



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Enzym katalysierte Reduktion von monosubstituierten
Acetophenonen mittels Xylose Reduktase aus *Candida tenuis*“

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2008

Verfasser:	Michael Vogl
Matrikel-Nummer:	0047947
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A419 Chemie
Betreuer:	Univ.-Ass. Dipl.-Chem. Dr. habil. Lothar Brecker

Als erstes möchte ich den Menschen danken, die nicht direkt mit dieser Arbeit in Verbindung stehen, mich aber auf meinem Weg dorthin, und auch während dessen, begleitet haben.

Somit danke ich zuerst meinen Eltern, die mich stets auf meinen Wegen unterstützt haben für den familiären und finanziellen Rückhalt, wodurch mir das Chemiestudium erst ermöglicht wurde. Weiters möchte ich meiner Freundin danken, die während dieser Zeit immer für mich da war.

Meinem Betreuer Lothar Brecker gilt spezieller Dank in vielerlei Hinsicht. Zum Einen für die Themenstellung, die mir ein weites Spielfeld geboten und sich nicht nur auf die Organische Chemie beschränkt hat, sondern auch weitere Einblicke in die Biochemie und Analytische Chemie zugelassen hat. Weiters für seine Betreuung bei der Arbeit im Allgemeinen und der kompetenten, fachlichen Hilfestellungen, die ich jeder Zeit in Anspruch nehmen konnte. Nicht zuletzt möchte ich mich für seine Unterstützung abseits der Diplomarbeit bedanken, die nicht selbstverständlich ist.

Bei Regina Kratzer möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und „außer-chemischen“ Hilfestellungen, sowie für die besondere Leihgabe, das *CtXR* Enzym, bedanken.

Für die entspannte Arbeitsatmosphäre im Labor danke ich Richard Turetschek und Christian Aichinger, die auch für die eine oder andere Ablenkung im Laboralltag gesorgt haben. Auch gilt mein Dank Michael Abraham, der mich bei so manchen Messungen unterstützt und mir bei technischen Problemen geholfen hat.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren möchte ich Susanne Felsing danken, die sich trotz „Messzeit-Engpass“ oft auch spontan für das Vermessen meiner Proben Zeit genommen hat

Michael Widhalm möchte ich vor allem für die Bereitstellung von Chemikalien danken.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Enzyme.....	1
1.1.1 Enzyme in der Chemie.....	1
1.1.2 Xylose Reduktase aus <i>Candida tenuis</i>	3
1.2 Chiralität.....	4
1.2.1 Was ist Chiralität.....	4
1.2.2 Chiralität in der Chemie und Natur.....	6
1.2.3 Mögliche Herstellung und Reinigung von enantiomerenreinen Verbindungen.....	9
1.3 Aufgabenstellung dieser Arbeit.....	12
2 Allgemeiner Teil und angewandte Methoden.....	13
2.1 Synthese.....	13
2.1.1 Geplante Substrate.....	14
2.1.2 Konzepte zur Synthese der Substrate.....	15
2.2 σ -Hammet-Gleichung als Auswahlkriterium für die Substanzen.....	17
2.3 Aktivitätsmessung.....	18
2.4 NMR.....	19
2.4.1 Warum D ₂ O und CDCl ₃	20
2.4.2 <i>In situ</i> NMR.....	20
2.4.3 Deuteriumeinbau durch Tautomerie.....	21
2.4.4 STD-NMR.....	21
2.5 IR.....	23
2.6 Bestimmung der Absolutkonfiguration.....	23
2.6.1 Bestimmung mittels Mosherester.....	23
2.6.2 Bestimmung mittels HPLC.....	24
2.6.3 Drehwert.....	25
3 Experimenteller Teil.....	27
3.1 Herstellung von <i>para</i> -Bromacetophenon [10].....	28
3.1.1 Durchführung.....	28
3.1.2 Analytische Daten.....	29
3.2 Herstellung von <i>ortho</i> - [12] und <i>para</i> -Hydroxyacetophenon [13].....	30

3.2.1 Durchführung	30
3.2.2 Analytische Daten	31
3.3 Herstellung von <i>ortho</i> -Methoxyacetophenon [18]	32
3.3.1 Durchführung	32
3.3.2 Analytische Daten	32
3.4 Herstellung von <i>para</i> -Methoxyacetophenon [19]	33
3.4.1 Durchführung	33
3.4.2 Analytische Daten	33
3.5 Herstellung von <i>meta</i> -Nitroacetophenon [20]	34
3.5.1 Durchführung	34
3.5.2 Analytische Daten	34
3.6 Herstellung von <i>para</i> -Nitroacetophenon [23]	36
3.6.1 Durchführung	36
3.6.2 Analytische Daten	36
3.7 Herstellung von <i>ortho</i> -Nitroacetophenon [24]	37
3.7.1 Durchführung	37
3.7.2 Analytische Daten	37
3.8 Herstellung von <i>meta</i> -Iodacetophenon [25]	38
3.8.1 Durchführung	38
3.8.2 Analytische Daten	38
3.9 Herstellung von <i>ortho</i> -Iodbenzoesäure [26]	39
3.9.1 Durchführung	39
3.9.2 Analytische Daten	39
3.10 Herstellung von <i>meta</i> -Bromacetophenon [28]	40
3.10.1 Durchführung	40
3.10.2 Analytische Daten	40
3.11 Herstellung von <i>ortho</i> -Bromacetophenon [29]	41
3.11.1 Durchführung	41
3.11.2 Analytische Daten	41
3.12 Herstellung von <i>ortho</i> -Brombenzoesäure [30]	42
3.12.1 Durchführung	42

3.12.2 Analytische Daten	42
3.13 Herstellung des <i>ortho</i> -Iodbenzoesäurechlorids [27].....	43
3.13.1 Durchführung	43
3.13.2 Analytische Daten	43
3.14 Herstellung des <i>ortho</i> -Brombenzoesäurechlorids [31]	44
3.14.1 Durchführung	44
3.14.2 Analytische Daten	44
3.15 Herstellung des Methylgrignard-Reagenzes [16].....	45
3.15.1 Darstellung.....	45
3.15.2 Analytische Daten	45
3.16 Herstellung von <i>ortho</i> -Iodacetophenon [32] aus <i>ortho</i> -Iodbenzoesäurechlorids [27].....	46
3.16.1 Durchführung	46
3.16.2 Analytische Daten	46
3.17 Herstellung von <i>ortho</i> -Bromacetophenon [29] aus <i>ortho</i> -Brombenzoesäurechlorid [31] .	47
3.17.1 Durchführung	47
3.17.2 Analytische Daten	47
3.18 Herstellung von <i>ortho</i> -Cyanoacetophenon [35]	48
3.18.1 Durchführung	48
3.18.2 Analytische Daten	49
3.19 Herstellung von <i>meta</i> -Cyanoacetophenon [36].....	50
3.19.1 Durchführung	50
3.19.2 Analytische Daten	50
3.20 Herstellung von <i>meta</i> -Thioaminoacetophenon [37]	51
3.20.1 Durchführung	51
3.20.2 Analytische Daten	51
3.21 Herstellung von <i>ortho</i> -Acetoxyacetophenon [38]	52
3.21.1 Durchführung	52
3.21.2 Analytische Daten	52
3.22 Herstellung von <i>para</i> -Acetoxyacetophenon [39]	53
3.22.1 Durchführung	53
3.22.2 Analytische Daten	53

3.23 Herstellung von <i>meta</i> -Acetaminoacetophenon [40]	54
3.23.1 Durchführung	54
3.23.2 Analytische Daten	54
3.24 Herstellung von <i>ortho</i> -Acetaminobenzoessäure [34]	55
3.24.1 Durchführung	55
3.24.2 Analytische Daten	55
3.25 Versuch zur Herstellung von <i>ortho</i> -Acetaminoacetophenon [33] aus <i>ortho</i> -Acetaminobenzoessäure [34].....	56
3.25.1 Durchführung	56
3.25.2 Ausbeute.....	56
3.25.3 Analytische Daten	56
3.26 Herstellung des Anthranilsäurechlorids [41]	57
3.26.1 Durchführung	57
3.26.2 Analytische Daten	57
3.27 Versuch zur Herstellung des Acetaminoanthranilsäurechlorids [42]	58
3.27.1 Durchführung	58
3.27.2 Analytische Daten	58
3.28 Herstellung von <i>ortho</i> - [29] und <i>para</i> -Bromacetophenon [10]	59
3.28.1 Durchführung	59
3.28.2 Analytische Daten	59
3.29 Herstellung des Mosheresters	60
3.29.1 Durchführung	60
3.29.2 Ausbeute.....	60
3.29.3 Analytische Daten	61
3.30 Chloracetophenon	62
3.30.1 Analytische Daten	62
3.31 Aminoacetophenon	64
3.31.1 Analytische Daten	64
3.32 <i>ortho</i> -Fluoracetophenon [8]	66
3.32.1 Analytische Daten	66
3.33 <i>para</i> -Cyanoacetophenon [9]	67

3.33.1 Analytische Daten	67
3.34 <i>para</i> -Thioaminoacetophenon [47].....	68
3.34.1 Analytische Daten	68
3.35 Ganzzellumsetzungen von <i>ortho</i> -Chlor- [1] und <i>ortho</i> -Bromacetophenon [29].....	69
3.35.1 Durchführung	69
3.35.2 Analytische Daten	69
3.36 Aktivitätsmessung	70
3.36.1 Durchführung	70
3.37 <i>In situ</i> NMR-Messungen.....	72
3.37.1 Durchführung	72
3.37.2 Auswertung.....	72
3.38 STD-NMR-Messungen.....	73
3.38.1 Auswertung.....	73
4 Ergebnisse	75
4.1 Synthese.....	75
4.2 Aktivitätsmessung und σ -Hammet-Werte	77
4.3 NMR-Shifts gegen Aktivitätsdaten und σ -Hammet-Werte.....	78
4.3.1 NMR-Shifts gegen σ -Hammet-Werte	79
4.3.2 NMR-Shifts gegen katalytische Aktivität.....	81
4.4 IR-Werte der Carbonylbande gegen Aktivitätsdaten und σ -Hammet-Werte.....	83
4.4.1 IR-Werte der Carbonylbande gegen σ -Hammet-Werte	83
4.4.2 IR-Werte der Carbonylbande gegen katalytische Aktivität.....	84
4.5 Reaktionsverfolgung mittels <i>in situ</i> NMR	84
4.6 Bindungsstudie mittels STD-NMR-Spektroskopie.....	86
4.7 Keto-Enol-Tautomerie	87
4.8 Absolutkonfiguration nach Mosher, HPLC und Drehwert.....	88
4.8.1 Absolutkonfiguration nach Mosher	89
4.8.2 Absolutkonfiguration mittels HPLC.....	90
4.8.3 Drehwert	90
5 Diskussion	91

6 Zusammenfassung	99
7 Abstract	101
8 Literaturverzeichnis.....	103

1 Einleitung

1.1 Enzyme

Enzyme sind Makromoleküle, die in biologischen Systemen chemische Reaktionen spezifisch katalysieren. Sie stellen eine Untergruppe der Proteine dar. Obwohl die Menschheit die positiven Eigenschaften von Enzymen schon seit Langem für diverse Zwecke genutzt hatte, begann deren Studium erst im Jahr 1789, als Antoine Lavoisier Zucker durch Hefe abbaute und dabei die Hauptprodukte CO_2 und Ethanol nachwies.¹ Im Jahr 1836 zeigte Jacob Berzelius, dass das Enzym Diastase Stärke effizienter hydrolysiert als Schwefelsäure.² Louis Pasteur glaubte, dass diese Prozesse nur in lebenden Zellen ablaufen können, hingegen postulierte Justus Liebig, dass chemische Substanzen biologische Vorgänge bewirken.^{3,4} Diese Verbindungen wurden „Fermente“ genannt und 1878 von Friedrich Wilhelm Kühne in Enzyme (griechisch *en*, in und *zyme*, Hefe) umbenannt.⁵ Erst 1897 wurde durch Eduard Buchner der erste zellfreie Hefeextrakt gewonnen, der Glucose zu Ethanol vergären lässt.⁶ James Sumner konnte 1926 erstmalig ein Enzym, die Schwertbohnen-Urease, kristallisieren.⁷ Jedoch waren die Kristalle nicht vollständig frei von anhaftenden Proteinen und somit konnte die Proteinnatur der Enzyme nicht zweifelsfrei bewiesen werden. In der Mitte der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts zeigten John Northrop und Moses Kunitz einen Zusammenhang der enzymatischen Aktivität von kristallinen Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin mit den jeweiligen Proteinmengen.⁸ Heutzutage ist die Zugehörigkeit der Enzyme zu den Proteinen vollständig geklärt. Die wesentlichen Erkenntnisse über Enzyme stammen aus der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts. So wurde erst 1963 die erste Aminosäure-Sequenz eines Enzyms entschlüsselt und 1965 die erste Röntgenstruktur aufgeklärt.^{9,10}

1.1.1 Enzyme in der Chemie

Enzyme sind in der Organischen Chemie auf Grund ihrer herausragenden Eigenschaften von großer Bedeutung. Sie weisen eine hohe katalytische Aktivität auf und können die Reaktionsgeschwindigkeit, verglichen mit der nicht enzymatisch katalysierten Reaktion, um einen Faktor von bis zu 10^{12} erhöhen.¹¹ Somit ist das Interesse am Einsatz von Enzymen sowie an weiteren Informationen über diese Molekülklasse sehr groß. Da Enzyme in lebenden Zellen gebildet werden, können bei Reaktionen die ganzen Zellen eingesetzt werden. Diese Methode findet zum Beispiel Anwendung beim Brauen von Bier oder beim

Brot backen.¹² Viele Enzyme, die aus Zellen extrahiert und gereinigt werden, verlieren nichts von ihrer Aktivität und können isoliert für chemische Umsetzungen eingesetzt werden.

Solch isolierte Enzyme weisen eine hohe Chemo Selektivität auf.¹³ So reagiert ein auf die spezifische Umsetzung einer bestimmten funktionellen Gruppe spezialisiertes Enzym nur auf diese eine Gruppe. Weitere, auch chemisch reaktivere funktionelle Gruppen im Substrat werden dabei nicht angegriffen und die Reaktion läuft nur an der enzymespezifischen Funktionalität ab. Ferner zeigen viele Enzyme eine hohe Regioselektivität wenn zwei gleiche funktionelle Gruppen in einem Molekül vorhanden sind. Diese beruht auf der dreidimensionalen Struktur der Makromoleküle. Es gelangen nur jene funktionellen Gruppen an das reaktive Zentrum des Enzyms, die auch die passende räumliche Anordnung im Enzym-Substrat-Komplex aufweisen. Dieses Prinzip wird gerne mit einem Schlüssel und Schloss verglichen.¹⁴

Die Tatsache, dass alle Enzyme nahezu nur aus L-Aminosäuren aufgebaut sind¹⁵ macht sie zu chiralen Katalysatoren; durch diese Eigenschaft sind sie enantioselektiv.¹⁶ Somit eignen sich Enzyme zur Trennung von racemischen Gemischen, wobei der Umsatz eines Enantiomers kinetisch kontrolliert katalysiert wird, während das andere quasi nicht reagiert (kinetische Racemattrennung). Wird ein achiraler Stoff in einer enzymkatalysierten Reaktion zu einer chiralen Substanz umgewandelt, so überwiegt in den meisten Fällen im Produkt ein Enantiomer.

Die Enzyme werden nach der IUPAC und IUBMB in sechs Klassen eingeteilt, welche auch die katalysierten Reaktionen beschreiben.¹⁷

- Oxidoreduktasen sind Enzyme, die Redoxreaktionen katalysieren.
- Transferasen übertragen funktionelle Gruppen (zum Beispiel Aldehyde, Ketone, Alkyle, Glycoside und Phosphate) von einem Substrat auf ein anderes.
- Hydrolasen sind Enzyme, die hydrolytisch Bestandteile von Wasser auf eine Molekülbindung addieren und diese dabei spalten.
- Lyasen sind Enzyme, die komplexe Moleküle spalten oder verknüpfen ohne die Spaltung von Adenosintriphosphat.
- Isomerasen katalysieren Isomerisierungen, wobei chemische Gruppen innerhalb eines Moleküls verschoben werden.
- Ligasen katalysieren die Spaltung oder Verknüpfung komplexer Moleküle unter Spaltung von Adenosintriphosphat.

1.1.2 Xylose Reduktase aus *Candida tenuis*

Das für diese Arbeit verwendete Enzym ist eine Xylose Reduktase (Abbildung 1) aus der Hefe *Candida tenuis* (*CtXR*) und zählt zu den Oxidoreduktasen. Der erste Schritt vom Xylosekatabolismus der Hefe wird von diesem Enzym katalysiert (Abbildung 2).¹⁸ Hierbei wird die offenkettige Form der D-Xylose mit Hilfe eines Koenzyms zu Xylitol reduziert. Das Enzym akzeptiert sowohl NADH als auch NADPH als Koenzym. Dieser Dualismus wurde bisher nur bei wenigen Enzymen beobachtet.¹⁹

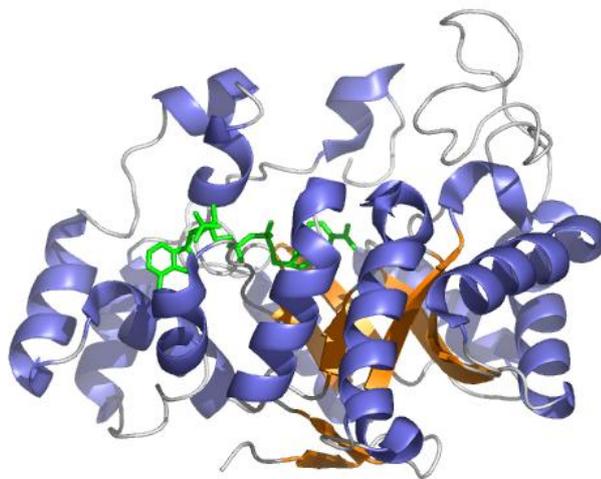


Abbildung 1: Struktur von *CtXR* gebunden an NADP⁺ (grün)²⁰

Untersuchungen der *CtXR* mit anderen möglichen Substraten zeigen, dass die katalytische Wirkung nicht auf die Reduktion von D-Xylose beschränkt ist, sondern auch andere Aldehyde sowie Ketone zu den entsprechenden Alkoholen reduziert werden.²¹ Auch von anderen Enzymen dieser Klasse ist bekannt, dass sie Aldehyde und Ketone, die nicht ihren natürlichen Substraten entsprechen, katalytisch reduzieren.²² Von großem Interesse bei den Umsetzungen mit *CtXR* ist *ortho*-Chloracetophenon [1], da dieses Substrat effizienter als das natürliche Substrat umgesetzt wird und das gebildete Produkt 1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2] ein während der enzymkatalysierten Reaktion erzeugtes Chiralitätszentrum besitzt. Da von vielen Enzymen bekannt ist, enantiomeren angereicherte Verbindungen zu erzeugen, sind der Enantiomerenüberschuss und die Absolutkonfiguration von dem entstandenen chiralen Alkohol ebenso von Interesse.

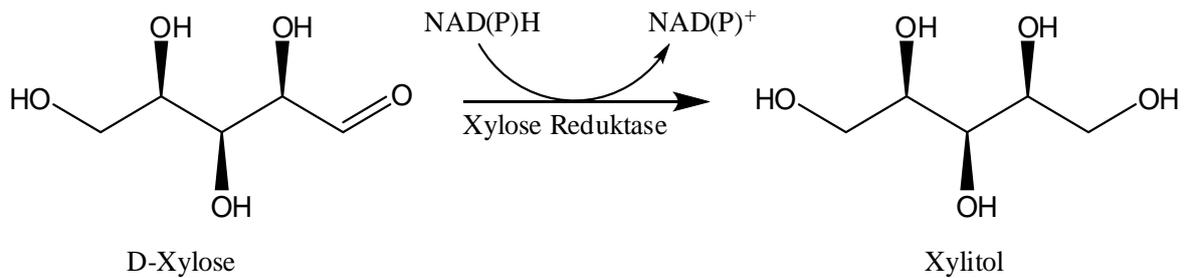


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Reduktion von D-Xylose¹⁹

1.2 Chiralität

1.2.1 Was ist Chiralität

Um den Begriff Chiralität zu beschreiben, ist die Vorstellung vom räumlichen Modell eines Moleküls, welches nur aus Atomen und Bindungen besteht, hilfreich. Mit diesem vereinfachten Molekülmodell wird bestimmt, ob eine symmetrische oder asymmetrische Struktur vorliegt. Symmetrisch sind jene Moleküle, die sich durch eine oder mehrere der folgenden Symmetrieeoperationen mit dem Ausgangszustand zur Deckung bringen lassen:

- Drehung um eine zwei- oder mehrzählige Symmetrieachse
- Spiegelung an einer Symmetrieebene
- Kombination einer Drehung und Spiegelung

Trifft keine dieser drei Möglichkeiten auf das Molekül zu, so wird es als asymmetrisch bezeichnet. Für die Existenz von Chiralität ist Asymmetrie eine hinreichende aber nicht notwendige Bedingung. Notwendig ist hingegen die Tatsache, dass das betrachtete Objekt mit seinem Spiegelbild nicht zur Deckung gebracht werden kann. Wird das Molekül an einer Ebene gespiegelt und entspricht dieses nicht mehr dem Ausgangsmolekül, wird diese topologische Eigenschaft „Händigkeit“ oder „Chiralität“ genannt (griechisch *chiros*, Hand). Dieser Begriff wird von den menschlichen Händen (Abbildung 3) abgeleitet, da auch diese nicht zur Deckung gebracht werden können. Sie verhalten sich also wie Bild und Spiegelbild zueinander.^{23,24}



Abbildung 3: Die Abdrücke der rechten und linken Hand sind Spiegelbilder²⁵

In der Organischen Chemie stellt ein sp^3 -hybridisierter Kohlenstoff häufig die Ursache der Chiralität von Molekülen dar. Liegt ein Kohlenstoffatom mit vier unterschiedlichen Substituenten vor, so kann keine der zuvor genannten Symmetrioperationen eine Deckung mit sich selbst erzeugen. Das Kohlenstoffatom besitzt folglich eine asymmetrische Umgebung und stellt ein Chiralitätszentrum dar. Zu jeder Verbindung, die ein solches chirales Kohlenstoffatom beinhaltet, gibt es natürlich eine zweite Verbindung, welche sich wie das Spiegelbild zur ersten verhält. Diese beiden Verbindungen werden als Enantiomere bezeichnet.²⁶

Enantiomere unterscheiden sich somit strukturell nur durch ihre räumliche Anordnung und nicht durch ihre Konnektivität, was sie zu Stereoisomeren macht. Nicht nur die Konnektivität ist bei einem Enantiomerenpaar gleich, sondern auch das chemische Verhalten gegenüber achiralen Molekülen sowie das Verhalten in einem NMR-beziehungsweise IR-Spektrometer. Die physikalischen Eigenschaften sind ebenfalls gleich, wobei die Rotation vom linear polarisierten Licht eine Ausnahme darstellt, denn jedes reine Enantiomer bewirkt dessen spezifische Rotation vom gleichen Betrag, aber mit unterschiedlichem Vorzeichen. Diese Eigenschaft wird optische Aktivität genannt. Wird das Licht nach rechts gedreht heißt die Verbindung (+)-Enantiomer, wird es nach links gedreht (-)-Enantiomer. Handelt es sich um ein 1:1 Gemisch aus beiden Enantiomeren, so ist dieses als Racemat oder racemische Mischung bekannt. Diese verfügt über keine optische Aktivität, da sich die spezifischen Rotationen der beiden gegenseitig aufheben. Die spezifische Rotation gibt jedoch keine Information über die Absolutkonfiguration eines Enantiomers, welche die räumliche Anordnung der Substituenten am Kohlenstoffatom beschreibt.^{27,28}

Um die beiden Enantiomere in ihrer Struktur eindeutig zu beschreiben, wurde von Cahn, Ingold und Prelog ein System eingeführt, welches eine Nomenklatur der Enantiomere

ermöglicht. Mit Hilfe dieses CIP-Systems werden die Enantiomere in (*R*) und (*S*) unterteilt. Für diese Einteilung werden die Atome, die sich an den chiralen Kohlenstoff binden, nach ihrer Priorität geordnet, wobei die Ordnungszahl als Prioritätskriterium gilt. Bei Gleichheit der gebundenen Atome werden die jeweils nächsten gebundenen Atome zur Unterscheidung herangezogen. Als Beispiel werden hier die Substituenten Amin, Methyl, Phenyl und Wasserstoff herangezogen. Der Stickstoff aus dem Amin bekommt die höchste Priorität (Ordnungszahl 7) gefolgt von den Kohlenstoffen aus Phenyl (Ordnungszahl 6 und zwei weitere gebundene Kohlenstoffe sowie ein Phantom-Kohlenstoff) und Methyl (Ordnungszahl 6 und drei weitere gebundene Wasserstoffe) sowie Wasserstoff (Ordnungszahl 1). Als Nächstes wird der Substituent mit der niedrigsten Priorität vom Betrachter nach hinten in die Zeichenebene gedreht. In diesem Beispiel handelt es sich dabei um den Wasserstoff. Dann werden die verbleibenden drei Substituenten nach absteigender Priorität verbunden. Beschreibt diese Verbindung eine Bewegung gegen den Uhrzeigersinn so handelt es sich um das (*S*)-Enantiomer, beschreibt es jedoch eine Drehung im Uhrzeigersinn so handelt es sich um das (*R*)-Enantiomer (Abbildung 4).^{27,28}

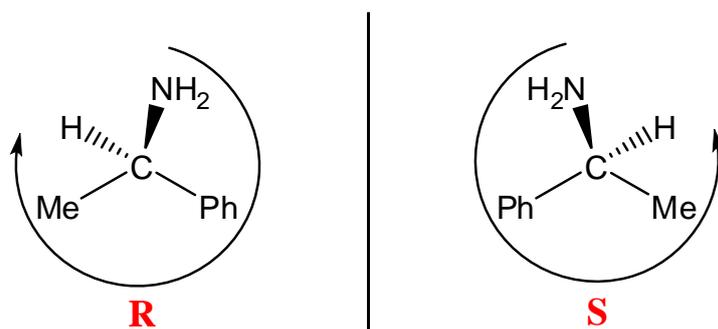


Abbildung 4: Modell von einem (*R*)-Molekül (im Uhrzeigersinn bewegt) und von einem (*S*)-Molekül (gegen den Uhrzeigersinn bewegt).

1.2.2 Chiralität in der Chemie und Natur

Warum ist Chiralität beziehungsweise die Absolutkonfiguration eines Moleküls in der Chemie so bedeutend, wenn die chemischen und skalaren physikalischen Eigenschaften eines Enantiomerenpaars gleich sind? Tritt eine chirale Verbindung mit einer chiralen Umgebung in Interaktion, so verändern sich die chemischen und physikalischen Eigenschaften. Dies geschieht jedoch nicht auf dieselbe Art und Weise, denn jedes Enantiomer interagiert unterschiedlich mit der chiralen Umgebung und bildet somit ein „match“ und ein „mismatch“-Paar.²⁹ So hat das (*S*)-Enantiomer in Verbindung mit einem zweiten reinen

Enantiomer zum Beispiel einen anderen Schmelzpunkt als das (*R*)-Enantiomer mit demselben reinen Enantiomer.

In der belebten Natur finden sich sehr häufig Bedingungen, die eine chirale Umgebung bewirken. Dies ist darauf zurückzuführen, dass quasi nur *L*-Aminosäuren und überwiegend *D*-Saccharide vorkommen. Sämtliche Peptide, Proteine und Glyco-Strukturen liegen daher in enantiomerenreiner Form vor. Diese Verbindungen sind für Bindungs- und Erkennungsprozesse auf molekularer Ebene verantwortlich und können auf Grund ihrer Chiralität nur jeweils ein Enantiomer produktiv binden. Viele Verbindungen in der Natur können also links und rechts unterscheiden. Zur Veranschaulichung dieses Phänomens werden wieder die menschlichen Hände als Beispiel genommen. Werden Handschuhe übergezogen, so passt immer nur ein Handschuh auf eine Hand. Ähnlich verhält es sich in der Natur, jedes Enantiomer hat seine eigene Aufgabe, beziehungsweise Wirkung in Kooperation mit einem passenden Gegenstück.³⁰

Es gibt in der Natur häufig unterschiedliche Wirkungen, die durch die Interaktion von zwei Enantiomeren mit einem oder mehreren Rezeptoren ausgelöst werden. So gibt es mehrere Moleküle, deren Enantiomere einen stark unterschiedlichen Geruch aufweisen. Das (*R*)-Limonen [Ia] riecht beispielsweise nach Orangen und sein Gegenüber, das (*S*)-Limonen [Ib], nach Zitronen.³¹ Ähnliches Verhalten zeigt auch Carvon [II], dessen (*S*)-Enantiomer dem Kümmel seinen charakteristischen Geruch verleiht, während das (*R*)-Enantiomer der Hauptbestandteil im Bouquet der Minze ist.³² Die Verbindungen sind in Abbildung 5 dargestellt.

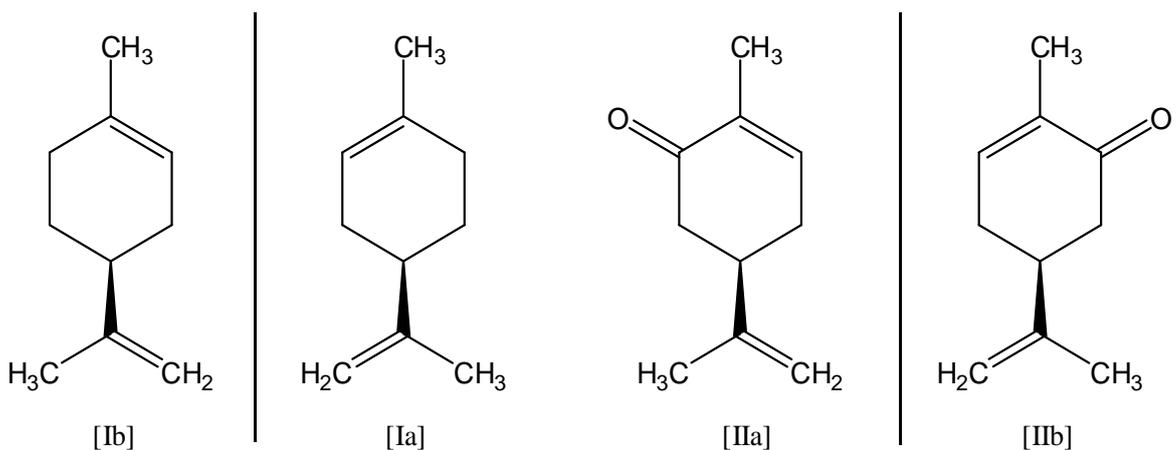
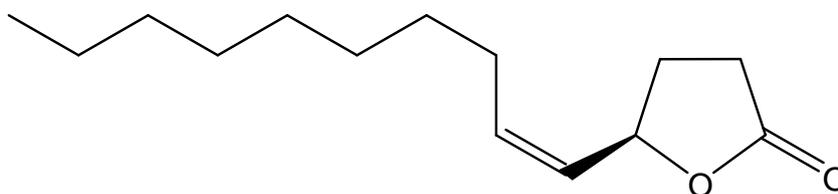


Abbildung 5: (*S*)-Limonen [Ib] Zitronengeruch, (*R*)-Limonen [Ia] Orangengeruch, (*R*)-Carvon [IIa] Pfefferminzgeruch, (*S*)-Carvon [IIb] Kümmelgeruch

Auch im Tierreich werden Enantiomere unterschiedlich aufgenommen. Zum Beispiel sind Pheromone Sexuallockstoffe von Insekten, die auch zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt werden. So wird das Pheromon des Weibchens der Art Japankäfer (*Popilia japonica*) eingesetzt, um die entsprechenden männlichen Käfer in Fallen zu locken. Dieses Pheromon besteht aus dem (R)-Enantiomer des einfachen Lactons (R)-5-(1-Decenyl)-dihydro-2(3H)-furanon [III], wohingegen das (S)-Enantiomer ein Inhibitor des (R)-Enantiomers ist (Abbildung 6). Schon 1 % des falschen Enantiomers zerstört die Wirkung. Ein solches Enantiomerengemisch kann nicht mehr sinnvoll als Lockstoff verwendet werden.³³



[III]

Abbildung 6: Pheromon der Japankäfer (*Popilia japonica*) [III]

Auch in der Pharmazie ist die Chiralität von großer Bedeutung. So kann das falsche Enantiomer in einem Medikament über Leben oder Tod entscheiden. L-Dopa ((S)-3,4-Dihydroxy-phenylalanin) [IV] ist ein Stoff (Abbildung 7), der zur Behandlung von Patienten mit Parkinson-Krankheit eingesetzt wird. Dabei ist ganz besonders darauf zu achten, dass nur das gewünschte Enantiomer verabreicht wird, denn dieses hat den Effekt, dass sich Nerven neu bilden. Das andere ist jedoch toxisch und kann in einer zu hohen Dosierung zum Tode führen. Ein weiteres medizinisches Beispiel ist Fenfluramin [V], dessen (R)-Enantiomer die Produktion des Hormons Serotonin stimuliert, das aber als Racemat vertrieben wurde. Neben der gewünschten Wirkung des Serotonins, ein Gefühl der Zufriedenheit zu bewirken, wurden aber Nebenwirkungen festgestellt, die das (S)-Enantiomer hervorrief. Um diese zu verhindern, wurde das enantiomerenreine (R)-Fenfluramin hergestellt, und unter dem Namen Dexfenfluramin [Va] wieder auf den Markt gebracht (Abbildung 7).

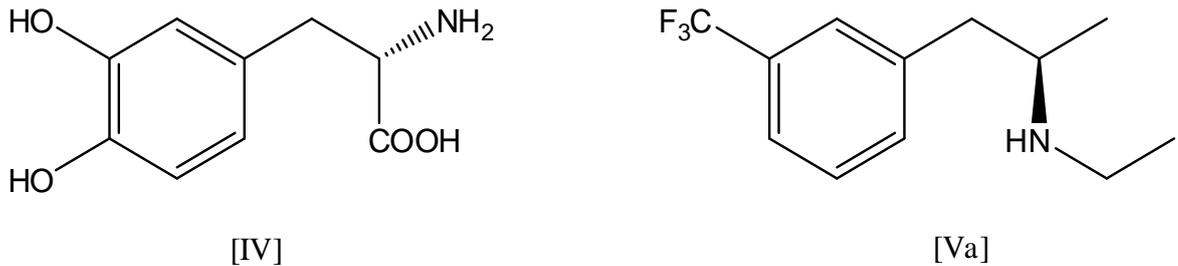


Abbildung 7: L-Dopa [IV], (*R*)-Fenfluramin [Va]

Das sind nur einige der vielen Beispiele, wie chirale Verbindungen in verschiedenen Bereichen zum Einsatz kommen und eine spezielle Wirkung aufweisen. Dabei spielt es eine bedeutende Rolle, welches Enantiomer angewandt wird, damit ein gewünschtes Resultat erzielt wird, denn wie oben erwähnt, kann es dabei auch um Leben oder Tod gehen. Auf Grund dieser Probleme besteht natürlich die Herausforderung, enantiomerenreine Produkte zu erzeugen, sofern diese für die Interaktion mit einer chiralen Umgebung gedacht sind. Wird aus einer achiralen Verbindung eine chirale Verbindung ohne chirale Induktion hergestellt, entsteht ein racemisches Gemisch, dessen chemische und skalare physikalische Eigenschaften ident sind.

1.2.3 Mögliche Herstellung und Reinigung von enantiomerenreinen Verbindungen

Wie gezeigt, ist es von großer Wichtigkeit, Verbindungen, die mit lebenden Organismen interagieren, in enantiomerenreiner Form zu synthetisieren. Aus diesem Grund wurden zwei unterschiedliche Wege entwickelt, um zu enantiomerenreinen Verbindungen zu gelangen. Einer dieser Wege basiert auf der Trennung der racemischen Mischung, der andere auf einen - durch eine chirale Umgebung beeinflussten - Reaktionsverlauf, bei dem nur ein Enantiomer entsteht.

1.2.3.1 Trennung von Enantiomeren

Die Trennung von Enantiomeren ist mit hohem Aufwand verbunden. Um zwei Verbindungen voneinander zu trennen, müssen sie unterschiedliche physikalische Eigenschaften, wie Schmelzpunkt, Siedepunkt oder Löslichkeit aufweisen. Wie bereits erwähnt, sind die chemischen und skalaren physikalischen Eigenschaften von Enantiomeren gleich. Diese können somit über herkömmliche Trennverfahren nicht aufgetrennt werden. Ziel ist es daher, die Eigenschaften der Enantiomere so zu verändern, dass sich diese

voneinander unterscheiden und eine Trennung durchgeführt werden kann. Wird dafür, zum Beispiel, eine racemische Mischung mit einer enantiomerenreinen Verbindung umgesetzt, so haben die entstandenen Diastereomere unterschiedliche Eigenschaften und können getrennt werden. In der Folge muss die eingeführte chirale Hilfsgruppe jedoch wieder abgespalten und aus dem Gemisch entfernt werden.

Eine andere Möglichkeit wird bei der chromatographischen Trennung mittels chiralen Säulenmaterials angewandt. Dabei interagiert das Gemisch mit diesem chiralen Material, das eine unterschiedliche Verweildauer in der Säule bewirkt und dadurch eine Trennung erzielt. Nun wird aber oftmals nur ein Enantiomer gebraucht und das Andere bleibt als Nebenprodukt zurück, welches nur selten Verwendung findet. Dies ist bei einem 1:1 Gemisch der Enantiomere natürlich nicht wirtschaftlich, zumal der Arbeits- und Materialaufwand der Trennung eingerechnet werden muss. Die Methode, die Enantiomere zu trennen, wird daher nur dann verwendet, wenn es keine Möglichkeit gibt, enantiomerenreine Verbindungen herzustellen.

1.2.3.2 Herstellung von enantiomerenreinen Verbindungen

Die gezielte Synthese von enantiomerenreinen Verbindungen stellt ein großes Arbeits- und Forschungsgebiet der Organischen Chemie dar, wobei es verschiedene Strategien gibt, von denen die wichtigsten im Folgenden diskutiert werden:

Die „Chiral Pool“ Strategie: Die in der Natur vorkommenden chiralen Stoffe sind zum größten Teil enantiomerenrein und einige von diesen können auch wirtschaftlich rentabel im größeren Maßstab isoliert werden. Diese Verbindungen bilden den „Chiral Pool“, der somit alle enantiomerenrein isolierten Naturstoffe umfasst. Als Beispiele seien Zucker und Aminosäuren erwähnt. Aus diesem Pool wird dann eine geeignete Substanz mit der gewünschten Absolutkonfiguration gewählt und als Startmaterial für die Synthese eines enantiomerenreinen Stoffes verwendet. Die Herstellung des Süßstoffs Aspartam ist ein Beispiel für diese Synthesestrategie. Dabei dienen (*S*)-Asparaginsäure und (*S*)-Phenylalanin, beides L-Aminosäuren, als Startmaterialien. Entscheidend für den Erfolg der Strategie ist ein geeignetes Startmaterial zu finden, damit der Syntheseweg nach wenigen Stufen zum Zielmolekül führt. Ist die Herstellung beider Enantiomere nach dieser Strategie erwünscht, so müssen oft unterschiedliche Wege gefunden werden, da in der Natur in den meisten Fällen nur ein Enantiomer des Eduktes vorliegt und das andere nicht gebildet wird. Somit gibt es oft keinen effizienten Weg beide Enantiomere aus Naturstoffen zu gewinnen.

Asymmetrische Synthese: Bei der Umsetzung eines achiralen Eduktes zu einem chiralen Produkt wird versucht mit Hilfsmitteln den Reaktionsverlauf so zu steuern, dass nur ein Enantiomer gebildet wird. Eine Möglichkeit besteht darin, ein chirales Hilfsreagenz (Auxiliar) kovalent an das Edukt zu binden. Diese Verbindung senkt die Aktivierungsenergie für die Bildung des gewünschten Enantiomers. Limitiert wird diese Methode dadurch, dass ein geeignetes Auxiliar gefunden werden muss, das bei einer Reaktion gute Ausbeuten und einen hohen Überschuss des gewünschten Enantiomers bewirkt, nach der Reaktion leicht vom Produkt abgespalten werden kann und wiederverwendbar ist.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, einen chiralen Katalysator zu verwenden, der gezielt die Reaktion zum gewünschten Produkt ablaufen lässt. Dabei wird durch räumliche und elektronische Wechselwirkungen zwischen Edukt und Katalysator ein Enantiomer bevorzugt gebildet. Die Vorteile sind die geringen Mengen an Katalysator, die für eine Reaktion verwendet werden, sowie dessen Wiederverwendbarkeit und leichte Abtrennung. Eine hohe Enantioselektivität der Katalysatoren ist aber nicht immer gegeben und kann somit die Enantiomerenreinheit des Produktes gegebenenfalls nicht gewährleisten. Als weiterer Nachteil sei der hohe Aufwand für die Entwicklung und Herstellung des Katalysators genannt.

Enzymkatalysierte asymmetrische Synthese: Streng genommen gehört auch diese Technik zu den katalytischen Methoden. Da sich aber die vorliegende Arbeit mit diesem Thema beschäftigt, ist sie an dieser Stelle unter einem eigenen Punkt angeführt. Wie bereits im Kapitel 1.1.1 dargestellt, werden chemische Umsetzungen in der Natur von Enzymen katalysiert. Durch deren chiralen Aufbau wird bei der Umsetzung von achiralen Edukten zu chiralen Produkten in der Regel ein Enantiomer in sehr großem Überschuss gebildet. Obwohl die Enzyme in der Natur sehr chemo- und regioselektive Umsetzungen bestimmter Substrate katalysieren, akzeptieren viele auch eine teils sehr breite Palette unnatürlicher Substrate. Diese Eigenschaft macht sich der Mensch zu nutze, indem er isolierte Enzyme für chemische Umsetzungen artifizieller achiraler Substrate einsetzt und dabei in vielen Fällen mit Enantiomeren angereicherte Produkte erzeugt. Diese Methode unterliegt natürlich starker Limitierung, denn nicht alle artifizielle Substrate werden mit einer hohen katalytischen Aktivitäten vom Enzyme umgesetzt. Daher werden zum Teil große Anstrengungen unternommen, um optimale Enzyme zu finden, welche die vom Menschen gewünschte Umsetzungen katalysieren.

1.3 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Basierend auf der Tatsache, dass das Enzym Xylose Reduktase aus *Candida tenuis* bei der Umsetzung des nicht natürlichen Substrats *ortho*-Chloracetophenon [1] eine höhere katalytische Effizienz aufweist als mit dem natürlichen Substrat Xylose, ist die erste Aufgabe die Synthese von weiteren monosubstituierten Acetophenonen. Diese potenziellen Substrate sollen dann mit dem Enzym und NADH umgesetzt werden, wobei die Akzeptanz durch den Biokatalysator sowie die katalytische Effizienz der einzelnen Umsetzungen getestet werden. Weiterhin sollen gemessene Substrateigenschaften wie Lage von IR-Banden und NMR-Shifts sowie das σ -Hammett der substituierten Aromaten mit der katalytischen Effizienz der Umsetzungen korreliert werden. Darüberhinaus sollen einige gut akzeptierte Acetophenone im 100 mg Maßstab mit dem Enzym umgesetzt werden, um Struktur, Enantiomerenreinheit und Absolutkonfiguration der Produkte zu bestimmen. Mit der Hilfe von *in situ* und STD-NMR-Messungen sollen abschließend Informationen über Enzymbindung und Umsetzung des *ortho*-Chloracetophenons [1] gewonnen werden.

2 Allgemeiner Teil und angewandte Methoden

2.1 Synthese

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wird von dem Enzym *CtXR* nicht nur das natürliche Substrat Xylose, sondern auch nicht natürliche Substrate wie α - und β -Ketosäuren, als auch *ortho*-Chloracetophenon [1] umgesetzt.³⁴ Ausgehend vom letzteren Beispielmolekül werden weitere monosubstituierte Acetophenone ausgewählt, um diese im Rahmen dieser Arbeit zu synthetisieren und dann auf die Akzeptanz durch das Enzym *CtXR* zu testen. Bei der Synthese steht die Chemie der Aromaten im Vordergrund, denn die angestrebten strukturellen Variationen befinden sich am Benzolring, während die Acetylgruppe erhalten bleibt.

Durch das zyklisch konjugierte Ringsystem weisen Aromaten eine höhere Stabilität gegenüber vielen chemischen Reaktionen auf als vergleichbare Aliphaten. Die hohe Elektronendichte bewirkt jedoch eine Nucleophilie des Benzols gegenüber den Elektrophilen, sodass nukleophile aromatische Substitutionen die Aromatenchemie dominieren. Dabei hat ein am aromatischen Ring befindlicher Substituent einen großen Einfluss auf die Regioselektivität der Reaktion sowie auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Bezüglich ihres Einflusses auf die delokalisierten π -Elektronen werden die Substituenten in zwei Gruppen eingeteilt:

Elektronenschiebende Substituenten: Dies sind Elektronenpaar-Donoren, die die π -Elektronendichte im Aromaten erhöhen und dadurch dessen Nucleophilie vergrößern. Dies hat zur Folge, dass die Reaktivität gegenüber Elektrophilen steigt. Solche Gruppen werden (+)-M-Substituenten oder aktivierende Substituenten genannt. Sie dirigieren die Einführung des zweiten Substituenten in die *ortho*- und *para*-Position.

Elektronenziehende Substituenten: Dies sind Elektronenpaar-Akzeptoren, die die π -Elektronendichte im Aromaten verringern und die Nucleophilie verkleinern. Folglich sinkt die Reaktivität gegenüber Elektrophilen. Solche Gruppen heißen (-)-M-Substituenten oder deaktivierende Substituenten. Sie dirigieren die Einführung des zweiten Substituenten in die *meta*-Position.

Eine weitere reaktionsbeeinflussende Eigenschaft der Substituenten liegt im Aufbau eines Dipolmoments im Ring und der damit verbundenen Polarisierung der σ -Bindungen, die induktiver Effekt genannt wird. Dessen Richtung und Größe beruht auf den Elektronegativitäten der Substituenten. Zieht ein Substituent die σ -Elektronen an sich, so

besitzt er einen (-)-I-Effekt, stößt er sie ab, gehört er zur Gruppe der Substituenten mit (+)-I-Effekt. Der induktive Effekt verändert somit auch die Nucleophilie des Aromaten sowie dessen Reaktivität: Ein Substituent mit (-)-I-Effekt aktiviert und einer mit (+)-I-Effekt desaktiviert.

Für die aktivierenden und dirigierenden Eigenschaften eines Substituenten sind folglich sowohl I-, als auch M-Effekte verantwortlich. Diese Gegebenheiten werden bei der Wahl der Synthese der geplanten Substrate berücksichtigt, da sie einen Einfluss auf die Umsetzungen haben.

2.1.1 Geplante Substrate

Ausgehend von *ortho*-Chloracetophenon [1] werden die zu synthetisierenden monosubstituierten Acetophenone ausgewählt. Hierbei spielen die elektronischen Eigenschaften der Substituenten sowie deren relative Position zur Acetylgruppe eine entscheidende Rolle. Durch unterschiedlichen Elektronenreichtum des aromatischen Systems wird die Polarisierung der Ketofunktion in der Acetylgruppe beeinflusst, was zu einem in Kapitel 5 beschriebenen Einfluss auf die Substratakzeptanz des Enzyms führen kann. Somit ist die Einführung von Substituenten, die unterschiedliche mesomere und induktive Effekte besitzen, von Interesse. Primäre Bedeutung besitzt dabei die Synthese von Acetophenonen, bei welcher die Halogene Fluor, Brom und Iod der jeweilige Zweitsubstituent sind, da deren chemischen Eigenschaften denen des Chlors ähnlich sind. Darüberhinaus werden die Nitro- und die Cyano-Gruppen als Beispiele für stark elektronenziehende Substituenten gewählt. Amino-, Hydroxy-, Methoxy- sowie Acetoxy-Gruppen hingegen sind die ausgewählten Vertreter der Substituenten mit (+)-M- und (+)-I-Effekten.

Die relative Lage der Zweitsubstituenten zur Acetylgruppe bewirkt einen unterschiedlichen Einfluss auf die elektronischen Eigenschaften der Ketofunktion. Weiterhin können unterschiedliche Substitutionspositionen die Substratbindung an das Enzym beeinflussen. Daher wird nicht nur die Art des Substituenten variiert, sondern auch deren Position am Ring relativ zur Acetylgruppe, was die Herstellung der jeweiligen *ortho*-, *meta*- und *para*-Derivate notwendig macht (Abbildung 8).

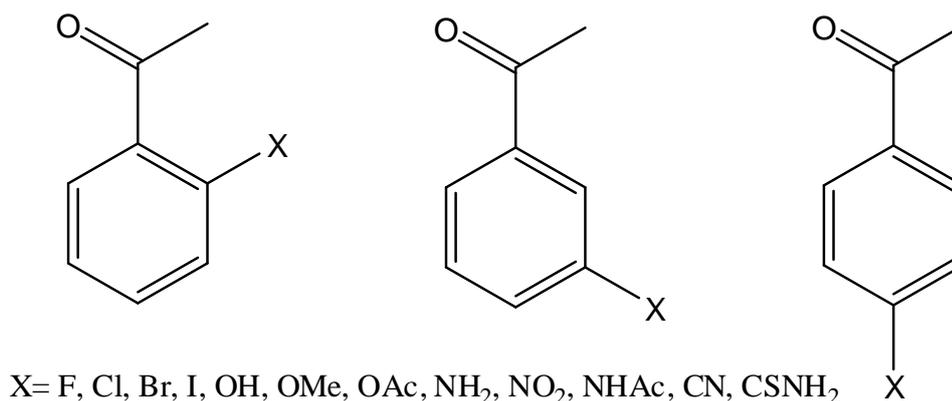


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Substrate

2.1.2 Konzepte zur Synthese der Substrate

Im Folgenden werden die Konzepte für die Synthese der geplanten Substrate beschrieben. Diese basieren zum Teil auf den vorhandenen oder kommerziell erworbenen Substraten: *ortho*- [1], *meta*- [3] und *para*-Chlor- [4] sowie *ortho*- [5], *meta*- [6] und *para*-Aminoacetophenon [7]. Darüberhinaus wurden *ortho*-Fluor- [8] und *para*-Cyanoacetophenon [9] kommerziell erworben.

2.1.2.1 Monosubstituierter Aromat wird acetyliert

Ausgehend von einem monosubstituierten Benzol soll hierbei die Acetylgruppe mittels Friedel-Crafts-Acylierung eingeführt werden. Die Friedel-Crafts-Acylierung ist eine elektrophile Substitution am Aromaten und eine Weiterentwicklung der Friedel-Crafts-Alkylierung. Bei beiden wird ein elektrophiler Kohlenstoff an einen nukleophilen Kohlenstoff des Aromaten gebunden. Der elektrophile Kohlenstoff kommt bei der Friedel-Crafts-Acylierung aus einem Carbonsäurechlorid oder einem Carbonsäureanhydrid. Damit diese Reaktion abläuft, wird eine Aktivierung durch eine Lewis-Säure Katalyse benötigt. Als Lewis-Säuren eignen sich unter anderem AlCl₃, FeCl₃ und ZnCl₂. Bei der Friedel-Crafts-Acylierung von Brombenzol wird durch (+)-M- und (-)-I-Effekt des Brom sowie aus sterischen Gründen nur das *para*-Bromacetophenon [10] gebildet, das somit auf diesem Weg selektiv hergestellt werden soll.³⁵

Mittels Fries-Umlagerung können aus Phenylacetat [11] die beiden Produkte *ortho*- [12] und *para*-Hydroxyacetophenon [13] gewonnen werden.³⁶ Hierbei wird mit Hilfe einer Lewis-Säure ein Komplex gebildet, der die Acetylgruppe absplattet und mittels Friedel-Crafts-Acylierung an den Aromaten substituiert. Die bevorzugten

Substitutionspositionen sind dabei *ortho* und *para*, da der am Aromaten verbleibende Sauerstoff den Ring aktiviert und die Acetylgruppe an diese Positionen dirigiert.

2.1.2.2 Acetophenon [14] wird mit der Zielgruppe substituiert

Hierbei wird zum Einen von Acetophenon [14] ausgegangen und ein weiterer Substituent mittels nukleophiler Substitution eingeführt. Da die Acetylgruppe einen (-)-M- und (-)-I-Effekt besitzt, sind bei vielen dieser Umsetzungen nur *meta*-substituierte Acetophenone in moderaten Ausbeuten zu erwarten. Laut J. J. Harrison *et al.* ist es jedoch möglich, mittels Kaliumbromat desaktivierte Aromaten an *ortho*- und *para*-Position in guten Ausbeuten zu bromieren.³⁷

Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz von bereits monosubstituierten Acetophenonen dar. Dabei wird der zweite Substituent am Aromaten lediglich in einen Neuen umgewandelt, die Position am Ring bleibt dabei erhalten. Somit können die aus der Fries-Umlagerung gewonnenen Hydroxyacetophenone mittels Methylierung mit Methyljodid und durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid zu den entsprechenden Methoxy- und Acetoxy-acetophenonen überführt werden.^{38,39} Die käuflich erworbenen Aminoacetophenone können analog zu den gewünschten Produkten umgesetzt werden.

Durch Oxidation mit Natriumperborat-Tetrahydrat könnten die Aminoacetophenone auch zu den entsprechenden Nitro- und Nitrosoverbindungen umgewandelt werden, alternativ kann dafür *meta*-Chlorperbenzoesäure als Oxidationsmittel verwendet werden.^{40,41}

Als alternative Herstellungsmethode sei die Sandmeyer-Reaktion genannt, bei der von einem Amino-substituierten Aromaten ausgegangen wird. Diese Aminogruppe wird mittels Säure und Nitrit diazotiert und dann durch ein Nukleophil substituiert. Über diesen Syntheseweg könnten neben den Halogen- auch alle Cyanoacetophenone dargestellt werden.^{42,43,44}

Aus den hergestellten Cyanoacetophenonen können durch Thionylierung mittels Lawesson´s-Reagenz die Thionylgruppen eingeführt werden.⁴⁵

2.1.2.3 Ausgehend von einer substituierten Benzoessäure durch Kettenverlängerung zum monosubstituierten Acetophenon

Da *ortho*-Aminoacetophenon [5] kein wohlfeil zugängliches Substrat ist, werden mehrere alternative Wege beschritten, um in wenigen Stufen zu dem gewünschten *ortho*-substituierten Acetophenon-Derivaten zu gelangen. Dabei wird die preiswertere

Anthranilsäure (*ortho*-Aminobenzoesäure) [15] genutzt, deren Aminofunktion ähnlich reagiert wie die NH₂-Gruppe in *ortho*-Aminoacetophenon [5]. Die abschließende Transformation der Säurefunktion zur Acetylgruppe wird nach einer Arbeitsvorschrift von A. Fürstner *et al.* oder P. Zhang *et al.* geplant.^{46,47} Dabei soll das Säurechlorid mittels Thionylchlorid hergestellt werden, das bei A. Fürstner *et al.* in einer Eisen-katalysierten Reaktion und mit dem entsprechenden Methylgrignard-Reagenz [16] umgesetzt wird.^{48,49} Weitere funktionelle Gruppen am Aromaten sollen bei dieser Reaktion nicht angegriffen werden.

2.2 σ -Hammet-Gleichung als Auswahlkriterium für die Substanzen

Ein weiteres Auswahlkriterium für die Substrate stellt das Ergebnis der σ -Hammet-Gleichung dar. L. P. Hammett erkannte um 1935, dass Substituenten an Benzoessäure und Phenylacetat [11] einen Effekt auf die Ionisationskonstanten der aromatischen Ringe ausüben, welcher bei einem Vergleich der beiden Verbindungen einen linearen Zusammenhang ergibt.⁵⁰ Einige Jahre später postulierte er den Satz „Ähnliche Veränderung der Struktur führt zu ähnlicher Veränderung der Reaktivität“.⁵¹ Diese Linearität der Ionisations-Konstante ist auf Basis des zuvor erwähnten Satzes nicht überraschend. Wird jedoch ein weiterer Parameter wie Reaktionsgeschwindigkeit miteinbezogen, so bleibt diese Linearität erhalten. Diese Tatsache sorgte für großes Erstaunen.⁵² Anstatt der Ionisations-Konstante führte L. P. Hammett somit den Parameter σ ein, der folgendermaßen definiert ist:

$$\sigma = \log K_X - \log K_H \quad [1]$$

Dabei ist K_H die Ionisationskonstante von Benzoessäure in Wasser bei 25 °C und K_X die Ionisationskonstante der substituierten Benzoessäure. Somit werden die elektronischen Einflüsse des Substituenten an dem Reaktionszentrum der Benzoessäure berücksichtigt. Folglich beschreibt ein positiver Wert von σ einen elektronenziehenden Substituenten und ein negativer Wert einen elektronenschiebenden. Die darauf basierende Hammett-Gleichung setzt sich wie folgt zusammen:

$$\log k_X = \rho\sigma + \log k_H \quad [2]$$

Hierbei ist k_X die Gleichgewichtskonstante, welche die Reaktionsgeschwindigkeit der substituierten Verbindung darstellt und k_H ist die Reaktionsgeschwindigkeit der entsprechenden unsubstituierten Verbindung. ρ stellt einen Korrekturfaktor des σ in Abhängigkeit des Substituenten X dar.

Da bei dieser Korrelation nur die elektronischen Effekte der Substituenten auf ein Reaktionszentrum betrachtet werden, sind Substituenten in dessen unmittelbarer Nähe mit einem gewissen Fehler behaftet. Es treten auch sterische Effekte auf, die nicht berücksichtigt werden können. So hat L. P. Hammett die Korrelation nur zwischen *meta*- und *para*-substituierten Benzoesäuren und Phenylacetaten hergestellt. Um *ortho*-substituierte Verbindungen zu beschreiben, haben T. Fujita und T. Nishioka ein erweitertes Modell vorgeschlagen.⁵³

Weiters ist zu erwähnen, dass die von L. P. Hammett eingeführten σ -Werte sich auf Lösungen in Wasser beziehen und nicht jede Reaktion in wässrigem Medium stattfindet. H. H. Jaffé beschreibt lösungsmittel- und substituentenabhängige Effekte wie Wasserstoffbrückenbindungen bei OH- und NH₂-Gruppen im wässrigen Medium, die σ -Hammett beeinflussen können.⁵⁴

Diese erweiterte σ -Hammett-Gleichung lässt sich nicht nur auf organische Reaktionen anwenden sondern auch auf biochemische und biologische, die zum größten Teil im wässrigen Medium ablaufen. Somit können die σ -Werte, die für wässrige Lösungen bestimmt wurden, verwendet werden. Doch ruft die Tatsache, dass Wasser als Lösungsmittel verwendet wird, ein neues Problem hervor. Die organischen Substrate sind meist nur schlecht in Wasser löslich und somit ist es notwendig, einen weiteren Faktor in die Gleichung miteinzubeziehen. Dieser löslichkeitsbeschreibende Term wird mit $\log P$ abgekürzt und setzt sich aus der Löslichkeit von Oktanol und der Löslichkeit der Substanz X in Wasser zusammen. R. F. Rekker *et al.* zählen als Pioniere bei der Berechnung von $\log P$.⁵⁵

Anhand dieser Gesichtspunkte wurde die Hammett-Gleichung zur Berechnung der enzymatischen Umsetzung herangezogen, um weitere Substrate mit hoher Aktivität zu finden. Diese sind im Weiteren synthetisiert und mit dem Enzym umgesetzt worden. Da dabei ein Zusammenhang zwischen Substituenten und Aktivität von Interesse ist, wird von allen Substanzen die Aktivität berechnet und verglichen.

2.3 Aktivitätsmessung

Die Aktivität des Enzyms wird über eine photometrische Methode bestimmt. Es wird die Konzentrationsänderung des NADHs in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt. Da NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm eine hohe Eigenabsorption aufweist und NAD⁺ bei dieser Wellenlänge keine Absorption besitzt, ist diese Methode für NADH-abhängige Reaktionen von Nutzen. Der Unterschied der Absorptionsbanden ist auf die Tatsache

zurückzuführen, dass der Pyrimidinring in NAD^+ aromatischen Charakter aufweist, welcher in NADH nicht vorhanden ist. Zur Bestimmung der Änderung der Konzentration wird das Lambert-Beer'sche Gesetz herangezogen:

$$E = \epsilon * c * d \quad [3]$$

E ist hierbei die Extinktion, die direkt proportional zur Schichtdicke d und der Konzentration der Lösung c ist. ϵ stellt den Extinktionskoeffizienten dar, der ein substanz- und wellenlängenabhängiger Faktor ist.

Die katalytische Aktivität eines Enzyms wird mit k_{cat} [s^{-1}] abgekürzt und beschreibt die Substratumsätze eines Enzyms pro Sekunde. Dabei wird k_{cat} aus folgender Gleichung dargestellt:

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}}/[E] \quad [4]$$

V_{max} ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und $[E]$ die molare Konzentration des Enzyms. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration und der Affinität des Enzyms zum Substrat wird durch die Michaelis-Menten Gleichung beschrieben:

$$V = k_{\text{cat}} [E][A]/(K_{\text{mA}} + [A]) \quad [5]$$

Hierbei ist V die Reaktionsgeschwindigkeit, k_{cat} die katalytische Aktivität eines Enzyms, $[E]$ die molare Konzentration des Enzyms, $[A]$ die Substratkonzentration und K_{mA} die enzymabhängige Michaelis-Menten-Konstante. Die Michaelis-Menten-Konstante gibt die Substratkonzentration an, bei der die halb-maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird. Die katalytische Effizienz beschreibt nun die Substratspezifität eines Enzyms und wird als $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ [$\text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$] bezeichnet.

2.4 NMR

Die NMR-Spektroskopie ist ein nützliches Werkzeug in der Organischen Chemie und hat eine Vielzahl von Anwendungsgebieten. Eine der Hauptaufgaben besteht darin, die Strukturen der synthetisierten Verbindungen aufzuklären und zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit werden anhand der erhaltenen chemischen Shifts der einzelnen Atome, im speziellen der Protonen, auf die Polarisierung der Verbindungen geschlossen. Somit können Vergleiche bezüglich Reaktivität und Aktivität der Substrate mit dem Enzym getätigt werden. Weitere Anwendungsgebiete der NMR-Spektroskopie in dieser Arbeit sind Reaktionsverfolgung und Substrat-Enzym-Bindungs-Studien.

2.4.1 Warum D₂O und CDCl₃

In dieser Arbeit wird von allen Zielsubstanzen ein Spektrensatz bestehend aus ¹H, ¹³C, COSY, HSQC und HMBC in CDCl₃, als auch in D₂O aufgenommen. Auf Grund der organischen Natur der Substrate weisen diese eine schlechte Löslichkeit in D₂O auf. Zur einfacheren Identifizierung und Bestimmung der Struktur wird der jeweils erste Spektrensatz in CDCl₃ gemessen. Dies führt zu einem leichteren Abgleich mit den in der Literatur befindlichen Daten. Der Nachteil dieses Lösungsmittels besteht darin, dass die Umsetzung der Substrate mit dem Enzym in wässriger gepufferter Lösung stattfindet und sich mit dem Lösungsmittel auch die spektralen Daten der Verbindungen ändern. Um die Spektren der Umsetzung mit denen der Strukturbestimmung und Identifizierung vergleichen zu können, mussten die Lösungsmittelbedingungen nahezu ident gewählt werden. Aus diesem Grund wurden die Spektren auch in D₂O mit dem entsprechenden Zusatz von Puffer gemessen.

2.4.2 *In situ* NMR⁵⁶

Diese Arbeitstechnik der NMR-Spektroskopie wird in dieser Arbeit zur Reaktions- und Produktkontrolle verwendet. Dabei wird die Reaktion im NMR-Röhrchen durchgeführt und mittels NMR-Spektrometers in regelmäßigen Abständen vermessen, was zu einer kontinuierlichen Kontrolle der Reaktion führt. Eine weitere Möglichkeit, diese Methode zu nutzen, ist die Reaktionskinetik zu untersuchen. Da jeweils ¹H-NMR-Spektren gemessen werden, können die Intensitäten der Protonensignale miteinander verglichen werden. Diese Vergleiche können dann zur Geschwindigkeitsbestimmung und somit zur Untersuchung der Kinetik der Reaktion benutzt werden.

Auch für enzymatische Umsetzung ist diese Methode geeignet, wenn ein paar Parameter berücksichtigt werden. Die meisten biologischen Umsetzungen laufen im wässrigen Medium ab, was für die NMR-Spektroskopie einen gewissen Nachteil darstellt, da Wasser ein sehr intensives Signal bei 4,70 ppm aufweist. Um dieses zu umgehen, wird die Reaktion in D₂O durchgeführt und das restliche HDO-Signal mittels Presaturation unterdrückt.^{57,58} Dies führt jedoch zu Intensitätsänderungen bei den dem Wassersignal nahen Signalen. Weiterhin zeigen die Protonen des Enzyms selbst Signale, die jedoch durch niedrige Enzymkonzentration relativ klein sind und durch eine kurze Spin-Spin Relaxationszeit eine große Signalhalbwertsbreite aufweisen. Da die NMR-Spektroskopie keine invasive Analysemethode ist, wird die Reaktionsmischung nicht beeinflusst. Aus diesem Grund

können eventuell entstandene Zwischenprodukte erkannt werden, ohne die Reaktionsmischung aufarbeiten zu müssen und dabei die Zwischenprodukte zu zerstören.

2.4.3 Deuteriumeinbau durch Tautomerie

Die Struktur der in Kapitel 2.1 besprochenen Substrate werden in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Wie in dieser Darstellung ersichtlich, besitzen alle Substrate eine Keto-Funktion in der Acylgruppe. Nun ist die Tatsache bekannt, dass solch ein Keton zu einem Enol tautomerisiert. Dabei wird ein Proton aus der Methylgruppe abgegeben, es bildet sich eine C=C Doppelbindung und das Sauerstoffatom nimmt ein Proton aus dem Lösungsmittel auf und bildet eine Hydroxy-Funktion. Beim Enol verläuft die Isomerisierung genau in die entgegengesetzte Richtung; das Proton des Alkohols wird abgegeben und die C=O-Bindung gebildet, die C=C Doppelbindung wird gebrochen und die Methylgruppe nimmt ein Proton aus dem Lösungsmittel auf (Abbildung 9). Diese Aufnahme und Abgabe von Protonen kann nun mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie gemessen werden. Voraussetzung dafür ist ein deuteriertes Lösungsmittel, das ein D^+ -Ion zur Verfügung stellt und somit einen Austausch von Wasserstoff und Deuterium zulässt. Durch den Vergleich von mehreren hintereinander gemessenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren kann nun dieser Austausch durch Signalintensitätsänderungen der Methylgruppe beobachtet werden.

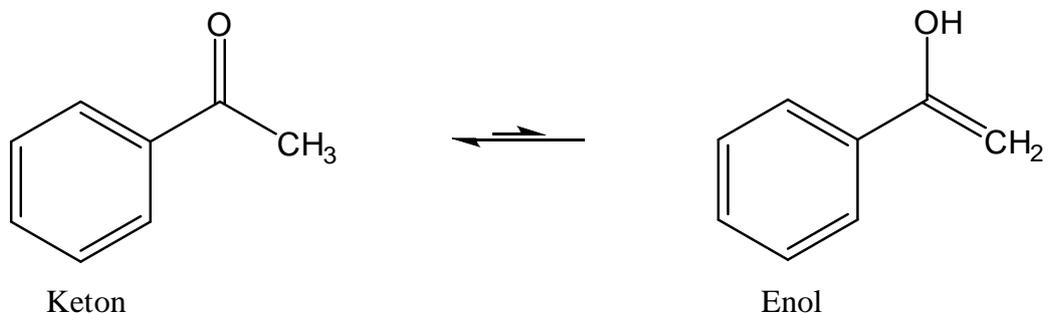


Abbildung 9: Keto-Enol-Tautomerie von Acetophenon [14]

2.4.4 STD-NMR

Diese Abkürzung steht für Saturation-Transfer-Difference-NMR-Spektroskopie. Diese Methode wird schon einige Jahre erfolgreich für Protein-Ligand-Bindungsstudien verwendet. Dabei ist es von großem Interesse, ob und wie sich die Substrate an das gewünschte Protein annähern und in späterer Folge binden. Speziell in der Entwicklung von Medikamenten ist solch eine Information von großer Bedeutung, da die Wirkung eines

solchen mit seiner Bindung einhergeht.⁵⁹ Auch in der Biokatalyse findet die Methode Anwendung, um die Bindung von Substraten und Produkten an Enzyme zu untersuchen.⁶⁰

Die Voraussetzungen und Bedingungen für die Aufnahme eines STD-NMR-Spektrums werden im Folgenden kurz erläutert. In einem NMR-Röhrchen werden Ligand und Protein in dem geeigneten deuterierten Lösungsmittel (D_2O) vermischt und vermessen. Dabei ist die Proteinkonzentration in katalytischen Maßstab zu wählen. Dann wird das Protein selektiv mit mehreren Vorsättigungspulsen über eine Gesamtzeit von 2-3 s gesättigt. Diese einzelnen Vorsättigungspulse haben eine Länge von 50 bis 80 ms und somit nur eine Bandbreite von wenigen Hz. Die Einstrahlfrequenz der Pulse sollte mehrere hundert Hz entfernt vom nächstliegenden Ligand-Signal sein, aber gleichzeitig nahe genug an den Proteinsignalen, um diese anzuregen. Auf Grund der geringen Bandbreite der Pulse und einer Einstrahlfrequenz bei -1 bis -2 ppm werden beispielsweise nur die Frequenzen der Methylgruppen angeregt. Durch die Spin-Diffusion, die bei Molekülen ab einer Größe von 10 kDa merklich auftritt, wird das gesamte Protein binnen weniger Millisekunden magnetisiert. Während der gesamten Sättigungszeit von 2-3 s binden und dissoziieren mehrere Liganden an das Protein, die während ihrer Bindungszeit über Dipol-Dipol-Wechselwirkung inkohärente Magnetisierung übernehmen. Diese behalten sie auch nach der Dissoziation in Lösung, da sie selbst als kleine Moleküle eine große Spin-Spin-Relaxationszeit besitzen. Die Gesamtmagnetisierung aller Moleküle wird dann durch einen 90° Puls in die Kohärenz überführt und detektiert. Die Experimente, bei denen die Proteine auf diese Weise vorgesättigt werden, heißen On-Resonanz Spektren.

Um die vom Protein auf den Liganden übertragene Magnetisierung zu bestimmen, muss ein entsprechendes Spektrum ohne Sättigung aufgenommen werden. Hierbei werden die Sättigungspulse bei einer Frequenz zwischen 20-40 ppm eingestrahlt, damit keine Protein- oder Substratfrequenz angeregt wird. Diese Experimente werden Off-Resonanz-Spektren genannt. Die Differenz der Off- und On-Resonanz Spektren ergibt das STD-NMR-Spektrum. Darin können nur die Signale der Protonen gefunden werden, deren Intensität durch den Magnetisierungsübertrag vom Protein auf den Liganden verändert wurde und die somit während der Bindungszeit eine große räumliche Nähe zur Proteinoberfläche besitzen. Der Sättigungstransfer spiegelt sich in der Intensität der Signale wieder und ist abhängig von der Zeit der Interaktion des Substrates mit dem Protein und vom Abstand zum Protein. Somit geben die Signale die gewünschte Information über die Lage und Bindungsstellen der Liganden am Protein wieder.⁵⁹

Mit den in den STD-NMR-Spektren vorliegenden Signalen und deren Intensitäten können folglich Rückschlüsse auf die Bindung und die Lage eines Liganden in der Proteintasche gezogen und dadurch wertvolle Information gewonnen werden.

2.5 IR

Mittels der IR-Spektroskopie werden Substanzen vermessen, wobei insbesondere die Wellenzahlen der Carbonylbanden von Interesse sind. Diese sind eindeutig zu identifizieren und geben Informationen über die C=O Streckschwingungen direkt am Reaktionszentrum. Somit kann ein Zusammenhang zwischen Lage der Schwingungsbande und der Reaktivität des Enzyms hergestellt werden. Für die Messungen wird eine HTR-Einheit verwendet und somit können die Proben direkt ohne weitere Vorbehandlung aufgetragen werden.

2.6 Bestimmung der Absolutkonfiguration

Da sich bei der enzymatischen Reduktion von monosubstituierten Acetophenonen ein Chiralitätszentrum im Produkt bildet, ist dessen Absolutkonfiguration von Interesse. Um sicher zu gehen, dass die Absolutkonfiguration, die bestimmt wurde, auch korrekt ist, wurden drei unterschiedliche Bestimmungsmethoden ausgewählt. Die drei Methoden werden im Folgenden näher beschrieben.

2.6.1 Bestimmung mittels Mosherester⁶¹

Diese Methode basiert auf der NMR-Spektroskopie und setzt voraus, dass die chirale Verbindung in zwei NMR-spektroskopisch unterscheidbare Diastereomere transferiert wird. Dazu wird das chirale Produkt mit einem chiralen Reagenz bekannter Absolutkonfiguration umgesetzt. In dieser Arbeit wird das Mosherchlorid zur Derivatisierung des entstandenen Alkohols verwendet. Dabei wird sowohl ein Derivat mit dem (*S*)-Mosherchlorid, als auch eines mit dem (*R*)-Mosherchlorid hergestellt.⁶² Die Reaktion mit dem (*S*)-Chlorid führt zum (*R*)-Mosherester und das (*R*)-Chlorid zum entsprechenden (*S*)-Ester. Von den beiden unterschiedlichen Mosherestern werden NMR-Spektren aufgenommen und miteinander verglichen. Dabei korreliert das chirale Zentrum des Derivatisierungsreagenz mit dem des Alkohols und führt zu einer Shiftveränderung der NMR-Signale aus den Liganden, die an dem asymmetrischen Kohlenstoff des Alkohols gebunden sind. Die Differenz der Shifts wird nach empirischen Regeln als Parameter für die Bestimmung der Absolutkonfiguration herangezogen. Die unterschiedlichen Shifts resultieren aus den unterschiedlichen chemischen

Umgebungen der Liganden. Dabei wird angenommen, dass die Konformation des Esters folgendermaßen aussieht: Die Trifluormethylgruppe, das asymmetrische Kohlenstoffatom des Mosheresters, der Carbonylkohlenstoff und der asymmetrische Kohlenstoff des Alkohols liegen in einer Ebene. Somit liegt die Phenyl- und Methoxygruppe außerhalb der Ebene und ihre Anordnung spiegelt die Absolutkonfiguration des Mosheresters wieder. Auch die Liganden des asymmetrischen Kohlenstoffs des Alkohols liegen außerhalb dieser Ebene, wodurch ihre räumliche Nähe zustande kommt. Dabei hat die Phenylgruppe eine abschirmende Wirkung und verschiebt den Shift des ihr gegenüberliegenden Liganden zu einer niedrigeren Frequenz als wenn die Methoxygruppe an dieser Position ist. Wird das andere Enantiomer des Mosheresters betrachtet, so haben die Methoxy- und Phenylgruppe ihre Plätze getauscht und der andere Ligand des Alkohols erfährt die Shifterniedrigung. Die relativen Veränderungen der Shifts sind spezifisch für die Absolutkonfiguration des Alkohols und können somit zur Bestimmung dieser herangezogen werden (Abbildung 10).

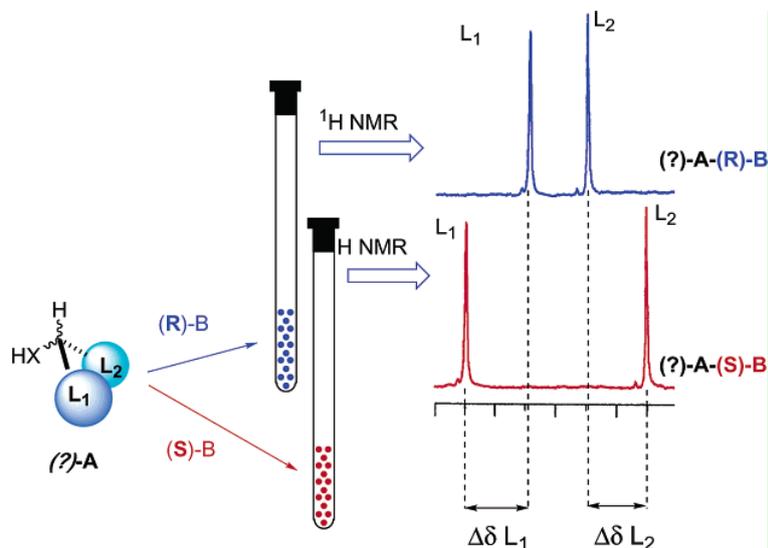


Abbildung 10: Shiftunterschiede der beiden Ester⁶¹

2.6.2 Bestimmung mittels HPLC

Mit Hilfe der HPLC können Substanzen voneinander getrennt werden, die unterschiedliche chemische und physikalische Eigenschaften haben. Bei chiralen Substanzen ist dies aufwendig, da die Probe in ein chirales Umfeld gebracht werden muss. Dies wird erreicht, indem ein chirales Säulenmaterial verwendet wird. Dabei wird das chirale Füllmaterial verwendet, an dem die Substanzen aufgetrennt werden. Wenn es sich bei der Probe um eine enantiomerenreine Verbindung handelt, kann natürlich keine Auftrennung erzielt werden.

Die Chromatographie gibt keine Information über die Absolutkonfiguration, sondern nur darüber, dass es sich um Enantiomere handelt. Um nun diese zu bestimmen, wird eine Referenz benötigt, deren Retentionszeit mit denen der Enantiomere verglichen wird. Liegen die Retentionszeiten der beiden Enantiomere jedoch zu nahe beieinander, so kann kein Unterschied durch einen Vergleich der Retentionszeiten festgestellt werden. Trifft diese Tatsache zu, wird eine Additionsmethode angewandt. In die Probe wird dabei eine gewisse Menge an Referenz zugegeben. Dadurch wird einer der beiden jeweils überlagernden Enantiomerenpeaks eine höhere Intensität aufweisen und kann somit eindeutig der Referenz zugeordnet werden. Besteht eine enantiomerenreine Probe und wird die Additionsmethode angewandt, so kann ein neuer Peak aufscheinen, dieser Peak verkörpert dann die Referenz und in der Probe befindet sich das andere Enantiomer. Diese Methode ist für eine schnelle und einfache Bestimmung der Absolutkonfiguration geeignet, solange eine reine Referenz zur Verfügung steht und sich die Enantiomere mittels chiraler HPLC auftrennen lassen.

2.6.3 Drehwert

Bei der Bestimmung des Drehwertes wird die optische Aktivität der chiralen Substanzen ausgenutzt. In dieser Arbeit wurde schon einmal die Tatsache erwähnt, dass eine Enantiomer linear polarisiertes Licht um die für sie spezifische Rotation verändert. Liegt eine enantiomere Substanz vor, so kann die Rotation mittels Polarimeter bestimmt werden. Der erhaltene Wert wird mit Werten aus der Literatur verglichen und kann somit Aufschluss über die Absolutkonfiguration geben. Voraussetzung für diese Methode sind bereits vorhandene Werte für die spezifische Rotation des zu untersuchenden Enantiomers.

3 Experimenteller Teil

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren werden mit einem Bruker Avance DRX 400 und einem Bruker Avance DRX 600-Spektrometer gemessen. Die ^{13}C -NMR-Spektren werden mit einer J-modulierten Methode aufgenommen.^{63,64} Die chemischen Shifts (δ) werden in ppm angegeben. Die in CDCl_3 gemessenen Spektren werden für ^1H auf 7,24 (CDCl_3) und für ^{13}C auf 77,0 (CDCl_3) sowie die in D_2O für ^1H auf 3,34 (CH_3OD) und für ^{13}C auf 49.50 (CH_3OD) referenziert. Die 2-dimensionalen Spektren werden nach den literaturbeschriebenen Standard-Methoden aufgenommen.⁶⁵

Die IR-Messungen werden auf einem Perkin Elmer FT-IR Spectrometer Spektrum 2000 durchgeführt, dabei wird jede Substanz drei mal vermessen und ein Mittelwert gebildet.

Die Aktivitätsmessungen werden auf einem Beckman DU-800-Spektrometer durchgeführt und die NADH-Abnahme durch die enzymatische Oxidation des Coenzym bei 340 nm gemessen.

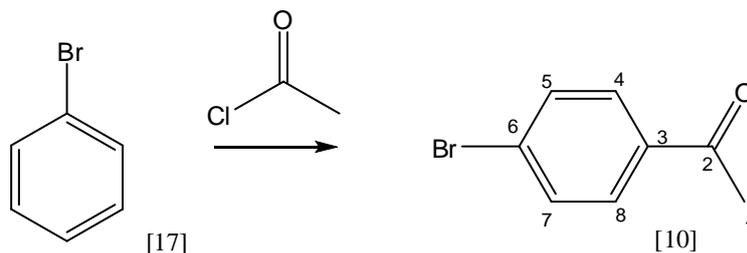
Der Drehwert wird mittels eines Perkin-Elmer Polarimeter 241 gemessen.

Die analytischen Dünnschichtchromatographien (DC) werden mittels Merck TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ Platten durchgeführt und mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Als Kieselgel zur Säulenchromatographie wird Silicagel 60 M (40-63 μm) von der Firma Macherey & Nagel verwendet.

Dichlormethan, Petrolether, Ether und Essigester werden zur Absolutierung destilliert, Tetrahydrofuran wird mittels Destillation mit Natrium/Benzophenon getrocknet.

Alle anderen Reagenzien werden in kommerzieller Reinheit ohne weitere Reinigung verwendet.

3.1 Herstellung von *para*-Bromacetophenon [10]³⁵



3.1.1 Durchführung

Es werden 1,3 eq. (3,4 g; 0,025 mol) AlCl_3 in 1,2 eq. (2,5 mL; 0,024 mol) Brombenzol [17] gegeben und auf 0-5 °C gekühlt, dazu wird 1,0 eq. (1,8 mL; 0,024 mol) Acetylchlorid unter Rühren langsam zugetropft und weitere 30 min nach Beendigung der Zugabe gerührt. Das Reaktionsgemisch wird danach auf 50 °C erwärmt und für zirka 5 h bei dieser Temperatur gerührt. Nach 42 h ohne Rühren der Mischung erstarrt diese zu einer festen Masse, die wieder erwärmt und in Eiswasser gegossen wird. Die resultierende wässrige Phase wird mit Dichlormethan mehrmals extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit Wasser, danach mit 20 mL 2 % NaOH und nochmals mit Wasser gewaschen. Danach wird mittels MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Das resultierende Rohprodukt wird auf einer Säule (Kieselgel) mit einem Gemisch von Petrolether/Essigester 2:1 gereinigt. Der erhaltene Feststoff wird in Petrolether umkristallisiert. Ausbeute: 1,9 g (40 % der Theorie).

3.1.2 Analytische Daten

3.1.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,56	s		26,51	1	2,67	s		27,60
2				196,97	2				203,65
3				135,84	3				136,04
4	7,80*	d	8,67	129,83*	4	7,92*	d	8,54	133,37*
5	7,58*	d	8,67	131,89*	5	7,76*	d	8,54	131,59*
6				128,29	6				n.d.
7	7,58*	d	8,67	131,89*	7	7,76*	d	8,54	131,59*
8	7,80*	d	8,67	129,83*	8	7,92*	d	8,54	133,37*

* Können nicht unterschieden werden

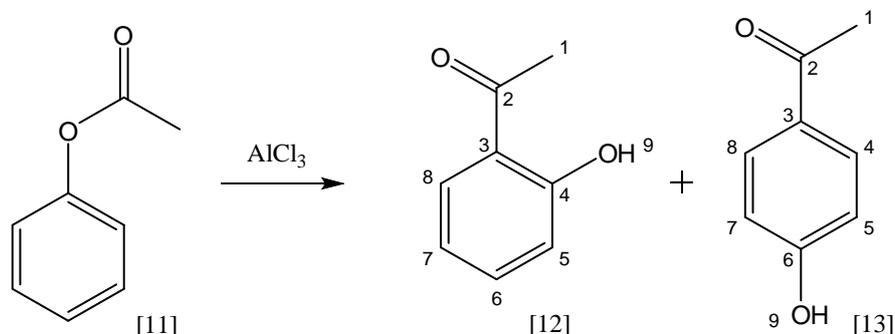
3.1.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1670,9 cm⁻¹

3.1.2.3 R_f-Wert

0,80 (Kieselgel, Petrolether/Essigester 2:1)

3.2 Herstellung von *ortho*- [12] und *para*-Hydroxyacetophenon [13]³⁶



3.2.1 Durchführung

In einem 250 mL Rundkolben werden 1 eq. (12,7 mL; 0,1 mol) Phenylacetat [11] gegeben und mit 1 eq. (18 g; 0,1 mol) Aluminiumchlorid vermischt. Auf den Kolben wird ein Kühler ohne Wasseranschluss (Luftkühler) und ein Trockenrohr aufgesetzt. Nachdem sich die anfangs sehr heftige HCl-Entwicklung beruhigt hat, wird für eine Stunde bei 100 °C gerührt. Danach werden zirka 100 g Eis und 15 mL aq. konz. HCl hinzu gegeben und noch einmal für 10 min erhitzt, bis sich alles gelöst hat. Danach wird auf Raumtemperatur gekühlt und dreimal mit Ether ausgeschüttelt. Die etherischen Phasen werden vereinigt und mit zweimal 50 mL 2 M NaCl gewaschen. Die wässrige alkalische Lösung wird in einen 500 mL Rundkolben transferiert und mit HCl angesäuert. Dann wird mittels Wasserdampfdestillation das *ortho*- und *para*-Produkt getrennt. Wenn die Kondensattropfen klar sind, ist die Destillation beendet und das Destillat wird dreimal mit 25 mL Ether extrahiert, mit MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das verbleibende rohe *ortho*-Hydroxyacetophenon [12] wird im Vakuum destilliert. Das *para*-Produkt kristallisiert im Destillationskolben. Die entstandenen Kristalle werden in wenig heißen Ether gelöst und mit Petrolether überschichtet und in Ruhe erkalten lassen. Ausbeute: *ortho*-Hydroxyacetophenon [12]: 3,3 g (24 % der Theorie), *para*-Hydroxyacetophenon [13]: 5,3 g (39 % der Theorie).

3.2.2 Analytische Daten

3.2.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl₃

ortho-Hydroxyacetophenon [12]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,61	s		26,57
2				204,49
3				119,69
4				162,35
5	6,95	dd	1,07/8,57	118,88
6	7,45	m		136,41
7	6,88	m		118,37
8	7,71	dd	1,64/7,98	130,67
9	12,23	s		

D₂O

ortho-Hydroxyacetophenon [12]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,70	s		27,73
2				208,78
3				120,44
4				161,14
5	7,02	d	8,56	118,94
6	7,62	pt		138,54
7	7,08	pt		121,30
8	7,97	d	8,04	133,26
9	n.d.			

para-Hydroxyacetophenon [13]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,56	s		26,30
2				197,98
3				129,95
4	7,89*	d	8,68	131,12*
5	6,90*	d	8,68	115,45*
6				160,83
7	6,90*	d	8,68	115,45*
8	7,89*	d	8,68	131,12*
9	6,87	s		

para-Hydroxyacetophenon [13]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,55	s		27,13
2				203,77
3				130,27
4	7,87*	d	8,82	132,92*
5	6,91*	d	8,82	116,83*
6				162,97
7	6,91*	d	8,82	116,83*
8	7,87*	d	8,82	132,92*
9	n.d.			

* Können nicht unterschieden werden

3.2.2.2 IR-Carbonylbande

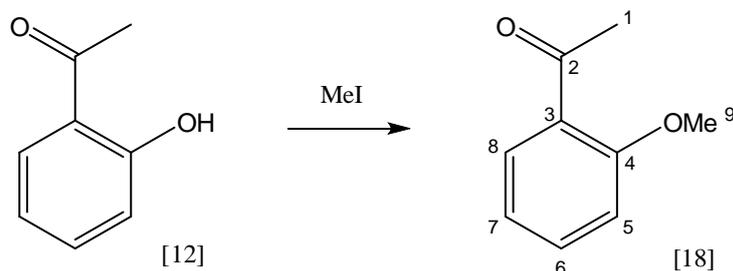
ortho-Hydroxyacetophenon [12]:

v (C=O) strong 1637,5 cm⁻¹

para-Hydroxyacetophenon [13]:

v (C=O) strong 1659,1 cm⁻¹

3.3 Herstellung von *ortho*-Methoxyacetophenon [18]³⁸



3.3.1 Durchführung

Es werden 1 eq. (0,2 g; 0,0015 mol) *ortho*-Hydroxyacetophenon [12], 8 eq. (0,8 mL; 0,0125 mol) Methyljodid und 5 eq. (1,0 g; 0,0075 mol) K_2CO_3 in 150 mL Aceton gelöst und 12 h refluxiert. Danach wird das Salz abfiltriert und das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wird mit Dichlormethan auf einer Säule (Kieselgel) gereinigt. Ausbeute: 0,22 g (98 % der Theorie).

3.3.2 Analytische Daten

3.3.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl_3					D_2O				
Nr.	^1H [ppm]	Mult.	J [Hz]	^{13}C [ppm]	Nr.	^1H [ppm]	Mult.	J [Hz]	^{13}C [ppm]
1	2,52	s		31,80	1	2,64	s		21,60
2				199,93	2				209,62
3				128,06	3				139,00
4				159,27	4				132,71
5	6,98	d	7,34	120,56	5	7,77*	d	8,36	127,38*
6	7,44	m		133,62	6	7,49*	pt		130,68*
7	6,94	pt		111,56	7	7,36*	m		133,27*
8	7,71	dd	1,63/7,62	130,36	8	7,36*	m		133,63*
9	3,89	s		55,47	9	2,44	s		30,86

* Können nicht unterschieden werden

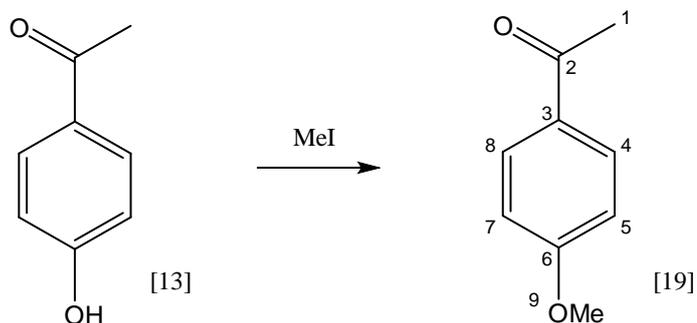
3.3.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong $1680,4 \text{ cm}^{-1}$

3.3.2.3 R_f -Wert

0,69 (Kieselgel, Dichlormethan)

3.4 Herstellung von *para*-Methoxyacetophenon [19]³⁸



3.4.1 Durchführung

Siehe Herstellung von *ortho*-Methoxyacetophenon [18]. Eingesetztes Edukt: (0,2 g; 0,0015 mol) *ortho*-Hydroxyacetophenon [12]. Ausbeute: 0,22 g (98 % der Theorie).

3.4.2 Analytische Daten

3.4.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,50	s		26,21
2				196,66
3				130,25
4	7,89*	d	8,90	130,48*
5	6,88*	d	8,90	113,59*
6				163,40
7	6,88*	d	8,90	113,59*
8	7,89*	d	8,90	130,48*
9	3,52	s		55,36

D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,63	s		27,31
2				203,99
3				131,04
4	8,01*	d	8,96	132,64*
5	7,09*	d	8,96	115,45*
6				165,21
7	7,09*	d	8,96	115,45*
8	8,01*	d	8,96	132,64*
9	2,25	s		31,69

* Können nicht unterschieden werden

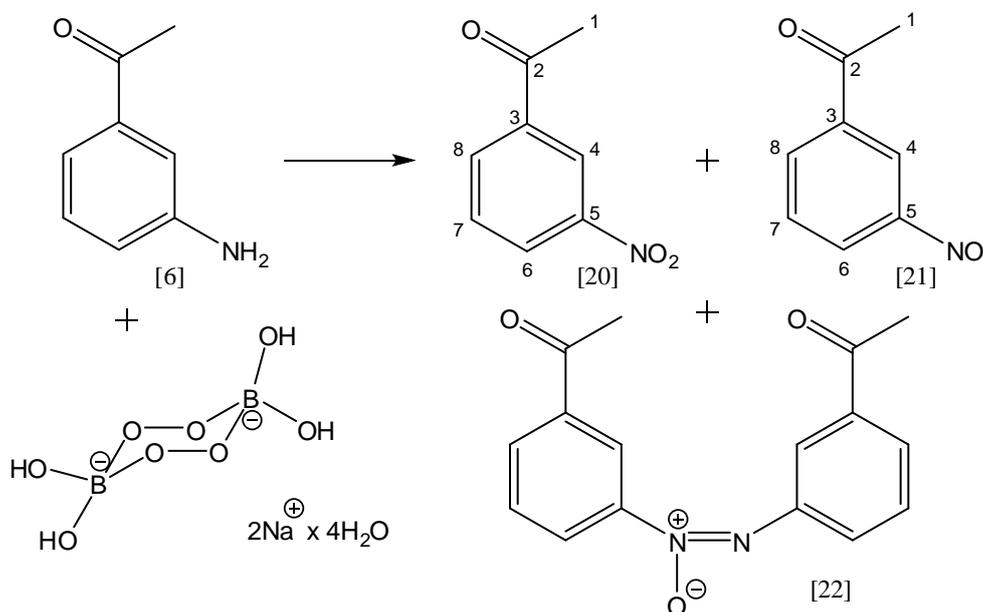
3.4.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1666,6 cm⁻¹

3.4.2.3 R_f-Wert

0,78 (Kieselgel, Dichlormethan)

3.5 Herstellung von *meta*-Nitroacetophenon [20]⁴⁰



3.5.1 Durchführung

Es wird 1 eq. (1,35 g; 0,01 mol) *meta*-Aminoacetophenon [6] in 20 mL Essigsäure gelöst und langsam 1 h in eine Lösung von 5 eq. (8,3 g; 0,05 mol) Natriumperborat-Tetrahydrat in Essigsäure bei 50-60 °C zugetropft. Nach weiteren 2 h Erwärmen wird die Lösung gekühlt, filtriert und zirka 250 mL Eiswasser zugegeben. Die entstandenen Produkte werden mit einer Säule (Kieselgel) mit Petrolether/Ether 2:1 als Laufmittel getrennt. Ausbeute: *meta*-Nitroacetophenon [20]: 0,5 g (34 % der Theorie) *meta*-Nitrosoacetophenon [21] reagiert zu einem Dimer weiter Dimer [22]: Ausbeute: 0,6 g (21 % der Theorie).

3.5.2 Analytische Daten

Von *meta*-Nitrosoacetophenon [21] können keine Spektren aufgenommen werden, da es nicht stabil ist.

Vom Dimer [22] werden keine 2D-NMR-Spektren aufgenommen, da es sich um ein im Rahmen des Problems unwichtiges Nebenprodukt handelt.

3.5.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl₃

meta-Nitroacetophenon [20]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,65	s		26,62
2				195,59
3				138,18
4	8,71	pt		123,09
5				148,32
6	8,37	m		127,29
7	7,65	pt		129,85
8	8,24	d	7,69	133,71

D₂O

meta-Nitroacetophenon [20]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,77	s		27,35
2				202,13
3				n.d.
4	8,83	s		135,57*
5				n.d.
6	8,53*	d	8,76	131,16*
7	7,82	pt		128,94*
8	8,41*	d	7,76	124,21*

* Können nicht unterschieden werden

3.5.2.2 IR-Carbonylbande

meta-Nitroacetophenon [20]:

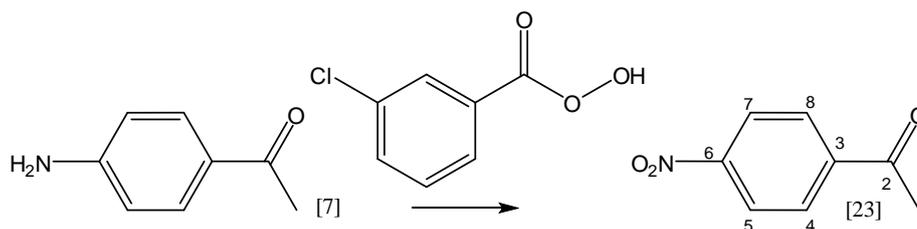
v (C=O) strong 1689,9 cm⁻¹

3.5.2.3 R_f-Wert

meta-Nitroacetophenon [20]:

0,58 (Kieselgel, Petrolether/Ether 2:1)

3.6 Herstellung von *para*-Nitroacetophenon [23]⁴¹



3.6.1 Durchführung

In einem Dreihalskolben mit einem Tropftrichter und Rückflusskühler werden 4 eq. (5,1 g; 0,03 mol) *meta*-Chlorperbenzoesäure in Chloroform gelöst und zum Sieden erhitzt. Zu dieser Lösung wird eine Lösung aus 1 eq. (1 g; 0,0074 mol) *meta*-Aminoacetophenon [6] in 20 mL Chloroform getropft. Nach Beenden des Zutropfens wird 2 h Rückfluss erhitzt. Danach wird die Mischung auf Raumtemperatur gebracht, filtriert und mit 1 N Natriumhydroxid-Lösung ausgeschüttelt. Mit Magnesiumsulfat wird getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Säule (Kieselgel) mit Dichlormethan als Laufmittel gereinigt. Ausbeute: 0,68 g (56 % der Theorie).

3.6.2 Analytische Daten

3.6.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,66	s		26,97	1	2,77	s		n.d.
2				196,46	2				n.d.
3				141,51	3				n.d.
4	8,30*	d	8,88	123,87*	4	8,40*	d	8,90	129,95*
5	8,09*	d	8,88	129,30*	5	8,22*	d	8,90	124,23*
6				150,54	6				n.d.
7	8,09*	d	8,88	129,30*	7	8,22*	d	8,90	124,23*
8	8,30*	d	8,88	123,87*	8	8,40*	d	8,90	129,95*

* Können nicht unterschieden werden

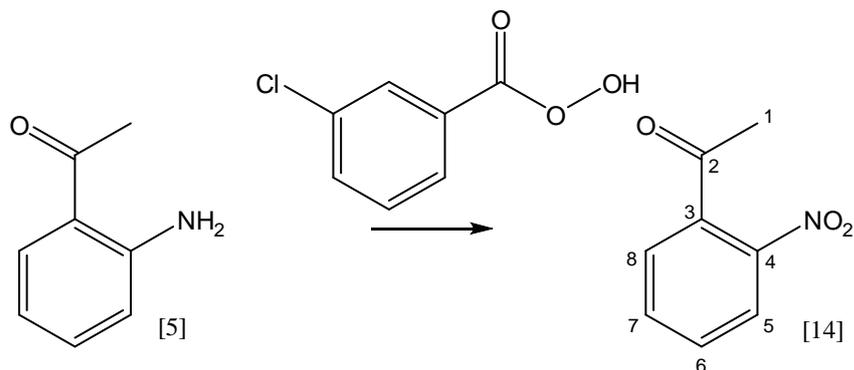
3.6.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1692,0 cm⁻¹

3.6.2.3 R_f-Wert

0,64 (Kieselgel, Dichlormethan)

3.7 Herstellung von *ortho*-Nitroacetophenon [24]⁴¹



3.7.1 Durchführung

Siehe Herstellung von *para*-Nitroacetophenon [23]. Eingesetztes Edukt (1 g; 0,0074 mol) *ortho*-Aminoacetophenon [5]. Ausbeute: 0.42 g (43 % der Theorie).

3.7.2 Analytische Daten

3.7.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,54	s		30,12	1	2,67	s		31,11
2				199,73	2				207,09
3				138,02	3				137,41
4				146,11	4				146,45
5	8,07	d	8,16	124,35	5	8,21	dd	0,86/8,26	126,02
6	7,58	pt		130,60	6	7,76	dpt		133,00
7	7,67	pt		134,18	7	7,88	dpt		136,38
8	7,41	d	7,67	127,32	8	7,65	dd	1,32/7,60	128,87

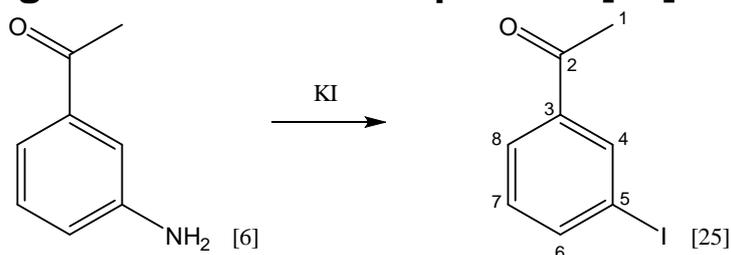
3.7.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1702,5 cm⁻¹

3.7.2.3 R_f-Wert

0,76 (Kieselgel, Dichlormethan)

3.8 Herstellung von *meta*-Iodacetophenon [25]⁴²



3.8.1 Durchführung

In einem Kolben werden 1 eq. (2 g; 0,015 mol) *meta*-Aminoacetophenon [6] gegeben und mit 20 mL einer 3 N Salzsäure solange gerührt und erhitzt, bis sich das *meta*-Aminoacetophenon [6] vollständig gelöst hat. Danach wird 1 eq. (1 g; 0,015 mol) Natriumnitrit in Wasser gelöst und zugegeben. Als nächster Schritt wird 1,2 eq. (2,8 g; 0,017 mol) Kaliumiodid in 15 mL Wasser gelöst, zu der zuvor erzeugten Lösung getropft und auf 80-90 °C erwärmt. Nach Ende der Gasentwicklung (N₂) wird noch 30 min gerührt. Danach wird die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gebracht und mit einer Bisulfit-Lösung das entstandene Iod zerstört. Die Lösung wird mittels 3 N NaOH-Lösung alkalisch gemacht und das Produkt mittels Wasserdampfdestillation isoliert. Das erhaltene Rohprodukt wird mittels Ether aus dem Destillat extrahiert, getrocknet und mit dem Rotationsverdampfer mit Vakuum das Lösungsmittel abdestilliert. Ausbeute: 2.3 g (63 % der Theorie).

3.8.2 Analytische Daten

3.8.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃			
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	¹³ C [ppm]
1	2,55	s	26,49
2			196,50
3			138,77
4	8,25	pt	137,26
5			94,38
6	7,87	m	141,80
7	7,18	pt	130,25
8	7,86	m	127,38

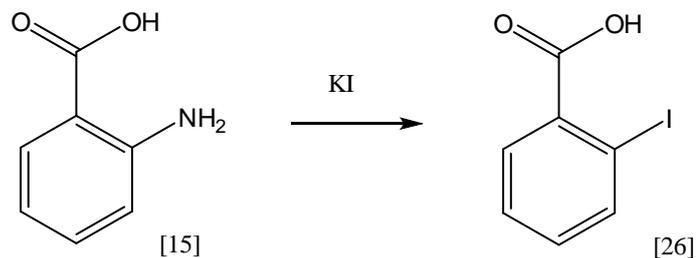
D ₂ O			
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	¹³ C [ppm]
1	2,65	s	27,88
2			203,62
3			139,49
4	8,38	pt	130,54*
5			n.d.
6	7,87	d	7,87
7	7,34	pt	136,89*
8	8,01	d	7,83

* Können nicht unterschieden werden

3.8.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1682,4 cm⁻¹

3.9 Herstellung von *ortho*-Iodbenzoesäure [26]⁴²



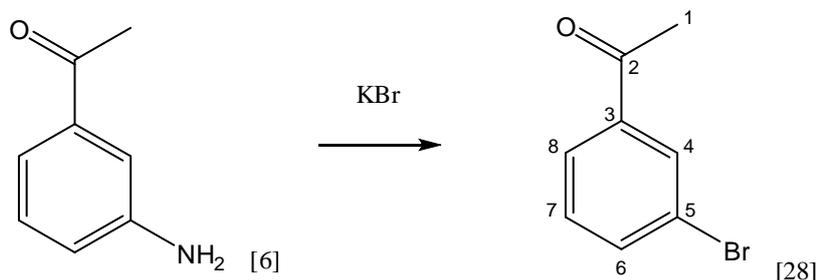
3.9.1 Durchführung

In einem 100 mL Dreihalskolben mit Thermometer, Tropftrichter, Rührkern und Rückflusskühler werden 1 eq. (4,6 g; 0,034 mol) *ortho*-Aminobenzoensäure [15] in 50 mL einer 3 N Salzsäure solange bei zirka 60 °C gerührt bis eine klare Lösung entsteht. Danach wird mittels Eis/Wasser auf 0-5 °C gekühlt. Dabei fällt die Anthranilsäure [15] als Hydrochlorid aus (weißer Niederschlag). Unter Rühren wird 1 eq. (2,3 g; 0,034 mol) Natriumnitrit, welches in 15 mL Wasser gelöst wird, zugetropft. Sobald sich das Hydrochlorid gelöst hat, wird 1 eq. (5,5 g; 0,034 mol) Kaliumiodid in 15 mL Wasser gelöst und zugetropft. Dann wird unter Gasentwicklung auf 80-90 °C erhitzt. Nach Ende der Gasentwicklung (N₂) wird die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gebracht und mit einer Bisulfit-Lösung das entstandene Iod zerstört. Das braune Rohprodukt wird abgesaugt und mehrmals mit Eiswasser gewaschen. Um Verunreinigungen zu entfernen, wird der Feststoff in einem 100 mL Rundkolben überführt, mit Ethanol versetzt und mit Aktivkohle am Rückfluss erhitzt. Nach 10 min wird heiß abfiltriert und nochmals zum Sieden gebracht. In die alkoholische Lösung werden 5 mL Wasser zugegeben und das Produkt beginnt zu kristallisieren. Danach wird es abgesaugt und getrocknet. Ausbeute: 5,7 g (68 % der Theorie).

3.9.2 Analytische Daten

Es sind keine analytischen Daten vorhanden, da es sich um ein Zwischenprodukt handelt, das direkt weiter umgesetzt wird, siehe Herstellung des *ortho*-Iodbenzoesäurechlorids [27].

3.10 Herstellung von *meta*-Bromacetophenon [28]⁴³



3.10.1 Durchführung

In einem Kolben werden 1 eq. (2 g; 0,015 mol) *meta*-Aminoacetophenon [6] gegeben und mit 10 mL einer 3 N Schwefelsäure solange gerührt und erhitzt, bis sich die *meta*-Aminoacetophenon [6] vollständig gelöst hat. Diese Lösung wird langsam in eine noch warme Lösung eingebracht, die folgendermaßen hergestellt wird: 2,5 g Kupfersulfat, 3,6 g Kaliumbromid, 2 mL Schwefelsäure und Cu-Späne werden in 20 mL Wasser am Rückfluss erhitzt und die festen Rückstände abfiltriert. Danach wird 1 eq. (1 g; 0,015 mol) Natriumnitrit in Wasser gelöst und langsam zugetropft. Es wird solange gerührt bis sich die Gasentwicklung einstellt und weitere 30 min vergangen sind. Danach wird das Gemisch im Wasserdampf destilliert, die organische Phase mit Dichlormethan ausgeschüttelt und vorsichtig das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer mit Vakuum abdestilliert. Ausbeute: 1,6 g (52 % der Theorie).

3.10.2 Analytische Daten

3.10.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

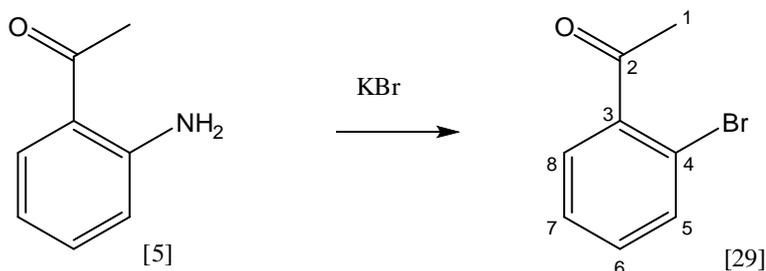
CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,52	s		26,43	1	2,68	s		27,72
2				196,37	2				203,37
3				138,63	3				139,51
4	8,00	pt		131,15	4	8,20	pt		128,78*
5				122,78	5				n.d.
6	7,61	dd	1,83/8,07	135,76	6	7,87*	d	8,20	131,98*
7	7,27	pt		130,05	7	7,50	pt		132,70*
8	7,80	d	7,84	126,70	8	7,99*	d	8,21	138,04*

* Können nicht unterschieden werden

3.10.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1683,1 cm⁻¹

3.11 Herstellung von *ortho*-Bromacetophenon [29]⁴³



3.11.1 Durchführung

Siehe Herstellung von *meta*-Bromacetophenon [28]. Eingesetztes Edukt (1 g; 0,008 mol) *ortho*-Aminoacetophenon [5]. Ausbeute: 0,1 g (7 % der Theorie).

3.11.2 Analytische Daten

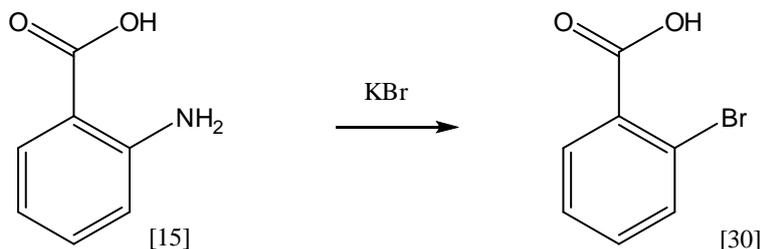
3.11.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,61	s		30,29	1	2,71	s		31,22
2				201,32	2				208,10
3				141,49	3				141,46
4				118,89	4				119,35
5	7,59	d	8,69	133,82	5	7,78	d	7,92	135,38
6	7,27	dpt		131,75	6	7,48	pt		134,16
7	7,35	pt		127,42	7	7,50	pt		129,22
8	7,44	dd	1,89/7,56	128,88	8	7,68	d	7,52	130,58

3.11.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1695,0 cm⁻¹

3.12 Herstellung von *ortho*-Brombenzoesäure [30]⁴³



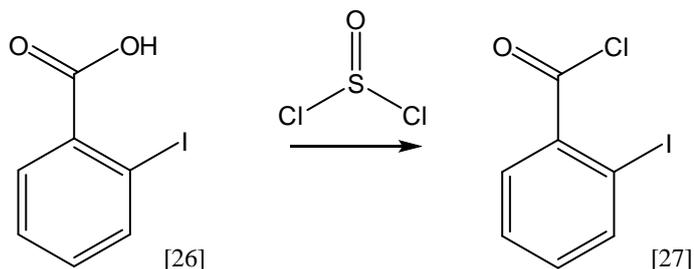
3.12.1 Durchführung

In einem Kolben werden 1 eq. (2 g; 0,015 mol) *ortho*-Aminobenzoessäure [15] gegeben und mit 20 mL einer 3 N Salzsäure solange gerührt und erhitzt, bis sich die *ortho*-Aminobenzoessäure [15] vollständig gelöst hat. Danach wird die Reaktionslösung mittels Eis/Wasser gekühlt und das Hydrochlorid der Anthranilsäure [15] fällt als weißer Niederschlag aus. Mit 1 eq. (1 g; 0,015 mol) Natriumnitrit in Wasser gelöst wird der Niederschlag bei Kühlung wieder gelöst. Diese Lösung wird langsam in eine noch warme Lösung eingebracht, die folgendermaßen hergestellt wird: 2,5 g Kupfersulfat, 3,6 g Kaliumbromid, 2 mL Schwefelsäure und Kupfer-Späne werden in 20 mL Wasser am Rückfluss erhitzt und die festen Rückstände abfiltriert. Das Gemisch wird solange am Rückfluss erhitzt, bis sich die Gasentwicklung einstellt und weitere 30 min vergangen sind. Die ausgefallene braune Masse wird abgesaugt und mit viel Wasser gewaschen, in Ethanol aufgenommen und unter Rückfluss mit Aktivkohle für zirka 20 min erhitzt und abfiltriert. Die Lösung wird mit wenig Wasser versetzt und es bilden sich Kristalle die abgesaugt werden. Ausbeute: 0,33 g (11 % der Theorie).

3.12.2 Analytische Daten

Es sind keine analytischen Daten vorhanden, da es sich um ein Zwischenprodukt handelt, das direkt weiter umgesetzt wird. Siehe Herstellung des *ortho*-Brombenzoesäurechlorids [31].

3.13 Herstellung des *ortho*-Iodbenzoesäurechlorids [27]⁴⁸



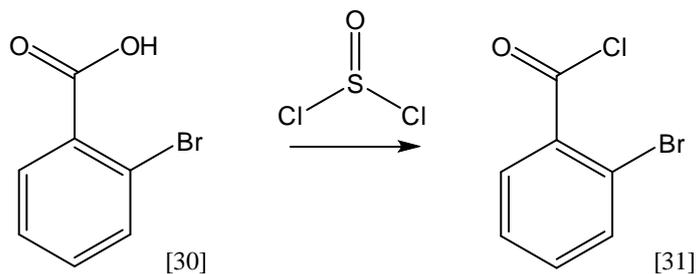
3.13.1 Durchführung

Es wird 1 eq. (0,247g; 0,001 mol) *ortho*-Iodbenzoesäure [26] in 5 mL Ether gelöst und mit 13 eq. (1 mL; 0,013 mol) Thionylchlorid für zirka 2 Stunden am Rückfluss erhitzt. Der Ether und die Thionylchlorid-Reste werden am Rotationsverdampfer unter Vakuum abdestilliert. Die Ausbeute wird nicht bestimmt, da das Produkt sofort weiterverwendet wird.

3.13.2 Analytische Daten

Es sind keine analytischen Daten vorhanden, da es sich um ein Zwischenprodukt handelt, das direkt weiter umgesetzt wird. Siehe Herstellung von *ortho*-Iodacetophenon [32] aus *ortho*-Iodbenzoesäurechlorid [27].

3.14 Herstellung des *ortho*-Brombenzoesäurechlorids [31]⁴⁸



3.14.1 Durchführung

Siehe Herstellung des *ortho*-Iodbenzoesäurechlorids [27]. Eingesetztes Edukt (0,2 g; 0,001 mol) *ortho*-Brombenzoesäure [30]. Die Ausbeute wird nicht bestimmt, da das Produkt sofort weiterverwendet wird.

3.14.2 Analytische Daten

Es sind keine analytischen Daten vorhanden, da es sich um ein Zwischenprodukt handelt, das direkt weiter umgesetzt wird. Siehe Herstellung von *ortho*-Bromacetophenon [29] aus *ortho*-Brombenzoesäurechlorids [31].

3.15 Herstellung des Methylgrignard-Reagenzes [16]⁴⁹

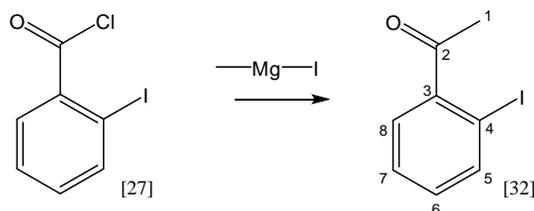
3.15.1 Darstellung

In einen Dreihalskolben mit Rückflusskühler, Calciumchloridrohr und Tropftrichter werden 1 eq. (2,4 g; 0,1 mol) Magnesiumspäne mit 10 mL absolutem Ether übergossen und mit 1/20 von 1 eq. (14,1 g; 0,1 mol) Methyljodid versetzt. Um die Reaktion zu starten, wird die Lösung kurz mit dem Heißluftfön erwärmt. Der Start der Reaktion macht sich durch eine Trübung und Erwärmung der Lösung bemerkbar. Sobald die Reaktion läuft, wird das restliche Methyljodid in absolutem Ether gelöst zur Reaktionsmischung getropft und für 2 h bei mehrmaligen kurzen Erhitzen gerühren. Die Magnesiumspäne lagern sich am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Im Überstand befindet sich das Produkt und kann mit einer Spritze abgesaugt werden. Das erhaltene Methylgrignard-Reagenz [16] ist an der Luft instabil und wird ohne weitere Aufarbeitung sofort verarbeitet. Die Ausbeute wird nicht bestimmt, da das Produkt sofort weiterverwendet wird.

3.15.2 Analytische Daten

Es werden keine analytischen Daten bestimmt, da es sich um ein Zwischenprodukt handelt, das direkt weiter umgesetzt wird. Siehe Herstellung von *ortho*-Iodacetophenon [32] aus *ortho*-Iodbenzoesäurechlorids [27], Herstellung von *ortho*-Bromacetophenon [29] durch aus *ortho*-Brombenzoesäurechlorids [31] und Versuch zur Herstellung von *ortho*-Acetaminoacetophenon [33] aus *ortho*-Acetaminobenzoessäure [34].

3.16 Herstellung von *ortho*-Iodacetophenon [32] aus *ortho*-Iodbenzoesäurechlorids [27]⁴⁶



3.16.1 Durchführung

Eine Lösung von 1,3 eq. (0,124 g; 0,001 mol) MeMgI und absolutem Ether wird unter Argon und Rühren in eine auf -78 °C gekühlte Lösung von 1 eq. (0,21 g; 0,8 mmol) *ortho*-Iodbenzoesäurechlorid [27] und 0,03 eq. (0,0085 g; 0,024 mmol) Eisen(III)-acetylacetonat getropft. Es tritt eine sofortige Farbveränderung ein von rot/orange auf braun/grün. Nach 15 min Rühren wird mit gesättigter NH₄Cl-Lösung gequentscht, auf Raumtemperatur gebracht und mit Ether mehrmals ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Extrakte wird am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert und mittels Säule (Kieselgel) mit einem Laufmittel von Dichlormethan/Essigester 3:2 gereinigt. Ausbeute: 0,12 g (61 % der Theorie).

3.16.2 Analytische Daten

3.16.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,52	s		29,47	1	2,70	s		30,72
2				201,77	2				216,77
3				144,07	3				151,59
4				90,93	4				n.d.
5	7,92	dd	1,00/7,90	140,87	5	8,08*	d	7,96	142,31*
6	7,10	dt		131,79	6	7,29*	pt		134,07*
7	7,38	dt		128,05	7	7,56*	pt		129,85*
8	7,43	dd	1,79/7,73	128,29	8	7,68*	d	7,68	130,14*

* Können nicht unterschieden werden

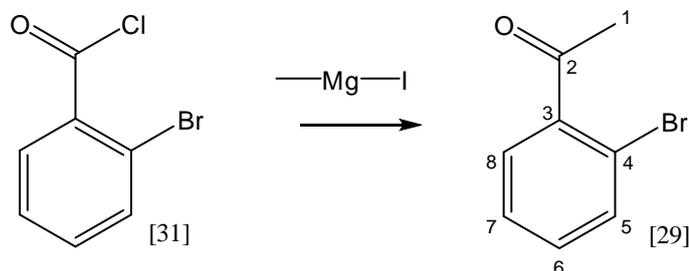
3.16.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1686,2 cm⁻¹

3.16.2.3 R_f-Wert

0,89 (Kieselgel; Dichlormethan/Essigester 3:2)

3.17 Herstellung von *ortho*-Bromacetophenon [29] aus *ortho*-Brombenzoesäurechlorid [31]⁴⁶



3.17.1 Durchführung

Siehe Herstellung von *ortho*-Iodacetophenon [32] aus *ortho*-Iodbenzoesäurechlorid [27]. Eingesetztes Edukt (0,17 g; 0,8 mmol) *ortho*-Brombenzoesäurechlorid [31]. Ausbeute: 0,06 g (38 % der Theorie).

3.17.2 Analytische Daten

3.17.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,61	s		30,29	1	2,71	s		31,22
2				201,32	2				208,10
3				141,49	3				141,46
4				118,89	4				119,35
5	7,59	d	8,69	133,82	5	7,78	d	7,92	135,38
6	7,27	dpt		131,75	6	7,48	pt		134,16
7	7,35	pt		127,42	7	7,50	pt		129,22
8	7,44	dd	1,89/7,56	128,88	8	7,68	d	7,52	130,58

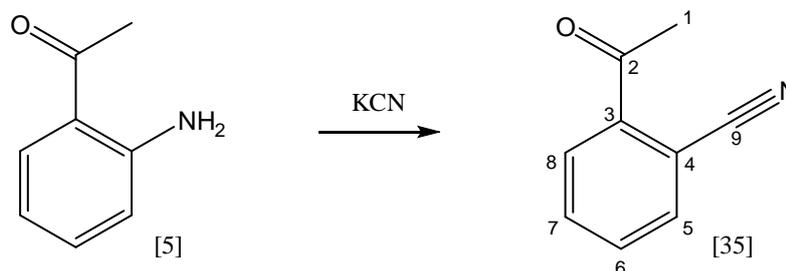
3.17.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1695,0 cm⁻¹

3.17.2.3 R_f-Wert

0,86 (Kieselgel; Dichlormethan/Essigester 3:2)

3.18 Herstellung von *ortho*-Cyanoacetophenon [35]⁴⁴



3.18.1 Durchführung

Es werden 2 eq. (5 g; 0,02 mol) Kupfersulfat in Wasser gelöst und erwärmt. Zu dieser Lösung wird 8 eq. (5,5 g; 0,08 mol) Kaliumcyanid gegeben. Da beim Lösen von Kaliumcyanid HCN-Gas entsteht, wird in einer geschlossenen Apparatur gearbeitet, die einen Auslass hat, der in den Abzugschacht mündet. Das entstandene Gas stellt somit keine weiteren Probleme dar. Zu dieser Lösung wird mittels Tropftrichter eine Diazoacetophenonlösung unter heftigem Rühren zutropft. Die Diazoverbindung wird wie folgt dargestellt: 1 eq. (1 g; 0,0074 mol) *ortho*-Aminoacetophenon [5] wird in Wasser und Schwefelsäure gelöst und dann eine Lösung aus 1,2 eq. (0,8 g; 0,012 mol) Natriumnitrit in Wasser zutropft. Beim Zutropfen entweicht N₂. Nach dem Beenden des Zutropfens der Diazoverbindung in die vorgelegte Lösung wird noch 2 h gerührt. Das Reaktionsprodukt ist in Wasser fast unlöslich und fällt als zähe Masse an der Gefäßwand aus. Mittels Filter wird die Masse von der Reaktionslösung getrennt, in Alkohol aufgenommen und mit Aktivkohle am Rückfluss erhitzt. Nach dem Abfiltrieren der Aktivkohle wird die Lösung nochmals zum Sieden gebracht und der Alkohol eingeeengt. Zu dieser Lösung wird Wasser getropft bis das Produkt ausfällt. Das Produkt ist nach diesem Reinigungsschritt immer noch mit dem Ausgangsprodukt verunreinigt, welches aber mit einer Säule (Kieselgel) mit Petrolether/Ether 1:1 als Laufmittel entfernt wird. Ausbeute: 0,21 g (20 % der Theorie).

3.18.2 Analytische Daten

3.18.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,67	s		27,80	1	2,73	s		28,43
2				196,07	2				202,11
3				139,81	3				140,27
4				110,98	4				110,51
5	7,80	d	7,87	135,23	5	7,95	d	7,32	137,09
6	7,63	pt		132,58*	6	7,87*	pt		134,95
7	7,69	pt		132,44*	7	7,80*	pt		137,77
8	7,92	d	7,21	129,84	8	8,18	d	7,96	132,49
9				118,05	9				120,78

* Können nicht unterschieden werden

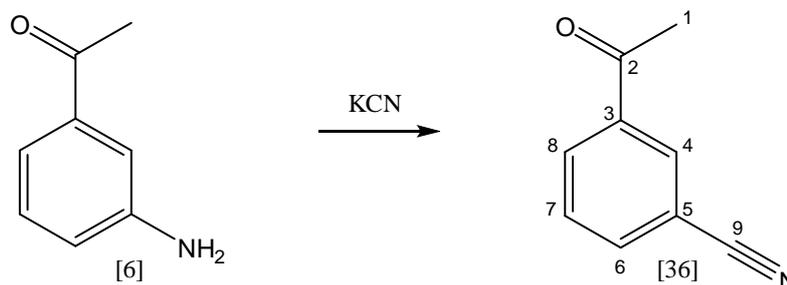
3.18.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1686,5 cm⁻¹

3.18.2.3 R_f-Wert

0,37 (Kieselgel; Petrolether/Ether 1:1)

3.19 Herstellung von *meta*-Cyanoacetophenon [36]⁴⁴



3.19.1 Durchführung

Siehe Herstellung von *ortho*-Cyanoacetophenon [35]. Eingesetztes Edukt (1 g; 0,0074 mol) *ortho*-Aminoacetophenon [5]. Ausbeute: 0,35 g (24 % der Theorie).

3.19.2 Analytische Daten

3.19.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃				D ₂ O					
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,62	s		26,54	1	2,72	s		n.d.
2				195,91	2				202,81
3				137,77	3				137,87
4	8,21	s		132,18*	4	8,41	s		131,78*
5				113,26	5				112,72
6	7,83	d	7,71	135,99	6	8,05	d	7,78	133,95*
7	7,60	pt		129,67	7	7,75	pt		134,46*
8	8,16	d	8,35	132,03*	8	8,30	d	7,27	138,41*
9				117,89	9				120,40

* Können nicht unterschieden werden

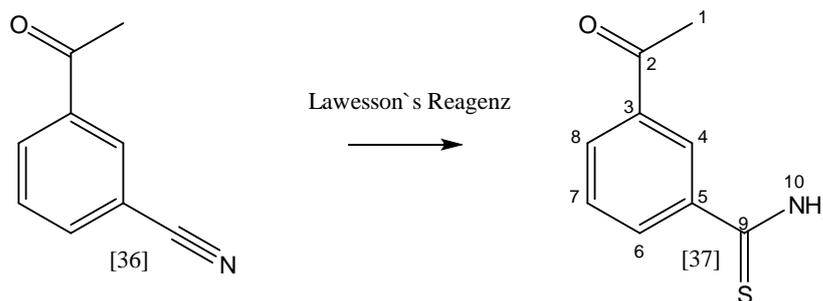
3.19.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1686,8 cm⁻¹

3.19.2.3 R_f-Wert

0,59 (Kieselgel; Petrolether/Ether 1:1)

3.20 Herstellung von *meta*-Thioaminoacetophenon [37]⁴⁵



3.20.1 Durchführung

Es wird 1 eq. 0,065 g (0,5 mmol) *meta*-Cyanoacetophenon [36] in 75 mL abs. Toluol und 10 mL abs. Ether gelöst. Zu dieser Lösung werden 12 eq. (0,75 mL; 0,006 mol) BF₃ in Ether gelöst gegeben. Dabei färbt sich die Lösung kaminrot. Danach wird 1,4 eq. (0,3 g; 0,7 mmol) Lawesson`s Reagenz hinzugegeben und bei 40 °C für 12 h gerührt. Dabei färbt sich die Lösung purpur, das Lösungsmittel wird eingeeengt. Die resultierende gelbliche Masse wird mittels Säule (Kieselgel) mit Toluol/Ether 2:1 als Laufmittel gereinigt. Ausbeute: 16 mg (17 % der Theorie).

3.20.2 Analytische Daten

3.20.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,63	s		26,23
2				197,39
3				137,2
4	8,39	pt		125,84
5				139,29
6	8,12	d	7,63	131,82
7	7,51	pt		128,94
8	8,06	d	7,65	131,45
9				n.d.
10a	7,68	s		
10b	7,32	s		

D₂O
Wurde nicht vermessen!

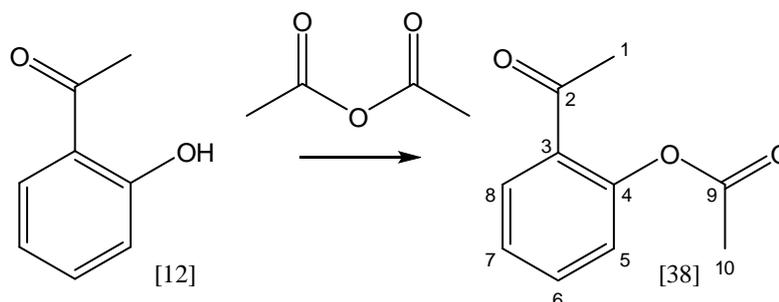
3.20.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1676,6 cm⁻¹

3.20.2.3 R_f-Wert

0,50 (Kieselgel; Toluol/Ether 2:1)

3.21 Herstellung von *ortho*-Acetoxyacetophenon [38]³⁹



3.21.1 Durchführung

In einem Rundkolben mit Kühler wird 1 eq. (0,2 g; 0,0015 mol) *ortho*-Hydroxyacetophenon [12] und 2,6 eq. (0,4 g; 0,004 mol) Essigsäureanhydrid in Pyridin gelöst. Nach 30 min Rückfluss erhitzen wird auf Raumtemperatur gekühlt und in Eis/Wasser geschüttet. Da das Produkt nicht ausfällt, wird mit HCl angesäuert. Falls sich immer noch kein Feststoff bildet, wird mittels Dichlormethan ausgeschüttelt und das Lösungsmittel der organischen Extrakte mit dem Rotationsverdampfer mit Vakuum abdestilliert. Es bilden sich gelb/orange Kristalle. Ausbeute: 0,25 g (94 % der Theorie).

3.21.2 Analytische Daten

3.21.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

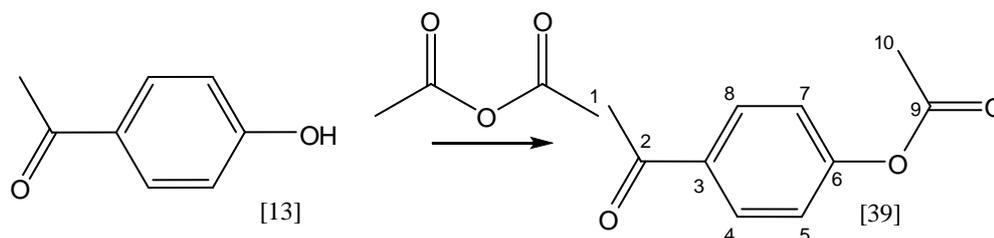
CDCl ₃				D ₂ O					
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,54	s		29,33	1	2,63	s		30,04
2				197,53	2				204,37
3				130,72	3				131,27
4				149,05	4				149,45
5	7,10	d	7,93	123,83	5	7,25*	dd	1,02/8,14	125,03*
6	7,51	pt		133,42	6	7,70*	dpt		128,40*
7	7,29	pt		126,03	7	7,48*	dpt		132,43*
8	7,79	d	7,86	130,28	8	7,99*	dd	1,55/7,79	136,14*
9				166,47	9				174,65
10	2,33	s		21,14	10	2,38	s		21,84

* Können nicht unterschieden werden

3.21.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1682,6 cm⁻¹

3.22 Herstellung von *para*-Acetoxyacetophenon [39]³⁹



3.22.1 Durchführung

In einem Rundkolben mit Kühler wird 1 eq. (0,5 g; 0,0038 mol) *para*-Hydroxyacetophenon [13] und 2,5 eq (0,94 g; 0,0092 mol) Essigsäureanhydrid in Pyridin gelöst. Nach 30 min Erhitzen am Rückfluss wird auf Raumtemperatur gekühlt und in Eis/Wasser geschüttet. Das Produkt fällt als weißer Feststoff aus, der abgesaugt wird. Ausbeute: 0,62 g (92 % der Theorie).

3.22.2 Analytische Daten

3.22.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

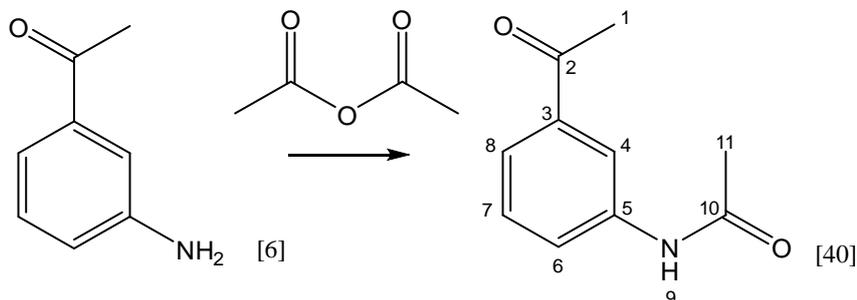
CDCl ₃				D ₂ O					
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,57	s		26,56	1	2,69	s		27,69
2				196,81	2				204,04
3				134,75	3				136,04
4	7,97*	d	8,60	129,93*	4	8,09*	d	8,80	131,95*
5	7,17*	d	8,60	121,75*	5	7,31*	d	8,80	123,51*
6				154,35	6				155,82
7	7,17*	d	8,60	121,75*	7	7,31*	d	8,80	123,51*
8	7,97*	d	8,60	129,93*	8	8,09*	d	8,80	131,95*
9				168,81	9				174,13
10	2,30	s		21,13	10	2,39	s		21,90

* Können nicht unterschieden werden

3.22.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1680,1 cm⁻¹

3.23 Herstellung von *meta*-Acetaminoacetophenon [40]³⁹



3.23.1 Durchführung

In einem Rundkolben mit Kühler wird 1 eq. (1 g; 0,007 mol) *meta*-Aminoacetophenon [6] in Pyridin gelöst und 2 eq. (1,5 g; 0,015 mol) Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach 30 min Erhitzen am Rückfluss wird auf Raumtemperatur gekühlt und konz. HCl zugegeben. Da hier erst nach 1 h eine leichte Trübung zu erkennen ist, wird die Lösung erst nach 12 h abgesaugt. Ausbeute: 1,14 g (92 % der Theorie).

3.23.2 Analytische Daten

3.23.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

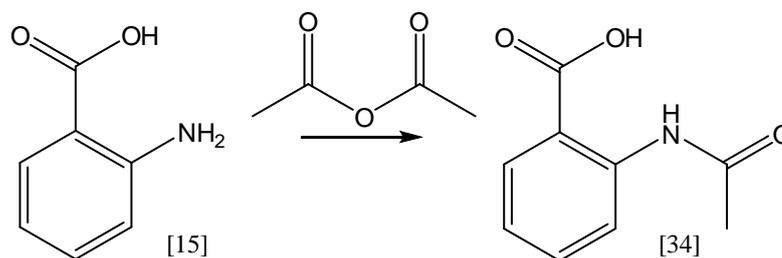
CDCl ₃				D ₂ O					
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,19	s		26,69	1	2,67	s		27,73
2				198,18	2				204,62
3				137,59	3				138,90*
4	8,01	s		119,19	4	8,02	s		122,67
5				138,88	5				138,64*
6	7,93	d	7,94	124,09	6	7,69	d	9,04	128,37
7	7,38	pt		129,28	7	7,56	pt		131,01
8	7,64	d	7,77	124,60	8	7,83	d	7,80	126,91
9	8,08	s			9	n.d.			
10				168,89	10				174,46
11	2,57	s		24,51	11	2,22	s		24,30

* Können nicht unterschieden werden

3.23.2.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1668,8 cm⁻¹

3.24 Herstellung von *ortho*-Acetaminobenzoesäure [34]³⁹



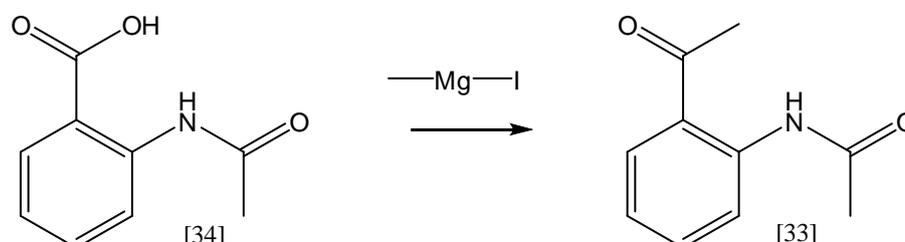
3.24.1 Durchführung

Siehe Herstellung von *meta*-Acetaminoacetophenon [40]. Eingesetztes Edukt (1 g; 0,007 mol) *ortho*-Aminobenzoesäure [15]. Ausbeute: 1,12 g (86 % der Theorie).

3.24.2 Analytische Daten

Es sind keine analytischen Daten vorhanden, da es sich um ein Zwischenprodukt handelt, das direkt weiter umgesetzt wird. Siehe Herstellung von *ortho*-Acetaminoacetophenon [33] durch Kettenverlängerung von *ortho*-Acetaminobenzoesäure [34].

3.25 Versuch zur Herstellung von *ortho*-Acetaminoacetophenon [33] aus *ortho*-Acetaminobenzoesäure [34]⁴⁷



3.25.1 Durchführung

In einem Schlenkkolben wird 1 eq. (0,9 g; 0,005 mol) *ortho*-Acetaminobenzoesäure [34] in abs. THF gelöst, auf 0 °C gekühlt und unter Ar-Schutzgas mit 4 eq. (3,3g; 0,02 mol) MeMgI versetzt. Beim Zutropfen bildet sich ein weißer Niederschlag. Nachdem das Zutropfen beendet ist, wird über Nacht gerührt. Die Lösung wird am nächsten Tag in ein Eis/Wasser Gemisch geschüttet und mit HCl auf pH 5 gebracht. Danach wird mit Ethylacetat ausgeschüttelt, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer mit Vakuum abdestilliert. Das NMR zeigt nur Ausgangsmaterial.

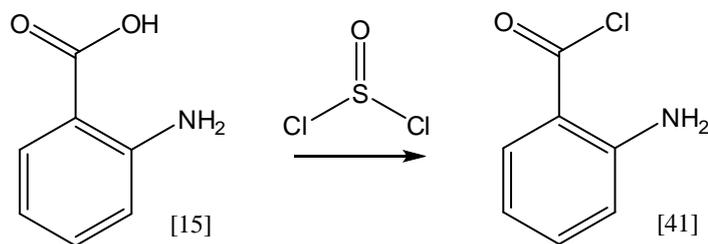
3.25.2 Ausbeute

Es wurde kein Produkt gefunden.

3.25.3 Analytische Daten

Kein Produkt vorhanden.

3.26 Herstellung des Anthranilsäurechlorids [41]⁴⁸



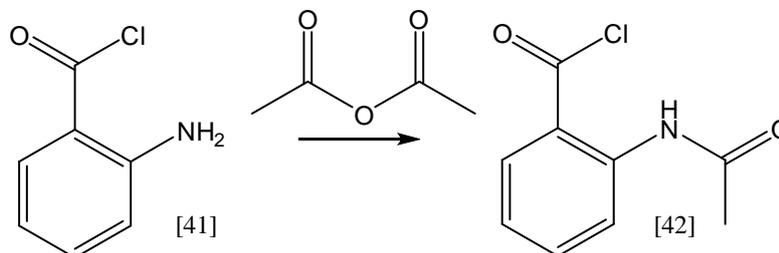
3.26.1 Durchführung

Es wird 1 eq. (1,37 g; 0,01 mol) Anthranilsäure [15] in 10 mL Ether gelöst und mit 10 eq. (13 mL; 0,13 mol) Thionylchlorid für zirka 2 h am Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird rot. Die Ether und Thionylchlorid-Reste werden mit dem Rotationsverdampfer unter Vakuum abdestilliert. Ausbeute: 1,4 g (90 % der Theorie).

3.26.2 Analytische Daten

Es sind keine analytischen Daten vorhanden, da es sich um ein Zwischenprodukt handelt, das direkt weiter umgesetzt wird. Siehe Herstellung des Acetaminoanthranilsäurechlorids [42].

3.27 Versuch zur Herstellung des Acetaminoanthranilsäurechlorids [42]³⁹



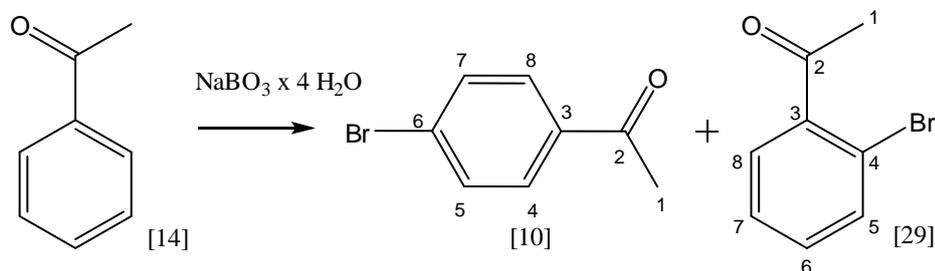
3.27.1 Durchführung

In einem Rundkolben mit Kühler wird 1 eq. (1 g; 0,007 mol) Anthranilsäurechlorid [41] in Pyridin gelöst und 2 eq. (1,5 g; 0,015 mol) Essigsäureanhydrid zugegeben. Nach 30 min erhitzen am Rückfluss wird auf Raumtemperatur gekühlt und konz. HCl zugegeben. Das Lösungsmittel der schwarzen Reaktionslösung wird mit dem Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert und ein NMR-Rohspektrum aufgenommen. Die aufgenommenen NMR-Spektren zeigen kein Produkt.

3.27.2 Analytische Daten

Kein Produkt vorhanden.

3.28 Herstellung von *ortho*- [29] und *para*-Bromacetophenon [10]³⁷



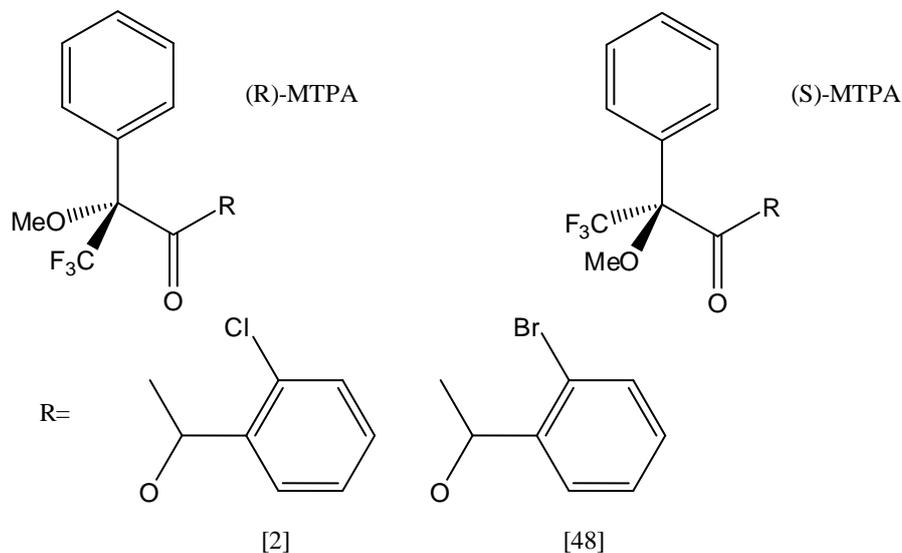
3.28.1 Durchführung

Es werden 8 mL Wasser und 8 mL konz. H_2SO_4 vermischt und 1 eq. (1,2 g; 10 mmol) Acetophenon [14] zugegeben. Bei Eiskühlung wird portionsweise 1,2 eq. (1,7 g; 12 mmol) Natriumborat zugegeben. Die Lösung verfärbt sich dabei nach gelb bis dunkel orange und erwärmt sich, die Reaktion wird 12 h gerührt. Aufarbeitung erfolgt durch Ausschütteln mit Dichlormethan, Trocknen der vereinigten organischen Extrakte und Abdestillieren des Lösungsmittels. Danach folgt eine Säule (Kieselgel) mit einem Laufmittel von Dichlormethan/Petrolether 3:2 zur Trennung der Verbindungen. Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, da sich die Produkte nicht trennen ließen.

3.28.2 Analytische Daten

Siehe Herstellung von *para*-Bromacetophenon [10] und Herstellung von *ortho*-Bromacetophenon [29] durch Kettenverlängerung des *ortho*-Brombenzoesäurechlorids [31].

3.29 Herstellung des Mosheresters⁶²



3.29.1 Durchführung

Es werden 1,25 eq. α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetylchlorid, 1,25 eq. Et₃N und 0,015 eq. DMAP zu einer Lösung von 1 eq. des zu bestimmenden Alkohols in abs. Dichlormethan gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 5 % wässriger HCl gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer mit Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt wird mittels Minisäule mit Dichlormethan als Laufmittel gereinigt.

3.29.2 Ausbeute

Wurde nicht bestimmt, da sofort NMR-Spektren aufgenommen wurden.

3.29.3 Analytische Daten

3.29.3.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; CDCl₃; 300,2 K)

(*R*)-Mosher-1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [43]

Nr.	¹ H [ppm]	Aufspaltung	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	1,59	d	6,6	20,84
8	7,14	m		n.d.

(*S*)-Mosher-1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [44]

Nr.	¹ H [ppm]	Aufspaltung	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	1,54	d	6,58	21,03
8	7,39	m		n.d.

(*R*)-Mosher-1-(2-Bromphenyl)-ethanol [45]

Nr.	¹ H [ppm]	Aufspaltung	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	1,59	d	6,57	21,02
8	7,13	d	7,58	n.d.

(*S*)-Mosher-1-(2-Bromphenyl)-ethanol [46]

Nr.	¹ H [ppm]	Aufspaltung	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	1,54	d	6,57	21,02
8	7,37	m		n.d.

3.29.3.2 R_f-Wert

(*R*)-Mosher-1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [43]

0,76 (Kieselgel; Dichlormethan)

(*S*)-Mosher-1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [44]

0,75 (Kieselgel; Dichlormethan)

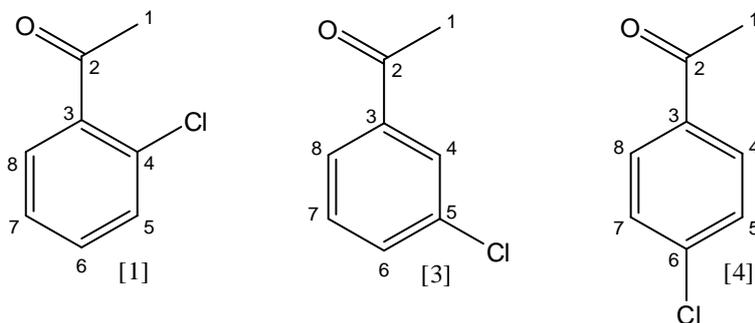
(*R*)-Mosher-1-(2-Bromphenyl)-ethanol [45]

0,77 (Kieselgel; Dichlormethan)

(*S*)-Mosher-1-(2-Bromphenyl)-ethanol [46]

0,76 (Kieselgel; Dichlormethan)

3.30 Chloracetophenon



3.30.1 Analytische Daten

3.30.1.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl₃

ortho-Chloracetophenon [1]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,61	s		30,62
2				200,33
3				139,09
4				131,22
5	7,38	dd	1,89/8,02	130,57
6	7,28	dt		126,85
7	7,35	dt		131,90
8	7,51	dd	1,61/7,63	129,32

meta-Chloracetophenon [3]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,55	s		26,45
2				196,58
3				138,55
4	7,88	dt		128,31
5				134,84
6	7,49	dd	2,17/7,98	132,93
7	7,36	t	7,89	129,86
8	7,78	dpt		126,33

para-Chloracetophenon [4]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,54	s		26,45
2				196,68
3				135,38
4	7,85*	d	8,46	129,64*
5	7,38*	d	8,46	128,80*
6				139,47
7	7,38*	d	8,46	128,80*
8	7,85*	d	8,46	129,64*

D₂O

ortho-Chloracetophenon [1]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,72	s		31,40
2				207,71
3				139,23
4				131,80
5	7,56*	m		128,68*
6	7,56*	m		130,96*
7	7,48*	pt		132,21*
8	7,72	d	6,96	134,34*

meta-Chloracetophenon [3]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,68	s		27,76
2				203,90
3				139,54
4	8,03	s		128,37*
5				135,76
6	7,94*	dpt		128,72*
7	7,55	pt		131,74*
8	7,72*	dpt		135,10*

para-Chloracetophenon [4]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,68	s		27,65
2				204,16
3				136,40
4	7,99*	d	8,56	131,56*
5	7,59*	d	8,56	130,35*
6				141,22
7	7,59*	d	8,56	130,35*
8	7,99*	d	8,56	131,56*

* Können nicht unterschieden werden

3.30.1.2 IR-Carbonylbande

ortho-Chloracetophenon [1]

v (C=O) strong 1695,2 cm⁻¹

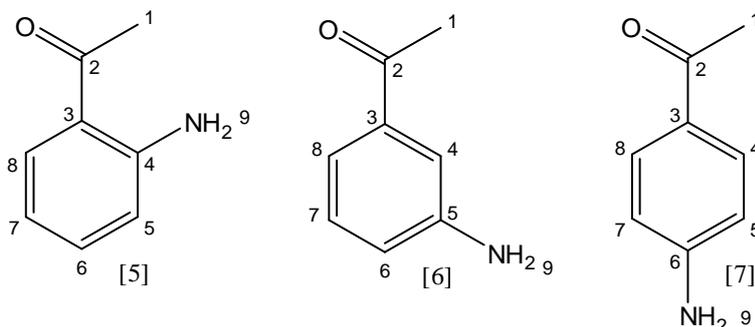
meta-Chloracetophenon [3]

v (C=O) strong 1686,8 cm⁻¹

para-Chloracetophenon [4]

v (C=O) strong 1682,4 cm⁻¹

3.31 Aminoacetophenon



3.31.1 Analytische Daten

3.31.1.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl₃

ortho-Aminoacetophenon [5]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,55	s		27,72
2				200,62
3				118,14
4				150,20
5	6,62	m		115,61*
6	7,24	m		134,26
7	6,62	m		117,10*
8	7,68	dd	1,54/8,83	131,92
9	6,27	s		

para-Aminoacetophenon [7]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,48	s		26,05
2				196,41
3				127,96
4	7,77*	d	8,54	130,78*
5	6,63*	d	8,54	113,72*
6				151,04
7	6,63*	d	8,54	113,72*
8	7,77*	d	8,54	130,78*
9	4,10	s		

D₂O

meta-Aminoacetophenon [6]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,54	s		26,67
2				198,37
3				138,25
4	7,25	s		114,01
5				146,65
6	6,85	d	7,87	119,63
7	7,22	pt		129,42
8	7,31	d	7,78	118,89
9	3,74	s		

ortho-Aminoacetophenon [5]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,60	s		28,67
2				205,79
3				119,95
4				151,48
5	6,85	dd	0,90/8,34	119,29*
6	7,40	dd	6,95/8,48	136,71
7	6,79	dd	7,07/8,15	118,19*
8	7,87	dd	1,48/3,16	134,03
9	n.d.			

meta-Aminoacetophenon [6]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,63	s		27,72
2				205,58
3				138,99
4	7,38	m		116,78
5				148,18
6	7,12	d	7,88	123,20
7	7,37	pt		131,18
8	7,46	d	7,80	121,19
9	n.d.			

para-Aminoacetophenon [7]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,55	s		26,84
2				203,52
3				127,80
4	7,85*	d	8,74	132,86*
5	6,82*	d	8,74	115,81*
6				154,78
7	6,82*	d	8,74	115,81*
8	7,85*	d	8,74	132,86*
9	n.d.			

* Können nicht unterschieden werden

3.31.1.2 IR-Carbonylbande

ortho-Aminoacetophenon [5]

v (C=O) strong 1639,7 cm⁻¹

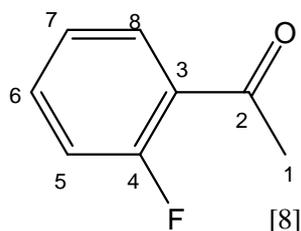
meta-Aminoacetophenon [6]

v (C=O) strong 1668,6 cm⁻¹

para-Aminoacetophenon [7]

v (C=O) strong 1650,0 cm⁻¹

3.32 *ortho*-Fluoracetophenon [8]



3.32.1 Analytische Daten

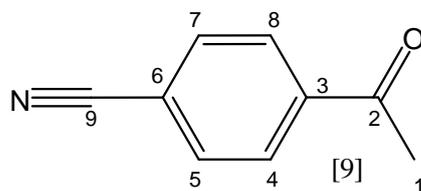
3.32.1.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,56	d	4,92	31,18	1	2,70	d	3,68	31,64
2				195,60	2				203,20
3				125,55	3				126,59
4				162,06	4				163,19
5	7,05	dd	1,12/11,39	116,46	5	7,35	pt		131,83
6	7,44	m		130,41	6	7,29	dd	8,40/11,76	137,21
7	7,14	dt		124,20	7	7,69	m		118,30
8	7,79	dt		134,50	8	7,86	dpt		126,01

3.32.1.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1683,3 cm⁻¹

3.33 *para*-Cyanoacetophenon [9]



3.33.1 Analytische Daten

3.33.1.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

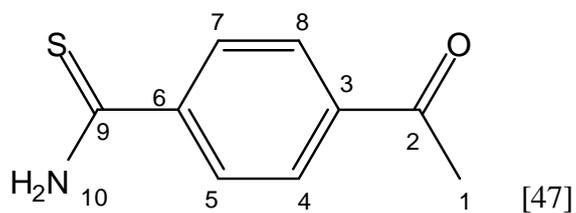
CDCl ₃					D ₂ O				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]	Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,62	s		26,73	1	2,73	s		27,92
2				196,48	2				203,51
3				139,93	3				141,29
4	8,02*	d	8,12	128,68*	4	8,13*	d	8,44	130,25*
5	7,75*	d	8,12	132,50*	5	7,94*	d	8,44	134,31*
6				116,43	6				117,08
7	7,75*	d	8,12	132,50*	7	7,94*	d	8,44	134,31*
8	8,02*	d	8,12	128,68*	8	8,13*	d	8,44	130,25*
9				117,89	9				120,18

* Können nicht unterschieden werden

3.33.1.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1686,8 cm⁻¹

3.34 *para*-Thioaminoacetophenon [47]



3.34.1 Analytische Daten

3.34.1.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; 300,2 K)

CDCl ₃				
Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	2,61	s		26,81
2				197,31
3				139,24
4	7,95*	m		128,44*
5	7,92*	m		127,10*
6				142,58
7	7,92*	m		127,10*
8	7,95*	m		128,44*
9				201,28
10a	7,64	s		
10b	7,18	s		

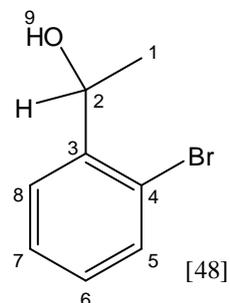
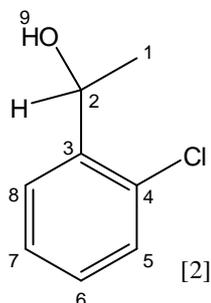
* Können nicht unterschieden werden

D₂O
Wurde nicht vermessen!

3.34.1.2 IR-Carbonylbande

ν (C=O) strong 1678,1 cm⁻¹

3.35 Ganzzellumsetzungen von *ortho*-Chlor- [1] und *ortho*-Bromacetophenon [29]



3.35.1 Durchführung

Die Umsetzung der Substrate zu den entsprechenden Alkoholen wird mittels Transformation mit ganzen Zellen erreicht, die von Regina Kratzer, Mitarbeiterin der TU-Graz, durchgeführt wird.⁶⁶ Von den erhaltenen Alkoholen werden zur Charakterisierung NMR-Spektren aufgenommen.

3.35.2 Analytische Daten

3.35.2.1 NMR-Shifts (400,13 MHz; CDCl₃; 300,2 K)

1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	1,47	d	6,47	23,49
2	5,27	q	6,37	66,96
3				143,04
4				131,64
5	7,30	d	7,76	129,38
6	7,19	dt		128,38
7	7,28	t	7,63	127,18
8	7,57	dd	1,55/7,77	126,39
9	1,95	s		

1-(2-Bromphenyl)-ethanol [48]

Nr.	¹ H [ppm]	Mult.	J [Hz]	¹³ C [ppm]
1	1,47	d	6,40	23,57
2	5,23	q	6,39	69,21
3				144,59
4				121,73
5	7,49	dd	1,20/7,96	132,67
6	7,10	dpt		128,77
7	7,32	dpt		127,85
8	7,57	dd	1,69/7,76	126,65
9	n.d.			

3.36 Aktivitätsmessung

3.36.1 Durchführung

Alle Messungen werden in einem 50 mM Natriumphosphat Puffer bei einem pH 7,0 und bei 25 °C durchgeführt. Da sich die Substrate im wässrigen Puffer schlecht lösen, werden diese zuvor in 5 % Ethanol der Gesamtlösungsmittelmenge vorgelöst. Nachdem sich das Substrat vollständig gelöst hat, wird die restliche Menge mit Puffer aufgefüllt.

Substanz	Substanzmenge [mM]		Katalytische Effizienz [mol ⁻¹ s ⁻¹]
Acetophenon [14]	2		0,5
<i>ortho</i> -Chloracetophenon [1]	5		340,3
<i>meta</i> -Chloracetophenon [3]	5		0,8
<i>para</i> -Chloracetophenon [4]	5		6,6
<i>ortho</i> -Hydroxyacetophenon [12]	0,2	self abs.	4,5
<i>meta</i> -Hydroxyacetophenon [49]	1,3	self abs.	2,4
<i>para</i> -Hydroxyacetophenon [13]	0,3	self abs.	0
<i>ortho</i> -Aminoacetophenon [5]	1,5	self abs.	0
<i>meta</i> -Aminoacetophenon [6]	0,25	self abs.	2,2
<i>para</i> -Aminoacetophenon [7]	0,7	self abs.	0
<i>ortho</i> -Nitroacetophenon [24]	1	self abs.	17,63
<i>meta</i> -Nitroacetophenon [20]	1	self abs.	36,7
<i>para</i> -Nitroacetophenon [23]	1	self abs.	224,4
<i>ortho</i> -Bromacetophenon [29]	1		260,9
<i>meta</i> -Bromacetophenon [28]	4		1,3
<i>para</i> -Bromacetophenon [10]	5		3,2
<i>ortho</i> -Cyanoacetophenon [35]	3		134,5
<i>meta</i> -Cyanoacetophenon [36]	3	self abs.	1,4
<i>para</i> -Cyanoacetophenon [9]	4		1,8
<i>ortho</i> -Iodacetophenon [32]	1		60,5
<i>meta</i> -Iodoacetophenon [25]	1		0,3
<i>ortho</i> -Methoxyacetophenon [18]	5		13,9
<i>para</i> -Methoxyacetophenon [19]	5		0
<i>ortho</i> -Acetoxyacetophenon [38]	5		1,8
<i>para</i> -Acetoxyacetophenon [39]	5		0
<i>meta</i> -Thioaminoacetophenon [37]	0,5	self abs.	0
<i>para</i> -Thioaminoacetophenon [47]	0,5	self abs.	2,1
<i>ortho</i> -Fluoracetophenon [8]	4		16,5
<i>meta</i> -Acetaminoacetophenon [40]	4		0

Da einige Substrate eine Eigenabsorption aufweisen, wird die Konzentration von diesen erniedrigt. Zu dieser hergestellten Lösung wird dann 290 μM NADH beigemischt und zuletzt wird das Enzym zugegeben. Die Messung wird sofort im Anschluss gestartet. Die Enzymkonzentration variiert zwischen 10 μM und 50 nM abhängig von der Substratlöslichkeit.

3.37 *In situ* NMR-Messungen

3.37.1 Durchführung

Es werden von den folgenden Verbindungen *in situ* NMR-Messungen der Xylose Reduktase Umsetzung aufgenommen: *ortho*-Chloracetophenon [1], *para*-Nitroacetophenon [23], *meta*-Nitroacetophenon [20], *ortho*-Bromacetophenon [29] und *ortho*-Aminoacetophenon [5]. Dafür werden die Substanzen mit 35 μL MeOD vorgelöst und mit D_2O auf 700 μL aufgefüllt. Danach wird das NADH und abschließend das Enzym beigemischt. Im Folgenden werden die zugegebenen Substrat-, NADH- und Enzymmengen angeführt.

Substrat	Substratmenge [g]	NADH [g]	Enzym [μL]
<i>ortho</i> -Chloracetophenon [1]	0,0058	0,005	3
<i>ortho</i> -Bromacetophenon [29]	0,0022	0,006	5
<i>ortho</i> -Aminoacetophenon [5]	0,0021	0,005	20
<i>meta</i> -Nitroacetophenon [20]	0,0015	0,006	40
<i>para</i> -Nitroacetophenon [23]	0,0018	0,005	20

3.37.2 Auswertung

Siehe Kapitel 4.5.

3.38 STD-NMR-Messungen

In Kapitel 2.4.4 sind die Grundlagen der Methode beschrieben, im Folgenden sind die Lösungen aufgelistet von denen STD-NMR-Messungen gemacht werden. Von der Umsetzungslösung von *ortho*-Chloracetophenon [1] werden mehrere NMR-Spektren aufgenommen, um Informationen über den Reaktionsverlauf zu bekommen.

Substrat	Substratmenge [g]	NADH [g]	NAD ⁺ [g]	Enzym [μ L]
<i>ortho</i> -Chloracetophenon [1]	0,0022	-	-	5
<i>ortho</i> -Chloracetophenon [1]	0,0022	0,003	-	-
<i>ortho</i> -Chloracetophenon [1]	0,0022	-	0,003	-
<i>ortho</i> -Chloracetophenon [1]	0,0022	0,003	-	5
<i>ortho</i> -Aminoacetophenon [5]	0,0021	-	-	5
<i>ortho</i> -Aminoacetophenon [5]	0,0021	0,003	-	-
<i>ortho</i> -Aminoacetophenon [5]	0,0021	-	0,003	-
<i>ortho</i> -Aminoacetophenon [5]	0,0021	0,003	-	5
1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2]	0,0022	-	-	5
1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2]	0,0022	0,003	-	-
1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2]	0,0022	-	0,003	-
1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2]	0,0022	-	0,003	5

3.38.1 Auswertung

Siehe Kapitel 4.6.

4 Ergebnisse

4.1 Synthese

Das Hauptaugenmerk der Synthese liegt darauf, die Substrate für die enzymatischen Umsetzungen in einer ausreichenden Reinheit herzustellen. Somit werden die meisten Reaktionen nur einmal durchgeführt und nicht bezüglich Ausbeute oder Umsatz optimiert. Folglich zeigen einige Substratherstellungen eine Ausbeute von über 90 %, andere nur 10 % auf.

Ausgehend von Brombenzol [17] kann durch Friedel-Crafts Acylierung *para*-Bromacetophenon [10] auf klassischem Weg hergestellt werden. Weiterhin wird diese Methode der Acylierung für die Synthese von *ortho*-Hydroxy- [12] und *para*-Hydroxyacetophenon [13] angewendet. Hierfür wird Phenylacetat [11] in einer Fries-Umlagerung umgesetzt, wobei die gewünschten Produkte mit moderaten Ausbeuten erhalten werden. Dabei weist das *ortho*-Produkt eine niedrigere Ausbeute auf, welche durch sterische Hinderung der Acetylgruppe durch die benachbarte Hydroxygruppe erklärt werden kann. Aus den beiden erhaltenen Hydroxyacetophenonen können in der Folge quantitativ *ortho*-Methoxy- [18] und *para*-Methoxy- [19], sowie *ortho*-Acetoxy- [38] und *para*-Acetoxyacetophenon [39] durch Methylierung beziehungsweise Acetylierung gewonnen werden.

Aus den kommerziell erworbenen Aminoacetophenonen wird mittels Sandmeyer-Reaktion *ortho*-Brom- [29], *meta*-Brom- [28], *ortho*-Cyano- [35], *meta*-Cyano- [36] und *meta*-Iodacetophenon [25] hergestellt. Dabei zeigt sich, dass die Substitutionen der Aminogruppe durch ein Bromid schlechtere Ausbeuten erzielen, als die mit einem Iodid oder Cyanid. Weiterhin ergibt die Durchführung der *ortho*-Substitutionen eine vergleichsweise schlechte Ausbeute, welche wiederum durch sterische Effekte erklärt werden kann.

Die Sandmeyer-Reaktion, bei der aus *meta*-Aminoacetophenon [6] das *meta*-Bromacetophenon [28] synthetisiert wird, weist ein erwünschtes Nebenprodukt auf, welches isoliert und als *meta*-Hydroxyacetophenon [49] identifiziert wird.

Aus *meta*-Aminoacetophenon [6] kann durch Oxidation der Aminogruppe mittels Natriumperborat-Tetrahydrat *meta*-Nitro- [20] und *meta*-Nitrosoacetophenon [21] hergestellt werden, wobei die Nitrosoverbindung laut der Arbeitsvorschrift, wie auch selbst festgestellt, nicht von langer Haltbarkeit sind und ein Dimer [22] bilden.⁴⁰ Durch diese Vielzahl an Nebenprodukten wird die Ausbeute des gewünschten Produkts erniedrigt und die Isolierung

erschwert. Aus diesem Grund wird ein alternativer Weg für die Synthese der beiden anderen Nitroverbindungen gewählt. Aus den beiden Substanzen *ortho*- [5] und *para*-Aminoacetophenon [7] können durch Oxidation mittels *meta*-Chlorperbenzoesäure die Verbindungen *ortho*- [24] und *para*-Nitroacetophenon [23] hergestellt werden. Durch leichte Modifikationen der Reaktionsführung, die in der Arbeitsvorschrift angegeben sind, hätten auch die beiden Nitroverbindungen synthetisiert werden können. Aber auch hier ist ein Hinweis in der Literatur für die Instabilität gegeben. Daher wird von der Synthese abgesehen.⁴¹

Die Substanz *meta*-Aminoacetophenon [6] wird ein weiteres Mal als Ausgangsprodukt gewählt. Aus dieser wird durch Acetylierung der Aminogruppe mit einer Ausbeute von 92 % *meta*-Acetaminoacetophenon [40] gewonnen.

Für eine weitere Herstellung des *ortho*-Aminoacetophenon [5] werden einige Synthesen durchgeführt, die im Folgenden aufgezeigt werden. Um eine Kettenverlängerung mittels Methylgrignard-Reagenzes [16] durchführen zu können, wird die Anthranilsäure [15] an der Aminogruppe durch Acetylierung geschützt. Doch kann bei der Kettenverlängerung kein Produkt isoliert werden. Ein weiterer Versuch gestaltet sich Folgendermaßen: Aus der Anthranilsäure [15] wird das Säurechlorid mit 90 % Ausbeute gewonnen, welches dann durch Acetylierung der Aminogruppe geschützt werden sollte. Jedoch kann auch hier kein Produkt isoliert werden.

Aus diesem Grund wird aus der Anthranilsäure [15] *ortho*-Iodanthranilsäure [26] und *ortho*-Brombenzoesäuren [30] mittels Sandmeyer-Reaktion synthetisiert, die anschließend in die korrespondierenden Säurechloride überführt werden. Dabei kann wieder eine bessere Ausbeute bei der Iodsubstitution beobachtet werden. Die Säurechloride werden nach einer kurzen Aufreinigung mittels Methylgrignard-Reagenzes [16] in die korrespondierenden Acetophenone überführt. Dabei werden bei der Kettenverlängerung des Iodderivates deutlich höhere Ausbeuten erzielt als bei dem Bromderivat.

Mit Hilfe von Michael Nagl kann aus *meta*-Cyanoacetophenon [36] mittels Lawesson's Reagenz *meta*-Thioaminoacetophenon [37] gewonnen werden. Desweiteren stellte er auch Proben seines von ihm zuvor hergestellten *para*-Thioaminoacetophenon [47] für Umsetzungen mit dem Enzym zur Verfügung.

Nachdem die synthetisierten Substrate auf ihre katalytische Aktivität geprüft werden, kann durch die dadurch erhaltenen Informationen einige geplante Verbindungen verworfen werden. Die Durchführung aller anderen Synthesewege erzielt keinen Erfolg.

4.2 Aktivitätsmessung und σ -Hammett-Werte

In Abbildung 11 ist die katalytische Aktivität, mit der die einzelnen Substrate von der Xylose Reduktase umgesetzt werden, gegen das zugehörige σ -Hammett des jeweiligen aromatischen Rings aufgetragen.

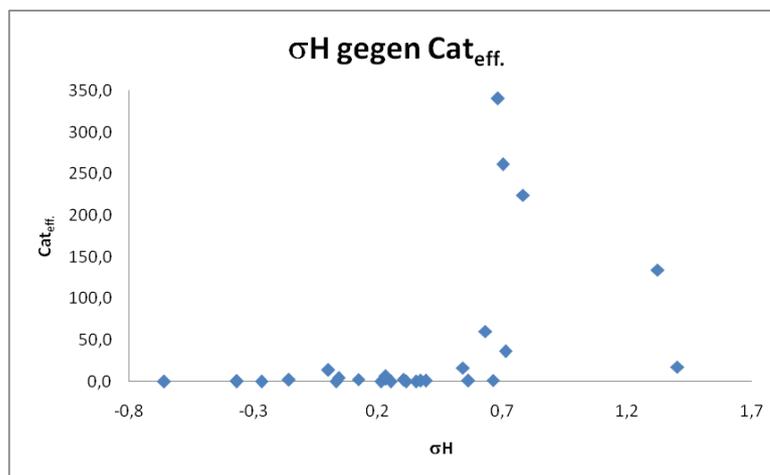


Abbildung 11: σ -Hammett-Werte gegen die katalytische Aktivität

In Tabelle 1 sind die entsprechenden Zahlenwerte aufgelistet. Es ist zu erkennen, dass *ortho*-Brom- [29], *ortho*-Chlor- [1], *ortho*-Cyano- [35], *ortho*-Iod- [32] und *para*-Nitroacetophenon [23] mit hoher Aktivität umgesetzt werden. Alle aromatischen Systeme dieser Substanzen haben, abgesehen von *para*-Nitroacetophenon [23], σ -Hammett-Werte um 0,7. Alle weiteren Verbindungen werden nicht oder nur mit kleiner bis mittlerer katalytischen Aktivität umgesetzt. Ihre σ -Hammett-Werte liegen im Bereich von 0,6 bis zu 0,8. Die Nitroverbindungen weisen im Allgemeinen einen höheren σ -Hammett-Wert auf, obwohl die katalytische Aktivität, abgesehen vom *para*-Produkt, moderat ist.

Tabelle 1

Substanz	σ H	Katalytische Effizienz [mol ⁻¹ s ⁻¹]
Acetophenon [14]	0,00	0,5
<i>ortho</i> -Chloracetophenon [1]	0,68	340,3
<i>meta</i> -Chloracetophenon [3]	0,37	0,8
<i>para</i> -Chloracetophenon [4]	0,23	6,6
<i>ortho</i> -Hydroxyacetophenon [12]	0,04	4,5
<i>meta</i> -Hydroxyacetophenon [49]	0,12	2,4
<i>para</i> -Hydroxyacetophenon [13]	-0,37	0
<i>ortho</i> -Aminoacetophenon [5]	0,03	0
<i>meta</i> -Aminoacetophenon [6]	-0,16	2,2
<i>para</i> -Aminoacetophenon [7]	-0,66	0
<i>ortho</i> -Nitroacetophenon [24]	1,40	17,63
<i>meta</i> -Nitroacetophenon [20]	0,71	36,7
<i>para</i> -Nitroacetophenon [23]	0,78	224,4

<i>ortho</i> -Bromacetophenon [29]	0,70	260,9
<i>meta</i> -Bromacetophenon [28]	0,39	1,3
<i>para</i> -Bromacetophenon [10]	0,23	3,2
<i>ortho</i> -Cyanoacetophenon [35]	1,32	134,5
<i>meta</i> -Cyanoacetophenon [36]	0,56	1,4
<i>para</i> -Cyanoacetophenon [9]	0,66	1,8
<i>ortho</i> -Iodacetophenon [32]	0,63	60,5
<i>meta</i> -Iodoacetophenon [25]	0,35	0,3
<i>ortho</i> -Methoxyacetophenon [18]	0,00	13,9
<i>para</i> -Methoxyacetophenon [19]	-0,27	0
<i>ortho</i> -Acetoxyacetophenon [38]	-0,37	1,8
<i>para</i> -Acetoxyacetophenon [39]	0,31	0
<i>meta</i> -Thioaminoacetophenon [37]	0,25	0
<i>para</i> -Thioaminoacetophenon [47]	0,30	2,1
<i>ortho</i> -Fluoracetophenon [8]	0,54	16,5
<i>meta</i> -Acetaminoacetophenon [40]	0,21	0

Allgemein lassen sich deutlich höhere Aktivität und σ -Hammett-Werte bei den *ortho*-Substraten erkennen. Auch hier sind die Nitroverbindungen eine Ausnahme, denn obwohl der σ -Hammett-Wert des *ortho*-Nitroacetophenons [24] der höchste von allen ist, liegt die Aktivität unter den der beiden anderen Nitroverbindungen.

Mittels Tabellenkalkulationsprogramm wird der Zusammenhang von katalytischer Aktivität und σ -Hammett-Werte optimiert. Weiters werden die unterschiedlichen Substitutionspositionen getrennt betrachtet. Im Artikel von B. Nidetzky *et al.* wird für die *ortho*- und *para*-Position ein Wert von 1 und für *meta*-Position der Wert 0 vorgeschlagen, dies wird übernommen.³⁴

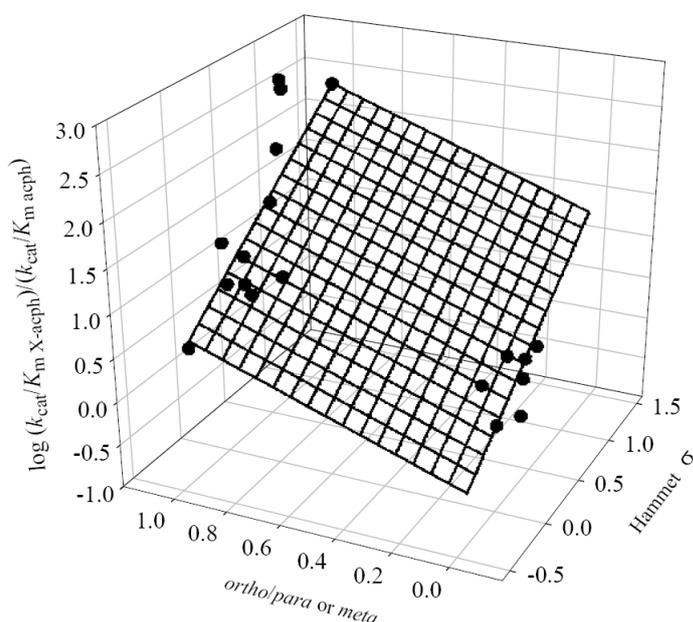


Abbildung 12: Katalytische Aktivität gegen σ -Hammett-Wert gegen Substitutionsposition

In Abbildung 12 ist der Zusammenhang grafisch dargestellt. Daraus ist gut ersichtlich, dass bei getrennter Betrachtung der Substitutionsposition jeweils ein linearer Anstieg zu erkennen ist, dabei werden die Werte der Nitroverbindungen nicht in die Berechnung einbezogen, siehe Kapitel 4.5. Durch diesen Zusammenhang kann die Berechnung zur Vorhersage der katalytischen Aktivität von Substraten genützt werden.

4.3 NMR-Shifts gegen Aktivitätsdaten und σ -Hammett-Werte

Hierbei werden ausgesuchte NMR-Shifts der Substrate mit den Aktivitätsdaten und σ -Hammett-Werten korreliert. Zur besseren Veranschaulichung werden diese Daten grafisch dargestellt. Dabei werden die NMR-Spektren mit einem Natriumphosphat-Puffer in D_2O gemessen.

4.3.1 NMR-Shifts gegen σ -Hammett-Werte

Durch den Vergleich der Carbonylkohlenstoff-NMR-Shifts und der σ -Hammett-Werte, der in der Abbildung 13 dargestellt wird, kann eine konstante Abhängigkeit der beiden Werte erkannt werden. Es ist zusätzlich zu sehen, dass einige Ausnahmen vorliegen. *ortho*-Hydroxy- [12], *ortho*-Methoxy- [18], *ortho*-Iod- [32], *ortho*-Brom- [29] und *ortho*-Chloracetophenon [1] repräsentieren die Substrate, deren NMR-Shifts nicht in Korrelation mit den entsprechenden σ -Hammett-Werten stehen.

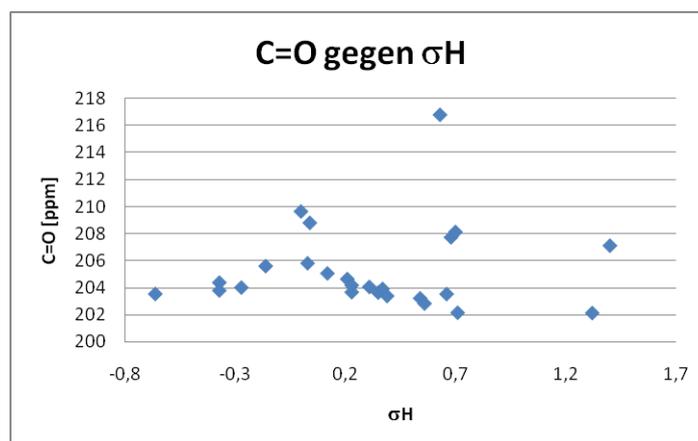


Abbildung 13: NMR-Shift des Carbonylkohlenstoffs gegen den σ -Hammett-Wert

Bei der Abbildung 14 wird der *ipso*-Kohlenstoff mit den σ -Hammett-Werten verglichen, dabei ist ein annähernd linear ansteigender Zusammenhang zu erkennen. Je höher der NMR-Shift, desto höher sind die σ -Hammett-Werte. Abgesehen von *ortho*-Hydroxy- [12], *ortho*-Amino- [5], *ortho*-Fluor- [8] und *ortho*-Iodacetophenon- [32] ist dieser Trend bei allen Verbindungen vorhanden.

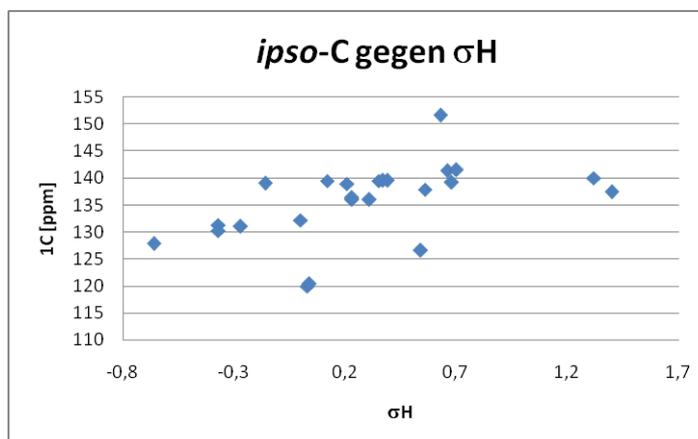


Abbildung 14: NMR-Shift des *ipso*-Kohlenstoffs gegen den σ -Hammett-Wert

In der Abbildung 15 werden die ^{13}C -NMR-Shifts der Methylkohlenstoffe gegen die σ -Hammett-Werte aufgetragen. Der bei den *ipso*-Kohlenstoffen erhaltene Trend kann in diesem Vergleich nicht erkannt werden. Teile der Abbildung zeigen einen konstanten Zusammenhang auf, obwohl viele Werte variieren. Die folgenden Substrate haben einen höheren ^{13}C -NMR-Shift als der, der konstanten Werte: *para*-Hydroxy- [13], *ortho*-Brom- [29], *ortho*-Chlor- [1], *ortho*-Fluor- [8], *ortho*-Iod- [32] und *ortho*-Nitroacetophenon [24]. Einen niedrigeren ^{13}C -NMR-Shift haben *para*-Acetoxy- [39], *ortho*-Amino- [5] und *meta*-Acetaminoacetophenon [40].

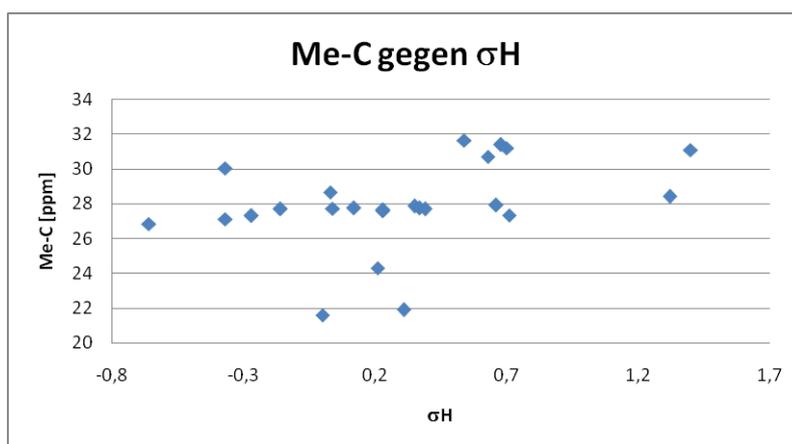


Abbildung 15: Methylkohlenstoff- ^{13}C -NMR-Shift gegen den σ -Hammett-Wert

Wird nun der ^1H -NMR-Shift der Methylprotonen gegen den σ -Hammett-Wert aufgetragen, so entsteht folgender Zusammenhang, der in Abbildung 16 dargestellt ist. Hierbei spiegelt sich eine eindeutige lineare Abhängigkeit der Werte wider. Ausnahmen sind *para*-Acetoxy- [39] und *meta*-Acetaminoacetophenon [40].

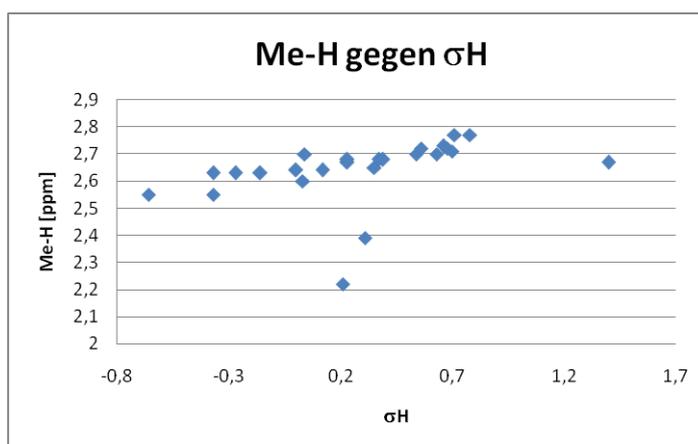


Abbildung 16: Methylprotonen- ^1H -NMR-Shifts gegen den σ -Hammett-Wert

4.3.2 NMR-Shifts gegen katalytische Aktivität

Beim Auftragen der katalytischen Aktivität der Substratumsetzung gegen die NMR-Shifts der ausgewählten Atome, entstehen die im Folgenden dargestellten Diagramme und Abhängigkeiten. Bei diesen Abbildungen wird eine logarithmische Darstellung der katalytischen Aktivität gewählt. Sie beginnt daher bei einem Wert von 0,1.

Wie schon beim Vergleich des NMR-Shifts der Carbonylkohlenstoffe mit dem σ -Hammett-Wert, kann auch beim Vergleich mit der Aktivität kein Zusammenhang erkannt werden. Die Streuung der Werte ist, wie in Abbildung 17 dargestellt, zu groß. Ein Teil der Substrate weist wieder eine lineare konstante Abhängigkeit auf, der andere Teil der Substrate zeigt eine starke Streuung. Zu diesem Teil gehören die Verbindungen *ortho*-Brom- [29], *ortho*-Chlor- [1], *ortho*-Hydroxy- [12], *ortho*-Methoxy- [18], *ortho*-Iod- [32] und *ortho*-Nitroacetophenon [24].

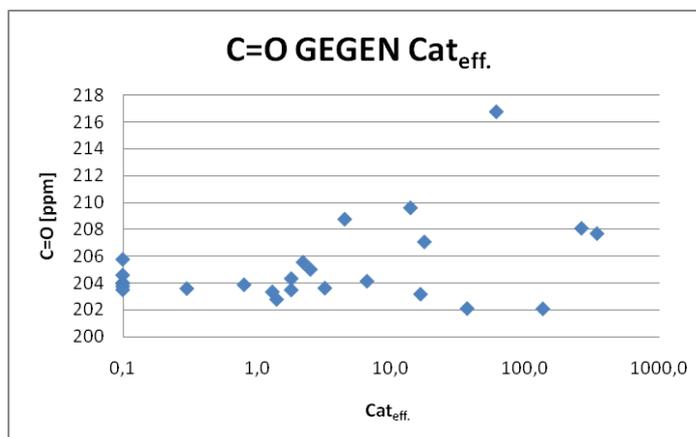


Abbildung 17: NMR-Shift der Carbonylkohlenstoffe gegen die katalytische Aktivität

Beim Vergleich des NMR-Shifts des *ipso*-Kohlenstoffatoms mit der katalytischen Aktivität, siehe Abbildung 18, kann kein Zusammenhang der beiden Werte festgestellt werden. Die Streuung der Substrate ist allgemein sehr hoch, sodass keine Gruppierungen vorhanden sind, die einen linearen Zusammenhang ergeben.

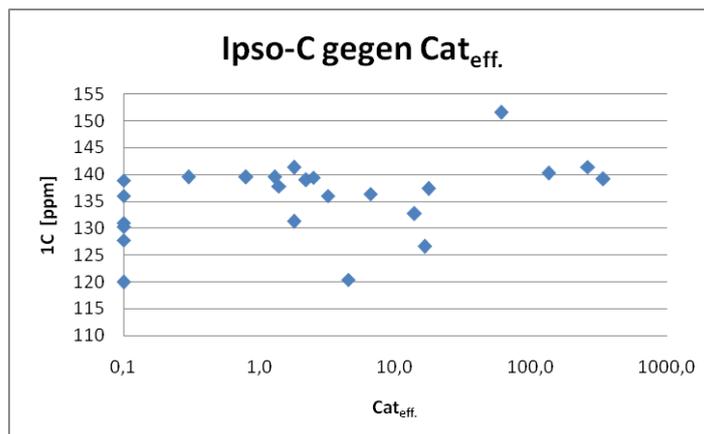


Abbildung 18: NMR-Shift des *ipso*-Kohlenstoffs gegen die katalytische Aktivität

In Abbildung 19 wird der ^{13}C -NMR-Shift der Methylkohlenstoffe mit den jeweiligen Werten der katalytischen Aktivität des Substrates verglichen. Dabei sind zwei linear konstante Zusammenhänge zu erkennen. Einer der Zusammenhänge wird aus den Substraten *ortho*-Brom- [29], *ortho*-Chlor- [1], *ortho*-Fluor- [8], *ortho*-Acetoxy- [38], *ortho*-Iod- [32] und *ortho*-Nitroacetophenon [24] gebildet, da deren ^{13}C -NMR-Shift über 30 ppm liegt. Der Andere wird aus den restlichen Substraten gebildet. Ausnahmen sind dabei die Substrate *ortho*-Methoxy- [18], *para*-Acetoxy- [39] und *meta*-Acetaminoacetophenon [40], die mit keinem der beiden Zusammenhänge korrelieren.

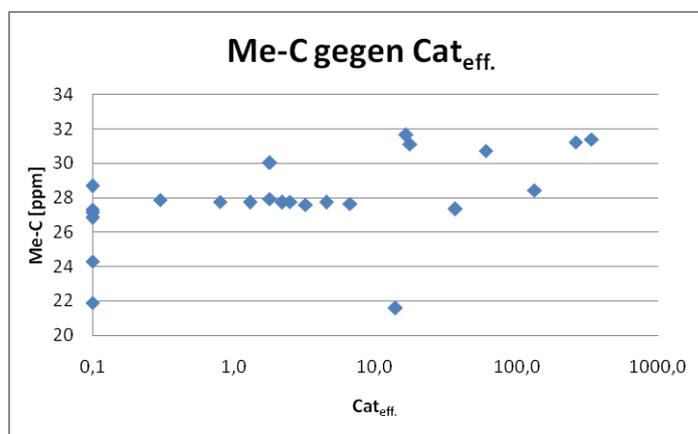


Abbildung 19: ^{13}C -NMR-Shift des Methylkohlenstoffs gegen die katalytische Aktivität

In Abbildung 20 wird die Abhängigkeit der ^1H -NMR-Shifts der Methylprotonen gegen die entsprechend katalytische Aktivität dargestellt. Obwohl die Streuung der Werte sehr hoch ist, kann eine Verschiebung der Shifts zu tiefem Feld mit steigender katalytischer Aktivität erkannt werden. Daher kann von einer Abhängigkeit der ^1H -NMR-Shifts der Methylprotonen und der katalytischen Aktivitäten ausgegangen werden.

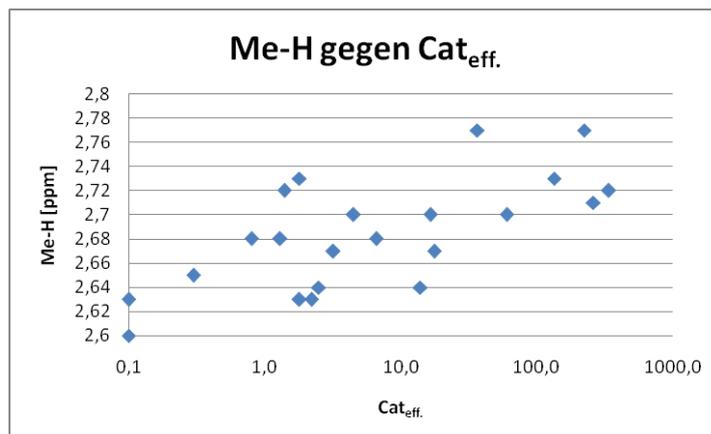


Abbildung 20: Methylprotonen-NMR-Shifts gegen die katalytische Aktivität

Auf Grund der schlechten Löslichkeit der meisten Substrate kann keine ausreichend hohe Messkonzentration erreicht werden. Aus demselben Grund stehen nicht alle ^{13}C -NMR-Shifts zur Verfügung. Davon sind im Speziellen die Methylkohlenstoff- und *ipso*-Kohlenstoff-NMR-Shifts betroffen. Weiterhin werden von den beiden Thioaminoverbindungen keine NMR-Spektren im wässrigen Lösungsmittel aufgenommen, da sich diese zu den entsprechenden Benzoesäuren umsetzen.

4.4 IR-Werte der Carbonylbande gegen Aktivitätsdaten und σ -Hammett-Werte

Für diese Vergleiche werden von den Substanzen IR-Spektren aufgenommen und die Werte der Carbonylbanden mit der Aktivität und den σ -Hammett-Werten verglichen.

4.4.1 IR-Werte der Carbonylbande gegen σ -Hammett-Werte

Werden nun die IR-Carbonylbanden gegen die σ -Hammett-Werte aufgetragen, siehe Abbildung 21, so ist ein eindeutiger linearer Zusammenhang festzustellen. Je höher die σ -Hammett-Werte, desto höher sind die IR-Carbonylbanden. Als Ausnahmen gelten die Substrate *ortho*-Amino- [5], *ortho*-Cyanid- [35], *ortho*-Hydroxy- [12] und *ortho*-Acetoxyacetophenon [38], die nicht in diesen linearen Zusammenhang passen, was anhand ihrer Struktur nicht weiter überraschend ist. Bei diesen Substraten können Wechselwirkungen zwischen den Substituenten und der Carbonylgruppe auftreten, die in Kapitel 5 behandelt werden.

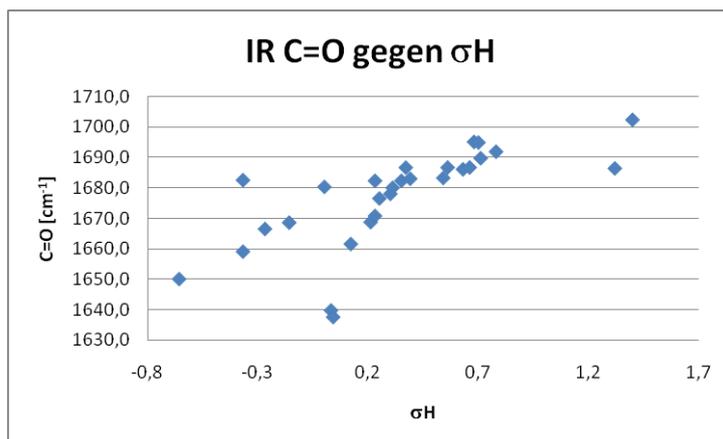


Abbildung 21: IR-Carbonylbande gegen den σ -Hammett-Wert

4.4.2 IR-Werte der Carbonylbande gegen katalytische Aktivität

Auch bei der Gegenüberstellung der katalytischen Aktivität mit den IR-Carbonylbanden kann ein schwacher, linear-ansteigender Zusammenhang erkannt werden. Die Ausnahmen in Abbildung 22 bestehen aus den Substraten *ortho*-Hydroxy- [12], *ortho*-Nitro- [24], *para*-Brom- [10], *meta*-Hydroxy- [49] und *meta*-Aminoacetophenon [6].

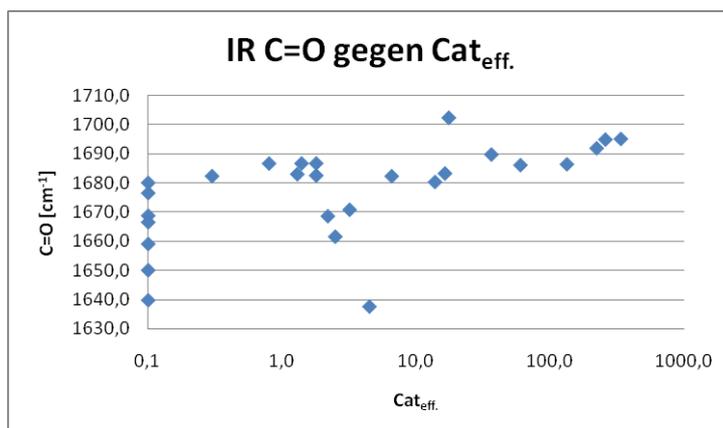


Abbildung 22: IR-Carbonylbande gegen katalytische Aktivität

4.5 Reaktionsverfolgung mittels *in situ* NMR

Die Reaktion der Substrate, die in dem Kapitel 3.37 aufgezählt werden, sind mittels *in situ* NMR-Spektroskopie verfolgt worden. Dabei zeigt sich, wie das NADH bei der Reduktion des Substrates vom Enzym verbraucht wird. Als Beispiel ist in Abbildung 23 die Umsetzung von *ortho*-Bromacetophenon [29] in den korrespondierenden Alkohol [48] gezeigt. Dabei geben die Kurven die Konzentrationsänderung während der Reduktion wieder, wobei die Bildung von NAD⁺ und des Produktes sowie die Abnahme des Substrates abgebildet sind. Durch diese Darstellung ist die Abhängigkeit der Konzentrationen der drei

Verbindungen eindeutig ersichtlich, denn je mehr Substrat umgesetzt wird, desto mehr Produkt und NAD^+ wird gebildet. Die Kurven gehen von einem steilen Anstieg in eine flach verlaufende Kurve über. Dies spiegelt die Sättigung der Produkte beziehungsweise den Mangel an Substrat wider. Ebenso kann eine Produkt-Hemmung des Enzyms zur Abnahme der Umsatzgeschwindigkeit beitragen.

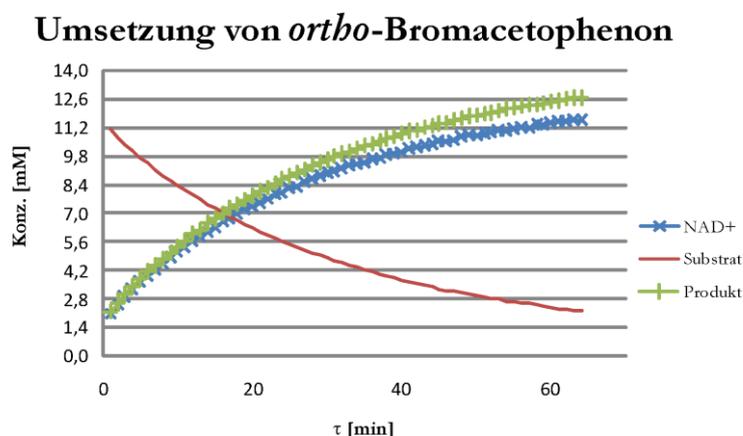


Abbildung 23: Umsetzung von *ortho*-Bromacetophenon [29] zu dem entsprechenden Alkohol [48] in Korrelation zur NAD^+ -Bildung

Das *in situ* NMR-Spektrum des *ortho*-Chloracetophenon [1], Abbildung 24, ergibt das selbe Ergebnis, abgesehen von der Tatsache, dass die Kurven steiler ansteigen und schneller abflachen, da die Reduktion schneller als bei *ortho*-Bromacetophenon [29] verläuft.

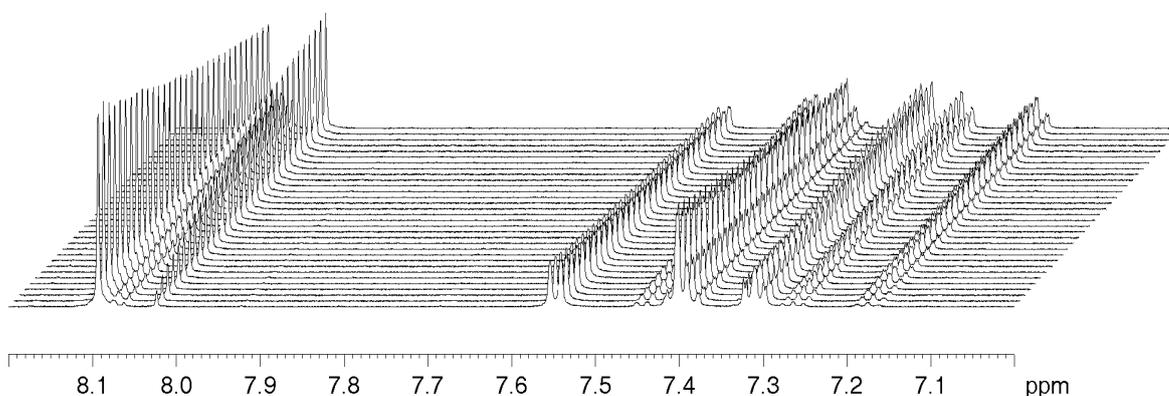


Abbildung 24: Stack-plot von der *in situ* NMR-Messung von *ortho*-Chloracetophenon [1].

Im Gegenteil dazu ist die Messung von *ortho*-Aminoacetophenon [5] zu sehen, wobei keine Umsetzung erwartet und detektiert wird. Es zeigen sich keine nennenswerten Änderungen in den Konzentrationen der gemessenen Verbindungen.

Überraschend sind die Ergebnisse der Umsetzung des *para*-Nitroacetophenons [23], denn bei dieser Umsetzung kann nicht nur die Reduktion des Ketons am Substrat beobachtet werden, sondern eine weitere Umsetzung des Substrats zu einer bis dato nicht näher charakterisierten Substanz.

In Abbildung 25 wird die Darstellung dieser Umsetzung gezeigt. Auch hierbei ist die Abflachung der Kurven zu erkennen, die auf Sättigung und Mangel beruhen. Das zweite Produkt wird in einem Verhältnis von 1:3 gebildet und benötigt zur Bildung kein NADH, denn die Konzentrationskurve von NAD^+ entspricht der des bekannten Substrates, dem Alkohol.

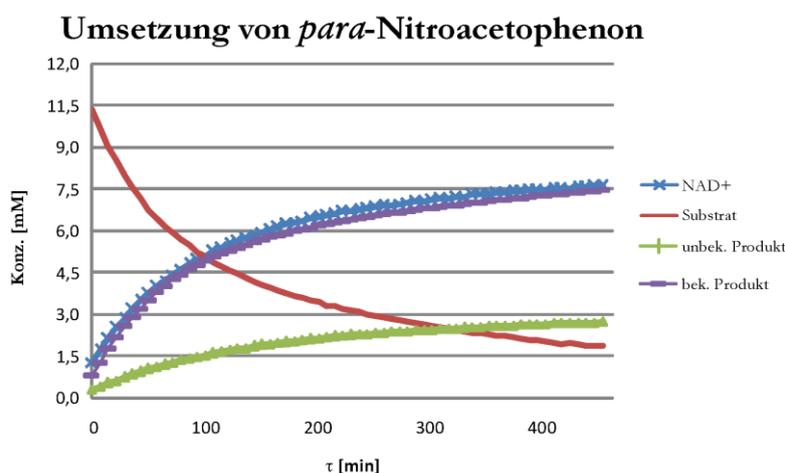


Abbildung 25: Umsetzung von *para*-Nitroacetophenon [23] zu dem entsprechenden Alkohol und ein zweites Produkt in Korrelation zur Bildung von NAD^+

Um Informationen über die unbekannte Substanz zu bekommen, wurde von der Umsetzung von *para*-Nitroacetophenon [23] ebenfalls eine *in situ* NMR-Messung durchgeführt. Es zeigen sich die gleichen Konzentrationsverläufe wie bei *para*-Nitroacetophenon [23] mit den Ausnahmen, dass das Nebenprodukt im Verhältnis 1:9 gebildet wird und der Anstieg der Kurven nicht so stark ausfällt, da die katalytische Aktivität niedriger ist.

4.6 Bindungsstudie mittels STD-NMR-Spektroskopie

Wie schon in Kapitel 2.4.4 erwähnt, können mittels STD-NMR-Messungen Informationen über die Bindung von Substraten an Enzymen gewonnen werden. In dieser Arbeit werden von drei Verbindungen STD-NMR-Spektren aufgenommen. Bei diesen drei Verbindungen handelt es sich um die beiden Substrate *ortho*-Amino- [5] und *ortho*-Chloracetophenon [1] sowie das Produkt 1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2]. Dabei sind die Interaktionen der Verbindungen mit dem Koenzym und dem Enzym selbst sowie die Reaktion von Interesse. Zu diesem Zweck werden von jeder der drei Verbindungen folgende Lösungen vermessen: Verbindung mit Koenzym, Verbindung mit Enzym, Verbindung mit Enzym und NADH sowie Verbindung mit Enzym und NAD^+ . Die Messungen, bei welchen der Verbindung nur das Koenzym zugegeben wurde, zeigen wie erwartet keine

STD-NMR-Signale. Wohingegen die Lösungen, in welchen die Verbindung und das Enzym vorhanden sind, schwache aber trotzdem deutlich STD-NMR-Signale zeigen. Die erhaltenen Signale können durch spezifische, aber auch unspezifische Bindungen an das Enzym erklärt werden. Dabei weist *ortho*-Aminoacetophenon [5] im Verhältnis zu den beiden anderen Verbindungen die niedrigsten STD-NMR-Signale auf. Wird nun zu diesen Lösungen noch das entsprechende Koenzym für die Rückreaktion hinzu gegeben, so verändern sich die Signale geringfügig, zeigen aber eine Signifikanz hinsichtlich einer Bindung im aktiven Zentrum. Bis zu diesen Experimenten ergeben alle getesteten Verbindungen dieselben Ergebnisse. Bei der Reaktionslösung werden nun unterschiedliche Ergebnisse bei den einzelnen Verbindungen erhalten, diese werden deshalb auch einzeln behandelt. Bei der Reaktionslösung von *ortho*-Chloracetophenon [1], in der Enzym und NADH enthalten ist, werden die größten STD-NMR-Signale von allen Verbindungen erhalten. Auch sind die Verhältnisse der einzelnen Signale untereinander anders, als bei den Messungen zuvor. Dieses Verhältnis bleibt auch während des Reaktionsverlaufs erhalten, auch wenn die Intensitäten zu Gunsten des Produktes abnehmen. Weiters sind die relativen Signale des Produktes deutlich höher als bei der entsprechenden Messung. Nur mit NAD^+ bei *ortho*-Aminoacetophenon [5] können sehr geringe Signalunterschiede zu den anderen gemessenen Lösungen dieser Verbindung festgestellt werden, was auf eine schlechte oder unspezifische Bindung hinweist, die auf Grund der schlechten katalytischen Aktivität erwartet werden.

4.7 Keto-Enol-Tautomerie

Um eine Aussage über den Einfluss der Keto-Enol-Tautomerie auf die katalytische Aktivität machen zu können, muss dieser Effekt gemessen werden. Wie schon in Kapitel 2.4.3 kurz beschrieben, wird dies durch Messungen von ^1H -NMR-Spektren und deren Vergleich bewerkstelligt. Durch den Austausch von Deuteronen gegen Protonen verändern sich die ^1H -NMR-Methylsignale der substituierten Acetophenone. Es werden drei Substrate vermessen: *ortho*-Amino- [5], *ortho*-Chlor- [1] und *ortho*-Bromacetophenon [29]. Dabei liegt der Versuchszeitraum bei neun Tagen. In Abbildung 26 wird die grafische Darstellung der Konzentrationskurven gezeigt. Der Deuteriumeinbau gehorcht einem exponentiellen Zeitverlauf, der durch den steilen Beginn der Kurven ersichtlich wird. Nach einer gewissen Zeit ergibt sich dadurch eine höhere Konzentration an deuterierten Molekülen.

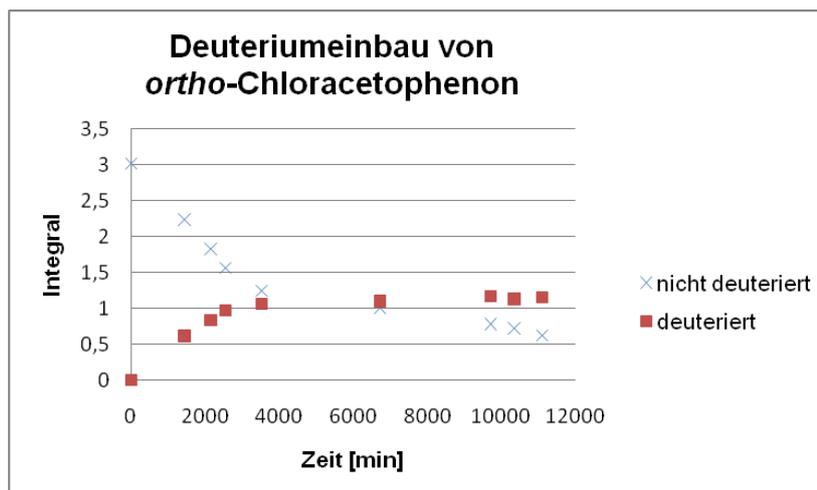


Abbildung 26: Konzentrationskurven der *ortho*-Chloracetophenon [1] deuteriert und nicht deuteriert

Wie in Abbildung 27 ersichtlich, ändern sich die Verläufe der Kurven von *ortho*-Chloracetophenon [1] im Vergleich zu *ortho*-Bromacetophenon [29] in Abbildung 26 minimal. Die Messungen mit *ortho*-Aminoacetophenon [5] zeigen, dass bei diesem Substrat keine Tautomerisierung stattfindet.

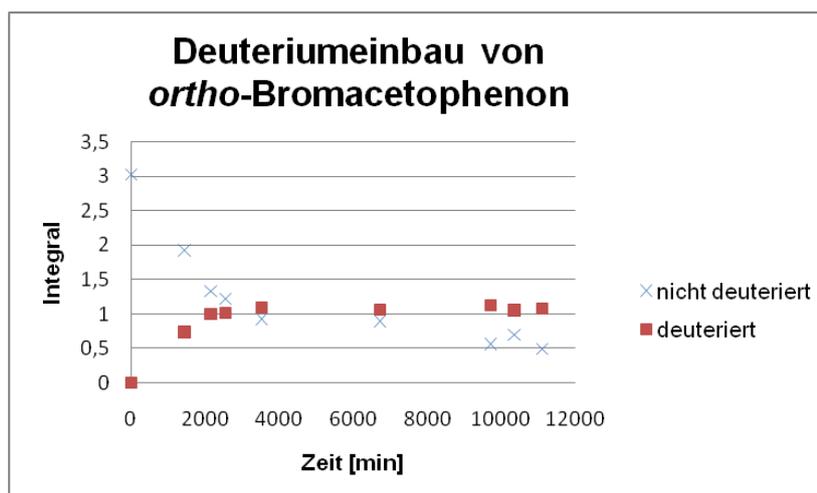


Abbildung 27: Konzentrationskurven der *ortho*-Bromacetophenon deuteriert und nicht deuteriert

4.8 Absolutkonfiguration nach Mosher, HPLC und Drehwert

Wie schon im Allgemeinen Teil dieser Arbeit beschrieben, ist die Absolutkonfiguration der Produkte von großer Bedeutung, jedoch ist die Bestimmung dieser mit einem gewissen Aufwand verbunden.

4.8.1 Absolutkonfiguration nach Mosher

Es werden nur die zwei am besten akzeptierten Substrate, siehe Aktivitätsmessung im Kapitel 3.36, mittels Xylose Reduktase in einer Menge reduziert, die weitere Versuche mit dem gewonnenen Produkt zulassen. Dies wird durch Umsetzungen mit ganzen Zellen von Regina Kratzer an der TU-Graz durchgeführt.⁶⁶ Bei diesen Substraten handelt es sich um *ortho*-Brom- [29] und *ortho*-Chloracetophenon [1] die zu 1-(2-Bromphenyl)-ethanol [48] und 1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2] umgesetzt werden. Mit diesen beiden Substanzen wird jeweils eine Umsetzung mit den beiden Moshersäurechlorid-enantiomeren durchgeführt. Die erhaltenen Produkte werden mittels ¹H-NMR-Spektroskopie vermessen, die daraus gewonnenen Spektren der beiden Enantiomere werden verglichen und die Absolutkonfiguration wird bestimmt. Die ¹H-NMR-Shifts, die dafür von Interesse sind, sind in Tabelle 2 angeführt.

Tabelle 2

Atomposition	1 [ppm]	8 [ppm]
(<i>S</i>)-Mosher-1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [44]	1,54	7,39
(<i>R</i>)-Mosher-1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [43]	1,59	7,14
Differenz	-0,05	0,25
(<i>S</i>)-Mosher-1-(2-Bromphenyl)-ethanol [46]	1,54	7,37
(<i>R</i>)-Mosher-1-(2-Bromphenyl)-ethanol [45]	1,59	7,13
Differenz	-0,05	0,24

Dabei sind die Differenzen der NMR-Shifts der jeweiligen Positionen zu vergleichen, siehe Abbildung 10. Alle Protonen, die eine negative Differenz aufweisen, sind im (*S*)-Ester zu kleinen ppm-Werten verschoben und weisen somit eine Nähe zum Phenylring des Mosheresters auf. Die Protonen, die eine positive Differenz ergeben, sind im (*R*)-Ester zu kleineren ppm-Werten verschoben und weisen dort eine relative Nähe zu dem Phenylring auf (Abbildung 28). Somit lässt sich folgender Schluss ziehen: Bei beiden CXR-Umsetzungsprodukten handelt es sich um den (*S*)-Alkohol.

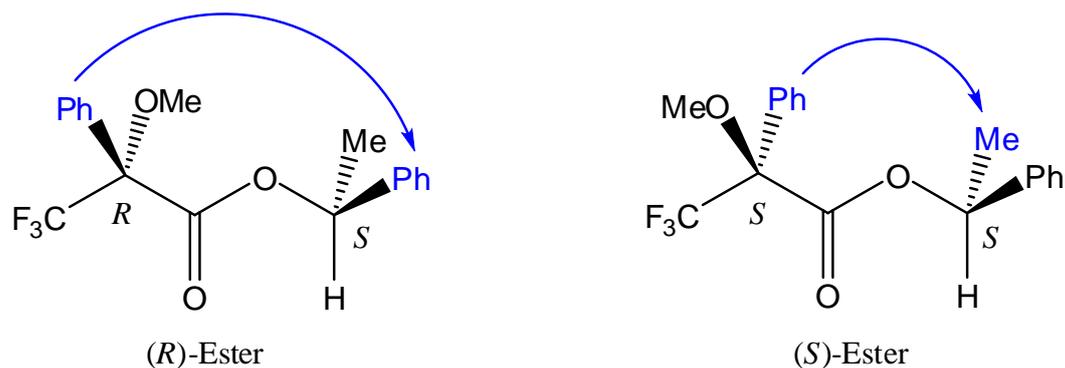


Abbildung 28: Beeinflussung der Substituenten durch den Phenylring des Mosher-Reagenzes

4.8.2 Absolutkonfiguration mittels HPLC

Um eine eindeutige Bestimmung der Absolutkonfiguration machen zu können, ist eine Referenz von Nöten. Leider stellt sich heraus, dass die verwendete Referenz, welche von einer Firma zur Verfügung gestellt wird, nicht verwendet werden kann, da über 90 % der Probe aus Verunreinigung bestand.

4.8.3 Drehwert

Die Messungen des Drehwertes, in Chloroform gelöst mit einer Konzentration von 11,2 mg/mL, ergeben einen Wert von $-0,657^\circ$. Mit diesem Ergebnis wird die optische Aktivität der Substanz berechnet, welche -58° beträgt. Durch das Vergleichen mit den in der Literatur bekannten Werten kann das Produkt als (*S*)-1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2] identifiziert werden.^{67,68,69,70}

5 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, dass eine Vielzahl monosubstituierter Acetophenone mittels des Enzyms Xylose Reduktase aus *Candida tenuis* (*CtXR*) zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert werden können. Dabei werden die halogensubstituierten Substrate mit den höchsten katalytischen Aktivitäten umgesetzt. Unter diesen werden die an der *ortho*-Position substituierten am besten akzeptiert. Folglich sind *ortho*-Brom- [29], *ortho*-Chlor- [1], *ortho*-Iod- [32] und *ortho*-Fluoracetophenon [8] die am besten von *CtXR* umgesetzten monosubstituierten Acetophenone. Weiterhin wird natürlich auch *ortho*-Cyanoacetophenon [35] gut akzeptiert, da dessen Cyanidgruppe einen Pseudohalogencharakter aufweist. Diese hohe katalytische Aktivität kann durch die mesomeren und induktiven Eigenschaften der Substituenten erklärt werden. Da Halogensubstituenten einen (-)I-Effekt haben und somit die Elektronen des Kohlenstoffatoms an sich ziehen, bildet sich ein Dipol, der den substituierten Phenylring und die Carbonylgruppe umfasst. Zudem sind die Halogenatome Wasserstoffbrückenakzeptoren und besitzen freie Elektronenpaare, die sie dem Molekül zur Mesomeriebildung zur Verfügung stellen können. Ebenso scheint eine Orbitalüberlappung vom *ortho*-ständigem Halogenatom und der Carbonylgruppe einen aktivierenden Einfluss auf die *CtXR* katalysierte Reduktion zu haben. Die Summe der Effekte stellt nun den Grund für die hohe katalytische Aktivität dieser Halogensubstrate dar. Da auch die Position des Substituenten eine größere Rolle spielt, ist die stabilisierende Wirkung der freien Elektronenpaare des Halogens in unmittelbarer räumlicher Nähe des reaktiven Zentrums ein reaktionsentscheidendes Kriterium.

Auch wird eine Keto-Enol-Tautomerie bei diesen Substraten festgestellt, deren Geschwindigkeit mittels Deuteriumeinbau bei ¹H-NMR-Messungen bestimmt werden kann. Dabei zeigt sich, dass diese Tautomerie eine Rolle bei der Umsetzung der Substrate spielt, denn die Substrate, deren Tautomere schnell isomerisieren, weisen eine höhere katalytische Aktivität auf als die, bei welchen keine oder eine sehr langsame Isomerisierung stattfindet. Damit zeigt sich, dass die Dipolbildung bei den gut akzeptierten Substraten so stark ausgeprägt ist, dass die Methylgruppe mit einbezogen wird.

An dieser Stelle sollten auch die drei Nitroacetophenone erwähnt werden, die ebenfalls eine hohe katalytische Aktivität aufzeigen. Dabei wird das *ortho*- [24] am schlechtesten und das *para*-Nitroacetophenon [23] am besten akzeptiert. Die freien Elektronenpaare der *ortho*-ständigen Nitrogruppe tragen also offensichtlich nur in einem

kleinen Maßstab zur Stabilisierung des Dipols bei. Durch die durchgeführten *in situ* NMR-Messungen der Umsetzung von *para*-Nitroacetophenon [23] stellt sich weiters heraus, dass das Keton nur zum Teil reduziert wird und die Nitroacetophenone mit dem Enzym parallel zu einem anderen Produkt reagieren. Bei dieser Nebenreaktion wird kein NADH verbraucht, was ein weiteres Indiz gegen die Reduktion des Ketons ist. Auf Grund der geringen Produktmenge, die bei der *in situ* NMR-Umsetzung entstanden sind, konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt dieses Produkt nicht charakterisiert werden. Ohne die Kenntnis der Reaktion und des Produktes können die zuvor bei den Halogenen getroffenen Annahmen bezüglich des Einflusses von elektronischen und induktiven Eigenschaften sowie der Substitutionsposition nicht ohne weiteres übernommen werden. Deshalb kann an dieser Stelle keine sinnvolle Aussage über den Zusammenhang des Substituenten und der katalytischen Aktivität getroffen werden.

Weitere *in situ* NMR-Messungen werden mit den Substraten *ortho*-Chlor- [1], *ortho*-Brom- [29] und *ortho*-Aminoacetophenon [5] durchgeführt. Dabei werden keine unerwarteten Beobachtungen gemacht. Der NADH-Verbrauch spiegelt den Umsatz im Verhältnis 1:1 wider, auch können keine Zwischenstufen oder Nebenprodukte nachgewiesen werden.

Die Herstellung der monosubstituierten Acetophenone stellt mit wenigen Ausnahmen keine größere Schwierigkeit dar und gelingt in angemessenen Ausbeuten und über kurze Synthesewege. Dies liefert eine größere Anzahl an unterschiedlichen Substraten, deren katalytische Aktivität bestimmt werden kann. *ortho*-Bromacetophenon [29] ist das mit Abstand am aufwendigsten herzustellende Substrat, da die Ausbeute der abschließenden Kettenverlängerungs-Reaktion in der Synthese besonders niedrig ausfällt. Ob diese geringe Reaktivität als Hinweis auf die hohe katalytische Aktivität der nachfolgenden enzymkatalysierten Reduktion interpretiert werden kann, ist nicht zu verifizieren. Dazu fehlen Vergleichswerte, da nur *ortho*-Iodacetophenon [32] als weiteres halogeniertes Substrat synthetisiert wird. Dessen Herstellung gelingt mit 62 % Ausbeute und die katalytische Aktivität der Reduktion ist um den Faktor vier kleiner als die des *ortho*-Bromacetophenons [29]. Die anderen beiden halogenierten Acetophenone, im Speziellen *ortho*-Chloracetophenon [1], dessen katalytische Aktivität am höchsten ist, wurden kommerziell erworben.

Mit Hilfe von spektroskopischen Methoden wird im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen der katalytischen Aktivität und des σ -Hammett-Werts untersucht. Dies wird zum Einen mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Messungen der

Substrate ermittelt. Wie im Kapitel 4.3 in dieser Arbeit veranschaulicht, würden mehrere NMR-Shifts von Atomen, die mehr oder weniger nahe am Reaktionszentrum liegen, miteinander verglichen mit dem Versuch, einen Zusammenhang mit der gemessenen katalytischen Aktivität herzustellen. Nicht bei jeder dieser Korrelationen zeigt sich eine Abhängigkeit der beiden Werte. So ergeben zum Beispiel die ^{13}C -NMR-Carbonylshifts keinen sinnvollen Zusammenhang mit der katalytischen Aktivität der $C\text{XR}$ katalysierten Substratumsetzung. Die Unterschiede der ^{13}C -NMR-*ipso*-Kohlenstoffshifts weisen einen quasi konstanten Wert auf, der unabhängig von der Aktivität ist. Ein ähnliches Verhalten zeigen die ^{13}C -NMR-Shifts der Methylkohlenstoffe. Nicht so die ^1H -Shifts der Methylprotonen. Trotz einer relativ starken statistischen Streuung der Messwerte in Abbildung 20 kann ein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden. Je höher der ^1H -NMR-Shift ist, desto höher ist die katalytische Aktivität. Dieses Verhalten steht im direkten Zusammenhang mit der zuvor beschriebenen Keto-Enol-Tautomerie, welche einen schwachen aber merklichen Einfluss auf die ^1H -NMR-Shifts hat.⁷¹ Alles in allem muss jedoch gesagt werden, dass die Korrelationen der NMR-Shifts der jeweiligen Atome mit den entsprechenden katalytischen Aktivitäten der entsprechenden Substratumsetzungen nicht zum gewünschten eindeutigen Ergebnis führt. Es können zwar lineare Zusammenhänge gefunden werden, aber diese sind meist konstant oder die Streuung der Messwerte ist zu hoch, um gute Vorhersagen zu treffen.

Bei weiteren Korrelationen werden die NMR-Shifts einzelner Atome mit den in der Literatur bekannten σ -Hammett-Werten der substituierten Phenylringe in Zusammenhang gebracht. Auch bei dieser Versuchsreihe werden die zuvor benutzten Atome zum Vergleich herangezogen. Dabei werden sowohl bei den *ipso*-Kohlenstoffen, als auch bei den Methylprotonen ein eindeutiger linearer Zusammenhang zwischen der katalytischen Aktivität und den σ -Hammett-Werten festgestellt. Wie in den Darstellungen in Abbildung 14 und Abbildung 16 zu erkennen ist, weichen jedoch einige Substrate deutlich von diesem Zusammenhang ab. Hierbei handelt es sich bei den *ipso*- ^{13}C -NMR-Shifts um *ortho*-Hydroxy- [12], *ortho*-Amino- [5], *ortho*-Fluor- [8], *ortho*-Iod- [32] und bei den ^1H -NMR-Shifts der Methylprotonen um *para*-Acetoxy- [39] und *meta*-Acetaminoacetophenon [40]. Abgesehen von den beiden Verbindungen *ortho*-Fluor- [8] und *ortho*-Iodacetophenon [32] können die Abweichungen durch einfache chemische Überlegungen begründet werden. Es handelt sich nämlich jeweils um Substrate, dessen Substituent eine Wasserstoffbrückenbindung als Donor oder als Akzeptor sehr gut eingehen kann. Als Voraussetzung für die abweichenden Werte kann die Substitutionsposition und ein

guter wasserstoffspendender oder -abstrahierender Substituent genannt werden. Durch die Erkenntnis, dass die *ipso*-Kohlenstoffe und die Methylprotonen in einem linear steigenden Zusammenhang zu den σ -Hammet-Werten stehen, können diese zur größenordnungsmäßigen Abschätzung von diesen verwendet werden.

Als weitere spektroskopische Methode wird die IR-Spektroskopie verwendet. Dabei wird nur die für ein Keton signifikante Carbonylbande für die Auswertung herangezogen. Es werden, wie bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung, Vergleiche mit der katalytischen Aktivität und mit dem σ -Hammet-Wert gezogen. Dabei kann bei beiden Vergleichen ein eindeutiger linearer Zusammenhang erkannt werden: Je höher die Wellenzahl der Carbonylbande, desto höher die katalytische Aktivität oder der σ -Hammet-Wert. Auch in diesem Fall liegt die Tendenz zu Ausnahmen bei der Korrelation mit den σ -Hammet-Werten niedriger als beim Vergleich mit der katalytischen Aktivität. Doch auch diese können mit denselben Überlegungen bezüglich der Wasserstoffbrückenbindung, die zuvor erwähnt wurde, begründet werden. Somit zeigt sich, dass die Wellenzahlen der Carbonylbanden als Mittel zur Vorhersage der katalytischen Aktivität und auch für eine Abschätzung des σ -Hammet-Wertes herangezogen werden können.

Zudem wird noch geprüft ob die gemessene katalytische Aktivität der Substrate mit dem σ -Hammet-Wert in direkter Korrelation steht. Dabei ergibt sich ein „optimaler“ σ -Hammet-Wert, der einen Wert um 0,7 annimmt. Alle anderen Substrate mit niedrigeren oder höheren σ -Hammet-Werten weisen eine deutlich niedrigere katalytische Aktivität auf. Auch wird diese Abhängigkeit in Zusammenhang mit der Substitutionsposition geprüft und mittels Tabellenkalkulationsprogramm optimiert. Dabei ist für die einzelnen Substitutionspositionen ein linearer Anstieg zu erkennen. Durch diesen Zusammenhang kann mittels mathematischen Berechnungen auf die katalytische Aktivität eines Substrates rückgeschlossen werden.

Die katalytischen Aktivitäten werden an der TU Graz von Regina Kratzer mittels UV-Spektrometer gemessen. Dabei wird, wie schon im Kapitel 2.3 beschrieben, die Konzentrationsänderung des Koenzyms NADH bei einer spezifischen Wellenlänge (340 nm) bestimmt. Da der Verbrauch von NADH und der Substratumsatz im Verhältnis 1:1 steht, kann somit auf die Menge des umgesetzten Substrates rückgeschlossen werden. Nun ist diese Methode davon abhängig, dass die UV-Absorption des Substrates bei 340 nm nicht zu hoch ist, denn ansonsten wird die Messung beeinflusst oder ist nicht sinnvoll durchführbar. Da die monosubstituierten Acetophenone unter anderem aus einem Phenylring bestehen, der

bekanntlich ein π -Elektronensystem aufweist, absorbieren diese somit selbst im kritischen Wellenlängenbereich. Das führt dazu, dass bei manchen Substraten (zum Beispiel die Nitro- und Cyanidverbindungen) die Substratkonzentration sehr niedrig gewählt werden muss, um nicht über die obere Grenze der Methode zu gelangen. Folglich ist die Menge des einzusetzenden Substrates so gering, dass dieses wiederum nur eine kleine Konzentrationsänderung des NADHs bewirkt. Diese Konzentrationsänderungen sind oft an der unteren Nachweisgrenze, was zu großen Fehlern bei der Bestimmung der katalytischen Aktivität führt. Somit ist für die Fortsetzung der Untersuchungen zu überlegen, ob diese schnelle Screening Methode für solch ein komplexes System zielführend ist, oder ob eine alternative Möglichkeit gesucht werden muss. Hierfür bietet sich zum Beispiel eine *in situ* IR-Messung an. Bei den bereits durchgeführten IR-Messungen zeigt sich, dass die Carbonylbande gut zu verfolgen ist und somit die Möglichkeit besteht, diese analytische Methode zur Aktivitätsmessung heran zu ziehen. Hierbei würde die direkte Abnahme des Substrats an dessen Carbonylbande gemessen werden. Eine weitere Alternative wäre die *in situ* NMR-Spektroskopie. Auch wenn diese Methode mit einem höheren zeitlichen und technischen Aufwand verbunden ist, hätte sie die Vorteile, dass die entstandenen Produkte möglicherweise direkt identifiziert werden und eventuelle Zwischen- und Nebenprodukte erkannt würden.

Um mehr Informationen über die Umsetzung und Bindung der Substrate an dem Enzym zu erhalten, werden die STD-NMR-Messungen durchgeführt. Die in Kapitel 4.6 genannten Verbindungen werden vermessen und bringen unterschiedliche Ergebnisse. Dabei zeigt sich, dass alle Verbindungen auch unspezifische an das Enzym binden. Durch Zugabe des Koenzyms für die Rückreaktion verändert sich diese Bindung gering. Aus diesen Ergebnissen können jedoch keine Rückschlüsse, außer dass der spezifische Bindungsanteil zunimmt, gezogen werden. Weiters zeigt die Verbindung *ortho*-Aminoacetophenon [5], welche eine niedrige katalytische Aktivität aufweist, ebenfalls nur geringfügige Änderungen der STD-NMR-Signale bei der Reaktionslösung im Vergleich zu den anderen Acetophenonen. Dies kann durch die schlechte Bindung und den dadurch auch schlechten Umsatz erklärt werden. Von großem Interesse war die Reaktionsmessung von *ortho*-Chloracetophenon [1], denn diese Verbindung zeigt eine hohe katalytische Aktivität. Auch mit der STD-NMR-Messung kann dies bestätigt werden, zudem verändern sich die Signalverhältnisse gegenüber der Messung mit *ortho*-Aminoacetophenon [5]. Die erhaltenen STD-Effekte dieser Verbindung sind hoch, was auf ein gutes Fitting schließen lässt. Jedoch zeigt das Experiment, dass das Substrat auch eine hohe Dissoziation aufweist, ohne dabei

umgesetzt zu werden. Die relativen Substratsignalintensitäten bleiben während der Reaktion erhalten, jedoch nehmen die Gesamtintensitäten zu Gunsten des Produktes ab, was auf die Konzentrationsänderung von NADH und Substrat zurückzuführen ist. Weiters sind die Produktsignalintensitäten deutlich höher als bei der Messung von der Rückreaktion. Die Rückreaktion mit 1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2] und NAD^+ zeigt ebenfalls eine Veränderung des Signalverhältnisses, wobei die relativen Signalintensitäten niedriger sind, als bei der Messung mit NADH. Da dabei aber eine Bindung vorliegen muss, liegt es nahe, dass es nicht zu einer schlechteren Bindungssituation kommt, sondern die Bindungszeit länger ist und dadurch niedrigere STD-Effekte erzielt werden. Diese Tatsache könnte auch eine Erklärung für die Unterschiede der relativen Signalintensitäten der beiden Messungen 1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2] mit NAD^+ und *ortho*-Chloracetophenon [1] mit NADH sein, denn in der Reaktionsmessung mit dem Substrat ist die Affinität des *ortho*-Chloracetophenon [1] zum Enzym größer als die des Produktes. Weiters wird die Bindungszeit des 1-(2-Chlorphenyl)-ethanol [2] verkürzt und die STD-Effekte dadurch vergrößert.

Eine weitere Aufgabenstellung dieser Arbeit besteht darin, die entstandenen Alkohole auf ihre Enantiomerenreinheit zu prüfen und, wenn diese enantiomerenrein vorliegen, die Absolutkonfiguration zu bestimmen. Dabei stellt sich heraus, dass der entstandene Alkohol eine Enantiomerenreinheit von 99,9 % aufweist. Die Absolutkonfiguration wurde mittels drei Methoden bestimmt, da die ersten zwei Verfahren widersprüchliche Ergebnisse liefern. Diese beiden Methoden sind die Bestimmung mittels HPLC und Referenzprobe, sowie die Bestimmung mittels Synthese des Mosheresters und anschließenden Vergleich der NMR-Spektren. Dabei ergibt die HPLC-Methode die (R)-Konfiguration des Alkohols und die Mosher-Methode die (S)-Konfiguration. Eine Kontrolle der HPLC-Referenz ergibt jedoch, dass diese nicht den gewünschten (R)-1-(2-Chlorphenyl)-Ethanol [2] enthält. Somit verliert diese Methode ihre Aussagekraft. Um nicht allein von der Mosherester-Methode abhängig zu sein, wird eine weitere Bestimmung herangezogen. Dabei handelte es sich um die Bestimmung des Drehwertes, der dann mit einem in der Literatur bekannten Wert abgeglichen wird.^{67,68,69,70} Dies führt wiederholt zu dem Ergebnis, dass das entstandene Produkt ein (S)-Alkohol ist.

Dazu ist noch zu erwähnen, dass die Drehwertbestimmung und die HPLC-Messung nur mit dem Produkt des *ortho*-Chloracetophenons [1] durchgeführt worden ist. Die Mosher-Methode wird darüberhinaus für die Untersuchung des Produktes der *ortho*-Bromacetophenon [29] Reduktion eingesetzt. Dies führt zu dem Ergebnis, dass auch dieser Alkohol eine (S)-Konfiguration aufweist.

Rückblickend auf die Frage- und Aufgabenstellung, die im Kapitel 1.3 formuliert ist, können alle Themengebiete bearbeitet und alle Aufgabenstellungen gelöst werden. Es wurden 20 monosubstituierte Acetophenone als Substrate synthetisiert und neun kommerziell erworben. Die katalytische Aktivität von deren Umsetzung mit dem Enzym *CXR* wird in der Folge bestimmt. Von den Produkten der beiden am besten akzeptierten Substrate wird die Absolutkonfiguration ermittelt. Es sind mehrere spektroskopische Methoden zur Bestimmung von Zusammenhängen zwischen der katalytischen Aktivität und des σ -Hammett-Werts gefunden werden. Ebenso können Aussagen über die Bindung des Substrates an das Enzym gemacht werden.

Es werden jedoch nur monosubstituierte Acetophenone untersucht. Bei einer weiteren Substitution am Aromaten ist zu erwarten, dass eine weitere Steigerung der katalytischen Aktivität erzielt wird. Desweiteren könnten die enantiomerenreinen entstandenen Alkohole als Synthesebausteine für die Herstellung von chiralen Produkten verwendet werden. Dafür sollte idealerweise noch eine weitere funktionelle Gruppe in das Molekül eingebracht werden, um einen weiteren Syntheseweg zu erleichtern. Dies setzt jedoch wieder voraus, dass dieses neue Substrat vom Enzym *CXR* akzeptiert und mit hoher katalytischer Aktivität umgesetzt wird. Eine solche Untersuchung führt zur Erhöhung der Anzahl der zu testenden Substrate. Abgesehen von diesen Tatsachen und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist zu schließen, dass dieses Enzym noch weitere bis dato ungetestete Substrate ähnlich oder besser umsetzt. Somit wird die noch zu testende Substratpalette immer größer und die Rufe nach neuen Substraten werden immer lauter. Ungeachtet dessen sollten die Probleme und die bis dato noch nicht bearbeiteten Fragen, die in dieser Arbeit aufgetreten sind, nicht vernachlässigt werden. Ebenso sollten alternative Methoden zur Bestimmung der katalytischen Aktivität für Substrate, die UV-Licht absorbieren, gefunden werden. Desweiteren stellt sich die Herausforderung, die Umsetzungsprodukte der Nitroacetophenone zu entschlüsseln, um sich mit der Frage nach der Reaktion dieser Umsetzung zu beschäftigen. Schlussendlich bleibt zu sagen, dass nur ein sehr kleiner Bereich der *CXR* katalysierten Umsetzungen in dieser Arbeit untersucht wird. Wobei selbst dieser, neben den Ergebnissen, noch weitere Fragen aufwirft und weitere Forschungsansätze liefert.

6 Zusammenfassung

In Zuge dieser Arbeit werden 29 monosubstituierte Acetophenone als Substrate synthetisiert oder kommerziell erworben. Diese werden mit dem Enzym *Candida tenuis* Xylose Reduktase (CXR) umgesetzt, dessen natürliches Substrat Xylose ist. Dadurch werden die katalytischen Aktivitäten der einzelnen Substratumsetzungen bestimmt. Es zeigt sich, dass es mehrere Substrate gibt, deren Reduktion eine höhere katalytische Aktivität als das natürliche Substrat aufweisen. Als Beispiel sei nur *ortho*-Chloracetophenon [1] genannt. Dabei stellt sich heraus, dass einige Substituenten an der *ortho*-Position eine Erhöhung der katalytischen Aktivität erzielen. Hiervon zeigen die Halogene und Pseudohalogenide die stärksten aktivierenden Einflüsse. Diese Tatsachen können durch elektronische und induktive Effekte sowie durch räumliche Nähe zum Reaktionszentrum erklärt werden. Auch haben die Halogene an *ortho*-Position einen großen Einfluss auf die Keto-Enol-Tautomerie, denn bei diesen Substraten ist in D₂O ein H/D-Austausch an der Methylgruppe am schnellsten. Somit kann ein Einfluss dieser Tautomerie auf die katalytische Aktivität nachvollzogen werden.

Von den beiden am besten akzeptierten Substraten werden größere Mengen umgesetzt, um weitere Untersuchungen bezüglich Absolutkonfiguration durchzuführen. Dabei stellt sich heraus, dass es sich bei dem Produkt um ein 99,9 % reines Enantiomer des jeweiligen Alkohols handelt. Dieser wird dann mit mehreren Methoden auf seine Absolutkonfiguration untersucht. Das Endergebnis legt eine (*S*)-Konfiguration vor.

Desweiteren werden *in situ* NMR-Messungen durchgeführt, um eventuell entstehende Zwischen- und Nebenprodukte zu beobachten. Solche können auch bei der Umsetzung der Nitro-substituierten Substrate detektiert werden. Jedoch kann das entstandene Nebenprodukt auf Grund der geringen Menge nicht ausreichend analysiert werden, um eine Aussage über dessen Struktur zu treffen. Die anderen *in situ* NMR-Messungen verlaufen unauffällig und zeigen klare und schlüssige Reaktionsverläufe der enzymkatalysierten Reduktionen.

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, einen Zusammenhang zwischen spektroskopischen Methoden und der katalytischen Aktivität oder des σ -Hammet-Werts der substituierten Phenylgruppen zu finden. Die zur Verfügung stehenden Methoden sind NMR-Shifts der einzelnen ¹H- und ¹³C-Atome und die IR-Carbonylbanden der Substrate. Dabei zeigt sich, dass die Wellenzahlen der IR-Carbonylbanden einen linear steigenden

Zusammenhang, sowohl mit der katalytischen Aktivität als auch mit dem σ -Hammett-Wert, haben. Außerdem werden die NMR-Shifts von dem Carbonyl-, *ipso*- und Methylkohlenstoff sowie den Methylprotonen gemessen und mit den katalytischen Aktivitäten und σ -Hammett-Werten korreliert. Dabei weisen nur Methylprotonen einen linear steigenden Zusammenhang auf, aus den restlichen Korrelationen sind keine oder nur eine konstante lineare Abhängigkeiten voneinander zu erkennen.

Mittels STD-NMR-Messungen können Informationen über die Bindung der Substrate an das Enzym gewonnen werden, dabei bestätigen sich die Ergebnisse aus den Aktivitätsmessungen. Zudem zeigt sich, dass die Substrate auch unspezifisch an dem Enzym binden und mit dem entsprechenden Koenzym eine spezifische Bindung eingehen, sofern sie umgesetzt werden. Zwischen Substrat und Produkt dürfte eine Bindungskonkurrenz vorliegen.

Der kleine Teil der Substratakzeptanz, den diese Arbeit abdeckt, bringt überraschende Ergebnisse. So kann der aus der Umsetzung entstandene Alkohol etwa als enantiomerenreiner Synthesebaustein verwendet werden.

7 Abstract

The main aim of this work was to investigate the catalytic activity of monosubstituted acetophenones in reaction with the enzyme *CzXR*. Therefore, 29 acetophenone-derivatives have been synthesized. The catalytic activities of *CzXR* catalysed transformation of these substrates varies over a large range of values. Hence, the dependence of the catalytic activity, spectroscopic data, and σ -Hammett-values of the substituted acetophenones was investigated. The used methods are NMR-spectroscopy and IR-spectroscopy. The IR-method showed the best correlation between C=O-bands and the catalytic activity. Furthermore *in situ* NMR and STD-NMR of selected *CzXR* catalysed reactions have been measured in order to study transformation and substrate-enzyme binding. Since some products were synthesized with a high catalytic activity the absolute configuration of them was on note. In answer to this question the Mosher esters and the optical rotation of the products were measured, and showed enantiomerically pure (*S*)-absolute configuration.

8 Literaturverzeichnis

- ¹ L. A. Lavoisier, *Traité Élémentaire de Chimie*, Cuchet, Paris, **1789**.
- ² J. J. Berzelius, *Jahresber.* **1836**, *15*, 237-245.
- ³ L. Pasteur, *Compt. Rend.* **1853**, *37*, 162-166.
- ⁴ J. von Liebig, *Ann. Chem. Pharm.* **1870**, *153*, 1-47.
- ⁵ W. Kühne, *Untersuchungen an dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg* **1878**, *1*, 291.
- ⁶ H. Buchner, *Münchener, Medizinische Wochenschrift* **1897**, *44*, 299-322.
- ⁷ J. B. Summer, A. L. Dounce, *J. Biol. Chem.* **1937**, *121*, 417-421.
- ⁸ J. H. Northrop, M. Kunitz, R. M. Herriot, *Crystalline Enzymes*, 2. Edition, Columbia University Press, New York, **1948**.
- ⁹ D. G. Smyth, W. H. Stein, S. Moore, *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 227-234.
- ¹⁰ D. C. Phillips, *Proc. Roy. Inst. Gr. Brit.* **1965**, *40*, 530-543.
- ¹¹ F. M. Menger, *Acc. Chem. Res.* **1963**, *26*, 206-212.
- ¹² S. Delwen, *Science* **1996**, *273*, 488-490.
- ¹³ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 3. Edition, Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**.
- ¹⁴ E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985-2993.
- ¹⁵ G. Jung, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1457-1459.
- ¹⁶ C. J. Sih, S.-H. Wu, *Topics Stereochem.* **1989**, *19*, 63-125.
- ¹⁷ E. C. Webb, 1992. *IUBMB enzyme nomenclature*, Academic Press Inc., San Diego, California, **1984**.
- ¹⁸ W. Neuhauser, D. Haltrich, K. D. Kulbe, B. Nidetzky, *Biochem. J.* **1997**, *326*, 683-692.
- ¹⁹ R. Kratzer, D. K. Wilson, B. Nidetzky, *IUBMB Life*, **2006**, *58*, 499-507.
- ²⁰ R. Kratzer, *Catalytic mechanism and substrate selectivity of Candida tenuis xylose reductase, a special aldo-keto reductase of pentose metabolism in yeast*. Dissertation, Technische Universität Graz, Graz, **2005**.
- ²¹ W. Neuhauser, D. Haltrich, K. D. Kulbe, B. Nidetzky, *Biochemistry* **1998**, *37*, 1116-1123.
- ²² D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi, *Chem. Commun.* **2007**, 4038-4040.
- ²³ J. H. Van't Hoff, *Arch. Neerl. Sci. Exactes. Nat.* **1874**, *9*, 445-454.
- ²⁴ J. A. Le Bel, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1874**, *22*, 337-347.
- ²⁵ Handabdrücke eines Kleinkindes

-
- ²⁶ L. Pasteur, *Compt. Rend.* **1848**, *26*, 535-538.
- ²⁷ R. S. Cahn, C. K. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.* **1966**, *78*, 413-447.
- ²⁸ V. Prelog, G. Helmchen, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 614-631.
- ²⁹ S. Masamune, W. Choy, J. S. Petersen, L. R. Sita, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 1-31.
- ³⁰ G. T. Tucker, M. S. Lennard, *Pharmaceut. Ther.* **1990**, *45*, 309-329.
- ³¹ E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1-42.
- ³² T. J. Leitereg, D. G. Guadagni, J. Harris, T. R. Mon, R. Teranishi, *J. Agric. Food Chem.* **1971**, *19*, 785-787.
- ³³ J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*; 1st ed.; Oxford University Press, USA, **2000**.
- ³⁴ P. Mayr, B. Nidetzky, *Biochem. J.* **2002**, *366*, 889-899.
- ³⁵ H. G. O. Becker, R. Gluch, W. Berger, R. Mayer, G. Domschke, K. Müller, E. Fanghänel, D. Pavel, J. Faust, H. Schmidt, M. Fischer, K. Schollberg, F. Gentz, K. Schwetlick, K. Gewalt, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, 20. Aufl.; Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg, **1996**, 362.
- ³⁶ L. M. Harwood, C. J. Moody, J. M. Percy, *Blackwell Science* **1999**, 589.
- ³⁷ J. J. Harrison, J. P. Pellegrini, C. M. Selwitz, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2169-2171.
- ³⁸ P. Gopalan, H. E. Katz, D. J. McGee, C. Erben, T. Zielinski, D. Bousquet, D. Muller, J. Grazul, Y. Olsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1741-1747.
- ³⁹ H. Garcia, R. Martinez-Utrilla, M. A. Miranda, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3131-3134.
- ⁴⁰ A. McKillop, J. A. Tarbin, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1753-1758.
- ⁴¹ K. E. Gilbert, W. T. Borden, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 659-661.
- ⁴² H. G. O. Becker, R. Gluch, W. Berger, R. Mayer, G. Domschke, K. Müller, E. Fanghänel, D. Pavel, J. Faust, H. Schmidt, M. Fischer, K. Schollberg, F. Gentz, K. Schwetlick, K. Gewalt, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, 20. Aufl.; Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg, **1996**, 590.
- ⁴³ J. Meisenheimer, P. Zimmermann, U. v. Kummer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1926**, *446*, 205-228.
- ⁴⁴ F. Ahrens, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20*, 2952-2958.
- ⁴⁵ M. Nagl, C. Panuschka, A. Barta, W. Schmid, *Synthesis* **2008**, (in print).
- ⁴⁶ B. Scheiper, M. Bonnekesel, H. Krause, A. Fürstner, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3943-3949.
- ⁴⁷ P. Zhang, E. A. Terefenko, J. Slavin, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2097-2099.
- ⁴⁸ Y. Liang, B. Su, J. Zhao, W. Sun, *Synth. Comm.* **2004**, *34*, 3235-3242.

-
- ⁴⁹ H. G. O. Becker, R. Gluch, W. Berger, R. Mayer, G. Domschke, K. Müller, E. Fanghänel, D. Pavel, J. Faust, H. Schmidt, M. Fischer, K. Schollberg, F. Gentz, K. Schwetlick, K. Gewalt, E. Seiler, G. Zeppenfeld, *Organikum*, 20. Aufl.; Johann Ambrosius Barth Verlag, Eidelberg, **1996**, 543.
- ⁵⁰ L. P. Hammett, *Chem. Rev.* **1935**, *17*, 125.
- ⁵¹ L. P. Hammett, *Physical Organic Chemistry*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, **1970**.
- ⁵² R. W. Taft, M. S. Newman, F. H. Verhoek, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4511.
- ⁵³ T. Fujita, T. Nishioka, *Prog. Phys. Org. Chem.* **1976**, *12*, 49.
- ⁵⁴ H. H. Jaffé, *Chem. Rev.* **1953**, *53*, 191.
- ⁵⁵ G. C. Nys, R. F. Rekker, *Chim. Therap.* **1973**, *8*, 521-527.
- ⁵⁶ L. Brecker, D. W. Ribbons, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 187-202.
- ⁵⁷ M. Guéron, P. Plateau, M. Decorps, *Prog NMR Spectrosc* **1991**, *23*, 157-209.
- ⁵⁸ J. P. Hore, *Methods Enzymol* **1989**, *176*, 64-77.
- ⁵⁹ B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 864-890.
- ⁶⁰ L. Brecker, G. D. Straganz, C. E. Tyl, W. Steiner, B. Nidetzky, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *42*, 85-89.
- ⁶¹ J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Rigüera, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17-117.
- ⁶² J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-519.
- ⁶³ C. Le Cocq, J. Y. Lallemand, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 150-152.
- ⁶⁴ D. W. Brown, T. T. Nakashima, D. L. Rabenstein, *J. Magn. Reson.* **1981**, *45*, 302-314.
- ⁶⁵ T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 1st ed., Elsevier Science Ltd., Oxford, **1999**.
- ⁶⁶ R. Kratzer, S. Egger, B. Nidetzky, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *110*, 1094-1101.
- ⁶⁷ K. Nakamura, M. Kawasaki, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 1079-1085.
- ⁶⁸ K. Nakamura, T. Matsuda, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8957-8964.
- ⁶⁹ K. Nakamura, Y. Inoue, T. Matsuda, I. Misawa, *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1* **1999**, *16*, 2397-2402.
- ⁷⁰ D. A. Evans, F. E. Michael, J. S. Tedrow, K. R. Campos, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3534-3543.
- ⁷¹ J. L. Burdett, M. T. Rogers, *J. Amer. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2105-2109.

Curriculum vitae

Michael J. VOGL

geboren am 17. März 1982 in Mödling
wohnhaft in 1230 Wien; Anton Baumgartnerstraße 44/C5/1208

Mutter: Ingrid Vogl geboren am 19. März 1957 in Sollenau; wohnhaft in 2603 Felixdorf; Franz Lehargasse 6
Beruf: Hauptschullehrerin

Vater: Walter Vogl geboren am 01. Juli 1955 in Wr. Neustadt; wohnhaft in 2603 Felixdorf; Franz Lehargasse 6
Beruf: Stv. Direktor beim Wasserleitungsverband der Triestingtal- und Südbahngemeinden

Geschwister: Isabell Vogl geboren am 01. Juni 1985 in Mödling; Beruf: Studentin

Schulausbildung:

1988/89 - 1991/92 Volksschule Felixdorf

1992/93 - 1998/99 Bundesrealgymnasium Gröhrmühlgasse in Wr. Neustadt

1998/99 - 2000/01 Maturaschule Dr. Roland in Wien 7

Abschluss: Externistenreifeproofung am Bundesoberstufengymnasium Wien 3 im März 2001

Präsenzdienst:

April 2001 - November 2001 in Groß Enzersdorf

Studium:

SS 2001 Beginn des Studiums der Chemie

WS 2006/07 Abschluss des 1. Studienabschnittes

WS 2008/09 Abschluss des 2. Studienabschnittes

SS 2008 Diplomarbeit unter Univ.-Ass. Dipl.-Chem. Dr. habil. Lothar Brecker

Praktische Berufserfahrungen:

Sommer 1997 Wasserleitungsverband der Triestingtal- und Südbahngemeinden

Oktober 2000 - Januar 2001 Fischer Austria GmbH

Sommer 2005 Wasserleitungsverband der Triestingtal- und Südbahngemeinden

Sommer 2006 Wasserleitungsverband der Triestingtal- und Südbahngemeinden