}_7$ gesucht.

4.2.2 Via Diazoketon- und Wittig Reaktion

Der zentrale Schlüsselschritt beim Aufbau carba-analoger Grundgerüste über die Mannich-Route ist die Malonestersynthese mit 2-alkylsubstituierten Allylbromiden. Als Ausgangsmaterial werden dabei *n*-Alkylaldehyde ungerader Kettenlänge verwendet (Abb. 13, Abb. 15).

Es war nun ein wesentliches Ziel dieser Arbeit die zentralen Bausteine aus einfachen, preiswert erhältlichen Ausgangsverbindungen - wie z.B. Fettsäurechloriden mit gerader Kettenlänge - aufzubauen. Eine entsprechende Retrosynthese ist in Abb. 15 dargestellt.

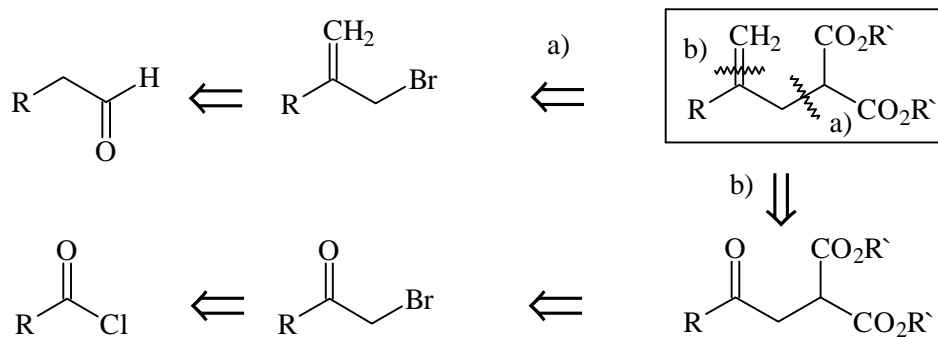


Abb. 15: α -Brommethylketone - Syntheseequivalente für 2-Alkyl-allylbromide

Entsprechend der Retrosynthese (Abb. 15) wurden α -Brommethylketone unterschiedlicher Alkylkettenlänge aus Säurechloriden und Diazomethan gewonnen (Organikum 1986; Abb. 16).

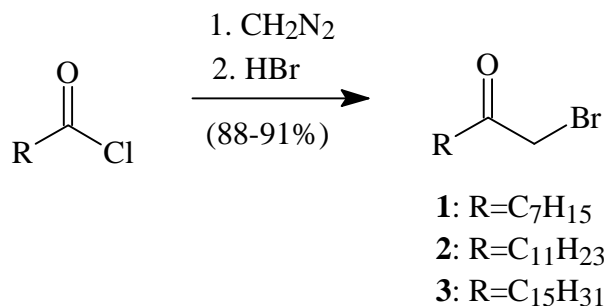
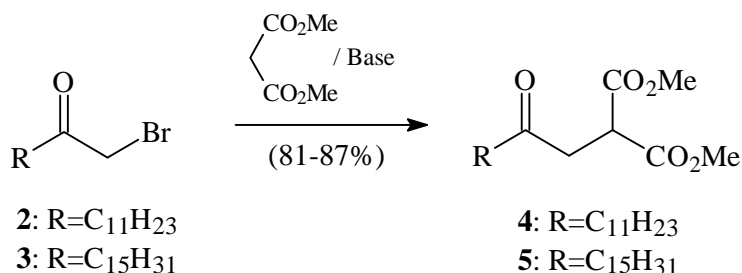
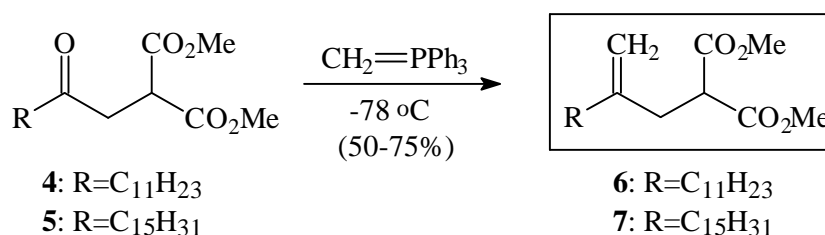


Abb. 16: Synthese von α -Brommethylketonen aus Fettsäurechloriden

Die Reaktion der Säurechloride mit Diazomethan lieferte zunächst die entsprechenden Diazoketone, die jedoch nicht isoliert, sondern direkt durch Zugabe von wässriger Bromwasserstoffsäure in die α -Brommethylketone **1-3** überführt wurden. Hiermit erfolgten Malonestersynthesen (Abb. 17).

Abb. 17: Malonestersynthesen mit α -Brommethylketonen

Dabei wurde Malonsäuredimethylester mit den α -Brommethylketonen **2-3** zu den Malonesterderivaten **4-5** alkyliert. Die anfänglich niedrigen Ausbeuten von 20 bis 40% konnten durch Optimierung auf 81-87% gesteigert werden. Durch Wittig Olefinierung von **4** u. **5** konnten die Zielverbindungen **6-7** entsprechend der zuvor beschriebenen Retrosynthese (Abb. 15) hergestellt werden (Abb. 18).

Abb. 18: Wittig-Reaktion mit den γ -Ketomalonestern **4-5**

Hierbei wurden unter den üblichen Reaktionsbedingungen (THF / -78°C) nur unvollständige Umsätze und dadurch niedrige Ausbeuten von 15-20% erzielt.

Störend bei dieser Reaktion sind vermutlich a) die CH-Acidität der Malonestergruppe, da das Olefinierungsreagenz auch als Base fungiert, sowie b) eine sterische Hinderung bei der Bildung des Übergangszustandes (Abb. 19).

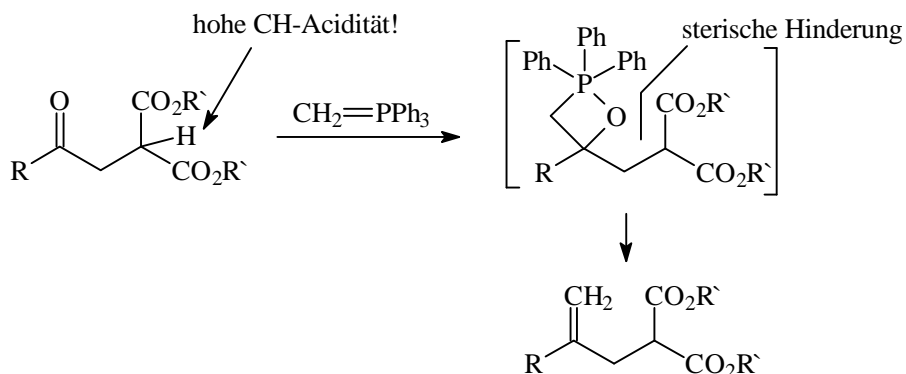


Abb. 19: Wittig-Reaktion - sterische Hinderung

Die Reaktionen zeigen eine starke Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels im Sinne von DME > THF > Et₂O. Die Produkte **6-7** konnten unter optimierten Bedingungen mit durchaus akzeptablen Ausbeuten von 50-75% erhalten werden. Dies gelang mit DME als Lösungsmittel und einem vierfachen Überschuß an Wittig-Reagenz.

Die Malonesterderivate **6** und **7** wurden wie bereits früher beschrieben mit Lithiumaluminiumhydrid zu den entsprechenden Diolen reduziert (Abb. 20).

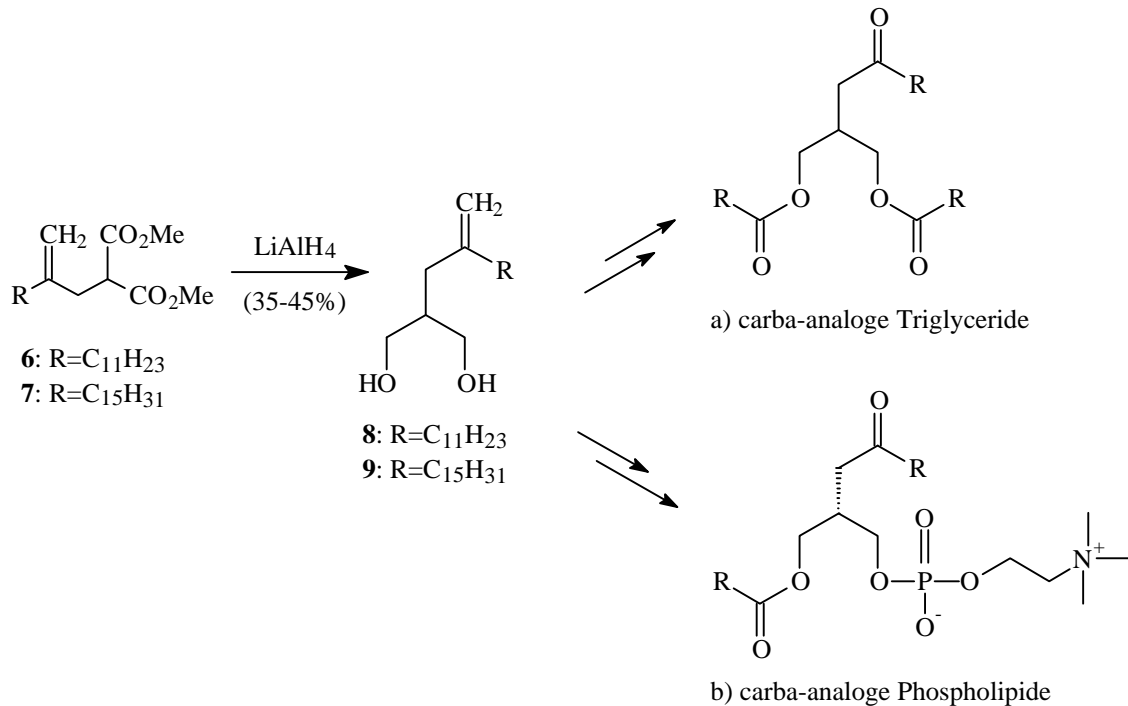


Abb. 20: Diolderivate: Darstellung carba-analoger Triglyceride/Phospholipide

Die so erhaltenen Diole **8** und **9** sind Zwischenstufen zur Darstellung von:

- carba-analogen Triglyceriden und
- carba-analogen Phospholipiden.

Carba-analoge Triglyceride können hieraus wie oben beschrieben (Abb. 13, Abb. 14) durch Acylierung der Diole und oxidativer Spaltung der *exo*-Methylengruppe in nur zwei Reaktionsschritten gewonnen werden. Zudem eignen sich die Diole auch zur Synthese entsprechender carba-analoger Phospholipide (s. Kap. 6.2.2).

4.2.3 Via Diazoketone - Ketale

Das zuvor beschriebene Verfahren zur Darstellung carba-analoger Triglyceride wurde in Bezug auf die Wittig-Reaktion modifiziert. Unabhängig vom Herstellungsweg ist klar, daß die über Wittig eingeführte *exo*-Methylengruppe nur als maskierte Carbonylfunktion dient (Abb. 21).

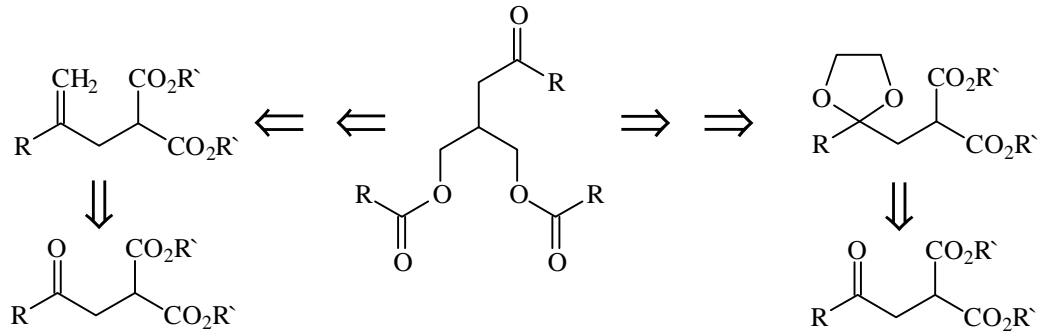
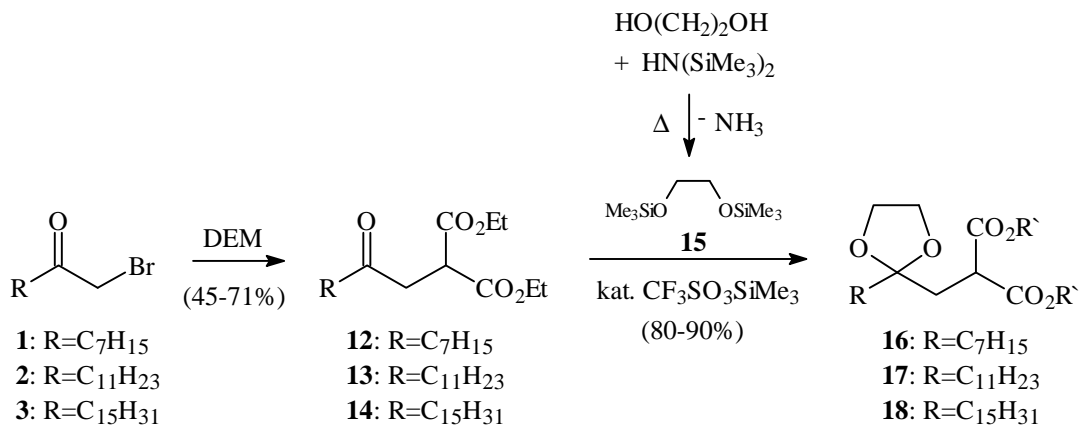


Abb. 21: Retrosynthese carba-analoger Triglyceride

Es war daher naheliegend, die Ketogruppe durch eine „klassische Schutzgruppe“ zu maskieren und dadurch die Wittig-Reaktion zu umgehen. Diese Schutzgruppe mußte jedoch eine Reihe von Anforderungen erfüllen:

- Einführung mit guten Ausbeuten (sterische Hinderung durch die Malonesterfunktion)
- basenstabil, z.B. gegenüber Lithiumaluminiumhydrid
- einfaches Abspalten
- einfache Reinigung der Reaktionsprodukte.

Diese Bedingungen werden natürlich von Ketalen erfüllt. Wird also die Ketogruppe in das entsprechende 1,3-Dioxolan überführt, so ergibt sich folgender Syntheseweg.

Abb. 22: Synthese ketalgeschützter γ -Ketomalonate

Hierzu wurden die entsprechenden γ -Ketomalonester **12-14** auf die zuvor beschriebene Weise durch Malonestersynthese der α -Brommethylketone mit Malonsäurediethylester gewonnen. Die Überführung dieser γ -Ketomalonester in die 1,3-Dioxolane gelang entsprechend dem von T. Tsunoda beschriebenen Verfahren durch leichtes Erwärmen mit Ethylenglykolbis-(trimethylsilylether) **15** (gewonnen durch Erhitzen von Ethylenglykol mit Hexamethyldisilazan) in Gegenwart katalytischer Mengen Trifluormethansulfonsäuretri-methylsilylester (Tsunoda T. 1980). Dabei ist zu berücksichtigen, daß laut Originalliteratur entsprechende Reaktionen bei -78°C erfolgen. Unter diesen Bedingungen werden die γ -Ketomalonester nicht umgesetzt. Vermutlich wird auch hier die Umsetzung durch sterische Hinderung erschwert (zwischen dem Dioxolanring und den Estergruppen; vgl. Abb. 19). Unter optimierten Bedingungen ($+80^{\circ}\text{C}$) werden nach diesem Verfahren hervorragende Ausbeuten von 80-90% erzielt. Nebenreaktionen wurden nicht beobachtet. Auch die Reinigung der Reaktionsprodukte gestaltet sich einfach, denn alle sonstigen Komponenten (Katalysator, $\text{Me}_6\text{Si}_2\text{O}$) sind leicht flüchtig und können im Vakuum entfernt werden.

Die so erhaltenen Malonesterderivate **16-18** wurden ebenfalls mit Lithiumaluminiumhydrid reduziert (Abb. 23).

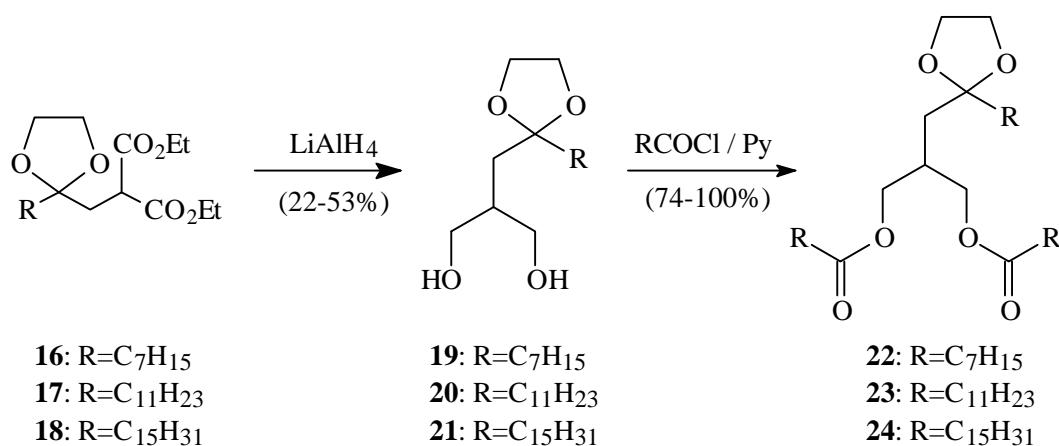


Abb. 23: Reduktion der ketalgeschützten Malonesterderivate **16-18**

Dabei wurden die gewünschten Diolderivate **19-21** erhalten, die mit den entsprechenden Säurechloriden umgesetzt die Diacylverbindungen **22-24** lieferten.

Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte unter aciden Bedingungen (Abb. 24).

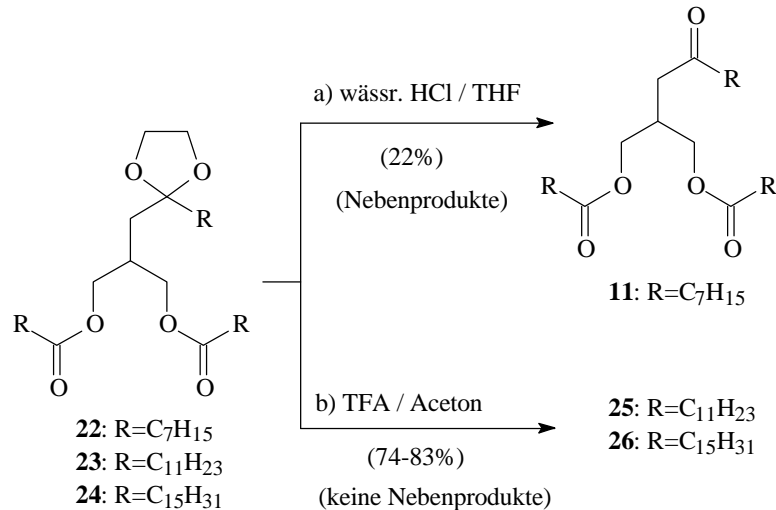
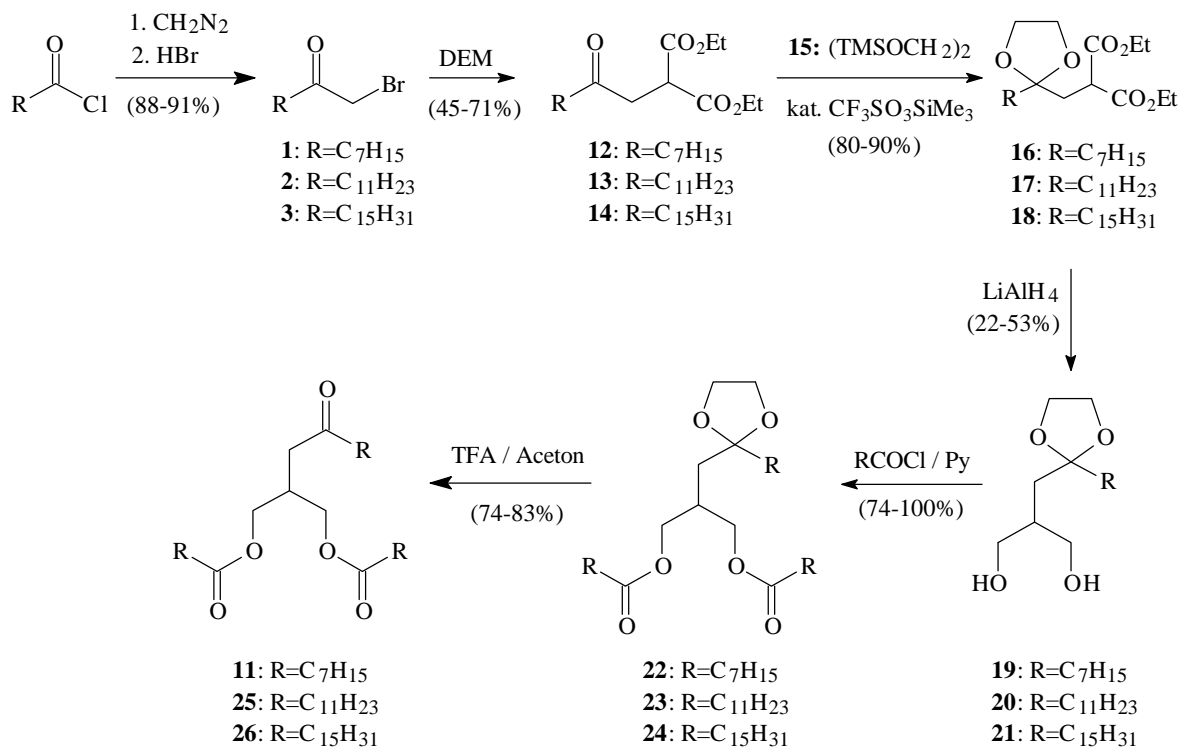


Abb. 24: Abspaltung der Schutzgruppe

Die Abspaltung auf klassische Weise mit wässriger Salzsäure in Tetrahydrofuran (Grieco P.A. 1977) ergab für R=C₇H₁₅ ein stark verunreinigtes Rohprodukt. Erst durch sorgfältige chromatographische Reinigung und mehrfacher Umkristallisation konnte das carba-analoge Tricaprylin **11** rein in Form farbloser Kristalle gewonnen werden. Deutlich bessere Resultate wurden durch kurzes Erwärmen mit Trifluoressigsäure in Aceton erzielt.

Die Synthese der carba-analogen Triglyceride mit den Alkylkettenlängen R≥C₇H₁₅, wie **11**, **25** und **26** erfolgte also nach dem verbessertem Verfahren, wie in Abb. 25 dargestellt.

Abb. 25: Synthese carba-analoger Triglyceride über ketalgeschützte γ -Ketomalonester

Die Verbindungen **11**, **25-26** wurden mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und IR eindeutig charakterisiert. Stellvertretend für diese Verbindungsgruppe ist in Abb. 26 das $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von **25** gezeigt.

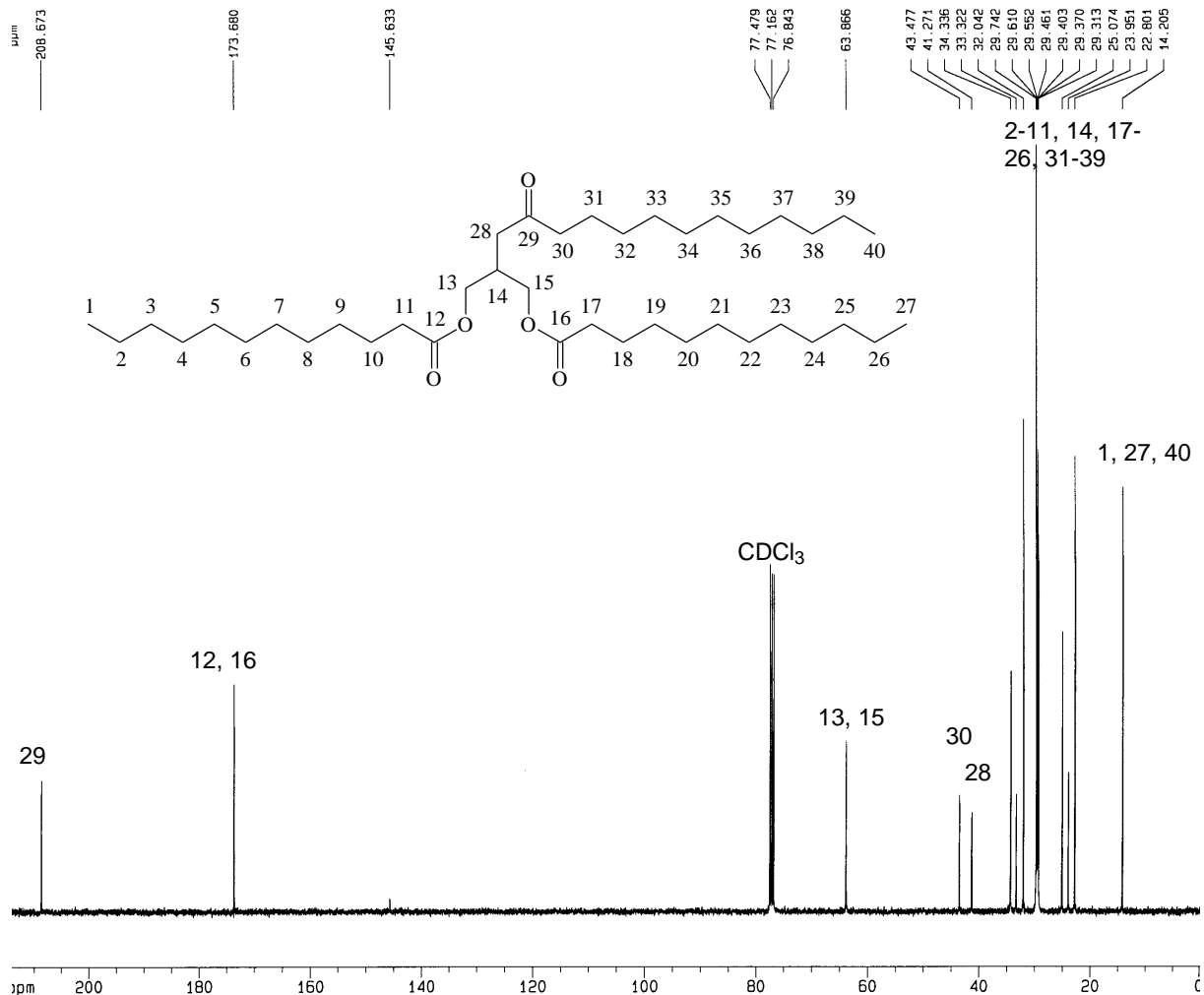
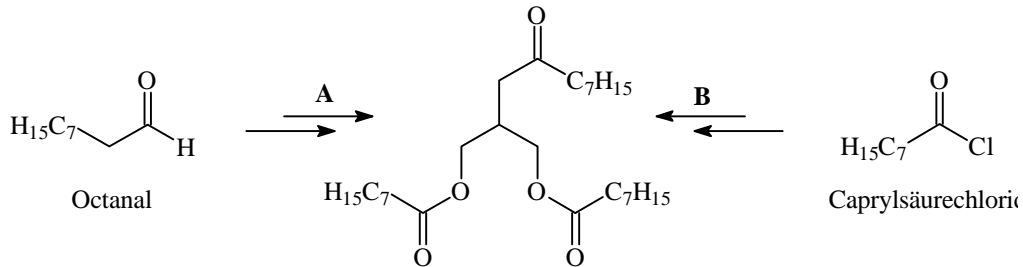


Abb. 26: $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von **25**

Neben den Signalen für die Alkylketten im Bereich von 14.2 bis 34.3 ppm erkennt man klar die Signale für die Methylengruppen (28, 30) bei 41.3 und 43.5 ppm. Bei 63.9 ppm findet man die Signale der acylierten Hydroxymethylgruppen (13, 15) gefolgt von den Signalen für die Carboxylgruppen (12, 16) bei 173.7 ppm und der Carbonylgruppe (29) bei 208.7 ppm.

4.2.4 *Via* Allylmalonester

Für die Synthese von carba-analogem Tricaprylin **11** wurde eine alternative Methode entwickelt, bei der die Zahl der notwendigen Reaktionsschritte reduziert werden konnte.



A: Berger Route; benötigt 7 Reaktionsschritte
B: Diazoketon Methode; benötigt 6 Reaktionsschritte

Abb. 27: Carba-analoges Tricaprylin - Ausgangsverbindungen

Über die Route **A** (Berger) werden sieben Reaktionsschritte benötigt (Abb. 27). Unangenehm ist das für die Malonestersynthese erforderliche 2-alkylsubstituierte Allylbromid, da diese Verbindung stark tränenreizend ist. Nach der Diazoketon-Methode **B** läßt sich das carba-analoge Triglycerid in sechs Reaktionsschritten herstellen. Allerdings erfordert die Herstellung von Diazomethan ebenfalls zwei zusätzliche Reaktionsschritte und ist zudem nicht unproblematisch. Der Zeit- und Arbeitsaufwand ist für beide Verfahren in etwa gleich groß. Daher bot es sich an, ein alternatives Verfahren ausgehend von 2-Allyl-propan-1,3-diol, zu erproben (Abb. 28).

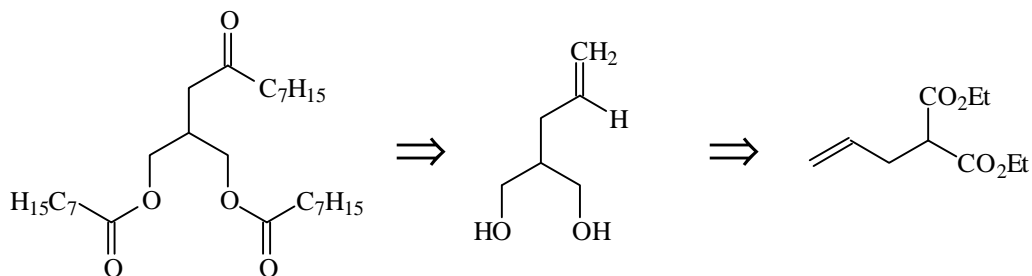


Abb. 28: Carba-analoge Triglyceride - alternative Syntheseroute

2-Allyl-propan-1,3-diol kann auf einfache Weise durch Reduktion des kommerziell erhältlichen Allylmalonsäure-diethylesters mit Lithiumaluminiumhydrid gewonnen werden (Breitgoff D.

1989). Damit gelang die Synthese der Zielverbindung tatsächlich in nur vier Reaktionsschritten (Abb. 29).

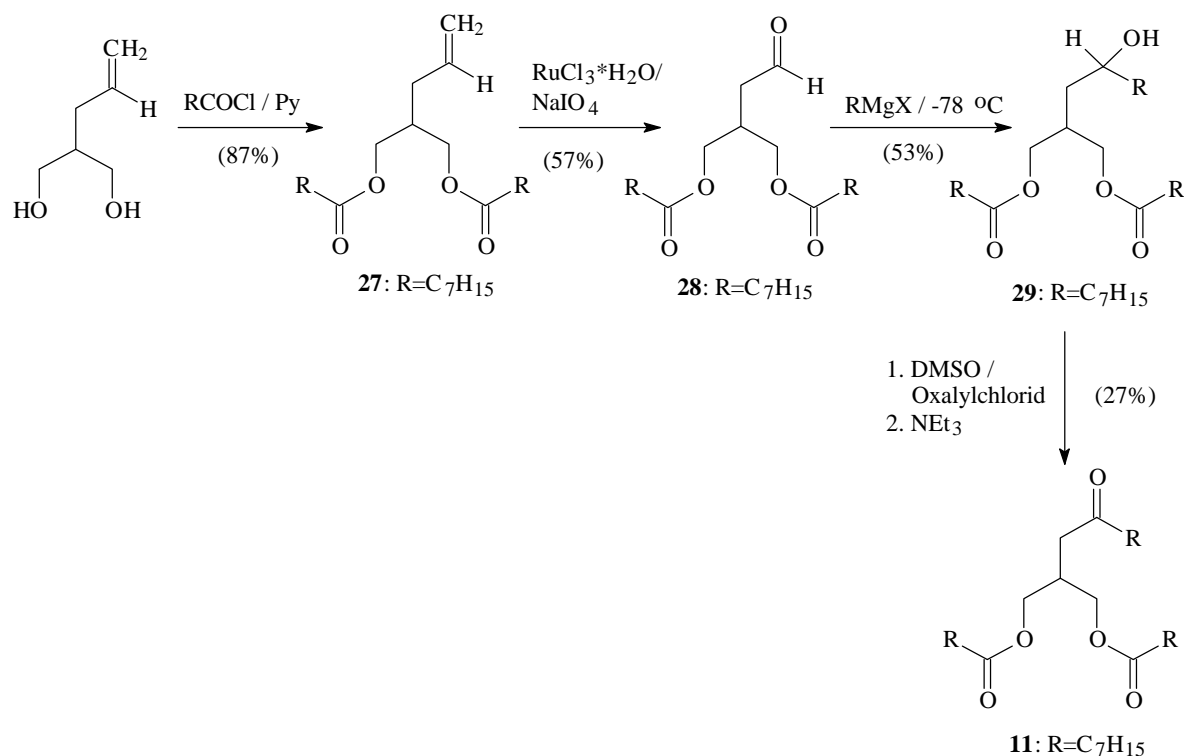


Abb. 29: Carba-analoges Tricaprylin - Allylpropandiol-Verfahren

Dazu wurde 2-Allyl-propan-1,3-diol mit Caprylsäurechlorid acyliert und der gebildete Diester **27** mittels Natriumperiodat / Rutheniumtrichloridhydrat in den Aldehyd **28** überführt. Bei der Reaktion von **28** mit *n*-Heptylgrignard bei -78°C wurde nur ein unvollständiger Reaktionsumsatz erzielt, so daß der Alkohol **29** noch zu ca. 45% mit dem Edukt **28** verunreinigt war (keine chromatographische Trennung möglich). Die Swern Oxidation von **29** lieferte das carba-analoge Tricaprylin **11**. Die Reinheit von **11** betrug nach mehrmaliger Umkristallisation $> 99\%$ (GC). Die jeweiligen Reaktionsschritte wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht optimiert.

Abgesehen von den noch teilweise niedrigen Ausbeuten einzelner Reaktionsschritte bietet diese Synthesevariante folgende Vorteile:

- Damit können *sn*-2 modifizierte carba-analoge Triglyceride mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen hergestellt werden.
- der Einsatz toxischer oder explosionsempfindlicher Reagentien (wie z.B. Diazomethan) entfällt
- es sind weniger Syntheseschritte notwendig.

4.3 Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der *sn*-1(3) Position

Diese Verbindungen wurden bislang nicht beschrieben. Diese Moleküle lassen sich retrosynthetisch mit den entsprechenden Säurechloriden korrelieren (Abb. 30).

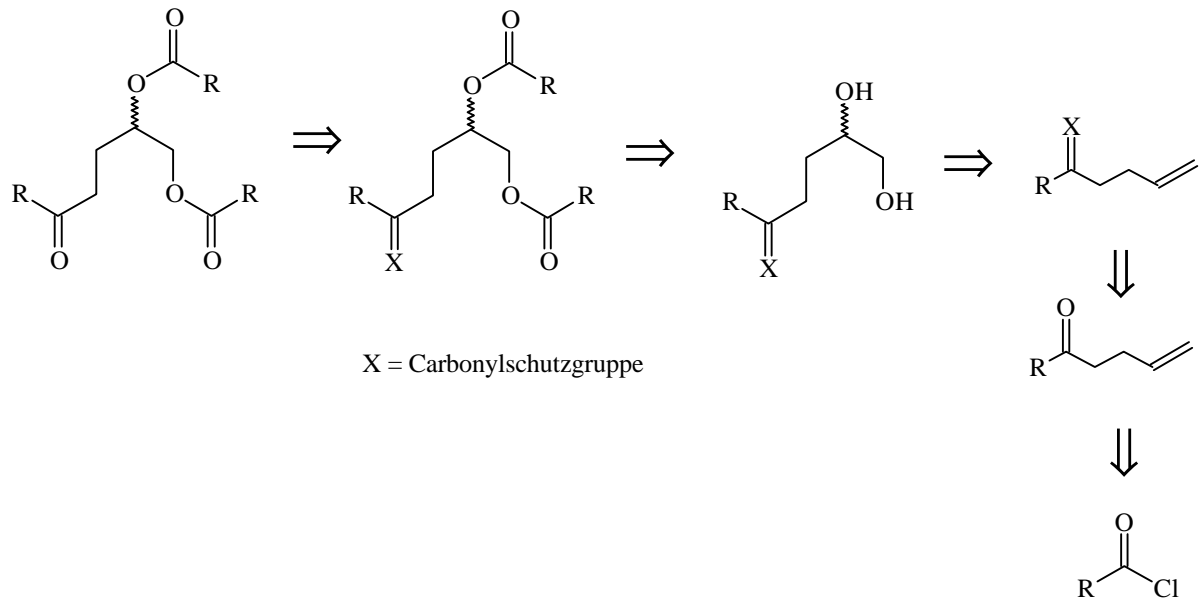


Abb. 30: *sn*-1(3) modifizierte carba-analoge Triglyceride - Retrosynthese

Zunächst wurde Allylmalonsäurediethylester in den entsprechenden Allylmalonsäuremonoethylester **30** überführt (Abb. 31).

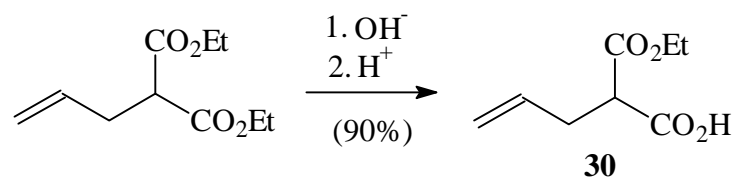


Abb. 31: Synthese von Allylmalonsäuremonoethylester **30**

Dies gelingt problemlos, denn das bei der Hydrolyse einer Estergruppe gebildete Anion verhindert einen weiteren nukleophilen Angriff aufgrund seiner negativen Ladung (Organikum 1986).

Mit **30** konnte die Synthese der Titelverbindungen entsprechend der Retrosynthese realisiert werden (Abb. 32).

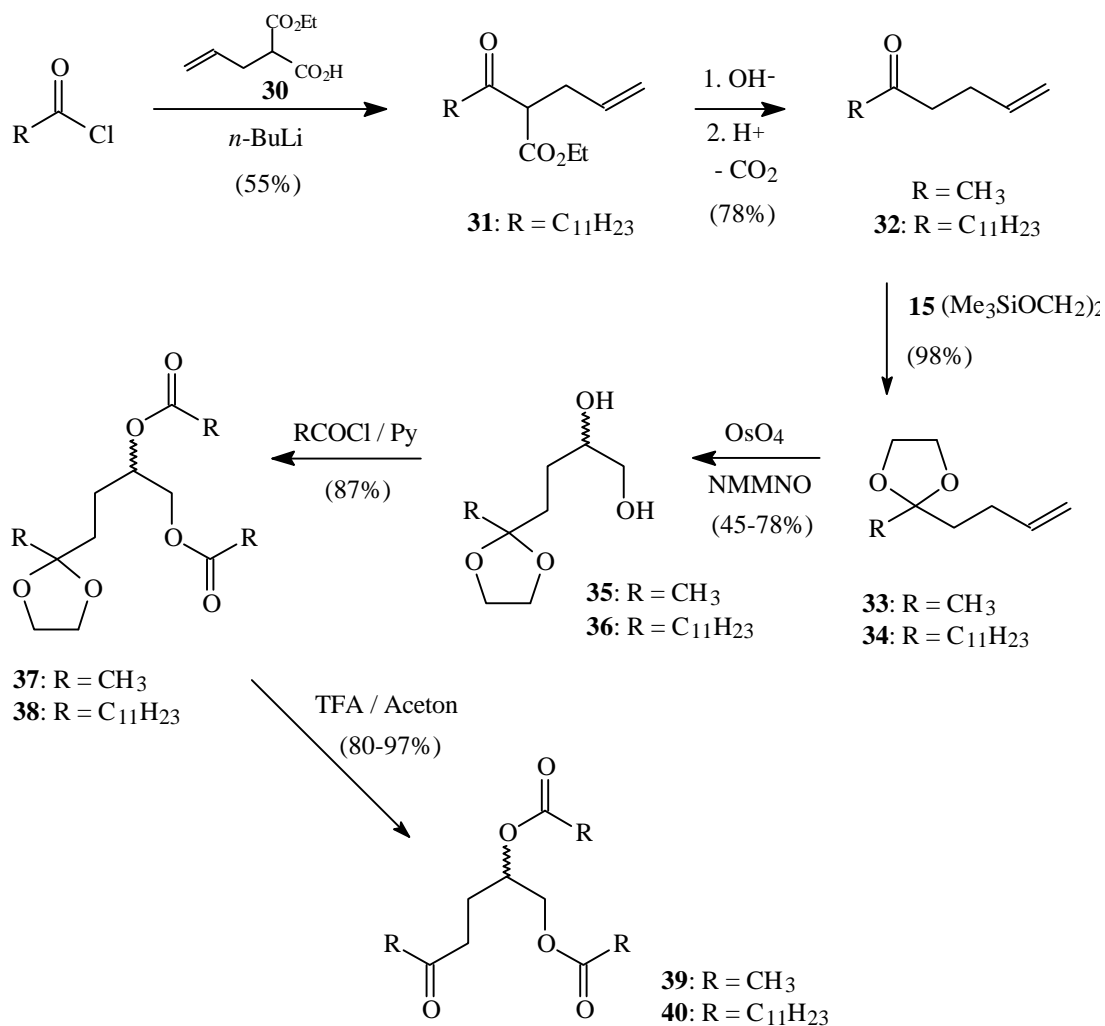


Abb. 32: Synthese carba-analoger Triglyceride modifiziert in der *sn*-1(3) Position

Dazu wurde **30** mit *n*-Butyllithium in das Dianion überführt und mit dem entsprechenden Carbonsäurechlorid acyliert. Die dabei primär gebildete β -Ketosäure ist nicht stabil und decarboxyliert spontan zum β -Ketoester **31**. Die verbleibende Esterfunktion wurde alkalisch hydrolysiert. Die nach dem Ansäuern gebildete β -Ketosäure decarboxylierte ebenfalls und lieferte das Alkylketon **32**. Umsetzung mit Ethylenglykol-bis-(trimethylsilylether) **15** führte in Gegenwart einiger Tropfen konzentrierter Schwefelsäure zu den entsprechenden 1,3-Dioxolanen **33** und **34**. Die olefinischen Doppelbindungen wurden mittels N-Methylmorpholin-N-oxid in Gegenwart katalytischer Mengen Osmiumtetroxid dihydroxyliert. Acylierung der Hydroxylgruppen und Entschützen der Carbonylgruppe lieferte das gewünschte carba-analoge Triacetin **39** bzw. Trilaurin **40**, welche mit den üblichen Analytikverfahren ¹H-NMR, ¹³C-NMR und IR eindeutig charakterisiert wurden. Stellvertretend für diese Substanzgruppe ist das ¹³C-NMR Spektrum von **40** in Abb. 33 abgebildet.

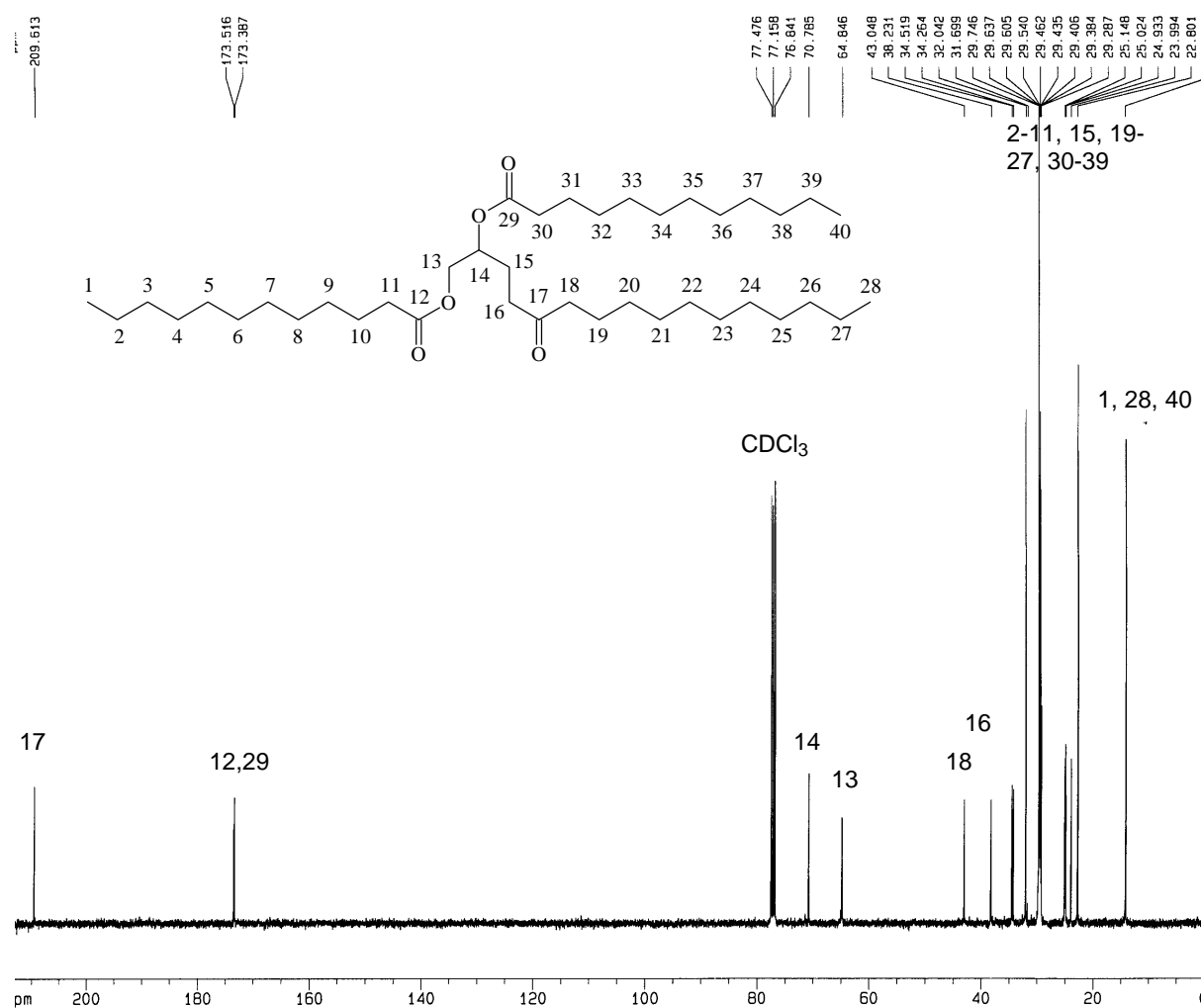
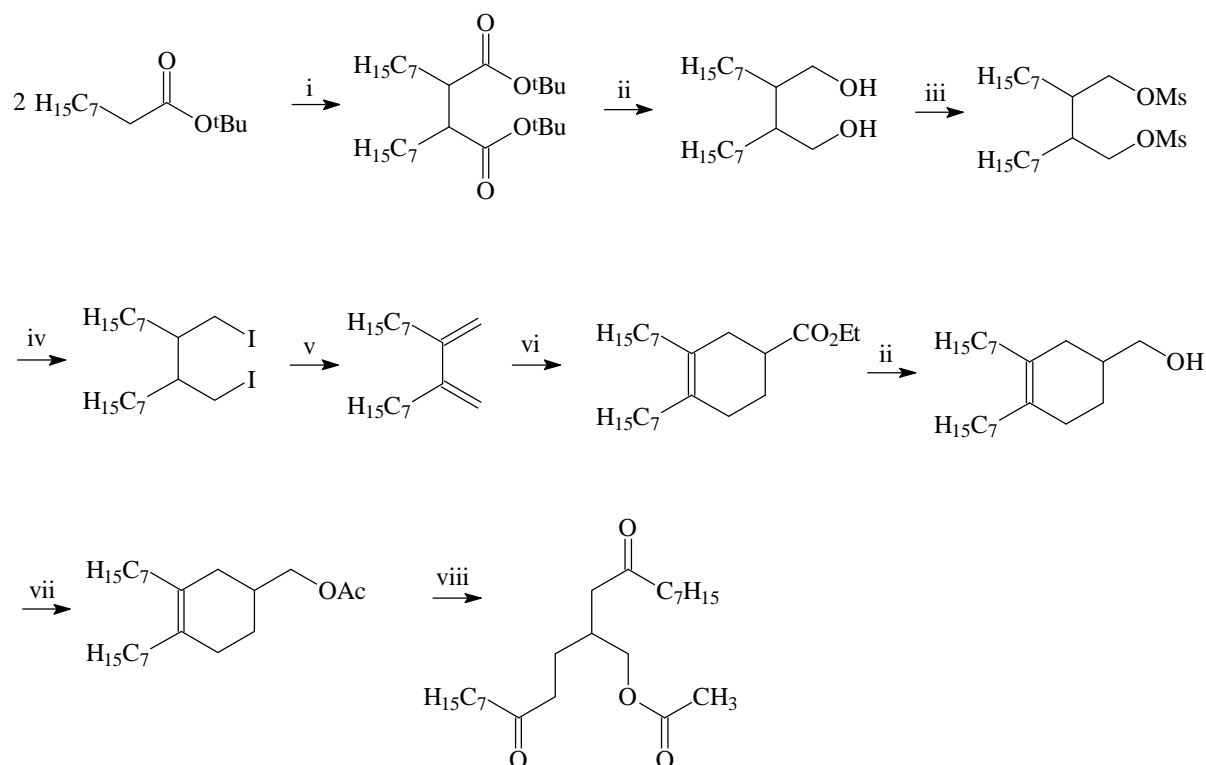


Abb. 33: ^{13}C -NMR Spektrum von **40**

Auch hier erkennt man neben den Signalen der Alkylketten bei 14.2-34.5 ppm die Signale der Methylengruppen 16 und 18 bei 38.2 und 43.0 ppm. Das Signal der acylierten Hydroxymethylgruppe 13 liegt bei 64.8 ppm und das der acylierten Hydroxymethylgruppe 14 bei 70.8 ppm. Bei 173.4 und 173.5 ppm findet man die Signale der Estergruppen (12, 29) und bei 209.6 ppm das Signal der Carbonylgruppe (17).

4.4 Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der *sn*-1,2(2,3) Positionen

Die Synthese eines derartigen, racemischen di-carba-analogen Glycerids wurde bislang nur von J. C. Briggs beschrieben (Briggs J. C. 1992, Abb. 34).



Reagentien: (i) $\text{LiN}(\text{iPr})_2 / \text{I}_2$; (ii) $\text{LiAlH}_4 / \text{Et}_2\text{O}$; (iii) $\text{MsCl} / \text{Et}_3\text{N} / \text{THF} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$, (iv) $\text{NaI} / \text{CH}_3\text{COCH}_2\text{CH}_3$; (v) ${}^t\text{BuOK} / \text{BuOH}$; (vi) $\text{CH}_2=\text{CHCO}_2\text{Et} / \text{PhMe}$; (vii) AcOAc / Py ; (viii) $\text{O}_3/\text{EtOAc}, \text{Me}_2\text{S}$

Abb. 34: Synthese eines di-carba-analogen Triglycerids nach J. C. Briggs

Dabei wurde Nonansäure-*tert.*-butylester mittels Iod / Lithumdiisopropylamin dimerisiert. Reduktion zum Diol, Mesylierung der Hydroxygruppen und anschließende Substitution des Mesylates durch Natriumiodid lieferte unter zweifacher basischer Eliminierung mittels Kalium-*tert.*-butanolat das 2,3-Diheptylbutadien. In einer Diels-Alder Addition wurde diese Verbindung mit Acrylsäureethylester umgesetzt, dann zum Alkohol reduziert, acyliert und durch Ozonolyse der Doppelbindung in das entsprechende racemische di-carba-analoge Glycerid überführt.

Die Herstellung dieser carba-analogen Verbindungen mit geradzahlicher Acylkettenlänge erfordert als Ausgangsverbindung somit einen um eine Methylengruppe längeren Fettsäure-*tert.*-butylester. Insbesondere bei längererkettigen Fettsäuren (Lauroyl, Palmitoyl und Sterinoyl) sind entsprechende ungeradzahlige Fettsäureester nur schwer zugänglich. Aus diesem Grund wurde das Verfahren von J. C. Briggs zur Darstellung der eigenen Verbindungen in einigen Punkten modifiziert (Abb. 49).

Das Ziel war :

- die neun Stufen umfassende Synthesesequenz zu vereinfachen
- geradzahlige Fettsäurederivate (Säurechloride oder Ester) als Ausgangsverbindungen einzusetzen.
- die Zielverbindung enantiomerenrein herzustellen.

Durch Retrosynthese kann die Zielverbindung formal auf Fettsäurechloride bzw. deren Ester zurückgeführt werden (Abb. 35).

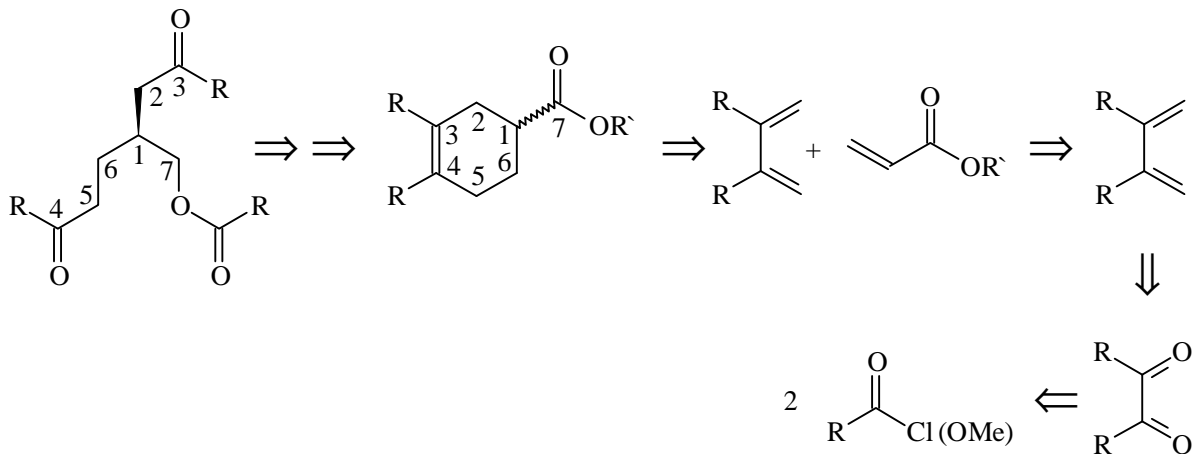


Abb. 35: *sn*-1,2(2,3) modifizierte Triglyceride - Retrosynthese

Zentraler Schlüsselschritt zum Aufbau des di-carba-analogen Glyceringerüsts ist eine Diels-Alder Reaktion. Das hierzu erforderliche Butadienderivat sollte aus dem entsprechenden 1,2-Diketon und dieses wiederum aus dem jeweiligen Fettsäurechlorid bzw. dem Fettsäuremethylester zu erhalten sein. Dementsprechend wurde am Beispiel von Laurinsäurechlorid bzw. Laurinsäuremethylester die Synthese des entsprechenden 1,2-Diketons untersucht (Abb. 36).

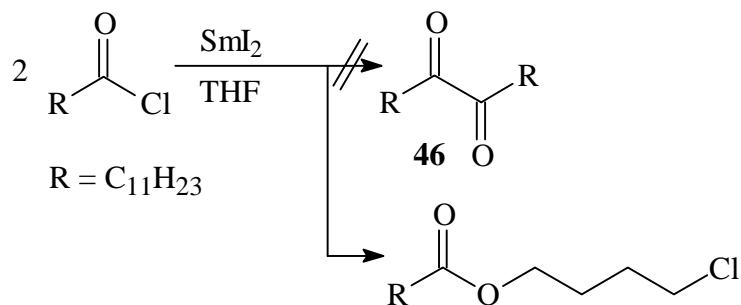


Abb. 36: Versuche zur Darstellung von dialkylsubstituierten 1,2-Diketonen

Nach Kagan sollte die Umsetzung von Säurechloriden mit Samarium(II)-iodid in THF direkt die entsprechenden 1,2-Diketone liefern (Kagan H.B. 1990). Bei der Umsetzung von Lauroylchlorid mit Samarium(II)-iodid wurde aber anstelle des erwarteten Diketons **46** ausschließlich der Laurinsäure-4-chlorbutylester erhalten. Dies konnte anhand der ¹NMR- und ¹³C-NMR Spektren eindeutig nachgewiesen werden. Unter diesen Reaktionsbedingungen erfolgt also unter Ringöffnung von Tetrahydrofuran (THF) formal die Addition des Säurechlorides.

Andererseits können 1,2-Diketone auch über den Umweg der Acyloinesterkondensation aus den entsprechenden Methylestern gewonnen werden. Anschließende Oxidation der Acyloine liefert dann die 1,2-Diketone (Abb. 37, Hansley V. L. 1935).

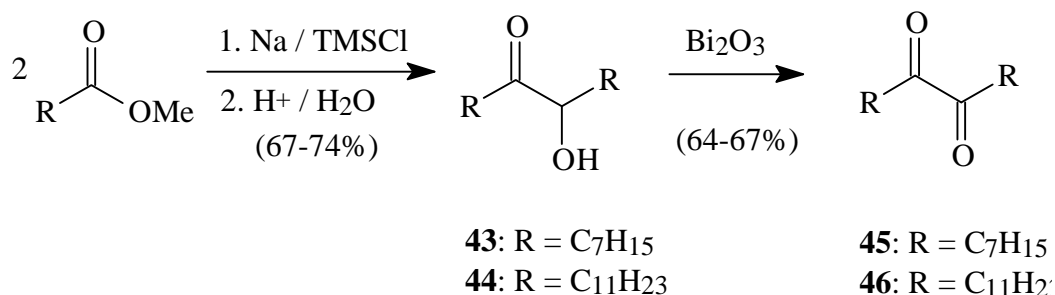


Abb. 37: 1,2-Diketone durch Acyloinesterkondensation

So lieferte in der Tat die Acyloinesterkondensation von Capryl- und Laurinsäuremethylester mit Natrium die gewünschten Acyloine **43-44**. Der Zusatz von Trimethylsilylchlorid (Rühlmann K. 1971) führte zu deutlich besseren Ausbeuten und zu weniger Nebenprodukten. Die Oxidation der Acyloine wird für gewöhnlich mit Kupfer(II)-acetat (Tietze L. F. 1991) oder Bismut(III)-oxid (Miyashita A. 1994) durchgeführt. Die Reaktion von **44** mit Kupfer-(II)-acetat in Eisessig führte jedoch auch bei mehrstündigem Erhitzen unter Rückfluß zu keinem Umsatz. Dagegen lieferte die Oxidation von **43** und **44** mit Bismut(III)-oxid die leicht durch Umkristallisation zu reinigenden Diketone **45-46**. Hierbei wurde ein Teil des Eduktes (20-30%) zurückgewonnen und wiederverwendet.

Mit dem Diketon **46** wurden mehrere Versuche zur Olefinierung durchgeführt (Abb. 38).

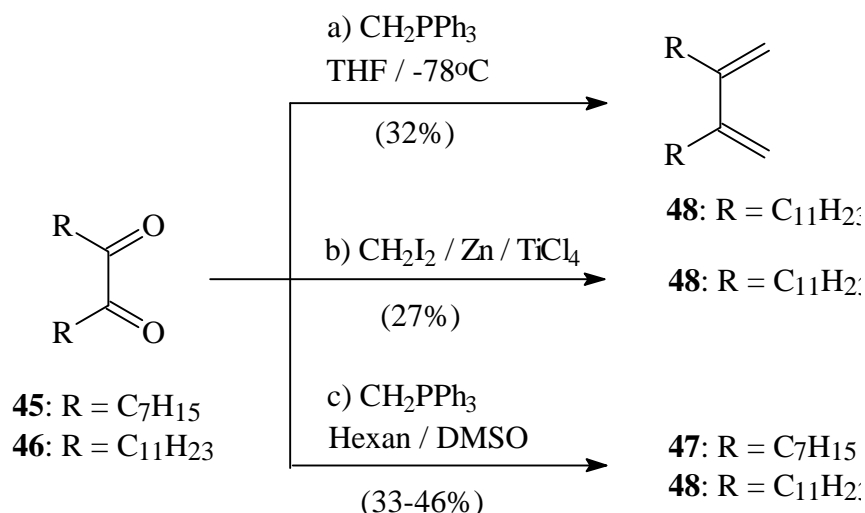


Abb. 38: Überführung der Diketone **45-46** in die Diene **47-48**

Das übliche Verfahren zur Überführung von Carbonylgruppen in die entsprechenden *exo*-Methylenverbindungen ist die Wittig-Reaktion (siehe auch Kap. 4.2). Unter den klassischen Reaktionsbedingungen mit a) Methyltriphenylphosphoniumbromid / *n*-BuLi / THF / -78°C wurde das Diketon **46** mit nur unbefriedigender Ausbeute (32%) in das Butadienderivat **48** überführt. Methode b) stellt eine Variante der Tebbe Reaktion dar (Lombardo). Dabei wird aktiviertes Zink in trockenem THF vorgelegt und anschließend mit Methylendiiodid (oder -dibromid) und Titan-tetrachlorid umgesetzt. Die anschließende Zugabe der Carbonylverbindung liefert **48** allerdings auch nur mit 27% Ausbeute. Obgleich die Lombardo-Methode bei sterisch anspruchsvollen Carbonylverbindungen gegenüber der Wittig Reaktion von Vorteil sein kann (Stanley H. P. 1993), wurden wegen der niedrigen Ausbeuten die weiteren Olefinierungen nach der Wittig-Variante c) durchgeführt. Dabei wurde Methyltriphenylphosphoniumbromid in DMSO / Hexan vorgelegt und bei Raumtemperatur mit *n*-BuLi versetzt. Das so gebildete Methyltriphenylphosphan wird mit den entsprechenden Carbonylverbindungen umgesetzt. Diese Variante besitzt gegenüber a) zwei Vorteile: 1. ist die Darstellung von Methyltriphenylphosphan einfacher und 2. sind die langkettigen Diketone bei Raumtemperatur wesentlich besser löslich als bei -78°C . Unter optimierten Bedingungen wurde **46** mit akzeptablen Ausbeuten (46%) in das Butadienderivat **48** überführt. Die Ausbeute an **47** betrug unter diesen Bedingungen 33%.

Durch die erfolgreiche Synthese der Butadienkomponente wurde das erste Ziel, d.h. die Korrelation dieses Bausteines mit einem Fettsäuremethylester erreicht.

Es galt nun einen Weg zur enantioselektiven Synthese der carba-analogen Zielverbindung zu finden. Eine Möglichkeit dazu bietet retrosynthetisch eine asymmetrische Diels-Alder Addition (Abb. 39).

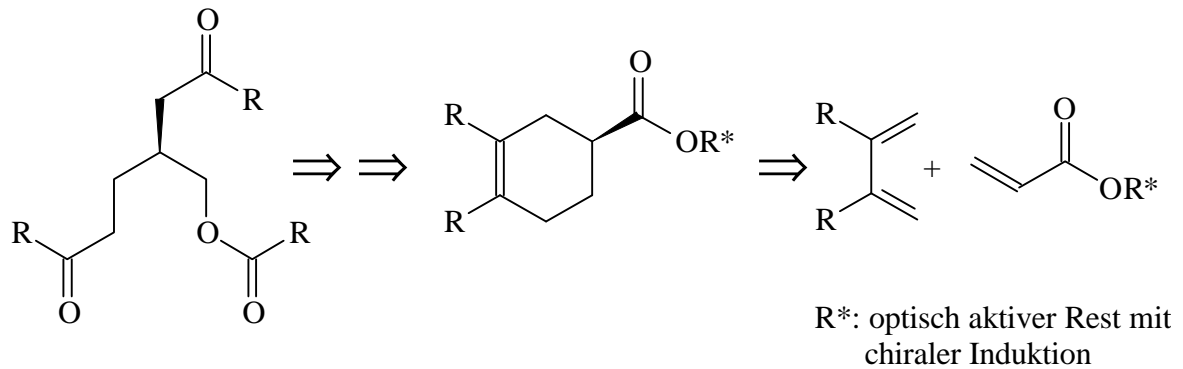


Abb. 39: Asymmetrische Diels-Alder Addition - Retrosynthese enantiomerenreiner Analoga

Die Diels-Alder Addition von Acrylsäureestern enantiomerenreiner Alkohole mit Butadienderivaten sollte unter Bildung eines neuen Stereozentrums zu den entsprechenden diastereomeren Cyclohexenderivaten führen.

Die asymmetrische Diels-Alder Reaktion mit α,β -ungesättigten Estern chiraler Alkohole wurde an zahlreichen Beispielen untersucht (Übersicht: Helmchen G. 1986, Furuta K. 1986, Kunz H. 1987). Im Falle chiraler Acrylsäureester können als optisch aktive Alkoholkomponente L(-)-Milchsäureethylester (Hartmann H. 1987) oder Cholin säurederivate (Maitra U. 1993) eingesetzt werden.

Den entscheidenden Ansatzpunkt für die eigene Syntheseplanung lieferte jedoch die Arbeit von Poll et. al. (Poll T. 1985) mit dem Acrylat des D-Pantolactons. Die Cycloaddition von Butadien bzw. 2-Methylbutadien mit dem Acrylat des D-Pantolactons lieferte in Gegenwart katalytischer Mengen Titan tetrachlorid die entsprechenden Cyclohexenderivate mit hoher Enantiomerenreinheit (Abb. 40).

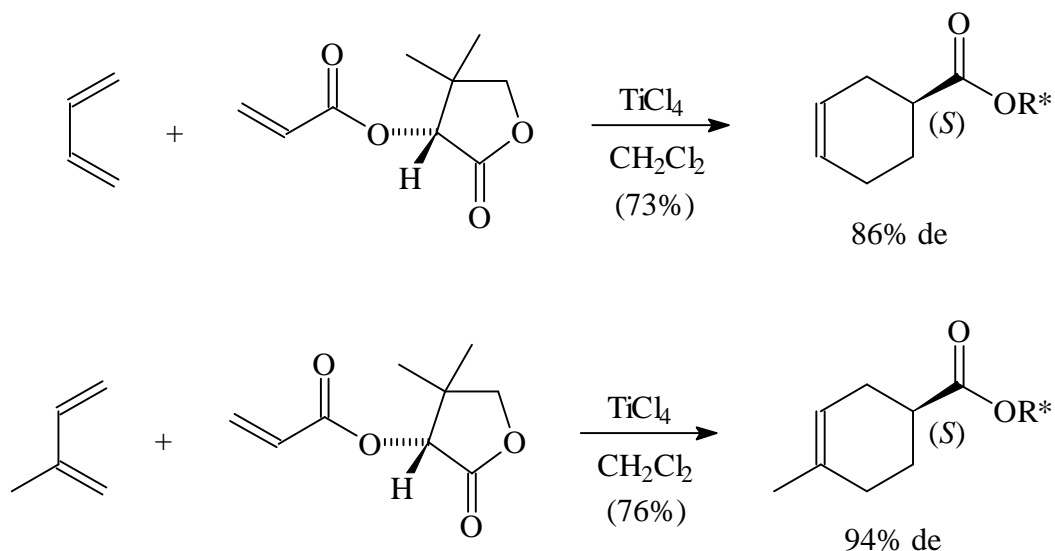


Abb. 40: Diastereoselektive Diels-Alder Addition (Poll T. 1985)

Nach Poll haben die gebildeten Cyclohexenderivate (*S*)-Konfiguration. Die Produkte sind kristallin und können durch mehrmalige Umkristallisation diastereomerenrein (> 99% de) erhalten werden. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß eine Methylgruppe in der 2-Position gegenüber dem nichtsubstituiertem Butadien eine deutlich höhere Diastereoselektivität beim Ringschluß liefert. Es kann daher erwartet werden, daß insbesondere 2,3-dialkylsubstituierte Butadiene auf diesem Wege mit hoher Diastereoselektivität ($\geq 94\%$ de) in die entsprechenden (*S*)-konfigurierten Cyclohexenderivate überführt werden können. Kommerziell verfügbar ist nur das D-Pantolacton. Laut Poll et. al. liefert jedoch das Acrylat des L(-)-Milchsäureethylesters bei der Diels-Alder Addition die gleiche absolute Konfiguration wie das „L-Pantolactonacrylat“ (Poll T. 1985), so daß durch Einsatz des Lactatacrylates auch die entsprechend (*R*)-konfigurierten Verbindungen zugänglich sein sollten.

Hierauf aufbauend wurde die asymmetrische Diels-Alder Addition von 2,3-dialkylsubstituierten Butadienen mit D-Pantolacton- sowie L(-)-Milchsäureethylester- acrylaten untersucht. Die hierzu benötigten Acrylate (**41** und **42**) wurden durch Acylierung von D-Pantolacton bzw. L(-)-Milchsäureethylester mit Acrylsäurechlorid / Pyridin gewonnen (Abb. 41).

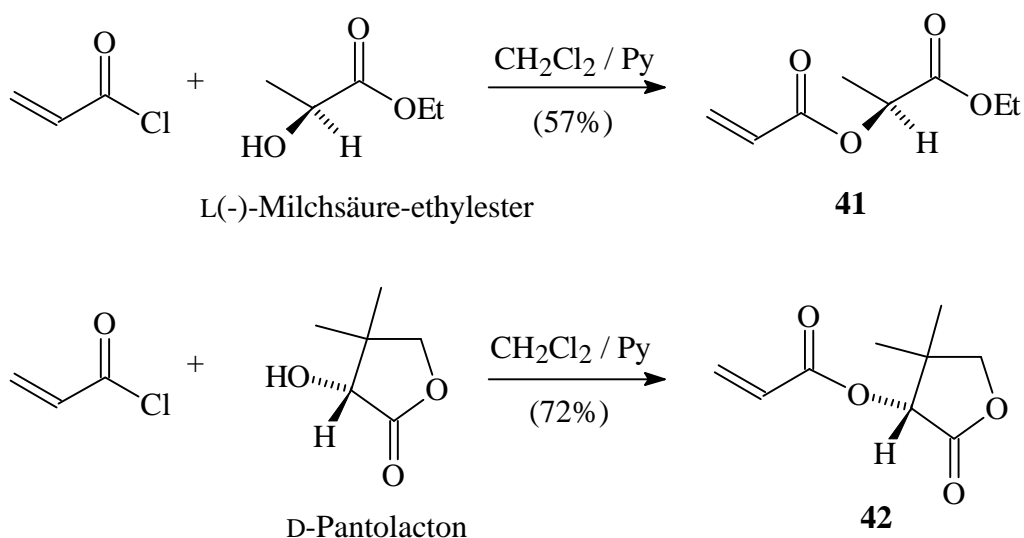


Abb. 41: Synthese der enantiomeren Acrylate **41** und **42**

41 und **42** sind recht polymerisationsempfindlich und müssen kühl (-20°C) gelagert werden. Sie können jedoch im Vakuum destillativ gereinigt werden. Die Diels-Alder Reaktion wurde zunächst mit dem kommerziell verfügbaren 2,3-Dimethylbutadien - der Vorstufe zum di-carba-analogen Triacetin - durchgeführt (Abb. 42).

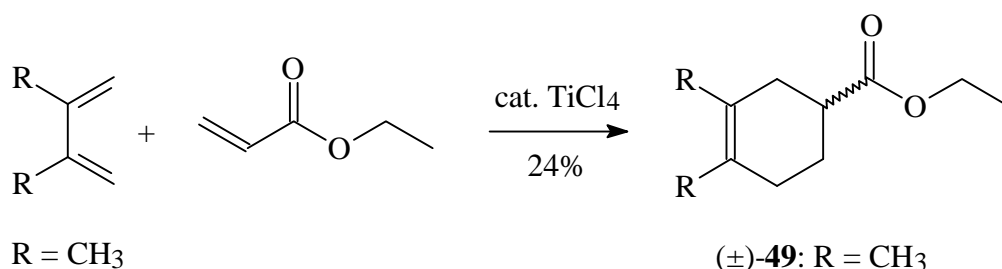
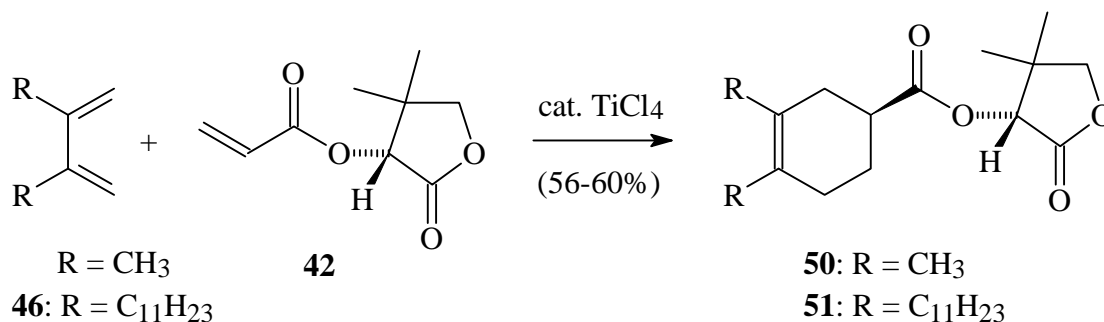


Abb. 42: Diels-Alder Additionen mit 2,3-Dimethylbutadien

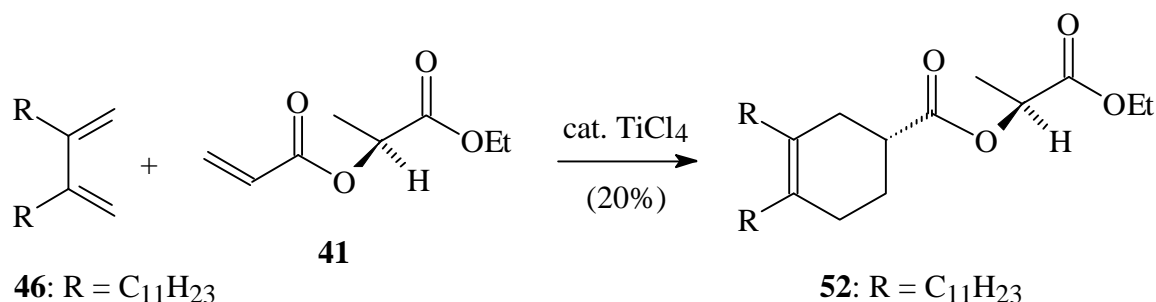
Die Umsetzung von 2,3-Dimethylbutadien mit Acrylsäureethylester lieferte bei 0°C in Gegenwart von Titan-tetrachlorid das Cyclohexenderivat **(±)-49** mit nur unbefriedigenden 24% Ausbeute. Als Nebenreaktionen wurden starke Polymerisationen beobachtet, denn der größte Teil des Rohproduktes blieb bei der destillativen Reinigung als nicht flüchtiger Bestandteil zurück.

Deutlich bessere Resultate lieferten Umsetzungen mit dem D-Pantolactonester **42** (Abb. 43).

Abb. 43: Asymmetrische Diels-Alder Addition mit **42**

Immerhin konnte hier das entsprechende Cyclohexenderivat **50** nach chromatographischer Reinigung und Umkristallisation mit 60% Ausbeute erhalten werden. **51** wurde als farbloses Öl mit 56% Ausbeute isoliert. Allerdings traten auch bei diesen Reaktionen Nebenprodukte auf, die nur schwer abzutrennen waren.

Die Umsetzung von **46** mit dem L-Milchsäureacrylat **41** lieferte eine nur unbefriedigende Ausbeute von 20% (Abb. 44).

Abb. 44: Asymmetrische Diels-Alder Addition mit **41**

Auch wurden zahlreiche Nebenprodukte beobachtet, die nicht vollständig abgetrennt werden konnten.

Die Cyclohexenderivate **49-52** besitzen an dem durch die Diels-Alder Addition gebildeten neuen Stereozentrum ein CH-acides Proton. Unter basischen Bedingungen kann somit eine Racemisierung über das Enolatanion erfolgen. Diese Nebenreaktion wurde zunächst befürchtet, da das für die Reduktion erforderliche Lithiumaluminiumhydrid in geringem Umfang auch als Base fungieren kann.

Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid lieferte aus den Estern **49-52** die entsprechenden Alkohole mit vorzüglichen Ausbeuten (Abb. 45).

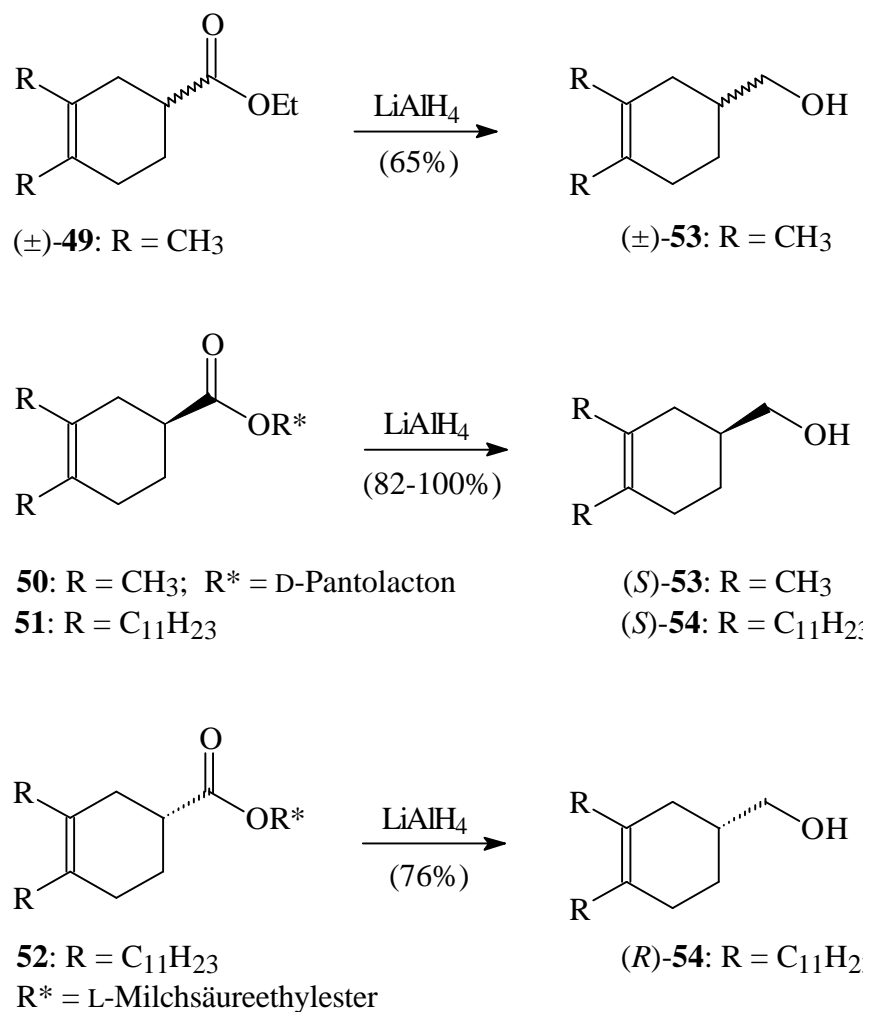


Abb. 45 : Reduktion der Cyclohexenderivate **49-52**

Die Enantiomerenreinheit von (*S*)-**53** konnte gaschromatographisch an einer Cyclodex β /1P bestimmt werden und betrug $> 99\%$ ee. Eine Racemisierung tritt demzufolge unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht ein. (*S*)-**54** wurde chromatographisch gereinigt und bei -30°C umkristallisiert. Bei Raumtemperatur ist die Substanz flüssig mit einem Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}} = -8.0^\circ$ ($c = 3.4$ Hexan). Bei der Reduktion von **52** wurde (*R*)-**54** mit einem deutlich niedrigeren Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}} = +1.5^\circ$ ($c = 3.4$ Hexan) erhalten (ca. 19% ee). Milchsäureacrylate sind somit für die Darstellung der carba-analogen Zielverbindungen ungeeignet.

Verbindungen der allgemeinen Struktur von (*S*)-**54** stellen wichtige Bausteine für die Synthese carba-analoger Triglyceride und Phospholipide dar, die in den *sn*-1,2(2,3)-Positionen des GlycerinGrundgerüsts modifiziert sind (Abb. 46).

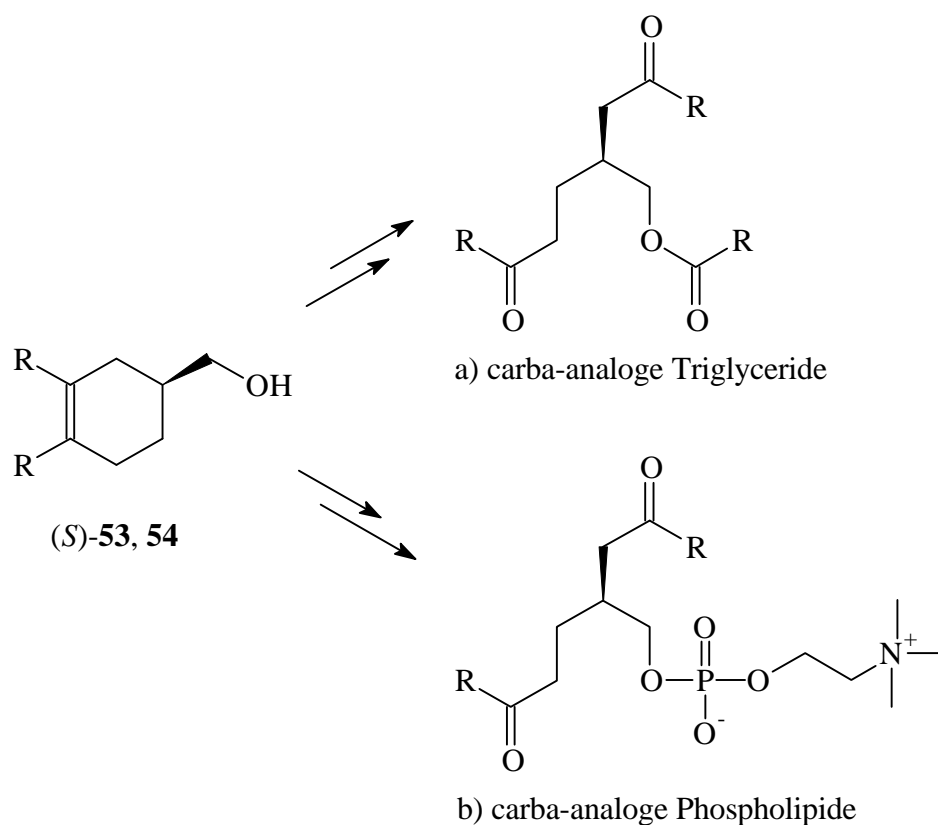


Abb. 46: (S)-**53**, **54** als Synthesebausteine für carba-analoge Triglyceride und Phospholipide

Stellvertretend für die Triglyceridanaloga wurde das racemische sowie enantiomerenreine (> 99% ee) carba-analoge Tricacetin (Modifikation der *sn*-1,2(2,3) Position) hergestellt (Abb. 47). Der Alkohol (S)-**54** (R = C₁₁H₂₃) wurde zur Synthese der entsprechenden carba-analogen Phospholipidverbindung eingesetzt (Kap. 6.3.2).

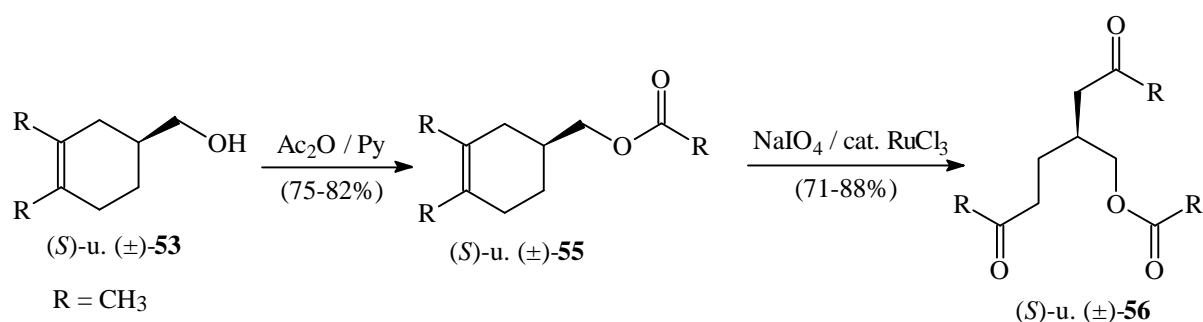


Abb. 47: Synthese von **56** - racemisch und enantiomerenrein

Dazu wurden die Alkohole (S)- und (±)-**53** mit Essigsäureanhydrid / Pyridin acetyliert und die erhaltenen Ester mit Natriumperodat / Rutheniumtrichlorid-hydrat oxidativ mit exzellenten Ausbeuten in die di-carba-analogen Triacetine ((S)- und (±)-**56**) überführt. (S)- und (±)-**56**

wurden mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und IR eindeutig bestimmt. Stellvertretend hierfür ist in Abb. 48 das $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von (*S*)-**56** gezeigt.

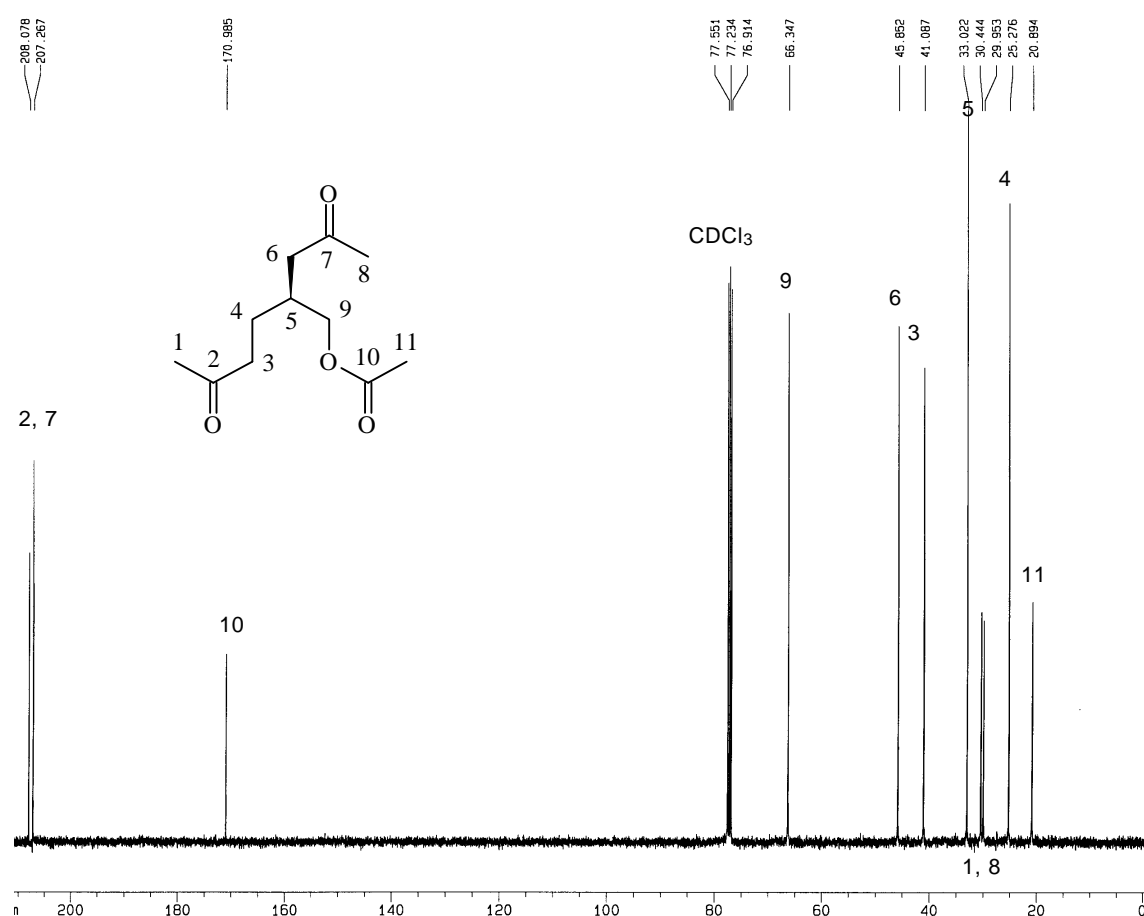


Abb. 48: $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von di-carba-analogem Triacetin (*S*)-**56**

Alle 11 Kohlenstoffatome von (*S*)-**56** erscheinen als getrennte Signale und können mit Hilfe eines Inkrementensystems eindeutig zugeordnet werden. Die Methylgruppe (11) des Acetylrestes liegt bei 20.9 ppm. Die Methylengruppe (4) findet man bei 25.3 ppm. Es folgen die Signale der Methylgruppen (1, 8; Methylketone) bei 29.9 bzw. 30.4 ppm sowie das Signal der Methingruppe (5) bei 33.0 ppm. Bei 41.1 und 45.8 ppm liegen die Signale der Methylengruppen 3 bzw. 6 (in α -Position zu den Ketofunktionen). Die restlichen Signale liegen bei: 66.3 ppm Methoxygruppe (9), 171.0 ppm Carboxylgruppe (10) und 207.3 bzw. 208.1 ppm Carbonylgruppen (2, 7).

Die wichtigste Zielsetzung für die Synthese der di-carba anlogen Glyceride konnte damit weitgehend erfüllt werden:

- die neun Stufen umfassende Synthesesequenz nach Briggs konnte auf sieben Reaktionsschritte verkürzt werden
- die Synthese erfolgte ausgehend von geradkettigen Fettsäuremethylestern
- die Zielverbindungen können enantiomerenrein hergestellt werden
- es werden geeignete Zwischenprodukte für die Synthese der entsprechenden carba-analogen Triglyceride und Phospholipide erhalten.

Die vollständige Reaktionssequenz ist in Abb. 49 zusammenfassend dargestellt.

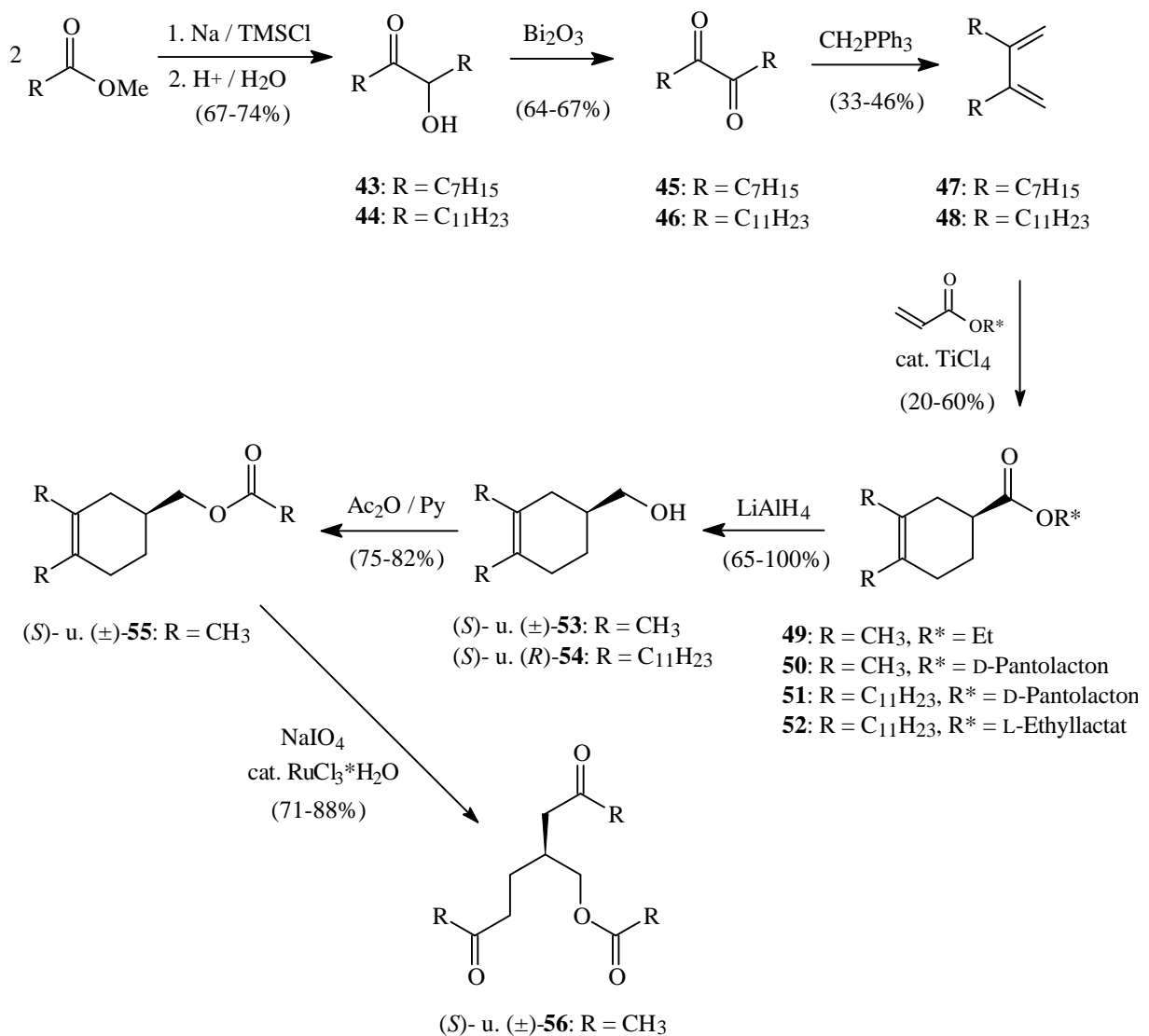


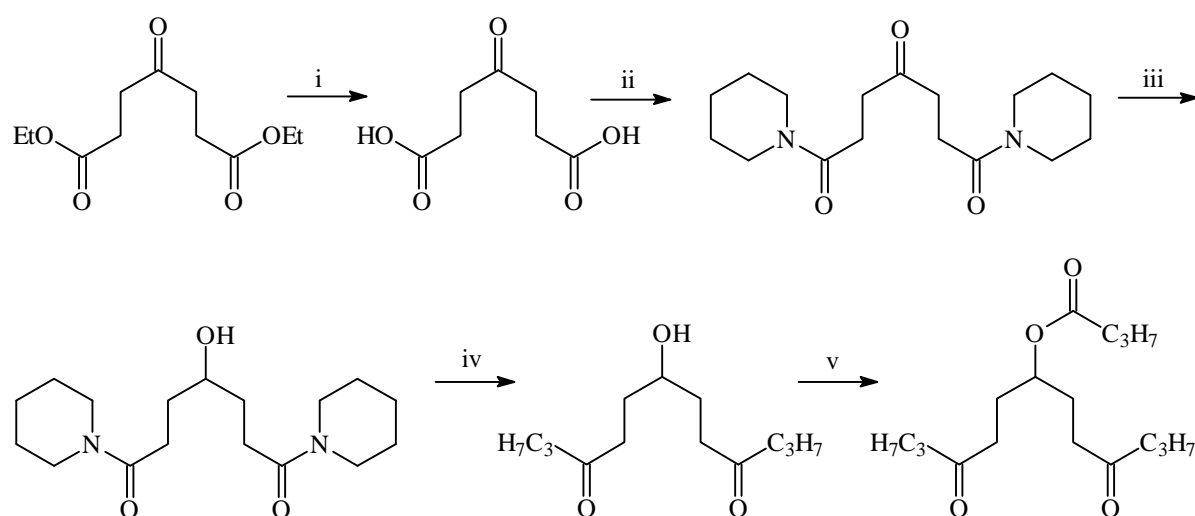
Abb. 49: Synthese di-carba-analoger Triglyceride mit Modifikation in den *sn*-1,2(2,3) Positionen

Die Wittig- sowie die Diels-Alder Reaktion sind kritische Stufen innerhalb dieser Synthesesequenz. Akzeptable Ausbeuten wurden bei der Wittig Reaktion mit dem Diketon **46** ($R = C_{11}H_{23}$) erzielt. Bei kürzerer Alkylkettenlänge ($R = C_7H_{15}$) sank die Ausbeute jedoch auf 33%. Offensichtlich müssen hier die Reaktionsbedingungen bei Variation der Alkylkettenlänge jeweils neu optimiert werden.

Bereits zufriedenstellend sind die Ergebnisse der Diels-Alder Reaktion sofern der D-Pantolacton-acrylsäureester **42** eingesetzt wird. Acrylsäureethylester und das L-Milchsäureethylesterderivat **41** sind unter diesen Reaktionsbedingungen nicht geeignet. Man findet viele Nebenreaktionen, so daß die gewünschten Cyclisierungsprodukte nur mit geringer Ausbeute zu erhalten sind. Auch ist die Diastereoselektivität der Diels-Alder Reaktion beim Einsatz von **41** mit ca. 19% de äußerst gering. Die Darstellung der carba-analogen Derivate in der (*R*)-Konfiguration benötigt demzufolge den L-Pantolacton-acrylsäureester, der jedoch nicht einfach zugänglich ist.

4.5 Carba-analoge Triglyceride - Modifikation der *sn*-1,3 Positionen

Die Synthese einer derartigen Verbindung wurde bereits erfolgreich in unserem Arbeitskreis von Berger durchgeführt (Berger M. 1993, 1994). Die hierzu entwickelte Syntheseroute ist in Abb. 50 dargestellt.



Reagentien: (i) NaOH (87%); (ii) Piperidin / CDI (88%); (iii) NaBH₄ / MeOH (93%); (iv) C₃H₇MgBr / THF (12%); (v) C₃H₇COCl / Py (81%)

Abb. 50: Di-carba-analoges Tributyrin nach Berger M. (1993, 1994)

Als Ausgangsmaterial wurde von M. Berger 4-Oxopimelinsäurediethylester alkalisch hydrolysiert und mit zwei Äquivalenten Piperidin in Gegenwart von N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) zum 4-Oxopimelinsäuredipiperidid umgesetzt, welches durch Natriumborhydrid zum entsprechenden Alkohol reduziert wurde. Die Grignardreaktion mit Propylmagnesiumbromid lieferte das Hydroxydiketon allerdings mit nur 12% Ausbeute. Acylierung mit Buttersäurechlorid / Pyridin führte zum gewünschten di-carba-analogen Tributyrin.

Die Grignardreaktion ist das Hauptproblem in dieser Reaktionssequenz. Selbst unter optimierten Reaktionsbedingungen beträgt die maximale Ausbeute an Hydroxydiketon laut Berger nur 12% und erfordert zudem eine aufwendige Reinigung.

Die niedrige Gesamtausbeute von 7 % über fünf Reaktionsschritte war ein Grund für die Entwicklung weiterer Synthesestrategien zur Darstellung dieser Verbindungsklasse. Die Synthese sollte dabei auf einfachen Ausgangssubstanzen, wie z.B. Fettsäurederivaten, aufbauen. Eine entsprechende Retrosynthese für diese Verbindungsklasse ist in Abb. 51 gezeigt.

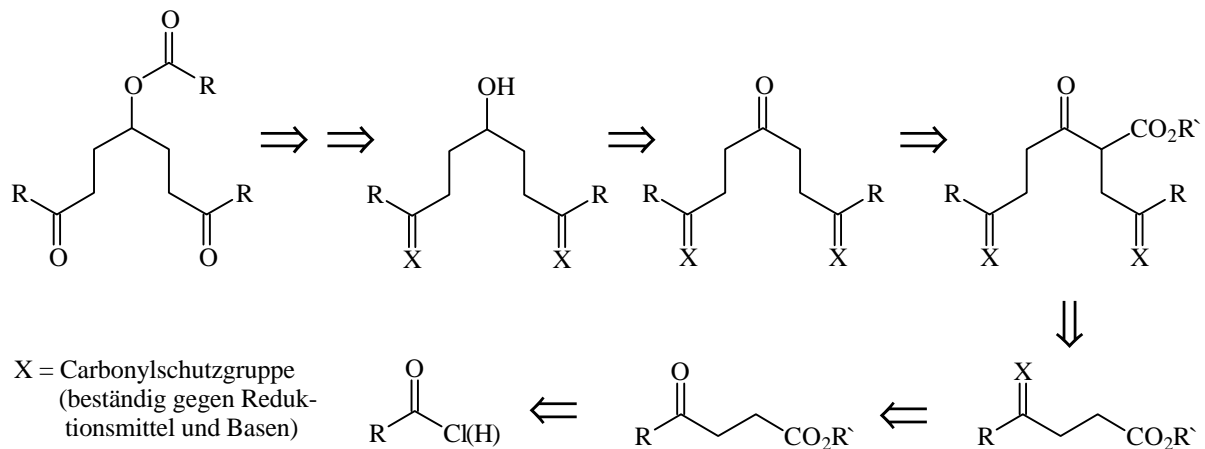


Abb. 51: Carba-analoge Triglyceride - Retrosynthese

Der zentrale Schlüsselschritt zum Aufbau des carba-analogen Glyceridgerüsts ist hierbei die Claisen-Kondensation mit einem γ -Ketoester, dessen Carbonylfunktion entsprechend geschützt ist.

Mit Laevulinsäureethylester ($R=CH_3$; Vorstufe von di-carba-analogem Triacetin) stand bereits ein kommerziell verfügbarer γ -Ketoester zur Verfügung. Da bereits sehr gute Erfahrungen mit ketalgeschützten Derivaten vorlagen (vgl. Abb. 22 Reaktion b) und Abb. 32), wurde der

Laevulinsäureethylester ebenfalls mit Ethylenglykol-bis-(trimethylsilyylether) **15** in das entsprechende 1,3-Dioxolan überführt (Abb. 52).

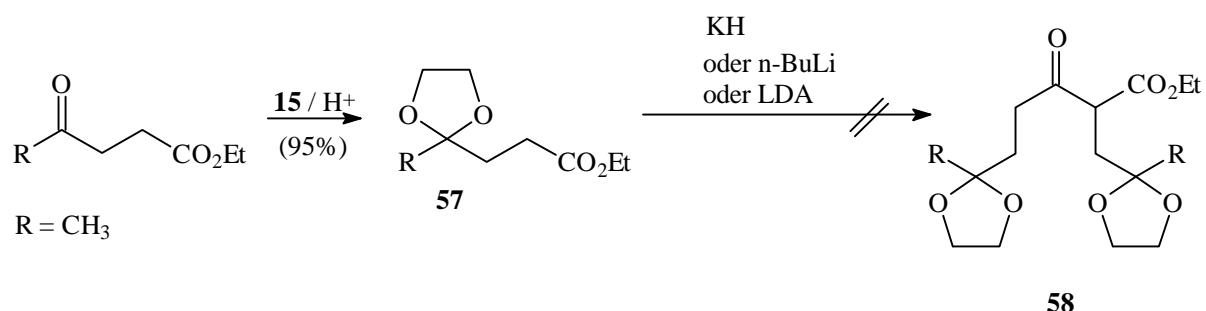


Abb. 52: Ketale - Schutzgruppe für γ -Ketoester

Erwartungsgemäß lieferte die Umsetzung des geschützten Derivats **57** mit exzellenter Ausbeute, doch scheiterten alle Versuche daraus mittels Claisen-Reaktion ein Kondensationsprodukt zu erhalten. Mit Kaliumhydrid und *n*-Butyllithium wurde nach protischer Aufarbeitung das Edukt (Laevulinsäureethylester) zurückerhalten. Der Einsatz von LDA führte hingegen zur Spaltung der Esterbindung und lieferte das entsprechende Diisopropylamid. Aus diesem Grund wurde wiederum mittels Wittig-Reaktion die *exo*-Methylengruppe eingefügt (Abb. 53).

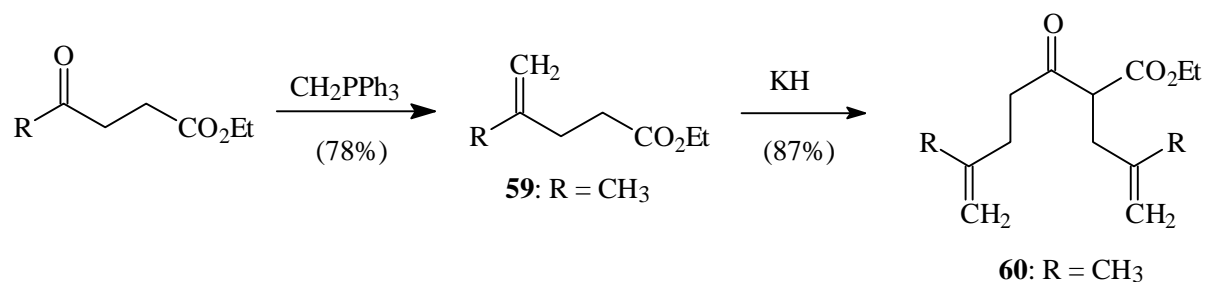
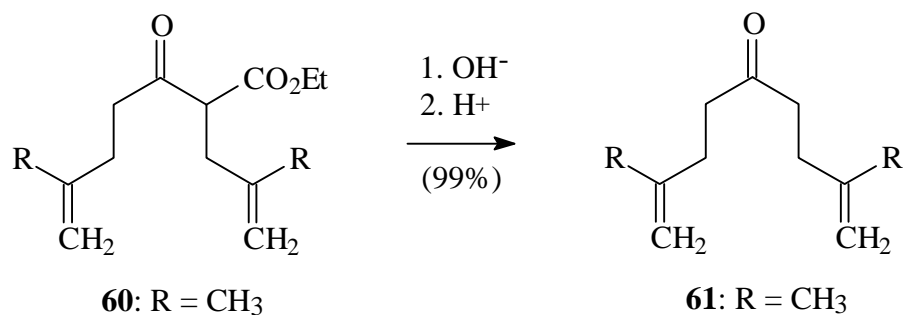
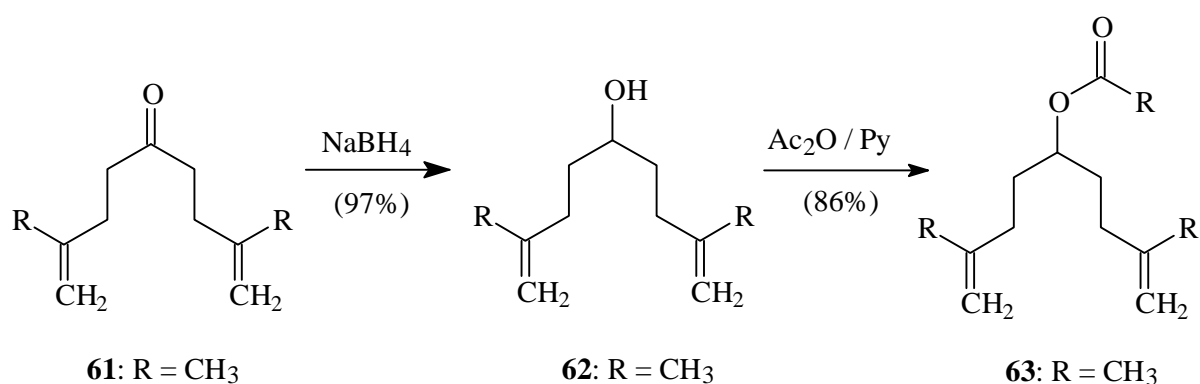


Abb. 53: Claisen-Kondensation mit methylen geschützten γ -Ketoestern

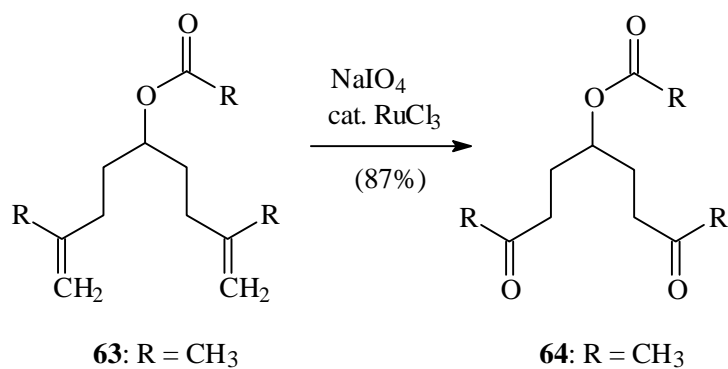
Die Claisen-Kondensation des so erhaltenen **59** erwies sich als völlig unproblematisch und lieferte dann auch die gewünschte Zielverbindung **60** mit vorzüglicher Ausbeute. Alkalische Hydrolyse von **60** und saure Aufarbeitung führte unter Decarboxylierung der β -Ketosäure zum symmetrischen Keton **61** (Abb. 54).

Abb. 54: Decarboxylierung von **60**

61 wurde mittels Natriumborhydrid zum Alkohol **62** reduziert (Abb. 55).

Abb. 55: Reduktion von **61** - Acetylierung von **62**

Die Acetylierung von **62** mit Essigsäureanhydrid / Pyridin lieferte das Acetylderivat **63**. Daraus konnte das 1,3-*sn*-di-carba-analoge Triacetin **64** durch oxidative Spaltung der C=C-Doppelbindungen hergestellt werden (Abb. 56).

Abb. 56: Oxidative Spaltung der C=C-Doppelbindungen von **63**

64 wurde mittels $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und IR eindeutig charakterisiert. In Abb. 57 ist das $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von **64** gezeigt.

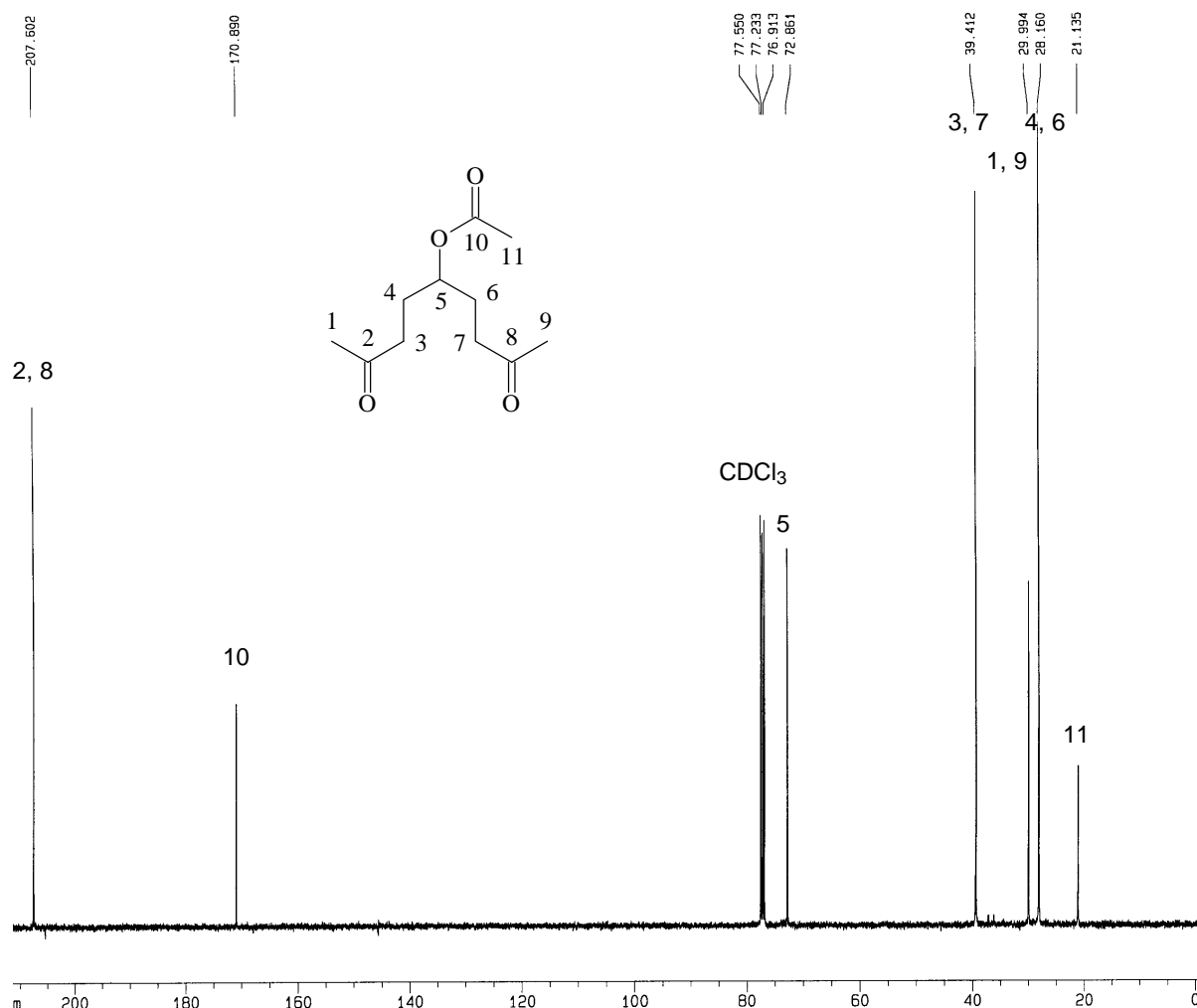


Abb. 57: $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum von di-carba-analogem Triacetin **64**

Für **64** werden erwartungsgemäß nur sieben Signale im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum gefunden. Die Methylgruppe (11) der Esterfunktion liegt bei 21.1 ppm, gefolgt von dem Signal bei 28.2 ppm für die beiden Methylengruppen (4 u. 6). Bei 30.0 ppm liegt das Signal der an den Ketogruppen (2, 8) gebundenen Methylgruppen (1 u. 9). Deutlich zu erkennen ist ferner das Signal der Estergruppe (10) bei 170.9 ppm und das Signal der Carbonylgruppen (2, 8) bei 207.6 ppm.

Die Synthese des carba-analogen Triacetins gelang somit ausgehend von dem kommerziell verfügbaren Laevulinsäureethylester in nur sechs Reaktionsschritten. Die gesamte Reaktionssequenz ist in Abb. 58 dargestellt.

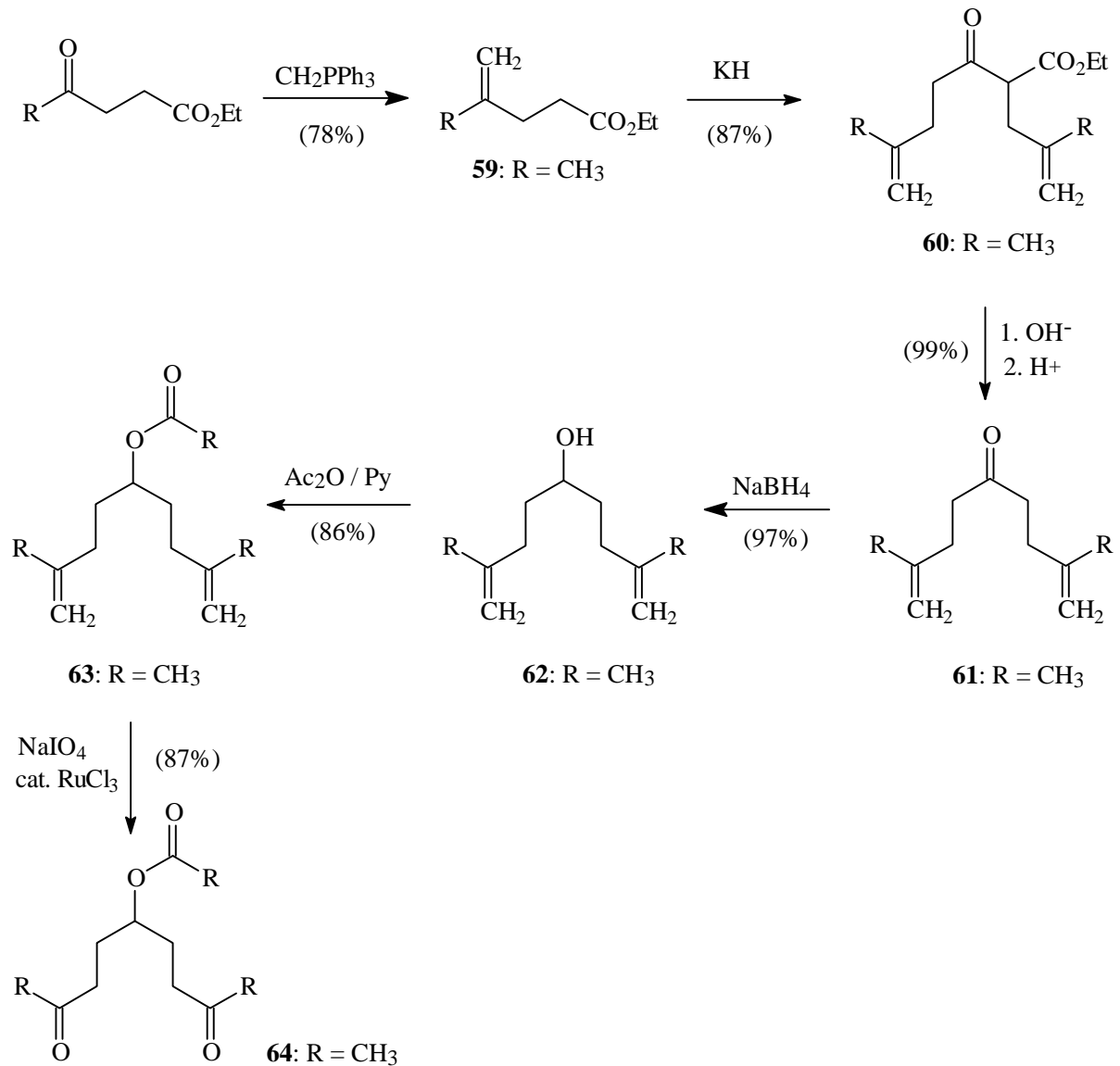


Abb. 58: Synthese di-carba-analoger Triglyceride modifiziert in den 1,3-*sn* Positionen

Die Synthese der carba-analogen Triglyceride mit längeren Alkylkettenlängen erfordert die entsprechenden γ -Ketoester. Diese sind nicht kommerziell verfügbar, können aber ausgehend von den entsprechenden Säurechloriden (Fujimura T. 1991) oder Aldehyden (Stetter H. 1980) hergestellt werden.

4.6 Zusammenfassung - Ausblick

Für die Herstellung carba-analoger Glyceride durch Modifikation der drei Esterfunktionen des GlycerinGrundgerüsts wurden neue Syntheseverfahren entwickelt bzw. bekannte Verfahren erweitert oder verbessert. Hierdurch gelang die Synthese von:

- carba-analogem Tricaprylin **11**, Trilaurin **25** und Tripalmitin **26**, alle modifiziert in der *sn*-2 Position
- carba-analogem Triacetin **39** und Trilaurin **40** jeweils modifiziert in der *sn*-1(3) Position (racemisch)
- di-carba-analogem Triacetin (*S*)- und (\pm)-**56** enantiomerenrein und racemisch modifiziert in den *sn*-1,2(2,3) Positionen.
- di-carba-analogem Triacetin **64** modifiziert in den *sn*-1,3 Positionen

Die Synthese der isosteren Verbindungen konnte auf leicht zugängliche und preiswerte Ausgangsmaterialien, wie Fettsäurechloride bzw. Fettsäuremethylester, zurückgeführt werden.

Folgende Fragen zu diesen Verbindungen müssen zukünftig geklärt werden :

- Können in der *sn*-1(3) Position modifizierte enantiomerenreine carba-analoge Glyceride durch asymmetrische *syn*-Dihydroxylierung gewonnen werden (z.B. mittels (DHQD)₂Pyr; Crispino G.A. 1993)?
- Wie kann die Bildung von Nebenprodukten bei der asymmetrischen Diels-Alder Addition zur Synthese *sn*-1,2(2,3) di-carba-analoger Glyceride eingeschränkt werden ?
- Ist die Syntheseroute zur Darstellung von *sn*-1,3 di-carba-analogen Triglyceriden auch bei langkettigen Derivaten anwendbar ?
- Eignen sich die beschriebenen Syntheserouten auch zur Synthese funktionalisierter Glyceridanaloga ? Und hieraus folgend:
- Können carba-analoge Glyceride an Trägermaterialien gebunden werden und sind diese Materialien dann geeignet für die Affinitätschromatographie, z.B. bei der Reinigung von Lipasen ?

5 Selektivitäten von Lipasen - Modellstudien

5.1 Regio- und Enantioselektivität gegenüber Triglyceriden

5.1.1 Einleitung

Die Esterbindungen von Triglyceriden werden chemisch unter stark sauren oder stark basischen Bedingungen unter Bildung von Partialglyceriden (Di- und Monoglyceride) hydrolysiert. Bei vollständiger Hydrolyse wird unter Freisetzung aller Fettsäuren Glycerin gebildet. Bei der chemischen Hydrolyse beobachtet man keine nennenswerte Selektivität gegenüber der Natur der Fettsäuren oder deren Positionen im Triglycerid. Triglyceride werden dagegen mit höherer Selektivität durch Lipasen und Esterasen gespalten, wobei ebenfalls Di- und Monoglyceride, Glycerin und Fettsäuren, entstehen (Abb. 59).

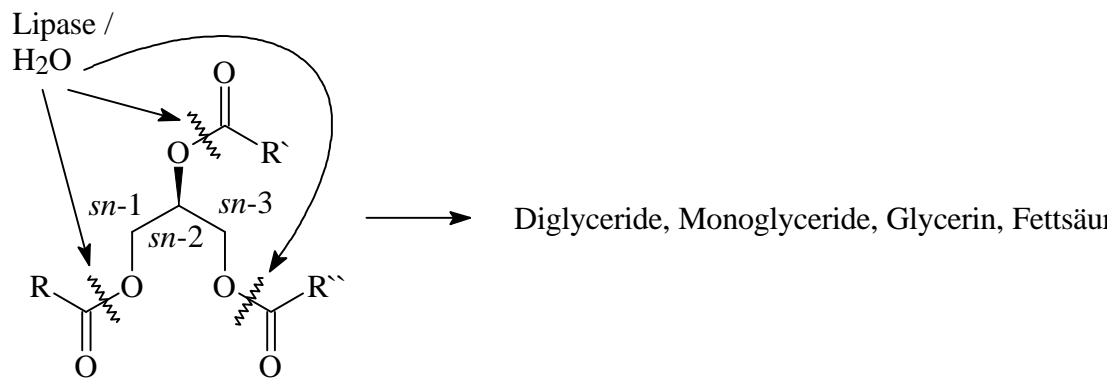


Abb. 59: Lipasekatalysierte Hydrolyse von Triglyceriden - Spaltpositionen

Enzymkatalysierte Hydrolysen verlaufen im Gegensatz zur chemischen Esterspaltung unter vergleichsweise milden Bedingungen. Sie erfolgt bereits bei Raumtemperatur und einem neutralen oder allenfalls leicht sauren bzw. basischen Reaktionsmilieu. Nahezu alle Lipasen zeigen spezifische Selektivitäten gegenüber a) der Natur der Acylgruppen oder b) den Positionen des Triglycerides. Die so gebildeten Produktgemische hängen damit stark von den Eigenschaften des jeweiligen Biokatalysators ab. Manche Lipasen hydrolysieren bevorzugt die Esterbindungen von Fettsäuren bestimmter Kettenlängen (kurz, mittel oder lang) oder hinsichtlich des Sättigungsgrades (gesättigt oder ungesättigt). Zudem besitzen Lipasen häufig eine deutliche Präferenz gegenüber den Stereopositionen, so daß die Spaltung der

Esterbindung oft nahezu ausschließlich an den primären Esterfunktionen (*sn*-1 und *sn*-3 Position) bzw. an einer dieser Esterfunktionen (*sn*-1 oder *sn*-3 Position) erfolgt. Die enzymatische Hydrolyse einer Acylgruppe in einem achiralen, symmetrisch substituierten Triglycerid liefert je nach Selektivität der Lipase mehrere, unterschiedliche Diglyceride (Abb. 60, Tab. 1).

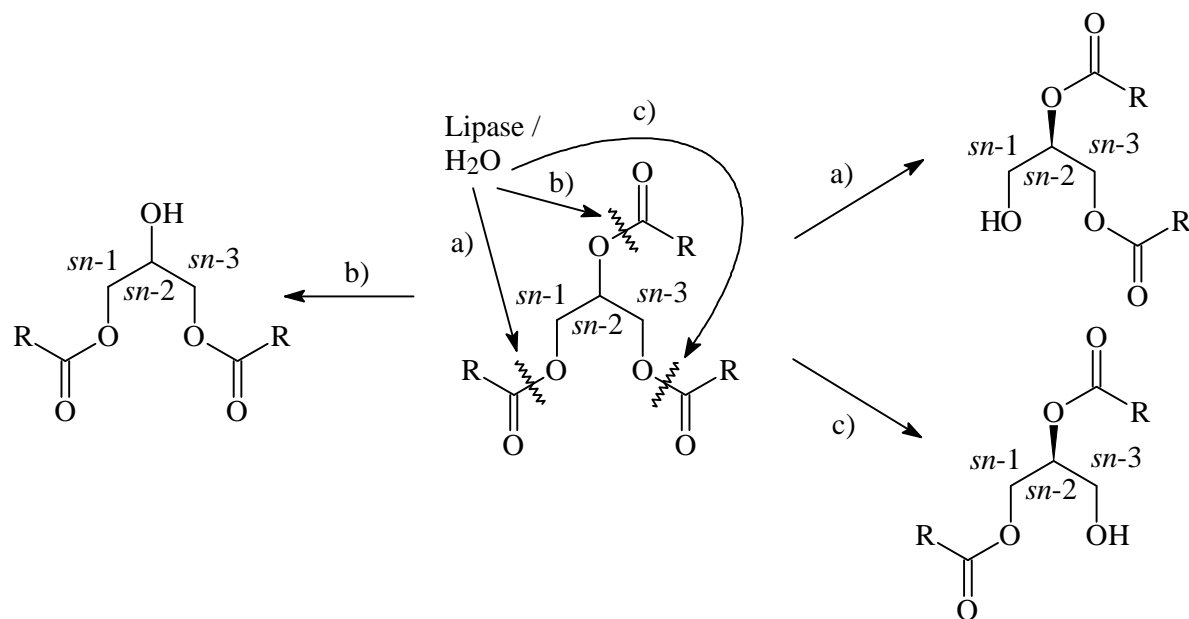


Abb. 60: Regio- und enantioselektive Hydrolyse von Triglyceriden

Die Spaltung einer primären Estergruppe gemäß a) oder c) führt zu chiralen Diglyceriden. Eine Lipase ist also enantioselektiv, wenn der Angriff bevorzugt in der *sn*-1 oder aber der *sn*-3 Position erfolgt. Wird dabei die sekundäre Estergruppe überhaupt nicht angegriffen, so ist die Lipase auch regioselektiv. Je nach Angriffsposition der Lipase können insgesamt vier Kombinationen von Regio- / Enantioselektivität unterschieden werden (Tab. 1).

Tab. 1: Spaltpositionen in Triglyceriden - Regio- und Enantioselektivitäten

Hydrolyse in:	Regioselektivität	Enantioselektivität
<i>sn</i> -1 oder <i>sn</i> -3	ja	ja
<i>sn</i> -1 oder <i>sn</i> -3 und <i>sn</i> -2	nein	ja
allen drei Positionen	nein	nein
<i>sn</i> -2 oder <i>sn</i> -1 und <i>sn</i> -3	ja	nein

Die Bestimmung dieser Lipaseselektivitäten ist jedoch durchaus nicht trivial, denn:

1. bei der enzymatischen Hydrolyse können acht Reaktionsprodukte auftreten (einschließlich der Fettsäure, Abb. 61)
2. das Verhältnis der Diglyceride untereinander bleibt während des Reaktionsverlaufes nicht konstant (Abb. 62, Abb. 63)
3. die gebildeten Diglyceride sind nicht stabil und können während der Hydrolyse, der Isolierung oder deren Analyse racemisieren (Abb. 64).
4. die Enantiomerenreinheit der Diglyceride kann bislang nicht direkt bestimmt werden und erfordert damit einen zusätzlichen Derivatisierungsschritt.

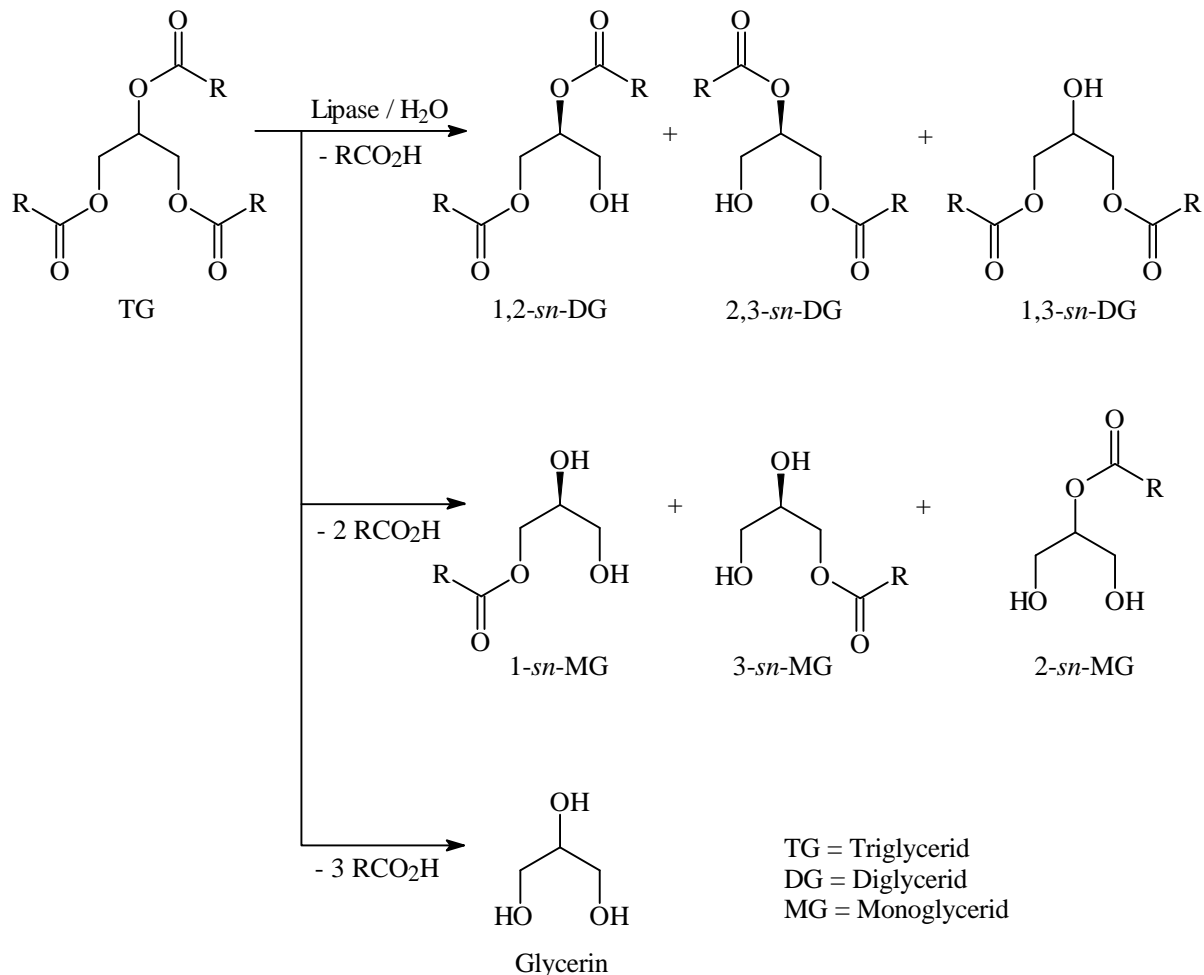


Abb. 61: Mögliche Reaktionsprodukte der lipasekatalysierten Hydrolyse von Triglyceriden

Die bei der Hydrolyse einer Acylgruppe im Triglycerid gebildeten Diglyceride sind ebenfalls Substrate für die verwendeten Lipasen und werden somit auch hydrolytisch gespalten. Von den hierbei gebildeten Monoglyceriden sind wiederum theoretisch zwei chiral (primäre

Estergruppe). Auch die so gebildeten Monoglyceride sind wieder Enzymsubstrate und liefern letztendlich Glycerin und die entsprechende Fettsäure. Das Hauptproblem ist nun nicht die eigentliche Analyse (Detektion) all dieser gebildeten Reaktionsprodukte, sondern die Tatsache, daß das Verhältnis der jeweiligen Diglyceride untereinander nicht konstant bleibt (Abb. 62).

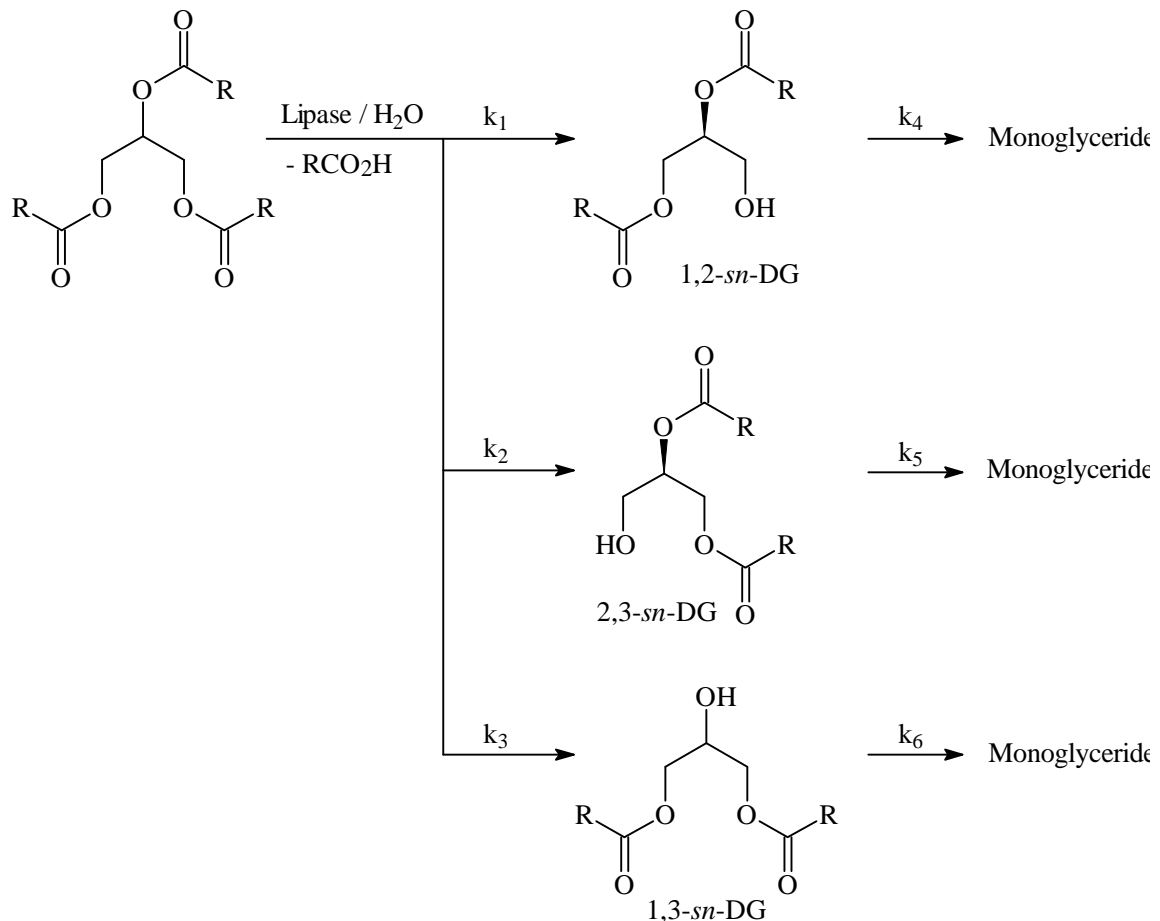


Abb. 62: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Di- und Monoglyceridbildung

Zunächst werden die Diglyceride $[1,2\text{-}sn\text{-DG}]_t$, $[2,3\text{-}sn\text{-DG}]_t$ und $[1,3\text{-}sn\text{-DG}]_t$ gemäß den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_1 - k_3 gebildet. Das Verhältnis von $k_1 : k_2 : k_3$ ist konstant und gibt Auskunft darüber, inwieweit eine Lipase gegenüber dem Triglycerid regio- bzw. enantioselektiv ist. Dieses Verhältnis ($k_1 : k_2 : k_3$) entspricht ebenfalls den Konzentrationen der Diglyceride $[1,2\text{-}sn\text{-DG}]_t : [2,3\text{-}sn\text{-DG}]_t : [1,3\text{-}sn\text{-DG}]_t$, aber nur unter der Voraussetzung, daß keine Folgereaktionen k_4 - k_6 auftreten. Diese Folgereaktionen beeinflussen jedoch maßgeblich die Produktverteilung der jeweiligen Diglyceride. Dies wird verständlich, wenn man sich am Beispiel der Enantioselektivität die Bildung von $[1,2\text{-}sn\text{-DG}]_t$ und $[2,3\text{-}sn\text{-DG}]_t$ und die hieraus gebildete Folgeprodukte, genauer betrachtet (Abb. 63).

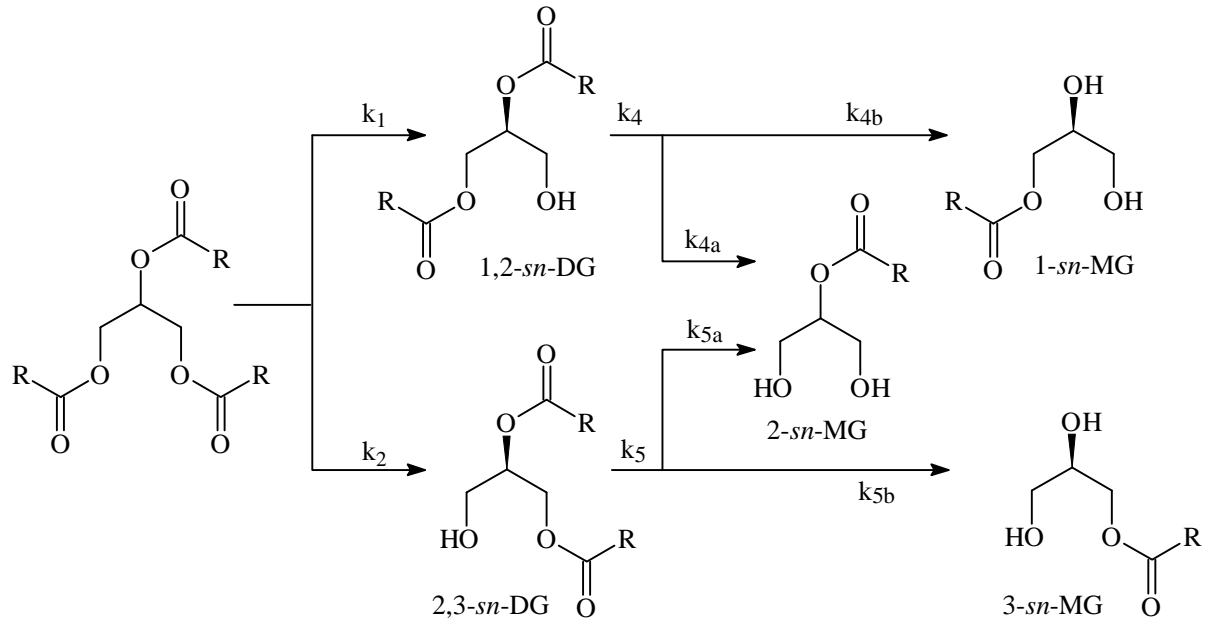


Abb. 63: Folgereaktionen der Diglyceride (k_4 , k_5)

Die Bildung von 1,2-*sn*- und 2,3-*sn*-Diglycerid erfolgt im Verhältnis von $k_1 : k_2$. Das 1,2-*sn*-Diglycerid wird also bevorzugt gebildet, sofern $k_1 > k_2$ ist. Dieses Diglycerid kann nun wiederum an der primären oder/und der sekundären Estergruppe mit $k_4 = k_{4a} + k_{4b}$ gespalten werden. Das andere Enantiomer (2,3-*sn*-Diglycerid) wird analog hierzu mit $k_5 = k_{5a} + k_{5b}$ hydrolysiert. Entscheidend ist nun das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten $k_4 : k_5$, denn bei $k_4 > k_5$ nimmt die Konzentration von [1,2-*sn*-DG] gegenüber der von [2,3-*sn*-DG] vergleichsweise rasch ab. Die Enantiomerenreinheit sinkt somit kontinuierlich mit fortschreitender Reaktion. Demgegenüber steigt die Enantiomerenreinheit von dem 1,2-*sn*-Diglycerid bei $k_4 < k_5$. Nur bei $k_4 = k_5$ kommt es zu keiner Beeinflussung der Enantiomerenreinheit durch die Folgereaktion.

Auf vollkommen analoge Weise beeinflussen die Folgereaktionen (k_4 - k_6) der Diglyceride (Abb. 62) die Ergebnisse bezüglich der Regioselektivität von Lipasen.

Eine fehlerfreie Bestimmung der Regio- und Enantioselektivität kann also nur gelingen, wenn die Folgereaktionen (k_4 - k_6) weitgehend ausgeschlossen werden können. Besonders geeignet ist die erste Phase der Umsetzung (Umsatz $\leq 5\%$). Hier überwiegt das Triglycerid deutlich gegenüber dem Diglycerid und ist gemäß der statistischen Wahrscheinlichkeit das bevorzugte Substrat.

Auf dieser Basis wurde von Rogalska und Verger die Regio- und Enantioselektivität von 25 Lipasen bestimmt (Rogalska E. 1993). Dazu wurden die Triglyceride Tricaprylin und Triolein

unter wässrigen Bedingungen mit der zu untersuchenden Lipase unter pH-Stat-Bedingungen (Autotitrator) inkubiert und die Hydrolyse bei einem Umsatz von 2% bzw. 5% abgebrochen. Die gebildeten Glyceridgemische wurden abgetrennt, mit (*R*)-Phenylethylisocyanat derivatisiert und mittels HPLC bestimmt (Rogalska E. 1993).

Unter diesen Bedingungen sind die Folgereaktionen weitgehend unbedeutend, doch unerwünschte Nebenreaktionen sind trotzdem nicht auszuschließen. Ein weiteres Problem liegt in der hohen „Mobilität“ der Acylgruppe in den Di- und Monoglyceriden. Der Fettsäurerest kann hierbei zwischen der primären und der sekundären Position (1,2-Acylgruppenwanderung) (Abb. 64) als auch zwischen den primären Positionen (1,3-Acylgruppenwanderung) wechseln (Abb. 65).

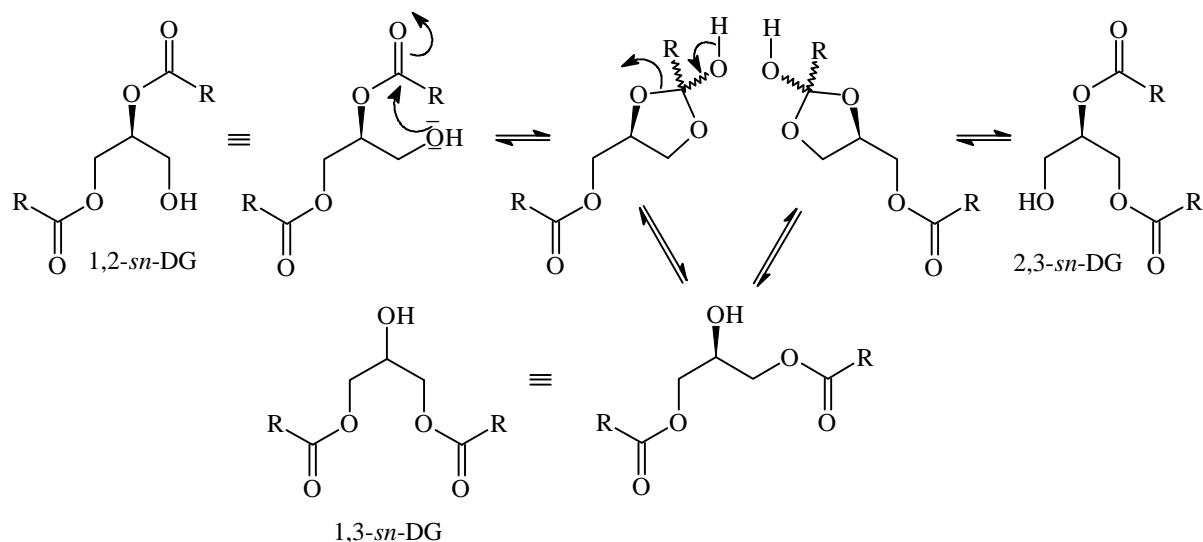


Abb. 64: 1,2-Acylgruppenwanderung ausgehend von einem 1,2-*sn* Diglycerid

Bei der 1,2-Acylgruppenwanderung wandert die Acylgruppe von der *sn*-2 in die *sn*-3 Position und liefert somit das regioisomere, achirale 1,3-Diglycerid. Bei der Rückreaktion werden das 1,2- und das 2,3-*sn*-Diglycerid mit gleicher Wahrscheinlichkeit gebildet, so daß letztendlich aus dem ursprünglich enantiomerenreinen Diglycerid eine Mischung aus dem racemischen 1,2(2,3)-*rac*- und dem achiralen 1,3-Diglycerid entsteht. Demgegenüber führt die 1,3-Acylgruppenwanderung ausschließlich zur Racemisierung ohne Bildung des regioisomeren Produktes (Abb. 65).

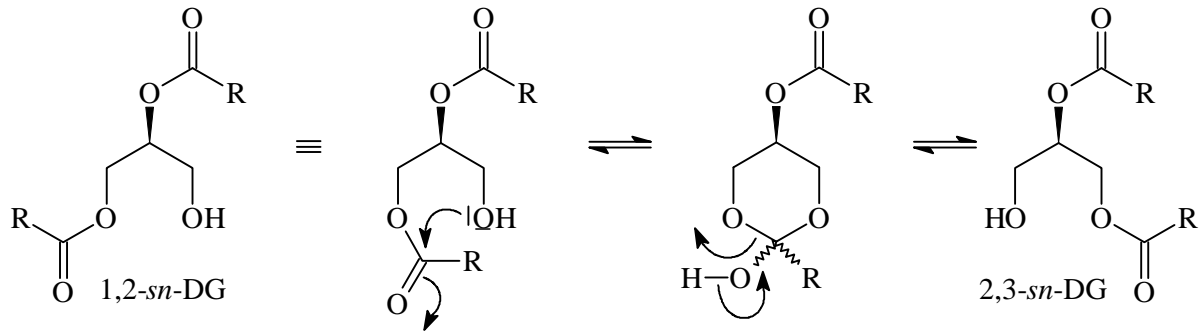


Abb. 65: 1,3-Acylgruppenwanderung ausgehend von einem 1,2-*sn*-Diglycerid

Bei der 1,3-Acylgruppenwanderung wird ebenfalls ein cyclischer Übergangszustand durchlaufen. Die Ringöffnung liefert mit gleicher Wahrscheinlichkeit das 1,2-*sn*- sowie das 2,3-*sn*-Diglycerid, wodurch das Racemat entsteht.

1,2-Acylgruppenwanderungen wurden am Beispiel von 1,3-*sn*-Dilaurin (sowie 1-*rac*-Monolaurin) von Berger eingehend untersucht (Berger M. 1993). Dabei wurde die Isomerisierung zum 1,2-*rac*-Dilaurin unter Variation des Lösungsmittels, der Temperatur oder unter Zusatz von Chemikalien wie Basen, Säuren, DCC, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, Ionenaustauscher, etc untersucht. Im thermodynamischen Gleichgewicht überwiegt das 1,3-*sn*-Dilaurin gegenüber dem 1,2-*rac*-Dilaurin mit 60:40. In protischen Lösungsmitteln wie a) Wasser und b) Methanol erfolgt die Isomerisierung demzufolge bereits bei Raumtemperatur (a) 3% bzw. b) 2% nach 24 h, a) 10% bzw. b) 6% nach 96 h). Dagegen ist das 1,3-*sn*-Diglycerid in aprotischen, organischen Lösungsmitteln weitgehend stabil ($\leq 1\%$ Isomerisierung nach 96 h in Hexan oder *tert.*-Butylmethylether) und isomerisiert erst unter Zusatz von Säuren, Basen oder aber bei höheren Temperaturen (Berger M. 1993). Auch die Stabilität von 1,2-*rac*-Di- und 2-*sn*-Monoglyceriden wurde untersucht (Kodali D. R. 1990, Mattson F. H. 1962, Crossley A. 1959). Dabei zeigte sich, daß diese Glyceride sowohl in Reinsubstanz als auch in Lösung leicht unter Acylgruppenwanderung isomerisieren und dies bereits bei Raumtemperatur. Die 1,3-Acylgruppenwanderung findet dagegen bei Raumtemperatur in protischen Lösungsmitteln nicht statt und wird erst nach Zusatz von Säuren bzw. Basen oder bei höheren Temperaturen beobachtet (Berger M. 1993).

Gut geeignete Analysenverfahren für die Bestimmung der Partialglyceride sind GC und HPLC. Die Glyceride müssen dazu jedoch in umlagerungsstabile Derivate überführt werden, da sonst leicht Acylgruppenwanderungen eintreten können. Die Bestimmung des Umsatzes und

der Regioselektivität kann mittels GC erfolgen, hierzu werden die freien Hydroxygruppen der Partialglyceride zuvor in die entsprechenden Trimethylsilylether überführt (Berger M. 1993). Für die Bestimmung der Enantioselektivität ist hingegen die HPLC die Methode der Wahl. Bewährt hat sich hier die Trennung der entsprechenden Urethane - gewonnen aus den Diglyceriden durch Umsetzung mit achiralen oder chiralen Isocyanaten - an geeigneten Säulen. Tab. 2 zeigt die für die Bestimmung der Enantioselektivität von Diglyceriden verwendeten Säulen und Derivatisierungsreagentien.

Tab. 2: Bestimmung der Enantioselektivität von Diglyceriden

Derivatisierungsreagenz	HPLC-Säule	Lit.
3,5-Dinitrophenylisocyanat	OA-4100 (chiral)	Tagaki T. 1987
R(+)-1-Phenylethylisocyanat	Si-60	Rogalska E. 1993

Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeiten wurde Tricaprylin enzymatisch hydrolysiert und die Triglyceridhydrolysate mit 3,5-Dinitrophenylisocyanat nach der Methode von Tagaki derivatisiert und bestimmt (Tagaki T. 1987).

5.1.2 Nachweis der Isomeren (1,2-*sn*; 2,3-*sn*; 1,3-*sn*)-Dicaprylin

Als Referenzsubstanzen wurde racemisches 1,2(2,3)-*rac*-Dicaprylin (Sigma) und "enantiomerenreines" 1,2-*sn*-Dicaprylin (Sigma) eingesetzt und in die entsprechenden 3,5-Dinitrophenylurethane überführt (**I.** und **II.** Abb. 66). Die Hydrolyse von Tricaprylin mit einer nicht regiospezifischen Lipase führt auch zur Bildung von 1,3-*sn*-Dicaprylin. 1,3-*sn*-Dicaprylin würde ebenfalls bei der Isomerisierung von 1,2(2,3)-*sn*-Dicaprylin (1,2-Acylgruppenwanderung) beobachtet werden. Es ist nicht kommerziell erhältlich, kann aber durch Acylierung von Glycerin im Gemisch mit den zwei anderen isomeren Diglyceriden erhalten und anschließend derivatisiert werden (**III.**; Abb. 66).

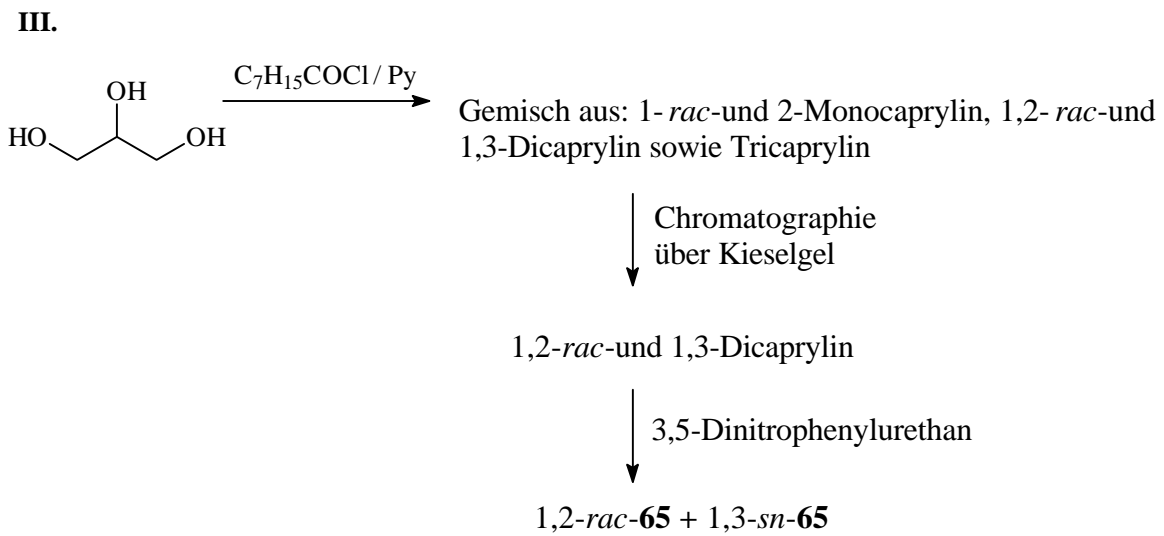
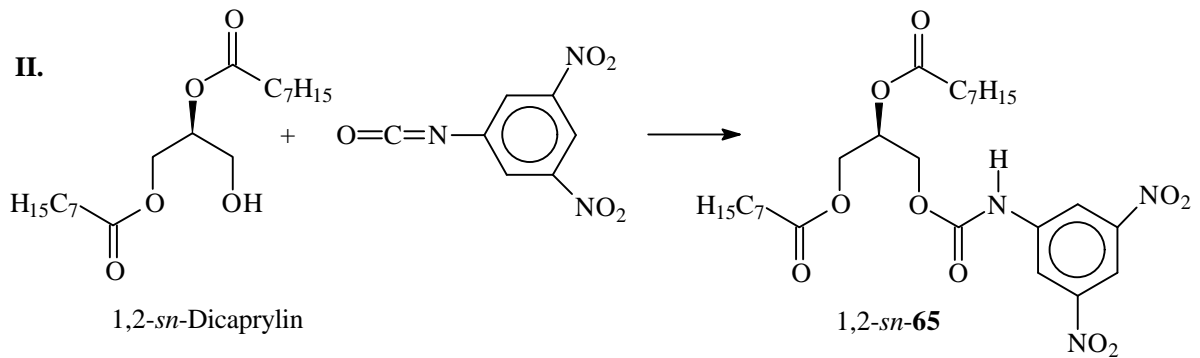
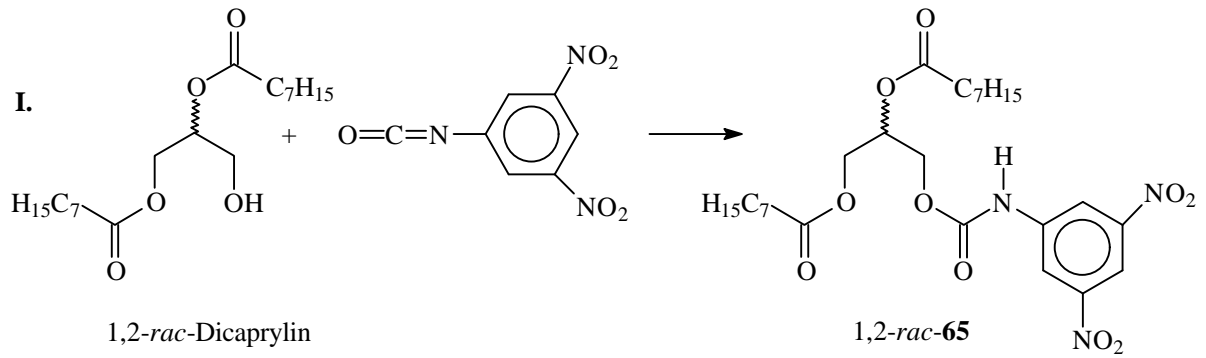


Abb. 66: Synthese der Referenzsubstanzen zur Bestimmung der Enantioselectivität von Lipasen

Die erhaltenen Produkte wurden mittels HPLC an der chiralen Phase OA-4100 getrennt (Abb. 67 a)-c)).

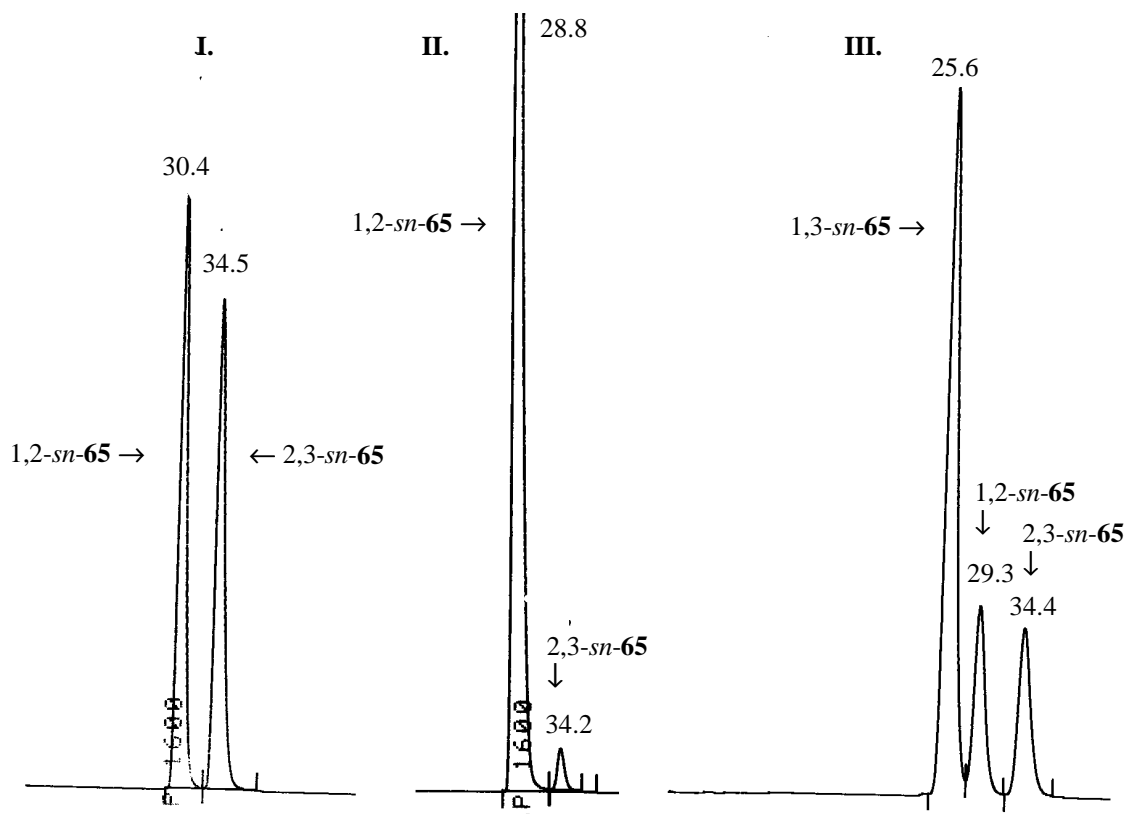


Abb. 67: Trennung von **I.** derivatisiertem 1,2-*rac*-Dicaprylin, **II.** 1,2-*sn*-Dicaprylin und **III.** einer Mischung der regioisomeren Diglyceride (1,3-*sn*-Dicaprylin und 1,2-*rac*-Dicaprylin). Säule: OA-4100

Trennbedingungen: *n*-Hexan: Methylenchlorid: *i*-Propanol = 80:20:1; flow = 0.75 ml/min; UV-Detektion bei $\lambda=254$ nm.

Die Enantiomeren und das 1,3-*sn*-Regioisomere werden unter diesen Bedingungen sehr gut getrennt. Die racemische Referenzsubstanz (*rac*-65) liefert nur die erwarteten zwei Signale im Verhältnis 50 : 50. Die Referenzsubstanz des 1,2-*sn*-Diglycerids ergab 97% von dem 1,2-*sn*-Enantiomer (1,2-*sn*-65) mit $R_t = 29.0$ min und 3% von dem 2,3-*sn*-Enantiomer (2,3-*sn*-65) mit $R_t = 34.2$ min (94% ee).

In Abb. 67; **III** überwiegt anteilmäßig deutlich das regioisomere 1,3-Diglycerid (1,3-*sn*-65). Diese Verbindung konnte in den vorherigen Proben nicht nachgewiesen werden, was für die Qualität der von Sigma gelieferten Referenzsubstanzen spricht. Das Mengenverhältnis der Signale beträgt hier 64 : 18 : 18 und entspricht damit ungefähr dem thermodynamischen Gleichgewicht zwischen 1,2-*rac*- und 1,3-*sn*-Diglycerid.

Diese Methode der Derivatisierung und Trennung von Diglyceriden nach Tagaki (Tagaki T. 1987) ist damit grundsätzlich für den Nachweis der Regio- und Enantioselektivität von Lipasen geeignet.

5.1.3 Bestimmung der **Regio-** und **Enantioselektivität** von Lipasen gegenüber Tricaprylin

Das zu untersuchende Enzym wurde in 800 µl Puffer pH= 7.0 gelöst und mit 200 µl einer 10 %igen Lösung von Tricaprylin in *tert*-Butylmethylether auf einem Eppendorfschüttler umgesetzt. Die Suspension wurde zweimal extrahiert und die vereinigten organischen Phasen für 10 min über Natriumsulfat getrocknet. Zur Bestimmung des Umsatzes wurde ein Teil der Probe gaschromatographisch (FID-Detektor) untersucht, wobei die ermittelten Werte mit den experimentell ermittelten Korrekturfaktoren (Triglycerid = 1.0; Diglycerid = 1.4; Monoglycerid = 2.5) korrigiert wurden. Die verbleibende Probensubstanz wurde mit einer Spatelspitze (4-10 mg) Dinitrophenylisocyanat derivatisiert und mittels HPLC an einer OA-4100 untersucht.

Zur Bestimmung der Meßfehler wurde die Hydrolyse von Tricaprylin mit der Lipase aus *Pseudomonas species* (Nr. 38; zur Nummerierung der Enzyme siehe Kap. 9.1) fünfmal durchgeführt. Die ermittelten Werte sind in Tab. 3 bzw. Abb. 68 dargestellt.

Tab. 3: Bestimmung des Meßfehlers

0.08 mg 38. <i>Pseudomonas species</i>	Zeit (min)	2,3- <i>sn</i> DG ee (%)	% DG	% MG
Nr. 1	15	94,8	11,5	0,9
Nr. 2	15	94,0	13,1	0,8
Nr. 3	15	91,6	13,7	1,0
Nr. 4	15	92,0	13,6	0,8
Nr. 5	15	92,6	13,2	1,1
Mittelwert $\pm \sigma_{n-1}$		93,0 \pm 1,4	13,0 \pm 0,9	0,9 \pm 0,1

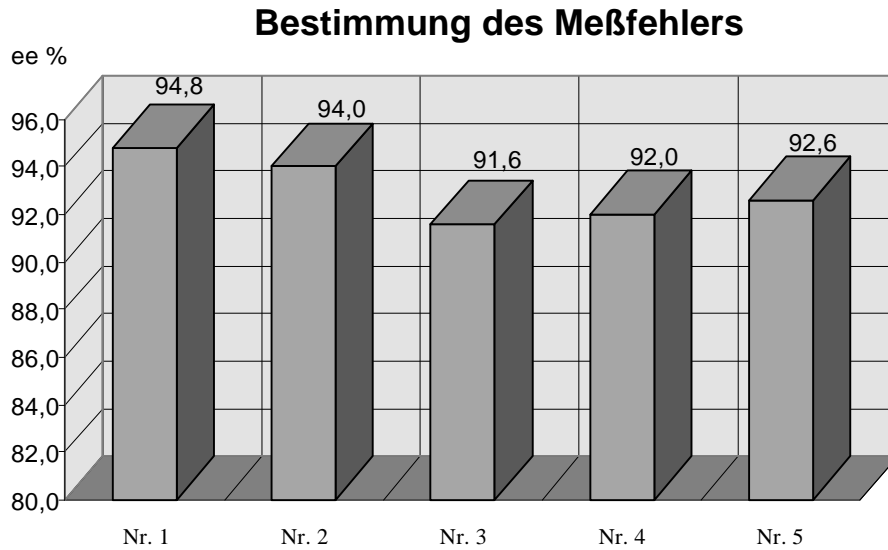


Abb. 68: Enantioselektivität der Lipase aus *Pseudomonas species* gegenüber Tricaprylin

Die Meßwerte sind also recht gut reproduzierbar. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß bei kleinen Hydrolyseraten $\leq 2\%$ der Meßfehler deutlich größer wird. Auch können andere Fehlerquellen auftreten. Die Hydrolyse kann nach der Beendigung des Schüttelvorganges weiter laufen, da zahlreiche Enzyme zur Bildung stabiler Emulsionen führen. Dadurch kann die Zeit, die zum Aufarbeiten der Probe (Zentrifugieren führt zur Phasentrennung und zum Abbruch der Reaktion) benötigt wird einen erheblichen Einfluß auf den Umsatz haben. Der Umsatz beeinflußt wiederum die Enantiomerenreinheit der Diglyceride und kann entsprechend Abb. 63 eine weitere Fehlerquelle bei der Bestimmung der EE-Werte darstellen.

Um eine Beeinträchtigung der Meßergebnisse durch Monoglyceridbildung zu verhindern, wurden die Hydrolysezeiten so gewählt, daß die Konzentration der Monoglyceride möglichst $\leq 2\%$ bleibt (Vorversuche).

In den nun beschriebenen Experimenten wurden insgesamt 44 Enzyme untersucht. Es handelt sich dabei hauptsächlich um extrazelluläre Lipasen aus Pilzen und Bakterien, sowie die Lipasen aus Schweinepankreas und zwei weitere Esterasen.

In der folgenden Tabelle sind die ermittelten Enantioselektivitäten sowie die Aktivitäten der einzelnen Enzyme in U/mg (μmol Umsatz/mg Enzym und Minute) zusammengestellt.

Tab. 4: Enantioselektivität von Lipasen gegenüber Tricaprylin

Enzym	mg	Zeit (min)	ee (%) ²⁾	% DG	% MG	Aktivität U/mg (µl)
1. <i>Arthrobacter species</i>	5	24 h	86,8 (1)	7,4	0,5	$4,7 \cdot 10^{-4}$
2. <i>Aspergillus niger</i>	7	24 h	67,6 (1)	1,9	-	$8,0 \cdot 10^{-5}$
3. <i>Aspergillus oryzae</i>	4	60	25,2 (1)	1,7	-	$3,0 \cdot 10^{-3}$
4. <i>Aspergillus sojae</i>	3	24 h	0,2 (3)	2,9	-	$2,9 \cdot 10^{-4}$
5. <i>Candida antarctica</i>	5	24 h	15,4 (3)	1,6	-	$9,4 \cdot 10^{-5}$
6. <i>Candida cylindracea</i>	2	60	14,2 (1)	1,3	-	$4,6 \cdot 10^{-3}$
7. <i>Candida cylindracea</i>	3	5	11,4 (3)	2,3	-	0,06
8. <i>Candida cylindracea</i> ¹⁾	2	15	5,6 (3)	3,4	-	0,05
9. <i>Candida species</i>	2	60	5,4 (1)	2,2	-	$7,8 \cdot 10^{-3}$
10. <i>Chromobacterium viscosum</i>	0,02	15	40,8 (3)	2,8	-	4,0
11. CLE aus <i>Candida cy.</i>	1	5	9,8 (3)	3,2	-	0,30
12. CLE aus <i>Candida cy.</i>	10 µl	15	4,4 (3)	3,1	-	$8,8 \cdot 10^{-3}$
13. CLE aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	2	15	21,0 (1)	6,3	0,1	0,09
14. Esterase 30000	1	5	87,8 (1)	4,0	-	0,34
15. <i>Humicola</i>	0,01	5	5,4 (1)	4,0	-	34
16. <i>Humicola lanuginosa</i>	2	30	23,4 (1)	11,9	1,3	0,09
17. Lipase 3A	8	60	86,4 (1)	2,9	-	$2,6 \cdot 10^{-3}$
18. Lipoproteinlipase	0,01	5	95,6 (1)	1,6	-	14
19. LPL aus <i>Pseudomonas sp.</i>	0,01	5	92,6 (1)	21,2	1,7	195
20. LPL aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	0,001	5	41,2 (1)	5,1	-	430
21. Lipoprotein <i>Pseudomonas</i> ¹⁾	1	2	91,6 (1)	4,5	-	0,96
22. Lipozym	0,3 µl	5	85,4 (1)	8,0	-	2,3
23. <i>Mucor javanicus</i>	0,1	60	55,2 (1)	13,3	0,2	0,96
24. <i>Mucor javanicus</i>	0,08	15	58,4 (1)	6,0	-	2,1
25. <i>Mucor miehei</i>	1	5	84,4 (1)	3,3	-	0,28
26. <i>Mucor miehei</i>	0,5	5	84,4 (1)	1,8	-	0,31
27. <i>Mucor miehei</i>	0,02	5	86,0 (1)	1,3	-	5,5
28. <i>Mucor miehei</i>	5	15	87,8 (1)	8,1	-	0,05

Enzym	mg	Zeit (min)	ee (%) ²⁾	% DG	% MG	Aktivität U/mg (µl)
29. <i>Mucor miehei</i> ¹⁾	1	5	81,6 (1)	3,2	-	0,27
30. Pancreas	3	15	2,2 (3)	4,6	0,3	0,05
31. Pantolactonesterase	2	24 h	82,8 (1)	5,5	-	8,4*10 ⁻⁴
32. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,02	15	92,6 (1)	2,5	-	3,5
33. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,02	15	75,4 (1)	3,2	-	4,5
34. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,2	20	96,6 (1)	9,6	-	1,0
35. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	1	5	87,4 (1)	1,3	-	0,11
36. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	1	5	84,0 (1)	14,6	0,9	1,3
37. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	2	2	86,4 (1)	4,9	-	0,52
38. <i>Pseudomonas species</i>	0,08	15	92,0 (1)	13,6	0,8	5,1
39. <i>Rhizopus arrhizus</i>	0,001	5	46,6 (1)	25,9	1,5	230
40. <i>Rhizopus delemar</i>	0,25	15	43,8 (1)	4,1	-	0,46
41. <i>Rhizopus javanicus</i>	2	15	50,4 (1)	36,9	7	0,62
42. <i>Rhizopus niveus</i>	3	30	46,8 (1)	3,7	-	0,02
43. Schweinepankreas	0,4	15	9,2 (3)	11,4	0,9	0,87
44. Schweinepankreas PPL	2	5	0,0	2,6	-	0,11

¹⁾ immobilisiert; ²⁾ Hydrolyse in der Position *sn*-(1 oder 3)

Damit die Ergebnisse übersichtlicher dargestellt und besser interpretiert werden können, wurde folgende Unterteilung vorgenommen. Unterschieden wurde nach dem Ursprung des Enzyms (Bakterienstamm, Pilz, Pankreas, ...) dargestellt in Abb. 69. Zudem sind in Tab. 4 zahlreiche Enzyme (z.B. aus *Pseudomonas fluorescens*) mehrfach aufgeführt. Dies bedeutet, daß sie entweder von unterschiedlichen Anbietern (z.B. Amano, Novo, Boehringer Mannheim,...) stammen oder sich in der Verarbeitungsform (nativ, gelöst oder immobilisiert) unterscheiden. Der Vergleich der Enantioselektivität in Bezug auf den Anbieter oder der Verarbeitungsform kann Rückschlüsse auf die Qualität der Enzyme liefern und ist dargestellt in Abb. 70.

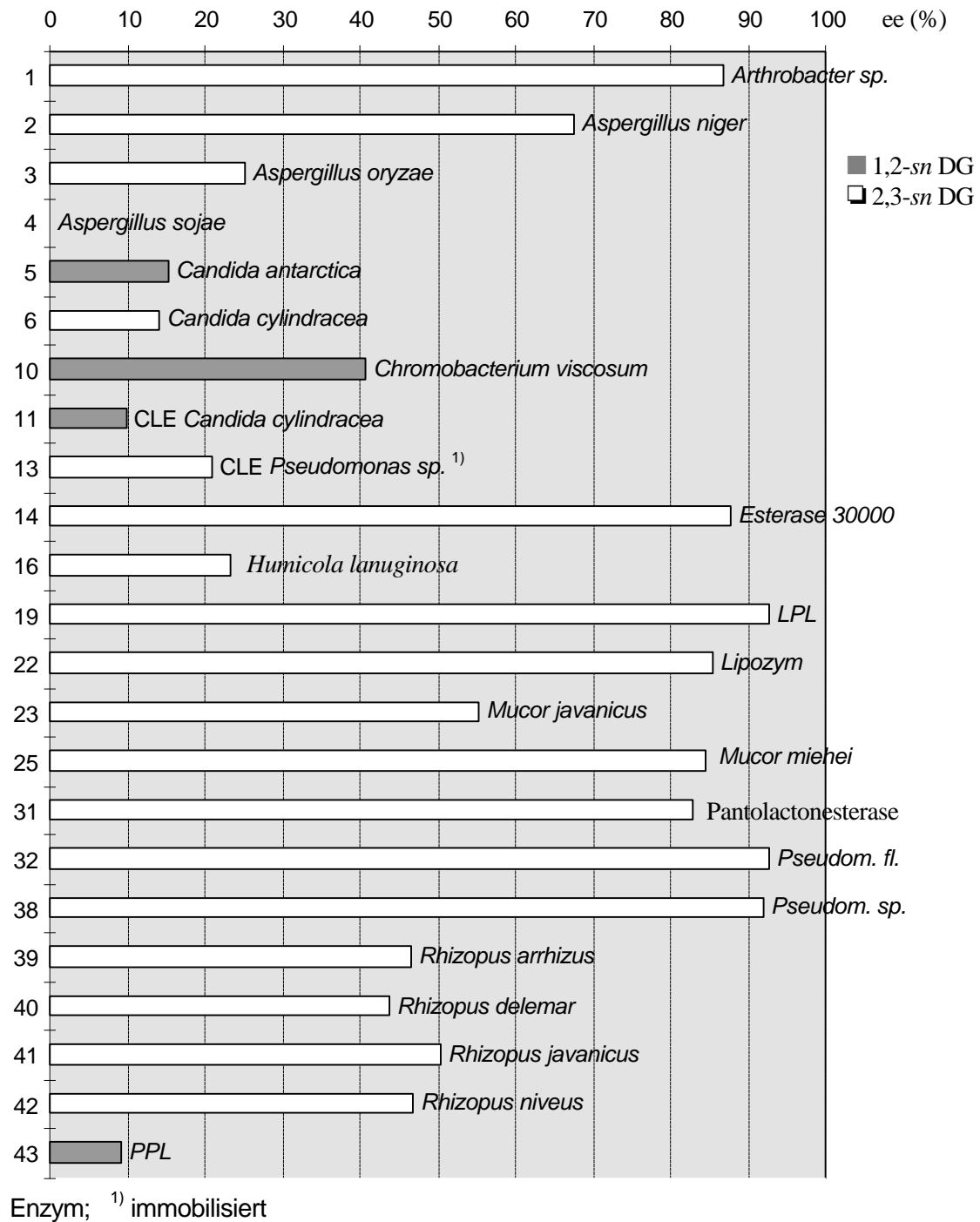


Abb. 69: Enantioselektivitäten unterschiedlicher Lipasen

Bis auf wenige Ausnahmen hydrolysieren die Lipasen bevorzugt die Acylgruppe in der *sn*-1 Position, es wird somit das 2,3-*sn*-Dicaprylin gebildet. Lediglich eine Lipase aus *Chromobacterium viscosum* zeigt eine signifikant stärkere Aktivität gegenüber der *sn*-3 Position.

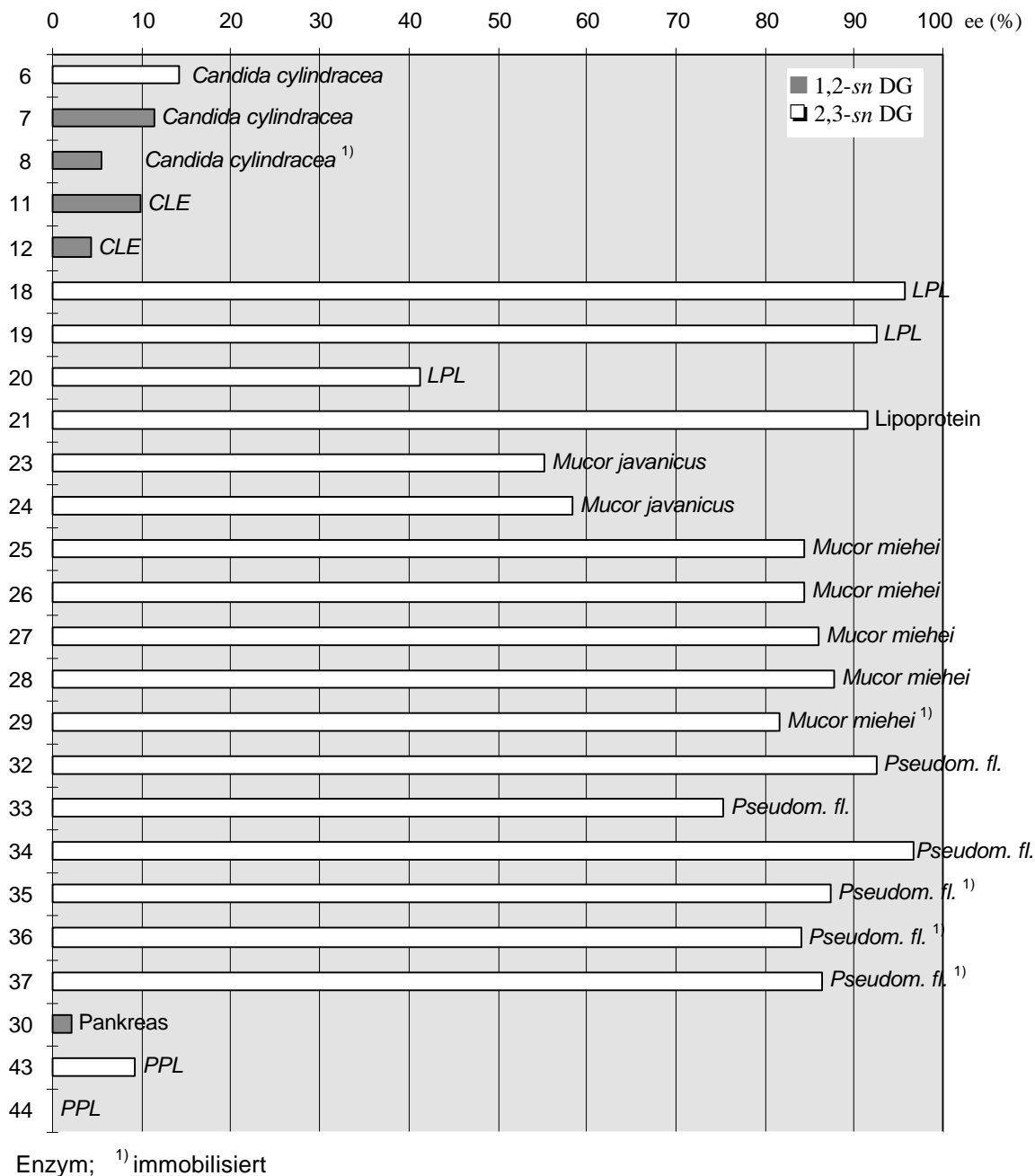


Abb. 70: Enantioselektivitäten von Lipasen - geordnet nach Anbieter bzw. Verarbeitungform

Prinzipiell verhalten sich die Enzyme unterschiedlicher Anbieter ähnlich, so zeigen z. B. die Lipasen aus Pankreas von Röhm (Nr. 30), von Fluka (Nr. 43) und von Sigma (Nr. 44) keine Selektivität. Auch die Lipasen aus *Candida cylindracea* von Amano (Nr. 6) und Boehringer Mannheim (7) u. (8), sowie die Cholinesterasen Nr. 11 und 12 jeweils von Boehringer Mannheim, zeigen keine Selektivität. Die Lipasen aus *Mucor javanicus* (Amano Nr. 23, Röhm Nr. 24) zeigen beide eine mittlere Selektivität. Sehr gut vergleichbar sind die durchweg hohen Enantioselektivitäten der Lipase aus *Mucor miehei* von Fluka (Nr. 25), Novo (Nr. 26, 27, 29)

und Gist-Brocades (Nr 28). Sehr gute Enantioselektivitäten zeigen die Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens*. Die Enzyme Nr. 32, 35, 36 und 37 werden von Amano angeboten, Nr. 33 und 34 stammen von Röhm. Interessant ist, daß bei den Amano Enzymen unterschiedliche Trägermaterialien zur Immobilisierung verwendet wurden, Toyonite -200-P bei Nr. 35, Diatomeenerde bei Nr. 36 und Kieselgur bei Nr. 37. Ein Einfluß auf die Enantioselektivität zeigt sich hingegen nicht. Auffällig bei den Lipoproteinlipasen ist die sehr gute Selektivität der Amano Lipasen (Nr. 18, 19, 21) und die deutlich schlechtere Selektivität des Boehringer Enzyms (Nr. 20).

Die Enantioselektivität wird vielfach durch zahlreiche Faktoren wie Lösungsmittel, Cosolventien, Temperatur und pH-Wert beeinflusst. Daher wurde die Hydrolyse von Tricaprylin auch ohne Lösungsmittel bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Auch wurde der Zusatz unterschiedlicher Lösungsmittel wie Hexan, *tert.*-Butylmethylether, Methylenchlorid, Aceton und THF bei pH= 7.0 untersucht. Die Ergebnisse der Hydrolysen mit einer Lipase aus *Pseudomonas species* (Nr. 38) sind in Tab. 5 und Abb. 72 dargestellt.

Tab. 5: Einfluß des Lösungsmittels (200 µl) und des pH- Wertes auf Aktivität, Enantioselektivität und Produktverhältnis der Hydrolyse von Tricaprylin mit einer Lipase aus *Pseudomonas species* (Nr. 38)

Lösungsmittel	Puffer	Zeit (min)	2,3- <i>sn</i> DG ee (%)	% DG	% MG
-	pH = 7.0	15	58,0	26.2	10.7
-	pH = 7.0	5	79,0	13.2	1.0
<i>n</i> -Hexan	pH = 7.0	15	52,6	13.6	8.7
<i>tert.</i> -Butylmethylether	pH = 7.0	15	94,8	11.5	0.9
Methylenchlorid	pH = 7.0	15	-	-	-
50% THF,	pH = 7.0	15	-	0.7	-
50% Aceton,	pH = 7.0	15	94,0	11.9	1.2
-	pH = 5.0	5	84,6	7.7	-
-	pH = 6.0	5	81,4	5.4	1.0
-	pH = 7.0	5	79,0	13.2	1.0
-	pH = 8.0	5	80,0	11.1	0.9

Enantioselektivität - Lösungsmiteleinflüsse

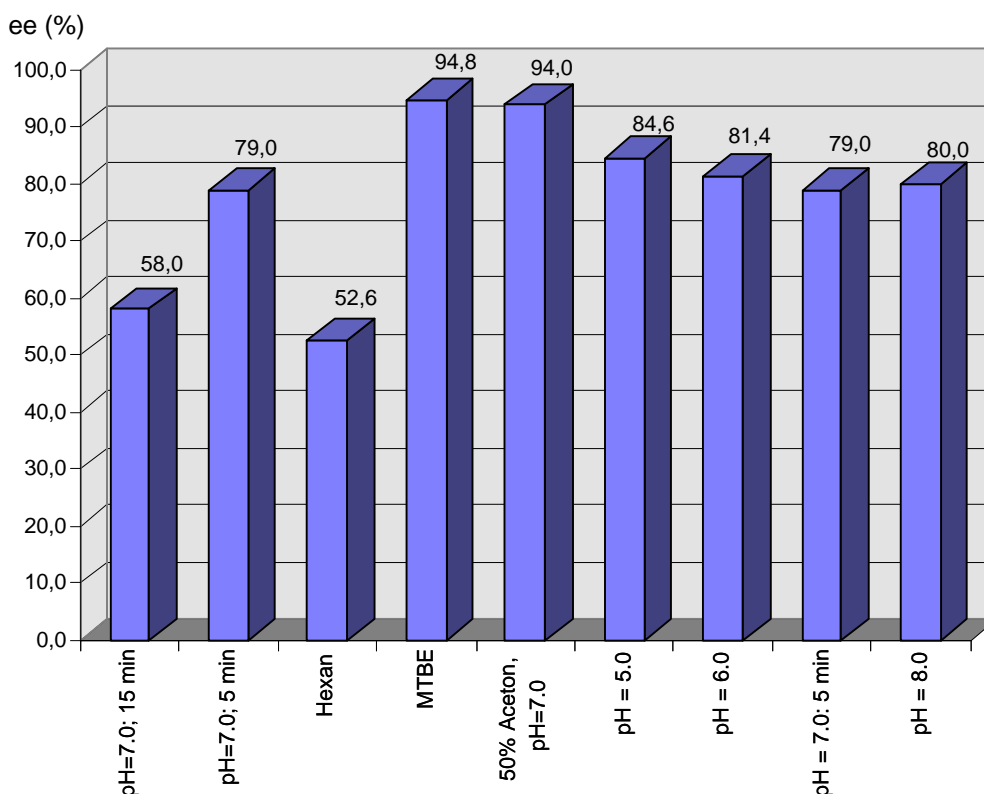


Abb. 71: Einfluß des Lösungsmittels und des Puffers auf die Enantioselektivität der Hydrolyse mit einer Lipase aus *Pseudomonas species* (Nr. 38)

Die Zugabe von Methylenchlorid und THF führt zu einer fast vollständigen Desaktivierung des Enzyms (Tab. 5). Weiterhin fällt auf, daß mit der Zunahme von Monoglycerid die Enantiomerenreinheit des Diglycerides sinkt, so wird nach 15 Minuten Reaktionszeit unter neutralen Reaktionsbedingungen ohne Lösungsmittelzusatz nur noch ein EE-Wert von 58.0 % (10.7 % MG) gemessen, gegenüber 79.0 % (1.0 % MG) nach 5 Minuten Reaktion. Demzufolge wird das 2,3-*sn*-Dicaprylin von der Lipase schneller als das enantiomere 1,2-*sn*-Dicaprylin umgesetzt. Dies erklärt auch die geringe Enantioselektivität bei der Hydrolyse des Triglycerids in Gegenwart von *n*-Hexan als Lösungsmittel. Offensichtlich wird in *n*-Hexan (unpolar) das Hydrolyseprodukt 2,3-*sn*-Dicaprylin schneller als das Triglycerid umgesetzt. Das Verhältnis von Monoglycerid zu Diglycerid ist mit 8.7 zu 13.6 zunächst unerwartet hoch. Verständlich wird dieses Resultat wenn man die Eigenschaften des Systems Wasser/Hexan/Substrate näher betrachtet (Abb. 72).

Wasser

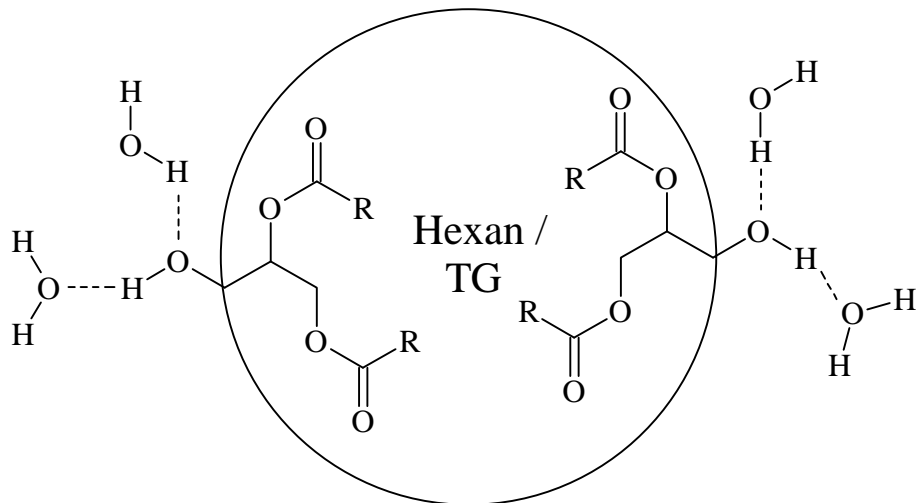


Abb. 72: Eigenschaften des Systems Wasser/Hexan/Substrat

Tricaprylin und *n*-Hexan sind jeweils sehr hydrophob, wasserunlöslich und gut miteinander mischbar. Durch Hydrolyse von Tricaprylin (TG) wird das deutlich polarere Dicaprylin gebildet. Die Wasserlöslichkeit von Dicaprylin ist aufgrund der hydrophoben Acylgruppen jedoch gering. Dies führt dazu, daß sich Dicaprylin bevorzugt in der Phasengrenzfläche anreichert, da die hydrophile Hydroxygruppe dort durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden kann, während sich die hydrophoben Acylgruppen in der Hexanphase befinden. Die Aktivität des Enzyms wird wesentlich durch die Phasengrenzfläche beeinflusst. Da in dem Lösungsmittel Hexan die Konzentration an Diglycerid in der Phasengrenzfläche besonders hoch ist, wird das Diglycerid schneller hydrolysiert.

Der gleiche Versuch wurde mit der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (Nr. 10) durchgeführt, da diese Lipase als einzige bevorzugt das *sn*-1,2-Diglycerid bildete. Dargestellt sind die Ergebnisse in Tab. 6 und Abb. 73.

Tab. 6: Einfluß des Lösungsmittels und des Puffers auf Aktivität, Enantioselectivität und Produktverhältnis der Hydrolyse mit 0.06 mg Lipase aus *Chromob. viscosum* (Nr. 10)

Lösungsmittel / Puffer	Zeit (min)	<i>sn</i> -1,2-DG ee (%)	% DG	% MG
ohne Lösungsmittel	15	34,0	37.3	11.7
ohne Lösungsmittel	5	17,6	8.0	0.4
<i>n</i> -Hexan	15	51,0	12.0	1.8
<i>tert.</i> -Butylmethylether	15	30,8	14.2	0.9
Methylenchlorid	15	-	-	-
50% THF, pH=7.0	15	-	0.5	-
50% Aceton, pH=7.0	15	5,0	9.4	-
Puffer pH = 5.0	5	14,6	6.6	-
Puffer pH = 6.0	5	6,8	5.4	-
Puffer pH = 7.0	5	17,6	8.0	0.4
Puffer pH = 8.0	5	23,0	19.6	1.2

Enantioselectivität - Lösungsmiteleinflüsse

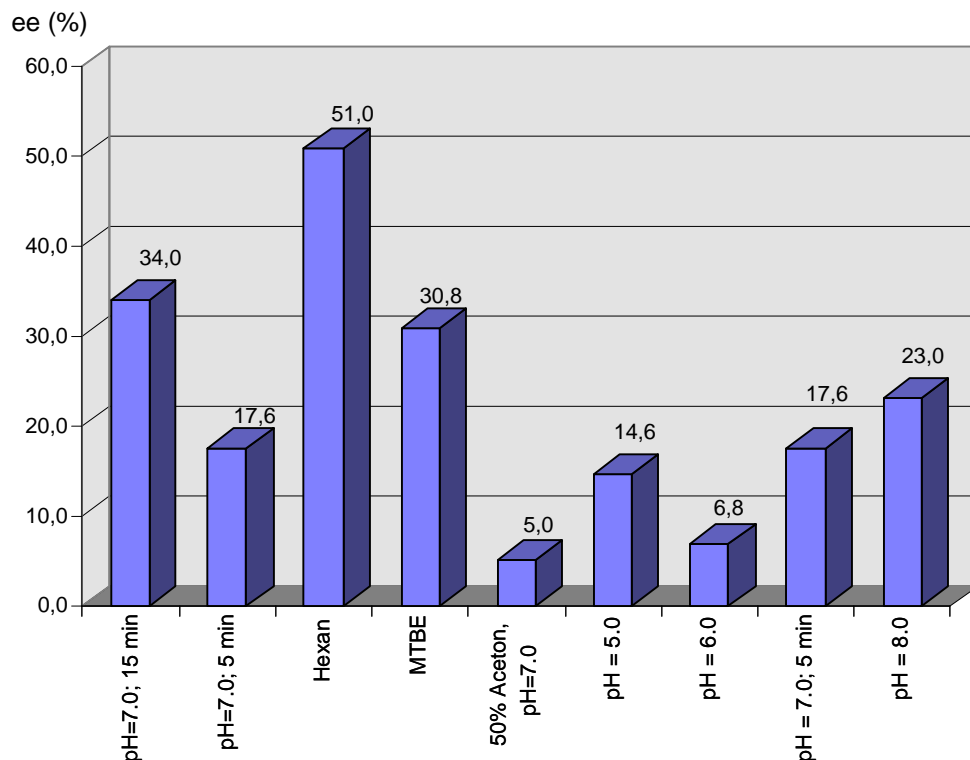


Abb. 73: Einfluß des Lösungsmittels und des Puffers auf die Enantioselectivität der Hydrolyse mit einer Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (Nr. 10)

Bemerkenswert ist der deutliche Anstieg der Enantioselektivität in Gegenwart von *n*-Hexan. In den Lösungsmitteln Methylenchlorid und THF verliert die Lipase ebenfalls ihre Aktivität (Tab. 6). Die Lösungsmiteleinflüsse zeigen ansonsten jedoch ein deutlich abweichendes Verhalten gegenüber der Lipase aus *Pseudomonas species*. So führt z.B. hier die Bildung von Monoglycerid zu einem höheren EE-Wert. Zur besseren Übersicht sind in Abb. 74 die Enantioselektivitäten der beiden Hydrolyseversuche gegenübergestellt.

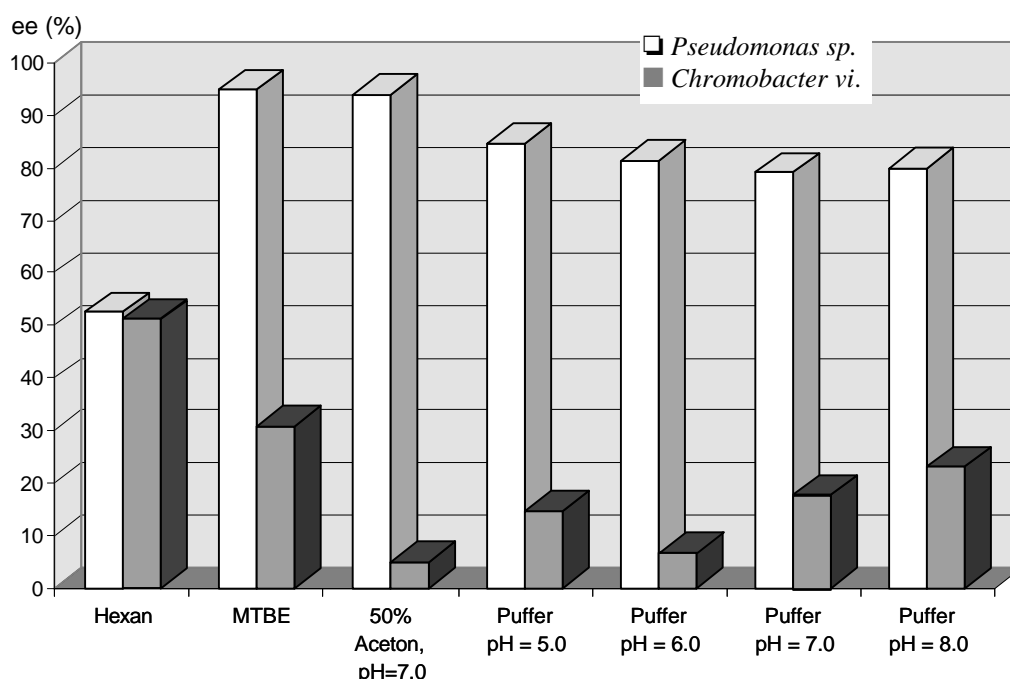


Abb. 74: Einfluß der Reaktionsbedingungen auf die Enantioselektivität zweier Lipasen

Die Lipase aus *Pseudomonas species* hat in *n*-Hexan die niedrigste Selektivität, die aus *Chromobacterium viscosum* die höchste. Sehr hohe Selektivität weist die Lipase aus *Pseudomonas species* in 50%igem Aceton auf, die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* weist unter diesen Bedingungen praktisch keine Selektivität auf. Keine pH-Abhängigkeit des EE-Wertes wurde bei der Lipase aus *Pseudomonas species* gefunden, die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* zeigt hingegen eine signifikante Abhängigkeit der EE-Werte vom pH-Wert.

In der Abb. 75 ist die Bildung der Di- und Monoglyceride unter den jeweiligen Reaktionsbedingungen für beide Enzyme gegenübergestellt.

Lösungsmiteleinfluß auf das DG-/MG- Verhältnis

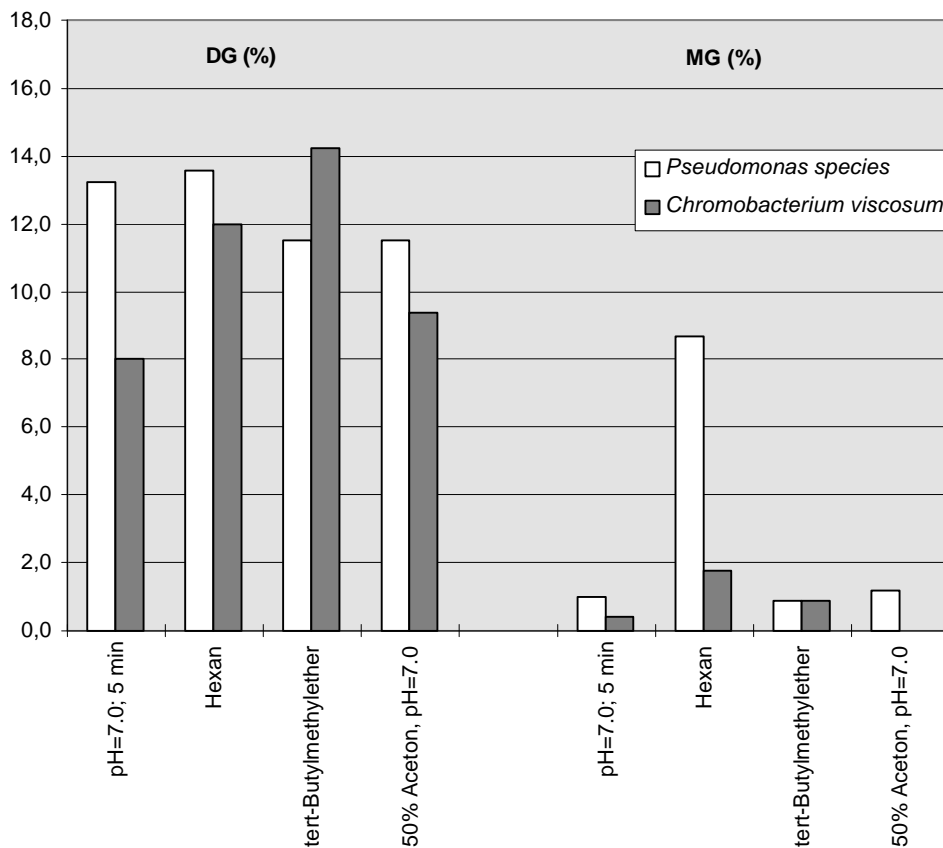


Abb. 75: Bildung von Di- und Monoglycerid zweier Lipasen unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen

Auffällig ist die bereits beschriebene Zunahme an Monoglycerid bei der Hydrolyse in Gegenwart der Lipase aus *Pseudomonas species*. Dieser Effekt wird auch bei der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* beobachtet, ist hier jedoch nicht so deutlich ausgeprägt. Vermutlich ist für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* das Triglycerid ein deutlich besseres Substrat als das Diglycerid.

In der folgenden Abbildung ist die Aktivität (Summe aus Di- und Monoglycerid) der zwei Lipasen bei unterschiedlichen pH-Werten dargestellt.

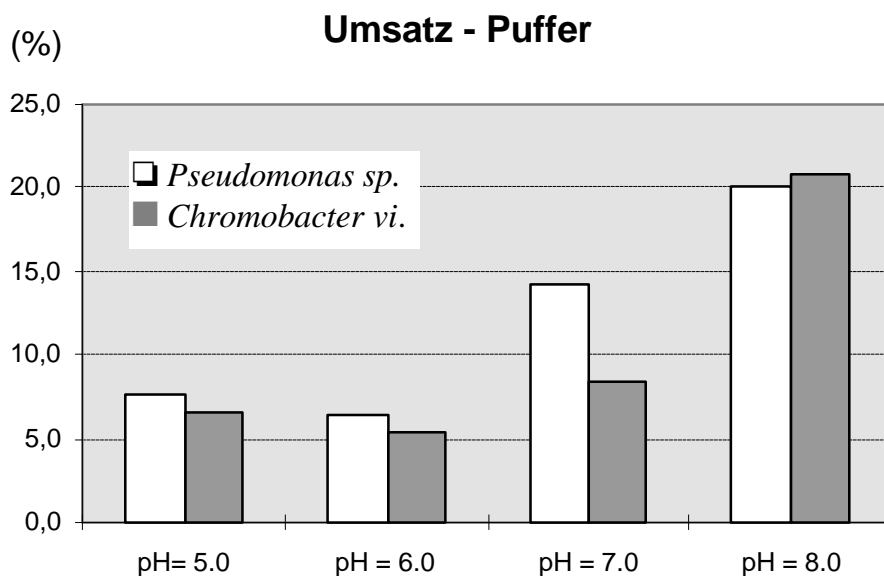


Abb. 76: Abhängigkeit des Umsatzes vom pH-Wert

Ein hoher pH-Wert (pH = 8.0) beschleunigt die lipasekatalysierte Hydrolyse. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen anderer Arbeitskreise überein, wonach freie Fettsäuren Lipasen inhibieren können.

Rückblickend auf die hier vorgestellten Daten stellen sich noch zwei Fragen.

- Sind einige der untersuchten Enzyme zur präparativen Darstellung von enantiomerenreinen 2,3-*sn*-Diglyceriden geeignet ?
- Treten beim Aufarbeiten der Hydrolysate oder unter den Derivatisierungsbedingungen Acylgruppenwanderungen auf ?

Zur Beantwortung der ersten Frage wurde gemäß Tab. 4 das Enzym ausgewählt, welches die höchste Enantioselektivität gegenüber Tricaprylin aufwies (Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* Nr. 34). Mit diesem Enzym wurde die Enantioselektivität in Abhängigkeit vom Reaktionsumsatz untersucht. Dazu wurden identische Reaktionsansätze nach unterschiedlichen Reaktionszeiten abgebrochen. Dargestellt sind die Ergebnisse in Tab. 7 und Abb. 77.

Tab. 7: Einfluß der Reaktionszeit (des Umsatzes) auf die Enantiomerenreinheit von 2,3-*sn*-DG; Lipase: *Pseudomonas fluorescens* (Nr. 34).

Nr.	Enzym	mg	Zeit (min)	2,3- <i>sn</i> -DG ee (%)	% DG	% MG
34	<i>Pseudomonas fl.</i>	0.2	10	97,2	6.6	-
34	<i>Pseudomonas fl.</i>	0.2	20	96,6	9.6	-
34	<i>Pseudomonas fl.</i>	0.2	40	94,0	27.8	3.5
34	<i>Pseudomonas fl.</i>	0.2	90	82,2	49.8 ¹⁾	32.6

¹⁾ 1.2% 1,3-*sn*-Dicaprylin

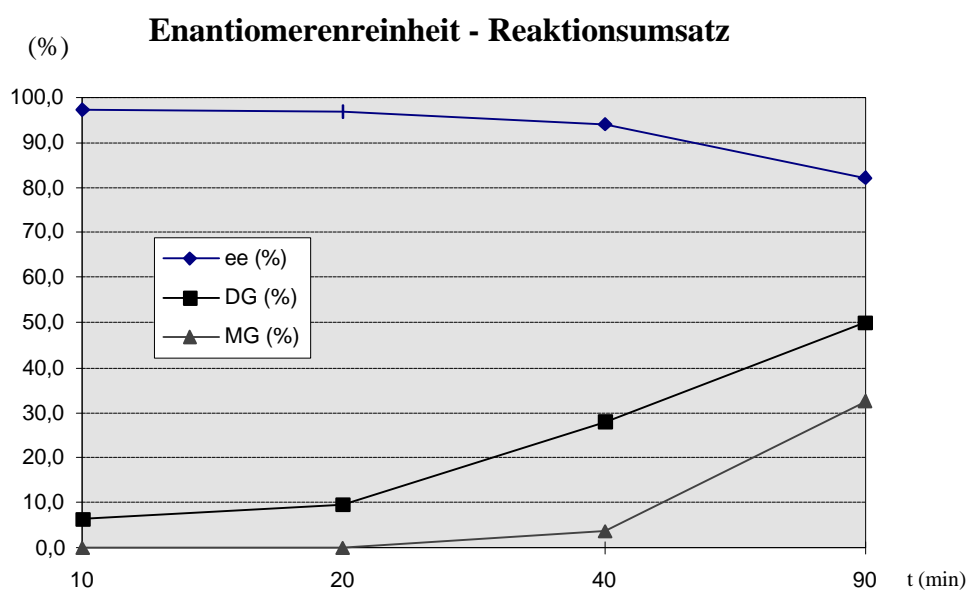


Abb. 77: Einfluß der Reaktionszeit (des Umsatzes) auf den EE-Wert von 2,3-*sn*-DG; Lipase: *Pseudomonas fluorescens* (Nr. 34)

Die Enantiomerenreinheit des 2,3-*sn*-Diglycerids sinkt mit zunehmender Monoglyceridbildung. Es ist also mit diesem Enzym nicht möglich in präparativen Mengen enantiomeren-reines 2,3-*sn*-Dicaprylin durch Hydrolyse von Tricaprylin zu gewinnen.

Die zweite Frage kann in sofern beantwortet werden, als daß in den untersuchten Proben bis auf eine Ausnahme (s. Tab. 7) kein 1,3-*sn*-Dicaprylin gefunden wurde. Demzufolge sind bei der enzymatischen Hydrolyse und bei der Derivatisierung keine Acylgruppenwanderungen aufgetreten. Zudem zeigte das 2,3-*sn*-Dicaprylin eine höhere Stabilität als erwartet. Eine Hydrolyseprobe der Lipase aus *Pseudomonas fluorescens* (Nr. 34), die erst nach 24 stündigem Stehen bei Raumtemperatur derivatisiert wurde, enthielt ebenfalls kein 1,3-Dicaprylin. Der EE-

Wert der Probe betrug 96.5% und entsprach damit dem erwarteten Betrag beim Einsatz von 0.2 mg Enzym und einer Reaktionszeit von 20 Minuten.

5.1.4 Vergleich der Ergebnisse mit Literaturdaten

Die Enantioselektivität von 25 unterschiedlichen Lipasen gegenüber Tricaprylin wurde von Rogalska E. (1993) beschrieben. Rogalska untersuchte die Hydrolyse bei 37°C unter pH-Stat Bedingungen bei 2% bzw. 5% Umsatz. Die Hydrolysate wurden mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat derivatisiert und mittels HPLC an einer Si-60 Säule getrennt. Cosolventien wurden bei der enzymkatalysierten Hydrolyse nicht verwendet. Die pH-Stat Methode hat den Vorteil, daß der Reaktionsumsatz direkt verfolgt werden kann, andererseits werden relativ große Substanzmengen benötigt.

Folgende der verwendeten Enzyme wurden ebenfalls von Rogalska E. untersucht (Tab. 8).

Tab. 8: Vergleich der Enantioselektivitäten mit Literaturwerten

Enzym	Umsatz (%)	ee (%)	ee(%) ¹⁾	ee(%) ²⁾	Diglycerid
10. <i>Chromobacterium viscosum</i>	2,8	30,8	34,0	33,1	1,2- <i>sn</i>
18. Lipoproteinlipase	1,6	95,6	93,8	94,2	2,3- <i>sn</i>
26. <i>Mucor miehei</i>	1,8	84,4	92,9	90,1	2,3- <i>sn</i>
27 <i>Mucor miehei</i>	1,3	86,0	92,9	90,1	2,3- <i>sn</i>
32. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,5	92,6	91,4	93,8	2,3- <i>sn</i>
34 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	9,6	96,6	91,4	93,8	2,3- <i>sn</i>
38. <i>Pseudomonas species</i>	13,6	92,0	100	100	2,3- <i>sn</i>
44. Schweinepankreas Lipase	2,6	0,0	3,1	0,3	1,2- <i>rac</i>
5. <i>Candida antarctica</i> B	1,6	15,4	100	100	2,3- <i>sn</i> ³⁾

¹⁾ Literaturwert bei 2% Umsatz; ²⁾ Literaturwert bei 5% Umsatz; ³⁾ Literaturwert: 1,2-*sn*

Die in dieser Arbeit ermittelten Enantioselektivitäten der Lipasen zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten. In den aufgeführten Beispielen wurde weder von E. Rogalska noch von uns 1,3-*sn*-Dilaurin gefunden. Für die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* wurde eine mittlere Selektivität gegenüber der *sn*-3 Position festgestellt. Die Lipasen aus *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas species* und Lipoproteinlipase zeigen jeweils eine hohe Selektivität gegenüber der *sn*-1 Position. Keine Selektivität zeigt die

Schweinepankreaslipase. Eine deutliche Abweichung ergab sich bei der Lipase aus *Candida antarctica* B. Es wurde eine äußerst geringe Selektivität gegenüber der *sn*-1 Position gefunden, laut Literatur sollte sie aber zu 100% *sn*-3 selektiv sein.

5.2 Regio- und Enantioselektivität von Lipasen gegenüber isosteren Triglyceriden

5.2.1 Einleitung

Die Bestimmung der Regio- und Enantioselektivität von Lipasen gegenüber natürlichen Triglyceriden ist grundsätzlich problematisch (Kap. 5.1.1). Hauptprobleme sind die Racemisierung sowie Isomerisierung der Reaktionsprodukte durch 1,2-Acylgruppenwanderungen (s. Kap. 5.1.1, Abb. 64). Diese können während der enzymatischen Hydrolyse, aber auch während der Isolierung oder Charakterisierung der Partialhydrolysate auftreten.

Daher sind vergleichende Untersuchungen an isosteren Verbindungen, wie z.B. den in Abb. 78 gezeigten Ether- und Ketoglyceriden, deren Partialhydrolysate keine labile Acylgruppe in der *sn*-2 Position besitzen, grundsätzlich interessant.

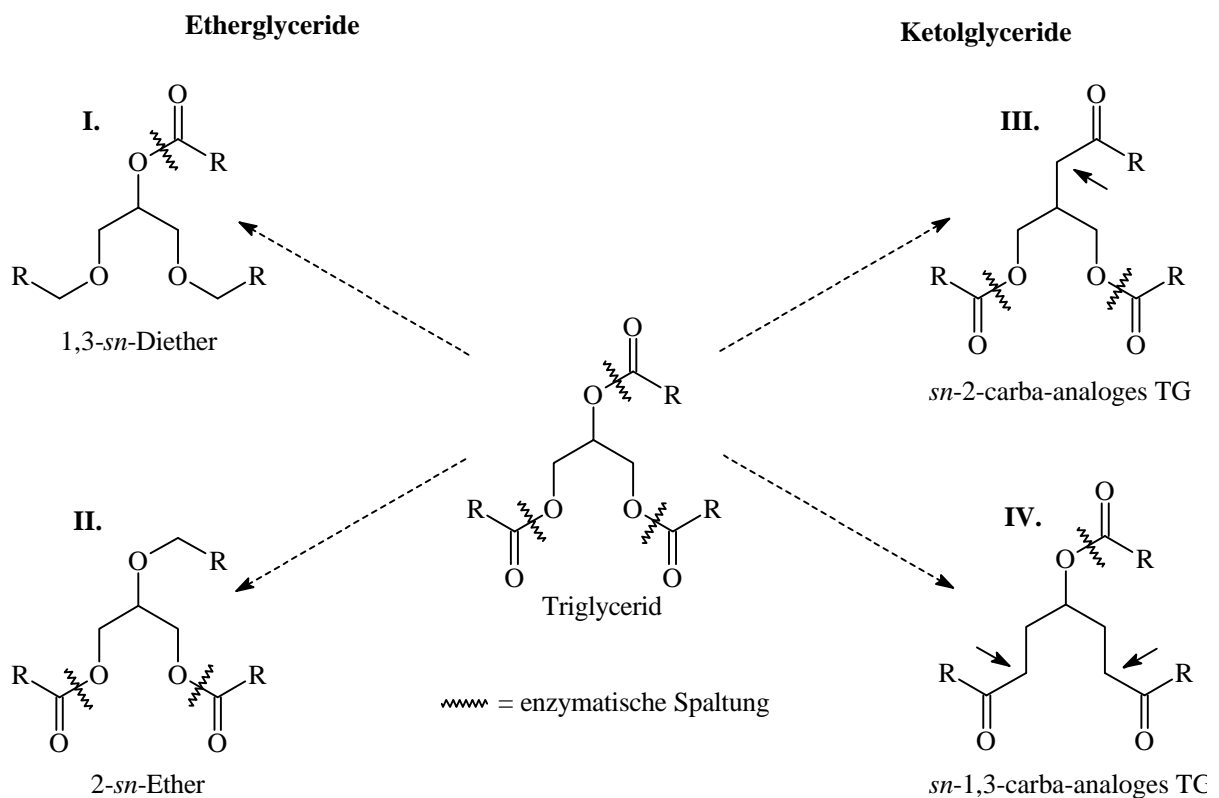


Abb. 78: Modellverbindungen für Triglyceride

In den Modellglyceriden **I-IV** ist die Zahl der enzymatischen Spaltpositionen eingeschränkt, wodurch natürlich auch 1,2-Acylgruppenwanderung ausgeschlossen werden können. Bei den Modellglyceriden können einerseits a) Etherglyceride (**I-II**; Paltauf F. 1984), sowie b) Ketoglyceride (**III-IV**; Berger M. 1993, 1994) unterschieden werden. Beide Substanzgruppen eignen sich grundsätzlich zur Bestimmung der Regio- und Enantioselektivitäten von Lipasen. Eine Lipase ist regioselektiv, wenn die Analoga **I** bzw. **III** - mit der Acylgruppe in der *sn*-2 Position - nicht umgesetzt werden während die Analoga **II** bzw. **IV** als Substrate akzeptiert werden. Die Lipase ist enantioselektiv, wenn mit hoher Selektivität nur eine der Acylgruppen in den Analoga **II** bzw. **IV** hydrolytisch gespalten wird.

Zunächst stellt sich die grundsätzliche Frage, ob und inwieweit Änderungen am Substrat von der Lipase toleriert werden. Diesbezüglich scheinen die Etherglyceride (**I** u. **II**) keine geeigneten Modellsubstrate zu sein. M. Berger stellte nach dem Verfahren von B. Borgström (1977) fest, daß die Pankreaslipase eine deutlich höhere Affinität zu Triglyceriden als zu den Etherglyceriden aufweist. Andererseits konnte er auch zeigen, daß die carba-analogen Triglyceride **III-IV** mit $R=C_3H_7$ ($R=C_7H_{15}$) eine vergleichbar hohe Affinität gegenüber Pankreaslipase besitzen. Auch die Hydrolyse und Alkoholyse von Tricaprylin und dem carba-analogen Tricaprylin wiesen laut Berger gleiche Umsatzraten auf (Berger M. 1993, 1994). Daraus könnte man schließen, daß carba-analoge Triglyceride ideale Modellsubstrate für die Untersuchung von Lipaseeigenschaften darstellen. Ungeklärt blieb jedoch bislang, ob die Substitution des Sauerstoffatoms in der *sn*-2 Position von Triglyceriden durch eine Methylengruppe (**III**) einen „signifikanten“ Einfluß auf die Enantioselektivität von Lipasen hat, und wenn ja in welcher Form ?

In den folgenden Untersuchungen wurde daher die Enantioselektivitäten zahlreicher Lipasen gegenüber dem carba-analogen Tricaprylin **11** bestimmt.

Bei der enzymatischen Hydrolyse solcher carba-analogen Triglyceride können zwei enantiomere Partialhydrolysate entstehen, die jedoch wiederum Substrate für die Lipase darstellen, da sie noch eine Acylgruppe enthalten (Abb. 79).

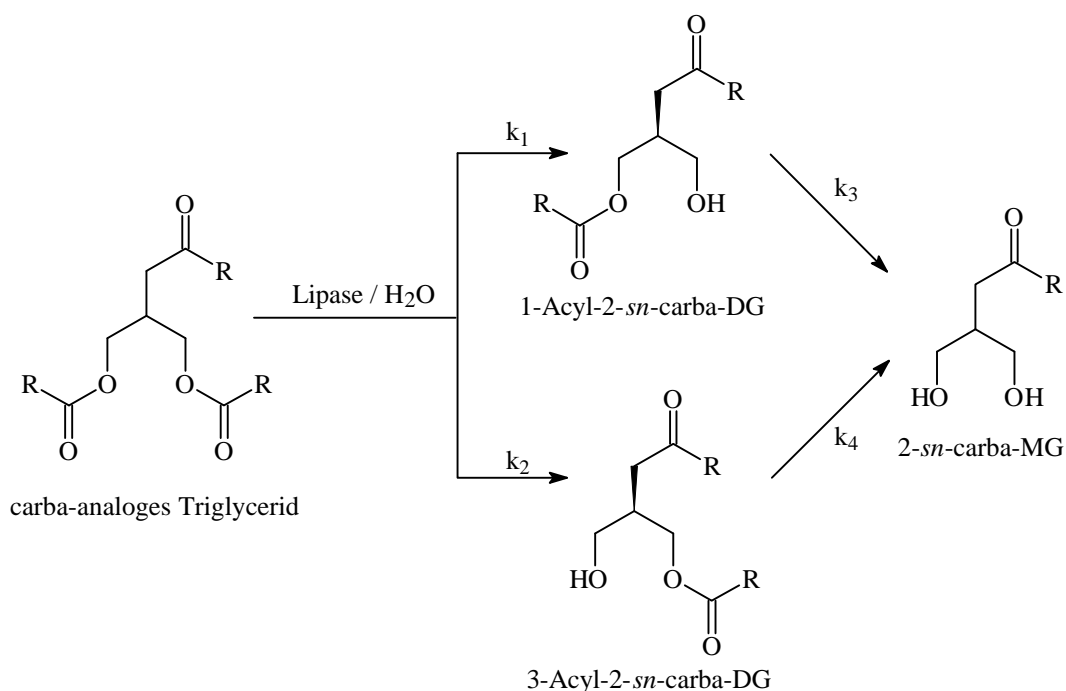


Abb. 79: Enzymatische Hydrolyse von carba-analogen Triglyceriden modifiziert in der *sn*-2 Position

Auch hier beeinflusst die Folgereaktion, d.h. die Hydrolyse zu den carba-analogen Monoglyceriden, die Enantiomerenreinheit der Diglyceridanaloga (vgl. Abb. 63). Daher muß auch hier die Analyse bei niedrigen Umsatzraten (5-15%) erfolgen.

Auch bei den carba-analogen Derivaten sind zwei Nebenreaktionen möglich. Einerseits können die Diglyceridanaloga durch 1,3- Acylgruppenwanderungen racemisieren (Abb. 80). Dies sollte jedoch erst bei höheren Temperaturen oder unter aciden bzw. basischen Bedingungen von Bedeutung sein (s. hierzu Kap. 5.1.1).

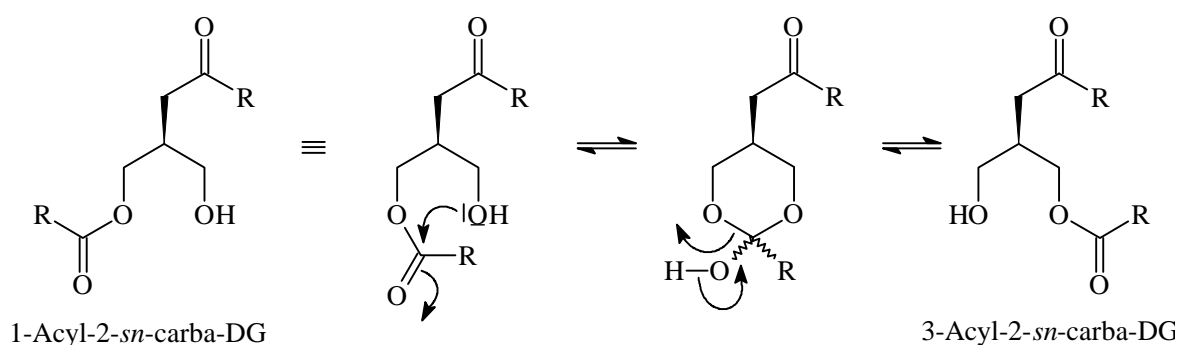


Abb. 80: 1,3-Acylgruppenwanderung in carba-analogen Diglyceriden

Andererseits können γ -Hydroxyketone cyclische Halbacetale (Lactole) bilden (Abb. 81).

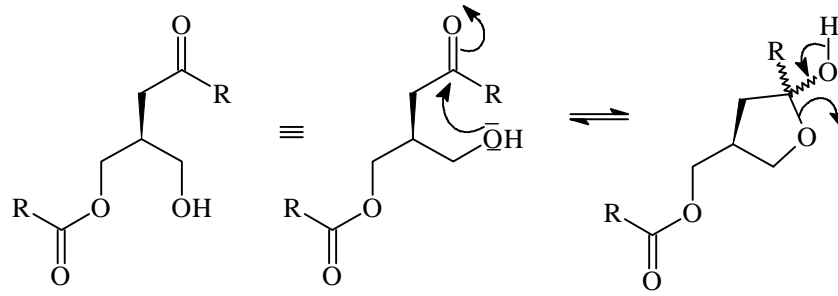


Abb. 81: Lactolbildung carba-analoger Diglyceride

Die Lactolbildung wird bei derartigen Verbindungen bereits bei Raumtemperatur beobachtet (ca. 20% Lactol nach 24h; Nachweis mittels ^{13}C -NMR und DC). Die Lactolbildung erfolgt auch rasch in Gegenwart von Kieselgel, so daß eine chromatographische Reinigung mit diesem Adsorbens nicht möglich ist.

5.2.2 Nachweis der carba-analogen Diglyceride

In Analogie zu den Hydrolysaten der natürlichen Triglyceride (Tricaprylin) war zu erwarten, daß auch die Hydrolyseprodukte der entsprechenden carba-Analoga nach Derivatisierung mittels 3,5-Dinitrophenylisocyanat (Abb. 82; I) durch HPLC an der OA-4100 trennbar sein sollten.

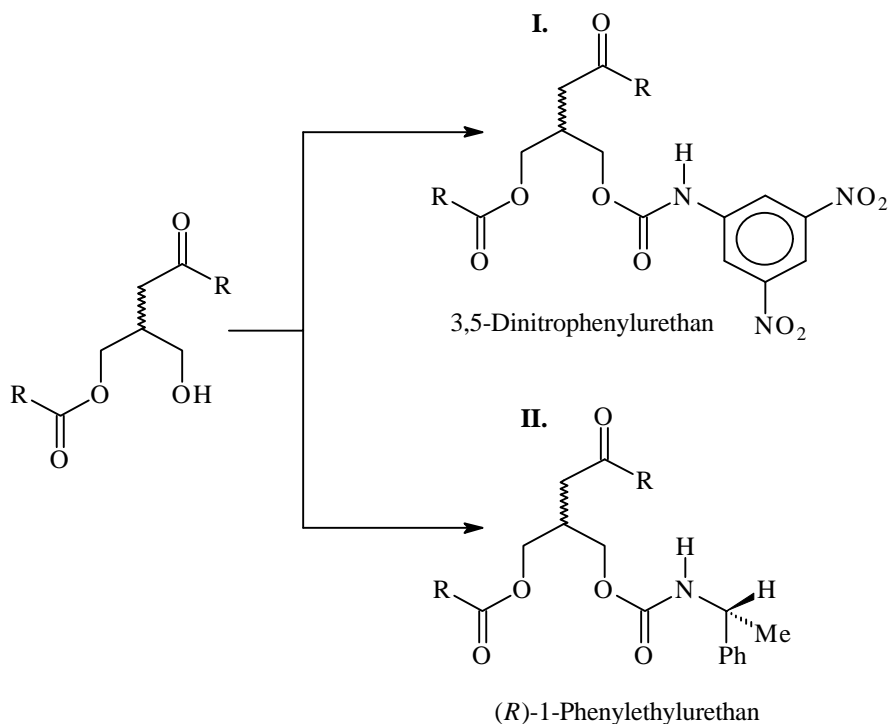


Abb. 82: Derivatisierung von carba-analogen Diglyceriden

Zu unserer großen Enttäuschung gelang dies jedoch leider nicht und zwar weder an der OA-4100 noch an anderen Chiralphasen, wie Chiralcel OD und (R,R)-Welk.

Dagegen konnten die durch Derivatisierung mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat erhaltenen (R)-1-Phenylethylurethane (Abb. 82; **II**) erfolgreich mittels HPLC an den Chiralphasen (R,R)-Welk und Chira Sept getrennt werden. Die racemischen Vergleichssubstanzen wurden gemäß Abb. 83 hergestellt.

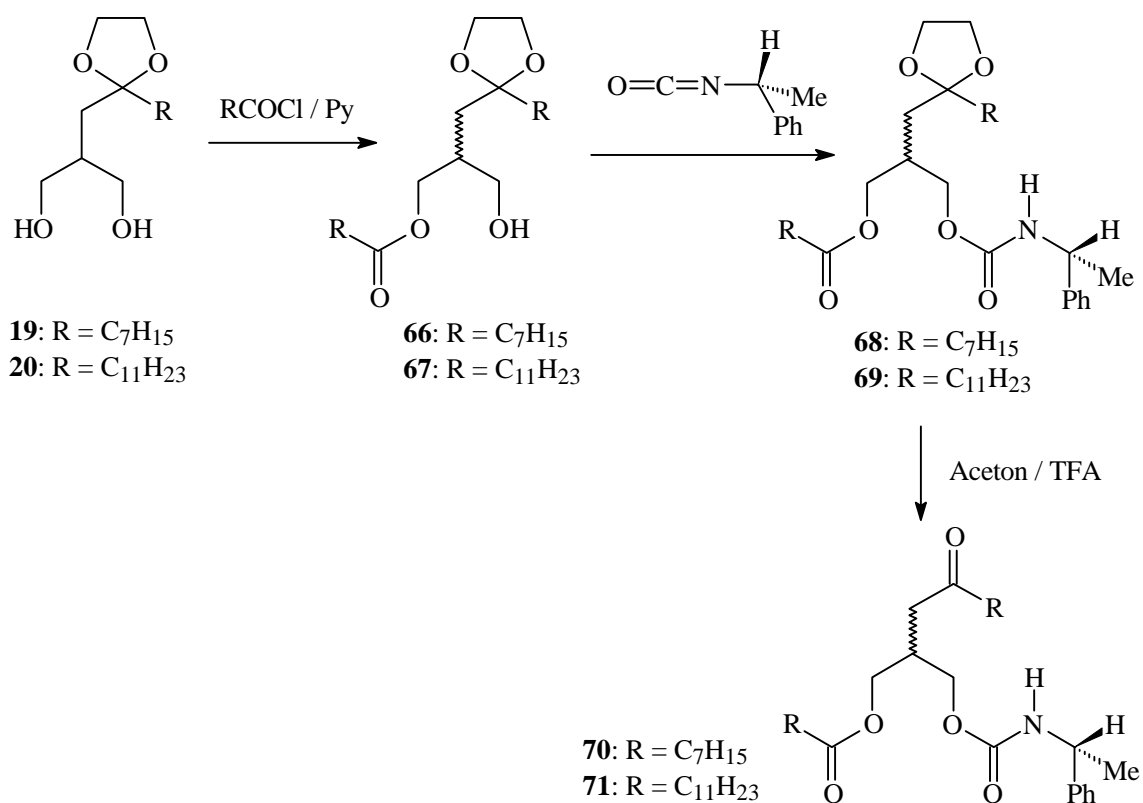


Abb. 83: Synthese und Derivatisierung racemischer Referenzsubstanzen

Dazu wurden die als Ketale geschützten Diole **19** und **20** zunächst in die entsprechenden Monoester **66** und **67** überführt. Nach Derivatisierung mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat wurde **68** und **69** erhalten. Kurzes Erwärmen mit Trifluoressigsäure in Aceton lieferte hieraus die Referenzsubstanzen **70-71**, die an den Chiralphasen (R,R)-Welk und Chira Sept getrennt werden konnten (Abb. 84).

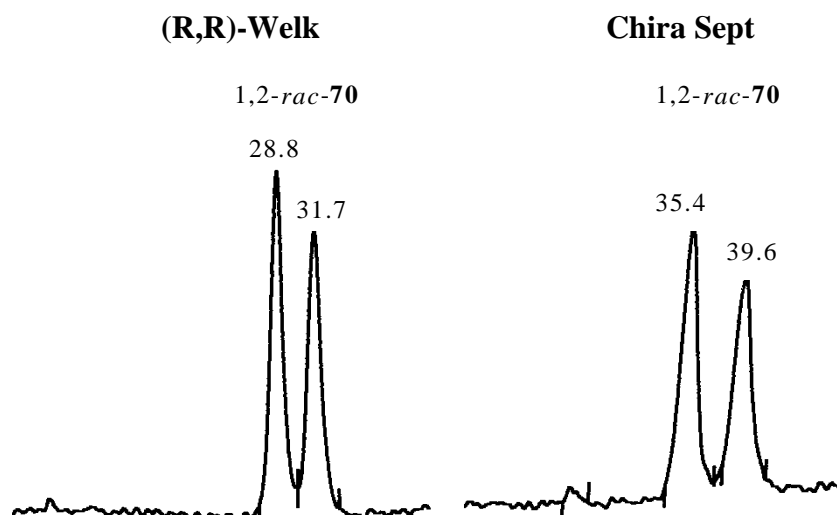


Abb. 84: Chromatographische Trennung derivatisierter carba-analoger Diglyceride (**70**)

Nachdem die Trennung der Enantiomeren erfolgreich gelungen war, ergaben sich nun zwei entscheidende Fragen:

1. Werden die carba-analogen Modellsubstanzen in Analogie zum natürlichen Triglycerid als Substrate akzeptiert ?
2. Welchen Einfluß hat die Methylengruppe in der *sn*-2 Position auf die Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse ?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde zunächst die Aktivität und Enantioselektivität der bereits zuvor untersuchten 44 Enzyme gegenüber dem Modellglycerid **11** bestimmt.

5.2.3 Bestimmung der Aktivität und Enantioselektivität von Lipasen gegenüber dem Triglyceridanaloga **11**

Zur Bestimmung der Aktivität wurden 200 µl einer equimolaren Mischung von Tricaprylin, carba-analogenem Tricaprylin **11** und Docosan in *tert.*-Butylmethylether zu 800 µl Puffer pH=7.0 und dem zu untersuchenden Enzym gegeben. Die Mischung wurde auf dem Eppendorfschüttler umgesetzt und anschließend zweimal mit Essigester extrahiert. Die Bestimmung des Reaktionsumsatzes erfolgte gaschromatographisch mit Docosan als internen Standard. Hierbei werden Tricaprylin, carba-analoges Tricaprylin **11** und Docosan mit nahezu identischer Empfindlichkeit gemessen, so daß eine Korrektur der erhaltenen Flächenprozentage nicht notwendig ist. Die Ergebnisse der enzymkatalysierten Hydrolysen sind in Tab. 9 aufgelistet.

Tab. 9: Verhältnis der Umsatzgeschwindigkeit bei enzymkatalysierten Hydrolysen von Tricaprylin und carba-analogenem Tricaprylin (**11**)

Enzym	mg	Zeit (min)	Umsatz TG (%)	Umsatz 11 (%)	$k_{(TG)}/k_{(11)}$
1. <i>Arthrobacter species</i>	4	24 h	2.8	4.7	0.6
2. <i>Aspergillus niger</i>	7	24 h	3.0	0	> 100
3. <i>Aspergillus oryzae</i>	3	10	21.5	3.6	6
4. <i>Aspergillus sojae</i>	4	24 h	12.7	2.6	5
5. <i>Candida antarctica</i>	6	4 h	13.4	8.0	1.7
6. <i>Candida cylindracea</i>	3	2 h	2.2	0	> 100
7. <i>Candida cylindracea</i>	4	10	18.1	8.3	2
8. <i>Candida cylindracea</i> ¹⁾	1	60	4.3	1.7	2.5
9. <i>Candida species</i>	2	60	12.7	11.5	1.1
10. <i>Chromobacterium viscosum</i>	0.1	10	12.6	20.6	0.6
11. CLE aus <i>Candida cylindracea</i>	2	10	19.8	9.3	2
12. CLE aus <i>Candida cylindracea</i>	10µl	30	18.1	7.7	2
13. CLE aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	4	10	21.9	30.8	0.7
14. Esterase 30000	1	10	27.7	2.0	13
15. <i>Humicola</i>	0.02	5	12.9	3.2	4
16. <i>Humicola lanuginosa</i>	2	60	20.4	6.6	3
17. Lipase 3A	8	2 h	11.2	0	> 100
18. Lipoproteinlipase	0.04	5	21.0	6.8	3
19. LPL aus <i>Pseudomonas species</i>	0.02	2	19.7	6.7	3
20. LPL aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	0.002	2	6.5	11.0	0.6
21. Lipoprotein <i>Pseudomonas</i> ¹⁾	1	2	17.3	7.1	2
22. Lipozym	0.5µl	5	11.9	0	> 100
23. <i>Mucor javanicus</i>	1	5	21.5	1.6	13
24. <i>Mucor javanicus</i>	1	2	19.2	3.9	5
25. <i>Mucor miehei</i>	2	10	24.4	2.7	9
26. <i>Mucor miehei</i>	1µl	5	19.4	0.3	58
27. <i>Mucor miehei</i>	0.04	5	32.6	1.7	19
28. <i>Mucor miehei</i>	3	60	29.9	0.6	50

Enzym	mg	Zeit (min)	Umsatz TG (%)	Umsatz 11 (%)	$k_{(TG)}/k_{(11)}$
29. <i>Mucor miehei</i> ¹⁾	2	10	30.6	1.75	17
30. Pancreas	2	60	25.5	5.0	5
31. Pantolactonesterase	4	24 h	4.0	8.6	0.5
32. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	2	16.4	1.4	11
33. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.2	10	22.5	7.4	3
34. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	2	30.4	12.5	2
35. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	3	5	20.1	20.3	1.0
36. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	1	2	12.7	5.9	2
37. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	2	2	5.5	2.1	3
38. <i>Pseudomonas species</i>	1	2	15.2	1.9	8
39. <i>Rhizopus arrhizus</i>	0.002	2	7.7	1.8	4
40. <i>Rhizopus delemar</i>	1	5	14.1	1.2	12
41. <i>Rhizopus javanicus</i>	1	5	12.4	1.4	9
42. <i>Rhizopus niveus</i>	3	30	10.7	1.4	8
43. Schweinepankreas	1	10	23.9	4.5	5
44. Schweinepankreas PPL	2	10	17.6	4.1	4

¹⁾ immobilisiert

In zahlreichen Fällen ist ein deutliches Abweichen der Verhältnisse der Hydrolysegeschwindigkeiten $k(TG)/k(11)$ vom Idealwert 1 festzustellen. Die Substitution des Glycerinsauerstoffatoms in der *sn-2* Position durch die Methylengruppe hat also einen signifikanten Einfluß auf die Enzym-Substrat Wechselwirkung. Zur besseren Beurteilung wurden die Enzyme entsprechend dem Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten $k(TG)/k(11)$ in drei Gruppen eingeordnet.

I. : Die Hydrolysegeschwindigkeiten verhalten sich in etwa gleich $0.5 \leq k(TG)/k(11) < 5$.

Diese Gruppe kann in zwei Untergruppen **I a, b)** aufgeteilt werden.

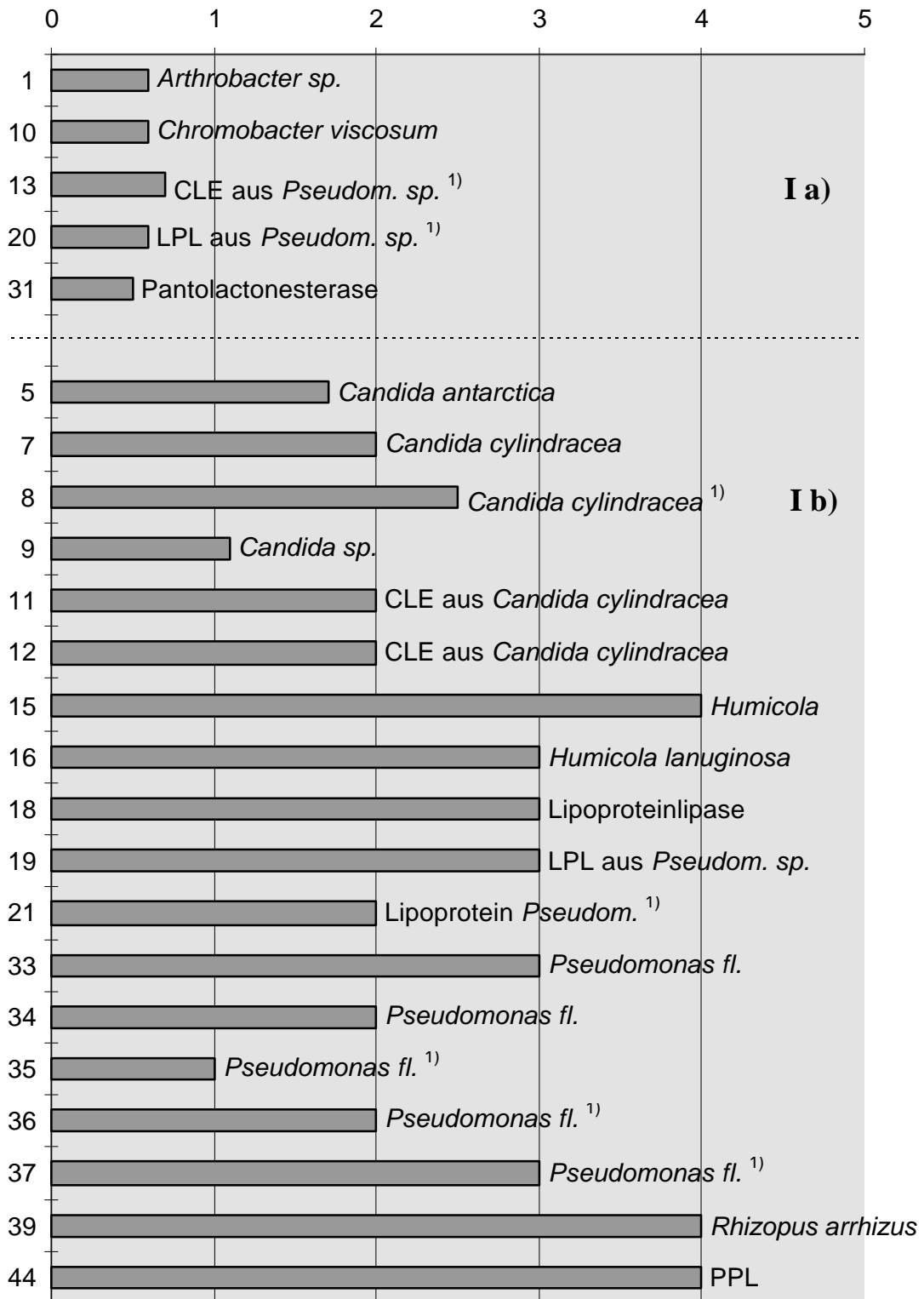
I. a): Die carba-analoge Verbindung wird schneller hydrolysiert $0.5 \leq k(TG)/k(11) < 1$

I. b): Die carba-analoge Verbindung wird weniger schnell hydrolysiert $1 \leq k(TG)/k(11) < 5$

II. : Tricaprylin wird deutlich schneller hydrolysiert $5 \leq k(TG)/k(11) \leq 20$

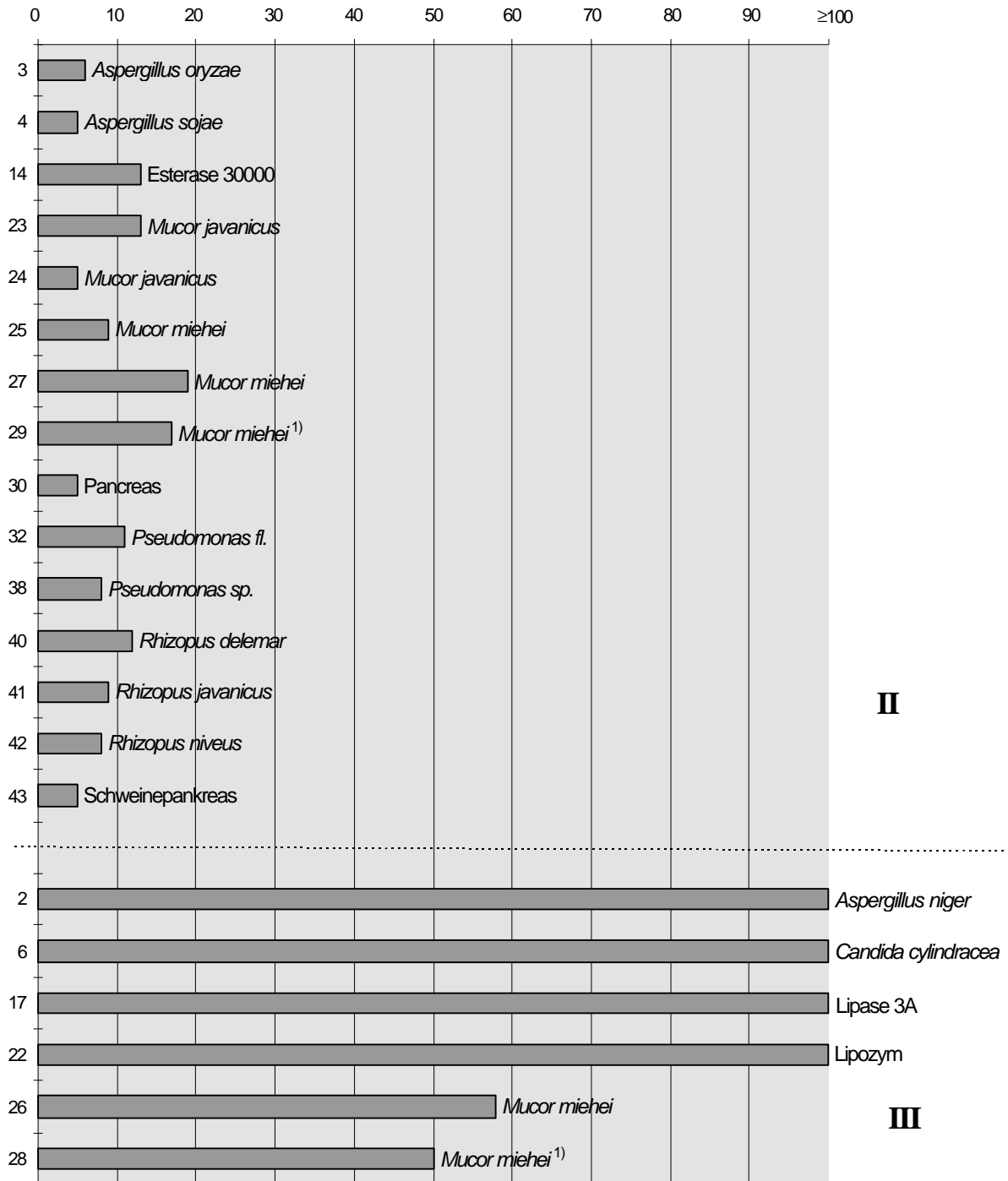
III. : Die carba-analoge Verbindung wird kaum hydrolysiert $k(TG)/k(11) > 20$

Die einzelnen Enzyme sind in Abb. 85 und Abb. 86 gemäß obiger Einteilung dargestellt.



I. a) $0.5 \leq k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) < 1$; **I. b)** $1 \leq k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) < 5$

Abb. 85: Enzyme, die Tricaprylin und die carba-analoge Verbindung vergleichbar schnell hydrolysieren; Skala 0-5



II : $5 \leq k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) \leq 20$; **III** : $k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) > 20$

Abb. 86: Enzyme, die Tricaprylin deutlich schneller als die carba-analoge Verbindung hydrolysieren; Skala 0-100

Wie in Abb. 85 und Abb. 86 dargestellt, sind die Enzyme bis auf wenige Ausnahmen in den Kategorien **I b)** und **II** anzutreffen, d.h. Tricaprylin wird schneller als die carba-analoge Verbindung hydrolysiert, die carba-analoge Verbindung wird jedoch auch als Substrat

akzeptiert und umgesetzt. Nur fünf Enzyme setzen die carba-analoge Verbindung schneller als Tricaprylin um **I a**) und sechs Enzyme sind spezifisch für Tricaprylin **III**.

Bei diesen Meßergebnissen ist allerdings zu beachten, daß nur qualitative und keine quantitativen Aussagen möglich sind. Es wurde angenommen, daß die Hydrolysen im Anfangsstadium, d.h. bis zu einem Umsatz von 10-15%, im wesentlichen linear verlaufen. In der Realität nimmt die Hydrolyse einen kurvenförmigen Verlauf, so daß Umsätze > 15% fehlerhaft gemessen werden. Zudem können kleine Umsätze < 2% gegenüber dem internen Standard nur ungenau bestimmt werden. Auch eine kompetitive Inhibierung der Enzyme kann die Meßergebnisse beeinflussen.

Abgesehen von den zuvor gesagten Einschränkungen liefert das Verhältnis der Abnahme von [TG]/[**11**] eine wichtige Information darüber, inwieweit die Verbindungen Tricaprylin und carba-analoga von den jeweiligen Enzymen als Substrate akzeptiert werden.

5.2.4 Bestimmung der Enantioselektivität von Lipasen gegenüber dem Modellglycerid **11**

Das Modellglycerid **11** ist bei Raumtemperatur ein Feststoff und benötigt für die enzymatische Hydrolyse demzufolge ein Cosolvens. In Kap. 5.1.3. wurde bereits der Einfluß zahlreicher Lösungsmittel auf die Enantioselektivität von Lipasen gegenüber Tricaprylin beschrieben. *tert.*-Butylmethylether lieferte dabei die besten Resultate, insofern daß a) die Aktivität der Enzyme hoch ist und b) die Enantioselektivität weitgehend den nativen Substraten entspricht. Die Hydrolysen wurden mit *tert.*-Butylmethylether als Cosolvens analog zu Kap. 5.1.3 mit 20 mg Substanz, Puffer pH = 7.0 sowie dem zu untersuchenden Enzym, durchgeführt. Das dabei gebildete carba-analoge Dicaprylin wurde mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat derivatisiert und mittels einer HPLC (Säule: (R,R)-Welk bzw. Chira Sept) getrennt. Hierbei wurden nur die Signale entsprechend der Referenzsubstanz 1,2-*rac*-**70** (s. Abb. 84) gefunden (keine Störung durch Lactole). Die Signale konnten nicht mit endgültiger Sicherheit den Verbindungen 1,2-*sn*-**70** bzw. 2,3-*sn*-**70** zugeordnet werden. Versuche geeignete Derivate für die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten, blieben bislang erfolglos (s. Kap. 7). Der Vergleich der Hydrolysen mit bekannten Substraten liefert jedoch deutliche Indizien dafür, daß die gewählte Zuordnung der Konfiguration mit hoher Wahrscheinlichkeit zutrifft (s. Kap. 7)

Die Ergebnisse der enzymatischen Hydrolyse von carba-analogenem Tricaprylin **11** sind in Tab. 10 zusammengefaßt.

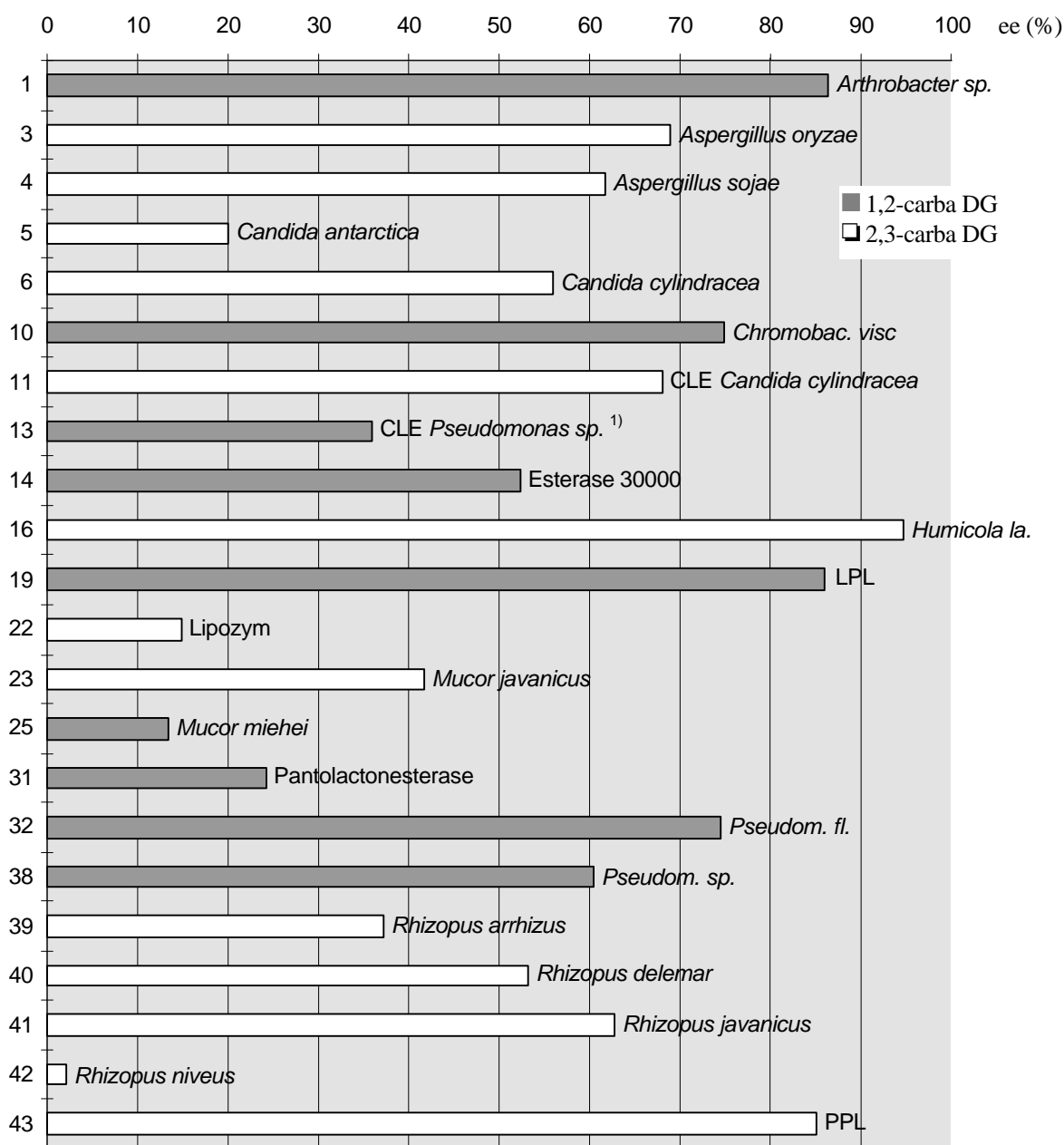
Tab. 10: Enantioselektivität unterschiedlicher Hydrolasen bestimmt mit carba-analogenem Tricaprylin **11**

Enzym	mg	Zeit	ee (%) ²⁾	Umsatz (%)
1. <i>Arthrobacter species</i>	4	24 h	86,4 (3)	2.3
2. <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
3. <i>Aspergillus oryzae</i>	2	30	69,0 (1)	18.9
4. <i>Aspergillus sojae</i>	4	24 h	61,6 (1)	4.9
5. <i>Candida antarctica</i>	6	4 h	20,0 (1)	12.2
6. <i>Candida cylindracea</i>	3	24 h	56,0 (1)	12.4
7. <i>Candida cylindracea</i>	3	15	69,6 (1)	7.7
8. <i>Candida cylindracea</i> ¹⁾	4	60	17,4 (1)	7.2
9. <i>Candida species</i>	2	60	62,4 (1)	12.4
10. <i>Chromobacterium viscosum</i>	0.1	5	74,8 (3)	18.6
11. CLE aus <i>Candida cylindracea</i>	1	15	68,0 (1)	8.7
12. CLE aus <i>Candida cylindracea</i>	10 µl	60	45,8 (1)	19.7
13. CLE aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	4	5	36,0 (3)	15.0
14. Esterase 30000	3	15	52,4 (3)	6.4
15. <i>Humicola</i>	0.06	5	≥96,0 (1)	29.6
16. <i>Humicola lanuginosa</i>	2	60	94,6 (1)	19.1
17. Lipase 3A	8	24 h	1,2 (3)	2.8
18. Lipoproteinlipase	0.06	5	85,2 (3)	17.2
19. LPL aus <i>Pseudomonas species</i>	0.04	2	86,0 (3)	17.1
20. LPL aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	0.002	2	56,4 (3)	7.5
21. Lipoprotein <i>Pseudomonas</i> ¹⁾	1	5	80,8 (3)	15.7
22. Lipozym	10 µl	15	14,8 (1)	8.5
23. <i>Mucor javanicus</i>	2	15	41,8 (1)	17.0
24. <i>Mucor javanicus</i>	1	15	40,8 (1)	14.7
25. <i>Mucor miehei</i>	2	30	13,4 (3)	3.3
26. <i>Mucor miehei</i>	2 µl	15	10,8 (1)	8.3
27. <i>Mucor miehei</i>	0.06	15	1,6 (1)	6.5
28. <i>Mucor miehei</i>	4	6 h	10,0 (1)	14.3

Enzym	mg	Zeit	ee (%) ²⁾	Umsatz (%)
29. <i>Mucor miehei</i> ¹⁾	2	60	41,4 (1)	13.1
30. Pancreas	3	60	75,8 (1)	10.3
31. Pantolactonesterase	4	24 h	24,2 (3)	20.4
32. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	2	74,4 (3)	14.3
33. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.2	15	90,4 (3)	9.4
34. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	2	87,4 (3)	8.2
35. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	2	15	70,2 (3)	15.4
36. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	1	5	79,4 (3)	20.3
37. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	3	5	92,4 (3)	10.0
38. <i>Pseudomonas species</i>	1	2	60,4 (3)	13.0
39. <i>Rhizopus arrhizus</i>	0.02	2	37,2 (1)	5.2
40. <i>Rhizopus delemar</i>	2	15	53,2 (1)	5.1
41. <i>Rhizopus javanicus</i>	1	15	62,8 (1)	6.5
42. <i>Rhizopus niveus</i>	3	30	2,2 (1)	3.8
43. Schweinepankreas	2	15	85,0 (1)	6.7
44. Schweinepankreas PPL	3	15	88,0 (1)	19.4

¹⁾ immobilisiert; ²⁾ Hydrolyse in der Position *sn*-(1 oder 3)

In der graphischen Darstellung wurden die Ergebnisse wiederum nach Ursprung des Enzyms (Abb. 87) bzw. nach Anbieter und Verarbeitungsform (Abb. 88) eingeordnet.



Enzym; ¹⁾ immobilisiert

Abb. 87: Enantioselektivität unterschiedlicher Lipasen

Es ist ein deutlich abweichendes Verhalten der Enantioselektivität beim Einsatz der carba-analogen Verbindung zu beobachten. Während bei dem natürlichen Substrat Tricaprylin kaum eine 1,2-*sn* Selektivität der Enzyme beobachtet wurde, weisen beim Einsatz der carba-analogen Verbindung ca. die Hälfte der Enzyme eine deutliche oder geringe 1,2-*sn* Selektivität auf.

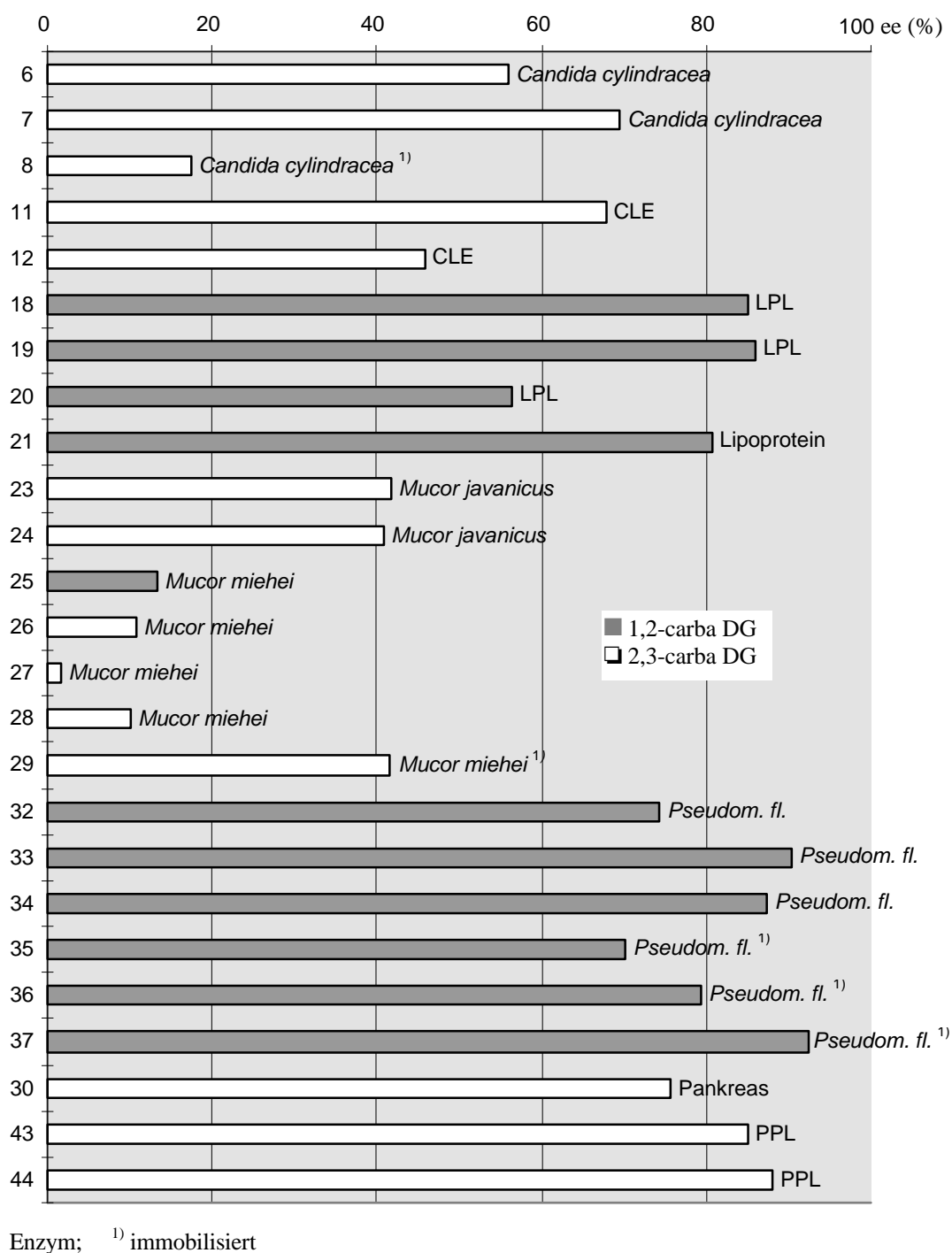


Abb. 88: Enantioselektivitäten von Lipasen - geordnet nach Anbieter bzw. Verarbeitungform

Prinzipiell verhalten sich die Enzyme unterschiedlicher Anbieter wiederum ähnlich. So zeigen die Lipasen aus *Mucor miehei* nur eine geringe bis mäßige Selektivität. Eine mittlere Selektivität zeigen die Lipasen aus *Candida cylindracea* und die Cholinesterasen. Hohe Selektivitäten wurde bei den Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens*, den Lipasen aus Pankreas und den Lipoproteinlipasen gefunden. Wie zuvor bei der Bestimmung der Enantioselektivität

gegenüber Tricaprylin, zeigen auch hier einzelne Enzyme ein von der Norm abweichendes Verhalten, wie z.B. die Lipase aus *Candida cylindracea* (Nr. 8), die Lipoproteinlipase (Nr. 20) und die Lipasen aus *Mucor miehei* (Nr. 25 u. Nr. 29).

5.3 Vergleich der Enantioselektivitäten von Lipasen gegenüber Tricaprylin und dem Modellglycerid 11

Die wichtigsten Ergebnisse der zuvor beschriebenen Untersuchungen sind in Tab. 11 sowie in Abb. 89 und Abb. 90 gegenübergestellt.

Tab. 11: Enantioselektivitäten und Hydrolyseverhalten von Lipasen gegenüber **I.** Tricaprylin und **II.** carba-analogenem Tricaprylin

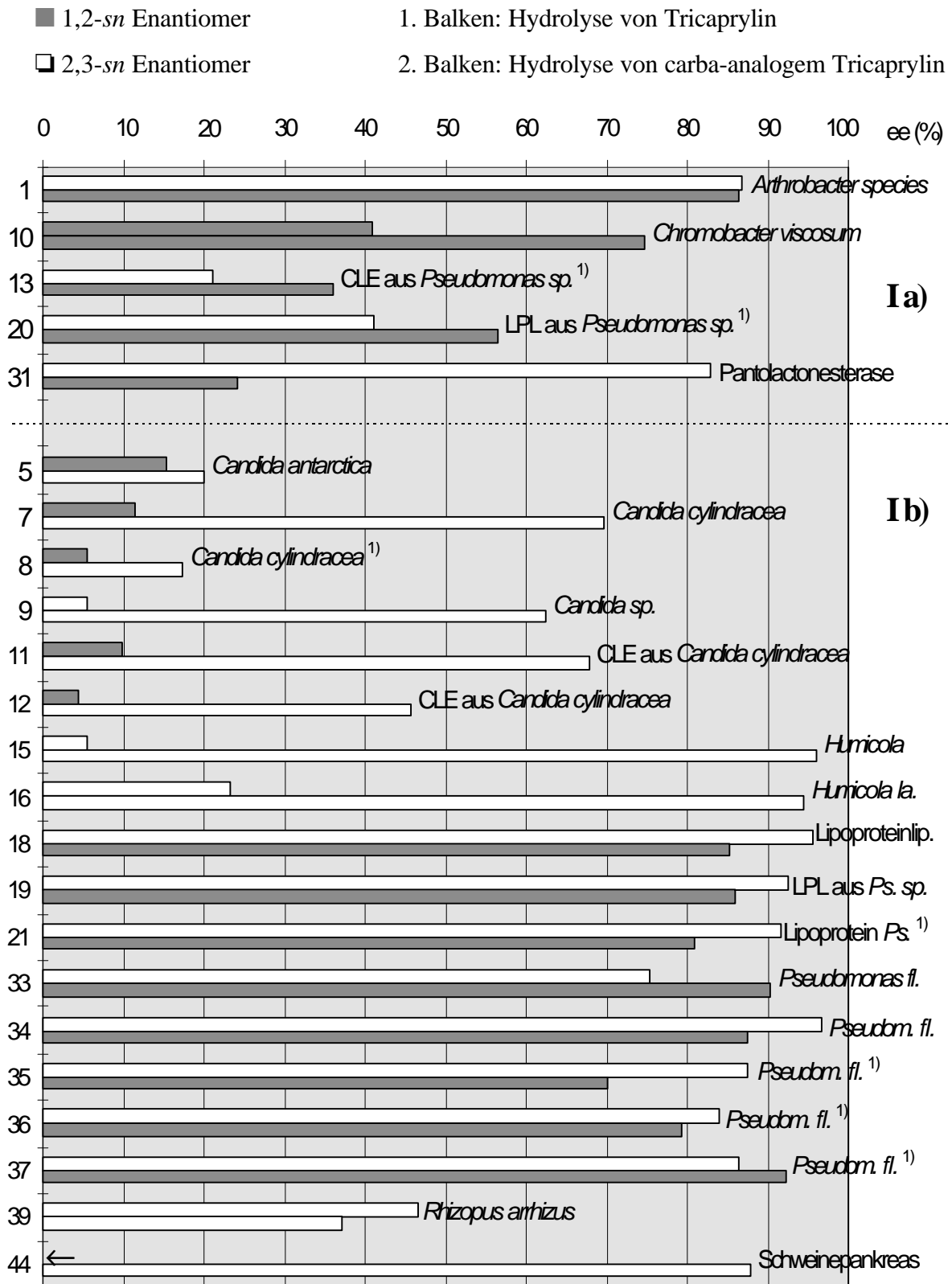
Enzym	I. ee (%) ²⁾	II. ee (%) ²⁾	$k_{(TG)}/k_{(11)}$
1. <i>Arthrobacter species</i>	86,8 (1)	86,4 (3)	0,6
2. <i>Aspergillus niger</i>	67,6 (1)	-	> 100
3. <i>Aspergillus oryzae</i>	25,2 (1)	69,0 (1)	6
4. <i>Aspergillus sojae</i>	0,2 (3)	61,6 (1)	5
5. <i>Candida antarctica</i>	15,4 (3)	20,0 (1)	1,7
6. <i>Candida cylindracea</i>	14,2 (1)	56,0 (1)	> 100
7. <i>Candida cylindracea</i>	11,4 (3)	69,6 (1)	2
8. <i>Candida cylindracea</i> ¹⁾	5,6 (3)	17,4 (1)	2,5
9. <i>Candida species</i>	5,4 (1)	62,4 (1)	1,1
10. <i>Chromobacterium viscosum</i>	40,8 (3)	74,8 (3)	0,6
11. CLE aus <i>Candida cylindracea</i>	9,8 (3)	68,0 (1)	2
12. CLE aus <i>Candida cylindracea</i>	4,4 (3)	45,8 (1)	2
13. CLE aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	21,0 (1)	36,0 (3)	0,7
14. Esterase 30000	87,8 (1)	52,4 (3)	13
15. <i>Humicola</i>	5,4 (1)	≥96,0 (1)	4
16. <i>Humicola lanuginosa</i>	23,4 (1)	94,6 (1)	3
17. Lipase 3A	86,4 (1)	1,2 (3)	> 100
18. Lipoproteinlipase	95,6 (1)	85,2 (3)	3

Enzym	I. ee (%) ²⁾	II. ee (%) ²⁾	k _(TG) /k ₍₁₁₎
19. LPL aus <i>Pseudomonas species</i>	92,6 (1)	86,0 (3)	3
20. LPL aus <i>Pseudomonas sp.</i> ¹⁾	41,2 (1)	56,4 (3)	0,6
21. Lipoprotein <i>Pseudomonas</i> ¹⁾	91,6 (1)	80,8 (3)	2
22. Lipozym	85,4 (1)	14,8 (1)	> 100
23. <i>Mucor javanicus</i>	55,2 (1)	41,8 (1)	13
24. <i>Mucor javanicus</i>	58,4 (1)	40,8 (1)	5
25. <i>Mucor miehei</i>	84,4 (1)	13,4 (3)	9
26. <i>Mucor miehei</i>	84,4 (1)	10,8 (1)	58
27. <i>Mucor miehei</i>	86,0 (1)	1,6 (1)	19
28. <i>Mucor miehei</i>	87,8 (1)	10,0 (1)	50
29. <i>Mucor miehei</i> ¹⁾	81,6 (1)	41,4 (1)	17
30. Pancreas	2,2 (3)	75,8 (1)	5
31. Pantolactonesterase	82,8 (1)	24,2 (3)	0,5
32. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	92,6 (1)	74,4 (3)	11
33. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	75,4 (1)	90,4 (3)	3
34. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	96,6 (1)	87,4 (3)	2
35. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	87,4 (1)	70,2 (3)	1,0
36. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	84,0 (1)	79,4 (3)	2
37. <i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹⁾	86,4 (1)	92,4 (3)	3
38. <i>Pseudomonas species</i>	92,0 (1)	60,4 (3)	8
39. <i>Rhizopus arrhizus</i>	46,6 (1)	37,2 (1)	4
40. <i>Rhizopus delemar</i>	43,8 (1)	53,2 (1)	12
41. <i>Rhizopus javanicus</i>	50,4 (1)	62,8 (1)	9
42. <i>Rhizopus niveus</i>	46,8 (1)	2,2 (1)	8
43. Schweinepankreas	9,2 (3)	85,0 (1)	5
44. Schweinepankreas PPL	0,0	88,0 (1)	4

¹⁾ Immobilisiert; ²⁾ Hydrolyse in der Position *sn*-(1 oder 3)

Die Ergebnisse sind in Abb. 89 und Abb. 90 noch einmal graphisch gegenübergestellt. Die Einteilung erfolgte anhand der Einteilung in Gruppen gemäß den unterschiedlichen Hydrolysegeschwindigkeiten zwischen Tricaprylin und dem carba-analogen Triglycerid **11**.

I a) $0.5 \leq k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) < 1$; **I b)** $1 \leq k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) < 5$; **II** $5 < 1 \leq k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) < 20$; **III** $k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) \geq 20$.



← Racemat, d.h. ee = 0 %; ¹⁾ immobilisiert

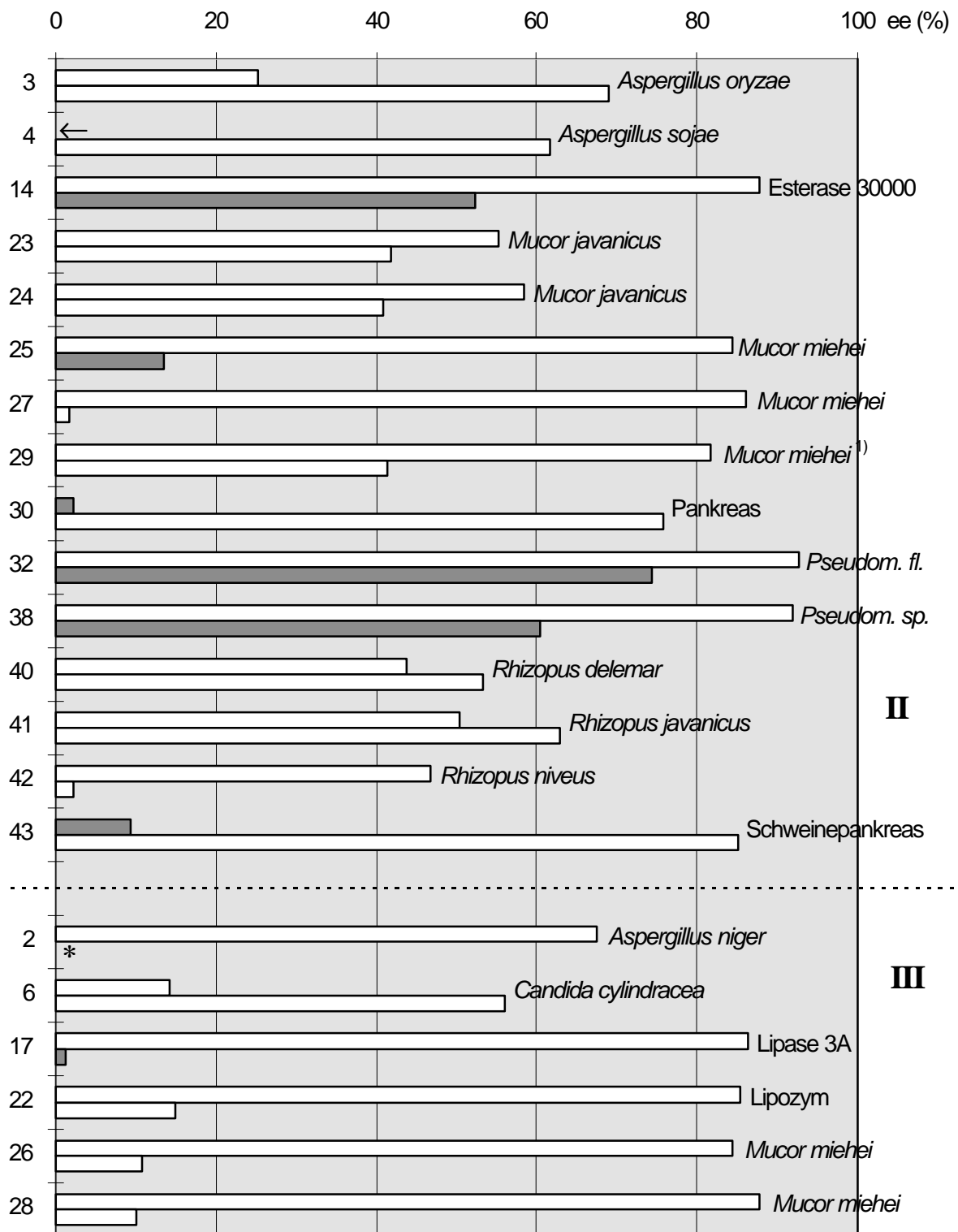
Abb. 89: Enantioselektivitäten und Hydrolyseverhalten von Lipasen gegenüber natürlichem- und carba-analogenem Tricaprylin **11**

■ 1,2-*sn* Enantiomer

1. Balken: Hydrolyse von Tricaprylin

□ 2,3-*sn* Enantiomer

2. Balken: Hydrolyse von carba-analogen Tricaprylin



← Racemat, d.h. ee = 0 %; * nicht bestimmt, da zu schlechtes Substrat; ¹⁾ immobilisiert

Abb. 90: Enantioselektivitäten und Hydrolyseverhalten von Lipasen gegenüber natürlichem- und carba-analogenem Tricaprylin **11**

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1.) Hohe Selektivität bei beiden Substraten, Umkehr der Enantioselektivität

Die Lipase aus *Arthrobacter species*, die Lipoproteinlipasen, die Lipasen aus *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas species* und die Esterase 30000 zeigen hohe Selektivitäten bezogen auf die *sn*-1 Position von Tricaprylin (Bildung von 2,3-*sn* Diglycerid). Die Modellverbindung wird von den Enzymen gut als Substrat akzeptiert und mit vergleichbarer Geschwindigkeit umgesetzt. Bei der Hydrolyse der Modellverbindung kehrt sich jedoch die Enantioselektivität der Lipase um, so daß nun die Lipasen *sn*-3 selektiv sind.

2.) Geringe Selektivität bei beiden Substraten, Umkehr der Enantioselektivität

Die Lipasen aus *Candida antarctica*, die immobilisierten Lipasen aus *Pseudomonas species* CLE (Nr. 13) und LPL (Nr.20) und die immobilisierte Lipase aus *Candida cylindracea* (Nr. 8) zeigen sowohl gegenüber Tricaprylin als auch gegenüber der Modellverbindung nur eine geringe Enantioselektivität. Beide Substrate werden von den Enzymen mit vergleichbarer Geschwindigkeit umgesetzt. Die Chiralität der erhaltenen Produkte wechselt je nach eingesetztem Substrat.

3.) Hohe Selektivität bei beiden Substraten (>75%), gleiche Chiralität der Produkte

Es wurde ursprünglich erwartet, daß selektive Lipasen die Modellverbindung **11** mit der gleichen Stereospezifität umsetzen wie das natürliche Substrat Tricaprylin. Interessanter Weise ist in dem vorliegenden Datenmaterial nicht ein Beispiel dabei, welches dies bestätigt.

4.) Geringe bis mittlere Selektivität bei beiden Substraten, gleiche Chiralität der Produkte

Betrachtet man die Enantioselektivität der Lipasen im Bereich von 30-75% ee, so finden sich Beispiele für dieses Verhalten. Die Lipasen aus *Rhizopus arrhizus*, aus *Rhizopus delemar* und aus *Rhizopus javanicus* sowie die Lipasen aus *Mucor javanicus* hydrolysieren beide Substrate jeweils in der *sn*-1 Position. Die Lipase aus *Chromobacterium viscosum* hydrolysiert beide Substrate in der *sn*-3 Position.

5.) Hohe Enantioselektivität gegenüber Tricaprylin, geringe Enantioselektivität gegenüber der Modellverbindung

Beispiele hierfür sind die Lipasen aus *Mucor miehei*, die Pantolactonesterase, die Lipase 3A und Lipozym. Mit Ausnahme der Pantolactonesterase wird die Modellverbindung schlecht als

Substrat von den Enzymen akzeptiert. Dies folgt aus dem Verhältnis der Hydrolysegeschwindigkeiten mit $k(\text{TG})/k(\mathbf{11}) > 10$.

6.) Niedrige Enantioselektivität gegenüber Tricaprylin, hohe Enantioselektivität gegenüber der Modellverbindung

Eine deutliche Steigerung der Enantioselektivität auf Werte von 45-75% ee wurde bei der Lipase aus *Aspergillus oryzae*, der Lipase aus *Aspergillus sojae* und den Lipasen aus *Candida* (Nr. 7, Nr. 9, Nr. 11, Nr.12) gefunden. Noch höhere EE-Werte (>75%) wurden bei den Lipasen aus *Humicola* und den Lipasen aus Pankreas (Nr. 30, 43 u. 44) ermittelt. Interessanter Weise sind alle hier aufgeführten Enzyme gegenüber dem Modellglycerid *sn*-1 selektiv bzw. *sn*-1 spezifisch. Die Modellverbindungen sind in dieser Rubrik wiederum „gute Substrate“ für die untersuchten Enzyme, da sie mit vergleichbaren Hydrolysegeschwindigkeiten umgesetzt werden.

7.) Sonderfälle

Eine „Ausnahme“ bildet die Lipase aus *Aspergillus niger*. Die Reaktivität dieses Enzyms gegenüber der Modellverbindung ist so niedrig, daß keine Bestimmung der Enantioselektivität erfolgen konnte.

5.4 Zusammenfassung - Ausblick

Die Enantioselektivitäten zahlreicher Lipasen wurden mit Tricaprylin als Substrat untersucht. Hierbei wurden hohe Enantioselektivitäten meist gegenüber der *sn*-1 Position beobachtet, eine mäßige Selektivität gegenüber der *sn*-3 Position wurde bei der Lipase aus *Chromobacterium viscosum* gefunden. Regioisomeres 1,3-*sn*-Dicaprylin wurde bei den Untersuchungen nicht beobachtet, es ist daher unwahrscheinlich, daß während der Hydrolyse bzw. während der Probenaufarbeitung und der Derivatisierung Acylgruppenwanderungen auftraten. Die Ergebnisse hinsichtlich der Enantioselektivität von Lipasen gegenüber Tricaprylin decken sich größtenteils mit literaturbekannten Daten.

Die Studien mit dem carba-analogen Tricaprylin **11** lieferten dagegen ein stark variierendes Bild. So wurden einige Enzyme gefunden, welche **11** deutlich schneller als das natürliche Glycerid hydrolysieren. Die meisten der untersuchten Enzyme setzten hingegen die carba-analoga Substanz langsamer um. Andere Lipasen hingegen schienen **11** kaum als Substrat zu akzeptieren. Auch bezüglich der Enantioselektivitäten der Lipasen wurde ein deutlich

unterschiedliches Verhalten der Enzyme beim Einsatz von **11** beobachtet. So wechselt die Enantioselektivität bei einigen Enzymen hier von *sn*-1 (Tricaprylin) auf *sn*-3 (**11**).

Andere Lipasen zeigen dagegen gleiche Stereoselektivität gegenüber beiden Substraten. Einige der Lipasen sind nur enantioselektiv gegenüber Tricaprylin und andere nur enantioselektiv gegenüber der carba-analogen Verbindung **11**.

Die hier vorgestellte Modellverbindung **11** (carba-analoges Tricaprylin modifiziert in der *sn*-2 Position) ist somit eine hoch empfindliche Sonde für das aktive Zentrum von Lipasen. Zur weiteren Untersuchung bietet es sich an, auch die carba-analogen Glyceride modifiziert in der *sn*-1(3) Position und modifiziert in den *sn*-1,2(2,3)-Positionen mit einzubeziehen.

6 Carba-analoge Phospholipide - Synthesestrategien

6.1 Einleitung

Phospholipide sind in biologischen Systemen als Hauptbestandteil der Zellmembranen von fundamentaler Bedeutung. In ihrer Zusammensetzung sind Phospholipide sehr variabel, sie besitzen jedoch einen gemeinsamen Aufbau aus im wesentlichen vier Grundkomponenten (Abb. 91).

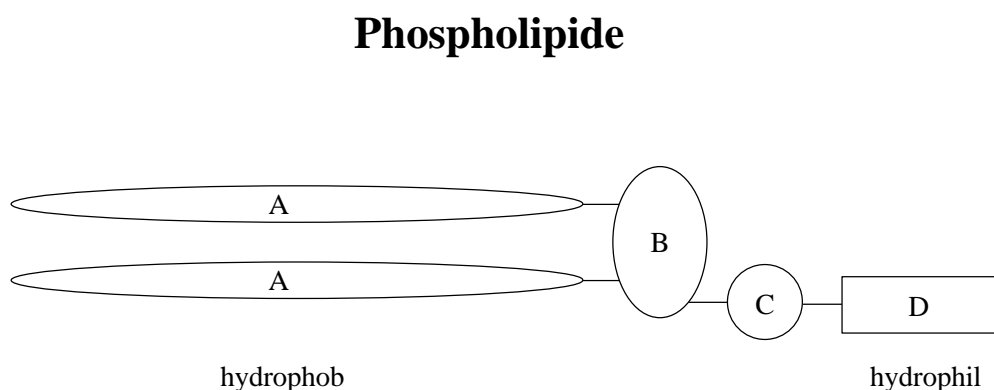


Abb. 91: Phospholipide - Schematischer Aufbau

Bei den Phosphoglyceriden besteht der hydrophobe Anteil A aus zwei Fettsäureresten. Der Mittelteil des Lipides (B) ist ein Glycerinmolekül, an dem die Fettsäuren A sowie die

Phosphatgruppe C über Esterbindungen verknüpft sind. Die Phosphatgruppe C bildet mit dem Alkohol D den polaren Kopf des Phospholipides. D kann entweder Cholin, Ethanolamin, Serin oder Inositol sein. Am häufigsten vertreten sind Glycerophospholipide mit dem hydrophilen Alkohol Cholin. In den natürlichen Phospholipiden befindet sich die Phosphatestergruppe in der *sn*-3 Position des Glycerins (Abb. 92).

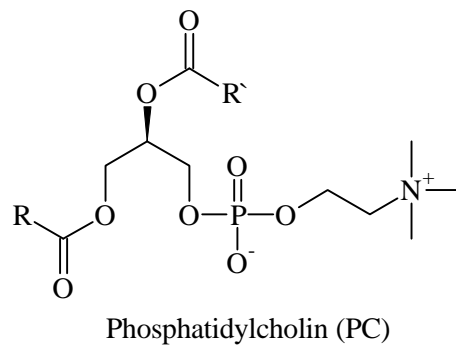


Abb. 92: Struktur der Phosphatidylcholine (PC)

Vor dem Hintergrund der Arbeiten über carba-analoge Glyceride bot es sich an auf diesem Wege auch zu carba-analogen Phospholipiden zu gelangen. Auch in Phospholipiden können die sp^3 -Sauerstoffatome des Glyceringerüsts durch sp^3 -Kohlenstoffe (CH_2 -Gruppen) ersetzt werden, wodurch man carba-analoge Phospholipide erhält (Abb. 93).

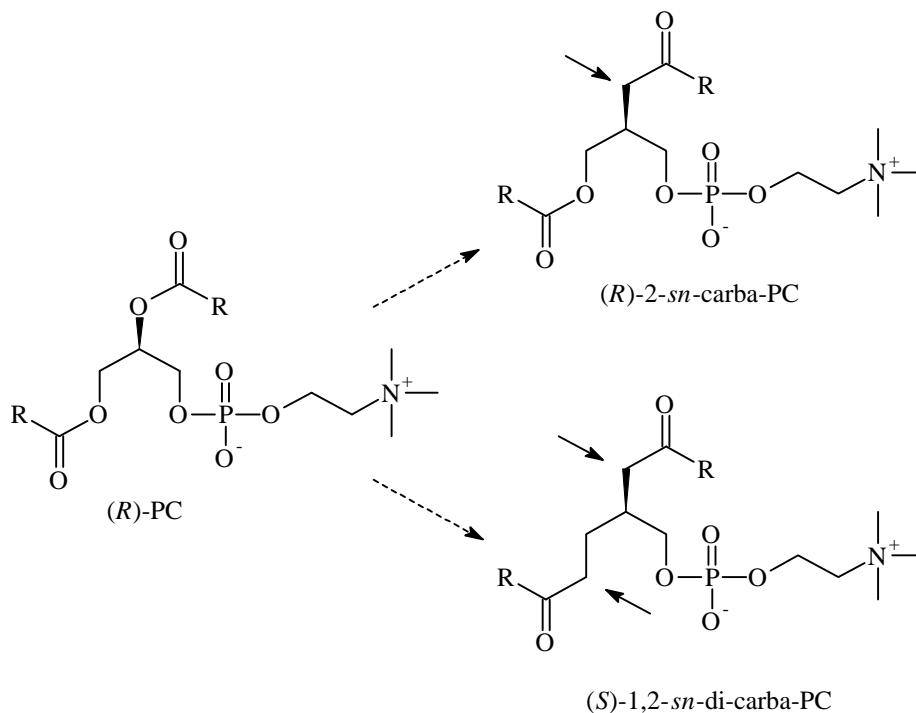


Abb. 93: Carba-analoge Phospholipide - Ersatz von sp^3 -Sauerstoff durch sp^3 C-Atome

Entsprechende carba-analoge Phospholipide sind von Interesse z.B. als:

- Pharmazeutische Wirkstoffe
- potentielle Inhibitoren der Phospholipase A₂ (Abb. 94)
- Modellsubstanzen zum Studium von Phospholipasen C und D
- Herstellung von Modellmembranen

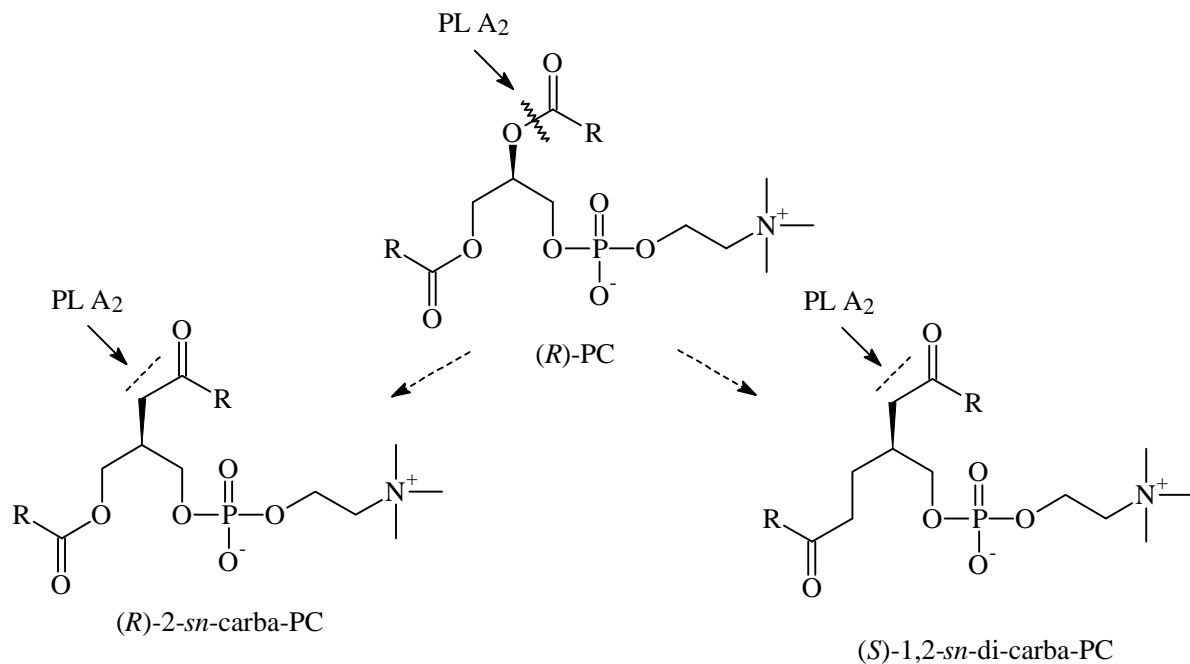


Abb. 94: Spaltung der Phospholipide durch PL A₂ - Hydrolyse stabile carba-Analoga

Aufgrund der Methylengruppe in der *sn*-2 Position können diese Phospholipidanaloga nicht durch Phospholipase A₂ gespalten werden. Sie sind daher als pharmazeutische Wirkstoffe (PL A₂-Inhibitoren) von potentiell Interesse, da die Abspaltung der Arachidonsäure aus der *sn*-2 Position von Phospholipiden eine Startreaktion in der Signalkaskade entzündlicher Prozesse ist. Derartige Phospholipidanaloga könnten auch andere Wirkeigenschaften aufweisen, z.B. bei der Thrombozytenaggregation, zelltoxisch gegenüber Tumorzellen, antivirale Eigenschaften, etc. (s. hierzu Kap. 3)

Im Rahmen dieser Arbeit haben wir uns die Aufgabe gestellt, eine Reihe carba-analoger Phospholipide in optisch reiner Form herzustellen.

6.2 Modifikation in der *sn*-2 Position

6.2.1 Einleitung

Bislang sind nur wenige derartiger Beispiele bekannt und diese auch nur in racemischer Form (Abb. 95).

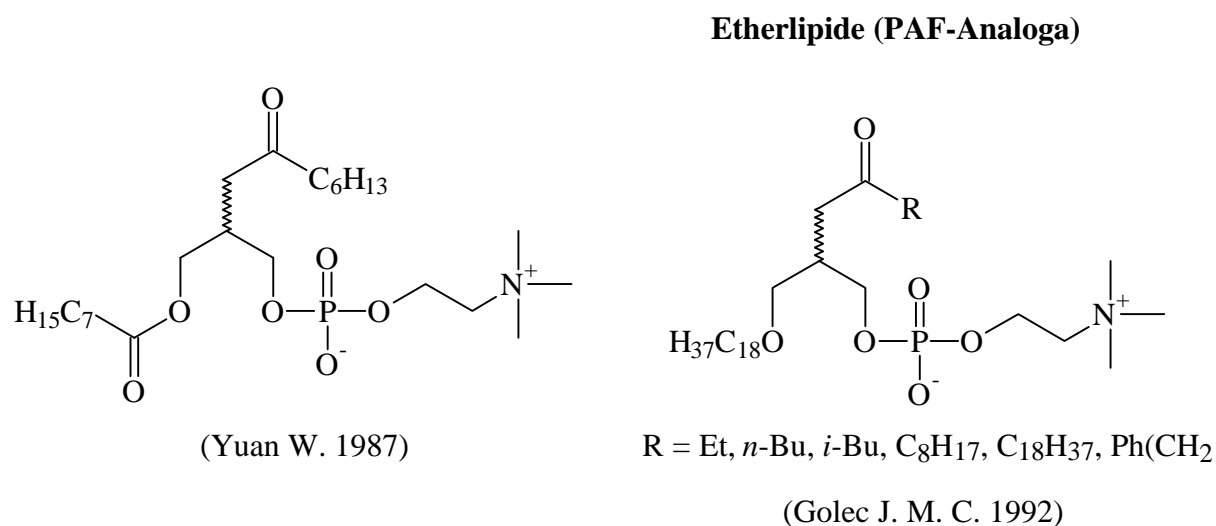


Abb. 95: Carba-analoge Phospholipide - Literaturbeispiele

Von W. Yuan wurde ein entsprechendes racemisches Phospholipidanalogue synthetisiert und hinsichtlich seiner Wirksamkeit als Inhibitor der Phospholipase A₂ (aus Schlangengift; *Naja naja naja* venom) untersucht (IC₅₀ = 1.5 mM; Yuan W. 1987).

Die von J. M. C. Golec synthetisierten racemischen Etherlipidanaloga wurden ebenfalls als Phospholipase A₂-Inhibitoren entwickelt (Golec J. M. C. 1992). Grundlage dieser Arbeiten war eine Röntgenstrukturanalyse des aktiven Zentrums der PL A₂ aus Schweinepankreas (Dijkstra B. W. 1981).

In unserem Arbeitskreis stand hingegen die enantioselektive Synthese dieser carba-analogen Phospholipide **I-III** (Abb. 96) im Vordergrund (Jakob B. 1992; Andersch P. 1995; Andersch P., Jakob B. 1997 a)-b), Peters H. 1997).

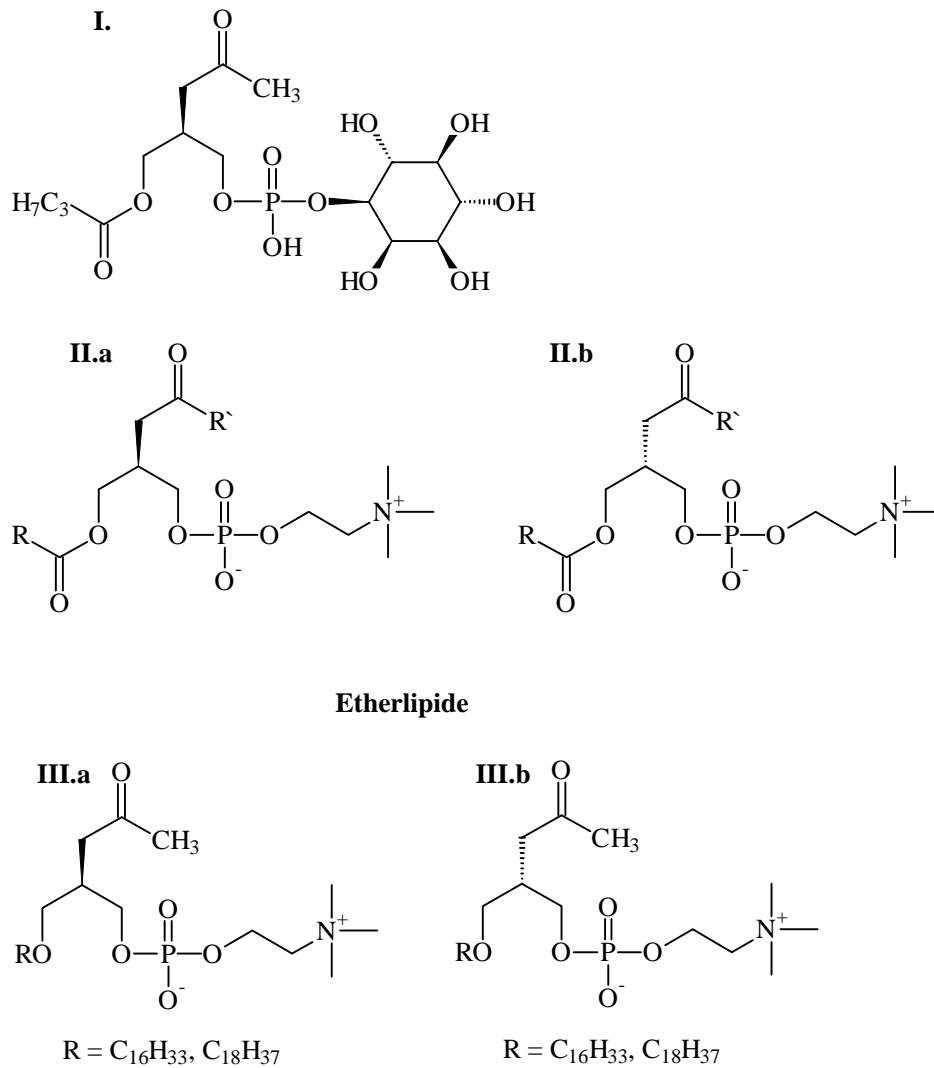


Abb. 96: Synthesen carba-analoger Phospholipide (geplant)

Die Synthese dieser Verbindungen ist jedoch durchaus nicht trivial und konnte daher erst teilweise realisiert werden (Andersch P., Jakob B. 1997 a)-b), Peters H. 1997). Gelungen ist bislang nur die Synthese eines Phospholipidanalogas der Formel **IIIb**, dessen Herstellung im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

6.2.2 Synthese von carba-analogenem Phosphatidylcholin

Die Synthese von enantiomerenreinem carba-analogenem Phosphatidylcholin lässt sich in zwei Teilschritte zerlegen. Eine retrosynthetische Analyse liefert die entsprechende, enantiomerenreine Glyceridkomponente. Das Phospholipidanalogon kann formal auf die entsprechende Glyceridkomponente sowie Cholinphosphat zurückgeführt werden (Abb. 97).

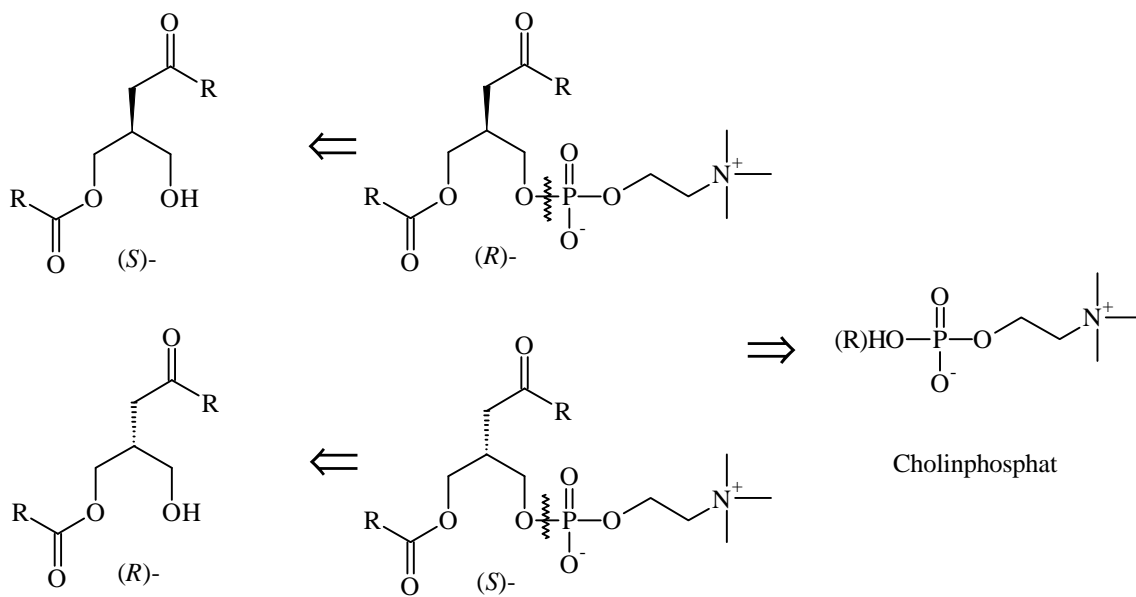


Abb. 97: Retrosynthese enantiomerenreiner, carba-analoger Phosphatidylcholine

Hauptproblem ist die enantioselektive Synthese der chiralen Glyceridkomponenten. In Übereinstimmung mit Kap. 5.2.3 kann dazu ein carba-analoges Triglycerid in Gegenwart einer enantioselektiven Lipase hydrolytisch gespalten werden. Die Hydrolyse einer Esterbindung liefert zunächst chirale Monoester, die weitere Hydrolyse führt hingegen zu achiralen Diolen (Abb. 98).

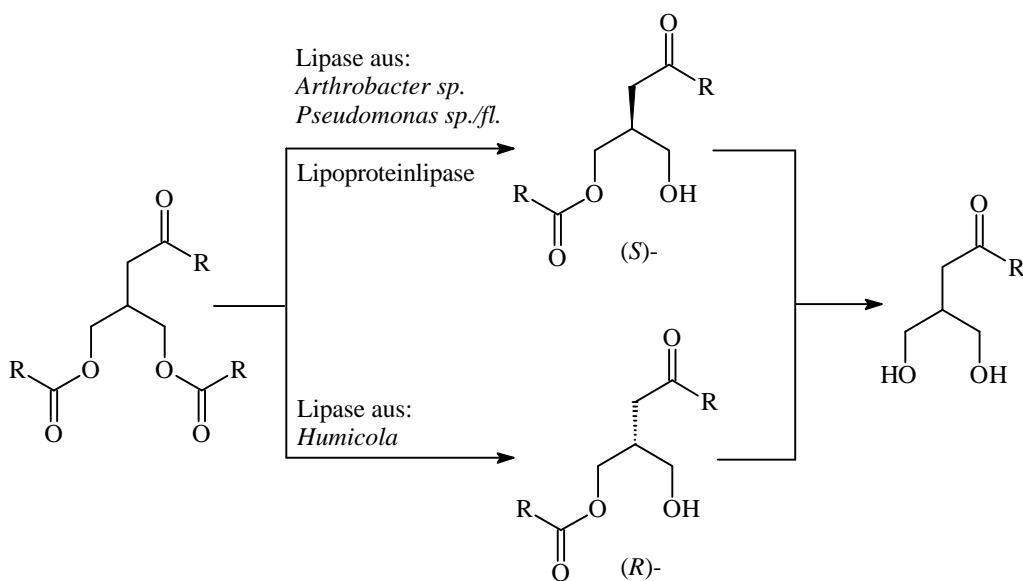


Abb. 98: Enantioselektive Hydrolyse carba-analoger Triglyceride

So führt die Hydrolyse mit einer *sn*-3 spezifischen Lipase, wie z.B. den Lipasen aus *Pseudomonas* (*fl.*, *sp.*, LPL), zu dem (*S*)-carba-analogen Diglycerid, aus dem das entsprechende Phospholipidanalogue hergestellt werden kann (Abb. 99).

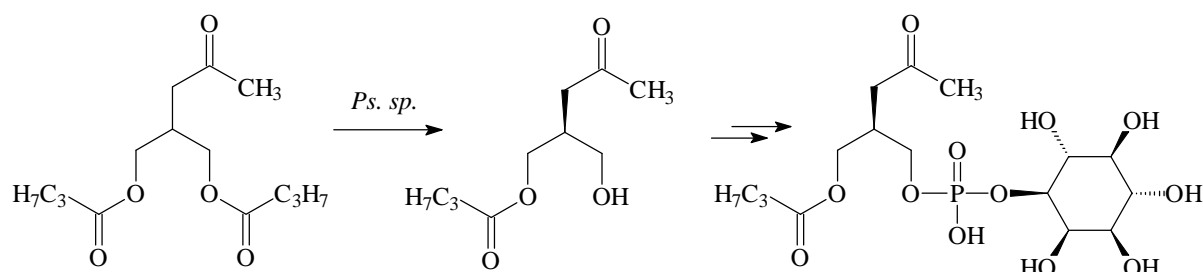


Abb. 99: Enantioselektive Synthese von carba-analogen Inositolphosphaten (Andersch P. 1995)

Nachteilig erwies sich hier die geringe Lagerstabilität der Diglyceridanaloga (<1 Tag bei Raumtemperatur !). Sie cyclisieren rasch unter Lactolbildung (s. Kap. 5.2.1). Daher wird bei der Phosphorylierung das Rohprodukt der Hydrolyse direkt eingesetzt, wobei jedoch immer Nebenreaktionen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde nach einem neuen Weg zu diesen Verbindungen gesucht.

Das Problem der Lactolbildung kann umgangen werden, wenn bei der enzymatischen Differenzierung Glyceridanaloga eingesetzt werden, in denen die Ketofunktion geschützt ist. Derartige Derivate sind Zwischenstufen der in Kap. 4.2. beschriebenen Verfahren zur Darstellung carba-analoger Triglyceride (Modifikation in der *sn*-2-Position). So konnte bereits früh gezeigt werden, daß die bei der Mannich-Route nach Berger (Kap. 4.2.1) erhaltenen Mono- und Triglyceridanaloga mit der olefinischen *exo*-Methylengruppe ebenfalls Substrate von Lipasen sind und enantioselektiv umgesetzt werden können (Jakob B. 1992; Abb. 100).

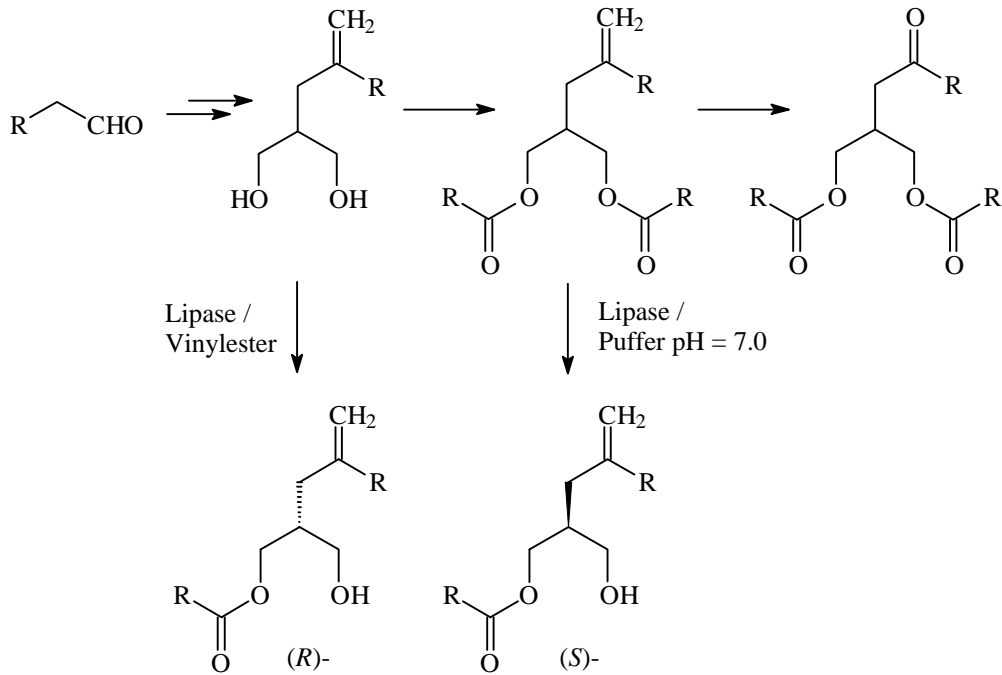


Abb. 100: Synthese und enzymatische Differenzierung carba-analoger Glyceridderivate

Besonders gut gelingt hier die Acylierung der Dirole zu den (R) -Monoestern, die mit sehr hoher Enantiomerenreinheit und hervorragender Ausbeute erhalten werden (Andersch P., Jakob B. 1997 a); Abb. 101,

Tab. 12). Die Enantiomerenreinheiten können hier direkt, d.h. ohne Derivatisierung, mittels HPLC an einer Chiralcel OD-Säule (UV-Detektion $\lambda \cong 212 \text{ nm}$) bestimmt werden.

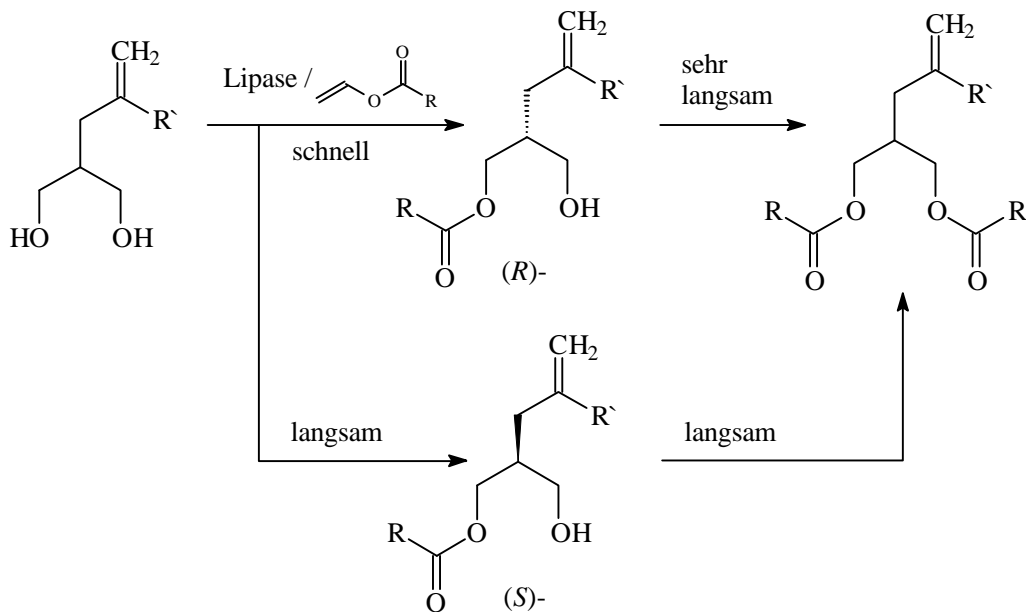


Abb. 101: Enantioselektive Acylierung achiraler Dirole mit einer Lipase aus *Pseudomonas sp.*

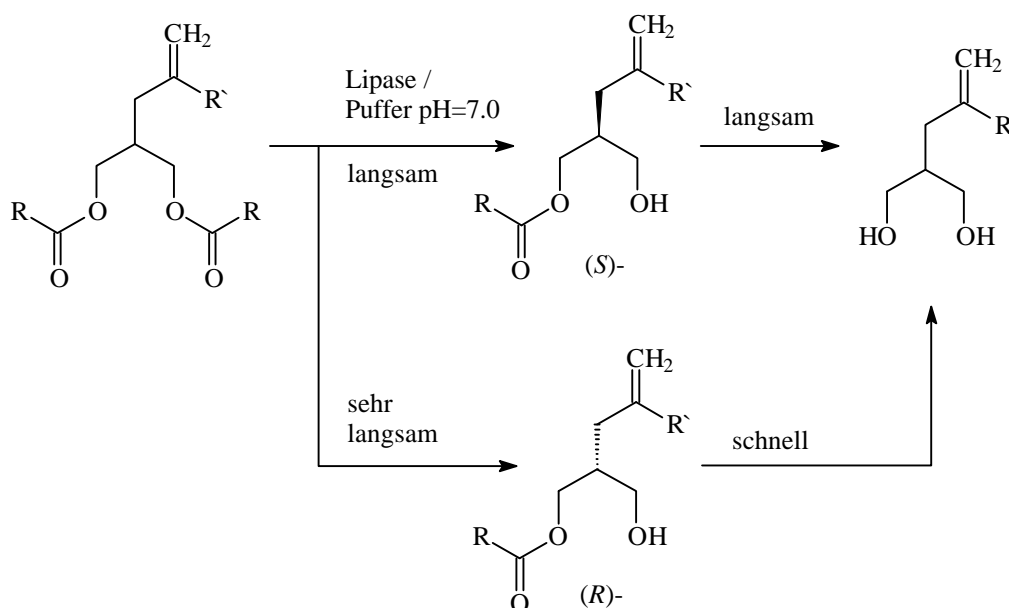
Tab. 12: Enantioselektive Acylierung achiraler Dirole mit einer Lipase aus *Pseudomonas sp.*

Substrat	Reaktionszeit (h)	Ausbeute (%) ¹	ee (%) ²
R = R' = C ₇ H ₁₅	6	92	93
R = R' = C ₇ H ₁₅	11	90	98
R = R' = C ₃ H ₇	7	93	92
R = R' = C ₃ H ₇	11	89	>98
R = R' = CH ₃	5	98	91
R' = CH ₃ ; R = C ₁₁ H ₂₃	11	90	>98

¹Bestimmt durch GC; ²Bestimmt durch HPLC, Säule: Chiralcel OD

Die Monoacylierung der Dirole mit der Lipase aus *Pseudomonas sp.* (SAM II von Amano) liefert die Monoester mit Enantiomerenreinheiten von 91-93%ee. Da die Folgereaktion vergleichsweise langsam verläuft, wird fast ausschließlich der Monoester gebildet. In der Folgereaktion zum 1,3-Diol ist der (*S*)-Monoester das bevorzugte Substrat, so daß die Enantiomerenreinheit mit zunehmender Reaktionsdauer sogar zunimmt. Sobald Diol und (*S*)-Monoester verbraucht sind, kommt die Reaktion praktisch zum Stillstand.

Die entsprechenden Hydrolysen der Diester liefern zwar die Monoester der (*S*)-Konfiguration, jedoch mit deutlich schlechteren Ausbeuten (Andersch P., Jakob B. 1997 a); Abb. 103, Tab. 14).

Abb. 103: Enantioselektive Hydrolyse achiraler Diester mit einer Lipase aus *Ps. sp.*

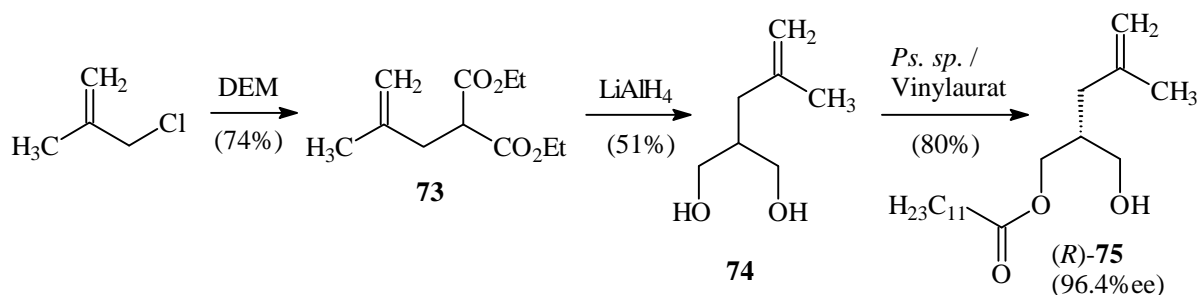
Tab. 14: Enantioselektive Hydrolyse achiraler Diester mit einer Lipase aus *Ps. sp.*

Substrat	Reaktionszeit (h)	Ausbeute (%) ¹	ee (%) ²
R = R' = C ₇ H ₁₅	20	30	96
R = R' = C ₃ H ₇	18	22	94
R = R' = CH ₃	30	24	95
R = R' = CH ₃	50	25	95
R = R' = CH ₃	5 ³	75	70

¹Bestimmt durch GC; ²Bestimmt durch HPLC, Säule: Chiralcel OD; ³Lipase PPL

Die (*S*)-Monoester entstehen zwar ebenfalls mit hoher Enantiomerenreinheit. Jedoch verläuft hier die Folgereaktion extrem rasch. Die primär gebildeten Monoglyceride stellen gute Substrate für die Lipasen dar und werden rasch zu den achiralen Diolen hydrolysiert. Dadurch werden bei hohen ee's niedrige Ausbeuten erhalten. Ein Versuch zur Steigerung der Ausbeute unter Verwendung von PPL war mit 75% zwar erfolgreich, die Enantioselektivität war jedoch mit 70% ee zu gering.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen der enzymatischen Acylierung wurde der carba-analoge Synthesebaustein (*R*)-**75** ausgehend von β -Methallylchlorid in drei Reaktionsschritten synthetisiert (Abb. 104).

Abb. 104: Synthese von (*R*)-**75**

Diethylmalonat (DEM) wurde mit β -Methallylchlorid alkyliert. Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid lieferte den Diol **74**, der enzymatisch mit einer Lipase aus *Pseudomonas species* zum Monoester (*R*)-**75** mit einer Enantiomerenreinheit von 96.4 % ee (bestimmt durch HPLC, Säule: Chiralcel OD) acyliert wurde (Beweis der absoluten Konfiguration s. Kap. 7.1).

Für die Anknüpfung des Phosphocholinrestes gibt es folgende Synthesemethoden (Abb. 105).

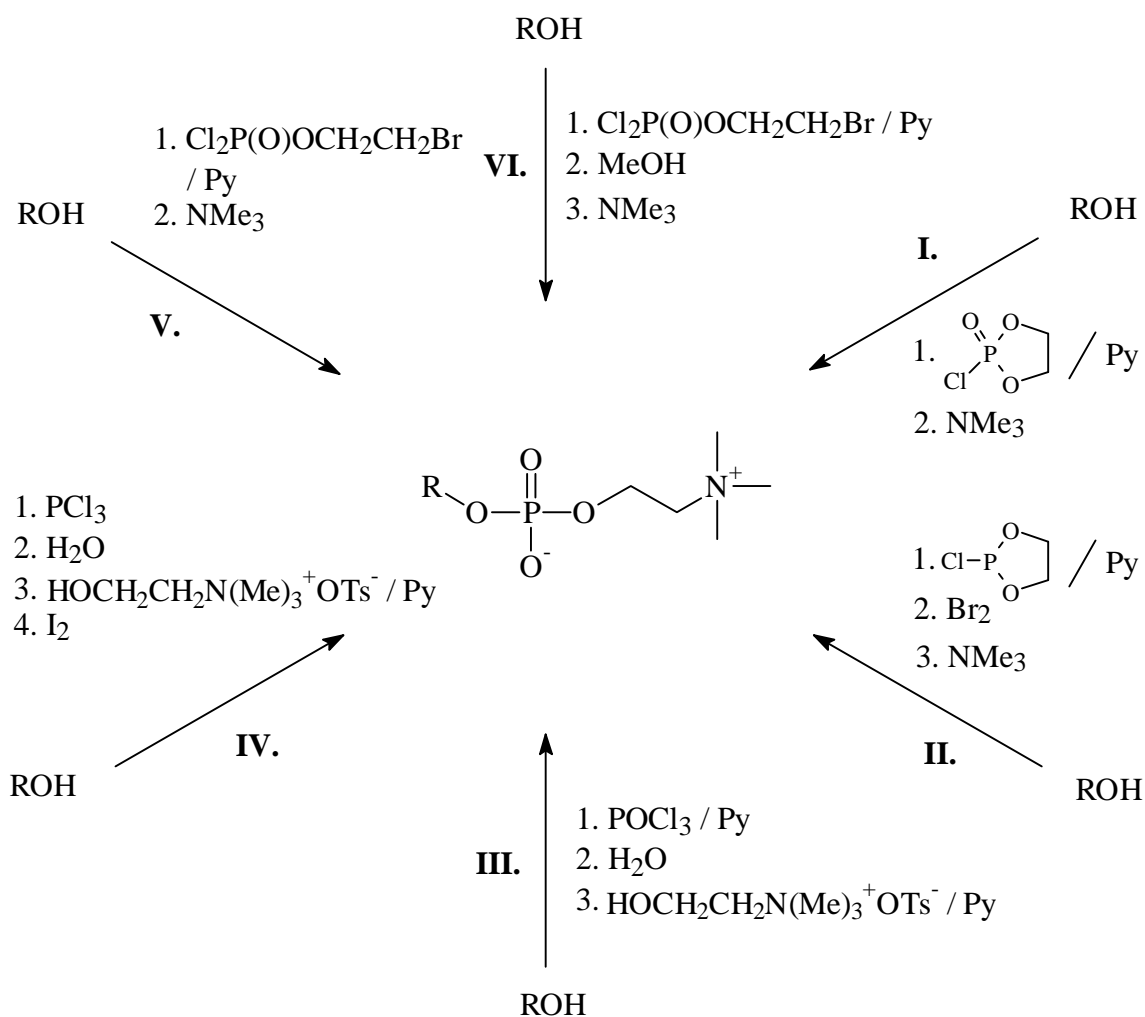
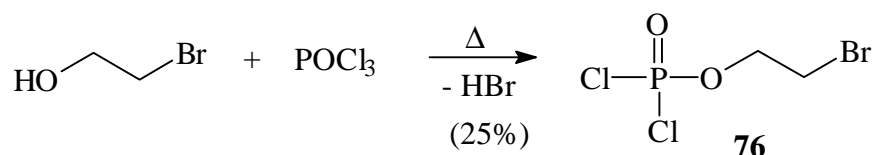


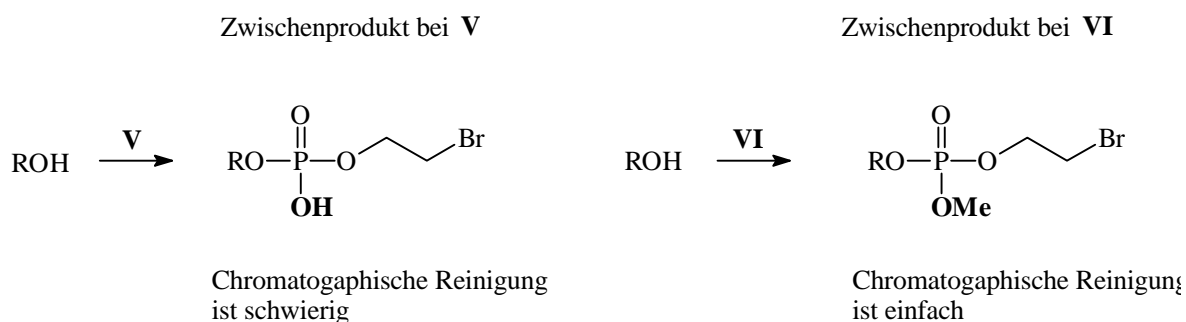
Abb. 105: Synthesemethoden zur Darstellung von Phosphocholinen ausgehend von Alkoholen
I.: Kim Ui T. 1991, Dijkman R. 1990, **II.**: Erukulla R. K. 1994, **III.**: Yu L. 1990, Alcaraz M.-L. 1996, **IV.**: Lindh I. 1989, **V.**: Hansen W. J. 1982, Ukawa K. 1989, **VI.**: Eibl. H. 1988, Woolley P. 1988

In Vorversuchen wurde *n*-Hexanol bzw. (*R*)-**75** entsprechend den Methoden **I-VI** phosphoryliert. Dabei stellte sich heraus, daß die Phosphorylierung nach **I** mit 2-Chlor-2-oxo-1,3,2-dioxophospholan Schwierigkeiten machte. Der aus (*R*)-**75** entstandene Ester konnte nicht chromatographisch gereinigt werden. Die Phosphorylierung von (*R*)-**75** nach **II** erwies sich als ungeeignet, da die Addition von Brom an die olefinische Doppelbindung nicht verhindert werden konnte. Auch Versuche zur direkten Verknüpfung mit Cholinphosphat (als Tosylat; **III-IV**) blieben weitgehend erfolglos. Die Phosphorylierung nach **V-VI** benötigt als Reagens Phosphorsäure-2-bromethylester-dichlorid **76**, erhältlich durch Umsetzung von 2-Bromethanol mit Phosphoroxitrichlorid (Abb. 106).

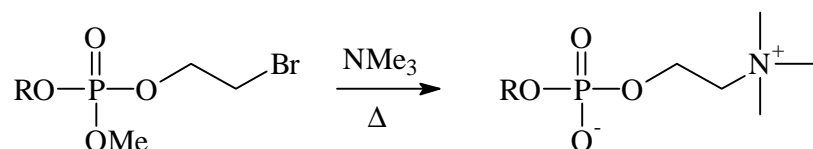
Abb. 106: Synthese von Phosphorsäure-2-bromethylester-dichlorid **76**

72 kann durch Destillation gereinigt werden. Die Gesamtausbeute ist recht niedrig, da die Reaktion nicht quantitativ verläuft und dabei auch die Di- und Triester gebildet werden.

Die Reaktionsprodukte der Phosphorylierung von (*R*)-**75** mit **76** nach der Methode **V** ließen sich durch Chromatographie über Kieselgel nicht zufriedenstellend trennen (Abb. 107). Die besten Resultate wurden mit Methode **VI** erzielt. Hierbei wird ein Equivalent des Alkohols ROH bei 0 °C mit **76** umgesetzt. Zugabe von Methanol und Erwärmen auf Raumtemperatur führt dann zu dem entsprechenden Methylesterderivat (Abb. 107).

Abb. 107: Zwischenprodukte der Phosphorylierung nach **V** bzw. **VI**

Die Umsetzung eines derartigen Methylesterderivates mit wässrigem Trimethylamin liefert das entsprechende Cholinderivat (Abb. 108).

Abb. 108: Synthese von Phosphocholinderivaten nach der Methode **VI**

Der Methylester dient hierbei *quasi* als temporäre Schutzgruppe, die beim folgenden Reaktionsschritt - der nucleophilen Substitution des Bromides durch Trimethylamin - abgespalten wird.

Bei der Phosphorylierung von (*R*)-**75** nach Methode **VI** mußte jedoch zunächst die Frage geklärt werden, ob unter den Reaktionsbedingungen Racemisierungen, z.B. durch 1,3-Acylgruppenwanderung, eintreten. Zur Herstellung der entsprechenden Referenzsubstanzen wurde daher auch der racemische Alkohol (\pm)-**75** in den entsprechenden Phosphorsäureester (\pm)-**76** überführt (Abb. 109).

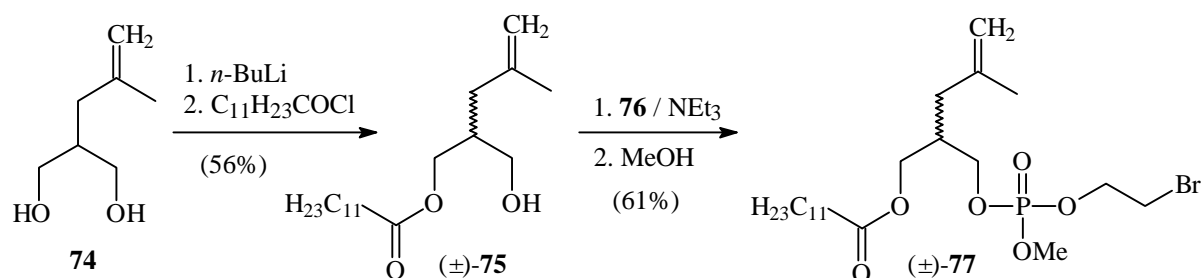


Abb. 109: Synthese von racemischen (\pm)-**76**

Die analog hierzu durchgeführte Phosphorylierung von (*R*)-**75** ergab (*S*)-**77** mit 77% Ausbeute. Durch die Phosphorylierung wird natürlich ein zusätzliches Chiralitätszentrum (Phosphoratom) eingeführt. (\pm)-**77** besteht daher aus vier Verbindungen (zwei diastereomere Enantiomerenpaare), (*S*)-**77** hingegen aus zwei Enantiomeren. Die diastereomeren und enantiomeren Verbindungen konnten teilweise mittels HPLC-Chromatographie an einer Chiralphase (Chiralcel OD) getrennt werden (Abb. 110; Trennbedingungen siehe Experimenteller Teil).

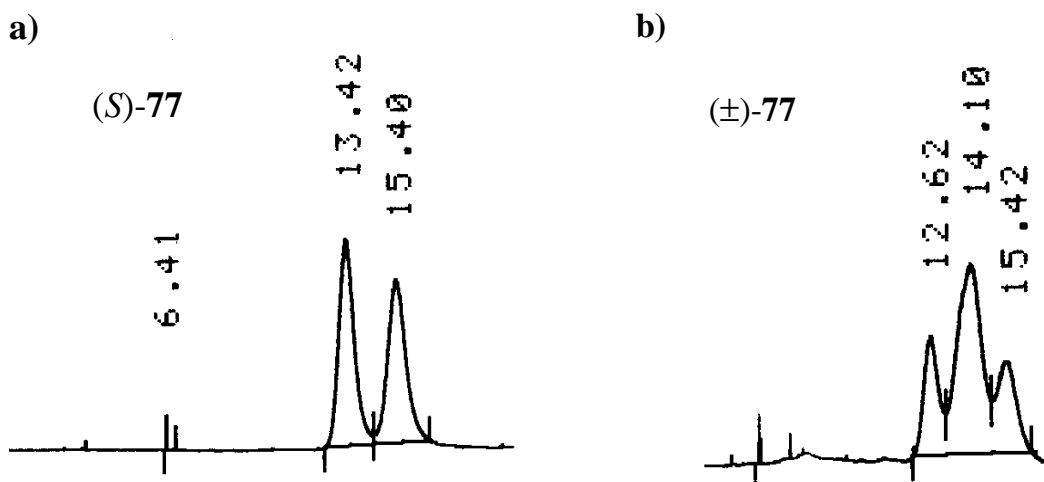


Abb. 110: HPLC-Chromatogramm von (*S*)-**77** und (\pm)-**77**

Man findet bei (*S*)-**77** zwei Signale (1:1) des Enantiomerenpaares. Bei (\pm)-**77** werden nur drei Signale mit den Intensitäten 1:2:1 beobachtet und nicht vier (1:1:1:1) wie erwartet. Die Diastereomeren von (*R*)-**77** werden also unter diesen Bedingungen nicht getrennt und liefern nur ein Signal. Man kann also davon ausgehen, daß bei der Phosphorylierung unter den beschriebenen Bedingungen keine Racemisierung des Phospholipides erfolgt.

(*S*)-**77** wurde mittels Rutheniumtrichlorid / Natriumperodat zum Keton (*S*)-**78** oxidiert, welches durch Umsetzung mit Trimethylamin das gewünschte carba-analoge Phosphatidylcholin (*S*)-**79** lieferte. Die gesamte Synthesesequenz ist in Abb. 111 zusammengefaßt.

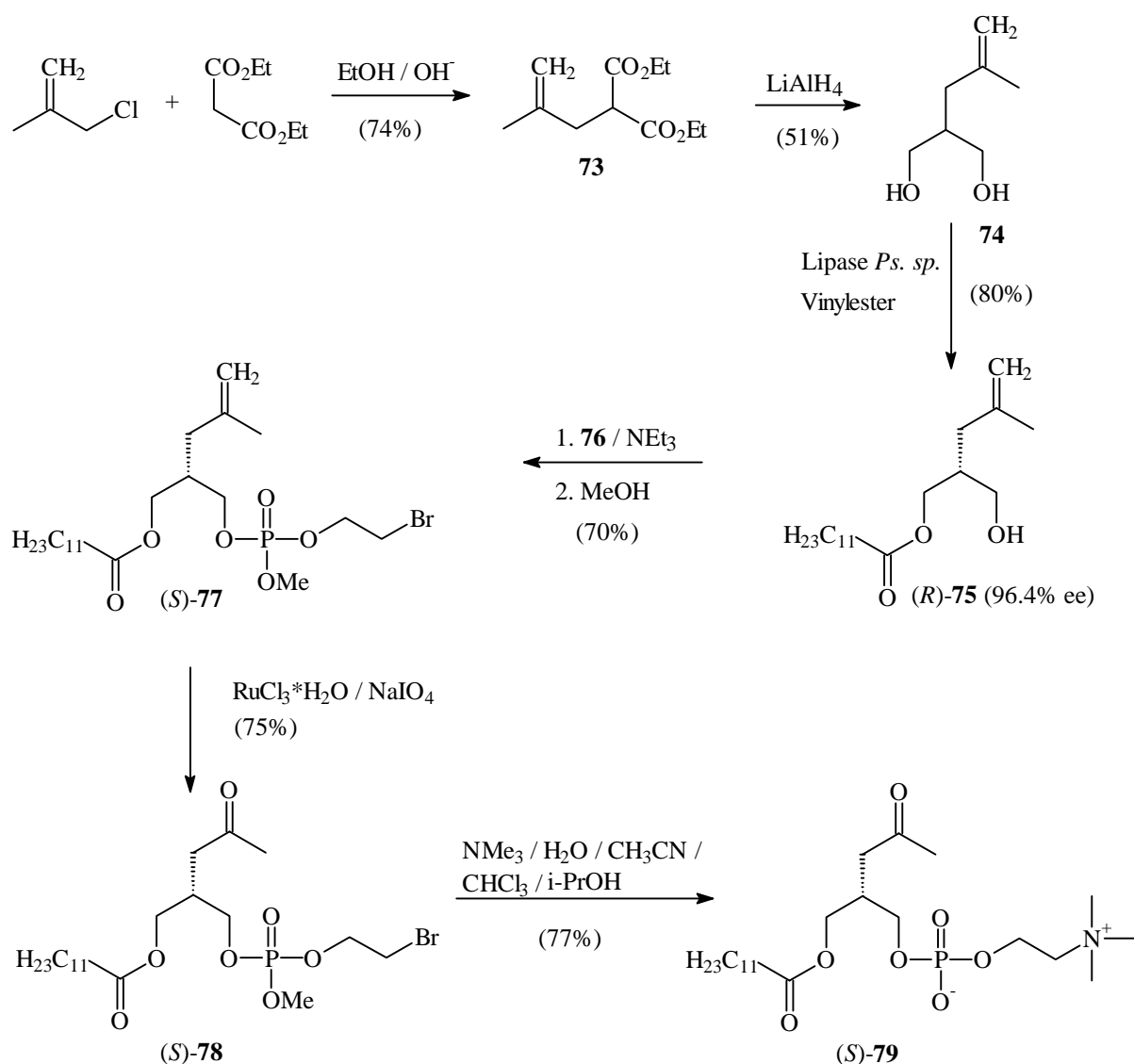


Abb. 111: Synthese eines carba-analogen Phosphocholins modifiziert in der *sn*-2 Position

Der Drehwert von (*S*)-**79** beträgt $[\alpha]_D = -4.3^\circ$ ($c = 3.0$, CH_2Cl_2); $[\alpha]_{365} = -8.5^\circ$ ($c = 3.0$, CH_2Cl_2). Die Verbindung wurde mittels NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{31}P -NMR, ^1H -/ ^{13}C -/ ^{31}P -

COSY Spektren) und IR eindeutig charakterisiert. Die Reinheit wurde mittels HPLC und ^{31}P -NMR überprüft (Abb. 117) und beträgt demzufolge $\geq 98\%$. Die biologische Wirksamkeit von (*S*)-**79** wird zur Zeit untersucht.

Repräsentativ ist in Abb. 111 das ^1H -NMR Spektrum von (*S*)-**79** dargestellt.

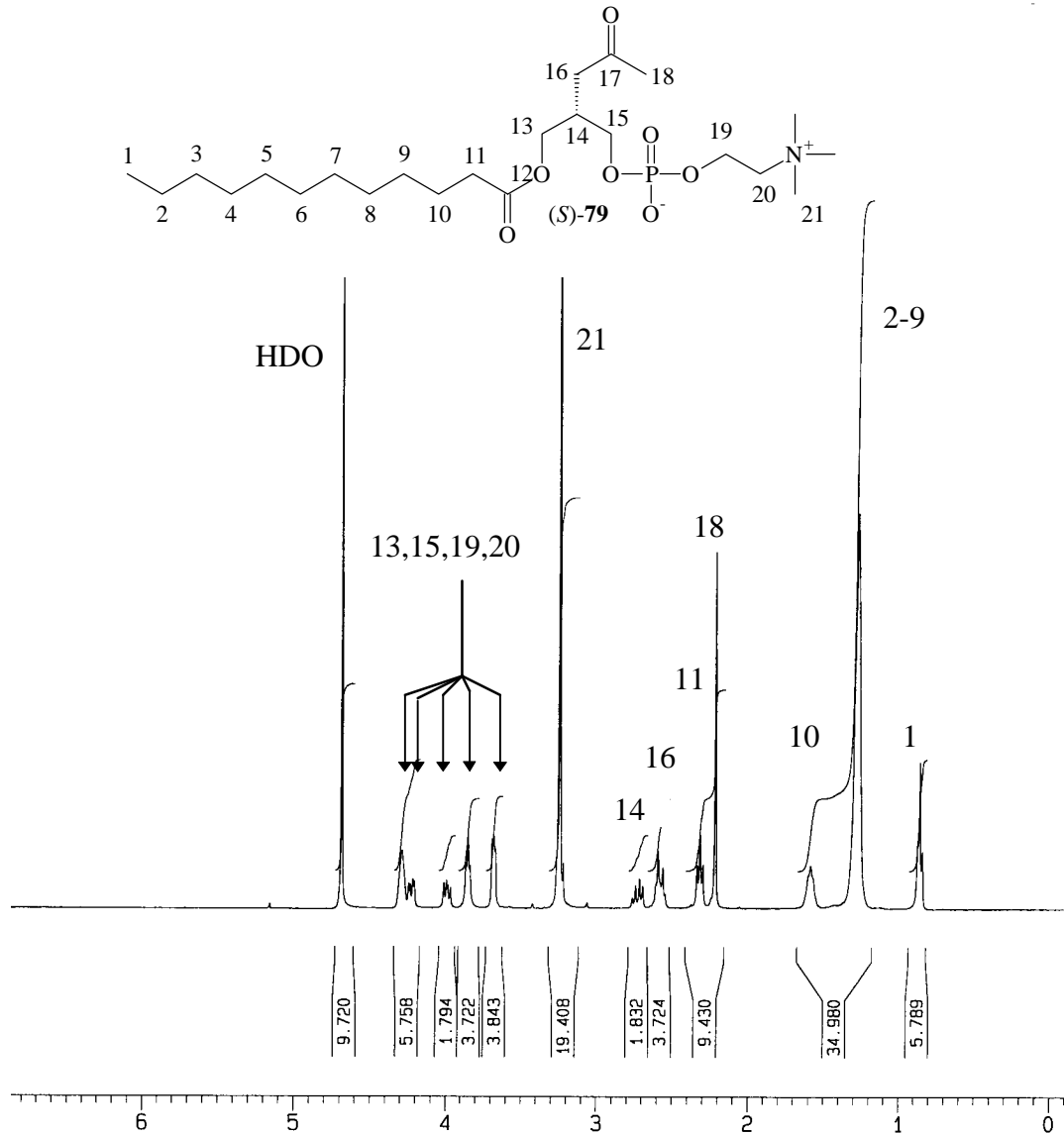


Abb. 111: ^1H -NMR Spektrum von (*S*)-**79**

Deutlich zu erkennen ist die Acylgruppe mit Signalen bei 0.9 ppm (1) (Tripplett, 3 H), 1.3 ppm (2-9) (Multipllett, 16 H), 1.6 ppm (10) (Multipllett, 2 H) und bei 2.3 ppm (11) (Tripplett, 3 H). Die Methylgruppe (18) benachbart zu der Ketofunktion liefert das Singulett bei 2.2 ppm (3 H). Die ebenfalls benachbarte Methylengruppe (16) führt zu einem Multipllett bei 2.6 ppm (2 H). Es folgt bei 2.7 ppm die CH-Gruppe (14) mit einem Multipllett. Bei 3.2 ppm befindet sich ein

intensives Singulett (9 H), welches von den Stickstoff gebundenen Methylgruppen (21) herrührt. Es folgen 5 Signalgruppen (8 H) bei 3.7, 3.8, 4.0, 4.2 und 4.3 ppm, die den drei CH₂-O und der CH₂-N Gruppe entsprechen.

Abb. 112 zeigt das ¹³C-NMR Spektrum des carba-analogen Phospholipids (*S*)-**79**. Auch hier

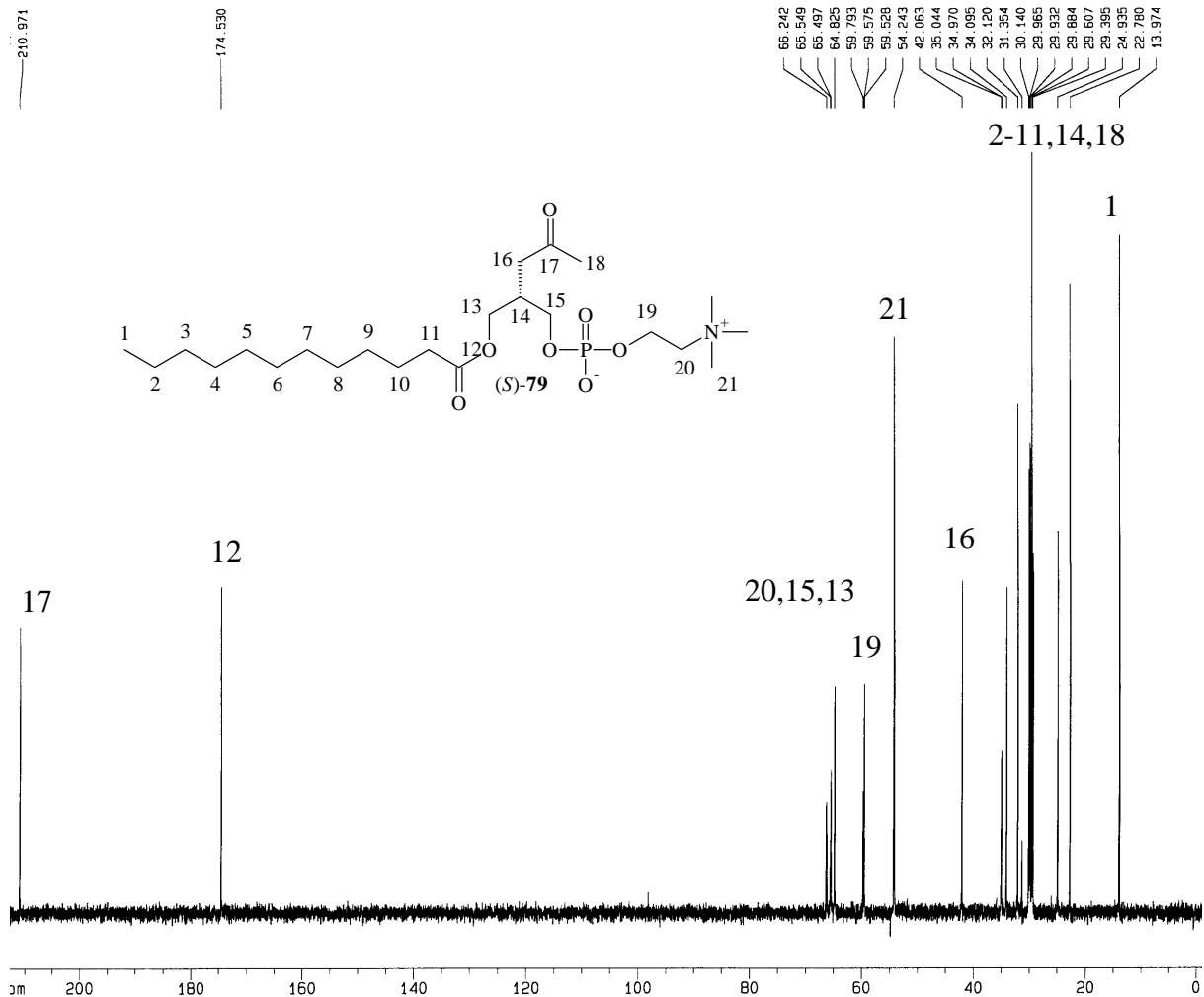


Abb. 112: ¹³C-NMR Spektrum von (*S*)-**79**

sind deutlich die Signale für die Lauroylgruppe zu erkennen. Sie liegen bei 11.4, 22.8-35.0 und 174.5 ppm. Bei 54.2 ppm befindet sich ein intensives Signal, welches von den drei am Stickstoff gebundenen Methylgruppen (21) herrührt. Die Signale zwischen 59.5 und 66.2 ppm entsprechen den CH₂-O Gruppen, sowie der CH₂-N Gruppe. Bei 174.5 ppm liegt die Estergruppe (12) und bei 211.0 ppm die Carbonylgruppe des carba-analogen Acetates (17).

Für die genaue Zuordnung der einzelnen Signale wurden auch ¹H,³¹P-COSY (Abb. 113), ¹H,¹H-COSY (Abb. 114) und ¹H,¹³C-COSY Spektren (Abb. 115) aufgenommen und analysiert.

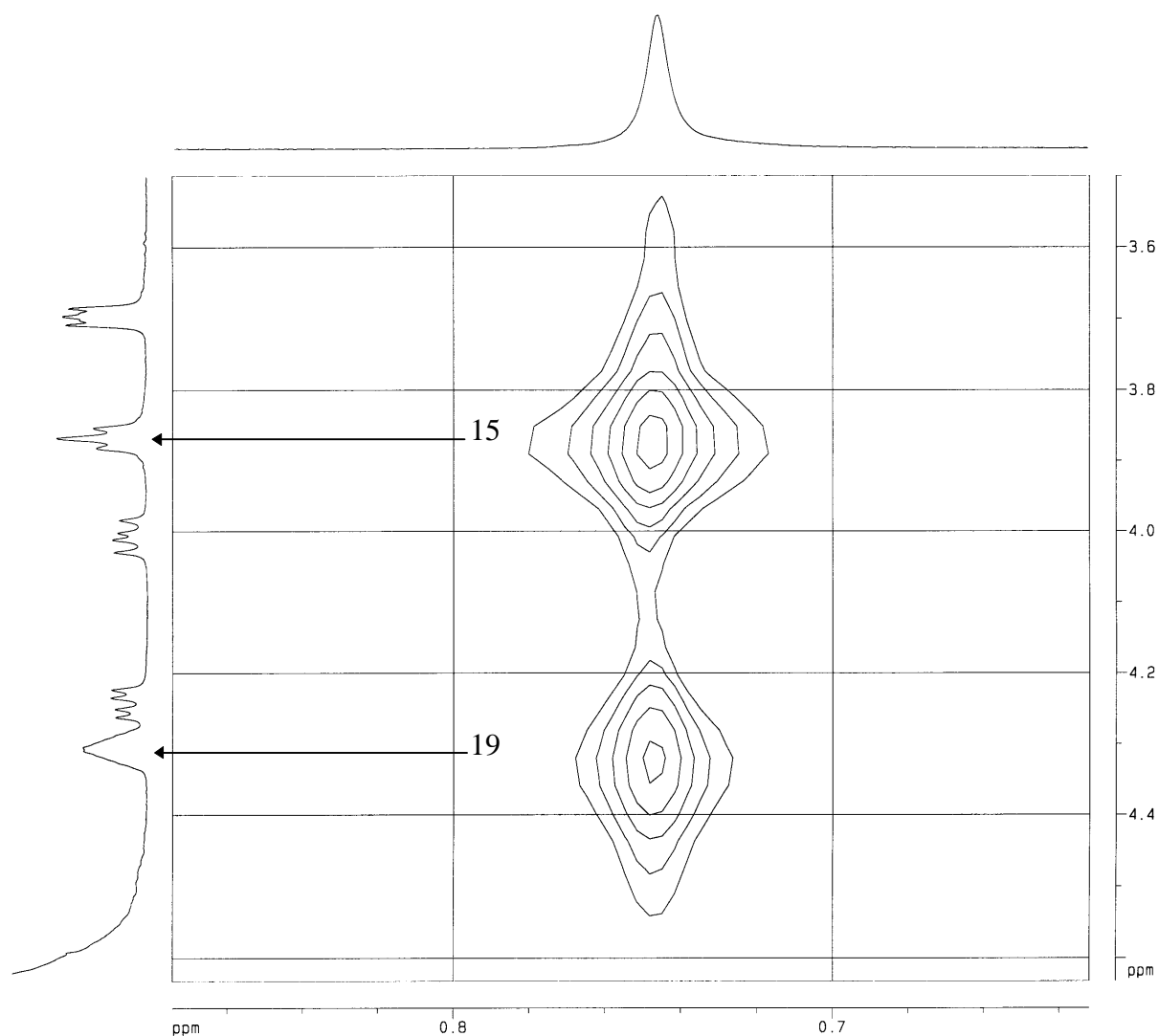


Abb. 113: $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -COSY-Spektrum von (*S*)-**79**

Anhand des $^1\text{H}, ^{31}\text{P}$ -COSY-Spektrums von (*S*)-**79** kann die Lage der $\text{CH}_2\text{-O-P}$ Gruppen eindeutig bestimmt werden. Bei 3.8 ppm handelt es sich um die $\text{CH}_2\text{-O-P}$ Gruppe, die zum carba-analogem Glycerid gehört. Hinter diesem „Tripplett“ verbirgt sich der AB-Teil eines ABX-Spinsystems, welches zusätzlich eine $^3J_{(\text{HP})}$ -Kopplung aufweist. Das Signal bei 4.3 ppm entspricht der $\text{CH}_2\text{-O-P}$ Gruppe des Cholinesters. Hier wird aufgrund der zusätzlichen Kopplung zum Stickstoff lediglich ein breites Singulett erhalten.

Eine weitere Hilfe bei der Zuordnung der einzelnen Signale bietet das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von (*S*)-**79** (Abb. 114).

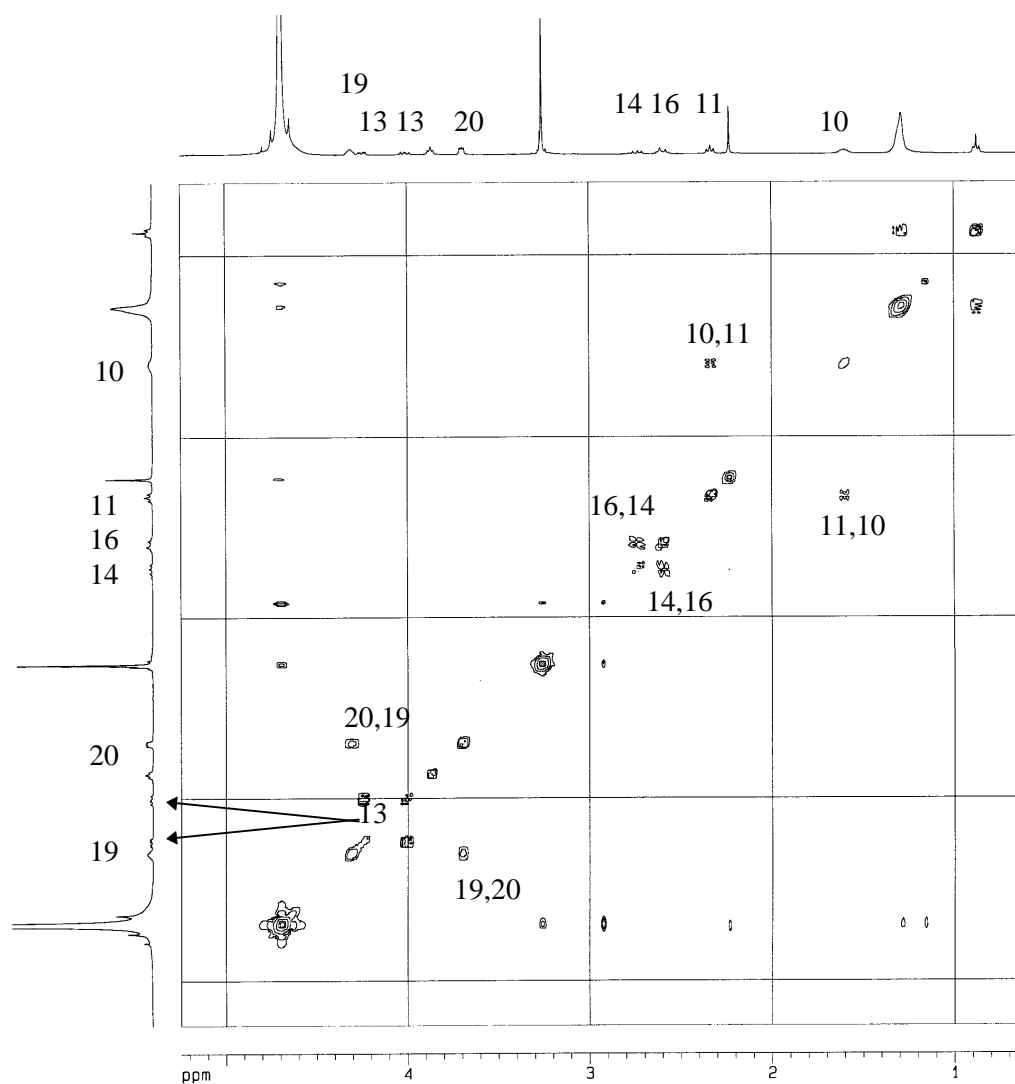


Abb. 114: $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von (*S*)-**79**

Wichtig ist insbesondere der Bereich von 3.7 bis 4.3 ppm, da hier die Signalgruppen nun eindeutig zugeordnet werden können. Die Methylengruppe bei 3.7 koppelt mit der Methylengruppe bei 4.3 ppm (Nr. 19), so daß es sich hierbei um die am Stickstoff gebundene Methylengruppe (Nr. 20) handeln muß. Die Signalgruppen bei 4.0 und 4.2 ppm koppeln ebenfalls miteinander. Es handelt sich hierbei um die acylierte $\text{CH}_2\text{-O}$ Gruppe (Nr. 13). Durch die benachbarte CH-Gruppe liegt ein ABX-Spinsystem vor. Bei 4.0 ppm befindet sich der A-Teil und bei 4.2 ppm der B-Teil des ABX-Spinsystem jeweils als Dublett von Dubletts aufgespalten. Unter Zuhilfenahme der zuvor beschriebene Spektren konnten im $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY-NMR Spektrum von (*S*)-**79** (Abb. 115) praktisch alle charakteristischen Signale dem ^1H - und dem ^{13}C -Spektrum zugeordnet werden.

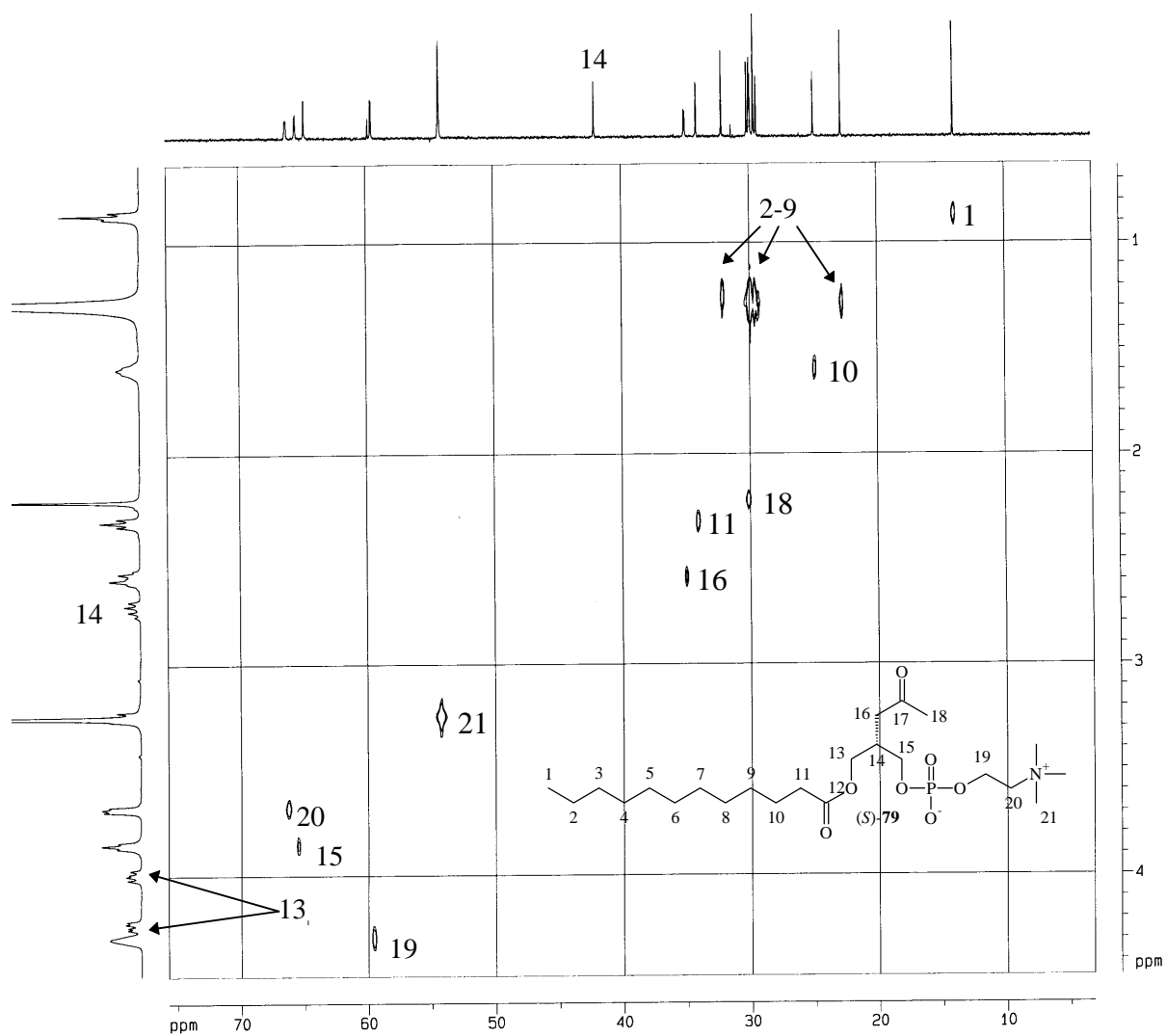


Abb. 115: ^1H , ^{13}C -COSY-NMR Spektrum von (S)-78

Das carba-analoge Phosphatidylcholin (S)-78 ist gemäß dem ^{31}P -NMR Spektrum sowie dem HPLC-Chromatogramm (Säule: RP-18; Streulichtdetektor) - dargestellt in Abb. 117 - sehr rein.

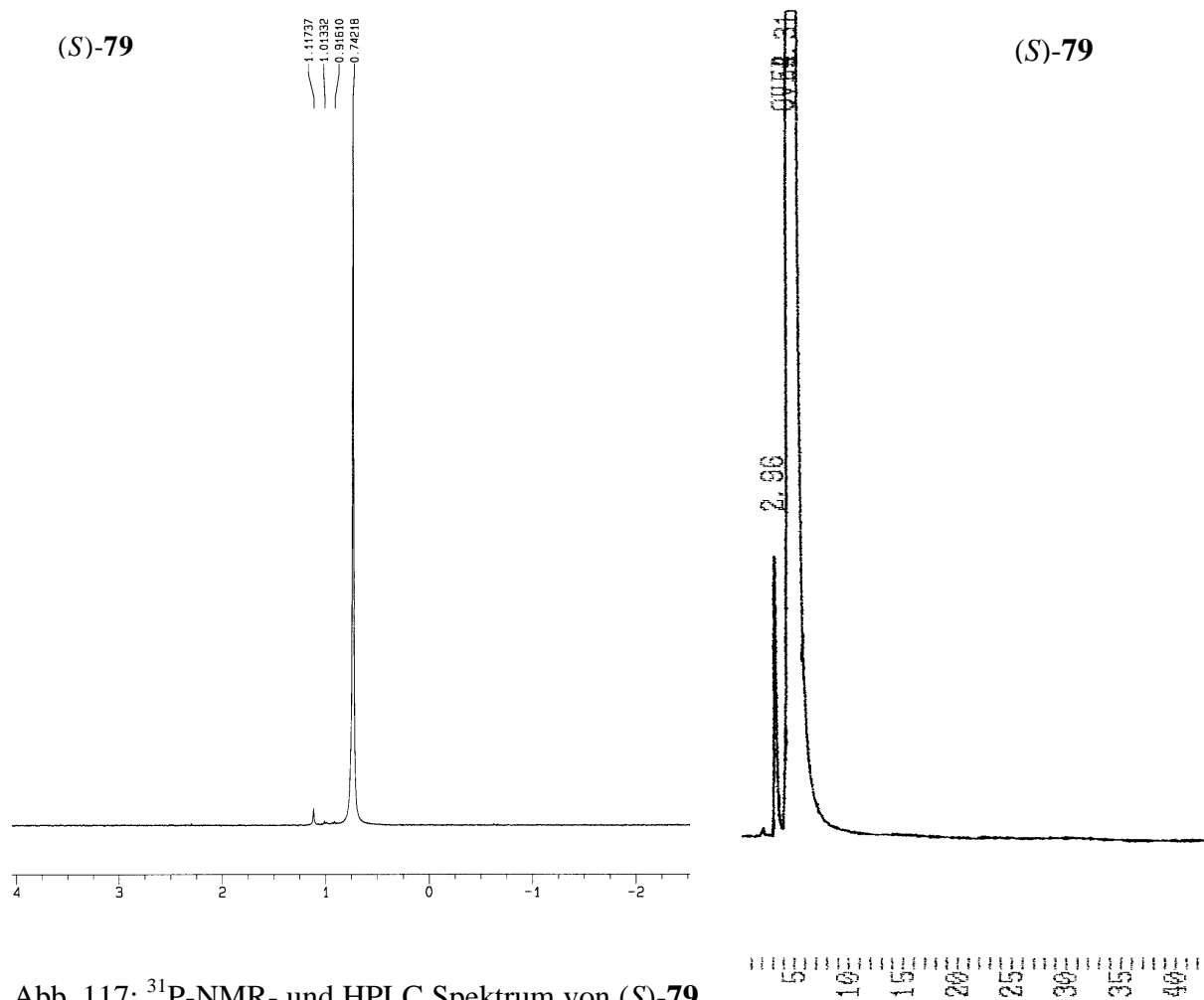


Abb. 117: ^{31}P -NMR- und HPLC Spektrum von (S)-79
(HPLC-Trennbedingungen siehe Experimenteller Teil).

Im ^{31}P -NMR Spektrum sind nur minimale Verunreinigungen bei 0.9, 1.0 und 1.1 ppm nachweisbar. Gemäß dem HPLC-Chromatogramm beträgt die Reinheit jedoch 99%.

6.3 Modifikation in den *sn*-1,2(2,3) Positionen

6.3.1 Einleitung

Die formale Substitution der sp^3 -Sauerstoffatome in der *sn*-1 und der *sn*-2 Position von Phosphatidylcholinen durch jeweils eine Methylengruppe führt zu den entsprechenden di-carba-analogen Phospholipiden (Abb. 117).

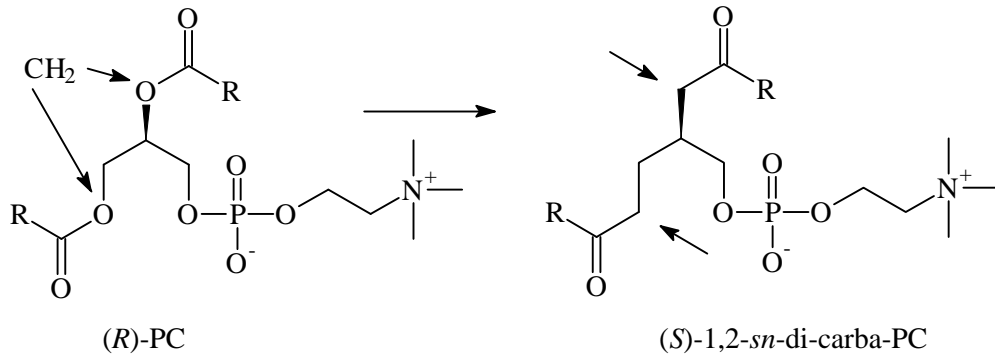


Abb. 117: Carba-analoge Phospholipide durch Modifikation der Positionen *sn*-1 und *sn*-2

Diese Verbindungsklasse wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. Da aus der Synthese der Triglyceridanaloga (Kap. 4.4) geeignete Synthesebausteine vorhanden waren, konnte die Synthese eines entsprechenden (*S*)-1,2-*sn*-di-carba-analogen Phosphatidylcholins in Angriff genommen werden.

6.3.2 Synthese von di-carba-analogem Phosphatidylcholin

Eine retrosynthetische Analyse ist in Abb. 118 dargestellt.

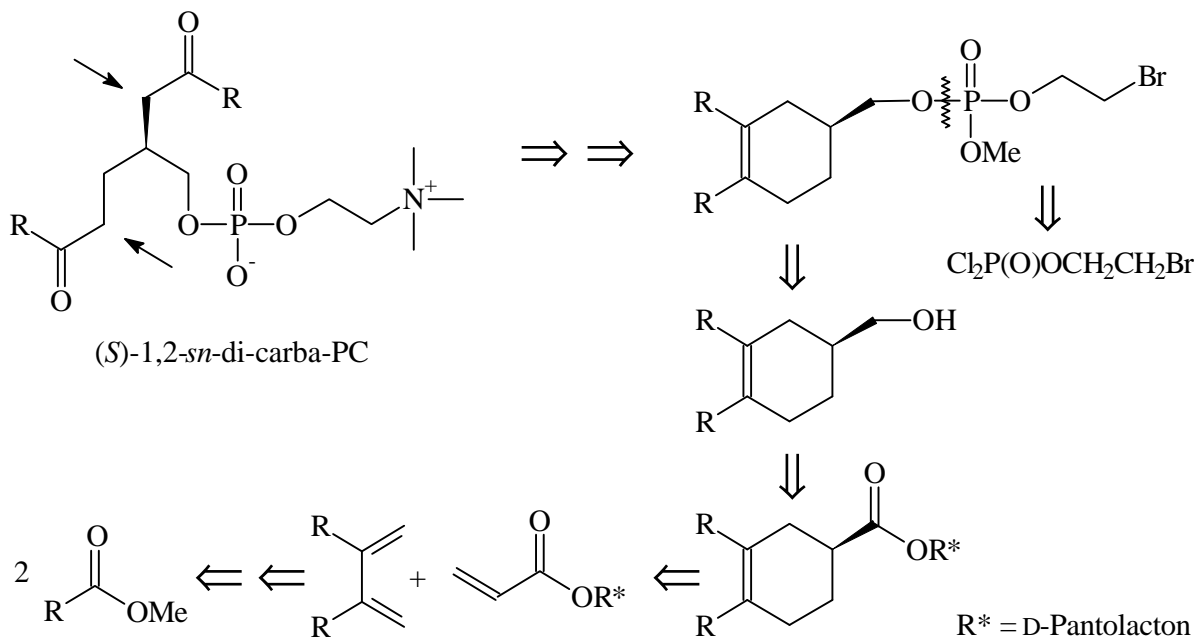


Abb. 118: Retrosynthese di-carba-analoger Phosphatidylcholone

Die von Laurinsäuremethylester ausgehende Synthese ist in Abb. 119 gezeigt.

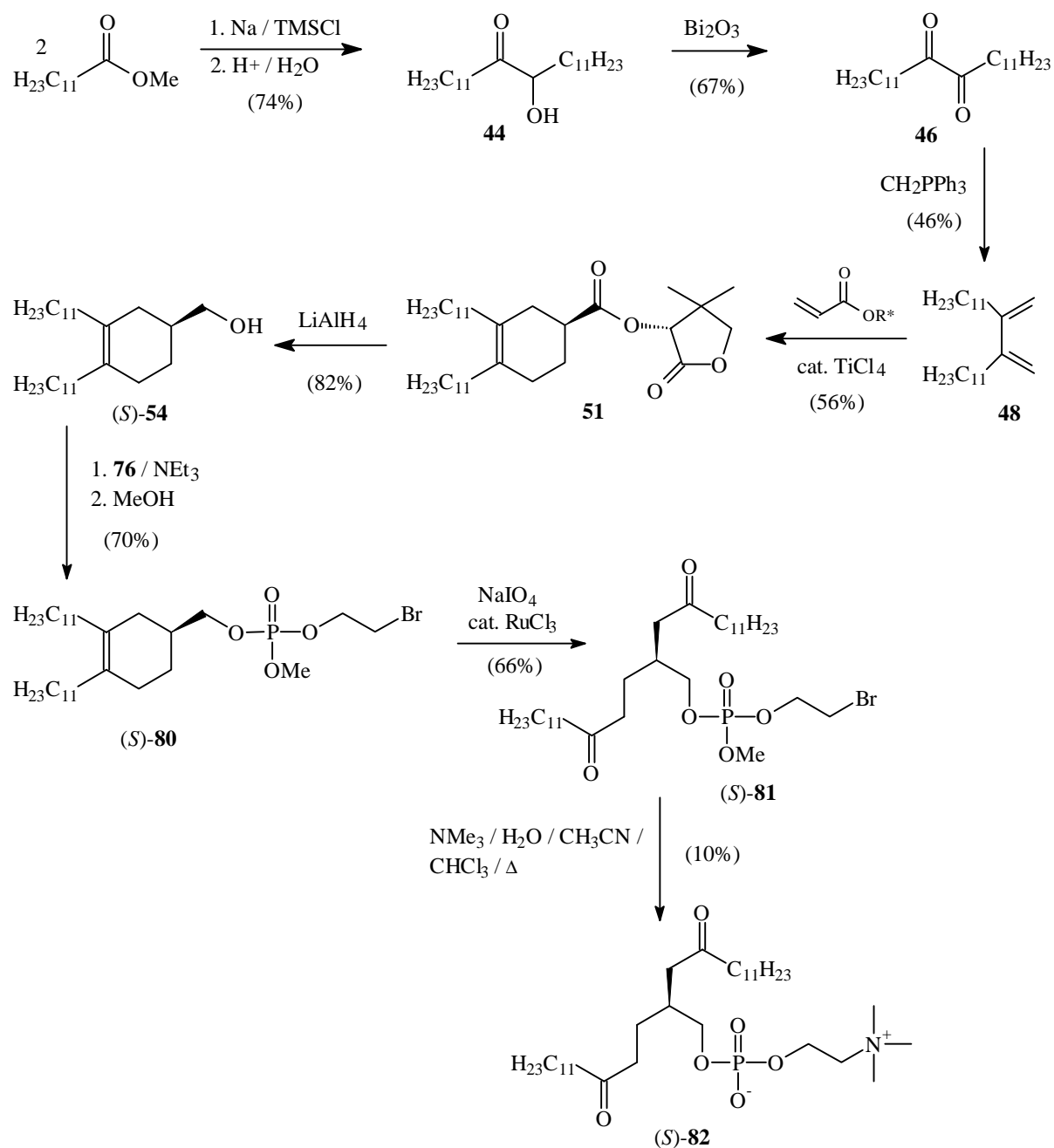


Abb. 119: Synthese von (S)-82

Dazu wurde durch reduktive Dimerisierung mittels Natrium aus Laurinsäuremethylester das Acyloin **44** gewonnen und dieses mit Bi_2O_3 zu **46** oxidiert. Wittig-Olefinierung von **46** ergab das gewünschte symmetrisch disubstituierte Butadien **48**, welches durch asymmetrische Diels-Alder Addition mit dem chiralen Acrylsäure-D-pantolactonester zum Cyclohexenderivat **51** cyclisiert wurde. Reduktion von **51** mittels Lithiumaluminiumhydrid lieferte den Alkohol (S)-**54**. Die Synthese zum Phosphocholin Derivat erfolgte analog dem zuvor beschriebenen

Verfahren (vgl. Kap. 6.2.2, Abb. 107, Abb. 108) durch Umsetzung mit Phosphorsäure-2-bromethylester-dichlorid **76** zu (*S*)-**80**. Die oxidative Spaltung der olefinischen Doppelbindung durch Ruthenium-(III)-chlorid/Natriumperiodat lieferte den C-analogen Phospholipidbaustein (*S*)-**81**. Dessen Alkylierung mit Trimethylamin lieferte nach chromatographischer Reinigung über Kieselgel das gewünschte di-carba-analoge Phosphatidylcholin (*S*)-**82**.

Entgegen aller Erwartungen gelang die Überführung des Bromethylesters (*S*)-**81** in das Cholinderivat (*S*)-**82** nur unbefriedigend. Obwohl bei der Synthese von (*S*)-**82** völlig identische Versuchsbedingungen wie bei (*S*)-**79** (77% Ausbeute) eingehalten wurden, konnte (*S*)-**82** lediglich mit 10 % Ausbeute (verunreinigt; s. HPLC-Chromatogramm Abb. 122) erhalten werden. Bei der chromatographischen Reinigung wurden weitere Fraktionen gewonnen, die auf eine Spaltung des Moleküls an den Phosphorsäureesterbindungen schließen lassen. Offensichtlich neigt das Produkt verstärkt zur Hydrolyse an diesen Bindungspositionen. (*S*)-**82** wurde mittels ^1H - , ^{13}C -und ^{31}P -NMR sowie IR charakterisiert und bestimmt. Bei den NMR-Spektren trat eine deutliche Linienverbreiterung auf. Hierdurch wurde die Auswertung erschwert und die Aufnahme von COSY-Spektren war nicht möglich. Die Reinheit der Verbindung wurde mittels HPLC bestimmt.

Abb. 120 zeigt das ^1H -NMR-Spektrum von (*S*)-**82**.

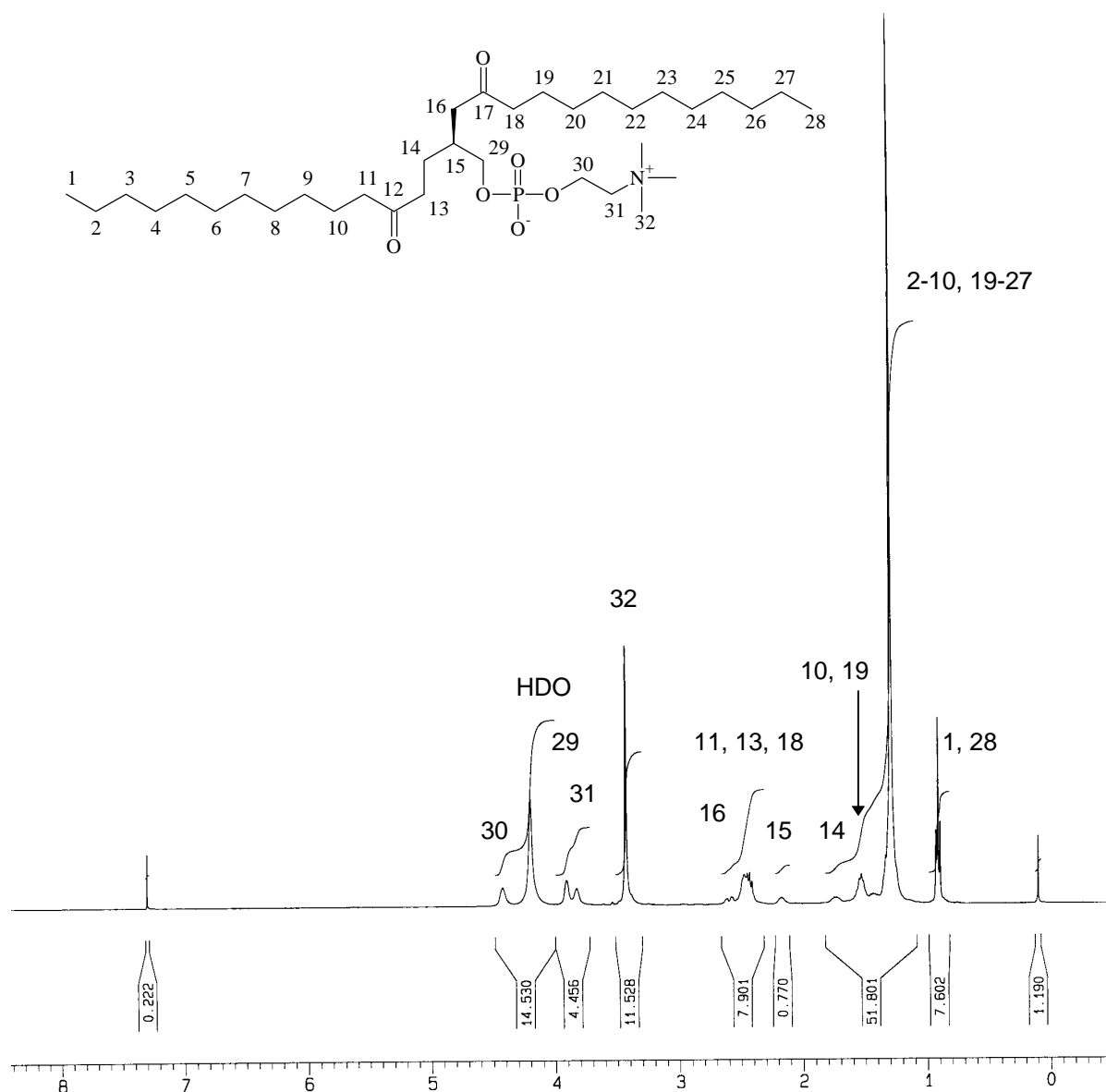


Abb. 120: ¹H-NMR-Spektrum von (S)-82

Aufgrund der Linienverbreiterung, vermutlich bedingt durch die Bildung von Aggregaten in der Lösung, sind die einzelnen Signale hier schwerer zu identifizieren. Die Signale der Alkylketten findet man bei 0.9, 1.3 sowie 1.5 ppm, gefolgt von den Signalen des di-carba-analogen Glyceringerüsts an C14 und an C15 bei 1.7 und 2.1 ppm. In dem Bereich von 2.4 bis 2.6 ppm liegen insgesamt die acht Protonensignale der den Carbonyl- benachbarten Methylengruppen. Bei 3.4 ppm liegt das charakteristische Singulett der drei Cholin-Methylgruppen. Die zwei an Sauerstoff - sowie die am Stickstoff gebundenen Methylengruppen (29, 30, 31) erscheinen jeweils nur als breites Singulett in dem Bereich von 3.8 bis 4.4 ppm. Von geringerer Qualität ist aufgrund der Linienverbreiterung auch das ¹³C-NMR-Spektrum von (S)-82 (Abb. 121).

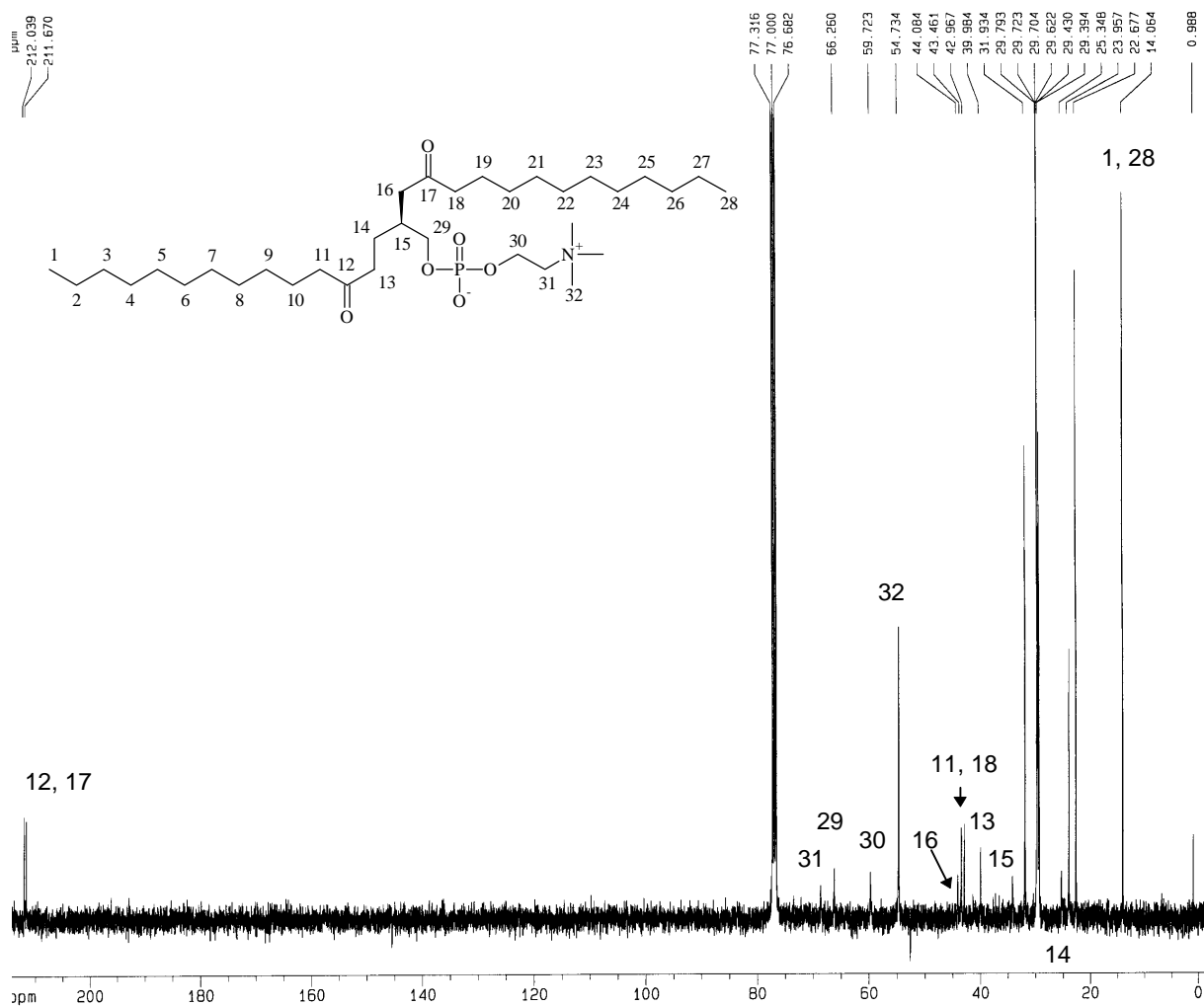


Abb. 121: ^{13}C -NMR-Spektrum von (S)-82

Trotzdem können alle Signale eindeutig identifiziert werden. Von hoher Intensität sind die Signale der Alkylketten. Sehr kleine Intensitäten weisen die Signale des di-carba-analoges Glyceringerüsts (13-16, 29) und des Cholinrestes (30, 31) auf. Besonders charakteristisch ist wiederum das intensivere Signal der drei Methylgruppen des Cholinrestes (32) bei 54.7 ppm sowie die zwei Signale der Carbonylgruppen (12, 17) bei 211.7 und 212.0 ppm. Die Reinheit des Produktes wurde ebenfalls mittels ^{31}P -NMR und HPLC Chromatographie überprüft (Abb. 122; Trennbedingungen siehe Experimenteller Teil).

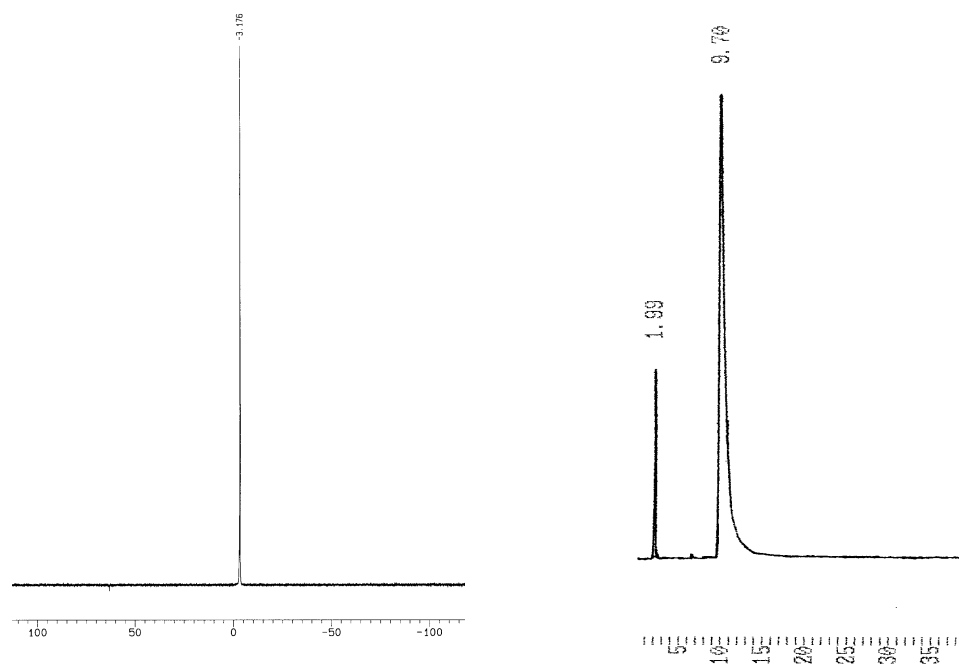


Abb. 122: ^{31}P -NMR und HPLC-Chromatogramm von (*S*)-**82**

Im ^{31}P -NMR-Spektrum ist nur ein Signal zu erkennen, andererseits ist bei sehr starker Spreizung eine „Schulter“ in dem Signal zu erkennen (nicht abgebildet), so daß offensichtlich eine weitere, sehr ähnliche phosphorhaltige Verbindung anwesend ist. In dem HPLC-Chromatogramm konnte unter Einsatz eines Streulichtdetektors eine Verunreinigung mit einem Anteil von 10,7 % festgestellt werden. Bei dieser Verunreinigung handelt es sich vermutlich um das „freie“ carba-analoge Glycerinphosphat gebildet durch Hydrolyse der Cholin-Phosphorsäureesterbindung.

6.4 Zusammenfassung - Ausblick

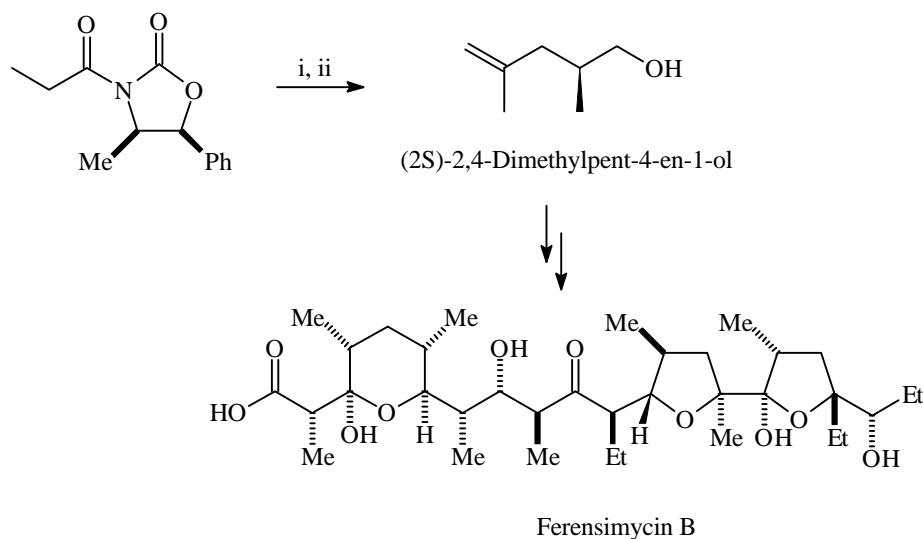
Zwei carba-analoge Phospholipide mit Modifikation in der *sn*-2 Position bzw. in den *sn*-1,2 Positionen konnten weitgehend enantiomerenrein hergestellt werden. Die Synthese des *sn*-2 carba-analogen Phospholipids bereitete keine größeren Schwierigkeiten, wohingegen das *sn*-1,2 di-carba-analoge Phospholipid erst unter erheblichen synthetischen Aufwand (acht Reaktionsschritte) und zudem in recht niedriger Ausbeute erhalten wurde. Zur Zeit noch unbefriedigend ist hier die Diels-Alder Addition, die aufgrund zahlreicher Nebenprodukte eine sehr sorgfältige chromatographische Reinigung erfordert. Hauptproblem ist jedoch der letzte Reaktionsschritt, d.h. die Überführung des Brommylesterderivates mit Trimethylamin in das di-carba-analoge Phosphatidylcholin. Das gewünschte Produkt hydrolysiert rasch unter den

Reaktionsbedingungen (10 % Ausbeute). Vielleicht ist hier eine andere Phosphorylierungsmethode von Vorteil ? In dieser Richtung ist noch weiterer Forschungsbedarf vorhanden.

7 Bestimmung der absoluten Konfigurationen

7.1 Von (*R*)-75

Die in Kap. 6.2.2 beschriebene Synthese eines in der *sn*-2 Position modifizieren, carba-analogen Phospholipids benutzt als Schlüsselschritt eine lipasekatalysierte Acylierung (*Pseudomonas sp.*), die den chiralen Monoester (*R*)-75 liefert. Mit (*R*)-75 wurden zahlreiche Derivatisierungsversuche durchgeführt, um geeignete Kristalle für eine Röntgenstrukturanalyse zu erhalten. Hierzu zählen unter anderem die Umsetzungen mit *p*-Tosylchlorid, α - u. β -Naphthylsulfonylchlorid, 3,5-Dinitrobenzoylchlorid, 4-Nitrobenzoylchlorid, 3,5-Dinitrophenylisocyanat, Phthalsäureanhydrid, Terephthalsäuredichlorid, Jones Reagens (Oxidation der Hydroxylgruppe zur Carbonsäure), etc. Oft wurden die erhaltenen Derivate weiter modifiziert, indem die Laurinsäure auf enzymatischem Wege abgespalten wurde oder die C=C-Doppelbindung oxidativ zum Keton gespalten, - und das so erhaltene Carbonylderivat mit 3,5-Dinitrophenylhydrazin zum entsprechenden Hydrazon umgesetzt - wurde. Letztendlich blieben all diese Bemühungen erfolglos. Aus diesem Grund entschlossen wir uns, die absolute Konfiguration von (*R*)-75 durch chemische Korrelation zu überprüfen. Eine geeignete Verbindung dafür ist das von Evans beschriebene (2*S*)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol (Evans D.A. 1991). Dieser Alkohol wurde dort als Zwischenprodukt bei der Synthese des Antibiotikums Ferensimycin B erhalten (Abb. 123).



Reagentien: (i) LDA, β -Methallyliodid (73%); (ii) LiAlH_4 / Et_2O (85%)

Abb. 123: (2S)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol - Zwischenprodukt der Ferensimycin B Synthese (Evans D.A. 1991).

Demzufolge liefert die Alkylierung von dem Oxazolidonderivat mit β -Methallyliodid nach anschließender Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid den Alkohol (2S)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol. Der Drehwert ist mit $[\alpha]_D = -3.9^\circ$ ($c = 4.1$, CH_2Cl_2) angegeben. Die Enantiomerenreinheit des Alkohols wurde nicht dokumentiert.

(R)-75 konnte in vier Reaktionsschritten in (2S)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol (S)-86 überführt werden (Abb. 124).

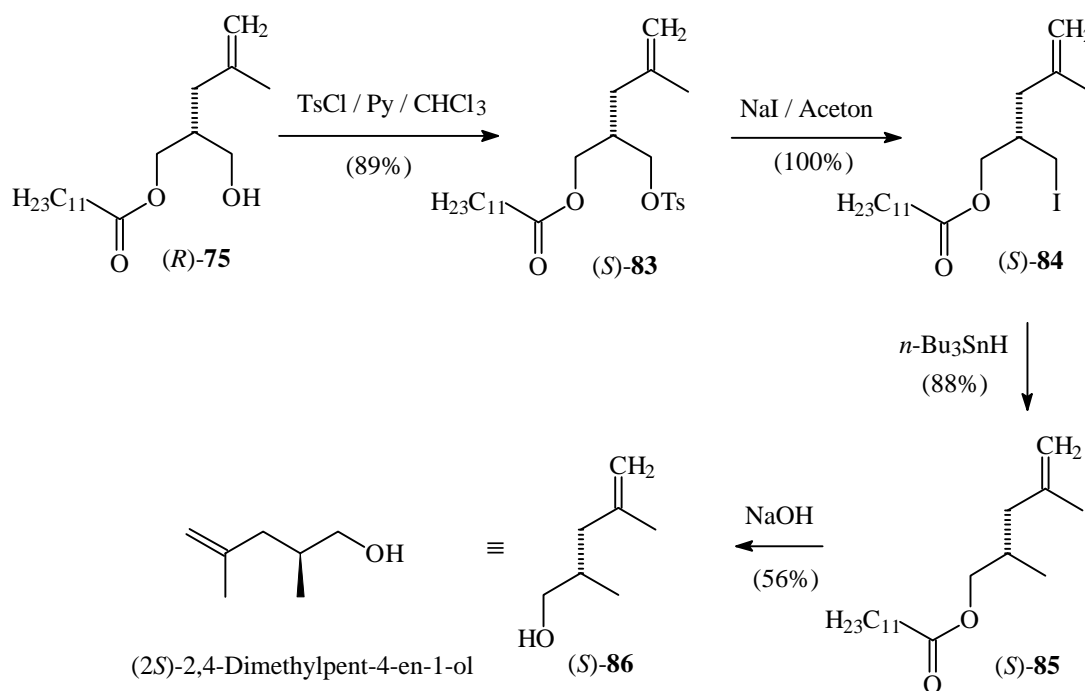


Abb. 124: Synthese von (2S)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol aus (R)-75

Dazu wurde (*R*)-**75** zunächst in das entsprechende Tosylat (*S*)-**83** überführt und dieses mittels Natriumiodid in Aceton (Finkelstein Reaktion) in das Iodid (*S*)-**84** überführt. Dehalogenierung von (*S*)-**84** mittels *n*-Bu₃SnH lieferte (*S*)-**85**, welches in wässrig-methanolischer Natronlauge hydrolysiert wurde. Der Drehwert des so erhaltenen (*S*)-**86** betrug $[\alpha]_D = -6.6^\circ$ ($c = 3.4$, CH₂Cl₂) und liegt damit deutlich über dem Literaturwert (Evans D.A. 1991) von $[\alpha]_D = -3.9^\circ$ ($c = 4.1$, CH₂Cl₂). Aufgrund des negativen Drehwertes steht jedoch eindeutig fest, daß die lipasekatalysierte Acylierung von dem Diolderivat **74** in Gegenwart der Lipase aus *Pseudomonas sp.* den entsprechen Monoester (*R*)-**75** mit der absoluten Konfiguration (*R*) liefert.

¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren der Verbindung (*S*)-**86** entsprechen den literaturbekannten Daten. Abb. 125 zeigt das ¹³C-NMR von (*S*)-**86**.

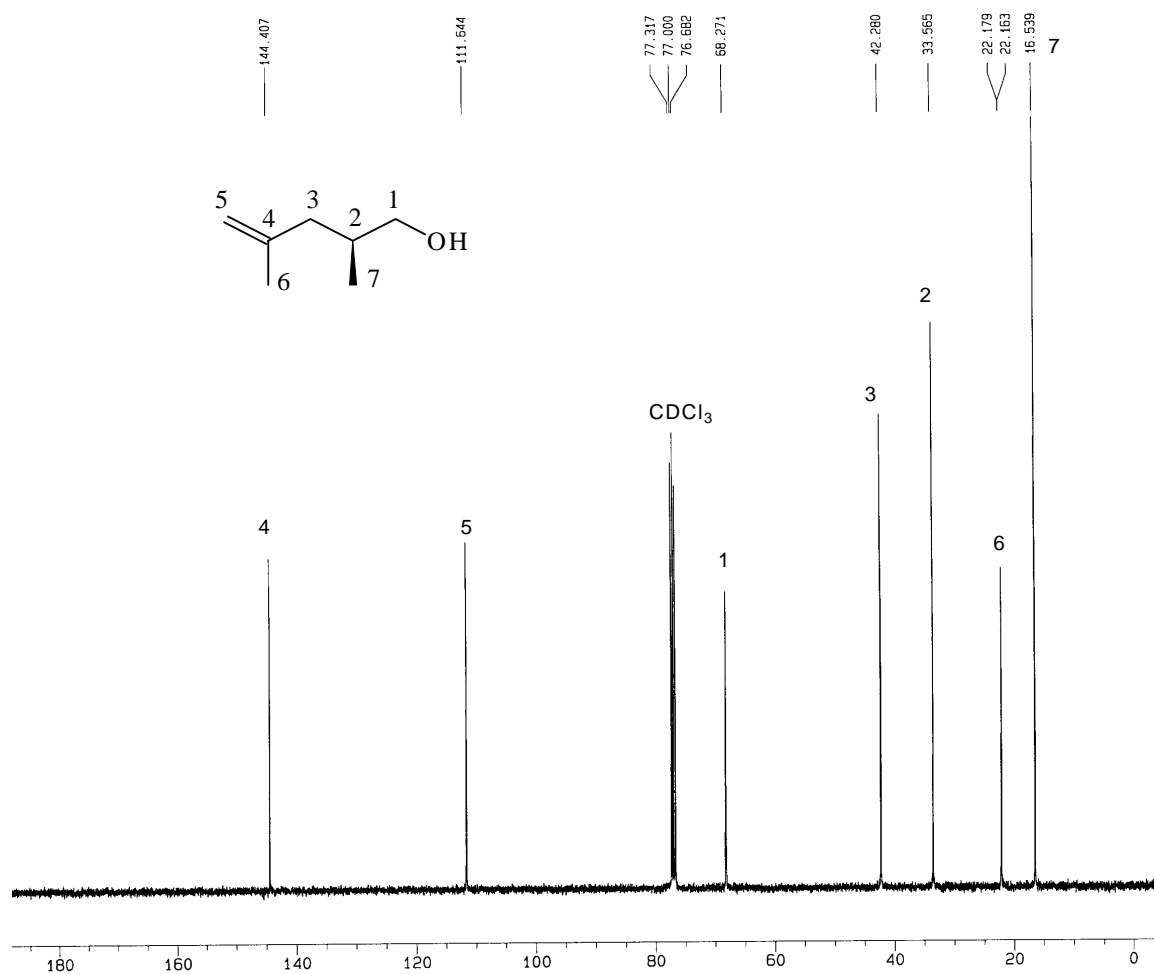


Abb. 125: ¹³C-NMR-Spektrum von (2*S*)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol (*S*)-**86**

Man erkennt deutlich die sieben Kohlenstoffatome von (*S*)-**86**.

7.2 Von carba-analogenem Dicaprylin

Die lipasekatalysierten Hydrolysen von carba-analogenem Tricaprylin **11** (Kap. 5.2.3) lieferten die entsprechenden Dicaprylinanaloge (*S*)- u.- (*R*)-**72** (Abb. 126).

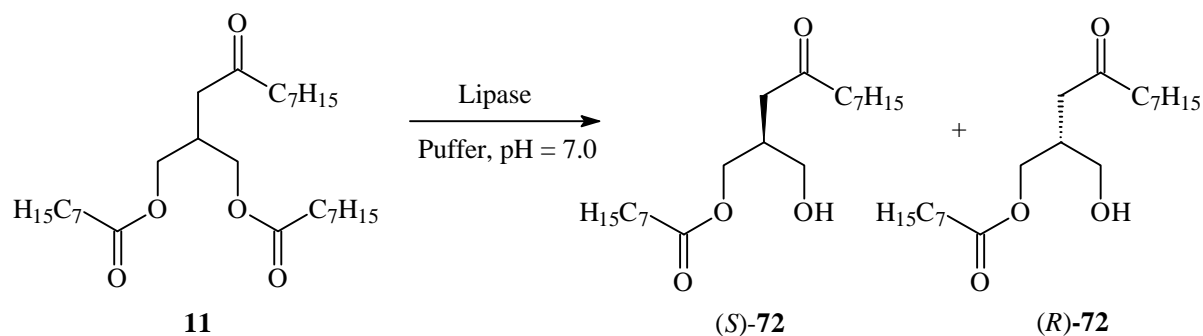


Abb. 126: Carba-analoges Dicaprylin (*S*)- u.- (*R*)-**72** durch lipasekatalysierte Hydrolyse von **11**

(*S*)- und (*R*)-**72** konnten nach der Derivatisierung mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat durch HPLC getrennt werden. Einige Lipasen hydrolysierten die Modellverbindung mit hoher Enantioselektivität, wie beispielsweise die Lipase aus *Humicola* ($\geq 96\%$ ee). Es war jedoch nicht klar, ob hierbei das (*S*)- oder das (*R*)- Enantiomere von **72** gebildet wurde. Aufgrund unserer langjährigen Erfahrungen mit lipasekatalysierten Hydrolyse- und Veresterungsreaktionen an 2-substituierten Propan-1,3-diolderivaten konnten wir jedoch annehmen, daß bei dieser Hydrolyse (*R*)-**72** gebildet wurde. Auch in diesem Fall wurden zahlreiche Derivatisierungen durchgeführt in der Hoffnung, geeignete Kristalle für eine Röntgenstrukturanalyse zu erhalten. Da (*R*)-**72** nicht lagerstabil ist (< 1 Tag) und rasch unter Lactolbildung cyclisiert, mußte für jede der durchgeführten Derivatisierungen (*R*)-**72** durch Hydrolyse von **11** frisch hergestellt und als Rohprodukt (nach 20% Umsatz am Autotritrator; pH-Stat Bedingungen) direkt eingesetzt werden. Entsprechende Umsetzungen wurden mit p-Tosylchlorid, 8-Bromcaprylsäure, Hexylisocyanat, 3,5-Dinitrophenylisocyanat, etc. durchgeführt. Auch hier blieben bislang alle Versuche erfolglos. Es konnte auch keine geeignete Verbindung für eine chemische Korrelation von (*R*)-**72** gefunden werden.

Für die gewählte Zuordnung sprechen jedoch die im Folgenden beschriebenen Indizien.

Berücksichtigt man die Tatsache, daß die Substitution des Sauerstoffatoms in der *sn*-2 Position durch die Methylengruppe in einem Triglycerid oft einen signifikanten Einfluß auf die Aktivität und Enantioselektivität einer Lipase hat (vgl. Kap. 5.2.4), so muß dieser

Sauerstoff eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung des Substrates mit dem aktiven Zentrum der Lipase spielen. Man kann also vermuten, daß die enzymatischen Hydrolysen von Glycerinderivaten - ebenfalls in der *sn*-2 Position mit einer Methylengruppe modifiziert - die gleiche Stereoselektivität aufweisen, wie die der Modellverbindung **11**. Vorausgesetzt die Struktur dieser Glycerinderivate weicht nicht zu sehr von der Struktur der Triglyceride ab (Abb. 127).

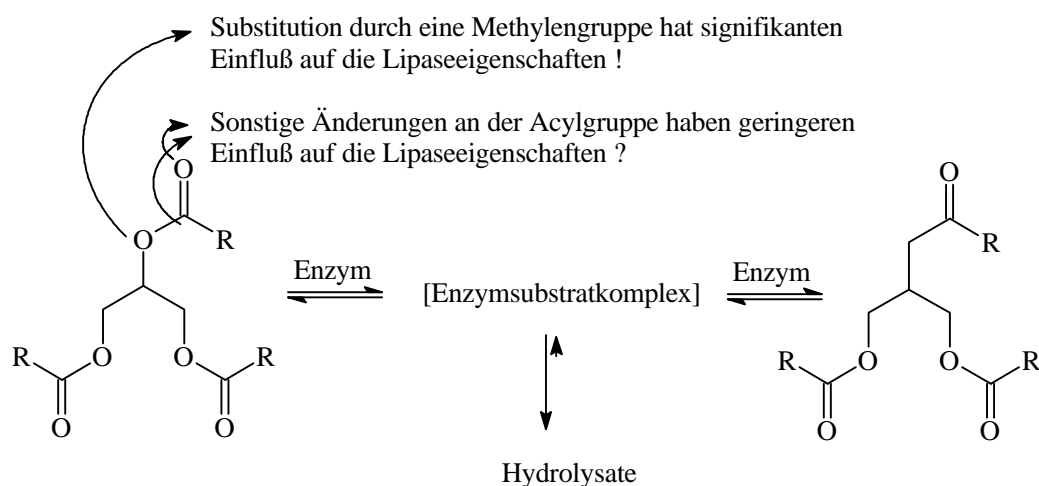


Abb. 127: Änderungen im Substrat auf die Lipaseeigenschaften (Enantioselektivität)

Tatsächlich deuten etliche Hydrolyseexperimente mit Lipasen auf diesen Zusammenhang hin. Am häufigsten wurden die Lipasen aus *Pseudomonas sp.* sowie PPL eingesetzt, wobei sehr häufig folgendes Phänomen beobachtet wird (Abb. 128).

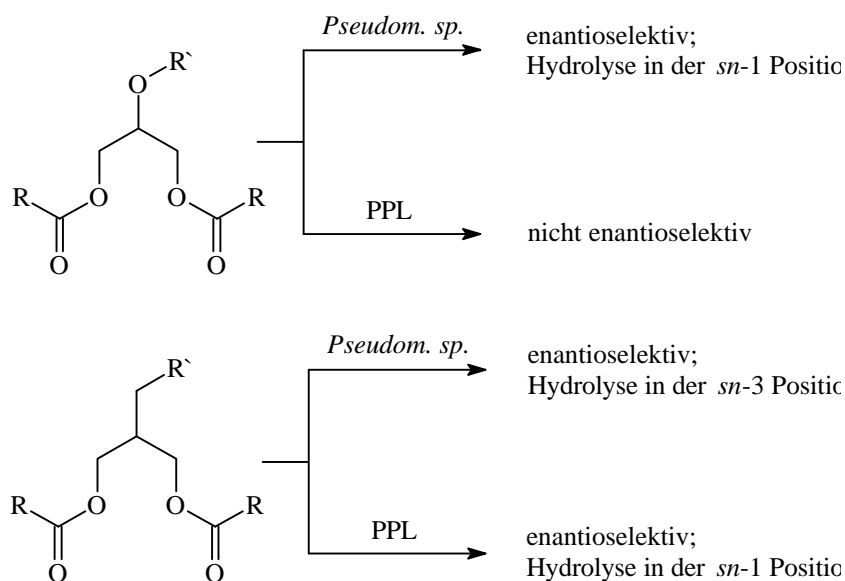


Abb. 128: Lipasekatalysierte Hydrolysen an glyceridähnlichen Substraten

Es ist zum Beispiel bekannt, daß die Lipase aus Schweinepankreas PPL gegenüber Triglyceriden keine Enantioselektivität aufweist, der Diester des 2-Allylpropan-1,3-diols wird jedoch mit hoher Enantioselektivität in der *sn*-1 Position hydrolysiert (Bergbreiter C.H. 1988, Wang Y.F. 1984). Demgegenüber hydrolysiert die Lipase aus *Pseudomonas fl.* Triglyceride mit hoher Enantioselektivität in der *sn*-1 Position, der Diester des 2-Benzylpropan-1,3-diols (Laumen K. 1987) und des 2-Allylpropan-1,3-diols (Breitgoff D. 1989) sowie des 2-(β -Methallylpropan)-1,3-diols (vgl. Kap. 6.2.2, Abb. 103, Tab. 14) werden hingegen enantioselektiv in der *sn*-3 Position gespalten.

Diese Ergebnisse können sehr gut mit denjenigen des carba-analogen Tricaprylins **11** korreliert werden. Dies ist jedoch noch kein Beweis für die getroffene Zuordnung, daher muß es weiterhin unser Ziel sein, die absolute Konfiguration von (*R*)-**72** zweifelsfrei zu bestimmen.

8 Zusammenfassung

Der systematische Ersatz der sp^3 -Sauerstoffatome in den Esterfunktionen von Triglyceriden führt zu isosteren, carba-analogen Glyceriden, die sich

- a) zum Studium lipasekatalysierter Hydrolysen und
- b) als Synthesebausteine für weitere Naturstoffanaloga, wie z.B. carba-analoge Phospho-lipide

eignen. Carba-analoge Phospholipide sind interessant aufgrund ihrer potentiellen biologischen Wirkungen, insbesondere als Inhibitoren der Phospholipase A_2 .

Im Rahmen dieser Arbeit wurden geeignete Syntheseverfahren zur Herstellung a) carba-analoger Triglyceride und b) entsprechend modifizierter Phospholipide entwickelt. Insgesamt konnten folgende carba-analogen Zielmoleküle hergestellt werden (Abb. 129, Abb. 130).

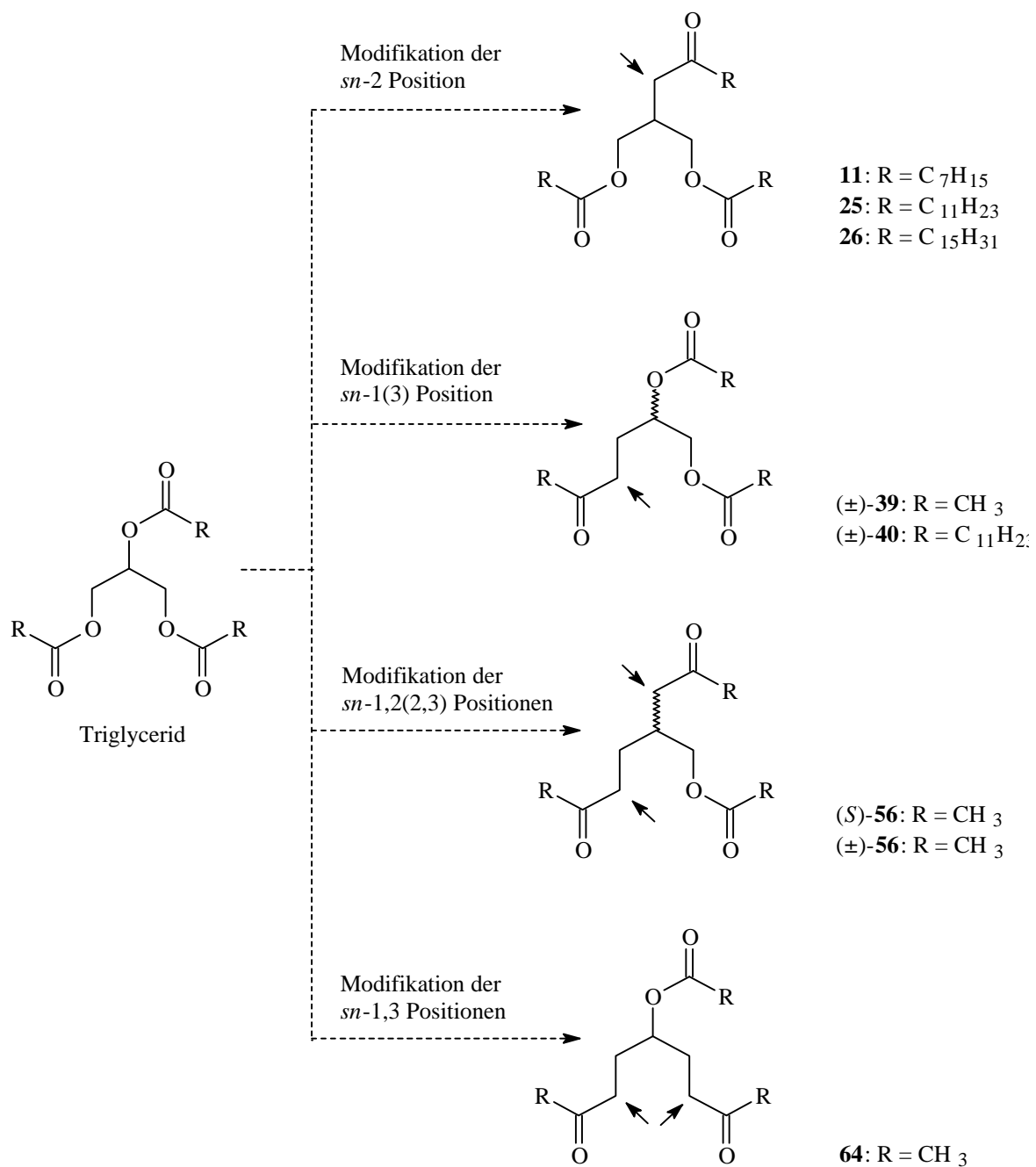


Abb. 129: Carba-analoge Triglyceride - Ersatz von sp³-Sauerstoffatomen durch Methylengruppen

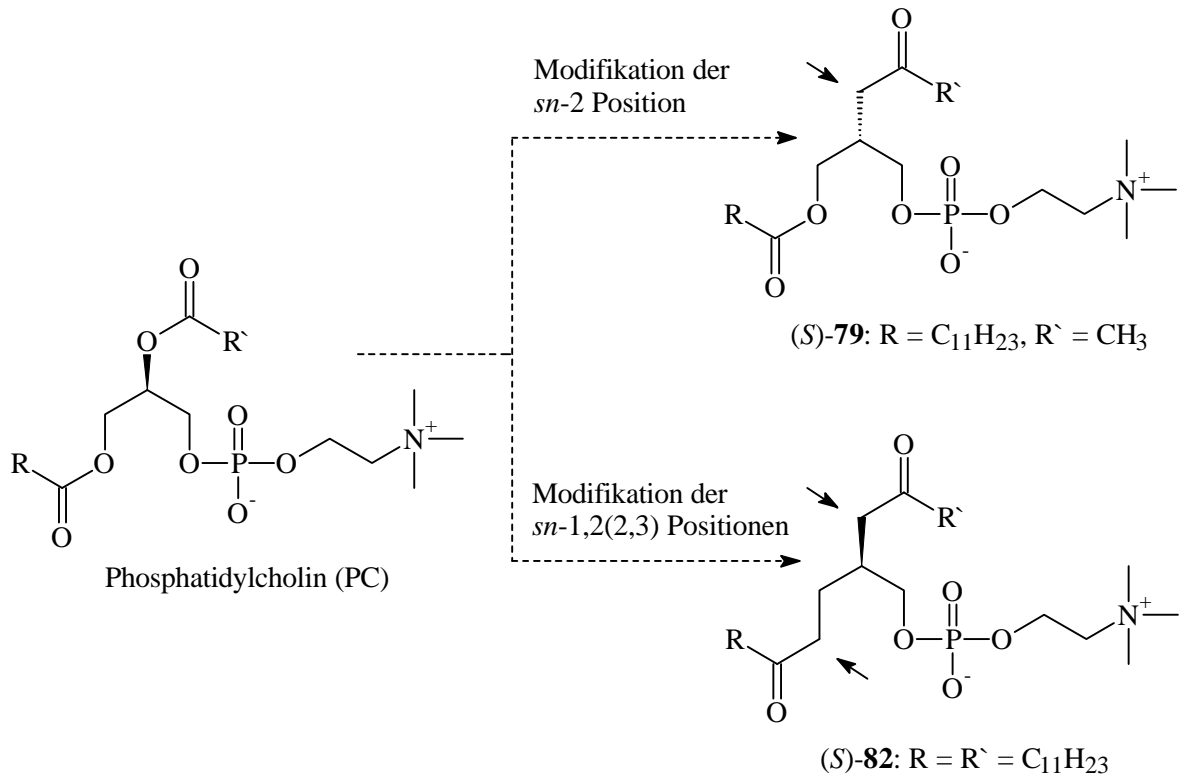


Abb. 130: Carba-analoge Phospholipide - Ersatz von sp³-Sauerstoffatomen durch Methylengruppen

Die Synthesen dieser Zielmoleküle gelangen aus einfach zugänglichen Ausgangsverbindungen, wie z.B. Fettsäurechloriden oder Fettsäuremethylestern. (*S*)-56, (*S*)-79 und (*S*)-82 konnten zudem mit hoher Enantiomerenreinheit (> 96% ee) hergestellt werden. Bei der Synthese des carba-analogen Phosphatidylcholins (*S*)-79 (Modifikation in der *sn*-2 Position) gelang dies über eine lipasekatalysierte Acylierung des achiralen Diolderivates **74** (Abb. 131).

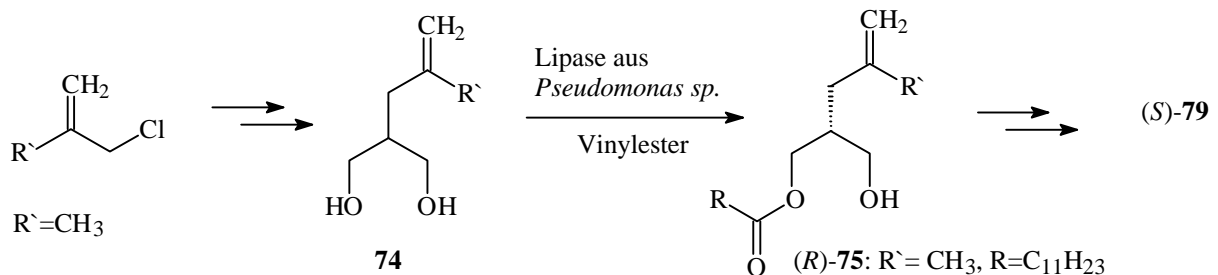


Abb. 131: Synthese von (*S*)-79 - Schlüsselschritt: lipasekatalysierte, enantioselektive Acylierung von **74**

Schlüsselschritt bei der Synthese von (*S*)-**56** (R=CH₃) und (*S*)-**82** (R=C₁₁H₂₃) - jeweils modifiziert in den *sn*-1,2 Positionen - waren dagegen asymmetrische Diels-Alder Additionen mit D-Pantolactonarylsäureester als chiraalem Auxiliar (Diastereoselektivität: ≥ 97% de; Abb. 132).

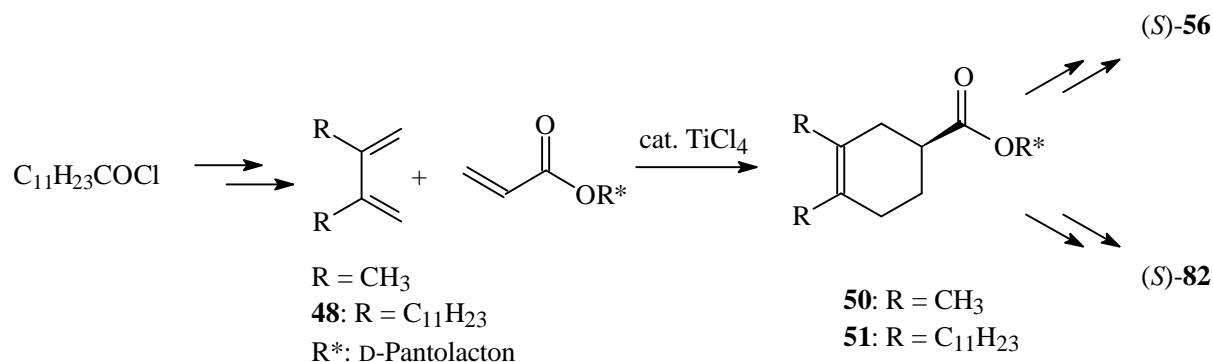


Abb. 132: Synthese von (*S*)-**56** und (*S*)-**82** - Schlüsselschritt: asymmetrische Diels-Alder Addition

Die Bestimmung der **Regio-** und **Enantioselektivitäten** von Lipasen kann bei Verwendung natürlicher Triglyceride als Substrate leicht zu fehlerhaften Resultaten führen, da die bei der Hydrolyse gebildeten Partialhydrolysate leicht unter 1,2-Acylgruppenwanderungen racemisieren. Dies ist bei den carba-analogen Modellglyceriden (**11**, **25**, **26**, **56**, **64**) ausgeschlossen. Ungeklärt ist jedoch die Frage, ob derartig modifizierte Verbindungen bei lipasekatalysierten Hydrolysen das gleiche Substratverhalten aufweisen wie Triglyceride. Zu diesem Zweck wurde die Enantioselektivität und die Substrattoleranz von 44 kommerziell verfügbarer Hydrolasen gegenüber Tricaprylin und dem Modellglycerid **11** untersucht.

Beim Einsatz von Tricaprylin wurden hohe Enantioselektivitäten nur gegenüber der *sn*-1 Position beobachtet, wie z.B. bei der Pantolactonesterase und den Lipasen aus *Pseudomonas* (*fl.*, *sp.*, LPL), *Mucor miehei* und *Arthobacter sp.* Eine Hydrolyse in der *sn*-2 Position trat nicht auf, die untersuchten Lipasen sind somit ausnahmslos regiospezifisch.

In Gegenwart von **11** zeigte sich dagegen, daß der Austausch von einem sp³-Sauerstoffatom gegen eine CH₂-Gruppe einen signifikanten Einfluß auf die Enzym-Substrat Wechselwirkung im aktiven Zentrum hat. Dies äußert sich durch a) eine unterschiedliche Substrattoleranz sowie b) Abweichungen in der Enantioselektivität. Beide Effekte variieren bei den untersuchten Lipasen stark. So wird **11** manchmal deutlich schneller, wie z.B. in Gegenwart der Pantolactonesterase (Faktor 2) als auch deutlich langsamer, wie z.B. in Gegenwart der Lipase aus *Aspergillus niger* (Faktor >100), umgesetzt. Oft wurden hohe Enantioselektivitäten nur gegenüber einem der beiden Substrate beobachtet, wie z.B. bei der Lipase aus

Schweinepankreas (enantioselektiv gegenüber **11**), oder der Lipase aus *Mucor miehei* (enantioselektiv gegenüber Tricaprylin). Bei den Lipasen aus *Pseudomonas* (*fl.*, *sp.*, LPL) wurde sogar eine Umkehr der Enantioselektivität von *sn*-1 (Ticaprylin) auf *sn*-3 (**11**) beobachtet.

Die Modellverbindung **11** ist somit eine empfindliche Sonde für das aktive Zentrum von Lipasen.

9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeines

9.1.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

^1H -NMR-Spektren: a) WM 250 (250.13 MHz), b) Bruker WM 400 (400.13 MHz).
Chemische Verschiebung in ppm gegen TMS als interner
/ externer Standard.

^{13}C -NMR-Spektren: a) Bruker WM 250 (62.896 MHz), b) Bruker WM 400 (100.63
MHz). Chemische Verschiebung in ppm gegen TMS als
interner / externer Standard.

^{31}P -NMR-Spektren: a) Bruker WM 250 (101.25 MHz) bzw. Bruker WM (161.98
MHz). Chemische Verschiebung gegen H_3PO_4 als externer
Standard.

IR-Spektren: Perkin-Elmer Infrared Spektrometer 397 bzw. 1420. Feststoffe
wurden mit Kaliumbromid verrieben (KBr-Preßling),
Flüssigkeiten wurden als Filme gemessen.

Schmelzpunkte: Büchi 510 Schmelzpunktapparatur, Aufheizrate $1^\circ\text{C}/\text{min}$.
(unkorrigiert).

Drehwerte: Perkin-Elmer Polarimeter 241, thermostatisierten Quarzküvette
mit 1 ml Probenvolumen, Länge 10 cm. Alle verwendeten
Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität eingesetzt. Alle Bestim-
mungen erfolgten bei einer Temperatur von 20°C .

- DC: Kieselgelfertigplatten 60 F254 5x10 cm der Firma Merck.
 Detektion a) unter UV-Licht b) längeres Stehen in einer Iodkammer c) Besprühen mit 1% Vanilin in konz. Schwefelsäure und Erhitzen der Platte auf ca. 150 °C.
- Säulenchromatographie: Kieselgel 60 mit 230-400 mesh der Fa. Merck.
- HPLC-Säulen: OA-4100; Sumitomo Chemical Co, Osaka Japan
 (R,R)-Welk; Merck; Darmstadt Deutschland
 Chira-Sept; Merck; Darmstadt Deutschland
 Chiralcel OD; Daicel Chemical Industries, LTD, Tokyo Japan
 RP-18; Merck; Darmstadt Deutschland
- Enzymatische Hydrolysen: a) Mikromaßstab: Umsetzungen erfolgten in 1,5 ml Eppendorf Gefäßen mit Verschlusskappe auf einem Eppendorfschüttler.
 b) präparativer Maßstab (pH-Stat): Umsetzungen erfolgten an einem Autotitrator der Firma Radiometer in Copenhagen mit pH-Meter PHM 82, Titrator TTT 80, Autobürette ABU 80, pH-Stat-Modul REA 270, Titrigraph Modul REA 160 und Servograph REA 80.
- GC: Shimadzu Gaschromatograph GC-14A, On Column-Injektion und Split-Splitless-Injektion, Autosampler AOC-14 für 12 Proben, FID-Detektor, verwendete Säulen:
 SE 54; 25m ID: 0.32 mm; CS, D-52379 Langerwehe
 BPX5; 25m-0.25; SGE, D-64331 Weiterstadt
 Cyclodex β /1 P; 25m ID: 0.32 mm; CS, D-52379 Langerwehe
- GC-Programme:
- (1) SE 54; 1.0 bar H₂; 80-275°C; 6 °C/min; 10 min 275°C
 - (2) SE 54; 0.5 bar H₂; 80-260°C; 6 °C/min; 10 min 260°C
 - (3) SE 54; 0.5 bar H₂; 75 °C; 5 min 75 °C; 75-240°C; 6 °C/min; 10 min 240°C

- (4) SE 54; 1.0 bar H₂; 70 °C; 5 min 70 °C; 70-240°C; 6 °C/min; 10 min 240°C
 (5) SE 54; 0.5 bar H₂; 120-270°C; 6 °C/min; 10 min 270°C
 (6) SE 54; 1.0 bar H₂; 70 °C; 2 min 70 °C; 75-220°C; 6 °C/min; 10 min 220°C
 (7) BPX5; 100 kPa H₂; 140 °C; 5 min 140°C; 140-350 °C; 8 °C/min; 15 min 350 °C
 (8) BPX5; 100 kPa H₂; 160-300 °C; 6 °C/min; 15 min 300 °C
 (9) BPX5; 100 kPa H₂; 160-260°C; 10 °C/min; 5 min 260°C; 260-300°C; 4°C/min; 15 min 300°C
 (10) BPX5; 100 kPa H₂; 140 °C; 5 min 140°C; 140-350 °C; 7 °C/min; 15 min 350 °C
 (11) β/1P; 0.5 bar H₂; 5 min 120°C; 120-160 °C; 1 °C/min; 15 min 160 °C
 (12) β/1P; 0.5 bar H₂; isotherm 108 °C

9.1.2 Liste der verwendeten Enzyme

Nr	Lipase/Esterase, Quelle	Hersteller, Bezeichnung
1	<i>Arthrobacter species</i>	Boehringer Mannheim
2	<i>Aspergillus niger</i>	Amano
3	<i>Aspergillus oryzae</i>	Boehringer Mannheim, 1600834
4	<i>Aspergillus sojae</i>	Röhm, EL 47-88
5	<i>Candida antarctica</i>	Novo, Novozym 435
6	<i>Candida cylindracea</i>	Amano
7	<i>Candida cylindracea</i>	Boehringer Mannheim, 129046
8	<i>Candida cylindracea</i> (immobilisiert)	Amano
9	<i>Candida species</i>	Meito Sangyo, Lipase MY
10	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Toyo Yozo, Enzyme T-01
11	Cholinesterase aus <i>Candida cylindracea</i>	Boehringer Mannheim, 129046
12	Cholinesterase aus <i>Candida cylindracea</i>	Boehringer Mannheim, 262609
13	Cholinesterase aus <i>Pseudomonas species</i> immobilisiert auf Kieselgel 60	Boehringer Mannheim
14	Esterase 30000	Gist-Brocades
15	<i>Humicola</i>	Novo SP 523; PPW 3942
16	<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano, Lipase CE
Nr	Lipase/Esterase, Quelle	Hersteller, Bezeichnung

17	Lipase 3A	Novo
18	Lipoproteinlipase	Amano
19	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas species</i>	Amano
20	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas species</i> (immobilisiert)	Boehringer Mannheim, 7344284
21	Lipoproteinlipase aus <i>Pseudomonas</i> immobilisiert auf Kieselgur	Amano, SAM III
22	Lipozym (<i>Mucor miehei</i>)	Novo
23	<i>Mucor javanicus</i>	Amano
24	<i>Mucor javanicus</i>	Röhm, EL 22-88
25	<i>Mucor miehei</i>	Fluka 46059
26	<i>Mucor miehei</i>	Novo, Lip SP 225
27	<i>Mucor miehei</i>	Novo, Lip SP 524
28	<i>Mucor miehei</i>	Gist-Brocades, Piccantase A
29	<i>Mucor miehei</i> immobilisiert auf Ionenaustauscher	Novo, Lipase SP 225
30	Pancreas	Röhm, EL 136-88
31	Pantolactonesterase <i>Bacillus subtilis niger</i>	Boehringer Mannheim
32	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
33	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Röhm, EL 237-87
34	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Röhm
35	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (immobilisiert auf Toyonite- 200-P)	Amano
36	<i>Pseudomonas fluorescens</i> immobilisiert auf Diatomeen Erde	Amano
37	<i>Pseudomonas fluorescens</i> immobilisiert auf Kieselgur	Amano
38	<i>Pseudomonas species</i>	Amano
39	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Boehringer Mannheim, 186791
40	<i>Rhizopus delemar</i>	Amano, Lipase D
41	<i>Rhizopus javanicus</i>	Amano, Lipase F-AP15
42	<i>Rhizopus niveus</i>	Amano, Lipase N
43	Schweinepankreas	Fluka 62300
44	Schweinepankreas PPL	Sigma, Lot 67F-0270

9.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV's)

9.2.1 Diazomethan AAV 1

5 mol Methylamin-hydrochlorid und 5 mol Harnstoff werden in 400 ml Wasser gelöst und unter Rückfluß 3 Stunden erhitzt. Nach dem Zulösen von 1.6 mol Natriumnitrit läßt man die auf -10°C abgekühlte Lösung in eine auf -5°C gekühlte Mischung von 600 g Eis und 110 g konz. Schwefelsäure unter Rühren langsam einfließen. Der sich abscheidende N-Methyl-N-nitroso-harnstoff wird abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen. Ausbeute 80 %.

In einem Erlenmeyer-Kolben werden unter dauerndem Schwenken des Gefäßes 0.1 mol N-Methyl-N-nitroso-harnstoff in kleinen Portionen in 100 ml Ether eingetragen, der mit 35 ml eisgekühlter 40%iger KOH unterschichtet ist. Die Temperatur darf dabei $+5^{\circ}\text{C}$ nicht überschreiten. 10 Minuten nach der letzten Zugabe gießt man die etherische Diazomethanlösung ab und trocknet sie 3 Stunden über wenig festem Kaliumhydroxid.

9.2.2 α -Brommethylketone AAV 2

In einen Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Tropftrichter und Innenthermometer gibt man eine etherische Diazomethanlösung, die aus 0.4 mol N-Methyl-N-nitroso-harnstoff nach AAV 1 hergestellt wurde. Dazu läßt man unter Rühren und Kühlen bei 0°C eine Lösung von 0.1 mol des Carbonsäurechlorids in 100 ml Ether zutropfen. Die Umsetzung erfolgt sehr rasch unter Gasentwicklung. Nach beendeter Zugabe des Säurechlorids läßt man noch eine Stunde bei RT stehen. Zu dieser Lösung werden unter Rühren 100 ml konz. Bromwasserstoffsäure zugetropft. Die Reaktion setzt unter Stickstoffentwicklung ein. Man erwärmt nach der Zugabe der Säure eine Stunde auf dem Wasserbad unter Rückfluß. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit Wasser auf das dreifache Volumen verdünnt. Die etherische Phase wird abgetrennt, mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wird filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation oder durch Destillation im Vakuum gereinigt.

9.2.3 Alkylierung von Malonsäuredimethylester mit α -Brommethylketonen AAV 3 a

16 ml (40 mmol) *n*-Butyllithium (15% in Hexan) werden unter Argon in 60 ml trockenem Ether gelöst. Bei 0°C werden nacheinander 2.5 ml trockenes Methanol, 6.0 g (45.4 mmol) Malonsäuredimethylester, gelöst in 40 ml trockenem Ether sowie 20.0 mmol des α -

Brommethylketons, gelöst in 80 ml trockenem Ether zugetropft. Es wird 20 Minuten bei 0 °C und 3 Stunden bei RT nachgerührt. Verdünnte Salzsäure wird bis zur aciden Reaktion zugefügt. Die etherische Phase wird abgetrennt und nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation oder durch Destillation im Vakuum gereinigt.

9.2.4 Alkylierung von Malonsäurediethylester mit α -Brommethylketonen AAV 3 b

4.0 g Natriumhydrid (60%ig) werden mit Pentan gewaschen und unter Rühren portionsweise in 350 ml trockenem Ethanol eingebracht (Vorsicht H₂-Entwicklung). Nach 20 minütigem Rühren werden 0.1 mol des nach AAV 2 hergestelltem α -Brommethylketon unter Eisbadkühlung zügig zugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend im Vakuum eingeengt. Nach Zugabe von 800 ml Hexan oder Hexan/Ether werden die unlöslichen Bestandteile abfiltriert. Das Filtrat wird im Vakuum eingeengt und das so erhaltene Rohprodukt durch Umkristallisation oder Destillation (Vakuum) gereinigt.

9.2.5 1,3-dioxolangeschützte γ -Ketomalonate AAV 4

20 mmol Ketoester werden unter Argon in 40 bis 60 mmol Ethylenglykol-bis-(trimethylsilylether) gelöst. 200 μ l Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester (TMS-triflat) werden als Katalysator zugetropft. Die Temperatur wird ca. eine Stunde lang auf 80 °C erhöht (Reaktionskontrolle mittels GC). Die flüchtigen Bestandteile werden im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt kann direkt weiterverwendet werden.

9.2.6 Reduktion von Malonestern mit Lithiumaluminiumhydrid AAV 5

4.55 g (120 mmol) Lithiumaluminiumhydrid werden unter Argon in 250 ml trockenem Ether suspendiert. Eine Lösung von 65 mmol Malonester in 70 ml trockenem Ether wird unter Eisbadkühlung zugetropft. Nach dem Rühren über Nacht (Raumtemperatur) wird durch vorsichtiges Zutropfen von 5 ml Wasser das überschüssige Hydrid zerstört. Nach 1,5 Stunden wird 600 ml Ether zugefügt und der Feststoff* abgesaugt. Das Filtrat wird nacheinander mit etwas verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung

gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Rohprodukt im Vakuum eingengt und durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

* Zur Optimierung der Ausbeute wird der Feststoff in 500 ml Methanol 2 Stunden erhitzt. Der Feststoff wird abgesaugt. Die Lösung wird im Vakuum eingengt und mit 300 ml Ether versetzt. Die etherische Lösung wird wie folgt weiterverarbeitet.

9.2.7 Diacylierung von Diolen AAV 6 a

22 mmol Diol werden in 150 ml trockenem Ether und 5 ml trockenem Pyridin gelöst und mit einer Spatelspitze Dimethylaminopyridin DMAP versetzt. Alternativ hierzu kann das Diol auch direkt in 20 ml Pyridin gelöst werden. Bei 0 °C werden langsam 48 mmol des Säurechlorids zugetropft. Nach zwölfstündigem Rühren bei Raumtemperatur wird überschüssiges Säurechlorid durch Zugabe von 5 ml Wasser hydrolysiert (ca. 30 Minuten). Dann werden 200 ml Hexan oder Hexan/Ether zugesetzt. Nacheinander wird mit Wasser, verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. Der Rückstand wird durch Chromatographie über Kieselgel oder durch Umkristallisation gereinigt.

9.2.8 Monoacylierung von Diolen AAV 6 b

10 mmol Diol werden in 10 ml trockenem Pyridin unter Argon gelöst. 10 mmol des Säurechlorids werden bei 0°C langsam zugetropft. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und analog AAV 6 a aufgearbeitet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Chromatographie über Kieselgel.

Alternative Methode: 10 mmol Diol werden in 40 ml trockenem Ether unter Argon gelöst. Die Lösung wird auf -78 °C gekühlt. Nacheinander werden 10 mmol *n*-Butyllithium sowie 10 mmol des Säurechlorids gelöst in 5 ml Ether zugetropft. Nach 15 Minuten wird auf Raumtemperatur erwärmt und gemäß AAV 6 a aufgearbeitet. Das Rohprodukt wird durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

9.2.9 Entschützen der 1,3-Dioxolanschutzgruppe AAV 7

10 mmol 1,3-Dioxolan werden in 50 ml trockenem Aceton gelöst, mit 1 ml Trifluoressigsäure (TFA) versetzt und 1 bis 2 Stunden auf 50 °C erwärmt (Reaktionskontrolle mittels GC). Nach Zugabe von 150 ml Hexan oder Hexan/Ether wird nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel im Vakuum befreit.

9.2.10 Acetylierung von Alkoholen AAV 8

10 mmol Alkohol werden in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und unter Eisbadkühlung langsam mit 5 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Es wird mindestens 2.5 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt, dann wird mit Ether/verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt (pH-Wert der wässrigen Phase < 7.0) und nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel im Vakuum befreit.

9.2.11 Oxidative Spaltung von Methylengruppen mit Natriummetaperiodat und Rutheniumtrichloridhydrat AAV 9

Pro mmol zu oxidierender Methylengruppe werden 3 mmol Natriummetaperiodat in 3 ml Wasser und 2 ml Acetonitril gelöst. Der Ester wird in 3 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst und zugefügt. Unter Eisbadkühlung werden 6 mol% Rutheniumtrichloridhydrat zugegeben, und es wird 10 Minuten bei 0 °C, 10 Minuten bei RT und 2.5 Stunden bei 50 °C nachgerührt (Reaktionskontrolle mittels DC). 200 ml Ether werden zugefügt, und die etherische Phase wird nacheinander mit wenig Wasser, gesättigter Na₂S₂O₃-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natrium- oder Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wird durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt.

9.2.12 Derivatisierung von Alkoholen mit 3,5-Dinitrophenylisocyanat AAV 10 a-b

a) Halbmikromaßstab

In einem geschlossenen Schraubdeckelgefäß werden 0.5 mmol Alkohol sowie 105 mg (0.5 mmol) 3,5-Dinitrophenylisocyanat in 0.6 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und über Nacht

stehen gelassen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel chromatographiert.

b) Mikromaßstab

In einem 1.5 ml Eppendorfgefäß mit Verschlusskappe werden 3-6 mg des Alkohols gelöst in ca. 400-500 µl Ether/Hexan mit einer Spatelspitze (ca. 5-10 mg) 3,5-Dinitrophenylisocyanat versetzt und 5-10 Minuten im Ultraschallbad suspendiert. Am folgenden Tag wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette chromatographiert.

9.2.13 Derivatisierung von Alkoholen mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat AAV 11 a-b

a) Halbmikromaßstab

In einem geschlossenen Schraubdeckelgefäß werden 0.3 mmol des Alkohols mit 70 µl (0.5 mmol) R(+)-1-Phenylethylisocyanat in 300 µl Hexan gelöst und mindestens 3 Stunden auf 60-70 °C erhitzt. Gereinigt wird das Rohprodukt durch Chromatographie über Kieselgel.

b) Mikromaßstab

In einem 1.5 ml Eppendorfgefäß mit Verschlusskappe werden 3-6 mg des Alkohols gelöst in ca. 400-500 µl Ether/Hexan mit 10-20 µl R(+)-1-Phenylethylisocyanat 1-3 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand über eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette chromatographiert.

9.3 Synthese carba-analoger Triglyceride modifiziert in der *sn*-2 Position

9.3.1 1-Brom-nonan-2-on **1**

Aus 85.6 g (0.8 mol) N-Methyl-N-nitrosoharnstoff wurden nach AAV 1 800 ml einer etherischen Diazomethanlösung hergestellt. Zu dieser Lösung wurden 42.3 g (260 mmol) Caprylsäurechlorid, gelöst in 220 ml Ether bei 0 °C zugetropft. Nach der vorsichtigen Zugabe von 260 ml konz. Bromwasserstoffsäure wurde der Ansatz entsprechend AAV 2 aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wurde im Wasserstrahlvakuum über eine 20 cm Vigreuxkolonne fraktioniert destilliert. Erhalten wurden 52.0 g (90%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 30 °C.

Sdp.: 122 °C/16 mbar

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.63

GC(7): R_t = 3.4 min (98%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.89 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})}$ = 6.5 Hz), 1.30 (m, 8 H, CH_2 -Kette), 1.63 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.66 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})}$ = 7.4 Hz), 3.89 (s, 2 H, CH_2Br).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.40 (CH_3), 22.96, 24.28, 29.36, 29.40, 31.84, 34.46 (CH_2 -Kette), 40.22 (CH_2Br), 202.52 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (Film) : 2980-2850 (s, v CH aliph.), 1715 (s, v $\text{C}=\text{O}$), 1460 (m, δ CH aliph.), weitere Banden bei : 1400 (m), 1060 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.2 1-Brom-tridecan-2-on **2**

Aus 64.2 g (0.6 mol) N-Methyl-N-nitrosoharnstoff wurden nach AAV 1 600 ml einer etherischen Diazomethanlösung hergestellt. Zu dieser Lösung wurden 32.8 g (150 mmol) Laurinsäurechlorid gelöst in 200 ml Ether bei 0 °C zugetropft. Nach der vorsichtigen Zugabe von 150 ml konz. Bromwasserstoffsäure wurde der Ansatz entsprechend AAV 2 aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wurde im Kugelrohrföfen bei 0.01 mbar destilliert und aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 36.6 g (88%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 53 °C.

Sdp.: 89-90 °C/0.01 mbar

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.66

GC(1): R_t = 11.2 min (97%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.88 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})}$ = 6.5 Hz), 1.30 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.62 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.65 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})}$ = 7.3 Hz), 3.88 (s, 2H, CH_2Br).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.43 (CH_3), 23.02-34.56 (9 Signale CH_2 -Kette), 40.06, 40.19 (CH_2Br , $\text{RCH}_2\text{C}=\text{O}$), 202.51 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (Film) : 2980-2830 (s, v CH aliph.), 1710 (s, v C=O), 1455 (s, δ CH aliph.), weitere Banden bei : 1400 (m), 1380 (m), 1240 (w), 1220 (w), 1120 (w), 1080 (m), 1040 (m), 710 (m), 630 (m) cm^{-1} .

9.3.3 1-Brom-heptadecan-2-on **3**

Aus 64.2 g (0.6 mol) N-Methyl-N-nitrosoharnstoff wurden nach AAV 1 600 ml einer etherischen Diazomethanlösung hergestellt. Zu dieser Lösung wurden 41.2 g (150 mmol) Palmitinsäurechlorid, gelöst in 200 ml Ether bei 0 °C zugetropft. Nach der vorsichtigen Zugabe von 260 ml konz. Bromwasserstoffsäure wurde der Ansatz entsprechend AAV 2 aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 45.5 g (91%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 66 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.68

GC(7): R_t = 16.4 min (95%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.89 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.4$ Hz), 1.26 (m, 24 H, CH_2 -Kette), 1.62 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.65 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.3$ Hz), 3.88 (s, 2 H, CH_2Br).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 13.08 (CH_3), 21.68-33.18 (CH_2 -Kette), 38.70, 38.83 (CH_2Br , $\text{RCH}_2\text{C}=\text{O}$), 201.15 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (Film) : 2990-2830 (s, v CH aliph.), 1720 (s, v C=O), 1475 (s, δ CH aliph.), weitere Banden bei : 1420 (m), 1400 (m), 1260 (w), 1240 (w), 1140 (w), 1100 (m), 1060 (m), 730 (m), 700 (w), 650 (m) cm^{-1} .

9.3.4 (2-Oxo-tridecyl)-malonsäuredimethylester **4**

2.5 ml Methanol wurden entsprechend AAV 3 a zu einer Lösung von 16 ml (40 mmol) *n*-Butyllithium (15% in Hexan) in 60 ml trockenem Ether getropft. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit einer Lösung von 5.28 g (40 mmol) Malonsäuredimethylester in 40 ml trockenem Ether versetzt. Im direkten Anschluß wurden 5.55 g (20 mmol) Brommethylketon **2**, gelöst in 80 ml trockenem Ether zügig (2-5 Minuten) zugetropft. Aufgearbeitet wurde nach AAV 3 a. Nach Umkristallisation aus 80 ml Methanol bei - 30 °C und Destillation im

Kugelrohrföhen wurden 5.71 g (87%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 45 °C erhalten.

Sdp.: 150 °C/0.01 mbar

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.47

GC(7): R_t = 17.0 min (98%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.89 (t, 3H, CH₃CH₂, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.27 (m, 16 H, CH₂-Kette), 1.60 (m, 2 H, CH₂CH₂C=O), 2.46 (t, 2H , CH₂CH₂C=O, ³J_(HH) = 7.4 Hz), 3.04 (d, 2 H, CHCH₂, ³J_(HH) = 7.2 Hz), 3.75 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3.91 (t, 1 H, CH, ³J_(HH) = 7.2 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.45 (CH₃CH₂), 23.05-32.28 (9 Signale CH₂-Kette), 41.57 (CHCH₂C=O), 43.00 (C₁₀H₂₁CH₂), 46.93 (CHCH₂C=O), 53.09 (O-CH₃), 169.68 (CO₂Me), 207.70 (C=O).

IR (Film) : 2990-2820 (s, v CH aliph.), 1740 (vs, v C=O), 1455 (s, δ CH aliph.), 1320-1170 (v C-O-C), weitere Banden bei : 1440 (s), 1410 (m), 1350 (m), 1100 (w), 1025 (s), 970 (m), 855 (br), 720 (m) cm⁻¹.

9.3.5 (2-Oxo-heptadecyl)-malonsäuredimethylester **5**

2.0 ml Methanol wurden entsprechend der AAV 3 a zu einer Lösung von 12 ml (30 mmol) *n*-Butyllithium (15% in Hexan) in 50 ml trockenem Ether getropft. Anschließend wurde auf 0°C gekühlt, und nacheinander eine Lösung von 4.62 g (35 mmol) Malonsäuredimethylester, gelöst in 30 ml trockenem Ether und von 5.00 g (15 mmol) Brommethylketon **3**, gelöst in 80 ml trockenem Ether zügig zugetropft. Es wurde noch 20 Minuten bei 0 °C und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur nachgerührt und wie in AAV 3 a beschrieben aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 4.70 g (81%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 58 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.48

GC(7): R_t = 21.1 min (74%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.90 (t, 3H, CH₃CH₂, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.28 (m, 24 H, CH₂-Kette), 1.60 (m, 2 H, CH₂CH₂C=O), 2.47 (t, 2H , CH₂CH₂C=O, ³J_(HH) = 7.4 Hz), 3.05 (d, 2 H, CHCH₂, ³J_(HH) = 7.2 Hz), 3.76 (s, 6 H, CO₂CH₃), 3.93 (t, 1 H, CH, ³J_(HH) = 7.2 Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.02 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$), 22.62-31.87 (CH_2 -Kette), 41.13 ($\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{O}$), 42.57 ($\text{C}_{14}\text{H}_{29}\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 46.49 ($\underline{\text{C}}\text{HCH}_2\text{C}=\text{O}$), 52.65 (O- CH_3), 169.25 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{Me}$), 207.26 (C=O).

IR (KBr) : 2990-2820 (s, v CH aliph.), 1730 (s, v C=O), 1470 (m, δ CH aliph.), 1320-1170 (v C-O-C), weitere Banden bei : 1440 (m), 1410 (m), 1350 (m), 1120 (m), 1080 (w), 960 (m), 860 (m), 720 (m), 670 (m) cm^{-1} .

9.3.6 (2-Methylen-tridecyl)-malonsäuredimethylester **6**

Eine Suspension von 17.16 g (48 mmol) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 200 ml trockenem Dimethoxyethan (DME) wurde unter Argon auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und mit 19.2 ml (48 mmol) *n*-Butyllithium (15% in Hexan) versetzt. Es wurde zunächst auf Raumtemperatur und dann 20 Minuten auf $60\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach erneutem Kühlen auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ wurde eine Lösung von 5.28 g (4 mmol) Ketomalonat **4**, gelöst in 40 ml trockenem DME zugetropft, woraufhin noch 10 Minuten bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ und über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt wurde. Nach Zugabe von 400 ml Diethylether wurde der unlösliche Rückstand abfiltriert und das Filtrat mit verd. Salzsäure, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und die Lösung im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (Ether:Hexan = 1:4). Erhalten wurden 3.92 g (75%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.62

GC(7): R_t = 15.7 min (95%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.92 (t, 3 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$, $^3J_{\text{HH}} = 6.8\text{ Hz}$), 1.30 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.46 (m, 2 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.05 (t, 2H, $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.6\text{ Hz}$), 2.66 (d, 2 H, $\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2$, $^3J_{\text{HH}} = 7.8\text{ Hz}$), 3.65 (t, 1 H, CH, $^3J_{\text{HH}} = 7.8\text{ Hz}$), 3.76 (s, 6 H, $\text{CO}_2\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 4.77, 4.82 (2x s, 2 H, C= $\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 15.60 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$), 23.04-36.40 (CH_2 -Kette), 50.97 (CH), 52.76 (O- CH_3), 111.24 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{C}$), 146.22 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}$), 169.85 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{Me}$).

IR (Film) : 3090 (vw, ν CH olefin.), 2980-2800 (s, ν CH aliph.), 1740 (vs, ν C=O), 1650 (m, ν C=C), 1440 (m, δ CH aliph.), 1250-1140 (s, ν C-O-C), 900 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 740 (w), 700 (w) cm^{-1} .

9.3.7 (2-Methylen-heptadecyl)-malonsäuredimethylester **7**

Eine Suspension von 4.29 g (12 mmol) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 50 ml trockenem Dimethoxyethan (DME) wurde unter Argon auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und mit 4.8 ml (12 mmol) *n*-Butyllithium (15% in Hexan) versetzt. Es wurde zunächst auf Raumtemperatur und dann 20 Minuten auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Nach erneutem Kühlen auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde eine Lösung von 1.53 g (4 mmol) Ketomalonat **5**, gelöst in 20 ml trockenem DME zugetropft, woraufhin noch 10 Minuten bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ und über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt wurde. Nach Zugabe von 150 ml Diethylether wurde der unlösliche Rückstand abfiltriert und das Filtrat mit verd. Salzsäure, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (Ether:Hexan = 1:5) und aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 765 mg (50%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von $26\text{ }^{\circ}\text{C}$.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.64

GC(7): $R_t = 20.2\text{ min}$ (91%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0.92$ (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8\text{ Hz}$), 1.30 (m, 24 H, CH_2 -Kette), 1.46 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.05 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6\text{ Hz}$), 2.66 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 7.8\text{ Hz}$), 3.65 (t, 1 H, CH, $^3J_{(\text{HH})} = 7.8\text{ Hz}$), 3.76 (s, 6 H, CO_2CH_3), 4.77, 4.82 (2x s, 2 H, $\text{C}=\text{CH}_2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.48$ (CH_3CH_2), 23.09-36.39 (CH_2 -Kette), 50.87 (CH), 52.87 (O- CH_3), 111.29 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 146.28 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 169.92 (CO_2Me).

IR (Film) : 3090 (w, ν CH olefin.), 2990-2800 (vs, ν CH aliph.), 1750 (vs, ν C=O), 1650 (m, ν C=C), 1440 (s, δ CH aliph.), 1300-1130 (s, ν C-O-C), 900 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1340 (m, br), 1030 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.8 2-(2-Methylen-tridecyl)-propan-1,3-diol **8**

450 mg (11.86 mmol) Lithiumaluminiumhydrid wurden unter Argon in 200 ml trockenem Ether suspendiert. 3.26 g (10 mmol) Malonester **6**, gelöst in 20 ml trockenem Ether wurden zugetropft. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt und gemäß AAV 4 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt (40x2cm; 1. Ether:Hexan=2:1, 2. Ether, 3. Ether:Methanol = 10:1). Umkristallisation aus Pentan im Tiefkühlschrank ergaben 1.22 g (45%) farbloser Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 47 °C.

R_f (Diethylether) = 0.30

GC(7): R_t = 16.2 min (99%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.92 (t, 3 H, CH₃, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.30 (m, 16 H, CH₂-Kette), 1.45 (m, 2 H, CH₂CH₂C=C), 2.05 (m, 5 H, CH₂CH₂C=C, CHCH₂C=C), 2.54 (s, br., 2 H, OH), 3.65-3.83 (m, 4 H, CH₂OH), 4.79, 4.83 (2x s, 2 H, C=CH₂).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.49 (CH₃), 23.08-36.08 (10 Signale CH₂-Kette), 40.27 (CH), 66.49 (CH₂OH), 111.34 (C=CH₂), 147.89 (CH₂=C).

IR (KBr) : 3700-3100 (s, br, v OH), 3080 (w, v CH olefin.), 2990-2800 (s, v CH aliph.), 1640 (m, v C=C), 1460 (s, δ CH aliph.), 1030 (s, br, v C-OH), 890 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1090 (w, br), 960 (m), 720 (w) cm⁻¹.

9.3.9 2-(2-Methylen-heptadecyl)-propan-1,3-diol **9**

450 mg (11.86 mmol) Lithiumaluminiumhydrid wurden unter Argon in 40 ml trockenem Ether suspendiert. 350 mg (0.92 mmol) Malonester **7**, gelöst in 4 ml trockenem Ether wurden zugetropft. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur nachgerührt und gemäß AAV 4 aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt (40x0.5 cm; 1. Ether:Hexan=2:1, 2. Ether, 3. Ether:Methanol = 10:1). Umkristallisation aus Pentan im Tiefkühlschrank lieferte 105 mg (35%) farbloser Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 49 °C.

R_f (Diethylether) = 0.31

GC(7): R_t = 20.6 min (77%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.92 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.30 (m, 24 H, CH_2 -Kette), 1.46 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.05 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.50 (s, br., 2 H, OH), 3.64-3.83 (m, 4 H, CH_2OH), 4.78, 4.82 (2x s, 2 H, $\text{C}=\text{CH}_2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.49 (CH_3), 23.09-36.08 (CH_2 -Kette), 40.26 (CH), 66.64 (CH_2OH), 111.34 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 147.88 ($\text{CH}_2=\text{C}$).

IR (KBr) : 3700-3100 (s, br, v OH), 3080 (w, v CH olefin.), 2990-2800 (s, v CH aliph.), 1640 (s, v C=C), 1460 (s, δ CH aliph.), 1030 (s, br, v C-OH), 880 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1230 (s), 1090 (w, br), 960 (m), 710 (m) cm^{-1} .

9.3.10 2-(2-Methylen-nonyl)-propan-1,3-dioldicaprylat **10**

1.0 g (4.67 mmol) 2-(2-Methylen-nonyl)-propan-1,3-diol (Berger M. 1993) wurden in 6 ml Pyridin mit 2.0 ml (11.7 mmol) Caprylsäurechlorid gemäß AAV 5 umgesetzt. Das isolierte Rohprodukt wurde über Kieselgel chromatographiert (Hexan:Ether = 5:1). Erhalten wurden 1.4 g (64%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 3) = 0.57

GC(7): R_t = 24.0 min (92%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90 (m, 9 H, CH_3), 1.32 (m, 24 H, CH_2 -Kette), 1.45 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 1.65 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.03 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6$ Hz), 2.11 (d, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.4$ Hz), 2.23 (m, 1 H, CH), 2.33 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 4.03-4.14 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.78, 4.85 (2x s, 2 H, $\text{C}=\text{CH}_2$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.41, 14.44 (CH_3), 22.99-35.78 (CH_2 -Kette, CH), 36.01 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 64.30 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 112.04 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 164.63 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 174.10 (CO_2R).

IR (Film) : 3080 (w, v CH olefin.), 3000-2820 (s, v CH aliph.), 1740 (s, v C=O), 1600 (m, v C=C), 1470 (s, δ CH aliph.), 1330-1140 (v C-O-C), 895 (m, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1380 (w), 1350 (w, br), 1110 (s), 1020 (m, br), 725 (m) cm^{-1} .

9.3.11 2-(2-Oxo-nonyl)-propan-1,3-dioldicaprylat **11**

a) aus **10** durch Reaktion mit $\text{RuCl}_3 / \text{NaIO}_4$

1.93 g (9.0 mmol) Natriummetaperiodat wurden in 8 ml Wasser und 6 ml Acetonitril gelöst und unter Eisbadkühlung analog AAV 9 mit 1.40 g (3.0 mmol) Olefin **10**, gelöst in 6 ml Tetrachlorkohlenstoff und 50 mg Rutheniumtrichlorid-hydrat umgesetzt und aufgearbeitet. Das Rohprodukt wurde aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 1.30 g (93%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 33 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.63

GC(7): $R_t = 25.4$ min (99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0.85$ (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.25 (m, 24 H, CH_2 -Kette), 1.36-1.66 (m, 6 H, CH_2 -Kette), 2.25 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.3$ Hz), 2.35 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 2.45 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.6$ Hz), 2.63 (m, 1 H, CH), 4.05 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.14$ (CH_3), 22.42-33.91 (10 Signale CH_2 -Kette, CH), 40.95, 43.06 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}_2(\text{O})\text{CH}_2$), 63.80 (CH_2O), 173.56 (CO_2R), 208,73 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (KBr) : 2980-2850 (s, v CH aliph.), 1765 (s, v $\text{C}=\text{O}$), 1280-1120 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1485 (m), 915 (w), 740 (w) cm^{-1} .

b) aus **22** durch Reaktion mit konz. HCl / THF

10.0 g (19.5 mmol) des Dioxolans **22** wurden in 130 ml THF gelöst, mit 16 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und drei Stunden auf 40 °C erwärmt (Reaktionskontrolle mittels GC). Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt. Nach der Zugabe von 300 ml Hexan wurde nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Tiefkühlstand zur Kristallisation gebracht. Der Feststoff wurde abgesaugt und durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; Ether:Hexan = 3:1) gereinigt. Die Produktfraktionen wurden im Vakuum eingengt und aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 2.3 g (22%) farbloser Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 33 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.63

GC(7): $R_t = 25.4$ min (98%)

Die NMR- und IR- Daten sind identisch mit den Spektren von Methode a).

Anmerkung: Die Spaltung des Ketals mittels HCl / THF erwies sich als ungeeignet. Deutlich bessere Resultate liefert die Reaktion mit TFA / Aceton nach AAV 7.

c) aus **29** durch Swern Oxidation

Zu einer auf -78 °C gekühlten Lösung von 1.8 ml (20 mmol) Oxalylchlorid (frisch destilliert) in 50 ml trockenem Methylenchlorid wurden 3.2 ml (41.4 mmol) trockenes Dimethylsulfoxid, gelöst in 10 ml trockenem Methylenchlorid vorsichtig zugetropft. 2 Minuten später wurde eine Lösung von 7.87 g (16.7 mmol) Alkohol **29** (Rohprodukt, enthielt ca. 45% Aldehyd **28**) in 20 ml Methylenchlorid zugetropft. Nach 20 minütigem Rühren bei -78 °C wurden noch 13 ml Triethylamin zugefügt. Daraufhin wurde auf Raumtemperatur erwärmt und mit Ether/Wasser und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und die flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; Ether:Hexan = 1:5) und durch Umkristallisation aus Methanol gereinigt. Erhalten wurden 2.14 g (27%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 33 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.66

GC(7): R_t = 25.4 min (>99%)

Die NMR- und IR- Daten sind identisch mit den Spektren nach der Methode a).

9.3.12 (2-Oxo-nonyl)-malonsäurediethylester **12**

5.0 g Natriumhydrid (60%ig) wurden mit Pentan gewaschen, portionsweise in 350 ml trockenem Ethanol eingebracht und mit 22.0 g (137 mmol) Malonsäurediethylester, sowie mit 21.1 g (95 mmol) Brommethylketon **1** wie in AAV 3b beschrieben umgesetzt und aufgearbeitet. Das isolierte Rohprodukt wurde im Kugelrohrföfen im Vakuum destilliert. Erhalten wurden 21.3 g (71 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.: 145 °C/0.01 mbar

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.50

GC(1): R_t = 15.3 min (96%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.88 (t, 3H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})}$ = 6.9 Hz), 1.27 (m, 14 H, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1.59 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.46 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})}$ = 7.4 Hz),

3.02 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 7.2$ Hz), 3.87 (t, 1 H, CH, $^3J_{(\text{HH})} = 7.2$ Hz), 4.16-4.24 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.10, 14.26$ (CH_3), 22.68, 23.94, 29.11, 29.20, 31.74 (CH_2 -Kette), 41.23 (CHCH_2), 42.76 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}_2$), 47.07 (CHCH_2), 61.73 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 169.03 (CO_2R), 207.50 (C=O).

IR (Film) : 3010-2820 (s, v CH aliph.), 1740 (vs, v C=O), 1470 (m, δ CH aliph.), 1350-1140 (v C-O-C), weitere Banden bei : 1380 (m), 1100 (m), 1040 (m), 860 (m), 725 (w) cm^{-1} .

9.3.13 (2-Oxo-tridecyl)-malonsäurediethylester **13**

2.0 g Natriumhydrid (60%ig) wurden mit Pentan gewaschen, portionsweise in 170 ml trockenem Ethanol eingebracht und mit 9.6 g (60 mmol) Malonsäurediethylester, sowie mit 13.9 g (50 mmol) Brommethylketon **2** entsprechend AAV 3b umgesetzt und aufgearbeitet. Das isolierte Rohprodukt wurde einmal aus Methanol und einmal aus Hexan umkristallisiert. Erhalten wurden 9.1 g (51 %) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 29 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.65

GC(1): $R_t = 20.2$ min (91%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0.90$ (t, 3H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.29 (m, 22 H, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1.60 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C=O}$), 2.47 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C=O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.4$ Hz), 3.03 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 7.2$ Hz), 3.87 (t, 1 H, CH, $^3J_{(\text{HH})} = 7.2$ Hz), 4.16-4.24 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.11, 14.18$ (CH_3), 22.78-32.01 (8 Signale CH_2 -Kette), 42.79 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2$), 47.09 (CHCH_2), 61.74 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 169.04 (CO_2R), 207.51 (C=O).

IR (Film) : 3010-2820 (s, v CH aliph.), 1730 (vs, v C=O), 1460 (m, δ CH aliph.), 1310-1130 (v C-O-C), weitere Banden bei : 1370 (m), 1330 (w), 1100 (m), 1030 (s), 860 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.14 (2-Oxo-heptadecyl)-malonsäurediethylester **14**

5.0 g Natriumhydrid (60%ig) wurden mit Pentan gewaschen, portionsweise in 350 ml trockenem Ethanol eingebracht und mit 22.0 g (137 mmol) Malonsäurediethylester, sowie mit 33.3 g (100 mmol) Brommethylketon **3** entsprechend AAV 3b umgesetzt und aufgearbeitet. Das isolierte Rohprodukt wurde aus Hexan umkristallisiert. Erhalten wurden 18.7 g (45 %) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 46 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 5) = 0.16

GC(2): R_t = 29.2 min (93%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.28 (m, 30 H, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1.61 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.48 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 3.04 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz), 3.89 (t, 1 H, CH, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz), 4.16-4.24 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.12, 14.21 (CH_3), 22.80-32.05 (CH_2 -Kette), 41.25 (CHCH_2), 42.80 ($\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{CH}_2$), 47.09 (CHCH_2), 61.77 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 169.06 (CO_2R), 207.56 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (KBr) : 3000-2810 (vs, v CH aliph.), 1730 (vs, v C=O), 1460 (m, δ CH aliph.), 1300-1130 (v C-O-C), weitere Banden bei : 1400 (w), 1380 (w), 1360 (m), 1325 (m), 1100 (s), 1020 (s), 850 (m), 720 (m) cm^{-1} .

9.3.15 1,2-Bis-(trimethylsiloxy)-ethan **15**

46.5 g (750 mmol) Ethylenglykol wurden mit einigen Tropfen Trimethylsilylchlorid vorgelegt und auf 130°C erwärmt. 122.7 g (760 mmol) Hexamethyldisilazan wurden zugetropft. Anschließend wurde 2h auf ca. 180 °C erhitzt (NH_3 -Entwicklung !). Der Rückstand wurde unter vermindertem Druck fraktioniert destilliert. Erhalten wurden 128 g (83%) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.: 70 °C /20 Torr

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.15 (s, 18 H, CH_3OSi), 3.68 (s, 4 H, CH_2O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = -0.44$ (CH_3), 64.06 (CH_2).

9.3.16 (2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-malonsäurediethylester **16**

Entsprechend AAV 4 wurden 20.2 g (67 mmol) γ -Ketomalonester **12** mit 15.5 g (75 mmol) Ethylenglykol-bis-(trimethylsilylether) **15** sowie 100 μl TMS-triflat eine Stunde aus 70 °C erwärmt. Nach Entfernen der flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurden 23.1 g (100%) einer leicht braun gefärbten Flüssigkeit erhalten. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiter eingesetzt.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.43

GC(1): $R_t = 18.0$ min (90%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0.90$ (t, 3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.27-1.40 (m, 16 H, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1.61 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 2.38 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 3.51 (t, 1 H, CH, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 3.93 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.18-4.25 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.16$ (CH_3), 22.70, 22.75, 23.99, 29.23, 31.89 (CH_2 -Kette), 35.83 (CHCH_2), 37.76 (CHCH_2), 47.75 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}_2$), 61.44 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O}$), 65.07 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 110.52 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 169.71 (CO_2R).

IR (Film) : 3010-2820 (s, v CH aliph.), 1730 (vs, v C=O), 1470 (m, δ CH aliph.), 1350-1140 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1380 (s), 1100 (m), 1040 (s), 955 (w, br), 860 (m), 725 (w) cm^{-1} .

9.3.17 (2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-malonsäurediethylester **17**

5.4 g (15mmol) γ -Ketomalonester **13** wurden mit 6.4 g (31mmol) Ethylenglykol-bis-(trimethylsilylether) **15** sowie 200 μl TMS-triflat 30 Minuten lang gemäß AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol bei - 30 °C umkristallisiert und rasch abgesaugt. Der farblose kristalline Feststoff wurde beim Erwärmen auf Raumtemperatur flüssig. Erhalten wurden 5.1 g (83%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.57

GC(8): $R_t = 20.0$ min (88%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.27-1.38 (m, 24 H, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1.61 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 2.38 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 3.51 (t, 1 H, CH, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 3.94 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.19-4.24 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.13, 14,20 (CH_3), 22.80-32.04 (9 Signale CH_2 -Kette), 35.86 (CHCH_2), 37.77 (CHCH_2), 47.75 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2$), 61.44 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O}$), 65.07 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 110.52 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 169.71 ($\text{C}(\text{O}_2\text{R})$).

IR (Film) : 3010-2820 (vs, v CH aliph.), 1730 (vs, br, v C=O), 1470 (s, δ CH aliph.), 1350-1140 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1380 (m), 1100 (w), 1040 (s), 950 (w, br), 870 (m), 725 (w) cm^{-1} .

9.3.18 (2-Pentadecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-malonsäurediethylester **18**

10.0 g (24.2mmol) γ -Ketomalonester **14** wurden mit 5.8 g (28 mmol) Ethylenglykol-bis-(trimethylsilylether) **15** sowie 400 μl TMS-triflat 30 Minuten lang gemäß AAV 4 umgesetzt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Pentan umkristallisiert. Erhalten wurden 9.5 g (86%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 38 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.73

GC(9): $R_t = 22.2$ min (90%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 3H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.28-1.41 (m, 32 H, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1.62 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 2.39 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 3.52 (t, 1 H, CH, $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 3.94 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.19-4.25 (m, 4 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.13, 14,21 (CH_3), 22.81-32.06 (CH_2 -Kette), 35.84 (CHCH_2), 37.78 (CHCH_2), 47.76 ($\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{CH}_2$), 61.45 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O}$), 65.08 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 110.53 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 169.72 ($\text{C}(\text{O}_2\text{R})$).

9.3.19 2-(2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diol **19**

Analog AAV 5 wurden 4.6 g (122 mmol) Lithiumaluminiumhydrid unter Argon in 250 ml trockenem Ether suspendiert. Unter Eisbadkühlung wurden 21.1 g (67 mmol) des Malonesterderivates **16**, gelöst in 70 ml trockenem Ether zugetroft. Nach dem Aufarbeiten wurde das isolierte Rohprodukt durch Chromatographie über Kieselgel (40 x 2 cm; Eluent 1. Ether : Hexan = 2 : 1, 2. Ether, 3. Ether : Methanol = 15 : 1) gereinigt. Erhalten wurden 7.6 g (44%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether) = 0.14

GC(1): R_t = 16.5 min (>99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.29-1.38 (m, 10 H, CH_2 -Kette), 1.63 (m, 2 H, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}_2$), 1.70 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz), 1.94 (m, 1 H, CH), 3.09 (s, br., 2 H, OH), 3.63-3.71 (m, 4 H, CH_2OH), 3.99 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.17 (CH_3), 22.75, 24.11, 29.35, 29.96, 31.91, 35.51 (CH_2 -Kette, CH), 37.33 (CHCH_2), 38.61 ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{CH}_2$), 64.81 (CH_2OH), 65.83 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 111.92 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$).

IR (Film) : 3700-3070 (vs, br, v OH), 3010-2810 (vs, v CH aliph.), 1470 (m, δ CH aliph.), 1120-1000 (vs, br, v C-OH), weitere Banden bei : 1380 (w), 1210 (m, br), 950 (m), 810 (w), 790 (w), 725 (w) cm^{-1} .

9.3.20 2-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diol **20**

Entsprechend AAV 5 wurden 1.3 g (34.3 mmol) Lithiumaluminiumhydrid unter Argon in 100 ml trockenem Ether suspendiert. Unter Eisbadkühlung wurden 5.0 g (12.5 mmol) des Malonesterderivates **17**, gelöst in 10 ml trockenem Ether zugetroft. Nach dem Aufarbeiten wurde das isolierte Rohprodukt durch Chromatographie über Kieselgel (40 x 1.5 cm; Eluent Ether: Methanol = 5 : 1) gereinigt. Erhalten wurden 2.1 g (53%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 45 °C.

R_f (Diethylether) = 0.16

GC(7): R_t = 19.3 min (89%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90 (t, 3H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.29-1.37 (m, 18 H, CH_2 -Kette), 1.63 (m, 2 H, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\underline{\text{CH}_2}$), 1.72 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.2$ Hz), 1.95 (m, 1 H, CH), 2.85 (s, br., 2 H, OH), 3.65-3.73 (m, 4 H, CH_2OH), 4.00 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.21 (CH_3), 22.80-35.53 (9 Signale CH_2 -Kette, CH), 37.33 (CHCH_2), 38.64 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\underline{\text{CH}_2}$), 64.82 (CH_2OH), 65.92 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 111.92 ($\underline{\text{C}}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$).

IR (KBr) : 3700-3100 (s, br, v OH), 2990-2810 (vs, v CH aliph.), 1460 (m, δ CH aliph.), 1090-1000 (s, br, v C-OH), weitere Banden bei : 1370 (w), 1140 (m), 940 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.21 2-(2-Pentadecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diol **21**

Entsprechend AAV 5 wurden 2.5 g (65.9 mmol) Lithiumaluminiumhydrid unter Argon in 80 ml trockenem Ether suspendiert. Unter Eisbadkühlung wurden 9.0 g (19.7 mmol) des Malonesterderivates **18**, gelöst in 10 ml trockenem Ether zugetroft. Nach dem Aufarbeiten wurde das isolierte Rohprodukt durch Chromatographie über Kieselgel (40 x 1.5 cm; Eluent Hexan : Ether: Methanol = 1 : 4 : 0.1) gereinigt. Erhalten wurden 1.6 g (22%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 57 °C.

R_f (Diethylether) = 0.16

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.7$ Hz), 1.29-1.39 (m, 26 H, CH_2 -Kette), 1.65 (m, 2 H, $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\underline{\text{CH}_2}$), 1.73 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.3$ Hz), 1.95 (m, 1 H, CH), 2.78 (s, br., 2 H, OH), 3.68-3.74 (m, 4 H, CH_2OH), 3.99 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.21 (CH_3), 22.81-35.54 (CH_2 -Kette, CH), 37.33 (CHCH_2), 38.65 ($\text{C}_{14}\text{H}_{29}\underline{\text{CH}_2}$), 64.82 (CH_2OH), 65.83 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 111.92 ($\underline{\text{C}}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$).

IR (KBr) : 3700-3100 (s, br, v OH), 2990-2810 (vs, v CH aliph.), 1460 (m, δ CH aliph.), 1090-1010 (s, br, v C-OH), weitere Banden bei : 1370 (w), 980 (w), 960 (w), 940 (w), 910 (w), 720 (m) cm^{-1} .

9.3.22 2-(2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-dioldicaprylat **22**

5.7 g (22 mmol) Diol **19** wurden gemäß AAV 6a in 150 ml trockenem Ether mit 5 ml Pyridin, einer Spatelspitze DMAP sowie 8.3 ml (48 mmol) Caprylsäurechlorid umgesetzt. Erhalten wurden 11.3 g (100%) einer farblosen Flüssigkeit. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigungsmaßnahmen weiter eingesetzt.

R_f (Ether:Pentan = 1:1) = 0.63

GC(7): R_t = 26.4 min (95%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.9$ Hz), 1.31 (m, 26 H, CH_2 -Kette), 1.64 (m, 6 H, CH_2 -Kette), 1.70 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.0$ Hz), 2.24 (m, 1 H, CH), 2.32 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6$ Hz), 3.96 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.98-4.20 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.15 (CH_3), 22.72-37.64 (CH_2 -Kette, CH), 64.69, 64.91 (CH_2O), 111.44 ($\underline{\text{C}}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 173.87 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{R}$).

IR (Film) : 3000-2820 (s, v CH aliph.), 1740 (s, v C=O), 1470 (m, δ CH aliph.), 1170 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1380 (w), 1110 (m), 950 (w), 725 (w) cm^{-1} .

9.3.23 2-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-dioldilaurat **23**

1.7 g (5.4 mmol) Diol **20** wurden gemäß AAV 6a in 5 ml Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 3.0 ml (13 mmol) Laurinsäurechlorid umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde zweimal aus Methanol / Chloroform umkristallisiert. Erhalten wurden 2.7 g (74%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 38 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.77

GC(7): R_t = 35.0 min (98%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.29 (m, 50 H, CH_2 -Kette), 1.64 (m, 6 H, CH_2 -Kette), 1.70 (d, 2 H, CHCH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 5.9$ Hz), 2.25 (m, 1 H, CH), 2.32 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 3.96 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.05-4.21 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20 (CH_3), 22.80-37.65 (CH_2 -Kette, CH), 64.71, 64.90 (CH_2O), 111.44 ($\underline{\text{C}}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 173.89 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{R}$).

IR (Film) : 2990-2810 (s, v CH aliph.), 1730 (s, v C=O), 1460 (m, δ CH aliph.), 1150 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1370 (w), 1100 (m), 1060 (m), 940 (w), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.24 2-(2-Pentadecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-dioldipalmitat **24**

2.2 g (5.9 mmol) Diol **21** wurden gemäß AAV 6a in 15 ml Pyridin gelöst und bei 0 °C mit 4.3 ml (15.6 mmol) Palmitinsäurechlorid umgesetzt. Das erhaltene Rohprodukt wurde zweimal aus Methanol / Chloroform umkristallisiert. Erhalten wurden 4.3 g (86%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 62 °C.

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.92 (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.30 (m, 74 H, CH_2 -Kette), 1.65 (m, 8 H, CH_2 -Kette), 2.31-2.35 (m, 5 H, $\underline{\text{CH}}$, $\underline{\text{CH}}_2\text{CO}_2\text{R}$), 3.97 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\underline{\text{CH}}_2\text{O}$), 4.05-4.20 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.07 (CH_3), 22.67-37.51 (CH_2 -Kette, CH), 64.55, 64.76 (CH_2O), 111.29 ($\underline{\text{C}}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 173.71 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{R}$).

IR (Film) : 3000-2820 (s, v CH aliph.), 1740 (s, v C=O), 1465 (s, δ CH aliph.), 1165 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1235 (w, br), 1115 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.25 2-(2-Oxo-tridecyl)-propan-1,3-dioldilaurat **25**

2.04 g (3.0 mmol) des Dioxolans **23** wurden in 25 ml Aceton und 1 ml Trifluoressigsäure gemäß AAV 7 umgesetzt und aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Essigester / Methylenchlorid zweimal umkristallisiert, worauf 1.42 g (74%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 62 °C erhalten wurde.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.76

GC(7): R_t = 33.0 min (94%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.29 (m, 48 H, CH_2 -Kette), 1.35-1.65 (m, 6 H, CH_2 -Kette), 2.32 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 2.42 (t, 2 H,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5 \text{ Hz}$), 2.49 (d, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 6.6 \text{ Hz}$), 2.67 (m, 1 H, CH), 4.04-4.11 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.20$ (CH_3), 22.80-34.34 (CH_2 -Kette, CH), 41.27, ($\text{C}_{11}\text{H}_{23}(\text{O})\text{CH}_2$), 43.48 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2=\text{O}$), 63.87 (CH_2O), 173.68 (CO_2R), 208,67 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (KBr) : 2980-2850 (s, v CH aliph.), 1740 (s, v $\text{C}=\text{O}$), 1455 (m, δ CH aliph.), 1280-1130 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1415 (w), 1375 (m, br), 1110 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.26 2-(2-Oxo-heptadecyl)-propan-1,3-dioldipalmitat **26**

2.60 g (3.06 mmol) Dioxolan **24** wurden in 25 ml Aceton und 1 ml Trifluoressigsäure gemäß AAV 7 umgesetzt und aufgearbeitet. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Essigester / Methylenchlorid zweimal umkristallisiert, worauf 2.04 g (83%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 77 °C erhalten wurde.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.77

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0.92$ (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8 \text{ Hz}$), 1.30 (m, 72 H, CH_2 -Kette), 1.63 (m, 6 H, CH_2 -Kette), 2.32 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6 \text{ Hz}$), 2.43 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5 \text{ Hz}$), 2.50 (d, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 6.6 \text{ Hz}$), 2.68 (m, 1 H, CH), 4.07-4.11 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.06$ (CH_3), 22.67-34.19 (CH_2 -Kette, CH), 41.26, 43.34 ($\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{CH}_2(\text{O})\text{CH}_2$), 63.72 (CH_2O), 173.54 (CO_2R), 208,54 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (KBr) : 2980-2840 (s, v CH aliph.), 1725 (s, v $\text{C}=\text{O}$), 1470 (m, δ CH aliph.), 1180 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1420 (w), 1280 (m), 1270 (m), 1110 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.3.27 2-(2-Propen)-propan-1,3-dioldicaprylat **27**

6.63 g (57 mmol) 2-(2-Propen)-propan-1,3-diol (Breitgoff, D. 1989) wurden analog AAV 6 a in 150 ml trockenem Ether und 15 ml trockenem Pyridin gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 17.89 g (110 mmol) Caprylsäurechlorid zur Reaktion gebracht. Das isolierte Rohprodukt wurde

durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; Ether:Hexan = 1:8) gereinigt, worauf 18.3 g (87%) einer farblosen Flüssigkeit erhalten wurde.

R_f (Diethylether : Hexan = 1 : 5) = 0.45

GC(1): R_t = 22.1 min (97%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})}$ = 6.8 Hz), 1.31 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.64 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 2.11-2.19 (m, 3 H, CHCH_2), 2.33 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})}$ = 7.5 Hz), 4.04-4.14 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$), 5.11 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.74-5.82 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.13 (CH_3), 22.70-34.39 (12 Signale CH_2 -Kette, CH), 63.80 (CH_2O), 117.50 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 135.10 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 173.81 (CO_2R).

IR (Film) : 3080 (w, v CH olefin.), 2980-2870 (s, v CH aliph.), 1740 (s, v C=O), 1640 (w, v C=C), 1270-1100 (s, v C-O-C), 915 (m, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1820 (m), 1470 (m), 1420 (w), 1380 (w), 1035 (m), 725 (w) cm^{-1} .

9.3.28 2-(2-Oxo-ethyl)-propan-1,3-dioldicaprylat **28**

8.0 g (21.7 mmol) 2-(2-Propen)-propan-1,3-dicaprylat **27**, gelöst in 50 ml Essigester wurden entsprechend AAV 9 mit 12.0 g (56.1 mmol) Natriummetaperiodat und 20 mg Rutheniumtrichlorid-hydrat gelöst in 25 ml Wasser / 50 ml Acetonitril zur Reaktion gebracht. Das isolierte Rohprodukt wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; 1. Ether:Hexan = 1:5, 2. Ether:Hexan = 1:1) gereinigt, worauf 4.6 g (57%) einer farblosen Flüssigkeit erhalten wurde.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.44

GC(7): R_t = 23.7 min (>99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})}$ = 6.8 Hz), 1.31 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.61-1.69 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 2.32 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})}$ = 7.5 Hz), 2.55 (m, 2 H, CHCH_2), 2.72 (m, 1 H, CH), 4.07-4.17 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$), 9.80 (t, 1 H, CHO, $^3J_{(\text{HH})}$ = 1.1 Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.12 (CH_3), 14.18-34.39 (13 Signale CH_2 -Kette, CH), 63.77 (CH_2O), 173.64 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{R}$), 199.85 (CHO).

IR (Film) : 2985-2860 (s, v CH aliph.), 2730 (w, v CHO), 1740 (vs, v C=O), 1270-1150 (s, v C-O-C), 915 (m, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1470 (m), 1420 (w), 1380 (w), 1110 (m), 1020 (w, br), 725 (w) cm^{-1} .

9.3.29 2-(2-Hydroxy-nonyl)-propan-1,3-dioldicaprylat **29**

535 mg (22 mmol) Magnesiumspäne wurden in 5 ml trockenem Ether unter Argon vorgelegt. Eine Lösung von 3.76 g (21 mmol) Hexylbromid in 20 ml trockenem Ether wurde zugetropft. Nach 10 minütigem Rühren wurde die Grignardlösung unter Argon in einen Tropftrichter dekantiert und zu einer auf -78°C gekühlten Lösung von 7.41 g (20 mmol) 2-(2-Propenon)-propan-1,3-dicaprylat **28** in 60 ml trockenem Ether zugetropft. Es wurde auf Raumtemperatur erwärmt, 20 Minuten nachgerührt und 200 ml Ether zugefügt. Die Lösung wurde nacheinander mit verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung ausgeschüttelt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt (40x2 cm; Ether). Erhalten wurden 5.0 g (53%) einer farblosen Flüssigkeit, die zu ca. 45% mit dem Edukt **28** verunreinigt war.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.44

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.31 (m, 28 H, CH_2 -Kette), 1.42-1.52 (m, 3 H, CHCH_2 , OH), 1.64 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 2.28-2.35 (m, 5 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, CH), 3.73 (m, 1 H, CHOH), 4.07-4.19 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$).

Verunreinigt durch ca. 45% Edukt.

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.14, 14.16 (CH_3), 22.71-38.37 (CH_2 -Kette, CH), , 63.88 (CH_2O), 69.90 (CH_2OH), 173.98 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{R}$).

Verunreinigt durch ca. 45% Edukt.

IR (Film) : 3600-3200 (m, br, ν OH), 3000-2820 (s, ν CH aliph.), 1730 (s, ν C=O, nicht umgesetztes Edukt), 1270-1150 (s, ν C-O-C), weitere Banden bei : 1465 (s), 1100 (s), 730 (w) cm^{-1} .

9.4 Synthese carba-analoger Triglyceride modifiziert in der *sn*-1(3) Position

9.4.1 Allylmalonsäuremonoethylester **30**

32.04g (160 mmol) Allylmalonsäurediethylester wurden in 50 ml Ethanol gelöst und mit einer Lösung von 10.56 g (160 mmol) KOH (85%ig) in 200 ml Ethanol versetzt. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und die Lösung daraufhin mit 300 ml Wasser und 200 ml Hexan ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde mit 30 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und mit 200 ml Diethylether extrahiert. Die org. Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden 25.01g (90%) eines farblosen Öls erhalten.

R_f (Diethylether:*i*-Propanol = 15:1) = 0.57

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.30 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 2.67-2.71 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 3.51 (t, 1 H, CH, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 4.24 (q, 2 H, CH_2O , $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 5.09-5.19 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.76-5.86 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 9.96 (s, 1 H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.13 (CH_3), 32.80 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 51.43 (CH), 61.93 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 118.00 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 133.76 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 168.90 (CO_2R), 174.45 (CO_2H).

9.4.2 1-Hexadecen-5-on-4-carbonsäureethylester **31**

2.4 g (13.9 mmol) Allylmalonsäuremonoethylester **30** wurden unter Ar in 60 ml trockenem THF gelöst. Bei -70°C wurden zunächst 18 ml (27.8 mmol) *n*-Butyllithium (15% in Hexan) zugefügt und nach 5 min. 3.3 ml (13.9 mmol) Laurinsäurechlorid in 10 ml trockenem THF innerhalb 2 min. zugetropft. Nach weiteren 5 min. bei -70°C wurde eine gekühlte Mischung aus 50 ml Diethylether und 50 ml 1N Salzsäure zügig zugegeben. Nach dem Auftauen wurden noch 50 ml Diethylether zugefügt und die organische Phase mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurden 3.54g (82%) eines gelben Öls

erhalten. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel chromatographiert (40x2 cm, Hexan : Diethylether = 2 : 1), wobei 2.37 g (55%) eines gelben Öls erhalten wurden.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.68

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.30 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 7.1$ Hz), 2.67-2.71 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 3.51 (t, 1 H, CH, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 4.24 (q, 2 H, CH_2O , $^3J_{(\text{HH})} = 7.1$ Hz), 5.09-5.19 (m., 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.76-5.86 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 9.96 (s, 1 H, CO_2H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20, 14.24 (CH_3), 22.80-34.06 (10 Signale CH_2 -Kette), 42.30 ($\text{CH}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2$), 58.73 (CH), 61.46 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 117.44 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 134.57 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 169.45, 179.26 (CO_2R , ?), 204.81 (C=O).

9.4.3 1-Hexadecen-5-on **32**

1.55 g (5 mmol) Ketoester **31** wurden in 10 ml 1n KOH (0.56 g KOH) und 10 ml MeOH über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Laut DC-Kontrolle lag kein Edukt mehr vor. Die Lösung wurde mit verd. Salzsäure angesäuert und 30 min. auf 50°C erwärmt. Anschließend wurde mit Diethylether extrahiert, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet über Magnesiumsulfat und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x1.5 cm, Hexan : Diethylether = 3 : 1) gereinigt. Erhalten wurden 0.93 g (78%) eines farblosen Feststoffs.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.75

GC(7): R_t = 10.3 min (98%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.9$ Hz), 1.29 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.60 (m, 2 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2$), 2.33-2.38 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 2.42, 2.52 (2x t, 4 H, 2x $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.4$ Hz), 4.98-5.08 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.79-5.87 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20, (CH_3), 22.80-32.04 (10 Signale CH_2 -Kette), 41.92, 43.06 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 115.24 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 137.37 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 210.51(C=O).

IR (Film) : 3090 (w, v CH olefin.), 3000-2820 (vs, v CH aliphat.), 1710 (s, v C=O), 1640 (m, v C=C), 1465 (s, δ CH aliphat.), 910 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1440 (vw), 1420 (m), 1170 (m, br), 1130 (w), 1000 (s), 720 (m) cm^{-1} .

9.4.4 2-But-3-enyl-2-methyl-[1,3]-dioxolan **33**

4.90 g (50 mmol) 5-Hexen-2-on wurden mit 11.35 g (55 mmol) Ethylenglykol-bis-(trimethylsilylether) **15** in 50 ml trockenem Diethylether sowie 40 Tr. konz. H_2SO_4 bei Raumtemperatur 1 Stunde gerührt. Einige Tropfen Triethylamin wurden zugefügt und die Lösung daraufhin mit Hexan und mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, getrocknet über Magnesiumsulfat und im Vakuum eingengt. Erhalten wurden 7.0 g (98%) eines farblosen Öls. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.57

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.35 (s, 3 H, CH_3), 1.76 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.15-2.21 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}$), 3.92-4.00 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.94-5.07 (m, 2 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$), 5.81-5.89 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\text{CH}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 24.00 (CH_3), 28.46 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 38.47 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 64.79 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 109.93 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 114.32 ($\text{CH}_2=\text{CH}$), 138.66 ($\text{CH}_2=\text{CH}$).

9.4.5 2-But-3-enyl-2-undecyl-[1,3]-dioxolan **34**

3.63g (15.22 mmol) Keton **32** wurden in 10 ml trockenem Diethylether gelöst und mit 3.51 g (17.0 mmol) Ethylenglykol-bis-(trimethylsilylether) **15** und 10 Tr. konz. Schwefelsäure 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. 100 μl Triethylamin wurden zugefügt und die Lösung daraufhin mit Hexan und mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Erhalten wurden 4.2 g (98%) einer farblosen Flüssigkeit. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.67

GC(7): R_t = 13.0 min (82%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 3 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz), 1.29 (m, 18 H, CH_2 -Kette), 1.61-1.75 (m, 4 H, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\underline{\text{CH}_2}\text{C}\underline{\text{CH}_2}$), 2.16 (m, 2 H, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}=\text{C}$), 3.96 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{O}$), 4.95-5.07 (m, 2 H, $\underline{\text{CH}_2}=\text{CH}$), 5.80-5.90 (m, 1 H, $\text{CH}_2=\underline{\text{CH}}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20 (CH_3), 22.79-36.44 (CH_2 -Kette), 37.46 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\underline{\text{CH}_2}$), 65.06 ($\text{OCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{O}$), 111.63 ($\underline{\text{C}}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 114.25 ($\underline{\text{CH}_2}=\text{CH}$), 138.78 ($\text{CH}_2=\underline{\text{CH}}$).

IR (Film) : 3080 (w, v CH olefin.), 3010-2810 (vs, v CH aliph.), 1640 (m, v C=C), 1470 (s, δ CH aliph.), 1250-1090 (v C-O-C), 910 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1740, 1720 (m, v C=O, Verunreinigung durch Edukt), 1370 (m, br), 950 (m), 725 (w) cm^{-1} .

9.4.6 4-(2-Methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-diol **35**

1.42 g (10 mmol) Dioxolan **33** wurden mit 1.62 g (12 mmol) 4-Methyl-morpholin-4-oxid Monohydrat in 50 ml *tert.*-Butanol gelöst und mit 15 ml 0.2%iger wässriger Osmiumtetroxidlösung übers Wochenende bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 25 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung und 200 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Erhalten wurden 790 mg (45%) einer gelblichen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:*i*-Propanol = 15:1) = 0.22; (R_f = 0.03 Verunreinigung)

GC(11): R_t = 39.0 min (>99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.33 (s, 3 H, CH_3), 1.52-1.58 (m, 2 H, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{CH}$), 1.71-1.90 (m, 2 H, $\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CH}$), 3.15 (s, br., 2 H, OH), 3.42-3.63 (m, 2 H, $\underline{\text{CH}_2}\text{OH}$), 3.66-3.72 (m, 1 H, $\underline{\text{CHOH}}$), 3.94-3.98 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 23.85 (CH_3), 27.55 ($\text{CH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{CH}$), 35.23 ($\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{CH}$), 64.76 ($\text{OCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{O}$), 66.89 (CH_2OH), 72.34 ($\underline{\text{CHOH}}$), 110.10 ($\underline{\text{C}}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$).

IR (Film) : 3600-3020 (vs, br, v OH), 3000-2830 (s, v CH aliphat.), 1050 (vs, br, v C-OH), weitere Banden bei : 1700 (m), 1650 (m, br), 1380 (m), 1220 (m, br), 1150 (w), 950 (m), 870 (s, br) cm^{-1} .

9.4.7 4-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-diol **36**

4.24 g (15 mmol) Dioxolan **34** wurden mit 2.5g (18.5 mmol) 4-Methyl-morpholin-4-oxid Monohydrat in 50 ml *tert.*-Butanol gelöst und mit 10 ml 0.2%iger wässriger Osmiumtetroxidlösung übers Wochenende bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit 100 ml gesättigter Natriumthiosulfatlösung und 200 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. Erhalten wurden 4.58 g (96%) eines farblosen Feststoffs. Die Umkristallisation aus 50 ml Hexan ergab 3.7 g (78%) eines farblosen Feststoffs.

R_f (Diethylether:*i*-Propanol = 15:1) = 0.47

GC(7): R_t = 19.1 min (83%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.90 (t, 3 H, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.28 (m, 18 H, CH₂-Kette), 1.53-1.63 (m, 4 H, C₁₀H₂₁CH₂CCH₂), 1.73-1.83 (m, 2 H, CH₂CH₂CH), 3.15 (s, br., 2 H, OH), 3.43-3.64 (m, 2 H, CH₂OH), 3.69 (m, 1 H, CHOH), 3.96 (s, 4 H, OCH₂CH₂O).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.13 (CH₃), 22.79-37.26 (CH₂-Kette), 38.94 (C₁₀H₂₁CH₂), 64.98 (CH₂OH), 66.70 (OCH₂CH₂O), 72.43 (CHOH), 111.88 (C(OCH₂CH₂O)).

IR (Film) : 3700-3030 (vs, br, v OH), 3000-2820 (vs, v CH aliphat.), 1465 (s, δ CH aliphat.), 1120-1010 (s, br, v C-OH), weitere Banden bei : 1710 (m), 1150 (m), 995 (w), 950 (w), 890 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.4.8 4-(2-Methyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-dioldiacetat **37**

754 mg (4.27 mmol) Diol **35** wurden zusammen mit einer Spatelspitze DMAP in 10 ml trockenem Ether und 2 ml Pyridin gelöst, mit 1.5 ml Essigsäureanhydrid versetzt und 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Aufgearbeitet wurde nach AAV 6 a. Erhalten wurden 970 mg (87%) einer leicht gelb gefärbten Flüssigkeit. Das Rohprodukt wurde direkt weiterverwendet.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.29

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.32 (s, 3 H, CH_3), 1.67-1.74 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.07 (2x s, 6 H, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 3.90-3.98 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.03-4.26 (m, 2 H, CH_2O), 5.09-5.11 (m, 1 H, CH-O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 20.85, 21.12 ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 23.99 (CH_3C), 25.38 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 34.70 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 64.83 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 65.12 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 71.58 (CH-O), 109.57 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 170.61, 170.81 (CO_2R).

IR (Film) : 3010-2820 (s, v CH aliph.), 1740 (vs, v C=O), 1450 (m, br, δ CH aliph.), 1320-1190 (vs, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1375 (s), 1105 (w, br), 1040 (s, br), 950 (m), 895 (w), 870 (m), 795 (w), 725 (w) cm^{-1} .

9.4.9 4-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-yl)-butan-1,2-dioldilaurat **38**

1.20 g (3.79 mmol) Diol **36** wurden in 10 ml Pyridin gelöst und unter Eisbadkühlung mit 1.9 ml (8.0 mmol) Laurinsäurechlorid versetzt. Es wurde 3 Stunden nachgerührt und gemäß AAV 6a aufgearbeitet. Das isolierte Rohprodukt wurde aus Essigester umkristallisiert (-30°C). Erhalten wurden 2.22g (86%) einer bei Raumtemperatur farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.64

GC(7): R_t = 35.3 min (80%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.92 (t, 9 H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.30 (m, 50 H, CH_2 -Kette), 1.58-1.70 (m, 10 H, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2$, 2x $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 2.33 (t, 4 H, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 3.95 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.05-4.30 (m, 2 H, CH_2O), 5.05 (m, 1 H, CH-O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.21 (CH_3), 22.81-37.40 (CH_2 -Kette), 64.97 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 65.09 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 71.40 (CH-O), 111.38 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 173.39, 173.61 (CO_2R).

IR (Film) : 3000-2820 (s, v CH aliph.), 1740 (s, v C=O), 1460 (m, δ CH aliph.), 1320-1130 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1380 (w), 1110 (m), 1075 (m), 950 (w), 900 (w, br), 725 (m) cm^{-1} .

9.4.10 1,2-Diacetoxy-hexan-5-on **39**

100 mg (0.34 mmol) Dioxolan **37** wurden in 5 ml trockenem Aceton gelöst und mit 0.3 ml Trifluoressigsäure nach AAV 7 30 Minuten bei 40-50 °C umgesetzt. Der Ansatz wurde aufgrund der guten Löslichkeit des Produktes in Wasser nicht wässrig aufgearbeitet. Statt dessen wurden die flüchtigen Bestandteile zunächst am Rotationsverdampfer und zuletzt im Ölpumpenvakuum entfernt. Es verblieben 71 mg (97%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.15

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.81-1.93 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.05, 2.06 (2x s, 6 H, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 2.50 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz), 4.02-4.23 (m, 2 H, CH_2O), 5.03-5.06 (m, 1 H, CH-O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 20.80, 21.04 ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 24.82 ($\text{CH}_3\text{C=O}$), 29.98 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 39.16 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 64.96 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 70.93 (CH-O), 170.62, 170.73 (CO_2R), 207.18 (C=O).

IR (Film) : 3010-2820 (s, v CH aliph.), 1730 (vs, br, v C=O), 1310-1190 (vs, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1435 (m, br), 1360 (vs), 1160 (s), 1120 (w), 1040, 1010 (s), 950 (m, br) cm^{-1} .

9.4.11 Hexadecan-5-on-1,2-dioldilaurat **40**

681 mg (1 mmol) Dioxolan **38** wurden in 6 ml trockenem Aceton gelöst und mit 0.4 ml Trifluoressigsäure nach AAV 7 umgesetzt (60 Minuten bei 40-50 °C) und aufgearbeitet. Das isolierte Rohprodukt wurde zweimal aus Essigester/Methylenchlorid umkristallisiert. Erhalten wurden 510 mg (80%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 40 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.74

GC(7): $R_t = 32.8$ min (98%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 9 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.29 (m, 48 H, CH_2 -Kette), 1.59-1.64 (m, 6 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\underline{\text{CH}_2}$), 1.80-1.95 (m, 2 H, $\text{CHCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{C=O}$), 2.32 (t, 4 H, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\underline{\text{CH}_2}\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 2.41 (t, 2 H, $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\underline{\text{CH}_2}\text{C=O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.4$ Hz), 2.48 (t, 2 H, $\text{CHCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{C=O}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 4.07-4.23 (m, 2 H, CH_2O), 5.05 (m, 1 H, CH-O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20 (CH_3), 22.80-34.52 (CH_2 -Kette), 38.23, ($\text{CHCH}_2\underline{\text{CH}_2}\text{C=O}$), 43.05 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\underline{\text{CH}_2}\text{C=O}$), 64.85 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 70.78 (CH-O), 173.39, 173.52 ($\underline{\text{CO}_2\text{R}}$), 209.61 (C=O).

IR (Film) : 2990-2810 (s, v CH aliph.), 1740 (s, v C=O), 1465 (s, δ CH aliph.), 1300-1190 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1420 (w), 1380 (m), 1110 (m), 725 (m) cm^{-1} .

9.5 Synthese di-carba-analoger Triglyceride modifiziert in den *sn*-1,2(2,3) Positionen

9.5.1 (*S*)- α -Acryloxy-milchsäureethylester **41**

Eine Lösung von 40.8 g (350 mmol) (*S*)-Milchsäureethylester in 500 ml trockenem Methylenchlorid wurde auf 0 °C gekühlt und mit 45.5 g (450 mmol) Triethylamin versetzt. 22.7 ml (350 mmol) Acrylsäurechlorid in 140 ml trockenem Methylenchlorid wurden innerhalb von 2 Stunden zugetropft. Es wurde weitere 4.5 Stunden bei 0 °C gerührt und nach Zugabe von 200 ml Ether nacheinander mit verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. Der Rückstand wurde im Kugelrohrföfen destilliert. Erhalten wurden 34.5 g (57 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.: 54 °C /0.2 mbar

R_f (Ether:Pentan = 3:2) = 0.60

IR (Film) : 3100 (w, v CH olefin.), 3020-2800 (s, v CH aliph.), 1760-1710 (vs, v C=O), 1610 (s, v C=C), 1450 (s, δ CH aliph.), 1320-1100 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1400 (s), 980 (s), 855 (m), 805 (s), 750 (m), 650 (m) cm^{-1} .

9.5.2 (*R*)- α -Acryloxy- β,β -dimethyl- γ -butyrolacton **42**

6.5 g (50 mmol) (*R*)-Pantolacton wurden unter Argon in 60 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und mit 10.5 ml (75 mmol) trockenem Triethylamin versetzt. Bei -30 °C wurden innerhalb von 30 Minuten 5.1 ml (63 mmol) Acrylsäurechlorid zugetropft. Nach 2.5 Stunden wurde auf RT erwärmt, mit 100 ml Ether verdünnt und nacheinander mit verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel im Vakuum befreit. Der Rückstand wurde im Kugelrohrföfen destilliert. Erhalten wurden 6.63 g (72 %) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.: 80-90 °C /0.01 mbar

R_f (Ether:Pentan = 3:2) = 0.37

GC(2): R_t = 6.0 min (94%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 1.15, 1.25 (2x s, 6 H, CH₃CCH₃), 4.08 (m, 2 H, CH₂-O), 5.45 (s, 2 H, CH-O), 5.97-6.57 (m, 3 H, CH₂=CH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 20.00, 23.18 (CH₃CCH₃), 40.47 (CH₃CCH₃), 75.29 (CH₂-O), 76.38 (CH-O), 127.21 (CH₂=C), 132.87 (CH₂=C), 164.94, 172.37, (CO₂R).

IR (Film) : 2990-2820 (s, v CH aliph.), 1785, 1730 (vs, v C=O), 1615 (m, v C=C), 1460 (m, δ CH aliph.), 1300-1100 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1400 (s), 1370 (m), 995 (s), 915 (w), 875 (w), 800 (s), 710 (w) cm⁻¹.

9.5.3 9-Hydroxy-hexadecan-8-on **43**

13.8g (0.60 mol) Natrium wurden in 450 ml trockenem Xylol bei 125 °C emulgiert. Bei einer Temperatur von 110°C wurden 80 ml (0.86 mol) Trimethylsilylchlorid zugegeben und anschließend 51.7 g (0.30 mol) Caprylsäureethylester zugetropft. Die Temperatur wurde drei Stunden auf 130 °C erhöht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 4ml Methanol zur Beseitigung von Natriumrückständen zugetropft. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in einem Liter Hexan aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt sowie mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde mit 150 ml Ameisensäure und 40 ml Wasser sowie 20 ml konzentrierter Salzsäure über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde mit 800 ml Hexan extrahiert und nacheinander mit 300 ml Wasser und 300 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus 150 ml Hexan umkristallisiert (-30 °C). Erhalten wurden 25.9 g (67%) des Acyloins als leicht gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 58°C.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.35

GC(2): R_t = 14.3 min (82%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.90 (t, 6 H, CH₃, ³J_(HH) = 6.9 Hz), 1.31-1.86 (m, 22 H, CH₂-Kette), 2.47 (m, 2 H, CH₂C=O), 3.51 (s, br., 1 H, OH), 4.18 (m, 1 H, CH-O).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.12, 14.13 (CH₃), 22.69-31.88 (10 Signale CH₂-Kette), 33.91 (CH₂CHOH), 37.98 (CH₂C=O), 76.54 (CHOH), 212.61 (C=O).

IR (Film) : 3640-3200 (w, br, v OH), 2980-2820 (s, v CH aliph.), 1715 (s, v C=O), 1450 (m, δ CH aliph.), 1170 (s, v C-OH), weitere Banden bei : 1370 (w), 940 (w), 720 (m) cm⁻¹.

9.5.4 13-Hydroxy-tetracosan-12-on **44**

13.8g (0.60 mol) Natrium wurden in 550 ml trockenem Xylol bei 125 °C emulgiert. Bei einer Temperatur von 110°C wurden 80 ml (0.86 mol) Trimethylsilylchlorid zugegeben und anschließend 64.3 g (0.30 mol) Laurinsäuremethylester zugetropft. Die Temperatur wurde drei Stunden auf 130 °C erhöht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 4 ml Methanol zur Beseitigung von Natriumrückständen zugetropft. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 400 ml Hexan und 400 ml Diethylether aufgenommen und mit verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt sowie mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde im Vakuum eingeeengt. Der Rückstand wurde mit 150 ml Ameisensäure und 40 ml Wasser sowie 20 ml konzentrierter Salzsäure über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde mit 400 ml Hexan und 400 ml Diethylether extrahiert und nacheinander mit 300 ml Wasser und 300 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus 200 ml Hexan umkristallisiert. Erhalten wurden 40.9 g (74%) des Acyloins als leicht gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 61 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.69

GC(7): R_t = 21.7 min (88%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})}$ = 6.9 Hz), 1.31-1.86 (m, 22 H, CH_2 -Kette), 2.47 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.51 (s, br., 1 H, OH), 4.18 (m, 1 H, CH-O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20 (CH_3), 22.80-32.04 (CH_2 -Kette), 33.92 (CH_2CHOH), 38.01 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 76.54 (CHOH), 212.64 (C=O).

IR (Film) : 3580-3120 (br, v OH), 2960-2840 (s, v CH aliph.), 1710 (s, v C=O), 1460 (s, δ CH aliph.), weitere Banden bei : 1400 (w), 1380 (w), 1100 (m), 905 (w), 720 (m) cm^{-1} .

9.5.5 Hexadecan-8,9-dion **45**

25.9 g (0.1 mol) Acyloin **43** wurden mit 150 ml Eisessig und 27.0 g (58 mmol) Bismut(III)oxid versetzt und vier Stunden bei 140 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 400 ml Wasser zugesetzt und das Produkt mit 600 ml Ether extrahiert. Die organische Phase wurde nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert (-30 °C). Erhalten wurden 16.6 g (64%) eines gelben Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 50 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.83

GC(2): R_t = 14.6 min (99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})}$ = 6.7 Hz), 1.30 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.59 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.74 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$, $^3J_{(\text{HH})}$ = 7.4 Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.10 (CH_3), 22.68, 23.23, 29.09, 29.23, 31.74 (CH_2 -Kette), 36.18 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 200.28 (C=O).

IR (Film) : 2980-2820 (s, v CH aliph.), 1705 (s, v C=O), 1455 (m, δ CH aliph.), weitere Banden bei : 1405 (m), 1370 (w), 1260 (w), 910 (w), 710 (m) cm^{-1} .

9.5.6 Tetracosan-12,13-dion **46**

a) Acyloinesterkondensation

36.9 g (0.1 mol) Acyloin **44** wurden mit 150 ml Eisessig und 27.0 g (58 mmol) Bismut(III)oxid versetzt und vier Stunden bei 140 °C gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 400 ml Wasser zugesetzt und das Produkt mit 400 ml Hexan und 200 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde nacheinander mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand aus Hexan umkristallisiert. Erhalten wurden 24.9 g (67%) eines gelben Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 74 °C.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.86

GC(2): R_t = 26.9 min (93%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.91 (t, 6 H, CH₃, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.29 (m, 32 H, CH₂-Kette), 1.61 (m, 4 H, CH₂CH₂C=O), 2.75 (t, 4 H, CH₂C=O, ³J_(HH) = 7.4 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.20 (CH₃), 22.80-32.04 (CH₂-Kette), 36.23 (CH₂C=O), 200.35 (C=O).

IR (Film) : 2960-2840 (s, v CH aliph.), 1705 (s, v C=O), 1460 (s, δ CH aliph.), weitere Banden bei : 1405 (m), 1370 (m), 1290 (w), 910 (m), 715 (s) cm⁻¹.

b) Umsetzung von Lauroylchlorid mit SmI₂

(0.5 mmol) Lauroylchlorid wurde unter Argon in 5 ml trockenem THF gelöst. Bei 0°C wurden 0.5 mmol SmI₂, gelöst in THF zugetropft. Nach 30 Minuten wurde Diethylether zugefügt und die Lösung mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel mit Diethylether als Eluent filtriert. Quantitative Rohausbeute.

R_f (Ether : Pentan = 1 : 1) = 0.59

GC(5): R_t = 14.5 min (94%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.92 (t, 3 H), 1.30 (m, 14 H, CH₂-Kette), 1.64 (m, 2 H), 1.75-1.82 (m, 2 H), 1.90-1.96 (m, 2 H), 2.33 (t, 2 H), 3.25 (t, 2 H), 4.14 (t, 2 H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 5.83, 14.14 (CH_3), 22.81-34.47 (CH_2 -Kette), 63.10 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 173.93 (CO_2R).

Aus den NMR-Spektren ist zu schließen, daß kein Diketon entstanden ist. Offensichtlich hat statt dessen das Säurechlorid mit dem Lösungsmittel THF unter Bildung von Laurinsäure-4-chlorbutylester reagiert, da nur so die Summe von 29 Protonen sowie die vier Triplets im ^1H -NMR zu erklären sind. Die Signale bei 63.10 und 173.93 ppm im $\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrums entsprechen der Estergruppe.

9.5.7 2,3-Diheptyl-buta-1,3-dien **47**

35.7 g (100 mmol) Triphenylmethylphosphoniumbromid wurden unter Argon in 130 ml Hexan suspendiert und mit 65 ml *n*-Butyllithiumlösung (15% in Hexan) versetzt. Nach 30 Minuten wurde 50 ml trockenes Dimethylsulfoxid zugefügt und 10 Minuten auf 50-60 °C erwärmt. Nach 20 Minuten wurden 16.2 g (24.4 mmol) Diketon **45**, gelöst in 20 ml Hexan zugefügt. Es wurde über Nacht nachgerührt, 100 ml Hexan zugegeben und nacheinander mit stark verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm) mit Hexan als Eluent gereinigt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Erhalten wurden 2.0 g (33%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Hexan) = 0.59

GC(1): R_t = 11.2 min (86%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.94 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.9$ Hz), 1.33 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.49 (m, 4 H, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.27 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz), 4.81, 5.09 (2x s, 4 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20 (CH_3), 22.81, 28.85, 29.35, 29.65, 32.02, 34.48 (CH_2 -Kette), 111.34 ($\underline{\text{CH}_2}\text{C}=\text{C}$), 148.34 ($\text{CH}_2\text{C}=\underline{\text{C}}$).

IR (Film) : 3095 (w, v CH olefin.), 2090-2820 (vs, v CH aliph.), 1600 (m, v C=C), 1445 (s, δ CH aliph.), 890 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1585 (w), 1365 (w), 715 (m) cm^{-1} .

9.5.8 2,3-Diundecyl-buta-1,3-dien **48**a) CH_2PPh_3 / DME / -78°C

5.07 g (14.2 mmol) Triphenylmethylphosphoniumbromid wurden unter Argon in 50 ml trockenem THF suspendiert und bei -78°C mit 9 ml *n*-Butyllithium (15% in Hexan) versetzt. Nach 40 Minuten wurde auf 40°C erwärmt, 90 Minuten nachgerührt und dann erneut auf -78°C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde eine Lösung von 1.24 g (3.38 mmol) Diketon **46** in 10 ml trockenem THF zugetropft. Es wurde eine Stunde bei -78°C und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit Ether/Wasser ausgeschüttelt und die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie über Kieselgel mit Hexan als Eluent gereinigt. Erhalten wurden 393 mg (32%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 27°C .

 R_f (Hexan) = 0.62GC(2): R_t = 26.1 min (94%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.93 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.32 (m, 32 H, CH_2 -Kette), 1.48 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.27 (t, 4 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 4.95, 5.09 (2x s, 4 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.22 (CH_3), 22.80-34.48 (CH_2 -Kette), 111.34 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 148.35 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$).

IR (Film) : 3090 (w, v CH olefin.), 3050-2700 (s, v CH aliph.), 1585 (w, v C=C), 1470 (s, δ CH aliph.), 890 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1380 (w), 725 (w) cm^{-1} .

b) CH_2I_2 / Zn

Unter Ar wurden 3.27g (50mmol) Zinkstaub in 50 ml trockenem THF vorgelegt und mit 940 mg 1,2-Dibromethan (5mmol) sowie 270 mg (2.5 mmol) TMS versetzt (Aktivierung). Nach 30 Minuten wurde eine Lösung von 1.833 g (5 mmol) Diketon **46** und 5.36 g (20 mmol) Methylendiiodid in 10 ml trockenem THF zugegeben. Dann wurden 1.9 g (10 mmol) Titan-tetrachlorid zugefügt. Nach 10 Stunden wurden 100 ml Ether zugesetzt. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert. Das Filtrat wurde mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und

gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde wie bei a) chromatographisch gereinigt.

Erhalten wurden 393 mg (32%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 26 °C.

R_f (Hexan) = 0.62

GC(2): R_t = 26.1 min (90%)

NMR- und IR Daten wie a)

c) CH_2PPh_3 / Hexan / DMSO

50.7 g (142 mmol) Triphenylmethylphosphoniumbromid wurden unter Argon in 400 ml Hexan suspendiert und mit 90 ml *n*-Butyllithiumlösung (15% in Hexan) versetzt und 40 Minuten gerührt. 80 ml trockenes Dimethylsulfoxid wurden zugefügt. Nach einstündigem Rühren bei RT wurden innerhalb von 10 Minuten portionsweise 12.4 g (33.8 mmol) Diketon **46** hinzugegeben. Nach vier Stunden wurden 600 ml Hexan zugefügt. Gewaschen wurde mit 300 ml Wasser und 300 ml gesättigter NaCl-Lösung. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde wie bei a) durch Chromatographie über Kieselgel gereinigt. Erhalten wurden 5.71 g (46.5%) eines farblosen Feststoffs.

Schmp.: 27 °C

R_f (Hexan) = 0.62

GC(2): R_t = 26.1 min (93%)

NMR- und IR Daten wie a)

9.5.9 3,4-Dimethyl-cyclohex-3-en-yl-carbonsäureethylester **49**

Unter Argon wurden 7.0 g (70 mmol) Acrylsäureethylester und 7.0 g (85 mmol) Dimethylbutadien in 50 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und die Mischung auf 0 °C abgekühlt. 0.5 ml Titan-tetrachlorid wurden zugetropft, worauf rasch eine Gelbrotfärbung eintrat. Nach 3 Stunden Rühren bei 0 °C wurde auf RT erwärmt und 1.5 g Natriumhydrogencarbonat zugesetzt und langsam portionsweise 1 ml Wasser zugefügt. Nach 30 Minuten Rühren bei RT wurden 100 ml Ether zugefügt, filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde im Kugelrohrföfen destilliert. Erhalten wurden 3.0 g (24%) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.: 110 °C/16 mbar

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 3) = 0.63

GC(6): R_t = 8.1 min (96%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 1.28 (t, 3 H, CH₃CH₂, ³J_(HH) = 7.1 Hz), 1.61-2.27 (m, 12 H, CH₃C=CCH₃, CH₂CHCH₂CH₂), 2.53 (m, 1 H, CH), 4.16 (q, 2 H, CH₂-O, ³J_(HH) = 7.1 Hz).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.38 (CH₃CH₂), 18.94, 19.08 (CH₃C=CCH₃), 26.01 (CHCH₂CH₂), 31.17 (CHCH₂CH₂), 33.90 (CHCH₂C=C), 40.41 (CH), 60.26 (CH₂-O), 124.09, 125.37 (C=C), 176.12 (CO₂R).

9.5.10 (*S*)-3,4-Dimethyl-cyclohex-3-en-yl-(*R*)-α-carboxy-β,β-dimethyl-γ-butyrolacton **50**

3.68 g (20 mmol) (*R*)-Acrylsäure-β,β-dimethyl-γ-butyrolacton **42** und 2.47 g (30 mmol) Dimethylbutadien wurden in 30 ml trockenem Methylenchlorid unter Argon auf - 10 °C gekühlt. Es wurden 0.5 ml Titan-tetrachlorid zugetropft und über Nacht auf RT gerührt. Es wurden 1.5 g Natriumhydrogencarbonat zugesetzt und langsam Portionsweise 1 ml Wasser zugefügt und bis zur Entfärbung gerührt (2 Stunden). 100 ml Ether wurden zugefügt, dann filtriert und das Filtrat mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; Ether:Pentan = 1:2 → Ether) gereinigt. Das hierbei gewonnene Rohprodukt wurde aus Hexan umkristallisiert (Kristallisation erfolgte sehr langsam). Erhalten wurden 3.2 g (60%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 58°C. Die absolute Konfiguration von **50** konnte durch Röntgenstrukturanalyse nicht bestimmt werden.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.49

GC(2): R_t = 16.7 min (89%)

[α]_D = -55 ° (c = 2.7, Hexan)

[α]₃₆₅ = -195 ° (c = 2.7, Hexan)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 1.13, 1.22 (2x s, 6 H, CH₃CCH₃), 1.64, 1.65 (2x s, 6 H, CH₃C=CCH₃), 1.75-1.83 (m, 1 H, 2.53 CHCH₂CH₂), 2.04 (m, 3 H, CHCH₂CH₂), 2.22-2.29

(m, 2 H, CHCH₂C=C), 2.70-2.78 (m, 1 H, CHCH₂CH₂), 4.06 (m, 2 H, CH₂-O), 5.40 (s, 1 H, CH-O).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 18.96, 19.10 (CH₃C=CCH₃), 19.99 (CH₃-C-CH₃), 23.22, 25.78 (CH₃-C-CH₃), 30.71 (CHCH₂CH₂), 33.81 (CHCH₂CH₂), 40.13, 40.34 (CHCH₂C=C), 74.78 (CH₂-O), 76.32 (CH-O), 123.65, 125.74 (C=C), 172.60, 176.80 (CO₂R).

IR (KBr) : 3040-2880 (m, v CH aliph.), 1810, 1775 (vs, v C=O), 1170 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1490 (m), 1410 (m), 1340 (m), 1260 (m), 1110 (m), 1040 (m), 1020 (m), 855 (w), 740 (w), 675 (w) cm⁻¹.

9.5.11 (*S*)-3,4-Diundecyl-cyclohex-3-en-yl-(*R*)-α-carboxy-β,β-dimethyl-γ-butyrolacton **51**

5.71 g (15.74 mmol) Butadien **48** wurden mit 3.68 (20 mmol) (*R*)-α-Acryloxy-β,β-dimethyl-γ-butyrolacton **42** unter Argon in 40 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und bei -10 °C mit 0.6 ml Titanatetrachlorid versetzt. Über Nacht wurde bei Raumtemperatur gerührt und dann portionsweise 2.5 g Natriumhydrogencarbonat sowie 6 ml Wasser vorsichtig zugegeben. Nach drei Stunden wurde das Produkt mit Diethylether extrahiert mit Wasser und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel (Eluent: Hexan : Diethylether = 10:1 bis 2:1) chromatographiert. Erhalten wurden 4.79 g (55.6%) eines gelben Öls.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.33

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.92 (t, 6 H, CH₃CH₂, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.15, 1.24 (2x s, 6 H, CH₃CCH₃), 1.31 (m, 36 H, CH₂-Kette), 1.76 (m, 1 H, CHCH₂CH₂), 1.99-2.09 (m, 7 H, 3x CH₂C=C, CHCH₂CH₂), 2.25 (m, 2 H, CHCH₂C=C), 4.09 (m, 2 H, CH₂-O), 5.41 (m, 1 H, CH-O).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.23 (CH₃CH₂), 20.05-33.17 (CH₂-Kette, CH₃-C-CH₃, CH₃-C-CH₃), 40.20, 40.34 (CHCH₂-C=C), 74.78, 74.80 (CH₂-O), 76.33 (CH-O), 128.38, 130.44 (C=C), 172.56, 175.00 (CO₂R).

IR (Film) : 3000-2820 (s, v CH aliphat.), 1795, 1750 (s, v C=O), 1470 (s, δ CH aliphat.), 1300-1070 (v C-O-C), weitere Banden bei : 1400 (w), 1380 (m), 1035, 1020, 1000, 725 cm^{-1} .

9.5.12 (*R*)-3,4-Diundecyl-cyclohex-3-en-yl-carbonsäure-1-(*S*)-ethoxycarbonyl-ethylester **52**

5.0 g (13.8 mmol) Dien **48** und 3.6 g (20.7 mmol) Acrylsäureester **41** wurden in 40 ml trockenem Methylenchlorid gelöst und auf 0 °C gekühlt. 0.5 ml Titan-tetrachlorid wurden zugegeben. Nach dem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurden 2.5 g Natriumhydrogencarbonat und 5 ml Wasser vorsichtig portionsweise zugegeben. Es wurde noch 45 Minuten nachgerührt und das Produkt daraufhin mit Diethylether extrahiert und mit Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde zweimal über Kieselgel (40x2 cm; Hexan : Diethylether = 10:1) chromatographiert. Erhalten wurden 1.5 g (20%) eines gelben Öls. Hier ist eine Optimierung dringend nötig !

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.27

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.92 (t, 6 H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.30 (m, 39 H, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 1.52 (d, 3 H, CH_3CH , $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 1.60-2.40 (m, 1 H, 4x $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, CHCH_2CH_2), 2.65 (m, 1 H, CHCO_2R), 4.23 (m, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O}$), 5.12 (m, 1 H, CH-O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.22 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$), 17.04 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O}$), 22.82-33.15 (CH_2 -Kette, CH_3CH), 40.15 (CHCO_2R), 61.35 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 79.16 (CH-O), 128.63, 130.15 ($\text{C}=\text{C}$), 171.07, 175.60 (CO_2R).

IR (Film) : 3010-2810 (vs, v CH aliphat.), 1740 (s, v C=O), 1455 (s, δ CH aliphat.), 1330-1080 (v C-O-C), weitere Banden bei : 1380 (m), 1350 (w), 1050 (m), 1020 (w), 860 (w), 725 (w) cm^{-1} .

9.5.13 (\pm)-3,4-Dimethyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (\pm)-**53**

3.5 g (19.2 mmol) **49** wurden in 50 ml Ether gelöst, mit 950 mg (25 mmol) Lithiumaluminiumhydrid versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Suspension wurde

vorsichtig in eine Mischung aus 150 ml verdünnter Salzsäure und 100 g Eis gegeben. Es wurde zweimal mit Hexan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; Ether:Hexan = 3:2) gereinigt. Erhalten wurden 1.8 g (65%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.39

GC(12): R_t = 24.4 min (50%), 26.5 min (50%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.25 (m, 1 H, CH), 1.64 (2x s, 6 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CCH}_3$), 1.72-1.84 (m, 4 H, CHCH_2CH_2), 1.95-2.05 (m, 3 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$, OH), 3.54 (m, 2 H, CH_2OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 19.02, 19.24 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{CCH}_3$), 26.16 (CHCH_2CH_2), 31.38 (CHCH_2CH_2), 34.86 ($\text{CHCH}_2\text{-C}=\text{C}$), 37.34 (CH), 68.03 (CH_2OH), 124.50, 125.75 ($\text{C}=\text{C}$).

IR (Film) : 3650-3050 (s, br, v OH), 3000-2800 (s, v CH aliph.), 1445 (m, δ CH aliph.), 1055 (v C-OH), weitere Banden bei : 1380 (m), 1260 (w), 1230 (w), 1295 (w), 1195 (w), 1045, 1020, 995, 945 (w) cm^{-1} .

9.5.14 (*S*)-3,4-Dimethyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (*S*)-**53**

732 mg (2.75 mmol) **50** wurden unter Argon in 30 ml trockenem Ether gelöst, portionsweise mit 420 mg (11.07 mmol) Lithiumaluminiumhydrid versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Überschüssiges Lithiumaluminiumhydrid wurde durch Zugabe von etwas Ethanol vernichtet. Der Ansatz wurde in 100 ml Hexan und 100 ml verdünnte Salzsäure gegeben und 10 Minuten gerührt. Es wurde 2x mit 50 ml Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel am Rotationsverdampfer befreit. Erhalten wurden 385 mg (100%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.39

GC(12): R_t = 26.5 min (>99%)

$[\alpha]_D = -121^\circ$ (c = 2.4, Hexan)

$[\alpha]_{365} = -412^\circ$ (c = 2.4, Hexan)

IR, ^1H - und ^{13}C -NMR siehe (\pm)-**53**.

9.5.15 (*S*)-3,4-Diundecyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (*S*)-**54**

4.4 g (8.1 mmol) **51** wurden in 80 ml Ether gelöst, mit 550 mg (14.5 mmol) Lithiumaluminiumhydrid versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Vorsichtig wurden 1 ml Methanol und dann 1 ml Wasser zugefügt. Mit 100 ml Ether wurde extrahiert und die organische Phase nacheinander mit verdünnter Salzsäure, mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Magnesiumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; Ether:Hexan = 1:5 \rightarrow 1:1) gereinigt. Das Rohprodukt wurde aus Methanol/Ether bei - 30 °C umkristallisiert. Beim Erwärmen auf Raumtemperatur wurde der Feststoff flüssig. Erhalten wurden 2.8 g (82%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.27

GC(1): R_t = 30.2 min (>99%)

$[\alpha]_D = - 8.0^\circ$ (c = 3.4, Hexan)

$[\alpha]_{365} = - 34.2^\circ$ (c = 3.4, Hexan)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.92 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.31 (m, 37 H, CH_2 -Kette, CH), 1.78 (m, 3 H, CHCH_2CH_2 , OH), 1.99-2.05 (m, 8 H, 4x $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 3.56 (m, 2 H, CH_2OH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.23 (CH_3), 22.83-33.33 (CH_2 -Kette), 37.34 (CH), 68.19 (CH_2OH), 129.19, 130.45 ($\text{C}=\text{C}$).

IR (Film) : 3550-3100 (s, br, v OH), 2980-2850 (vs, v CH aliph.), 1460 (m, δ CH aliph.), 1045 (v C-OH), weitere Banden bei : 1380 (w), 720 (w) cm^{-1} .

9.5.16 (*R*)-3,4-Diundecyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-en (*R*)-**54**

1.2 g (2.24 mmol) **52** wurden in 40 ml Ether gelöst, mit 200 mg (5.3 mmol) Lithiumaluminiumhydrid versetzt und entsprechend 9.5.15 aufgearbeitet. Erhalten wurden 715 mg (76%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.27

GC(1): R_t = 30.2 min (89%)

$[\alpha]_D = + 1.5^\circ$ (c = 3.4, Hexan)

$[\alpha]_{365} = + 7.7^\circ$ (c = 3.4, Hexan)

IR, ^1H - und ^{13}C -NMR siehe (S)-**54**.

9.5.17 (\pm)-3,4-Dimethyl-1-acetoxymethyl-cyclohex-3-en (\pm)-**55**

1.65 g (1.77 mmol) (\pm)-**53** wurden in 10 ml Pyridin gelöst und mit 5 ml Essigsäureanhydrid 2.5 Stunden bei RT gerührt und entsprechend AAV 8 aufgearbeitet. Erhalten wurden 1.61 g (75%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.57

GC(4): R_t = 8.3 min (96%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.26-1.32 (m, 1 H, CH), 1.63 (s, 6 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CCH}_3$), 1.75 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2=\text{C}$), 1.90-2.06 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2$), 2.07 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 3.97 (d, 2 H, CH_2O , $^3J_{(\text{HH})} = 6.5$ Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 18.92, 19.19 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{C}=\text{C}\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 21.01 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}_2\text{R}$), 26.21 ($\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$), 31.10, 33.96 ($\underline{\text{C}}\text{HCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 34.84 ($\text{CH}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{C}$), 68.98 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 124.16, 125.66 ($\underline{\text{C}}=\underline{\text{C}}$), 171.28 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{R}$).

IR (Film) : 3020-2800 (s, v CH aliph.), 1745 (vs, br, v C=O), 1445 (s, δ CH aliph.), 1300-1200 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1355 (m), 1055, 1045 (s), 970 (m), 915 (w), 870 (w), 835 (w), 810 (w), 705 (w) cm^{-1} .

9.5.18 (S)-3,4-Dimethyl-1-acetoxymethyl-cyclohex-3-en (S)-**55**

375 mg (2.67 mmol) (S)-**53** wurden in 10 ml Pyridin gelöst, mit 5 ml Essigsäureanhydrid 2.5 Stunden bei RT 20 Minuten bei 50 °C gerührt und entsprechend AAV 8 aufgearbeitet. Erhalten wurden 400 mg (82%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 2) = 0.57

GC(4): R_t = 8.2 min (98%)

$[\alpha]_D = -93.6^\circ$ ($c = 2.5$, Hexan)

$[\alpha]_{365} = -312^\circ$ ($c = 2.5$, Hexan)

IR, ^1H - und ^{13}C -NMR siehe (\pm)-**55**.

9.5.19 (\pm)-4-Acetoxymethyl-octa-2,7-dion (\pm)-**56**

Zu 4.71 g (22.0 mmol) Natriummetaperiodat gelöst in 45 ml Wasser und 35 ml Acetonitril wurde eine Lösung von 1.61g (8.8 mmol) (\pm)-**55** in 35 ml Tetrachlorkohlenstoff zugefügt und unter Eisbadkühlung mit 130 mg Rutheniumtrichloridhydrat zur Reaktion gebracht. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß AAV 9. Erhalten wurden 1.34g mg (71%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether) = 0.27

GC(4): $R_t = 13.7$ min (~97%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.59$ (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2=\text{O}$), 2.02 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 2.13, 2.14 (2x s, 6 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 2.24 (m, 1 H, CH), 2.36-2.54 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.90-4.04 (m, 2 H, CH_2O).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 20.89$ ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 25.28 (CHCH_2CH_2), 29.95, 30.44 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 33.02 (CH), 41.09 (CHCH_2CH_2), 45.85 ($\text{CHCH}_2\text{C}=\text{O}$), 66.35 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 170.98 (CO_2R), 207.27, 208.08 (C=O).

IR (Film) : 3080-2850 (m, v CH aliph.), 1720 (vs, v C=O), 1280-1190 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei :1400 (m, br), 1350 (s), 1150 (m), 1020 (s), 950 (w, br), 725 (w, br) cm^{-1} .

9.5.20 (*S*)- 4-Acetoxymethyl-octa-2,7-dion (*S*)-**56**

Zu 1.07 g (5.0 mmol) Natriummetaperiodat gelöst in 15 ml Wasser und 10 ml Acetonitril wurde eine Lösung von 365 mg (2.0 mmol) (*S*)-**55** in 10 ml Tetrachlorkohlenstoff zugefügt und unter Eisbadkühlung mit 30 mg Rutheniumtrichloridhydrat zur Reaktion gebracht. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß AAV 9. Erhalten wurden 378 mg (88%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether) = 0.27

GC(4): $R_t = 13.7$ min (94%)

$[\alpha]_D = -5.5^\circ$ ($c = 2.5$, CH_2Cl_2)

$[\alpha]_{365} = -16.0^\circ$ ($c = 2.5$, CH_2Cl_2)

IR, ^1H - und ^{13}C -NMR siehe (\pm)-**56**.

9.6 Synthese di-carba-analoger Triglyceride modifiziert in den *sn*-1,3 Positionen

9.6.1 **57**; Reaktion von Laevulinsäureethylester mit **15**

7.21 g (50 mmol) Laevulinsäureethylester wurden mit 12.4 g (60 mmol) Bistrimethylsilylglykol **15** und 45 Tr konz. Schwefelsäure 30 Minuten lang auf 70°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mit Ether/Hexan extrahiert und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Trocknen über Magnesiumsulfat, einengen im Vakuum und Destillation des Rückstandes im Kugelrohrföfen ergaben 7.1 g (75%) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.: $50^\circ\text{C}/0.01$ mbar

GC(2): $R_t=5.5$ min (94%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.24$ (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz), 1.31 (s, 3 H, CH_3C), 2.00-2.40 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 3.90-3.95 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.12 (q, 2 H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.31$ (CH_3CH_2), 24.16 ($\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 28.99 (CH_3C), 34.22 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 60.37 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 64.87 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 109.28 (CH_3C), 173.75 (CO_2R).

IR (Film) : 3010-2870 (s, v CH aliph.), 1735 (vs, v C=O), 1440 (w, δ CH aliph.), weitere Banden bei : 1380 (s), 1180 (m), 1135 (m), 1100 (m), 1050 (s), 950 (m), 910 (m) cm^{-1} .

9.6.2 **58**; Versuche zur Claisen Kondensation mit **57**

10 mmol **57** wurden unter Ar in 50 ml trockenem Lösungsmittel auf -78°C gekühlt. Nach Zugabe von 10 mmol Base wurde innerhalb 2 h auf Raumtemperatur erwärmt. 100 ml Ether wurden zugefügt und nacheinander mit verd. Salzsäure, ges. NaHCO_3 - und ges. NaCl-Lösung

gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt.

a) Lösungsmittel: Diethylether; Base: *n*-BuLi

b) Lösungsmittel: THF; Base: KH

c) Lösungsmittel: THF; Base: LDA

Bei a) und b) wurde nur das Edukt isoliert (GC). Bei c) wurde hingegen das entsprechende Diisopropylamid durch Substitution der Ethylesterbindung erhalten ($^1\text{H-NMR}$). Dies geht aus den Signalen bei $\delta = 1.17$ (d, 6 H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$, $^3\text{J}_{(\text{HH})} = 6.7$ Hz), 1.38 (d, 6 H, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$, $^3\text{J}_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 3.50 (sept, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$, $^3\text{J}_{(\text{HH})} = 6.7$ Hz), 3.97 (sept, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{CH}_3)_2$, $^3\text{J}_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz) hervor.

9.6.3 (2-Methylenpropyl)-essigsäureethylester **59**

Unter Argon wurden 35.7 g (100 mmol) Methyltriphenylphosphoniumbromid in 100 ml trockenem THF suspendiert und bei -78°C mit 40 ml (100 mmol) *n*-Butyllithium (15% in Hexan) versetzt. Es wurde 30 Minuten bei -78°C und 2.5 Stunden bei RT nachgerührt. Dann wurde erneut auf -78°C gekühlt, eine Lösung von 7.2 g (50 mmol) Laevulinsäureethylester in 20 ml trockenem THF zugetropft und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 24 Stunden wurden zunächst 5 ml Methanol und dann 300 ml Pentan zugefügt. Die unlöslichen Bestandteile wurden abfiltriert und das Filtrat zweimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vorsichtig im Vakuum eingengt (Badtemperatur RT). Der Rückstand wurde im Kugelrohrföfen destilliert. Erhalten wurden 5.5 g (78%) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.: $70\text{-}80^\circ\text{C}/16$ mbar

GC(3): $R_t = 1.6$ min (99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.27$ (t, 3 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$, $^3\text{J}_{(\text{HH})} = 7.2$ Hz), 1.76 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 2.35 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3\text{J}_{(\text{HH})} = 7.6$ Hz), 2.47 (m, 2 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 4.15 (q, 2 H, $\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$, $^3\text{J}_{(\text{HH})} = 7.2$ Hz), 4.71, 4.76 (2x s, 2 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.33$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$), 22.54 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{C}=\text{C}$), 32.79, 32.85 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$), 60.38 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 110.44 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{C}$), 144.24 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}$), 173.34 ($\underline{\text{C}}\text{O}_2\text{R}$).

IR (Film) : 3060 (w, v CH olefin.), 2980-2870 (s, v CH aliph.), 1730 (vs, v C=O), 1640 (m, v C=C), 1440 (δ CH aliph.), 1320-1130 (s, v C-O-C), 880 (δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1360 (s), 1340 (m), 1090 (m), 1045, 1020, 780 (w, br) cm^{-1} .

9.6.4 2,8-Dimethylnona-1,8-dien-5-on-4-carbonsäureethylester **60**

1.95 g (13.71 mmol) **59** wurden unter Argon innerhalb einer Minute zu einer Suspension von 7.50 mmol Kaliumhydrid (1.5 g 20-25%ig mit Pentan gewaschen) in 20 ml trockenem THF gegeben. Die Suspension färbt sich rasch gelb. Nach 10 Minuten wurden vorsichtig erst einige ml Ethanol, dann Wasser und zuletzt verd. Salzsäure zugefügt. Mit Ether/Hexan wurde extrahiert und nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeeengt. Erhalten wurden 1.51 g (87%) einer leicht gelb gefärbten Flüssigkeit. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 3) = 0.57

GC(4): R_t = 13.0 min (98%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 1.29 (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 1.75, 1.76 (2x s, 6 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 2.31 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 2.40-2.80 (m, 4 H, CH_2CH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.72 (t, 1 H, CH, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz), 4.22 (q, 2 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 4.68, 4.71, 4.76, 4.80 (4x s, 4 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.30 (CH_3CH_2), 22.62, 22.70 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 31.21 ($\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 35.93 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 40.27 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 57.73 (CH), 61.50 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 110.42, 112.24 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 142.09, 144.30 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 169.52 (CO_2R), 204.05 (C=O).

IR (Film) : 3080 (m, v CH olefin.), 3000-2850 (s, v CH aliph.), 1790, 1720 (vs, v C=O), 1650 (m, v C=C), 1450 (m, δ CH aliph.), 1350-1140 (s, v C-O-C), 890 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1375 (m), 1100 (m), 1030 (m) cm^{-1} .

9.6.5 2,8-Dimethylnona-1,8-dien-5-on **61**

1.51 g (6.33 mmol) β -Ketoester **60** wurden in 20 ml 1N methanolischer KOH über Nacht bei RT gerührt und eine weitere Stunde unter Rückfluß erhitzt. Mit verdünnter Salzsäure wurde angesäuert und 40 Minuten unter Rückfluß erwärmt. Dann wurde Ether/Hexan zugefügt und nacheinander mit Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Erhalten wurden 1.05 g (99%) einer farblosen Flüssigkeit. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet.

R_f (Ether:Pentan = 1:1) = 0.63

GC(3): R_t = 7.0 min (>99%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 1.75 (s, 6 H, CH₃), 2.31 (t, 4 H, CH₂CH₂C=O, ³J_(HH) = 7.6 Hz), 2.59 (t, 4 H, CH₂CH₂C=O, ³J_(HH) = 7.6 Hz), 4.68, 4.75, (2x s, 4 H, CH₂=C).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 22.69 (CH₃), 31.59 (CH₂C=C), 41.09 (CH₂C=O), 110.26 (CH₂=C), 144.62 (CH₂=C), 209.76 (C=O).

IR (Film) : 3080 (m, v CH olefin.), 2990-2840 (s, v CH aliph.), 1710 (vs, v C=O), 1650 (s, v C=C), 1445 (s, δ CH aliph.), 880 (vs, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1370 (m), 1300 (w), 1090 (s), 1020 (w) cm⁻¹.

9.6.6 2,8-Dimethyl-nona-1,8-dien-5-ol **62**

1.05 g (6.33 mmol) Keton **61** wurden in 30 ml *i*-Propanol gelöst und mit 1.6 g (42 mmol) Natriumborhydrid 3 Stunden bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, dann wurden 100 ml Ether zugefügt und der ausgefallene Feststoff abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt. Es verblieben 1.03 g (97%) einer farblosen Flüssigkeit, die ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet wurde.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.44

GC(5): R_t = 14.5 min (94%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.23$ (d, 1 H, OH, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz), 1.58-1.71 (m, 4 H, CH_2CH), 1.77 (s, 6 H, CH_3), 2.08-2.25 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 3.63-3.67 (m, 1 H, CH), 4.75, 4.76, (2x s, 4 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 22.55$ (CH_3), 31.17 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 35.38 (CH_2CH), 71.60 (CH), 110.21 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 145.99 ($\text{CH}_2=\text{C}$).

IR (Film) : 3550-3100 (s, br, v OH), 3080 (m, v CH olefin.), 2980-2820 (s, v CH aliph.), 1710 (vs, v C=O), 1640 (s, v C=C), 1445 (s, δ CH aliph.), 1080 (s, v C-OH), 880 (vs, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1370 (m), 950 (w) cm^{-1} .

9.6.7 5-Acetoxy-2,8-dimethyl-nona-1,8-dien **63**

930 mg (5.52 mmol) **62** wurden in 6 ml Pyridin gelöst und unter Eisbadkühlung mit 2 ml Essigsäureanhydrid versetzt. Es wurde zunächst auf RT (1 Stunde) dann für 3 Stunden auf 60°C erwärmt. 100 ml Ether/Hexan wurden zugefügt. Gewaschen wurde nacheinander mit verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Erhalten wurden 998 mg (86%) einer farblosen Flüssigkeit. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigungsschritte weiterverwendet.

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 3) = 0.63

GC(4): $R_t = 8.6$ min (>99%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.70$ -1.78 (m, 10 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$, CH_2CH), 2.04-2.09 (m, 7 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{R}$), 4.71, 4.75, (2x s, 4 H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 4.92 (m, 1 H, CH).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 21.31$ ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 22.55 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 23.21 (CH_2CH), 33.61 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 73.88 (CH), 110.27 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 145.15 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 170.89 (CO_2R).

IR (Film) : 3060 (m, v CH olefin.), 2900-2800 (s, v CH aliph.), 1730 (s, v C=O), 1640 (s, v C=C), 1445 (s, δ CH aliph.), 1300-1180 (s, br, v C-O-C), 880 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1375 (s), 1010 (s), 945 (m), 800 (m) cm^{-1} .

9.6.8 5-Acetoxy-nona-2,8-dion **64**

1.3 g (18 mmol) Natriummetaperiodat wurden in 6 ml Wasser und 4 ml Acetonitril gelöst. 211 mg (1 mmol) Ester **63** sowie 32 mg Rutheniumtrichloridhydrat, gelöst in 6 ml Tetrachlorkohlenstoff wurden unter Eisbadkühlung zugefügt. Es wurde 2.5 Stunden auf 50 °C erwärmt, mit 200 ml Ether extrahiert und mit wenig gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Trocknen über Natriumsulfat und Einengen im Vakuum ergaben 187 mg (87%) einer leicht gelb gefärbten Flüssigkeit.

R_f (Ether) = 0.31

GC(4): R_t = 13.1 min (>99%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 1.74-1.88 (m, 4 H, CH₂CH), 2.02 (s, 3 H, CH₃CO₂R), 2.12 (s, 6 H, CH₃C=O), 2.45 (t, 4 H, CH₂C=O, ³J_(HH) = 7.4 Hz), 4.83 (m, 1 H, CH).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 21.13 (CH₃CO₂R), 28.16 (CH₂CH), 29.99 (CH₃C=O), 39.41 (CH₂CH₂CH), 72.86 (CH), 170.89 (CO₂R), 207.60 (C=O).

IR (Film) : 2900-2800 (s, v CH aliph.), 1730 (vs, br, v C=O), 1300-1170 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1450 (br), 1400 (br), 1500, 1000 cm⁻¹.

9.7 Untersuchungen zur Enantioselektivität und Aktivität von Lipasen und Esterasen gegenüber einem natürlichen- und einem carba-analogen Triglycerid

9.7.1 Derivatisierung von 1,2-*rac*-Dilaurin mit 3,5-Dinitrophenylisocyanat (±)-**65**

25 mg (0.07 mmol) 1,2-*rac*-Dicaprylin (Sigma) wurden nach AAV 11 a mit 40 mg (0.19 mmol) 3,5-Dinitrophenylisocyanat über Nacht umgesetzt. Gereinigt wurde durch Chromatographie über eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette (Hexan:Ether = 1:2). Es ist lediglich erforderlich eine Fraktion zu nehmen (farblos). Die Verunreinigungen sind intensiv gelb gefärbt, besitzen einen niedrigeren R_f-Wert und können daher leicht abgetrennt werden.

R_f (Diethylether:Pentan = 3:2) = 0.46

HPLC-Trennbedingungen: OA 4100, Gemisch (Hexan:Methylenchlorid:*i*-Propanol = 80:20:1), flow = 0.75 ml/min, UV-Detektion λ = 254nm.

$R_T = 30.4$ min (50%) 1,2-Enantiomer

$R_T = 34.5$ min (50%) 2,3-Enantiomer

9.7.2 Derivatisierung von 1,2-*sn*-Dilaurin mit 3,5-Dinitrophenylisocyanat 1,2-*sn*-**65**

10 mg 1,2-*sn*-Dicaprylin (Sigma) wurden nach AAV 11 b mit 30 mg 3,5-Dinitrophenylisocyanat über Nacht umgesetzt. Gereinigt wurde durch Chromatographie über eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette (Hexan:Ether = 1:2).

R_f (Diethylether:Pentan = 3:2) = 0.46

HPLC-Trennbedingungen wie oben:

$R_T = 28.8$ min (97%) 1,2-Enantiomer

$R_T = 34.2$ min (3%) 2,3-Enantiomer

9.7.3 Herstellung und Derivatisierung einer Mischung aus 1,3- und *rac*-Dilaurin Dilaurin 1,3-**65** / (\pm)-**65**

1.0 g (10.86 mmol) Glycerin wurden in 5 ml trockenem Pyridin und 15 ml Tetrahydrofuran gelöst und mit 3.7 ml (21.72 mmol) Caprylsäurechlorid versetzt. Es wurde über Nacht bei RT gerührt, analog AAV 6 a aufgearbeitet und über Kieselgel chromatographiert (1. Hexan:Ether = 3:1 \rightarrow Triglycerid, 2. Hexan:Ether = 1:1 \rightarrow Diglyceride, 3. Ether:Methanol = 7:1 \rightarrow Monoglyceride).

20 mg der Diglyceridfraktion wurden nach AAV 11 b mit 20 mg 3,5-Dinitrophenylisocyanat umgesetzt und durch Chromatographie über Kieselgel (Hexan:Ether = 1:2) gereinigt.

R_f (Diethylether:Pentan = 3:2) = 0.46

HPLC-Trennbedingungen: OA 4100, 15 % Hexan und 85 % Gemisch (Hexan : Methylenchlorid : *i*-Propanol = 105:20:1), flow = 1.5 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 254$ nm.

$R_T = 32.9$ min (64%) 1,3-Isomer

$R_T = 35.1$ min (18%) 1,2-Enantiomer

$R_T = 38.7$ min (18%) 2,3-Enantiomer

9.7.4 2-(2-Heptyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diolmonocaprylat **66**

512 mg (2 mmol) Diol **19** wurden analog zu AAV 6 b in 5 ml trockenem Pyridin gelöst, mit 360 μ l (2 mmol) Caprylsäurechlorid umgesetzt und nach 2.5 Stunden aufgearbeitet. Der

Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (Ether:Hexan = 3:1). Erhalten wurden 494 mg (64%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.27

GC(10): R_t = 24.4 min (92%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.30-1.38 (m, 19 H, CH_2 -Kette, OH), 1.60-1.79 (m, 6 H, CH_2 -Kette), 2.06 (m, 1 H, CH), 2.33 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz), 3.55-3.63 (m, 2 H, CH_2OH), 3.98 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.00-4.19 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{OC=O}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.14, 14.16 (CH_3), 22.70-37.34 (CH_2 -Kette, CH), 64.77, 64.93 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 65.38 ($\text{CH}_2\text{-OC=O}$), 111.71 ($\text{C}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O})$), 174.30 (CO_2R).

IR (Film) : 3600-3200 (m, br, v OH), 3000-2830 (vs, v CH aliph.), 1745 (vs, v C=O), 1470 (m, δ CH aliph.), .), 1350-1140 (m, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1385 (m), 1130-1020 (s, br), 980, 955, 820 (w), 730 (w) cm^{-1} .

9.7.5 2-(2-Undecyl-[1,3]-dioxolan-2-ylmethyl)-propan-1,3-diolmonolaurat **67**

234 mg (0.75 mmol) Diol **20** wurden analog zu AAV 6 b in 5 ml trockenem Pyridin gelöst, mit 180 μl (0.75 mmol) Laurinsäurechlorid umgesetzt und nach 2.5 Stunden aufgearbeitet. Der Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (Ether:Hexan = 3:2). Erhalten wurden 220 mg (59%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether : Pentan = 3 : 2) = 0.26

9.7.6 Derivatisierung von **66** mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat **68**

30 mg (0.155 mmol) **66** wurden gemäß AAV 12 a mit 25 μl (0.18 mmol) R(+)-1-Phenylethylisocyanat in 100 μl Hexan innerhalb 3 Stunden bei 60 °C umgesetzt. Es wurde über eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette chromatographiert (1. Hexan:Ether = 2:1, 2. Hexan:Ether = 1:1). Erhalten wurden ca. 25 mg (60%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.32

Nachweis der Diastereomeren mittels analytischer HPLC:

1. Trennung an der OA 4100; 75% Hexan und 25% Gemisch (Hexan:Methylenchlorid : *i*-Propanol = 80:20:1), flow = 1.5 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 254$ nm.

$R_T = 13.4$ min und 14.6 min

2. Trennung an der (R,R)-Welk; 95% Hexan und 5% *i*-Propanol, flow = 2.0 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 254$ nm.

$R_T = 17.7$ min und 19.4 min

3. Keine Trennung wurde bei der Verwendung einer Chiracel OD oder einer RP-18 erreicht.

9.7.7 Derivatisierung von **67** mit R(+)-1-Phenylethylisocyanat **69**

35 mg (0.07 mmol) **67** wurden gemäß AAV 12 a mit 25 μ l (0.18 mmol) R(+)-1-Phenylethylisocyanat in 100 μ l Hexan innerhalb von 3 Stunden bei 60 °C umgesetzt. Es wurde über eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette chromatographiert (1. Hexan:Ether = 2:1, 2. Hexan:Ether = 1:1). Erhalten wurden ca. 30 mg (67%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.37

Nachweis der Diastereomeren mittels analytischer HPLC:

1. Trennung an der OA 4100; 97% Hexan und 3% Gemisch (Hexan: *i*-Propanol = 19:1), flow = 2.0 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 254$ nm.

$R_T = 31.8$ min und 34.9 min

2. Trennung an der (R,R)-Welk; 95% Hexan und 5% *i*-Propanol, flow = 2.0 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 254$ nm.

$R_T = 20.0$ min und 21.4 min

9.7.8 Entschützen von **68** mit Aceton / TFA **70**

Ca. 20 mg des 1,3-Dioxolans **68** wurden nach AAV 7 in 1.5 ml Aceton gelöst, mit 20 Tr. Trifluoressigsäure versetzt und 30 Minuten auf 45-50°C erwärmt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt (Ölpumpe/0.01 mbar).

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.35

Nachweis der Diastereomeren mittels analytischer HPLC:

1. Trennung an der (R,R)-Welk; 95% Hexan und 5% *i*-Propanol, flow = 2.0 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 213$ nm.

$R_T = 32.9$ min und 36.5 min

2. Trennung an der Chira Sept; 88% Hexan und 12% Gemisch (Hexan: *i*-Propanol = 95:5), flow = 2.0 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 213$ nm.

$R_T = 39.4$ min und 43.7 min

3. Mit der OA-4100, der Chiralcel OD sowie einer Si-60 wurden keine Trennungen erzielt.

9.7.9 Entschützen von **69** mit Aceton / TFA **71**

Ca. 25 mg des 1,3-Dioxolans **69** wurden nach AAV 7 in 1.5 ml Aceton gelöst, mit 20 Tr. Trifluoressigsäure versetzt und 30 Minuten auf 45-50°C erwärmt. Die flüchtigen Bestandteile wurden im Vakuum entfernt (Ölpumpe/0.01 mbar).

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.40

Nachweis der Diastereomeren mittels analytischer HPLC:

Trennung an der (R,R)-Welk; 95% Hexan und 5% *i*-Propanol, flow = 2.0 ml/min, UV-Detektion $\lambda = 213$ nm.

$R_T = 32.9$ min und 36.5 min

Anmerkung: Von den chiralen Alkoholen **66** und **67** wurden nach AAV 11 a auch die 3,5-Dinitrophenylurethane hergestellt und diese nach AAV 7 mit Aceton/TFA in die entsprechenden Ketoderivate überführt. Die Trennung dieser Verbindungen mittels HPLC an einer OA-4100 in Analogie zu den Derivaten der natürlichen Diglyceride gelang nicht. Auch an der Chiralcel OD und der (R,R)-Welk wurde keine Trennung erzielt.

9.7.10 Reinheit der eingesetzten Reagentien

Das für die enzymatischen Studien eingesetzte Tricaprylin wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm, Hexan:Ether = 5:1) gereinigt. Hierzu wurde kommerzielles Tricaprylin (97%) der Fa. Fluka verwendet. Das nach Einengen im Vakuum erhaltene Tricaprylin besaß laut GC eine Reinheit von 99.5% und war frei von Diglyceriden.

GC (7): $R_t = 24.4$ min

Die carba-analoge Verbindung des Tricaprylins besaß laut GC eine Reinheit von 99.4%.

GC (7): $R_t = 25.4$ min

9.7.11 Bestimmung der Responsefaktoren

a) Tri-, Di- und Monocaprylin

Tri-, Di- und Monocaprylin werden vom FID-Detektor aufgrund der stark differierenden Zahl an CH_2 -Gruppen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit bei der GC-Analyse detektiert. Die bei der enzymatischen Hydrolyse von Tricaprylin ermittelten Flächenprozent der Produktverteilung müssen dementsprechend korrigiert werden. Hierzu wurden equimolare Mengen an Tricaprylin, Dicaprylin* und Monocaprylin* in Essigester gelöst. Mit dieser Stammlösung wurde die Empfindlichkeit der jeweiligen Komponente (Verhältnis der Kehrwerte der Peakflächen) bestimmt.

Folgende Korrekturfaktoren wurden ermittelt: Tricaprylin = 1.0; Dicaprylin = 1.4; Monocaprylin = 2.5

* Als Isomergemische aus Versuch 9.7.3

b) Tricaprylin, carba-analoges Tricaprylin, Docosan

Der Umsatzes enzymatischer Hydrolysen mit dem carba-analogen Triglycerid **11** wurde durch Vergleich der Abnahme der Peakflächen bezogen auf Docosan als interner Standard bestimmt. Der Einsatz eines internen Standards ist in diesem Fall notwendig, da die Hydrolyseprodukte von **11** durch Bildung diastereomerer Lactole gaschromatographisch nicht quantifiziert werden konnten. Die in Analogie zu a) ermittelten Korrekturfaktoren sind: Tricaprylin \cong **11** \cong Docosan = 1.0

9.7.12 Bestimmung der Aktivität mikrobieller Lipasen und Esterasen gegenüber Tricaprylin

In 1.5 ml Eppendorfgläsern wurde das zu untersuchende Enzym in 800 μl Puffer pH = 7.0 (Fluka) gelöst und mit 200 μl einer Stammlösung (10% Tricaprylin in *tert.*-Butylmethylether) auf einem Eppendorfschüttler umgesetzt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 400 μl Essigester zugesetzt, kurz geschüttelt und die Probe für 3 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert. Die Phasen wurden vorsichtig getrennt, dann wurde noch einmal mit 600 μl Essigester extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Es wurde 20 Minuten über eine Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde dann im Verhältnis a) 1/3 und b) 2/3

(Bestimmung der Enantioselektivität s. 9.7.14) geteilt. Die Bestimmung des Umsatzes erfolgte gaschromatographisch mit der Lösung a). Die Aktivität wurde bei einem Umsatz von ca. 2-15% bestimmt, um Meßfehler möglichst klein zu halten.

9.7.13 Vergleich der Enzymaktivitäten von Tricaprylin und **11**

In 1.5 ml Eppendorfgefäßen wurde das zu untersuchenden Enzym in 800 µl Puffer pH = 7.0 gelöst und mit 200 µl einer Stammlösung (470 mg Tricaprylin, 469 mg **11** und 329 mg Docosan aufgefüllt auf 13 ml mit *tert.*-Butylmethylether) auf einem Eppendorfschüttler umgesetzt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 400 µl Essigester zugesetzt, kurz geschüttelt und die Probe für 3 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert. Die Phasen wurden vorsichtig getrennt, dann wurde noch einmal mit 600 µl Essigester extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Gaschromatographisch wurde die Abnahme an Tricaprylin und der carba-analogen Verbindung **11** bezogen auf Docosan - als internen Standard - bestimmt.

9.7.14 Bestimmung der Enantioselektivität mikrobieller Lipasen gegenüber Tricaprylin

Die Lösung b) aus 9.7.12 wurde in ein Eppendorfgefäß mit 4-8 mg 3,5-Dinitrophenylisocyanat pipettiert, eine Stunde auf dem Eppendorfschüttler inkubiert und über Nacht bei RT stehengelassen. Aufgearbeitet wurde nach AAV 10 b. Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit erfolgte mittels HPLC unter Einsatz der OA-4100 und UV-Detektion bei $\lambda = 254$ nm.

9.7.15 Bestimmung der Enantioselektivität mikrobieller Lipasen gegenüber **11**

In 1.5 ml Eppendorfgefäßen wurde das zu untersuchenden Enzym in 800 µl Puffer pH = 7.0 (Fluka) gelöst und mit 200 µl einer Stammlösung (1.200 g carba-analogenes Tricaprylin, 780 mg Docosan in 12 ml *tert.*-Butylmethylether) auf einem Eppendorfschüttler umgesetzt. Zum Abbruch der Reaktion wurden 400 µl Essigester zugesetzt, kurz geschüttelt und die Probe für 3 Minuten bei 15000 U/min zentrifugiert. Die Phasen wurden vorsichtig getrennt, dann wurde noch einmal mit 600 µl Essigester extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Es wurde 20 Minuten über eine Spatelspitze Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde dann im Verhältnis a) 1/3 und b) 2/3 geteilt. Der Umsatzes wurde gaschromatographisch mit der Lösung a) bestimmt. Die Lösung b) wurde in ein Eppendorfgefäß dekantiert und mit ca. 15 µl

R(+)-1-Phenylethylisocyanat nach AAV 11 b derivatisiert. Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit erfolgte durch HPLC mit den Säulen: (R,R)-Welk oder Chira Sept mittels UV-Detektion bei $\lambda = 213$ nm.

9.7.16 Carba-analoges Dicaprylin (*R*)-72

Eine Lösung von 0.2-2 mmol **11** in 5 ml *tert.*-Butylmethylether wurde mit 20 ml Puffer pH=7.0 emulgiert. 2-10 mg der Lipase aus *Humicola* wurden zugefügt und die frei werdende Carbonsäure mit 0.1 n NaOH unter pH-Stat Bedingungen (Autotitrator) titriert. Nach einem Umsatz von 20% wurde mit Diethylether extrahiert und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde kurz (ca. 10 Minuten) über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer (Raumtemperatur) entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde für Derivatisierungsversuche immer sofort weiterverwendet. Die Enantiomerenreinheit von (*R*)-72 wurde nach AAV 11 b bzw. 9.7.15 bestimmt.

9.8 Synthese carba-analoger Phospholipide modifiziert in der *sn*-2 Position

9.8.1 (2-Methylen-propyl)-malonsäurediethylester 73

In einem 2l 3H-Kolben mit Tropftrichter, Rückflußkühler, Gasableitungsrohr und Magnetührer wurden unter Argon 450 ml trockenes Ethanol vorgelegt. Portionsweise wurden 11.5 g (0.5 mol) Natrium zugegeben. Nach vollständiger Umsetzung wurden unter Eisbadkühlung nacheinander 120g (0.75 mol) Malonsäurediethylester sowie 45.3 g (0.5 mol) β -Methallylchlorid in 50 ml trockenem Ethanol zugetropft. Es wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 600 ml Ether aufgenommen, filtriert und das Filtrat nacheinander mit verd. Salzsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde im Wasserstrahlvakuum über eine 30 cm Vigreuxkolonne fraktioniert destilliert. Erhalten wurden 79.3 g (74%) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.:112°C/18 mbar

R_f (Diethylether : Pentan = 1 : 1) = 0.61

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.21$ (t, 6 H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 1.70 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 2.57 (d, 2 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz), 3.53 (t, 1 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz), 4.14 (q, 4 H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz), 4.68, 4.74 (2x s, 2 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 13.81$ ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2\text{O}$), 22.01 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{C}=\text{C}$), 36.25 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{C}$), 50.25 ($\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}$), 61.12 ($\text{CH}_3\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$), 112.02 ($\text{H}_2\underline{\text{C}}=\text{C}$), 141.45 ($\text{H}_2\text{C}=\underline{\text{C}}$), 168.84 ($\text{C}=\text{O}$).

IR (Film) : 3090 (w, v CH olefin.), 3010-2800 (s, v CH aliph.), 1745 (vs, v C=O), 1650 (w, v C=C), 1450 (m, δ CH aliph.), 1370 (m, δ CH_3), 1320-1130 (v C-O-C), 900 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1335 (w), 1100 (w), 1030 (w), 865 (w), 535 (w) cm^{-1} .

9.8.2 2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diol **74**

Gemäß AAV 5 wurden unter Argon 11.5 g (0.3 mol) Lithiumaluminiumhydrid in 650 ml trockenem Ether suspendiert. Eine Lösung von 53.5 g (0.25 mol) (2-Methylenpropyl)-malonsäurediethylester **73** in 200 ml trockenem Ether wurde zutropft. Chromatographische Reinigung des erhaltenen Rohproduktes über Kieselgel (40x2cm; 1. Ether:Hexan = 2:1, 2. Ether, 3. Ether:Methanol = 10:1) und anschließende Destillation im Vakuum ergaben 16.6 g (51%) eines farblosen Öls.

Sdp.: 92°C/1 mbar

R_f (Diethylether) = 0.22

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 1.69$ (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 1.92 (m, 3 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 3.51-3.71 (m, 4 H, CH_2OH), 3.76 (s, br., 2 H, OH), 4.67, 4.74 (2x s, 2 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 21.96$ (CH_3), 36.31 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{C}=\text{C}$), 39.42 (CH), 64.87 (CH_2OH), 111.96 ($\text{H}_2\underline{\text{C}}=\text{C}$), 143.08 ($\text{H}_2\text{C}=\underline{\text{C}}$).

IR (Film) : 3600-3100 (s, v OH), 3090 (w, v CH olefin.), 3000-2800 (s, v CH aliph.), 1650 (m, v C=C), 1450 (m, δ CH aliph.), 1380 (m, δ CH_3), 1040 (s, br, v C-OH), 900 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1110 (m), 970 (m) cm^{-1} .

9.8.3 (*R*)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolaurat (*R*)-**75**

6.51 g (50 mmol) Diol **74** wurden in 70 ml Methyl-*tert*-butylether gelöst, mit 16.0 g (70 mmol) Vinylaurat und 150 mg Lipase aus *Pseudomonas species* versetzt und 29 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde filtriert und im Vakuum eingengt. Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; 1. Ether: Hexan = 1:5, 2. Ether: Hexan = 1:1) ergaben 12.45 g (80%) einer farblosen Flüssigkeit, die zur Vermeidung von Acylgruppenwanderungen im Tiefkühlschrank gelagert wurde.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.33

GC(7): R_t = 20.0 min (>99%)

[α]_D = + 7.8 ° (c = 2.75, Hexan)

[α]₃₆₅ = + 23.8 ° (c = 2.75, Hexan)

ee = 96.4 %

Bestimmung der Enantiomerenreinheit mittels analytischer HPLC: Säule Chiralcel OD; *n*-Hexan : *i*-PrOH = 97 : 3, flow = 1.0 ml/min, UV-Detektion λ=215 nm.

R_T = 6.44 min (98.2%), R_T = 8.99 min (1.8%)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.91 (t, 3 H, CH₃CH₂, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.29 (m, 16 H, CH₂-Kette), 1.62-1.67 (m, 2 H, C₉H₁₉CH₂), 1.77 (s, 3 H, CH₃C=C), 2.05-2.12 (m, 4 H, CHCH₂C=C, OH), 2.35 (t, 2 H, CH₂CO₂R, ³J_(HH) = 7.5 Hz), 3.51-3.64 (m, 2 H, CH₂OH), 4.07-4.25 (m, 2 H, CH₂OC=O), 4.77, 4.84 (2x s, 2 H, CH₂=C).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.20 (CH₃), 22.28-34.47 (CH₂-Kette, CH₃C=C), 36.84 (CH), 38.47 (CH₂C=C), 62.81 (CH₂-OH), 64.26 (CH₂-O), 112.74 (CH₂=C), 143.02 (CH₂=C), 174.61 (CO₂R).

IR (Film) : 3700-3100 (s, br, v OH), 3080 (m, v CH olefin.), 2990-2800 (s, v CH aliph.), 1730 (s, v C=O), 1640 (m, v C=C), 1460 (m, δ CH aliph.), 1320-1130 (s, br, v C-O-C), 880 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1370 (m), 1100 (m), 1030 (m), 990 (w), 715 (w) cm⁻¹.

9.8.4 (±)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolaurat (±)-**75**

550 mg (4.22 mmol) Diol **74** wurden gemäß AAV 6 b unter Argon in 30 ml trockenem Ether gelöst, auf - 78°C gekühlt und nacheinander mit 2.7 ml (4mmol) *n*-Butyllithium (15% in

Hexan) sowie 1 ml (4.32 mmol) Lauroylchlorid nach AAV 6b umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie über Kieselgel (30x0.5 cm; 1. Ether: Hexan = 1:3, 2. Ether: Hexan = 1:1) gereinigt. Erhalten wurden 0.74 g (56%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.33

Trennung der Enantiomeren mittels analytischer HPLC: Säule Chiralcel OD; *n*-Hexan : *i*-PrOH = 97 : 3, flow = 1.0 ml/min, UV-Detektion $\lambda=215$ nm.

$R_T = 6.13$ min (50%), $R_T = 8.48$ min (50%)

NMR- und IR Daten siehe (*R*)-**75**

9.8.5 Phosphorsäure-2-bromethylester-dichlorid **76**

40.0 ml (0.44 mol) Phosphoroxytrichlorid wurden mit 15.5 ml (0.22 mol) 2-Bromethanol unter leichtem Vakuum (200-300 mbar) eine Stunde gerührt (HCl-Entwicklung !). Bei 50 °C und 90 mbar wurde weitere zwei Stunden lang gerührt. Destillation im Vakuum ergaben 27.8 g (25%) einer farblosen Flüssigkeit.

Sdp.:65 °C/0.2 mbar

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 3.63$ (dt, 2 H, CH_2Br , $^3J_{(\text{HH})} = 6.3$ Hz, $^4J_{(\text{HP})} = 0.9$ Hz), 4.60 (dt, 2 H, CH_2O , $^3J_{(\text{HH})} = 6.3$ Hz, $^3J_{(\text{HP})} = 10.6$ Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 24.48, 27.58$ (CH_2Br), 70.08, 70.16 (CH_2O).

$^{31}\text{P-NMR}$ (161.975 MHz, CDCl_3) : $\delta = 8.50$

9.8.6 (*S*)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-2-bromethyl-methyl-phosphat (*S*)-**77**

6.25 g (20 mmol) Monoester (*R*)-**75** wurden unter Argon in 100 ml trockenem Toluol gelöst, auf 0°C gekühlt und mit 3.04 g (30 mmol) trockenem Triethylamin versetzt. 6.05 g (25 mmol) **76** wurden zügig zugetropft. Es wurde 30 Minuten bei 0°C und 2.5 Stunden bei RT nachgerührt. 5.6 ml (40 mmol) Triethylamin und 4.0 ml (100 mmol) Methanol wurden zugesetzt. Nach 2 stündigem Rühren wurden 200 ml Ether zugefügt und mit Wasser und

verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (40x2 cm; 1. Ether: Hexan = 3:2, 2. Ether). Erhalten wurden 7.22 g (70%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether) = 0.30

GC(7): R_t = 24.7 min (97%)

$[\alpha]_D = + 3.4^\circ$ (c = 2.1, Hexan)

$[\alpha]_{365} = + 10.0^\circ$ (c = 2.1, Hexan)

HPLC: R_T = 13.42 min (50%), 15.40 min (50%)

Trennung der Diastereomeren und Enantiomeren mittels analytischer HPLC: Säule Chiralcel OD, *n*-Hexan : *i*-PrOH = 98 : 2, flow = 1.0 ml/min, Streulichtdetektor.

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90 (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz), 1.28 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.64 (m, 2 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2$), 1.76 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 2.09-2.19 (m, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.26 (m, 1 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.33 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 3.56 (t, 2 H, CH_2Br , $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz), 3.82 (d, 3 H, CH_3OP , $^3J_{\text{HP}} = 11.2$ Hz), 4.05-4.17 (m, 4 H, CHCH_2OP , $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$), 4.33 (dt, 2 H, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OP}$, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 8.2$ Hz), 4.77, 4.86 (2x s, 2 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.21 (CH_3), 22.25-36.62 (CH_2 -Kette, CH_2Br , $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 54.61, 54.67 ($\text{CH}_3\text{-OP}$), 63.25 ($\text{CH}_2\text{-OC}=\text{O}$), 66.89, 66.94 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 67.59, 67.65 ($\text{CHCH}_2\text{-OP}$), 113.35 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 141.92 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 174.61 (CO_2R).

$^{31}\text{P-NMR}$ (161.975 MHz, CDCl_3) : δ = 0.94, 0.95

IR (Film) : 3060 (w, v CH olefin.), 2990-2810 (s, v CH aliph.), 1730 (s, v C=O), 1640 (m, v C=C), 1450 (s, δ CH aliph.), 1310-1240, 1200-1140 (s, v C-O-C), 885 (m, δ CH olefin.), weitere Banden bei : 1370 (m), 1120-970 (vs, br), 950 (w), 805 (m), 740, 710 (w, br) cm^{-1} .

9.8.7 (\pm)-2-(2-Methylen-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-2-bromethyl-methyl-phosphat
(\pm)-**77**

Entsprechend dem obigen Ansatz wurden 625 mg (2.0 mmol) Monoester (\pm)-**75** unter Argon in 10 ml trockenem Toluol gelöst, auf 0°C gekühlt und nacheinander mit dem Säurechlorid **76** und Methanol umgesetzt. Chromatographiert wurde über Kieselgel (30x0.5 cm; 1. Ether: Hexan = 3:2, 2. Ether). Erhalten wurden 626 mg (61%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether) = 0.30

HPLC: R_T = 12.62 min (25%), 14.10 min (50%), 15.42 min (25%)

Trennung der Diastereomeren und Enantiomeren mittels analytischer HPLC: Säule Chiralcel OD, *n*-Hexan : *i*-PrOH = 98 : 2, flow = 1.0 ml/min, Streulichtdetektor.

NMR- und IR Daten siehe (*S*)-**77**

9.8.8 (*S*)-2-(2-Oxo-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-2-bromethyl-methyl-phosphat (*S*)-**78**
Gemäß AAV 9 wurden 6.4 g (30 mmol) Natriummetaperiodat in 20 ml Wasser und 15 ml Acetonitril gelöst und mit 160 mg (6 mol%) Rutheniumtrichloridhydrat und 5.65 g (11 mmol) (*S*)-**77** gelöst in 15 ml Tetrachlorkohlenstoff unter Eisbadkühlung umgesetzt. Das Rohprodukt wurde durch Chromatographie über Kieselgel (40x2 cm; Ether:Methanol = 100:1) gereinigt, wobei 3.67 g (75%) eines farblosen Öls erhalten wurde.

R_f (Diethylether) = 0.15

[α]_D = + 0.67 ° (c = 4.75, Hexan)

[α]₃₆₅ = + 2.5 ° (c = 4.75, Hexan)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.89 (t, 3 H, CH₃CH₂, ³J_(HH) = 6.8 Hz), 1.27 (m, 16 H, CH₂-Kette), 1.62 (m, 2 H, C₉H₁₉CH₂), 2.18 (s, 3 H, CH₃C=O), 2.31 (t, 2 H, CH₂CO₂R, ³J_(HH) = 7.6 Hz), 2.50-2.66 (m, 3 H, CHCH₂C=O), 3.55 (t, 2 H, CH₂Br, ³J_(HH) = 6.1 Hz), 3.80 (d, 3 H, CH₃OP, ³J_(HP) = 11.2 Hz), 4.05-4.14 (m, 4 H, CHCH₂OP, CH₂OC=O), 4.32 (dt, 2 H, BrCH₂CH₂OP, ³J_(HH) = 6.1 Hz, ³J_(HP) = 8.2 Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.20 (CH_3), 22.78-34.47 (CH_2 -Kette, CH_2Br , $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$, CH), 41.33 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 54.68, 54.74 ($\text{CH}_3\text{-OP}$), 63.18 ($\text{CH}_2\text{-OC}=\text{O}$), 66.99, 67.04, 67.37, 67.42 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $\text{CHCH}_2\text{-OP}$), 113.35 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 173.61 (CO_2R), 206.12 ($\text{C}=\text{O}$).

^{31}P -NMR (161.975 MHz, CDCl_3) : δ = 0.90, 0.92

IR (Film) : 2990-2810 (s, v CH aliph.), 1725, 1710 (s, v C=O), 1455 (m, δ CH aliph.), 1310-1240, 1200-1140 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1410 (w), 1355 (m, br), 1120-970 (vs, br), 950 (w), 850 (m, br), 805 (m), 740, 710 (w, br) cm^{-1} .

9.8.9 (*S*)-2-(2-Oxo-propyl)-propan-1,3-diolmonolauroyl-phosphorylcholin (*S*)-**79**

1.5 g (2.9 mmol) des Esters (*S*)-**78** wurden mit 15 ml Trimethylaminlösung (45%ig), 6 ml *i*-Propanol, 6 ml Acetonitril und 3 ml Methylenchlorid in einem verschlossenen Rundkolben 2.5 Stunden auf 55°C erhitzt. Es wurde dreimal 8 ml konz. Ammoniaklösung/Methanol (1:1) zugefügt und die flüchtigen Bestandteile jeweils im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde über Kieselgel chromatographiert (20x1.5 cm; Aceton:Methanol:konz. Ammoniaklösung : Wasser = 2:10:0.3:1). Erhalten wurden 1.25 g (77%) eines farblosen hygroskopischen Feststoffs.

R_f (8 ml Methanol+10 Tr. konz. Ammoniaklösung+20 Tr. Wasser) = 0.28

Reinheitsbestimmung mittels HPLC an einer RP18:

Eluent: Methanol : Wasser = 95:5; flow = 0.7 ml/min; Detektion mittels Steulichtdetektor

R_T = 4.3 min (99.1%)

$[\alpha]_{\text{D}} = -4.3^\circ$ (c = 3.0, CH_2Cl_2)

$[\alpha]_{365} = -8.5^\circ$ (c = 3.0, CH_2Cl_2)

^1H -NMR (400.13 MHz, D_2O), *HH-COSY* : δ = 0.86 (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3\text{J}_{\text{HH}} = 6.6$ Hz), 1.28 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.59 (m, 2 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2$), 2.22 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 2.32 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.5$ Hz), 2.55-2.65 (m, 2 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.70-2.74 (m, 1 H, CH), 3.25 (s, 9 H, NCH_3), 3.69 (m, 2 H, $\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.87 („t“, br, 2 H, CHCH_2OP , AB-Teil eines ABX-Spinsystems, $^2\text{J}_{\text{HH}} \cong ^3\text{J}_{\text{HH}} \cong 5.6$ Hz), 3.95 (dd, 1 H, $\text{CHCH}_2\text{OC}=\text{O}$, A-Teil eines ABX-Spinsystems, $^2\text{J}_{\text{HH}} = 10.6$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 7.0$ Hz), 4.23 (dd, 1 H, $\text{CHCH}_2\text{OC}=\text{O}$, B-Teil eines ABX-Spinsystems, $^2\text{J}_{\text{HH}} = 10.6$ Hz, $^3\text{J}_{\text{HH}} = 4.5$ Hz), 4.30 (s, br, 2 H, $\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{N}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3), *CH-COSY* : δ = 13.97 (CH_3), 22.78-32.12 (CH_2 -Kette), 31.35 ($\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 34.09 ($\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2$), 34.97, 35.04 ($\text{CHCH}_2\text{C}=\text{O}$), 42.06 (CH), 54.24 (CH_3N), 59.53, 59.57 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 64.82 ($\text{CH}_2\text{-OC}=\text{O}$), 65.50, 65.55 ($\text{CHCH}_2\text{-OP}$), 66.24 (CH_2N) 174.53 (CO_2R), 210.97 ($\text{C}=\text{O}$).

^{31}P -NMR (161.975 MHz, CDCl_3), *PH-COSY* : δ = 0.37

IR (KBr) : 3700-3200 (m, br, v OH), 3020-2820 (s, v CH aliph.), 1730 (s, v $\text{C}=\text{O}$), 1320-1220 (s, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1650 (m), 1480 (s), 1380 (w), 1330 (w), 1175 (m), 1100 (s), 1060 (s), 970 (s), 915 (s), 880 (m), 840 (s), 810 (w), 780 (s), 740 (w), 720 (w), 620 (w) cm^{-1} .

9.9 Synthese carba-analoger Phospholipide modifiziert in den *sn*-1,2(2,3) Positionen

9.9.1 (*S*)-3,4-Diundecyl-1-hydroxymethyl-cyclohex-3-enyl-2-bromomethyl-methyl-phosphat (*S*)-**80**

1.34 g (3.18 mmol) des Alkohols (*S*)-**54** wurden in 15 ml trockenem Toluol unter Argon gelöst und die Lösung auf 0 °C abgekühlt. 1 ml (7.0 mmol) trockenes Triethylamin wurden zugegeben und 1.21 g (5mmol) 2-Bromethanolphosphorsäureesterdichlorid **76** zügig zugetropft. Es wurde 30 Minuten bei 0 °C und 3 Stunden bei RT gerührt, dann 2 ml (14.0 ml) Triethylamin und 1 ml Methanol zugefügt und weitere 2 Stunden bei RT gerührt. Nach Zugabe von 100 ml Ether wurde mit sehr verdünnter Salzsäure sowie gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Zur weiteren Reinigung wurde der Ester über Kieselgel chromatographiert (40x2 cm, Ether:Hexan = 1:1 → 1:0; Ether:Methanol = 10:1). Erhalten wurden 1.38 g (70%) eines farblosen Öls.

R_f (Diethylether) = 0.31

GC(7): R_t = 31.3 min (96%)

$[\alpha]_D = -23.1^\circ$ ($c = 1.7$, CH_2Cl_2)

$[\alpha]_{365} = -79.6^\circ$ ($c = 1.7$, CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.91 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.30 (m, 37 H, CH_2 -Kette, CH), 1.60-2.04 (m, 10 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{CCH}_2\text{CH}_2$, 2x $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{CH}_2$), 3.57 (t, 2 H, CH_2Br , $^3J_{(\text{HH})} = 6.2$ Hz), 3.82 (d, 3 H, CH_3OP , $^3J_{(\text{HP})} = 11.2$ Hz), 3.98 (dd, 2 H, CHCH_2OP , $^3J_{(\text{HH})} = ^3J_{(\text{HP})} = 6.5$ Hz), 4.34(dt, 2 H, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OP}$, $^3J_{(\text{HH})} = 6.2$ Hz, $^3J_{(\text{HP})} = 8.3$ Hz).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.22 (CH_3), 22.82-33.23 (CH_2 -Kette, CH_2Br), 35.21, 35.28 ($\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 54.51, 54.57 ($\text{CH}_3\text{-OP}$), 66.76, 66.82 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 72.55, 72.62 ($\text{CHCH}_2\text{-OP}$), 128.68, 130.43 ($\text{C}=\text{C}$).

^{31}P -NMR (161.975 MHz, CDCl_3) : δ = 1.095, 1.097

IR (Film) : 2990-2810 (s, v CH aliph.), 1455 (δ CH aliph.), 1310-1240 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1380 (w), 1185 (m), 960 (w), 850 (m), 810 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.9.2 (*S*)-Octacosan-12,17-dion-14-hydroxymethyl-2-bromethyl-methyl-phosphat (*S*)-**81**

1.50 g (7.0 mmol) Natriummetaperiodat wurden in 5 ml Wasser gelöst und zu einer Lösung von 860 mg (1.38 mmol) des Phosphorsäureesters (*S*)-**80** in 3.5 ml Acetonitril und 3.5 ml Tetrachlorkohlenstoff gegeben. 20 mg (6 mol%) des Katalysators Rutheniumtrichloridhydrat wurden beigelegt und die Lösung dann 5 Std. auf 55°C erhitzt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach dieser Reaktionszeit zeigte sich jedoch kein nennenswerter Umsatz, so daß 5 ml Essigester zugefügt wurden und nochmals 20 Minuten auf 55°C erhitzt wurde. Laut Dünnschichtchromatographie lag nun ein vollständiger Reaktionsumsatz vor. Der Ansatz wurde gemäß AAV 9 aufgearbeitet. Nach chromatographischer Reinigung über Kieselgel (40x1.5 cm; Ether: Methanol = 100:1) wurden 596 mg (66%) eines farblosen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 30 °C erhalten.

R_f (Diethylether) = 0.44

$[\alpha]_D = 0.0^\circ$ (c = 2.75, CH_2Cl_2)

$[\alpha]_{365} = +2.4^\circ$ (c = 2.75, CH_2Cl_2)

$[\alpha]_D = +0.56^\circ$ (c = 3.4, Hexan)

$[\alpha]_{365} = +4.4^\circ$ (c = 3.4, Hexan)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.89 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.27 (m, 32 H, CH_2 -Kette), 1.55-1.62 (m, 6 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2.18 (m, 1 H, CH), 2.37-2.57 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 3.55 (t, 2 H, CH_2Br , $^3J_{(\text{HH})} = 6.1$ Hz), 3.80 (dd, 3 H, CH_3OP , $^3J_{(\text{HP})} = 11.2$ Hz), 4.00-4.04 (m, 2 H, $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OP}$), 4.29-4.35 (m, 2 H, CHCH_2OP).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.03 (CH_3), 22.59-33.94 (CH_2 -Kette, CH_2Br , CH), 39.87, 42.80, 43.31, 43.88 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 54.43, ($\text{CH}_3\text{-OP}$), 66.74, 66.79 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$), 69.69, 69.75 ($\text{CHCH}_2\text{-OP}$), 209.48, 210.27 ($\text{C}=\text{O}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (161.975 MHz, CDCl_3) : δ = 1.025, 1.043

IR (Film) : 3000-2800 (s, v CH aliph.), 1710 (s, v C=O), 1455 (δ CH aliph.), 1310-1240 (s, v C-O-C), weitere Banden bei : 1375 (m), 1185 (m), 960 (w), 850 (m), 810 (m), 720 (w) cm^{-1} .

9.9.3 (S)-Octacosan-12,17-dion-14-hydroxymethyl-phosphorylcholin (S)-**82**

419 mg (0.67 mmol) des Esters (S)-**81** wurden in 10 ml 45%iger wässriger Trimethylaminlösung, 4 ml *i*-Propanol, 4 ml Acetonitril und 2 ml Methylenchlorid gelöst und für 2.5 Stunden in einem verschlossenen Rundkolben auf 55 °C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum eingeeengt (sehr starkes Schäumen). Der Rückstand wurde über Kieselgel (15x1 cm; Eluent: Chloroform:Methanol:Wasser = 5:5:1) gereinigt. Erhalten wurden drei Fraktionen 1. Fraktion 40 mg (löslich in Chloroform), 2. Fraktion 240 mg (unlöslich in Chloroform), 3. Fraktion 110 mg (unlöslich in Chloroform).

Entsprechend dem ^1H -, ^{13}C -, und ^{31}P -NMR Spektren entsprach lediglich die erste Fraktion dem gewünschten Produkt (Ausbeute 10%), wohingegen die übrigen Fraktionen auf eine Folgehydrolyse des Produktes hinweisen und hauptsächlich aus Cholin bestanden.

Reinheitsbestimmung mittels HPLC an einer RP18:

Eluent: Methanol : Wasser = 95:5; flow = 0.7 ml/min; Detektion mittels Steulichtdetektor

R_T = 9.7 min (89.3%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.92 (t, 6 H, CH_3 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.30 (m, 32 H, CH_2 -Kette), 1.54 (m, 4 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2$), 1.75 (m, 2 H, CHCH_2CH_2), 2.15 (m, 1 H, CH), 2.40-2.55

(m, 6 H, C₁₀H₂₁CH₂, CHCH₂CH₂), 2.60 (d, 2 H, CHCH₂C=O), 3.45 (s, 9 H, NCH₃), 3.76 (s, br, CH₂N), 3.93 (s, br, 2 H, CHCH₂OP), 4.42 (s, br, 2 H, POCH₂CH₂N).

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 14.06 (CH₃), 22.68-33.90 (CH₂-Kette, CH), 25.35 (CHCH₂CH₂), 39.98 (CHCH₂CH₂), 42.97, 43.46 (C₁₀H₂₁CH₂), 44.08 (CHCH₂C=O), 54.73, (NCH₃), 59.72 (OCH₂CH₂N), 66.26 (CHCH₂OP), 68.30 (CH₂N), 211.67, 212.04 (C=O).

³¹P-NMR (161.975 MHz, CDCl₃) : δ = -3.176

IR (KBr) : 3700-3100 (s, br, v OH), 3020-2820 (s, v CH aliph.), 1700 (s, v C=O), 1465 (s, δ CH aliph.), 1320-1200 (vs, br, v C-O-C), weitere Banden bei : 1640 (m, br), 1410 (m), 1380 (m), 1110-1000 (vs, br), 970 (s), 930 (m), 800-740 (m, br), 720 (m) cm⁻¹.

9.10 Bestimmung der absoluten Konfiguration

9.10.1 (S)-2-(2-Methylen-propyl)-1-lauroyl-3-tosyl-propan-1,3-diol (S)-**83**

625 mg (2.0 mmol) des Alkohols (*R*)-**75** wurden in 2 ml trockenem Chloroform gelöst, mit 316 mg (4.0 mmol) Pyridin und 572 mg (3 mmol) Tosylchlorid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurden 5 ml Diethylether und einige Tropfen Wasser zugefügt. Nach 20 min. wurde mit Diethylether extrahiert und die org. Phase nacheinander mit Wasser, verdünnter Salzsäure, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Methanol umkristallisiert. Erhalten wurden 835 mg (89%) farbloser Kristalle mit einem Schmelzpunkt von 38°C.

Obwohl die Substanz gut kristallisierte, konnte die absolute Konfiguration der Verbindung nicht durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden. Ursache hierfür war die zu geringe Ordnung der Fettsäurekettenlänge in dem Kristall, was einen kleinen Streuwinkel der Röntgenreflexe von ca. 30% zur Folge hatte.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:1) = 0.58

GC(7): R_t = 26.4 min (90-95%, teilweise Zersetzung auf der GC-Säule)

HPLC (Si-60, *n*-Hexan:*i*-Propanol=95:5; flow=0.75 ml/min; λ = 254 nm):

$R_T = 4.2$ min (100%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0.92$ (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.31 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.57-1.62 (m, 2 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2$), 1.70 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 2.07 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.24 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.6$ Hz und m 1 H, CH), 2.49 (s, 3 H, CH_3Ar), 3.49-4.10 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 4.68, 4.81 (2x s, 2 H, $\text{CH}_2=\text{C}$), 7.37, 7.39, 7.81, 7.83 (4x s, 4 H, CH Aromat).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : $\delta = 14.05$ (CH_3CH_2), 21.57-34.09 (11 Signale, CH_2 -Kette, CH_3Ar , $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 35.45 (CH), 36.14 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 62.96 (CH_2OS), 69.46 ($\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$), 113.33 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 127.93 (C_2+C_6 Ar), 129.80 (C_3+C_5 Ar), 133.00 (C_1 Ar), 141.38 (C_4 Ar), 144.75 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 173.38 (CO_2R).

IR (Film) : 3070 (w, v CH olefin.), 3000-2830 (vs, v CH aliph.), 1730 (vs, v C=O), 1650 (m, v C=C), 1600 (m, v C=C arom.), 890 (m, δ CH olefin.), 830, 810 (s, δ CH arom. 1,4-disubstituiert) weitere Banden bei : 1450 (m, br), 1360 (s), 1170 (vs), 1090 (m), 1015 (w), 905 (br), 785 (w), 700 (w), 660 (s) cm^{-1} .

9.10.2 (S)-2-(2-Methylen)-4-lauroylmethyl-5-iod-pentan (S)-**84**

720 mg (1.54 mmol) Tosylat (S)-**83** wurden in 10 ml trockener, mit Natriumiodid gesättigter Acetonlösung unter Lichtausschluß 4 Stunden auf 55 °C erwärmt, wobei Natriumtosylat als Niederschlag ausfiel. Nach dem Abkühlen wurde 80 ml Wasser zugefügt und zweimal mit Hexan extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Erhalten wurden 650 mg (100%) einer leicht gelben Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:2) = 0.76

GC(12): $R_t = 26.3$ min (98%)

$^1\text{H-NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3) : $\delta = 0.90$ (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.8$ Hz), 1.29 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.62-1.68 (m, 2 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2$), 1.76 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 1.81-1.86 (m, 1 H, CH), 2.10 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.35 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 3.24-3.36 (m 2 H, CH_2I), 3.93-4.17 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$), 4.83, 4.88 (2x s, 2 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 10.51 (CH_2I), 14.10 (CH_3CH_2), 22.08-36.14 (11 Signale, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$, CH), 39.63 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 66.33 (CH_2O), 113.49 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 141.60 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 173.60 (CO_2R).

IR (Film) : 3070 (w, v CH olefin.), 2990-2830 (vs, v CH aliphat.), 1730 (vs, v C=O), 1650 (m, v C=C), 1450 (m, δ CH aliphat.), 1170 (s, br, v C-O-C), 890 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei: 1270 (m), 1110 (m), 720 (w), 660 (w) cm^{-1} .

9.10.3 (*S*)-2-(2-Methylen)-4-lauroylmethyl-pentan (*S*)-**85**

650 mg (1.54 mmol) (*S*)-**84** wurden in 20 ml trockenem Diethylether unter Argon gelöst, die Lösung auf -25°C abgekühlt und mit 1.2 ml *n*- Bu_3SnH (4.52 mmol) versetzt. Es wurde innerhalb einer Stunde auf 0°C erwärmt und eineinhalb Stunden bei 35°C nachgerührt. Weitere 100 ml Diethylether wurden zugefügt und die organische Phase nacheinander mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand über Kieselgel (20 cm; Eluent: Ether:Hexan = 1:7) chromatographiert. Erhalten wurden 400 mg (88%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:2) = 0.77

GC(12): R_t = 21.3 min (99%)

^1H -NMR (400.13 MHz, CDCl_3) : δ = 0.85 (t, 3 H, CH_3CH_2 , $^3J_{(\text{HH})} = 6.9$ Hz), 0.88 (d, 3 H, CH_3CH , $^3J_{(\text{HH})} = 6.6$ Hz), 1.23 (m, 16 H, CH_2 -Kette), 1.56-1.62 (m, 2 H, $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{CH}_2$), 1.68 (s, 3 H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$), 1.80-2.11 (m, 3 H, $\text{CHCH}_2\text{C}=\text{C}$), 2.28 (t, 2 H, $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}$, $^3J_{(\text{HH})} = 7.5$ Hz), 3.80-3.96 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{O}$), 4.66, 4.74 (2x s, 2 H, $\text{CH}_2=\text{C}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100.625 MHz, CDCl_3) : δ = 14.34 (CH_3CH_2), 16.99-34.62 (13 Signale, CH_2 -Kette, $\text{CH}_3\text{C}=\text{C}$, CH_3CH), 42.32 ($\text{CH}_2\text{C}=\text{C}$), 69.10 (CH_2O), 112.33 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 143.61 ($\text{CH}_2=\text{C}$), 174.21 (CO_2R).

IR (Film) : 3070 (w, v CH olefin.), 2990-2820 (vs, v CH aliphat.), 1730 (vs, v C=O), 1645 (m, v C=C), 1450 (s, δ CH aliphat.), 1170 (s, br, v C-O-C), 880 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei: 1370 (m), 1350 (w), 1110 (m), 1070 (w), 1000 (m, br), 720 (w) cm^{-1} .

9.10.4 (2*S*)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol (*S*)-**86**

326 mg (1.1 mmol) (*S*)-2-(2-Methylen)-4-lauroylmethyl-pentan (*S*)-**85** wurden in wässrigem Methanol (90%) mit 500 mg Natriumhydroxyd 2 Tage bei Raumtemperatur und 2 Stunden bei 50 °C gerührt. Anschließend wurde etwas Methanol und Wasser zugefügt und dreimal mit einer Mischung aus Diethylether:Pentan = 1:6 extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum vorsichtig eingeeengt. Erhalten wurden 70 mg (56%) einer farblosen Flüssigkeit.

R_f (Diethylether:Pentan = 1:2) = 0.35

GC(13): R_t = 3.1 min (97%)

[α]_D = - 6.6 ° (c = 3.5, CH₂Cl₂)

[α]₃₆₅ = - 18.8 ° (c = 3.5, CH₂Cl₂)

Lit. (Evans D.A. 1991): [α]_D = - 3.9 ° (c = 4.1, CH₂Cl₂)

¹H-NMR (400.13 MHz, CDCl₃) : δ = 0.92 (d, 3 H, CH₃CH, ³J_(HH) = 6.5 Hz), 1.83-1.92 (m, 2 H, CH₂C=C), 1.95 (t 1 H, OH, ³J_(HH) = 5.7 Hz), 2.13-2.19 (m, 2 H, CH), 3.41-3.55 (m, 2 H, CH₂OH), 4.73, 4.78 (2x s, 2 H, CH₂=C).

Lit. (Evans D.A. 1991): δ = 0.89 (d, 3 H, ³J_(HH) = 6.5 Hz), 1.73 (s, 3 H), 1.81-1.91 (m, 2 H), 2.09-2.18 (m, 1 H), 2.64 (br., s, 1 H, OH), 3.42-3.50 (2 H), 4.71, 4.76 (2x s, 2 H)

¹³C{¹H}-NMR (100.625 MHz, CDCl₃) : δ = 16.51 (CH₃CH), 22.15 (CH₃C=C), 33.55 (CH), 42.25 (CH₂C=C), 68.21 (CH₂OH), 111.61 (CH₂=C), 144.37 (CH₂=C).

Lit. (Evans D.A. 1991): δ = 16.6, 22.2, 33.6, 42.2, 68.0, 111.7, 144.3

IR (Film) : 3550-3100 (vs, br, v OH), 3070 (m, v CH olefin.), 2990-2800 (vs, v CH aliph.), 1645 (s, v C=C), 1450 (s, δ CH aliph.), 1370 (s, δ CH₃), 880 (s, δ CH olefin.), weitere Banden bei: 1030 (vs), 935 (w), 840 (w), 810 (w) cm⁻¹.

Den spektroskopischen Daten zufolge handelt es sich eindeutig um die literaturbekannte Verbindung (2*S*)-2,4-Dimethylpent-4-en-1-ol. Der Drehwert weicht von dem Literaturwert ab, die Enantiomerenreinheit ist jedoch in der Literatur nicht dokumentiert.

10 Literaturliste

Ader U. 1992 I-III

Ader U., Schneider M. P., *Tetrahedron: Asymmetry* **3** (1992) I: 201, II: 205, III: 521

Alcaraz M.-L. 1996

Alcaraz M.-L., Peng L. Klotz P., Goeldner M., *J. Org. Chem.* **61** (1996) 192

Andersch P. 1995

Andersch P., *Dissertation*, Bergische Universität-GH-Wuppertal (1995)

Andersch P., Jakob B. 1997 a)

Andersch P., Jakob B., Schiefer R., Schneider M.P., in: *Molecular Mechanisms of Signalling and Membrane Transport*, Edited by Wirtz K.W.A., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1997

Andersch P., Jakob B. 1997 b)

Andersch P., Jakob B., Haase B., Schneider M., *Indian J. Chem.* **36B** (1997) 981

Berdel W.E. 1994

Berdel W.E., *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **10** (1994) 175

Bergbreiter C.H. 1988

Bergbreiter C.H., Wong C.H., *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 7200

Berger M. 1991a-b

Berger M., Schneider M., *Biotechnol. Lett.* **13** (1991) a) 333, b) 641

Berger M. 1993

Berger M., *Dissertation*, Bergische Universität-GH-Wuppertal (1993)

Berger M. et. al. 1994

Berger M., Jakob B., Schneider M.P., *Bioorg. & Med. Chem.* **2**(7) (1994) 573

Berger M., Jakob B. 1993

Berger M., Jakob B., Schneider M. P., *Proceedings Food Ingredients Europe (FIE) Paris* (1993) 220

Berggren M.I. 1993

Berggren M.I., Gallegos A., Dressler L.A., Modest E.J., Powis G., *Cancer Res.* **53** (1993) 4297

Berkovic D. 1995

Berkovic D., Grunwald U., Menzel W., Unger C., Hiddemann W., Fleer E.A.M., *Eur. J. Cancer* **31**:12 (1995) 2080

Berridge M.J. 1987

Berridge M.J., *Ann. Rev. Biochem.* **56** (1987) 159

Billington D.C. 1993

Billington D.C., in: *The Inositol Phosphates - Chemical and Biological Significance*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim (1993)

Borgström B. 1977

Borgström B., Donnér J., *FEBS Lett.* **83** (1977) 23

Brady L. 1990

Brady L. Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Høge-Jensen B., Nørskov L., Thim L., Menge U., *Nature* **343** (1990) 767

Breitgoff D. 1989

Breitgoff D., *Dissertation*, Bergische Universität-GH-Wuppertal (1989)

Briggs J. C. 1992

Briggs J. C., *Carbohydr. Res.* **234** (1992) 23

Carlsen P. H. J. 1981

Carlsen P. H. J., Katsuki T., Martin V. S., Sharpless K. B., *J. Org. Chem.* **46** (1981) 3936

Chao W. 1993

Chao W., Olson M.S., *Biochem. J.* **292** (1993) 617

Commenil P. 1995

Commenil P., Belingheri L., Sancholle M., Dehorter B., *Lipids* **30** (1995) 351

Crispino G.A. 1993

Crispino G.A., Jeong K.-S., Kolb H.C., Wang Z.-M., Xu D., Sharpless K.B., *J. Org. Chem.* **58** (1993) 3785

Crossley A. 1959

Crossley A., Freeman P., Hudson J. F., Pierce J. H., *J. Chem. Soc.* (1959) 760

Crout D. H. C. 1989

Crout D. H. C., Christen M. in R. Scheffold (ed), *Modern Synthetic Methods*, Vol 5, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1989 p 1

Desnuelle P. 1972

Desnuelle P., in P.D. Boyer (ed.), *The Enzymes*, Vol 7, Academic Press, New York 1972 p 575

Dijkman R. 1990

Dijkman R., Dekker N., de Haas G. H., *Biochim. Biophys. Acta* **1043** (1990) 67

Dijkstra B.W. 1981

Dijkstra B.W., Kalk K.H., Hol W.G.J., Drenth J., *Biol.* **147** (1981) 97

Eibl. H. 1988

Eibl. H., Woolley P., *Chem. Phys. Lipids* **47** (1988) 63

Ergan F. 1988

Ergan F., Trani M., André G., *Biotechnol. Lett.* **10** (1988) 629

Ergan F. 1990

Ergan F., Trani M., André G., *Biotechnol. Bioeng.* **35** (1990) 195

Erukulla R. K. 1994

Erukulla R. K., Byun H.-S., Bittman R., *Tetrahedron Lett.* **35**:32 (1994) 5783

Evans D.A. 1991

Evans D.A., Polniaszek R.P., DeVries K.M., Guinn D.E., Mathre D.J., *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 7613

Fu X. 1995

Fu X., Zhu X., Gao K. Duan J., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72** (1995) 527

Fujimura T. 1991

Fujimura T., Aoki S., Nakamura E., *J. Org. Chem.* **56**:8 (1991) 2809

Furuta K. 1986

Furuta K., Iwanaga K., Yamamoto H., *Tetrahedron Lett.* **27** (1986) 4507

Gelb M.H. 1986

Gelb M.H., *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 3146

Ghorage A. 1989.

Ghorage A., Kumar G.S., *J. C. S. Chem. Commun.* (1989) 1533

Goergens U. 1991

Goergens U., Schneider M. P., *J. C. S. Chem. Commun.* (1991) 1064

Golec J.M.C. 1992

Golec J.M.C., Hedgecock C.J.R., Kennewell P.D., *Tetrahedron Lett.* **33**:4 (1992) 547

Gololobov M.Y. 1988

Gololobov M.Y., Borisov I.L., Belikov V.M., Svedas V.K., *Biotechnol. Bioeng.* **32** (1988) 866

Grieco P.A. 1977

Grieco P.A., Nishizawa M., Oguri T., Burke S.D., Marinovic N., *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 5773

Gulomova K. 1996

Gulomova K., Ziomek E., Schrag J.D., Davranov K., Cygler M., *Lipids* **31** (1996) 375

Hansen W.J. 1982

Hansen W.J., Murari R., Wedmid Y., Baumann W.J., *Lipids* **17** (1982) 453

Hansley V. L. 1935

Hansley V. L., *J. Amer. Chem. Soc.* **53** (1935) 2303

Hartmann H. 1987

Hartmann H., Hady A.F.A., Sartor K., Weetmann J., Helmchen G., *Angew. Chem.* **99** (1987) 1188

Helmchen G. 1986

Helmchen G., Karge R., Weetmann J., in: *Modern Synthetic Methods*, Scheffold R. (Ed.), Springer, Heidelberg, 1986, vol. **4** p. 262

Jaeger K.E. 1994 a)

Jaeger K.E., Ransac S., Koch H.B., Ferrato F., Dijkstra B.W., *FEBS Lett.* **332** (1994) 143

Jaeger K.E. 1994 b)

Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Vanheuvcl M., Missct O., *FEMS Microbiol. Rev.* **15** (1994) 29

Jakob B. 1992

Jakob B. *Diplomarbeit*, Bergische Universität-GH-Wuppertal (1992)

Jensen R.G. 1982

Jensen R.G., Dejong F.A., Clarck R.M., Palmgren L., Liao T.H., Hamosh M., *Lipids* **17** (1982) 570

Jensen R.G. 1983

Jensen R.G., Dejong F.A., Clarck R.M., *Lipids* **18** (1983) 239

Jia C.1993

Jia C., Haines A.H., *J. Chem. Perkin Trans. 1* (1993) 2521

Kagan H.B. 1990

Kagan H.B., *New J. Chem.*, **14** (1990) 453

Khor H.T. 1986

Khor H.T., Tan N.H., Chua C.L., *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **63** (1986) 538

Kim Ui T. 1991

Kim Ui T., Bhatia S. K., Hajdu J., *Tetrahedron Lett.* **32:45** (1991) 6521

Kirchner G. 1985

- Kirchner G., Scollar M.P., Klibanov A.M., *J. Amer. Chem. Soc.* **107** (1985) 7072
- Klibanov A.M. 1986**
- Klibanov A.M., *Chemtech* **16** (1986) 354
- Kodali D.R. 1990**
- Kodali D.R., Tercyak A., Fahey D. A., Small D. M., *Chem. Phys. Lipids* **52** (1990) 163
- Kunz H. 1987**
- Kunz H., Müller B., Schanzenbach D., *Angew. Chem.* **99** (1987) 269
- Larsson A.L.E. 1997**
- Larsson A.L.E., Persson B.A., Bäckvall J.-E., *Angew. Chem.* **109:11** (1997) 1256
- Laumen K. 1987**
- Laumen K., *Dissertation*, Bergische Universität-GH-Wuppertal (1987)
- Laumen K. 1988**
- Laumen K., Schneider M. P., *J. C. S. Chem. Commun.* (1988) 598
- Lindh I. 1989**
- Lindh I., Stawiński J., *J. Org. Chem.* **54** (1989) 1338
- Lobell M. 1993**
- Lobell M., *Dissertation* UNI-GHS-Wuppertal 1993
- Macrae A.R. 1983**
- Macrae A.R., *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **60** (1983) 291
- Maitra U. 1993**
- Maitra U., Mathivanan P., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1993) 1469
- Martinelle M. 1995**
- Martinelle M., Holmquist M., Hult K., *Biochim. Biophys. Acta* **1258** (1995) 272
- Martinez C. 1992**
- Martinez C., De Geus P., Lauwereys M., Matthyssens G., Cambillau C., *Nature* **356** (1992) 615
- Mase T. 1995**
- Mase T., Matsumiya Y., Matsuura A., *Biosci. Biotech. Biochem.* **59** (1995) 329
- Mattson F. H. 1962**
- Mattson F. H., Volpenheim R. A. *J. Lipid Res.* **3** (1962) 281
- Mischitz M. 1991**
- Mischitz M., Pöschl U., Faber K., *Biotechnol. Lett.* **13** (1991) 653
- Miyashita A. 1994**

Miyashita A., Suzuki Y., Iwamoto K.-i., Higashino T., *Chem. Pharm. Bull.* **42**:12 (1994) 2633

Noble M. 1994

Noble M., Cleasby A., Johnson L.N., Egmond M. R. Frenken L.G.J., *Protein Eng.* **7** (1994) 559

Ohno M.1986

Ohno M., Fujita K., Shiraiwa M., Izumi A., Kobayashi S., Yoshiwara H., Kudo I., Inoue K., Nojima S., *J. Med. Chem.* **29** (1986) 1814

Organikum 1986

Organikum, 16. Auflage, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1986

Österberg E. 1988

Österberg E., Ristoff C., Holmberg K., *Tenside Surfactants Detergents* **25** (1988) 293

Ostermann G. 1991

Ostermann G., Hofmann B., Kertscher H.-P., Till U., *J. Lip. Med.* **3** (1991) 225

Paltauf F. 1984

Paltauf F., Mangold H.K., in: *Ether Lipids - Biochemical and Biomedical aspects*, Academic Press, New York, London 1984 p 49, 211

Peters H. 1997

Peters H., *Diplomarbeit*, Bergische Universität-GH-Wuppertal (1997)

Poll T. 1985

Poll T., Sobczak A., Hartmann H., Helmchen G., *Tetrahedron Lett.* **26** (1985) 3095

Ransac S. 1991

Ransac S., Rogalska E., Gargouri Y., Deveer A.M.T.J., Paltauf F., Gancet C., Dijkman R., de Haas G.H., Verger R., *Steroselectivity of Lipases*, in: *Lipases : structure, mechanism and genetic engineering* / CEC, GBF monographs Vol 16, Ed. by R.D. Schmidt - Weinheim ; New York : Basel ; Cambridge : VCH 1991 p 117

Ringsdorf H. 1988

Ringsdorf H., Schlarb B., Venzmer J., *Angew. Chem.* **100** (1988) 118

Rogalska E. 1993

Rogalska E., Cudrey C., Ferrato F., Verger R., *Chirality* **5** (1993) 24

Rühlmann K. 1971

Rühlmann K., *Synthesis* (1971) 236

Santaniello E. 1992

Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P., Manzocchi A., *Chem. Rev.* **92** (1992) 1071

Sarda L. 1958

Sarda L., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta* **21** (1958) 349

Schneider M. P. 1992

Schneider M. P., Goergens U., *Tetrahedron: Asymmetry* **3** (1992) 525

Shing T. K. M. 1994

Shing T. K. M., Tai V. W.-F., Tam E. K. W. *Angew. Chem.* **106**:22 (1994) 2408

Smith W.L. 1985

Smith W.L., Borgeat P., in: *Biochemistry of Lipids and Membranes*, Vance D.E., Vance J.E. (Hrsg.) Menlo Park (Benjamin/Cummings) 1985 p 325

Stanley H. P. 1993

Stanley H. P. *Carbonyl Methylenation and Alkylidenation using Titanium-Based Reagents* in: *Organic Reactions* Vol. 43, Edited by Leo A. Paquette et. al. - John Wiley & Sons, Inc (1993), p.1

Stetter H. 1980

Stetter H., Basse W., Nienhaus J., *Chem. Ber.* **113**:2 (1980) 690

Stocklein W. 1993

Stocklein W., Sztajer H., Menge U., Schmidt R.D., *Biochim. Biophys. Acta* **1168** (1993) 181

Stryer L. 1991 a-c

Stryer L., in: *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, New York 1991, a) s. 985, b) s. 297, c) s. 1021

Tagaki T. 1987

Tagaki T., Itabashi Y., *Lipids* **22**:8 (1987) 596

Theil F. 1997

Theil F., in: *Enzyme in der Organischen Synthese*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin Oxford (1997) 17

Tietze L. F. 1991

Tietze L. F., Eicher Th, in: *Reaktionen und Synthesen*, Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York (1991), s. 269

Tornquist H. 1976

Tornquist H., Blefrage P., *J. Biol. Chem.* **251** (1976) 813

Tsunoda T. 1980

Tsunoda T., Suzuki M., Noyori R., *Tetrahedron Lett.* **21** (1980) 1357

Ukawa K. 1989

Ukawa K. et. al., *Chem. Pharm. Bull.* **37** (1989) 1249

Ulbrich-Hofmann R. 1998

Ulbrich-Hofmann R., Haftendorn R., Dittrich N., Hirche F., Aurich I., *Fett/Lipid* **100** (1998) 114

van Tilbeurgh H. 1993

van Tilbeurgh H., Egloff M.-P., Martinez C., Rugani N., Verger R., Cambillau, *Nature* **362** (1993) 814

Villeneuve P. 1995

Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J. *Lipids* **76** (1995) 109

Villeneuve P. 1997

Villeneuve P., Foglia T.A., *Inform* **8:6** (1997) 640

Waldmann H. J. 1991

Waldmann H. J., *Kontakte (Darmstadt)* **2** (1991) 33

Wang Y.F. 1984

Wang Y.F., Sih C.J., *Tetrahedron Lett.* **25** (1984) 4999

Winkler F.K. 1990

Winkler F.K., D'Arcy A., Huziker W., *Nature* **343** (1990) 771

Wong C.H. 1986

Wong C.H., Sweers, H.M., *J. Amer. Chem. Soc.* **108** (1986) 6421

Woolley P. 1988

Woolley P., Eibl, H., *Chem. Phys. Lipids* **47** (1988) 55

Yamagushi S. 1991

Yamagushi S., Mase T., *Appl. Microbial Biotechnol.* **34** (1991) 720

Yu L. 1990

Yu L., Deems R. A., Hajdu J., Dennis E. A., *J. Biol. Chem.* **265** (1990) 2657

Yuan W. 1987

Yuan W., Bermann R.J., Gelb M.H., *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 8071