

**ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ ΣΥΝΘΕΣΗ
ΧΕΙΡΟΜΟΡΦΩΝ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΦΕΡΟΜΟΝΩΝ ΜΕ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΕΣ
ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ**

ΚΑΛΑΪΤΖΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

2006

ΤΑ ΜΕΛΗ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

- 1. Ιουλία Σμόνου** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας του Π.Κ. (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
- 2. Χαράλαμπος Κατερινόπουλος** Καθηγητής Τμήματος Χημείας του Π.Κ.
- 3. Εμμανουήλ Στρατάκης** Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας του Π.Κ.
- 4. Μιχαήλ Ορφανόπουλος** Καθηγητής Τμήματος Χημείας του Π.Κ.
- 5. Δημήτριος Γανωτάκης** Καθηγητής Τμήματος Χημείας του Π.Κ.
- 6. Γεώργιος Τσιώτης** Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας του Π.Κ.
- 7. Γεώργιος Κόκοτος** Καθηγητής Τμήματος Χημείας του Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. **Σμόνου Ιουλία**, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας.
2. **Κατερινόπουλος Χαράλαμπος**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
3. **Ορφανόπουλος Μιχάλης**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
4. **Γανωτάκης Δημήτρης**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
5. **Κόκοτος Γιώργος**, Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας
6. **Στρατάκης Μανώλης**, Αναπληρωτής Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
7. **Τσιώτης Γιώργος**, Επίκουρος Καθηγητής,
Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Σμόνου Ιουλίας.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιβλέπουσα Καθηγήτρια Ι. Σμόνου, όχι μόνο για την ανάθεση του θέματος της διατριβής αυτής, αλλά και για την υλικοτεχνική υποδομή και την οικονομική βοήθεια που μου παρείχε. Την ευχαριστώ επίσης για την συνεχή ενθάρρυνσή της στις δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Ευχαριστώ τους Καθηγητές κ. Μ. Στρατάκη και κ. Χ. Κατερινόπουλο για τις εποικοδομητικές συζητήσεις, τις πολύτιμες συμβουλές και που δέχτηκαν να είναι μέλοι της συμβουλευτικής επιτροπής μου.

Καθοριστικό ρόλο στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής είχε ο Καθηγητής κ. Μ. Ορφανόπουλος. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω όχι μόνο για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε, αλλά και για την πολύτιμη καθοδήγησή του.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Δ. Γανωτάκη, τον Καθηγητή κ. Γ. Τσιώτη και τον Καθηγητή κ. Γ. Κόκοτο που δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Γ. Βασιλικογιαννάκη για τις αρκετά πολύτιμες συμβουλές του στο συνθετικό κομμάτι της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ τον Δρ. Α. Σπύρο για τη διάθεσή του να βοηθήσει στην επίλυση οποιουδήποτε τεχνικού προβλήματος των φασματομέτρων NMR.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Ευχαριστώ το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (IKY) για την οικονομική βοήθεια που μου παρείχε.

Ευχαριστώ την εταιρεία BioCatalytics και τον Δρ. Σπύρο Καμπουράκη για την συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα του φίλους και συνεργάτες Κ. Τσαγκαράκη, Δ. Ξημεράκη, Π. Σαράφη, Μ. Ρουμπελάκη, Μ. Σμαραγδάκη, Μ. Αλμπέρτη, Μ. Τζιράκη, Γ. Μαργαρό, Μ. Ρουσάκη, Γ. Τσικαλά, Δρ. Γ. Λυκάκη και

Δρ. Ν. Χατζάκη για την άψογη συνεργασία τους αλλά και τις επικοινωνιακές συζητήσεις.

Τέλος ευχαριστώ βαθύτατα την αρραβωνιαστικιά μου Ελένη και τους γονείς μου για την υπομονή και την αμέριστη υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Ημερομηνία γέννησης:	13 Οκτωβρίου 1978
Τόπος γέννησης:	Ηράκλειο Κρήτης
Πατρώνυμο:	Νικόλαος Καλαϊτζάκης

ΣΠΟΥΔΕΣ

-
- 1998-2002** Χημικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Πτυχίο **7,76**.
- 2001** Διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας το έτος 2001 με τίτλο: “Φωτοξειδωση χειρόμορφων αλκενίων προσροφημένων σε ζεόλιθο Na-Y” με επιβλέποντα Καθηγητή τον κ. Μ. Στρατάκη, Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 2002-Σήμερα** Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στον τομέα Οργανικής Χημείας στο Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Κρήτης με επιβλέπουσα την Καθηγήτρια Ι. Σμόνου.
- 2005** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης με τίτλο “Στερεοεκλεκτική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών και α-αλκυλο-β-κετο εστέρων καταλυόμενη από 20 απομονωμένες NADPH-εξαρτώμενες κετορεδοκτάσες”. Εργαστήριο Οργανικής Χημείας – Βιοκατάλυσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Ι. Σμόνου

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

-
- Τριετής υποτροφία του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών (**Ι.Κ.Υ.**) μετά από πανελλήνιες γραπτές εξετάσεις για την εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής, 2003-2006.

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- Διπλωματική εργασία σε εργαστήριο Οργανικής Χημείας το έτος 2001 με τίτλο: «Φωτοξείδωση χειρόμορφων αλκενίων προσροφημένων σε ζεόλιθο Na-Y» με επιβλέποντα τον Καθηγητή Μ. Στρατάκη, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Βοηθός προπτυχιακού εργαστηρίου Οργανικής Χημείας το έτος 2003-2004, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Βοηθός στο μάθημα Οργανικής Χημείας Ι κατά το χειμερινό εξάμηνο του ακαδημαϊκού έτους 2004-2005, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Patent)

- Καταχώρηση διπλώματος ευρεσιτεχνίας με τίτλο “METHOD OF MAKING (+)-SITOPHILURE” προς έγκριση στις ΗΠΑ, 2006.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ - ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- Δ. Καλαϊτζάκης, Μ. Στρατάκης, «Μελέτη της διαστερεοεκλεκτικότητας κατά τη φωτοξείδωση ενός χειρόμορφου αλκενίου σε διάλυμα και σε ζεόλιθο Na-Y». 9^ο Μεταπτυχιακό Συνέδριο Πανεπιστημίου Κρήτης στα Ανώγεια Ρεθύμνου Κρήτης τον Ιούνιο του 2003.
- European Symposium in Organic Chemistry (ESOC14) Helsinki, Finland, 4-8 Ιουλίου 2005. “Stereoselective reductions of α -alkyl-1,3-diketones catalyzed by isolated ketoreductases”. D. Kalaitzakis, S. Kambourakis and I. Smonou.
- 3rd COST B22 ANNUAL CONGRESS, 1-4 Οκτωβρίου 2006, Athens-Greece. "Synthesis of valuable chiral intermediates by isolates ketoreductases: application in the synthesis of the natural pheromone (+)-Sitophilure". D. Kalaitzakis and I. Smonou.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- Stratakis, M.; Kalaitzakis, D.; Stavroulakis, D.; Kosmas, G.; Tsagkarakis, K. “Remarkable Change of the Diastereoselection in the Dye-Sensitized Ene Hydroperoxidation of Chiral Alkenes by Zeolite Confinement” *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3471 – 3474.
- Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Highly Stereoselective Reductions of α -Alkyl-1,3-diketones and α -Alkyl- β -keto esters Catalyzed by Isolated NADPH-dependent Ketoreductases”. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799 – 4801.
- Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “A Two-Step Chemoenzymatic Synthesis of the Natural Pheromone (+)-Sitophilure Utilizing Isolated, NADPH-Dependent Ketoreductases”. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2309 – 2313.
- Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Synthesis of valuable chiral intermediates by isolated ketoreductases: Application in the synthesis of α -alkyl- β -hydroxy ketones and 1,3 diols”. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1958 – 1969.
- Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Formal Synthesis of *Sitophilus granarius* Natural Pheromone, Sitophilate, by Isolated, NADPH-Dependent Ketoreductases” In preparation.
- Kalaitzakis, D.; Smonou, I. “Assignment of Relative Configuration of Small Acyclic α -Alkyl- β -hydroxy Carbonyl Compounds by Proton Nuclear Magnetic Resonance” In preparation.
- Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Enzymatic Synthesis of α -substituted-1,3-diols by Isolated NADPH-dependent Ketoreductases” In preparation.

CURRICULUM VITAE

Birthdate: 13 October 1978
Birthplace: Heraklio, Greece

EDUCATION AND RELEVANT EXPERIENCE

- 1998-2002** Bachelor's of Science degree in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete.
- 2001** Undergraduate diploma thesis "Photooxygenation of chiral alkenes by zeolite confinement" elaborated under the supervision of prof. M. Stratakis, Organic Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete
- 2002-present** PhD thesis in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete, Supervisor Prof. I. Smonou.
- 2002-2005** Master Thesis, Department of Chemistry, University of Crete Supervisor Prof. I. Smonou. Title: "Stereoselective reduction of α -alkyl-1,3-diketones and α -alkyl- β -keto esters catalyzed by 20 isolated NADPH-dependent ketoreductases".
- 2003-2004** Teaching assistant in the undergraduate Organic Chemistry laboratory.
- 2004-2005** Teaching assistant in the Organic Chemistry I course.

SCHOLARSHIP

- National Scholarships Foundation (**IKY**) for 3 years graduate studies (2003-2006), upon national examinations.

PATENTS

- Provisional patent “METHOD OF MAKING (+)- SITOPHILURE” (pending), USA.

CONFERENCES

- D. Kalaitzakis, M. Stratakis, «Photooxygenation of chiral alkenes by zeolite confinement». 9^o post-graduate Greek Conference of Chemistry, June 2003.
- D. Kalaitzakis, S. Kambourakis and I. Smonou.. “Stereoselective reductions of α -alkyl-1,3-diketones catalyzed by isolated ketoreductases”. European Symposium in Organic Chemistry (ESOC14) Helsinki, Finland, 4-8 July 2005.
- 3rd COST B22 ANNUAL CONGRESS, 1-4 October 2006, Athens-Greece. "Synthesis of valuable chiral intermediates by isolates ketoreductases: application in the synthesis of the natural pheromone (+)-Sitophilure". D. Kalaitzakis and I. Smonou.

PUBLICATIONS

- Stratakis, M.; Kalaitzakis, D.; Stavroulakis, D.; Kosmas, G.; Tsagkarakis, K. “Remarkable Change of the Diastereoselection in the Dye-Sensitized Ene Hydroperoxidation of Chiral Alkenes by Zeolite Confinement” *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3471 – 3474.
- Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Highly Stereoselective Reductions of α -Alkyl-1,3-diketones and α -Alkyl- β -keto esters Catalyzed by Isolated NADPH-dependent Ketoreductases”. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799 – 4801.
- Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “A Two-Step Chemoenzymatic Synthesis of the Natural Pheromone (+)-Sitophilure Utilizing Isolated, NADPH-Dependent Ketoreductases”. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2309 – 2313.

- Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Synthesis of valuable chiral intermediates by isolated ketoreductases: Application in the synthesis of α -alkyl- β -hydroxy ketones and 1,3 diols”. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1958 – 1969.
- Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Formal Synthesis of *Sitophilus granarius* Natural Pheromone, Sitophilate, by Isolated, NADPH-Dependent Ketoreductases” In preparation.
- Kalaitzakis, D.; Smonou, I. “Assignment of Relative Configuration of Small Acyclic α -Alkyl- β -hydroxy Carbonyl Compounds by Proton Nuclear Magnetic Resonance” In preparation.
- Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. “Enzymatic Synthesis of α -substituted-1,3-diols by Isolated NADPH-dependent Ketoreductases” In preparation.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκαν οι στερεοεκλεκτικές ενζυμικές αναγωγές με NAD(P)H-εξαρτώμενες, απομονωμένες κετορεδουκτάσες για τη σύνθεση πολύτιμων χειρόμορφων ενδιάμεσων, όπως οπτικώς ενεργών α -υποκατεστημένων- β -υδροξυ κετονών και α -υποκατεστημένων-1,3-διολών. Επίσης πραγματοποιήθηκε χημειοενζυμική σύνθεση των φερομονών Sitophilure, Sitophilate, Stegobinone και Stegobiol. Σε όλα τα προϊόντα των ενζυμικών αναγωγικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σχετικής αλλά και της απόλυτης στερεοδομής τους με NMR φασματοσκοπία.

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η ενζυμικά καταλύομενη στερεοεκλεκτική αναγωγή δέκα μονοϋποκατεστημένων και τριών α-διϋποκατεστημένων-1,3-δικετονών με σειρά από 64 απομονωμένες κετορεδουκτάσες. Σε όλες τις περιπτώσεις προέκυψε ποσοτικά τουλάχιστον μια οπτικώς καθαρή υδροξυ κετόνη, ενώ υπήρξαν περιπτώσεις όπου σχηματίστηκαν τρία από τα τέσσερα στερεοϊσομερή με εξαιρετική οπτική καθαρότητα. Εκτός από τη υψηλή στερεοεκλεκτικότητα των ενζύμων σε πολλές περιπτώσεις η δραστικότητα ήταν εξαιρετική. Σε μη συμμετρικές δικετόνες η ενζυμική αναγωγή πραγματοποιήθηκε με υψηλή τοποεκλεκτικότητα οδηγώντας σε σχηματισμό ενός ισομερούς μέσω Δυναμικού Κινητικού Διαχωρισμού.

Στο δεύτερο κεφάλαιο παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση της φερομόνης Sitophilure των οργανισμών rice weevil και maize weevil. Η σύνθεση ξεκίνησε από την εμπορικά διαθέσιμη 3,5-επτανοδιόνη και ολοκληρώθηκε σε τρία μόνο στάδια με ολική απόδοση 81%.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση της φερομόνης Sitophilate του οργανισμού granary weevil. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε μέσω ενζυμικής αναγωγής ενός α -μεθυλο- β -κετοεστέρα. Πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα στάδια με ολική απόδοση 62%. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της δομής του υποστρώματος, της θερμοκρασίας και του pH στην στερεοεκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών, οι οποίες λαμβάνουν μέρος στη συγκεκριμένη χημειοενζυμική σύνθεση.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζεται η χημειοενζυμική σύνθεση των συστατικών της φυσικής φερομόνης του οργανισμού drugstore beetle μέσω ενζυμικής αναγωγής ενός β-κετοεστέρα και μιας 1,3-δικετόνης. Η σύνθεση επιτεύχθηκε με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα παράγοντας τη φερομόνη Stegobinone σε καθαρή κρυσταλλική μορφή.

Στο πέμπτο κεφάλαιο παρουσιάζεται ο προσδιορισμός της σχετικής στερεοδομής για τις μονοϋποκατεστημένες και τις α-διϋποκατεστημένες-β-υδροξυ κετονες, οι οποίες προέκυψαν από την ενζυμική αναγωγή των αντίστοιχων δικετονών. Ο προσδιορισμός για τις μονοϋποκατεστημένες υδροξυ κετόνες πραγματοποιήθηκε υπολογίζοντας τη σταθερά σύζευξης μεταξύ των υδρογόνων των δυο ασύμμετρων κέντρων, όπου και βρέθηκε ότι η σταθερά αυτή ήταν μικρότερη για τα *syn* διαμορφωμερή σε σχέση με τα αντίστοιχα *anti*. Για τις διϋποκατεστημένες υδροξυ κετόνες εφαρμόστηκε ο κανόνας του Heathcock, όπου μετρήθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις τριών συγκεκριμένων ανθράκων με φασματοσκοπία ^{13}C NMR. Από όλα τα αποτελέσματα εξάχθηκε ένας εμπειρικός κανόνας προσδιορισμού της σχετικής στερεοδομής των α-μονοϋποκατεστημένων-β-υδροξυ κετονών με φασματοσκοπία ^1H NMR. Η μέθοδος αυτή βασίστηκε στην εμφάνιση του καρβινολικού πρωτονίου του *syn* ισομερούς σε υψηλότερες χημικές μετατοπίσεις σε σχέση με του αντίστοιχου *anti*.

Στο έκτο κεφάλαιο παρουσιάζεται ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οπτικά ενεργών δευτεροταγών αλκοολών. Στη μέθοδο που εφαρμόστηκε χρησιμοποιήθηκε το χειρόμορφο αντιδραστήριο ανισοτροπίας α-μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (MPA). Η μέθοδος αυτή βασίστηκε στην μέτρηση των τιμών $\Delta\delta^{R-S}$ μεταξύ των R-MPA και S-MPA εστέρων των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων που μελετήθηκαν.

Στο έβδομο κεφάλαιο παρουσιάζεται η ενζυμική σύνθεση α-υποκατεστημένων-1,3-διολών χρησιμοποιώντας τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες. Η σύνθεση έγινε με ενζυμική αναγωγή των αντίστοιχων α-υποκατεστημένων-1,3-δικετονών, η οποία πραγματοποιήθηκε, σε πολλές περιπτώσεις, με υψηλή δραστηριότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα παράγοντας οπτικώς καθαρές τις 1,3-διόλες.

SUMMARY

In the present dissertation the stereoselective enzymatic reductions by using NAD(P)H-dependent isolated ketoreductases were studied for the synthesis of valuable chiral intermediates such as optically active α -substituted- β -hydroxy ketones and α -substituted-1,3-diols. The chemoenzymatic synthesis of the pheromones Sitophilure, Sitophilate, Stegobinone and Stegobiol was accomplished successfully. The relative and absolute configuration for all the products of the enzymatic reductions were determined by NMR methods.

The reduction of thirteen α -substituted-1,3-diketones with 32 isolated ketoreductases is presented in the first chapter. In every case at least one optically pure hydroxy ketone was produced, while in many cases three out of the four possible stereoisomers were formed with excellent optical purity. All these results show that the ketoreductases are very active, stereoselective and regioselective towards these substrates. For the unsymmetrical diketones the enzymatic reduction was accomplished via Dynamic Kinetic Resolution.

The second chapter describes the chemoenzymatic synthesis of the pheromone Sitophilure of rice weevil and maize weevil. This synthesis started from the commercially available 3,5-heptanedione and was accomplished in only three steps with overall yield 81%.

In the third chapter the chemoenzymatic synthesis of the pheromone of granary weevil, Sitophilate is presented. The synthesis was accomplished via enzymatic reduction of an α -methyl- β -keto ester. It was completed in four steps with overall yield 62%. The effect of substrate modification as well as reaction conditions (temperature and pH) in the stereoselectivity of ketoreductases used in this particular chemoenzymatic synthesis was also studied here..

In chapter four the chemoenzymatic synthesis of the substances of drugstore beetle's pheromone via enzymatic reduction of a β -keto ester and a 1,3-diketone is presented. The synthesis was achieved with high stereoselectivity producing the pheromone Stegobinone in pure crystalline form.

In chapter five the determination of the relative stereochemistry for all the products of all the enzymatic reductions was achieved. For the monosubstituted

hydroxy ketones the assignment was accomplished by calculating the coupling constant between the two asymmetric hydrogens. It was found that this constant was smaller for the *syn* isomers than the coupling constant for the corresponding *anti*. For the disubstituted hydroxy ketones the Heathcock's rule was applied. The chemical shifts of three specific carbons were measured with ^{13}C NMR spectroscopy. A new empirical rule for the assignment of the relative configuration of α -monosubstituted- β -hydroxy ketones by ^1H NMR spectroscopy is presented. This method is based on the downfield chemical shift of the carbinol proton of *syn* isomer compared to the corresponding *anti*.

In the sixth chapter the absolute stereochemistry of the optically active secondary alcohols was determined. The assignment was accomplished utilizing the chiral derivatizing agent *a*-methoxy phenylacetic acid (MPA). This method relied on the calculation of $\Delta\delta^{R-S}$ differentiation between the corresponding *R*-MPA and *S*-MPA esters of the products from the enzymatic reductions that were studied.

In the seventh chapter the enzymatic synthesis of α -substituted-1,3-diols utilizing the isolated ketoreductases is presented. This synthesis was achieved by enzymatic reduction of the initially formed α -substituted- β -hydroxy ketones in optically pure form by the same reductive enzymes. The enzymatic reduction was performed, in many cases, with high activity and diastereoselectivity producing optically active 1,3-diols.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
Σελίδα Υπογραφών.....	2
Ευχαριστίες.....	4
Βιογραφικό σημείωμα στα Ελληνικά.....	6
Βιογραφικό σημείωμα στα Αγγλικά.....	9
Περίληψη στα Ελληνικά.....	12
Περίληψη στα Αγγλικά.....	14
Περιεχόμενα.....	16

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένζυμα στην οργανική σύνθεση	19
Δομικά χαρακτηριστικά και εκλεκτικότητα των ενζύμων	23
Κινητικός Διαχωρισμός	26
Δυναμικός Κινητικός Διαχωρισμός	27
Κετορεδουκτάσες – Νικοτιναμιδιακοί Συμπαράγοντες	31
Κετορεδουκτάσες στην ασύμμετρη σύνθεση	37

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αποτελέσματα-Συζήτηση	44
Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων.	45
Κεφάλαιο 1. Παρασκευή οπτικώς καθαρών α-υποκατεστημένων-β-υδροξυ κετονών με τη χρήση κετορεδουκτασών.	49
Πειραματικό μέρος Κεφαλαίου 1	60
Κεφάλαιο 2. Χημειοενζυμική σύνθεση της φυσικής φερομόνης (+)-Sitophilure.	72
Πειραματικό μέρος Κεφαλαίου 2	76
Κεφάλαιο 3. Χημειοενζυμική σύνθεση της φυσικής φερομόνης του εντόμου <i>Sitophilus granaries</i> .	81
Πειραματικό μέρος Κεφαλαίου 3	93

Κεφάλαιο 4.	Χημειοενζυμική σύνθεση της φυσικής φερομόνης Stegobinone και Stegobiol του εντόμου Drugstore beetle (<i>stegobium paniceum</i> L.).	102
	Πειραματικό μέρος Κεφαλαίου 4	110
Κεφάλαιο 5.	Προσδιορισμός της σχετικής στερεοδομής μικρών, άκυκλων α-αλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων.	117
	Νέος τρόπος προσδιορισμού της σχετικής στερεοδομής μικρών άκυκλων α-αλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων με ^1H NMR.	121
	Πειραματικό μέρος Κεφαλαίου 5	127
Κεφάλαιο 6.	Προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των α-αλκυλο-β-υδροξυ κετονών και εστέρων.	131
	Πειραματικό μέρος Κεφαλαίου 6	139
Κεφάλαιο 7.	Ενζυμική σύνθεση α-υποκατεστημένων-1,3-διολών με τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες.	152
	Πειραματικό μέρος Κεφαλαίου 7	161
	GC χρωματογραφήματα	170
	Φάσματα NMR	200
	Βιβλιογραφία	281

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

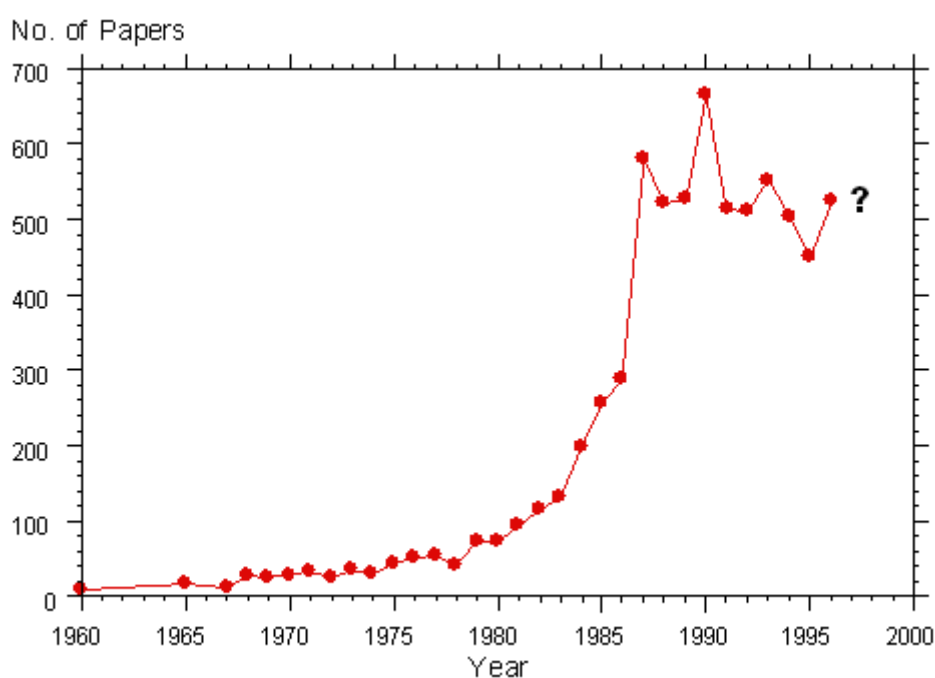
Η οργανική σύνθεση αποτελεί έναν από τους πιο ανεπτυγμένους κλάδους της χημείας επιδεικνύοντας συνεχώς και ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερο την χρησιμότητά της. Διαρκής είναι η ερευνητική προσπάθεια για την ανακάλυψη πιο αποδοτικών αντιδραστηρίων και καταλυτών, με μοναδικό σκοπό τη σύνθεση πολύπλοκων μορίων (όπως τα Macrolides), των οποίων η δομή αποτελούσε απαγορευτικό στοιχείο τις προηγούμενες δεκαετίες. Ένας από τους σημαντικότερους στόχους των συνθετικών οργανικών χημικών είναι η ανακάλυψη μεθόδων για την στερεοελεγχόμενη παρασκευή οπτικώς ενεργών ενώσεων. Ιδιαίτερα όσον αφορά την παρασκευή νέων φαρμακευτικών ενώσεων, όπου η σχέση μεταξύ χειρομορφίας και βιολογικής δραστηριότητας είναι εξαιρετικά σημαντική,¹ η ανάπτυξη μεθόδων σύνθεσης καθαρών εναντιομερών είναι πλέον απαραίτητη. Το γεγονός αυτό φαίνεται καθαρά από την υιοθέτηση μέτρων, από την Διεύθυνση Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, όπου καθίσταται απαγορευτική η έγκριση φαρμάκων που δεν έχουν συντεθεί σε εναντιομερικώς καθαρή μορφή.² Βασική βέβαια προϋπόθεση είναι οι μέθοδοι σύνθεσης οπτικώς ενεργών μορίων να είναι, εκτός από αποδοτικές, περιβαλλοντικά και οικονομικά αποδεκτές.

Τα τελευταία χρόνια γίνονται αρκετές προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων καταλυτών, οι οποίοι αποτελούν τον σημαντικότερο παράγοντα σύγχρονης - παράλληλης ανάπτυξης της οργανικής σύνθεσης. Καταλύτες, όπως οξέα κατά Lewis, πολυλειτουργικοί καταλύτες και μέταλλα αποτελούν ερευνητικό στόχο πολλών ομάδων συνθετικών χημικών, καθώς συντελούν σημαντικά στην αποτελεσματική σύνθεση βιοενεργών μορίων.³ Μια κατηγορία καταλυτών η οποία έχει αναπτυχθεί σημαντικά και εφαρμόζεται εκτενώς στην οργανική σύνθεση είναι οι βιοκαταλύτες.⁴

Η χρήση των φυσικών καταλυτών – κυρίως ενζύμων – για την μετατροπή οργανικών ενώσεων δεν είναι κάτι καινούριο καθώς χρησιμοποιούνται, είτε σαν ολόκληρα κύτταρα είτε σαν απομονωμένα ένζυμα, για περίπου ένα αιώνα.⁵ Φυσικά, το ερευνητικό ενδιαφέρον στο παρελθόν ήταν τελείως διαφορετικό από τα σύγχρονα ενδιαφέροντα. Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες αφορούσαν την διερεύνηση των βιοχημικών πορειών και των ενζυμικών μηχανισμών, η τεράστια δυναμικότητα της χρήσης των ενζύμων για μετατροπή μη-φυσικών οργανικών ενώσεων αναγνωρίστηκε

προς το τέλος της δεκαετίας του 80. Σαν αποτέλεσμα αυτής της μεγάλης ερευνητικής προσπάθειας, τα ένζυμα έχουν κερδίσει μια σημαντική θέση στην μοντέρνα οργανική σύνθεση.⁶ Αυτό αντανακλάται στην αύξηση των δημοσιεύσεων που περιλαμβάνουν στοιχεία βιομετατροπών τα τελευταία χρόνια. Έτσι ενώ το 1991 μόνο το 8% όλων των δημοσιεύσεων στην συνθετική οργανική χημεία περιλάμβανε στοιχεία βιομετατροπής⁷ τώρα εκτιμάται ότι το ποσοστό αυτό αγγίζει το 15% (Σχήμα 1).

Σχήμα 1: Ετήσιες δημοσιεύσεις πάνω σε βιολογικές μετατροπές μη-φυσικών οργανικών ενώσεων



Παλαιότερα υπήρχε η αντίληψη ότι τα ένζυμα αποτελούν καταλύτες μόνο των φυσικών τους υποστρωμάτων ρυθμίζοντας μεταβολικές πορείες σε ζώντες οργανισμούς. Αυτό υποδήλωνε ότι οι μη-φυσικές οργανικές ενώσεις δεν μπορούσαν να θεωρηθούν ως υποστρώματα. Γρήγορα όμως αποδείχτηκε ότι η ικανότητα των ενζύμων να δεχτούν υποστρώματα είναι ευρύτερη από ότι πιστεύονταν.⁸ Φυσικά, υπάρχουν αρκετά ένζυμα τα οποία είναι εκλεκτικά και δραστικά αποκλειστικά με τα φυσικά τους υποστρώματα. Αυτά τα ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και γενικά δεν χρησιμοποιούνται για βιομετατροπές. Από την άλλη μεριά, υπάρχει ένας εντυπωσιακά μεγάλος αριθμός βιοκαταλυτών που επιδεικνύει μεγάλη καταλυτική ικανότητα σε μη-φυσικά υποστρώματα.⁸ Για πολλά από αυτά τα

ένζυμα, τα φυσικά τους υποστρώματα – αν υπάρχουν – δεν είναι γνωστά. Η ικανότητά τους να καταλύουν συνθετικές μετατροπές με μη φυσικά υποστρώματα χρησιμοποιείται σε αντιδράσεις *in vitro*, καθιστώντας τη βιοκατάλυση μια από τις σπουδαιότερες εναλλακτικές μεθόδους που έχουν τώρα στη διάθεσή τους οι πλέον σύγχρονοι οργανικοί χημικοί.⁹

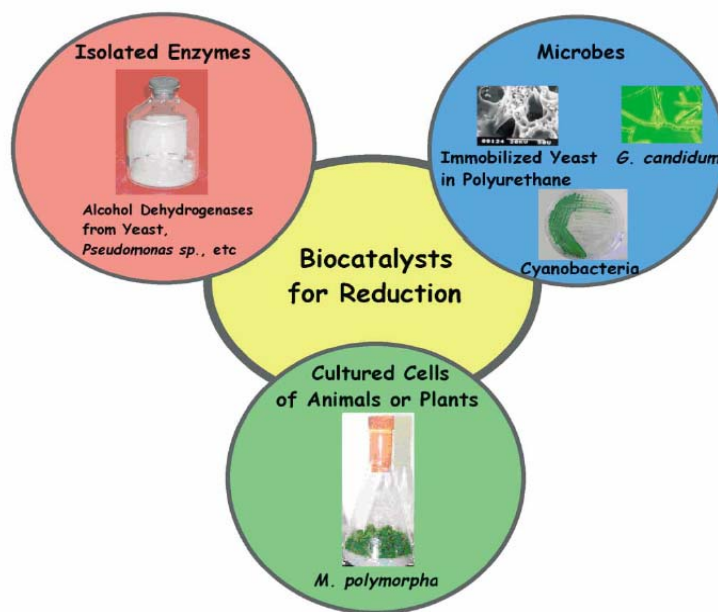
Οι βιοκαταλύτες έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά όταν συγκρίνονται με τους χημικούς (ομογενείς ή ετερογενείς) καταλύτες. Μερικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τους βιοκαταλύτες από τους χημικούς καταλύτες αναφέρονται παρακάτω.⁸

- Είναι πολύ αποτελεσματικοί καταλύτες. Γενικά οι ταχύτητες των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων είναι μεγαλύτερες κατά ένα παράγοντα της τάξης του $10^8 - 10^{10}$. Σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση της ταχύτητας μπορεί να υπερβεί τον παράγοντα 10^{12} , τιμή την οποία οι χημικοί καταλύτες δεν είναι εύκολο να την επιτύχουν¹⁰. Γενικά οι χημικοί καταλύτες χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις του 0,1% - 1% σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος, ενώ οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται για αντίστοιχες ταχύτητες, σε συγκεντρώσεις της τάξης του $10^{-3}\%$ - $10^{-4}\%$, γεγονός που καθιστά τα ένζυμα ιδιαίτερα αποτελεσματικούς καταλύτες.
- Τα ένζυμα είναι περιβαλλοντικά αποδεκτοί καταλύτες σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες βαρέων μεταβατικών μετάλλων καθώς είναι αποικοδομήσιμα στο περιβάλλον και λειτουργικά σε υδατικά διαλύματα.
- Είναι ενεργά κάτω από ήπιες συνθήκες όπως σε θερμοκρασία 20 – 40 °C καθώς και σε pH 5 – 8. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων μη επιθυμητών αντιδράσεων όπως οι αποικοδομήσεις, ισομεριώσεις, αντικαταστάσεις και ρακεμοποιήσεις.
- Το γεγονός ότι τα περισσότερα ένζυμα δρουν κάτω από παρόμοιες συνθήκες, αυτό δίνει τη δυνατότητα της χρήσης ενός αριθμού ενζύμων ταυτόχρονα πραγματοποιώντας πολλά στάδια αντίδρασης σε ένα μόνο εργαστηριακό σκεύος. Αυτό είναι αρκετά πρακτικό στην περίπτωση όπου ένα ενδιάμεσο προϊόν είναι αρκετά ασταθές και είναι αδύνατη η απομόνωσή του ή στην περίπτωση όπου μια ανεπιθύμητη ισορροπία μπορεί να οδηγηθεί προς το επιθυμητό προϊόν συνδυάζοντας δυο συνεχόμενα ενζυμικά στάδια μεταξύ τους.
- Έχουν αρκετά μεγάλη ποικιλία ως προς τα υποστρώματα που μπορούν να δεχτούν, καθώς καταλύουν αντιδράσεις είτε φυσικών είτε τεχνητών μη φυσικών

υποστρωμάτων συμβάλλοντας δυναμικά στην οργανική σύνθεση. Μόλις τη δεκαετία του 1980 άρχισε η δυναμική εφαρμογή των φυσικών καταλυτών για τη μετατροπή μη φυσικών οργανικών ενώσεων και από τότε συνεχίζεται με επιτυχία, με αποτέλεσμα την ραγδαία εξέλιξη του πεδίου της βιοκατάλυσης.

- Πολλοί από τους βιοκαταλύτες είναι εμπορικά διαθέσιμοι και εύκολοι στη χρήση όπως οι χημικοί καταλύτες. Για την ανακάλυψη επιπλέον νέων βιοκαταλυτών είναι απαραίτητη η καλλιέργεια κυττάρων από καλλιέργειες σπόρων (seed cultures), οι οποίοι μπορεί να είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι βιοκαταλύτες για αναγωγή οι οποίοι είναι εμπορικά διαθέσιμοι με τη μορφή απομονωμένων ενζύμων ή καλλιεργημένων κυττάρων (Σχήμα 2).

Σχήμα 2: Είδη βιοκαταλυτών για ασύμμετρη αναγωγή.



- Με την ύπαρξη αρκετών διαφορετικών ενζύμων, οι βιοκαταλύτες αυτοί μπορούν να καταλύσουν μια μεγάλη ποικιλία οργανικών αντιδράσεων. Έτσι, τα ένζυμα έχουν ταξινομηθεί από τη διεθνή ένωση βιοχημείας (International Union of Biochemistry) σε έξι κύριες ομάδες:
 1. **Οξειδοοικοκτάσεις**, που καταλύουν τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και τις αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου.

2. **Τρανσφεράσες** που καταλύουν τη μεταφορά λειτουργικών ομάδων, όπως άκυκλο και φωσφορικών ομάδων ή σακχάρων, από ένα μόριο σε άλλο
 3. **Υδρολάσες** που καταλύουν την υδρόλυση αμιδίων, εστέρων και πεπτιδίων.
 4. **Λυάσες** που καταλύουν τις αντιδράσεις προσθήκης σε διπλούς δεσμούς καθώς και τις αντίστροφες αντιδράσεις απόσπασης.
 5. **Ισομεράσες** που καταλύουν αντιδράσεις ισομερισμού όπως τη μετακίνηση διπλών δεσμών, Z/E ισομερισμούς και αντιδράσεις ρακεμοποίησης.
 6. **Λιγκάσες** που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών C-O, C-S, C-N, C-C και δεσμούς φωσφορικών εστέρων.
- Τα τελευταία χρόνια με τις μεθόδους γενετικής μηχανικής η τροποποίηση των ενζύμων έχει οδηγήσει στον σχηματισμό πολλών μεταλλαγμένων πρωτεϊνών με διαφορετικές ιδιότητες.¹¹ Η τροποποίηση των ενζύμων σχηματίζει καινούργιους και πιο βελτιωμένους καταλύτες με σαφώς καλύτερες ιδιότητες (π.χ στερεοεκλεκτικότητα, δραστηριότητα, σταθερότητα).¹² Επίσης με τη μέθοδο του γενετικού ανασυνδιασμού πολλά ένζυμα κλώνοποιούνται και υπερεκφράζονται σε οργανισμούς οι οποίοι μπορούν να καλλιεργηθούν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, όπως το *Escherichia coli*. Το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή ενζύμων σε αρκετά μεγάλες ποσότητες, τα οποία μπορούν να διατεθούν στο εμπόριο ή να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανική κλίμακα.¹³

Δομικά χαρακτηριστικά και εκλεκτικότητα των ενζύμων

Τα ένζυμα είναι μακρομόρια κυρίως πρωτεϊνικής φύσεως. Η πολυαμιδική τους αλυσίδα διατηρείται σε μια τρισδιάστατη δομή, αυτήν με τη χαμηλότερη ενέργεια ΔG ,¹⁴ ο οποία καθορίζεται κυρίως από την πρωτοταγή τους δομή. Εξαιτίας του φυσικού υδατικού τους περιβάλλοντος, οι υδρόφιλες πολικές ομάδες, όπως -COOH, -OH, -NH₂, -SH, -CONH₂, εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνειά τους, ενώ στην εσωτερική εντοπίζονται οι υδρόφοβες, όπως αρυλο και αλκυλο ομάδες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η επιφάνεια του ενζύμου να είναι καλυμμένη από ένα στρώμα νερού. Η ποσότητά του φτάνει έως και το 10% της ποσότητας του ενζύμου σε ξηρή κατάσταση και το οποίο ονομάζεται 'δομικό νερό'.¹⁵ Το νερό αυτό προσδένεται ισχυρά στην επιφάνεια της πρωτεΐνης με δεσμούς υδρογόνου και είναι απαραίτητο

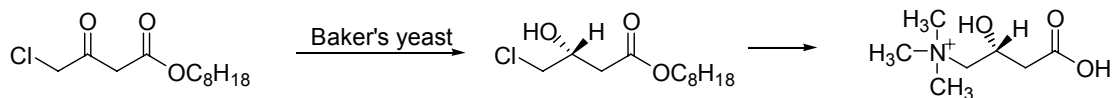
για να αποκτήσει το ένζυμο την κατάλληλη τρισδιάστατη δομή και έτσι την καταλυτική του δραστηριότητα. Ολόκληρη η δομή που αποκτά το ένζυμο σταθεροποιείται από ασθενείς δυνάμεις Van-Der-Waals των αλειφατικών αλυσίδων, π-π αλληλεπιδράσεις αρωματικών δακτυλίων ή γέφυρες αλάτων μεταξύ φορτισμένων ομάδων του μορίου. Εκτός από τους πολυπεπτιδικούς δεσμούς που αποτελούν τον σκελετό του ενζύμου (πρωτεΐνη), ομοιοπολικοί δεσμοί εντοπίζονται μεταξύ ατόμων S (S – S) και ονομάζονται δισουλφιδικοί δεσμοί. Τέτοιοι δεσμοί είναι αρκετά σημαντικοί, καθώς ανάλογα με τον αριθμό δισουλφιδικών δεσμών στο ένζυμο επηρεάζεται η σταθερότητά του στη θερμοκρασία. Μεγάλη επιρροή στη θερμοσταθερότητα του ενζύμου έχουν επίσης και οι δεσμοί αλάτων καθώς και τα κατάλοιπα ασπαραγινικού οξέος.

Τα ένζυμα εξαιτίας της πολύπλοκης δομής τους διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα τα οποία και φαίνονται μέσα από τις αντιδράσεις που καταλύουν. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ενζύμων είναι η κάθε είδους εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν:

α) Χημειοεκλεκτικότητα

Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να δρουν εκλεκτικά σε μια δραστική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων εξίσου δραστικών ομάδων του ίδιου μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή καθαρών ενώσεων χωρίς την παρουσία παραπροϊόντων. Παράδειγμα αποτελεί η χημειοενζυμική σύνθεση της L-Καρνιτίνης (Σχήμα 3).¹⁶

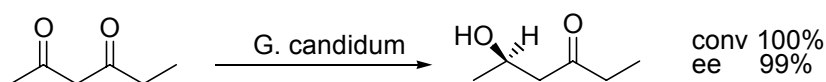
Σχήμα 3



β) Τοποεκλεκτικότητα

Εξαιτίας της πολύπλοκης τρισδιάστατης δομής τους έχουν την ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες οι οποίες βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου υποστρώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αναγωγή της 2,4-εξανοδιόνης με τον μικροοργανισμό *Geotrichum candidum* (Σχήμα 4).¹⁷

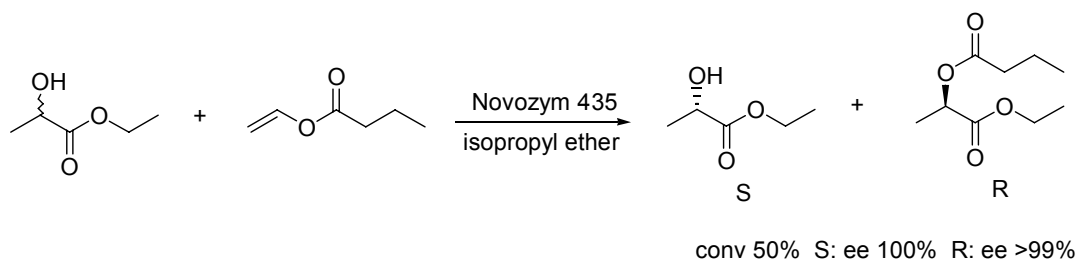
Σχήμα 4



γ) Εναντιοεκλεκτικότητα

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα δύο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μια από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου, όπως φαίνεται στην αντίδραση εστεροποίησης του 2-υδροξυ προπανοϊκού αιθυλεστέρα με το ένζυμο Novozym 435 (Σχήμα 5).¹⁸

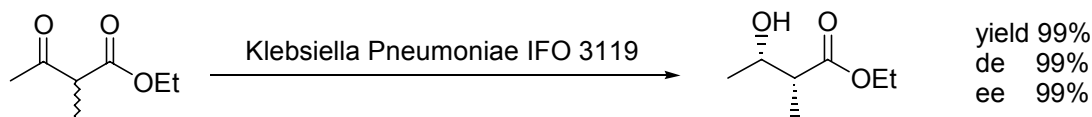
Σχήμα 5



δ) Διαστεροεκλεκτικότητα

Έχουν την ικανότητα να διακρίνουν ένα από τα διαστερομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστεροτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου. Αυτό έχει παρατηρηθεί στην αντίδραση αναγωγής του 2-μεθυλο-ακετοξικού αιθυλεστέρα με τον μικροοργανισμό *Klebsiella Pneumoniae* IFO 3119 (Σχήμα 6).¹⁹

Σχήμα 6



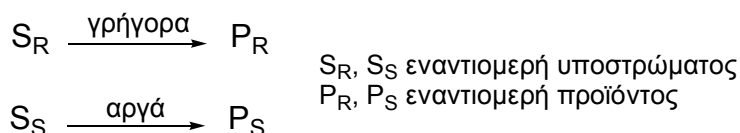
Τα ένζυμα, εξαιτίας της εκλεκτικότητάς τους και της καταλυτικής τους ικανότητας συνήθως χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό ενός μίγματος εναντιομερών ή διαστερομερών. Ο διαχωρισμός αυτό μπορεί να γίνει μέσω κινητικού ή δυναμικού κινητικού διαχωρισμού.

ΚΙΝΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

Παρόλο που έχουν γίνει θεαματικά βήματα στην ασύμμετρη σύνθεση, ο διαχωρισμός των ρακεμικών μιγμάτων αποτελεί την συνηθέστερη επιλογή ακόμα και στη βιομηχανία για την παραγωγή εναντιομερικά καθαρών ενώσεων. Μια από τις σημαντικότερες μεθόδους διαχωρισμού εναντιομερών ουσιών είναι ο κινητικός διαχωρισμός.

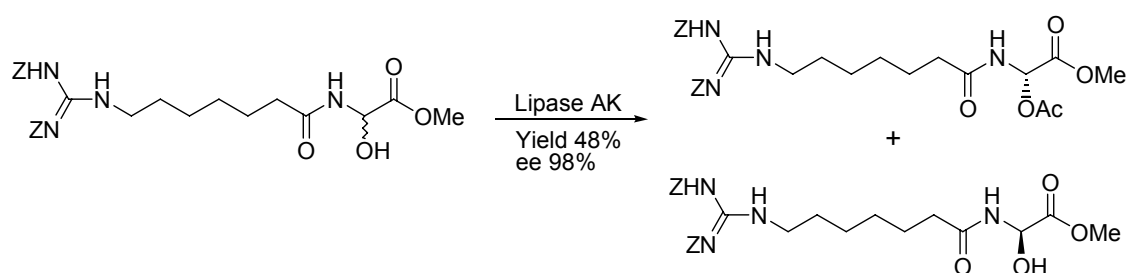
Ο κινητικός διαχωρισμός στηρίζεται στην διαφορετική ταχύτητα με την οποία δυο εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος μετατρέπονται σε προϊόντα (Σχήμα 7). Αν ο διαχωρισμός είναι αποτελεσματικός, τότε ένα από τα δύο εναντιομερή του μίγματος μετατρέπεται στο επιθυμητό προϊόν ενώ το άλλο παραμένει πρακτικά αμετάβλητο.

Σχήμα 7: Κινητικός Διαχωρισμός.



Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο κινητικός διαχωρισμός ενός ρακεμικού υδροξυ εστέρα, ο οποίος επιτυγχάνεται με αντίδραση εστεροποίησης καταλυόμενη από τη λιπάση AK (Σχήμα 8).²⁰

Σχήμα 8



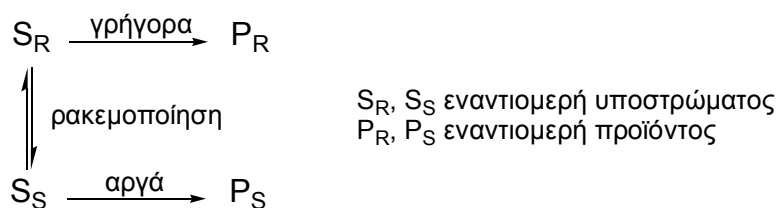
Όμως η διαδικασία του κινητικού διαχωρισμού έχει κάποιους περιορισμούς. Πρώτον, η μέγιστη θεωρητική απόδοση είναι μόνο 50% και δεύτερον, απαιτείται μέθοδος εργαστηριακού διαχωρισμού του προϊόντος από το υπόστρωμα που δεν αντέδρασε. Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί με μοναδικό στόχο την παρασκευή εναντιομερικά καθαρών ενώσεων με

πολύ μεγαλύτερη απόδοση. Η προσπάθεια αυτή οδήγησε στην εξέλιξη του κλασικού κινητικού διαχωρισμού στον **Δυναμικό Κινητικό Διαχωρισμό (ΔΚΔ)**.

ΔΥΝΑΜΙΚΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

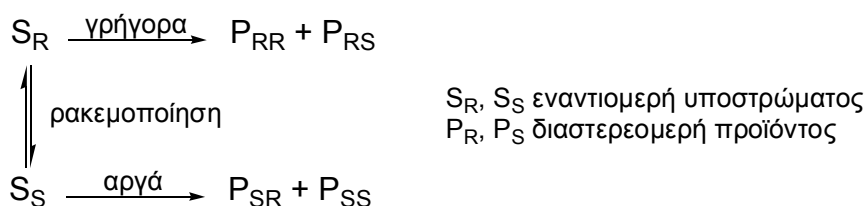
Ο δυναμικός κινητικός διαχωρισμός (ΔΚΔ) είναι μια μέθοδος η οποία συνδυάζει αποτελεσματικά το στάδιο διαχωρισμού του κινητικού διαχωρισμού, με την ισορροπία ή ρακεμοποίηση του αρχικού χειρόμορφου υποστρώματος, με αποτέλεσμα την παραγωγή του εναντιομερικά καθαρού προϊόντος σε ικανοποιητική απόδοση (Σχήμα 9). Με αυτόν τον τρόπο όλα τα υποστρώματα μπορούν να μετατραπούν σε ένα μοναδικό εναντιομερές προϊόν με θεωρητική απόδοση 100%.

Σχήμα 9: Δυναμικός Κινητικός Διαχωρισμός.



Η ρακεμοποίηση του υποστρώματος μπορεί να επιτευχθεί με χημικό τρόπο, με βιοκαταλυτικό τρόπο είτε και αυθόρμητα. Σε κάθε περίπτωση βέβαια, οι συνθήκες πρέπει να επιλεγούν προσεκτικά για την αποφυγή της ρακεμοποίησης του προϊόντος. Η χρήση του ΔΚΔ δεν περιορίζεται μόνο στην εκλεκτική σύνθεση του ενός εναντιομερούς. Όταν η αντίδραση προχωρά με τη δημιουργία ενός καινούριου στερεογονικού κέντρου, είναι πιθανή η στερεοεκλεκτική σύνθεση του ενός διαστερομερούς (Σχήμα 10).

Σχήμα 10

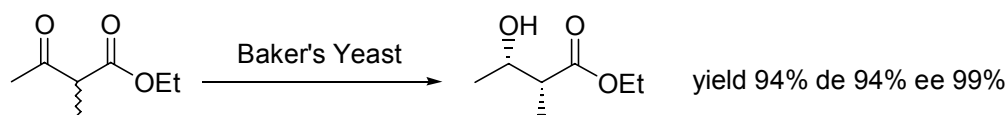


Συνήθως τα ένζυμα παίρνουν μέρος σε αντιδράσεις μέσω ΔΚΔ για τη σύνθεση οπτικά καθαρών ενώσεων με υψηλές αποδόσεις. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα αναφέρονται παρακάτω.

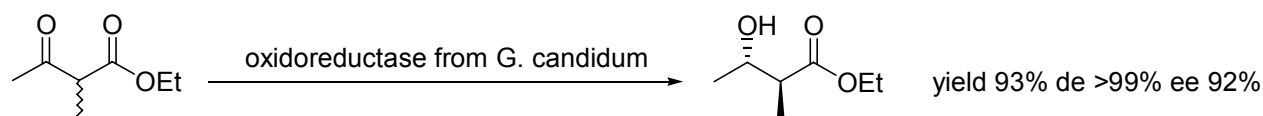
Ενζυμικές μέθοδοι Δυναμικού Κινητικού Διαχωρισμού

Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τη μεγάλη δραστικότητα των ενζύμων καθώς και τη ρακεμοποίηση του υποστρώματος με αποτέλεσμα την παραγωγή οπτικώς καθαρών ενώσεων με μεγάλη απόδοση. Τέτοια διαδικασία έχει επιτευχθεί κατά τη βιοκαταλυτική αναγωγή α-υποκατεστημένων καρβονυλικών ενώσεων με μικροοργανισμούς, όπως η δημοφιλής baker's yeast (Σχήμα 11),²¹ ή με απομονωμένα ένζυμα (Σχήμα 12).²²

Σχήμα 11

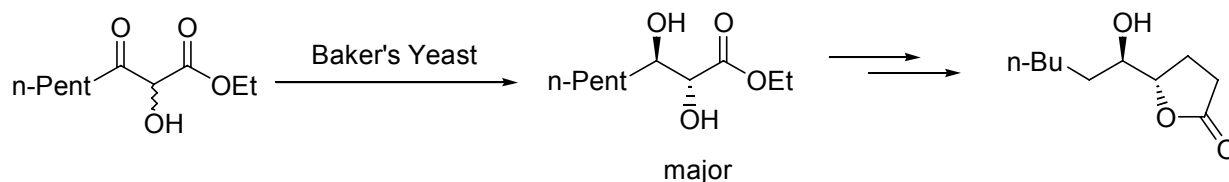


Σχήμα 12



Παρόμοιες αντιδράσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση διαφόρων φυσικών προϊόντων, όπως έγινε στην περίπτωση του φυσικού προϊόντος (4S,5R)-5-υδροξυ-γ-δεκαλακτόνη (Σχήμα 13).²³

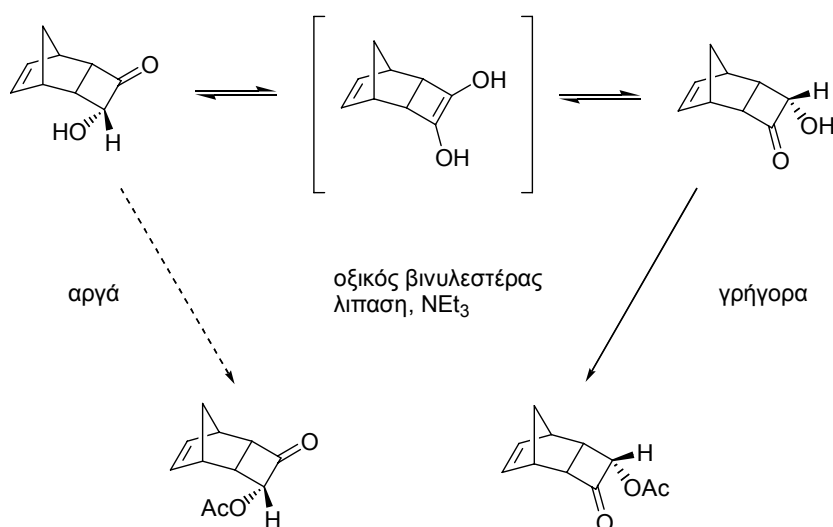
Σχήμα 13



Εκτός από τη βιοκαταλυτική δυναμική αναγωγή, δυναμικός κινητικός διαχωρισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί και με ενζυμικές αντιδράσεις υδρόλυσης και

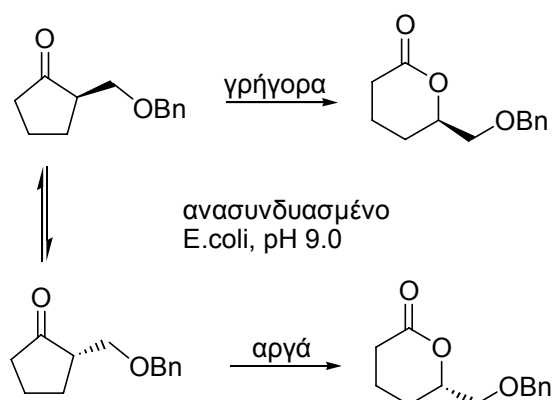
εστεροποίησης. Το 1997 ο Ogasawara απέδειξε ότι η τρικυκλική ρακεμική ακυλοΐνη (Σχήμα 14) δίνει αντίδραση δυναμικής εστεροποίησης με οξικό βινυλεστέρα εναντιοεκλεκτικά μέσω της ενδιάμεσης meso-ενεδιόλης παρουσία λιπάσης και τριαιθυλαμίνης, δίνοντας τον αντίστοιχο ενδο-εστέρα.²⁴

Σχήμα 14



Πολύ πρόσφατα δημοσιεύτηκε το πρώτο παράδειγμα ΔΚΔ το οποίο εφαρμόστηκε σε μια μικροβιακή οξείδωση Bayer-Villiger, χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο E.coli strain το οποίο υπερέκφραζε το ένζυμο μονοξυγεννάση της κυκλοεξανόνης. Έτσι το υπόστρωμα 2-βενζυλοξυμεθυλο κυκλοπεντανόνη μετατράπηκε μέσω ΔΚΔ στο εναντιομερικώς καθαρό R-6-βενζυλοξυμεθυλο τετραυδροπυραν-2-όνη (Σχήμα 15).²⁵

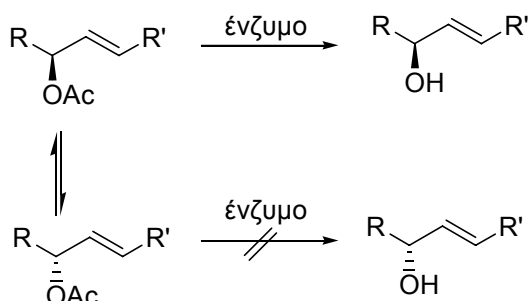
Σχήμα 15



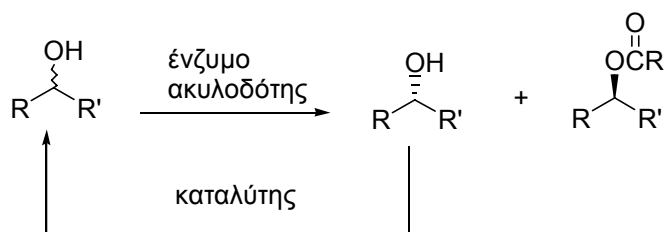
Συνδιασμένη χρήση μεταβατικών μετάλλων και ενζύμων για ΔΚΔ

Εκτός από την ξεχωριστή χρήση μετάλλων και ενζύμων στην επίτευξη ΔΚΔ, το 1996 ο Williams και οι συνεργάτες του παρουσίασαν την «συνέργεια» ενζύμων και συμπλόκων μεταβατικών μετάλλων για τη σύνθεση οπτικώς ενεργών ενώσεων μέσω ΔΚΔ. Έτσι πραγματοποιήθηκε η παλλάδιο-καταλυόμενη ρακεμοποίηση ενός αλλυλικού εστέρα παρουσία μιας υδρολάσης (Σχήμα 16)²⁶ και η καταλυτική ρακεμοποίηση μιας δευτεροταγούς αλκοόλης, με προσωρινή οξείδωση ακολουθούμενη από αναγωγή με τη χρήση καταλυτών μεταφοράς υδρογόνου, με την παρουσία μιας λιπάσης (Σχήμα 17).²⁷

Σχήμα 16



Σχήμα 17

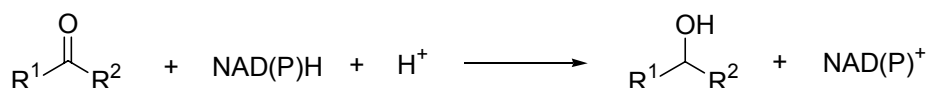


Γενικότερα ο δυναμικός κινητικός διαχωρισμός αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο παραγωγής εναντιομερικά καθαρών ενώσεων, ενώ τα τελευταία χρόνια αποτελεί μια εναλλακτική τυπική διαδικασία για ασύμμετρη σύνθεση. Στην παρούσα διατριβή η πλειοψηφία των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε μέσω ΔΚΔ, χρησιμοποιώντας μια συγκεκριμένη κατηγορία ενζύμων, τις κετορεδοκτάσες.

ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

Οι κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα που ανήκουν στη κατηγορία των οξειδορεδουκτασών και αποτελούν μέρος της οικογένειας των αφυδρογονασών/ρεδουκτασών. Ο καταλυτικός τους ρόλος είναι η αναγωγή καρβόνυλο ομάδων. Τα φυσικά τους υποστρώματα είναι αλκοόλες όπως αιθανόλη, λακτικό, γλυκερόλη κ.τ.λ. καθώς και οι αντίστοιχες καρβονυλικές ενώσεις. Παρόλα αυτά έχουν τη ικανότητα να ανάγουν εναντιοεκλεκτικά και μη φυσικά υποστρώματα. Για την πραγματοποίηση μιας αναγωγής, τα ένζυμα αυτά απαιτούν τη χρήση συνενζύμων όπως NADH ή NADPH. Η αναγωγή πραγματοποιείται με μεταφορά ενός υδριδίου στο καρβονυλικό υπόστρωμα, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση του Σχήματος 18:

Σχήμα 18: Γενική αντίδραση αναγωγής με τις κετορεδουκτάσες.



Υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες ενζύμων που ενεργοποιούν την προσβολή του υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στο υπόστρωμα (Σχήμα 19).²⁸ Υπάρχουν τα ένζυμα τύπου E1 και E2, με τα οποία η προσβολή του υδριδίου γίνεται από την si-επιφάνεια της καρβονυλομάδας και τα τύπου E3 και E4, με τα οποία η προσβολή γίνεται από την re-επιφάνεια, προκύπτοντας αντίστοιχα οι R και S αλκοόλες. Μηχανιστικά τα ένζυμα τύπου E1 και E3 μεταφέρουν το pro-(R)-υδρίδιο του συνενζύμου, ενώ τα τύπου E2 και E4 χρησιμοποιούν το pro-(S)-υδρίδιο.

Παραδείγματα ενζύμων τύπου E1 – E3 είναι:

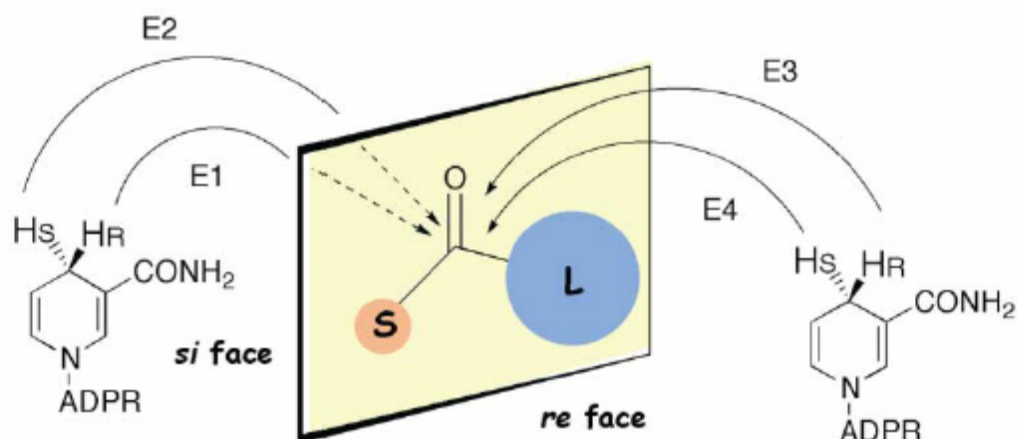
E1: *Pseudomonas* sp. alcohol Dehydrogenase,²⁷ *Lactobacillus kefir* alcohol Dehydrogenase.²⁹

E2: *Geotrihum candidum* glycerol Dehydrogenase,³⁰ *Mucor javanicus* dihydroxyacetone reductase.

E3: Yeast alcohol dehydrogenase, Horse liver alcohol Dehydrogenase,³¹ *Moraxella* sp. alcohol dehydroenase.³²

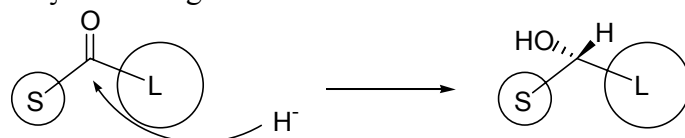
E4: Άγνωστη.

Σχήμα 19: Αναγωγή καρβονυλίου από NADH.



Στις περισσότερες περιπτώσεις των αφυδρογονασών, το στεreoχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης μπορεί να προβλεφθεί από ένα απλό μοντέλο, αναφερόμενο σαν “κανόνας του Prelog”. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό η αφυδρογονάση μεταφέρει το υδρίδιο από την *re*-επιφάνεια της προχειρόμορφης κετόνης. Το αποτέλεσμα της αναγωγής με ένα ένζυμο που υπακούει στον κανόνα του Prelog είναι ο σχηματισμός της *S* αλκοόλης (Σχήμα 20).

Σχήμα 20: Κανόνας του Prelog.

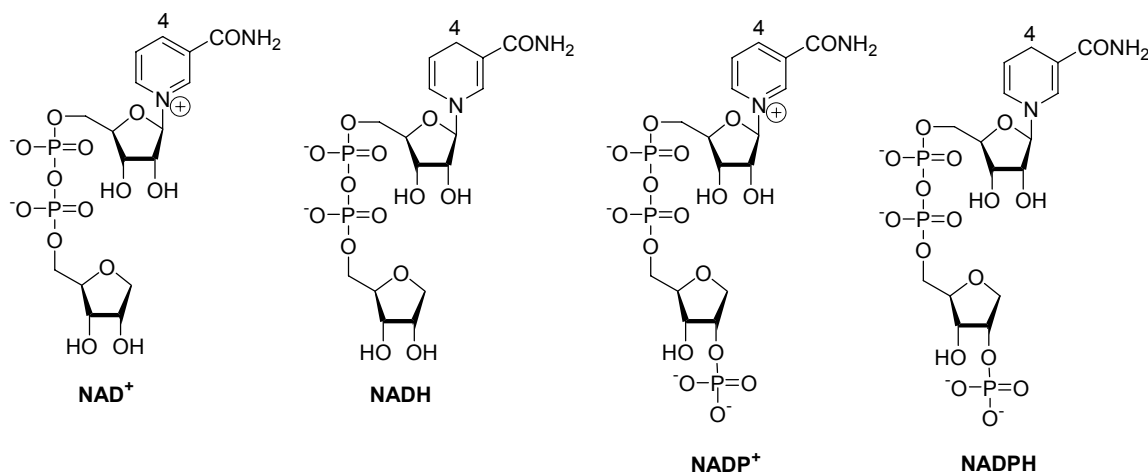


Οι πλειοψηφία των αφυδρογονασών υπακούει στον κανόνα του Prelog (Prelog ένζυμο) παράγοντας *S* αλκοόλες, ενώ ελάχιστα είναι τα ένζυμα με αντίθετη εκλεκτικότητα (*anti*-Prelog ένζυμο). Αυτό σημαίνει ότι οι περισσότερες κετορεδουκτάσες ανήκουν στην κατηγορία E3 (Σχήμα 19). Πάντως σε κάθε περίπτωση, για την πραγματοποίηση μιας ενζυμικής αντίδρασης αναγωγής, είναι απαραίτητη η ύπαρξη συνενζύμου NADH ή NADPH.

ΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΚΟΙ ΣΥΜΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Το νικοτιναμιδο αδενινο δινουκλεοτίδιο (NAD^+) και το 2'-φωσφορυλιωμένο άλας (NADP^+) (Σχήμα 21) συμμετέχουν σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις καταλυόμενες από αφυδρογονάσες. Ο νικοτιναμιδικός δακτύλιος των ενώσεων αυτών είναι οξειδοαναγωγικά ενεργός, μπορώντας να δεχτεί ένα υδρίδιο (ή δυο ηλεκτρόνια και ένα πρωτόνιο) για το σχηματισμό των υδρογονωμένων παραγώγων NADH και NADPH . Η αντίστροφη μεταφορά υδριδίου από ένα αναγωγικό υπόστρωμα στο NAD(P)^+ , και αυτή από το NAD(P)H σε ένα οξειδωτικό, είναι στερεοεκλεκτική και χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Κάθε ένζυμο είναι ικανό να μεταφέρει στερεοεκλεκτικά ένα από τα διαστερεοτοπικά υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση C-4 του NAD(P)H σε μια καρβονυλομάδα ενός υποστρώματος.³³

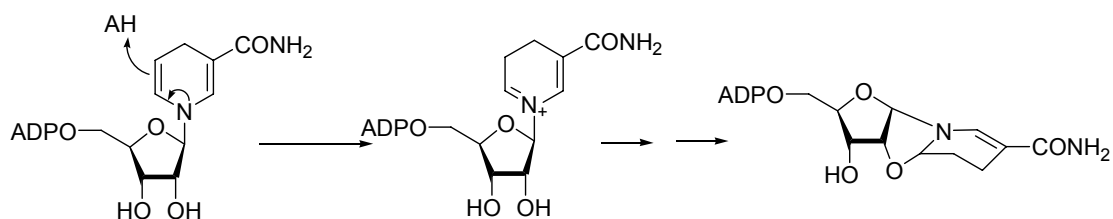
Σχήμα 21: Νικοτιναμιδικοί Συμπάραγοντες.



Η ανηγμένη και η οξειδωμένη μορφή των νικοτιναμιδικών συμπαραγόντων είναι και οι δυο αποικοδομίσιμες σε υδατικά διαλύματα. Γενικά οι ανηγμένες μορφές είναι σταθερές σε βασικά διαλύματα, αλλά ασταθείς σε όξινα, σε αντίθεση με τις οξειδωμένες μορφές που είναι σταθερές σε όξινα διαλύματα και ασταθείς σε βασικά.³⁴ Γι' αυτό οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως σε pH περίπου 7, σε μια ενδιάμεση δηλαδή τιμή σταθερότητας.

Η αποικοδόμηση του NAD(P)H σε pH 5-9 κυρίως οφείλεται σε όξινη κατάλυση (Σχήμα 22).^{31, 32}

Σχήμα 22: Αποικοδόμηση του NAD(P)H.



Έτσι, πραγματοποιείται πρωτονίωση του νικοτιναμιδιακού δακτυλίου στον άνθρακα-5, ακολουθούμενη από γρήγορη μετάθεση σχηματίζοντας κυκλικό αιθέρα.³⁵ Στην περίπτωση του NADPH πραγματοποιείται μια επιπλέον ενδομοριακή κυκλοποίηση στη θέση της 2-φωσφορικής ομάδας.³⁴ Έτσι σε ανόργανα ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής των συνενζύμων είναι περιορισμένοι. Οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το NADPH σε 0,1M φωσφορικό νάτριο, σε pH 7.0, 25 °C είναι 27 και 13 ώρες αντίστοιχα. Σε οργανικά όμως ρυθμιστικά διαλύματα οι χρόνοι ζωής αυξάνονται αρκετά. Τέτοια διαλύματα είναι imidazole, triethanolamine, Hepes και Tris. Έτσι οι χρόνοι ημιζωής για το NADH και το NADPH σε 0,1M Tris σε pH 7.0 και 25 °C είναι 330 και 31 ώρες αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των NAD(P)⁺ το κυριότερο στάδιο για την αποικοδόμησή τους είναι η πυρηνόφιλη προσθήκη στον άνθρακα-4 για το σχηματισμό 1,4-διυδροξυπυριδινικής δομής, πορεία η οποία μπορεί να καταλύεται από ένζυμο. Τα πυρηνόφιλα μπορεί να είναι υποστρώματα ή κάποιες άλλες ενώσεις του διαλύματος. Για παράδειγμα, παρουσία 0,1M πυρουβικού σε pH 7.0 το NAD⁺ έχει χρόνο ημιζωής 6,9 ώρες.³³

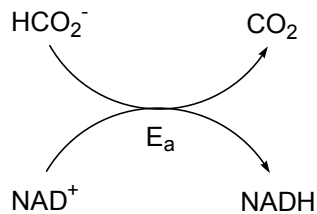
Τα συνένζυμα είναι ενώσεις εμπορικά διαθέσιμες εδώ και πολλά χρόνια. Παρόλα αυτά το κόστος τους είναι αρκετά υψηλό και για αυτό το λόγο απαιτούνται τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού. Ένας τέτοιος τρόπος είναι τα συστήματα αναγέννησης των συνενζύμων.³⁶

Για να είναι μια μέθοδος αναγέννησης συνενζύμων αποτελεσματική θα πρέπει να είναι αρκετά εκλεκτική ως προς το υπόστρωμα, σε σχέση με την επιθυμητή ενζυμική αντίδραση, και να έχει την ικανότητα να ανακυκλώνει τον συμπαράγοντα 10² – 10⁵ φορές. Προς το παρόν, μόνο η ενζυμική κατάλυση παρέχει τέτοια μεγάλη εκλεκτικότητα για την αναγωγή του NAD(P)⁺ σε NAD(P)H. Το μόνο μειονέκτημα των ενζυμικών ανακυκλώσεων είναι η δαπάνη και η περιορισμένη σταθερότητα των ενζύμων.

Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα για την ανακύκλωση του NADH και NADPH. Τα πιο χρήσιμα συστήματα αναγέννησης είναι:

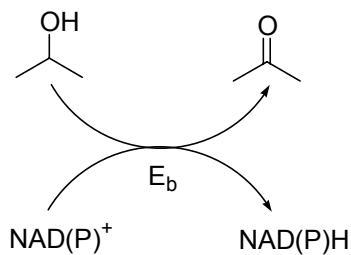
1. Άλας του μυρμηκικού οξέος/αφυδρογονάση του μυρμηκικού (E_a) από *Candida boidinii* (Σχήμα 23),³⁷

Σχήμα 23



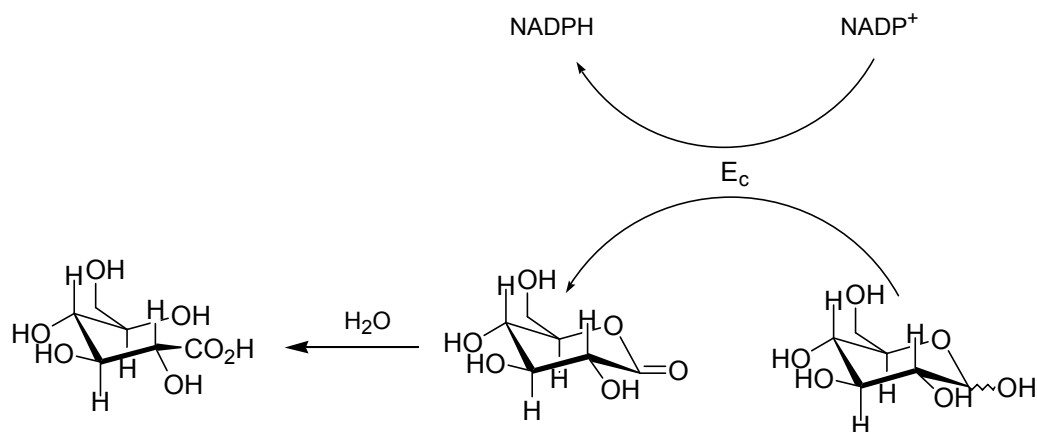
2. Ισοπροπανόλη/αλκοολική αφυδρογονάση (E_b) από *Theromoanaerobium brockii* (για NADP),³⁸ ή *Pseudomonas sp* (για NAD)²⁸ (Σχήμα 24).

Σχήμα 24



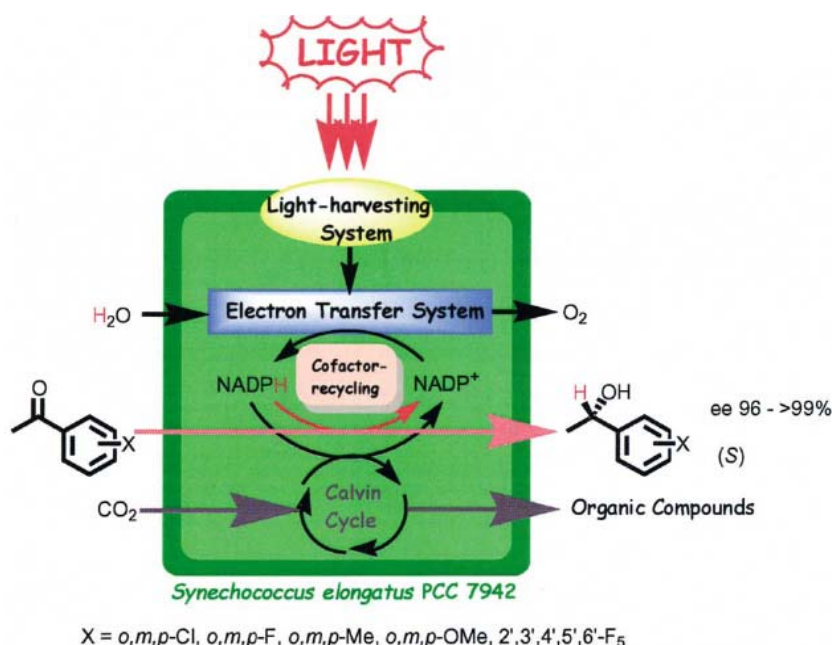
3. Γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης (E_c) από *Bacillus* (για NAD(P)H) (Σχήμα 25).³⁹

Σχήμα 25



Οι πιο σύγχρονες μέθοδοι ανακύκλωσης των συνενζύμων περιλαμβάνουν φωτοχημικές μεθόδους,⁴⁰ οι οποίες είναι φιλικές στο περιβάλλον και αποδίδουν την κατάλληλη ενέργεια για την αναγέννηση του NAD(P)H, για παράδειγμα με τη χρήση ενός κυανοβακτηρίου, ενός φωτοσυνθετικού βιοκαταλύτη. Σε αυτή την περίπτωση η ενέργεια του φωτός δεσμεύεται από το κυανοβακτήριο, μετατρέπεται σε χημική ενέργεια κατά την παραγωγή του NADPH, μέσω συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίου και συνεπώς η χημική ενέργεια (NADPH) χρησιμοποιείται για την αναγωγή του υποστρώματος (Σχήμα 26). Η φωτεινή ενέργεια, η οποία συνήθως χρησιμοποιείται για την αναγωγή του CO₂ και τη σύνθεση οργανικών ενώσεων, χρησιμοποιείται στην περίπτωση αυτή για την αναγωγή του υποστρώματος.

Σχήμα 26: Χρήση της φωτεινής ενέργειας σαν κινητήρια δύναμη για αναγωγή.



Με τη χρήση των συστημάτων ανακύκλωσης των νικοτιναμιδικών συνενζύμων το κόστος των ενζυμικών αναγωγών έχει μειωθεί σημαντικά. Έτσι η χρήση των κετορεδοκτασών στην ασύμμετρη σύνθεση έχει αυξηθεί κατά πολύ τα τελευταία χρόνια συμβάλλοντας ουσιαστικά στη σύνθεση πολύτιμων χειρόμορφων ενδιάμεσων και βιολογικά δραστικών ενώσεων.⁴¹

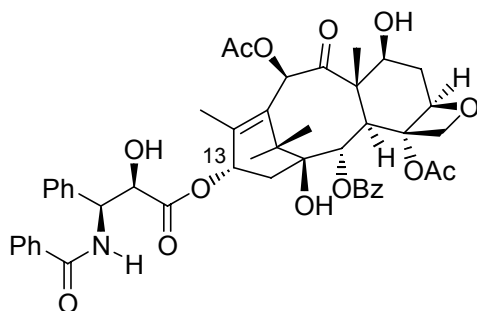
ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ ΣΤΗΝ ΑΣΥΜΜΕΤΡΗ ΣΥΝΘΕΣΗ

Όπως έχει αναφερθεί, η χειρομορφία είναι ο παράγοντας κλειδί για την βιολογική δραστικότητα πολλών φυσικών προϊόντων και φαρμάκων. Για το λόγο αυτό οι φαρμακευτικές βιομηχανίες αναζητούν ολοένα και περισσότερους καταλύτες για τη σύνθεση οπτικώς ενεργών ενώσεων. Τα τελευταία χρόνια οι κετορεδουκτάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ασύμμετρη σύνθεση. Απόδειξη αποτελεί η ολοένα και αυξανόμενη χρήση τους στην σύνθεση φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Παρακάτω αναφέρονται μερικά πρόσφατα χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής ή χρήσης των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη σύνθεση.

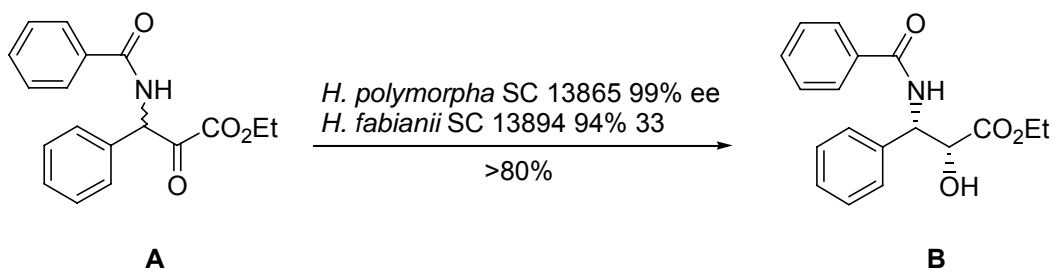
Αντικαρκινικά φάρμακα

Από όλα τα αντιμιτωτικά μέσα, το paclitaxel (Taxol) (Σχήμα 27) είναι ένα πολύπλοκο, πολυκυκλικό διτερπένιο το οποίο επιδεικνύει μια μοναδική δράση στις πρωτεΐνες των μικροσωληνίσκων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαίρεση των κυττάρων. Το paclitaxel είναι η μοναδική γνωστή ένωση που παρεμποδίζει τη διαδικασία αυτή σταθεροποιώντας τους μικροσωληνίσκους και έτσι έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου. Για την σύνθεση της πλάγιας αλυσίδας του C-13 χρησιμοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα της φαρμακευτικής εταιρείας Bristol-Meyers Squibb ενζυμική αναγωγή του αντίστοιχου α-κετο εστέρα **A** χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Η απόδοση ξεπέρασε το 80% και το επιθυμητό προϊόν **B** προέκυψε με μεγάλη εναντιομερική περίσσεια (Σχήμα 28).⁴²

Σχήμα 27: Paclitaxel (Taxol).



Σχήμα 28



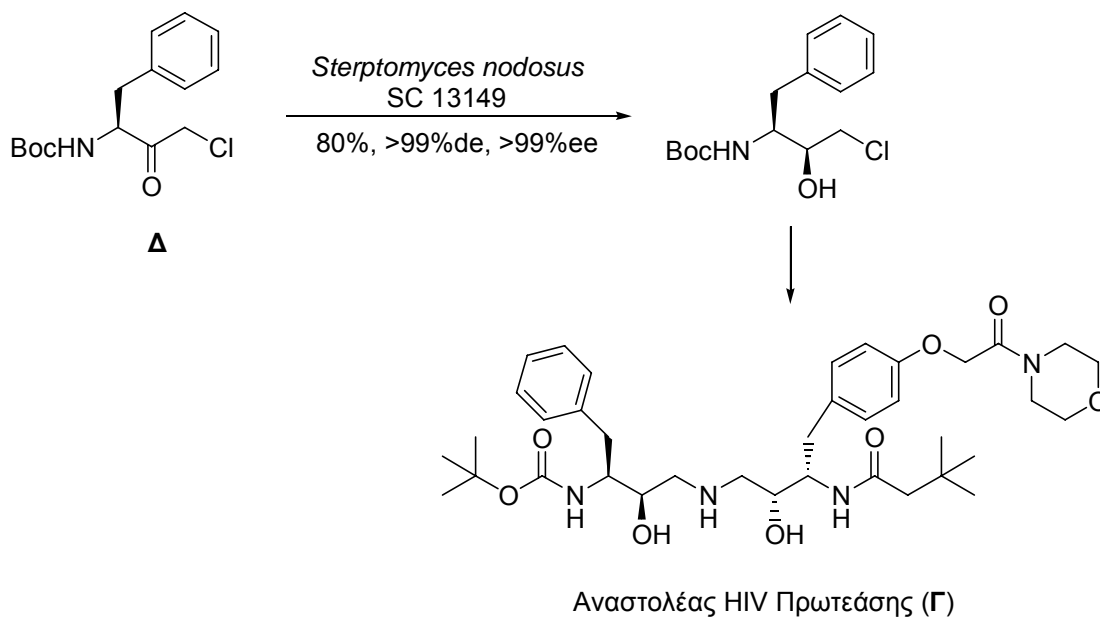
Φάρμακα εναντίον ιών

Ένα βασικό στάδιο του κύκλου ζωής του ανθρώπινου ιού ανοσοανεπάρκειας (HIV-1) είναι η πρωτεολυτική διαδικασία των πρόδρομων πρωτεϊνών με το ένζυμο HIV-1 πρωτεάση. Αναστολή του ενζύμου αυτού σταματά την αντιγραφή του ιού οπότε η HIV-1 πρωτεάση είναι ένας στόχος για τη θεραπεία από τον ιό. Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η ένωση **Γ** επιδεικνύει σημαντική anti-HIV δραστηριότητα.⁴³ Για τη σύνθεσή της πραγματοποιήθηκε ενζυμική αναγωγή της κετόνης **Δ** από τον Patel και τους συνεργάτες του παράγοντας το ενδιάμεσο κλειδί για τη σύνθεση της ένωσης **Γ** (Σχήμα 29).⁴⁴

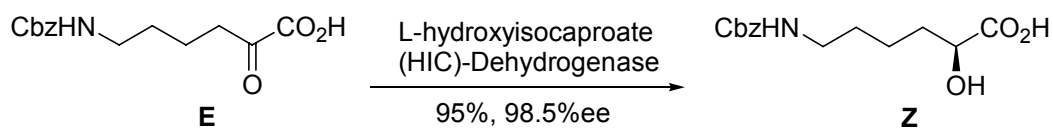
Αντιυπερτασικά φάρμακα

Η ceranopril είναι μια ένωση η οποία χρησιμοποιείται σαν φάρμακο κατά της υπέρτασης.⁴⁵ Ρόλος της είναι η αναστολή του ACE και έτσι αποτρέπεται η μετατροπή της αγγειοτενσίνης I στην αγγειοτενσίνη II. Για τη σύνθεσή της χρειάζεται η ενδιάμεση ένωση **Z** η οποία προκύπτει με ενζυμική αναγωγή του α-κετο οξέος **E** (Σχήμα 30).⁴⁶

Σχήμα 29



Σχήμα 30

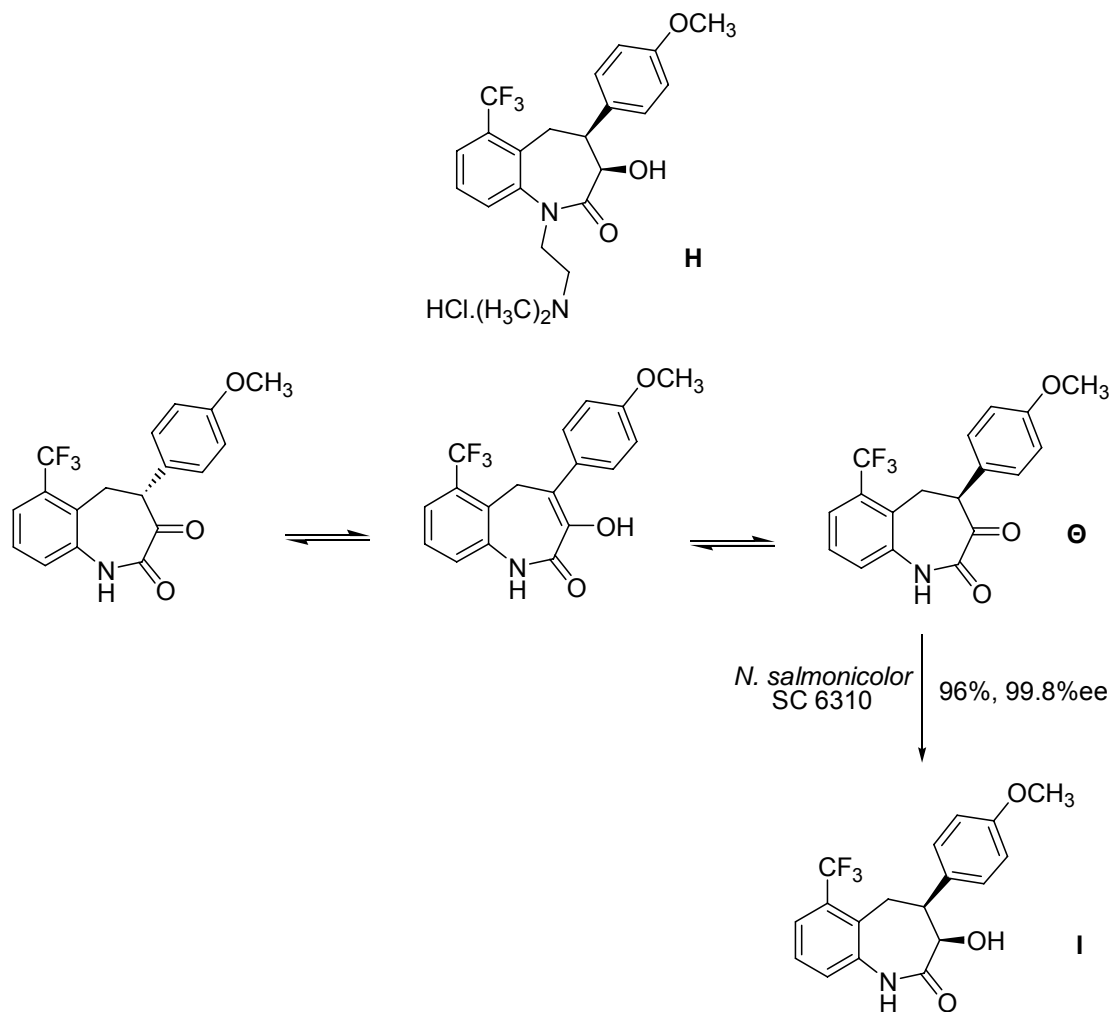


Σαν φάρμακο κατά της υπέρτασης χρησιμοποιείται επίσης και η ένωση **H**,⁴⁷ η οποία εμποδίζει την εισροή εξωκυτταρικού ασβεστίου στο κύτταρο μπλοκάροντας κανάλια ασβεστίου. Η ένωση αυτή παρασκευάστηκε με ενζυμική αναγωγή της δικετόνης **Θ**, μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού (Σχήμα 31).⁴⁸

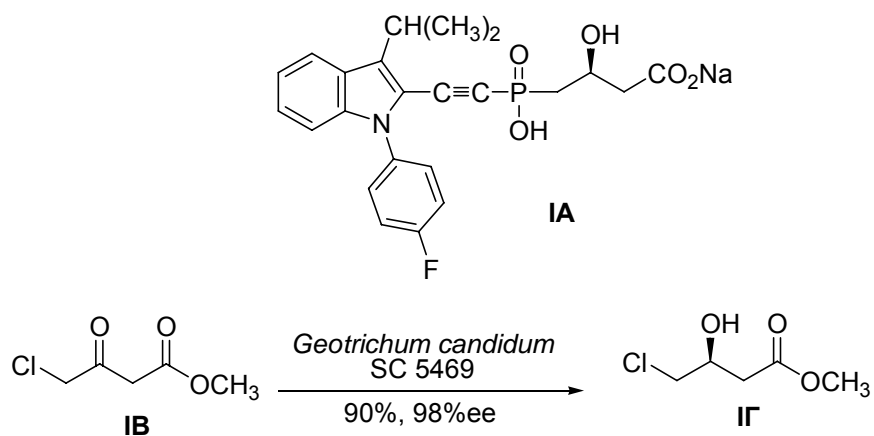
Αντιχοληστερολικά φάρμακα

Η ένωση **ΠΓ** είναι το ενδιάμεσο κλειδί για την ένωση **ΙΑ**, η οποία είναι ανταγωνιστής της χοληστερόλης. Για την παρασκευή της ένωσης **ΠΓ** πραγματοποιήθηκε ενζυμική αναγωγή του β-κετο εστέρα **ΙΒ** (Σχήμα 32).⁴⁹

Σχήμα 31

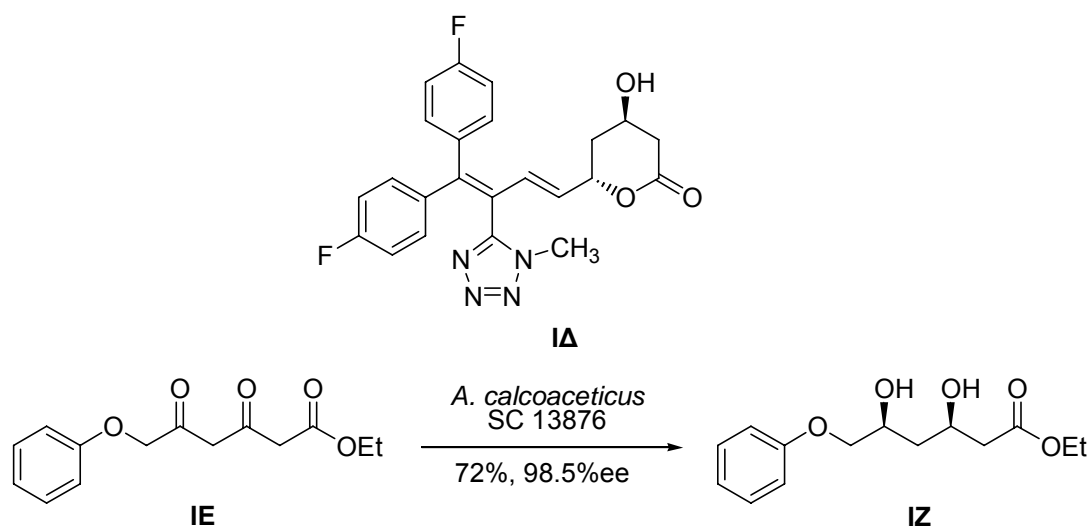


Σχήμα 32



Παρόμοια δράση με την ένωση **1A** έχει και η ένωση **1Δ**,⁵⁰ η οποία προέκυψε και σε αυτή την περίπτωση με ενζυμική αναγωγή της δικετόνης **1E** (Σχήμα 33).⁵¹

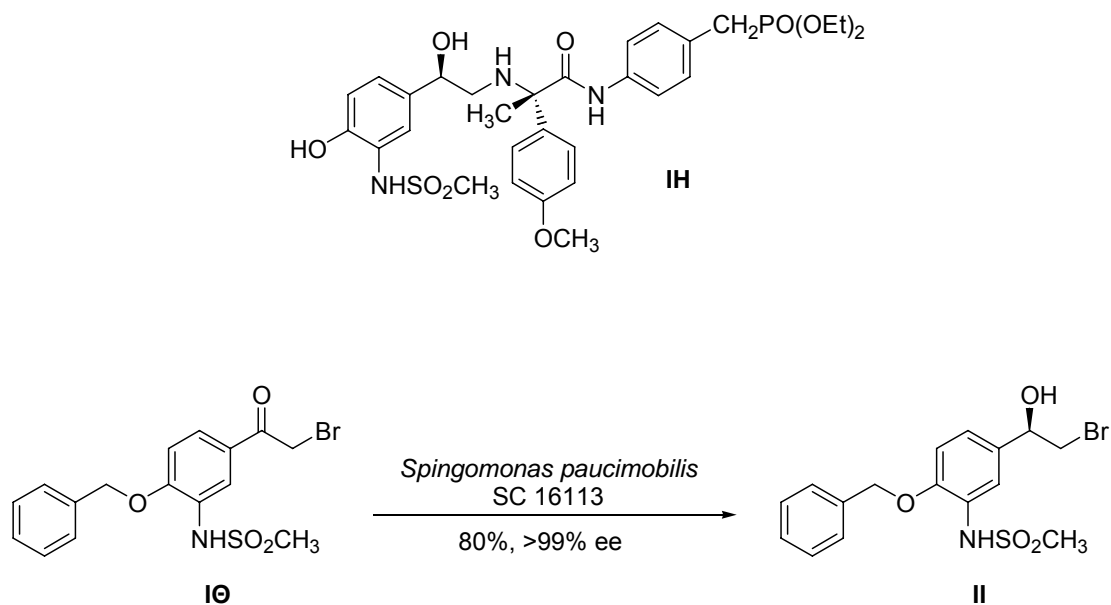
Σχήμα 33



Φαρμακα ανταγωνιστές β3-υποδοχέα

Οι β3-υποδοχείς βρίσκονται στην επιφάνεια κυττάρων και ευθύνονται για την λιπόλυση, θερμογένεση και την χαλάρωση του εντερικού λείου μυ. Συνεπώς, πολλές ερευνητικές ομάδες απασχολούνται για την ανακάλυψη εκλεκτικών β3 ανταγωνιστών για τη θεραπεία γαστρεντερικών δυσλειτουργιών, διαβήτη τύπου II και παχυσαρκία. Μια ένωση που δρα σαν ανταγωνιστής β3-υποδοχέα είναι η ένωση **1H**. Η σύνθεσή της πραγματοποιήθηκε μέσω ενζυμικής αναγωγής της κετόνης **1O** (Σχήμα 34).⁵²

Σχήμα 34



Από όλα τα παραπάνω παραδείγματα είναι φανερό η μεγάλη σημασία των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση. Το πλεονέκτημα της χρήσης των ενζύμων αυτών οφείλεται στην ικανότητά τους για στερεοεκλεκτική και τοποεκλεκτική αναγωγή, καθώς και στα υψηλά ποσοστά μετατροπής (έως και 100%). Έτσι είναι δυνατό να προκύψουν χειρόμορφες ενδιάμεσες ενώσεις με εξαιρετικά υψηλή οπτική καθαρότητα (>99% ee), το οποίο είναι απαραίτητο για την σύνθεση φαρμακευτικών χειρόμορφων προϊόντων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο βασικός στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής περιλαμβάνει την σύνθεση χρήσιμων, οπτικώς ενεργών ενδιάμεσων και φυσικών φερομονών με χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών.

Επιλέχθηκαν για το σκοπό αυτό 64 απομονωμένες και NAD(P)H εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες, η οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρεία BioCatalytics. Η επιλογή τους στηρίχθηκε στην πληθώρα πλεονεκτημάτων που συγκεντρώνουν, όπως υψηλή καταλυτική ικανότητα, στερεοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα, χημειοεκλεκτικότητα, καθώς και στην ικανότητά τους να δέχονται ως υποστρώματα μεγάλο αριθμό μορίων με διαφορετικά στερεοχημικά χαρακτηριστικά, όπως δικετόνες, υδροξυ κετόνες και β-κετοεστέρες.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε επτά κεφάλαια:

- Το **Πρώτο Κεφάλαιο** περιλαμβάνει την ενζυμική παρασκευή οπτικώς καθαρών α-υποκατεστημένων-β-υδροξυ κετονών με τη χρήση 32 απομονωμένων κετορεδουκτασών. Παράλληλα μελετήθηκε η τοποεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα που επέδειξαν τα ένζυμα αυτά στην αναγωγή των αντίστοιχων 1,3-δικετονών.
- Στο **Δεύτερο Κεφάλαιο** περιγράφεται η χημειοενζυμική σύνθεση της φυσικής φερομόνης των εντόμων rice weevil και maize weevil, Sitophilure, χρησιμοποιώντας τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες. Η συγκεκριμένη στερεοεκλεκτική σύνθεση αποτελεί την απλούστερη και συντομότερη μέθοδο σε σχέση με τις προηγούμενες δημοσιευμένες συνθέσεις.
- Το **Τρίτο Κεφάλαιο** περιλαμβάνει τη σύνθεση της φερομόνης του εντόμου *Sitophilus granaries*, η οποία ονομάζεται Sitophilate. Η μέθοδος περιλαμβάνει συνδιασμό κατάλληλων ενζυμικών αναγωγών και υδρόλυση με χρήση κετορεδουκτασών και υδρολασών.
- Στο **Τέταρτο Κεφάλαιο** περιγράφεται η χημειοενζυμική σύνθεση της φυσικής φερομόνης Stegobinone και Stegobiol του εντόμου “drugstore beetle” *Stegobium paniceum* L.

- Το **Πέμπτο Κεφάλαιο** περιλαμβάνει την ενζυμική σύνθεση οπτικά καθαρών α-υποκατεστημένων-1,3-διολών με τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες.
- Στο **Έκτο Κεφάλαιο** παρουσιάζεται η μέθοδος προσδιορισμού της σχετικής στερεοδομής των α-αλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων. Επίσης παρουσιάζεται ένας νέος εμπειρικός κανόνας για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής των ενώσεων αυτών με φασματοσκοπία ^1H NMR, ο οποίος εξάγεται από τα συστηματικά αποτελέσματα των χημικών μετατοπίσεων συγκεκριμένων υδρογόνων των ενώσεων αυτών.
- Στο **Έβδομο Κεφάλαιο** παρουσιάζεται ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οπτικά καθαρών α-αλκυλο-β-υδροξυ κετονών και εστέρων με τη μέθοδο των χειρόμορφων αντιδραστηρίων ανισοτροπίας.

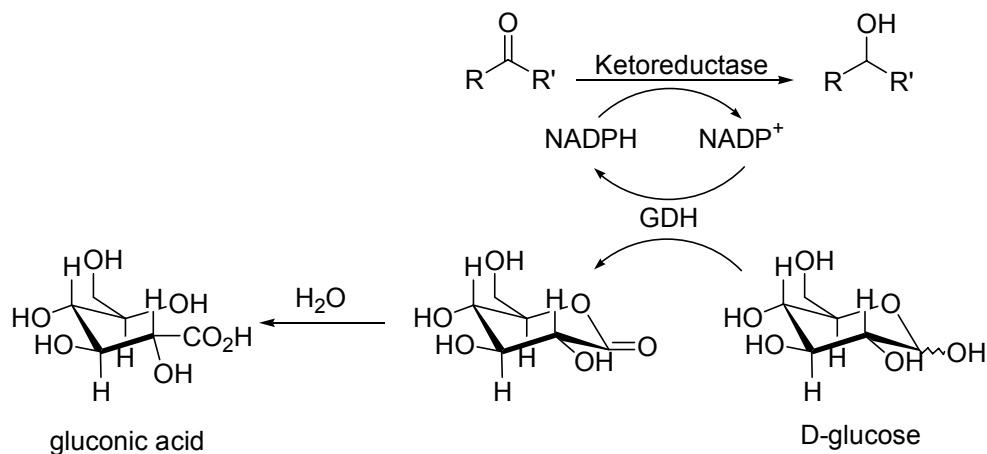
Μεθοδολογία ενζυμικών αντιδράσεων

Οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν απομονωμένες κετορεδουκτάσες, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρία BioCatalytics.⁵³ Τα ένζυμα αυτά απομονώθηκαν από διάφορους μικροοργανισμούς, οι οποίοι επέδειξαν αναγωγική δραστικότητα σε αντιδράσεις σε ολόκληρο κύτταρο. Μετά την απομόνωση τους, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση και υπερέκφραση σε ξενιστή *E. coli*, όπου μετά από καθαρισμό προέκυψαν τα ένζυμα σε στερεή μορφή και με καθαρότητες που αγγίζουν το 70%. Όλες οι κετορεδουκτάσες αποδείχτηκαν εξαιρετικά σταθερές για πολλούς μήνες μετά από την αποθήκευσή τους στους -20°C .

Οι κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 64 σε αριθμό (KRED-101-131, KRED-A1A-A1Z, KRED-B1A-B1G) και όλες ήταν NADPH-εξαρτώμενες εκτός από δυο (KRED-B1B, B1C) που ήταν NADH εξαρτώμενες. Και τα δυο συνένζυμα είναι επίσης εμπορικά διαθέσιμα από την BioCatalytics. Για την αναγέννηση και των δυο μορφών συνενζύμου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ανακύκλωσης γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης. Στο σύστημα αυτό έλαβαν μέρος η D-γλυκόζη και η αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH), ένζυμο το οποίο και αυτό είναι διαθέσιμο από την BioCatalytics. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο σύστημα, η αφυδρογονάση της γλυκόζης οξειδώνει τη D-γλυκόζη σε γλυκονικό οξύ ανάγοντας ταυτόχρονα το

NAD(P)⁺ σε NAD(P)H (Σχήμα 31). Η GDH είναι καθαρά εξειδικευμένο ένζυμο στην D-γλυκόζη, οπότε δεν οξειδώνει το προϊόν της αντίδρασης (αλκοόλη). Έτσι με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος ανακύκλωσης απαιτείται καταλυτική ποσότητα του συνενζύμου βοηθώντας στην ελάττωση του κόστους των ενζυμικών αντιδράσεων.

Σχήμα 31: Γενική αντίδραση αναγωγής με τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες.



Εξαιτίας της παραγωγής γλυκονικού οξέος κατά την αντίδραση, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για τη διατήρηση του pH σε σταθερά επίπεδα. Το pH των αντιδράσεων (στις περισσότερες περιπτώσεις) ήταν 6.9, τιμή στην οποία τα ένζυμα εμφάνισαν αρκετά καλή δραστηριότητα και σταθερότητα. Επίσης σε αυτή την τιμή το συνένζυμο ήταν σταθερό για περίπου 18 – 24 ώρες. Άρα όλες οι αντιδράσεις διάρκεσαν το πολύ 24 ώρες. Η θερμοκρασία των αντιδράσεων διατηρήθηκε από τους 25°C έως 37°C, τιμές αρκετά ικανοποιητικές για τη διατήρηση της σταθερότητας των ενζύμων και συνενζύμων, αλλά και για την αποφυγή παράπλευρων χημικών αντιδράσεων, που πιθανώς να οδηγούσαν σε παραπροϊόντα.

Πριν από τις ενζυμικές αντιδράσεις, για λόγους ταυτοποίησης, παρασκευάστηκε όλη η σειρά των προϊόντων αλκοολών σε ρακεμική μορφή, με χημική μέθοδο.

Για την εύρεση των πιο δραστικών και εκλεκτικών ενζύμων, όλα τα υποστρώματα εξετάστηκαν με όλη τη σειρά των κετορεδουκτασών.

Ο έλεγχος της πορείας των ενζυμικών αντιδράσεων, της εναντιοεκλεκτικότητας και της διαστερεοεκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με αέριο χρωματογράφο με χειρόμορφη τριχοειδή κολώνα. Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με

Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR) πρωτονίου και άνθρακα καθώς (σε κάποιες περιπτώσεις) και με φασματομετρία μάζας.

Τέλος, μετά από την δοκιμή όλων των υποστρωμάτων με τις κετορεδουκτάσες, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός σχετικής και απόλυτης στερεοδομής όλων των οπτικά ενεργών προϊόντων.

Ακολουθώντας την παραπάνω μεθοδολογία οι ενζυμικές αναγωγές πραγματοποιήθηκαν με μεγάλη ευκολία συνθέτοντας πολύτιμες χειρόμορφες ενώσεις, αλλά και φυσικά προϊόντα αποδεικνύοντας την μεγάλη σημασία των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη οργανική σύνθεση.

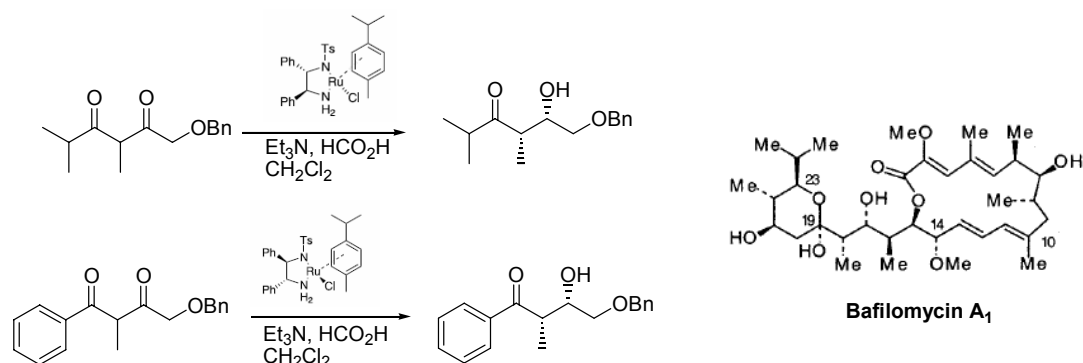
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΟΠΤΙΚΩΣ ΚΑΘΑΡΩΝ α -ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ- β -ΥΔΡΟΞΥ ΚΕΤΟΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΕΤΟΡΕΛΟΥΚΤΑΣΩΝ

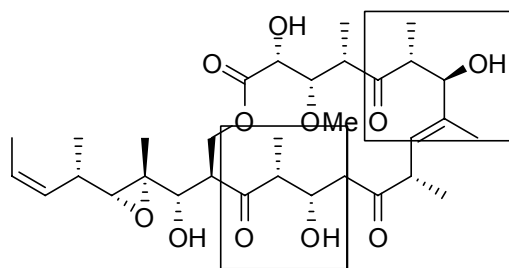
Η ασύμμετρη αναγωγή των διπλών δεσμών ($C=X$ όπου $X=C, O, N$), αποτελεί μια πολύ χρήσιμη και ευρέως εφαρμόσιμη μέθοδο για την εισαγωγή ασύμμετρων κέντρων σε προχειρόμορφες ενώσεις, με αρκετά υψηλές αποδόσεις (έως και 100%). Η ασύμμετρη αναγωγή των κετονών είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς οι χειρόμορφες αλκοόλες συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα φαρμακευτικών προϊόντων, ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν χειρόμορφες πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση μεγαλύτερων και πιο πολύπλοκων ενώσεων.

Οι οπτικώς ενεργές α -υποκατεστημένες- β -υδροξυ κετόνες αποτελούν πολύ σημαντική κατηγορία χειρόμορφων ενώσεων και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση αρκετών φυσικών και φαρμακευτικών προϊόντων⁵⁴ καθώς επίσης αποτελούν μέρος σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικά-δραστικών ενώσεων.⁵⁵ Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση του νέου αντιβακτηριακού και αντιμυκητιακού φαρμάκου bafilomycin A₁, όπου χρησιμοποιήθηκαν δυο α -μεθυλο- β -υδροξυ κετόνες⁵⁶ (Σχήμα 32), καθώς και το αντικαρκινικό tedanolide,⁵⁷ τμήμα του οποίου αποτελούν υδροξυ κετόνες (Σχήμα 33).

Σχήμα 32. Το αντιβακτηριακό και αντιμυκητιακό φάρμακο bafilomycin A₁, το οποίο έχει συντεθεί μέσω δυο α -μεθυλο- β -υδροξυ κετονών.



Σχήμα 33. Η αντικαρκινική ένωση Tedanolide.



Tedanolide

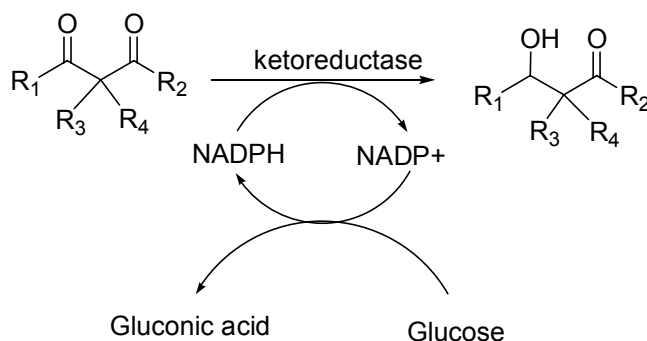
Αρκετές χημικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση των β-υδροξυ κετονών. Στις μεθόδους αυτές περιλαμβάνονται: ασύμμετρες αναγωγές α-αλκυλο-1,3-δικετονών χρησιμοποιώντας χειρόμορφους καταλύτες του Ru(II)⁵⁸ και του Co(II),⁵⁹ ασύμμετρη αλδολική συμπύκνωση ξεκινώντας από διάφορες χειρόμορφες πρόδρομες ενώσεις όπως αμίδια⁶⁰ και κετόνες.⁶¹ Συμπυκνώσεις ξεκινώντας από μη χειρόμορφες κετόνες παρουσία βάσεων αμινών και MgI₂ σαν ενεργοποιητή,⁶² ή μέσω ενολικών ενώσεων του βορίου,⁶³ του τιτανίου,⁶⁴ και ενολικών αλάτων του Zr.⁶⁵ Αλδολικές συμπυκνώσεις παρουσία βάσεων LDA, LTMP και LHMDs,⁶⁶ καθώς και χειρόμορφων αμινών.⁶⁷ β-Υδροξυ κετόνες μπορούν επίσης να προκύψουν από μη ρακεμικές ομοπροπαργυλικές αλκοόλες με καταλυτική ενδομοριακή υδροσιλανίωση.⁶⁸

Εναλλακτικά, βιοκαταλυτικές μέθοδοι έχουν εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια για την σύνθεση παρόμοιων ενώσεων,⁶⁹ συμβάλλοντας σημαντικά στην ελαχιστοποίηση της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης στην οργανική σύνθεση. Η ασύμμετρη αναγωγή των κετονών έχει εκτενώς μελετηθεί. Όμως στις περισσότερες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ολόκληρα κύτταρα μικροοργανισμών σαν βιοκαταλύτες,⁷⁰ εξαιτίας της έλλειψης αξιόπιστων πηγών για την προμήθεια μεγάλων ποσοτήτων κετορεδουκτασών σε σταθερή, καθαρή μορφή. Παρόλο που υπάρχουν αρκετοί μικροοργανισμοί που μπορούν να πραγματοποιήσουν μια αναγωγή, πολλά προβλήματα έχουν παρουσιαστεί όσον αφορά τη χρήση τους. Τα προβλήματα αυτά δημιουργούνται εξαιτίας της παρουσίας στο κύτταρο πολλών ενζύμων με διαφορετική εκλεκτικότητα, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενώσεων με χαμηλή εναντιοεκλεκτικότητα. Επίσης, το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται μπορεί να αποτελέσει τον κύριο παράγοντα καταστροφής του κυττάρου εξαιτίας της τοξικότητας που μπορεί να έχει. Με τη χρήση απομονωμένων και καθαρών ενζύμων

αποφεύγονται τα παραπάνω προβλήματα. Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία η χρήση απομονωμένων κετορεδουκτασών για την αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών για την παρασκευή α-αλκυλο-β-υδροξυ κετονών.

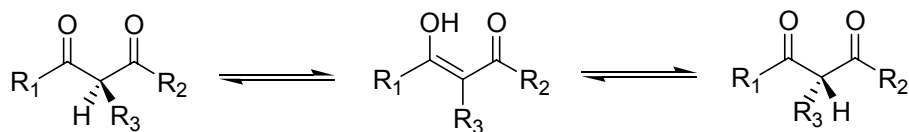
Τα υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενζυμική σύνθεση των β-υδροξυ κετονών είναι οι α-υποκατεστημένες-1,3-δικετόνες (Σχήμα 34).

Σχήμα 34. α-Υποκατεστημένες-1,3-δικετόνες.



Τα υποστρώματα αυτά είναι απλά μόρια με την ιδιαιτερότητα ότι, σε περίπτωση που ένας από τους μεσαίους υποκαταστάτες (R₃, R₄) είναι υδρογόνο, τότε επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ των δυο εναντιομερών. Η ισορροπία αυτή λαμβάνει χώρα μέσω της ενολικής μορφής όπως φαίνεται στο Σχήμα 35.

Σχήμα 35. Ισορροπία μεταξύ των εναντιομερών των α-μονοϋποκατεστημένων-1,3-δικετονών.

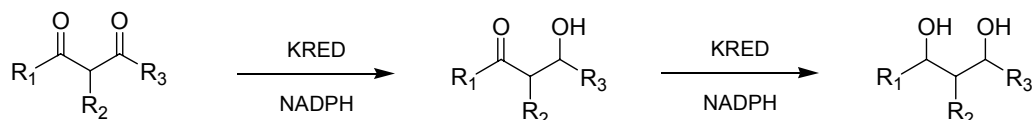


Αυτή η αυθόρμητη ισορροπία καθιστά τέτοιου είδους μόρια πολύ ενδιαφέροντα στην οργανική σύνθεση, καθώς είναι σε θέση να λάβουν μέρος στη διαδικασία του δυναμικού κινητικού διαχωρισμού⁷¹ και έτσι να δώσουν οπτικά καθαρές τις β-υδροξυ κετόνες με αποδόσεις που αγγίζουν το 100%.

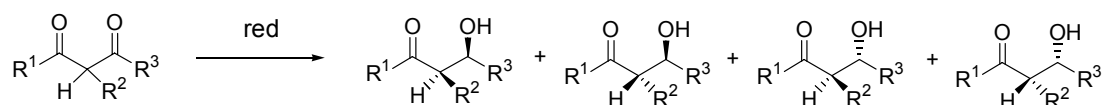
Με αναγωγή αυτών των υποστρωμάτων μπορούν θεωρητικά να προκύψουν α-υποκατεστημένες-β-υδροξυ κετόνες ή και α-υποκατεστημένες-1,3-διόλες (Σχήμα 36).

Με την αναγωγή ενός εκ των δυο καρβονυλίων προκύπτει ένωση με δυο ασύμμετρα κέντρα, δηλαδή συνολικά τέσσερα δυνατά στερεοϊσομερή (Σχήμα 37).

Σχήμα 36. Αναγωγή των α-υποκατεστημένων-1,3-δικετονών.



Σχήμα 37. Αναγωγή των α-υποκατεστημένων-1,3-δικετονών.



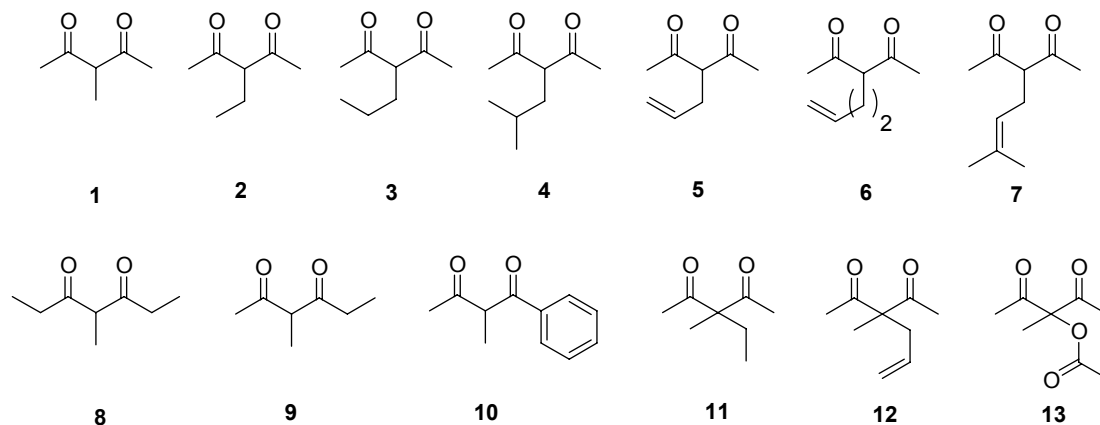
Άρα για το σχηματισμό μίας μόνο υδροξυ κετόνης απαιτείται τοποεκλεκτική αναγωγή ενός εκ των δυο καρβονυλίων, ενώ για το σχηματισμό ενός μόνο στερεοϊσομερούς απαιτείται διαστερεοεκλεκτική και εναντιοεκλεκτική αναγωγή της δικετόνης.

Η σύνθεση λοιπόν ενός ή περισσότερων διαφορετικών διαστερομερών από τις α-υποκατεστημένες-β-υδροξυ κετόνες, με μεγάλη απόδοση και οπτική καθαρότητα, πραγματοποιήθηκε βιοκαταλυτικά με χρήση τριάντα δύο απομονωμένων και NADPH-εξαρτώμενων κετορεδοκτασών (KRED-101-131 και KRED-A1B). Τα υποστρώματα τα οποία επιλέχθηκαν για τη μελέτη αυτή ήταν δέκα μονοϋποκατεστημένες δικετόνες (**1-10**), από τις οποίες οκτώ είναι συμμετρικές (**1-8**) και δύο μη συμμετρικές (**9, 10**), καθώς και τρεις διυποκατεστημένες δικετόνες (**11-13**) (Σχήμα 38).⁷²

Η σύνθεση των δικετονών αυτών πραγματοποιήθηκε με πολύ απλές αντιδράσεις. Τα υποστρώματα **1-7** και **10** παρασκευάστηκαν με αντίδραση αλκυλίωσης της αντίστοιχης δικετόνης με το κατάλληλο αλκυλαλογονίδιο. Η παρασκευή των **8** και **9** έγινε με αλδολική συμπύκνωση της 3-πεντανόνης με την κατάλληλη αλδεΐδη ακολουθούμενη από αντίδραση οξείδωσης. Οι δικετόνες **11** και **12** παρασκευάστηκαν με δυο διαδοχικές αντιδράσεις αλκυλίωσης της 2,4-πεντανοδιόνης με τα κατάλληλα αλκυλαλογονίδια. Τέλος η δικετόνη **13** παρασκευάστηκε με αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης της 3-χλωρο-2,4-

πεντανοδιόνης με οξικό νάτριο ακολουθούμενη από αντίδραση αλκυλίωσης με μεθυλο ιωδίδιο.

Σχήμα 38. α-Υποκατεστημένες-1,3-δικετόνες.



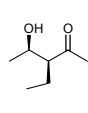
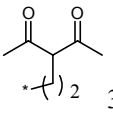
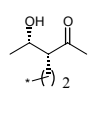
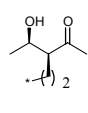
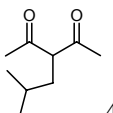
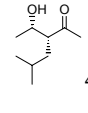
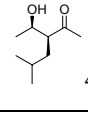
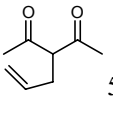
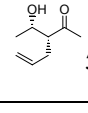
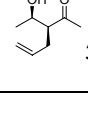
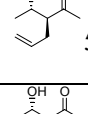
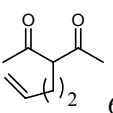
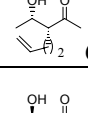
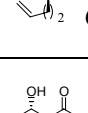
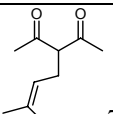
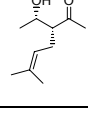

Η μελέτη των υποστρωμάτων αυτών με τις 32 κετορεδουκτάσες έγινε μετά από την παρασκευή των ρακεμικών υδροξυ κετονών με χημική αναγωγή και τον διαχωρισμό των τεσσάρων παραγόμενων στερεοϊσομερών σε αέριο χρωματογράφο με χειρόμορφη τριχοειδή κολώνα. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής παρουσιάζονται παρακάτω.

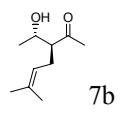
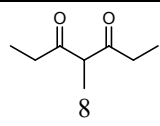
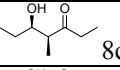
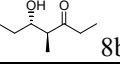
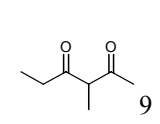
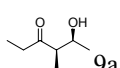
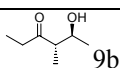
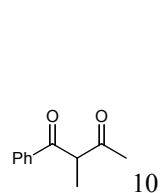
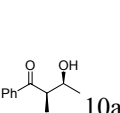
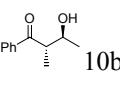
Μονοϋποκατεστημένες δικετόνες

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα (όσον αφορά την στερεοεκλεκτικότητα και το ποσοστό μετατροπής) της ενζυμικής αναγωγής των δέκα α-μονοϋποκατεστημένων-1,3-δικετονών .

Πίνακας 1

Entry	Υπόστρωμα	KRED	Διαστερομερική αναλογία %				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
			A R-Alkyl, S-OH	B S-Alkyl, S-OH	C S-Alkyl, R-OH	D R-Alkyl, R-OH		
1		102 & 106	>99 3R,4S	-	-	-	100% (24h)	
		A1B	74 3R,4S	-	26 3S,4R	-	100% (10min)	
		127	3	94 3S,4S	-	3	90% (24h)	
2		102 & 106	>99 3R,4S	-	-	-	100% & 90% (12h)	

		112	96 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	4	-	-	100% (3h)	 2c
		A1B	-	-	95 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	5	100% (1h)	
		107	-	-	90 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	10	100% (6h)	
		118 & 119	-	>98 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	
3	 3	102 & 106	>99 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	-	-	100% & 93% (12h & 24h)	 3a
		112	97 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	3	-	100% (6h)	
		A1B	-	-	96 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	4	100% (1h)	 3c
		107	8	-	79 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	10	82% (24h)	
		118 & 119	5	95 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	
4	 4	101	96 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	-	4	100% (6h)	 4a
		102 & 106	>99 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	-	-	94% & 76% (24h)	
		123	96 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	1	3	100% (6h)	
		A1B	-	-	90 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	10	100% (24h)	 4c
		107	-	-	72 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	28	40% (24h)	
5	 5	102 & 106	>99 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	-	-	100 (3h & 6h)	 5a
		112	95 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	2	-	3	100% (1h)	
		A1B	-	-	99 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	1	100 (20min)	 5c
		107	2	2	90 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	6	100% (12h)	
		108	1	99 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	 5b
		118 & 119	1 & 1	99 & 97 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	0 & 2	100% (24h & 12h)	
6	 6	102 & 106	>99 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	-	-	100% (12h & 24h)	 6a
		A1B	-	-	92 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	8	100% (2h)	
		107	-	-	84 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	26	100% (6h)	 6c
		118 & 119	7 & 7	93 & 90 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	0 & 3	100% (24h)	
		124	4	96 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	
7	 7	102 & 106	>99 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	-	-	100% (12h)	 7a
		131	93 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	7	-	100% (24h)	
		107	-	-	97 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	3	100% (12h)	 7b

		A1B	-	-	>98 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>	-	100% (0.5h)	
		118 & 119	10 & 8	90 & 92 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	93% (24h)	
		124	5	95 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	7b
8		A1B	-	-	97 4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>	3	100% (40min)	
		118 & 119	4 & <1	96 & >99 4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>	-	-	93% & 100% (24h & 12h)	
9		102 & 106	>99 2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	-	-	-	100% & 85% (24h)	
		103	>99 2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	-	-	-	85% (24h)	
		127	3	96 2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	-	1	92% (24h)	
10		102	91 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	8	1	-	75% (24h)	
		106	95 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	3	2	-	46% (24h)	
		126	94 2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	6	-	-	100% (24h)	
		107	1	96 2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	3	-	75% (24h)	
		127	6	94 2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	

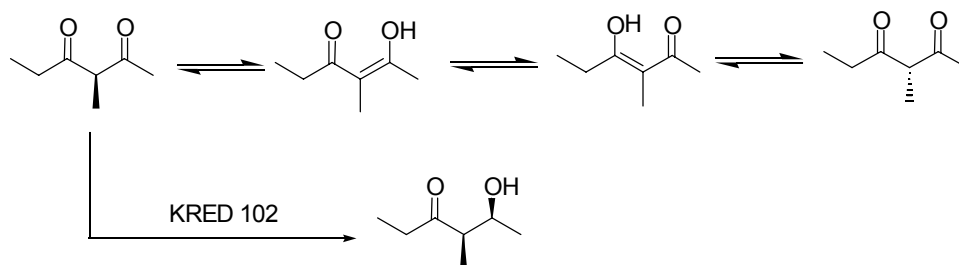
Στον πίνακα αναγράφονται τα υποστρώματα, τα ένζυμα, η διαστεreoμερική αναλογία των στερεοϊσομερών που σχηματίζονται, το ποσοστό μετατροπής %, ο χρόνος αντίδρασης, καθώς και τα προϊόντα των αντιδράσεων με την απόλυτη στερεοδομή, όπως προσδιορίστηκε.

Από τα αποτελέσματα των ενζυμικών αντιδράσεων φαίνεται ξεκάθαρα ότι η αναγωγή των δικετονών γίνεται με μεγάλη τοποεκλεκτικότητα και δραστηριότητα. Δηλαδή μοναδικό προϊόν των αντιδράσεων είναι η α-αλκυλο-β-υδροξυ κετόνη και όχι η διόλη, σε χρόνους που δεν ξεπερνούν τις 24 ώρες. Μόνο σε κάποιες εξαιρέσεις ανιχνεύτηκε ο σχηματισμός και διόλης, όπως θα παρουσιαστεί στη συνέχεια. Από όλες τις δικετόνες που μελετήθηκαν, ανάλογα με το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε, προέκυψαν δύο ή και περισσότερα διαφορετικά στερεοϊσομερή με υψηλή οπτική καθαρότητα (93–99% ee). Για παράδειγμα, στις πέντε από τις δέκα μονοϋποκατεστημένες δικετόνες (2, 3, 5, 6, 7) προέκυψαν τρία από τα τέσσερα πιθανά στερεοϊσομερή με μεγάλη οπτική καθαρότητα (>95% ee). Στις υπόλοιπες πέντε περιπτώσεις (1, 4, 8, 9, 10) σχηματίστηκαν δυο από τα τέσσερα στερεοϊσομερή.

Η μελέτη της αναγωγής των παραπάνω υποστρωμάτων με τα ένζυμα KRED-102 και 106 αποδείχτηκε ιδιαίτερα ενδιαφέρονσα. Τα ένζυμα αυτά παρουσίασαν παρόμοια στερεοεπιλογή (*R*-αλκυλο, *S*-υδροξυ), αφού σε κάθε περίπτωση

σχημάτισαν το ίδιο στερεοϊσομερές με μεγάλη διαστερομερική περίσσεια. Μοναδική εξαίρεση για τα συγκεκριμένα ένζυμα αποτελεί το υπόστρωμα **8**, το οποίο δεν ήταν δυνατόν να αναχθεί σε διάστημα 24 ωρών. Αντιθέτως έδωσαν αντίδραση με το υπόστρωμα **9** παρόλο που η διαφορά του από το **8** είναι μόνο ένας άνθρακας. Η αναγωγή στην περίπτωση της δικετόνης **9** προχώρησε εκλεκτικά μόνο από την πλευρά της μεθυλομάδας αποδεικνύοντας της υψηλή τοποεκλεκτικότητα που εμφανίζουν τα ένζυμα αυτά. Η αναγωγή των δικετονών **9** και **10** πραγματοποιήθηκε μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού (Σχήμα 39).

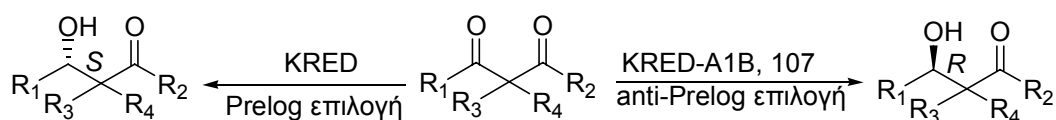
Σχήμα 39. Δυναμικός κινητικός διαχωρισμός της δικετόνης **9**



Παρόμοια στερεοεπιλογή παρουσίασαν και οι κετορεδουκτάσες 118 και 119. Στα παραδείγματα που αναγράφονται στον Πίνακα 1, τα ένζυμα αυτά σχημάτισαν το ίδιο στερεοϊσομερές (*S*-αλκυλο, *S*-υδροξυ) με αρκετά υψηλή οπτική καθαρότητα. Εξαίρεση αποτελούν τα υποστρώματα **1**, **4**, **9** και **10** όπου η εκλεκτικότητά τους ήταν μικρή.

Αξιοσημείωτη είναι η δραστηκότητα των ενζύμων A1B και 107. Η μεγάλη σημασία τους δεν οφείλεται μόνο στην υψηλή εκλεκτικότητα που παρουσίασαν σε πολλές περιπτώσεις (κυρίως η A1B), αλλά στην στερεοδομή της προκύπτουσας αλκοόλης. Σε όλες τις αντιδράσεις η στερεοδομή της σχηματιζόμενης αλκοόλης ήταν *R* εκτός από την δικετόνη **1**. Αυτό αποτελεί εξαίρεση καθώς όλα τα υπόλοιπα ένζυμα σχημάτισαν εκλεκτικά την *S* αλκοόλη (Σχήμα 40).

Σχήμα 40. Στερεοεπιλογή των κετορεδουκτασών

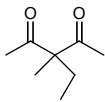



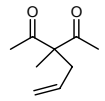




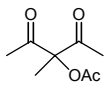



Επομένως οι κετορεδουκτάσες A1B και 107 παρουσιάζουν anti-Prelog επιλογή. Το αποτέλεσμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, δεδομένου ότι αναγωγικά ένζυμα με anti-Prelog συμπεριφορά είναι ιδιαίτερα σπάνια.

Διϋποκατεστημένες δικετόνες

Εκτός από τις μονοϋποκατεστημένες δικετόνες που προαναφέρθηκαν, στα πλαίσια της συγκεκριμένης έρευνας μελετήθηκαν και τρεις διϋποκατεστημένες δικετόνες. Τα καλύτερα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής των τριών α-διϋποκατεστημένων-1,3-δικετονών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2

entry	Υπόστρωμα	KRED	Διαστερομερική αναλογία %				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
			A <i>R</i> -Alkyl, <i>S</i> -OH	B <i>S</i> -Alkyl, <i>S</i> -OH	C <i>S</i> -Alkyl, <i>R</i> -OH	D <i>R</i> -Alkyl, <i>R</i> -OH		
11		112	91 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	9	-	100% (1h)	 11a
		108	1	99 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	70% (24h)	 11b
		118 & 119	-	> 99 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	
		A1B	-	-	11	89 3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>	100% (1.5h)	 11d
		107	-	-	49	51	34% (24h)	
12		101 & 112	98 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	2	-	100% (1h)	 12a
		113 & 115	94 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>	-	6	-	100% (6h)	
		A1B	-	-	10	90 3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>	100% (24h)	 12d
		107	-	-	65 4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>	35	100% (1h)	 12c
		108 & 119	-	> 99 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (24h)	
		118	-	> 99 3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>	-	-	100% (6h)	 12b
13		112 ^a	98	-	2	-	100% (0.2h)	 13a
		113 ^a	97	-	3	-	100% (0.2 h)	

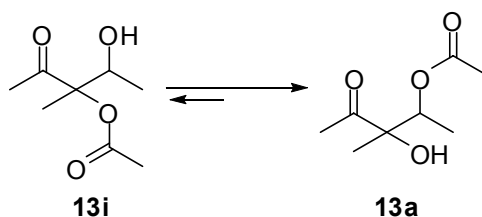
α. Η απόλυτη στερεοδομή του προϊόντος της αντίδρασης δεν προσδιορίστηκε, η αντιστοιχία του κύριου ισομερούς ως A βασίστηκε στο χρόνο εξαγωγής του στον αέριο χρωματογράφο με χειρόμορφη κλώνα.

Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι οι κετορεδουκτάσες ανάγουν αποτελεσματικά και αυτού του τύπου τα υποστρώματα. Και σε αυτές τις περιπτώσεις η αντίδραση σταματάει στον σχηματισμό της υδροξυ κετόνης, ενώ δεν ανιχνεύτηκε ο σχηματισμός διόλης. Επίσης η αναγωγή οδήγησε σε περισσότερα από ένα στερεοϊσομερη. Συγκεκριμένα από το υπόστρωμα **11** προέκυψαν δυο διαστερομερή, από το **12** τρία ενώ από το **13** ένα ισομερές με υψηλή οπτική καθαρότητα.

Στην περίπτωση των υποστρωμάτων αυτών οι κετορεδουκτάσες 102 και 106 δεν έδωσαν καμία αντίδραση, γεγονός που οφείλεται στην διπλή υποκατάσταση των υποστρωμάτων στην 3 θέση. Αντιθέτως, τα ένζυμα 118 και 119 παρέμειναν εξίσου δραστικά μετατρέποντας σε ποσοστό 100% τις δικετόνες **11** και **12**, παρουσιάζοντας την ίδια στερεοεκλεκτικότητα. Έτσι σχηματίστηκαν τα οπτικώς καθαρά προϊόντα **11b** και **12b** με *S*-αλκυλο και *S*-υδροξυλο στερεοαπεικόνιση. Η κετορεδουκτάση A1B διατήρησε την anti-Prelog επιλογή, όσον αφορά τη στερεοχημεία της υδροξυλομάδας, όμως η διαστεροεκλεκτικότητα μεταβλήθηκε. Έτσι, ενώ με τις μονοϋποκατεστημένες δικετόνες το κύριο προϊόν ήταν το *S,R* ισομερές, με τις διϋποκατεστημένες προέκυψε το *R,R*, **11d** και **12d**, με σχετικά υψηλή διαστεροεκλεκτικότητα.

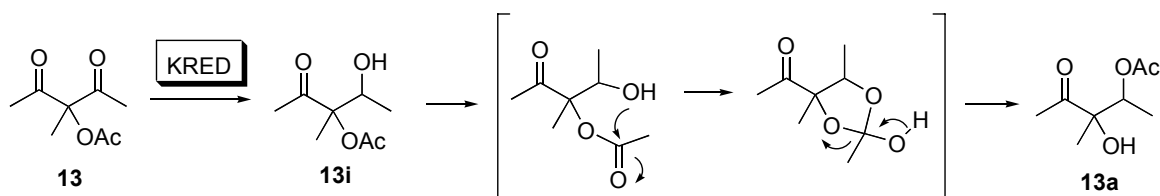
Αντικαθιστώντας έναν από τους μεσαίους α-υποκαταστάτες (R_3 , R_4) των α-διϋποκατεστημένων-1,3-δικετονών με ανθρακική αλυσίδα που περιέχει ετεροάτομο (π.χ. οξυγόνο), μπορεί να προκύψει μια ακόμα μεγάλη τάξη σημαντικών ενδιαμέσων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το υπόστρωμα **13**, στο οποίο μία από τις α-αλκυλομάδες έχει αντικατασταθεί με μία Ο-ακετυλομάδα. Το υπόστρωμα αυτό είναι αρκετά χρήσιμο, καθώς το προϊόν αναγωγής του είναι μία α,β-διυδροξυ κετόνη με ένα τριτοταγές υδροξύλιο. Στερεοεκλεκτική σύνθεση τέτοιων μορίων είναι αρκετά δύσκολη. Όμως στην περίπτωση των κετορεδουκτασών το προϊόν αυτό προκύπτει μέσα σε ένα μόνο στάδιο ξεκινώντας από το υπόστρωμα **13** (Πίνακας 2). Επ' αυτού, η στερεοεκλεκτική αναγωγή της δικετόνης **13** οδηγεί στον σχηματισμό του ενδιαμέσου προϊόντος **13i** (Σχήμα 41). Το προϊόν αυτό βρίσκεται σε ισορροπία με την ένωση **13a**, ισορροπία η οποία είναι μετατοπισμένη προς το θερμοδυναμικά σταθερότερο προϊόν **13a**, όπως παρατηρήθηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$.

Σχήμα 41. Ισορροπία μεταξύ των υδροξυ κετονών **13i** και **13a**.



Έτσι μετά από ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα το μοναδικό προϊόν είναι το **13a**, το οποίο προκύπτει σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα.

Σχήμα 42. Ενζυμική μετατροπή υποστρώματος **13**.



Η πορεία της αντίδρασης αυτής μελετήθηκε με ^1H NMR σε τρία διαφορετικά διαλύματα με διαφορετικές τιμές pH (6.5, 6.9 και 7.5). Σε κάθε περίπτωση η β-ακετυλο προστατευμένη αλκοόλη **13a** ήταν το μοναδικό προϊόν αν και σε μικρούς χρόνους (5 λεπτά) παρατηρήθηκε μίγμα των προϊόντων **13i** και **13a**. Πολλά ένζυμα έδωσαν αντίδραση με το υπόστρωμα **13** όμως μόνο δυο έδωσαν υψηλή στερεοεκλεκτικότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος.

Όλα τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών αναφέρονται σε αντιδράσεις σε μικρή κλίμακα, όπου χρησιμοποιείται 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος (pH~6.9) και υπόστρωμα συγκέντρωσης 50 mM (2-5 mg). Για τη μελέτη της χρησιμότητας των κετορεδουκτασών πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις σε μεγαλύτερη κλίμακα. Συγκεκριμένα 570 mg της δικετόνης **1** ανάχθηκαν με την KRED-102 σχηματίζοντας την υδροξυ κετόνη **1a** με χημική απόδοση 90% (513 mg), με μεγάλη οπτική καθαρότητα (>99% de, >99% ee) και με χημική καθαρότητα >95% χωρίς χρωματογραφικό διαχωρισμό. Επίσης και η δικετόνη **8** (710 mg) ανάχθηκε με τις KRED-119 και A1B παράγοντας την υδροξυ κετόνη **8b** και **8c** με απόδοση 87 (618 mg) και 85% (604 mg), με μεγάλη οπτική καθαρότητα (>99% de, >99% ee για την KRED-119 και 94% de, >99% ee για την KRED-A1B) και με χημική καθαρότητα >95%, αντίστοιχα.

Γενικά οι κετορεδουκτάσες αποδείχτηκαν εξαιρετικοί καταλύτες για την βιομετατροπή των α-αλκυλο-1,3-δικετονών προς α-υποκατεστημένες-β-υδροξυ κετόνες. Όλες οι απαιτήσεις για υψηλή δραστηριότητα, τοποεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα εκπληρώθηκαν στο μέγιστο με τη χρήση των ενζύμων αυτών. Αξιόπιστες αποδείχτηκαν οι κετορεδουκτάσες και στις αντιδράσεις σε μεγαλύτερη κλίμακα παράγοντας τα προϊόντα με υψηλή χημική απόδοση και οπτική καθαρότητα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

1. Γενικές μέθοδοι

Οι α-αλκυλο-1,3-δικετόνες **1-7** και **11, 12** παρασκευάστηκαν από την εμπορικά διαθέσιμη 2,4-πεντανοδιόνη (ακετυλακετόνη) με αντίδραση αλκυλίωσης με το κατάλληλο αλκυλαλογονίδιο. Η α-αλκυλο-1,3-δικετόνη **10** παρασκευάστηκε από την εμπορικά διαθέσιμη 1-φαινυλο-1,3-βουτανοδιόνη με αντίδραση αλκυλίωσης με μεθυλο ιωδίδιο.

Οι δικετόνες **8** και **9** παρασκευάστηκαν με αντίδραση οξείδωσης των αντίστοιχων ρακεμικών κετο αλκοολών. Η δικετόνη **13** παρασκευάστηκε από την εμπορικά διαθέσιμη 3-χλωρο-1,3-πεντανοδιόνη με επεξεργασία με οξικό νάτριο και ακολούθως με αντίδραση αλκυλίωσης με μεθυλο ιωδίδιο.

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο (Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID. Κολώνα: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm χειρόμορφη κολώνα, 20% permethylated cyclodextrin). Η λήψη των φασμάτων ¹H NMR έγινε με φασματόμετρο 300 MHz και 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα CDCl₃ και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλο σιλάνιο (TMS). Οι χημικές αποδόσεις αναφέρονται σε απομονωμένες και φασματοσκοπικά καθαρές ενώσεις.

1.1 Σύνθεση των α-αλκυλο-1,3-δικετονών, 1-7 και 10.⁷³

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου η ακετυλακετόνη (50 mmol) ή η 1-φαινυλο-1,3-βουτανοδιόνη (50 mmol) διαλύθηκαν σε άνυδρη ακετόνη (40 mL) και προξηραμένο ανθρακικό κάλιο (46.5 mmol) προστέθηκε στο διάλυμα. Το μίγμα αναδεύτηκε σε

θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν, σε διάρκεια 2 λεπτών, το κατάλληλο αλκυλοϊωδίδιο [**1**, **2**, **10**] ή αλκυλοβρωμίδιο [**3**, **4**, **5**, **6**, **7**] (61.5 mmol). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρήθηκε είτε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή με αέρια χρωματογραφία. Μετά από συμπύκνωση του μίγματος, προστέθηκε αιθέρας (50 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό, για την απομάκρυνση των αλάτων και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Τα προϊόντα που προέκυψαν ανάχθηκαν ενζυμικά χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τελείως καθαρά προϊόντα απομονώθηκαν μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 8/1). Απόδοση 70 – 91%.

Δικετόνη 1 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 90%.

¹H-NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.64 (q, *J*=7.2Hz, 1H), 2.12 (s, 6H), 2.09 (s, 6H), 1.81 (s, 3H), 1.30 (d, *J*=7.2Hz, 3H).

Δικετόνη 2 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 88%

¹H-NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.51 (t, *J*=7.2Hz, 1H), 2.22 (q, *J*=7.5Hz, 2H), 2.14 (s, 6H), 2.11 (s, 6H), 1.80 – 1.90 (m, 2H), 1.01 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.87 (t, *J*=7.2Hz, 3H).

Δικετόνη 3 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 80%

¹H-NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.62 (t, *J*=7.5Hz, 1H), 2.19 (t, *J*=7.5Hz, 2H), 2.17 (s, 6H), 2.13 (s, 6H), 1.79 – 1.85 (m, 2H), 1.38 – 1.46 (m, 2H), 1.23 – 1.31 (m, 2H), 0.95 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.92 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Δικετόνη 4 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 82%

¹H-NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.69 (t, *J*=7.2 Hz, 1H), 2.15 (s, 6H), 2.11 (s, 6H), 2.09 (d, *J*=7.2 Hz, 2H), 1.69 - 1.77 (m, 2H), 1.56-1.67 (m, 1H), 1.38 - 1.52 (m, 1H), 0.90 (d, *J*=6.6 Hz, 6H), 0.88 (d, *J*=6.6 Hz, 6H).

Δικετόνη 5 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 70%

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 5.74 - 5.89 (m, 2H), 4.93-5.14 (m, 4H), 3.71 (t, *J*=7.2 Hz, 1H), 2.93 - 2.99 (m, 2H), 2.52 - 2.61 (m, 2H), 2.16 (s, 6H), 2.08 (s, 6H).

Δικετόνη 6 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 72%

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 5.58 - 5.89 (m, 2H), 4.91 - 5.09 (m, 4H), 3.63 (t, *J*=7.2 Hz, 1H), 2.23 - 2.33 (m, 4H), 2.15 (s, 6H), 2.11 (s, 6H), 1.87 - 2.04 (m, 4H).

Δικετόνη 7 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 85%

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 4.86 - 4.98 (m, 2H), 3.60 (t, $J=7.2$ Hz, 1H), 2.44 - 2.55 (m, 2H), 2.14 (s, 6H), 2.08 (s, 6H), 1.65-1.70 (m, 2H), 1.64 (s, 6H), 1.60 (s, 6H).

Δικετόνη 10 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 89%

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.40 – 7.98 (m, 10H), 4.46 (q, $J=7.2$ Hz, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.43 (d, $J=6.9$ Hz, 3H).

1.2 Σύνθεση των δικετονών 11 και 12.⁷³

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου η 3-αιθυλο-2,4-πεντανοδιόνη (39 mmol, 5 g) ή η 3-αλλυλο-2,4-πεντανοδιόνη (39 mmol, 5.54 g) διαλύθηκαν σε άνυδρη ακετόνη (40 mL) και προξηραμένο ανθρακικό κάλιο (40 mmol, 5.5 g) προστέθηκε στο διάλυμα. Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκαν, σε διάρκεια 2 λεπτών, μέθυλο ιωδίδιο (45 mmol, 2.72 mL). Το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρήθηκε είτε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή με αέρια χρωματογραφία. Μετά από συμπύκνωση του μίγματος, προστέθηκε αιθέρας (50 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Τα προϊόντα που προέκυψαν ανάχθηκαν ενζυμικά χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τελείως καθαρά προϊόντα απομονώθηκαν μετά από χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/ EtOAc , v/v, 8/1). Απόδοση 90% και για τα δυο προϊόντα.

Δικετόνη 11. Απόδοση: 72% από 2,4-πεντανοδιόνη.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 2.05 (s, 6H), 1.85 (q, $J=7.5$ Hz, 2H), 1.25 (s, 3H), 0.75 (t, $J=7.5$ Hz, 3H).

Δικετόνη 12. Απόδοση: 63% από 2,4-πεντανοδιόνη.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 5.44 – 5.64 (m, 1H), 5.05 – 5.14 (m, 2H), 2.59 (d, $J=7.5$ Hz, 2H), 2.10 (s, 6H), 1.31 (s, 3H).

1.3 Σύνθεση των δικετονών 8 και 9 με οξείδωση των αντίστοιγων υδροξυ κετονών με PCC.⁷⁴

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου PCC (22.5 mmol, 4.9 g) προστέθηκαν σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (20 mL) και το μίγμα ψύχθηκε στους 0 °C. Ακολούθησε προσθήκη, για 5 λεπτά, της αντίστοιχης υδροξυ κετόνης (15 mmol, 2.16 g της κετο αλκοόλης 8 ή

1.95 g της κετο αλκοόλης **9**) διαλυμένης σε ξηρό CH₂Cl₂ (5 mL) και το μίγμα αναδεύτηκε στους 0 °C, για 2 ώρες, έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως διαπιστώθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Στο διάλυμα προστέθηκε αιθέρας (50 mL) και το προϊόν απομονώθηκε με διπλή διήθηση, πάνω από στερεό Florisil. Τα στερεά ξεπλύθηκαν με Et₂O και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν που προέκυψε ανάχθηκε ενζυμικά χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Τελείως καθαρή δικετόνη προέκυψε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 70% και για τις δυο περιπτώσεις.

Δικετόνη 8 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 70%

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 6.66 (q, *J*=6.9 Hz, 1H), 2.33 - 2.55 (m, 8H), 1.80 (s, 3H), 1.28 (d, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.11 (t, *J*=7.5 Hz, 3H), 1.02 (t, *J*=7.2 Hz, 3H).

Δικετόνη 9 (σε ισορροπία με την ενολική της μορφή). Απόδοση: 70%

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 3.65 (q, *J*=6.9 Hz, 1H), 2.50 (q, *J*=7.2 Hz, 1H), 2.48 (q, *J*=7.2 Hz, 1H), 2.42 (q, *J*=7.5 Hz, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.08 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.30 (d, *J*=6.9 Hz, 3H), 1.11 (t, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.04 (t, *J*=7.2 Hz, 3H).

1.4 Σύνθεση της δικετόνης 13.⁷⁵

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου ξηρό οξικό νάτριο (11 mmol, 902 mg) και 3-χλωρο-2,4-πεντανοδιόνη (11 mmol, 1.25 mL) διαλύθηκαν σε ξηρό DMF (20 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε στους 50 °C για 20 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, 50 mL νερού προστέθηκαν και το μίγμα εκχυλίστηκε με CHCl₃ (3 x 60 mL). Η οργανική φάση ξεπλύθηκε με νερό (3 x 60 mL), ξηράθηκε με MgSO₄ και απομακρύνθηκε υπό κενό. Καθαρό προϊόν προέκυψε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 60%.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση αλκυλίωσης, με μέθυλο ιωδίδιο, όπως και για τις δικετόνες **11** και **12**. Απόδοση 90%. Συνολική απόδοση για τα δυο βήματα: 54%. Το προϊόν που προέκυψε ανάχθηκε ενζυμικά χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Δικετόνη 13. Απόδοση: 54% (από 3-χλωρο-2,4-πεντανοδιόνη)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 2.25 (s, 6H), 2.19 (s, 3H), 1.73 (s, 3H).

2. Σύνθεση των ρακεμικών υδροξυ κετονών.⁷⁶

Οι ρακεμικές υδροξυ κετόνες **1-7** και **11-13** παρασκευάστηκαν με αντίδραση αναγωγής με NaBH₄. Οι αντίστοιχες υδροξυ κετόνες **8** και **9** παρασκευάστηκαν από την 3-πεντανόνη με αλδολική συμπύκνωση με την αντίστοιχη αλδεΐδη. Η υδροξυ κετόνη **10** παρασκευάστηκε από την 1-φαινυλο-1-προπανόνη με αλδολική συμπύκνωση με ακεταλδεΐδη.

2.1 Σύνθεση των ρακεμικών αλκοολών 1-7 και 11-13.

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου NaBH₄ (0.098 mmol) προστέθηκε σε άνυδρη αιθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην η δικετόνη (0.3 mmol) διαλυμένη σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2-4 ώρες στους 0 °C και η αντίδραση ελέγχθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε αργά στους 0 °C κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x20 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 6/1). Απόδοση 70 – 80%.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την αναγωγή της δικετόνης **13**. Μετά τον καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 9/1), απομονώθηκαν 30% ρακεμικής αλκοόλης.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 1: ¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 4.08 – 4.17 (m, 1H), 3.85 – 3.96 (m, 1H), 2.49 – 2.66 (m, 2H), 2.19 (s, 6H), 1.21 (d, *J*=6.3Hz, 3H), 1.16 (d, *J*=7.2Hz, 3H), 1.15 (d, *J*=6.3Hz, 3H), 1.12 (d, *J*=7.2Hz, 3H).

Πρόγραμμα για ανάλυση στο GC με χειρόμορφη κολώνα: 60 °C, 2 °C/min έως 90 °C

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 2: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.98 – 4.02 (m, 1H), 3.92 – 3.98 (m, 1H), 2.38 – 2.53 (m, 2H), 2.20 (s, 6H), 1.58 – 1.75 (m, 4H), 1.21 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.17 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 0.92 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.90 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Μετά από προσθήκη 0.5 mL νερού και εκχύλιση από 1 mL της αντίδρασης με EtOAc (1 mL), η οργανική φάση ψύχτηκε στους 0 °C και προστέθηκαν 60 μL οξικού ανυδρίτη, 10 mg K₂CO₃ και καταλυτική ποσότητα (~1 mg) DMAP. Μετά από

ανάδευση του μίγματος για 5 λεπτά στη θερμοκρασία αυτή, έγινε ανάλυση στο GC με χειρόμορφη κολώνα. Πρόγραμμα: 80 °C ισόθερμα.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 3: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 3.95 – 4.01 (m, 1H), 3.87 – 3.94 (m, 1H), 2.50 – 2.59 (m, 2H), 2.19 (s, 6H), 1.46 – 1.69 (m, 4H), 1.23 – 1.37 (m, 4H), 1.21 (d, $J=6\text{Hz}$, 2H), 1.17 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 2H), 0.92 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.91 (t, $J=7\text{Hz}$, 3H).

Αυτή η υδροξυ κετόνη εστεροποιήθηκε χρησιμοποιώντας τριφθοροξικό ανυδρίτη. Η αντίδραση εστεροποίησης έγινε όπως και για την υδροξυ κετόνη 2, με τη διαφορά ότι η αντίδραση έγινε σε CH_2Cl_2 και χρησιμοποιήθηκε $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ αντί οξικού ανυδρίτη. Πρόγραμμα: 65 °C ισόθερμα.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 4: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 3.94 – 4.01 (m, 1H), 3.81 – 3.90 (m, 1H), 2.56 – 2.70 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 1.31 - 1.68 (m, 6H), 1.23 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.18 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 0.92 (d, $J=6.3$ Hz, 12H).

Εστεροποίηση όπως περιγράφεται για την υδροξυ κετόνη 3. Πρόγραμμα: 70 °C ισόθερμα.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 5: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 5.63 – 5.84 (m, 2H), 5.00 – 5.11 (m, 4H), 3.99 – 4.07 (m, 1H), 3.89 – 3.98 (m, 1H), 2.58 – 2.69 (m, 2H), 2.32 – 2.42 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.22 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.17 (d, $J=6.3$ Hz, 3H).

Εστεροποίηση όπως περιγράφεται για την υδροξυ κετόνη 3. Πρόγραμμα: 65 °C ισόθερμα.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 6: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5,71 - 5,80 (m, 2H), 4.96 - 5.04 (m, 4H), 3.94 -4.01 (m, 1H), 3.87-3.94 (m, 1H), 2.55 - 2.63 (m, 2H), 2.20 (s, 6H), 1.94 - 2.09 (m, 4H), 1.58 - 1.84 (m, 4H), 1.21 (d, $J=6.5$ Hz, 3H), 1.17 (d, $J=6.0$ Hz, 3H).

Εστεροποίηση όπως περιγράφεται για την υδροξυ κετόνη 3. Πρόγραμμα: 65 °C ισόθερμα.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 7: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 5.00 – 5.12 (m, 2H), 3.98 – 4.07 (m, 1H), 3.86 - 3.97 (m, 1H), 2.51 – 2.60 (m, 2H), 2.26 – 2.39 (m, 4H), 2.17 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.68 (s, 6H), 1.61 (s, 6H), 1.22 (d, $J=6.3$ Hz, 3H), 1.18 (d, $J=6.3$ Hz, 3H).

Εστεροποίηση όπως περιγράφεται για την υδροξυ κετόνη 2. Πρόγραμμα: 95 °C ισόθερμα.

2.2 Σύνθεση των ρακεμικών υδροξυ κετονών 8, 9 και 10 με αλδολική συμπύκνωση.⁶⁶

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου διυσοπροπυλαμίνη (30 mmoles, 4.2 mL) διαλύθηκαν σε ξηρό THF (15mL) και, στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην BuLi (1.6 M σε εξάνιο, 20 mmol, 12.5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά και έπειτα ψύχθηκε στους -78 °C. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος της 3-πεντανόνης (20 mmol, 2.1 mL) ή της 1-φαινυλο-1-προπανόνης (20 mmol, 2.66 mL) σε ξηρό THF (10 mL) και ανάδευση για άλλα 40 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκε, για 10 λεπτά, διάλυμα ξηρού THF (10 mL) που περιείχε την κατάλληλη αλδεΐδη (20 mmol, ακεταλδεΐδη 1.12 mL ή προπαναλδεΐδη 1.44 mL) και το μίγμα αναδεύτηκε έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως φάνηκε από χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη αιθέρα (60 mL) και εκχύλιση του διαλύματος με κορεσμένο NH₄Cl (100 mL), κορεσμένο NaCl (100 mL) και νερό (100 mL). Ακολούθησε ξήρανση με MgSO₄ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό κενό. Καθαρισμός του προϊόντος έγινε με silica gel χρωματογραφία (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 70%.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 8: ¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.77 – 3.85 (m, 1H), 3.56 – 3.65 (m, 1H), 2.37 -2.69 (m, 6H), 1.29 – 1.61 (m, 4H), 1.12 (d, *J*=7.2Hz, 3H), 1.11 (d, *J*=7.2Hz, 3H), 1.05 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 1.04 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 0.97 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 0.94 (t, *J*=7.2Hz, 3H).

Πρόγραμμα: 65 °C, 1 °C/min έως 100 °C

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 9: ¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 4.05 – 4.13 (m, 1H), 3.85 – 3.95 (m, 1H), 2.36 -2.64 (m, 6H), 1.19 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 1.14 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 1.13 (d, *J*=7.5 Hz, 3H), 1.09 (d, *J*=7.5 Hz, 3H), 1.05 (t, *J*=7.2 Hz, 6H).

Εστεροποίηση όπως περιγράφεται για την υδροξυ κετόνη 2. Πρόγραμμα: 85 °C ισόθερμα.

Ρακεμική υδροξυ κετόνη 10: ¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 7.43 – 7.98 (m, 10H), 4.21 – 4.29 (m, 1H), 4.06 – 4.15 (m, 1H), 3.38 – 3.53 (m, 2H), 1.27 (d, *J*=7.2Hz, 6H), 1.23 (d, *J*=6.3Hz, 6H).

Εστεροποίηση όπως περιγράφεται για την υδροξυ κετόνη 3. Πρόγραμμα: 90 °C ισόθερμα.

3. Ενζυμικές αναγωγές.

Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν 32 διαφορετικές κετορεδουκτάσες (KRED-101-131 και KRED-A1B) της εταιρίας Biocatalytics (Inc. Pasadena, CA USA). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν συνένζυμο NADPH και ανακυκλωτικό ένζυμο αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH), εμπορικά διαθέσιμα από την εταιρία Biocatalytics.

3.1 Ενζυμικές αντιδράσεις σε μικρή κλίμακα.

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH=6,9) προστίθενται το υπόστρωμα (25 mM), η κετορεδουκτάση (2 mg/mL), NADPH (2,5 mM, 2 mg), γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH, 2 mg/mL). Το διάλυμα αναδεύεται στους 37 °C και ο έλεγχος της αντίδρασης πραγματοποιείται κάθε 1 ώρα με λήψη δείγματος από την αντίδραση, το οποίο αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση με EtOAc. Όλες οι ενζυμικές αντιδράσεις έγιναν ακολουθώντας αυτό το πρωτόκολλο, εκτός για τις δικετόνες **1** και **9** που έγιναν σε pH 6.5 και για τη δικετόνη **13** που έγινε σε pH 7.5.

Υδροξυ κετόνη 1a: ^{17}H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 4.10 – 4.17 (m, 1H), 2.47 – 2.58 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.16 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.15 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ κετόνη 1b: ^{17}H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.86 – 3.95 (m, 1H), 2.50 – 2.60 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.21 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.12 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ κετόνη 2a: ^1H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.96 – 4.04 (m, 1H), 2.48 – 2.54 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 1.63 – 1.78 (m, 2H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.92 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ κετόνη 2b: ^1H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.91 – 3.99 (m, 1H), 2.43 – 2.50 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.58 – 1.69 (m, 2H), 1.21 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.90 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ κετόνη 2c: ^1H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.96 – 4.04 (m, 1H), 2.48 – 2.54 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.63 – 1.76 (m, 2H), 1.17 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.92 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ κετόνη 3a: ^1H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.96 – 4.02 (m, 1H), 2.55 – 2.60 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.52 – 1.71 (m, 2H), 1.23 – 1.38 (m, 2H), 1.18 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H), 0.92 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 3b: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 3.89 – 3.95 (m, 1H), 2.51 – 2.57 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.48 – 1.64 (m, 2H), 1.25 – 1.34 (m, 2H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.92 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 4a: ^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 3.93 – 4.01 (m, 1H), 2.62 – 2.70 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.33 – 1.68 (m, 3H), 1.17 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.91 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 6H).

Υδροξύ κετόνη 5a: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.74 – 5.82 (m, 1H), 5.01 – 5.11 (m, 2H), 4.01 – 4.07 (m, 1H), 2.64 – 2.68 (m, 1H), 2.39 – 2.42 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 5c: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.74 – 5.82 (m, 1H), 5.02 – 5.12 (m, 2H), 4.02 – 4.07 (m, 1H), 2.64 – 2.68 (m, 1H), 2.39 – 2.43 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 5b: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.67 – 5.76 (m, 1H), 5.03 – 5.11 (m, 2H), 3.92 – 3.97 (m, 1H), 2.60 – 2.65 (m, 1H), 2.34 – 2.37 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.23 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 6a: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.72 – 5.81 (m, 1H), 4.98 – 5.05 (m, 2H), 3.97 – 4.04 (m, 1H), 2.59 – 2.64 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.96 – 2.04 (m, 1H), 2.06 – 2.14 (m, 1H), 1.76 – 1.85 (m, 1H), 1.64 – 1.72 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 6b: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.72 – 5.81 (m, 1H), 4.98 – 5.05 (m, 2H), 3.90 – 3.95 (m, 1H), 2.55 – 2.60 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.02 – 2.07 (m, 2H), 1.70 – 1.78 (m, 1H), 1.60 – 1.68 (m, 1H), 1.22 (d, $J=6\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 7a: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.09 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 4.00 – 4.05 (m, 1H), 2.57 – 2.61 (m, 1H), 2.29 – 2.41 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 7c: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.09 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 4.00 – 4.05 (m, 1H), 2.56 – 2.60 (m, 1H), 2.29 – 2.41 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 7b: ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 5.04 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 3.90 – 3.95 (m, 1H), 2.53 – 2.58 (m, 1H), 2.24 – 2.36 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.69 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 8c:^{80, 81, 82} ^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 3.79 – 3.84 (m, 1H), 2.44 – 2.63 (m, 3H), 1.47 – 1.55 (m, 1H), 1.33 – 1.42 (m, 1H), 1.12 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 1.05 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H), 0.95 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H).

Υδροξύ κετόνη 8b:^{80, 81, 82} ¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.58 – 3.65 (m, 1H), 2.38 – 2.70 (m, 3H), 1.29 – 1.63 (m, 2H), 1.12 (d, *J*=7.2Hz, 3H), 1.03 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 0.97 (t, *J*=7.2Hz, 3H).

Υδροξύ κετόνη 9a:^{99, 101} ¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 4.06 – 4.14 (m, 1H), 2.40 – 2.62 (m, 3H), 1.15 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 1.14 (d, *J*=7.5 Hz, 3H), 1.06 (t, *J*=7.2 Hz, 3H).

Υδροξύ κετόνη 9b: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.88 – 3.95 (m, 1H), 2.41 – 2.62 (m, 3H), 1.20 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.11 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 1.06 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Υδροξύ κετόνη 10b:⁵⁸ ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.44 – 7.97 (m, 5H), 4.08 – 4.14 (m, 1H), 3.45 – 3.51 (m, 1H), 1.28 (d, *J*=6Hz, 3H), 1.23 (d, *J*=7Hz, 3H).

Υδροξύ κετόνη 10a:⁵⁸ ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.46 – 7.98 (m, 5H), 4.22 – 4.27 (m, 1H), 3.39 – 3.45 (m, 1H), 1.27 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 1.23 (d, *J*=6.5Hz, 3H).

Υδροξύ κετόνη 11a: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.92 – 3.98 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.80 – 1.88 (m, 1H), 1.52 – 1.60 (m, 1H), 1.12 (d, *J*=6Hz, 3H), 1.12 (s, 3H), 0.85 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 214.56, 71.54, 55.85, 27.69, 27.23, 18.35, 16.86, 8.94

Υδροξύ κετόνη 11b: ¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 4.02 – 4.09 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 1.50 – 1.71 (m, 2H), 1.13 (d, *J*=6.6Hz, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.80 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 215.61, 70.41, 55.74, 29.26, 26.75, 17.43, 15.82, 8.57

Υδροξύ κετόνη 12a: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 5.73 – 5.81 (m, 1H), 5.05 – 5.11 (m, 2H), 3.95 – 4.00 (m, 1H), 2.48 – 2.54 (m, 1H), 2.26 – 2.31 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.14 (d, *J*=6Hz, 3H), 1.14 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 213.77, 134.23, 118.04, 71.66, 55.63, 39.24, 27.41, 18.25, 17.66

Υδροξύ κετόνη 12b: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 5.60 – 5.69 (m, 1H), 5.06 – 5.10 (m, 2H), 3.95 – 4.00 (m, 1H), 2.35 – 2.39 (m, 1H), 2.25 – 2.29 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.14 (d, *J*=6.5Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 215.01, 132.99, 118.46, 71.06, 55.529, 40.81, 27.45, 17.64, 16.51

Υδροξυ κετόνη 12d: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.60 – 5.68 (m, 1H), 5.06 – 5.11 (m, 2H), 3.95 – 4.00 (m, 1H), 2.34 – 2.39 (m, 1H), 2.25 – 2.29 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.15 (s, 3H), 1.14 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ κετόνη 13a: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 5.17 (q, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 1.27 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

3.2 Ενζυμικές αντιδράσεις σε μεγάλη κλίμακα

Σε 100 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH 6.9 ή σε pH 6.5) προστίθενται 50 mM υποστρώματος, γλυκόζη (120 mM, 2.16 g), NADPH (0.5 mM, 42 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (50 mg) και η κατάλληλη κετορεδοουκτάση (50-150 mg). Το μίγμα αναδεύεται στους 37 °C μέχρι το πέρας της αντίδρασης, όπως φαίνεται από τον αέριο χρωματογράφο. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμίζεται σε τιμή 6,9 ή 6,5 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x100 mL). Μερικές φορές απαιτείται φυγοκέντριση (6000 rpm, 10 λεπτά) για τον καλό διαχωρισμό υδατικής οργανικής φάσης, εξαιτίας δημιουργίας γαλακτώματος. Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηραίνεται με MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο αυτό η δικετόνη **1** (570 mg, 50 mM) ανάχθηκε με την KRED-102 (150 mg) σε pH 6.5. Απόδοση 90%, 513 mg. Η δικετόνη **8** (710 mg, 50 mM) ανάχθηκε με την KRED-119 (100 mg) σε pH 6.9. Απόδοση 87%, 618 mg. Η ίδια ποσότητα της δικετόνης **8** ανάχθηκε επίσης με την KRED-A1B (50 mg) σε pH 6.9. Απόδοση 85%, 604 mg.

3.3 Ενζυμική αναγωγή του υποστρώματος 13 με την KRED-112

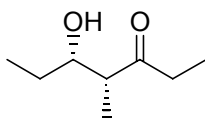
Σε 8 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH 7.5) προστέθηκαν 2 mg της KRED-112, 2 mg αφυδρογονάση της γλυκόζης, 2 mg NADPH, 200 mg γλυκόζη (140 mM) και τέλος 200 mg υποστρώματος (145 mM), τα οποία προστέθηκαν περιοδικά (10 mg κάθε 5 λεπτά). Το μίγμα αναδεύτηκε στους 25 °C για 2 ώρες μέχρι το πέρας της αντίδρασης, όπως φάνηκε από τον αέριο χρωματογράφο. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x10 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη **13a**. Απόδοση 90%, 180 mg.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΦΕΡΟΜΟΝΗΣ (+)-SITOPHILURE⁷⁷

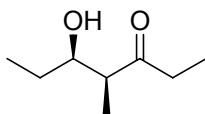
Το 1984, ο Burkholder και οι συνεργάτες του απομόνωσαν την φερομόνη συσσωμάτωσης που παράγεται από τα αρσενικά είδη των επιβλαβών εντόμων rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) και maize weevil (*Sitophilus zeamais* M.), η οποία ονομάστηκε Sitophilure.⁷⁸ Από το εκχύλισμα χιλιάδων εντόμων απομονώθηκε η βιολογικά-δραστική αυτή ένωση και αρχικά ταυτοποιήθηκε σαν (4*R*,5*S*)-4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-επτανόνη. (Σχήμα 43).

Σχήμα 43. Αρχικός προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής της φερομόνης Sitophilure.



Ύστερα από τη σύνθεση και των τεσσάρων στερεοϊσομερών της ένωσης αυτής αποδείχτηκε ότι η ενεργή μορφή της ένωσης αυτής είναι το (4*S*,5*R*)-ισομερές (Σχήμα 44).⁷⁹ Από τότε έχουν δημοσιευτεί αρκετές συνθέσεις της ρακεμικής,⁸⁰ άλλων ισομερών⁸¹ και της φυσικής φερομόνης.⁸²

Σχήμα 44. Φερομόνη Sitophilure.

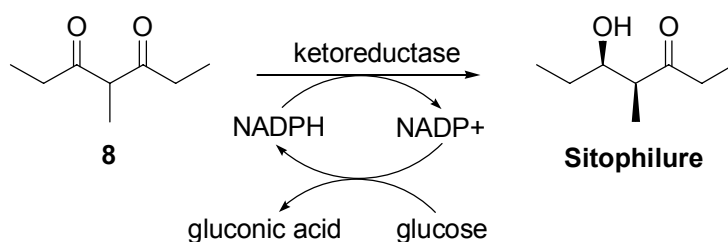


Μεγάλες οικονομικές καταστροφές των αποθηκευμένων δημητριακών (καλαμπόκι, ρύζι κ.α.) οφείλονται κυρίως σε τρία είδη εντόμων του γένους *Sitophilus* (*Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, αντίστοιχα) σε όλο τον κόσμο. Η έγκαιρη ανακάλυψη των παρασιτισμών είναι πολύ σημαντική για την αποφυγή περαιτέρω ζημιών και συνεπώς μεγάλων οικονομικών επιπτώσεων. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η εφεύρεση παγίδων οι οποίες θα συμβάλουν σημαντικά στην μείωση του παρασιτισμού. Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι παγίδες που περιέχουν

πολύ μικρές ποσότητες της συνθετικής φερομόνης (+)-Sitophilure είναι αρκετά αποτελεσματικές για τον έγκαιρο έλεγχο του παρασιτισμού και των τριών ειδών εντόμων.⁸³ Όμως εξαιτίας της πολύ μικρής ποσότητας που είναι δυνατό να απομονωθεί από χιλιάδες και πλέον έντομα, είναι αναγκαία η εργαστηριακή σύνθεση της φερομόνης αυτής. Παρόλα αυτά μέχρι στιγμής δεν υπάρχει μια πρακτική και οικονομική μέθοδος για τη σύνθεση της ελκυστικής, για τα έντομα αυτά, φερομόνης.⁷⁴⁻⁷⁷ Για αυτό το λόγο, όλες οι εμπορικά διαθέσιμες παγίδες είναι εξαρτώμενες από τροφή.

Επειδή η φερομόνη Sitophilure είναι μια α-μεθυλο-β-υδροξυ κετόνη θα μπορούσε εύκολα να προκύψει με στερεοεκλεκτική αναγωγή της αντίστοιχης δικετόνης **8** (Σχήμα 45). Η δικετόνη αυτή είναι επίσης μια φυσική φερομόνη συσσωμάτωσης του εντόμου *Sitona lineatous*.⁸⁴

Σχήμα 45. Στερεοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή της 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνης **8**.

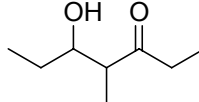


Όπως παρουσιάστηκε εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο, η ενζυμική αναγωγή με απομονωμένες κετορεδοουκτάσες αποτελεί μια από τις αποτελεσματικότερες μεθόδους για την στερεοεκλεκτική αναγωγή 1,3-δικετονών. Επομένως επιλέχθηκε αυτή η μεθοδολογία για τη σύνθεση της φερομόνης Sitophilure. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικές αντιδράσεις με 64 απομονωμένες και εμπορικά διαθέσιμες κετορεδοουκτάσες (BioCatalytics, Inc. Pasadena, CA, USA) για τη μελέτη της αναγωγής της 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνης.

Τα καλύτερα αποτελέσματα αναγράφονται στον Πίνακα 3 που ακολουθεί. Από τον πίνακα αυτό φαίνεται ότι αρκετά ένζυμα επέδειξαν δραστικότητα στην αντίδραση αναγωγής και σε όλες τις περιπτώσεις μοναδικό προϊόν ήταν η υδροξυ κετόνη **8(A-D)** και όχι η διόλη. Όπως φαίνεται με τον τρόπο αυτό μπορούν να προκύψουν δυο από τα τέσσερα στερεϊσομερή (**8B** και **8D**) σε οπτικώς καθαρή μορφή, χρησιμοποιώντας πέντε διαφορετικά ένζυμα, σε πολύ μικρούς χρόνους αντίδρασης, χωρίς το σχηματισμό διόλης. Συγκεκριμένα η KRED-119 και 128, σε

μικρή κλίμακα, ολοκλήρωσαν την αντίδραση σε 12 και 3 ώρες, αντίστοιχα, σχηματίζοντας το ισομερές **8D**, ενώ οι KRED-A1B, KRED-A1C και KRED-A1D ολοκλήρωσαν την αντίδραση σε μόλις 40 και 60 λεπτά, αντίστοιχα, σχηματίζοντας το **8B** ισομερές. Μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία βιοκαταλύτης ή χημικός καταλύτης που να παράγει τη συγκεκριμένη υδροξυ κετόνη **8B** σε οπτικώς καθαρή μορφή, από τη συγκεκριμένη δικετόνη **8**, σε τόσο μικρό χρόνο αντίδρασης.

Πίνακας 3

Υπόστρωμα (8)	KRED	Διαστερομερική αναλογία % ^[α]				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν (8A-D)
		A	B	C	D		
	101	3	-	6	91	100% (6h)	
	114	8	4	-	88	90% (24h)	
	115	4	-	4	92	>99% (6h)	
	118	4	-	-	96	93% (24h)	
	119	<1	-	-	>99	100% (12h)	
	123	20	-	-	80	100% (6h)	
	128	3	-	1	96	100% (3h)	
	130	6	-	-	94	28% (24h)	
	A1A	<2	-	-	>98	20% (24h)	
	A1B	-	97	3	-	100% (40min)	
	A1C	-	98	2	-	100% (1h)	
	A1D	-	97	3	-	100% (1h)	

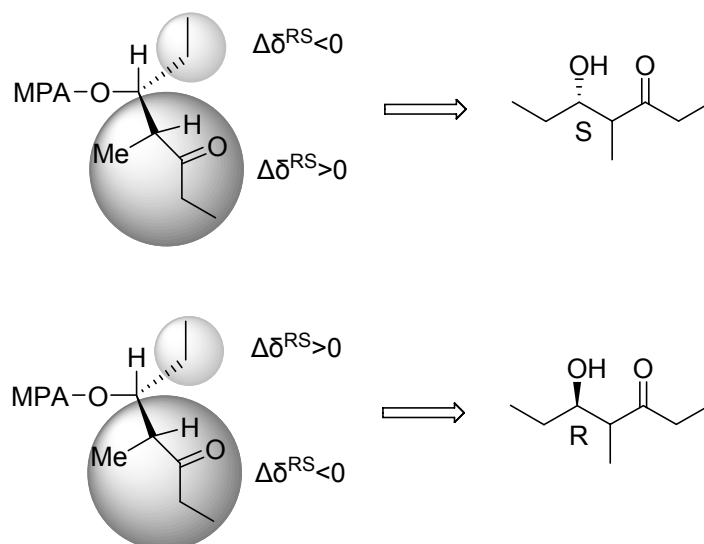
[α] Τα ισομερή A/B/C/D κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το χρόνο εξαγωγής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εξέρχεται πρώτο.

Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των ισομερών **8B** και **8D**, πραγματοποιήθηκαν ενζυμικές αντιδράσεις σε μεγάλη κλίμακα και απομονώσαμε την κετο αλκοόλη **8(B, D)** με υψηλή απόδοση και οπτική καθαρότητα (87% απόδοση, 99% de, >99% ee με την KRED-119 και 85% απόδοση, 96% de, >99% ee με την KRED-A1C). Τα φάσματα ¹H-NMR⁸⁵ και ¹³C-NMR⁸⁶ των απομονωμένων προϊόντων αποδεικνύουν ότι η σχετική στερεοχημεία του προϊόντος **8D** (Πίνακας 3) είναι *anti* και του προϊόντος **8B** είναι *syn*. Η απόλυτη στερεοχημεία των υδροξυ κετονών προσδιορίστηκε με την εύρεση της στερεοχημείας της υδροξυλομάδας, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της χειρόμορφης παραγοντοποίησης (chiral derivatizing agents),⁸⁷ η οποία και θα περιγραφεί εκτενώς σε επόμενο κεφάλαιο. Έτσι, με τη χρήση του α-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (MPA), τα στερεοϊσομερή **8B** και **8D** μετατράπηκαν στους αντίστοιχους MPA-εστέρες (Σχήμα 46) και προσδιορίστηκε ότι το ισομερές **8B** έχει *R* στερεοδομή στην υδροξυλομάδα, ενώ το ισομερές **8D** έχει *S*. Άρα η απόλυτη στερεοχημεία των ισομερών **8B** και **8D** βρέθηκε να είναι (4*S*,5*R*) και

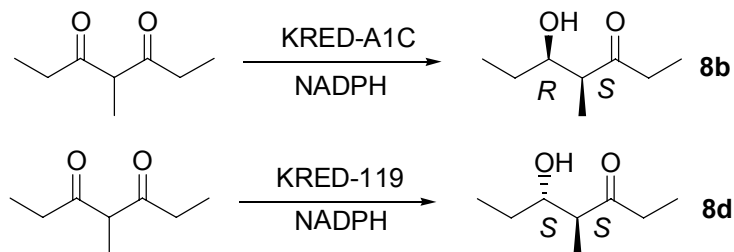
(4*S*,5*S*), αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψη ότι η σχετική στερεοχημεία του προϊόντος **8D** είναι *anti* και του προϊόντος **8B** είναι *syn* (Σχήμα 47). Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι οι κετορεδουκτάσες KRED-A1B, KRED-A1C και KRED-A1D επιδεικνύουν ασυνήθιστη anti-Prelog εκλεκτικότητα σχηματίζοντας την υδροξυκετόνη **8B** με *R*-στερεοχημεία στην υδροξυλομάδα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 47, το προϊόν της αναγωγής της δικετόνης **8** με την KRED-A1C έχει την ίδια στερεοδομή με αυτήν της φυσικής φερομόνης (+)-Sitophilure. Επομένως η φυσική φερομόνη μπορεί να παραχθεί πολύ εύκολα από την αντίστοιχη δικετόνη με τη χρήση των απομονωμένων κετορεδουκτασών.

Σχήμα 46. Προσδιορισμός της στερεοχημείας της υδροξυλομάδας της 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-επτανόνης.



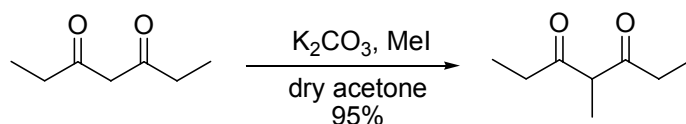
Σχήμα 47. Η απόλυτη στερεοδομή των ισομερών B και D της υδροξυκετόνης **8**.



Σε μεγάλη κλίμακα η αντίδραση της 4-μεθυλο-3,5-επτανодиόνης **8** με την KRED-A1C ολοκληρώθηκε σε 24 ώρες παράγοντας τη φερομόνη με χημική απόδοση 85%, de 96%, ee >99% και χημική καθαρότητα >99%, χρησιμοποιώντας καταλυτική

ποσότητα του συνενζύμου NADPH (0.81% σε σχέση με το υπόστρωμα), το οποίο ανακυκλώθηκε με τη χρήση της αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH). Η αντίστοιχη 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη δεν είναι εμπορικά διαθέσιμη, όμως μπορεί πολύ εύκολα να παρασκευαστεί από την εμπορικά διαθέσιμη 3,5-επτανοδιόνη με αντίδραση αλκυλίωσης (Σχήμα 48).

Σχήμα 48. Παρασκευή της πρόδρομης ένωσης της φερομόνης Sitophilure.



Συνοψίζοντας, η κετορεδουκτάση KRED-A1C χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή της οπτικά καθαρής φερομόνης συσσωμάτωσης των εντόμων rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.) και maize weevil (*Sitophilus zeamais* M.). Απ'όσο γνωρίζουμε αυτή είναι η πιο εύκολη και πρακτική χημειοενζυμική σύνθεση της φερομόνης (+)-Sitophilure σε μόλις δυο στάδια και ολική χημική απόδοση 81%, ξεκινώντας από την εμπορικά διαθέσιμη 3,5-επτανοδιόνη.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

1. Γενικές μέθοδοι

Η 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη παρασκευάστηκε από την εμπορικά διαθέσιμη 3,5-επτανοδιόνη με αντίδραση αλκυλίωσης με μέθυλο ιωδίδιο. Η ρακεμική 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-επτανόνη παρασκευάστηκε από την 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη με αναγωγή με $NaBH_4$.

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο (Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID. Κολώνα: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m χειρόμορφη κολώνα, 20% permethylated cyclodextrin). Η λήψη των φασμάτων 1H NMR έγινε με φασματόμετρο 300 MHz και 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα $CDCl_3$ και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλο σιλάνιο (TMS). Οι χημικές αποδόσεις αναφέρονται σε απομονωμένες και φασματοσκοπικά καθαρές ενώσεις.

1.1 Σύνθεση της 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνης (8).⁷³

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου η 3,5-επτανοδιόνη (5 mmol, 640 mg, 676 μ L) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (20 mL) και στο διάλυμα προστέθηκε K_2CO_3 (4.7 mmol, 642 mg). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκε, σε διάρκεια 2 λεπτών το μέθυλο ιωδίδιο (6.15 mmol, 873 mg, 383 μ L) και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 2 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε αιθέρας (30 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Απόδοση 95% (674 mg) σε ισορροπία με την ενολική της μορφή.

1H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 6.66 (q, $J=6.9$ Hz, 1H), 2.33-2.55 (m, 8H), 1.80 (s, 3H), 1.28 (d, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.11 (t, $J=7.5$ Hz, 3H), 1.02 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

1.2 Σύνθεση της ρακεμικής 4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-επτανόνης (8A-D).⁷⁶

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου προστέθηκε $NaBH_4$ (0.098 mmol, 4 mg) σε άνυδρη μεθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην η 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη (0.3 mmol, 43 mg) διαλυμένη σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 2 ώρες στους 0 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε, στην ίδια θερμοκρασία, κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x15 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/ $EtOAc$, v/v, 6/1). Απόδοση 80%.

1H NMR ($CDCl_3$ 300 MHz, δ ppm): 3.73-3.84 (m, 1H), 3.54-3.64 (m, 1H), 2.71 (s, OH), 2.36-2.68 (m, 6H), 1.28-1.59 (m, 4H), 1.10 (d, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.09 (d, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.03 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 1.02 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 0.95 (t, $J=7.2$ Hz, 3H), 0.92 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$ 300MHz, δ ppm): 216.8, 216.7, 75.0, 72.6, 50.5, 49.3, 36.0, 35.1, 27.5, 26.9, 14.2, 10.4, 9.9, 9.8, 7.6, 7.5.

2. Ενζυμικές αναγωγές

64 διαφορετικές κετορεδουκτάσες (KRED-101-131, KRED-A1A-A1Z και KRED-B1A-B1G, BioCatalytics, Inc. Pasadena, CA USA) δοκιμάστηκαν για τον

προσδιορισμό των καταλληλότερων ενζύμων για την εκλεκτική αναγωγή του υποστρώματος 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη (**8**). Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αυτών χρησιμοποιήθηκαν επίσης NADPH και NADH (για τις KRED-B1B, KRED-B1C) σαν συνένζυμα και αφυδρογονάση της γλυκόζης σαν ανακυκλωτικό ένζυμο.

2.1 Ενζυμικές αντιδράσεις σε μικρή κλίμακα

Το υπόστρωμα 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη (**8**) (25 mM) αναμίχθηκε με NADPH (2.5 mM, 2 mg), την αντίστοιχη κετορεδουκτάση (2 mg/mL), γλυκόζη (100 mM, 18 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (2 mg/mL) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH 6.9). Οι αντιδράσεις αναδεύτηκαν στους 25-37 °C και ο έλεγχος τους γινόταν κάθε μια ώρα με αέριο χρωματογράφο, μετά από εκχύλιση του δείγματος αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα.

3. Ενζυμικές αντιδράσεις σε μεγάλη κλίμακα

3.1 Σύνθεση της (4S,5S)-4-μεθυλο-5-υδροξυ-3-επτανόνης 8D. ΜΕΘΟΔΟΣ Α

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20 mL, 200 mM, pH 6.9) που περιείχε την 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη (**8**) (50 mM, 1 mmol, 142 mg), γλυκόζη (120 mM, 432 mg), NADPH (0.5 mM, 0.01 mmol, 9 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (8 mg) και την KRED-119 (10 mg) αναδεύτηκε στους 37 °C για 24 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 6.9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x15 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη. Απόδοση 87%, 125 mg.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.54-3.65 (m, 1H), 2.36-2.70 (m, 3H), 1.29-1.61 (m, 2H), 1.10 (d, *J*=7.2Hz, 3H), 1.03 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 0.95 (t, *J*=7.2Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300MHz, δ ppm): 216.8, 75.0, 50.5, 36.0, 27.6, 14.2, 10.0, 7.5.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΣ Β.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (16 mL, 200 mM, pH 6.9) που περιείχε την 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη (84 mM, 1.35 mmol, 192 mg), γλυκόζη (130 mM, 375

mg), NADPH (0.69 mM, 0.011 mmol, 10 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (8 mg) και την KRED-A1C (10 mg) αναδεύτηκε στους 25 °C για 24 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 6.9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x15 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη. Απόδοση 85%, 165 mg.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.77-3.85 (m, 1H), 2.72 (s, OH), 2.41-2.64 (m, 3H), 1.32-1.58 (m, 2H), 1.12 (d, *J*=7.1Hz, 3H), 1.05 (t, *J*=7.3Hz, 3H), 0.95 (t, *J*=7.4Hz, 3H).

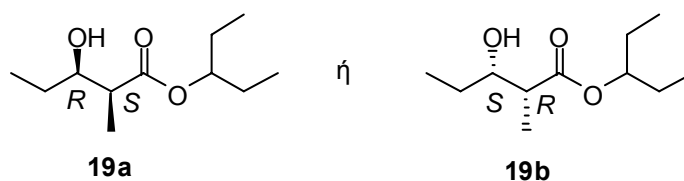
¹³C NMR (CDCl₃ 300MHz, δ ppm): 216.7, 72.6, 49.3, 35.1, 26.9, 10.4, 9.9, 7.6.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΦΕΡΟΜΟΝΗΣ ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *SITOPHILUS GRANARIUS*

Το *Sitophilus granarius* είναι ένα έντομο που αναπτύσσεται και τρέφεται σε αποθήκες σιτηρών με αποτέλεσμα την καταστροφή τεράστιων ποσοτήτων αποθηκευμένων τροφίμων, με συνέπεια να προκαλούνται σοβαρές οικονομικές απώλειες σε όλο τον κόσμο. Το 1987 ο Burkholder και οι συνεργάτες του κατάφεραν να απομονώσουν τη φερομόνη συσσωμάτωσης του εντόμου αυτού, την οποία και ονόμασαν Sitophilate.⁸⁸ Η φερομόνη αυτή είναι ελκυστική μόνο για το έντομο *Sitophilus granarius*, σε αντίθεση με τη φερομόνη Sitophilure, η οποία έλκει και τα τρία είδη εντόμων του γένους *Sitophilus* (*zeamais*, *oryzae* και *granaries*). Η φερομόνη Sitophilate εκλύεται μόνο από το αρσενικό έντομο και έλκει και τα δυο φύλα του είδους αυτού.⁸⁹ Η βιολογικά-δραστική ένωση ταυτοποιήθηκε σαν 2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικός 1-αιθυλοπροπυλοεστέρας (**19a, b**), με σχετική στερεοχημεία *syn* (*erythro*) (Σχήμα 49).

Σχήμα 49. *Syn* 2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικός 1-αιθυλοπροπυλοεστέρας.

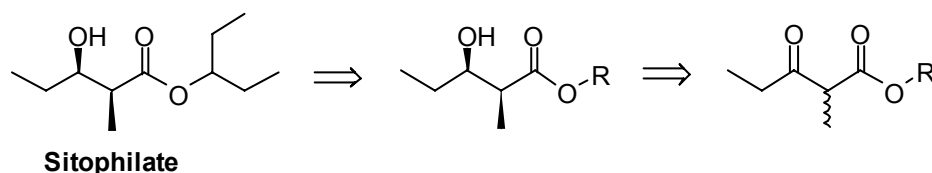


Για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής της ένωσης αυτής, ο Mori και οι συνεργάτες του συνέθεσαν και τα δυο εναντιομερή της.⁹⁰ Με σύγκριση των φασματοσκοπικών, χρωματογραφικών και βιολογικών δεδομένων μεταξύ της φυσικής φερομόνης και των δυο εναντιομερών ενώσεων, απέδειξαν ότι η βιολογικά δραστική μορφή είναι το (2*S*,3*R*)-εναντιομερές (Σχήμα 49, **19a**). Από τότε έχουν δημοσιευτεί αρκετές συνθέσεις είτε της ρακεμικής είτε της φυσικής μορφής της ένωσης αυτής.^{83,91} Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, η επιθυμητή στερεοχημεία (2*S*,3*R*) προέκυψε από μια επιπλέον αντίδραση αντιστροφής-Mitsunobu, καθιστώντας τη σύνθεση πιο περίπλοκη. Άλλες μέθοδοι οδήγησαν στην φερομόνη, όμως με μικρή διαστεροεκλεκτικότητα ή εναντιοεκλεκτικότητα.

Συνολικά καμία από τις μέχρι τώρα γνωστές συνθετικές μεθόδους δεν είναι αρκετά πρακτική και οικονομική για τη σύνθεση της φερομόνης Sitophilate, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε παγίδες μείωσης του παρασιτισμού του εντόμου *Sitophilus granarius*.⁹²

Όπως παρουσιάστηκε αναλυτικά στην προηγούμενη ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής σχετικά με τη σύνθεση της φερομόνης Sitophilure, έτσι και εδώ χρησιμοποιήθηκε η ίδια προσέγγιση για την χημειοενζυμική σύνθεση της Sitophilate, με τη χρήση κετορεδουκτασών. Δεδομένου ότι η ένωση αυτή είναι ένας α-μεθυλο-β-υδροξυ εστέρας, μπορεί να προκύψει από στερεοεκλεκτική αναγωγή ενός α-μεθυλο-β-κετο εστέρα μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού (ΔΚΔ) (Σχήμα 50).⁹³

Σχήμα 50. Ρετροσύνθεση της φερομόνης Sitophilate.

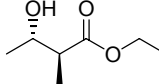
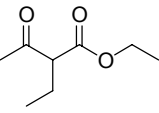
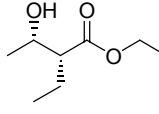
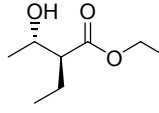
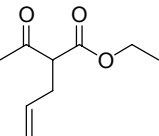
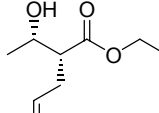
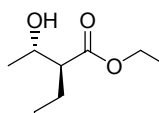


Σε προηγούμενη ερευνητική εργασία (Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης) αποδείχτηκε ότι, οι απομονωμένες κετορεδουκτάσες μπορούν να καταλύσουν την αναγωγή των α-αλκυλο-β-κετο εστέρων.^{71b}

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται χαρακτηριστικά αποτελέσματα της μελέτης αυτής. Συγκεκριμένα οι κετοεστέρες **14**, **15**, και **16** με μέθυλο, αίθυλο και προπένυλο α-υποκατάσταση αντίστοιχα, μπορούν να μετατραπούν εκλεκτικά και, σε πολλές περιπτώσεις με μεγάλη δραστηριότητα, σε υδροξυ εστέρες με μεγάλη οπτική καθαρότητα.

Πίνακας 4

Υπόστρωμα	KRED	Διαστερομερική αναλογία (%) ^[a]				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
		A	B	C	D		
 14	102	>99	-	-	-	>99% (3h)	 14a
	103	>99	-	-	-	94% (24h)	
	106	>99	-	-	-	>99% (6h)	
	110	97	-	-	3	37% (24h)	
	116	86	-	-	14	>99% (24h)	
	117	90	-	-	10	>99% (24h)	
	120	85	-	-	15	>99% (24h)	

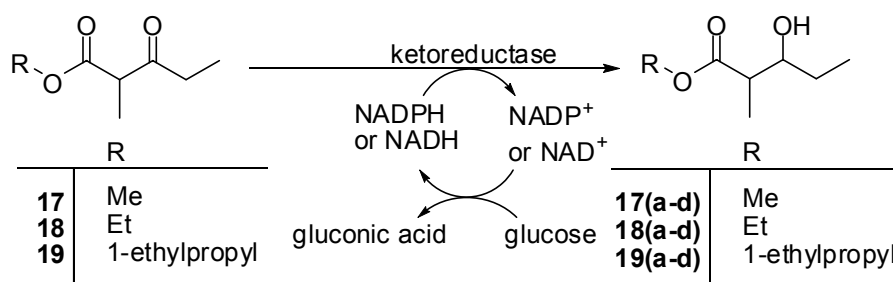
	107	-	15	-	85	>99% (6h)		14d
	102	>99	-	-	-	>99% (4h)		15a
	103	97	-	3	-	74% (24h)		
	106	>99	-	-	-	>99% (6h)		
	110	95	-	5	-	23% (24h)		
	108	20	-	80	-	>99% (24h)		15c
	116	10	-	90	-	>99% (24h)		
117	15	-	85	-	>99% (24h)			
	102	>99	-	-	-	>99% (1h)		16a
	103	92	-	8	-	>99% (24h)		
	106	>99	-	-	-	>99% (2h)		
	110	96	-	4	-	33% (24h)		
	108	1	-	99	-	>99% (2h)		16c
	116	1	-	99	-	>99% (6h)		
	117	1	-	99	-	>99% (6h)		
	118	1	-	99	-	>99% (2h)		
	119	1	-	99	-	>99% (2h)		
	120	1	-	99	-	>99% (2h)		

[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλύεται πρώτο.

Ο προσδιορισμός της απόλυτης και σχετικής στερεοδομής όλων των προϊόντων αναγωγής πραγματοποιήθηκε σε κάθε περίπτωση με χρήση χειρόμορφων ενώσεων παραγοντοποίησης (chiral derivatizing agents) και θα παρουσιαστεί αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο (Κεφάλαιο 5, 6).

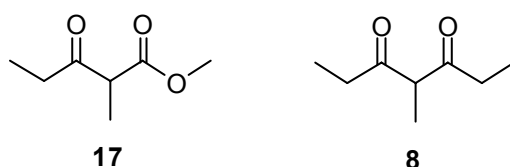
Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, σχεδιάστηκε η σύνθεση της φερομόνης Sitophilate μέσω της ενζυμικής αναγωγής κατάλληλων αρχικών α-μεθυλο-β-κετοεστέρων. Μελετήθηκαν τρεις α-μεθυλο-β-κετο εστέρες με 62 NADPH και δυο NADH-εξαρτώμενες, απομονωμένες κετορεδοκτάσες, παρουσία αφυδραγονάσης της γλυκόζης σαν ανακυκλωτικό του NAD(P)H (Σχήμα 51).

Σχήμα 51. Ενζυμική αναγωγή των α-μεθυλο-β-κετοεστέρων **17**, **18**, και **19** με τις κετορεδοκτάσες.



Το πρώτο υπόστρωμα που μελετήθηκε ήταν ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας **17**. Το υπόστρωμα αυτό επιλέχτηκε λόγω της ομοιότητάς του με την 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη, πρόδρομη ένωση της φερομόνης Sitophilure (Σχήμα 52), η οποία είχε συντεθεί επιτυχώς χημειοενζυμικά (Κεφάλαιο 2) στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Σχήμα 52. 2-Μεθυλο-3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας **17**, 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνη **8**.



Έτσι αναμενόταν ότι ορισμένα από τα ένζυμα θα επιδείκνυαν την ίδια υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τον σχηματισμό του (2*S*,3*R*)-ισομερούς, όπως επέδειξαν στην περίπτωση της 4-μεθυλο-3,5-επτανοδιόνης **8**. Τα καλύτερα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλεστέρα **17** παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5

Υπόστρωμα	KRED	Διαστεreoμερική αναλογία % ^[a]				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
		A	B	C	D		
 17	101	19	31	25	25	>99% (6h)	 17a-d
	104	42	9	34	15	39% (24h)	
	107	4	-	93	3	>99% (2h)	
	111	16	17	36	31	>99% (6h)	
	112	6	35	37	22	>99% (12h)	
	113	7	41	33	19	>99% (12h)	
	114	12	8	49	31	>99% (6h)	
	115	16	18	35	31	>99% (6h)	
	116	11	14	75	-	40% (24h)	
	117	26	15	59	-	20% (24h)	
	118	3	3	94	-	>99% (24h)	
	119	3	7	90	-	>99% (12h)	
	121	10	8	42	40	>99% (24h)	
	123	10	5	46	39	>99% (6h)	
127	-	1	99	-	15% (24h)		

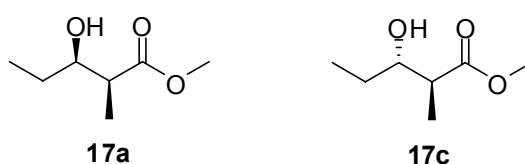
	128	2	1	97	-	50% (24h)
	130	4	5	91	-	45% (24h)
	131	5	5	90	-	45% (24h)
	A1A	5	10	85	-	25%(24h)
	A1B	90	-	1	9	>99% (2h)
	A1C	90	-	-	10	>99% (2h)
	A1D	87	-	1	12	>99% (2h)
	A1F	-	-	98	2	>99% (24h)
	A1I	-	-	97	3	>99% (24h)
	B1B	-	-	>98	-	>99% (24h)
	B1C	-	-	>98	-	90% (24h)
	B1E	-	-	98	2	>99% (24h)
	B1F	16	1	75	8	40% (24h)

[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλύεται πρώτο.

Όπως φαίνεται πολύ καθαρά, δυο από τα τέσσερα στερεοϊσομερή προϊόντα μπορούν να σχηματιστούν ποσοτικά (ποσοστά μετατροπής >99%) και σε μικρούς χρόνους αντίδρασης (2h έως 24h). Για παράδειγμα, η KRED-107 ολοκλήρωσε την αναγωγική αντίδραση μόλις σε δυο ώρες, σχηματίζοντας το ισομερές **17c** (Πίνακας 5) σε αναλογία 93% και οι KRED-A1B και KRED-A1C ολοκλήρωσαν την αντίδραση επίσης σε δυο ώρες σχηματίζοντας το ισομερές **17a** σε αναλογία 90%. Ορισμένα ένζυμα παρουσίασαν υψηλή στερεοεκλεκτικότητα και σχημάτισαν, με υψηλά ποσοστά μετατροπής, μόνο ένα από τα τέσσερα στερεοϊσομερή. Για παράδειγμα, η NADH-εξαρτώμενη κετορεδουκτάση B1B σε 24 ώρες, κατέλυσε την δημιουργία του ισομερούς **17c** με μεγάλη οπτική καθαρότητα.

Όπως προσδιορίστηκε με ^1H NMR φασματοσκοπία η σχετική στερεοδομή του προϊόντος **17a** είναι *syn* και του προϊόντος **17c** *anti*. Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής πραγματοποιήθηκε με ^1H NMR φασματοσκοπία κατόπιν μετατροπής των προϊόντων στους αντίστοιχους MPA-εστέρες. Έτσι το ισομερές **17c** έχει (2*S*,3*S*) στερεοδομή ενώ το **17a** έχει την επιθυμητή (2*S*,3*R*) (Σχήμα 53).

Σχήμα 53. Η απόλυτη στερεοδομή των στερεοϊσομερών **17a** και **17c**.

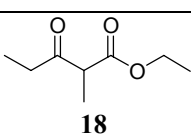
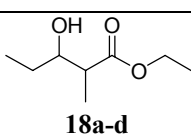


Μεταξύ όλων των κετορεδουκτασών που δοκιμάστηκαν φάνηκε για άλλη μια φορά ότι τα ένζυμα A1B, A1C και A1D επέδειξαν *anti*-Prelog εκλεκτικότητα σχηματίζοντας το (2*S*,3*R*) ισομερές (**17a**). Ωστόσο, η εκλεκτικότητά αυτών των *anti*-Prelog ενζύμων δεν ήταν τόσο υψηλή για τον κετοεστέρα **17** (80% de, KRED-A1C), συγκριτικά με την εκλεκτικότητα κατά την αναγωγή της δικετόνης **8** (96% de, KRED-A1C).

Για την αύξηση της διαστεροεκλεκτικότητας των ενζύμων αυτών μεταβάλαμε ελαφρά τη δομή του κετο εστέρα παρασκευάζοντας τον 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικό αιθυλεστέρα **18**. Το υπόστρωμα αυτό έχει χρησιμοποιηθεί ως αρχική ένωση για τη σύνθεση της φερομόνης Sitophilate το 1998 με ολόκληρο τον μικροοργανισμό *Geotrichum candidum*. Στην εν λόγω σύνθεση ωστόσο το κύριο ισομερές ήταν το (2*S*,3*S*), οπότε και χρειάστηκε αντίδραση αντιστροφής-Mitsunobu.^{5k}

Τα καλύτερα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού αιθυλεστέρα **18** παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6

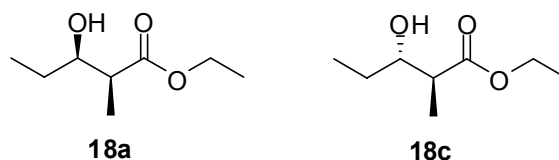
Υπόστρωμα	KRED	Διαστερομερική αναλογία % ^[a]				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
		A	B	C	D		
 18	101	10	31	34	25	>99% (6h)	 18a-d
	104	-	7	93	-	79% (24h)	
	107	-	-	93	7	>99% (12h)	
	111	7	14	46	33	>99% (6h)	
	112	3	45	39	13	>99% (12h)	
	113	2	49	35	14	>99% (12h)	
	114	3	8	63	26	>99% (12h)	
	115	6	14	47	33	>99% (12h)	
	116	2	15	83	-	51% (24h)	
	117	2	12	86	-	55% (24h)	
	118	8	-	92	-	>99% (24h)	
	119	12	-	88	-	>99% (12h)	
	121	5	4	45	46	>99% (24h)	
	123	4	5	50	41	>99% (24h)	
	127	-	1	99	-	32% (24h)	
	128	-	6	94	-	28% (24h)	
	130	3	29	68	-	19% (24h)	
	131	54	38	-	8	14% (24h)	
	A1A	-	-	-	-	<10%(24h)	

A1B	78	-	9	13	>99% (2h)
A1C	80	-	8	12	>99% (2h)
A1D	82	-	6	12	>99% (2h)
A1F	-	-	98	2	>99% (24h)
A1I	-	-	97	3	>99% (24h)
B1B	-	-	>99	-	>99% (24h)
B1C	-	1	99	-	90% (24h)
B1E	-	-	>99	-	>99% (24h)
B1F	22	-	74	4	66% (24h)

[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλύεται πρώτο.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα, ορισμένα ένζυμα αντέδρασαν πολύ εκλεκτικά και με υψηλά ποσοστά μετατροπής. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, οι KRED-B1E και B1B που ολοκλήρωσαν την αντίδραση σε 24 ώρες σχηματίζοντας μόνο ένα από τα τέσσερα στερεοϊσομερή σε οπτικά καθαρή μορφή (**18c**, Πίνακας 6). Το σημαντικότερο στην περίπτωση αυτή είναι το γεγονός ότι η εκλεκτικότητα των *anti*-Prelog ενζύμων (A1B, A1C, A1D), αντί να αυξηθεί, μειώθηκε από 74-80% de (στην περίπτωση του κετοεστέρα **17**) σε 56-64% de, σχηματίζοντας το ισομερές **18a**. Όπως βρέθηκε από τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής το ισομερές **18a** έχει (2*S*,3*R*) στερεοδομή, ενώ το **18c** (2*S*,3*S*) (Σχήμα 54).

Σχήμα 54. Η απόλυτη στερεοδομή των ισομερών **18a** και **18c**.

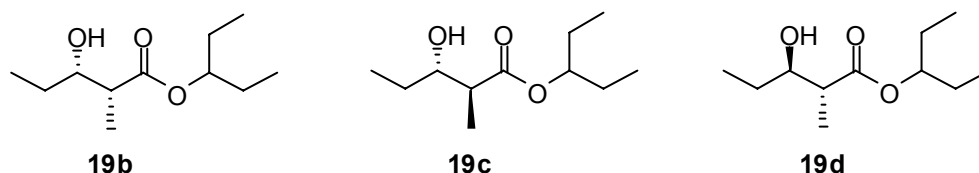


Στη συνέχεια παρασκευάστηκε ο κετοεστέρας 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός 1-αιθυλοπροπυλεστέρας **19**, ο οποίος και αποτελεί την άμεση πρόδρομη ένωση για το Sitophilate. Το υπόστρωμα αυτό έχει χρησιμοποιηθεί από την ερευνητική ομάδα του Ohta για τη σύνθεση του Sitophilate με αναγωγή με τον μικροοργανισμό *Pichia farinosa* IAM 4682.^{4c} Όμως και σε αυτή την περίπτωση το κύριο ισομερές ήταν το (2*S*,3*S*), οπότε και χρειάστηκε αντίδραση αντιστροφής-Mitsunobu.

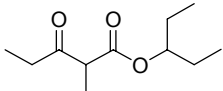
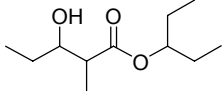
Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού 1-αιθυλοπροπυλεστέρα **19** με τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες παρουσιάζονται στον

Πίνακα 4. Εκτός από τα ένζυμα KRED-104, KRED-A1B, KRED-A1C και KRED-A1D, όλα τα υπόλοιπα έδωσαν σαν κύριο προϊόν το ισομερές **19c** με (2*S*,3*S*) στερεοδομή. Το κύριο ισομερές της αντίδρασης με την KRED-104 (**19b**) έχει (2*R*,3*S*) στερεοδομή, ενώ στην περίπτωση των *anti*-Prelog ενζύμων (A1B, A1C, A1D), το κύριο ισομερές (**19d**) έχει (2*S*,3*R*) στερεοδομή (Σχήμα 55).

Σχήμα 55. Η απόλυτη στερεοδομή των ισομερών **19b**, **19c** και **19d**.



Πίνακας 7

Υπόστρωμα	KRED	Διαστερομερική αναλογία % ^[a]				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
		A	B	C	D		
 19	101	-	20	80	-	90% (24h)	 19a-d
	104	-	60	40	-	32% (24h)	
	107	-	-	60	40	32% (24h)	
	111	-	11	80	9	>99% (24h)	
	112	3	8	64	25	>99% (24h)	
	113	5	9	64	22	>99% (24h)	
	114	-	16	71	13	>99% (24h)	
	115	-	10	82	8	>99% (12h)	
	116	-	6	94	-	80% (24h)	
	117	-	4	96	-	80% (24h)	
	118	-	29	71	-	>99% (24h)	
	119	-	41	59	-	>99% (24h)	
	121	1	4	57	38	>99% (24h)	
	123	-	10	80	10	85% (24h)	
	127	-	-	>99	-	30% (24h)	
	128	-	27	73	-	20% (24h)	
	130	-	-	-	-	<5% (24h)	
	131	-	-	-	-	<10% (24h)	
	A1A	-	-	-	-	<10%(24h)	
	A1B	16	1	22	61	>99% (24h)	
A1C	16	1	23	60	>99% (24h)		
A1D	17	1	19	63	>99% (24h)		
A1F	-	1	65	34	82% (24h)		

	A1I	-	-	98	2	29% (24h)
	B1B	-	-	>99	-	>99% (24h)
	B1C	-	1	99	-	90% (24h)
	B1E	-	-	>99	-	22% (24h)
	B1F	-	-	-	-	<10% (24h)

[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλύεται πρώτο.

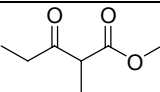
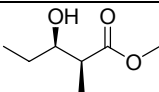
Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 7 φαίνεται ότι αυξάνοντας το μέγεθος της εστερομάδας του κετο εστέρα, εκτός από την KRED-104, όλες οι χρησιμοποιούμενες κετορεδουκτάσες έχουν την τάση να δώσουν το *anti* ισομερές. Ακόμα και στην περίπτωση των *anti*-Prelog ενζύμων (A1B, A1C, A1D), η στερεοεκλεκτικότητα τους αντιστράφηκε σχηματίζοντας σαν κύριο προϊόν το *anti* ισομερές **19d**, ενώ με τα προηγούμενα υποστρώματα (**17**, **18**) έδωσαν το *syn* (**17a**, **18a** αντίστοιχα).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών μεταξύ των κετοεστέρων **17**, **18** και **19** (Πίνακες 5, 6 και 7 αντίστοιχα) οδηγηθήκαμε τελικά στην επιλογή του υποστρώματος **17**, για τη σύνθεση της φερομόνης Sitophilate. Ο κύριος λόγος ήταν διότι με τον συγκεκριμένο κετοεστέρα **17** τα *anti*-Prelog ένζυμα παρουσίασαν την καλύτερη στερεοεκλεκτικότητα, σχηματίζοντας τον υδροξυ εστέρα **17a** με την επιθυμητή στερεοχημεία (2*S*,3*R*).

Για την αύξηση της διαστεροεκλεκτικότητας των ενζύμων KRED-A1B, A1C και A1D, και έτσι την βελτίωση της διαστερομερικής περιόσεως του ισομερούς προϊόντος **17a**, έγινε μεταβολή στις συνθήκες της αντίδρασης. Μελετήθηκε η επίδραση της μεταβολής του pH και της θερμοκρασίας στην διαστεροεκλεκτικότητα της μελετούμενης αντίδρασης.

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δυο αντιδράσεις με τα ένζυμα αυτά. Μια σε pH 6.0 και μια σε pH 8.0, στους 37 °C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8

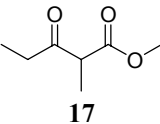
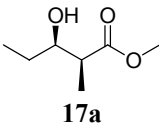
Υπόστρωμα	KRED	Συνθήκες αντίδρασης	Διαστερομερική αναλογία % ^[α]				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
			A	B	C	D		
 17	A1B	pH 6.0, 37 °C	74	-	1	25	>99% (2h)	 17a
		pH 8.0, 37 °C	92	-	1	7	>99% (20h)	
	A1C	pH 6.0, 37 °C	75	-	1	24	>99% (2h)	
		pH 8.0, 37 °C	91	-	1	8	>99% (24h)	

	A1D	pH 6.0, 37 °C	70	-	1	29	>99% (2h)	
		pH 8.0, 37 °C	92	-	1	7	>99% (24h)	

[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλύεται πρώτο.

Από τις αντιδράσεις αυτές παρατηρήθηκε ότι όντως το pH τις αντιδράσεις επηρεάζει σημαντικά την διαστεροεκλεκτικότητα των ενζύμων. Και τα τρία ένζυμα παρουσίασαν αυξημένη διαστεροεκλεκτικότητα σε pH 8.0 (**17a**, 82-84% de), ενώ σε pH 6.0 ήταν αρκετά μειωμένη (**17a**, 40-50% de). Επίσης επηρεάστηκε και η δραστηρότητά τους, αφού χρειάστηκαν μόλις δυο ώρες να ολοκληρώσουν την αντίδραση σε pH 6.0, ενώ σε pH 8.0 20-24 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς οι περισσότερες κετορεδουκτάσες εμφανίζουν την μέγιστη δραστηρότητα σε όξινο pH. Το επόμενο βήμα ήταν να διατηρηθεί το pH σταθερό σε τιμή 8.0 και να μεταβληθεί σταδιακά η θερμοκρασία της αντίδρασης από τους 37 °C στους 25 °C και τελικά στους 0 °C. Ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες (0 °C) τα τρία αυτά ένζυμα έδρασαν καταλυτικά και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9

Υπόστρωμα	KRED	Συνθήκες αντίδρασης	Διαστερομερική αναλογία % ^[α]				Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
			A	B	C	D		
 17	A1B	pH 8.0, 37 °C	92	-	1	7	>99% (20h)	 17a
		pH 8.0, 25 °C	93	-	1	6	>99% (24h)	
		pH 8.0, 0 °C	96	-	0.5	3.5	95% (24h)	
	A1C	pH 8.0, 37 °C	91	-	1	8	>99% (24h)	
		pH 8.0, 25 °C	92	-	1	7	>99% (24h)	
		pH 8.0, 0 °C	93	-	1	6	90% (24h)	
	A1D	pH 8.0, 37 °C	92	-	1	7	>99% (24h)	
		pH 8.0, 25 °C	93	-	1	6	>99% (24h)	
		pH 8.0, 0 °C	94	-	1	5	70% (24h)	

[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλύεται πρώτο.

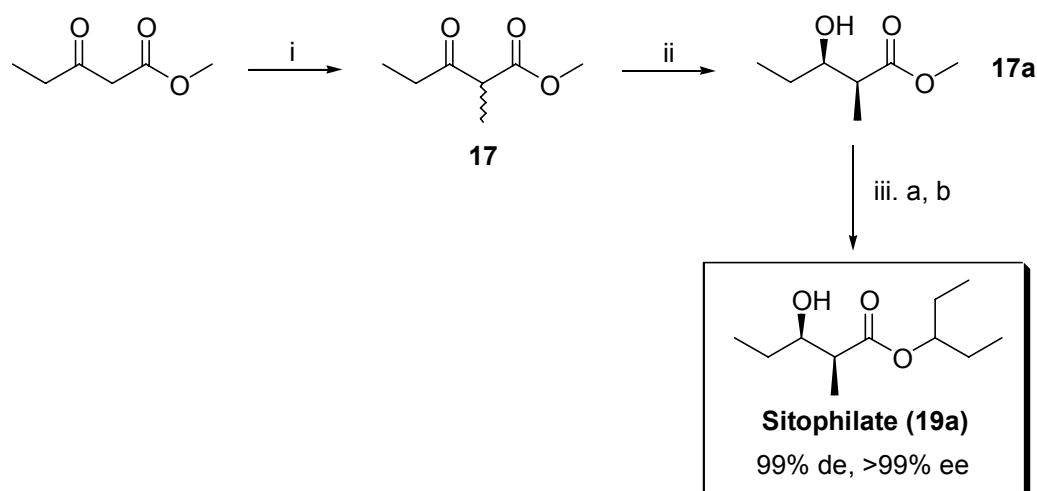
Όπως αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9, η μείωση της θερμοκρασίας συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση της εκλεκτικότητας. Η ελάττωση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση της διαστεροεκλεκτικότητας και για τα τρία ένζυμα. Συγκεκριμένα για την KRED-A1B η διαστεροεκλεκτικότητα αυξήθηκε από

84% de, στους 37 °C, σε 92% de, στους 0 °C. Αυτή ήταν η υψηλότερη εκλεκτικότητα μεταξύ των τριών *anti*-Prelog ενζύμων. Η ελάττωση βέβαια της θερμοκρασίας μείωσε ελαφρά τη δραστικότητα και των τριών ενζύμων. Έτσι για την KRED-A1B το ποσοστό μετατροπής ελαττώθηκε στο 95% σε διάρκεια 24 ωρών, γεγονός αρκετά λογικό, καθώς τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν τη μέγιστη δραστικότητα σε θερμοκρασία 25-37°C.

Από όλα τα προαναφερθέντα πειράματα καταλήξαμε στην επιλογή της KRED-A1B σαν της καταλληλότερης κετορεδουκτάσης για τη σύνθεση της φερομόνης Sitophilate, με συνθήκες αντίδρασης 0 °C και σε pH 8.0.

Για τη σύνθεση της φερομόνης ξεκινήσαμε αρχικά από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξο πεντανοϊκό μεθυλεστέρα, ο οποίος εύκολα και ποσοτικά μετατράπηκε στον 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκό μεθυλεστέρα **17** (Σχήμα 56). Ο κετοεστέρας **17** ανάχθηκε ενζυμικά παρουσία της KRED-A1B, για 12 ώρες στους 0 °C και για 12 ώρες στους 25 °C, μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης με 90% χημική απόδοση. Κατά τη βιομετατροπή αυτή, η διαστερομερική περίσσεια του προϊόντος ήταν 90%, ενώ η εναντιομερική περίσσεια >99%. Η μετεστεροποίηση του υδροξυεστέρα **17a** πραγματοποιήθηκε εύκολα με αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης τους άλατος του εστέρα **17a** με το 3-βρωμοπεντάνιο. Μετά από το στάδιο αυτό ήταν απαραίτητος ο χρωματογραφικός καθαρισμός του προϊόντος, κατά τον οποίο τα δυο διαστερομερή διαχωρίστηκαν σχετικά εύκολα και έτσι προέκυψε η φερομόνη με ιδιαίτερα υψηλή οπτική και χημική καθαρότητα (99% de, >99% ee).

Σχήμα 56. Χημειοενζυμική σύνθεση της φερομόνης Sitophilate.

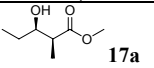
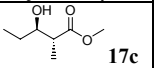
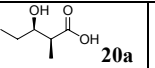
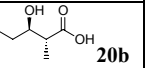


i. K₂CO₃, MeI, ξηρή ακετόνη, reflux, >99% απόδοση ii. KRED-A1B, NADPH, 0 °C - rt, 90% απόδοση, 90%de, >99% ee iii. a) NaOH, MeOH/H₂O, 1/1 v/v, rt b) 3-βρωμοπεντάνιο, ξηρό DMF, 50 °C, 65% απόδοση, 99%de, >99%ee.

Η συνολική χημική απόδοση της σύνθεσης έφτασε το 58.5%, ξεκινώντας από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξο πεντανικό μεθυλεστέρα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κατά τη σύνθεση αυτή, η ενζυμική αναγωγή πραγματοποιήθηκε αρχικά στους 0°C και σε pH 8.0. Λόγω της χαμηλής όμως δραστηριότητας του ενζύμου στις συνθήκες αυτές, απαιτήθηκε επιπλέον ποσότητα ενζύμου KRED-A1B. Έτσι χρειάστηκαν 70 mg ενζύμου για την μετατροπή 200 mg υποστρώματος (**17**), ενώ για την ίδια αντίδραση στους 25 °C, χρειάστηκαν 50 mg ενζύμου για την μετατροπή 900 mg του ίδιου υποστρώματος. Στην δεύτερη περίπτωση όμως η διαστερομερική περίσσεια είναι χαμηλή (82% de). Για πρακτικούς λόγους επομένως ενζυμική αναγωγή πραγματοποιήθηκε στους 25 °C και η βελτίωση της διαστερομερικής περισσειας έγινε στο επόμενο στάδιο της υδρόλυσης. Για το σκοπό αυτό η υδρόλυση του εστέρα πραγματοποιήθηκε επίσης ενζυμικά με τη χρήση 24 απομονωμένων και εμπορικά διαθέσιμων υδρολασών (BioCatalytics, Inc., Pasadena, CA, USA). Τα καλύτερα αποτελέσματα της υδρόλυσης του υδροξυ εστέρα **17a** με τις απομονωμένες υδρολάσες παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

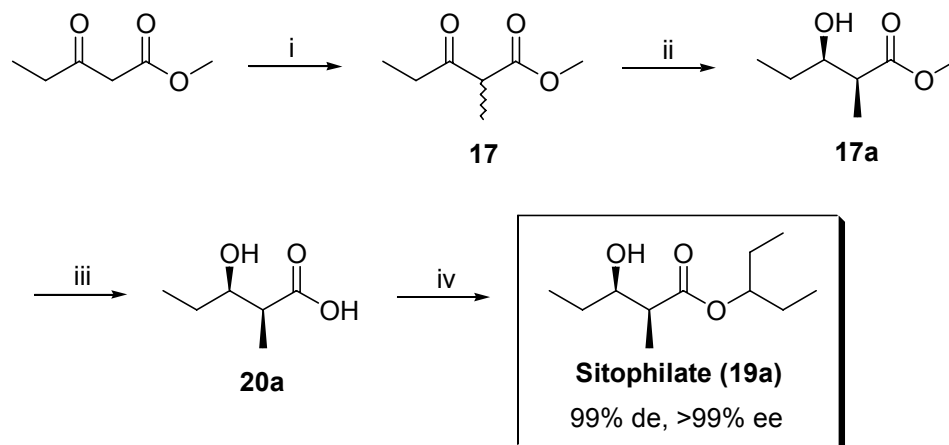
Πίνακας 10

Υπόστρωμα: Διαστερομερική αναλογία% υδροξυ εστέρα		Υδρολάσες ICR	Χρόνος αντίδρασης	Προϊόν	
 17a	 17c			 20a	 20b
91	9	110	24h	92	8
		112	24h	99	1
		123	1h	95	5

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι η ενζυμική υδρόλυση του εστέρα **17a** με τις υδρολάσες ICR-110, ICR-112 και ICR-123 οδηγεί σε αύξηση της διαστερομερικής περισσειας του παραγόμενου οξέος. Συγκεκριμένα, το καλύτερο αποτέλεσμα έδωσε η ICR-112, η οποία αύξησε την διαστερομερική περίσσεια του οξέος **20a** σε 98%. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιήθηκε και σε μεγαλύτερη κλίμακα (200 mg) οπότε

η χημική απόδοση της ενζυμικής υδρόλυσης ήταν 83% και της τελικής αντίδρασης εστεροποίησης 80% (99% de, >99% ee) (Σχήμα 57).

Σχήμα 57. Τελική χημειοενζυμική σύνθεση της φερομόνης Sitophilate.



i. K_2CO_3 , MeI, ξηρή ακετόνη, reflux, >99% απόδοση ii. KRED-A1B, NADPH, rt, 95% απόδοση, 82%de, >99% ee iii. ICR-112, rt, 83% απόδοση, 98% de, >99% ee iv. KOH, 3-bromopentane, ξηρό DMF, 50 °C, 80% απόδοση, 99%de, >99%ee.

Συνοψίζοντας, δύο ένζυμα, δηλαδή μια απομονωμένη κετορεδοκτάση (KRED-A1B) και μια υδρολάση (ICR-112), χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση της φερομόνης του εντόμου *Sitophilus granarius*. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε τέσσερα στάδια, με ολική απόδοση 59.8%, ξεκινώντας από τον εμπορικά διαθέσιμο 3-οξο πεντανικό μεθυλεστέρα. Η φερομόνη Sitophilate προέκυψε με μεγάλη οπτική και χημική καθαρότητα (99% de, >99% ee). Αυτή είναι η πιο αποδοτική και πρακτική μέθοδος σύνθεσης της φερομόνης, που έχει γίνει μέχρι σήμερα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

1. Γενικές μέθοδοι.

Ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας **17** και ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκός αιθυλεστέρας **18** παρασκευάστηκαν από τους εμπορικά διαθέσιμους 3-οξο πεντανοϊκό μεθυλεστέρα και 3-οξο πεντανοϊκό αιθυλεστέρα, αντίστοιχα, με αντίδραση αλκυλίωσης με μέθυλο ιωδίδιο. Ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκός 1-αιθυλοπροπυλεστέρας **19** παρασκευάστηκε από τον 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκό μεθυλεστέρα με αντίδραση μετεστεροποίησης με 3-πεντανόλη. Οι ρακεμικοί α-

μεθυλο-β-υδροξυ εστέρες παρασκευάστηκαν από τους αντίστοιχους α-μεθυλο-β-κετο εστέρες με αναγωγή με NaBH₄.

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο (Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID. Κολώνα: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm χειρόμορφη κολώνα, 20% permethylated cyclodextrin). Η λήψη των φασμάτων ¹H NMR έγινε με φασματόμετρο 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα CDCl₃ και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλο σιλάνιο (TMS). Η λήψη των φασμάτων μάζας έγινε σε GC-MS (Simatzu GCMS-QP5050 με κολώνα SPB-5 και ανιχνευτή μάζας CI). Οι χημικές αποδόσεις αναφέρονται σε απομονωμένες και φασματοσκοπικά καθαρές ενώσεις.

1.1 Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλεστέρα 17.⁷³

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου ο 3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας (15 mmol, 1.88 mL) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (20 mL) και στο διάλυμα προστέθηκε K₂CO₃ (14 mmol, 1.932 g). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκε, σε διάρκεια 2 λεπτών το μέθυλο ιωδίδιο (18.4 mmol, 1.146 mL) και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε αιθέρας (30 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Χωρίς περαιτέρω καθαρισμό ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας **17** χρησιμοποιήθηκε στην ενζυμική αναγωγή. Απόδοση >99% (2.16g).

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 3.72 (s, 3H), 3.53 (q, *J*=7.5Hz, 1H), 2.46 – 2.64 (m, 2H), 1.34 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.07 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

1.2 Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού αιθυλεστέρα 18.⁷³

Η σύνθεση του υποστρώματος **18** πραγματοποιήθηκε όπως στην περίπτωση του κετο εστέρα **17**. Χρησιμοποιήθηκαν 15 mmol αρχικού εστέρα και η απόδοση ήταν >99%.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 4.18 (q, *J*=7.0Hz, 2H), 3.51 (q, *J*=7.0Hz, 1H), 2.46 – 2.65 (m, 2H), 1.34 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.27 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.08 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

1.3 Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού 1-αιθυλοπροπυλεστέρα 19.⁹⁴

Σε διάλυμα 3-πεντανόλης (2.084mmol, 224μL) και DMAP (0.1mmol, 13mg), σε ξηρό τολουόλιο (8 mL), προστέθηκε ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας **17** και το μίγμα αναδεύτηκε, μέχρι βρασμού, για τέσσερις μέρες. Στη συνέχεια προστέθηκε NH₄Cl (15 mL) και το διάλυμα εκχυλίστηκε με EtOAc (2x20 mL). Η οργανική φάση εκπλύθηκε με 1N HCl (15 mL), ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Χωρίς περαιτέρω καθαρισμό το προϊόν χρησιμοποιήθηκε στην ενζυμική αναγωγή. Απόδοση 85%, 176 mg.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 4.76 – 4.82 (m, 1H), 3.53 (q, *J*=7.5Hz, 1H), 2.47 – 2.67 (m, 2H), 1.53 – 1.62 (m, 2H), 1.34 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.08 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.88 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.87 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

1.4 Σύνθεση του ρακεμικού 2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού μεθυλεστέρα 17.⁷⁶

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου NaBH₄ (0.646 mmol, 24 mg) προστέθηκε σε άνυδρη μεθανόλη (10 mL) και το διάλυμα ψύχθηκε στους 0 °C. Στην θερμοκρασία αυτή και σε διάρκεια 5 λεπτών προστέθηκε στάγδην ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας **17** (2.1mmol, 303mg) διαλυμένος σε άνυδρη αιθανόλη (5 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε για 3 ώρες στους 0 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστέθηκε, στην ίδια θερμοκρασία, κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl (1 mL) και το διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό. Κατόπιν προστέθηκαν 15 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα (2x15 mL). Η οργανική φάση ξηράνθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 6/1). Απόδοση 80%, 246mg.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.79 – 3.83 (m, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.56 – 3.61 (m, 1H), 2.51 – 2.58 (m, 2H), 1.39 – 1.61 (m, 4H), 1.20 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 1.17 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 0.98 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 0.96 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

1.5 Σύνθεση του ρακεμικού 2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού αιθυλεστέρα 18.

Η σύνθεση του ρακεμικού υδροξυ εστέρα **18** πραγματοποιήθηκε όπως στην περίπτωση του ρακεμικού υδροξυ εστέρα **17**. Χρησιμοποιήθηκαν 2 mmol αρχικής ουσίας και η απόδοση ήταν 80%.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.16 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 4H), 3.78 – 3.83 (m, 1H), 3.56 – 3.60 (m, 1H), 2.49 – 2.56 (m, 2H), 1.40 – 1.61 (m, 4H), 1.27 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 6H), 1.20 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 1.17 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.98 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.96 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).

1.6 Σύνθεση του ρακεμικού 2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού 1-αιθυλοπροπυλεστέρα 19.

Η σύνθεση του ρακεμικού υδροξυ εστέρα **19** πραγματοποιήθηκε όπως στην περίπτωση του ρακεμικού υδροξυ εστέρα **17**. Χρησιμοποιήθηκαν 2 mmol αρχικής ουσίας και η απόδοση ήταν 85%.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.76 – 4.83 (m, 2H), 3.78 – 3.83 (m, 1H), 3.54 – 3.60 (m, 1H), 2.71 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H, OH), 2.61 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H, OH), 2.49 – 2.56 (m, 2H), 1.41 – 1.63 (m, 12H), 1.22 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 1.18 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.98 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.97 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.89 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 12H).

1.6 Μετεστεροποίηση του (2S,3R)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού μεθυλεστέρα και σύνθεση του *Sitophilate*.⁷⁵

Σε διάλυμα του (2S,3R)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού μεθυλεστέρα **17a** (1.26mmol, 183mg) σε $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1/1 v/v, 15mL) προστέθηκε NaOH (1.26mmol, 50mg) και το διάλυμα αναδεύτηκε για 20 ώρες στους 25 °C. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης το διάλυμα συμπυκνώθηκε δίνοντας λευκό στερεό. Μετά από ξήρανση, στο στερεό προστέθηκαν ξηρό DMF (10 mL) και, στους 25 °C, το 3-βρωμοπεντάνιο (1.39mmol, 172 μL), διαλυμένο σε ξηρό DMF (5 mL). Μετά από ανάδευση στους 50 °C για 24 ώρες, στο διάλυμα προστέθηκαν 20 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με CHCl_3 (3x20mL). Η οργανική φάση εκπλύθηκε με νερό (3x20mL), ξηράνθηκε και συμπυκνώθηκε στο κενό βρύσης. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/ EtOAc , v/v, 10/1) για να δώσει 156 mg καθαρής φερομόνης. Απόδοση 65%, de 99%, ee >99%.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.76 – 4.82 (m, 1H), 3.78 – 3.84 (m, 1H), 2.60 (d, $J=4.0\text{Hz}$, 1H, OH), 2.51 – 2.57 (m, 1H), 1.41 – 1.64 (m, 6H), 1.19 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.98 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.89 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.88 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 176.20, 76.94, 73.20, 44.08, 26.69, 26.42, 26.37, 10.75, 10.36, 9.58, 9.52.

MS (m/z): 173 (2), 144 (6), 115 (40), 103 (20), 97 (10), 85 (12), 74 (100).

2. Ενζυμικές αντιδράσεις.

Ο προσδιορισμός των καταλληλότερων ενζύμων για την εκλεκτική αναγωγή των υποστρώματων **17**, **18** και **19** έγινε με δοκιμασία μεταξύ 64 διαφορετικών κετορεδουκτάσων (KRED-101-131, KRED-A1A-A1Z και KRED-B1A-B1G, BioCatalytics, Inc. Pasadena, CA USA. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αυτών σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν NADPH και NADH (για τις KRED-B1B, KRED-B1C) σαν συνένζυμα και αφυδρογονάση της γλυκόζης σαν ανακυκλωτικό ένζυμο του συνενζύμου. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 24 διαφορετικές υδρολάσες (BioCatalytics, Inc. Pasadena, CA USA) για την εκλεκτική υδρόλυση του υδροξυ εστέρα **17a**.

2.1 Ενζυμικές αντιδράσεις αναγωγής σε μικρή κλίμακα.

Το υπόστρωμα (κετο εστέρες **17**, **18**, **19**, 25 mM) αναμίχθηκε με NADPH (2.5 mM, 2 mg), την αντίστοιχη κετορεδουκτάση (2 mg/mL), γλυκόζη (100 mM, 18 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (2 mg/mL) και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (1 mL, 200 mM, pH 6.9). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύονταν στους 25-37 °C και ο έλεγχός τους γινόταν κάθε μια ώρα με λήψη δείγματος και ανάλυση με αέριο χρωματογράφο, μετά από εκχύλιση του δείγματος αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα. Στην περίπτωση των *anti*-Prelog ενζύμων (KRED-A1B, A1C, A1D), πραγματοποιήθηκαν επιπλέον ενζυμικές αντιδράσεις σε μικρή κλίμακα με ακριβώς ίδιο πειραματικό, σε ρυθμιστικό διάλυμα 1ml, 200mM, pH 6.0 ή pH 8.0 και σε θερμοκρασία 0 °C ή 25 °C.

Υδροξυ εστέρας **17c**^{83, 91}: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.71 (s, 3H), 3.57 – 3.61 (m, 1H), 2.51 – 2.58 (m, 1H), 1.53 – 1.62 (m, 1H), 1.39 – 1.48 (m, 1H), 1.20 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.98 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Υδροξυ εστέρας **18a**^{83, 91}: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 4.16 (q, *J*=7.0Hz, 2H), 3.78 – 3.83 (m, 1H), 2.50 – 2.56 (m, 1H), 1.40 – 1.53 (m, 2H), 1.27 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.17 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.96 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Υδροξυ εστέρας **18c**^{83, 91}: ¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 4.17 (q, *J*=7.5Hz, 2H), 3.55 – 3.61 (m, 1H), 2.59 (d, *J*=7Hz, 1H, OH), 2.49 – 2.55 (m, 1H), 1.53 – 1.61 (m, 1H), 1.40 – 1.49 (m, 1H), 1.27 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.20 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.98 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Υδροξυ εστέρας **19c**:^{83, 91} ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 4.78 – 4.83 (m, 1H), 3.54 – 3.60 (m, 1H), 2.69 (d, *J*=7.0Hz, 1H, OH), 2.50 – 2.56 (m, 1H), 1.42 – 1.64 (m, 6H), 1.23 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.99 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.89 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

2.2 Ενζυμικές αντιδράσεις υδρόλυσης σε μικρή κλίμακα.

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (4,5 mL, pH 7.0, 200 mM) προστίθενται ο (2*S*,3*R*)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικός μεθυλεστέρας **17a** (25 mg) και η υδρολάση (5 mg). Το διάλυμα αναδεύεται στους 37 °C. Ο έλεγχος της αντίδρασης γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα (1h, 2h, 4h και 24h) με αέριο χρωματογράφο μετά από εκχύλιση 1 mL του μίγματος, σε βασικό pH, με EtOAc, για τον υπολογισμό της οπτικής καθαρότητας του απομείναντος υδροξυ εστέρα. Αν η οπτική καθαρότητα μεταβληθεί, το παραγόμενο οξύ απομονώνεται με εκχύλιση του μίγματος, σε όξινο pH, με EtOAc και το καθαρό οξύ εστεροποιείται στον αντίστοιχο μεθυλεστέρα με διαζωμεθάνιο. Ο παραγόμενος εστέρας αναλύεται σε αέριο χρωματογράφο με χειρόμορφη κολώνα για τον υπολογισμό της διαστεreoμερικής του περιόσεως, η οποία συμπίπτει με αυτήν του οξέος.

2.3 Ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλεστέρα 17 σε pH 8.0 και 0°C, με την KRED-A1B.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (20 mL, pH 8.0, 200 mM) που περιείχε τον 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικό μεθυλεστέρα **17** (69.5 mM, 1.39mmol, 200mg), γλυκόζη (120 mM, 432mg), NADPH (0.7 mM, 0.014 mmol, 12 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (10 mg) και την KRED-A1B (50 mg) αναδεύτηκε στους 0 °C. Μετά από 12 ώρες προστέθηκαν άλλα 20 mg KRED-A1B, 5 mg αφυδρογονάση της γλυκόζης και 8 mg NADPH και το διάλυμα αναδεύτηκε στους 25 °C για επιπλέον 12 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 8.0 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x20 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό βρύσης. Απομονώθηκε καθαρός και οπτικώς ενεργός ο υδροξυ εστέρας **17a**. Απόδοση 90%, 183 mg, 90% de, >99% ee.

2.4 Ενζυμική αναγωγή του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικού μεθυλεστέρα 17 σε pH 6.9 και 25°C, με την KRED-A1B.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 mL, pH 6.9, 200 mM) που περιείχε τον 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικό μεθυλεστέρα **17** (62.5 mM, 6.25 mmol, 900 mg), γλυκόζη (120 mM, 2.16 g), NADPH (0.5 mM, 0.05 mmol, 44 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (15 mg) και την KRED-A1B (50 mg) αναδεύτηκε στους 25 °C μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 6.9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x100 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό βρύσης παράγοντας καθαρό και οπτικώς ενεργό τον υδροξυ εστέρα **17a**. Απόδοση 95%, 866 mg, 82% de, >99% ee.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.79 – 3.84 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.54 – 2.59 (m, 1H), 1.40 – 1.53 (m, 2H), 1.18 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.97 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

2.5 Ενζυμική υδρόλυση του (2*S*,3*R*)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού μεθυλεστέρα 17a με την ICR-112.

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (30 mL, pH 7.0, 200 mM) διαλύθηκαν η υδρολάση ICR-112 (45 mg) και ο (2*S*,3*R*)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικός μεθυλεστέρας **17a** (200 mg). Το διάλυμα αναδεύτηκε στους 37 °C για 24 ώρες. Το προϊόν απομονώθηκε μετά από εκχύλιση του διαλύματος σε βασικό pH με Et₂O (15 mL). Στη συνέχεια, το διάλυμα οξινίστηκε μέχρι pH 3, η υδατική φάση εκχυλίστηκε με EtOAc (3x15 mL), η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό βρύσης. Απομονώθηκε καθαρό το (2*S*,3*R*)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικό οξύ **20a**. Απόδοση 83%, 150 mg, 98% de, >99% ee.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.84 – 3.91 (m, 1H), 2.59 – 2.65 (m, 1H), 1.45 – 1.57 (m, 2H), 1.21 (d, *J*=7.2 Hz, 3H), 0.99 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

2.6 Εστεροποίηση του (2*S*,3*R*)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού οξέος 20a με 3-βρωμοπεντάνιο. Σύνθεση του Sitophilate.⁷⁵

Σε διάλυμα του (2*S*,3*R*)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού οξέος **20a** (150 mg, 1.136 mmol) σε άνυδρο DMF (10mL) προστέθηκε KOH (64 mg, 1.136 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε στους 80 °C για 3 ώρες. Στη συνέχεια η θερμοκρασία ελαττώθηκε στους 50 °C και προστέθηκε το 3-βρωμοπεντάνιο (156 μL, 1.25 mmol). Το διάλυμα

αναδεύτηκε στους 50 °C για 24 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, στο διάλυμα προστέθηκαν 20 mL νερό και το μίγμα εκχυλίστηκε με CHCl₃ (3x20mL). Η οργανική φάση εκπλύθηκε με νερό (3x20mL), ξηράνθηκε και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 9/1) για να δώσει 184 mg καθαρού Sitophilate. Απόδοση 80%, de 99%, ee >99%.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 4.76 – 4.82 (m, 1H), 3.78 – 3.84 (m, 1H), 2.60 (d, *J*=4.0Hz, 1H, OH), 2.51 – 2.57 (m, 1H), 1.41 – 1.64 (m, 6H), 1.19 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.98 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.89 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.88 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 176.20, 76.94, 73.20, 44.08, 26.69, 26.42, 26.37, 10.75, 10.36, 9.58, 9.52.

MS (m/z): 173 (2), 144 (6), 115 (40), 103 (20), 97 (10), 85 (12), 74 (100).

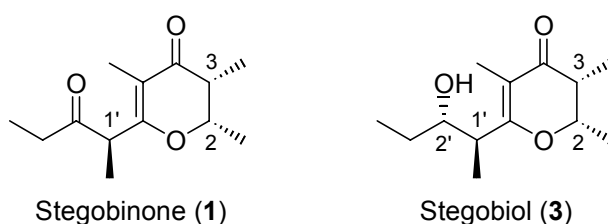
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΧΗΜΕΙΟΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΦΕΡΟΜΟΝΗΣ STEGOBINONE ΚΑΙ STEGOBIOL ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ DRUGSTORE BEETLE (*Stegobium paniceum* L.)

Το έντομο “drugstore beetle”, *Stegobium paniceum* L., είναι είδος παγκοσμίως γνωστό σαν επιβλαβές έντομο αποθηκευμένων τροφίμων. Ζει στις πιο θερμές περιοχές με περισσότερο ήπιο κλίμα, ενώ σε τροπικά κλίματα είναι λιγότερο διαδεδομένο. Τρέφεται με οτιδήποτε σπιτικό τρόφιμο και καρυκείματα, καθώς επίσης ξύλο, μαλλί, δέρμα ακόμα και φάρμακα. Είναι γνωστό ότι διατρυπά βιβλία, ξύλινα αντικείμενα ακόμα και κονσερβοκούτια ή ελάσματα από αλουμίνιο. Γενικά τα έντομα που αναπτύσσονται σε αποθηκευμένα προϊόντα προκαλούν τεράστιες οικονομικές επιπτώσεις σε όλο τον κόσμο. Εκτός αυτού προκαλούν επίσης αηδία, ενόχληση και οργή σε όλους αυτούς που ανακαλύπτουν τις ζημιές που δημιουργούν τα έντομα αυτά.

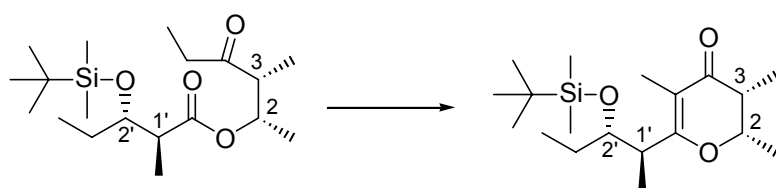
Ένα από τα κύρια συστατικά της φυλετικής φερομόνης του εντόμου αυτού απομονώθηκε από τον Kuwahara και τους συνεργάτες του,⁹⁵ το 1975 και ονομάστηκε Stegobinone. Η Stegobinone είναι το κύριο συστατικό της φερομόνης και η δομή που προτάθηκε για την ένωση αυτή φαίνεται στο Σχήμα 58 (1). Η Stegobinone έχει αναφερθεί ότι είναι ελκυστική και για το έντομο *Anobium punctatum*.⁹⁶ Το δευτερεύον συστατικό της φερομόνης του drugstore beetle απομονώθηκε από τον Kodama και τους συνεργάτες του το 1987.⁹⁷ Ονομάστηκε Stegobiol και η δομή του φαίνεται στο Σχήμα 58 (3). Έχει αναφερθεί ότι η Stegobinone και η Stegobiol, σε καθαρή μορφή, είναι κρυσταλλικές ενώσεις.

Σχήμα 58. Η δομή της Stegobinone και της Stegobiol.



Έπειτα από τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των ενώσεων αυτών,⁹⁸ έχουν δημοσιευτεί αρκετές συνθέσεις για τη φερομόνη αυτή. Η πρώτη ασύμμετρη σύνθεση αναφέρθηκε από τον Mori και τους συνεργάτες του το 1986.⁹⁹ Όμως από τη σύνθεση αυτή προέκυψε υγρή και όχι κρυσταλλική Stegobinone (**1**) εξαιτίας της μικρής εναντιομερική περίσσεια στον C-3. Ρακεμοποίηση σε αυτόν τον άνθρακα προέκυψε κατά το στάδιο της κυκλοποίησης (Σχήμα 59). Επίσης αναφέρθηκε ότι η συγκεκριμένη αντίδραση κυκλοποίησης ήταν ιδιότροπη και δύσκολο να επαναληφθεί.

Σχήμα 59: Αντίδραση κυκλοποίησης.

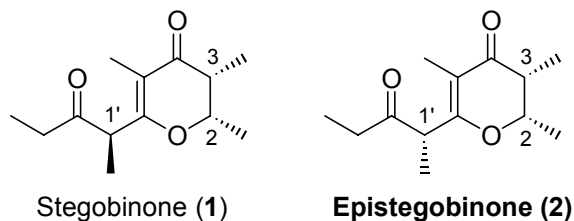


Ύστερα από την ανακάλυψη μιας πιο αξιόπιστης αντίδρασης κυκλοποίησης από τους Oppolzer και Rodriguez (1993),¹⁰⁰ δημοσιεύτηκαν το 1998 δυο συνθέσεις της οπτικής καθαρής Stegobinone (**1**) και Stegobiol (**3**).¹⁰¹ Από αυτές μόνο αυτή του Mori^{95b} οδήγησε σε κρυσταλλική Stegobiol (**3**) και Stegobinone (**1**) χρησιμοποιώντας παρασκευαστικό TLC. Όμως αυτή την περίπτωση αναφέρθηκε ότι η αντίδραση κλειδί κυκλοποίησης ήταν ιδιότροπη και από τις τρεις προσπάθειες πέτυχαν οι δυο. Μια επιπλέον σύνθεση, η οποία πραγματοποιήθηκε με τελειώς διαφορετική συνθετική πορεία, δημοσιεύτηκε από τον Matteson και τους συνεργάτες του.¹⁰² Όμως στην περίπτωση αυτή πραγματοποιήθηκαν πολλά συνθετικά βήματα μέχρι την παρασκευή της φερομόνης. Και ο Matteson ανέφερε ότι προσπάθησε να πραγματοποιήσει την αντίδραση κυκλοποίησης (Σχήμα 59), χωρίς όμως αποτέλεσμα.

Γενικά η Stegobinone (**1**) αποδείχτηκε αρκετά δύσκολος συνθετικός στόχος, παρόλο που έχει σχετικά απλή δομή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ένωση αυτή επιμερίζεται πολύ εύκολα στο 1'-επιμερές (**2**) (Σχήμα 60). Το 1'-επιμερές (**2**) έχει αποδειχτεί ότι είναι ισχυρό απωθητικό για το έντομο *Stegobium raniceum* ακόμα και σε πολύ μικρό ποσοστό. Η ρακεμική **1** είναι επίσης απωθητική. Όταν η ένωση **1** βρίσκεται σε μερικώς κρυσταλλική ή υγρή μορφή, και περιέχει μικρή ποσότητα από το **2** ή και άλλα διασtereoμερή, είναι εντελώς ασταθής σε παρατεταμένη αποθήκευση.

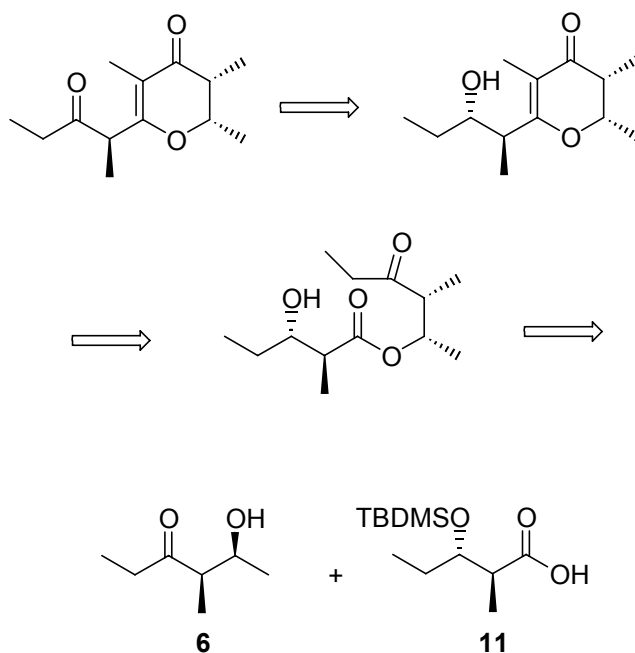
Έτσι για τη σύνθεση σταθερής και κρυσταλλικής Stegobinone (**1**) απαιτούνται αντιδράσεις με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα.

Σχήμα 60. Δομή της Epistegobinone (**2**).



Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των φερομονών αυτών με την ίδια συνθετική πορεία που ακολούθησε η ερευνητική ομάδα του Mori,^{95b} χρησιμοποιώντας τις ίδιες ενδιάμεσες ενώσεις **6** και **11**, (Σχήμα 61). Τις ενώσεις όμως αυτές συνθέσαμε χημειοενζυμικά, εκμεταλλευόμενοι την εκλεκτικότητα των κετορεδουκτασών όπως προαναφέραμε στα Κεφάλαια 1, 2 και 3. Για να προκύψει καθαρή και κρυσταλλική Stegobinone (**1**) θα πρέπει οι ενδιάμεσες ενώσεις να είναι οπτικώς πολύ καθαρές. Μέχρι στιγμής η πιο απλή συνθετική πορεία για τη σύνθεση της ένωσης **6** περιλαμβάνει 6 στάδια, ενώ για την **11** απαιτούνται 7 στάδια.^{95a}

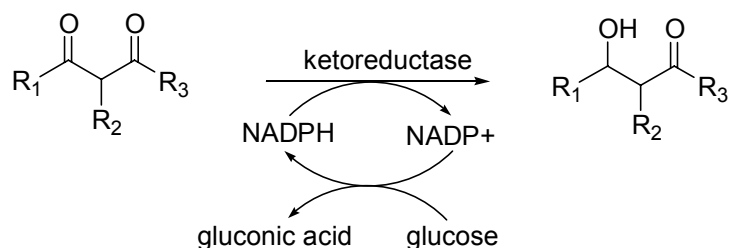
Σχήμα 61. Ενδιάμεσες ενώσεις για τη σύνθεση της Stegobiol και της Stegobinone.



Όπως δείχτηκε λοιπόν προηγουμένως, οι απομονωμένες κετορεδοκτάσες αποτελούν ισχυρούς καταλύτες για τη στερεοεκλεκτική αναγωγή καρβονυλο ενώσεων. Παρουσιάστηκε ήδη εκτενώς η στερεοεκλεκτική παρασκευή α-αλκυλο-β-υδροξυ κετονών και α-αλκυλο-β-υδροξυ εστέρων, καθώς και η σύνθεση των φερομονών Sitophilure και Sitophilate. Η σύνθεση λοιπόν της φυλετικής φερομόνης του *Stegobium paniceum*, Stegobiol (**3**) και Stegobinone (**1**) πραγματοποιήθηκε μέσω της ενζυμικής αναγωγής με τις απομονωμένες κετορεδοκτάσες

Η στερεοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή των α-αλκυλο-1,3-δικετονών είναι δυνατόν να παράγει οπτικώς καθαρές α-αλκυλο-β-υδροξυ κετόνες (Σχήμα 62). Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκαν 32 απομονωμένες και NADPH-εξαρτώμενες κετορεδοκτάσες, παρουσία του ανακυκλωτικού συστήματος γλυκόζη/αφυδρογονάση της γλυκόζης, για την ανακύκλωση του συνενζύμου. Το υπόστρωμα το οποίο μελετήθηκε στην προκειμένη περίπτωση ήταν η 3-μεθυλο-2,4-εξανοδιόνη (**5**) από την οποία με εκλεκτική αναγωγή προκύπτει η υδροξυ κετόνη (**6**).

Σχήμα 62. Ενζυμική αναγωγή α-αλκυλο-1,3-δικετονών.



Αρκετά ένζυμα από τα 32 που δοκιμάστηκαν αποδείχτηκαν δραστικά στην αντίδραση αναγωγής της 3-μεθυλο-2,4-εξανοδιόνης (**5**). Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11

Substrate	KRED	Diastereomeric ratio % ^[a]				Conversion (time)
		A	B	C	D	
				-	-	
	102	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	-	-	-	100% (24h)
	103	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	-	-	-	85% (24h)
	106	>99 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	-	-	-	85% (24h)
	108	68	29	-	3	>99% (24h)
	116	62	33	2	3	86% (24h)
	117	67	31	1	1	81% (24h)

	120	70	30	-	-	>99% (12h)
	127	3	96 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)	-	1	92% (24h)
	128	21	75	4	-	25% (24h)
	130	43	56	1	-	100% (24h)
	131	82	13	2	3	63% (24h)

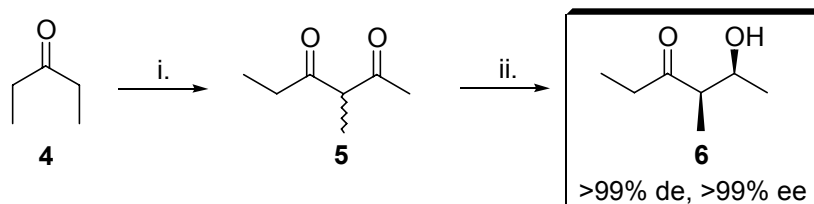
[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλούεται πρώτο.

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι οι απομονωμένες κετορεδουκτάσες είναι ικανές να ανάγουν εκλεκτικά τη δικετόνη **5** χωρίς το σχηματισμό της αντίστοιχης διόλης. Όλες οι αντιδράσεις ήταν πολύ τοποεκλεκτικές, καθώς η αναγωγή πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά στο καρβονύλιο, που βρίσκεται δίπλα στη μεθυλομάδα. Το καταλληλότερο ένζυμο αποδείχτηκε η KRED-102, με την οποία ολοκληρώθηκε η αντίδραση μέσα σε 24 ώρες, σχηματίζοντας το ένα από τα τέσσερα στερεοϊσομερή, με υψηλή εναντιομερική και διαστερομερική περίσσεια (>99% ee). Από τα φάσματα ¹H NMR και μετατρέποντας την κετο αλκοόλη **6** στους αντίστοιχους MPA-εστέρες, ταυτοποιήθηκε η απόλυτη στερεοδομή της, η οποία ήταν 2*S*,3*R*. Οπότε χρησιμοποιώντας την κετορεδουκτάση 102, η ενδιάμεση ένωση **6** μπορεί εύκολα να προκύψει με μεγάλη οπτική καθαρότητα. Η αναγωγή της δικετόνης πραγματοποιήθηκε μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού σχηματίζοντας ένα μόνο στερεοϊσομερές με ποσοστό μετατροπής 100%.

Η συνολική σύνθεση του ενδιάμεσου **6** ξεκίνησε από την 3-πεντανόνη **4**, η οποία μετατράπηκε πολύ εύκολα στην δικετόνη **5**. Τελικά η υδροξυ κετόνη **6** προέκυψε με ενζυμική αναγωγή, σε μεγάλη κλίμακα, χρησιμοποιώντας την KRED-102. Η ολική απόδοση ξεκινώντας από την 3-πεντανόνη ήταν 78% (Σχήμα 63).

Όπως φαίνεται μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία κάποια πιο πρακτική και αποτελεσματική σύνθεση της ενδιάμεσης ένωσης **6**.

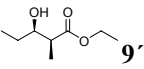
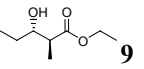
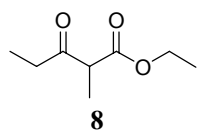
Σχήμα 63. Χημειοενζυμική σύνθεση της (2*S*,3*R*)-3-μεθυλο-2-υδροξυ-4-εξανόνης.



i. a) LDA, CH₃CHO, ξηρό THF, -78°C, 99% απόδοση; b) Jone's οξείδωση, ακετόνη, 0°C, 90% απόδοση, (89% από την 3-πεντανόνη); ii. KRED-102, NADPH, rt, 88% απόδοση, >99% de, >99% ee, (ολική απόδοση 78%).

Για τη σύνθεση του ενδιαμέσου **11** (Σχήμα 61), μελετήσαμε την αναγωγή του β-κετο εστέρα **8**, καθώς όπως έχουμε δείξει σε προηγούμενα κεφάλαια, η στερεοεκλεκτική αναγωγή των α-αλκυλο-β-κετο εστέρων είναι δυνατό να παράγει οπτικώς καθαρούς α-αλκυλο-β-υδροξυ εστέρες. Η μελέτη έγινε χρησιμοποιώντας 64 απομονωμένες κετορεδουκτάσες. Τα αποτελέσματα της αναγωγής παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12

Substrate	KRED	Diastereomeric ratio % ^[a]				Conversion (time)
		A	B	C	D	
			-		-	
	101	10	31	34	25	>99% (6h)
	104	-	7	93	-	79% (24h)
	107	-	-	93	7	>99% (12h)
	111	7	14	46	33	>99% (6h)
	112	3	45	39	13	>99% (12h)
	113	2	49	35	14	>99% (12h)
	114	3	8	63	26	>99% (12h)
	115	6	14	47	33	>99% (12h)
	116	2	15	83	-	51% (24h)
	117	2	12	86	-	55% (24h)
	118	8	-	92	-	>99% (24h)
	119	12	-	88	-	>99% (12h)
	121	5	4	45	46	>99% (24h)
	123	4	5	50	41	>99% (24h)
	127	-	1	99 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)	-	32% (24h)
	128	-	6	94	-	28% (24h)
	130	3	29	68	-	19% (24h)
	131	54	38	-	8	14% (24h)
	A1B	78 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	-	9	13	>99% (2h)
	A1C	80 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	-	8	12	>99% (2h)
	A1D	82 (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)	-	6	12	>99% (2h)
	A1F	-	-	98 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)	2	>99% (24h)
	A1I	-	-	97 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)	3	>99% (24h)
	B1B	-	-	>99 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)	-	>99% (24h)
B1C	-	1	99 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)	-	90% (24h)	
B1E	-	-	>99 (2<i>S</i>,3<i>S</i>)	-	>99% (24h)	
B1F	22	-	74	4	66% (24h)	

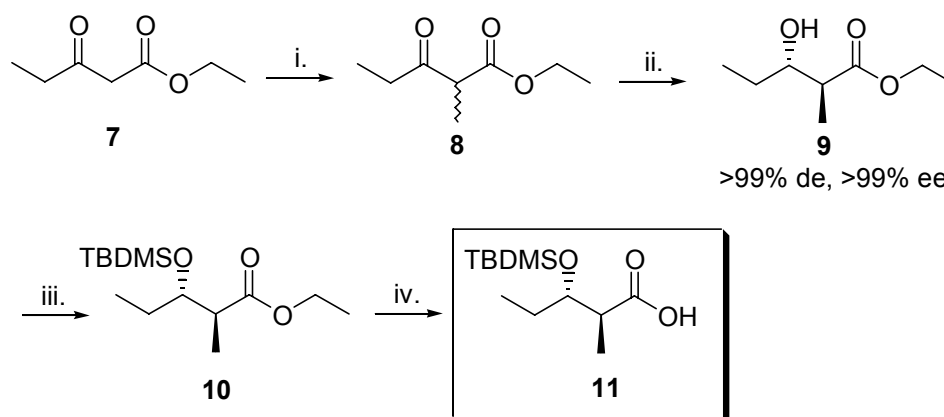
[α] Τα ισομερή A/B/C/D παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλύεται πρώτο.

Από όλα τα θετικά ένζυμα, έξι κατάφεραν να σχηματίσουν το ένα ισομερές με μεγάλη οπτική καθαρότητα. Το καλύτερο αποτέλεσμα προέκυψε από την αναγωγή με το ένζυμο KRED-B1E, το οποίο ποσοτικά (>99% ποσοστό μετατροπής) οδήγησε στο σχηματισμό του ενός ισομερούς με εξαιρετική εναντιομερική και διαστερομερική περίσσεια (>99%). Και σε αυτή την περίπτωση η αναγωγή πραγματοποιήθηκε μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού, προκύπτοντας ένα ισομερές σε ποσοστό 100%. Από τα φάσματα ^1H NMR και μετατρέποντας τον υδροξυ εστέρα **9** στους αντίστοιχους MPA-εστέρες, προσδιορίστηκε η απόλυτη στερεοαπεικόνιση, η οποία ήταν 2*S*,3*S*. Από αυτήν την μελέτη λοιπόν προσδιορίστηκε ότι η κετορεδουκτάση B1E είναι το καταλληλότερο ένζυμο για την σύνθεση του ενδιαμέσου **11** με εξαιρετική οπτική καθαρότητα.

Η συνολική σύνθεση του ενδιαμέσου **11** παρουσιάζεται στο Σχήμα 64. Η αρχική ουσία ήταν ο εμπορικά διαθέσιμος 3-οξο πεντανικός αιθυλεστέρας **7**, ο οποίος εύκολα και ποσοτικά μετατράπηκε στον κετο εστέρα **8**. Ο υδροξυ εστέρας **9** προέκυψε με την ενζυμική αναγωγή, σε μεγάλη κλίμακα (632 mg), χρησιμοποιώντας την KRED-B1E. Τελικά η ένωση **11** σχηματίστηκε με αντίδραση προστασίας του υδροξυλίου με TBDMSCl, ακολουθούμενη από υδρόλυση της εστερομάδας. Ξεκινώντας από τον κετο εστέρα **7**, η ολική απόδοση έφτασε το 73% (Σχήμα 64).

Η σύνθεση αυτή, που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, είναι η πιο πρακτική και αποτελεσματική μέθοδος για την ασύμμετρη σύνθεση της πρόδρομης ένωσης **11**, εκ όσων έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

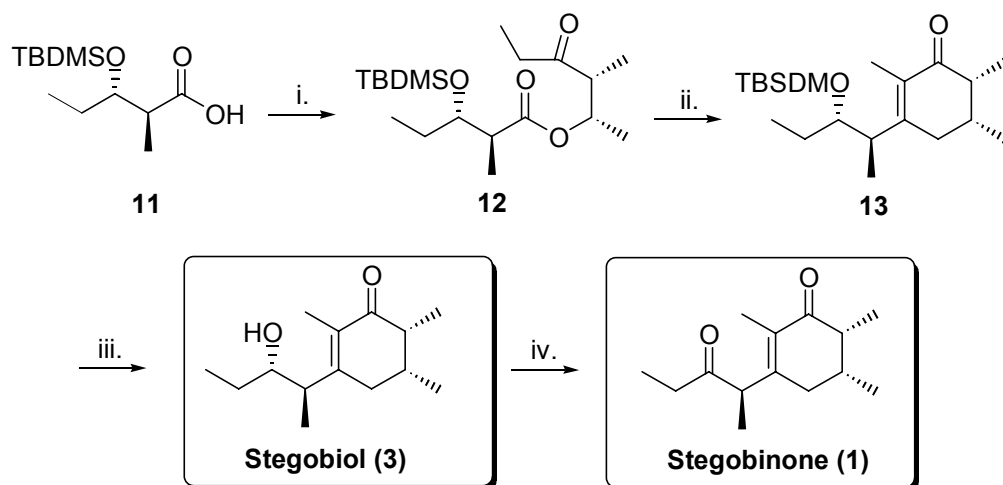
Σχήμα 64. Χημειοενζυμική σύνθεση της πρόδρομης ένωσης **11**.



i. K_2CO_3 , MeI, ξηρή ακετόνη, reflux, >99% απόδοση; ii. KRED-B1E, NADPH, rt, 99% απόδοση, >99% de, >99% ee; iii. TBDMSCl, imidazole, DMF, rt, 85% απόδοση; iv. NaOH, MeOH/H₂O (1/1, v/v), rt, 87%, (ολική απόδοση 73%).

Στη συνέχεια, έχοντας συνθέσει χημειοενζυμικά και τις δυο ενδιάμεσες ενώσεις με μεγάλη απόδοση και οπτική καθαρότητα, ακολουθήσαμε την συνθετική πορεία, όπως είχε παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία από την ομάδα του Mori.^{95b} Αρχικά πραγματοποιήθηκε αντίδραση εστεροποίησης της αλκοόλης **6** και του οξέος **11**, μετά από ενεργοποίηση του **11** με το 2,6-dichlorobenzoyl chloride. Από την αντίδραση αυτή προέκυψε ο εστέρας **12**, ο οποίος εύκολα μετατράπηκε στην προστατευμένη Stegobiol, χρησιμοποιώντας 5 ισοδύναμα $TiCl_4$ και 8 ισοδύναμα δισοπροπυλαμίνης. Αυτή είναι η αντίδραση κλειδί (Σχήμα 59) για την κυκλοποίηση του εστέρα **12**, η οποία όπως είχε αναφερθεί από τον Mori^{95b} και τον Matteson^{96b} ήταν αρκετά ιδιότροπη αντίδραση. Στην παρούσα πορεία η αντίδραση αυτή αποδείχτηκε πολύ αξιόπιστη αφού την επαναλάβαμε τρεις φορές με επιτυχία με απόδοση 67%. Στη συνέχεια αποπροστασία της ένωσης **13** έδωσε την φερομόνη Stegobiol. Ύστερα από καθαρισμό της ένωσης αυτής δεν καταφέραμε να την απομονώσουμε σε κρυσταλλική μορφή. Αυτό δεν μας ανησύχησε καθώς η Stegobiol είναι αρκετά σταθερή ακόμα και σε ελαιώδη μορφή. Το τελευταίο βήμα ήταν η οξείδωση της Stegobiol προς την Stegobinone. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο Jones, όπου μετά από ένα γρήγορο καθαρισμό, καταφέραμε να απομονώσουμε την φερομόνη Stegobinone σε καθαρή και κρυσταλλική μορφή. Η ένωση αυτή γρήγορα κρυσταλλώθηκε, όταν αφέθηκε στους -20°C για 12 ώρες. Το γεγονός ότι η Stegobinone κρυσταλλώθηκε τόσο εύκολα δηλώνει την υψηλή χημική καθαρότητα, καθώς και την μεγάλη εναντιομερική και διαστερομερική περίσσεια με την οποία συντέθηκε. Η ολική απόδοση της τελευταίας συνθετικής πορείας ήταν 40% ξεκινώντας από το ενδιάμεσο **11** (Σχήμα 65). Η δομή και των δυο ενώσεων **1** και **3** ταυτοποιήθηκε με ¹H NMR φασματοσκοπία και σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα.

Σχήμα 65. Τελική σύνθεση της Stegobiol και της Stegobinone από της πρόδρομες ενώσεις **6** και **11**.



i. a) 2,6-dichlorobenzoyl chloride, Et_3N , THF, rt; b) **6**, DMAP, C_6H_6 , $0^\circ\text{C} - \text{rt}$, 83% απόδοση; ii. 5 equiv. TiCl_4 , 8 equiv. $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, CH_2Cl_2 , $-78^\circ\text{C} - -15^\circ\text{C}$, 67% απόδοση; iii. HF aq., MeCN, 80% απόδοση; iv. Jones's, ακετόνη, 0°C , 90% απόδοση.

Συνοψίζοντας, 64 απομονωμένες και εμπορικά διαθέσιμες κετορεδουκτάσες δοκιμάστηκαν για τη σύνθεση της φυλετικής φερομόνης του εντόμου drugstore beetle, *Stegobium raniceum*. Από τη σύνθεση αυτή προέκυψε κρυσταλλική Stegobinone (**1**), χωρίς την ανίχνευση του 1'-επιμερούς (**2**), ούτε σε μικρό ποσοστό. Η φερομόνη αποδείχτηκε αρκετά σταθερή ύστερα από την αποθήκευσή της στους -20°C . Οι αντιδράσεις κλειδί για τη σύνθεση ήταν η στερεοεκλεκτική ενζυμική αναγωγή των α-αλκυλο-1,3-δικετονών και των α-αλκυλο-β-κετο εστέρων, με τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Γενικές μέθοδοι.

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο (Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID. Κολώνα: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm χειρόμορφη κολώνα, 20% permethylated cyclodextrin). Η λήψη των φασμάτων ^1H NMR έγινε με φασματόμετρο 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα CDCl_3 και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η λήψη των φασμάτων μάζας έγινε σε GC-MS (Simatzu GCMS-

QP5050 με κολώνα SPB-5 και ανιχνευτή μάζας CI). Οι χημικές αποδόσεις αναφέρονται σε απομονωμένες και φασματοσκοπικά καθαρές ενώσεις.

Σύνθεση της 3-μεθυλο-2,4-εξανοδιόνης 5.⁶⁶

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, δισοπροπυλαμίνη (30 mmoles, 4.2 mL) διαλύθηκε σε ξηρό THF (15mL) και, στους 0 °C, προστέθηκε στάγδην BuLi (1.6 M σε εξάνιο, 22 mmol, 13.75 mL). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά και έπειτα ψύχθηκε στους -78 °C. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος της 3-πεντανόνης (20 mmol, 2.1 mL) σε ξηρό THF (10 mL) και ανάδευση για άλλα 40 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκε, για 10 λεπτά, διάλυμα ξηρού THF (10 mL) που περιείχε την κατάλληλη αλδεΐδη (22 mmol, 1.23 mL) και το μίγμα αναδεύτηκε έως την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως φαίνεται από χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από προσθήκη αιθέρα (60 mL) και εκχύλιση του διαλύματος με κορεσμένο NH₄Cl (100 mL), κορεσμένο NaCl (100 mL) και νερό (100 mL). Ακολούθησε ξήρανση με MgSO₄ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό κενό. Καθαρισμός του προϊόντος έγινε με silica gel χρωματογραφία (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 99%, 2.593 g.

Στη συνέχεια ακολούθησε οξείδωση με το αντιδραστήριο Jones's.¹⁰³ Σε διάλυμα της ρακεμικής 3-μεθυλο-2-υδροξυ-4-εξανόνης (2.593 g, 19.8 mmol) σε ακετόνη (30 mL) προστέθηκε αργά το αντιδραστήριο Jones's στους 0°C μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, όπως φάνηκε από χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας. Τότε το μίγμα αραιώθηκε με Et₂O και κορεσμένο διάλυμα θειοθειικού νατρίου, αναδεύτηκε για 5 λεπτά και η οργανική φάση διαχωρίστηκε. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε με Et₂O. Η οργανική φάση ξεπλύθηκε με νερό, με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηράνθηκε σε MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προϊόν που προέκυψε ανάχθηκε ενζυμικά χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 90%, 2.281 g.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 3.65 (q, *J*=6.9 Hz, 1H), 2.50 (q, *J*=7.2 Hz, 1H), 2.48 (q, *J*=7.2 Hz, 1H), 2.42 (q, *J*=7.5 Hz, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.08 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.30 (d, *J*=6.9 Hz, 3H), 1.11 (t, *J*=7.2 Hz, 3H), 1.04 (t, *J*=7.2 Hz, 3H).

Ενζυμική αναγωγή της 3-μεθυλο-2,4-εξανόδιόνης (6) με την KRED-102.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 mL, pH 6.5, 200 mM) που περιείχε την 3-μεθυλο-2,4-εξανοδιόνη 5 (80 mM, 7.8 mmol, 1.0 g), γλυκόζη (120 mM, 2.26

g), NADPH (0.078 mmol, 68 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (30 mg) και την KRED-102 (100 mg) αναδεύτηκε στους 25 °C μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 6.5 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x100 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη. Απόδοση 85%, 892 mg, >99% de, >99% ee.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 4.06 – 4.14 (m, 1H), 2.40 – 2.62 (m, 3H), 1.15 (d, *J*=6.6 Hz, 3H), 1.14 (d, *J*=7.5 Hz, 3H), 1.06 (t, *J*=7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 7.6, 10.8, 20.2, 35.7, 51.5, 67.5, 217.0.

Σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός αιθυλεστέρας 8.⁷³

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου ο 3-οξο πεντανικός μεθυλεστέρας (4 mmol, 576 mg) διαλύθηκε σε άνυδρη ακετόνη (15 mL) και στο διάλυμα προστέθηκε K₂CO₃ (3.72 mmol, 513 mg). Το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστέθηκε, σε διάρκεια 2 λεπτών το μέθυλο ιωδίδιο (4.92 mmol, 306 μL) και το μίγμα θερμάνθηκε μέχρι βρασμού για 20 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης προστέθηκε αιθέρας (40 mL), ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Χωρίς περαιτέρω καθαρισμό ο 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικός αιθυλεστέρας **8** χρησιμοποιήθηκε στην ενζυμική αναγωγή. Απόδοση >99% (632 mg).

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 4.18 (q, *J*=7.0Hz, 2H), 3.51 (q, *J*=7.0Hz, 1H), 2.46 – 2.65 (m, 2H), 1.34 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.27 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.08 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Ενζυμική σύνθεση του (2*S*,3*S*)-2-μεθυλο-3-υδροξυ πεντανικού αιθυλεστέρα (9) με την KRED-B1E.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (80 mL, pH 6.9, 200 mM) που περιείχε τον 2-μεθυλο-3-οξο πεντανικό αιθυλεστέρα **8** (50 mM, 4.0 mmol, 632 mg), γλυκόζη (120 mM, 1.73 g), NADPH (0.04 mmol, 35 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (20 mg) και την KRED-B1E (100 mg) αναδεύτηκε στους 25 °C μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 6.9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Το προϊόν

απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (2x80 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την αλκοόλη. Απόδοση 99%, 634 mg, >99% de, >99% ee.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 4.17 (q, *J*=7.5Hz, 2H), 3.55 – 3.61 (m, 1H), 2.59 (d, *J*=7Hz, 1H, OH), 2.49 – 2.55 (m, 1H), 1.53 – 1.61 (m, 1H), 1.40 – 1.49 (m, 1H), 1.27 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.20 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.98 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Σύνθεση του 2*S*,3*S* αιθυλεστέρα 10.⁹⁹

Σε διάλυμα της ένωσης **9** (640 mg, 4 mmol) σε ξηρό DMF (25 mL) προστέθηκαν μιδαζόλιο (817 mg, 12 mmol) και TBDMSCl (904 mg, 6 mmol). Το διάλυμα αναδεύτηκε επί 15 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το διάλυμα προστέθηκε σε παγωμένο νερό και εκχειλίστηκε με Et₂O (4x20 mL). Οι οργανική φάση ξεπλύθηκε με νερό και κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηράθηκε σε MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 200/1). Απόδοση 85%, 928 mg.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 4.11 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 3.88 – 3.95 (m, 1H), 2.56 – 2.66 (m, 1H), 1.42 – 1.55 (m, 2H), 1.25 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 1.07 (d, *J*=6.9Hz, 3H), 0.88 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.03 (s, 3H).

Σύνθεση του 2*S*,3*S*-οξέος 11.

Σε διάλυμα της ένωσης **10** (538 mg, 1.97 mmol) σε MeOH/H₂O, 1/1 v/v (25 mL) προστέθηκε NaOH (102 mg, 2.56 mmol) και το μίγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Στη συνέχεια το μίγμα συμπυκνώθηκε υπό κενό, διαλύθηκε με νερό (20 mL) και εκχυλίστηκε με Et₂O (15 mL). Η υδατική φάση οξινίστηκε με οξικό οξύ σε pH 5 και εκχυλίστηκε με Et₂O (3x20 mL). Η οργανική φάση ξηράθηκε σε MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Απόδοση 87%, 419 mg.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 3.75 – 3.82 (m, 1H), 2.64 – 2.73 (m, 1H), 1.51 – 1.66 (m, 2H), 1.22 (d, *J*=7.2Hz, 3H), 0.92 (s, 9H), 0.91 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 0.12 (s, 3H), 0.11 (s, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): -4.5, -4.1, 8.8, 12.9, 18.5, 26.0, 26.5, 45.1, 74.9, 181.6.

Σύνθεση του εστέρα 12.⁹⁹

Σε διάλυμα του **11** (419 mg, 1.71 mmol) και Et₃N (0.265 mL, 1.9 mmol) σε άνυδρο THF (15 mL) προστέθηκε 2,6-διχλωροβενζοΐλο χλωρίδιο (0.273 mL, 1.9 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε για 15 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από διήθηση και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό, το υπόλειμμα διαλύθηκε σε άνυδρο βενζόλιο (15 mL). Στο διάλυμα προστέθηκε διάλυμα της ένωσης **6** (247 mg, 1.9 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (2 mL) και DMAP (293 mg, 1.9 mmol) σε άνυδρο βενζόλιο (3 mL) στους 0°C. Το μίγμα που προέκυψε αναδεύτηκε για 2 ώρες στους 0°C και για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια αραιώθηκε με Et₂O (30 mL), ξεπλύθηκε με 1M HCl, νερό, κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηράνθηκε σε MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 50/1). Απόδοση 83%, 509 mg.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 5.09 – 5.17 (m, 1H), 3.86 – 3.93 (m, 1H), 2.39 – 2.78 (m, 4H), 1.34 – 1.55 (m, 2H), 1.02 – 1.20 (m, 12H), 0.88 (s, 9H), 0.87 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H).

Σύνθεση της ένωσης 13.¹⁰⁰

Σε διάλυμα της ένωσης **12** (509 mg, 1.42 mmol) σε ξηρό CH₂Cl₂ (80 mL) προστέθηκαν στάγδην, στους -78°C, διάλυμα TiCl₄ (1M σε CH₂Cl₂, 7.1 mL, 7.1 mmol) και αιθυλοδισοπροπυλαμίνη (1.932 mL, 11.4 mmol). Το μίγμα αναδεύτηκε στους -78°C για 2 ώρες, στη συνέχεια η θερμοκρασία ανέβηκε στους -10°C σε διάρκεια 2 ωρών και αναδεύτηκε στη θερμοκρασία αυτή για 38 ώρες. Τότε στο διάλυμα προστέθηκε κορεσμένο διάλυμα NH₄Cl, αραιώθηκε με Et₂O και η οργανική φάση διαχωρίστηκε. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε με Et₂O. Η οργανική φάση ξεπλύθηκε με απεσταγμένο νερό (δυο φορές), κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηράνθηκε σε MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 50/1). Απόδοση 67%, 328 mg.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, δ ppm): 4.38 – 4.46 (m, 1H), 3.83 – 3.89 (m, 1H), 2.91 – 3.01 (m, 1H), 2.25 – 2.34 (m, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.50 – 1.60 (m, 2H), 1.30 (d, *J*=6.6Hz, 3H), 1.01 (d, *J*=6.9Hz, 6H), 0.83 – 0.92 (m, 4H), 0.84 (s, 9H), 0.04 (s, 3H), -0.01 (s, 3H).

Σύνθεση της Stegobiol 3.⁹⁹

Σε διάλυμα της ένωσης **13** (248 mg, 0.72 mmol) σε CH₃CN προστέθηκε διάλυμα 40% HF (0.1 mL, 1.8 mmol) στους 0°C. Το διάλυμα αναδεύτηκε στους 0°C για 10 ώρες, αραιώθηκε με Et₂O και κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και οι φάσεις διαχωρίστηκαν. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε με Et₂O. Η οργανική φάση εκπλύθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηράνθηκε σε MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 80%, 130 mg. Η Stegobiol που απομονώθηκε ήταν σε ελαιώδη μορφή.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 4.46 – 4.53 (m, 1H), 3.54 – 3.61 (m, 1H), 2.82 – 2.88 (m, 1H), 2.35 – 2.42 (m, 1H), 1.90 (d, *J*=7.0Hz, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.53 – 1.63 (m, 1H), 1.37 – 1.46 (m, 1H), 1.32 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.18 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.04 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 1.00 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 9.2, 9.4, 10.0, 14.6, 15.8, 28.2, 40.9, 43.6, 75.2, 76.6, 109.2, 172.7, 197.0.

MS (m/z): 226 (11.1), 168 (72.1), 141 (20.6), 139 (13.4), 125 (9.7), 124 (9.3), 112 (100).

Σύνθεση της Stegobinone 1.¹⁰³

Σε διάλυμα της ένωσης **3** (130 mg, 0.57 mmol) σε ακετόνη (15 mL) προστέθηκε αργά το αντιδραστήριο Jones' στους 0°C για 40 δευτερόλεπτα. Τότε το μίγμα αραιώθηκε με Et₂O και κορεσμένο διάλυμα θειοθειικό νάτριο, αναδεύτηκε για 5 λεπτά και η οργανική φάση διαχωρίστηκε. Η υδατική φάση εκχυλίστηκε με Et₂O. Η οργανική φάση εκπλύθηκε με νερό, με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃, κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξηράνθηκε σε MgSO₄ και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 4/1). Απόδοση 90%, 115 mg. Μετά την απομόνωση η Stegobinone αποθηκεύτηκε στους -20°C για 12 ώρες, οπότε κρυσταλλώθηκε.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 4.43 – 4.47 (m, 1H), 3.63 (q, *J*=7.0Hz, 1H), 2.35 – 2.52 (m, 3H), 1.79 (s, 1H), 1.30 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.28 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.06 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.03 (d, *J*=7.5Hz, 3H).

¹³C NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 7.9, 9.36, 9.39, 12.8, 15.7, 33.9, 43.7, 49.2, 77.2, 109.4, 169.0, 197.0, 207.5.

MS (m/z): 224 (8.6), 168 (44.5), 113 (28.4), 83 (22.9), 57 (100).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

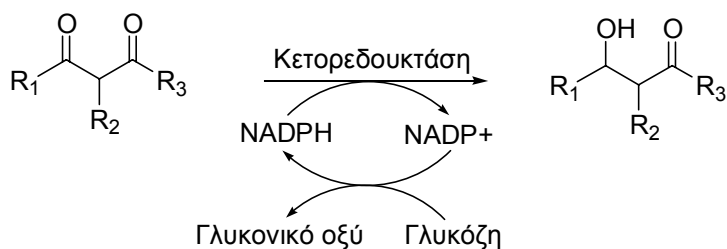
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΣΤΕΡΕΟΔΟΜΗΣ ΜΙΚΡΩΝ, ΑΚΥΚΛΩΝ α-ΑΛΚΥΛΟ-β-ΥΔΡΟΞΥ ΚΑΡΒΟΝΥΛΟ ΕΝΩΣΕΩΝ

Στην ενότητα αυτή θα παρουσιαστεί ο τρόπος προσδιορισμού της σχετικής στερεοδομής των α-άλκυλο-β-υδροξυ κετονών και εστέρων, οι οποίοι έχουν σχηματιστεί μέσω ασύμμετρης ενζυμικής αναγωγής στα προηγούμενα κεφάλαια.

Τα τελευταία χρόνια οι εργασίες, σχετικά με την μελέτη του προσδιορισμού της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών, έχουν αυξηθεί σημαντικά. Η γενική μέθοδος περιλαμβάνει την παραγοντοποίηση των υποστρωμάτων με την άγνωστη στερεοχημεία, με δυο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστηρίου.¹⁰⁴ Ωστόσο η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη για τον προσδιορισμό μόνο του ασύμμετρου κέντρου της υδροξυλομάδας και όχι για άλλα γειτονικά ασύμμετρα κέντρα. Η γνώση της σχετικής στερεοδομής δυο ασύμμετρων κέντρων είναι αρκετά χρήσιμη στον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής μιας οργανικής ένωσης.

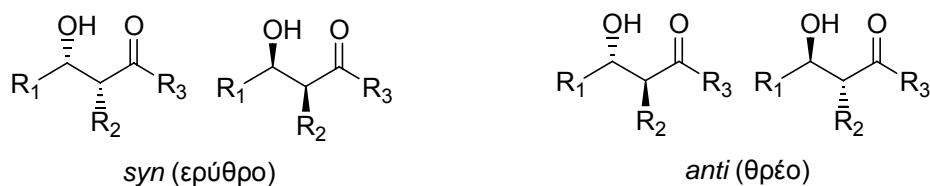
Οι α-άλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεις είναι πολύ χρήσιμα ενδιάμεσα στην οργανική σύνθεση. Όπως παρουσιάστηκε εκτενώς στα Κεφάλαια 1, 2, 3 και 4 τέτοιου είδους ενώσεις συντέθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής με ασύμμετρη ενζυμική αναγωγή των αντίστοιχων α-άλκυλο-1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων (Σχήμα 66).

Σχήμα 66. Ενζυμική σύνθεση α-άλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων.



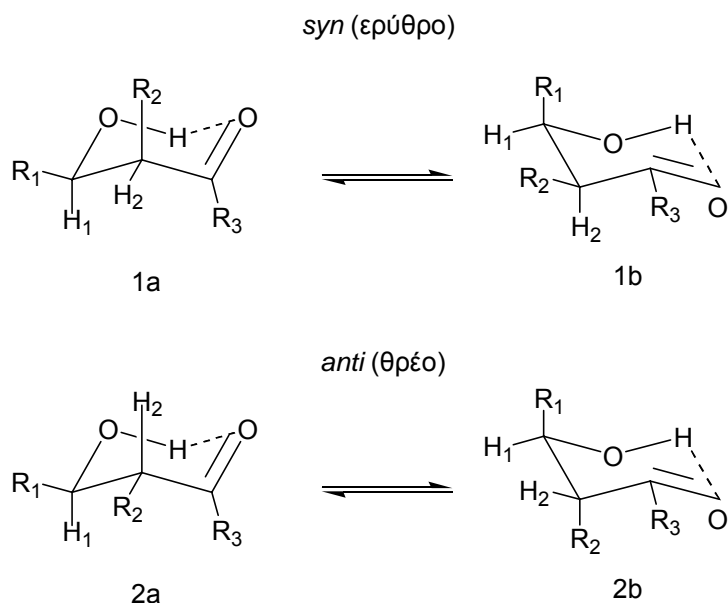
Οι ενώσεις αυτές μπορούν να βρεθούν σε δυο σχετικές διαμορφώσεις. Τη διαμόρφωση *syn* (ερύθρο) και τη διαμόρφωση *anti* (θρέο), οι οποίες είναι μεταξύ τους διαστερεομερείς (Σχήμα 67). Οπότε με τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής των ενώσεων αυτών ταυτοποιείται η μια ή η άλλη διαμόρφωση.

Σχήμα 67. Διαστερεομερείς διαμορφώσεις *syn* (ερύθρο) και *anti* (θρέο).



Οι α -αλκυλο- β -υδροξυ καρβονυλο ενώσεις είναι ιδιαίτερα μόρια διότι διαθέτουν ένα υδροξύλιο σε β -θέση σε σχέση με το καρβονύλιο. Το δομικό αυτό στοιχείο συμβάλει στην ύπαρξη ενός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου, με αποτέλεσμα να λαμβάνουν τα μόρια αυτά σε μια κυκλική διαμόρφωση (Σχήμα 68).¹⁰⁵ Όταν στις ενώσεις αυτές υπάρχει υδρογόνο σε α -θέση, τότε οι διαμορφώσεις αυτές συντελούν στη διαφοροποίηση των τιμών της σταθεράς σύζευξης μεταξύ των πρωτονίων H_1 και H_2 του *syn* και του *anti* ισομερούς, στα φάσματα 1H NMR τους, με του τελευταίου να αναμένεται μεγαλύτερη.⁹⁹







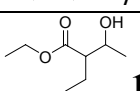
Σχήμα 68. Διαμορφωμερή των α -αλκυλο- β -υδροξυ καρβονυλο ενώσεων.



Από τα φάσματα 1H NMR των προϊόντων αναγωγής των ενζυμικών αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν, είναι δυνατός ο προσδιορισμός της σχετικής στερεοδομής μετρώντας τις τιμές της σταθεράς σύζευξης. Οι τιμές αυτές μετρήθηκαν μόνο για τις ενώσεις που δεν υπήρχε κανένα βιβλιογραφικό δεδομένο για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοχημείας και για αυτές που διαθέτουν υδρογόνο σε α -θέση.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των σταθερών σύζευξης για τις ενώσεις αυτές παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 13

Ένωση	J_{H1-H2} (<i>syn</i>) (Hz)	J_{H1-H2} (<i>anti</i>) (Hz)
 2	4.9	6.7
 3	4.0	6.2
 4	3.7	[α]
 5	4.7	6.4
 6	4.5	6.0
 7	4.5	6.3
 15	4.9	6.1

[α] Λόγω στερεοειδικότητας των ενζύμων, δεν σχηματίστηκε το *anti* ισομερές.

Από τον πίνακα είναι φανερό ότι σε όλες τις περιπτώσεις η σταθερά σύζευξης του *syn* ισομερούς είναι μικρότερη από του αντίστοιχου *anti*. Παρατηρούμε ότι οι τιμές για το $J_{(syn)}$ κυμαίνονται συστηματικά κάτω από 5Hz, ενώ για το $J_{(anti)}$ πάνω από 6Hz (Πίνακας 14).

Πίνακας 14

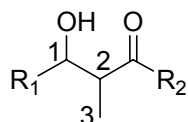
	J_{H1-H2} (Hz)
<i>syn</i> (ερύθρο)	3.7 – 4.9
<i>anti</i> (θρέο)	6.0 – 6.7

Επόμενος, από τα επαναλαμβανόμενα αυτά αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της σχετικής στερεοδομής των α-μονοϋποκατεστημένων-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων με τη λήψη φάσματος ^1H NMR και μέτρηση της σταθεράς

σύζευξης J_{H1-H2} . Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις βιβλιογραφικές προβλέψεις για την *syn* και *anti* διαμόρφωση.⁹⁹

Όσον αφορά της α-διυποκατεστημένες ενώσεις δεν θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε τη μέθοδο αυτή, καθώς δεν υπάρχει υδρογόνο σε α-θέση οπότε δεν μπορεί να μετρηθεί σταθερά σύζευξης. Το 1979 ο Heathcock δημοσίευσε ένα εύκολο τρόπο για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων, οι οποίες έχουν σε α-θέση μια μεθυλο ομάδα.¹⁰⁶ Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε ^{13}C NMR. Αυτό που παρατήρησε είναι ότι οι άνθρακες C_1 , C_2 και C_3 του *anti* ισομερούς εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τους αντίστοιχους του *syn* ισομερούς (Σχήμα 69).

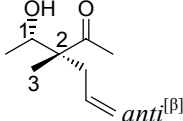
Σχήμα 69.



Η μελέτη αυτή έγινε με μεγάλο αριθμό ενώσεων και διαπιστώθηκε ότι η διαφοροποίηση αυτή συμβαίνει σε κάθε περίπτωση. Τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής μεταξύ της υδροξυλομάδας και της μεθυλομάδας σε α-θέση για τις διυποκατεστημένες υδροξυ κετόνες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 15

β-υδροξυ κετόνη	C_1	C_2	C_3
<i>syn</i> ^[α]	70.412 ppm	55.731 ppm	15.817 ppm
<i>anti</i> ^[β]	71.538 ppm	55.852 ppm	16.856 ppm
<i>syn</i> ^[α]	71.056 ppm	55.529 ppm	16.511 ppm

	71.658 ppm	55.633 ppm	17.662 ppm
---	------------	------------	------------

[α] *Syn* σχετική στερεοχημεία μεταξύ υδροξυλομάδας και μεθυλομάδας.

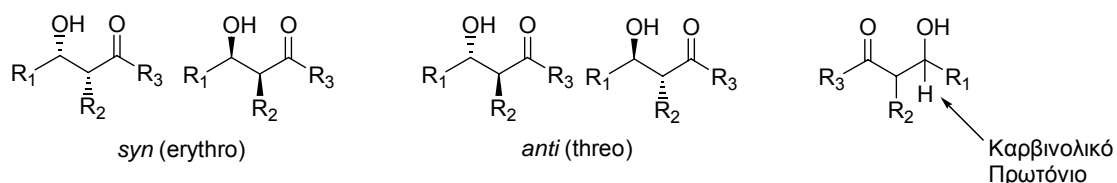
[β] *Anti* σχετική στερεοχημεία μεταξύ υδροξυλομάδας και μεθυλομάδας.

Από τον Πίνακα 15 παρατηρούμε ότι πράγματι για τα *anti* ισομερή οι χημικές μετατοπίσεις των συγκεκριμένων ανθράκων εμφανίζονται σε χαμηλότερα πεδία σε σχέση με τους αντίστοιχους των *syn* ισομερών. Το γεγονός αυτό έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τον κανόνα Heathcock με αποτέλεσμα τον εύκολο προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής και για αυτές τις ενώσεις.

ΝΕΟΣ ΤΡΟΠΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΣΤΕΡΕΟΔΟΜΗΣ ΜΙΚΡΩΝ, ΑΚΥΚΛΩΝ α-ΑΛΚΥΛΟ-β-ΥΔΡΟΞΥ ΚΑΡΒΟΝΥΛΟ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ¹H NMR.

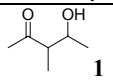
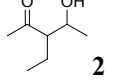
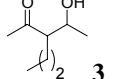
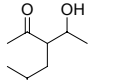
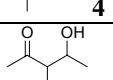
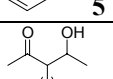
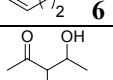
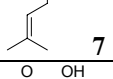
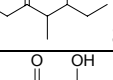
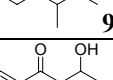
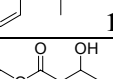
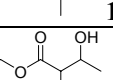
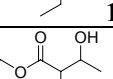
Γνωρίζοντας τη σχετική στερεοδομή όλων των α-μονοϋποκατεστημένων-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων, παρατηρήσαμε ότι η φασματοσκοπία ¹H NMR αποτελεί μια πολύ ισχυρή τεχνική για τον απευθείας προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής παρόμοιων ενώσεων. Από όλα τα φάσματα ¹H NMR των μονοϋποκατεστημένων ενώσεων διακρίναμε ότι σε κάθε περίπτωση το καρβινολικό υδρογόνο (Σχήμα 70) του *anti* ισομερούς εμφανίζεται συστηματικά σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με το αντίστοιχο του *syn* ισομερούς. Η διαφοροποίηση αυτή είναι αρκετά εμφανής ακόμα και σε μικρότερης από 500MHz ισχύος φασματόμετρο. Οπότε μετά από μια απλή χημική αναγωγή της αντίστοιχης 1,3-δικαρβονυλικής ένωσης, η σχετική στερεοδομή μπορεί πολύ εύκολα να προσδιοριστεί μόνο από τις χημικές μετατοπίσεις των καρβινολικών υδρογόνων στο φάσμα ¹H NMR. Η επαναλαμβανόμενη αυτή παρατήρηση σε τουλάχιστον είκοσι υποστρώματα (Πίνακας 16) οδηγεί στην εξαγωγή ενός νέου εμπειρικού κανόνα για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής των α-μονοϋποκατεστημένων-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων.

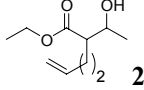
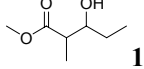
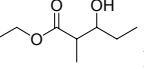
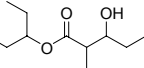
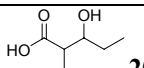
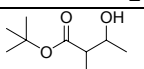
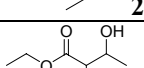
Σχήμα 70. Καρβινολικό πρωτόνιο.



Οι χημικές μετατοπίσεις του καρβινολικού πρωτονίου για τα ερύθρο και για τα θρέο ισομερή αναγράφονται στον Πίνακα 16. Επίσης φαίνεται και η διαφοροποίηση ($\Delta^{\delta \text{ syn anti}}$) μεταξύ των καρβινολικών πρωτονίων των δυο ισομερών.

Πίνακας 16

Entry	Υδροξυ καρβονυλο ένωση	Καρβινολικό πρωτόνιο ^[a]		$\Delta^{\delta \text{ syn anti}}$ (ppm) ^[a]
		<i>syn</i> (ppm)	<i>anti</i> (ppm)	
1		4.126	3.914	0.212
2		3.997	3.948	0.049
3		3.979	3.912	0.067
4		3.968	3.859	0.109
5		4.025	3.936	0.089
6		3.982	3.910	0.072
7		4.020	3.929	0.091
8		3.806	3.609	0.197
9		4.089	3.904	0.185
10		4.246	4.108	0.138
11		4.062	3.872	0.190
12		3.979	3.925	0.054
13		4.014	3.928	0.086

14		3.991	3.909	0.082
15		3.809	3.587	0.222
16		3.805	3.583	0.222
17		3.800	3.568	0.232
18		3.876	3.640	0.236
19		3.935	3.869	0.066
20		4.090	4.004	0.086

[α] Όλες οι χημικές μετατοπίσεις υπολογίστηκαν για το ρακεμικό μίγμα σε διάλυμα CDCl₃.

Για όλες τις περιπτώσεις η απορρόφηση του καρβονικού πρωτονίου για το *syn* διαστερομερές κυμαίνεται μεταξύ 3.800 ppm (Entry 17) έως 4.246 ppm (Entry 10), ενώ για το *anti* μεταξύ 3.568 ppm (Entry 17) έως 4.108 ppm (Entry 10). Η διαφοροποίηση $\Delta^{\delta \text{ syn anti}}$ κυμαίνεται μεταξύ 0.049 ppm (Entry 2) έως 0.236 (Entry 18) (Πίνακας 17).

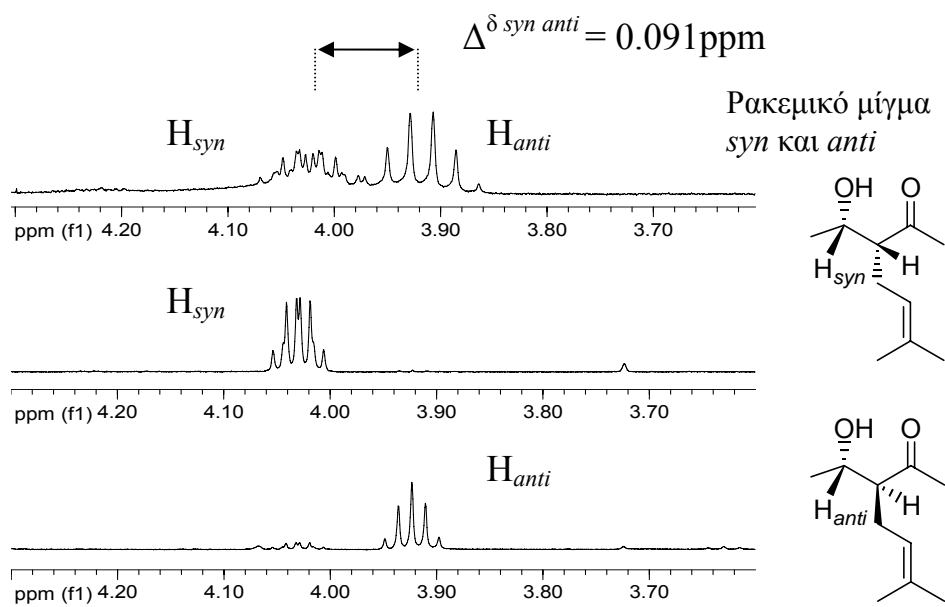
Πίνακας 17

	Καρβονικό πρωτόνιο (ppm)	$\Delta^{\delta \text{ syn anti}}$ (ppm)
<i>syn</i> (erythro)	3.800 – 4.246	0.049 – 0.236
<i>anti</i> (threo)	3.568 – 4.108	

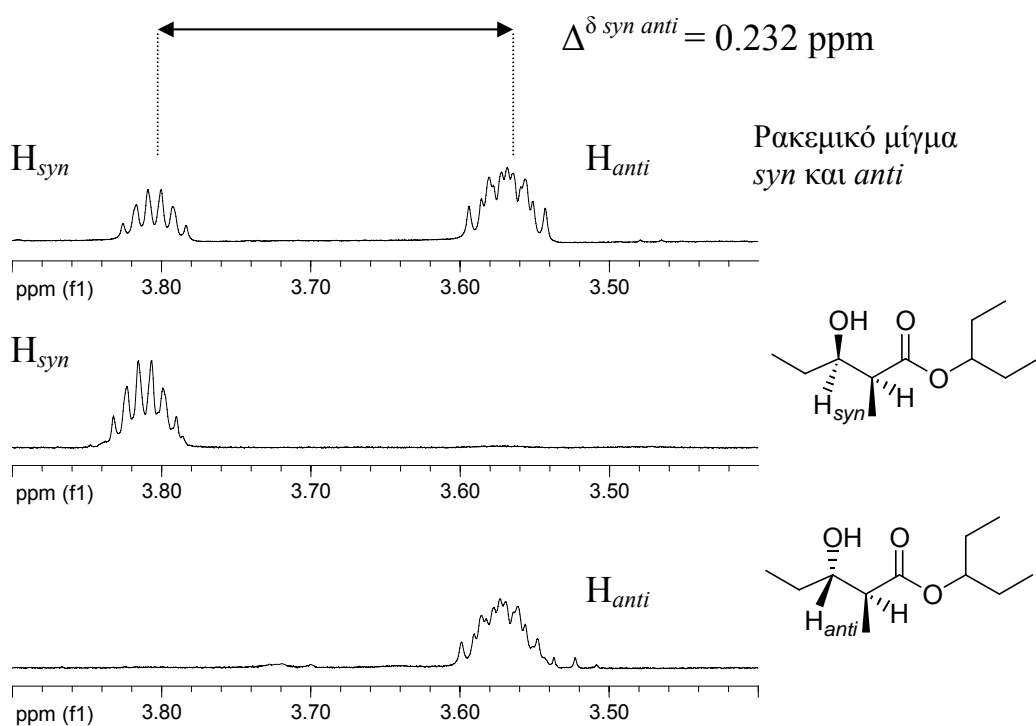
Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα (Entry 7 και 17) όπου φαίνεται καθαρά η διαφοροποίηση $\Delta^{\delta \text{ syn anti}}$ των καρβονικών πρωτονίων.

Σχήμα 71. Προσδιορισμός $\Delta^{\delta_{syn\ anti}}$ των καρβινολικών πρωτονίων από το φάσμα ^1H NMR.

ENTRY 7



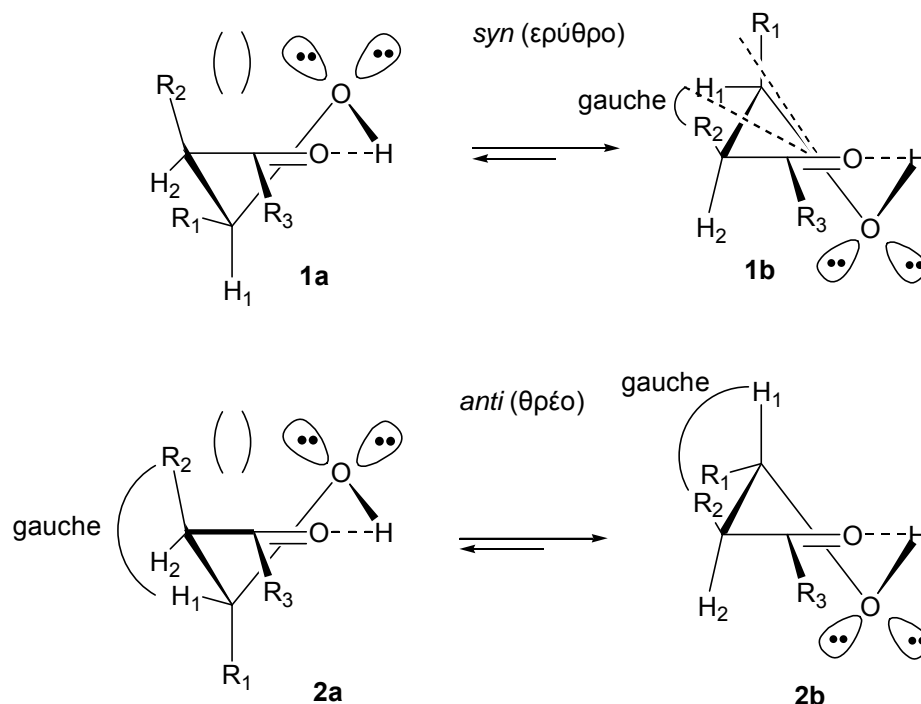
ENTRY 17



Όπως ήδη αναφέρθηκε οι α-υποκατεστημένες-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεις είναι ιδιαίτερα μόρια καθότι διαθέτουν ένα υδροξύλιο σε β-θέση σε σχέση με το

καρβονύλιο, γεγονός που συμβάλει στην ύπαρξη ενός ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου. Έτσι τα μόρια αυτά βρίσκονται σε μια κυκλική διαμόρφωση τύπου half chair (Σχήμα 72).

Σχήμα 72. Διαμορφωμερή των α-αλκυλο-β-υδροξυ καρβονυλο ενώσεων.



Η μετατόπιση του καρβινολικού πρωτονίου του *anti* ισομερούς σε υψηλότερα πεδία μπορεί να εξηγηθεί με δυο τρόπους. Με το φαινόμενο της μαγνητικής ανισοτροπίας αλλά και με τον αριθμό των στεreoχημικών αλληλεπιδράσεων του υδρογόνου H₁.

Το φαινόμενο της μαγνητικής ανισοτροπίας¹⁰⁷ εξηγεί τον λόγο για τον οποίο τα αξονικά πρωτόνια εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με τα ισημερινά.¹⁰⁸ Το ίδιο συμβαίνει στην περίπτωση των υδροξυ κετονών. Αν εξεταστούν οι διαμορφώσεις των *syn* και *anti* υδροξυ κετονών στο Σχήμα 72 φαίνεται ότι οι διαμορφώσεις **1b** και **2b** είναι σταθερότερες σε σχέση με τις **1a** και **2a** αντίστοιχα. Δηλαδή η ισορροπία είναι μετατοπισμένη προς τα δεξιά, όπως φαίνεται στο Σχήμα 72. Αυτό οφείλεται στην στεreoχημική αλληλεπίδραση του R₂ υποκαταστάτη (στις διαμορφώσεις **1a** και **2a**) με τα αδεδμικά ζεύγη ηλεκτρονίων του οξυγόνου της υδροξυλομάδας. Από τις σταθερότερες διαμορφώσεις **1b** και **2b**, μόνο στην **1b** το υδρογόνο H₁ είναι ισημερινό. Εξαιτίας του φαινομένου της μαγνητικής ανισοτροπίας

δημιουργείται ένας κώνος αποπροστασίας ο οποίος αποπροστατεύει το ισημερινό υδρογόνο σε σχέση με το αξονικό. Μεταξύ όμως των διαμορφώσεων **1b** και **2b**, μόνο στην **1b** υπάρχει ισημερινό υδρογόνο (H_1) το οποίο και αποπροστατεύεται. Άρα τελικά το H_1 υδρογόνο για το *syn* διαμορφωμένες είναι περισσότερο αποπροστατευμένο από το αντίστοιχο του *anti* διαμορφωμένους και έτσι εμφανίζεται σε χαμηλότερα πεδία.

Όσον αφορά την εξήγηση με τις στερεοχημικές αλληλεπιδράσεις μελετώντας και τις τέσσερις διαμορφώσεις του σχήματος 72, φαίνεται ότι μόνο στο ένα διαμορφωμένες του *syn* ισομερούς (το **1b**) υπάρχει στερεοχημική τάση μεταξύ του υδρογόνου H_1 και του R_2 υποκαταστάτη (*gauche* διαμόρφωση). Στην περίπτωση όμως του *anti* ισομερούς, στερεοχημικές τάσεις μεταξύ του υδρογόνου H_1 και του R_2 υποκαταστάτη (*gauche* διαμόρφωση), υπάρχουν και στο **2a** αλλά και στο **2b** διαμορφωμένες. Εξαιτίας λοιπόν των περισσότερων στερεοχημικών αλληλεπιδράσεων του υδρογόνου H_1 στο *anti* ισομερές, το καρβινολικό αυτό πρωτόνιο προστατεύεται περισσότερο και άρα εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία.

Συνοψίζοντας, η σχετική στερεοδομή των μικρών και άκυκλων α-μονοϋποκατεστημένων-β-υδροξυ ενώσεων μπορεί πολύ εύκολα να προσδιοριστεί με φασματοσκοπία NMR πρωτονίου. Ο προσδιορισμός μπορεί να γίνει συγκρίνοντας απλά τα φάσματα 1H NMR του ρακεμικού μίγματος (το οποίο προκύπτει με μια απλή αναγωγή της 1,3-δικαρβονυλικής ένωσης με $NaBH_4$) με αυτά των οπτικά καθαρών υδροξυ ενώσεων. Όλες οι άκυκλες υδροξυ ενώσεις παρασκευάστηκαν πρώτα με χημική αναγωγή των αντίστοιχων 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων και στη συνέχεια ενζυμικά. Σε όλες τις περιπτώσεις η διαφοροποίηση μεταξύ των καρβινολικών πρωτονίων στο ρακεμικό μίγμα (προϊόν χημικής αναγωγής) είναι αρκετά ευδιάκριτες για να χαρακτηριστεί ποιο είναι το ερυθρό και ποιο το θρέο ισομερές.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Γενικές μέθοδοι

Η λήψη των φασμάτων ^1H NMR έγινε με φασματόμετρο 300 MHz και 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα CDCl_3 και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS).

Οι ρακεμικές υδροξυ καρβονυλο ενώσεις παρασκευάστηκαν με αντίδραση αναγωγής των αντίστοιχων δικαρβονυλικών ενώσεων με NaBH_4 . Οι οπτικώς ενεργές υδροξυ καρβονυλο ενώσεις παρασκευάστηκαν με αντίδραση ενζυμικής αναγωγής των αντίστοιχων δικαρβονυλικών ενώσεων με τις απομονωμένες κετορεδοουκτάσες. Οι πειραματικές διαδικασίες έχουν ήδη αναφερθεί στα Κεφάλαια 2, 3, 4.

Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα ^1H NMR για τις ενώσεις **14**, **15**, **16**, **20**, **21**, **22** και **23**. Οι υπόλοιπες έχουν ήδη παρουσιαστεί στα Κεφάλαια 2,3 και 4.

Υδροξυ εστέρας **14** (ρακεμικός)

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 4.14 (q, $J=6.9\text{Hz}$, 4H), 3.98 – 4.09 (m, 1H), 3.78 – 3.91 (m, 1H), 2.34 – 2.53 (m, 2H), 1.25 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 6H), 1.19 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.16 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 6H), 1.15 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

Συν-υδροξυ εστέρας **14**¹⁰⁹

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 4.14 (q, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 3.98 – 4.09 (m, 1H), 2.41 – 2.53 (m, 1H), 1.25 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.16 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.15 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ εστέρας **15** (ρακεμικός)

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 4.17 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 4.16 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.85 – 4.03 (m, 2H), 2.22 – 2.35 (m, 2H), 1.59 – 1.75 (m, 4H), 1.26 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.25 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.20 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.17 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.92 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.91 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Συν-υδροξυ εστέρας **15**

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 4.16 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.90 – 4.02 (m, 1H), 2.24 – 2.36 (m, 1H), 1.59 – 1.74 (m, 2H), 1.26 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.17 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.91 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ εστέρας 16 (ρακεμικός)

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 5.64 – 5.87 (m, 2H), 4.96 – 5.16 (m, 4H), 4.15 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 4.14 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 3.95 – 4.05 (m, 1H), 3.85 – 3.95 (m, 1H), 2.33 – 2.56 (m, 6H), 1.25 (t, *J*=7.2Hz, 6H), 1.20 (d, *J*=6.3Hz, 6H).

Συν-υδροξυ εστέρας 16¹¹⁰

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 5.69 – 5.86 (m, 1H), 4.96 – 5.13 (m, 2H), 4.14 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 3.95 – 4.05 (m, 1H), 2.34 – 2.55 (m, 3H), 1.25 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 1.19 (d, *J*=6.6Hz, 3H).

Anti-υδροξυ εστέρας 16¹¹⁰

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 5.64 – 5.83 (m, 1H), 4.97 – 5.14 (m, 2H), 4.15 (q, *J*=7.2Hz, 2H), 3.85 – 3.96 (m, 1H), 2.34 – 2.48 (m, 3H), 1.25 (t, *J*=7.2Hz, 3H), 1.21 (d, *J*=6.3Hz, 3H).

Υδροξυ εστέρας 21 (ρακεμικός)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 5.73 – 5.83 (m, 2H), 4.97 – 5.06 (m, 4H), 4.19 (q, *J*=7.5Hz, 2H), 4.18 (q, *J*=7.5Hz, 2H), 3.96 – 4.02 (m, 1H), 3.87 – 3.94 (m, 1H), 2.49 (bs, 1H), 2.38 – 2.45 (m, 2H), 2.35 (bs, 1H), 1.99 – 2.16 (m, 4H), 1.77 – 1.85 (m, 2H), 1.65 – 1.72 (m, 2H), 1.29 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 1.28 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 1.23 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.20 (d, *J*=6.5Hz, 3H).

Συν-υδροξυ εστέρας 21¹¹¹

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 5.74 – 5.82 (m, 1H), 4.96 – 5.05 (m, 2H), 4.18 (q, *J*=7.5Hz, 2H), 3.95 – 4.02 (m, 1H), 2.40 – 2.45 (m, 1H), 2.39 (bs, 1H), 1.99 – 2.16 (m, 2H), 1.77 – 1.85 (m, 1H), 1.65 – 1.72 (m, 1H), 1.28 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 1.19 (d, *J*=6.5Hz, 3H).

Υδροξυ οξύ 20 (ρακεμικό)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.85 – 3.90 (m, 1H), 3.61 – 3.67 (m, 1H), 2.55 – 2.65 (m, 2H), 1.45 – 1.68 (m, 4H), 1.25 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.21 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.00 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.99 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Συν-υδροξυ οξύ 20

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 3.84 – 3.91 (m, 1H), 2.59 – 2.65 (m, 1H), 1.45 – 1.57 (m, 2H), 1.21 (d, *J*=7.2 Hz, 3H), 0.99 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

Υδροξυ εστέρας 22 (ρακεμικός)

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 3.91 – 3.97 (m, 1H), 3.83 – 3.89 (m, 1H), 2.69 (bs, 1H), 2.47 (bs, 1H), 2.16 – 2.25 (m, 2H), 1.57 – 1.74 (m, 4H), 1.48 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.95 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.94 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Anti-υδροξυ εστέρας 22

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 3.83 – 3.89 (m, 1H), 2.69 (bs, 1H), 2.16 – 2.20 (m, 1H), 1.59 – 1.74 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.94 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

Υδροξυ εστέρας 23 (ρακεμικός)

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 4.18 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 4.17 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 4.02 – 4.16 (m, 1H), 3.90 – 4.02 (m, 1H), 2.00 – 2.17 (m, 2H), 1.27 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.25 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.20 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 1.17 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 1.00 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.96 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.94 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.89 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

Syn-υδροξυ εστέρας 23

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.13 – 4.22 (m, 2H), 4.06 – 4.12 (m, 1H), 2.28 – 2.32 (m, 1H), 2.09 – 2.16 (m, 1H), 1.28 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 1.23 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H), 0.99 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.97 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

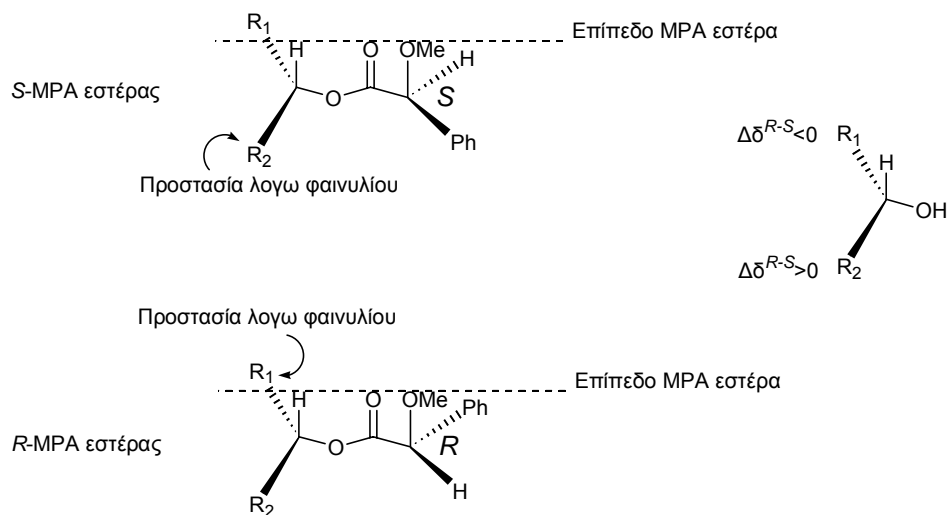
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΣΤΕΡΕΟΔΟΜΗΣ ΤΩΝ α - ΑΛΚΥΛΟ- β -ΥΔΡΟΞΥ ΚΕΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΕΣΤΕΡΩΝ

Ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των οργανικών ενώσεων βασίζεται ολοένα και περισσότερο σε απλές και αξιόπιστες μεθόδους. Η κλασική μέθοδος ανισοτροπίας, την οποία εισήγαγαν και αξιοποίησαν οι Dale και Mosher,¹¹² ο Trost και οι συνεργάτες του¹¹³ και άλλοι,¹¹⁴ συνεχίζει να αποτελεί την απλούστερη και πιο αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής δευτεροταγών αλκοολών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων (στο φάσμα $^1\text{H NMR}$) των δυο διαστερομερών εστέρων οι οποίοι προκύπτουν με παραγοντοποίηση της αλκοόλης με τα δυο εναντιομερή ενός χειρόμορφου αντιδραστήριου ανισοτροπίας, όπως το α -μεθοξυ-τριφθορομεθυλοφαινυλοξικό οξύ (MTPA) ή α -μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ MPA.

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα διαμόρφωσης για διάφορα χειρόμορφα αντιδραστήρια ανισοτροπίας τα οποία εξηγούν τα φάσματα $^1\text{H NMR}$ και προβλέπουν την απόλυτη στερεοδομή των ενώσεων.

Το χειρόμορφο αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν το α -μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (MPA). Αποδείχτηκε κατάλληλο για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των ενώσεων που μελετήθηκαν. Το μοντέλο διαμόρφωσης που προτείνεται για το αντιδραστήριο αυτό φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

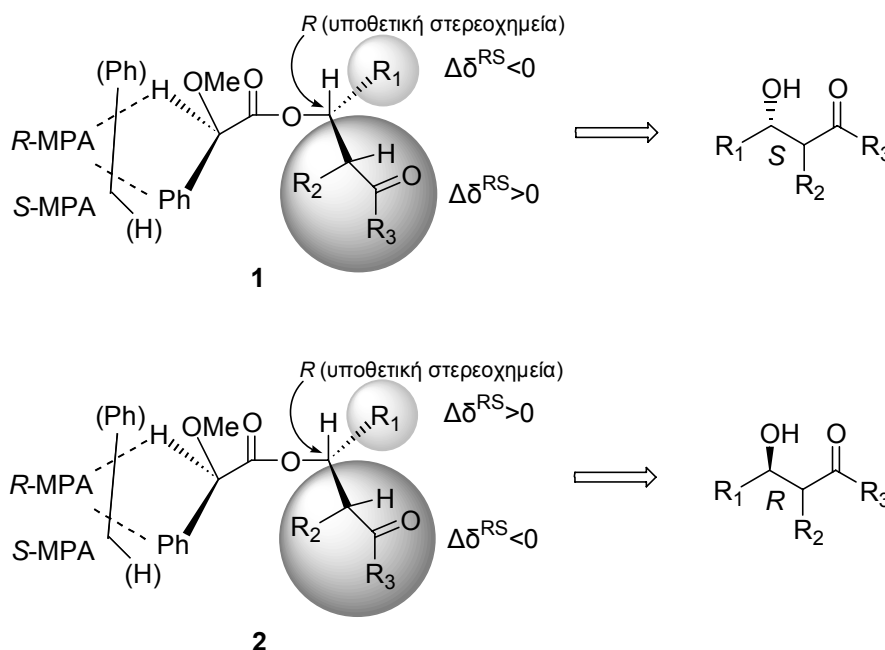
Σχήμα 73. Μοντέλο διαμόρφωσης για τους (R)-MPA και (S)-MPA εστέρες των δευτεροταγών αλκοολών.



Όπως φαίνεται στο Σχήμα 73, μετά την εστεροποίηση της δευτεροταγούς αλκοόλης και με τα δυο εναντιομερή του MPA, η επικρατέστερη διαμόρφωση των MPA-εστέρων είναι αυτή η οποία περιλαμβάνει το υδρογόνο της αλκοόλης, το καρβονύλιο και την μεθύξυ ομάδα στο ίδιο επίπεδο. Αυτό σημαίνει ότι κάθε υποκαταστάτης της αλκοόλης (R_1 , R_2) έχει απέναντί του ένα συγκεκριμένο υποκαταστάτη, είτε υδρογόνο, είτε φαινύλιο. Για παράδειγμα, η ομάδα R_1 του *R*-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα φαινύλιο, ενώ η R_2 ένα υδρογόνο. Αντιθέτως, η ομάδα R_1 του *S*-MPA εστέρα έχει απέναντι ένα υδρογόνο, ενώ η R_2 ένα φαινύλιο. Γενικά οι ομάδες οι οποίες είναι εκλειπτικές ως προς το φαινύλιο εμφανίζονται σε υψηλότερα πεδία στο φάσμα ^1H NMR, λόγω προστασίας. Έτσι στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ομάδα R_1 του *R*-MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία (χαμηλές τιμές χημικών μετατοπίσεων-ppm) σε σχέση με την αντίστοιχη του *S*-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις χημικές μετατοπίσεις στο φάσμα ^1H NMR για την ομάδα R_1 μεταξύ του *R*-MPA και του *S*-MPA εστέρα να είναι αρνητική ($\Delta\delta^{R-S} < 0$). Αντιθέτως για την ομάδα R_2 , στον *S*-MPA εστέρα, λόγω του φαινυλίου, εμφανίζεται σε υψηλότερα πεδία σε σχέση με την αντίστοιχη του *R*-MPA εστέρα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η διαφορά στις μετατοπίσεις για την ομάδα R_2 μεταξύ του *R*-MPA και του *S*-MPA εστέρα να είναι θετική ($\Delta\delta^{R-S} > 0$). Λόγω των διαφοροποιήσεων αυτών στα φάσματα ^1H NMR των *R*-MPA και *S*-MPA εστέρων, σε κάθε περίπτωση είναι δυνατός ο προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των δευτεροταγών αλκοολών.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των α -αλκυλο- β -υδροξυ κετονών και των α -αλκυλο- β -υδροξυ εστέρων. Ο κανόνας εφαρμόστηκε ύστερα από μετατροπή όλων των αλκοολών και στα δυο εναντιομερή του MPA εστέρα. Η απόλυτη στερεοδομή προσδιορίστηκε βάσει του Σχήματος 2. Αρχικά θεωρούμε μια υποθετική στερεοχημεία για την αλκοόλη. Μετά τη μετατροπή της στους αντίστοιχους *R* και *S* MPA εστέρες, αν τα $\Delta\delta^{R-S}$ συμφωνούν με το μοντέλο του Σχήματος 73, τότε η στερεοδομή είναι αυτή που υποθέσαμε αρχικά. Αν δεν συμφωνούν, τότε η στερεοδομή της είναι η αντίστροφη. Στο Σχήμα 74 η στερεοχημεία της αλκοόλης θεωρήθηκε αρχικά *R*. Στη διαμόρφωση **1** του Σχήματος 74 τα $\Delta\delta^{R-S}$ δεν συμφωνούν με το μοντέλο του Σχήματος 73, οπότε η απόλυτη στερεοχημεία της αλκοόλης δεν είναι *R*, αλλά *S*. Στη διαμόρφωση **2** τα $\Delta\delta^{R-S}$ συμφωνούν με το μοντέλο, οπότε η απόλυτη στερεοχημεία της αλκοόλης είναι αυτή που υποθέσαμε αρχικά, δηλαδή *R*.

Σχήμα 74. Προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής των α -αλκυλο- β -υδροξυ κετονών και των α -αλκυλο- β -υδροξυ εστέρων.

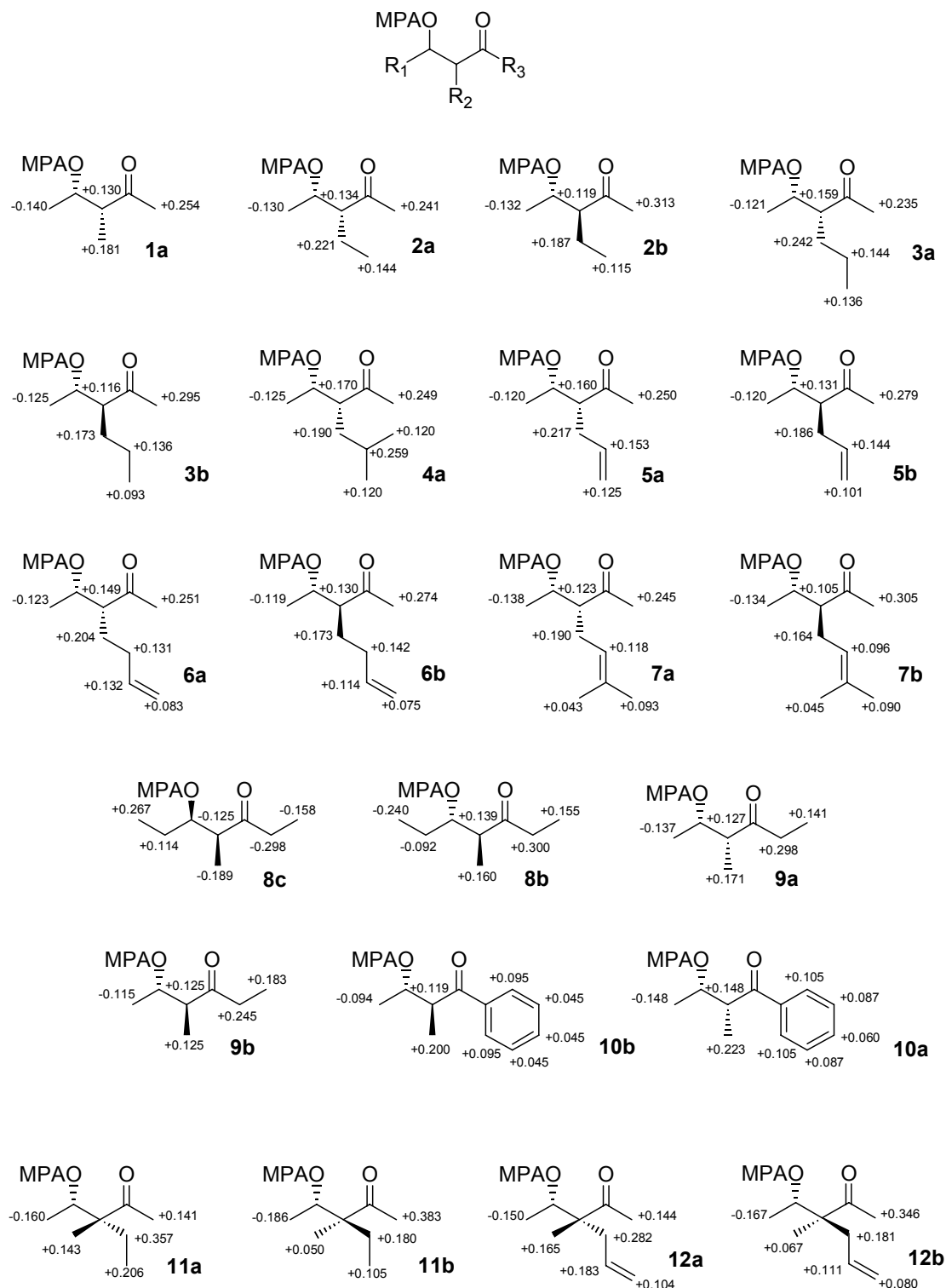


Ο κανόνας αυτός αποδείχτηκε αρκετά αξιόπιστος, καθώς για όλες τις αλκοόλες που μελετήσαμε το $\Delta\delta^{R-S}$ ήταν αρκετά ευδιάκριτο για να προσδιοριστεί. Τα δεδομένα των τιμών $\Delta\delta^{R-S}$ για τα πρωτόνια των α -αλκυλο- β -υδροξυ κετονών παρουσιάζονται στο Σχήμα 75. Από το σχήμα αυτό φαίνεται καθαρά πόσο αξιόπιστη είναι η μέθοδος με τους MPA-εστέρες. Για κάθε αλκοόλη ήταν δυνατό να μετρηθούν οι τιμές $\Delta\delta^{R-S}$ και έτσι να υπολογιστεί η απόλυτη στερεοδομή. Το σημαντικό στην περίπτωση αυτή είναι ότι όταν οι τιμές $\Delta\delta^{R-S}$ από την μια πλευρά του υδροξυλίου είναι αρνητικές, τότε από την άλλη είναι θετικές και το αντίστροφο. Το γεγονός αυτό συμφωνεί απόλυτα με τον κανόνα αυτόν και αν δεν συνέβαινε έστω και για ένα πρωτόνιο τότε η στερεοδομή δεν θα μπορούσε να προσδιοριστεί αξιόπιστα. Για τις αλκοόλες όπου το $\Delta\delta^{R-S}$ ήταν αρνητικό από την R_1 ομάδα, ενώ από την άλλη πλευρά ήταν θετικό, τότε η απόλυτη στερεοδομή ήταν *S*. Στην περίπτωση όμως που συνέβη το αντίθετο (αλκοόλη **8c**, Σχήμα 75) τότε η απόλυτη στερεοδομή ήταν *R*. Τα $\Delta\delta^{R-S}$ κυμάνθηκαν μεταξύ $|0.043|$ (**7a**) έως $|0.383|$ (**11b**), τιμές οι οποίες είναι αρκετά μεγάλες για να εξαχθεί ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα.

Έτσι γνωρίζοντας τη σχετική στερεοδομή των α -αλκυλο- β -υδροξυ κετονών (Κεφάλαιο 5) και μετά τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής του υδροξυλίου

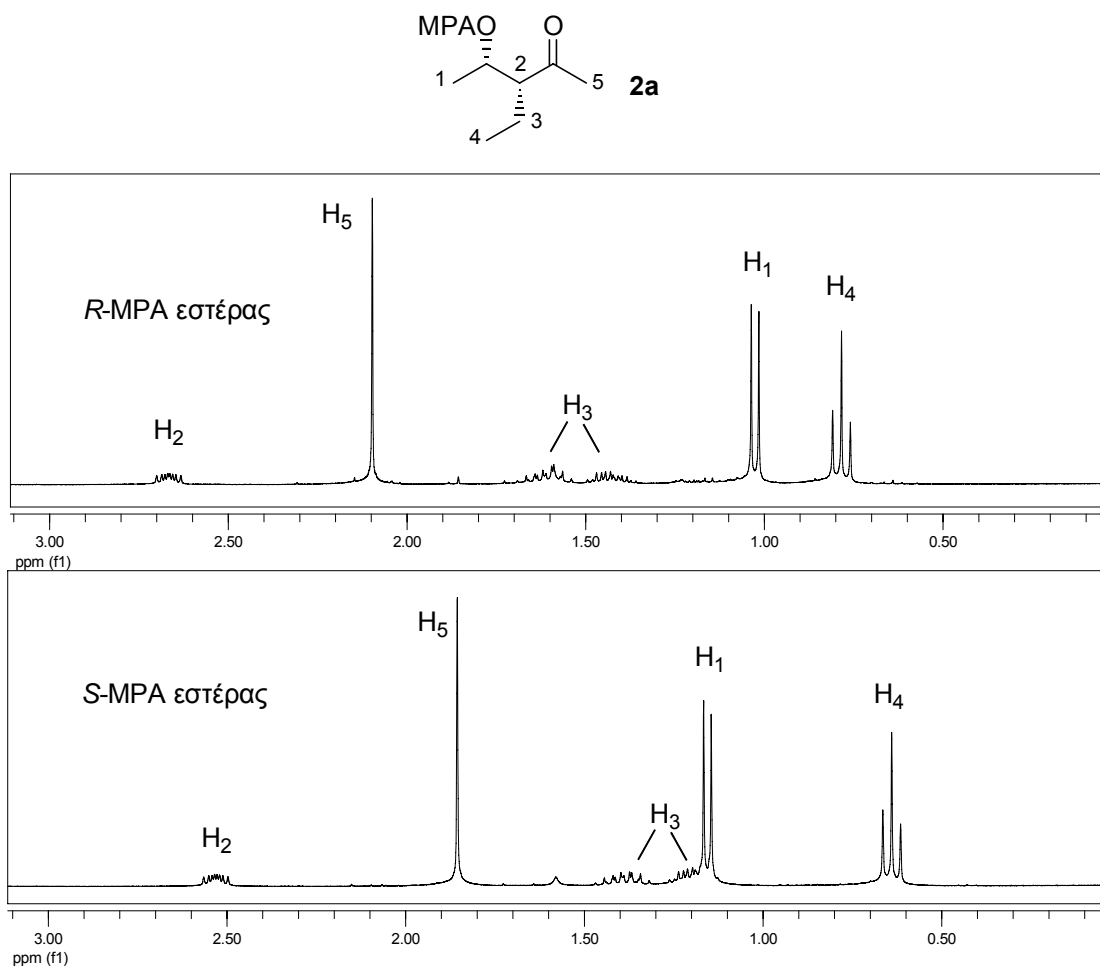
από τη μελέτη των ^1H NMR φασμάτων των *R* και *S* MPA εστέρων τους, προσδιορίστηκε η απόλυτη στεreoχημεία των ενώσεων αυτών πλήρως.

Σχήμα 75. Οι τιμές των $\Delta\delta^{R-S}$ για τα πρωτόνια των MPA εστέρων των α -αλκυλο- β -υδροξυ κετονών.



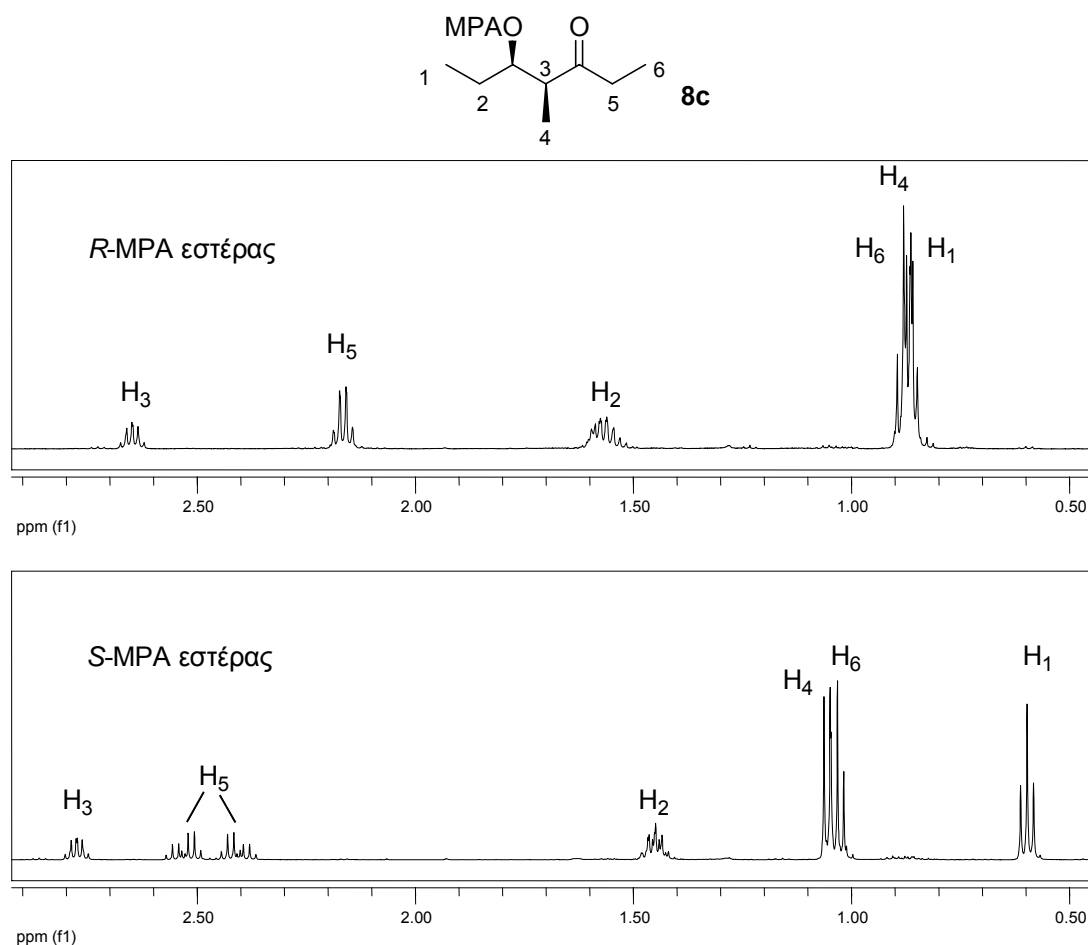
Στα παρακάτω φάσματα παρουσιάζονται δυο χαρακτηριστικά παραδείγματα από τα οποία φαίνεται πώς προκύπτει η απόλυτη στερεοδομή των δευτεροταγών αλκοολών, για τις υδροξυ κετόνες **2a** και **8c**, από το φάσμα ^1H NMR των αντίστοιχων *R*-MPA και *S*-MPA εστέρων.

Σχήμα 76. Προσδιορισμός της απόλυτης στερεοδομής της δευτεροταγούς αλκοόλης **2a** με φασματοσκοπία ^1H NMR.



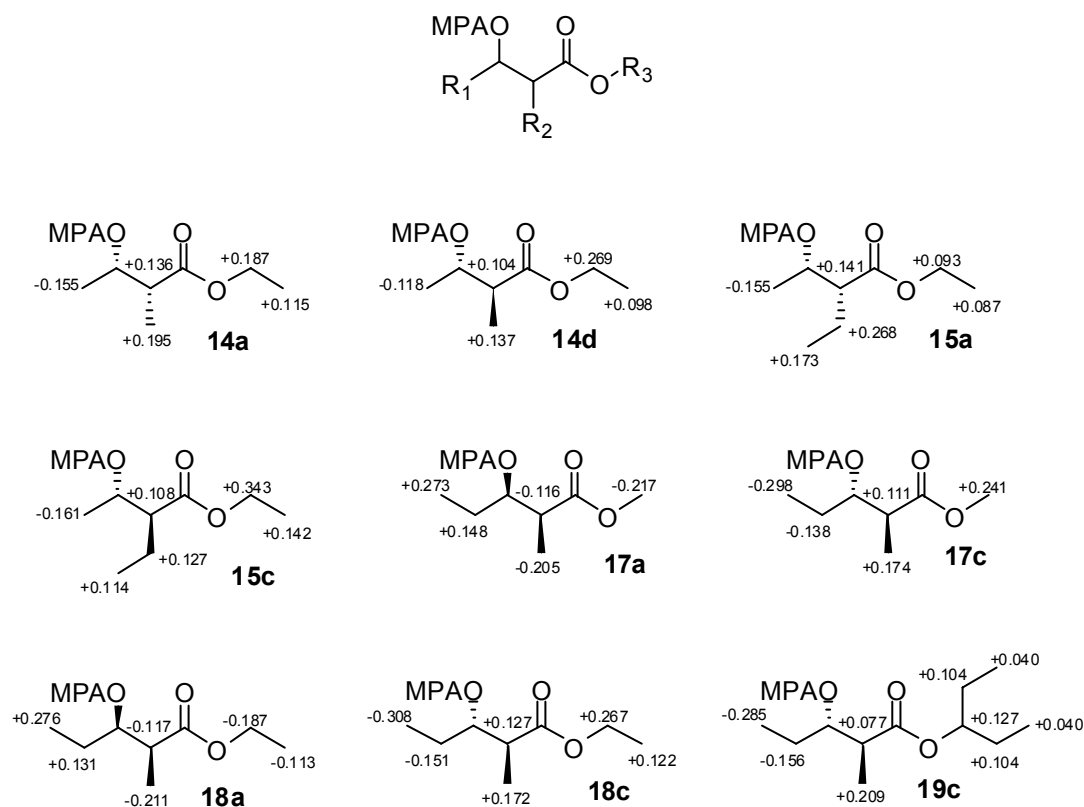
Από το Σχήμα 76 παρατηρούμε ότι το $\Delta\delta^{R-S}$ των υδρογόνων H₁ είναι αρνητικό (-0.130) ενώ για τα υπόλοιπα υδρογόνα θετικό (+0.134 H₂, +0.221 H₃, +0.144 H₄ και +0.241 H₅). Οπότε η απόλυτη στερεοχημεία για την δευτεροταγή υδροξυλομάδα της ένωσης **2a** είναι *S*. Το αντίστροφο αποτέλεσμα παρατηρούμε για την αλκοόλη **8c** (Σχήμα 77). Το $\Delta\delta^{R-S}$ των υδρογόνων H₁ και H₂ είναι θετικό (+0.267 και +0.114 αντίστοιχα), ενώ για τα υπόλοιπα υδρογόνα αρνητικό (-0.125 H₃, -0.189 H₄, -0.298 H₅, -0.158 H₆). Οπότε η απόλυτη στερεοχημεία για την δευτεροταγή υδροξυλομάδα της ένωσης **8c** είναι *R*.

Σχήμα 77. Προσδιορισμός της απόλυτης στεreoχημείας της δευτεροταγούς αλκοολής **8c** με φασματοσκοπία ^1H NMR.



Η ίδια ακριβώς μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των α -αλκυλο- β -υδροξυ εστέρων. Και σε αυτή την περίπτωση οι β -υδροξυ εστέρες μετατράπηκαν στους αντίστοιχους *R* και *S*-MPA εστέρες. Οι τιμές των $\Delta\delta^{R-S}$ για τα πρωτόνια των MPA εστέρων των α -αλκυλο- β -υδροξυ εστέρων παρουσιάζονται στο Σχήμα 78. Και σε αυτή την περίπτωση η εφαρμογή της μεθόδου αποδείχτηκε πολύ ικανοποιητική. Τα $\Delta\delta^{R-S}$ κυμάνθηκαν μεταξύ $|0.040|$ (**18c**) έως $|0.343|$ (**15c**), τιμές οι οποίες είναι αρκετά μεγάλες για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η απόλυτη στερεοδομή των αλκοολών. Για όλες τις αλκοόλες η απόλυτη στερεοδομή βρέθηκε *S*, εκτός από τις **17a** και **18a**, όπου βρέθηκε *R*. Για τις *S* αλκοόλες τα πρωτόνια του R₁ υποκαταστάτη είχαν αρνητικές τιμές $\Delta\delta^{R-S}$, ενώ οι υπόλοιποι είχαν θετικές. Το αντίστροφο συνέβη για τις *R* αλκοόλες, όπου τα πρωτόνια του R₁ υποκαταστάτη είχαν θετικές τιμές $\Delta\delta^{R-S}$, ενώ οι υπόλοιποι είχαν αρνητικές.

Σχήμα 78. Οι τιμές των $\Delta\delta^{R-S}$ για τα πρωτόνια των MPA εστέρων των α -αλκυλο- β -υδροξυ εστέρων.

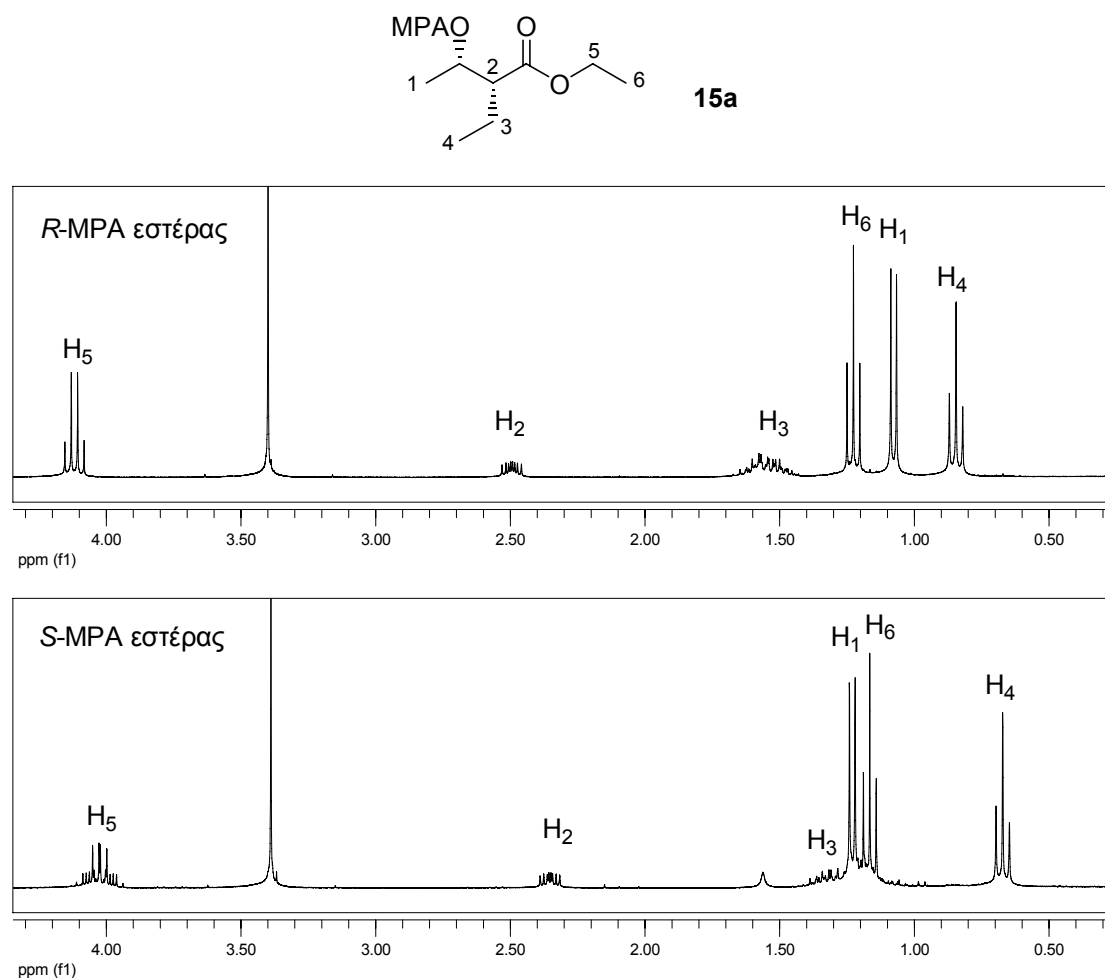


Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται ένα χαρακτηριστικό παραδείγματα στο οποίο παρουσιάζεται πώς προκύπτει η απόλυτη στερεοδομή της δευτεροταγούς αλκοόλης, για τον υδροξυ εστέρα **15a**, από το φάσμα ¹H NMR των αντίστοιχων *R*-MPA και *S*-MPA εστέρων. Από το Σχήμα 79 παρατηρούμε ότι το $\Delta\delta^{R-S}$ των υδρογόνων H₁ είναι αρνητικό (-0.155) ενώ για τα υπόλοιπα υδρογόνα θετικό (+0.141 H₂, +0.268 H₃, +0.173 H₄, +0.093 H₅ και +0.087 H₆). Οι τιμές αυτές είναι αρκετά εμφανείς ακόμα και σε φασματόμετρο χαμηλότερης διακριτικής ικανότητας των 500 MHz, οπότε είναι δυνατό να προσδιοριστεί πολύ εύκολα η απόλυτη στερεοδομή για την δευτεροταγή υδροξυλομάδα της ένωσης **15a**, η οποία είναι *S*.

Συνοψίζοντας, η μέθοδος της ανισοτροπίας με το χειρόμορφο αντιδραστήριο α -μεθοξυ φαινυλοξικό οξύ (MPA), χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της απόλυτης στερεοδομής των 22 α -αλκυλο- β -υδροξυ κετονών και των 9 α -αλκυλο- β -υδροξυ εστέρων, οι οποίοι σχηματίστηκαν από τις ασύμμετρες ενζυμικές αναγωγές με τις κετορεδουκτάσες. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε αρκετά εύκολη και αξιόπιστη, καθώς σε κάθε περίπτωση ήταν δυνατή η ταυτοποίηση της απόλυτης στερεοδομής των δευτεροταγών αλκοολών. Η μέθοδος βασίστηκε στην μέτρηση των τιμών $\Delta\delta^{R-S}$

μεταξύ των *R*-MPA και *S*-MPA εστέρων των προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων που μελετήσαμε.

Σχήμα 79. Προσδιορισμός της απόλυτης στεreoχημείας της δευτεροταγούς αλκοόλης **15a** με φασματοσκοπία ^1H NMR.



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

1. Γενικές μέθοδοι

Όλες οι οπτικώς ενεργές α-αλκυλο-β-υδροξυ κετόνες και οι α-αλκυλο-β-υδροξυ εστέρες παρασκευάστηκαν με ενζυμική αναγωγή των αντίστοιχων δικαρβονυλικών ενώσεων, χρησιμοποιώντας τις απομονωμένες κετορεδουκτάσες.

Οι οπτικώς ενεργοί MPA εστέρες παρασκευάστηκαν με αντιδράσεις εστεροποίησης μεταξύ των δευτεροταγών αλκοολών και των δυο εναντιομερών του α-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος.

Η λήψη των φασμάτων ^1H NMR έγινε με φασματόμετρα 300 MHz και 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα CDCl_3 και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλο σιλάνιο (TMS).

1.1 Σύνθεση των MPA εστέρων των α-αλκυλο-β-υδροξυ κετονών και α-αλκυλο-β-υδροξυ εστέρων.¹¹⁵

Σε διάλυμα της αντίστοιχης δευτεροταγούς αλκοόλης (0.1 mmol), σε άνυδρο CH_2Cl_2 , προστίθενται 1.1 ισοδύναμα DCC (0.11 mmol, 23 mg), 1.1 ισοδύναμα του αντίστοιχου (*R*) ή (*S*) MPA (0.11 mmol, 18 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 90%.

(*R*)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 1a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.43 (m, 5H), 5.19 – 5.27 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.65 – 2.75 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 1.08 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 1.05 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

(*S*)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 1a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.43 (m, 5H), 5.13 – 5.22 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.53 – 2.62 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.21 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.88 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 2a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.42 (m, 5H), 5.10 – 5.19 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.65 – 2.72 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.56 – 1.71 (m, 1H), 1.38 – 1.51 (m, 1H), 1.05 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.80 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 2a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.44 (m, 5H), 5.07 – 5.15 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.52 – 2.58 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.34 – 1.46 (m, 1H), 1.19 – 1.28 (m, 1H), 1.17 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.66 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 2b.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.42 (m, 5H), 5.08 – 5.17 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.55 – 2.62 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.44 – 1.64 (m, 2H), 1.08 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 0.84 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 2b.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.40 (m, 5H), 5.04 – 5.13 (m, 1H), 4.68 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.43 – 2.50 (m, 1H), 1.75 (s, 3H), 1.27 – 1.47 (m, 2H), 1.22 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.72 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 3a.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.43 (m, 5H), 5.10 – 5.16 (m, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.73 – 2.77 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.54 – 1.63 (m, 1H), 1.28 – 1.35 (m, 1H), 1.13 – 1.25 (m, 2H), 1.06 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.83 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 3a.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.44 (m, 5H), 5.07 – 5.12 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.58 – 2.62 (m, 1H), 1.88 (s, 3H), 1.33 – 1.41 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H), 1.00 – 1.11 (m, 3H), 0.70 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 3b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.41 (m, 5H), 5.08 – 5.14 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.64 – 2.69 (m, 1H), 2.06 (s, 3H), 1.51 – 1.58 (m, 1H), 1.32 – 1.39 (m, 1H), 1.15 – 1.25 (m, 2H), 1.09 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.87 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 3b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.41 (m, 5H), 5.04 – 5.10 (m, 1H), 4.68 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.52 – 2.56 (m, 1H), 1.76 (s, 3H), 1.34 – 1.42 (m, 1H), 1.21 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.14 – 1.20 (m, 1H), 1.01 – 1.12 (m, 2H), 0.78 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 4a.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.43 (m, 5H), 5.07 – 5.12 (m, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.80 – 2.84 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.56 – 1.62 (m, 1H), 1.38 – 1.45 (m, 1H), 1.07 – 1.12 (m, 1H), 1.05 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.84 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.83 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 4a.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.33 – 7.44 (m, 5H), 5.03 – 5.08 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.63 – 2.68 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.37 – 1.43 (m, 1H), 1.25 – 1.32 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H), 0.81 – 0.86 (m, 1H), 0.71 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 5a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.44 (m, 5H), 5.57 – 5.71 (m, 1H), 5.10 – 5.19 (m, 1H), 4.94 – 5.02 (m, 2H), 4.75 (s, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.80 – 2.88 (m, 1H), 2.29 – 2.40 (m, 1H), 2.13 – 2.22 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.06 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 5a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.44 (m, 5H), 5.44 – 5.57 (m, 1H), 5.06 – 5.15 (m, 1H), 4.79 – 4.92 (m, 2H), 4.71 (s, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.65 – 2.72 (m, 1H), 2.07 – 2.18 (m, 1H), 1.88 – 1.97 (m, 1H), 1.86 (s, 3H), 1.18 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 5b.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.42 (m, 5H), 5.56 – 5.70 (m, 1H), 5.09 – 5.18 (m, 1H), 4.96 – 5.03 (m, 2H), 4.71 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.72 – 2.80 (m, 1H), 2.15 – 2.36 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.11 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 5b.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.33 – 7.42 (m, 5H), 5.43 – 5.56 (m, 1H), 5.06 – 5.15 (m, 1H), 4.82 – 4.95 (m, 2H), 4.69 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.59 – 2.67 (m, 1H), 1.96 – 2.18 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.23 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 6a.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.42 (m, 5H), 5.63 – 5.72 (m, 1H), 5.11 – 5.16 (m, 1H), 4.94 – 4.99 (m, 2H), 4.74 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.75 – 2.79 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.96 – 2.30 (m, 1H), 1.86 – 1.94 (m, 1H), 1.71 – 1.79 (m, 1H), 1.39 – 1.47 (m, 1H), 1.05 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 6a.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.43 (m, 5H), 5.50 – 5.58 (m, 1H), 5.08 – 5.13 (m, 1H), 4.85 – 4.92 (m, 2H), 4.71 (s, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.60 – 2.65 (m, 1H), 1.87 (s, 3H), 1.74 – 1.88 (m, 2H), 1.51 – 1.59 (m, 1H), 1.19 – 1.25 (m, 1H), 1.18 (d, *J*=6.5Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 6b.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.42 (m, 5H), 5.64 – 5.73 (m, 1H), 5.09 – 5.14 (m, 1H), 4.95 – 5.00 (m, 2H), 4.71 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.68 – 2.73 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.87 – 2.02 (m, 2H), 1.67 – 1.75 (m, 1H), 1.44 – 1.51 (m, 1H), 1.09 (d, *J*=6.5Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 6b.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.33 – 7.42 (m, 5H), 5.52 – 5.61 (m, 1H), 5.06 – 5.12 (m, 1H), 4.89 – 4.94 (m, 2H), 4.69 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.55 – 2.60 (m, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.72 – 1.83 (m, 2H), 1.50 – 1.58 (m, 1H), 1.25 – 1.32 (m, 1H), 1.21 (d, *J*=6.5Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 7a.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.43 (m, 5H), 5.09 – 5.18 (m, 1H), 4.92 – 4.99 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.73 – 2.81 (m, 1H), 2.22 – 2.33 (m, 1H), 2.07 – 2.17 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.05 (d, *J*=6.3Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 7a.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.44 (m, 5H), 5.07 – 5.15 (m, 1H), 4.82 – 4.89 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.60 – 2.67 (m, 1H), 2.03 – 2.14 (m, 1H), 1.86 – 1.97 (m, 1H), 1.84 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.19 (d, *J*=6.3Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 7b.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.42 (m, 5H), 5.08 – 5.19 (m, 1H), 4.91 – 4.97 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.64 – 2.74 (m, 1H), 2.19 – 2.31 (m, 1H), 2.06 – 2.17 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.10 (d, *J*=6.3Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 7b.

¹H NMR (CDCl₃ 300 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.41 (m, 5H), 5.05 – 5.14 (m, 1H), 4.81 – 4.88 (m, 1H), 4.68 (s, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.52 – 2.60 (m, 1H), 2.06 – 2.17 (m, 1H), 1.92 – 2.01 (m, 1H), 1.73 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.23 (d, *J*=6.6Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 8c.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.44 (m, 5H), 5.08 – 5.12 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.59 – 2.65 (m, 1H), 2.14 (q, *J*=7.5Hz, 2H), 1.48 – 1.59 (m, 2H), 0.85 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.84 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.84 (d, *J*=7.0Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 8c.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.43 (m, 5H), 5.11 – 5.15 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.72 – 2.77 (m, 1H), 2.46 – 2.54 (m, 1H), 2.34 – 2.42 (m, 1H), 1.39 – 1.45 (m, 2H), 1.03 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.00 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.57 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 8b.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.43 (m, 5H), 5.07 – 5.11 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.81 – 2.87 (m, 1H), 2.36 – 2.49 (m, 2H), 1.50 – 1.56 (m, 1H), 1.39 – 1.46 (m, 1H), 1.03 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.99 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 0.56 (t, *J*=7.0Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 8b.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.42 (m, 5H), 5.09 – 5.13 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.67 – 2.73 (m, 1H), 2.17 – 2.25 (m, 1H), 2.04 – 2.12 (m, 1H), 1.61

– 1.69 (m, 1H), 1.46 – 1.55 (m, 1H), 0.87 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.83 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.80 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 9a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.43 (m, 5H), 5.15 – 5.24 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.68 – 2.77 (m, 1H), 2.36 – 2.48 (m, 2H), 1.06 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.04 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.00 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 9a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.43 (m, 5H), 5.11 – 5.19 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.56 – 2.65 (m, 1H), 2.07 – 2.20 (m, 2H), 1.20 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.87 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 0.86 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 9b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.41 (m, 5H), 5.12 – 5.18 (m, 1H), 4.68 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.75 – 2.81 (m, 1H), 2.35 – 2.46 (m, 2H), 1.09 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.04 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.98 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 9b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.40 (m, 5H), 5.10 – 5.16 (m, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.37 (s, 3H), 2.62 – 2.68 (m, 1H), 2.07 – 2.23 (m, 2H), 1.21 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.91 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.79 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 10b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 8.00 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 7.56 – 7.61 (m, 1H), 7.47 – 7.50 (m, 2H), 7.29 – 7.33 (m, 5H), 5.27 – 5.33 (m, 1H), 4.57 (s, 1H), 3.78 – 3.84 (m, 1H), 3.33 (s, 3H), 1.16 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 1.13 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 10b.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 8.90 (d, *J*=7.0Hz, 2H), 7.53 – 7.57 (m, 1H), 7.42 – 7.46 (m, 2H), 7.29 – 7.32 (m, 2H), 7.22 – 7.25 (m, 3H), 5.30 – 5.35 (m, 1H), 4.66 (s, 1H), 3.66 – 3.72 (m, 1H), 3.32 (s, 3H), 1.23 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 0.96 (d, *J*=7.0Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 10a.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.90 (d, *J*=7.5Hz, 2H), 7.56 – 7.61 (m, 1H), 7.46 – 7.50 (m, 2H), 7.30 – 7.35 (m, 5H), 5.27 – 5.33 (m, 1H), 4.66 (s, 1H), 3.69 – 3.75 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.17 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 1.11 (d, *J*=6.0Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 10a.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.80 (d, *J*=7.0Hz, 2H), 7.53 – 7.56 (m, 1H), 7.40 – 7.44 (m, 2H), 7.30 – 7.40 (m, 5H), 5.25 – 5.31 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.54 – 3.60 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 1.25 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 0.95 (d, *J*=7.0Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 11a.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.42 (m, 5H), 5.22 – 5.25 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.64 – 1.71 (m, 1H), 1.35 – 1.43 (m, 1H), 1.09 (s, 3H), 0.95 (d, *J*=6.0Hz, 3H), 0.70 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 11a.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.43 (m, 5H), 5.17 – 5.21 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 1.27 – 1.35 (m, 1H), 1.11 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 0.97 – 1.05 (m, 1H), 0.95 (s, 3H), 0.49 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 11b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.40 (m, 5H), 5.19 – 5.23 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.59 – 1.67 (m, 1H), 1.34 – 1.41 (m, 1H), 1.05 (s, 3H), 0.98 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.74 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 11b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.39 (m, 5H), 5.11 – 5.15 (m, 1H), 4.67 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 1.40 – 1.48 (m, 1H), 1.22 – 1.28 (m, 1H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.63 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 12a.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.43 (m, 5H), 5.52 – 5.60 (m, 1H), 5.19 – 5.23 (m, 1H), 4.91 – 5.01 (m, 2H), 4.75 (s, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.37 – 2.41 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 2.03 – 2.07 (m, 1H), 1.11 (s, 3H), 0.97 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 12a.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.33 – 7.44 (m, 5H), 5.33 – 5.42 (m, 1H), 5.14 – 5.18 (m, 1H), 4.89 – 5.91 (m, 1H), 4.69 – 4.74 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.08 – 2.13 (m, 1H), 1.94 (s, 3H), 1.65 – 1.70 (m, 1H), 1.12 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.94 (s, 3H).

(R)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 12b.

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.32 – 7.40 (m, 5H), 5.50 – 5.59 (m, 1H), 5.17 – 5.21 (m, 1H), 4.98 – 5.06 (m, 2H), 4.70 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.31 – 2.35 (m, 1H), 2.07 – 2.12 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.01 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας της υδροξυ κετόνης 12b.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 7.33 – 7.40 (m, 5H), 5.40 – 5.49 (m, 1H), 5.11 – 5.15 (m, 1H), 4.95 – 4.98 (m, 1H), 4.86 – 4.90 (m, 1H), 4.68 (s, 1H), 3.38 (s, 3H), 2.13 – 2.18 (m, 1H), 1.91 – 1.96 (m, 1H), 1.69 (s, 3H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.01 (s, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 14a.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.46 (m, 5H), 5.17 – 5.26 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.10 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.56 – 2.66 (m, 1H), 1.22 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.13 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.11 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 14a.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 7.28 – 7.47 (m, 5H), 5.14 – 5.23 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.80 – 4.01 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 2.43 – 2.52 (m, 1H), 1.26 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.11 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 0.94 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 14d.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.46 (m, 5H), 5.14 – 5.23 (m, 1H), 4.71 (s, 1H), 3.99 – 4.10 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 2.62 – 2.72 (m, 1H), 1.20 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.12 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.09 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 14d.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.46 (m, 5H), 5.10 – 5.21 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.68 – 3.89 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 2.52 – 2.62 (m, 1H), 1.24 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.07 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 0.99 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 15a.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.45 (m, 5H), 5.08 – 5.17 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.14 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 3.42 (s, 3H), 2.47 – 2.55 (m, 1H), 1.45 – 1.69 (m, 2H), 1.24 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.10 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.86 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 15a.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.03 – 5.13 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 3.96 – 4.13 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.33 – 2.41 (m, 1H), 1.45 – 1.69 (m, 2H), 1.25 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H), 1.18 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 0.69 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 15c.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.10 – 5.21 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.02 – 4.10 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 2.43 – 2.51 (m, 1H), 1.49 – 1.65 (m, 2H), 1.21 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 1.10 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 0.90 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα 15c.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.06 – 5.16 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.63 – 3.84 (m, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.34 – 2.42 (m, 1H), 1.30 – 1.51 (m, 2H), 1.26 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H), 1.06 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H), 0.78 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (17a)

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.45 (m, 5H), 5.11 – 5.16 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.41 (s, 1H), 2.53 – 2.59 (m, 1H), 1.55 – 1.66 (m, 2H), 0.92 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.86 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (17a)

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.45 (m, 5H), 5.11 – 5.16 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.42 (s, 1H), 2.65 – 2.70 (m, 1H), 1.43 – 1.51 (m, 2H), 1.12 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.59 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (17c)

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.45 (m, 5H), 5.07 – 5.12 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.42 (s, 1H), 2.72 – 2.79 (m, 1H), 1.50 – 1.58 (m, 1H), 1.40 – 1.49 (m, 1H), 1.12 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.57 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (17c)

^1H NMR (CDCl_3 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.08 – 5.12 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.36 (s, 1H), 2.62 – 2.68 (m, 1H), 1.64 – 1.71 (m, 1H), 1.54 – 1.61 (m, 1H), 0.95 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.87 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (18a)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.30 – 7.45 (m, 5H), 5.13 – 5.17 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.91 – 3.98 (m, 1H), 3.83 – 3.89 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.50 – 2.57 (m, 1H), 1.67 – 1.75 (m, 1H), 1.55 – 1.62 (m, 1H), 1.12 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 0.91 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.86 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (18a)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.12 – 5.16 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 4.09 (q, *J*=7.0Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 2.62 – 2.68 (m, 1H), 1.52 – 1.60 (m, 1H), 1.43 – 1.49 (m, 1H), 1.23 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.12 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.58 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(R)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (18c)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.08 – 5.13 (m, 1H), 4.72 (s, 1H), 4.03 – 4.11 (m, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.70 – 2.76 (m, 1H), 1.52 – 1.59 (m, 1H), 1.40 – 1.48 (m, 1H), 1.22 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 1.11 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 0.56 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(S)-MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (18c)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.10 – 5.14 (m, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.82 – 3.88 (m, 1H), 3.74 – 3.80 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.61 – 2.67 (m, 1H), 1.64 – 1.72 (m, 1H), 1.52 – 1.60 (m, 1H), 1.10 (t, *J*=7.0Hz, 3H), 0.94 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.86 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(R)-MPA MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (19c)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.45 (m, 5H), 5.11 – 5.15 (m, 1H), 4.72 – 4.77 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.72 – 2.79 (m, 1H), 1.40 – 1.60 (m, 6H), 1.12 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 0.89 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.87 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.52 (t, *J*=7.0Hz, 3H).

(S)-MPA MPA εστέρας του υδροξυ εστέρα (19c)

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.31 – 7.46 (m, 5H), 5.11 – 5.15 (m, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.58 – 4.63 (m, 1H), 3.41 (s, 3H), 2.65 – 2.70 (m, 1H), 1.39 – 1.65 (m, 6H), 0.91 (d, *J*=7.5Hz, 3H), 0.85 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.83 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.80 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ α-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ-1,3-ΔΙΟΛΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΕΣ ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

Η ασύμμετρη σύνθεση οπτικώς καθαρών 1,3-διολών είναι αρκετά δημοφιλής, καθώς τέτοιες ενώσεις αποτελούν μέρος σημαντικών φυσικών προϊόντων, με βιολογική δραστηριότητα, όπως τα Macrolides.¹¹⁶ Πολλές μέθοδοι έχουν μελετηθεί για τη στερεοεκλεκτική σύνθεση των 1,3-διολών.¹¹⁷ Στις περισσότερες από αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί είτε χειρόμορφοι καταλύτες, είτε χειρόμορφες πρόδρομες ενώσεις. Μερικές προσεγγίσεις έχουν γίνει με τη χρήση ενζύμων σαν καταλύτες. Τα ένζυμα, είτε απομονωμένα είτε μέσα σε κύτταρο, έχουν αποδειχτεί πολύ χρήσιμα στον στερεοεκλεκτικό σχηματισμό 1,3-διολών, μέσω αναγωγής ή ενζυμικού διαχωρισμού.

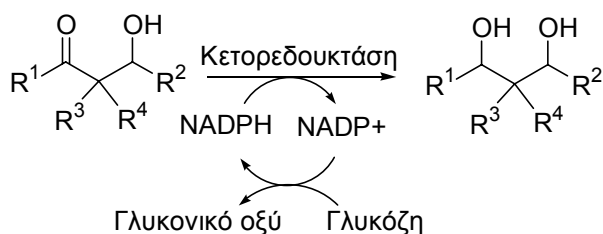
Η ενζυμική αναγωγή των 1,3-δικετονών σπάνια οδηγεί απευθείας στο σχηματισμό των διολών. Το κύριο προϊόν στην περίπτωση αυτή είναι μια β-υδροξυ κετόνη, γεγονός που οφείλεται στην αργή, ή καθόλου, αντίδραση της δεύτερης κετο-ομάδας. Η πραγματοποίηση απλής αναγωγής των 1,3-δικετονών για το σχηματισμό β-υδροξυ κετονών αποδεικνύει ότι οι τελευταίες δεν είναι γενικώς καλά υποστρώματα για τις αφυδρογονάσεις. Στην βιβλιογραφία είναι δύσκολο να βρεθούν μελέτες, που να έχουν σχεδιαστεί για την σύνθεση 1,3-διολών μόνο με τη χρήση ενζύμων. Μοναδικές εξαιρέσεις αποτελούν οι μελέτες των Fauve και Veschambre,¹¹⁸ τον Ikeda,¹¹⁹ τον Patel¹²⁰ και τους Wolberg και Müller,¹²¹ η οποίοι χρησιμοποίησαν βιοκαταλύτες για τη σύνθεση 1,3-διολών. Μέχρι σήμερα δεν έχει εμφανιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία καμία μελέτη για τον βιοκαταλυτικό σχηματισμό α-υποκατεστημένων-1,3-διολών από 1,3-δικετόνες.

Στην παρούσα διατριβή θα παρουσιαστεί η πρώτη μελέτη για την στερεοεκλεκτική σύνθεση α-υποκατεστημένων-1,3-διολών με απομονωμένες κετορεδουκτάσες.

Όπως παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 1, οι απομονωμένες κετορεδουκτάσες αποδεικνύονται εξαιρετικοί καταλύτες για την στερεοεκλεκτική παρασκευή α-υποκατεστημένων-β-υδροξυ κετονών.⁷¹ Έτσι χρησιμοποιώντας τις α-υποκατεστημένες-1,3-δικετόνες σαν υποστρώματα, τα ένζυμα αυτά προσφέρουν τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουν αναγωγή στερεοεκλεκτικά και τοποεκλεκτικά. Έτσι με τη χρήση του κατάλληλου ενζύμου είναι δυνατός ο ποσοτικός σχηματισμός ενός μόνο διαστερομερούς για τις κετο αλκοόλες, κατά βούληση. Στις περισσότερες

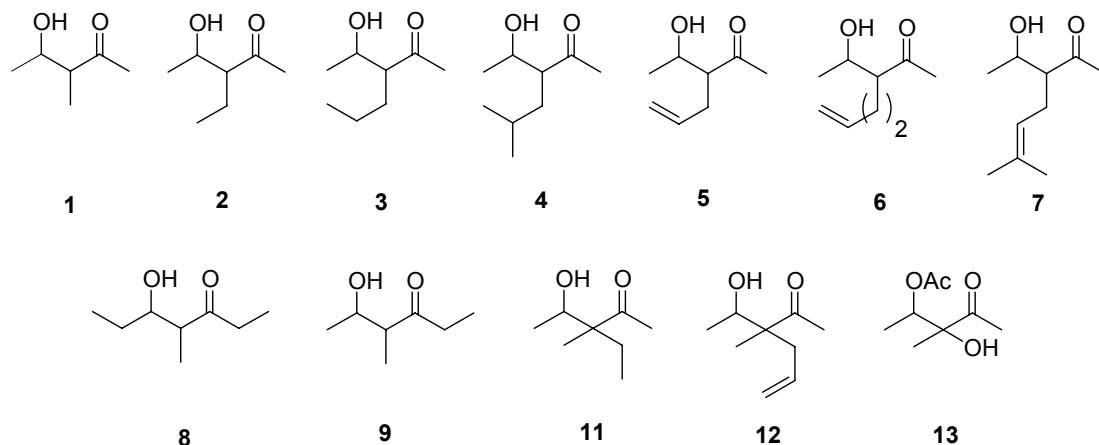
περιπτώσεις το μοναδικό προϊόν της αντίδρασης ήταν μόνο η κετο αλκοόλη, χωρίς το σχηματισμό διόλης. Από τις 32 κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν, μόνο σε έξι περιπτώσεις και για συγκεκριμένα υποστρώματα, παρατηρήθηκε σχηματισμός διόλης, έστω και σε μικρό ποσοστό, ξεκινώντας από την αντίστοιχη δικετόνη. Τα ένζυμα αυτά ήταν οι KRED-101, 111, 112, 114, 115 και A1B. Μόνο σε μια περίπτωση (δικετόνη **13**, Πίνακας 2, Κεφάλαιο 1) αυξήθηκε ο αριθμός των ενζύμων που σχημάτισαν την διόλη. Οι συγκεκριμένες κετορεδουκτάσες χρησιμοποιήθηκαν για τον περαιτέρω στερεοεκλεκτικό σχηματισμό 1,3-διολών, ξεκινώντας από οπτικά καθαρές και ενζυμικά παραγόμενες α-υποκατεστημένες-β-υδροξυ κετόνες (Σχήμα 80).

Σχήμα 80. Ενζυμική σύνθεση 1,3-διολών



Όλες οι υδροξυ κετόνες που χρησιμοποιήσαμε ήταν προϊόντα ενζυμικής αναγωγής και η αντίδραση συνεχίστηκε, για το σχηματισμό διόλης, μέσα στην ίδια φιάλη αντίδρασης απλά προσθέτοντας επιπλέον ποσότητα του κατάλληλου ενζύμου, χωρίς την απομόνωση της ενδιάμεσης κετο αλκοόλης. Οι υδροξυ κετόνες που μελετήσαμε ήταν εννέα α-μόνοαλκυλο υποκατεστημένες (**1-9**) και τρεις διυποκατεστημένες (**11-13**) (Σχήμα 81). Σε μερικές από αυτές τις υδροξυ κετόνες χρησιμοποιήσαμε περισσότερα από ένα, διαφορετικά διαστερομερή.

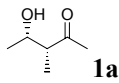


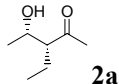


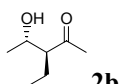


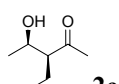

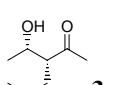


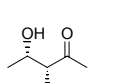


Σχήμα 81. Οι υδροξυ κετόνες που μελετήσαμε.























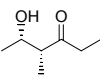
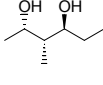
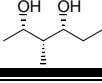
Μονοϋποκατεστημένες α-αλκυλο-β-υδροξυ κετόνες.

Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής των εννέα α-μονοϋποκατεστημένων-β-υδροξυ κετονών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 18

Υπόστρωμα	Entry	KRED	Διαστερομερική αναλογία %		Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
			Syn ^[a]	Anti ^[a]		
 1a	1	101	-	>99	100% (24h)	
	2	111	-	>99	100% (24h)	
	3	112	-	>99	80% (24h)	
	4	114	-	>99	90% (24h)	
	5	115	-	>99	95% (24h)	
	6	A1B	95	5	100% (2h)	
 2a	7	101	-	>99	100% (24h)	
	8	111	-	>99	100% (24h)	
	9	112	-	>99	80% (24h)	
	10	114	-	>99	100% (24h)	
	11	115	-	>99	40% (24h)	
	12	A1B	>99	-	100% (24h)	
 2b	13	101	5	95	90% (24h)	
	14	111	-	>99	85% (24h)	
	15	112	5	95	70% (24h)	
	16	114	-	>99	95% (24h)	
	17	115	-	>99	70% (24h)	
	18	A1B	95	5	100% (24h)	
 2c	19	101	5	95	53% (24h)	
	20	111	-	>99	34% (24h)	
	21	112	-	>99	60% (24h)	
	22	114	-	>99	30% (24h)	
	23	115	-	>99	26% (24h)	
	24	A1B	-	>99	70% (24h)	
 3a	25	101	-	>99	70% (24h)	
	26	111	-	>99	10% (24h)	
	27	112	-	>99	50% (24h)	
	28	114	-	>99	51% (24h)	
	29	115	-	>99	40% (24h)	
	30	A1B	>99	-	90% (24h)	
 5a	31	101	-	>99	90% (24h)	
	32	111	-	>99	60% (24h)	
	33	112	-	>99	51% (24h)	
	34	114	-	>99	90% (24h)	
	35	115	-	>99	43% (24h)	
	36	A1B	>99	-	100% (24h)	

 5b	37	101	-	>99	95% (24h)	
	38	111	-	>99	100% (24h)	
	39	112	-	>99	80% (24h)	
	40	114	-	>99	98% (24h)	
	41	115	-	>99	90% (24h)	
	42	A1B	>99	-	50% (24h)	
 5c	43	101	-	>99	45% (24h)	
	44	111	-	>99	10% (24h)	
	45	112	-	>99	65% (24h)	
	46	114	-	>99	30% (24h)	
	47	115	-	-	<5% (24h)	
	48	A1B	-	>99	100% (24h)	
 4a	49	101	-	>99	15% (24h)	
	50	111	-	-	5% (24h)	
	51	112	-	>99	35% (24h)	
	52	114	-	>99	60% (24h)	
	53	115	-	-	7% (24h)	
	54	A1B	-	-	0% (24h)	
 6a	55	101	-	>99	100% (24h)	
	56	111	-	>99	100% (24h)	
	57	112	-	>99	100% (24h)	
	58	114	-	>99	80% (24h)	
	59	115	-	>99	85% (24h)	
	60	A1B	>99	-	10% (24h)	
 7a	61	101	-	>99	38% (24h)	
	62	111	-	>99	10% (24h)	
	63	112	-	>99	30% (24h)	
	64	114	-	>99	10% (24h)	
	65	115	-	-	<5% (24h)	
	66	A1B	>99	-	45% (24h)	
 7c	67	101	-	>99	20% (24h)	
	68	111	-	-	<5% (24h)	-
	69	112	-	-	<5% (24h)	-
	70	114	-	-	5% (24h)	-
	71	115	-	-	<5% (24h)	-
	72	A1B	-	-	0% (24h)	-
 8c	73	101	>99	-	80% (24h)	
	74	111	>99	-	15% (24h)	
	75	112	>99	-	90% (24h)	
	76	114	-	-	<5% (24h)	
	77	115	-	-	5% (24h)	
	78	A1B	20	80	40% (24h)	
 8b	79	101	-	>99	50% (24h)	
	80	111	-	>99	75% (24h)	
	81	112	-	>99	15% (24h)	
	82	114	-	>99	22% (24h)	

	83	115	-	>99	33% (24h)	
	84	A1B	-	-	0% (24h)	-
 9a	85	101	-	>99	100% (24h)	
	86	111	-	>99	100% (24h)	
	87	112	-	>99	55% (24h)	
	88	114	-	>99	70% (24h)	
	89	115	-	>99	90% (24h)	
	90	A1B	>99	-	100% (2h)	

[α] Σχετική στερεοδομή μεταξύ των 1,3-υδροξυλομάδων

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι οι απομονωμένες κετορεδουκτάσες, σε πολλές περιπτώσεις, είναι ικανές να καταλύσουν αποτελεσματικά την αναγωγή των υδροξυ κετονών, σχηματίζοντας είτε το *syn* είτε το *anti* ισομερές των 1,3-διολών. Από τα έξι ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν η κετορεδουκτάση KRED-A1B φαίνεται να διαφέρει σημαντικά στην εκλεκτικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα πέντε. Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις έχει την τάση να σχηματίσει το *syn* ισομερές σε αντίθεση με τα άλλα ένζυμα που δίνουν το *anti*. Εξαιρέση αποτελούν τα υποστρώματα **2c**, **5c** και **8c** όπου με την KRED-A1B παράγεται το *anti* ισομερές. Ωστόσο σε όλα τα υποστρώματα το ένζυμο αυτό κατά την αναγωγή ευνοεί τον σχηματισμό της *R* αλκοόλης. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι η στερεοεκλεκτικότητα της KRED-A1B δεν επηρεάζεται από τη στερεοδομή της αρχικής υδροξυλομάδας. Δηλαδή είτε *S*, είτε *R* είναι η στερεοδομή της προϋπάρχουσας υδροξυλομάδας, η A1B στην περαιτέρω αναγωγή ευνοεί πάντα το σχηματισμό της δεύτερης υδροξυλομάδας με *R* στερεοχημεία. Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα αρχικά αποτελέσματα που υποδεικνύουν ότι η KRED-A1B είναι ένα *anti*-Prelog ένζυμο. Όσον αφορά τα υπόλοιπα ένζυμα (KRED-101, 111, 112, 114, 115), στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σχημάτισαν το *anti* ισομερές με εξαίρεση το υπόστρωμα **8c**, όπου προέκυψε το *syn* ισομερές. Τα ένζυμα αυτά δεδομένου ότι ακολουθούν Prelog συμπεριφορά θα αναμέναμε σε όλες τις περιπτώσεις να σχηματίζουν την *S* αλκοόλη. Αυτό όμως δεν συνέβη αποδεικνύοντας ότι η στερεοεπιλογή των ενζύμων αυτών επηρεάζεται από τη στερεοχημεία του υποστρώματος. Έτσι στην περίπτωση των υποστρωμάτων **2c**, **5c** και **7c**, όπου η στερεοχημεία τους ήταν (*3S,4R*), οι κετορεδουκτάσες αυτές είχαν την ίδια στερεοεκλεκτικότητα με την KRED-A1B, σχηματίζοντας δηλαδή την *R* αλκοόλη. Μοναδική εξαίρεση στην περίπτωση αυτή ήταν η φερομόνη Sitophilure **8c**, από την αναγωγή της οποίας προέκυψε η *S* αλκοόλη.

Εκτός της υψηλής στερεοεκλεκτικότητας των ενζύμων, οι κετορεδουκτάσες αυτές επέδειξαν σε πολλά παραδείγματα και υψηλή δραστικότητα. Σε μερικές περιπτώσεις (Entries 6 και 90) η αντίδραση ολοκληρώθηκε μόλις σε δυο ώρες, ενώ άλλες ολοκληρώθηκαν σε 24 ώρες. Η δραστικότητα των ενζύμων επηρεάστηκε σημαντικά από τη δομή της υδροξυ κετόνης. Έτσι για παράδειγμα, με τα υποστρώματα **4a**, **7a** και **7c** κανένα ένζυμο δεν κατάφερε να πετύχει ποσοστό μετατροπής πάνω από 60%.

Η απόλυτη στερεοδομή των διολών εξάχθηκε εύκολα από τα φάσματα ¹H NMR χωρίς παραγοντοποίηση, καθώς οι ενώσεις αυτές είναι πλήρως συμμετρικές. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το προϊόν της αναγωγής του υποστρώματος **9a**, όπου χρειάστηκε η μετατροπή του σε MPA-διεστέρα.

α-Διωποκατεστημένες -β-υδροξυ κετόνες.

Εκτός από τις μονοϋποκατεστημένες α-αλκυλο-β-υδροξυ κετόνες που προαναφέρθηκαν, διερευνήθηκε και η δυνατότητα ενζυμικής αναγωγής και δυο α-διαλκυλοϋποκατεστημένων-β-υδροξυ κετονών (**11**, **12**) με τις ίδιες κετορεδουκτάσες. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής των υποστρωμάτων αυτών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 19

Υπόστρωμα	Entry	KRED	Διαστερομερική αναλογία %		Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
			Syn ^[a]	Anti ^[a]		
 11b	91	101	-	>99	100% (24h)	
	92	111	-	>99	100% (24h)	
	93	112	-	>99	50% (24h)	
	94	114	-	>99	100% (24h)	
	95	115	-	>99	100% (24h)	
	96	A1B	-	-	0% (24h)	
 12a	97	101	-	>99	52% (24h)	
	98	111	-	>99	40% (24h)	
	99	112	-	>99	29% (24h)	
	100	114	-	>99	100% (24h)	
	101	115	-	>99	25% (24h)	
	102	A1B	-	-	0% (24h)	
 12b	103	101	-	>99	100% (24h)	
	104	111	-	>99	100% (24h)	
	105	112	-	>99	65% (24h)	
	106	114	-	>99	100% (24h)	
	107	115	-	>99	100% (24h)	
	108	A1B	-	-	0% (24h)	

[a] Σχετική στερεοδομή μεταξύ των 1,3-υδροξυλομάδων

Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι οι κετορεδουκτάσες ανάγουν αποτελεσματικά και αυτού του τύπου τα υποστρώματα, σχηματίζοντας όμως, στην περίπτωση αυτή, μόνο το *anti* ισομερές. Σημαντική είναι η επίδραση των διυποκατεστημένων υποστρωμάτων στην KRED-A1B, καθώς δεν πραγματοποιήθηκε καμία αντίδραση με το ένζυμο αυτό. Αντιθέτως τα υπόλοιπα πέντε ένζυμα, ήταν δραστικά και παρουσίασαν πολύ μεγάλη εκλεκτικότητα και, σε πολλές περιπτώσεις, μεγάλη δραστηριότητα ολοκληρώνοντας την αντίδραση σε 24 ώρες. Η εκλεκτικότητά τους δεν μεταβλήθηκε καθόλου, καθώς η στερεοχημεία της υδροξυλομάδας στο στάδιο αυτό ήταν *S*. Και για τις διόλες αυτές, η απόλυτη στερεοδομή τους εξάχθηκε πολύ εύκολα από τα φάσματα ¹H NMR χωρίς παραγοντοποίηση.

Αξιοσημείωτα είναι τα αποτελέσματα της αναγωγής του υποστρώματος **13a** (Πίνακας 20). Η ένωση αυτή προέκυψε ενζυμικά από τη δικετόνη **13** με την KRED-112 όπως παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 1. Το υπόστρωμα διαθέτει μια β-προστατευμένη, ως προς το καρβονύλιο, υδροξυλομάδα, καθώς και μία τριτοταγή υδροξυλομάδα σε α-θέση. Εκλεκτική αναγωγή και αποπροστασία της ένωσης αυτής μπορεί να δώσει μια 1,2,3-τριόλη. Τα αποτελέσματα της ενζυμικής αναγωγής του υποστρώματος αυτού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 20

Υπόστρωμα	Entry	KRED	Διαστερομερική αναλογία %		Ποσοστό μετατροπής (χρόνος)	Προϊόν
			A ^[β]	B ^[β]		
 13a	109	101	3	97	100% (24h)	
	110	102	-	>99	100% (24h)	
	111	106	-	>99	70% (24h)	
	112	111	8	92	100% (24h)	
	113	112	2	98	100% (24h)	
	114	113	3	97	100% (24h)	
	115	114	22	78	100% (24h)	
	116	115	8	92	90% (24h)	
	117	119	3	97	30% (24h)	
	118	121	20	80	70% (24h)	
	119	123	25	75	46% (24h)	
	120	130	-	>99	52% (24h)	
	121	131	-	>99	20% (24h)	
122	A1B	>99	-	100% (24h)		

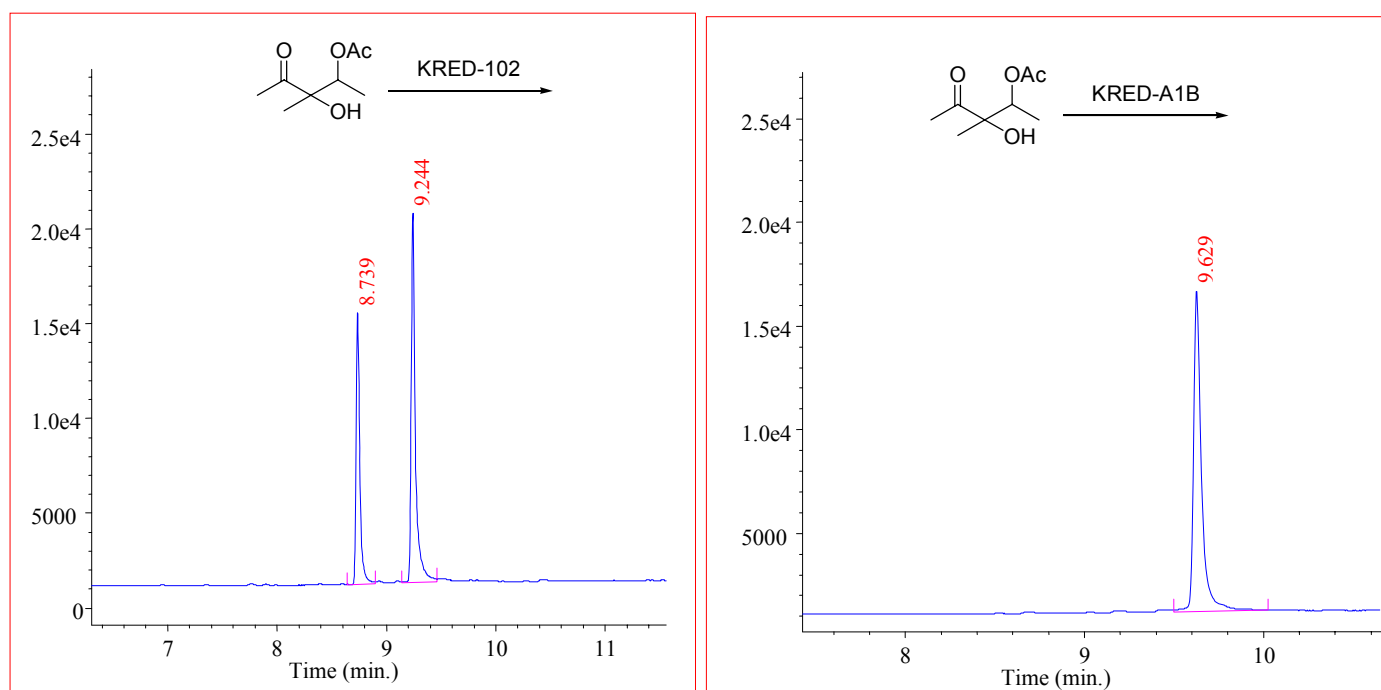
[β] Τα ισομερή A/B παρατίθενται ανάλογα με το χρόνο έκλουσής τους από τη χειρόμορφη κολώνα του αέριου χρωματογράφου, με το A να εκλούεται πρώτο.

Παρόλο που στις προηγούμενες αντιδράσεις ο αριθμός των ενζύμων που επέδειξαν δραστηριότητα ήταν μόλις έξι, στην περίπτωση του υποστρώματος **13a**, ο αριθμός αυξήθηκε στο 14. Αυτό οφείλεται στην τελείως διαφορετική δομή της ένωσης αυτής

σε σχέση με τις προηγούμενες. Έτσι για επτά ένζυμα η αντίδραση ολοκληρώθηκε σε 24 ώρες (Entries 109, 110, 112, 113, 114, 115, 122), ενώ για τις υπόλοιπες, τα ποσοστά μετατροπής κυμαίνονται μεταξύ 20 και 90%. Από τις πρώτες 13 αντιδράσεις το κύριο προϊόν ήταν το B στερεοϊσομερές. Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις το ισομερές αυτό ήταν και το μοναδικό (>99% ee, entries 110, 111, 120, 121). Μοναδική εξαίρεση ως προς την στερεοεκλεκτικότητα και πάλι αποτελεί η KRED-A1B, η οποία οδήγησε στον σχηματισμό του A ισομερούς με υψηλή στερεοεκλεκτικότητα και ποσοστό μετατροπής (>99% ee, 100% ποσοστό μετατροπής).

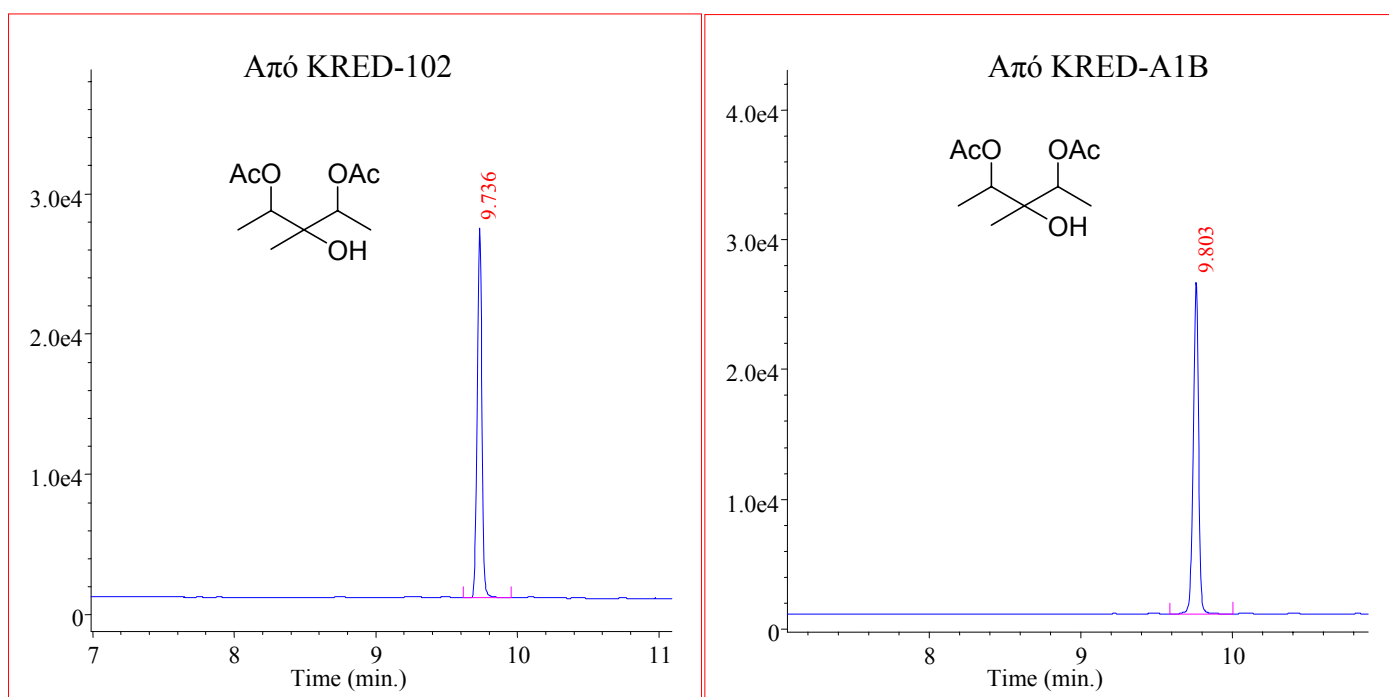
Η ταυτοποίηση των προϊόντων έγινε με φασματοσκοπία ^1H NMR από τις ενζυμικές αντιδράσεις με τις KRED-102 και KRED-A1B. Από τα φάσματα αυτά, αλλά και από τα GC χρωματογραφήματα, ο αριθμός των προϊόντων αρχικά φαινόταν μεγαλύτερος από τον αναμενόμενο. Τα προϊόντα της αντίδρασης με την KRED-102 φαινόταν να ήταν δύο διαστερομερή, ενώ από την αντίδραση με την KRED-A1B ένα διαστερομερές. Το περίεργο ήταν ότι τα προϊόντα αυτά δεν συνέπιπταν ούτε στα φάσματα ^1H NMR, αλλά ούτε και στο GC. Δηλαδή φαινόταν να σχηματίζονται τρία διαστερομερή έναντι των δυο που αναμενόταν (Σχήμα 82).

Σχήμα 82. Αέρια χρωματογραφήματα από τις ενζυμικές αντιδράσεις με τις KRED-102 και A1B

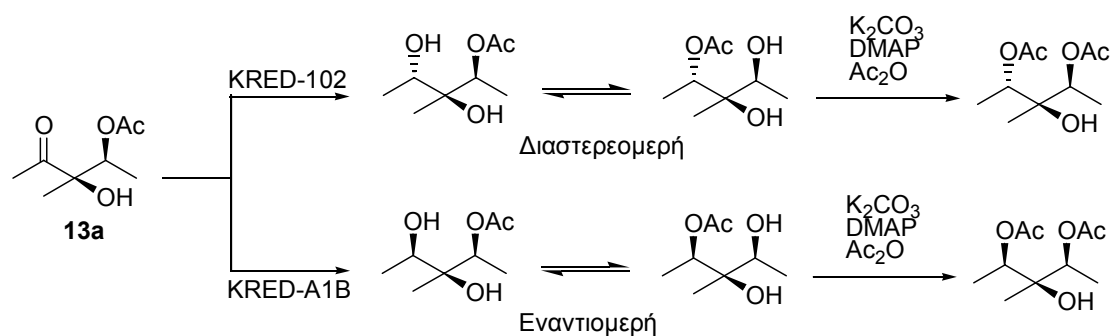


Το αποτέλεσμα αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι το ισομερές που σχηματίζεται από την αντίδραση με την KRED-102 βρίσκεται σε ισορροπία με το διαστερομερές του μέσω ενδομοριακής μετάθεσης της εστερομάδας, ενώ το ισομερές της αντίδρασης με την KRED-A1B βρίσκεται σε ισορροπία με το εναντιομερές του, το οποίο δεν συμπίπτει με τα δυο προηγούμενα (Σχήμα 84). Απόδειξη αυτής της υπόθεσης αποτελεί η αντίδραση εστεροποίησης των προϊόντων, η οποία έδωσε ένα μόνο ισομερές από κάθε αντίδραση, όπως φαίνεται και από τα φάσματα ^1H NMR αλλά και από το GC (Σχήμα 83). Η συνολική ερμηνεία της ενζυμικής αναγωγής του **13a** φαίνεται στο Σχήμα 84, όπου η απόλυτη στερεοδομή της αρχικής υδροξυ κετόνης είναι καθαρά υποθετική.

Σχήμα 83. Αέρια χρωματογραφήματα μετά από τις αντιδράσεις εστεροποίησης.



Σχήμα 84. Εξήγηση των αποτελεσμάτων των ενζυμικών αντιδράσεων του υποστρώματος **13a** με τις KRED-102 και KRED-A1B.



Συνοψίζοντας, 32 απομονωμένες και NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες δοκιμάστηκαν για τη στερεοεκλεκτική σύνθεση α-υποκατεστημένων-1,3-διολών. Η σύνθεση αυτή πραγματοποιήθηκε σε δυο ενζυμικά βήματα, ξεκινώντας αρχικά από α-υποκατεστημένες-1,3-δικετόνες. Αυτή είναι η πρώτη ενζυμική σύνθεση α-υποκατεστημένων-1,3-διολών με απομονωμένες κετορεδουκτάσες, η οποία και αποδείχθηκε σε πολλές περιπτώσεις αποτελεσματική, από άποψη στερεοεκλεκτικότητας και απόδοσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

1. Γενικές μέθοδοι

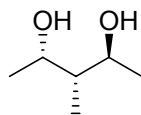
Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων καθώς και οι εκλεκτικότητες μελετήθηκαν με αέριο χρωματογράφο (Hewlett Packard 5890 Series II με ανιχνευτή FID. Κολώνα: 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm χειρόμορφη κολώνα, 20% permethylated cyclodextrin). Η λήψη των φασμάτων ¹H NMR έγινε με φασματόμετρο 300 MHz και 500 MHz της Bruker, σε διάλυμα CDCl₃ και σαν σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλο σιλάνιο (TMS). Οι χημικές αποδόσεις αναφέρονται σε απομονωμένες και φασματοσκοπικά καθαρές ενώσεις.

1.1 Ενζυμικές αντιδράσεις σε μικρή κλίμακα

Αμέσως μετά την ενζυμική παρασκευή των α-υποκατεστημένων-β-υδροξυ κετονών πραγματοποιήθηκε δεύτερη ενζυμική αναγωγή για το σχηματισμό 1,3-διολών. Μετά τη σύνθεση των υδροξυ κετονών, στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα (1 mL, 200 mM, pH 6.9), προστέθηκαν η ίδια ή διαφορετική κετορεδουκτάση (3-5 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (2 mg), NADPH (2 mg) και γλυκόζη (18 mg). Οι αντιδράσεις αναδεύτηκαν στους 37 °C και ο έλεγχος τους γινόταν κάθε μια ώρα με αέριο χρωματογράφο, μετά από διπλή εκχύλιση του δείγματος αντίδρασης με οξικό αιθυλεστέρα. Η ανάλυση των προϊόντων έγινε με αέριο χρωματογράφο και ¹H NMR.

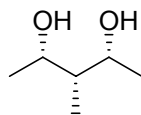
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης 1a με την KRED-111.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 4.08 – 4.14 (m, 1H), 3.83 – 3.89 (m, 1H), 2.81 (bs, 2H), 1.54 – 1.61 (m, 1H), 1.24 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.19 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 0.88 (d, *J*=7Hz, 3H).



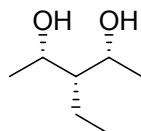
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **1a** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.08 – 4.14 (m, 2H), 2.35 (bs, 2H), 1.36 – 1.42 (m, 1H), 1.20 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H), 0.94 (d, $J=7\text{Hz}$, 3H).



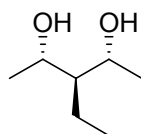
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **2a** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.09 – 4.14 (m, 2H), 2.33 (bs, 2H), 1.48 – 1.54 (m, 2H), 1.23 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H), 1.14 – 1.18 (m, 1H), 1.02 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).



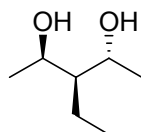
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **2b** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 3.95 – 4.02 (m, 2H), 2.91 (bs, 2H), 1.38 – 1.45 (m, 2H), 1.24 – 1.30 (m, 1H), 1.27 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H), 0.86 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).



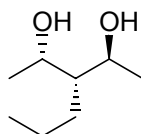
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **2c** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.21 – 4.26 (m, 1H), 4.00 – 4.05 (m, 1H), 2.83 (bs, 1H), 2.65 (bs, 1H), 1.40 – 1.49 (m, 1H), 1.29 – 1.37 (m, 1H), 1.24 – 1.29 (m, 1H), 1.27 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.96 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).



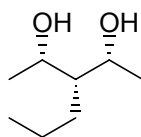
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **3a** με την KRED-101.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.19 – 4.25 (m, 1H), 3.96 – 4.03 (m, 1H), 2.81 (bs, 1H), 2.61 (bs, 1H), 1.23 – 1.45 (m, 5H), 1.27 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.21 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.92 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).



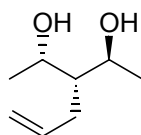
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **3a** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.09 – 4.15 (m, 2H), 2.34 (bs, 2H), 1.37 – 1.46 (m, 5H), 1.22 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 6H), 0.94 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).



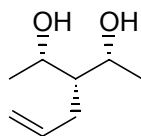
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **5a** με την KRED-101.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.77 – 5.86 (m, 1H), 5.02 – 5.11 (m, 2H), 4.23 – 4.28 (m, 1H), 4.01 – 4.06 (m, 1H), 2.90 (bs, 1H), 2.57 (bs, 1H), 2.21 – 2.28 (m, 1H), 2.08 – 2.14 (m, 1H), 1.44 – 1.48 (m, 1H), 1.28 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).



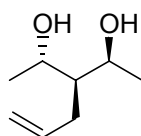
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **5a** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.92 – 6.00 (m, 1H), 5.07 – 5.12 (m, 1H), 4.97 – 5.01 (m, 1H), 4.01 – 4.17 (m, 2H), 2.28 – 2.36 (m, 4H), 1.39 – 1.44 (m, 1H), 1.25 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H).



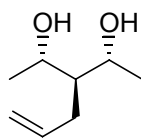
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **5b** με την KRED-111.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.76 – 5.86 (m, 1H), 5.02 – 5.11 (m, 2H), 4.23 – 4.28 (m, 1H), 4.01 – 4.06 (m, 1H), 2.97 (bs, 1H), 2.67 (bs, 1H), 2.21 – 2.28 (m, 1H), 2.07 – 2.14 (m, 1H), 1.43 – 1.49 (m, 1H), 1.27 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).



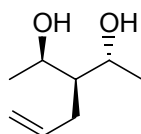
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **5b** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.68 – 5.80 (m, 1H), 5.02 – 5.12 (m, 1H), 3.93 – 4.01 (m, 2H), 2.81 (bs, 2H), 2.15 – 2.22 (m, 2H), 1.44 – 1.50 (m, 1H), 1.28 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H).



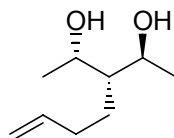
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **5c** με την KRED-A1B.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.76 – 5.86 (m, 1H), 5.02 – 5.11 (m, 2H), 4.23 – 4.29 (m, 1H), 4.00 – 4.07 (m, 1H), 2.87 (bs, 1H), 2.53 (bs, 1H), 2.21 – 2.28 (m, 1H), 2.07 – 2.14 (m, 1H), 1.43 – 1.49 (m, 1H), 1.27 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.22 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).



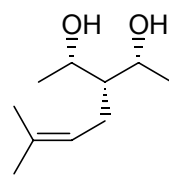
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **6a** με την KRED-101.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.76 – 5.84 (m, 1H), 4.95 – 5.05 (m, 2H), 4.22 – 4.27 (m, 1H), 3.99 – 4.04 (m, 1H), 2.88 (bs, 1H), 2.69 (bs, 1H), 2.12 – 2.20 (m, 1H), 2.02 – 2.10 (m, 1H), 1.47 – 1.55 (m, 1H), 1.33 – 1.44 (m, 2H), 1.28 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.21 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H).



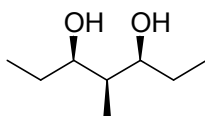
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **7a** με την KRED-A1B.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.18 – 5.23 (m, 1H), 4.08 – 4.14 (m, 2H), 2.20 – 2.26 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.33 – 1.38 (m, 1H), 1.23 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 6H).



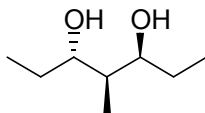
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **8c** με την KRED-112.

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 3.73 – 3.79 (m, 2H), 2.63 (bs, 2H), 1.41 – 1.61 (m, 5H), 0.93 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 6H), 0.88 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).



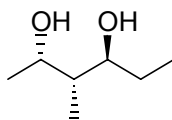
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **8b** με την KRED-111.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 3.82 – 3.87 (m, 1H), 3.55 – 3.60 (m, 1H), 2.52 (bs, 1H), 2.42 (bs, 1H), 1.39 – 1.66 (m, 5H), 0.97 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.96 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.95 (d, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).



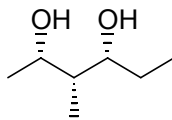
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **9a** με την KRED-101.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.09 – 4.17 (m, 1H), 3.55 – 3.63 (m, 1H), 2.84 (bs, 1H), 2.72 (bs, 1H), 1.48 – 1.66 (m, 3H), 1.18 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.96 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.91 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).



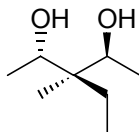
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **9a** με την KRED-A1B.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 4.06 – 4.13 (m, 1H), 3.75 – 3.80 (m, 1H), 2.55 (bs, 1H), 2.40 (bs, 1H), 1.41 – 1.60 (m, 3H), 1.20 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.93 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.91 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H).



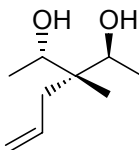
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **11b** με την KRED-101.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 3.95 – 3.99 (m, 1H), 3.90 – 3.94 (m, 1H), 3.02 (bs, 1H), 2.97 (bs, 1H), 1.59 – 1.66 (m, 2H), 1.18 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.16 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.88 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H), 0.80 (s, 3H).



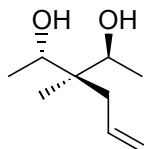
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **12a** με την KRED-114.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 5.87 – 5.96 (m, 1H), 5.08 – 5.16 (m, 2H), 3.94 – 4.00 (m, 1H), 3.85 – 3.92 (m, 1H), 3.16 (bs, 1H), 2.74 (bs, 1H), 2.41 – 2.47 (m, 1H), 1.92 – 1.98 (m, 1H), 1.21 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 1.17 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 3H), 0.82 (s, 3H).



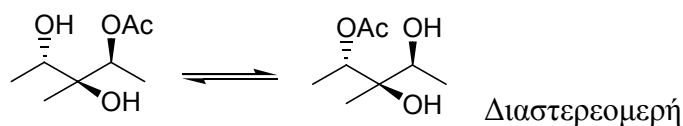
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **12b** με την KRED-101.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 5.86 – 5.95 (m, 1H), 5.07 – 5.15 (m, 2H), 3.94 – 3.99 (m, 1H), 3.85 – 3.90 (m, 1H), 3.28 (bs, 1H), 2.91 (bs, 1H), 2.40 – 2.46 (m, 1H), 1.91 – 1.96 (m, 1H), 1.20 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.17 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 0.82 (s, 3H).



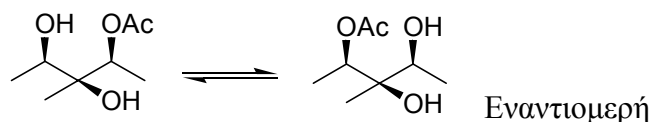
Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **13a** με την KRED-102.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 5.10 (q, *J*=6.5Hz, 1H), 5.00 (q, *J*=6.5Hz, 1H), 3.61 – 3.67 (m, 1H), 3.55 – 3.61 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.26 (d, *J*=6.0Hz, 3H), 1.25 (d, *J*=6.0Hz, 3H), 1.21 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.16 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.06 (s, 3H).



Αναγωγή της υδροξυ κετόνης **13a** με την KRED-A1B.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 5.05 (q, *J*=6.5Hz, 1H), 3.72 – 3.78 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.25 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.14 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.08 (s, 3H).

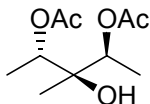


1.2 Αντίδραση εστεροποίησης των προϊόντων αναγωγής της 13a με τις KRED-102 και KRED-A1B.

Μετά την απομόνωση των προϊόντων από τις ενζυμικές αναγωγές της υδροξυ κετόνης **13a** με τις KRED-102 και KRED-A1B, προστέθηκαν μικρές ποσότητες K₂CO₃, οξικού ανυδρίτη και DMAP, και το μίγμα αναδεύτηκε στους 0 °C για πέντε λεπτά. Στη συνέχεια έγινε διήθηση του μίγματος και το διήθημα εκχυλίστηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO₃ και NaCl. Η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και απομακρύνθηκε υπό κενό.

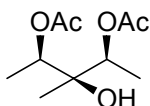
Εστέρας του προϊόντος της **13a** από την ενζυμική αναγωγή με την KRED-102.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 4.97 (q, *J*=6.5Hz, 1H), 4.92 (q, *J*=6.5Hz, 1H), 3.04 (s, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.25 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.24 (d, *J*=6.5Hz, 3H), 1.14 (s, 3H).



Εστέρας του προϊόντος της **13a** από την ενζυμική αναγωγή με την KRED-A1B.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 4.98 (q, *J*=6.5Hz, 2H), 3.03 (s, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.20 (d, *J*=6.5Hz, 6H), 1.11 s, 3H).



1.3 Ενζυμική σύνθεση της (3R)-μεθυλο-(2S,4S)εξανοδιόλης σε μεγάλη κλίμακα, από την 3-μεθυλο-2,4-εξανοδιόνη 9.

Σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (78 mL, 200 mM, pH 6.5) προστέθηκαν η 3-μεθυλο-2,4-εξανοδιόνη (50 mM, 3.9 mmol, 500 mg), η κετορεδουκτάση KRED-102 (50 mg), γλυκόζη (120 mM, 1.68 g), NADPH (0.5 mM, 0.039 mmol, 34 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (15 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε στους 25 °C για 24 ώρες. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 6.5 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε σε τιμή 6.9 και σε αυτό προστέθηκαν η κετορεδουκτάση KRED-101 (180 mg), γλυκόζη (1.5 g), NADPH (34 mg), αφυδρογονάση της γλυκόζης (15 mg) και το μίγμα αναδεύτηκε στους 25 °C για άλλες 24 ώρες. Σποραδικά (κάθε 1 ώρα) κατά τη διάρκεια της αντίδρασης το pH επαναρυθμιζόταν σε τιμή 6.9 με προσθήκη σταγόνων NaOH (2 M). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το προϊόν απομονώθηκε έπειτα από εκχύλιση του μίγματος με EtOAc (3x80 mL). Στη συνέχεια η οργανική φάση ξηράθηκε με MgSO₄ και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό παράγοντας καθαρή και οπτικώς ενεργή την διόλη. Απόδοση 95%, 489 mg.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 4.09 – 4.17 (m, 1H), 3.55 – 3.63 (m, 1H), 2.84 (bs, 1H), 2.72 (bs, 1H), 1.48 – 1.66 (m, 3H), 1.18 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.96 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.91 (d, *J*=7.0Hz, 3H).

Σύνθεση του MPA διεστέρα της (3R)-μεθυλο-(2S,4S)εξανοδιόλης.¹¹²

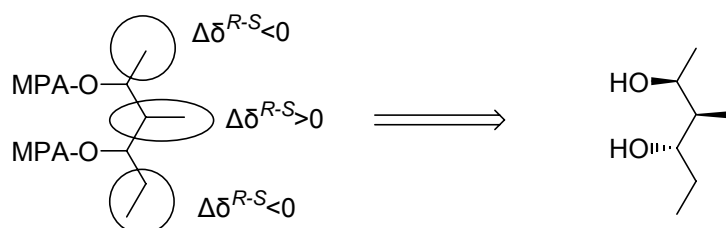
Σε διάλυμα της διόλης (0.1 mmol), σε άνυδρο CH₂Cl₂, προστίθενται 2.2 ισοδύναμα DCC (0.22 mmol, 46 mg), 2.2 ισοδύναμα του αντίστοιχου (R) ή (S) MPA (0.22 mmol, 36 mg) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Μετά από ανάδευση στους 0 °C για 6 ώρες και άλλες 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό κενό. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης (εξάνιο/EtOAc, v/v, 5/1). Απόδοση 90%.

(R)-MPA διεστέρας της (3R)-μεθυλο-(2S,4S)εξανοδιόλης.

¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.28 – 7.45 (m, 10H), 5.04 – 5.09 (m, 1H), 4.77 – 4.82 (m, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.45 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 1.72 – 1.79 (m, 1H), 1.44 – 1.53 (m, 1H), 1.25 – 1.38 (m, 1H), 1.02 (d, *J*=6.0Hz, 3H), 0.83 (d, *J*=7.0Hz, 3H), 0.43 (t, *J*=7.5Hz, 3H).

(S)-MPA διεστέρας της (3R)-μεθυλο-(2S,4S)εξανοδιόλης.

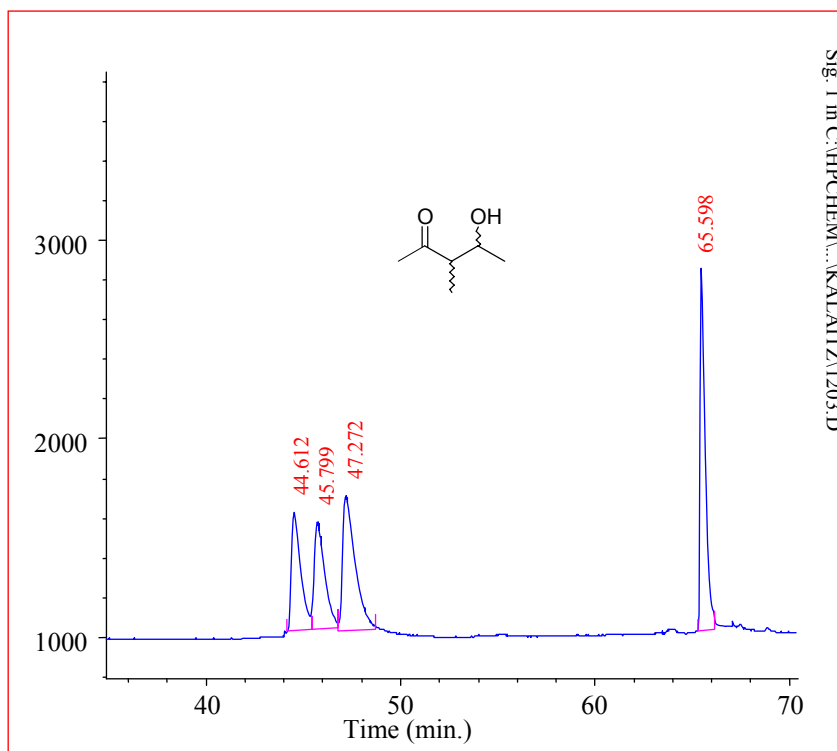
¹H NMR (CDCl₃ 500 MHz, δ ppm): 7.29 – 7.42 (m, 10H), 4.67 – 4.72 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.45 – 4.50 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.39 (s, 3H), 1.59 – 1.65 (m, 1H), 1.23 – 1.32 (m, 2H), 1.09 (d, *J*=6.0Hz, 3H), 0.64 (t, *J*=7.5Hz, 3H), 0.83 (d, *J*=7.0Hz, 3H).



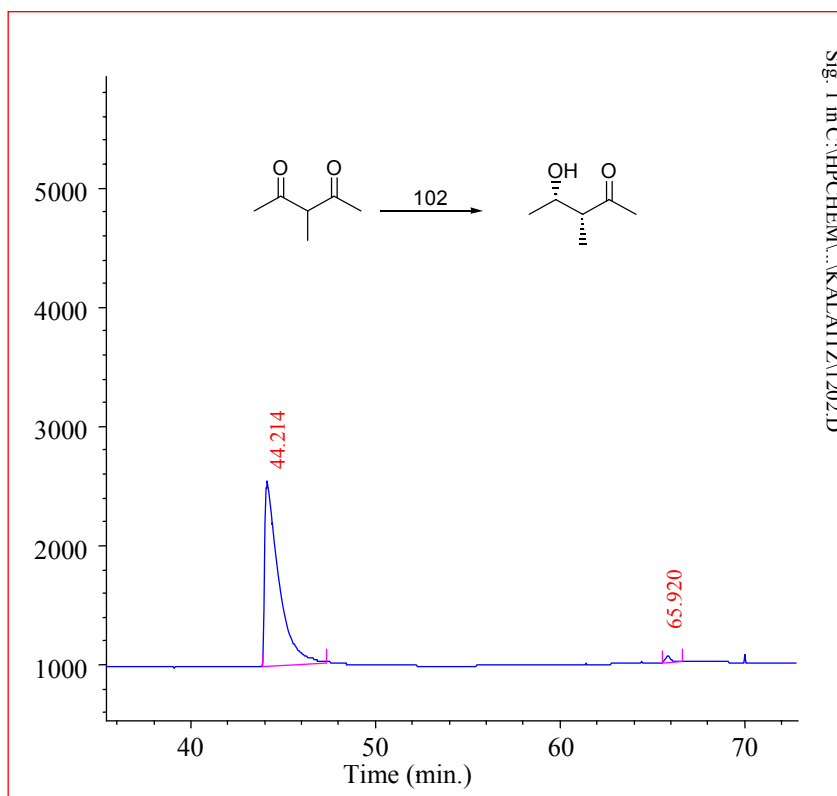
GC

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

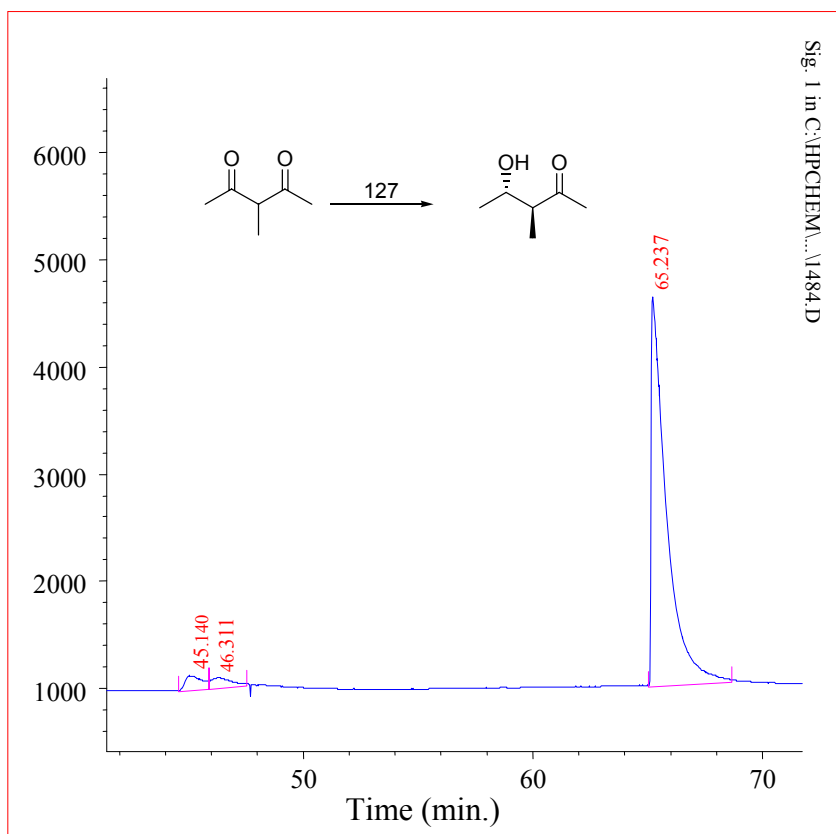
GC 1



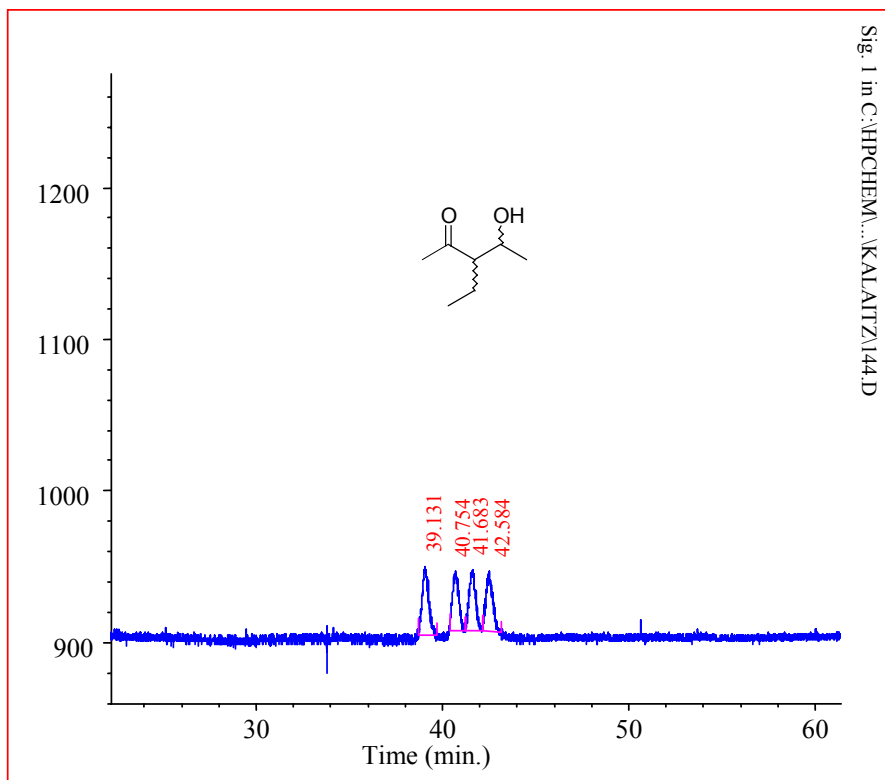
GC 2



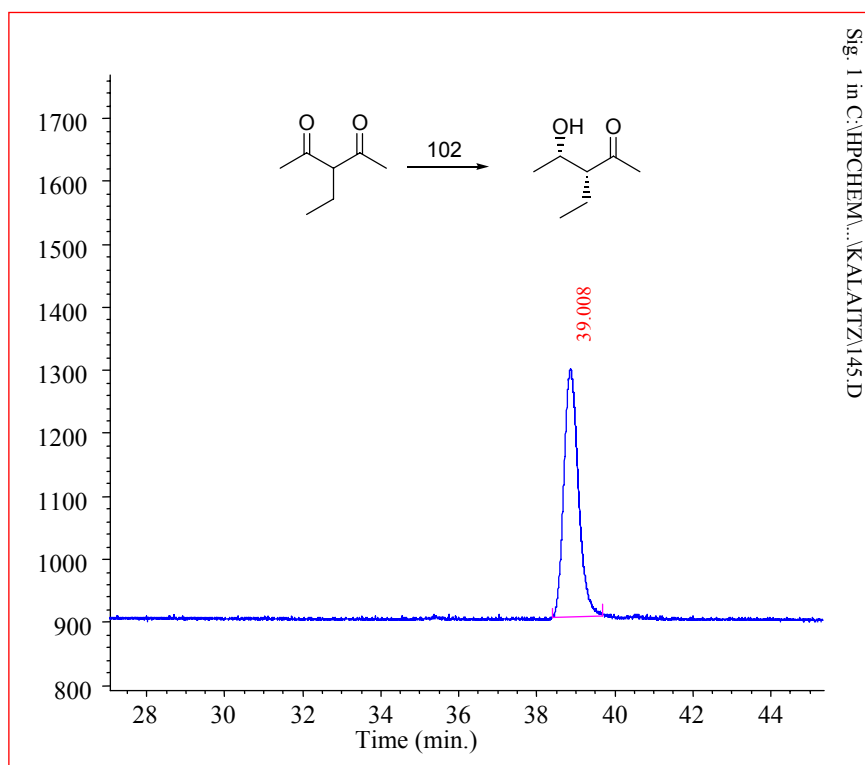
GC 3



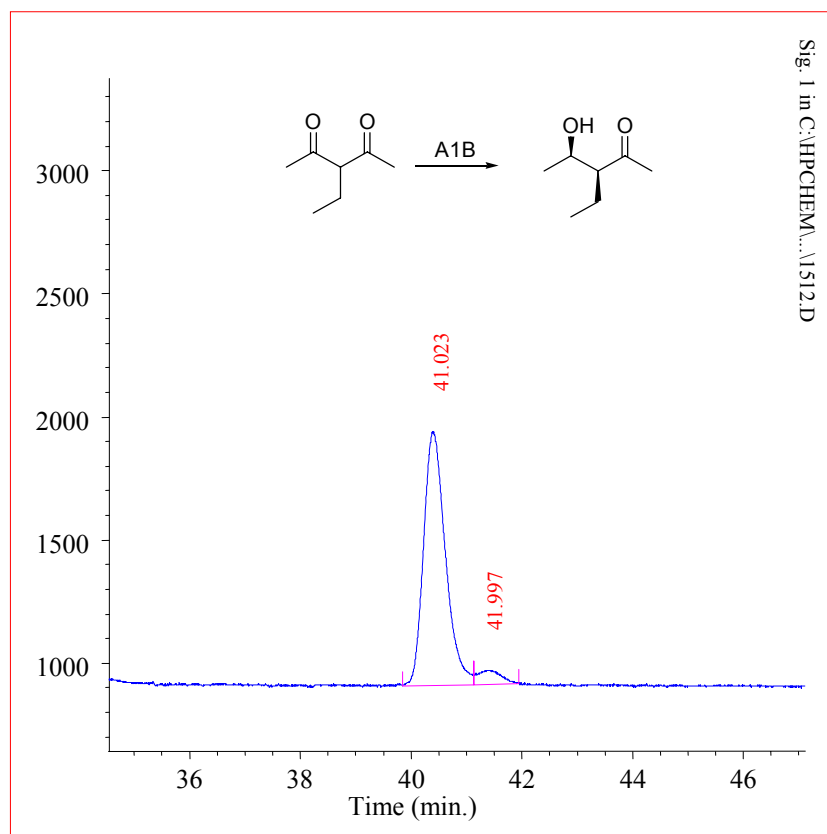
GC 4



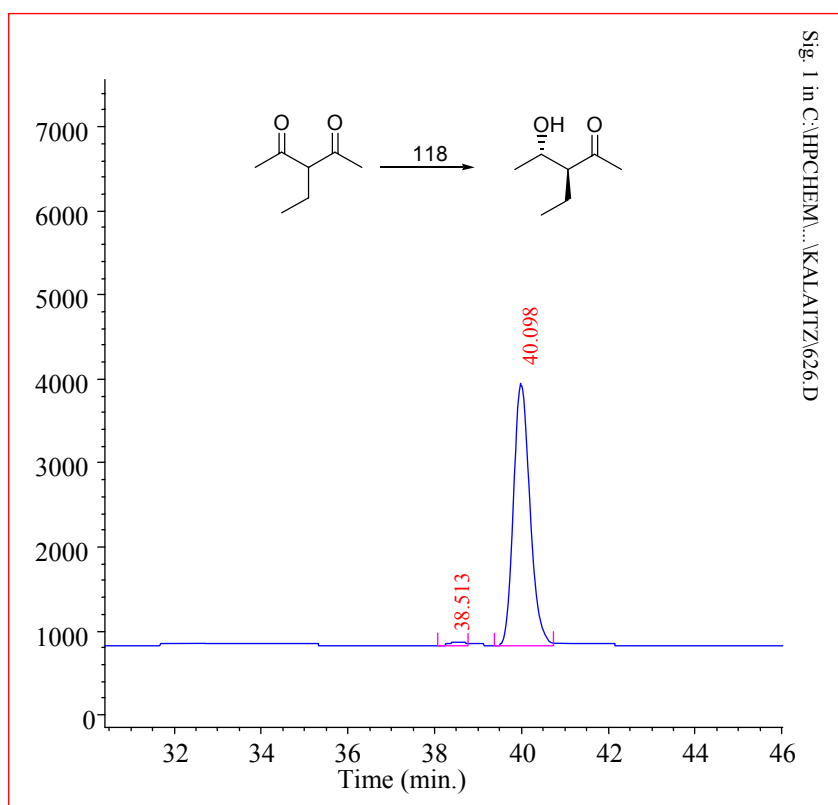
GC 5



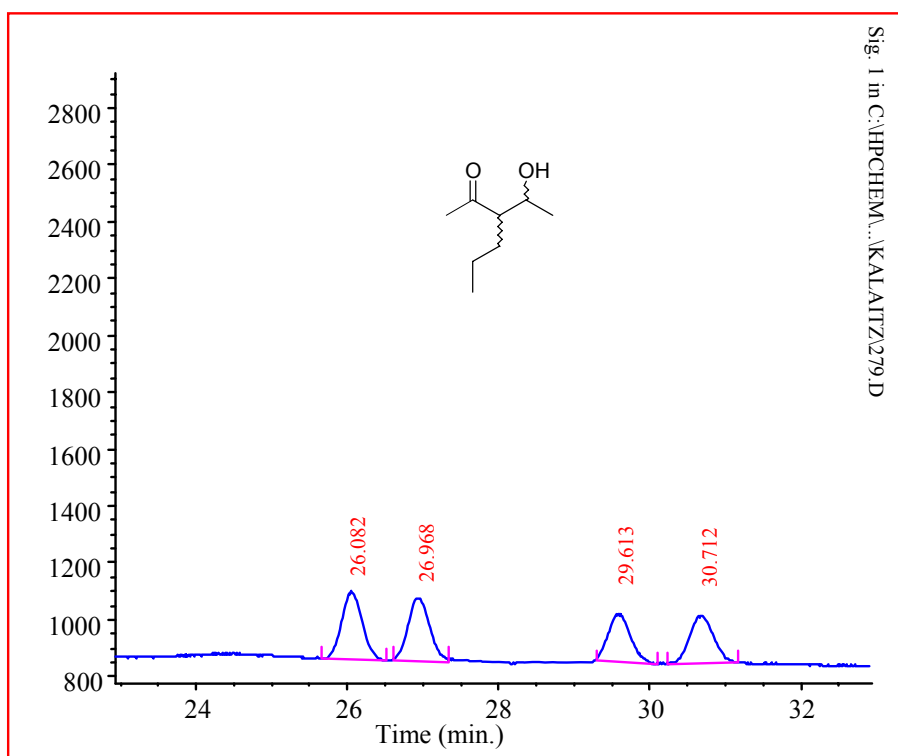
GC 6



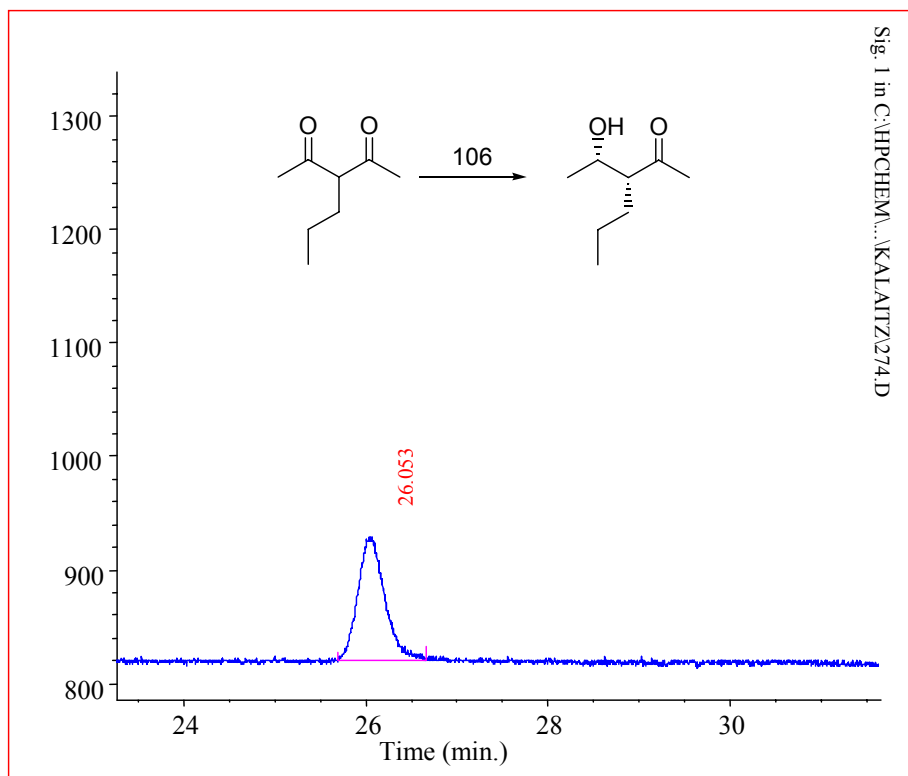
GC 7



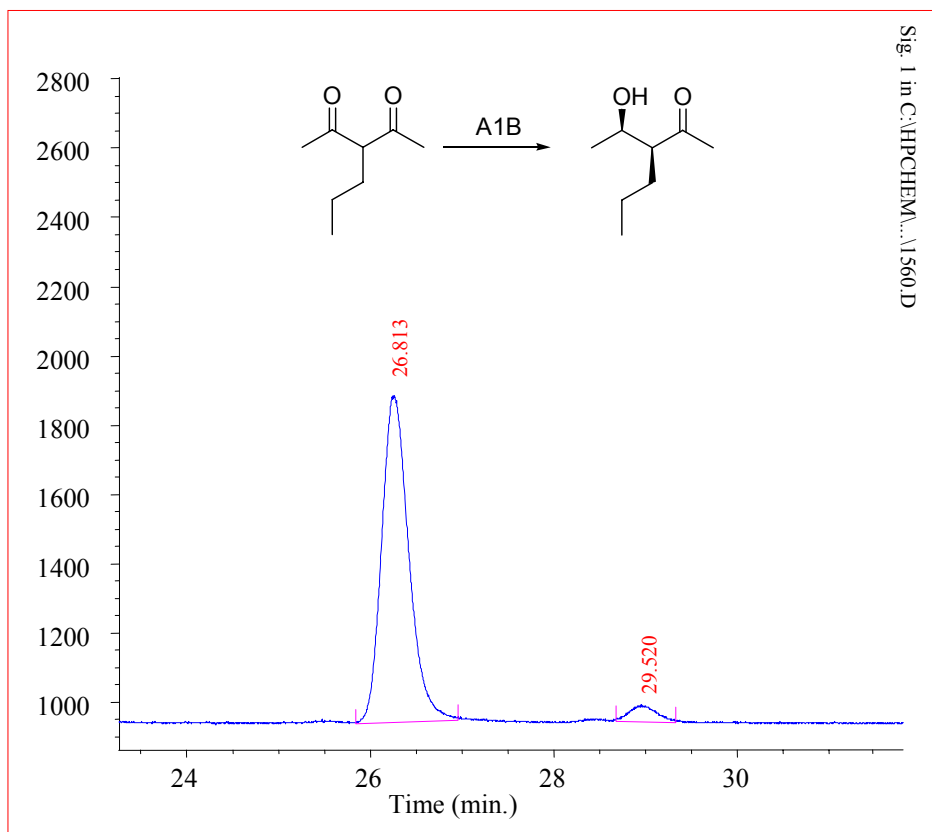
GC 8



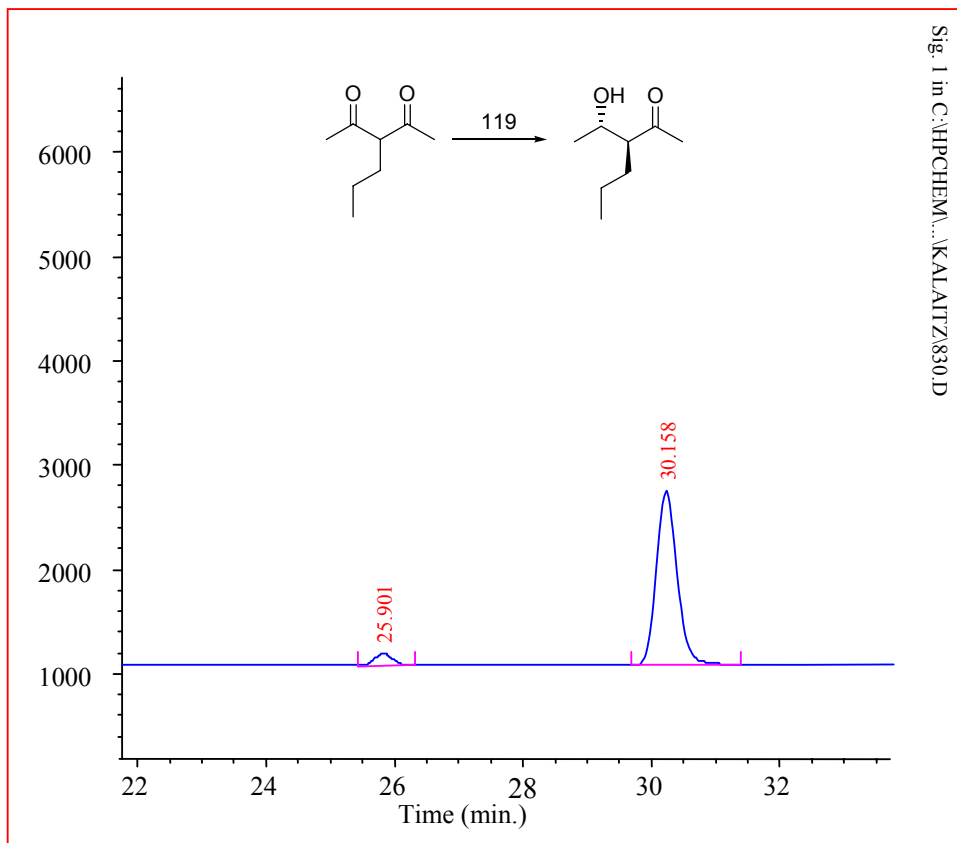
GC 9



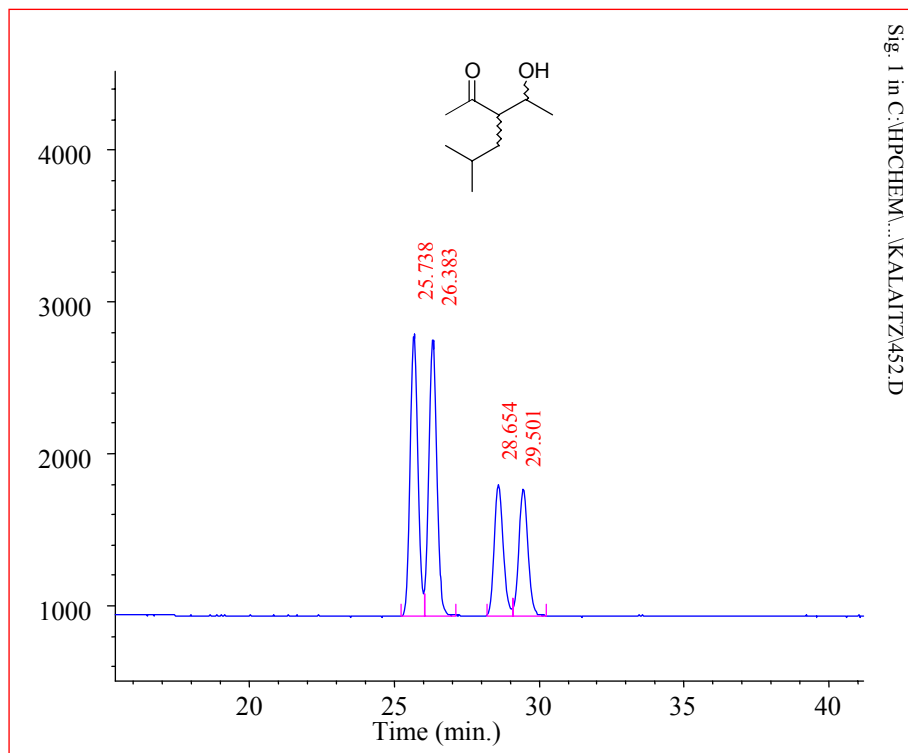
GC 10



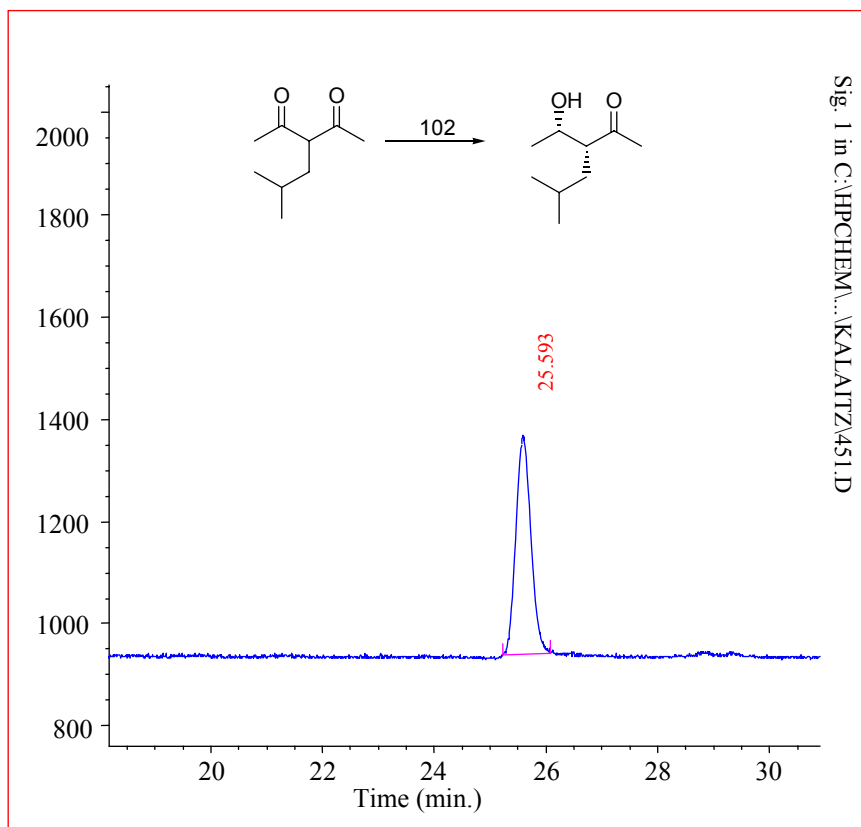
GC 11



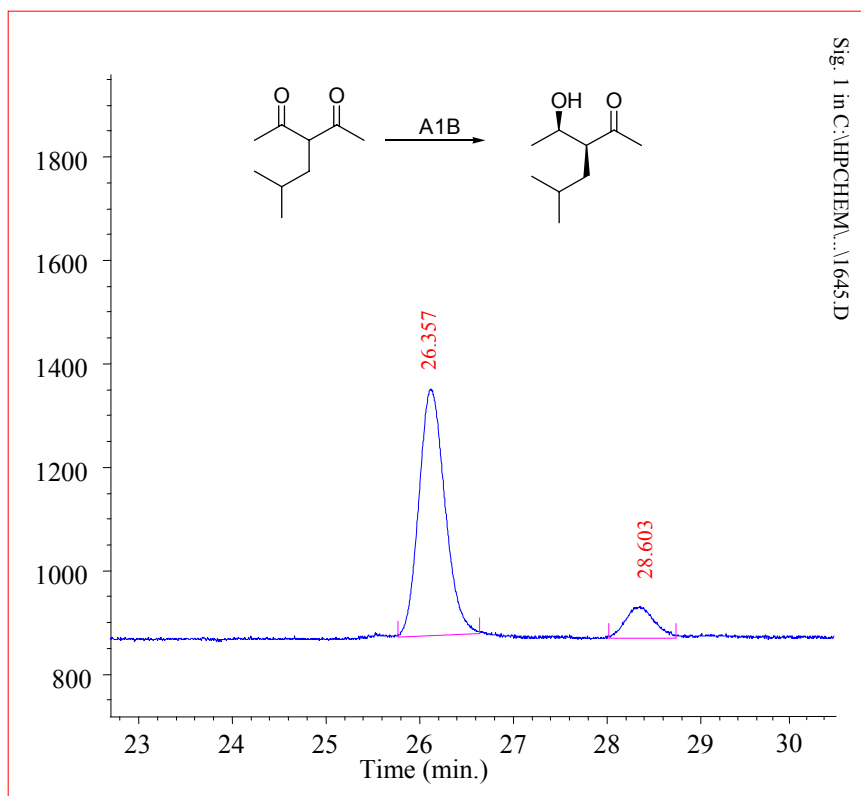
GC 12



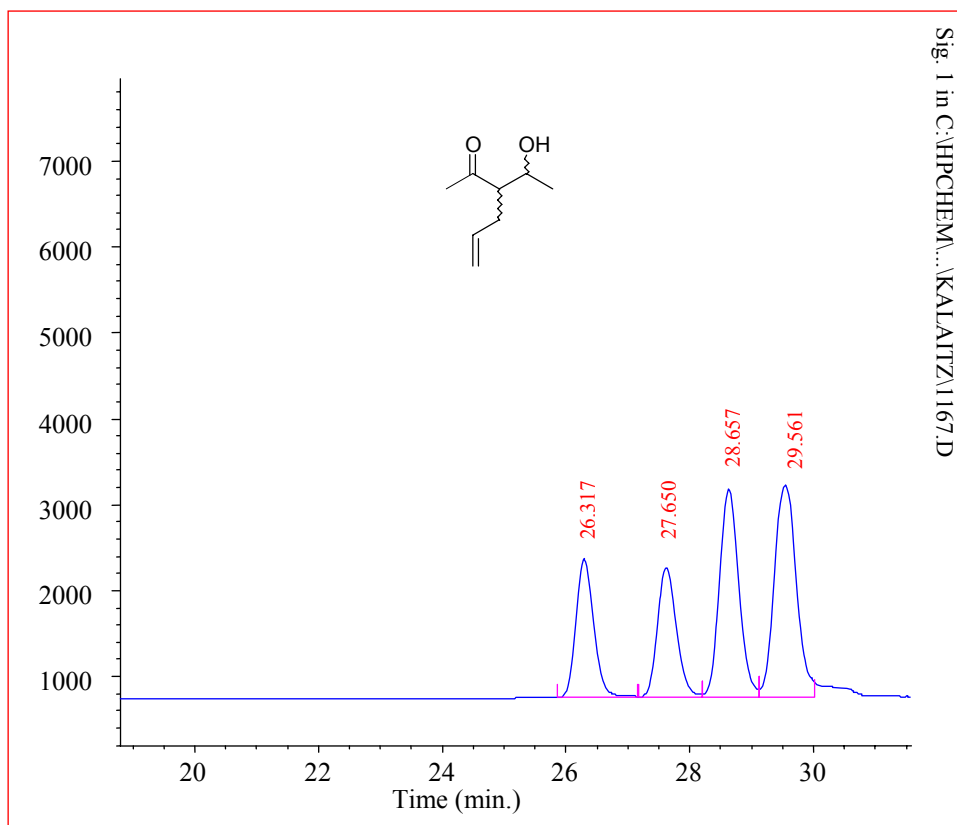
GC 13



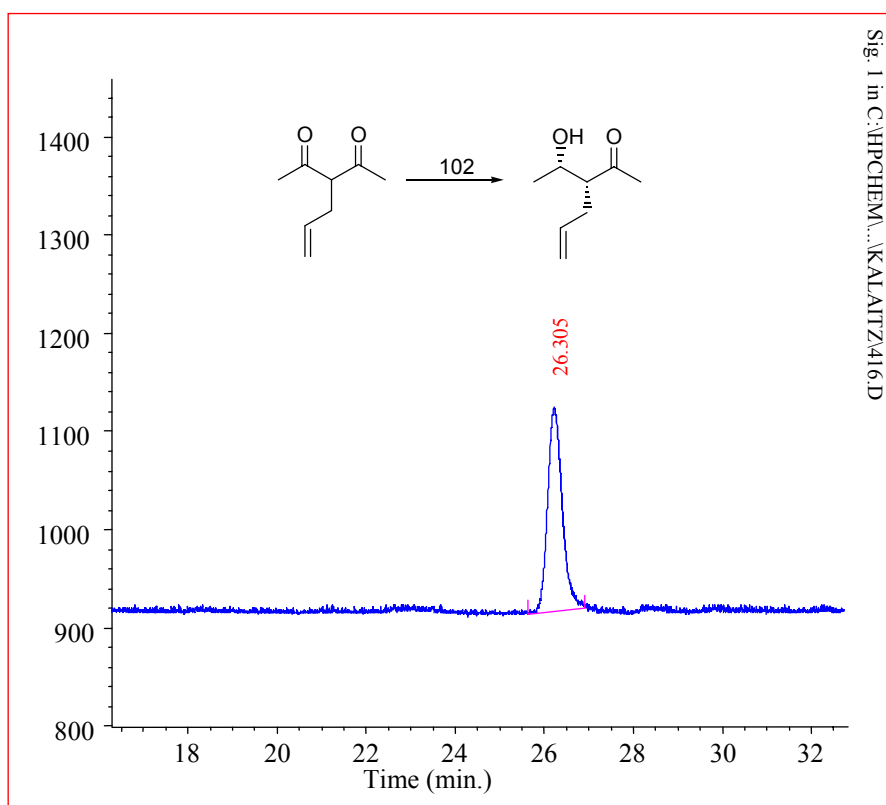
GC 14



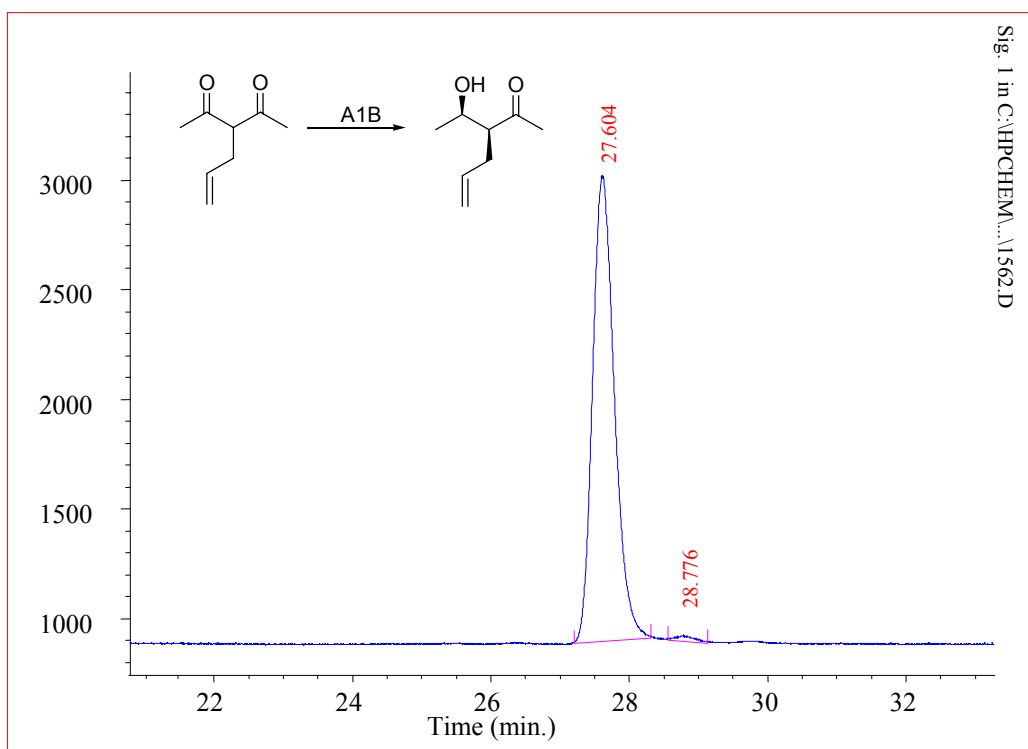
GC 15



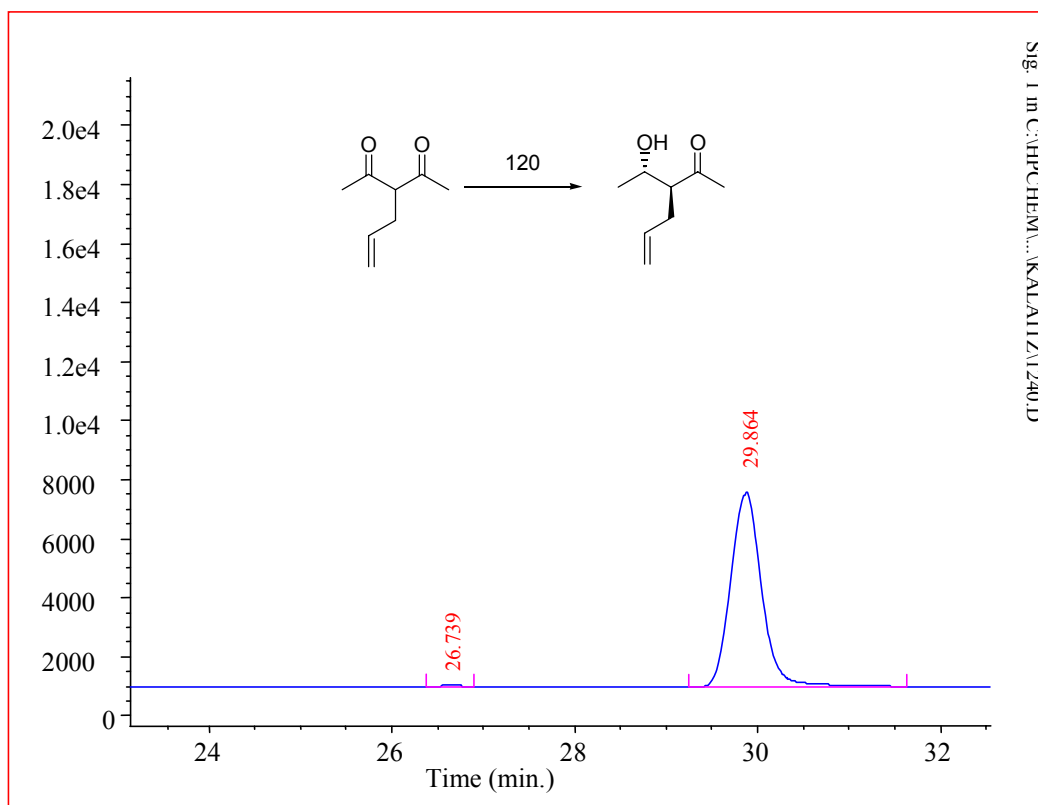
GC 16



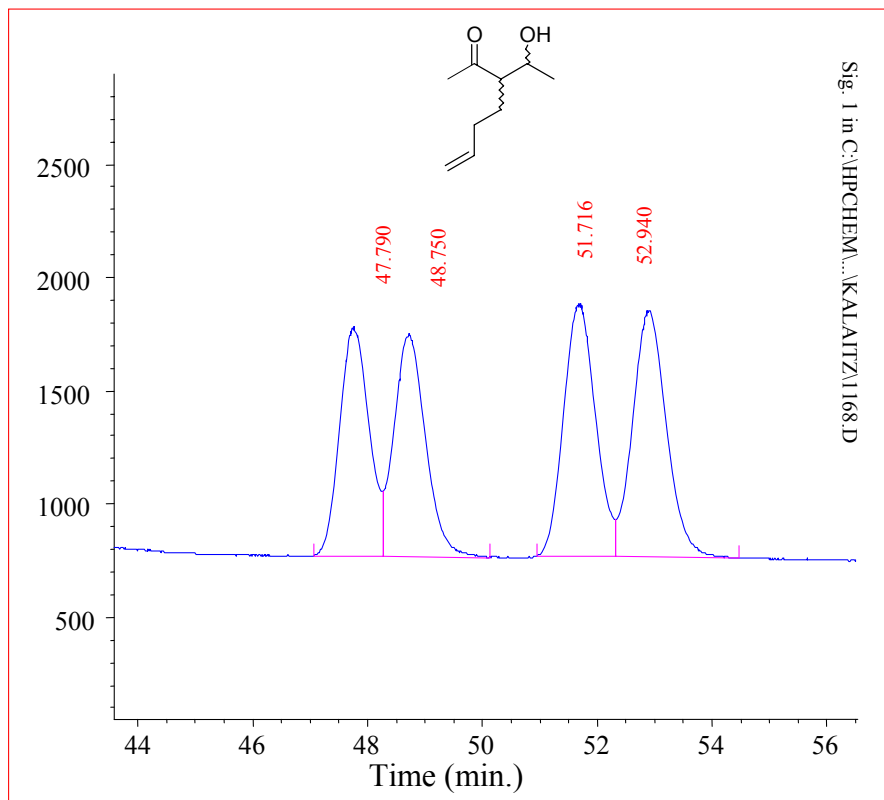
GC 17



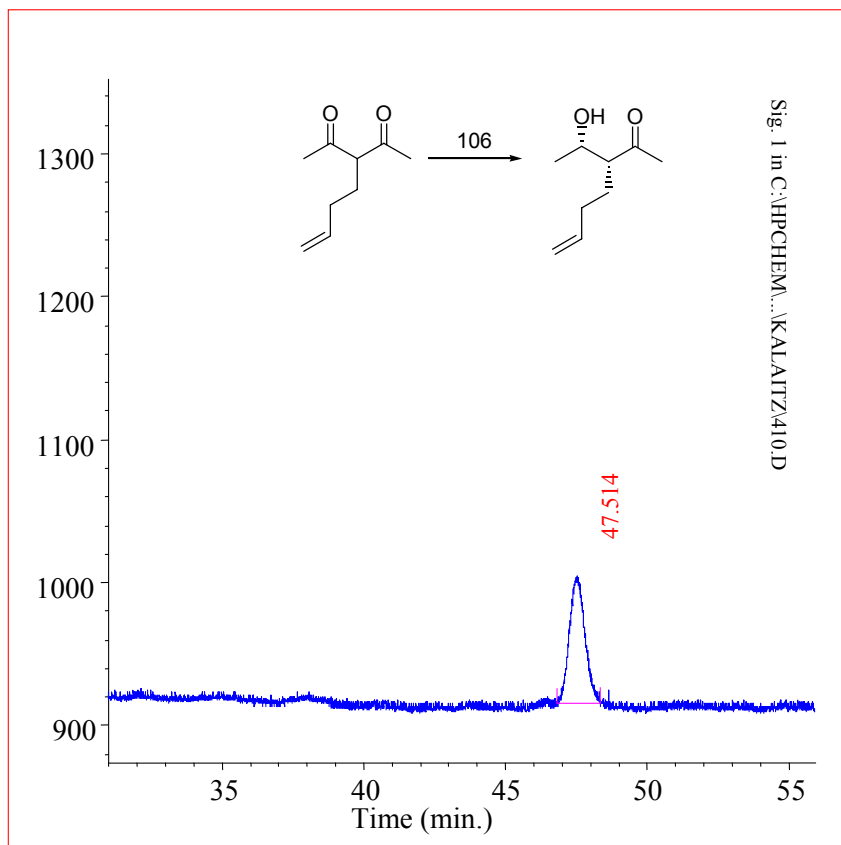
GC 18



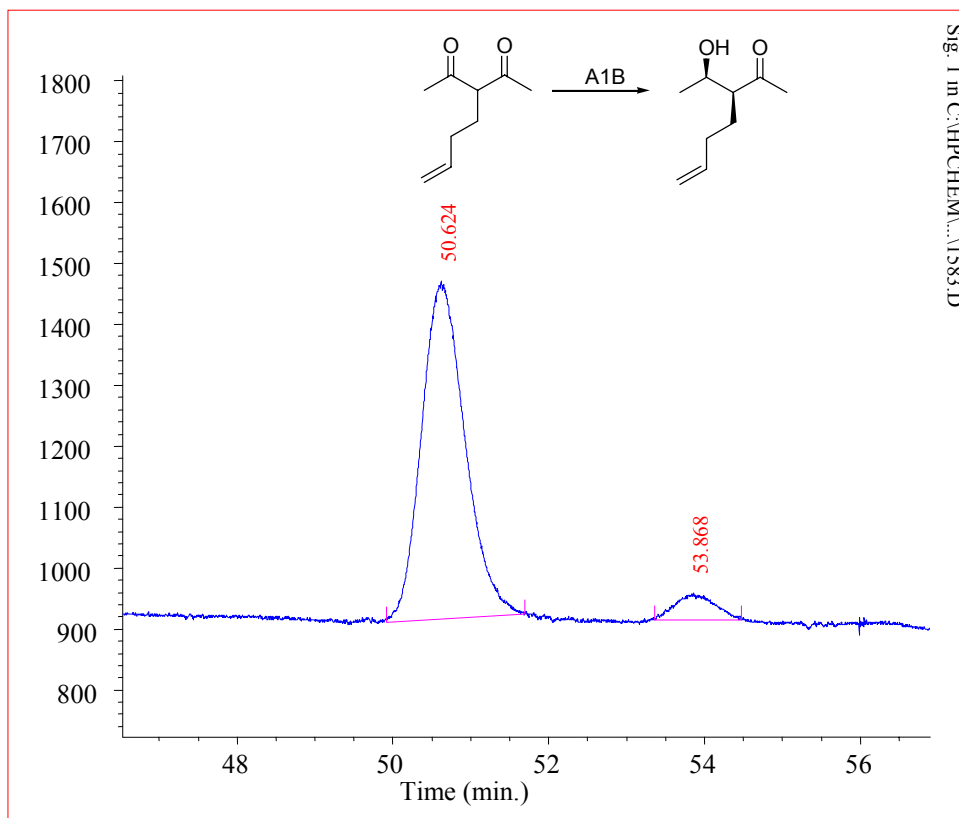
GC 19



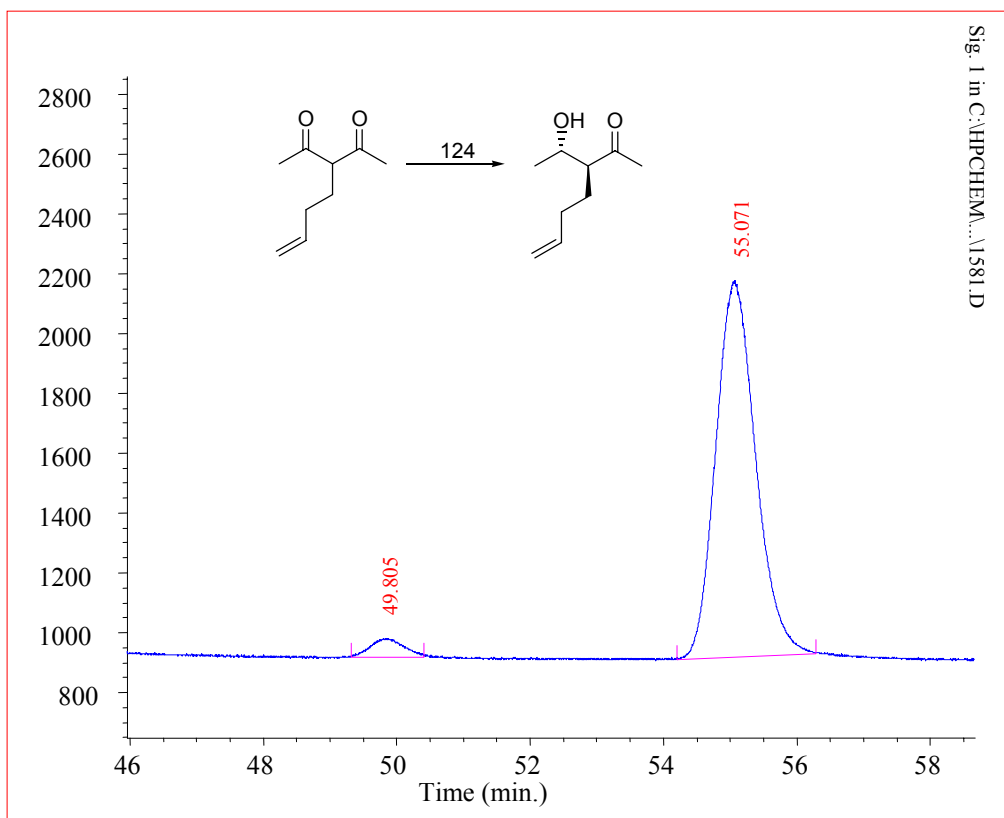
GC 20



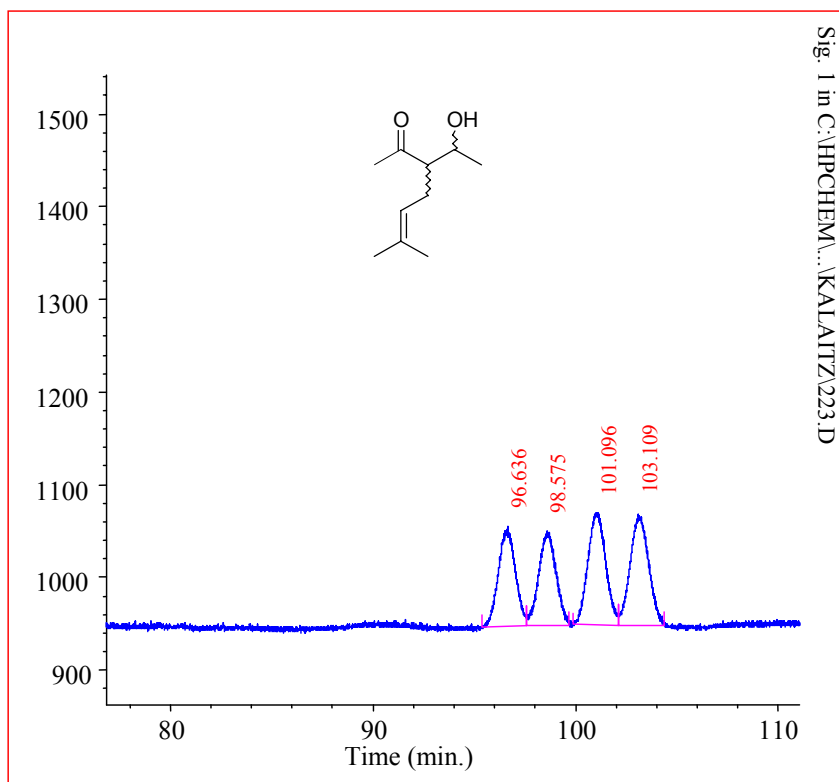
GC 21



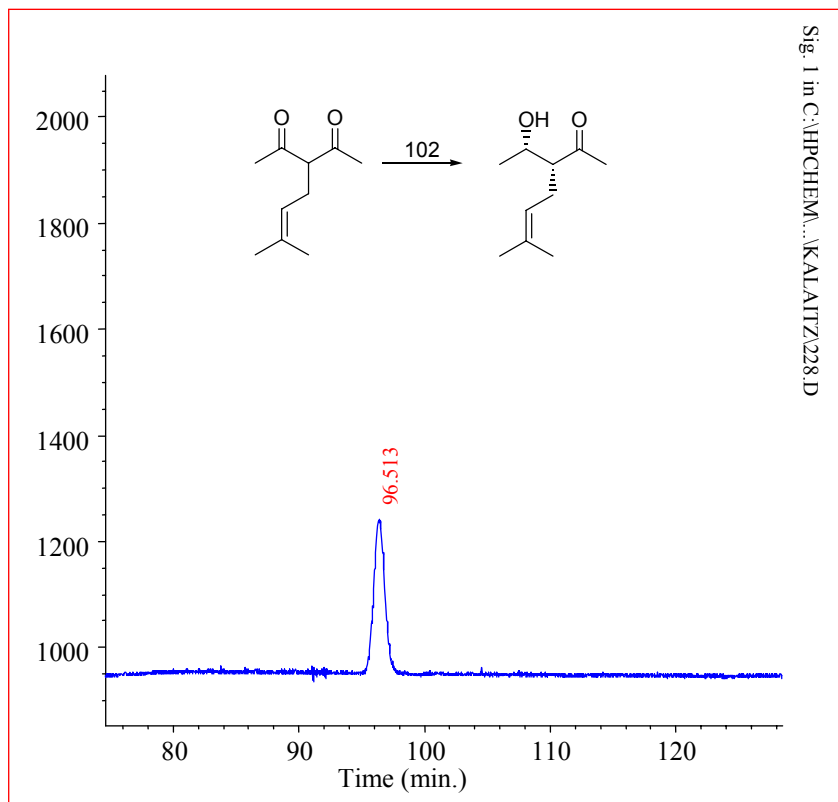
GC 22



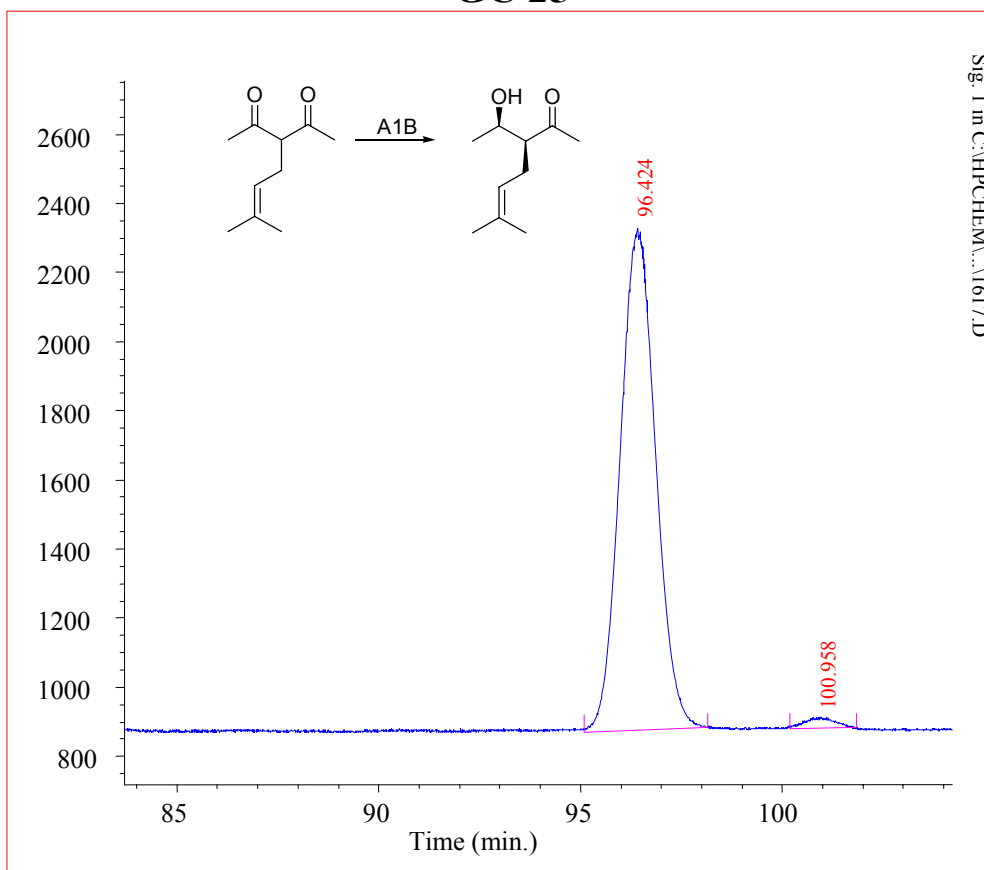
GC 23



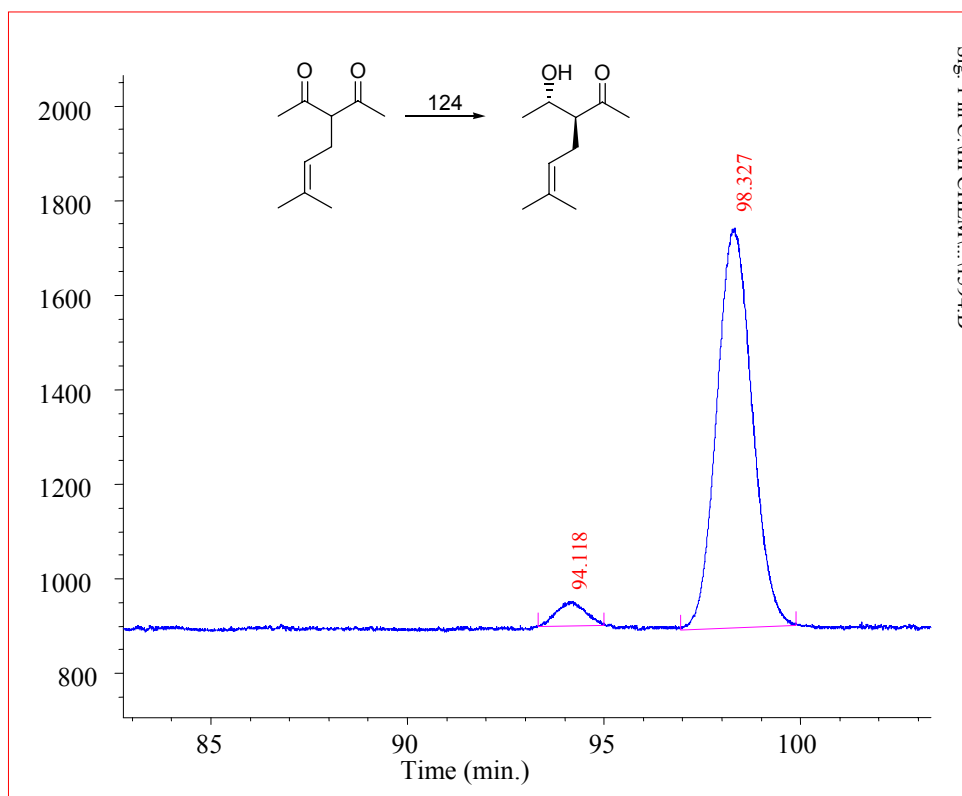
GC 24



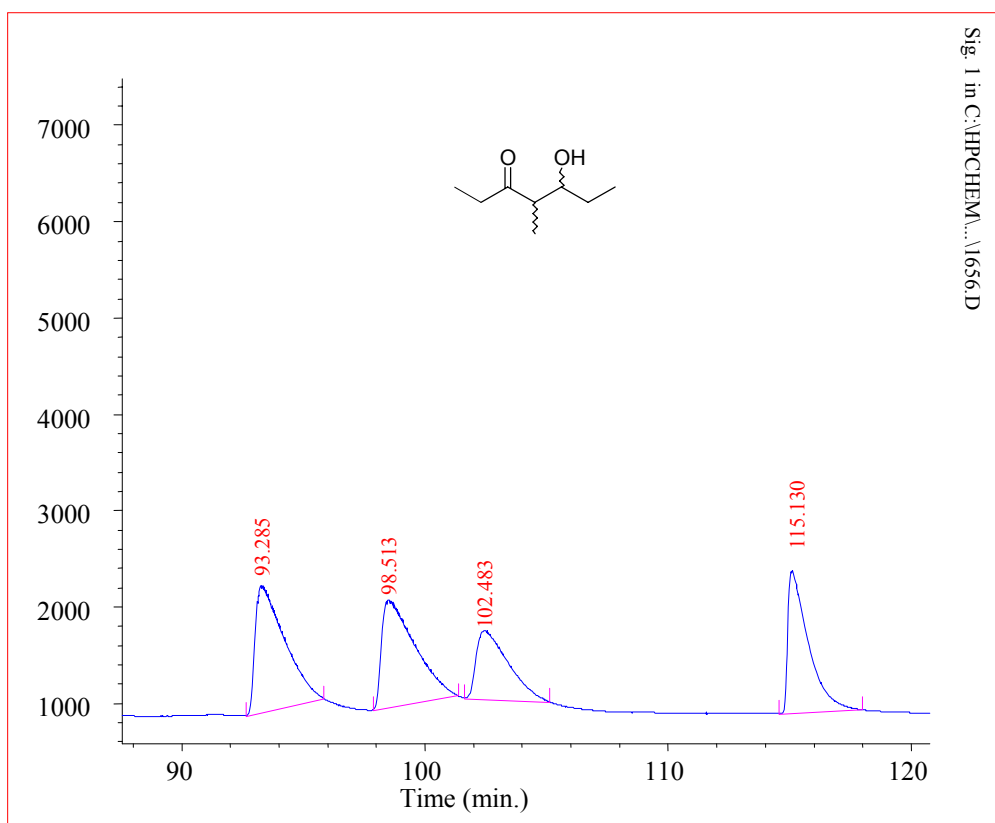
GC 25



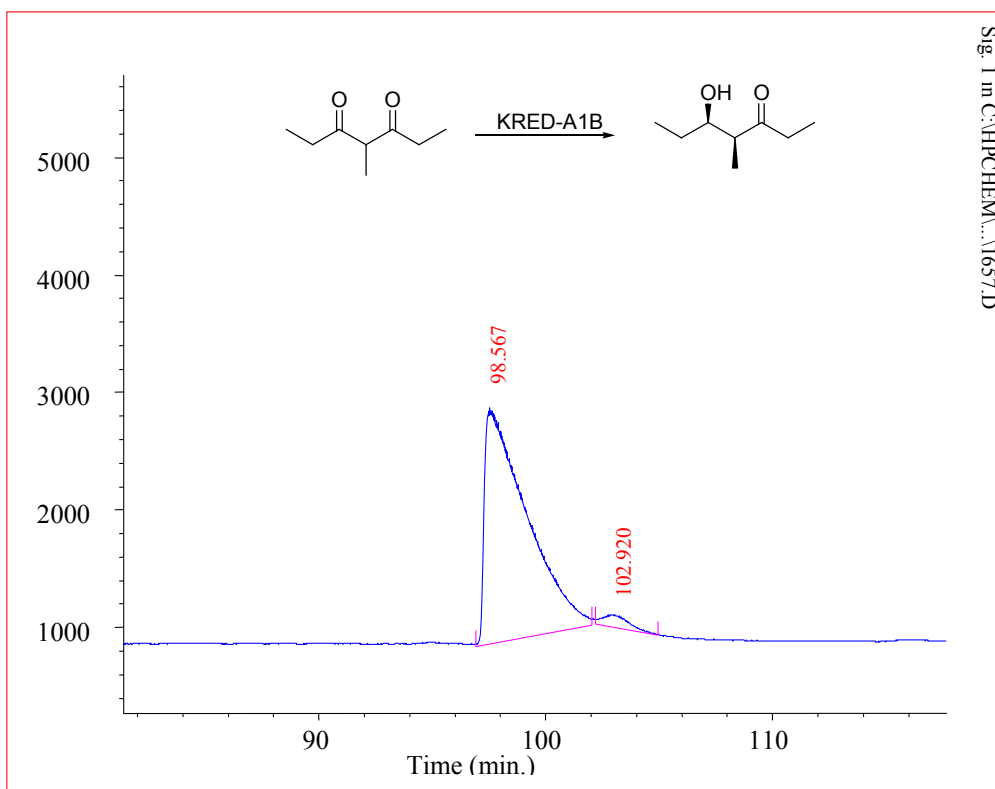
GC 26



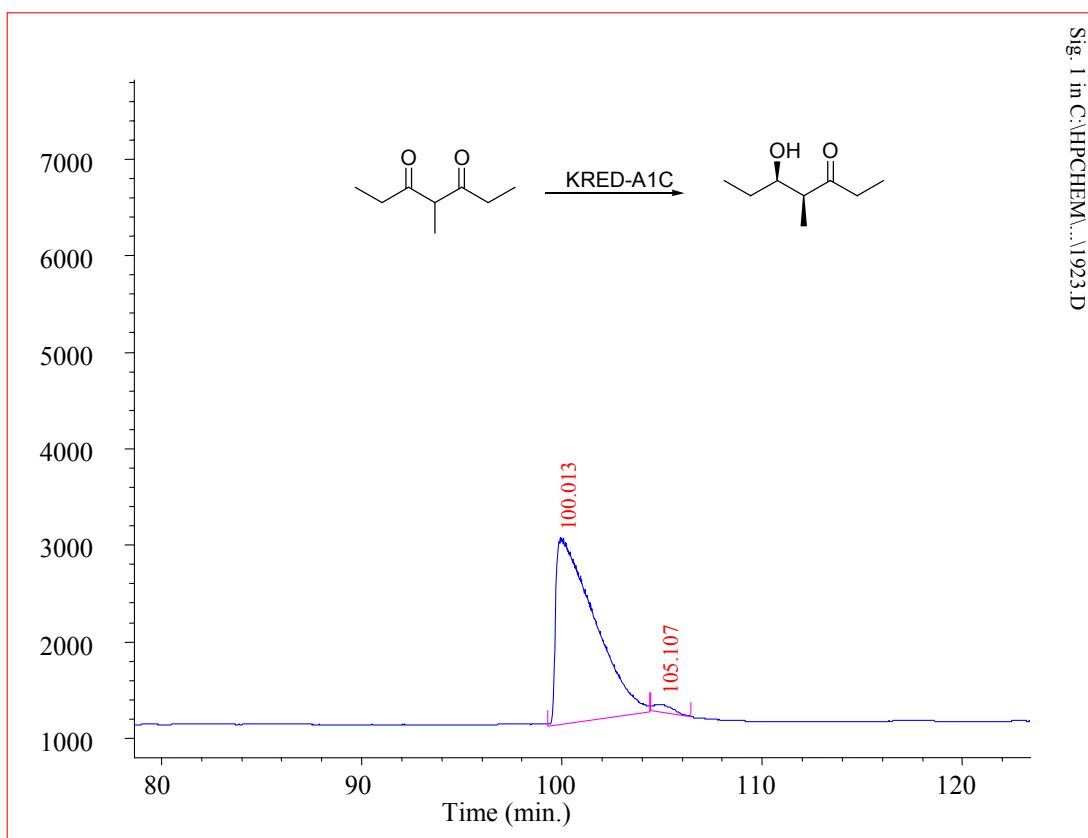
GC 27



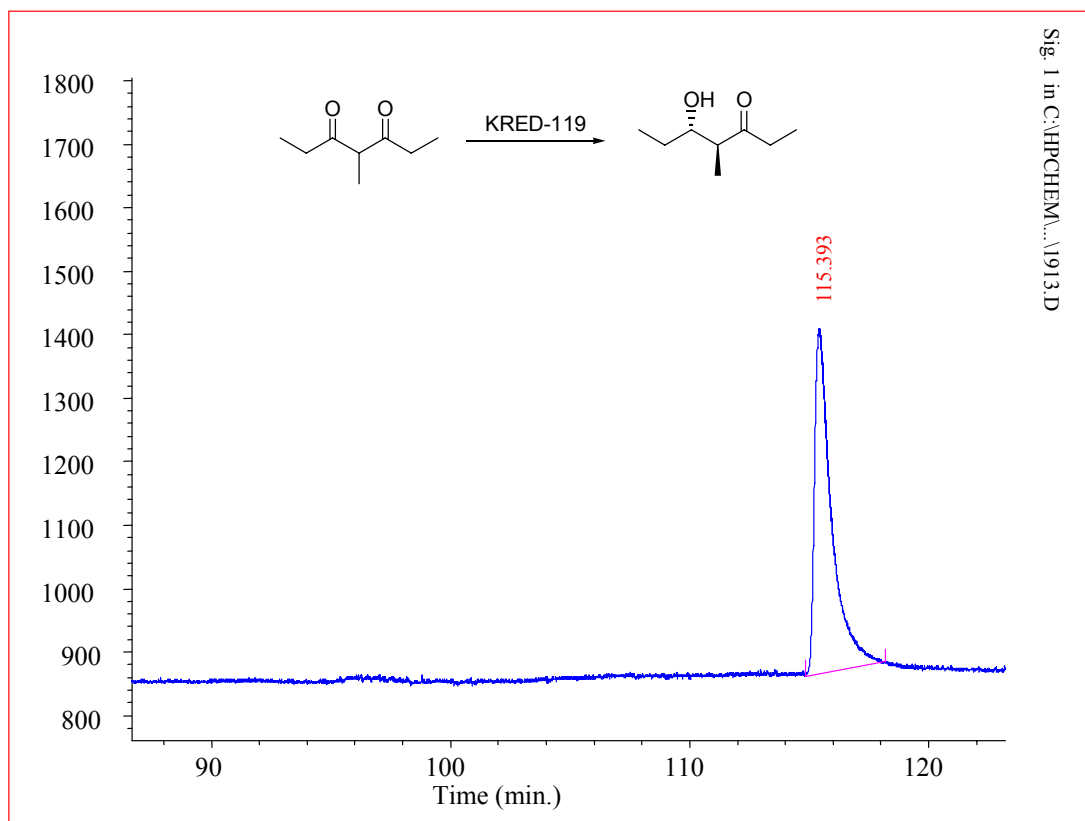
GC 28



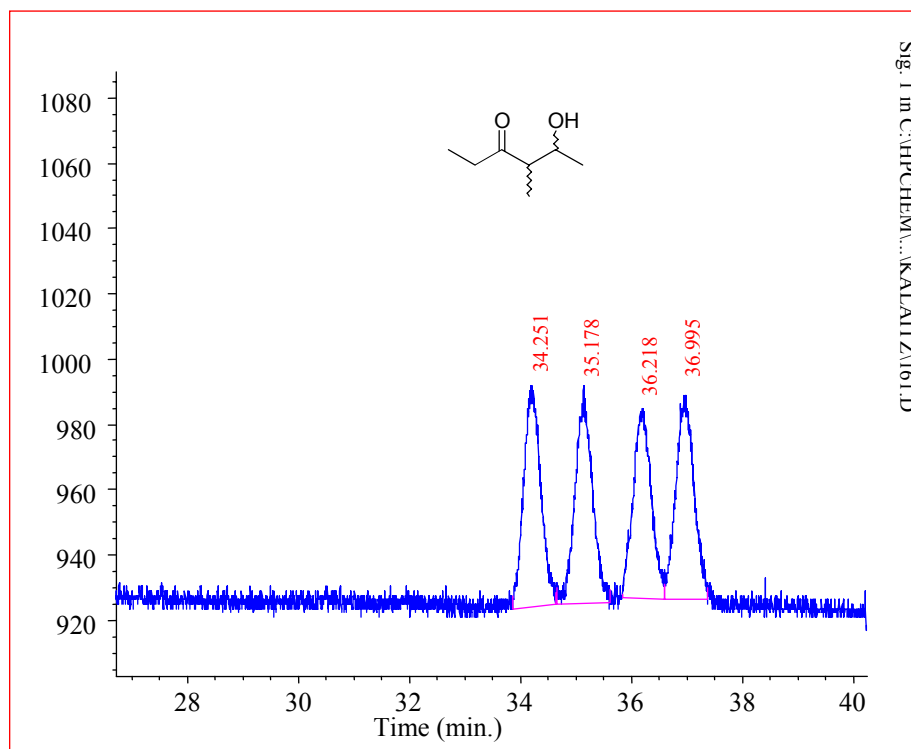
GC 29



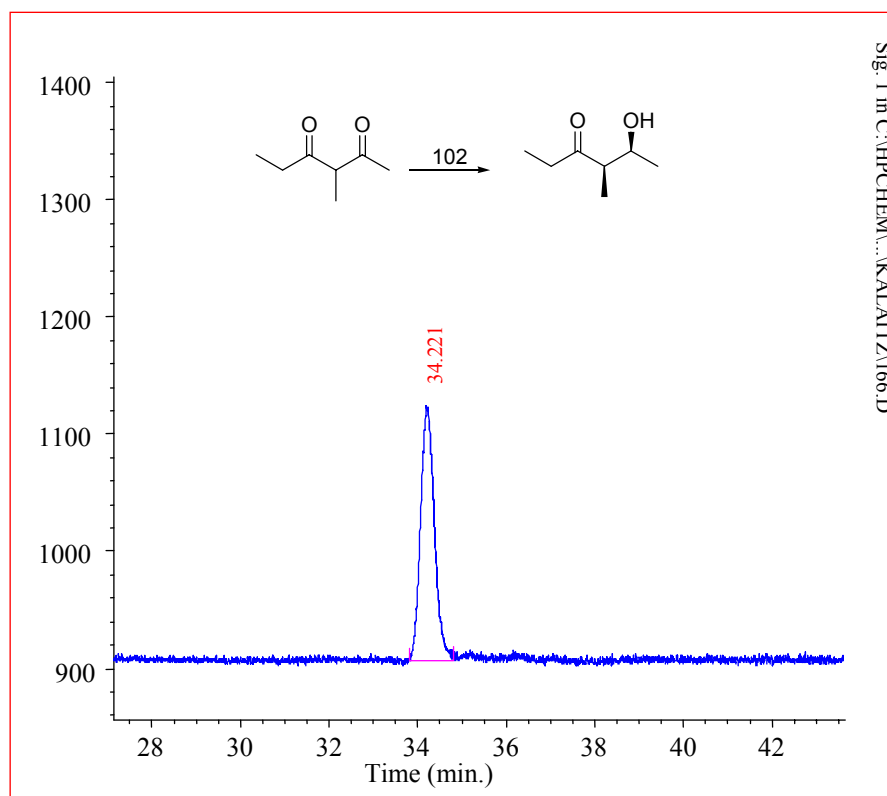
GC 30



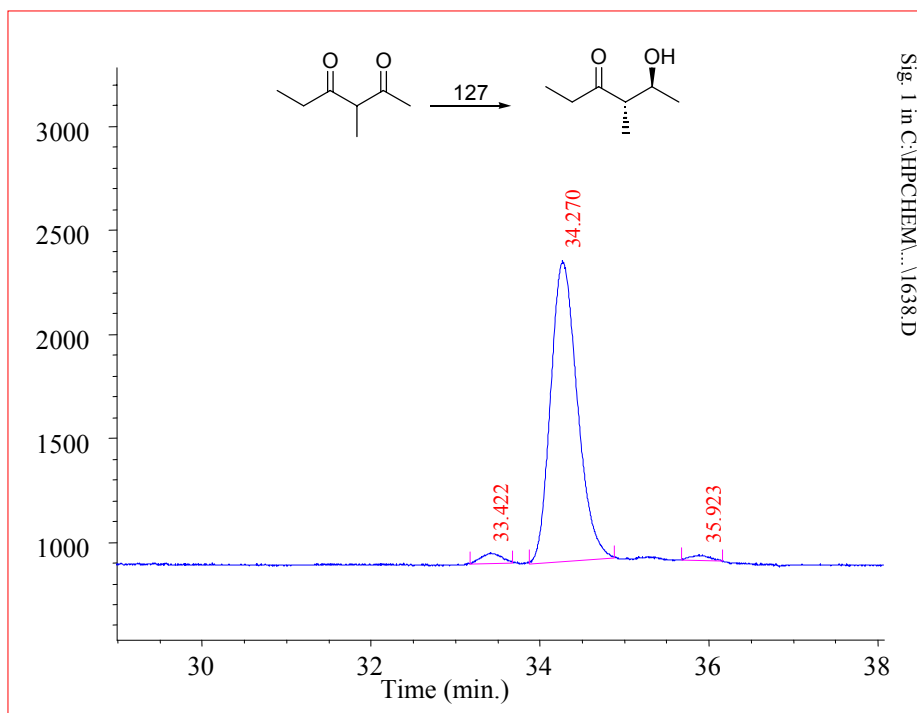
GC 31



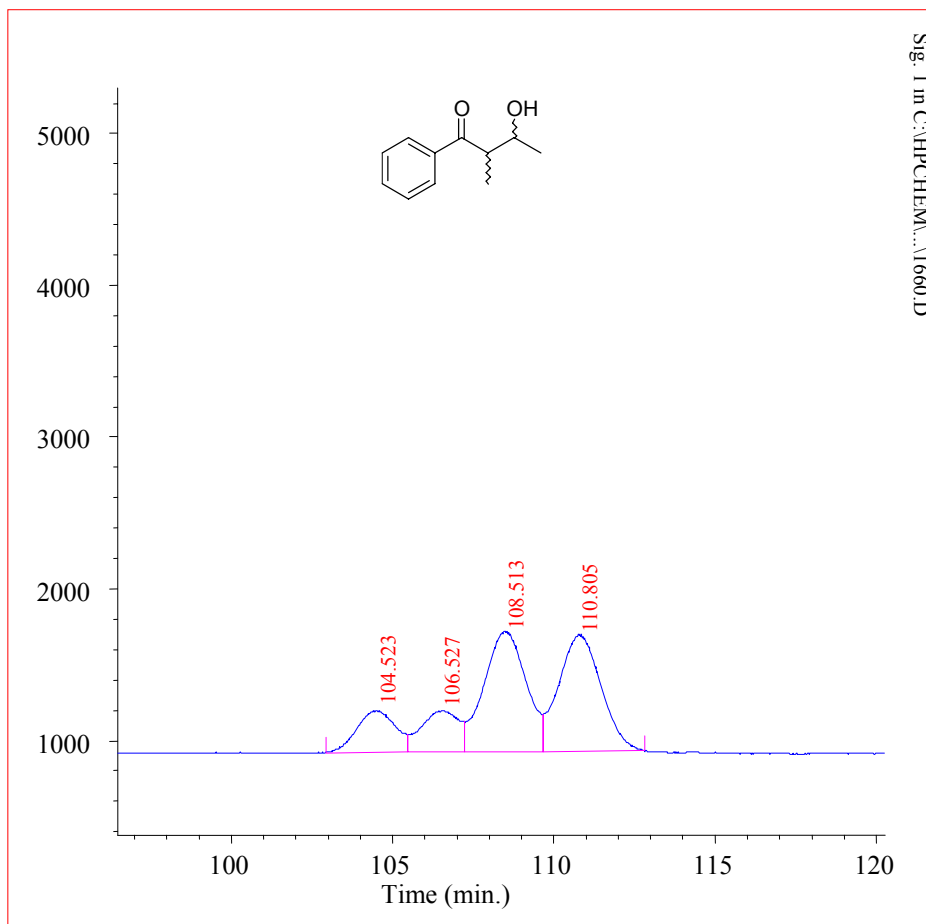
GC 32



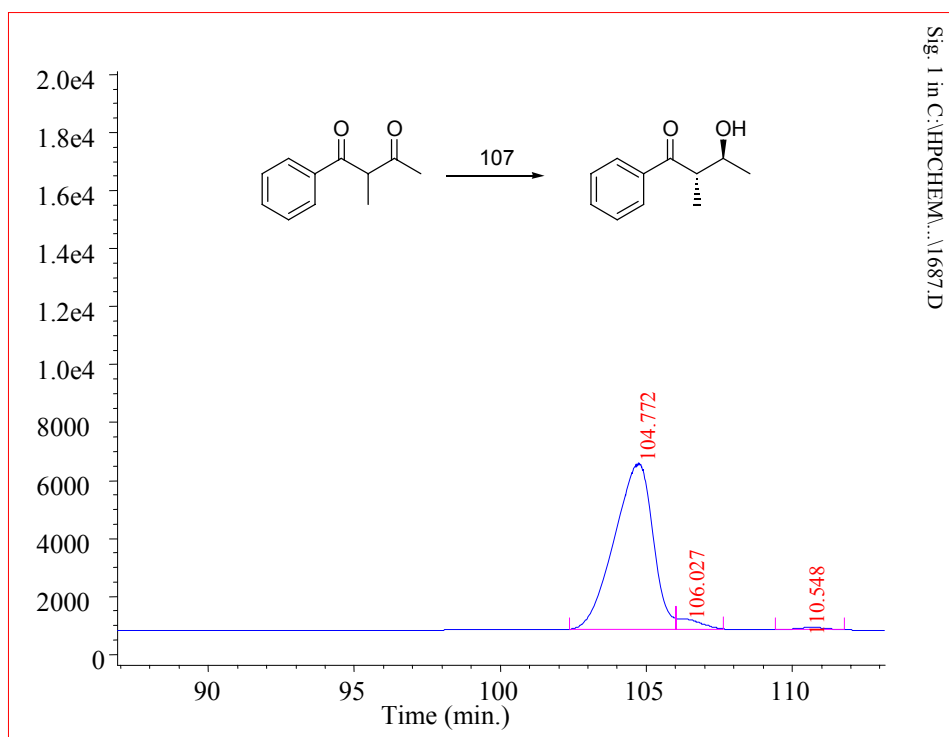
GC 33



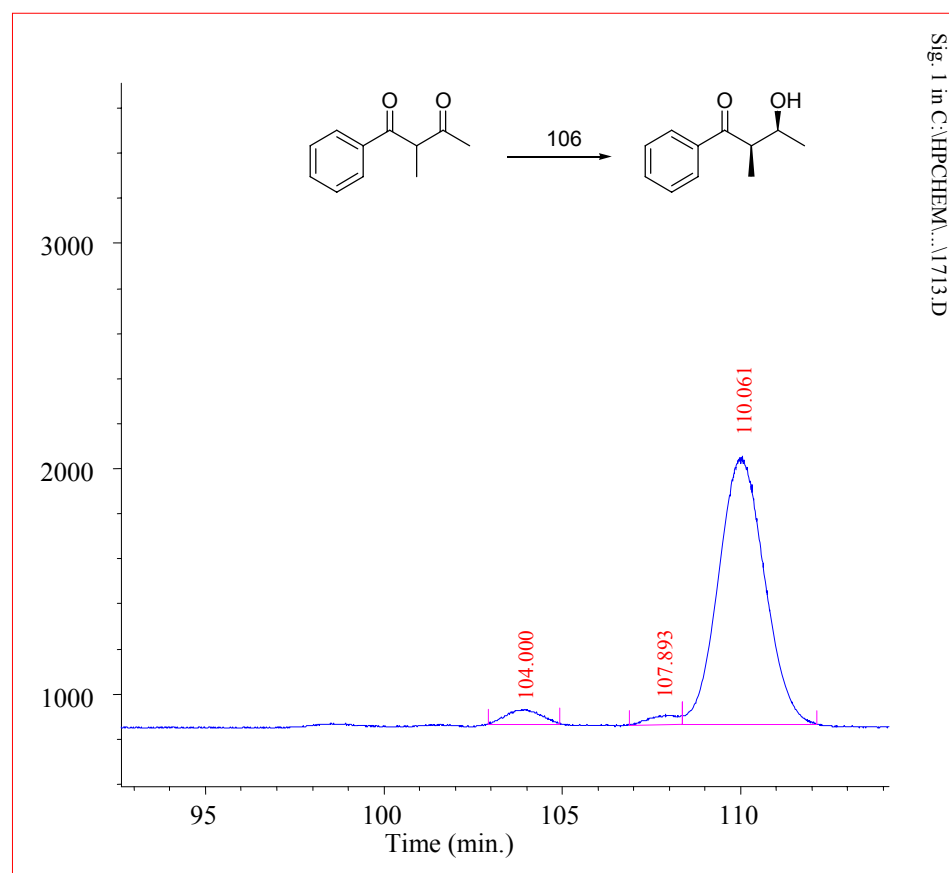
GC 34



GC 35



GC 36



GC 37

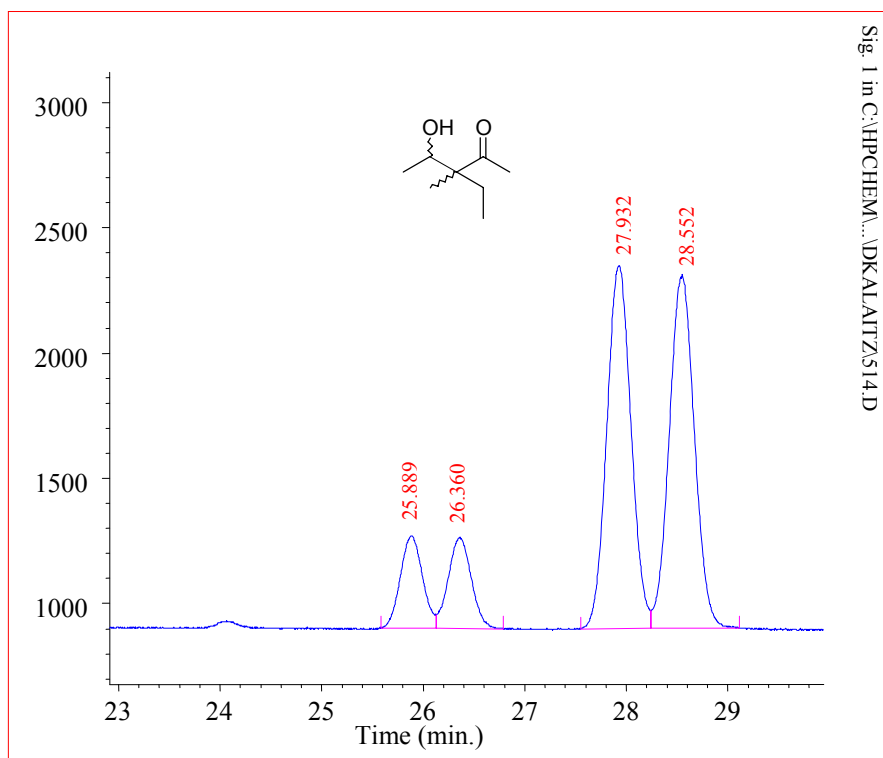


Fig. 1 in C:\HP\CHEM\...DKAL\ATZ\514.D

GC 38

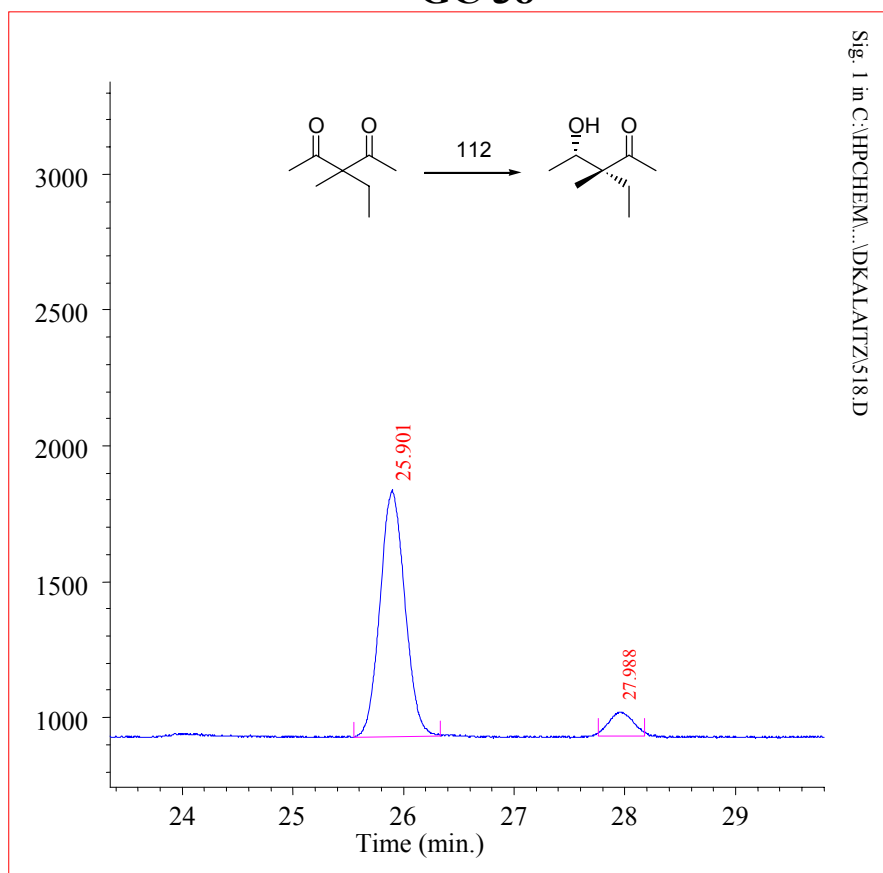
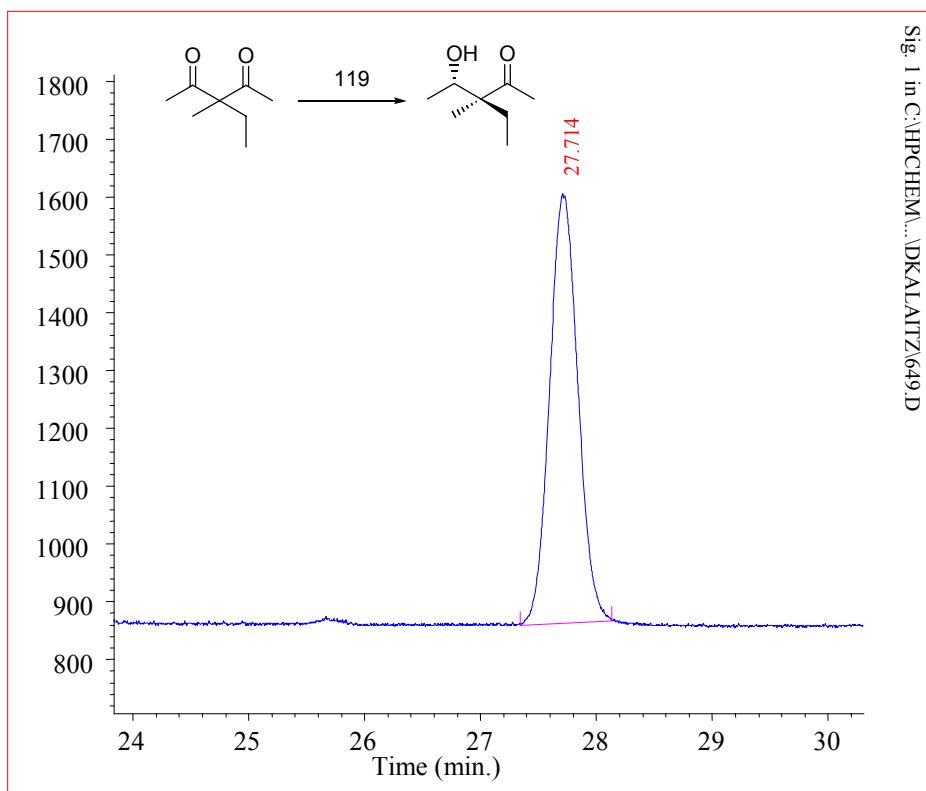
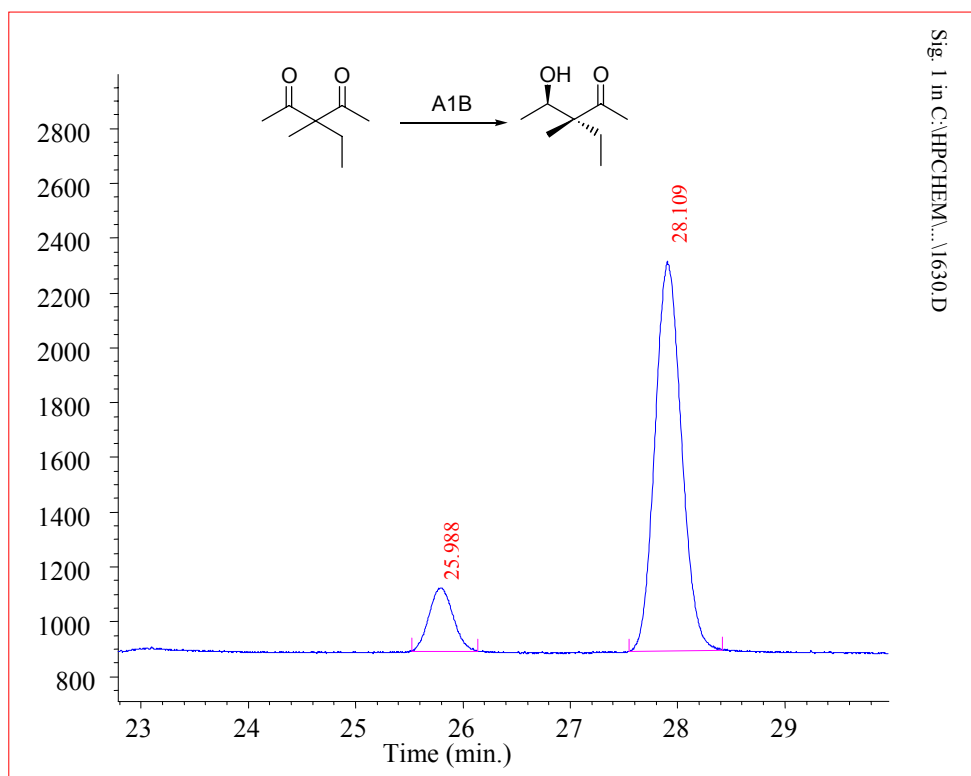


Fig. 1 in C:\HP\CHEM\...DKAL\ATZ\518.D

GC 39



GC 40



GC 41

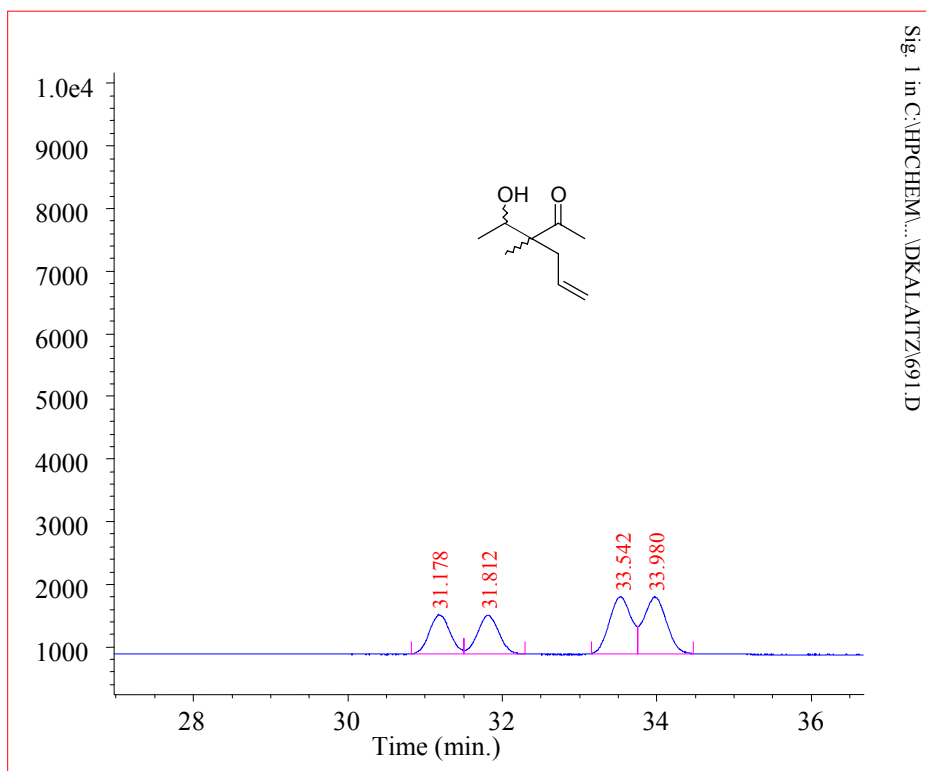


Fig. 1 in C:\HP\CHEM\... \DKALAITZ\6911.D

GC 42

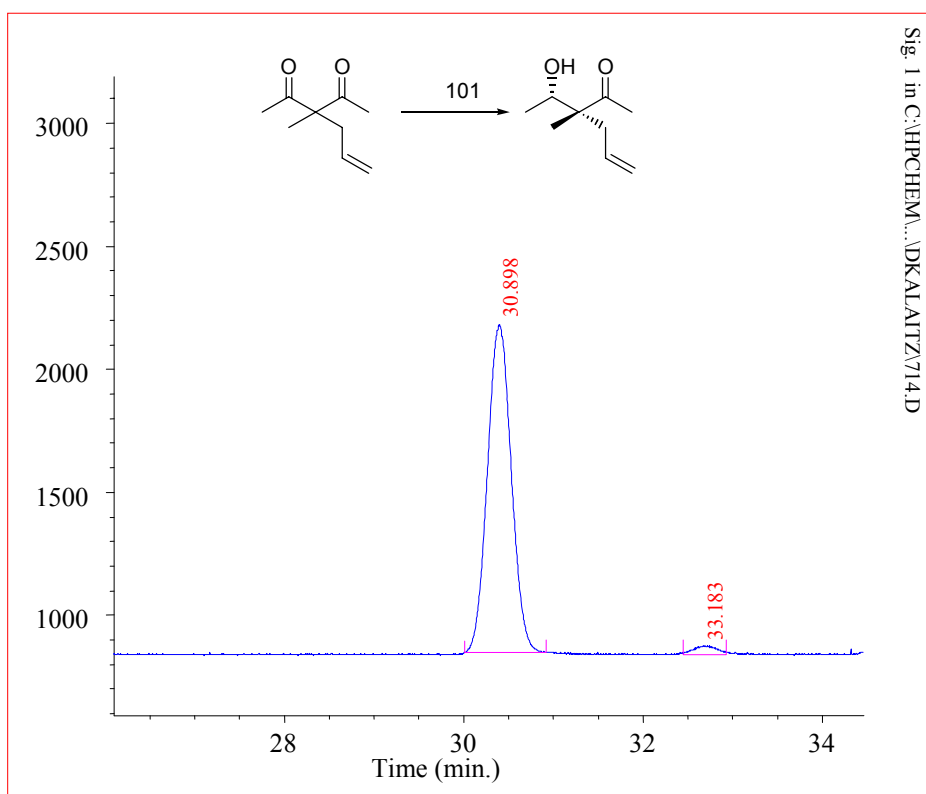
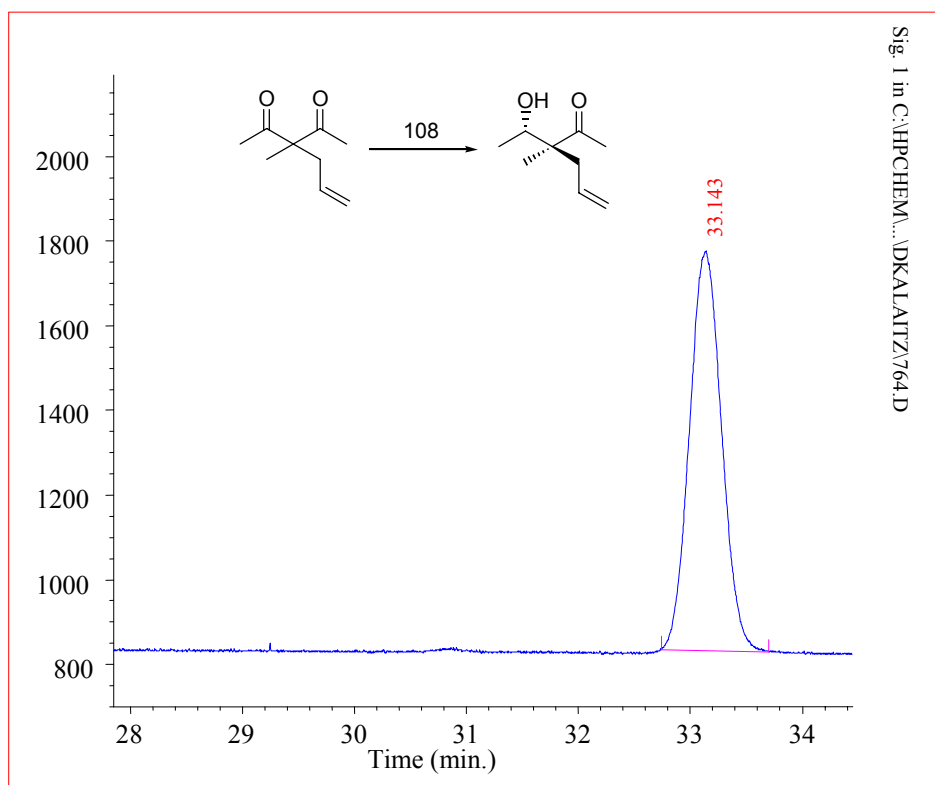
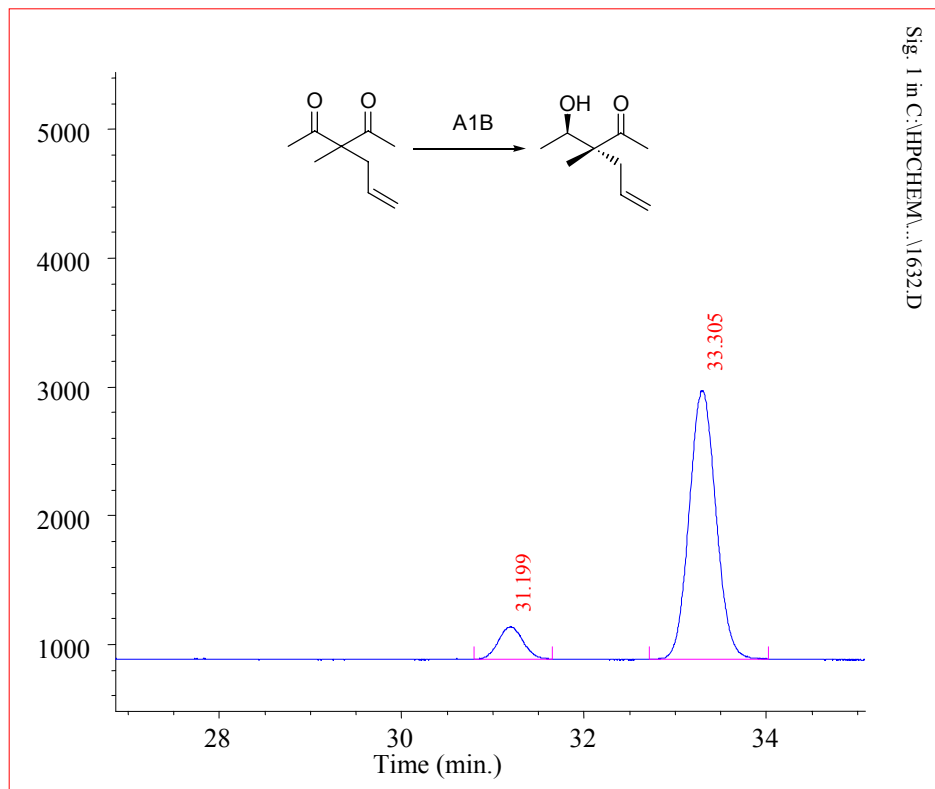


Fig. 1 in C:\HP\CHEM\... \DKALAITZ\714.D

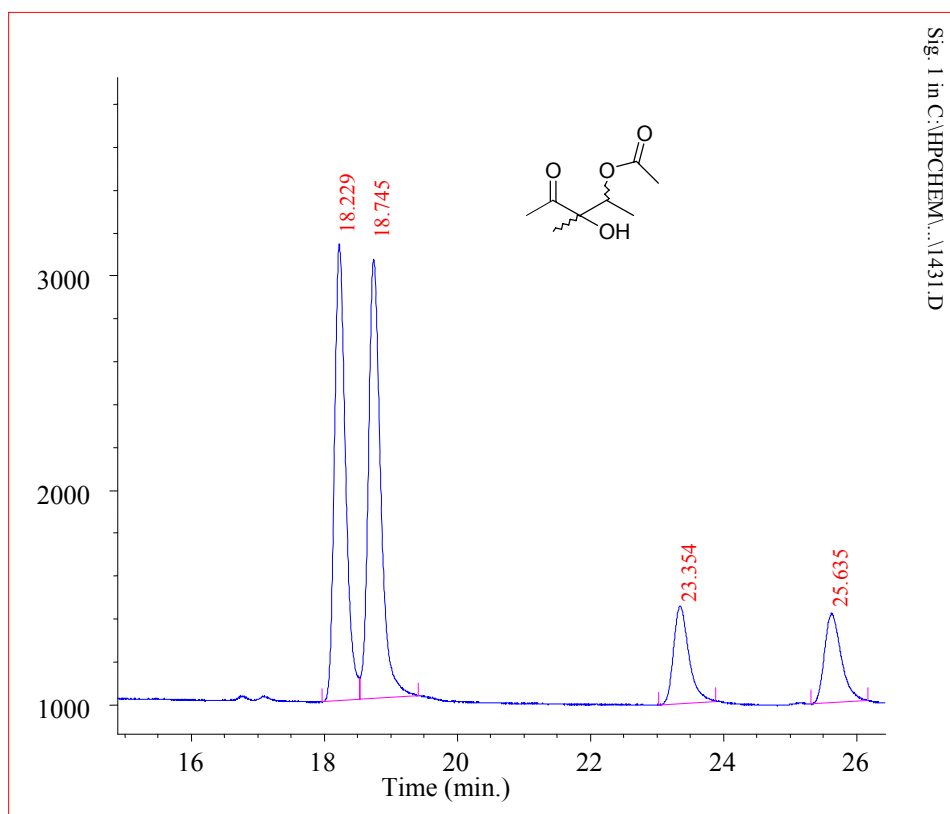
GC 43



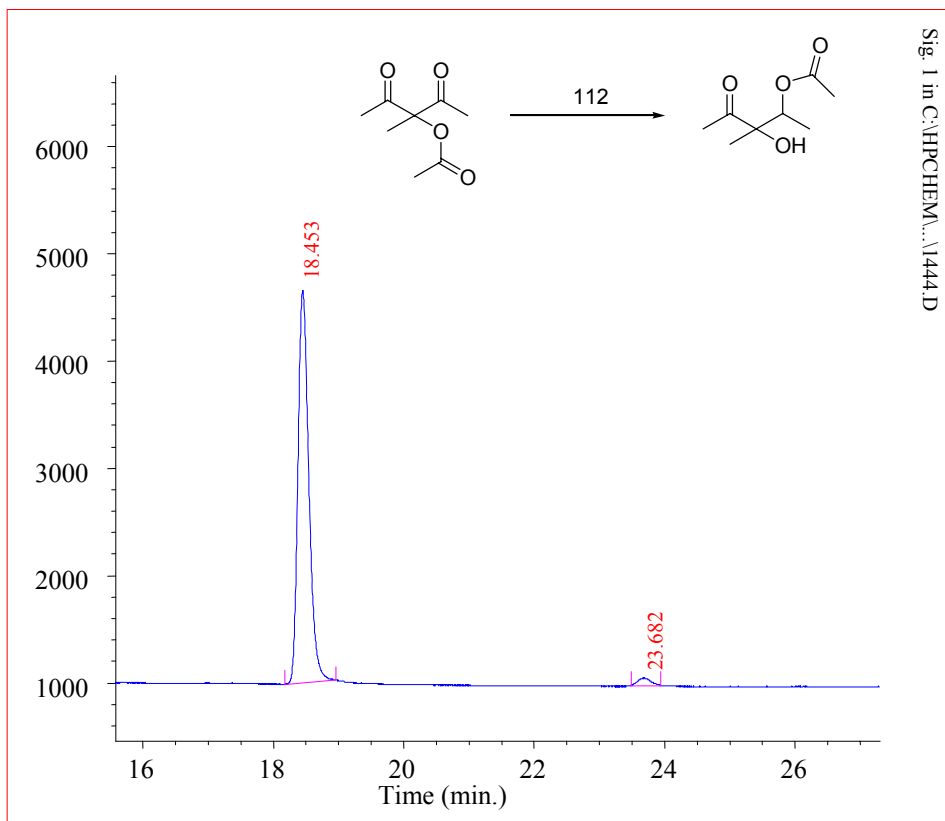
GC 44



GC 45



GC 46



GC 47

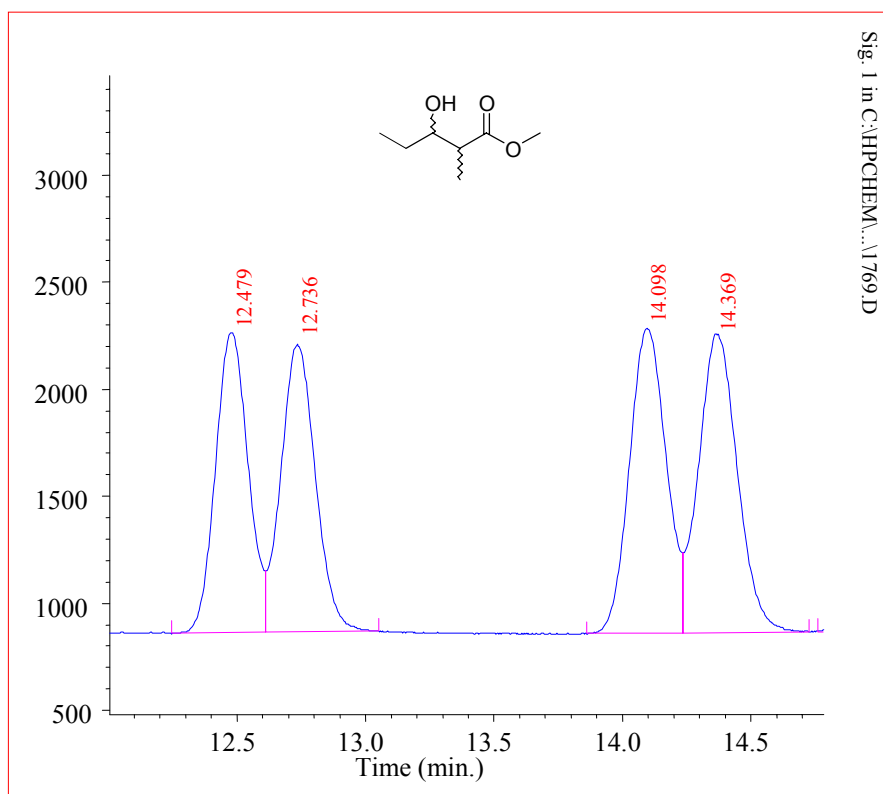


Fig. 1 in C:\HPCHEM\...1769.D

GC 48

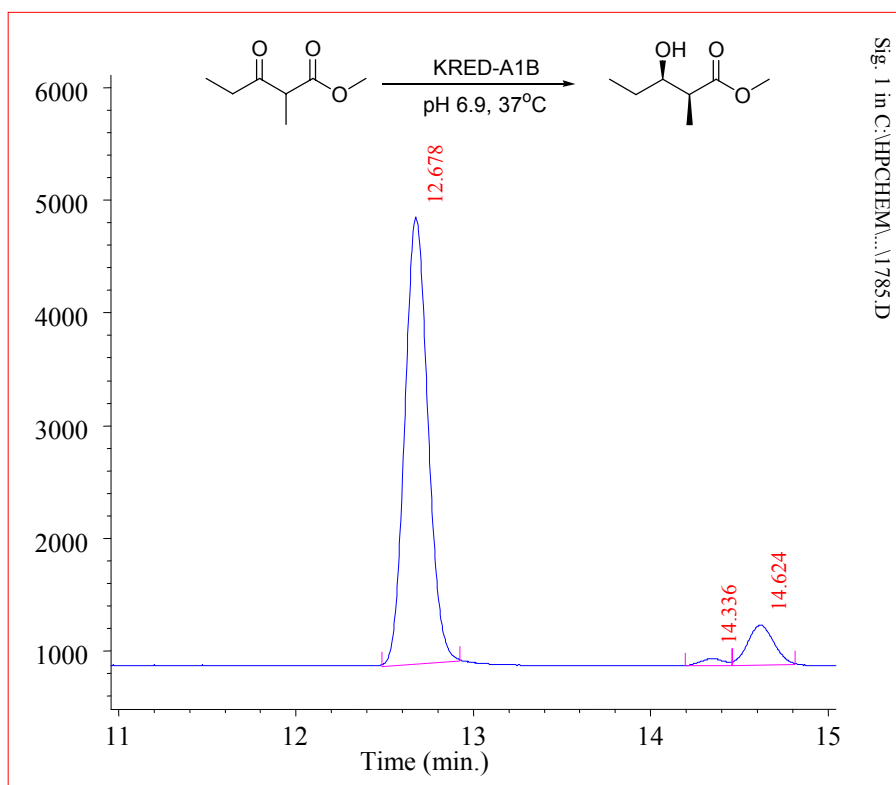
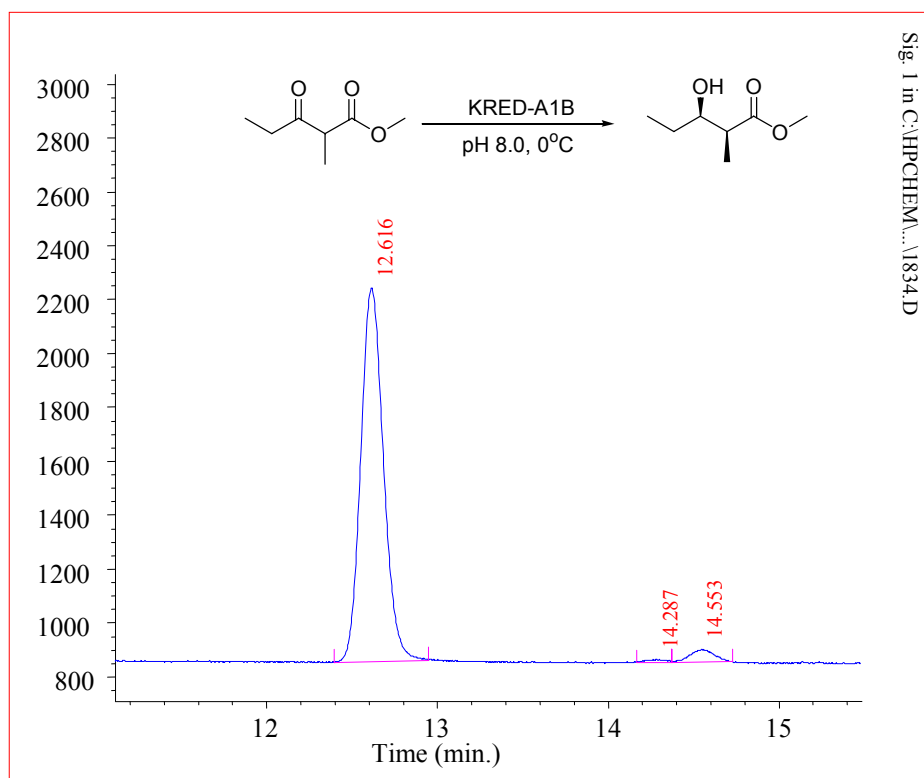
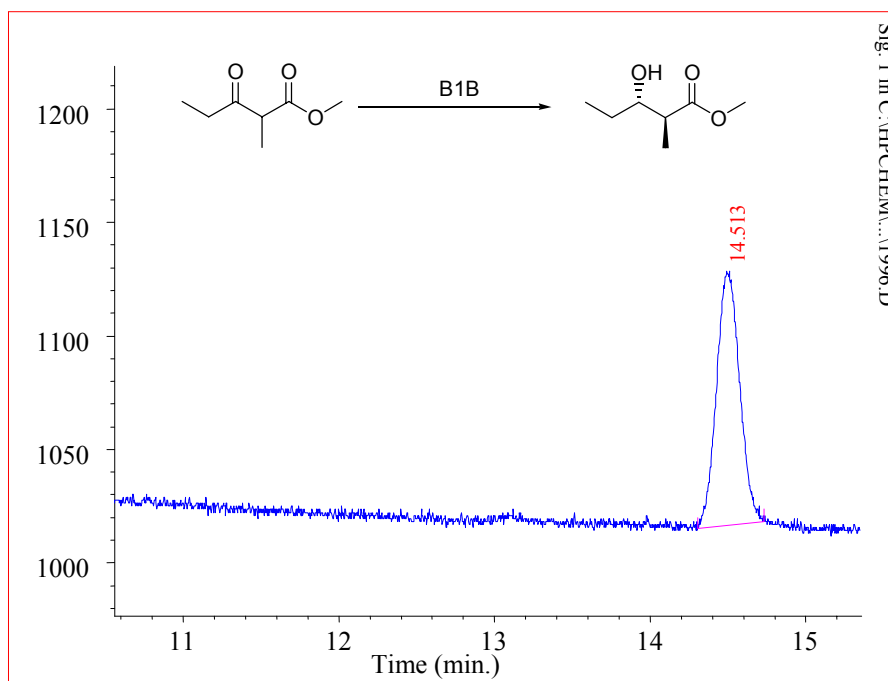


Fig. 1 in C:\HPCHEM\...1785.D

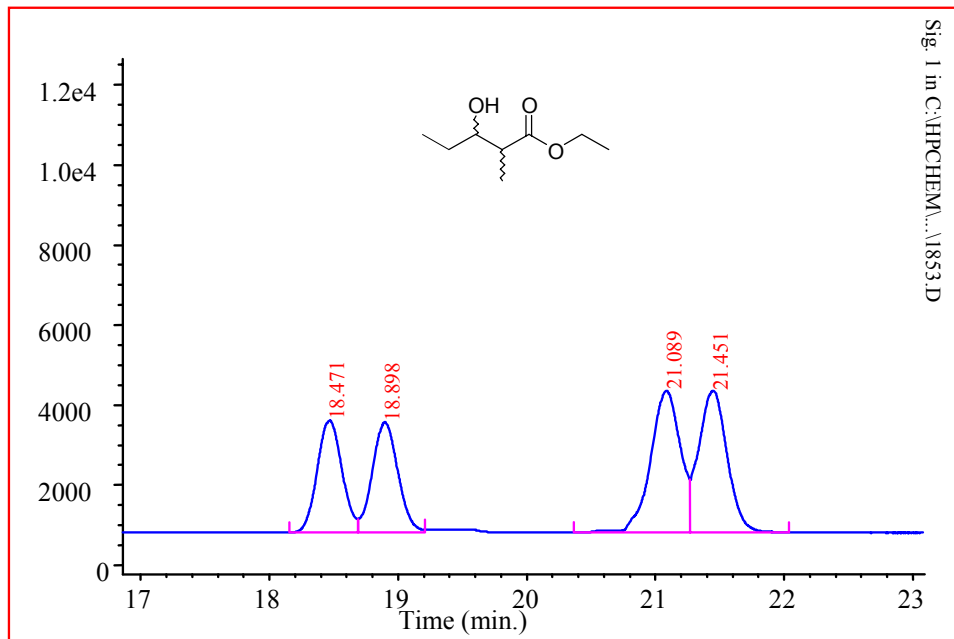
GC 49



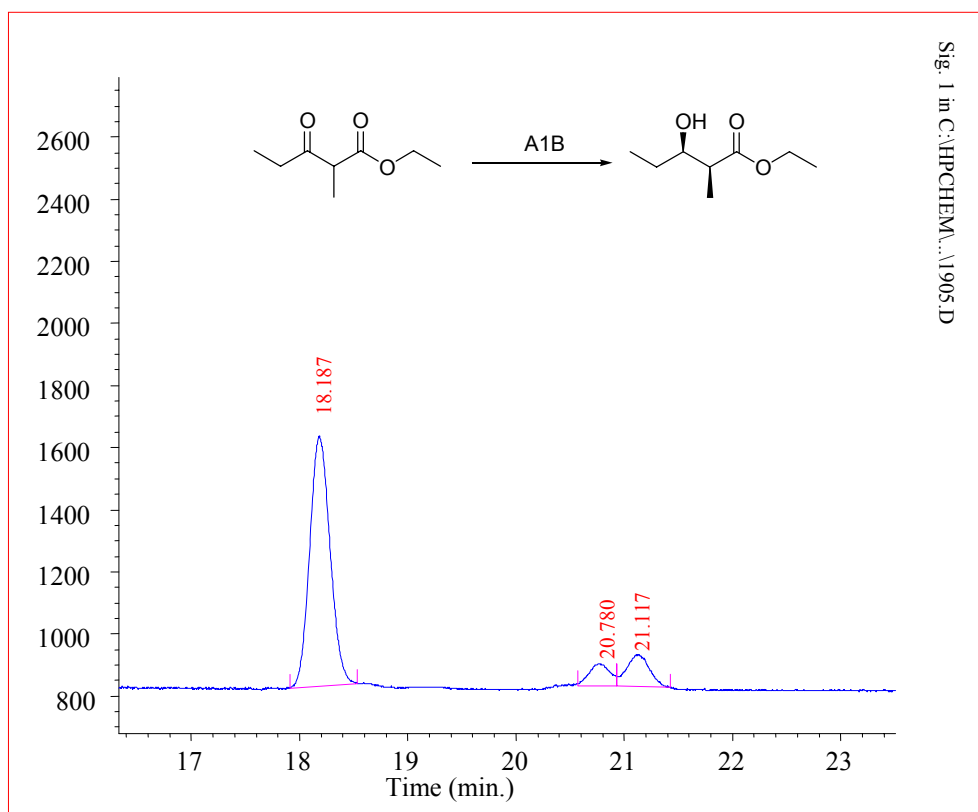
GC 50



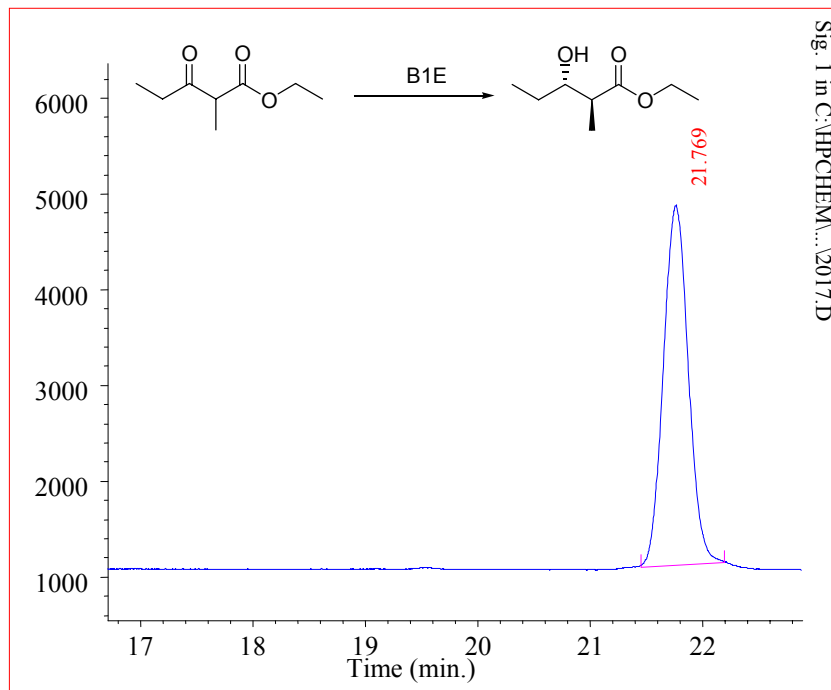
GC 51



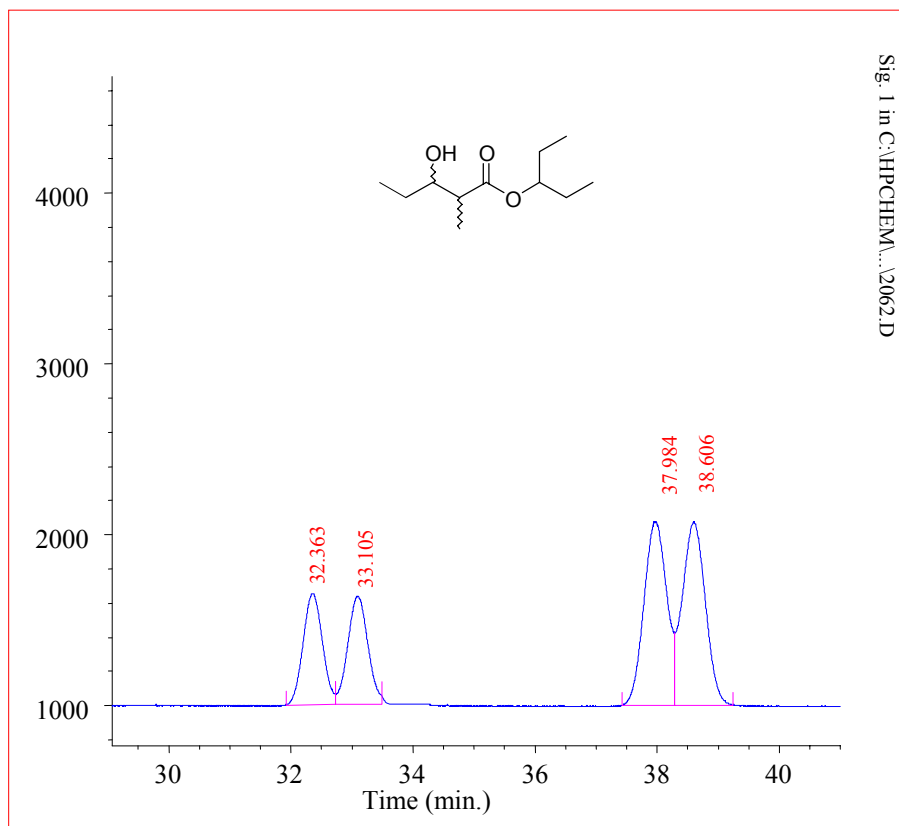
GC 52



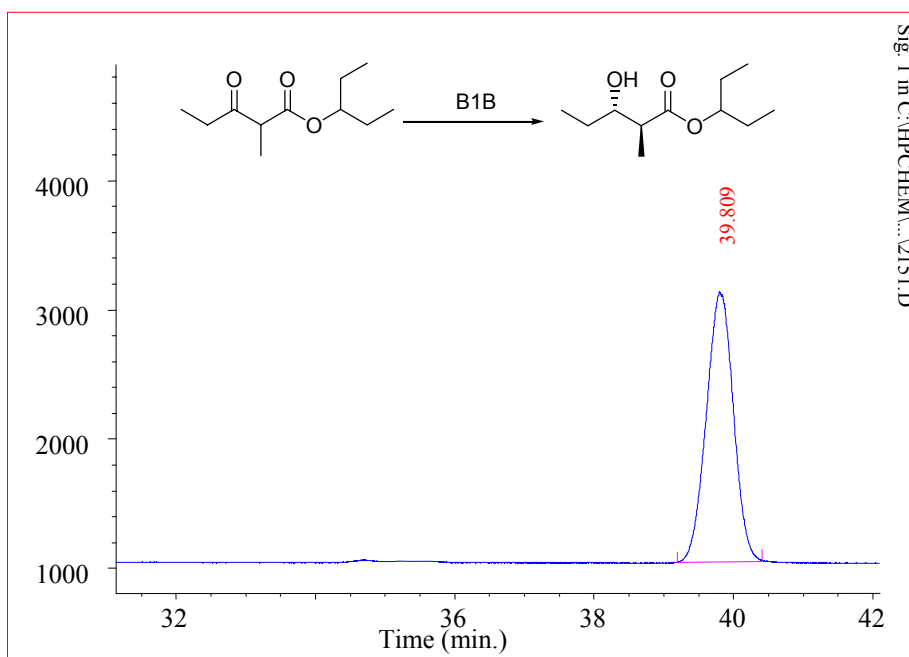
GC 53



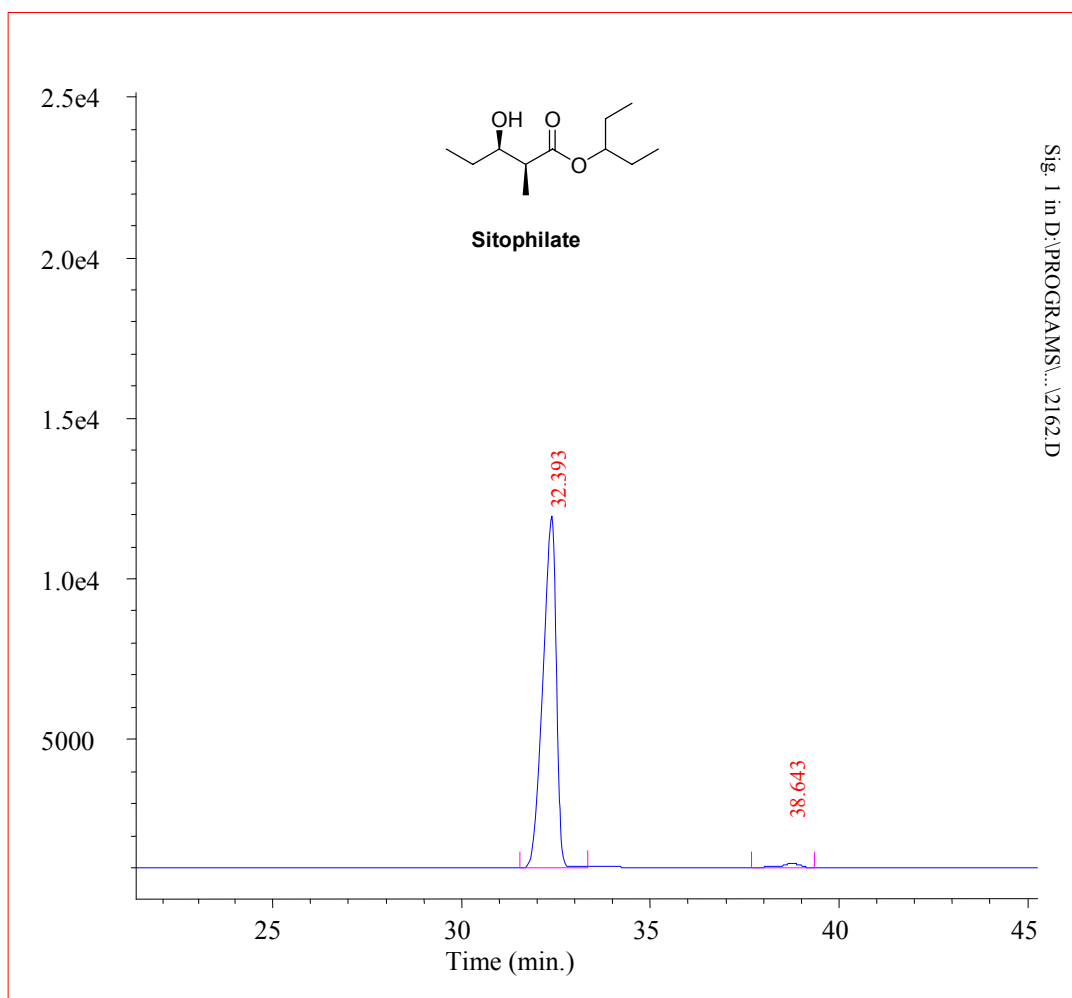
GC 54



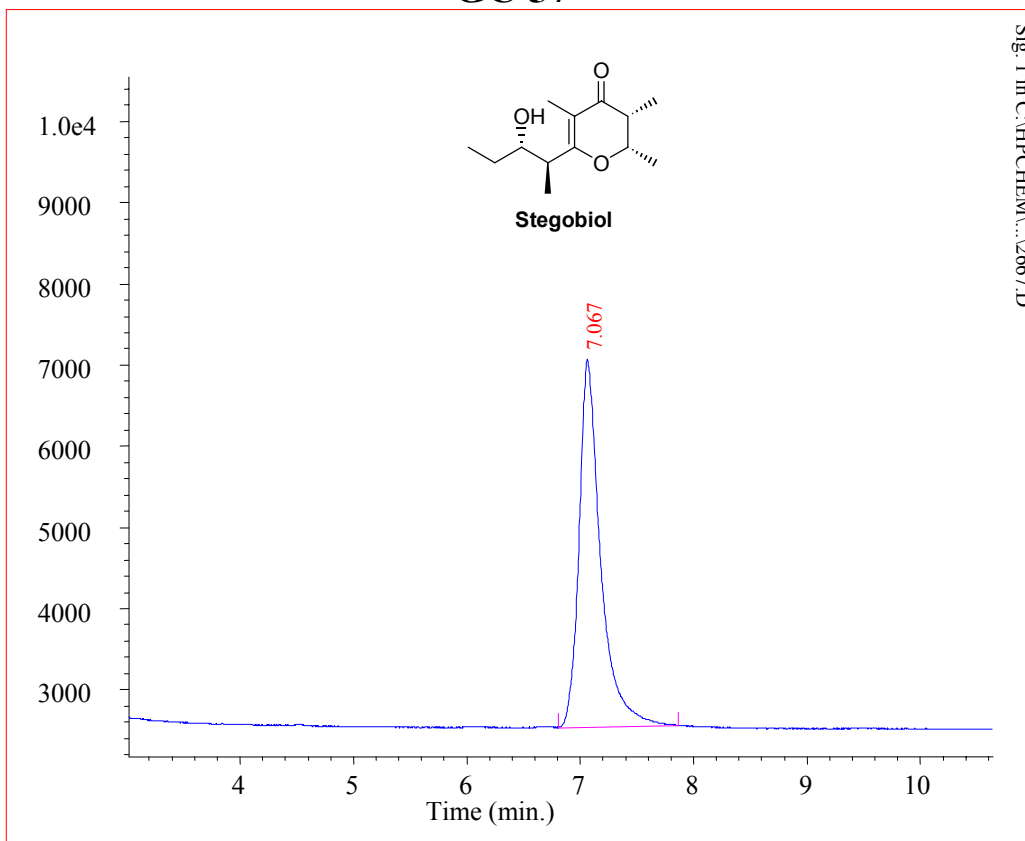
GC 55



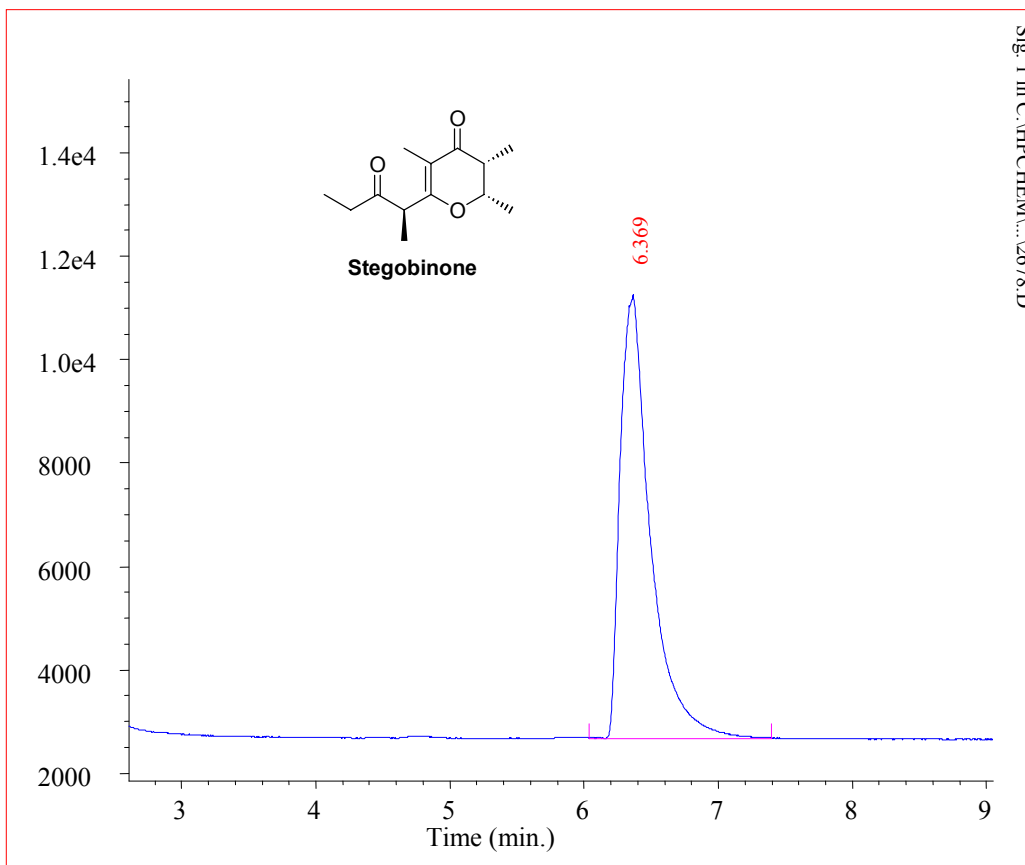
GC 56



GC 57



GC 58

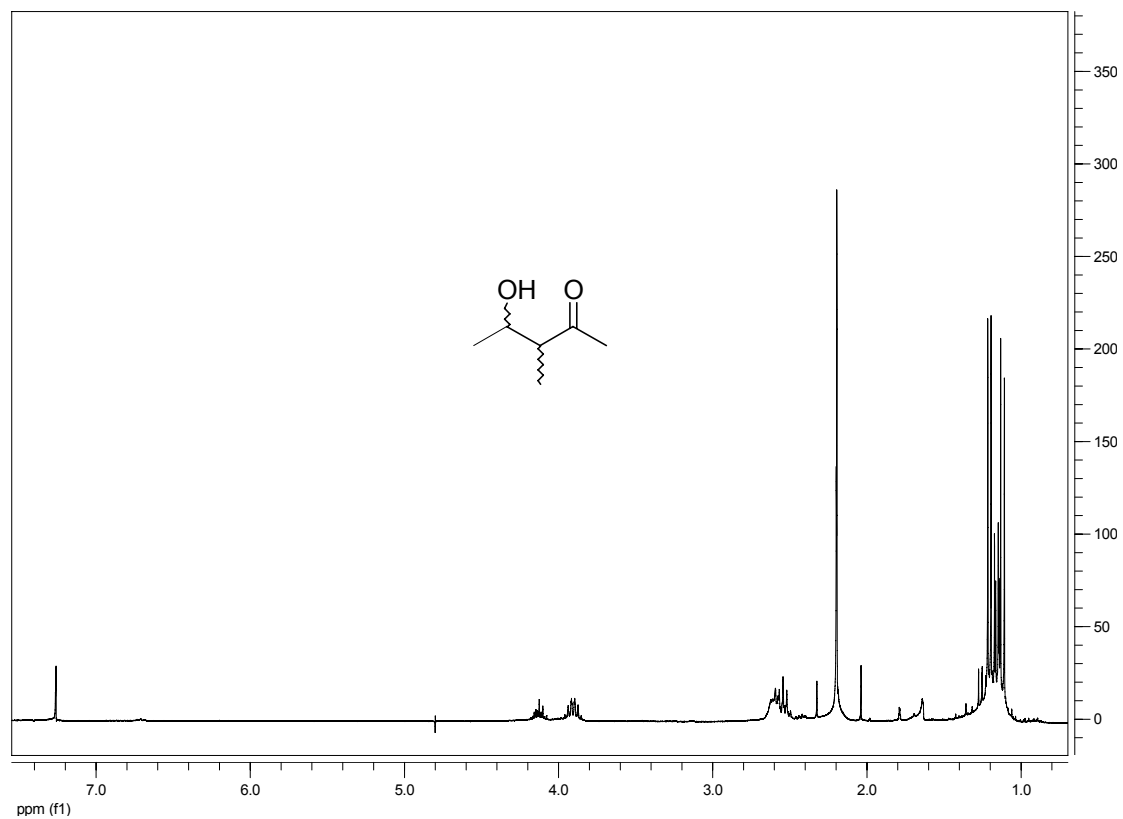


ΦΑΣΜΑΤΑ

NMR

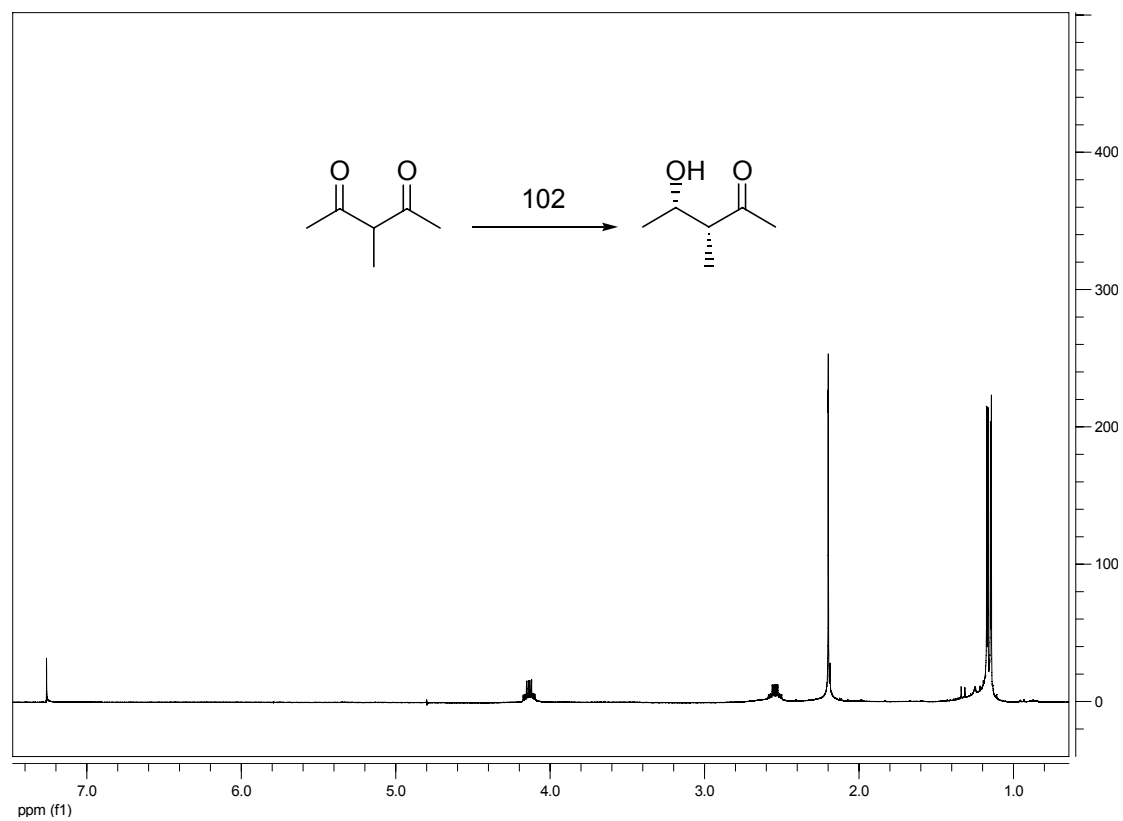
NMR 1

¹H-NMR, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη 1



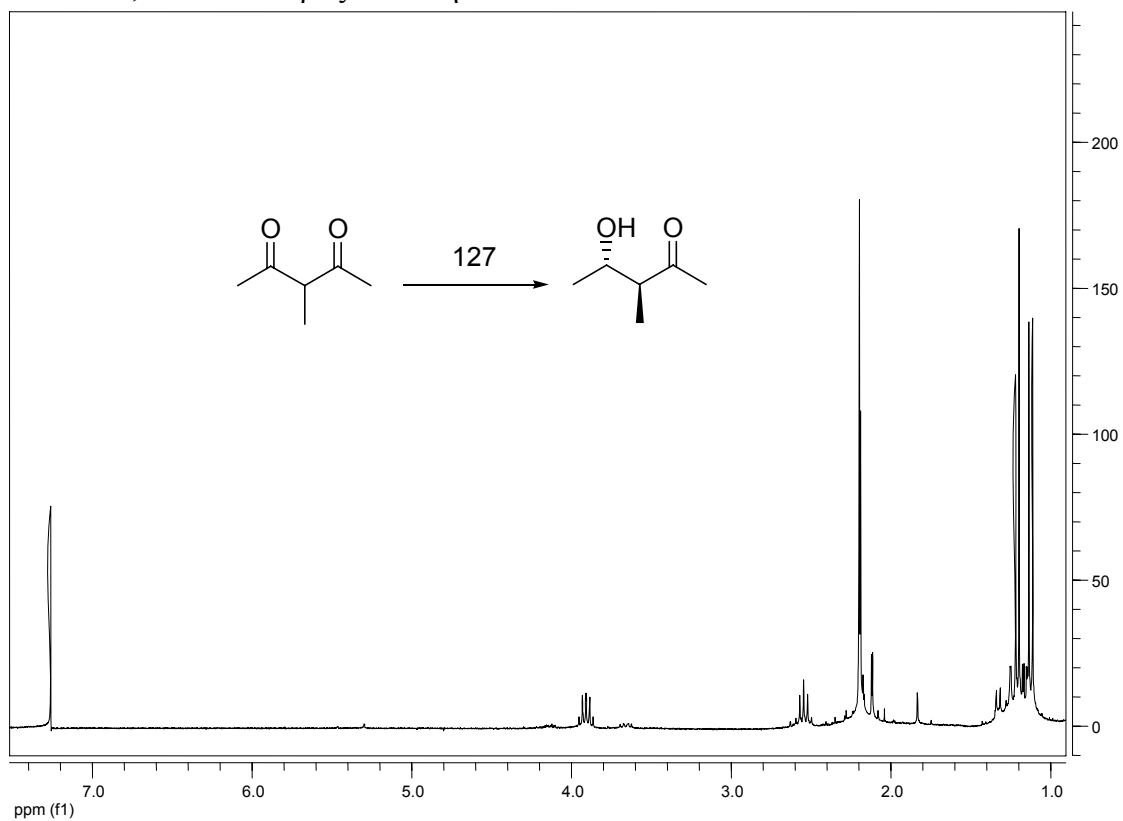
NMR 2

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ κετόνη 1a



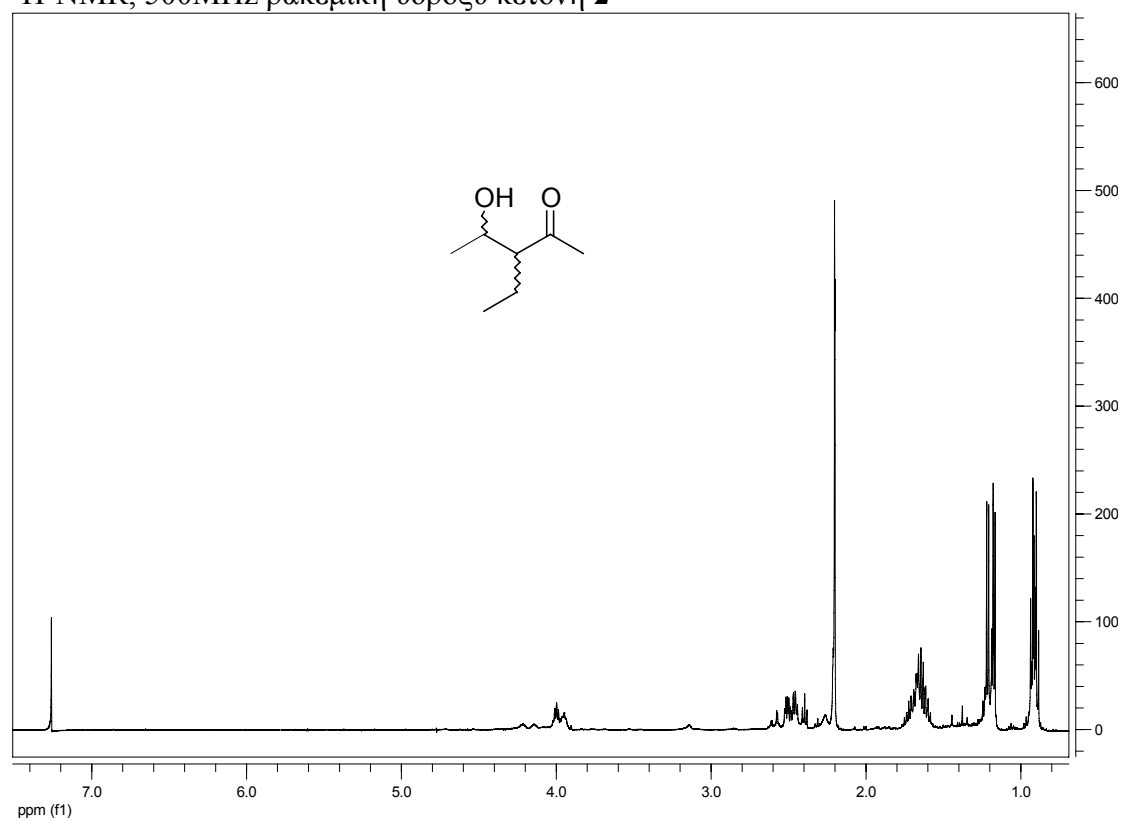
NMR 3

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz υδροξυ κετόνη **1b**



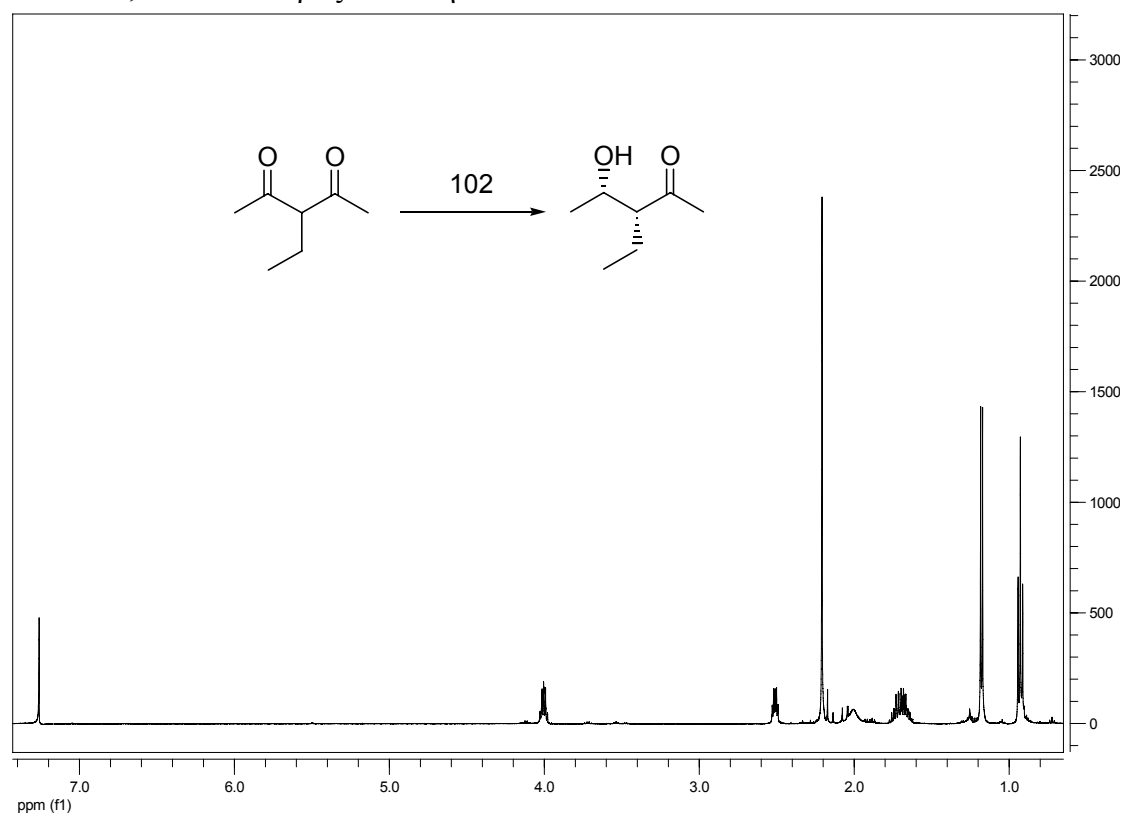
NMR 4

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **2**



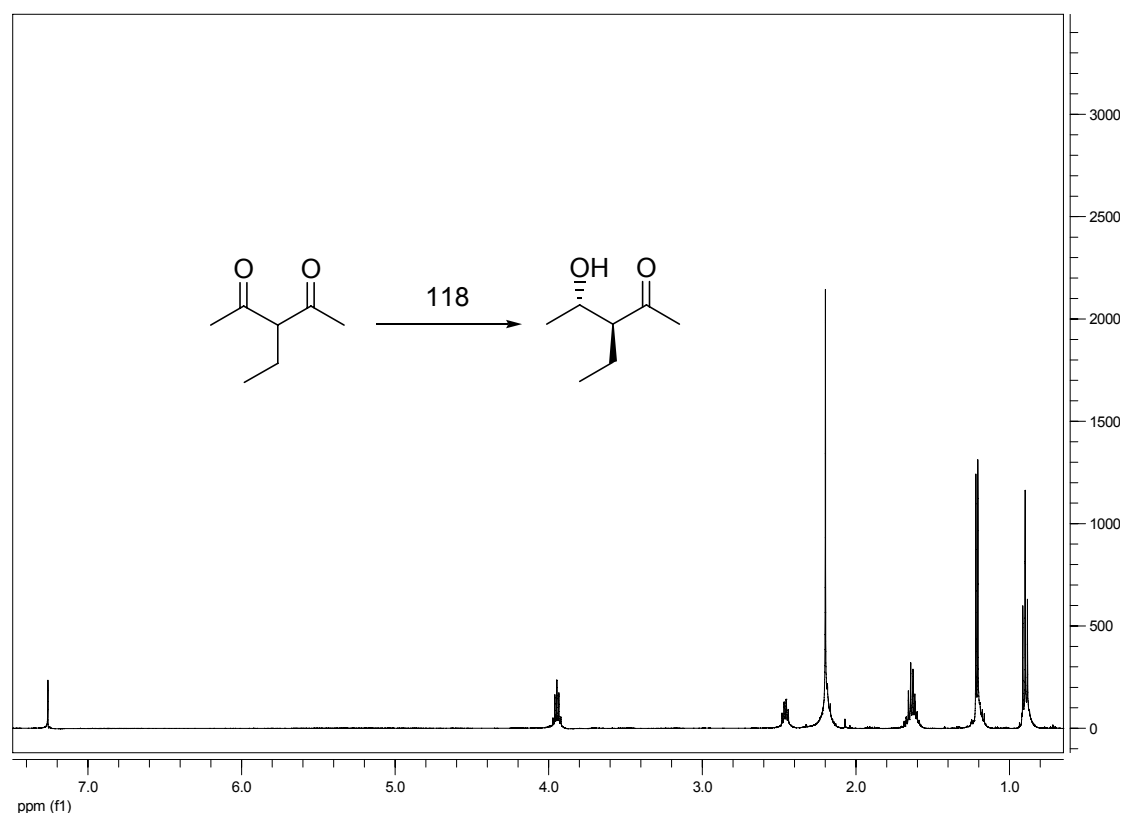
NMR 5

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη **2a**



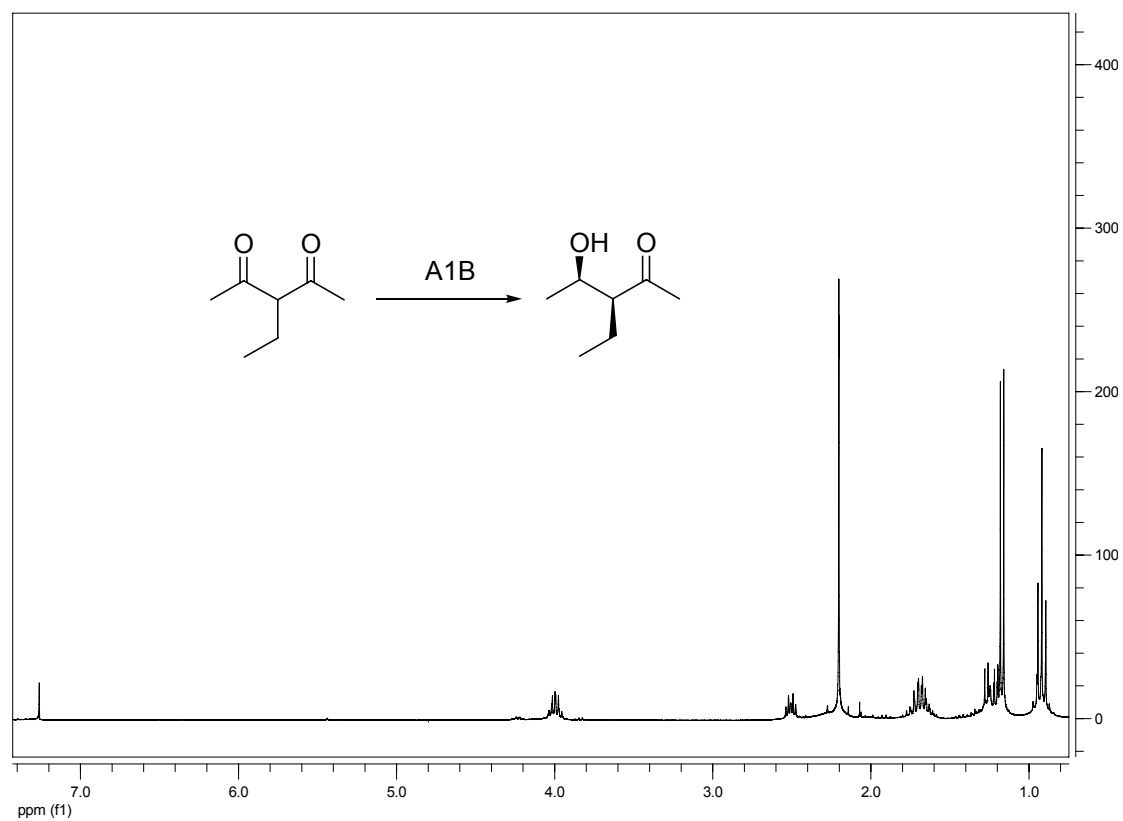
NMR 6

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη **2b**



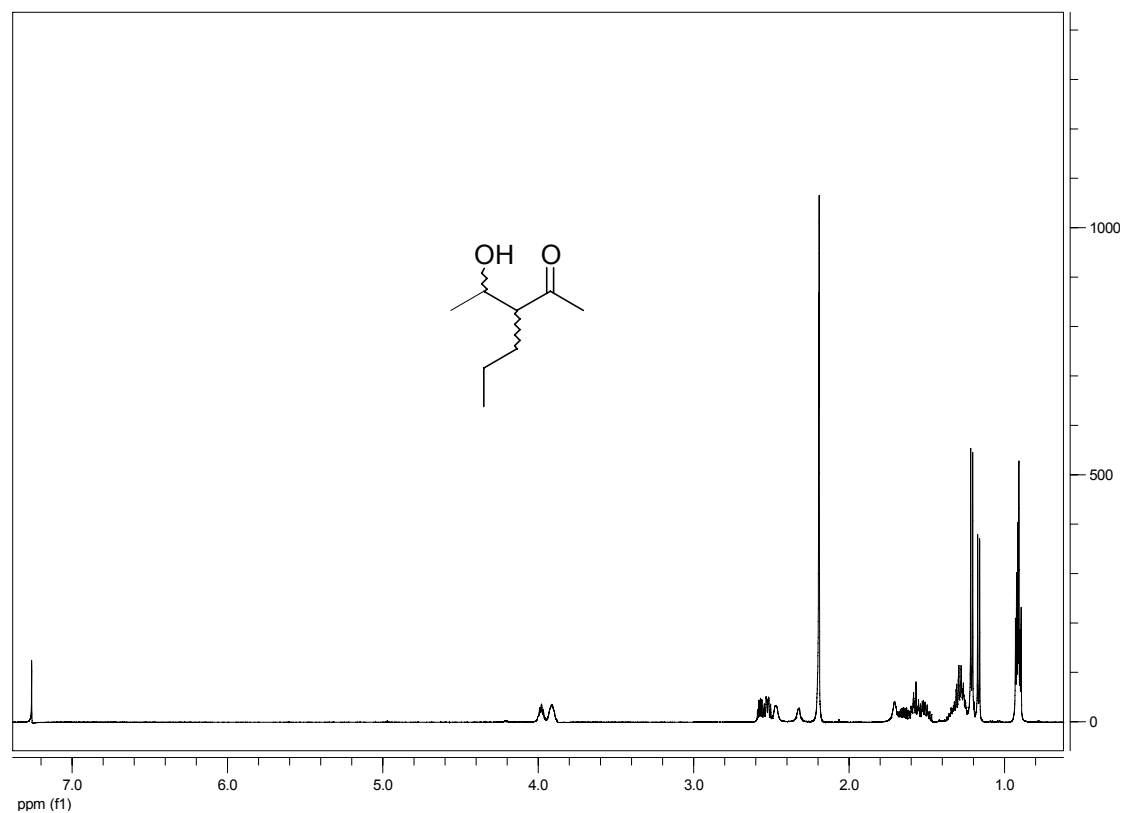
NMR 7

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz υδροξυ κετόνη 2c



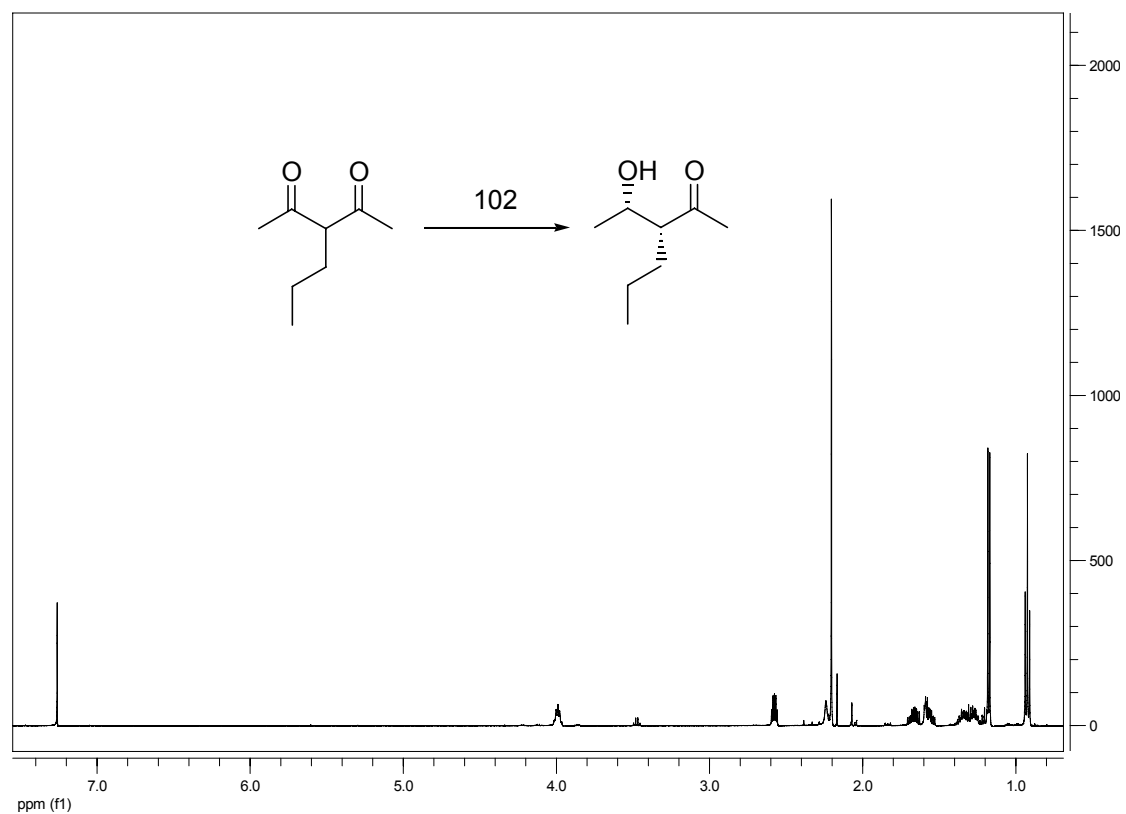
NMR 8

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη 3



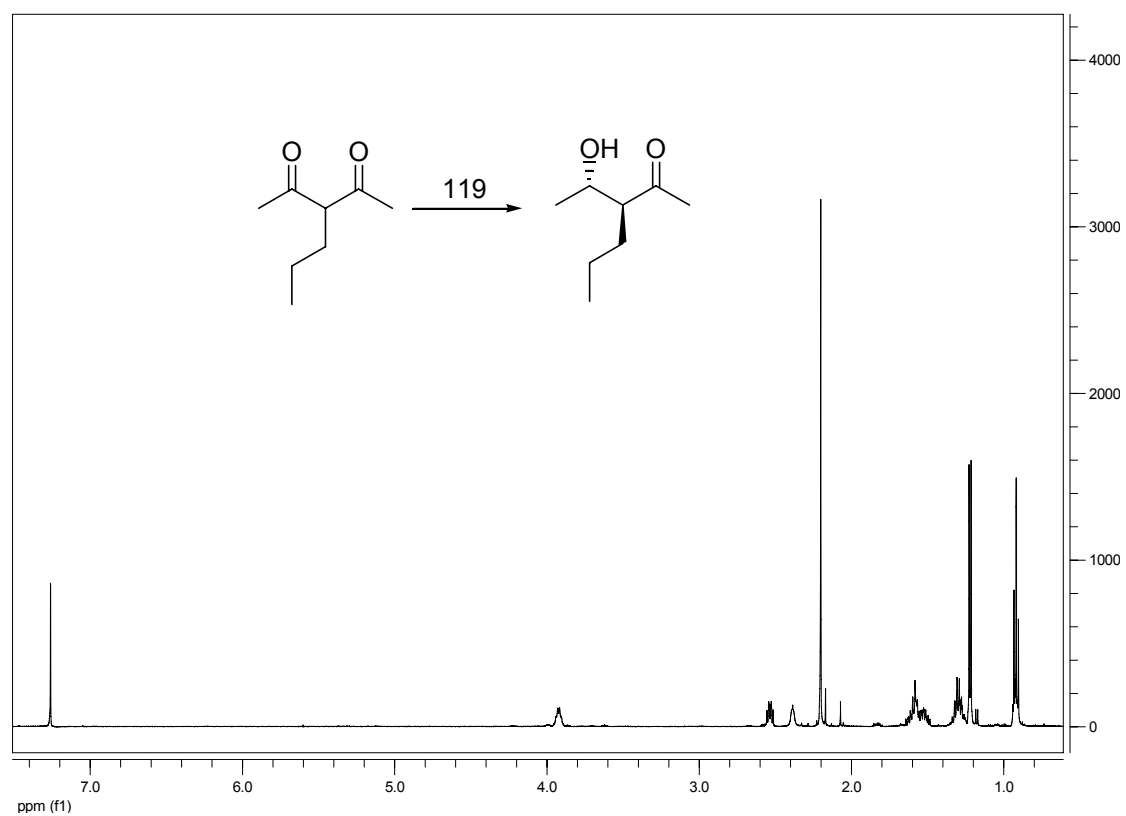
NMR 9

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη 3a



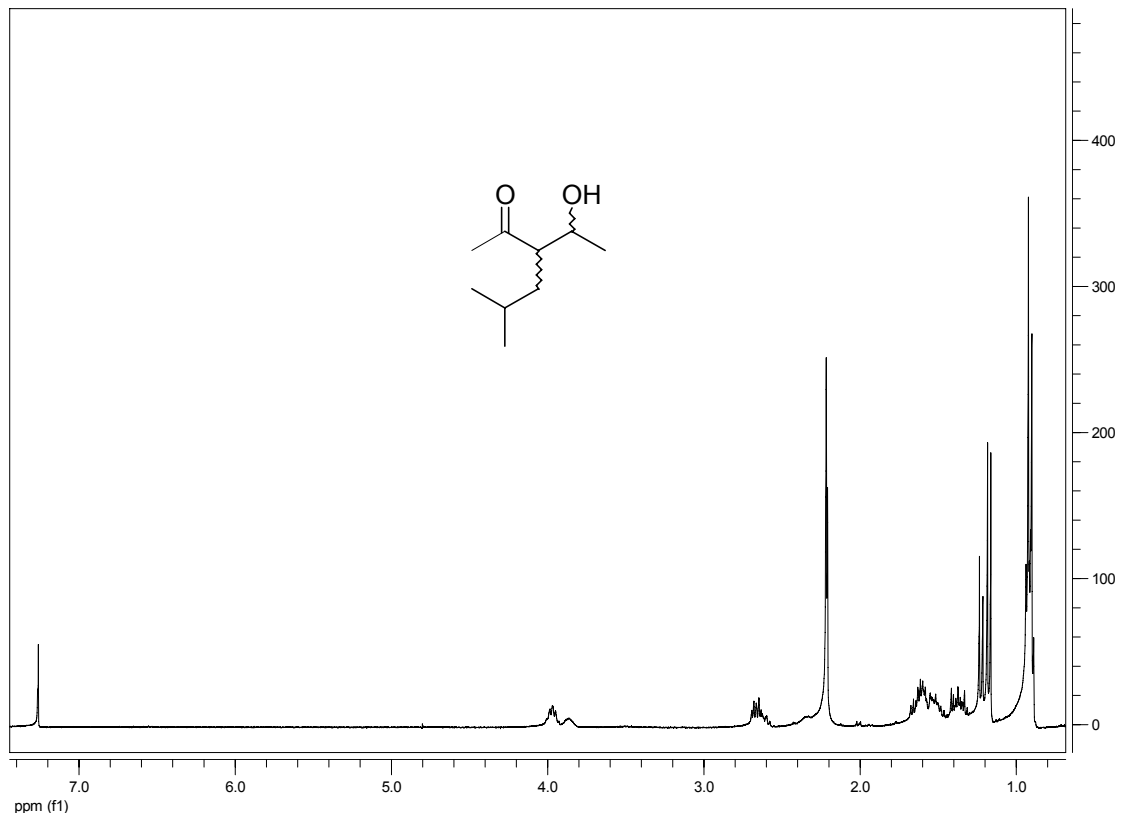
NMR 10

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη 3b



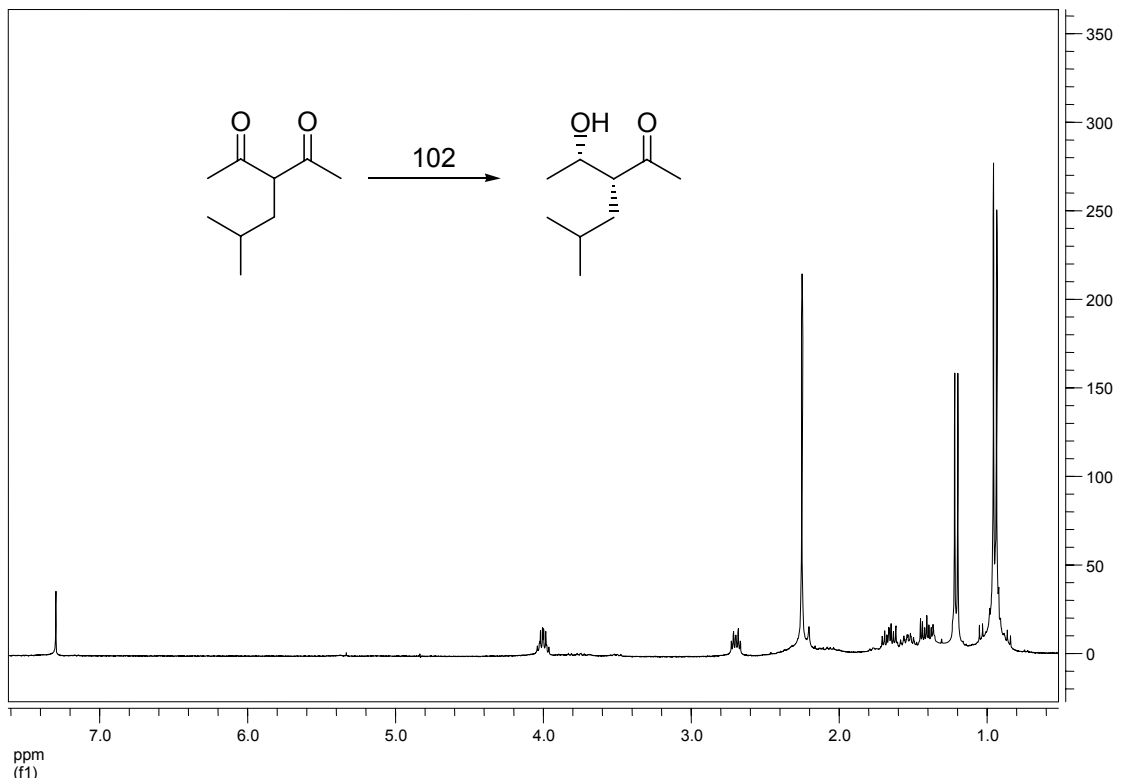
NMR 11

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη 4



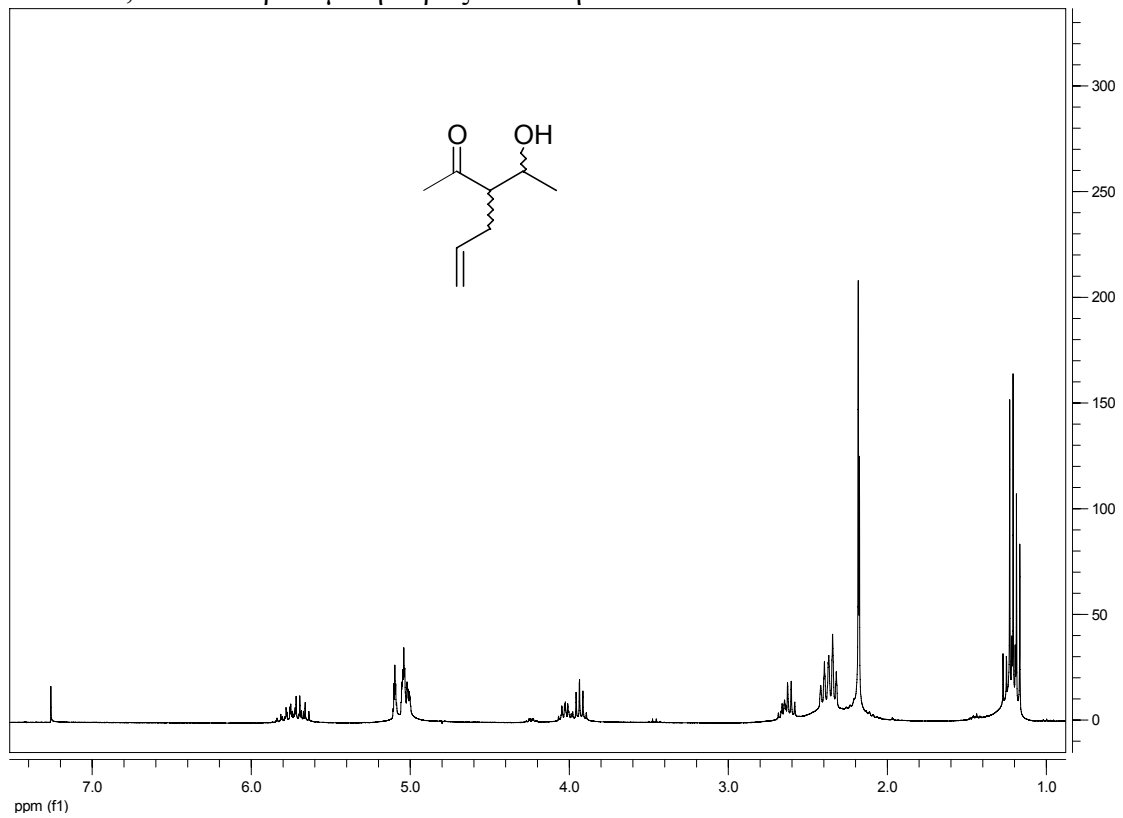
NMR 12

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz υδροξυ κετόνη 4a



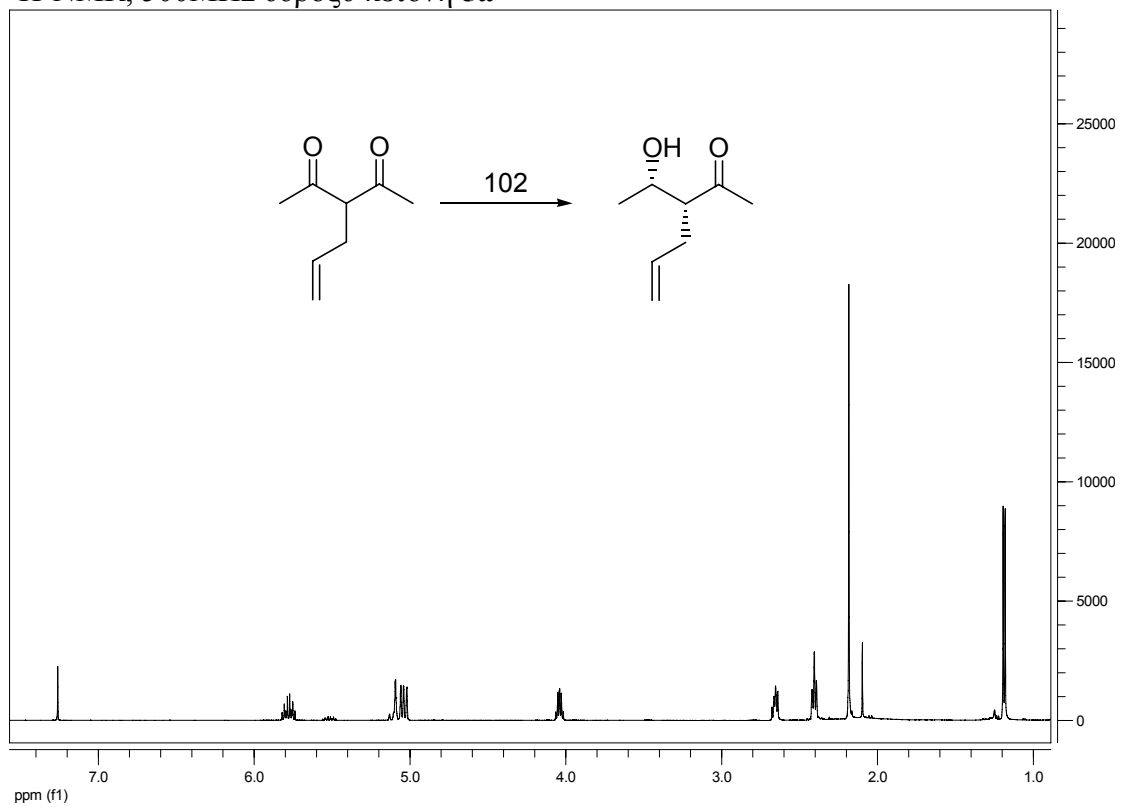
NMR 13

¹H-NMR, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη 5



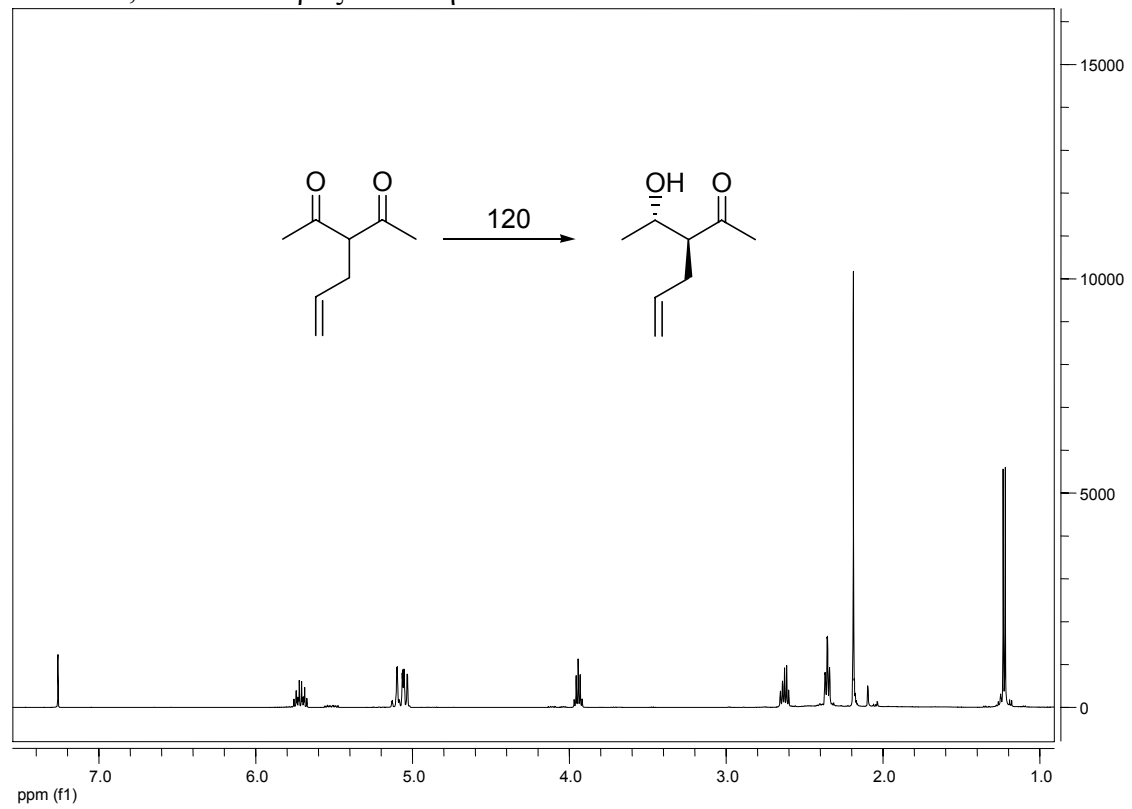
NMR 14

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη 5a



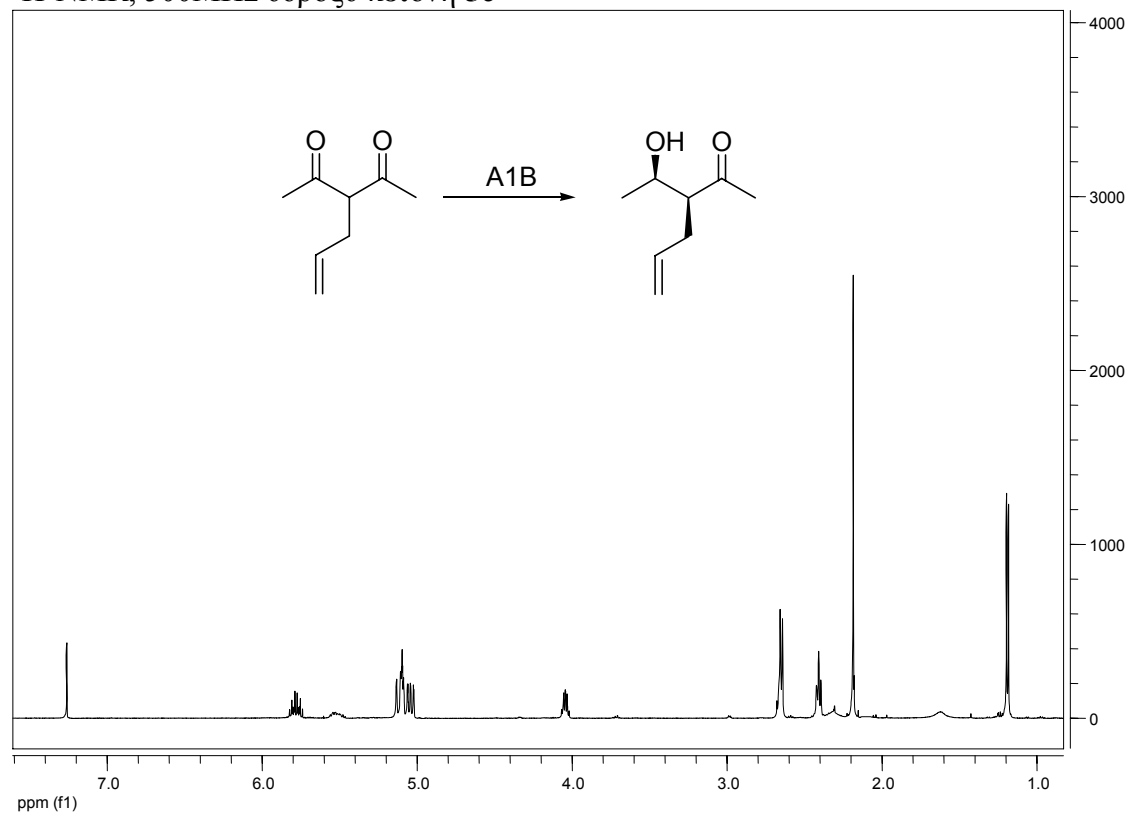
NMR 15

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη **5b**



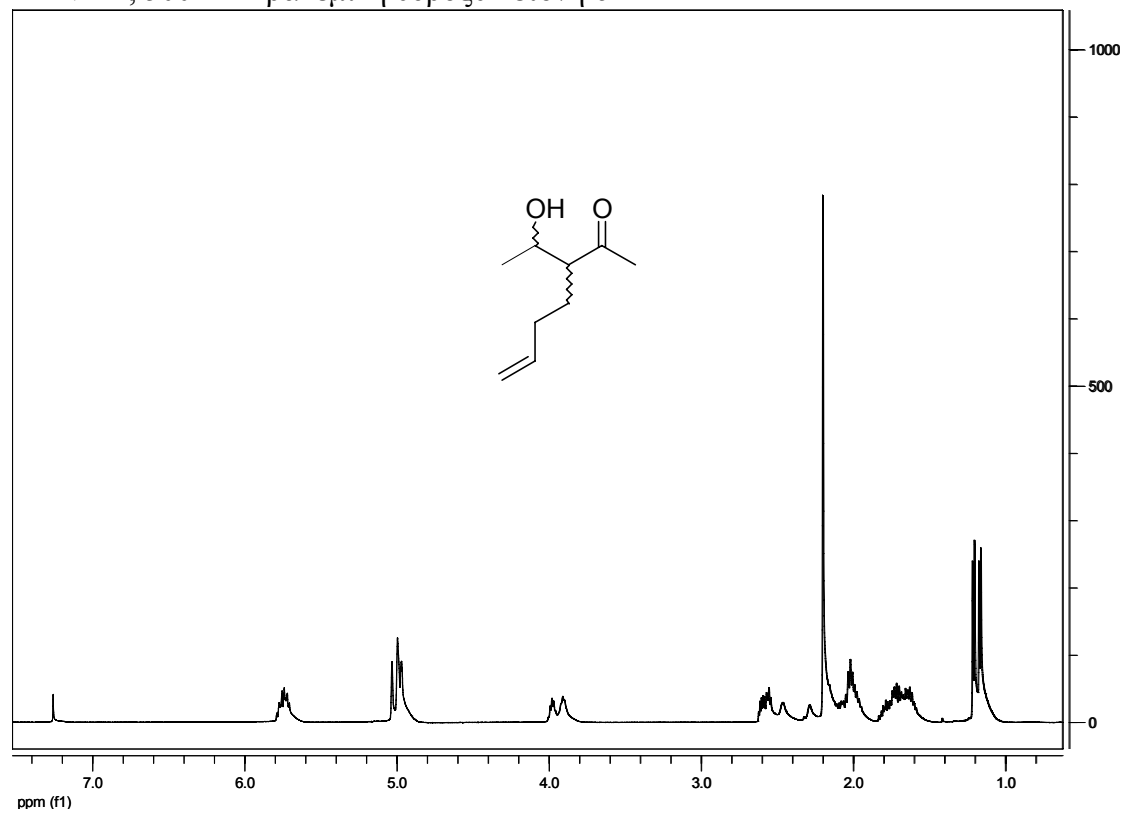
NMR 16

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη **5c**



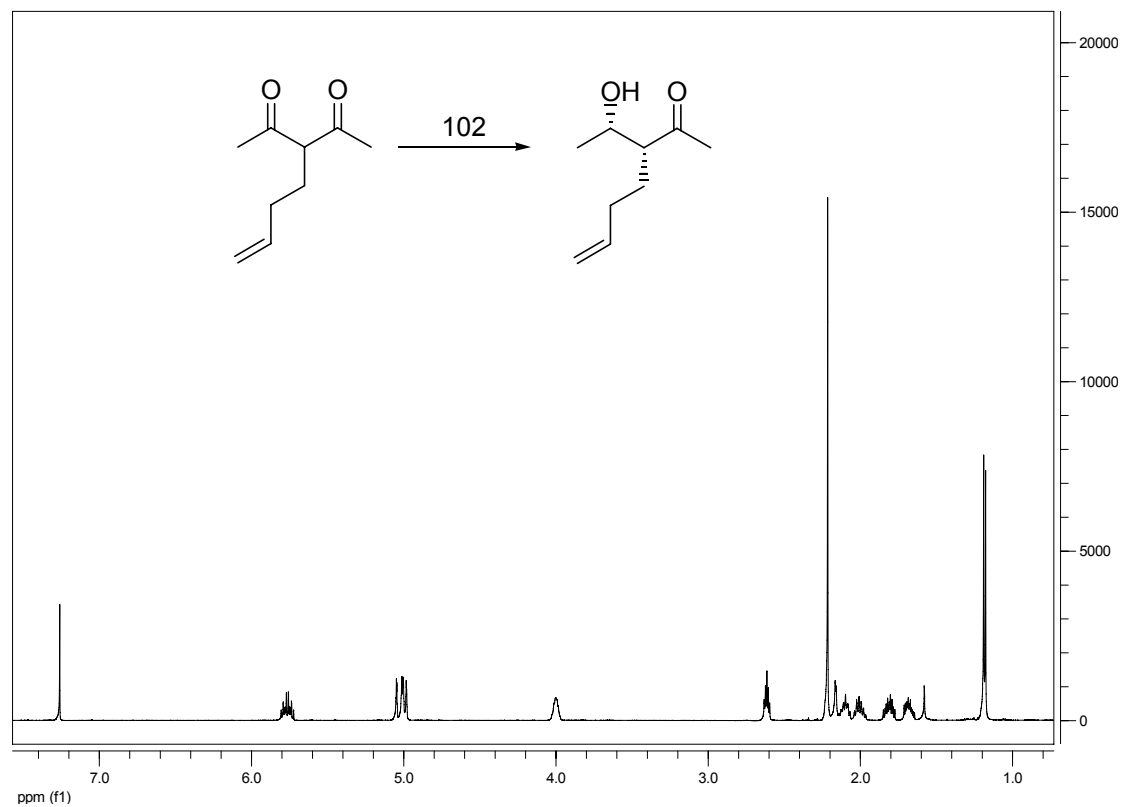
NMR 17

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **6**



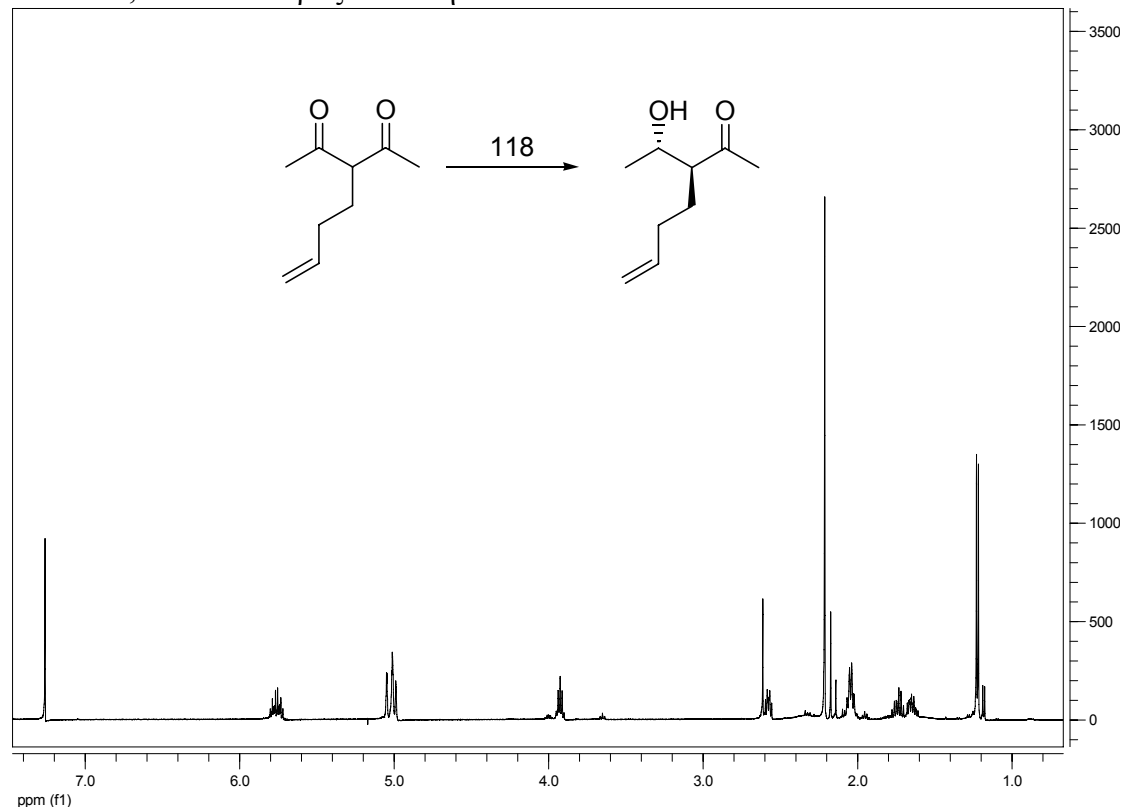
NMR 18

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη **6a**



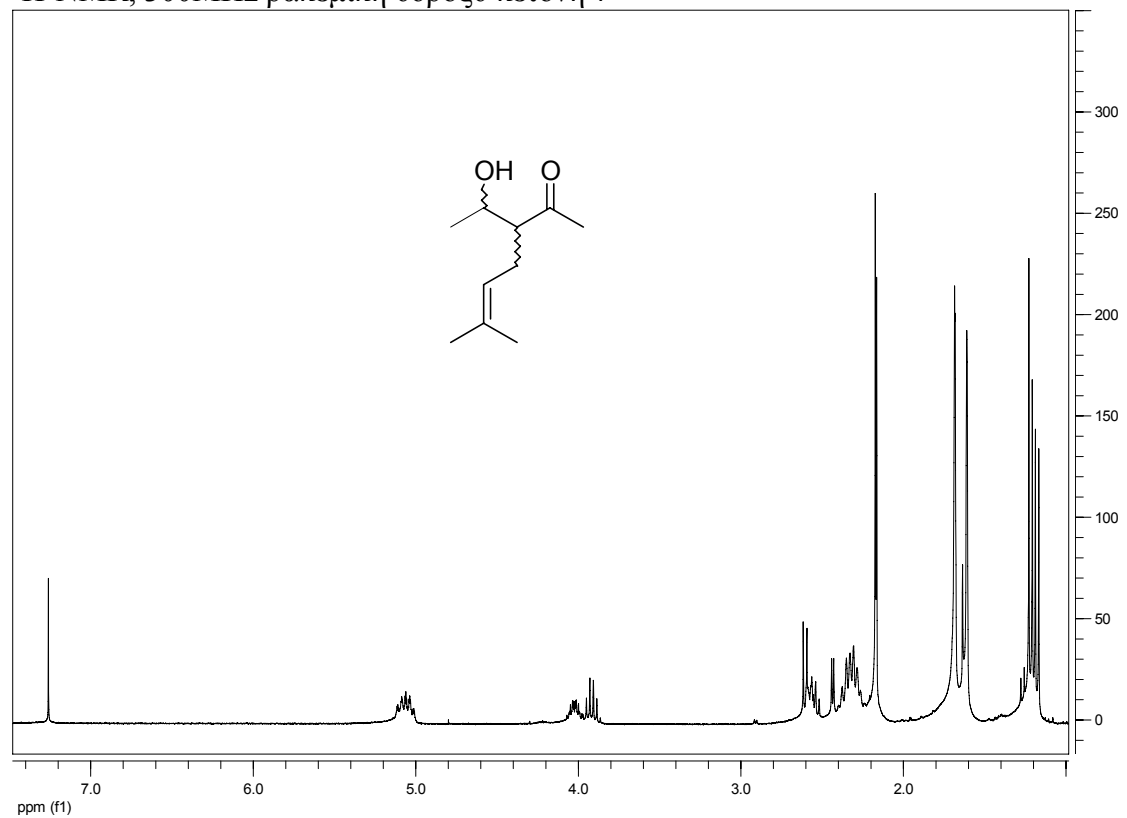
NMR 19

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη **6b**



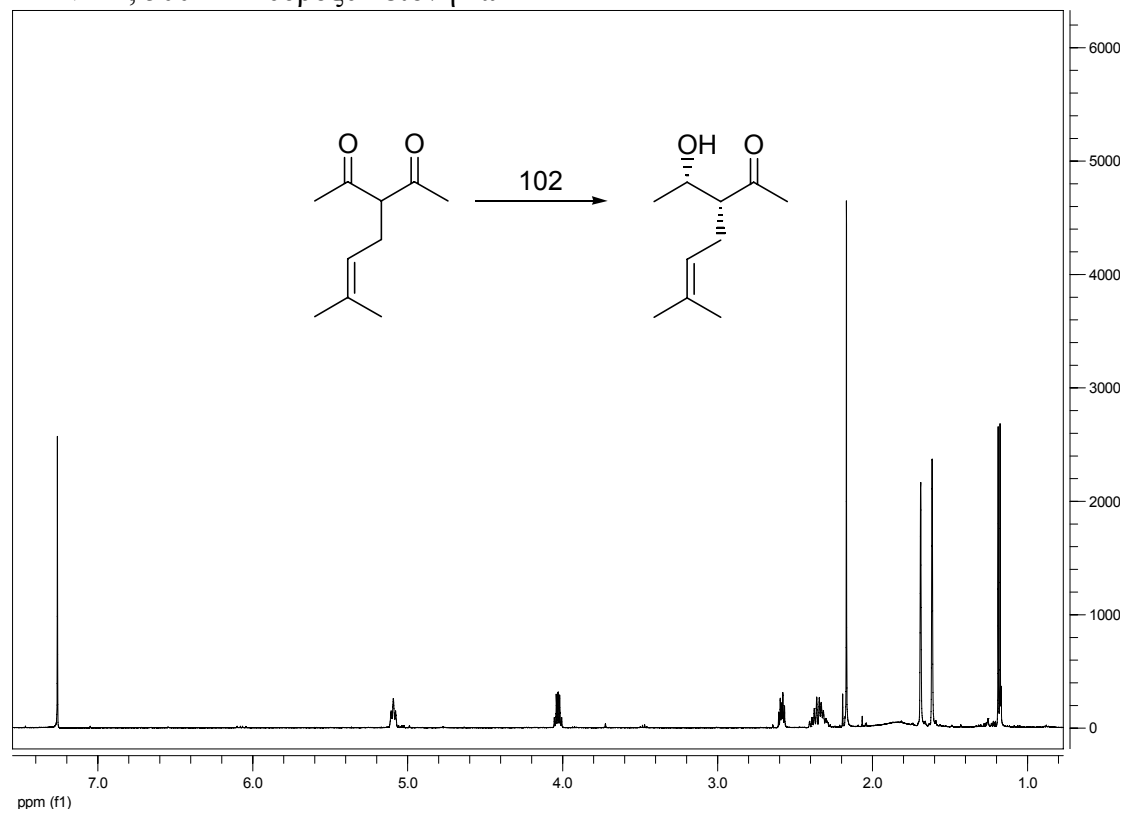
NMR 20

¹H-NMR, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **7**



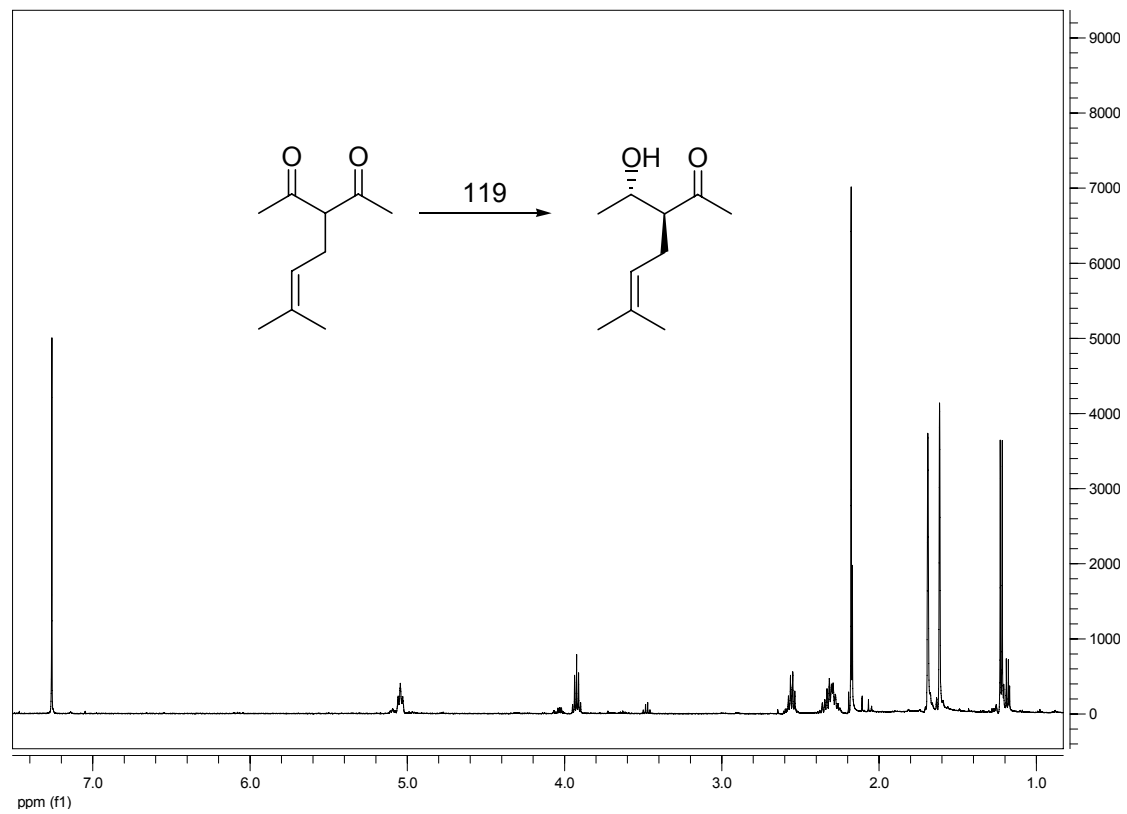
NMR 21

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη 7a



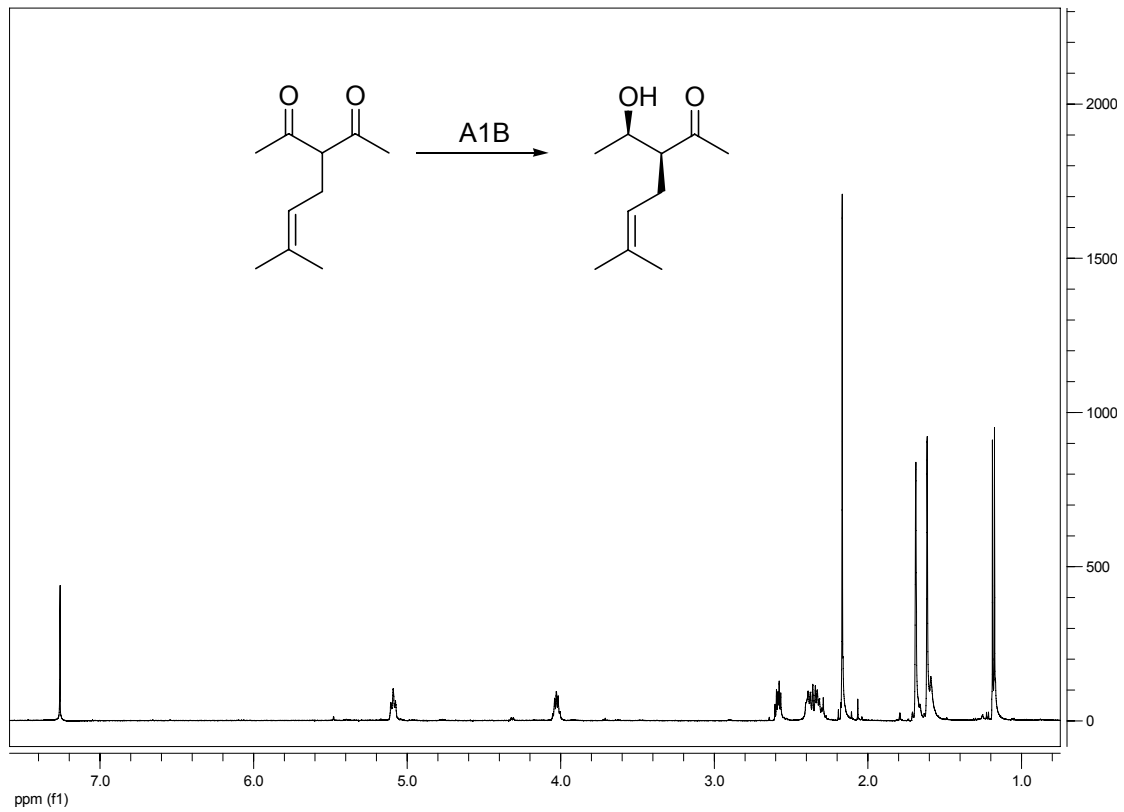
NMR 22

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη 7b



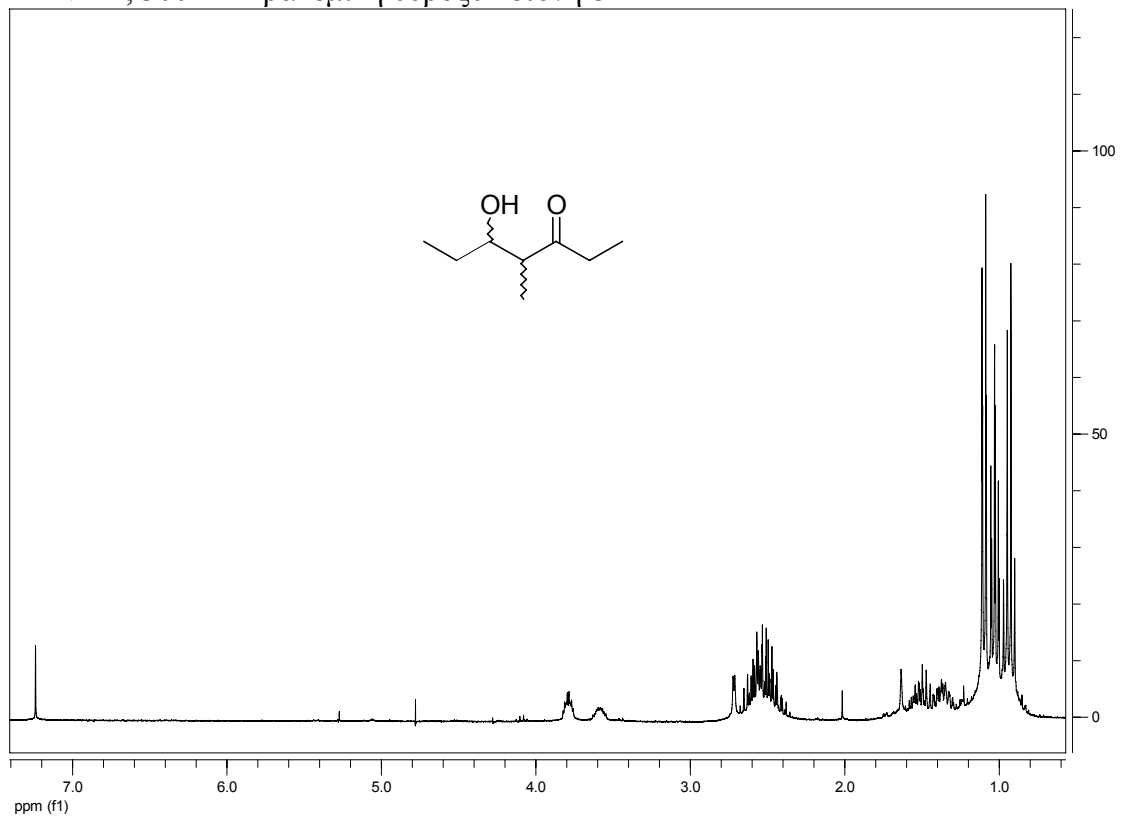
NMR 23

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη 7c



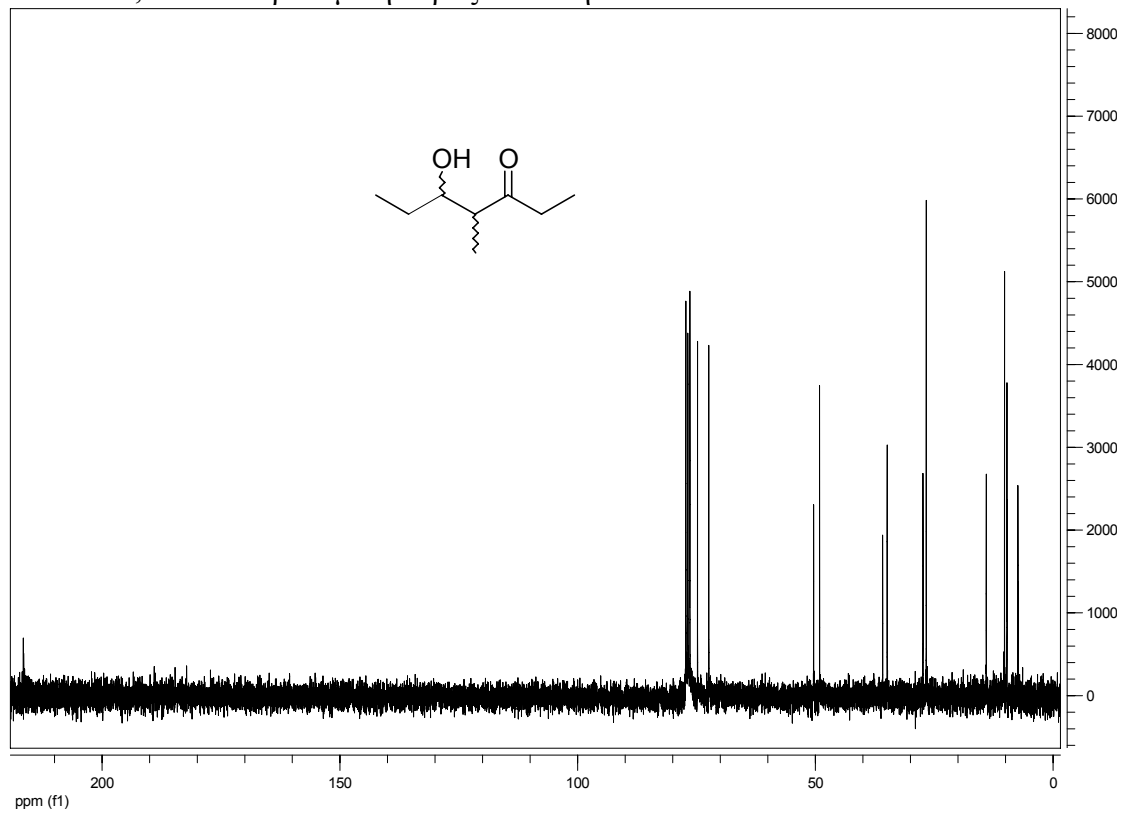
NMR 24

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη 8



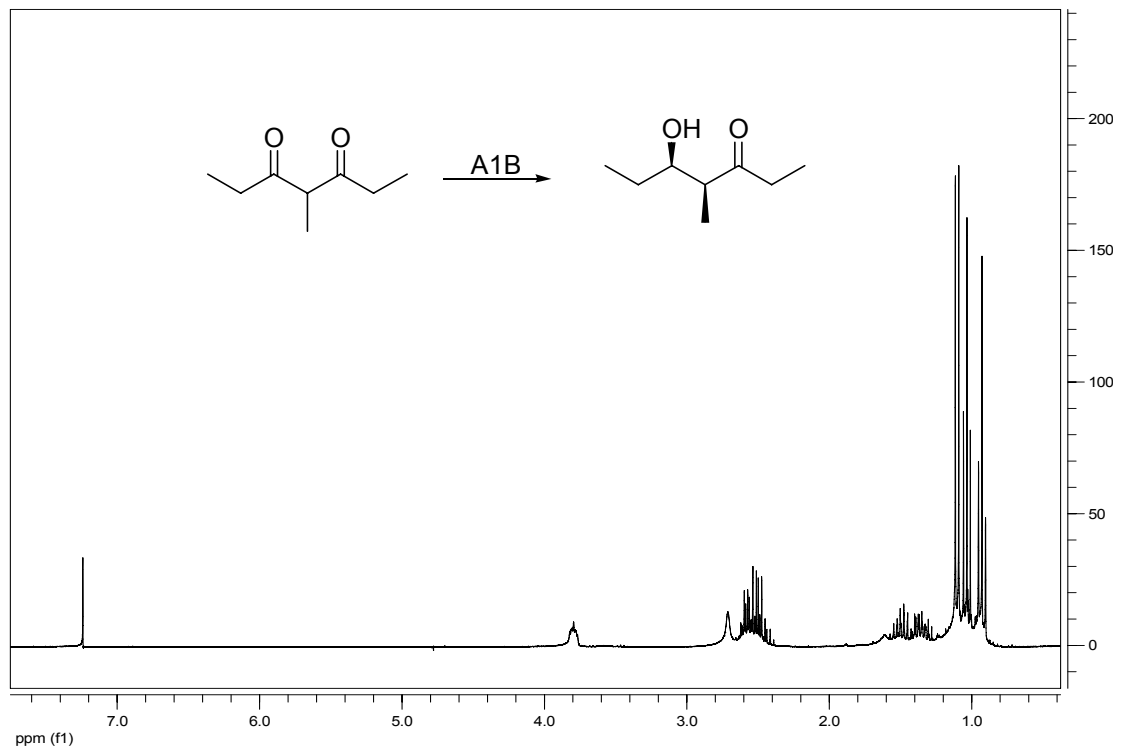
NMR 25

^{13}C -NMR, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **8**



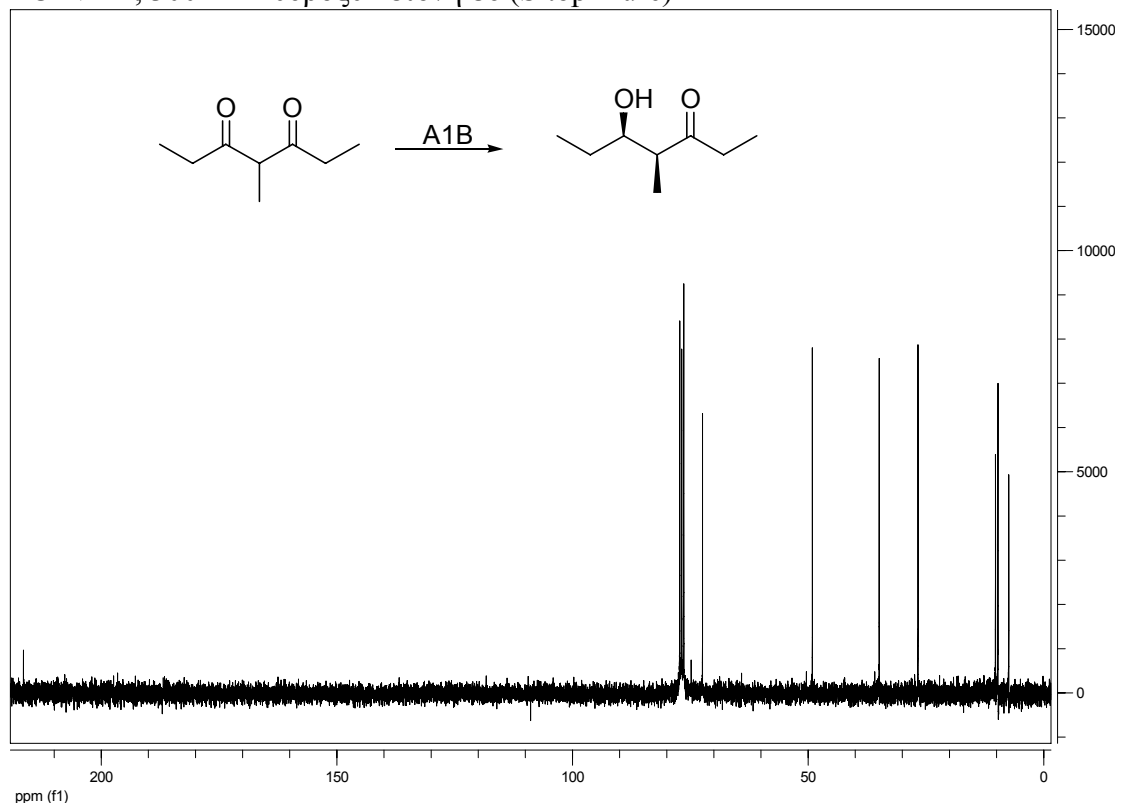
NMR 26

^1H -NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη **8c** (Sitophilure)



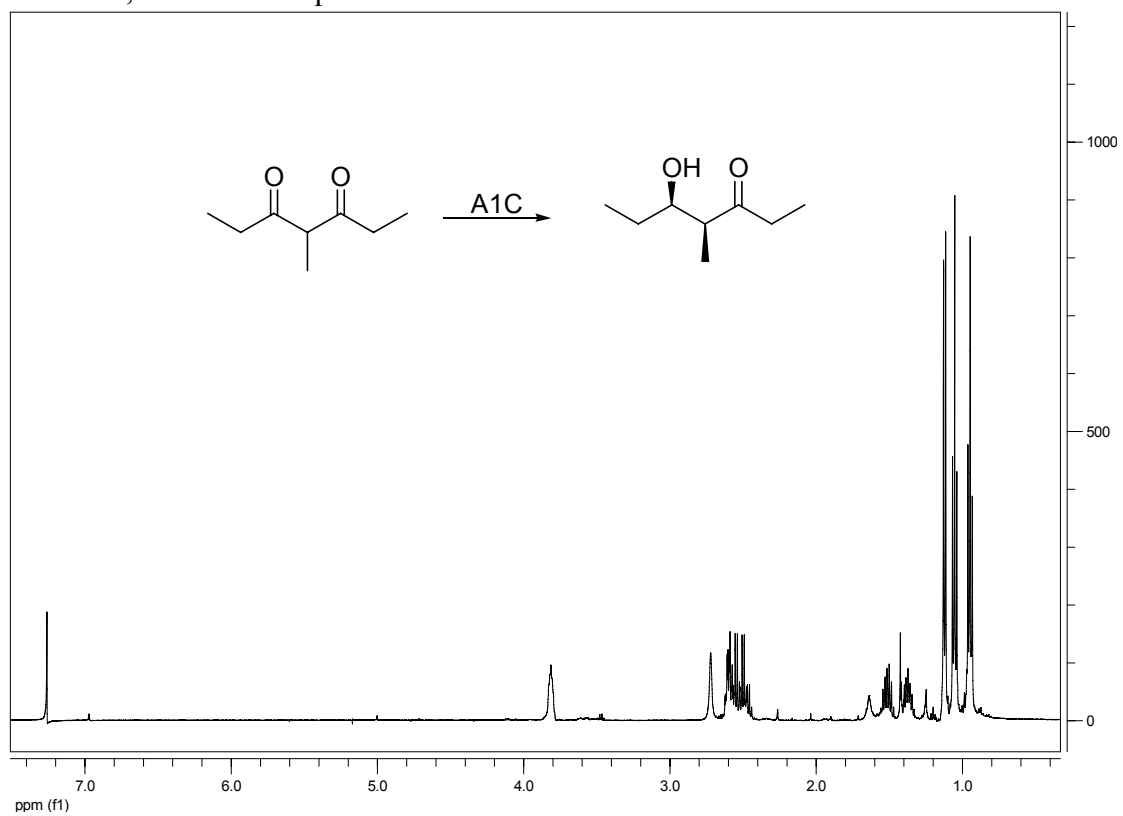
NMR 27

^{13}C -NMR, 300MHz υδροξυ κετόνη **8c** (Sitophilure)



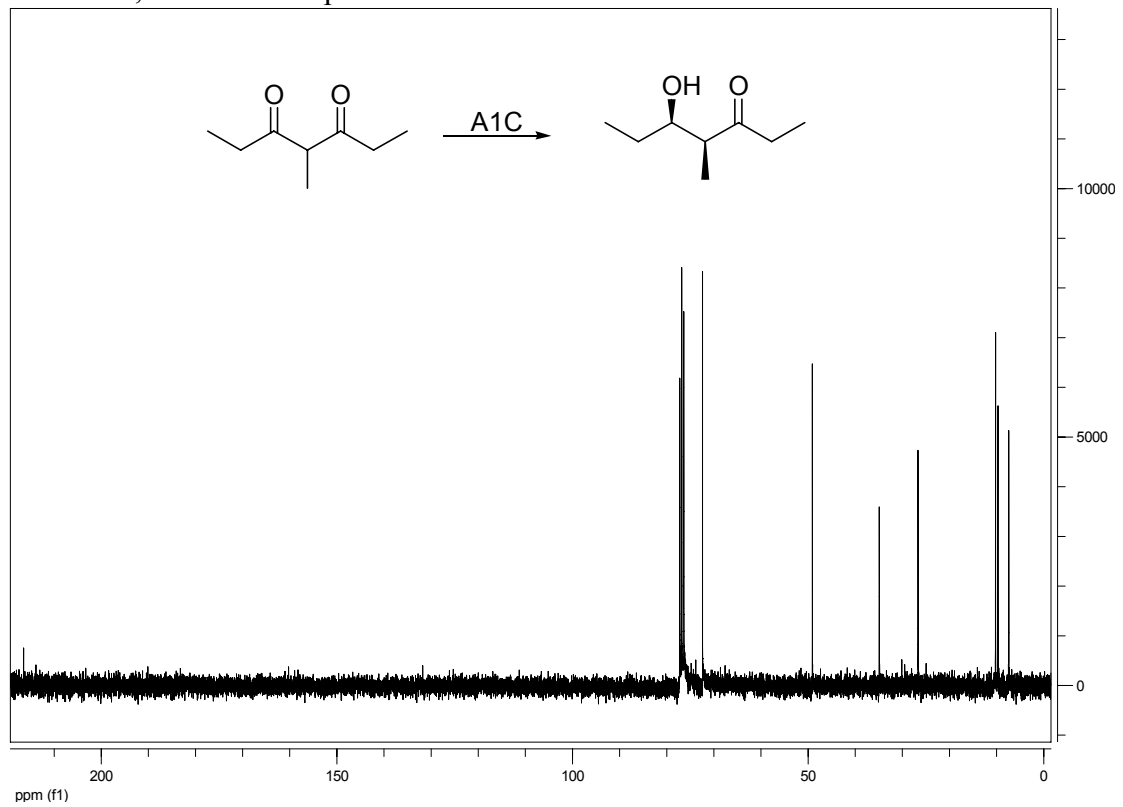
NMR 28

^1H -NMR, 500MHz Sitophilure



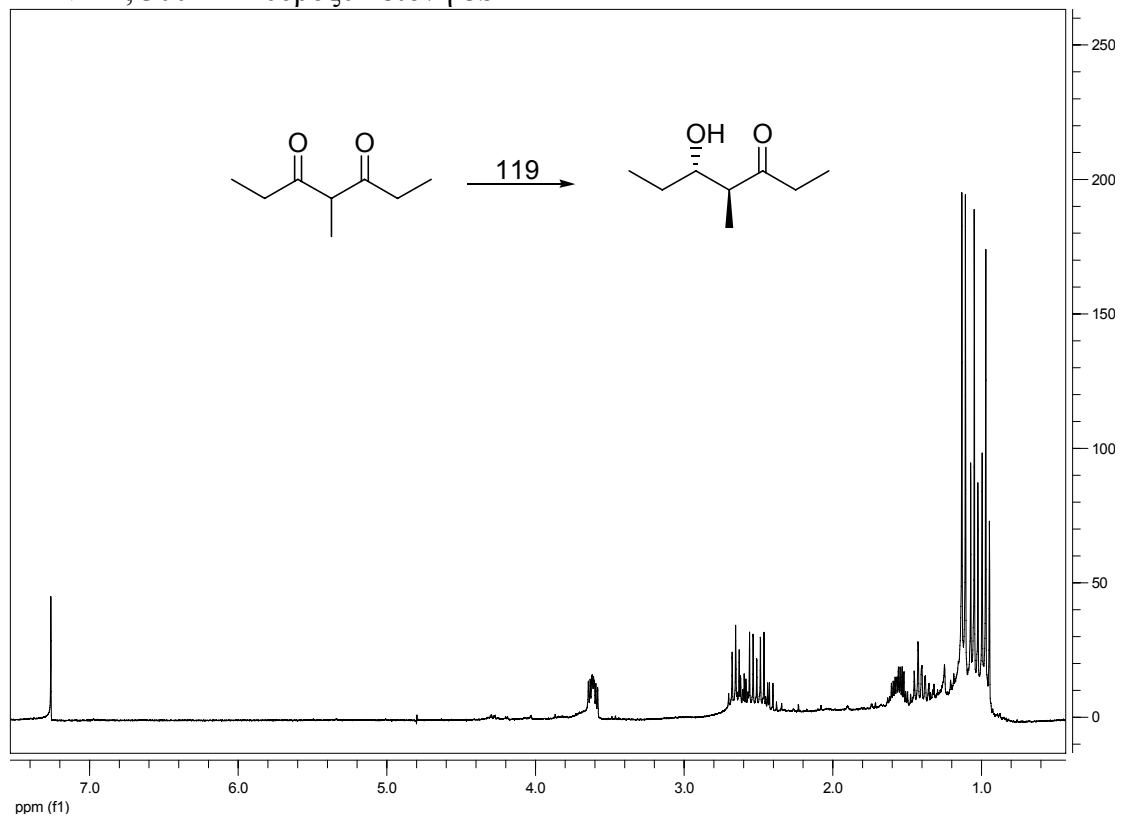
NMR 29

^{13}C -NMR, 300MHz Sitophilure



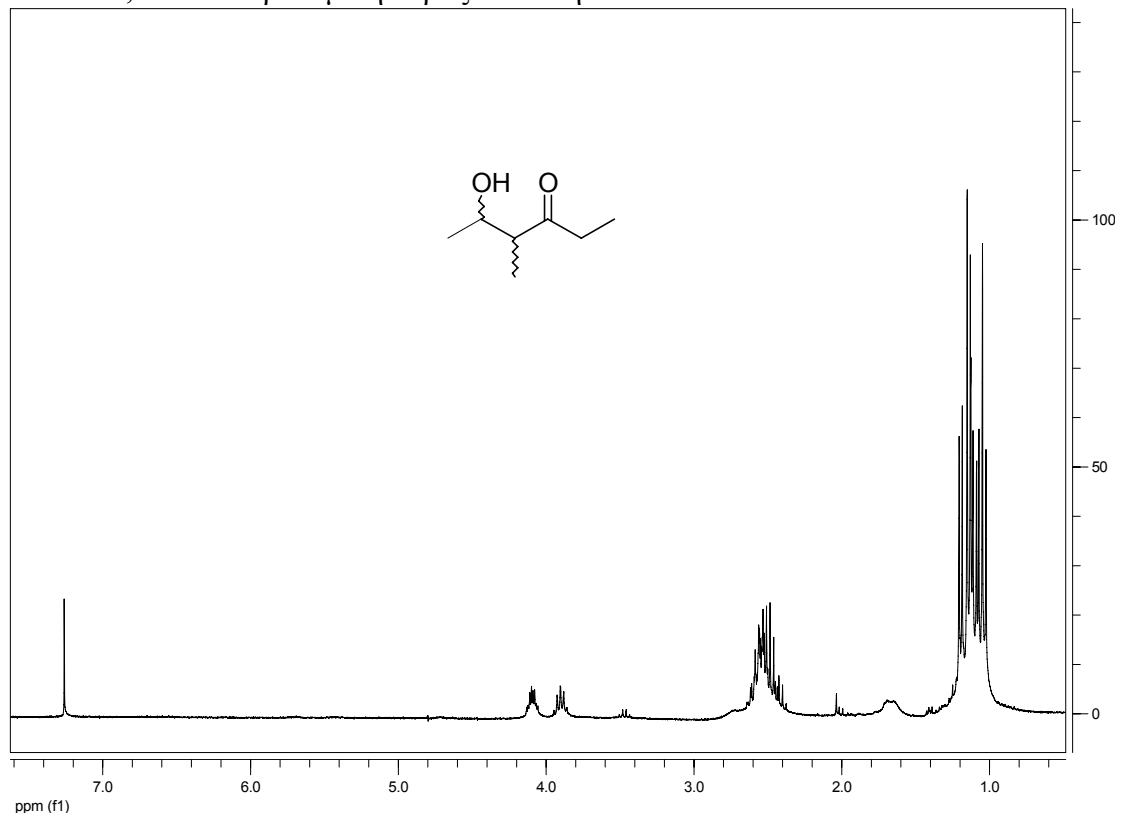
NMR 30

^1H -NMR, 300MHz υδροξυ κετόνη **8b**



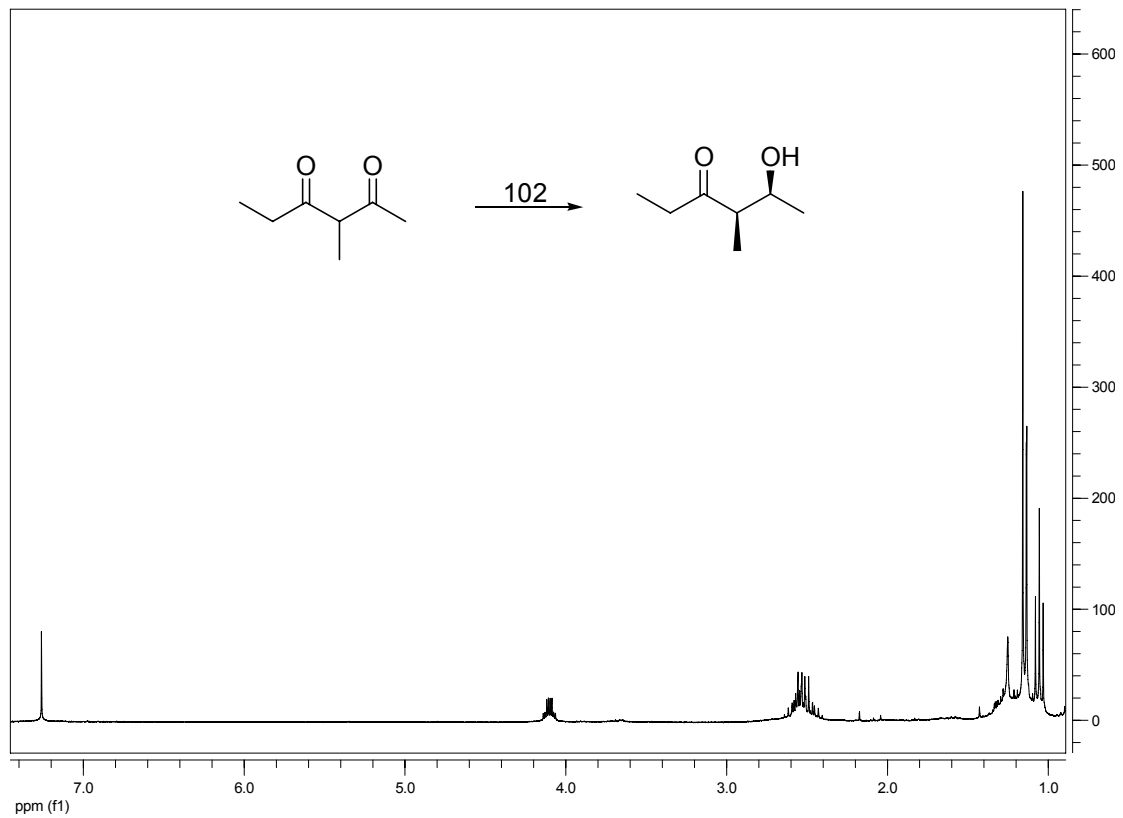
NMR 31

¹H-NMR, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη 9



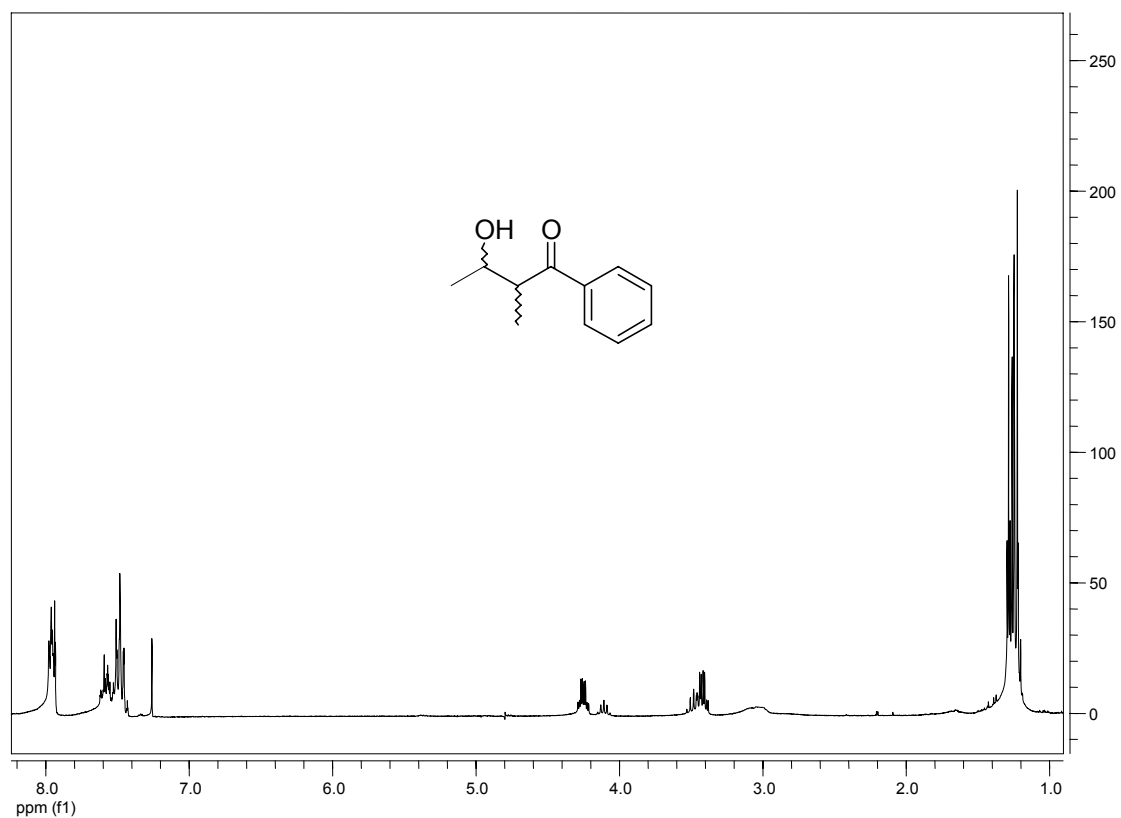
NMR 32

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ κετόνη 9a



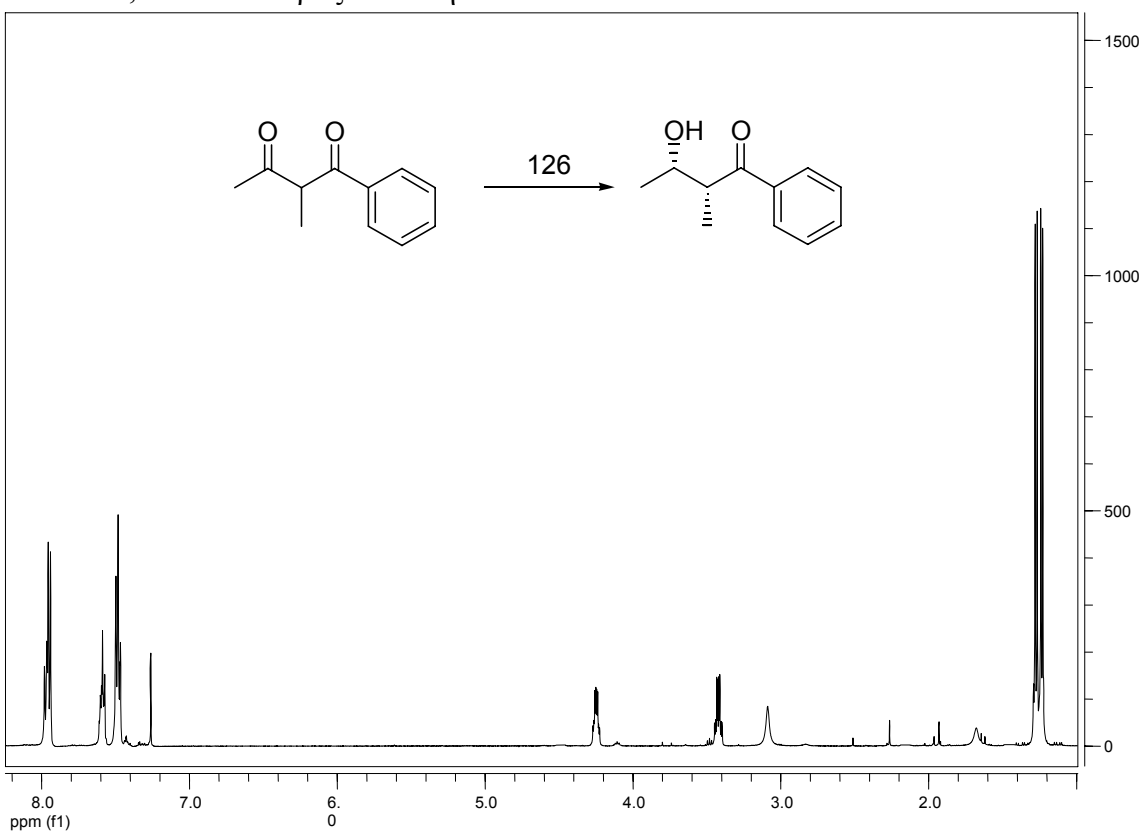
NMR 33

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **10**



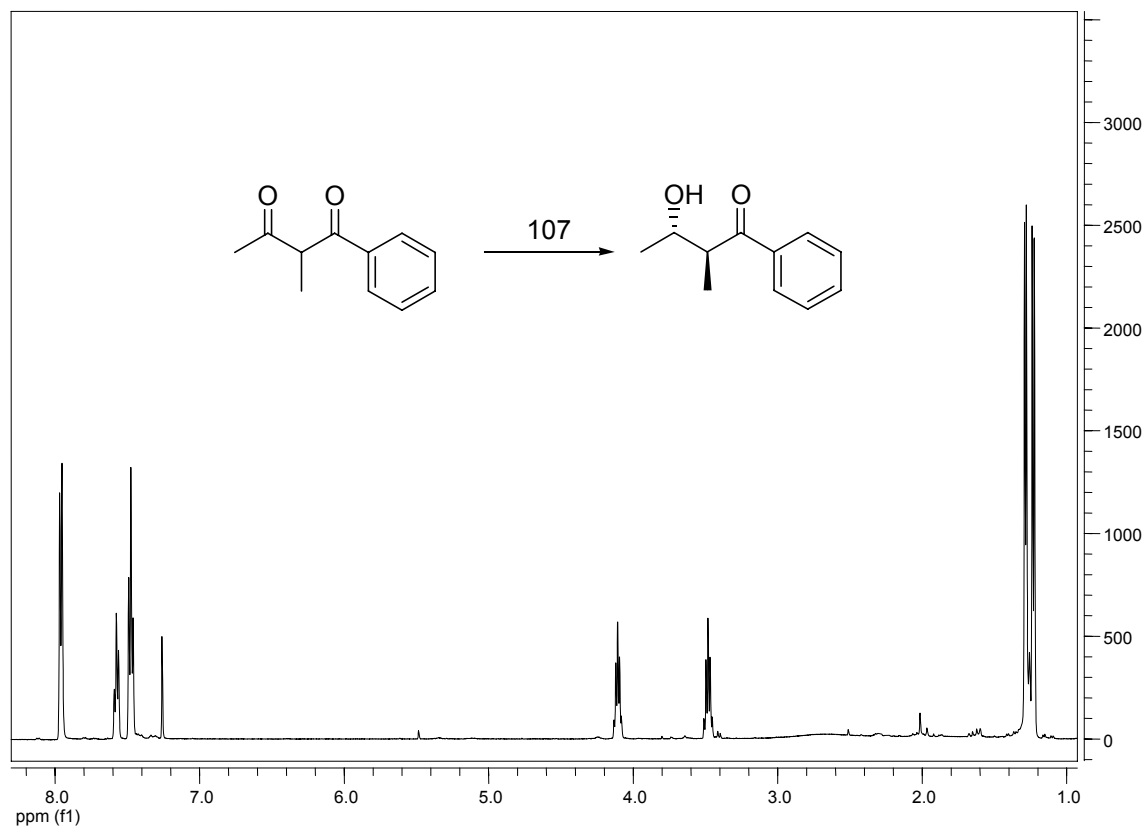
NMR 34

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη **10a**



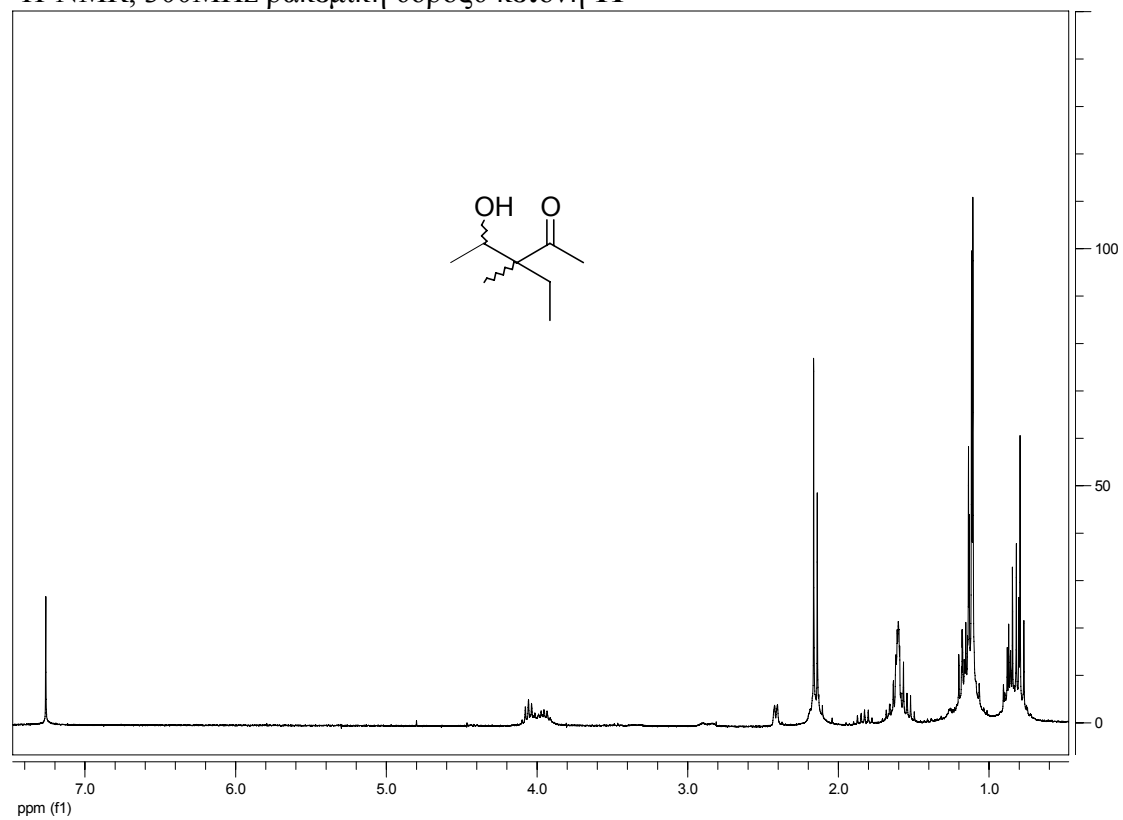
NMR 35

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ κετόνη **10b**



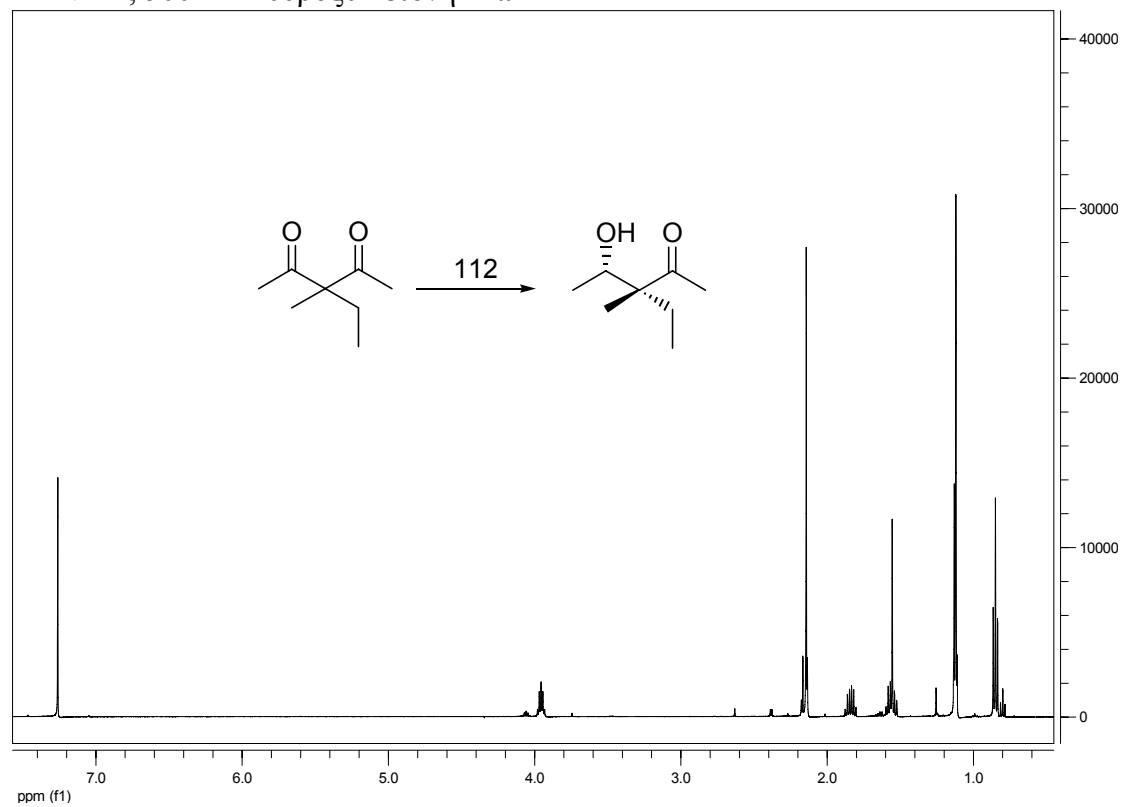
NMR 36

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **11**



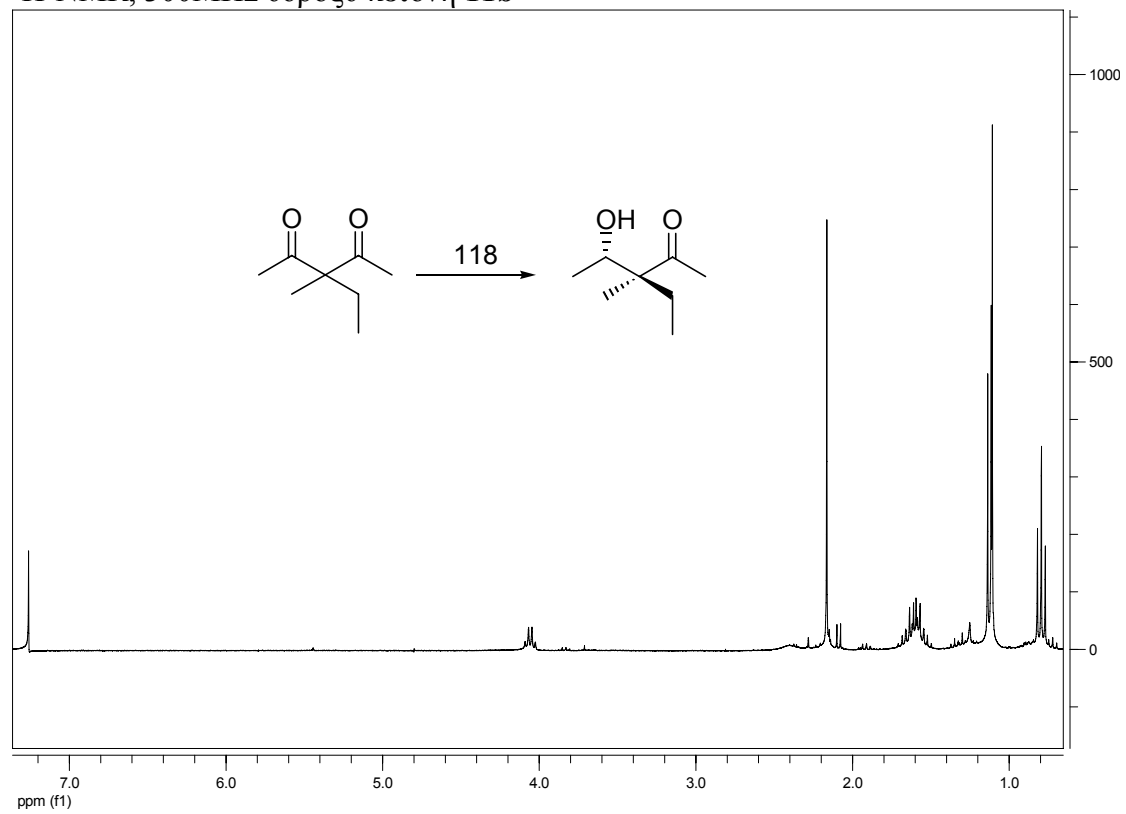
NMR 37

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη 11a



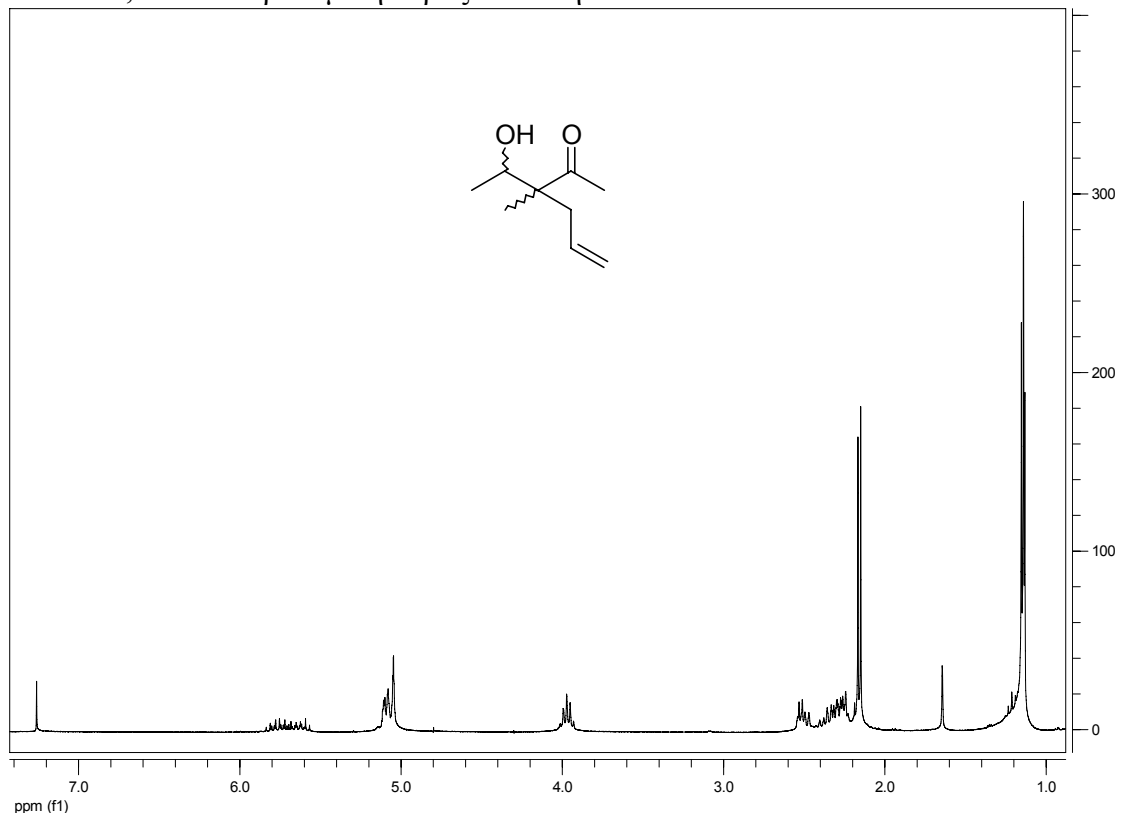
NMR 38

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ κετόνη 11b



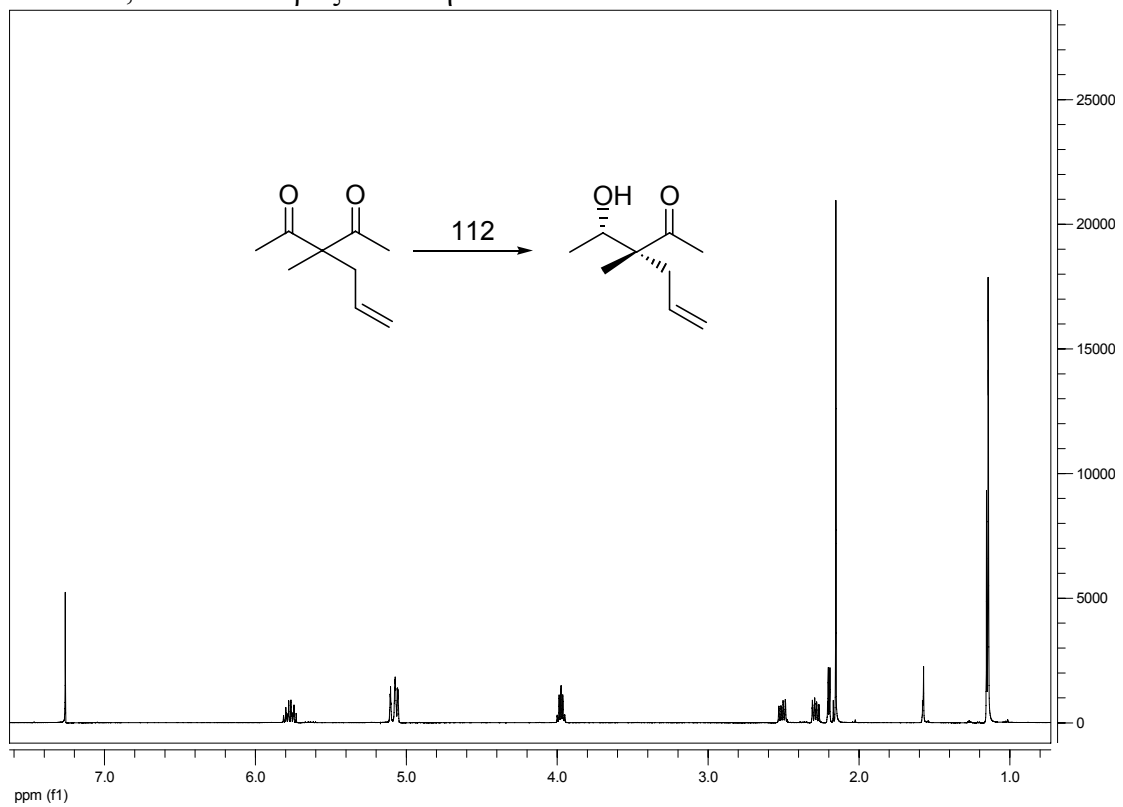
NMR 39

¹H-NMR, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **12**



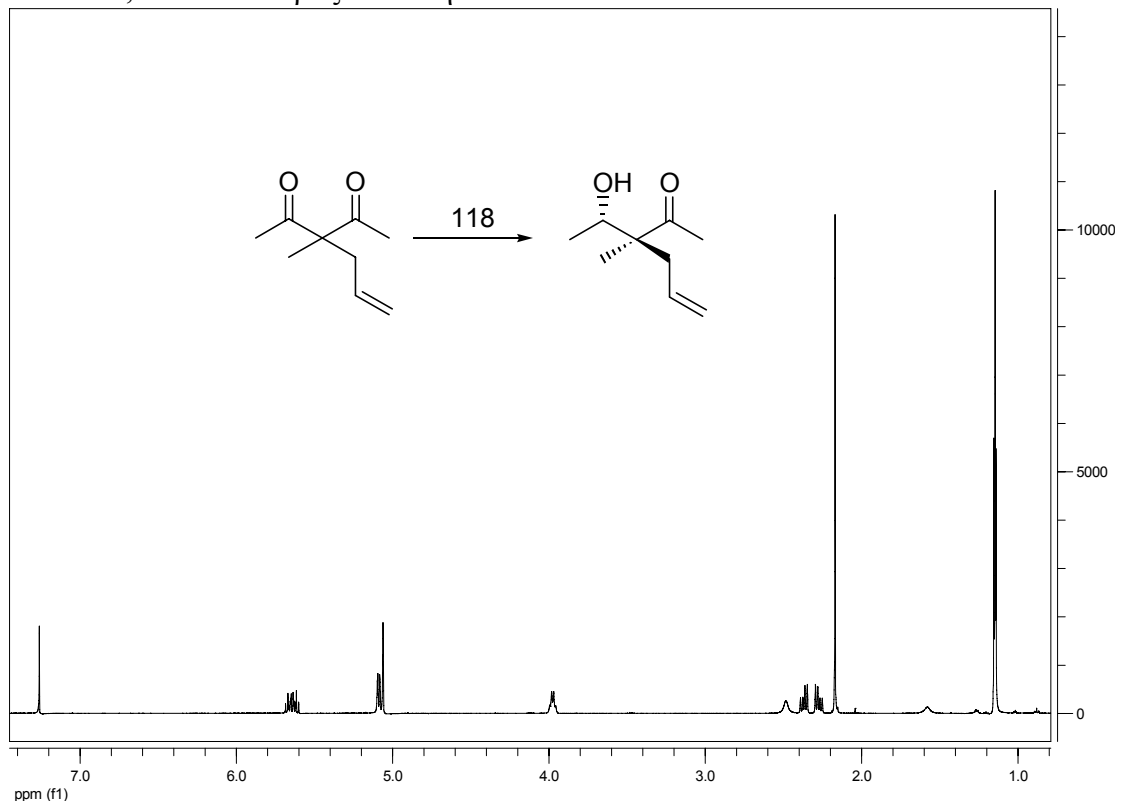
NMR 40

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη **12a**



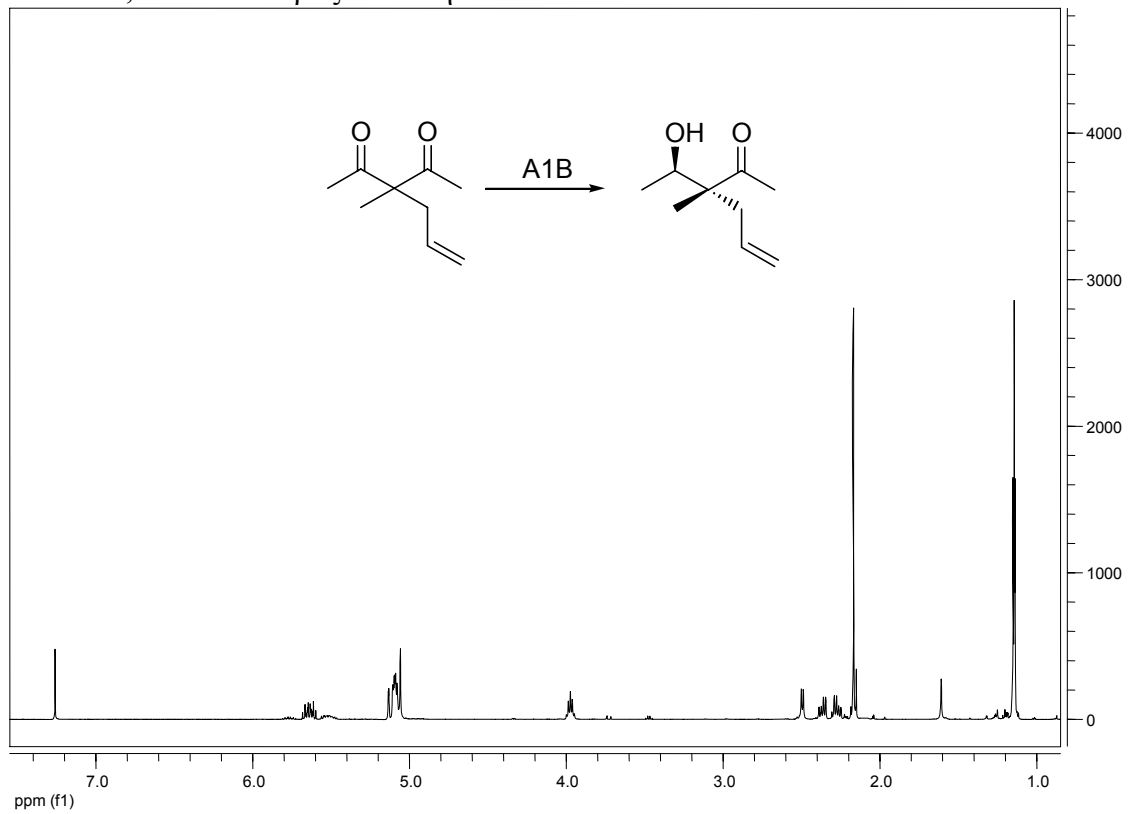
NMR 41

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη **12b**



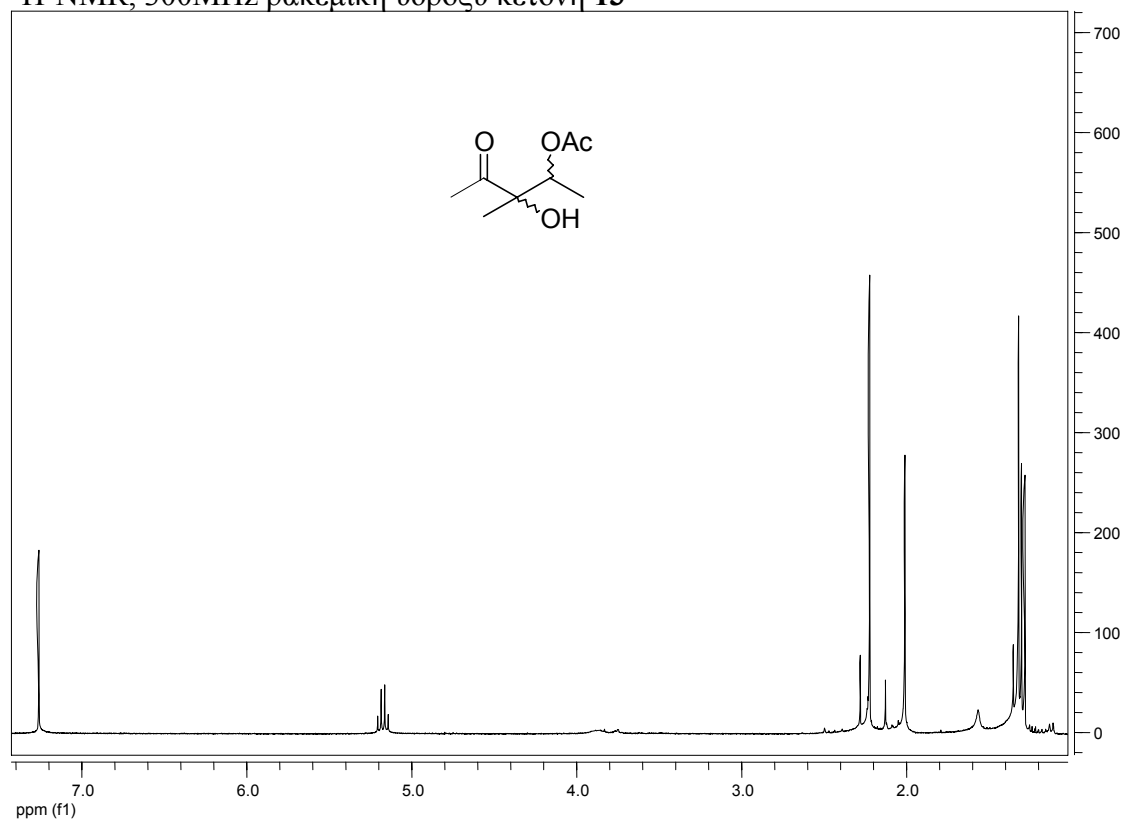
NMR 42

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ κετόνη **12d**



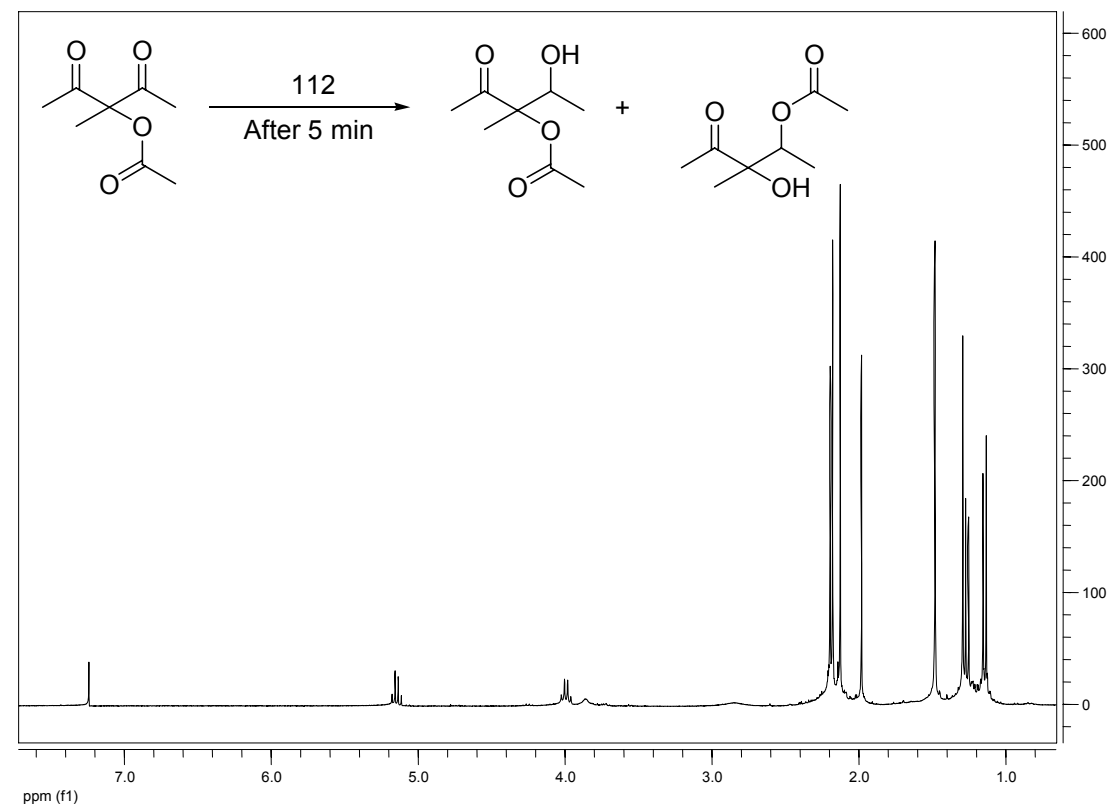
NMR 43

¹H-NMR, 300MHz ρακεμική υδροξυ κετόνη **13**



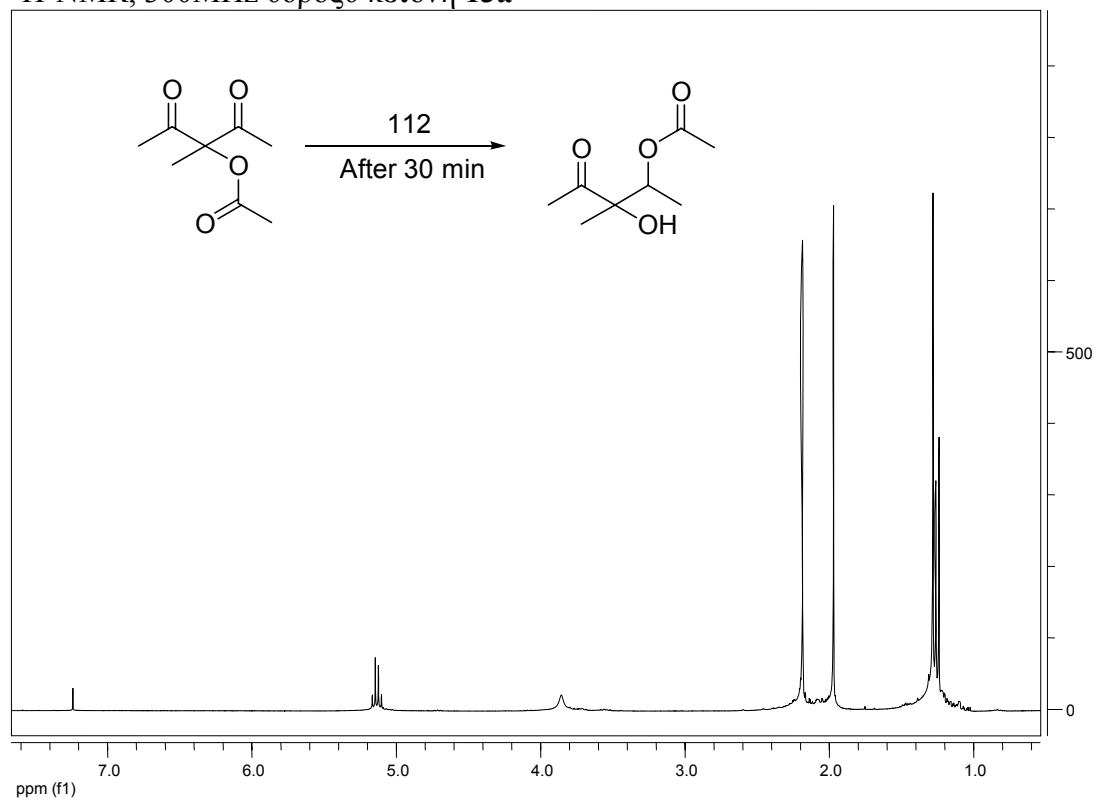
NMR 44

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ κετόνη **13a**



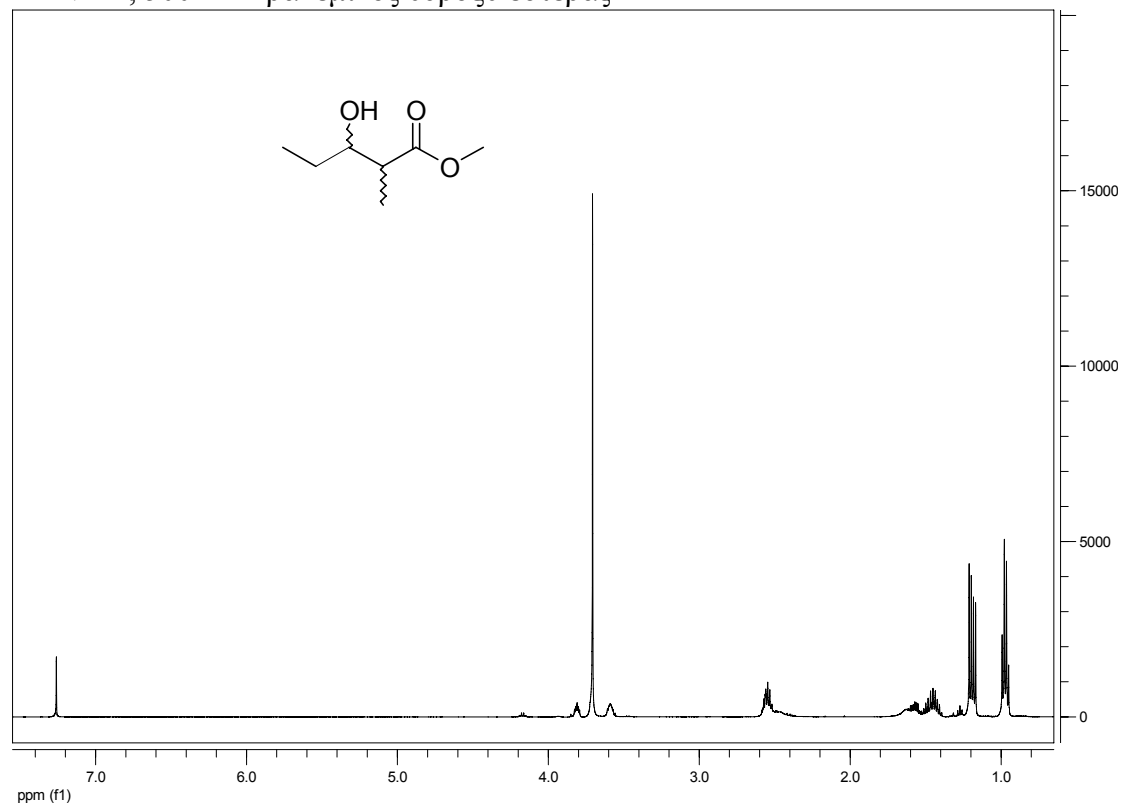
NMR 45

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ κετόνη **13a**



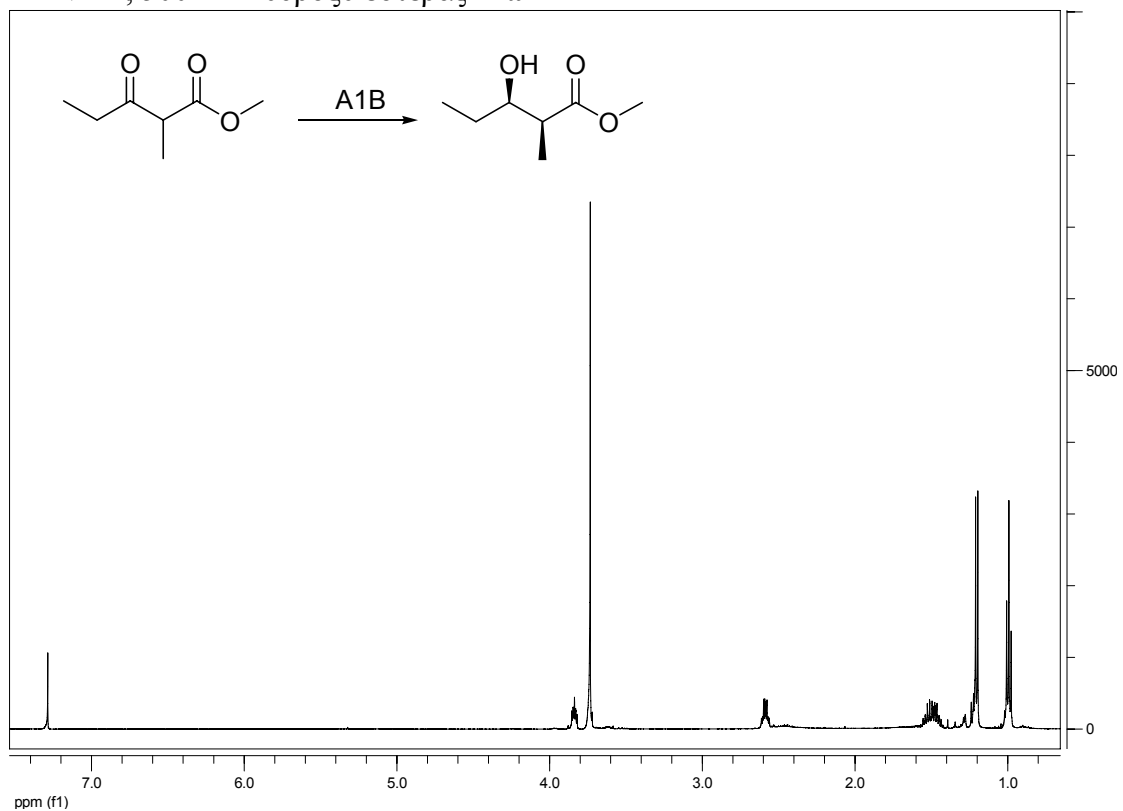
NMR 46

¹H-NMR, 500MHz ρακεμικός υδροξυ εστέρας **17**



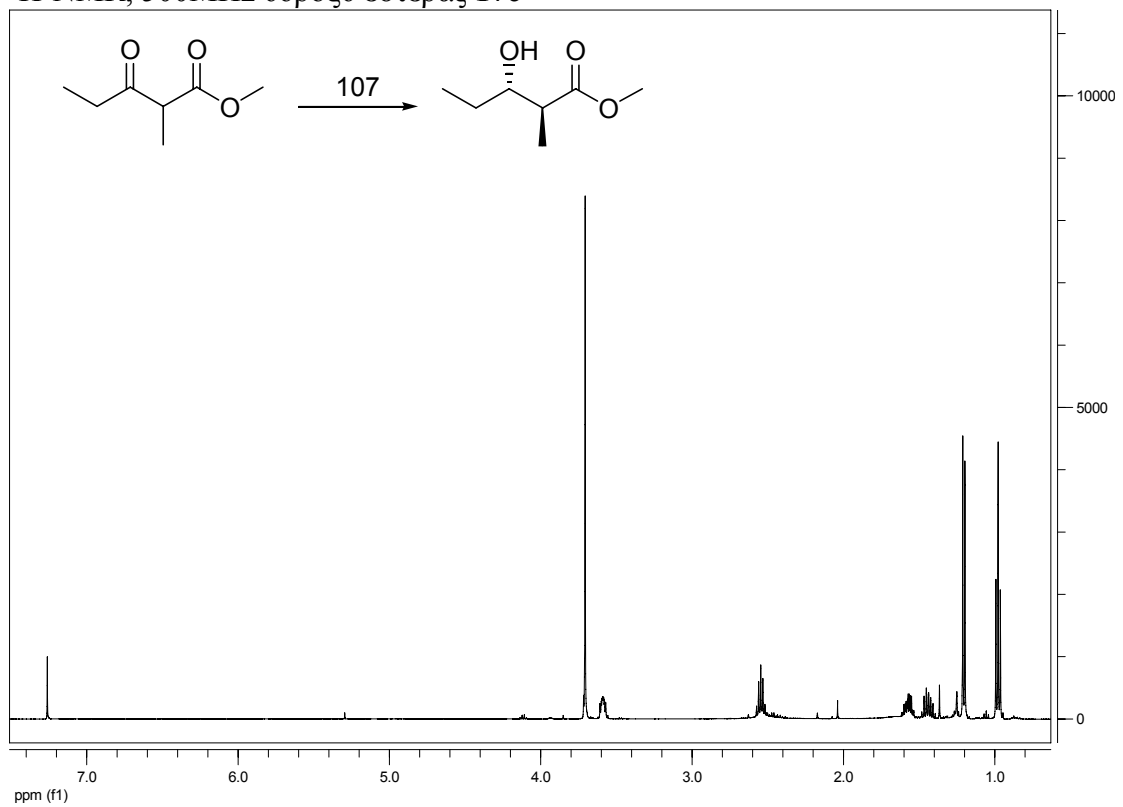
NMR 47

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ εστέρας **17a**



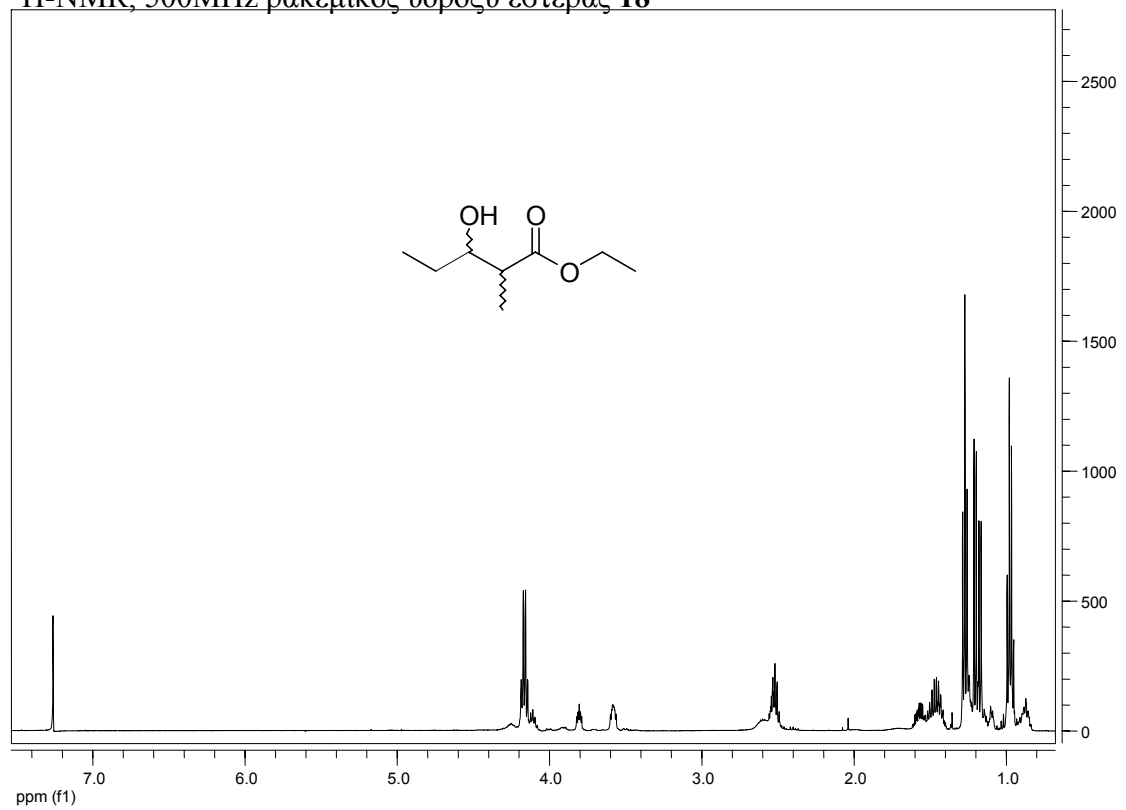
NMR 48

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ εστέρας **17c**



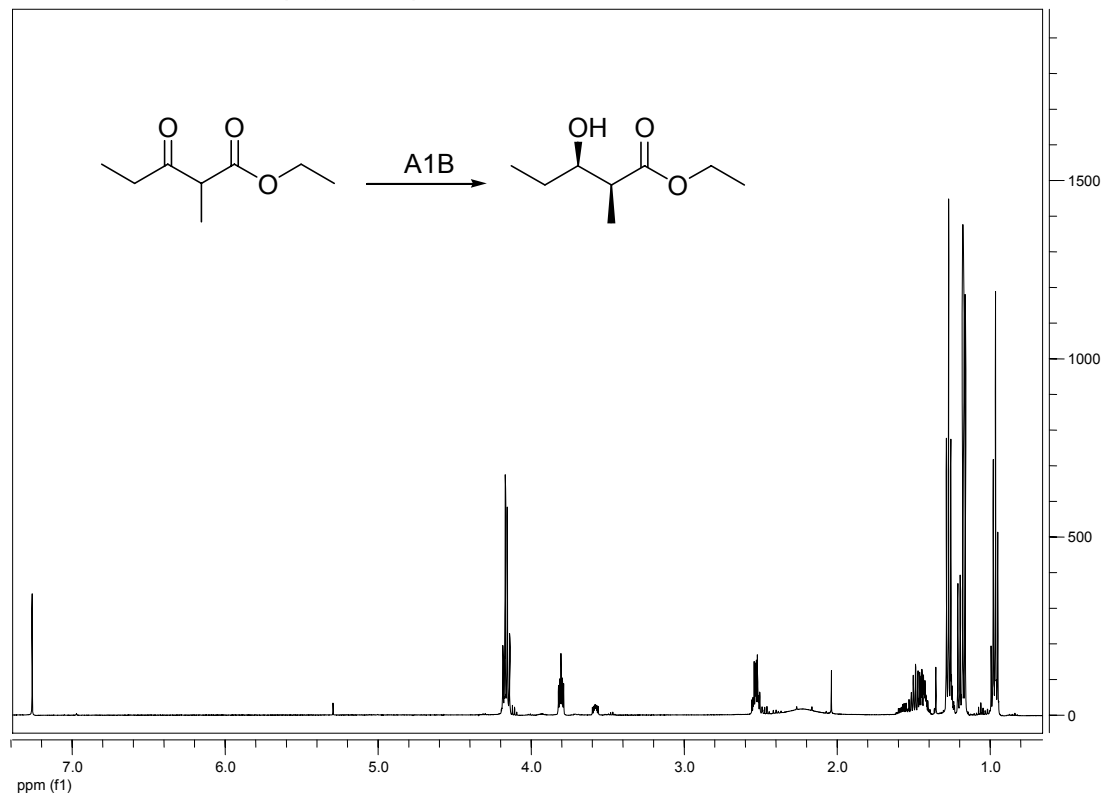
NMR 49

¹H-NMR, 500MHz ρακεμικός υδροξυ εστέρας **18**



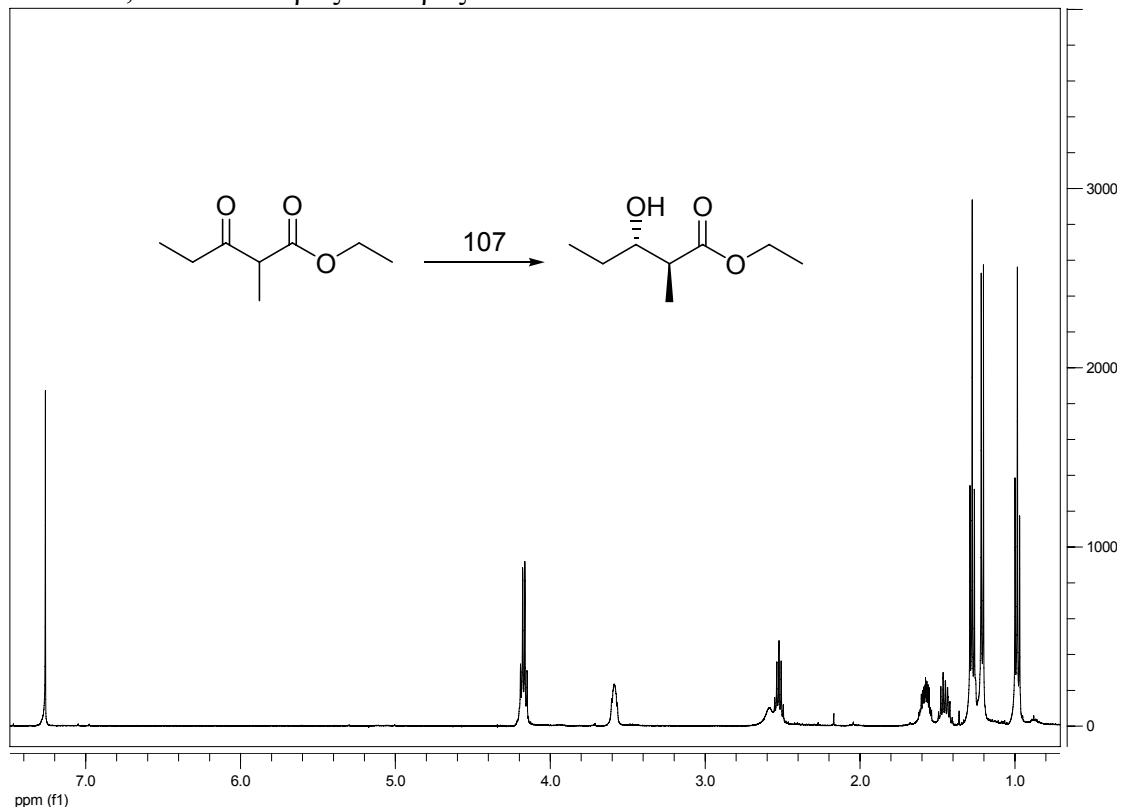
NMR 50

¹H-NMR, 500MHz υδροξυ εστέρας **18a**



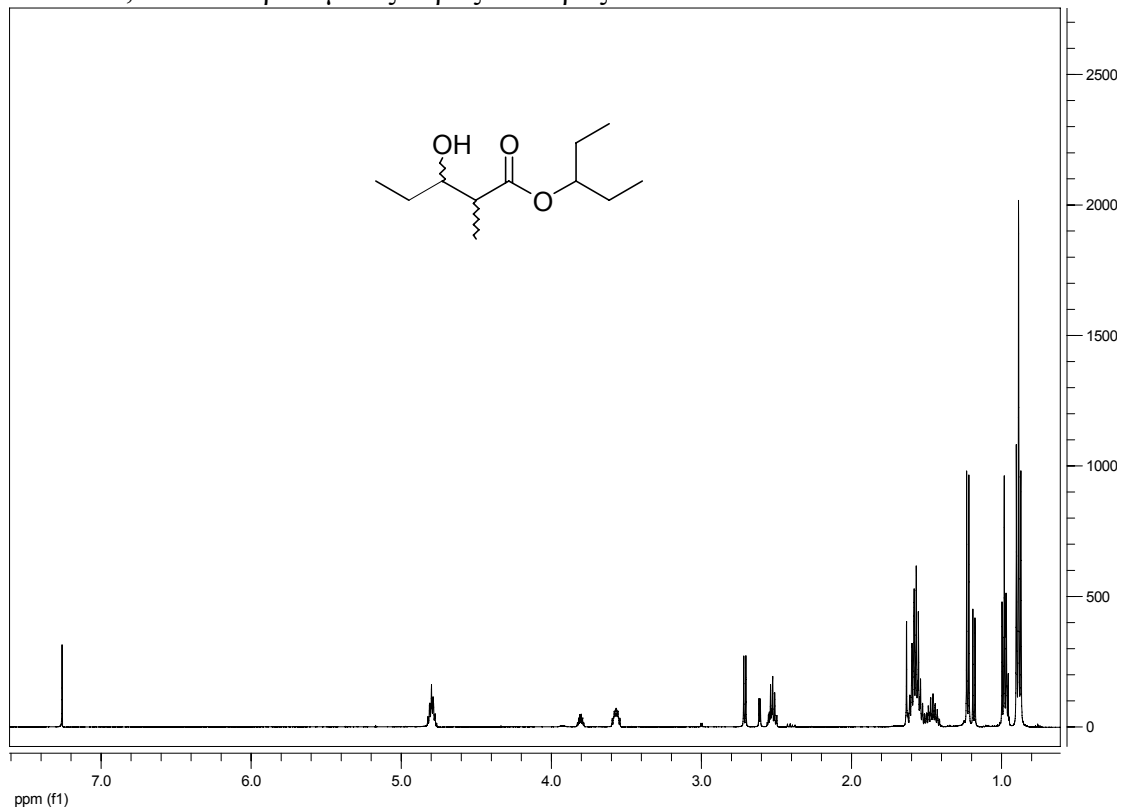
NMR 51

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ εστέρας **18c**



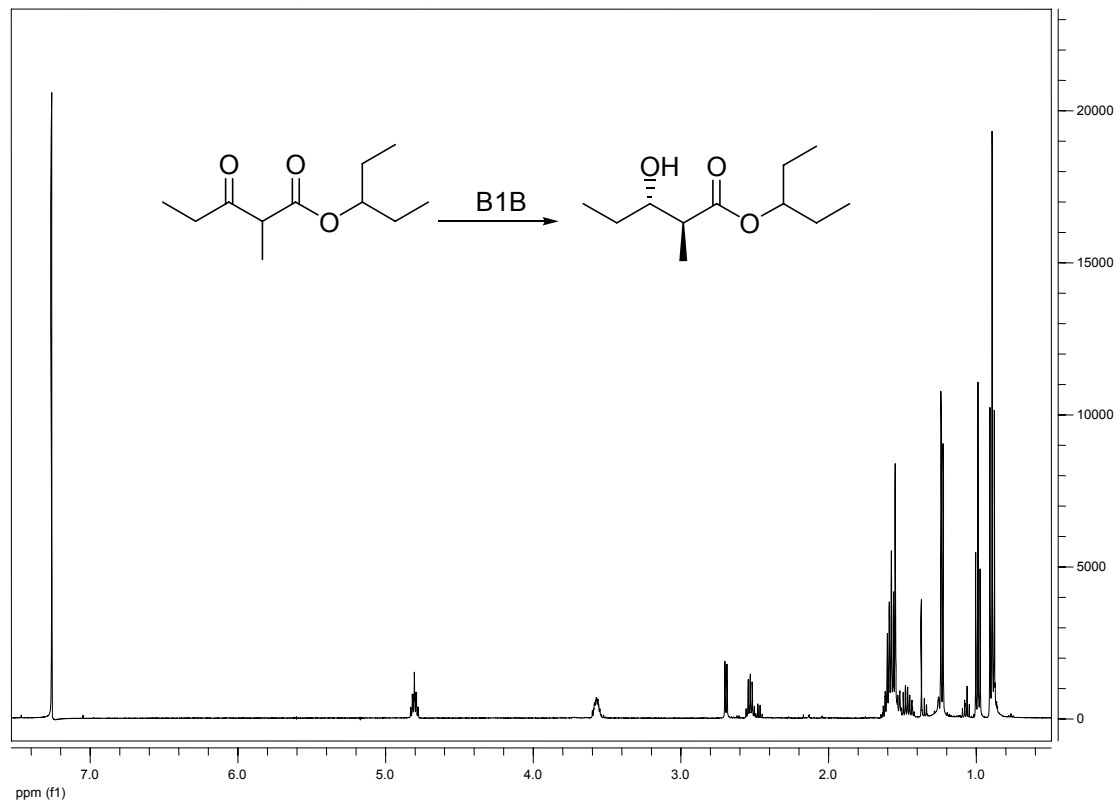
NMR 52

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμικός υδροξυ εστέρας **19**



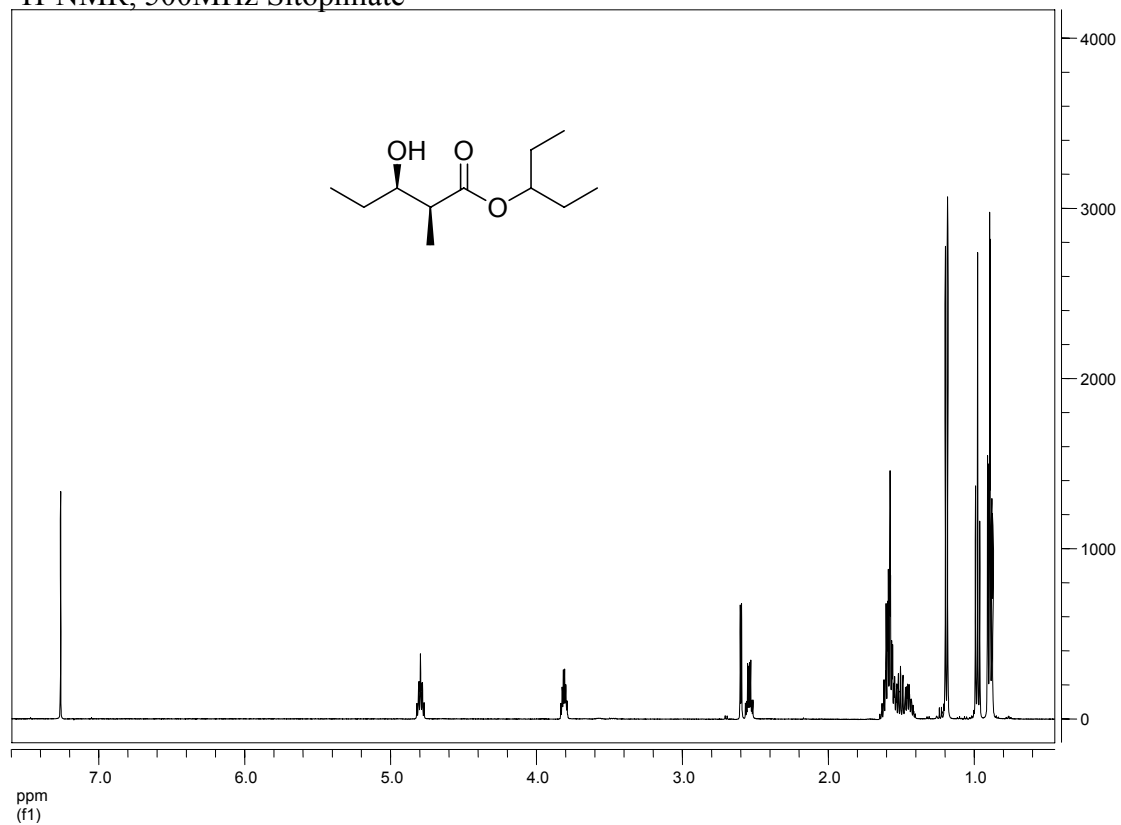
NMR 53

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ εστέρας **19c**



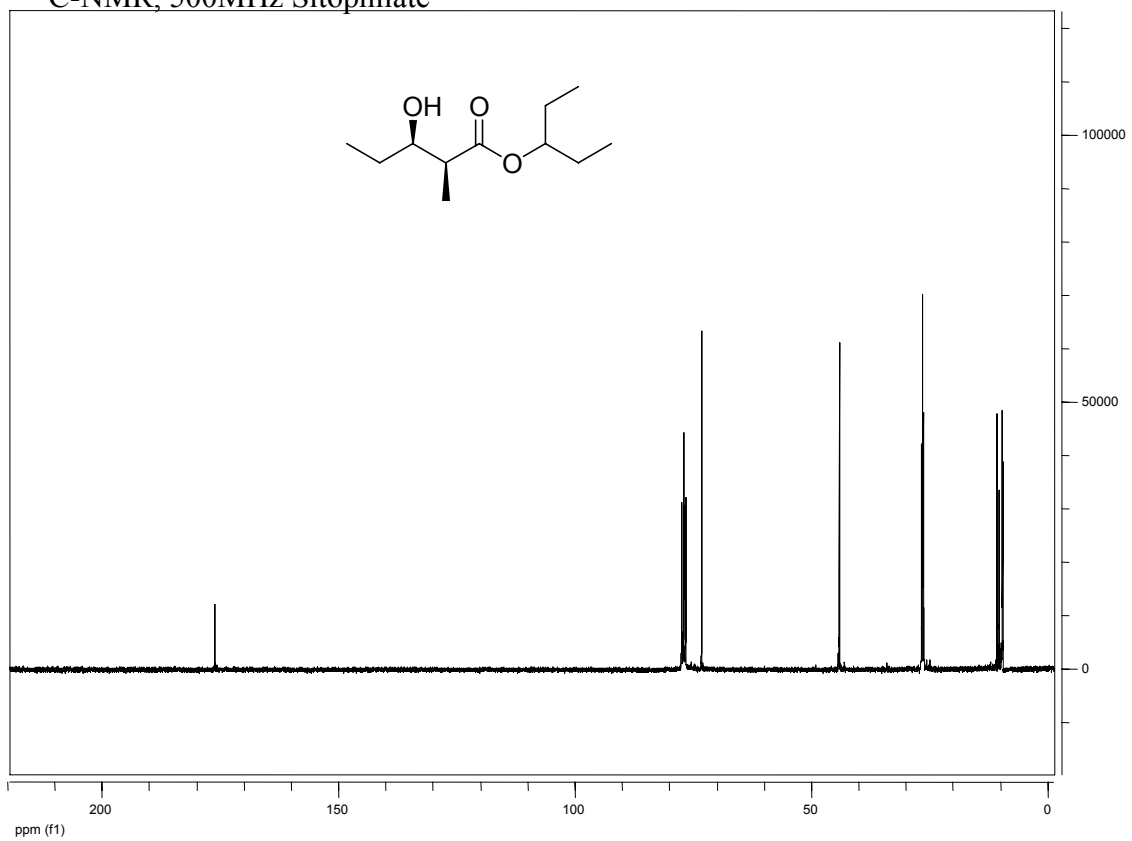
NMR 54

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz Sitophilate



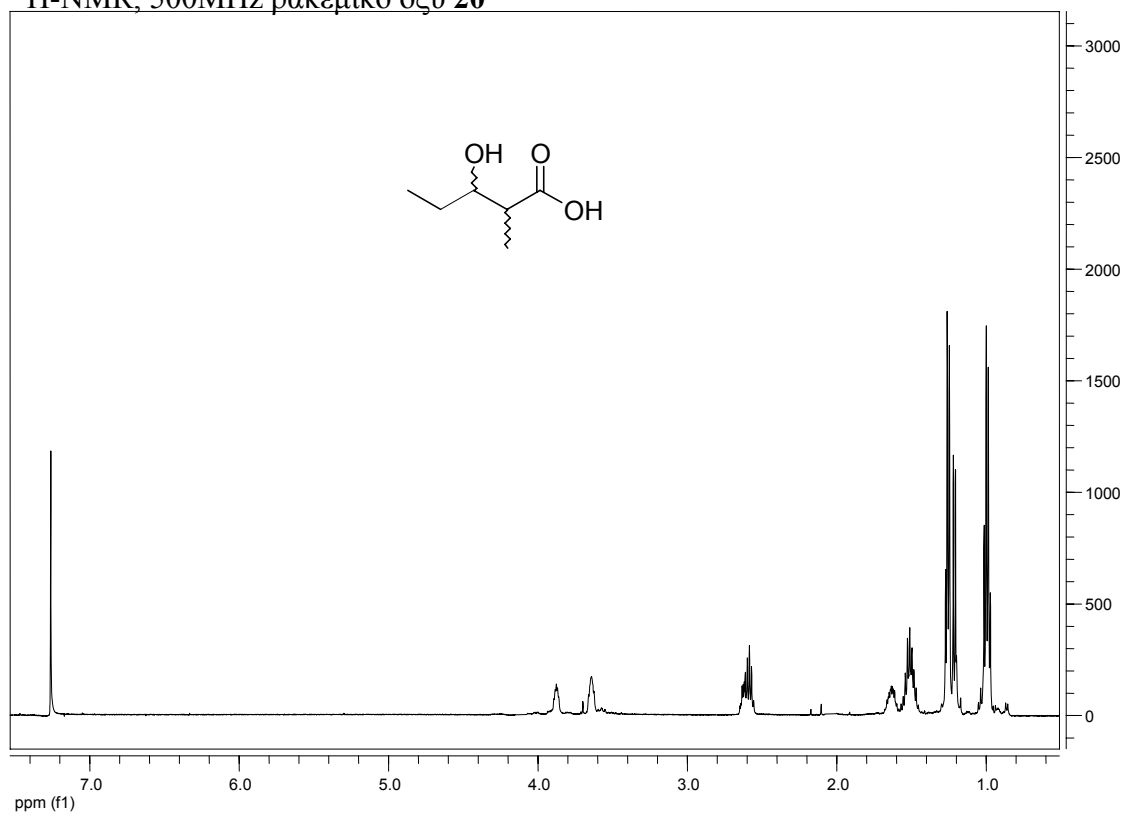
NMR 55

¹³C-NMR, 500MHz Sitophilate



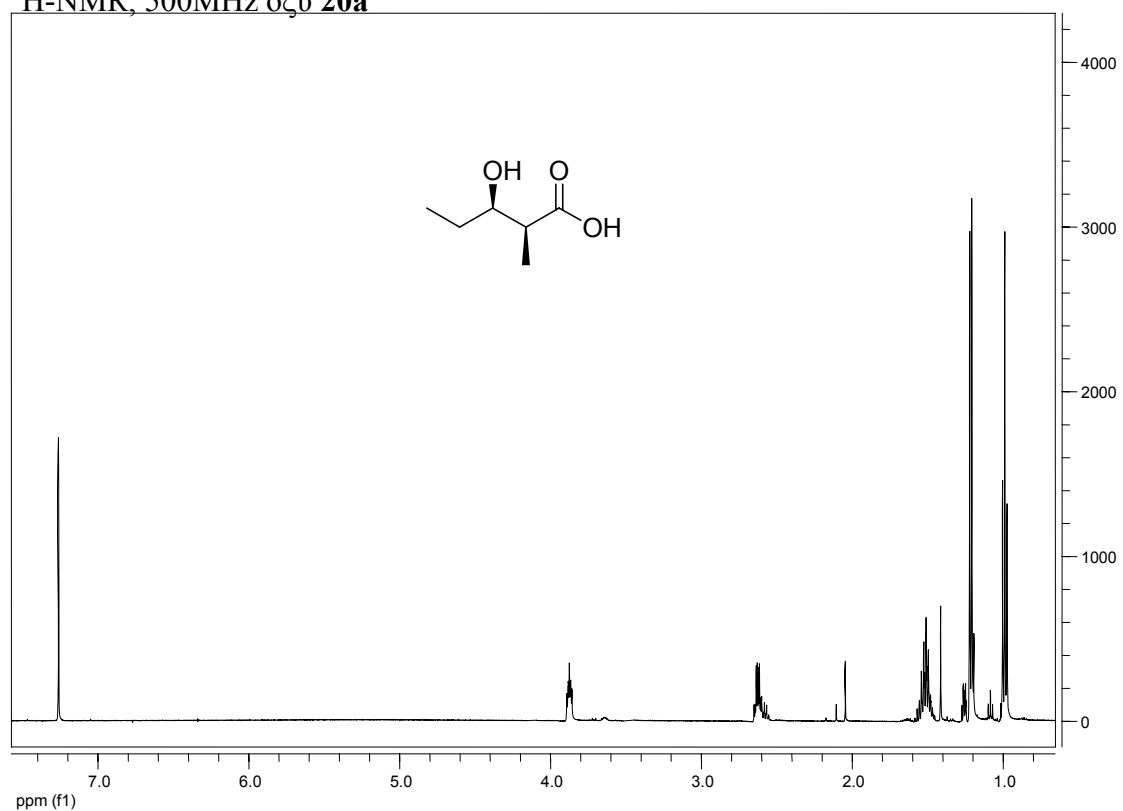
NMR 56

¹H-NMR, 500MHz ρακεμικό οξύ 20



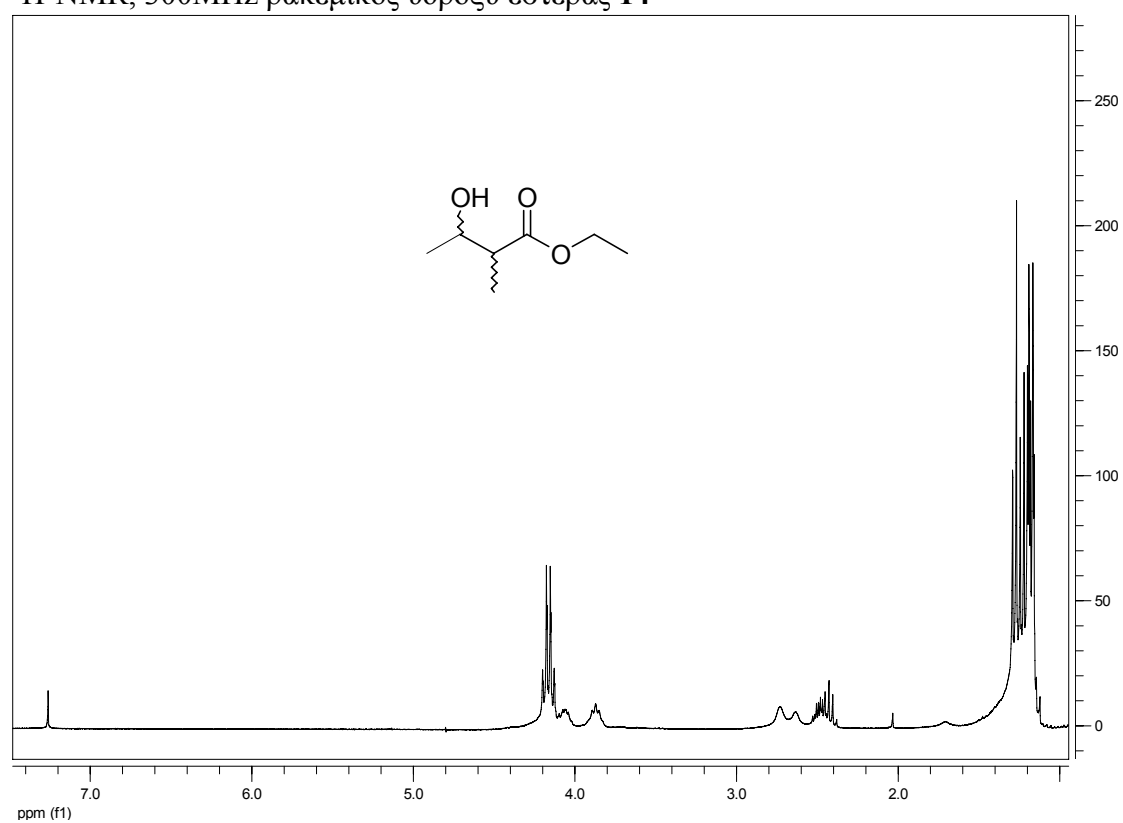
NMR 57

¹H-NMR, 500MHz οξύ **20a**



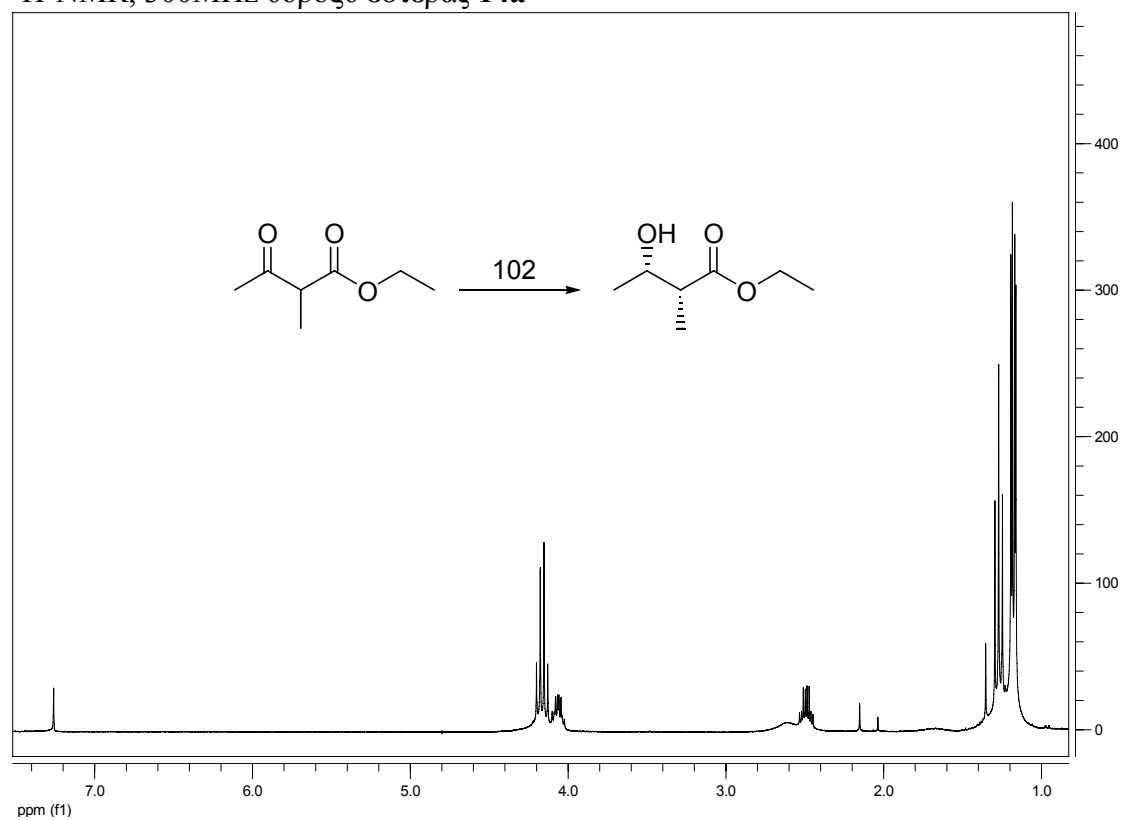
NMR 58

¹H-NMR, 300MHz ρακεμικός υδροξύ εστέρας **14**



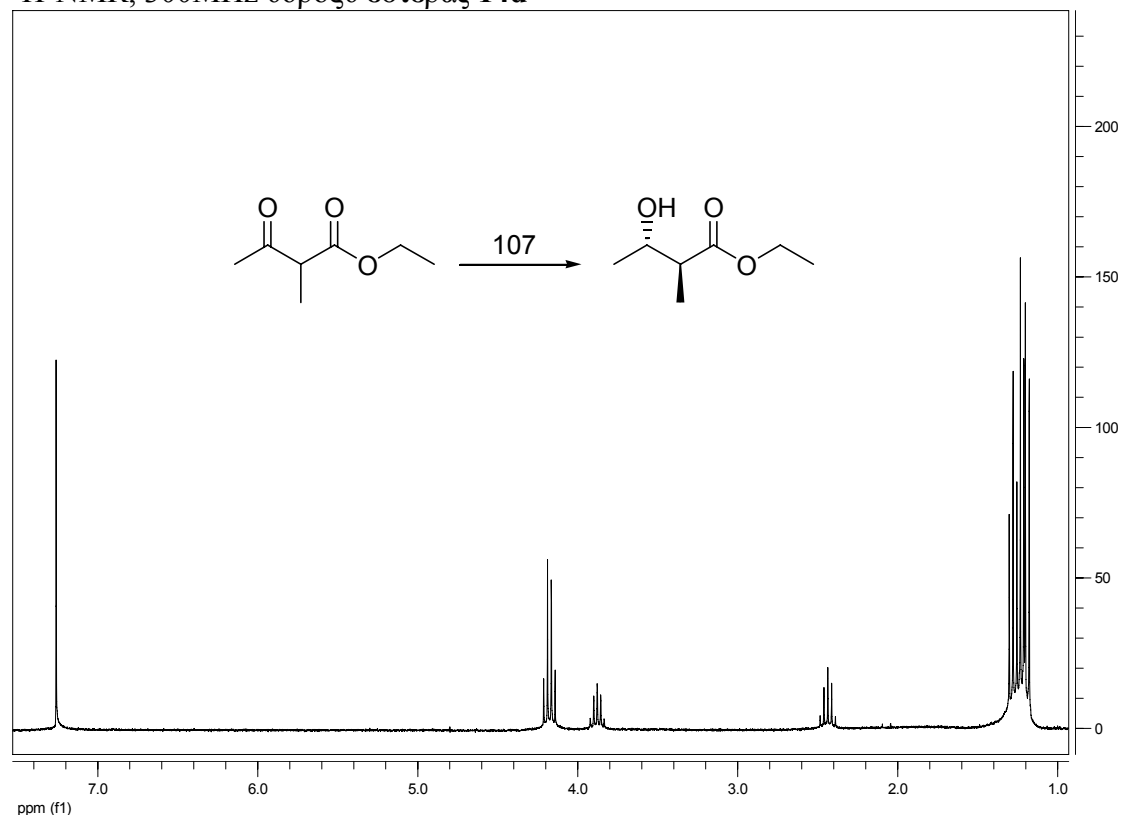
NMR 59

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ εστέρας **14a**



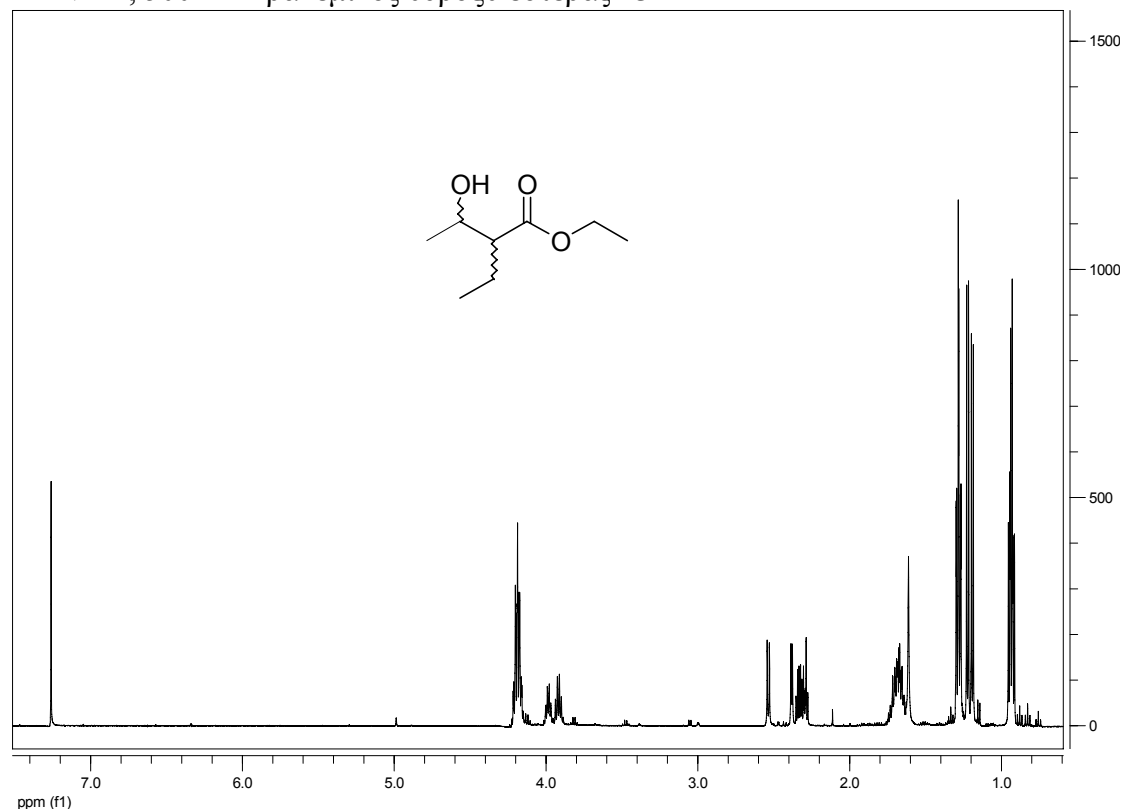
NMR 60

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ εστέρας **14d**



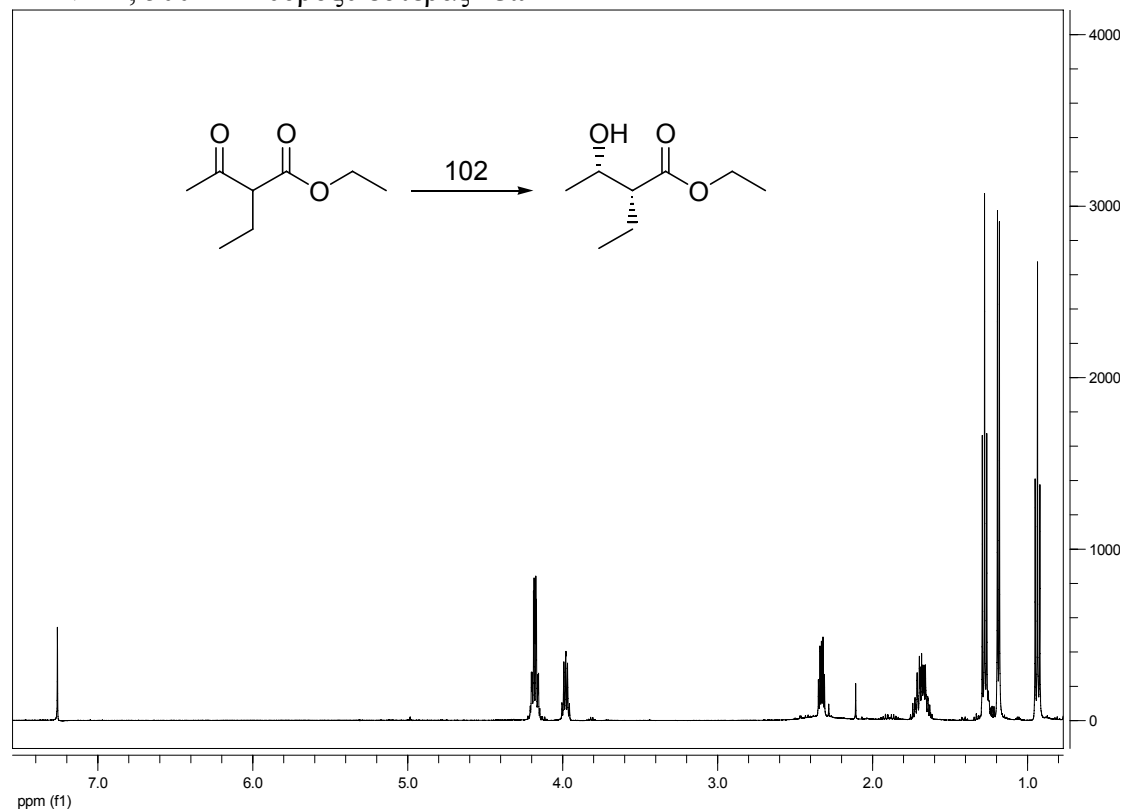
NMR 61

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμικός υδροξυ εστέρας **15**



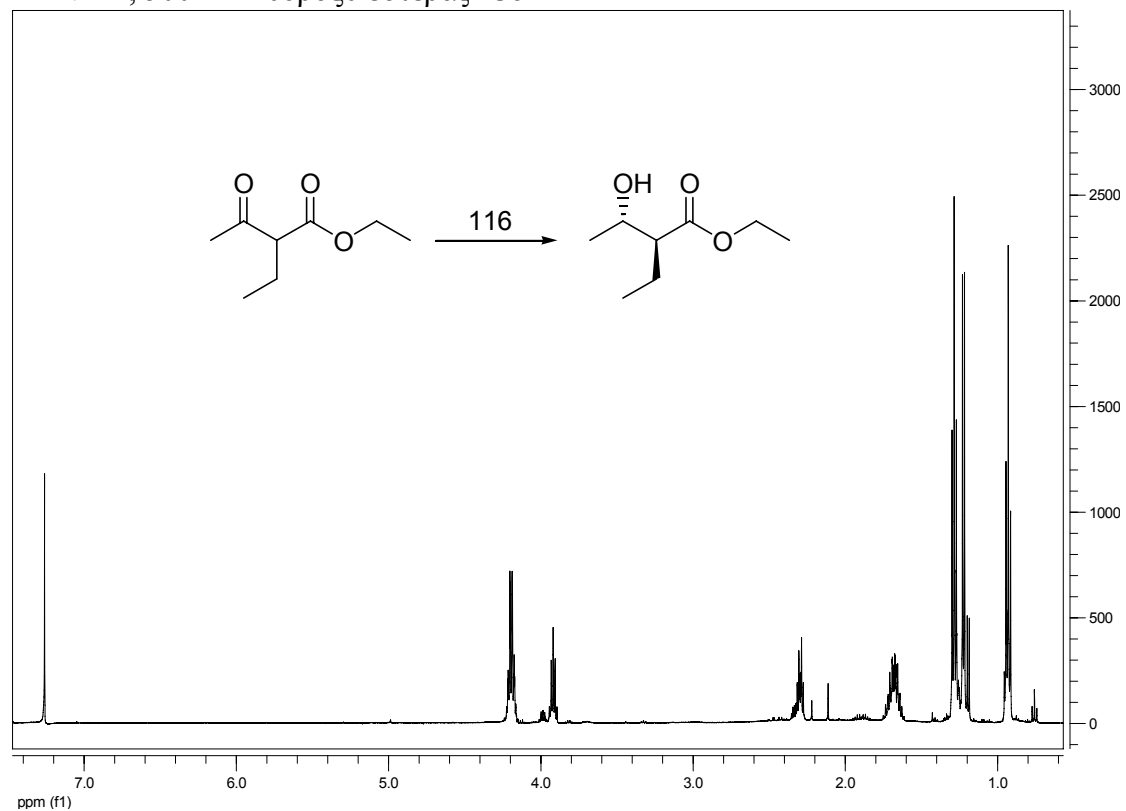
NMR 62

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ εστέρας **15a**



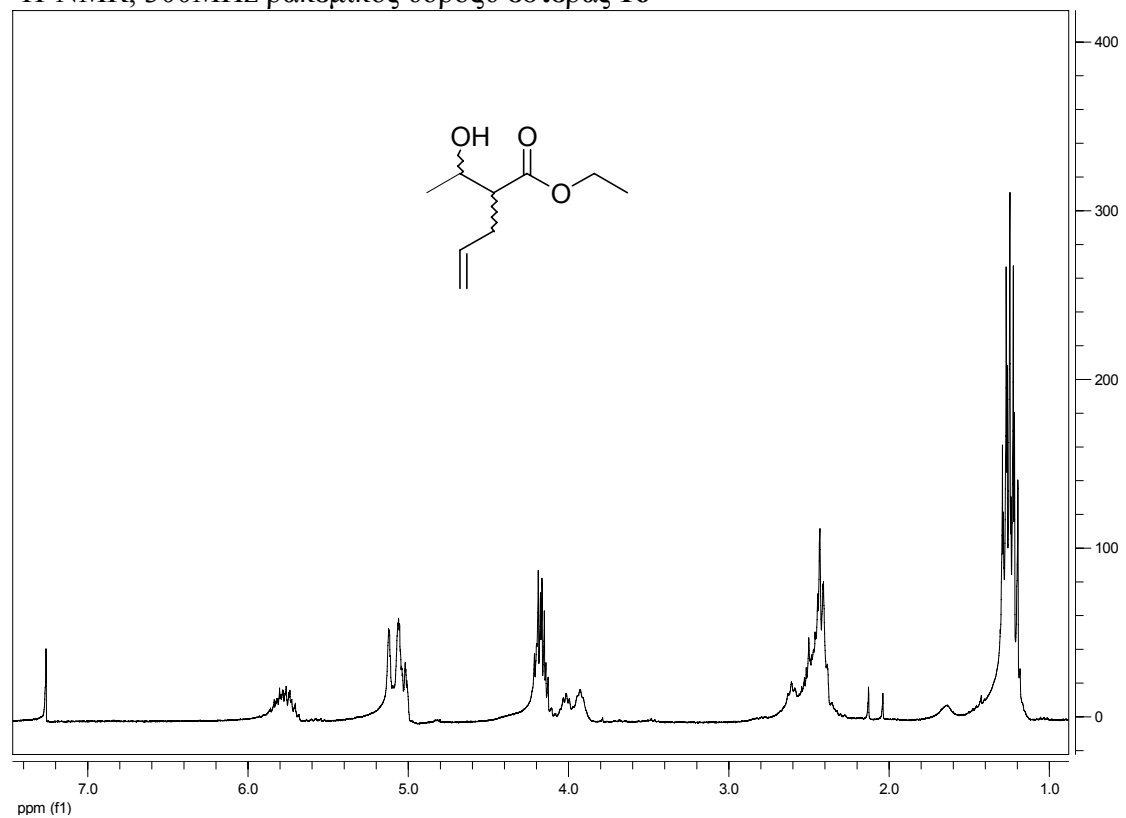
NMR 63

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz υδροξυ εστέρας **15c**



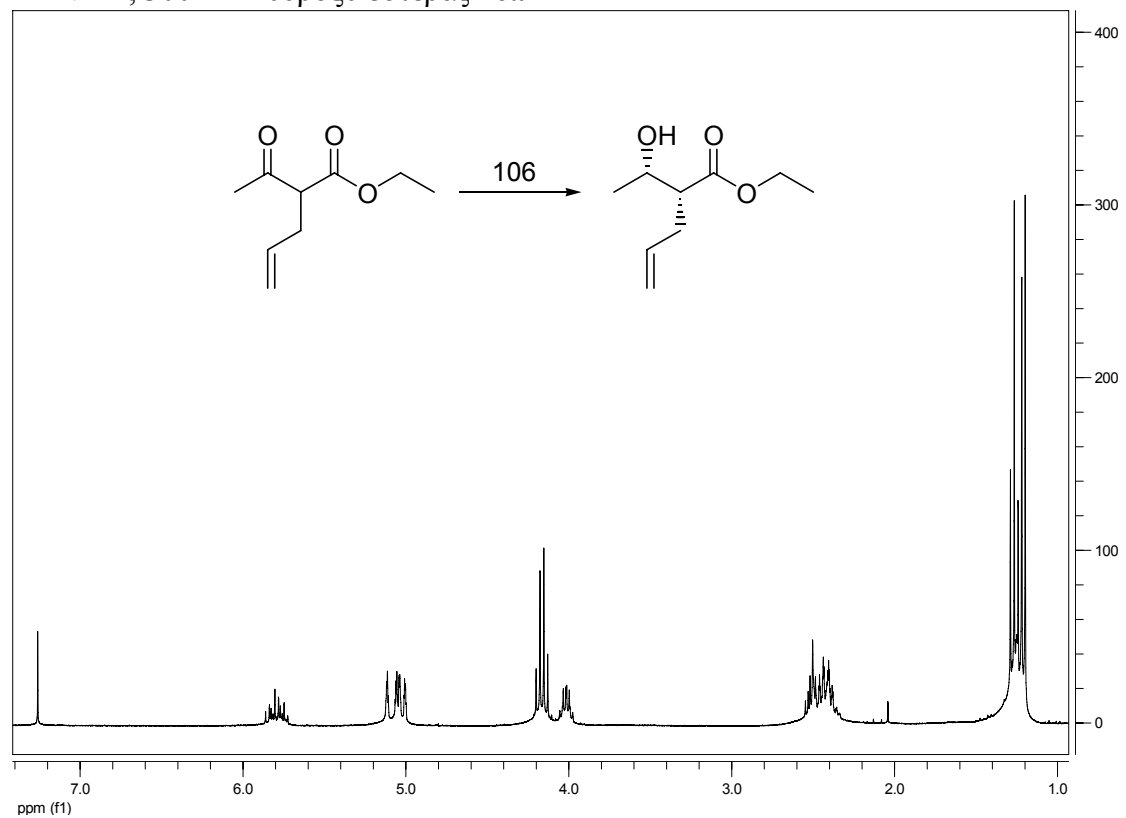
NMR 64

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz ρακεμικός υδροξυ εστέρας **16**



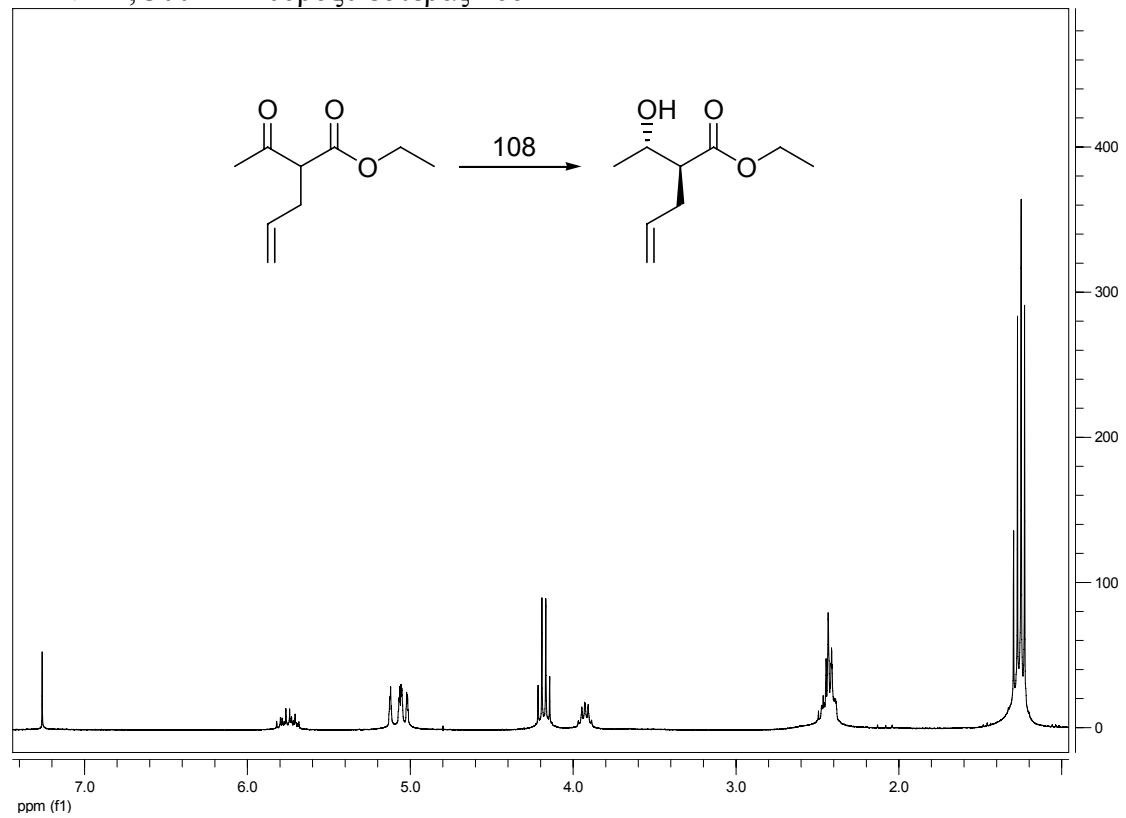
NMR 65

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ εστέρας **16a**



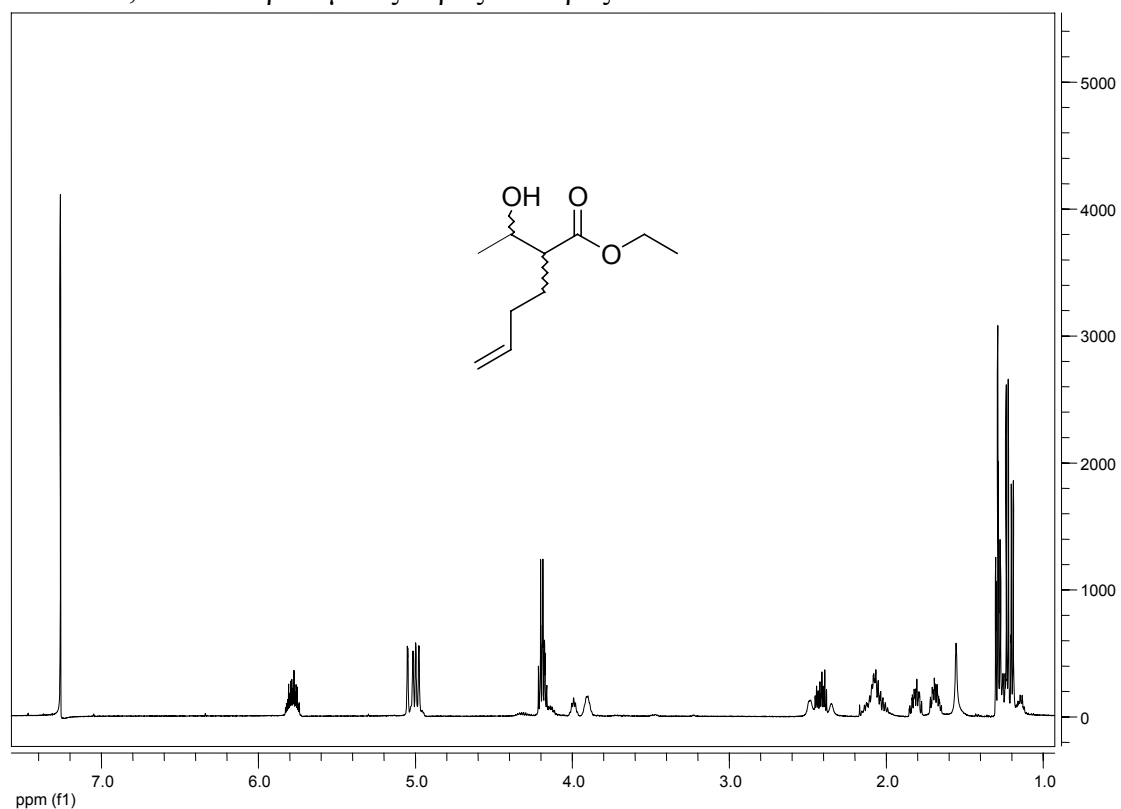
NMR 66

¹H-NMR, 300MHz υδροξυ εστέρας **16c**



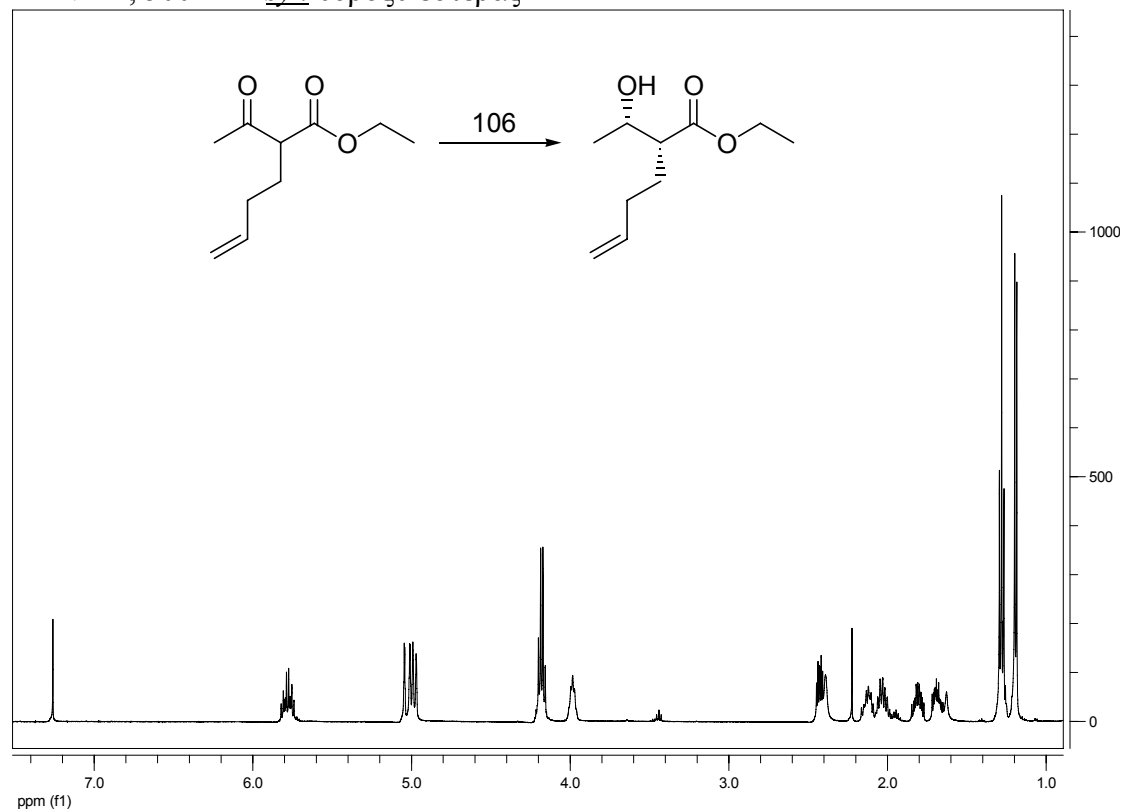
NMR 67

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμικός υδροξύ εστέρας **21**



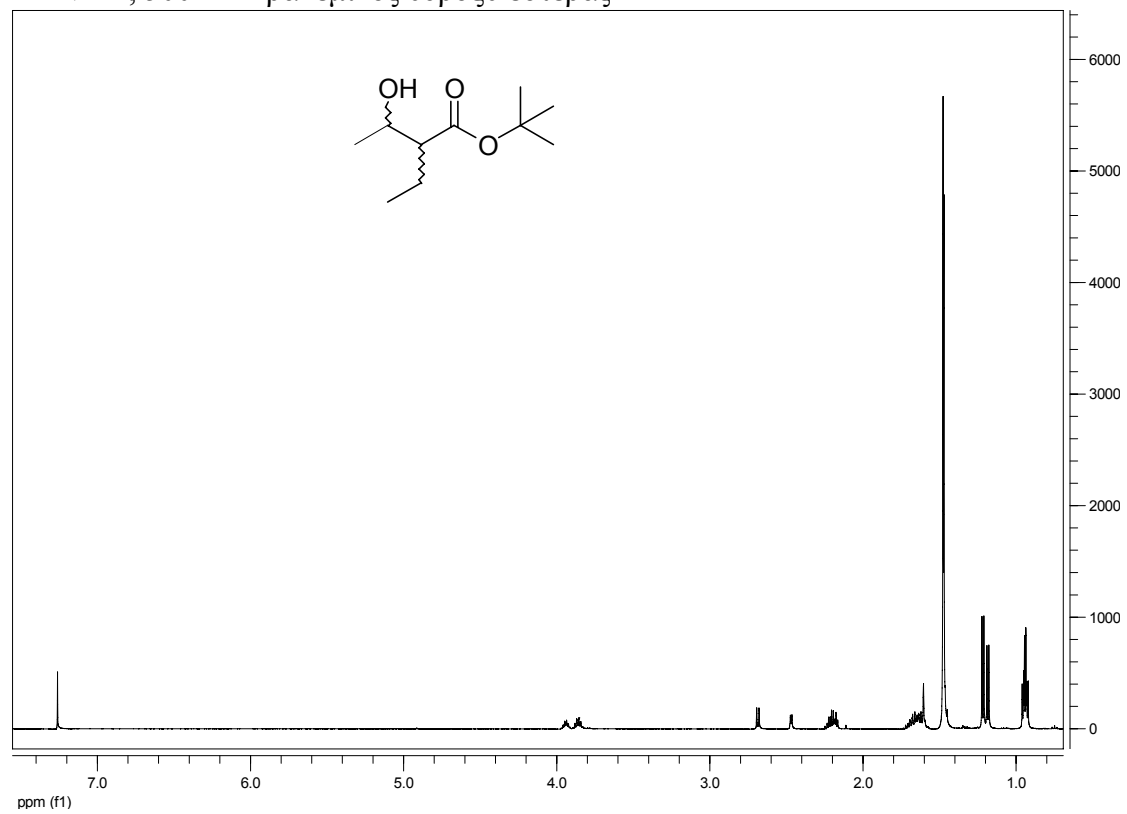
NMR 68

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz *syn* υδροξύ εστέρας **21**



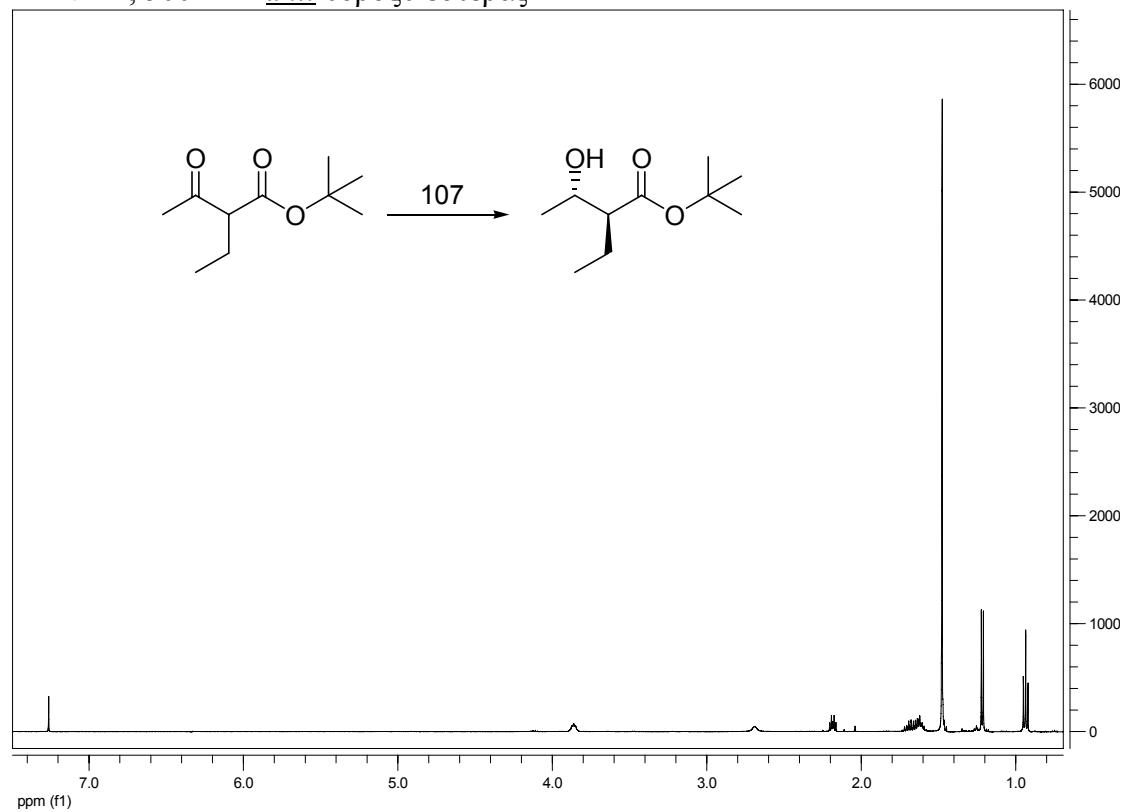
NMR 69

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμικός υδροξύ εστέρας **22**



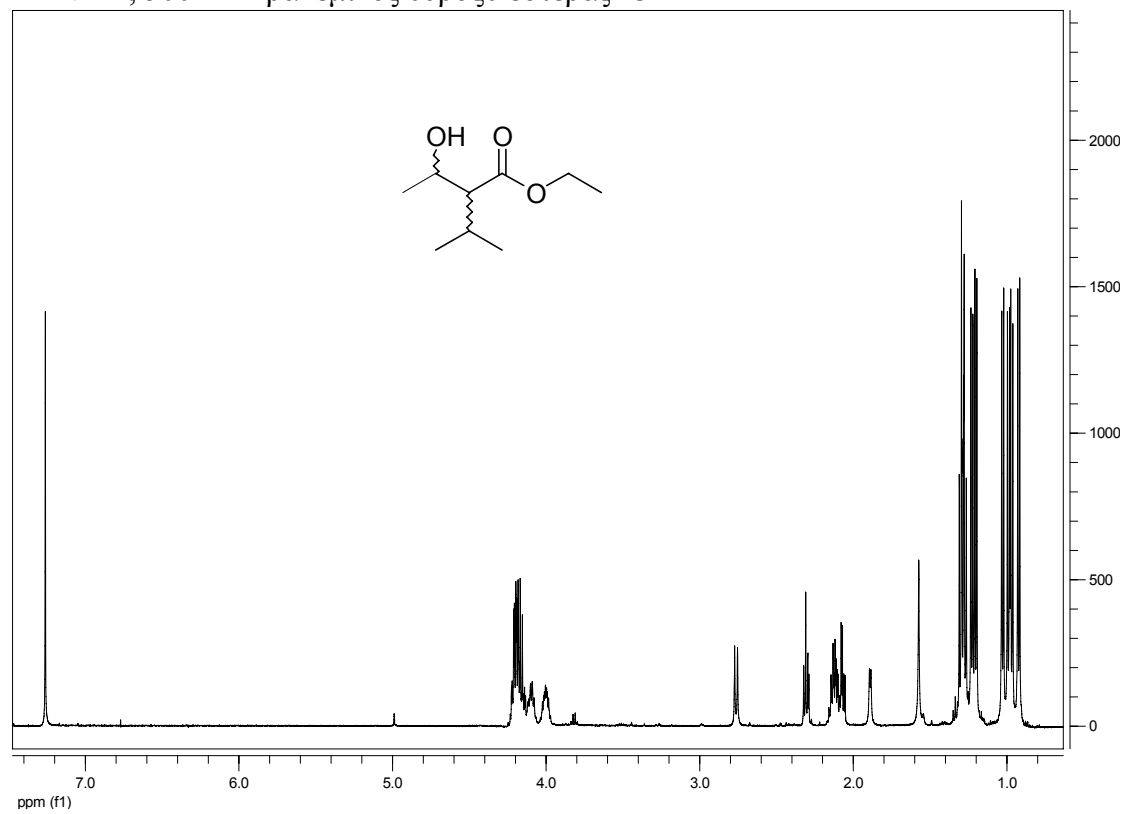
NMR 70

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz *anti* υδροξύ εστέρας **22**



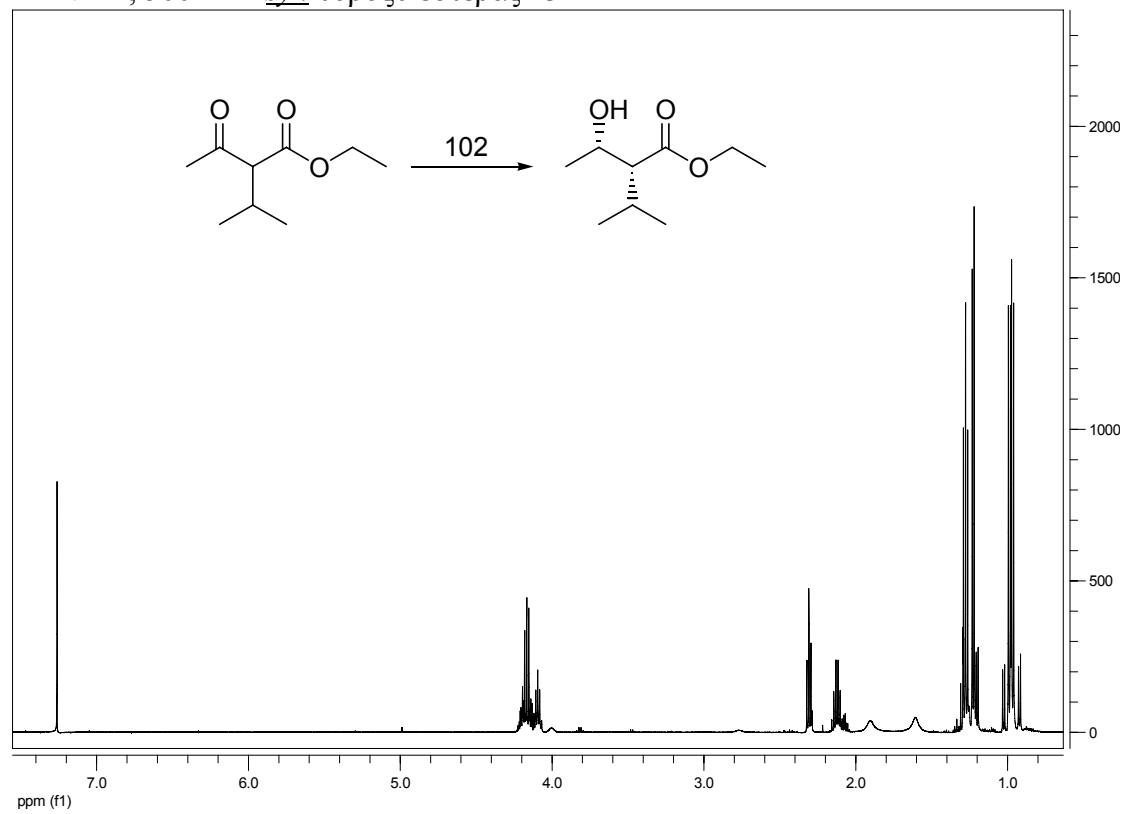
NMR 71

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz ρακεμικός υδροξυ εστέρας **23**



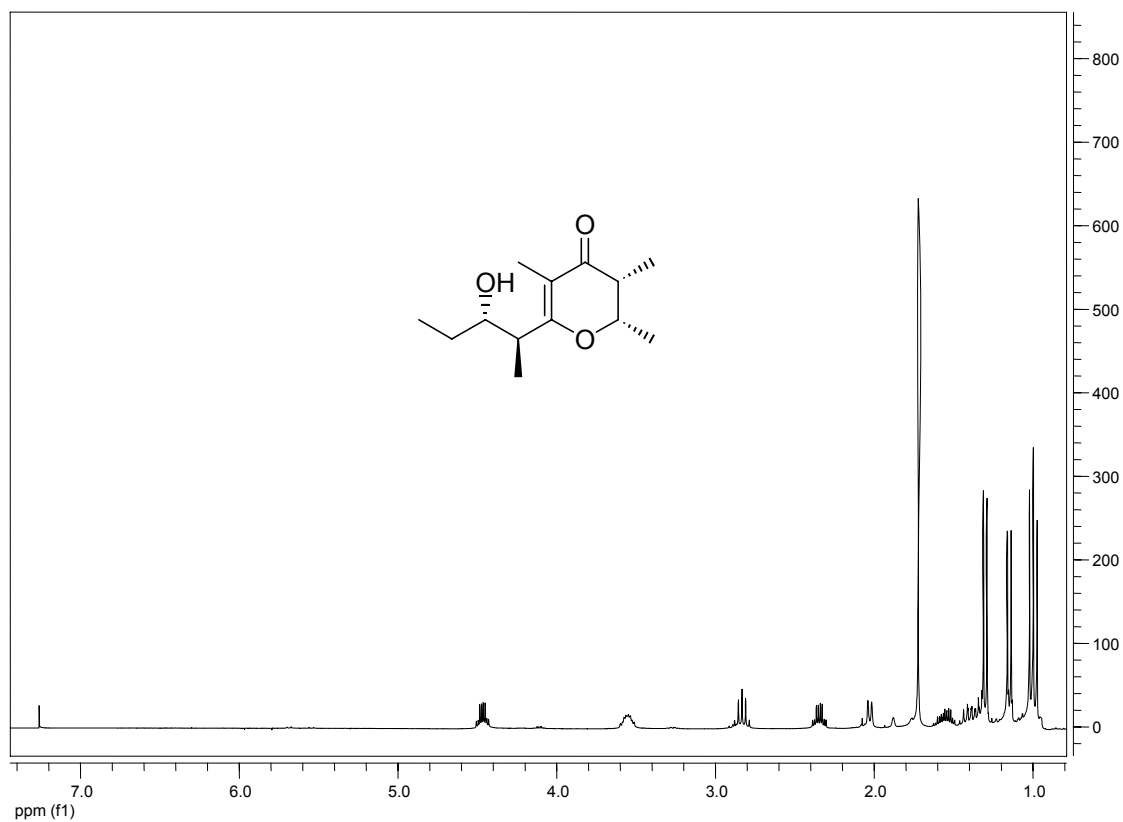
NMR 72

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz *syn* υδροξυ εστέρας **23**



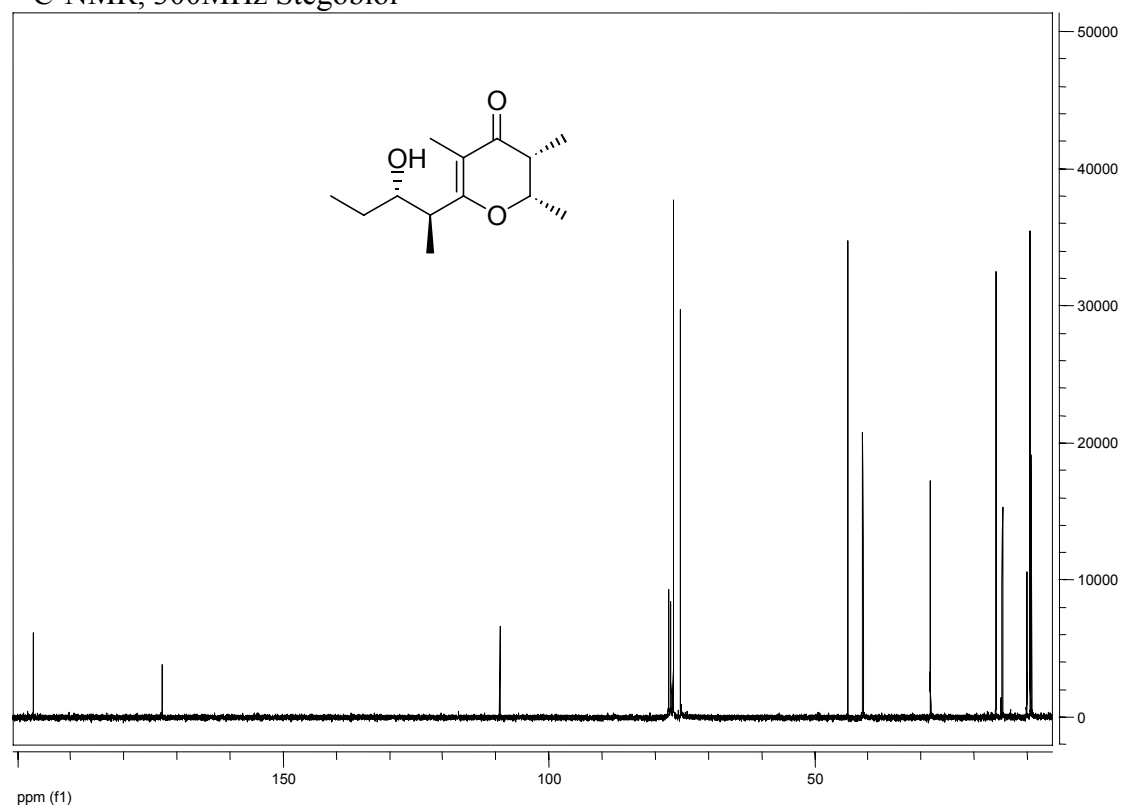
NMR 73

¹H-NMR, 300MHz Stegobiol



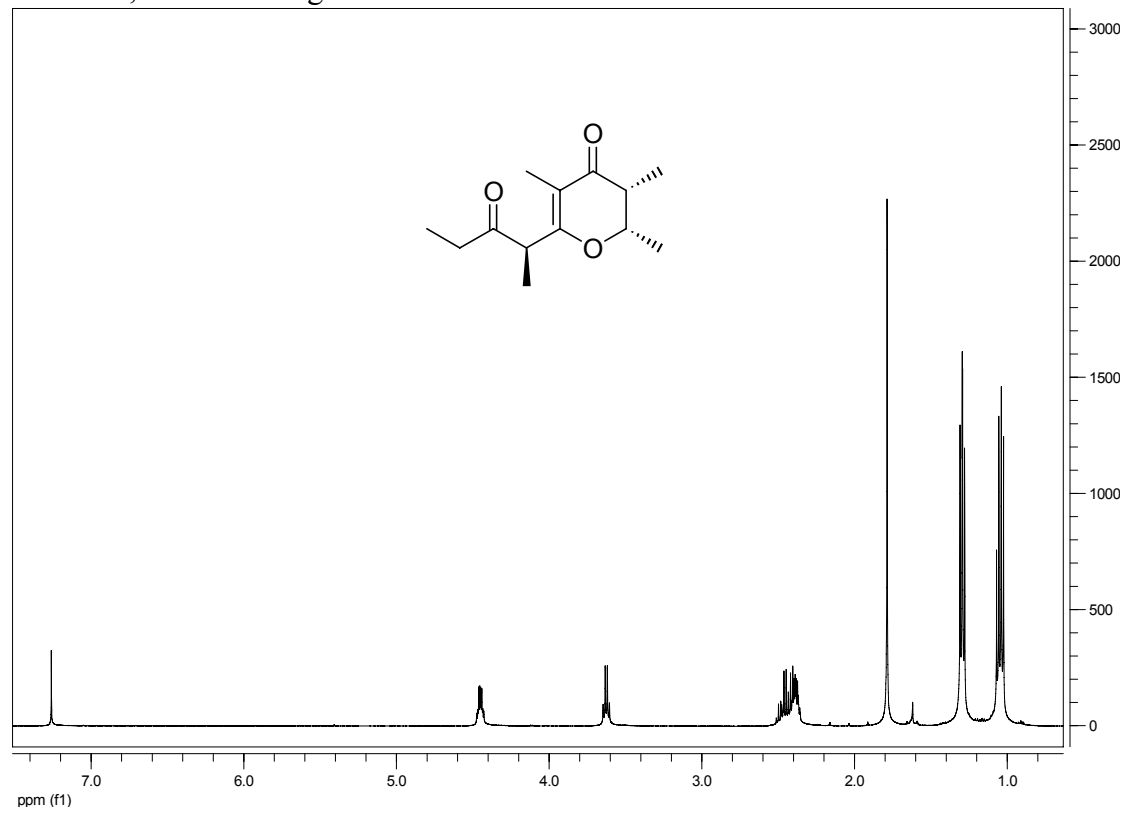
NMR 74

¹³C-NMR, 300MHz Stegobiol



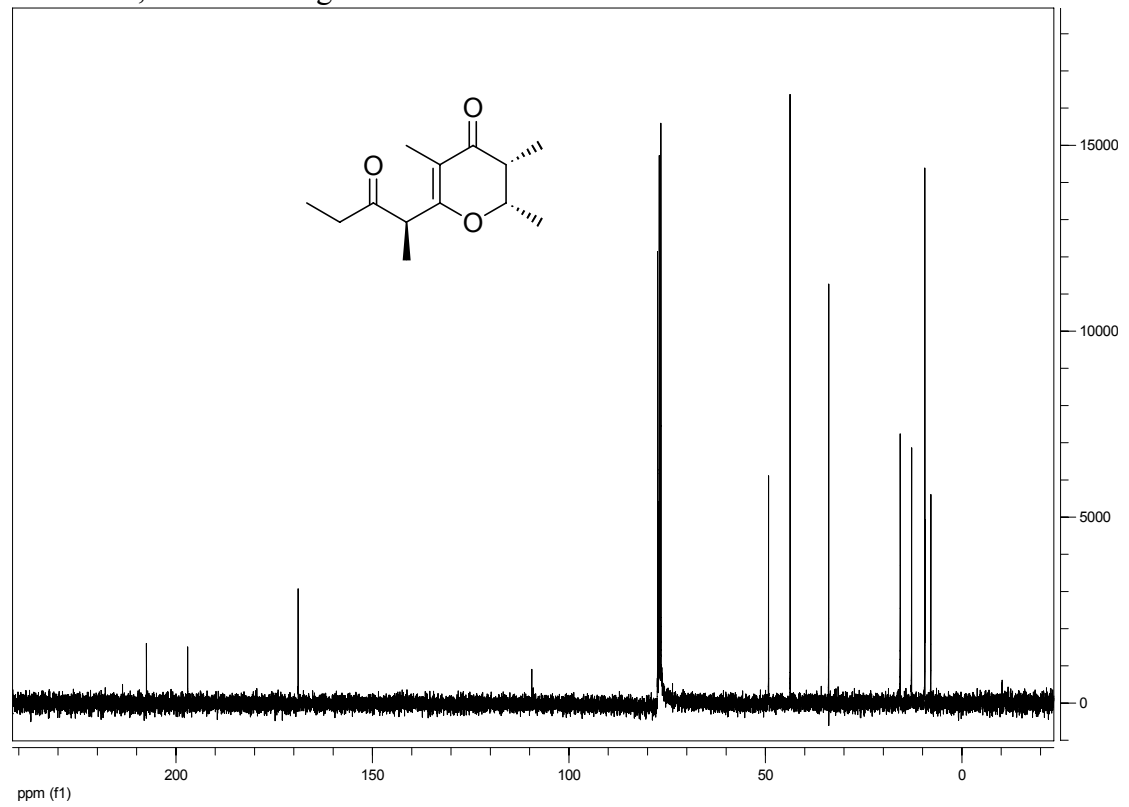
NMR 75

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz Stegobinone



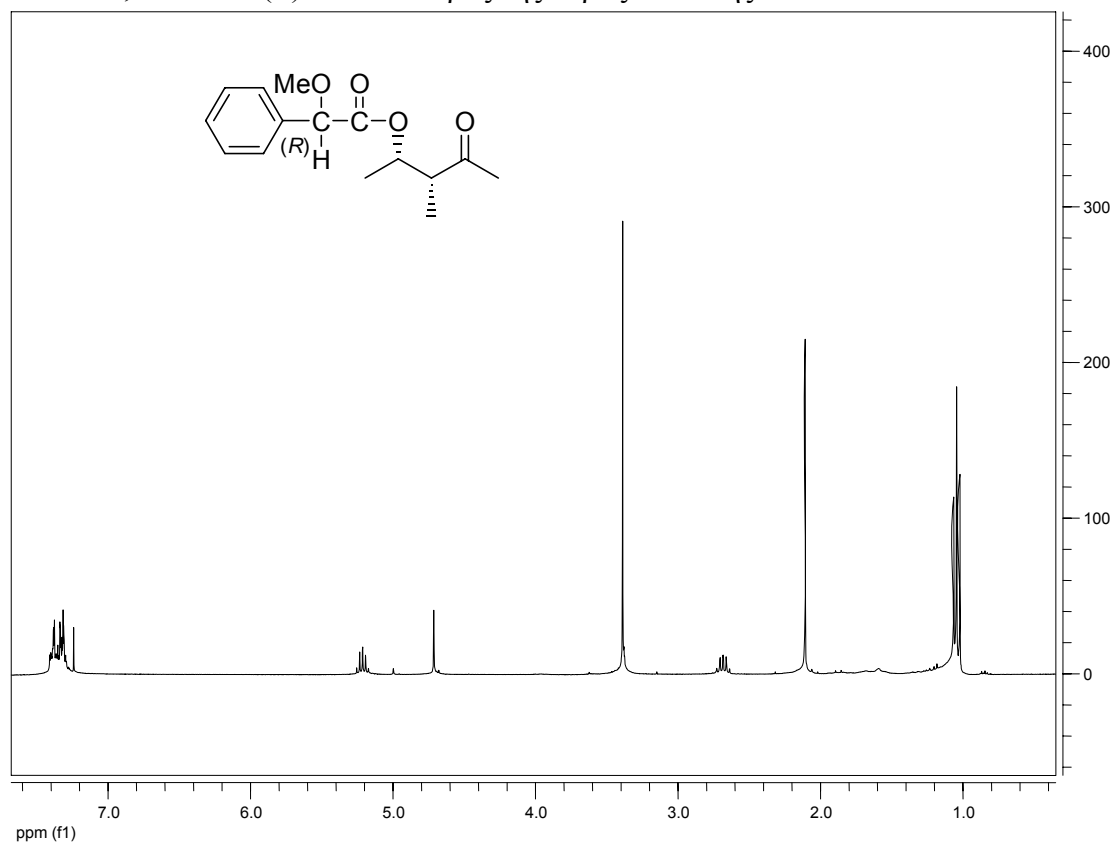
NMR 76

$^{13}\text{C-NMR}$, 300MHz Stegobinone



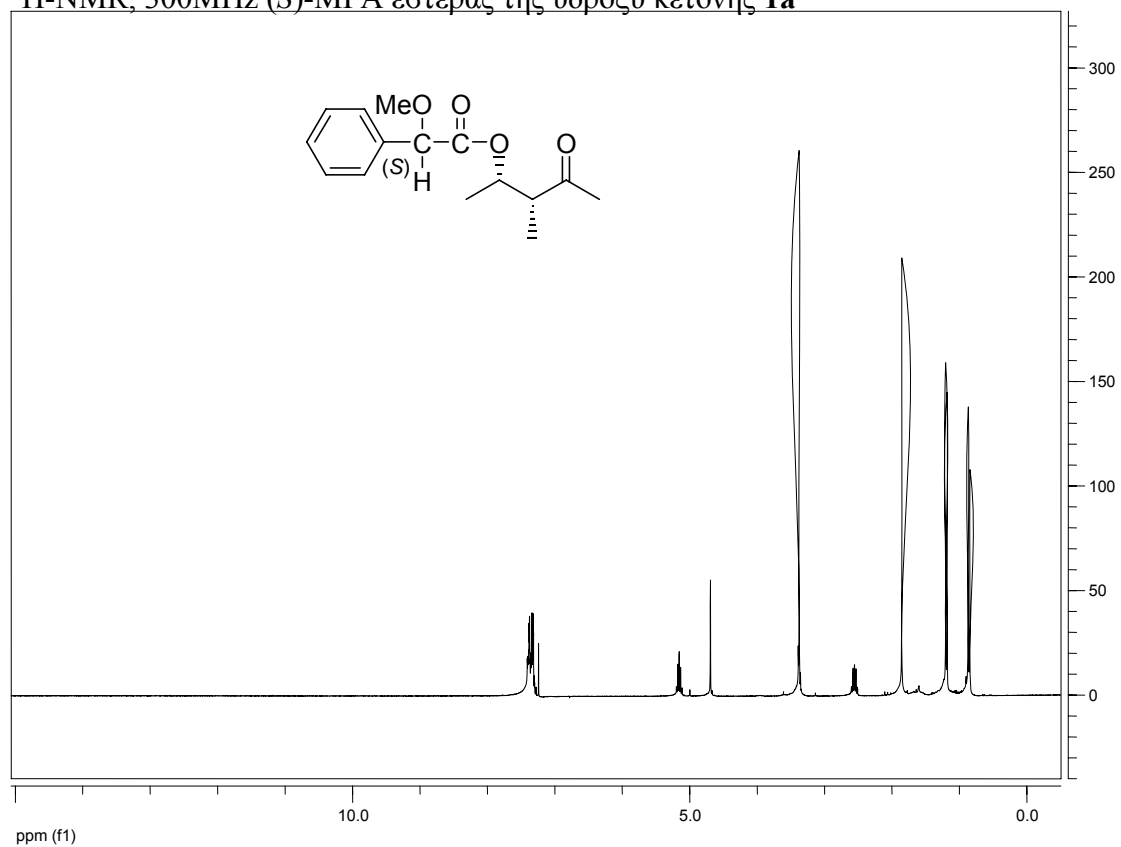
NMR 77

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **1a**



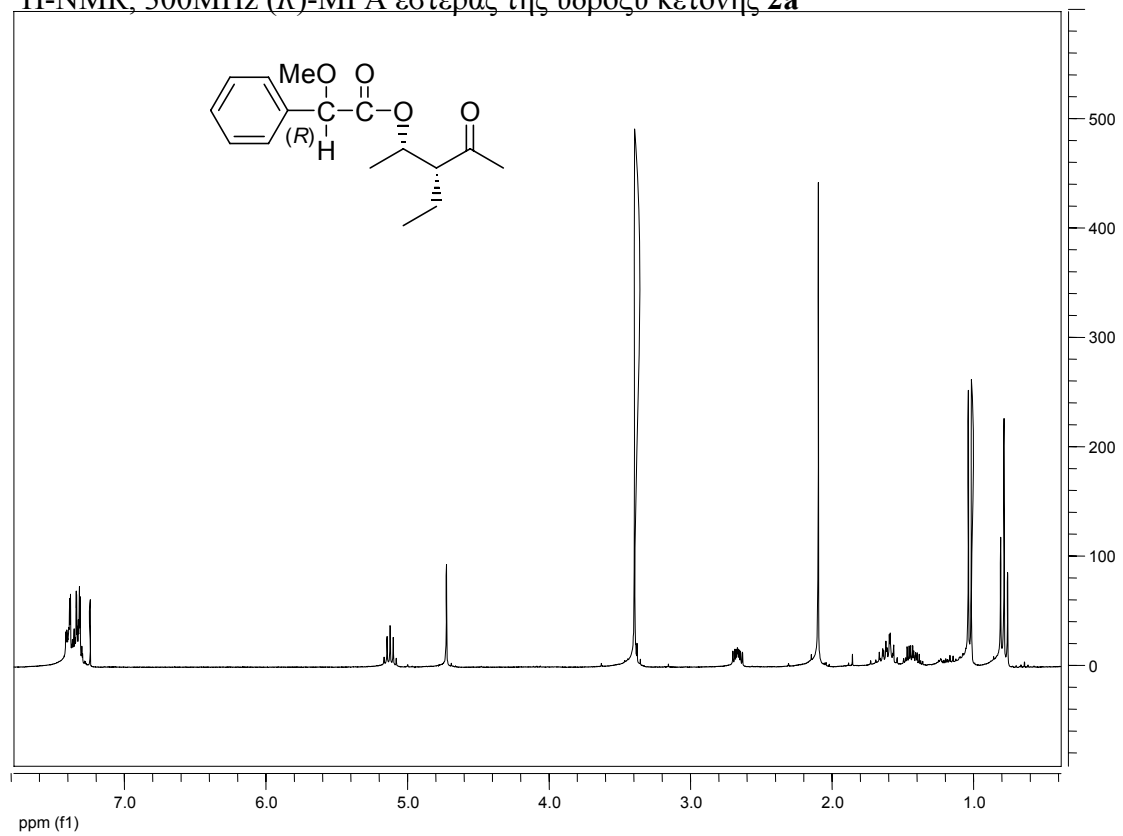
NMR 78

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **1a**



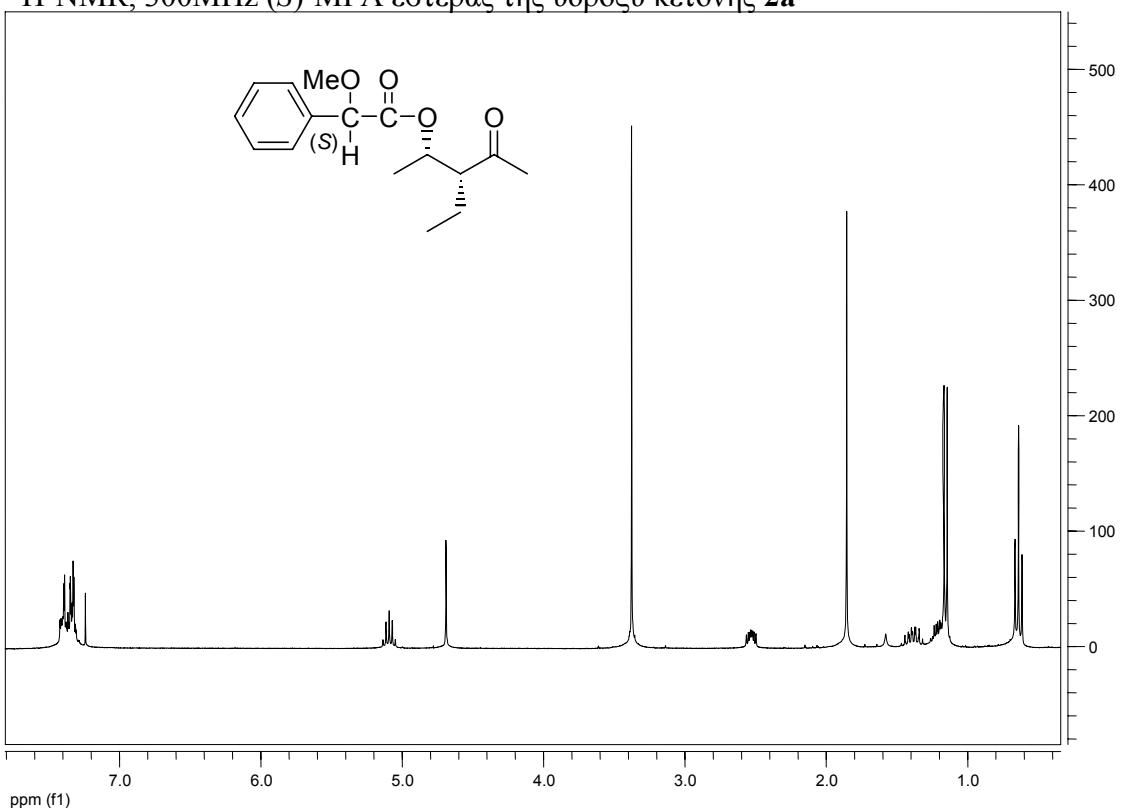
NMR 79

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **2a**



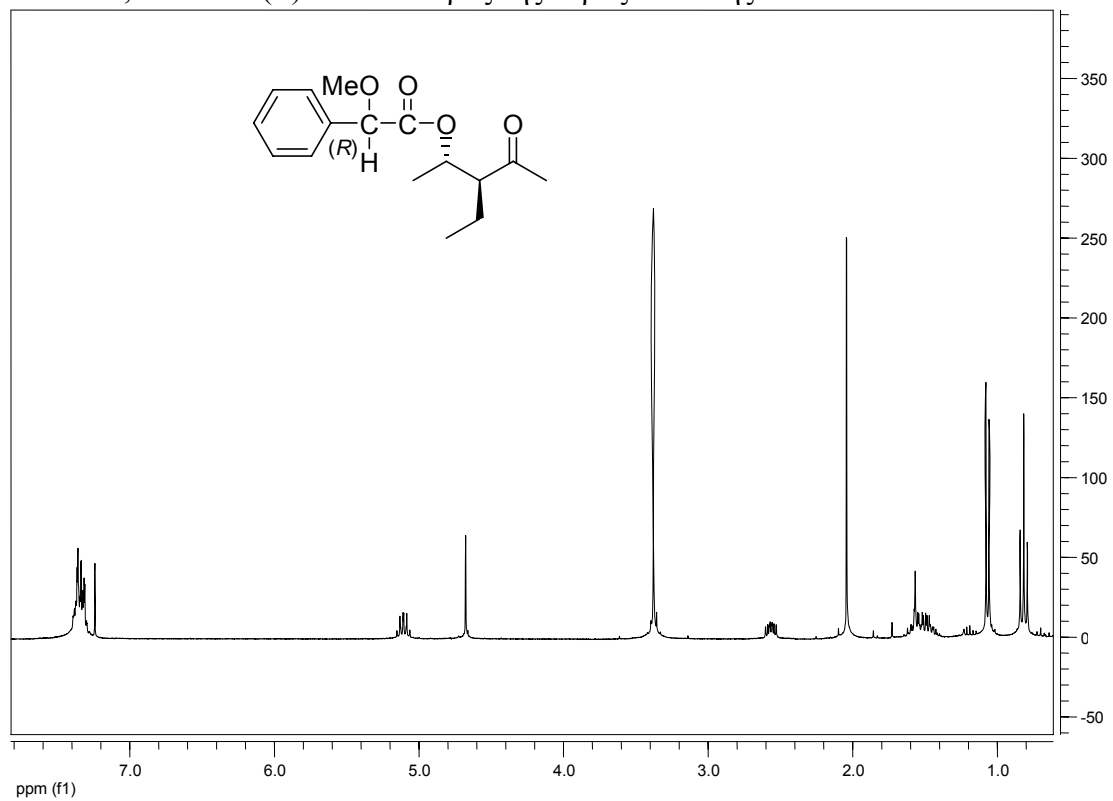
NMR 80

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **2a**



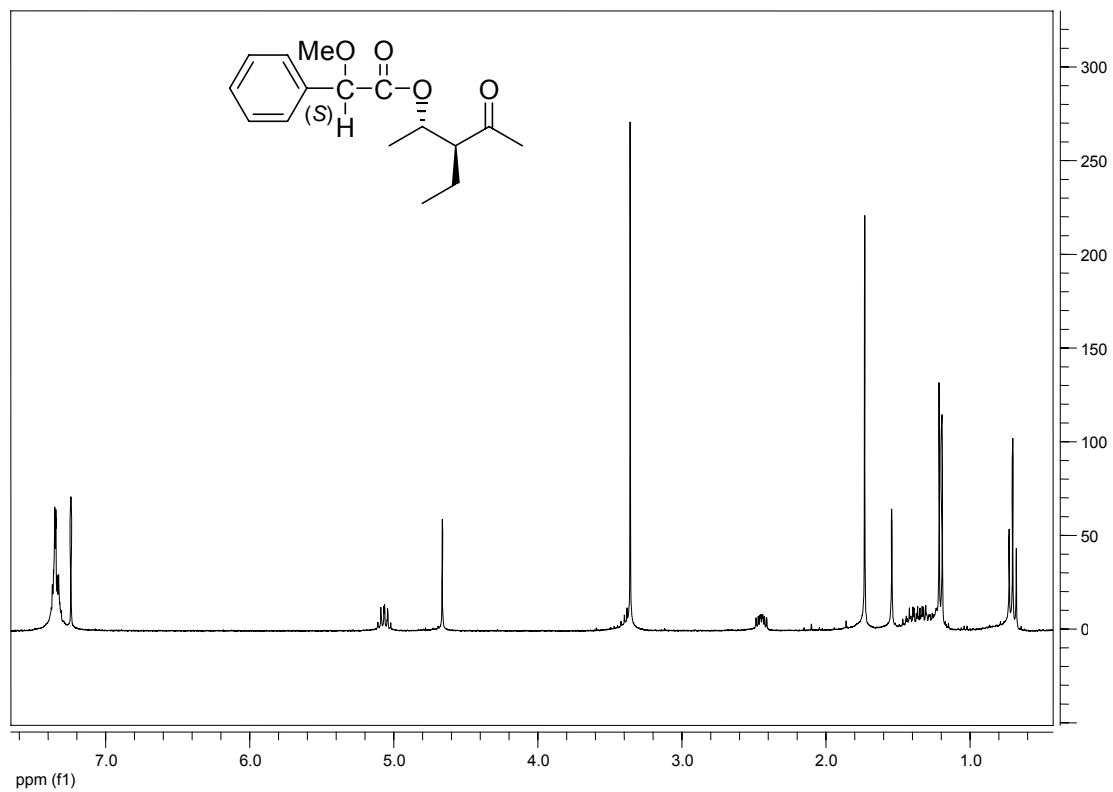
NMR 81

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **2b**



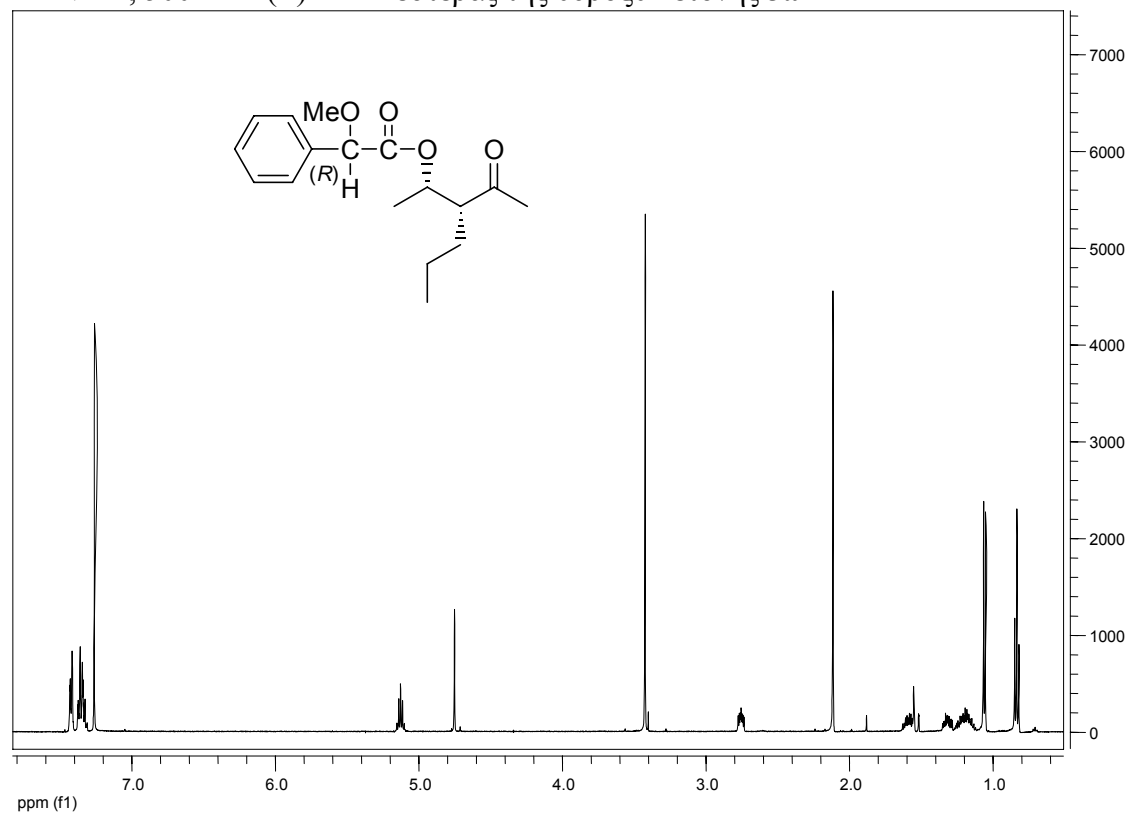
NMR 82

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **2b**



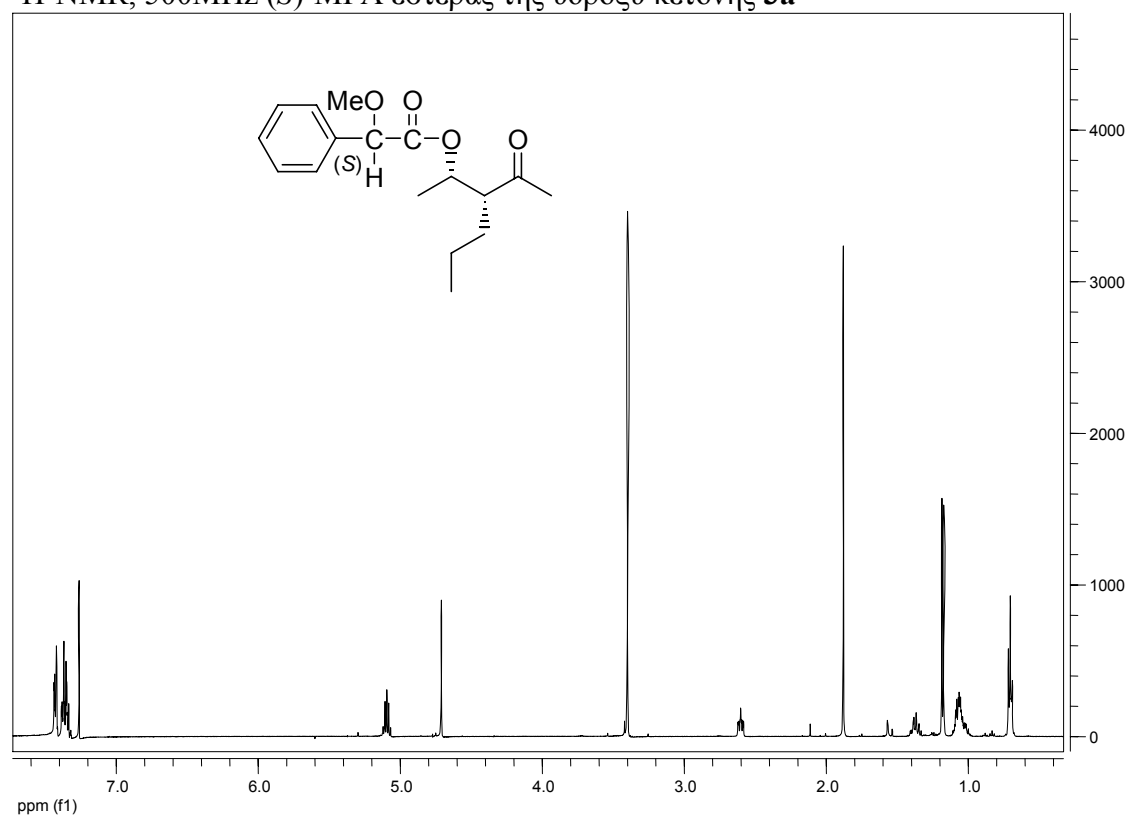
NMR 83

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **3a**



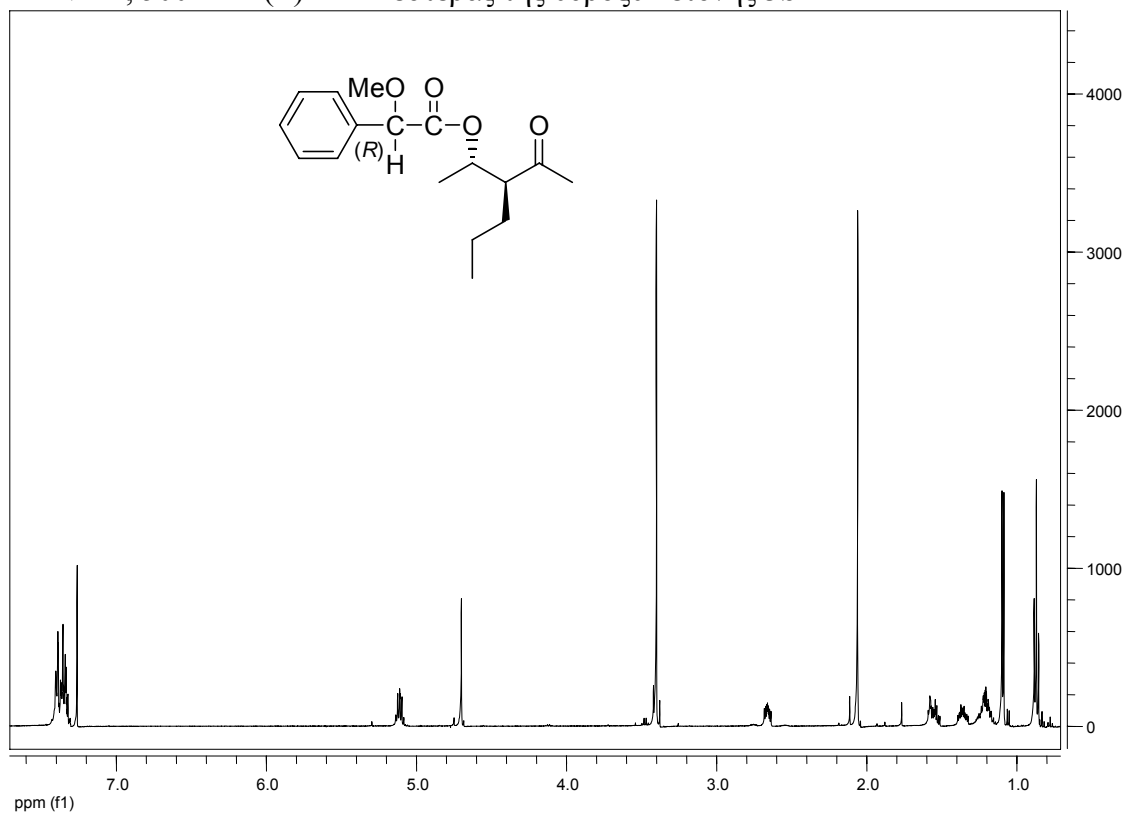
NMR 84

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **3a**



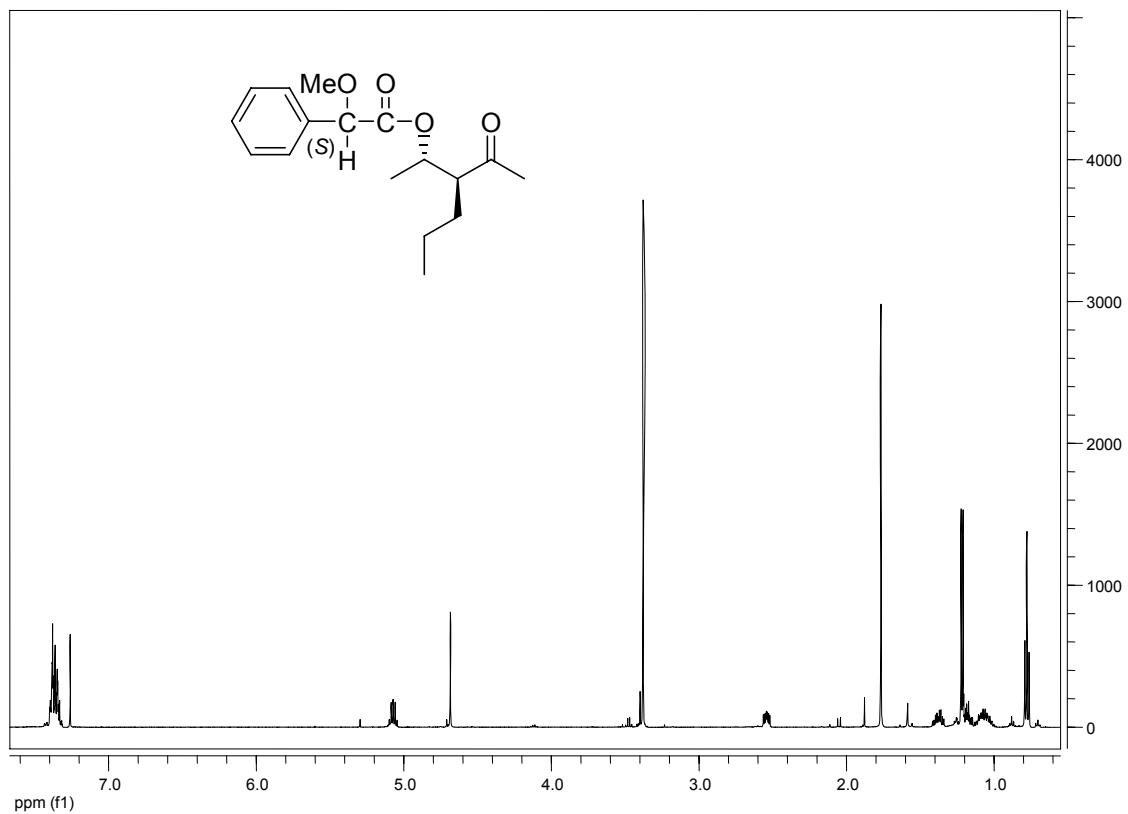
NMR 85

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **3b**



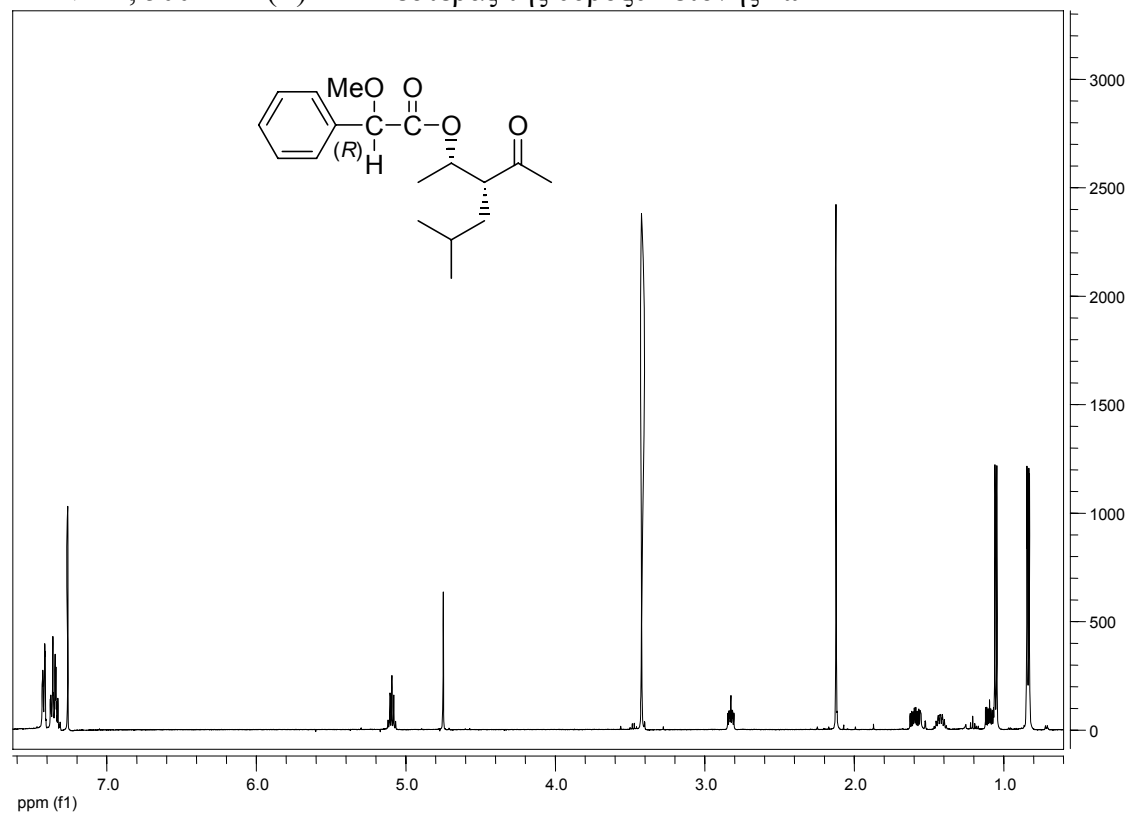
NMR 86

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **3b**



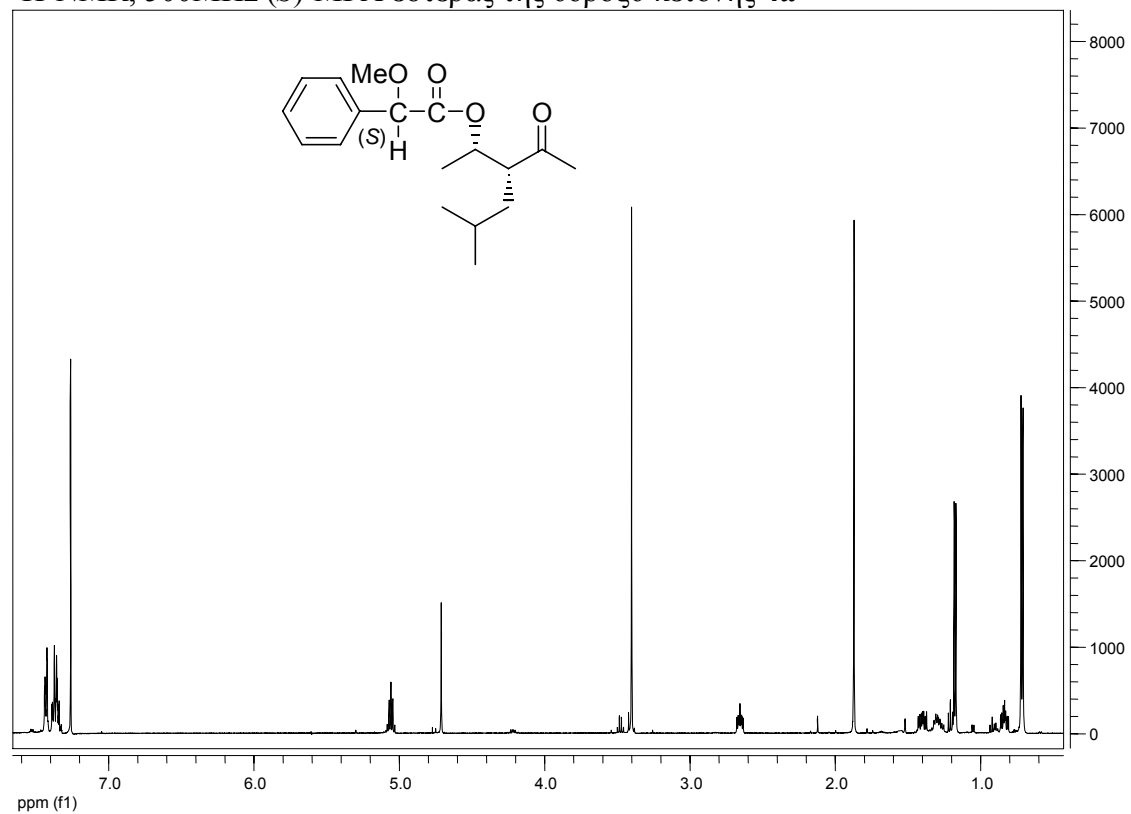
NMR 87

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **4a**



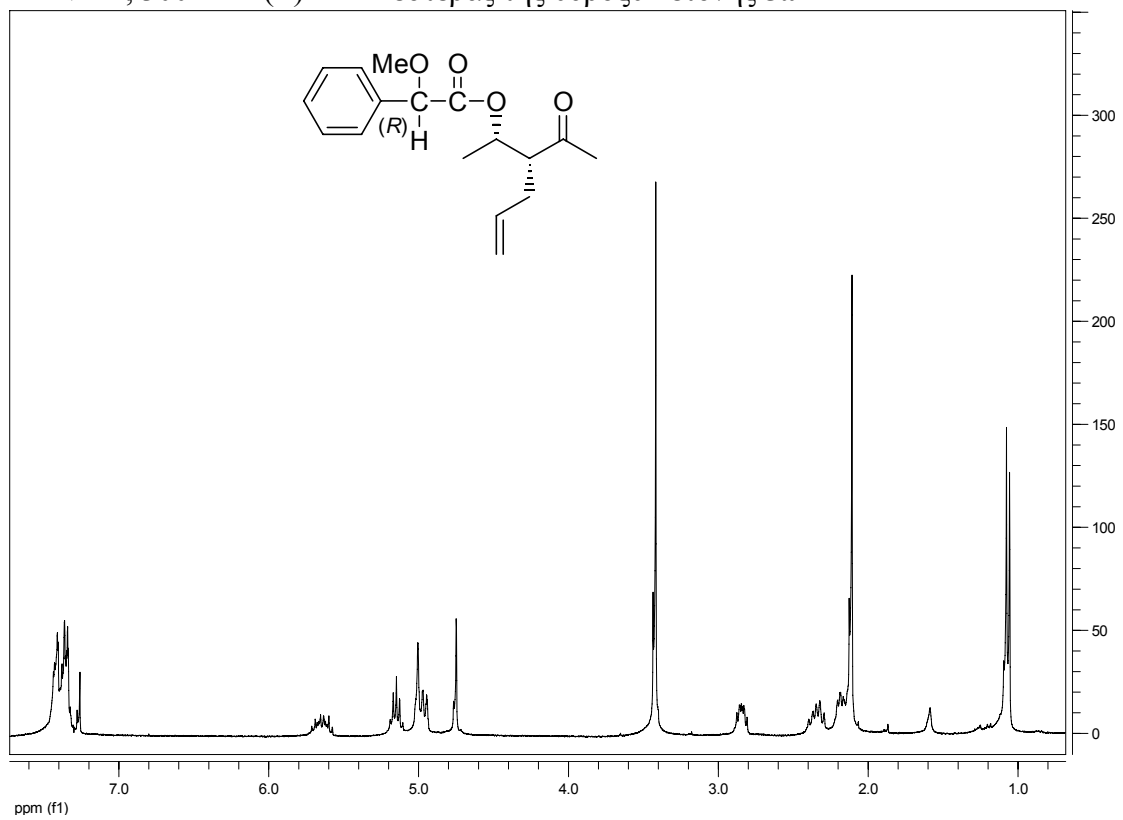
NMR 88

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **4a**



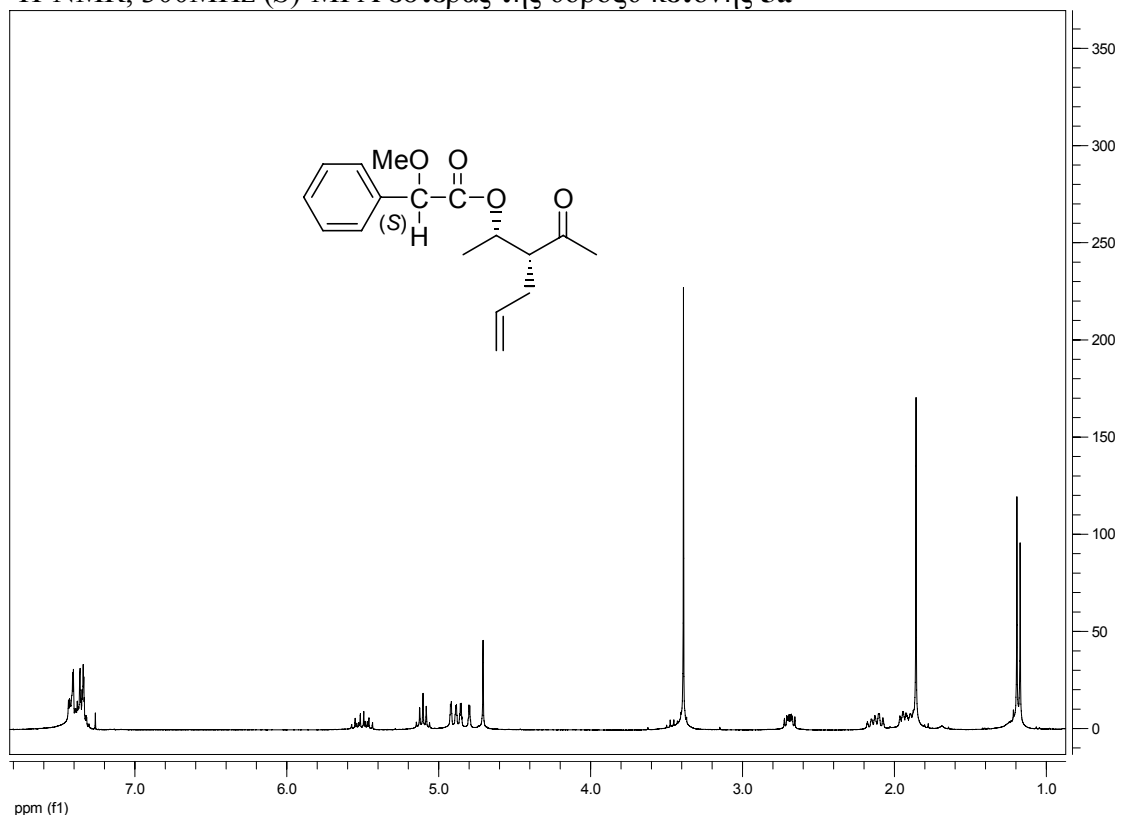
NMR 89

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **5a**



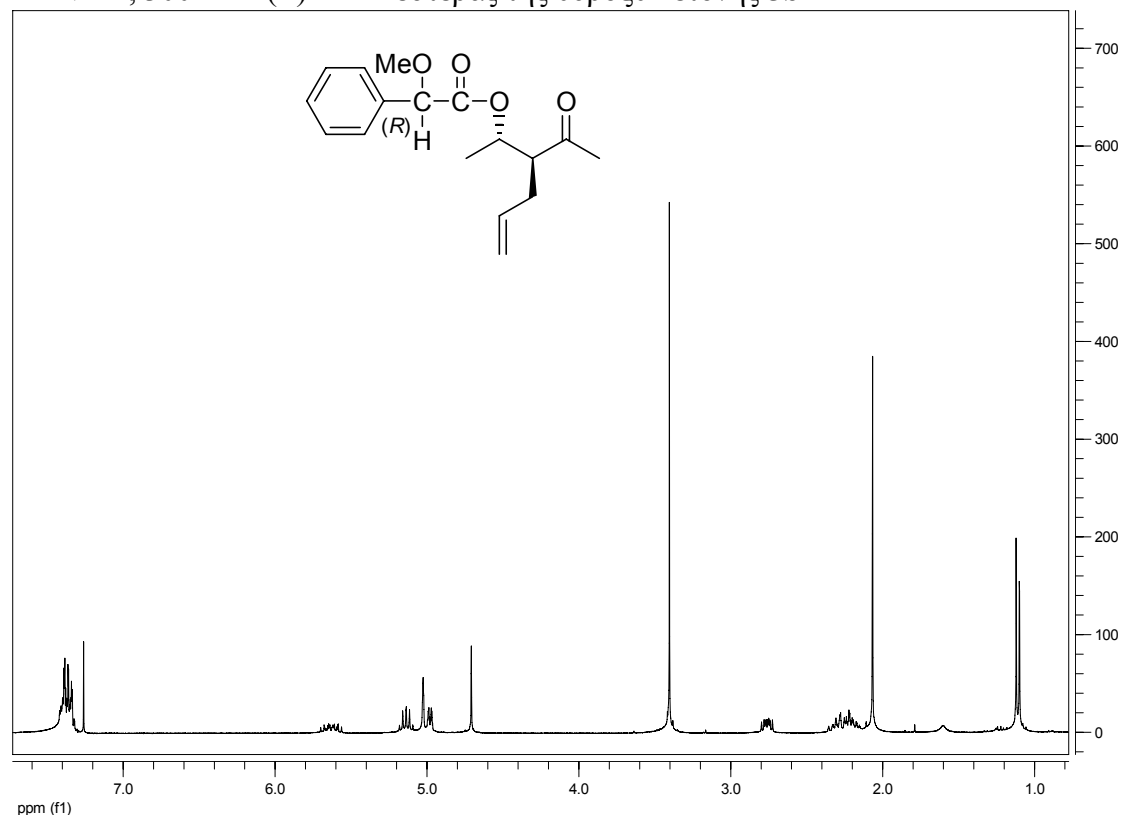
NMR 90

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **5a**



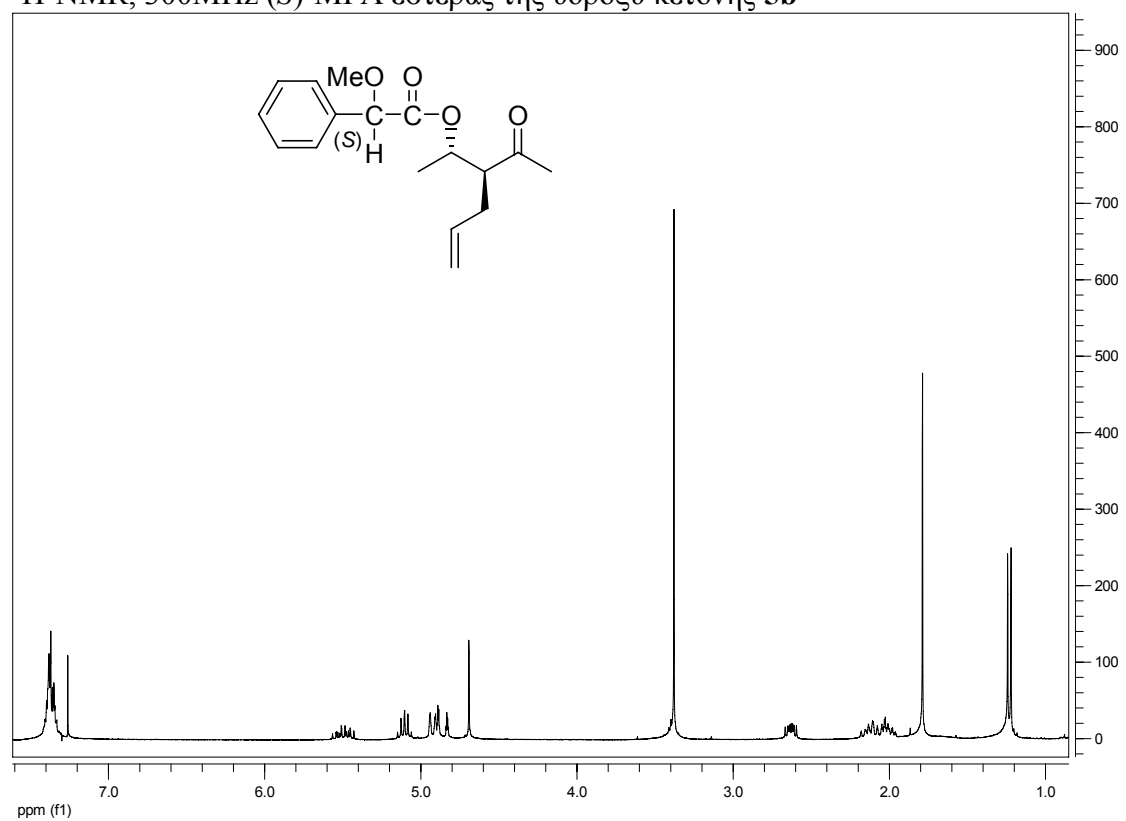
NMR 91

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **5b**



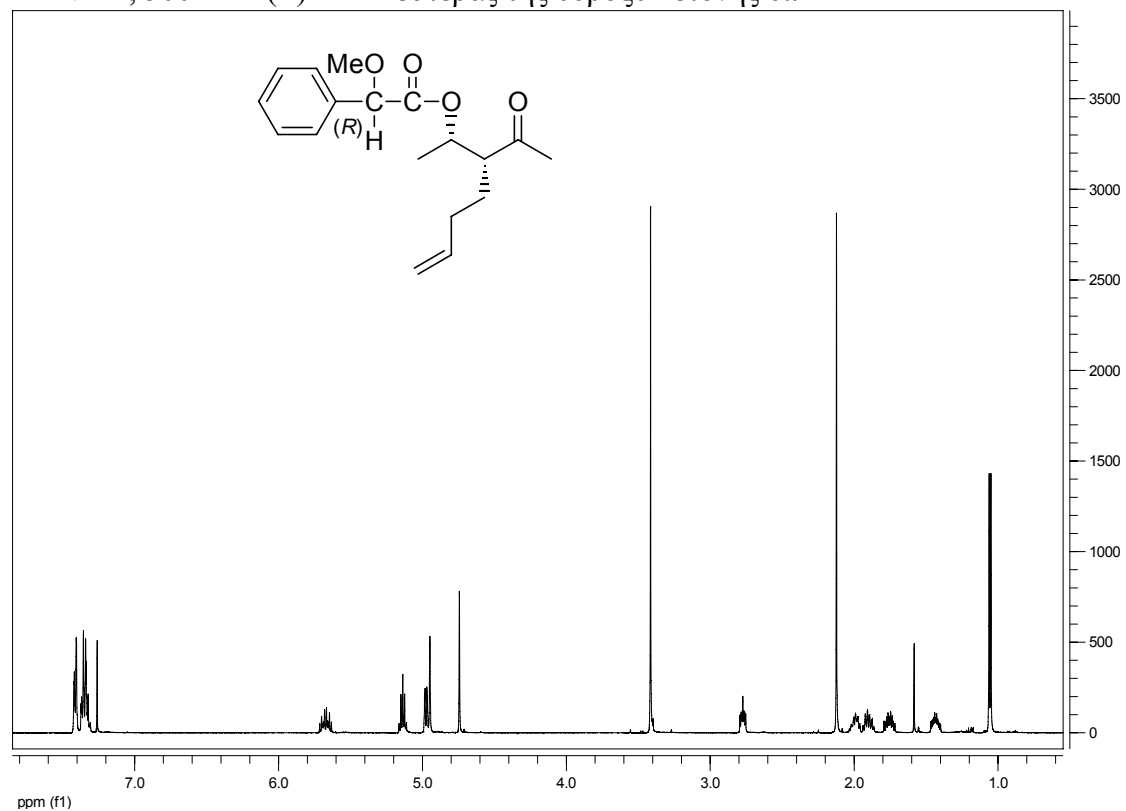
NMR 92

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **5b**



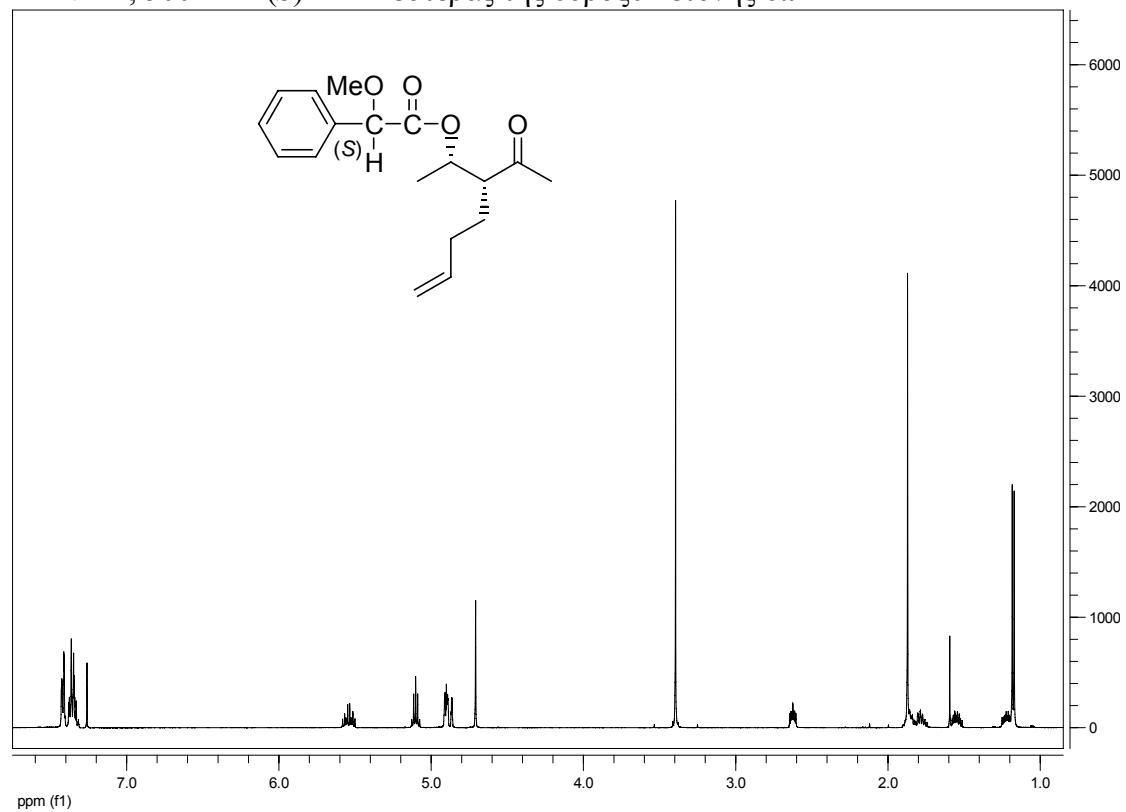
NMR 93

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **6a**



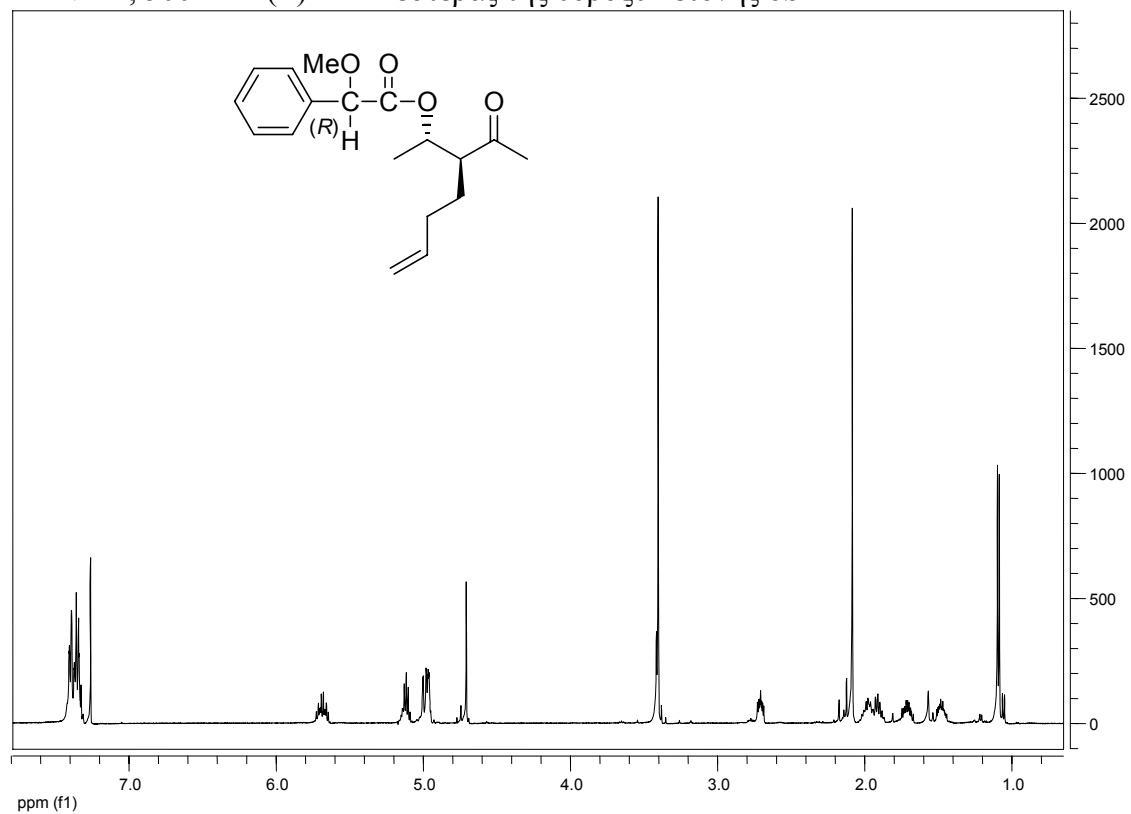
NMR 94

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **6a**



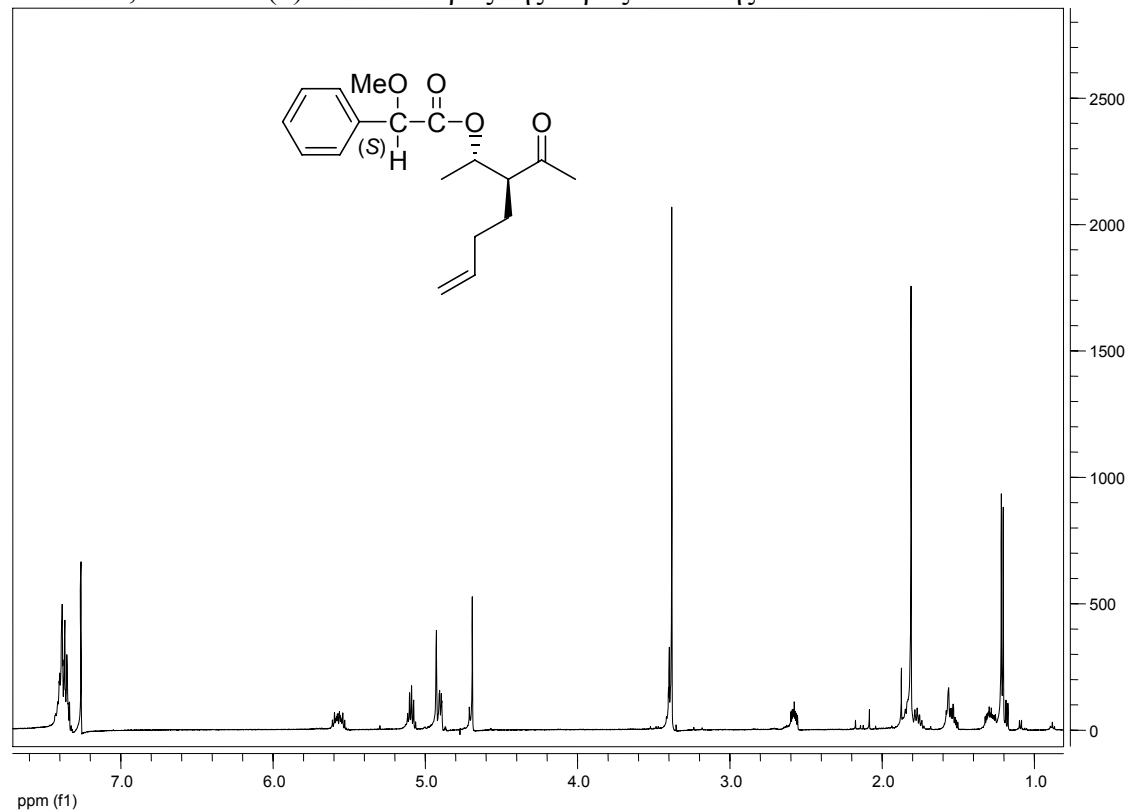
NMR 95

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **6b**



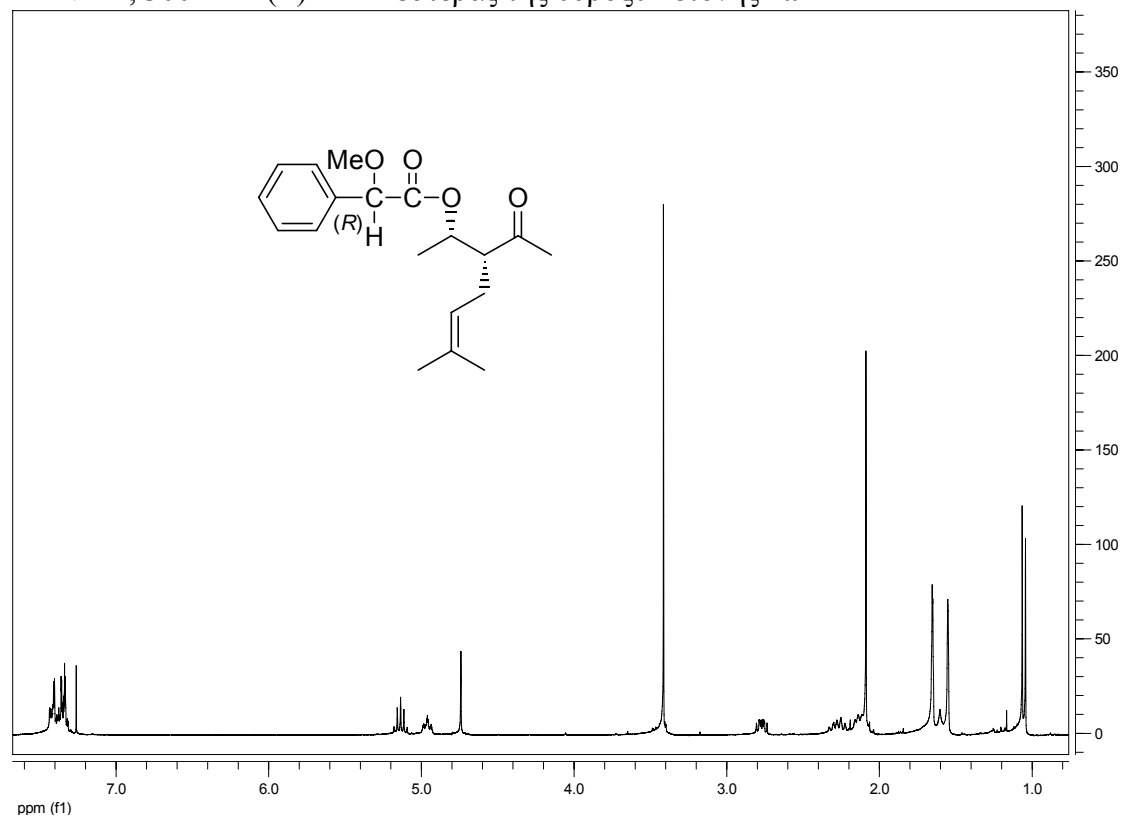
NMR 96

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **6b**



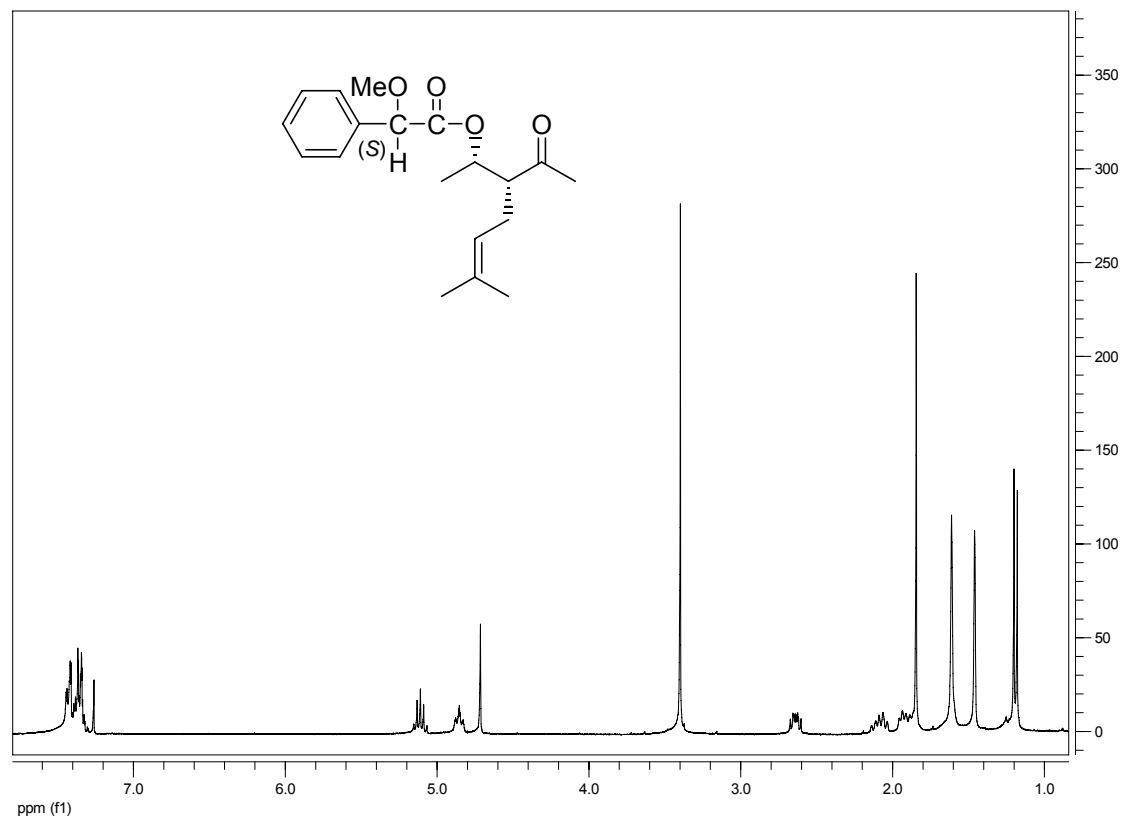
NMR 97

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **7a**



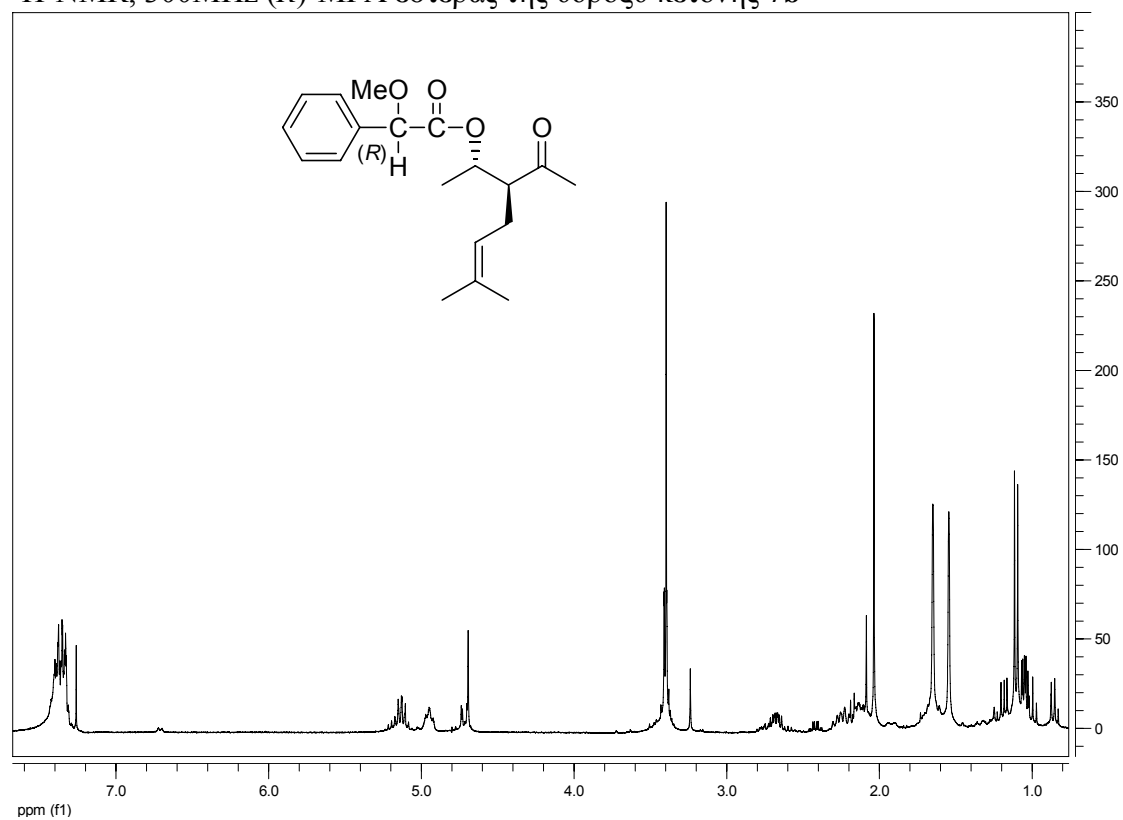
NMR 98

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **7a**



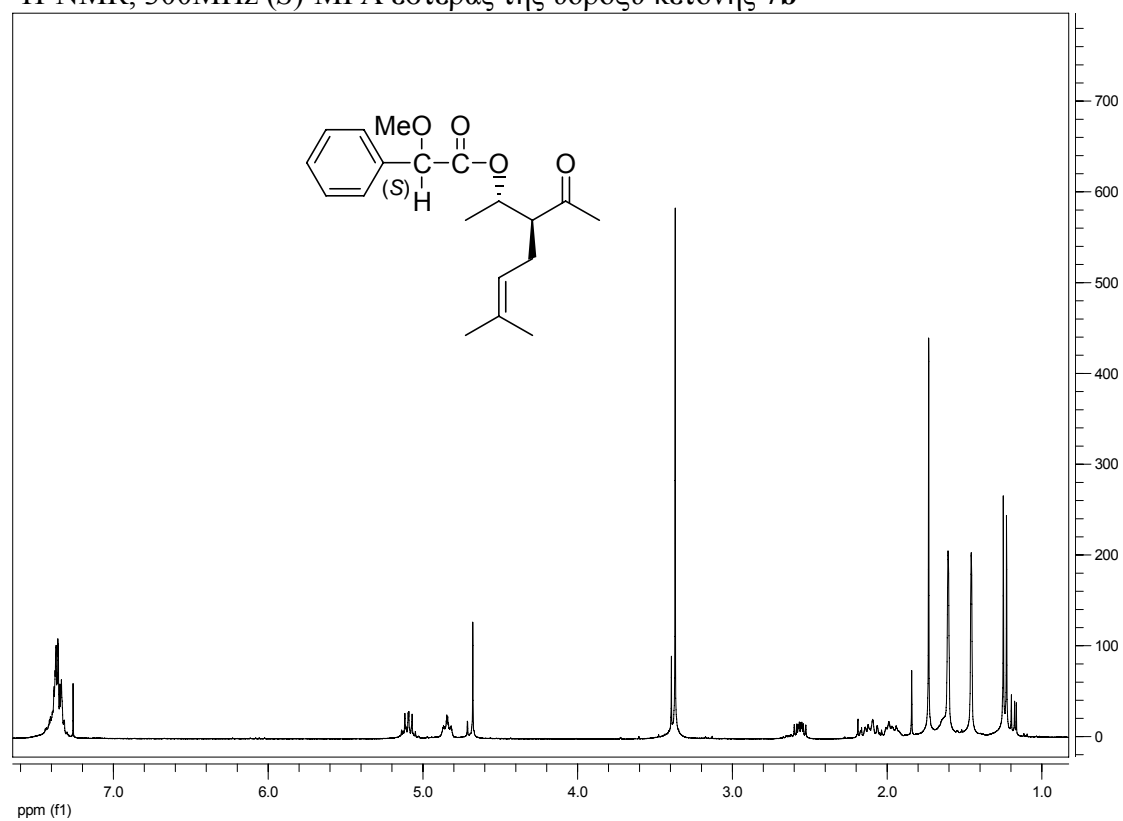
NMR 99

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **7b**



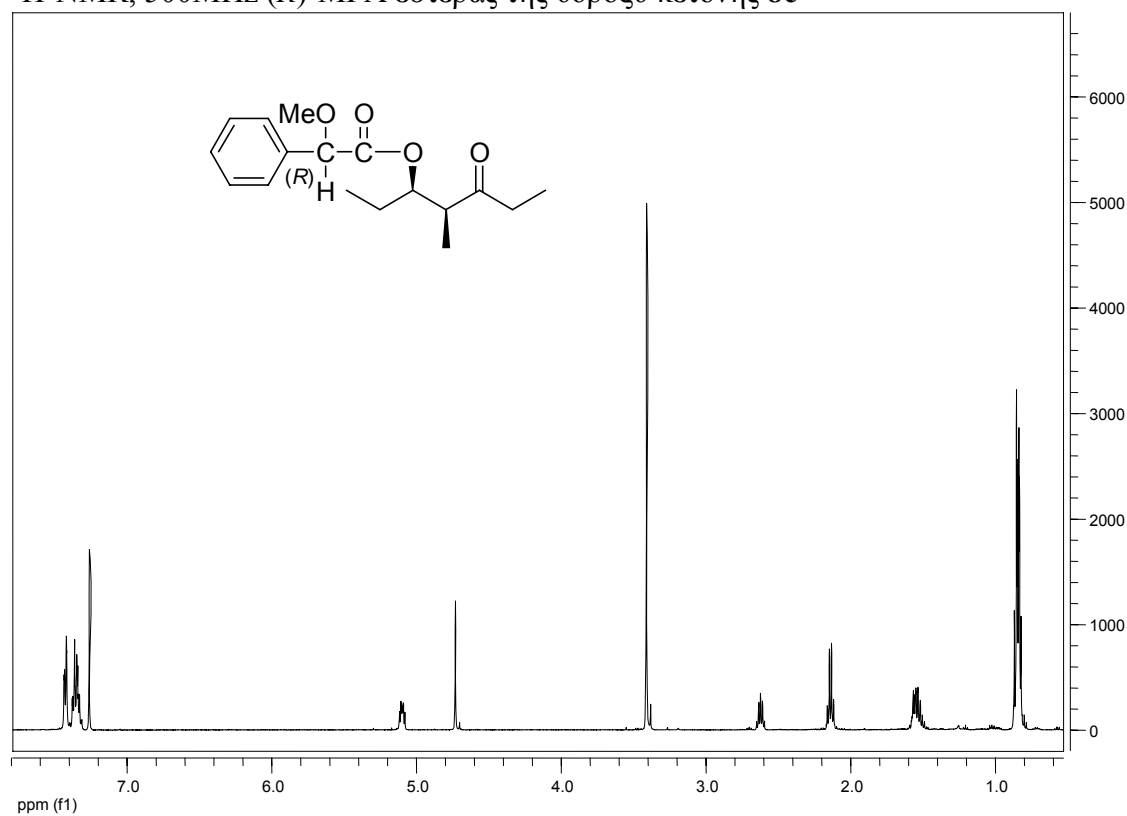
NMR 100

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **7b**



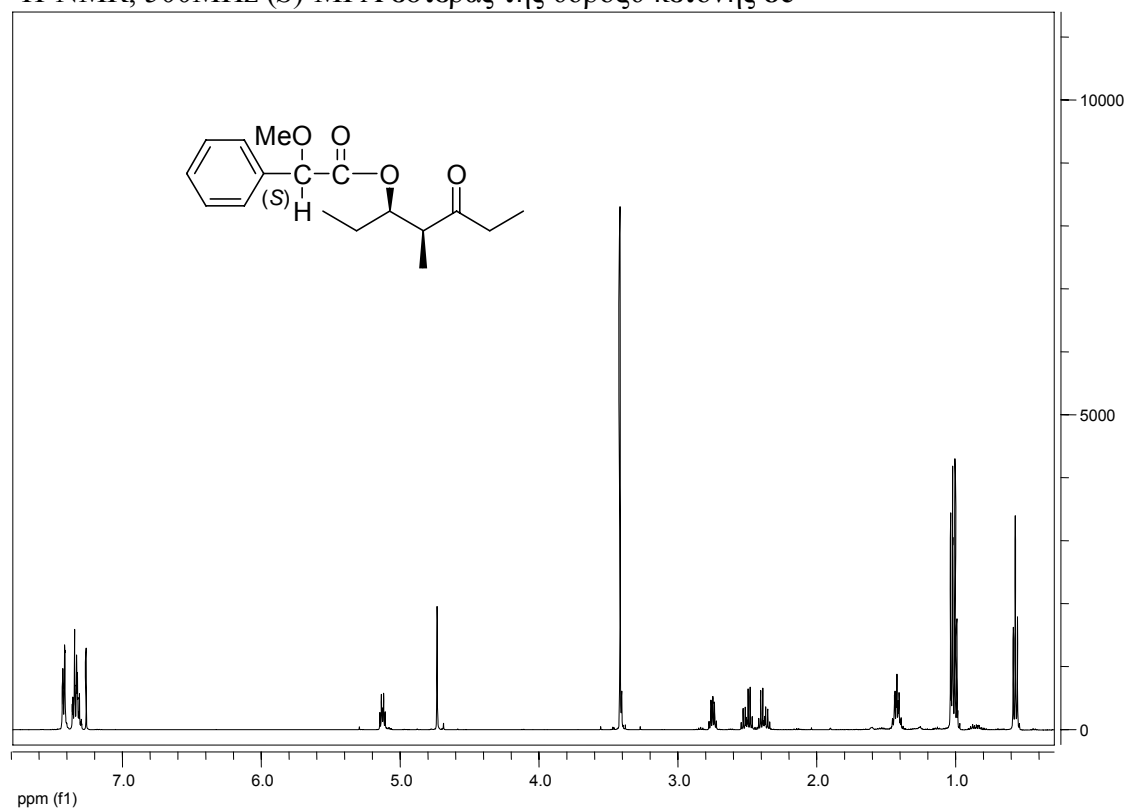
NMR 101

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **8c**



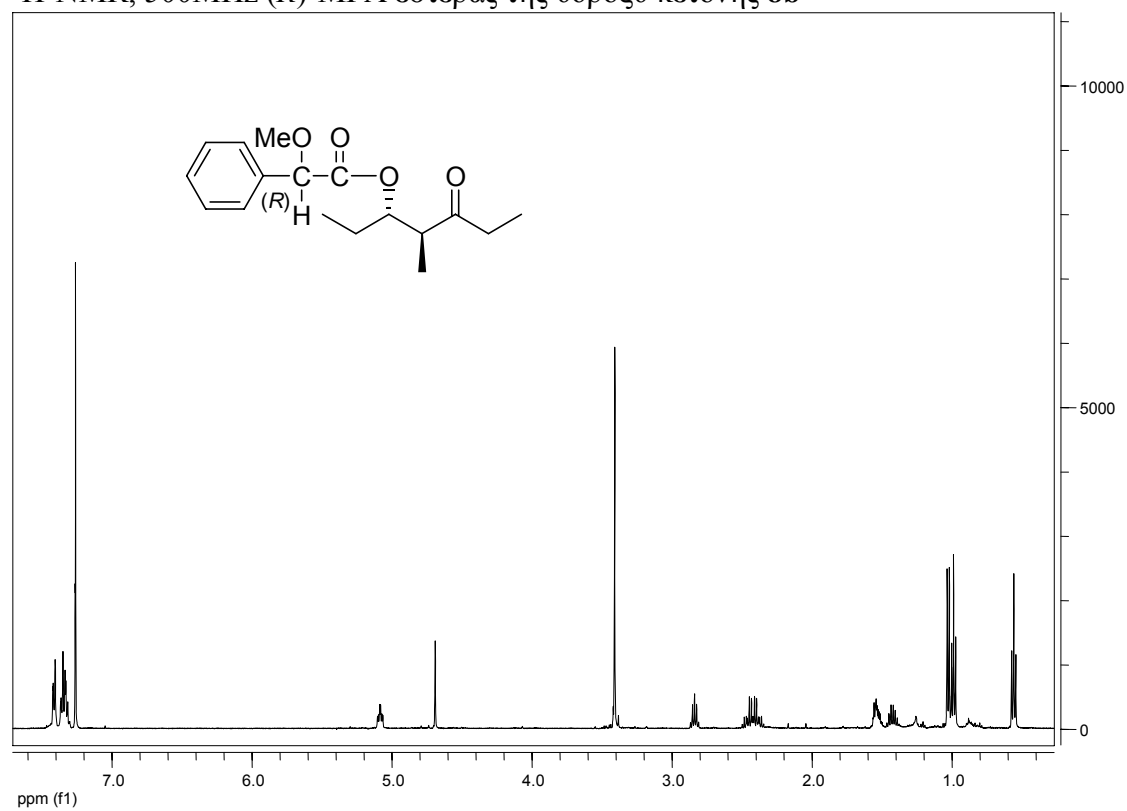
NMR 102

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **8c**



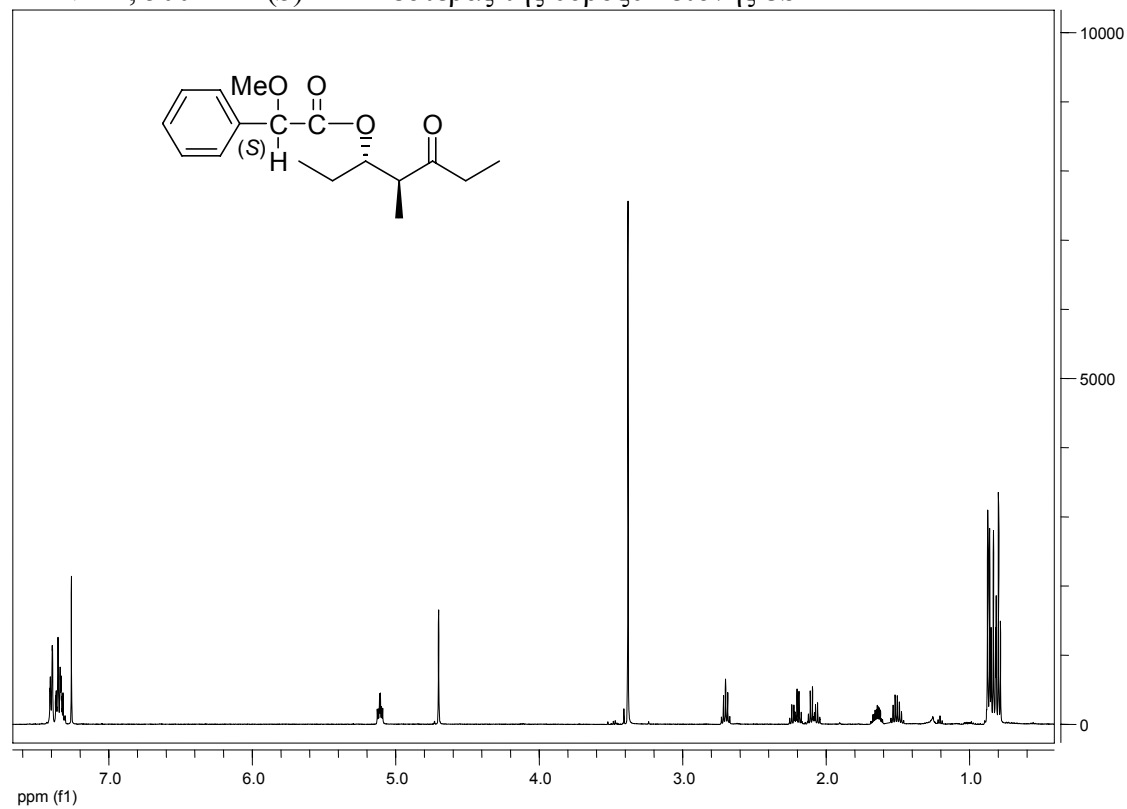
NMR 103

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **8b**



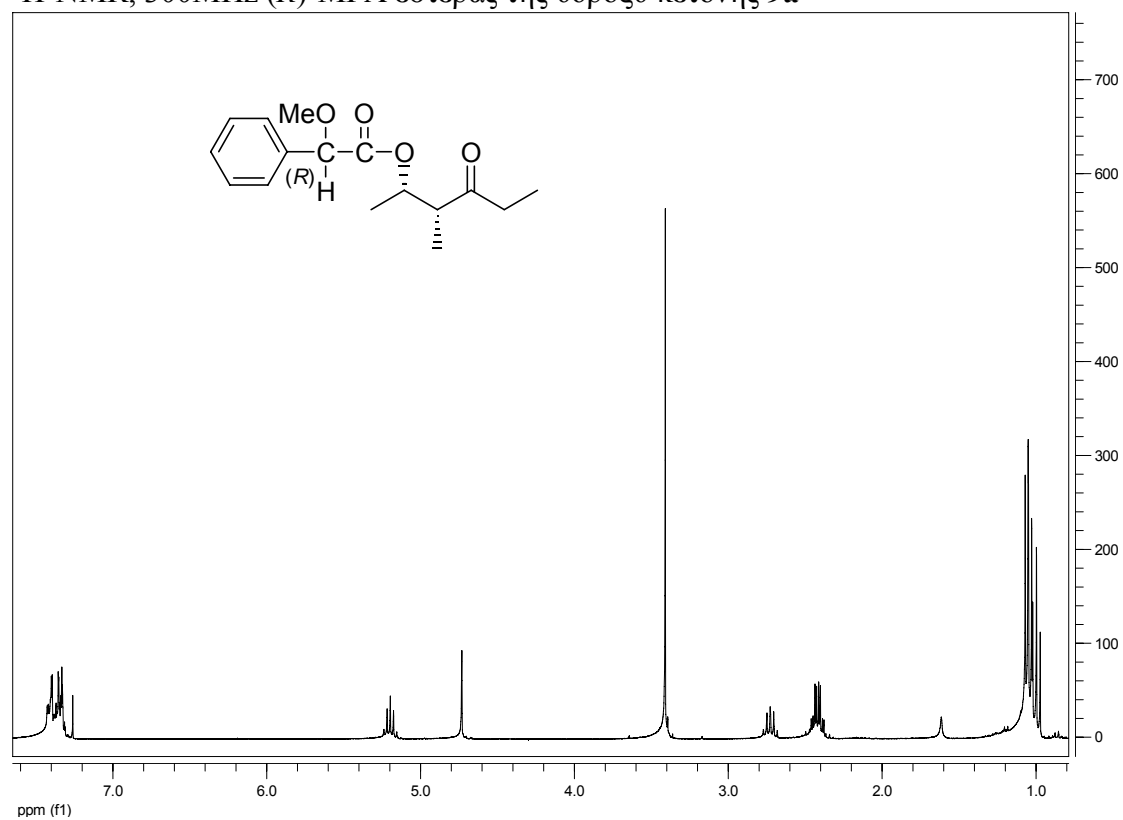
NMR 104

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **8b**



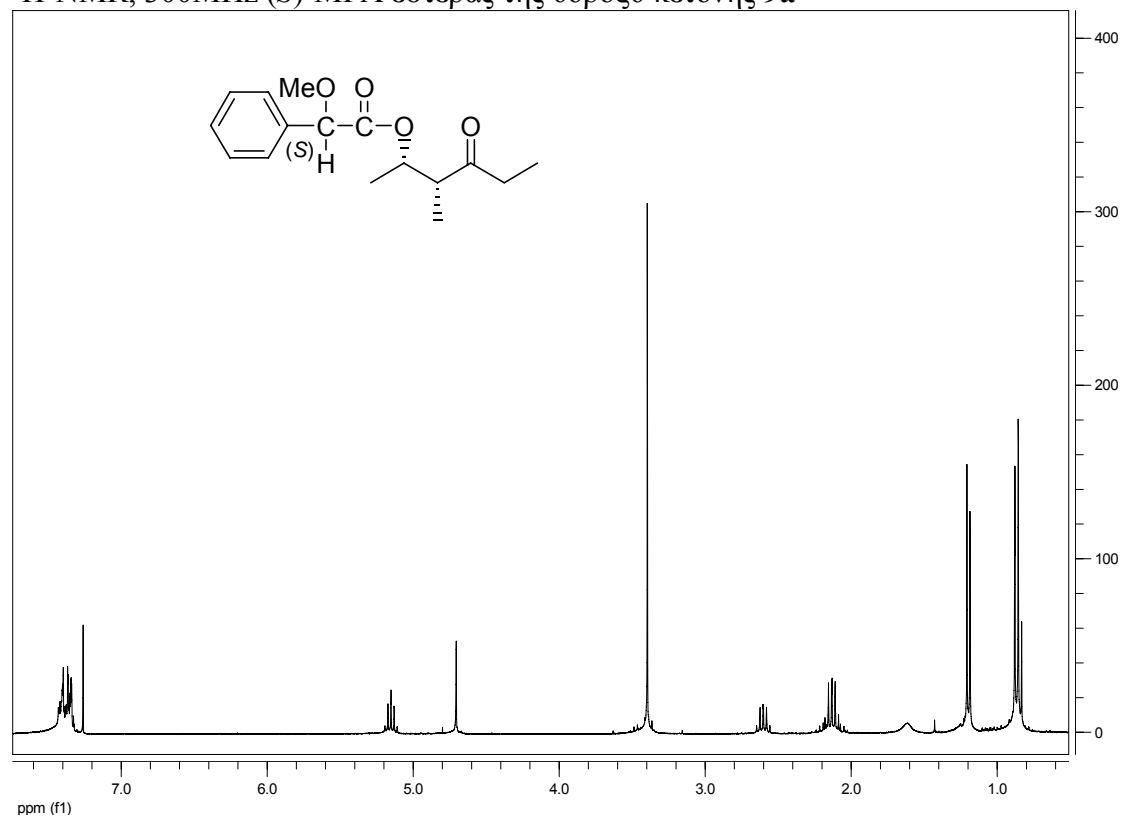
NMR 105

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **9a**



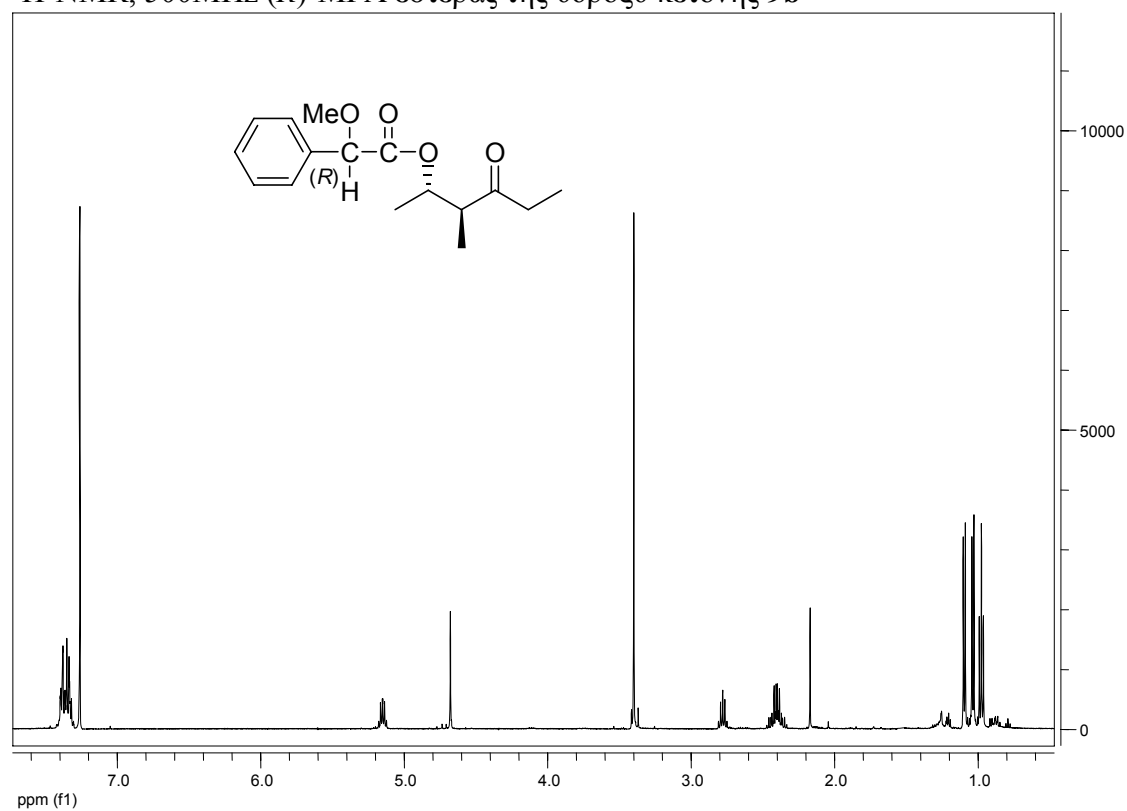
NMR 106

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **9a**



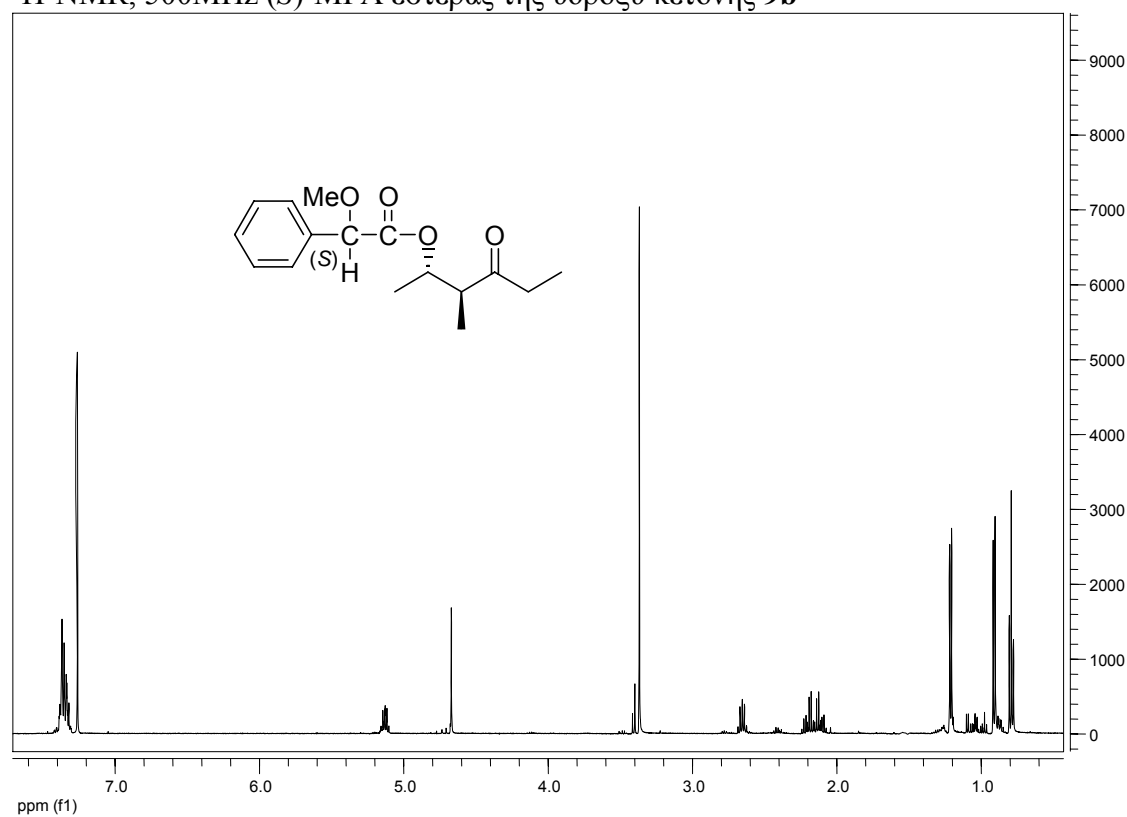
NMR 107

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **9b**



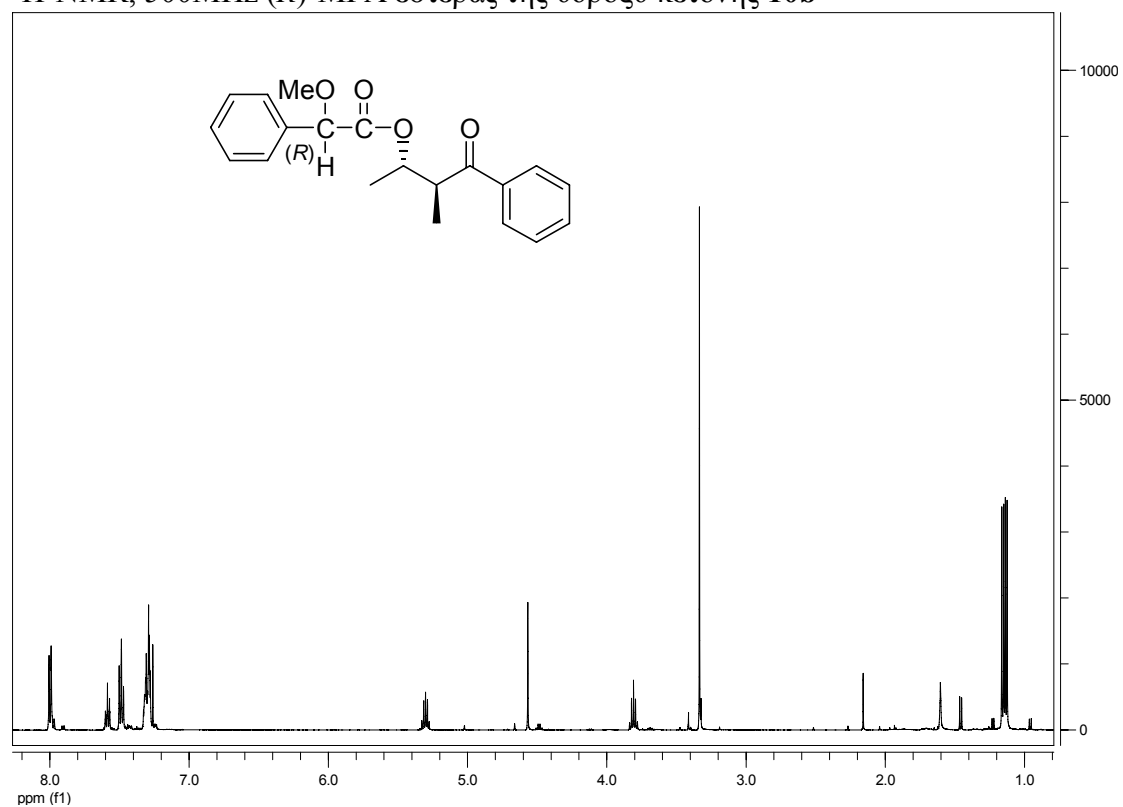
NMR 108

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **9b**



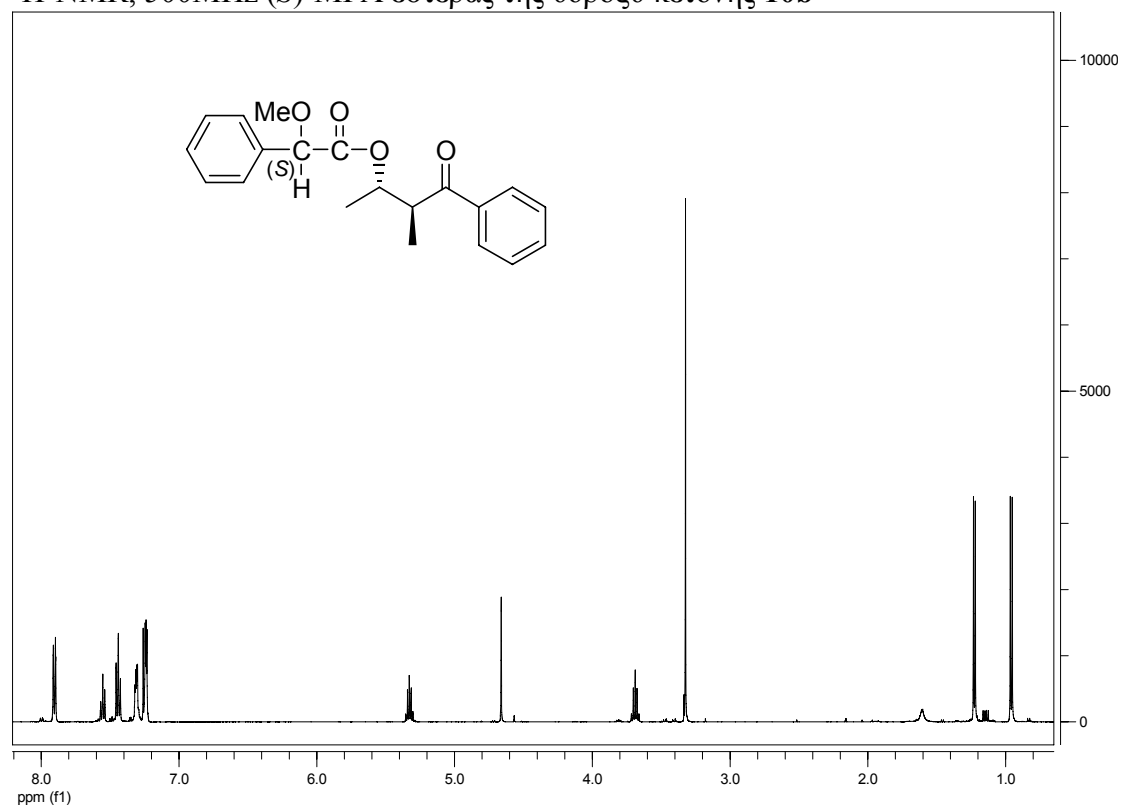
NMR 109

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **10b**



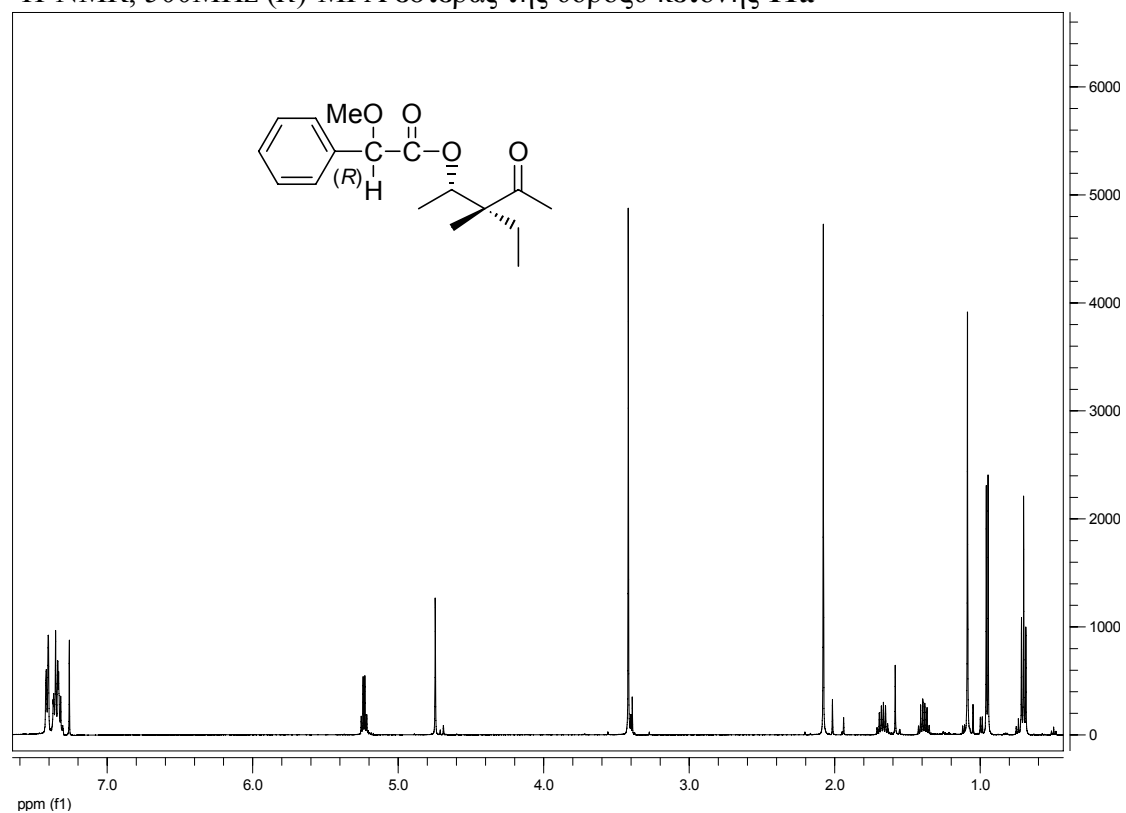
NMR 110

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **10b**



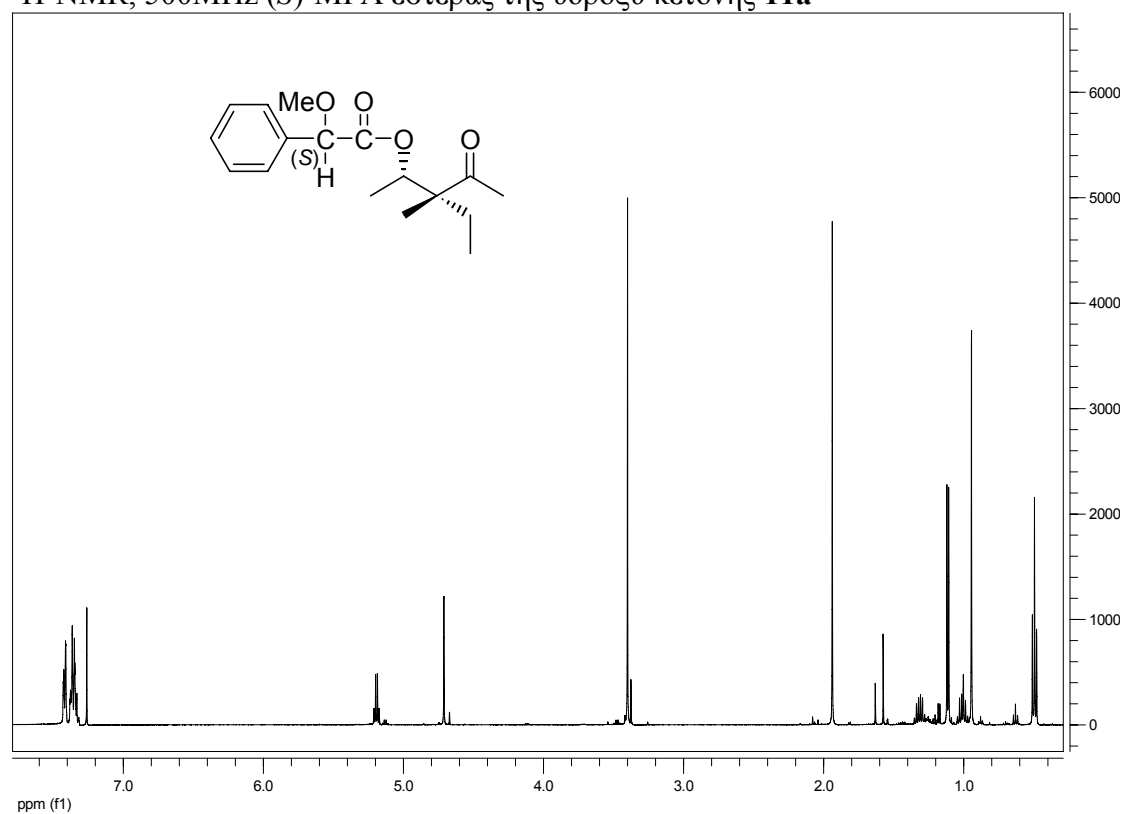
NMR 111

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **11a**



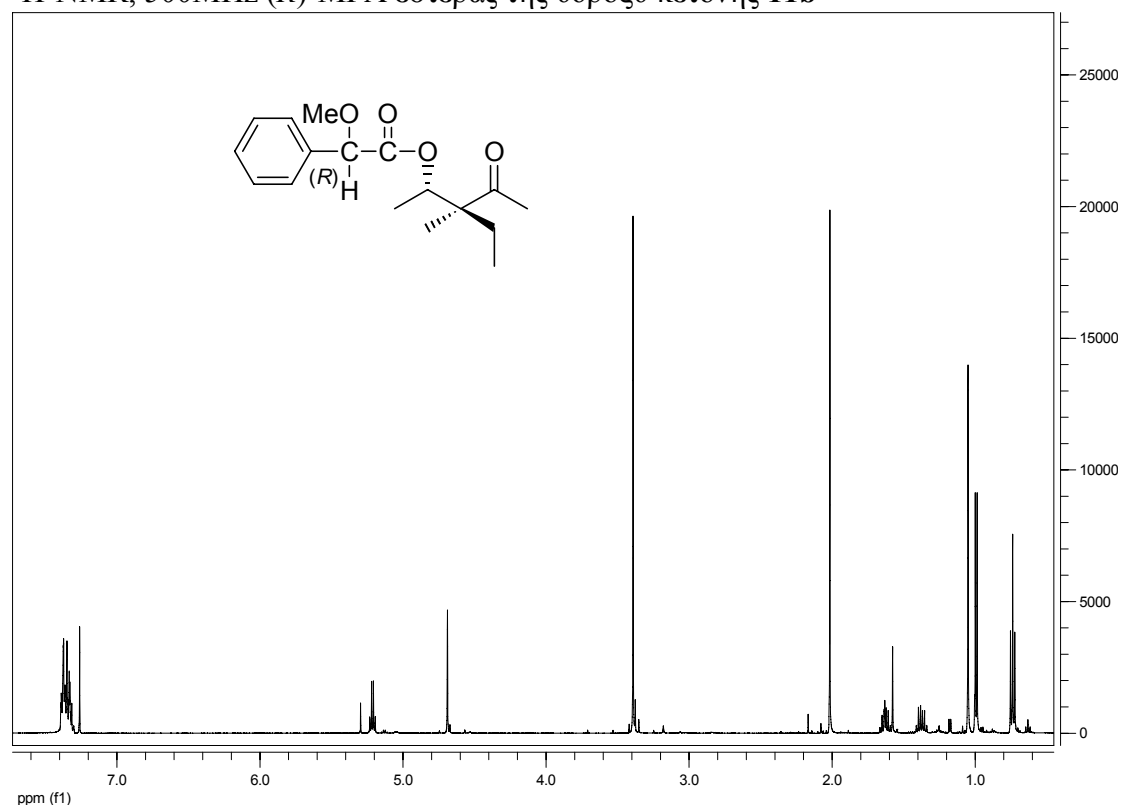
NMR 112

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **11a**



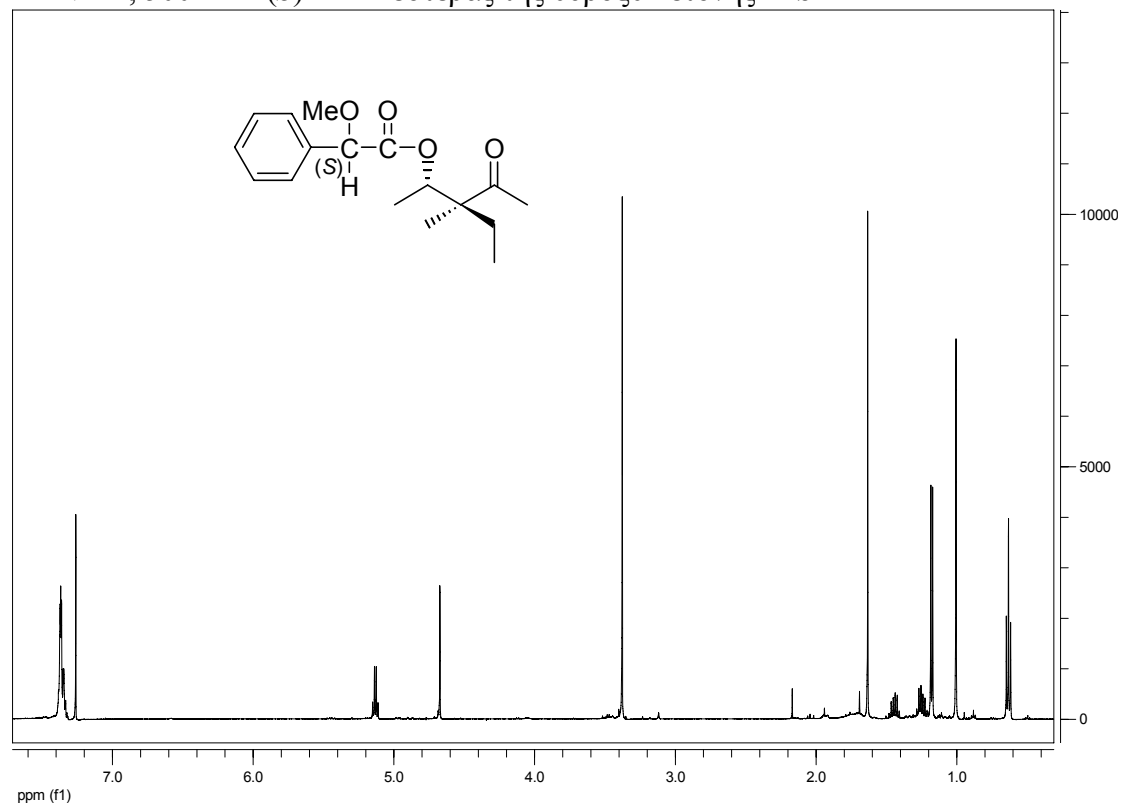
NMR 113

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **11b**



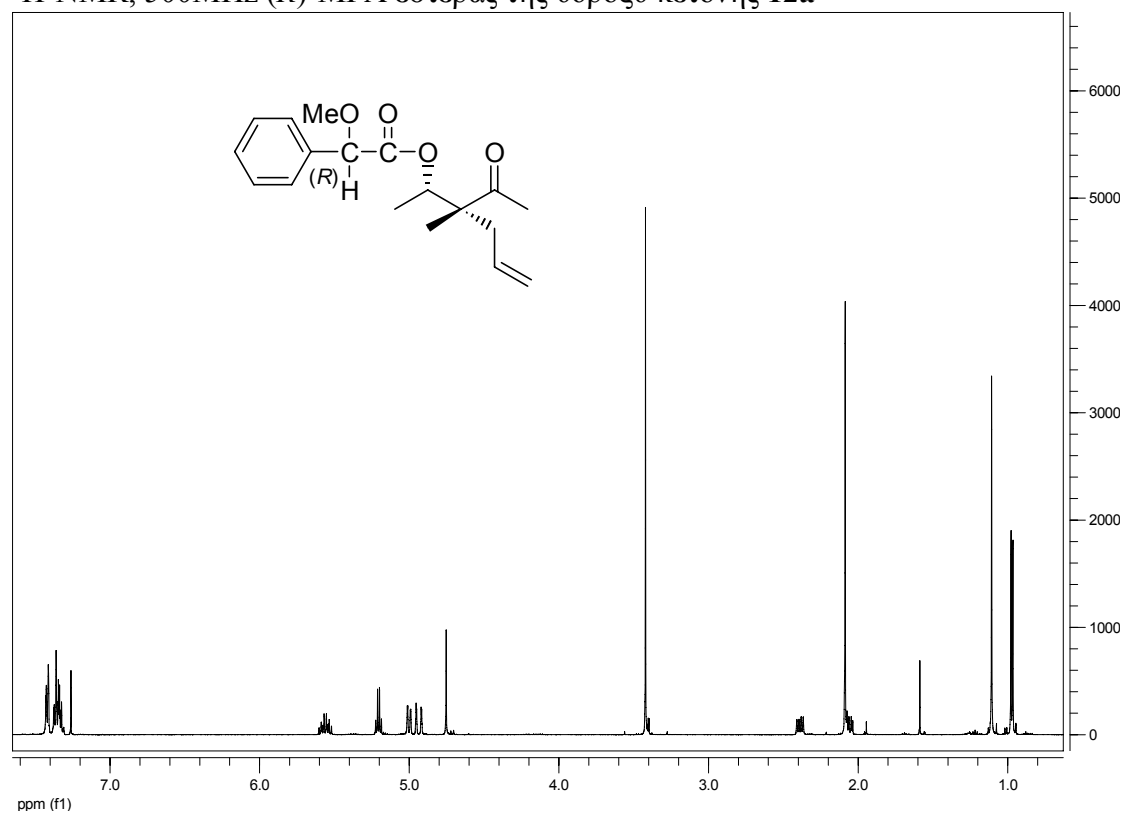
NMR 114

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **11b**



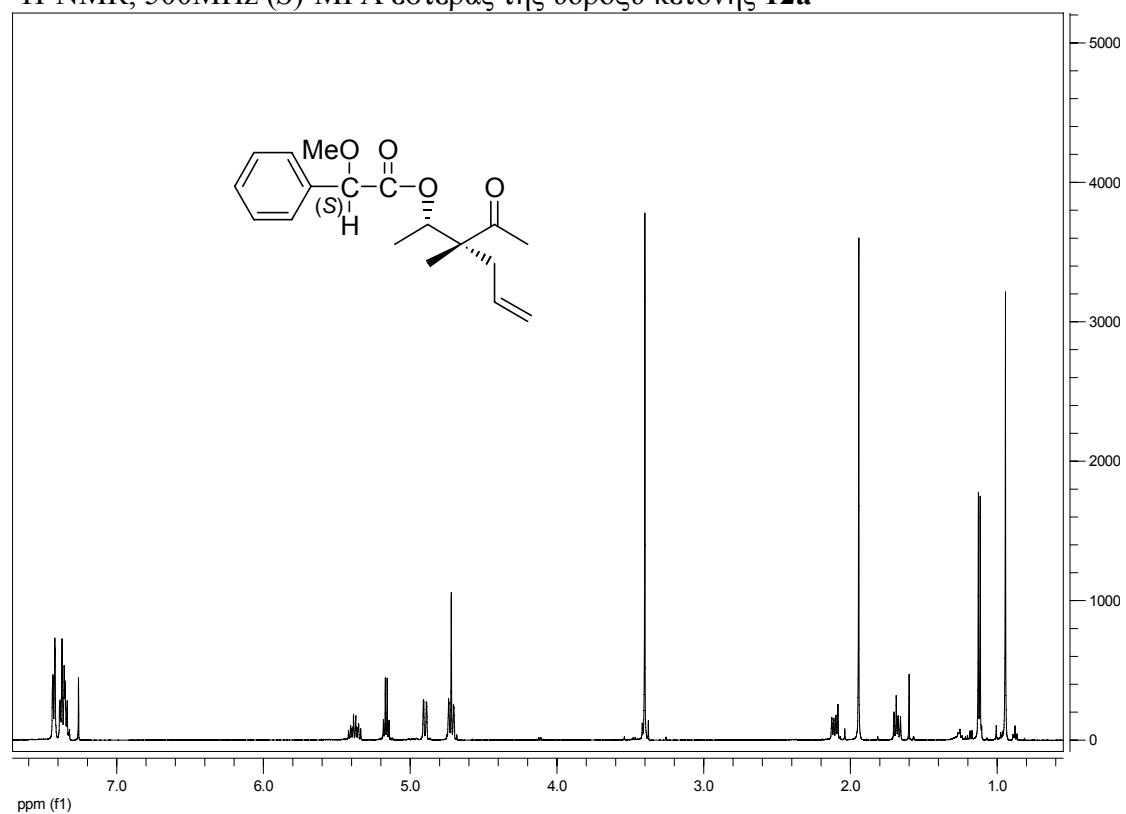
NMR 115

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **12a**



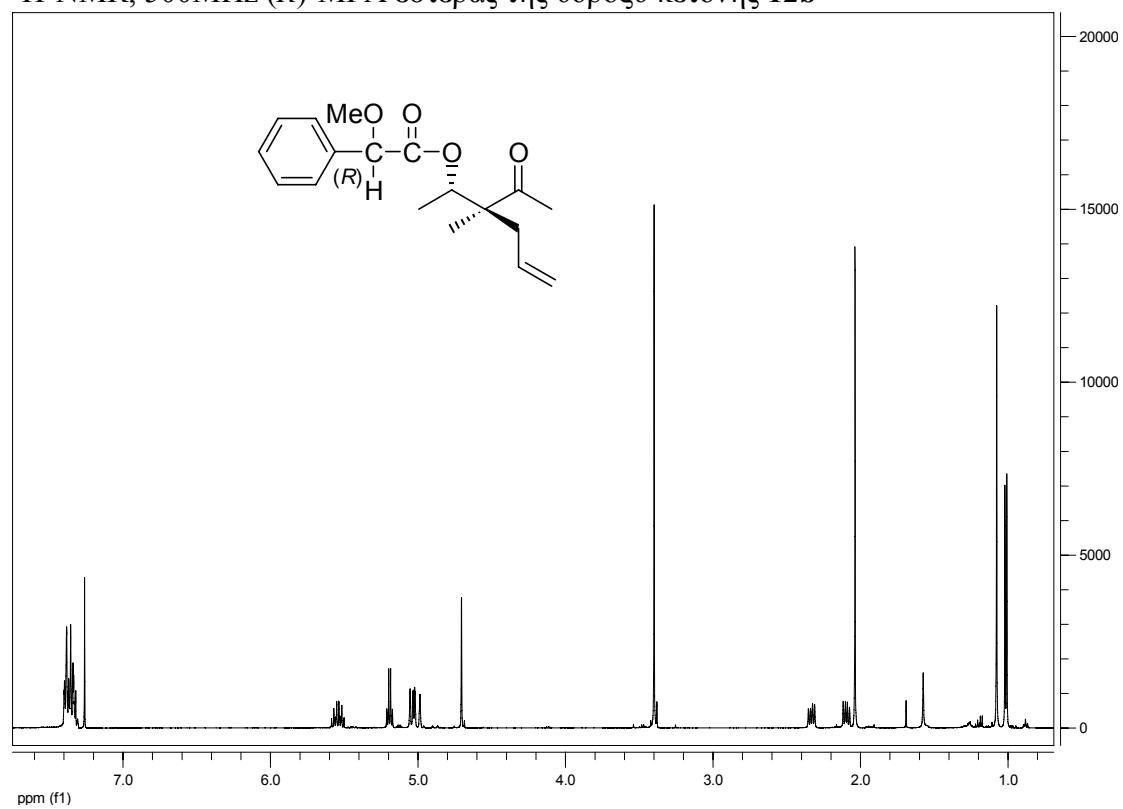
NMR 116

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **12a**



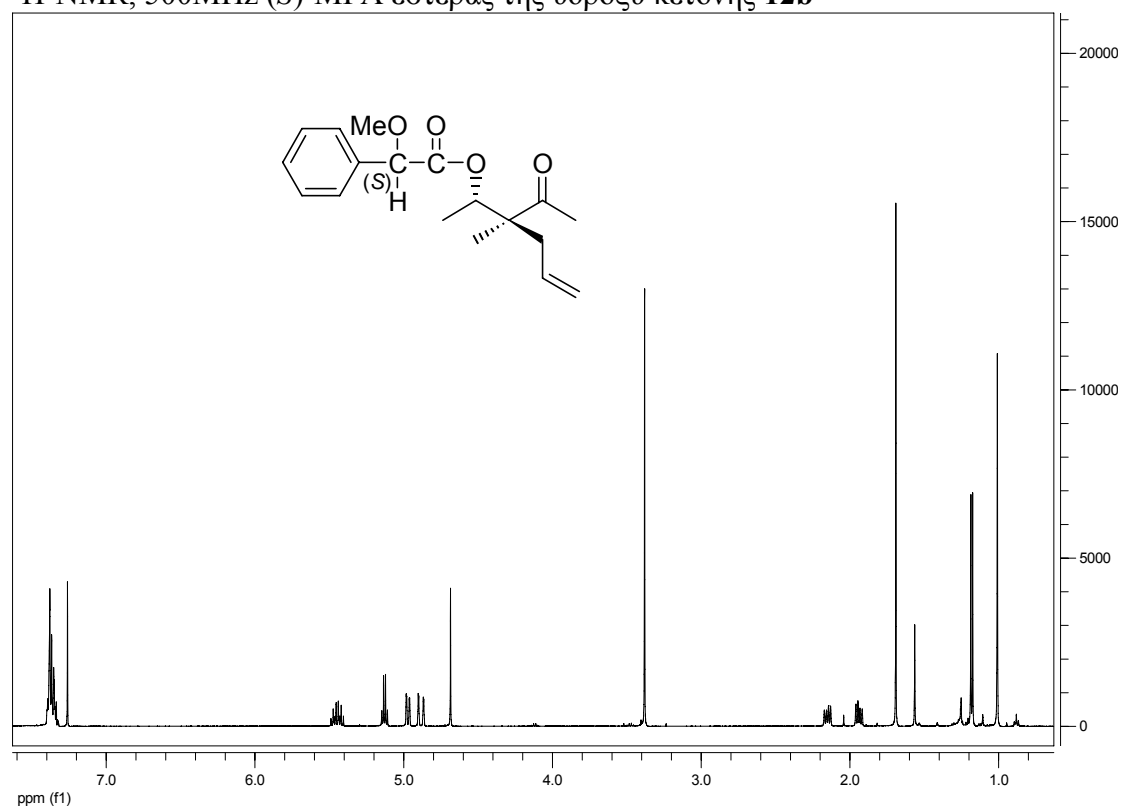
NMR 117

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **12b**



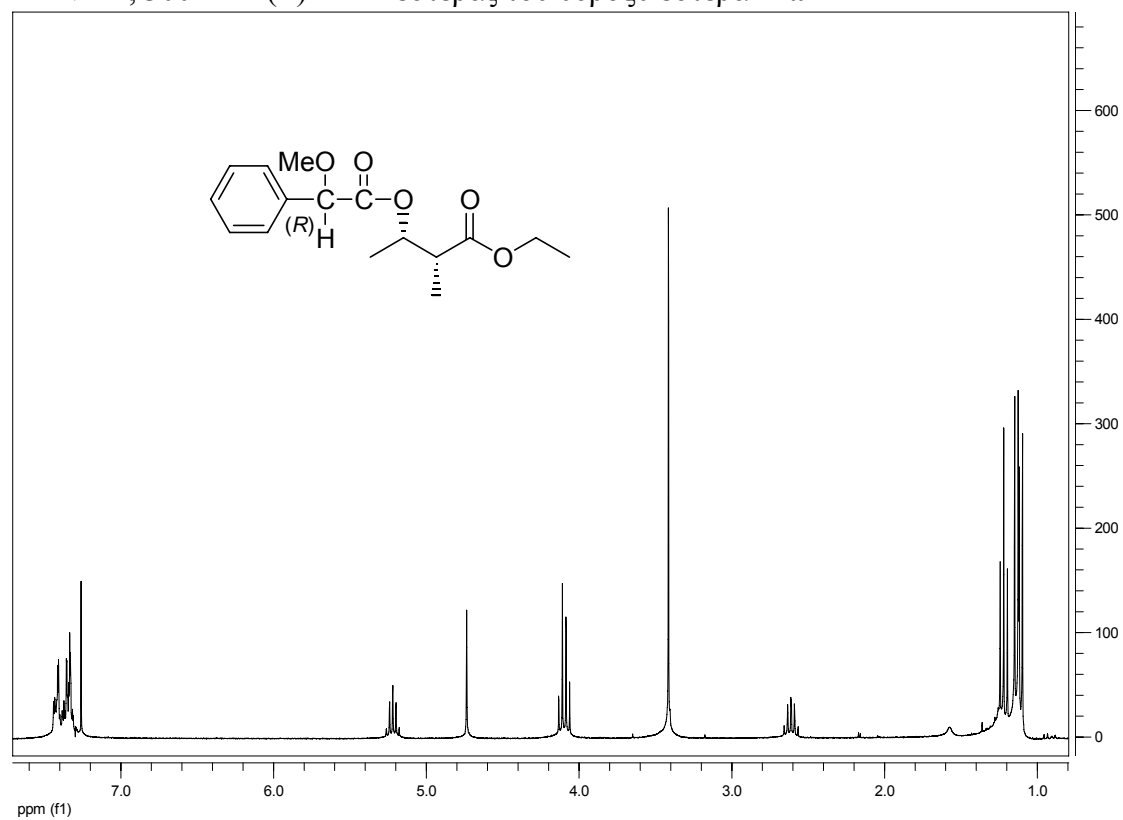
NMR 118

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας της υδροξυ κετόνης **12b**



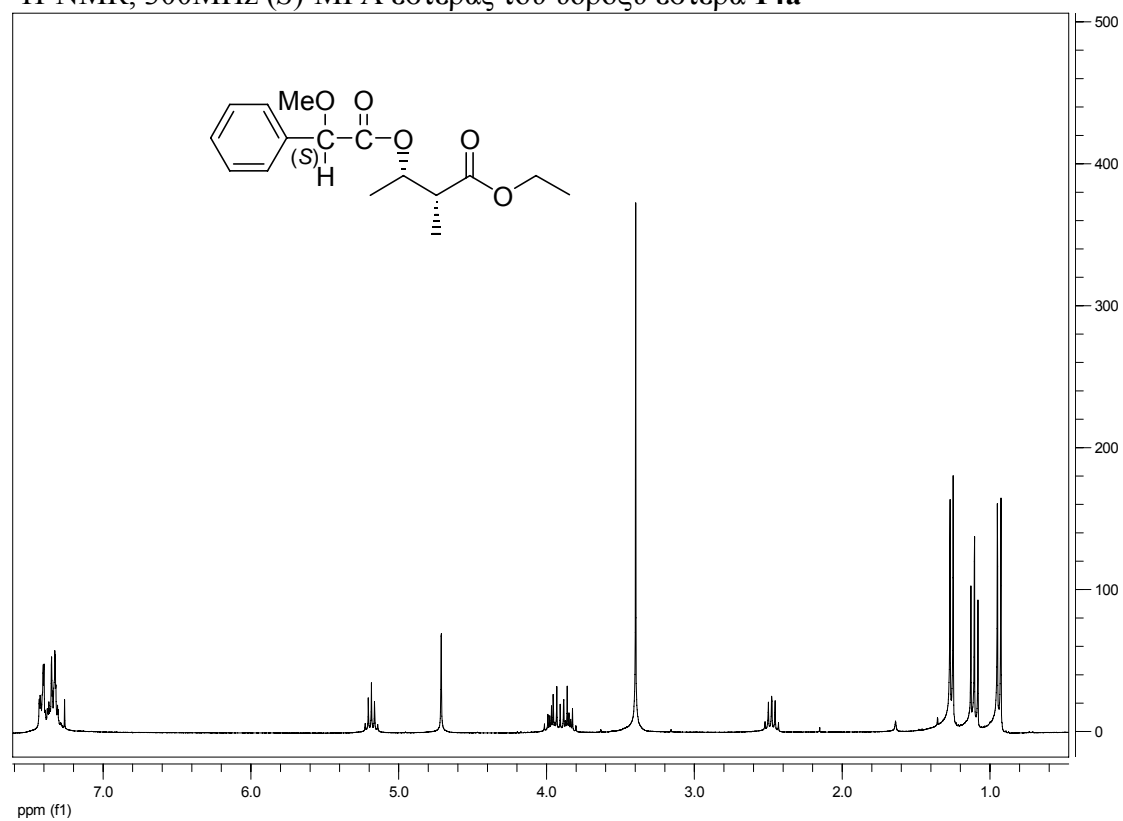
NMR 119

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **14a**



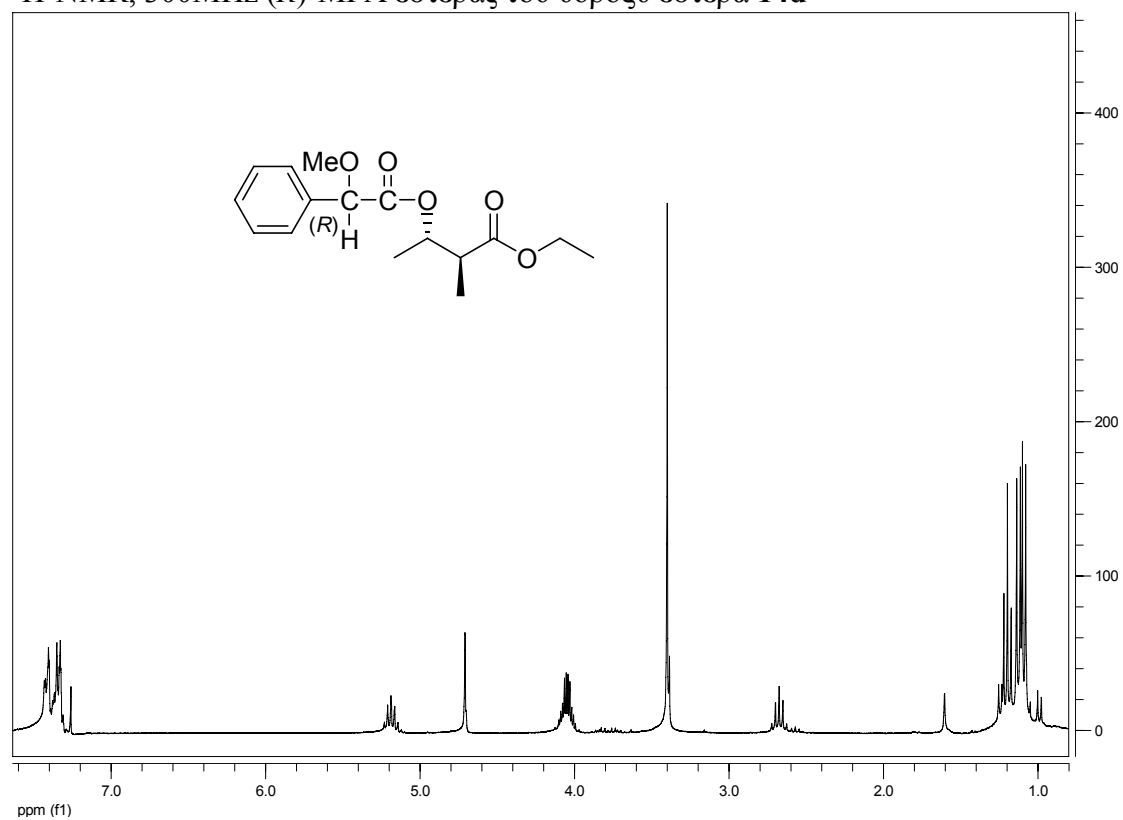
NMR 120

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **14a**



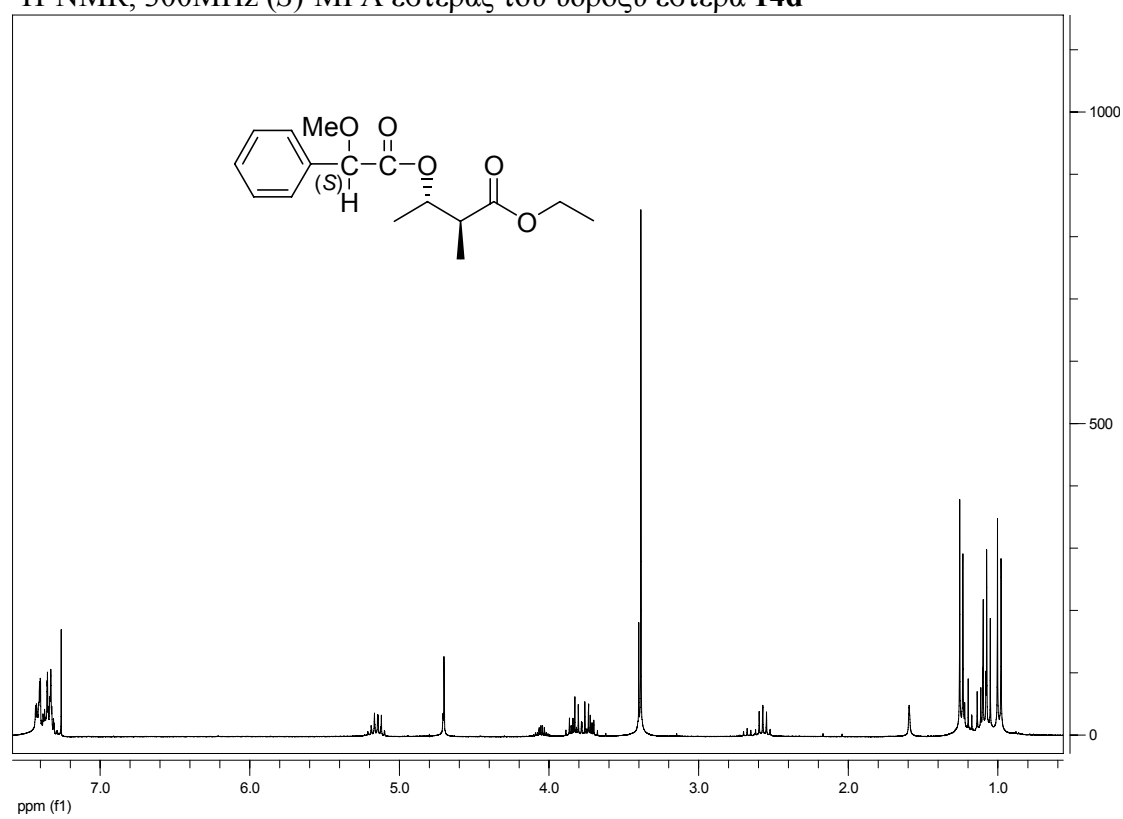
NMR 121

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **14d**



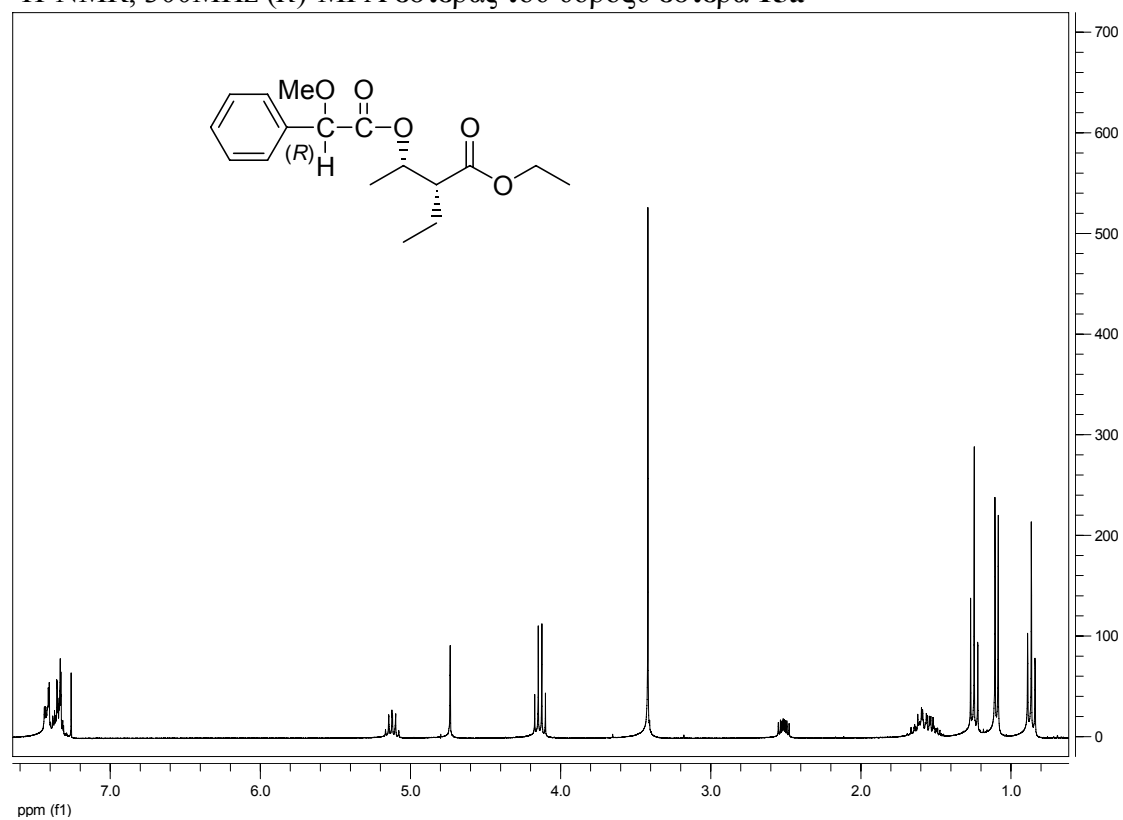
NMR 122

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **14d**



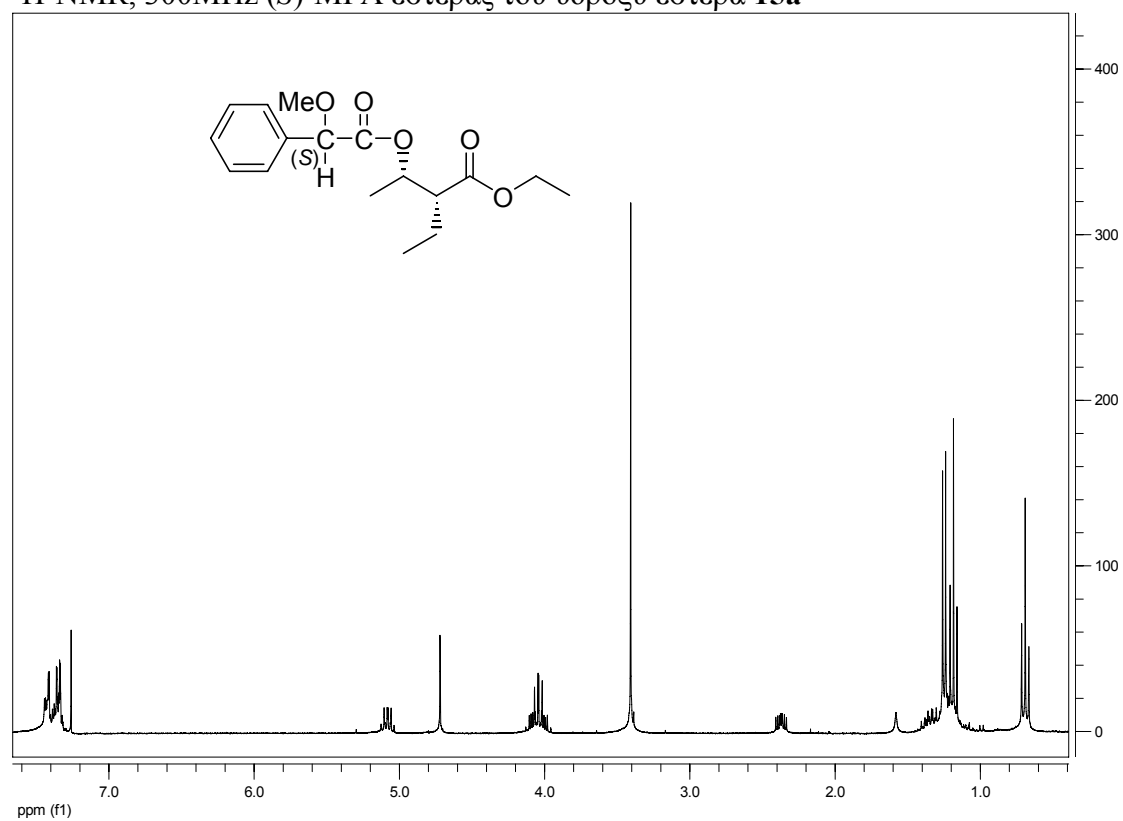
NMR 123

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **15a**



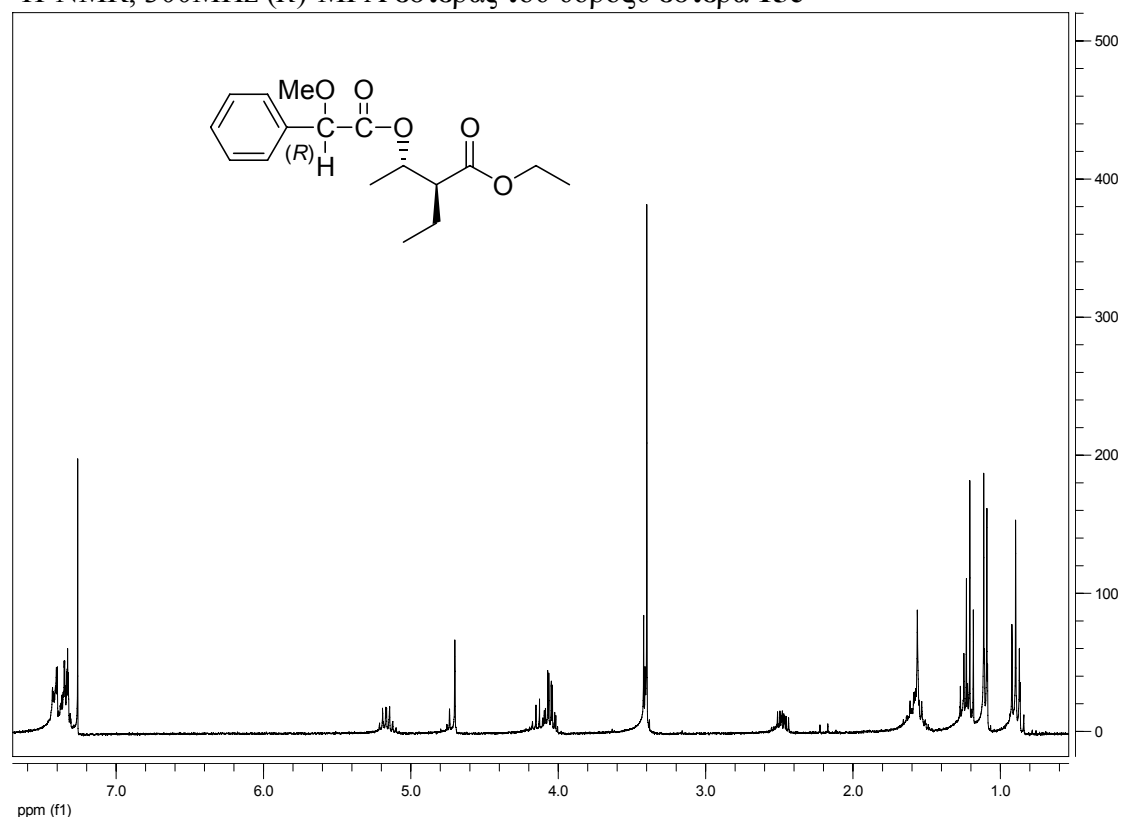
NMR 124

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **15a**



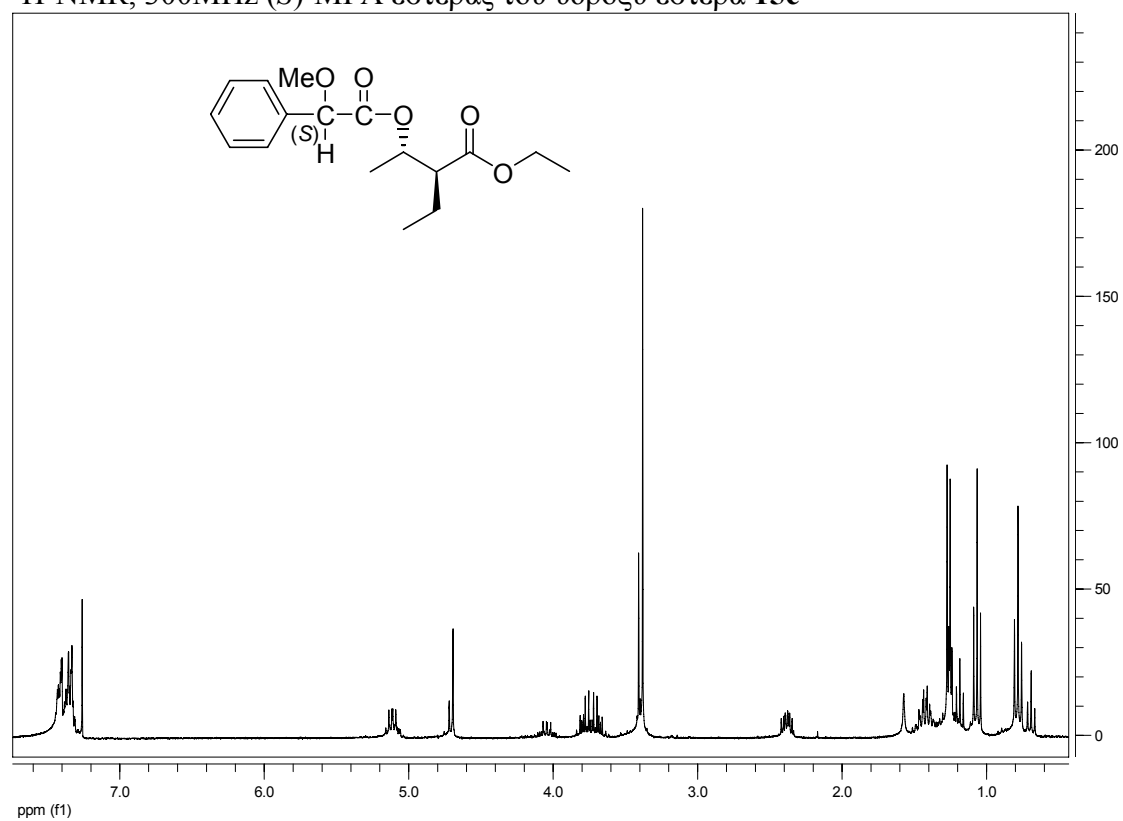
NMR 125

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **15c**



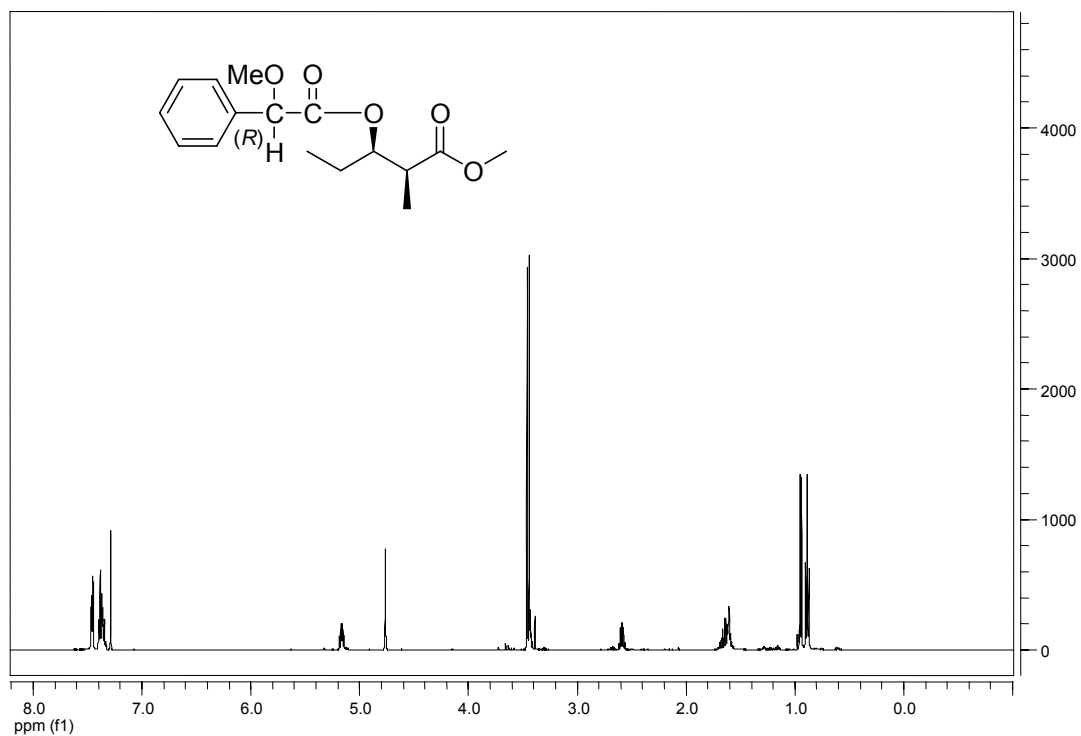
NMR 126

$^1\text{H-NMR}$, 300MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **15c**



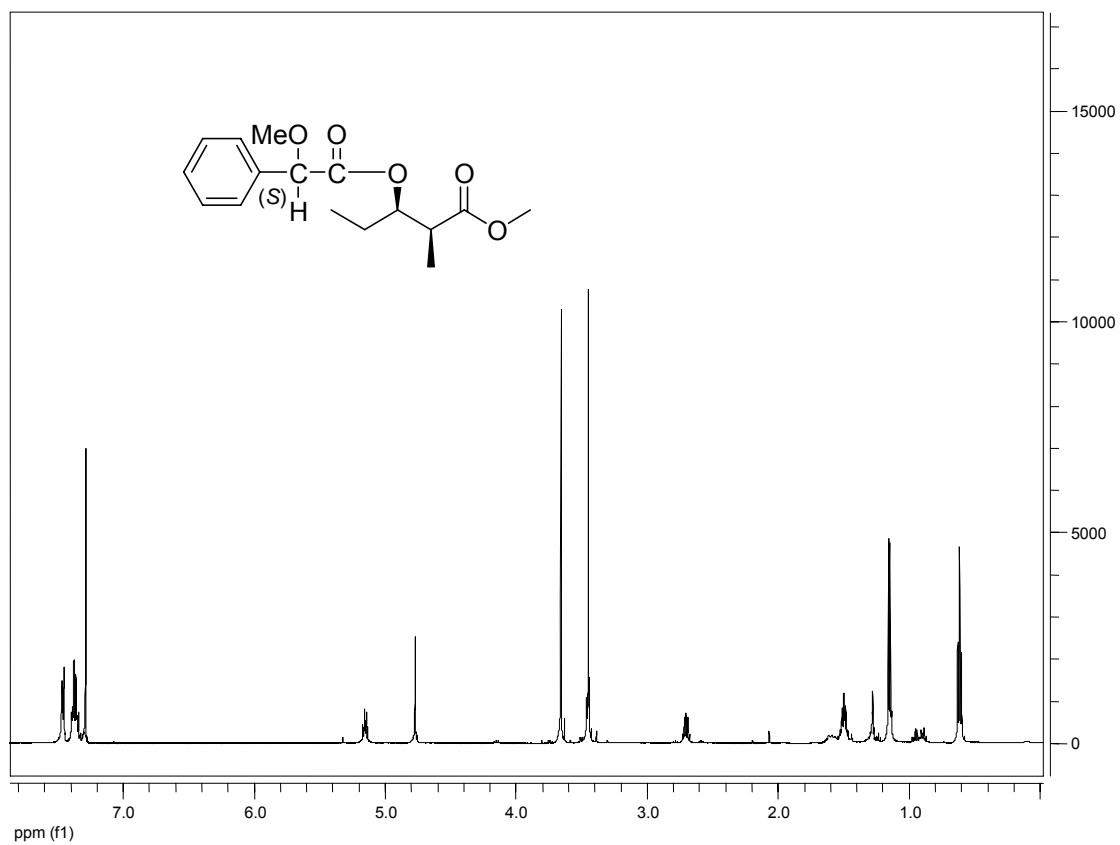
NMR 127

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **17a**



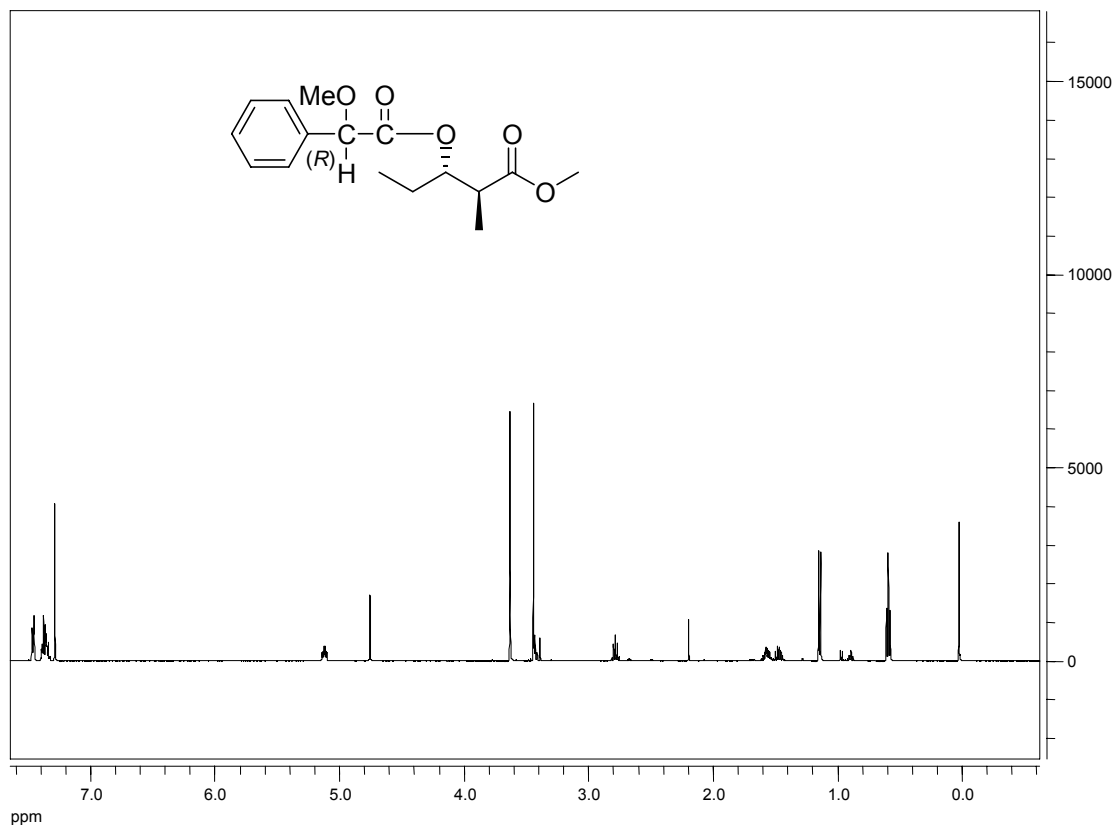
NMR 128

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **17a**



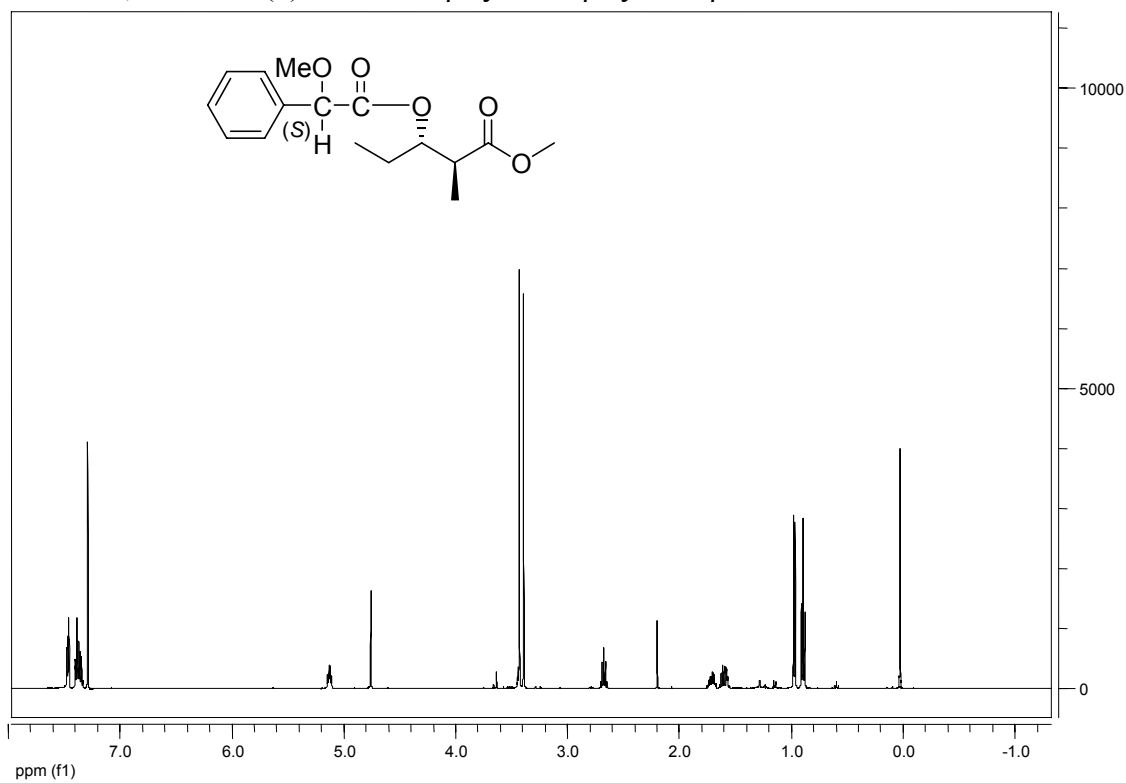
NMR 129

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **17c**



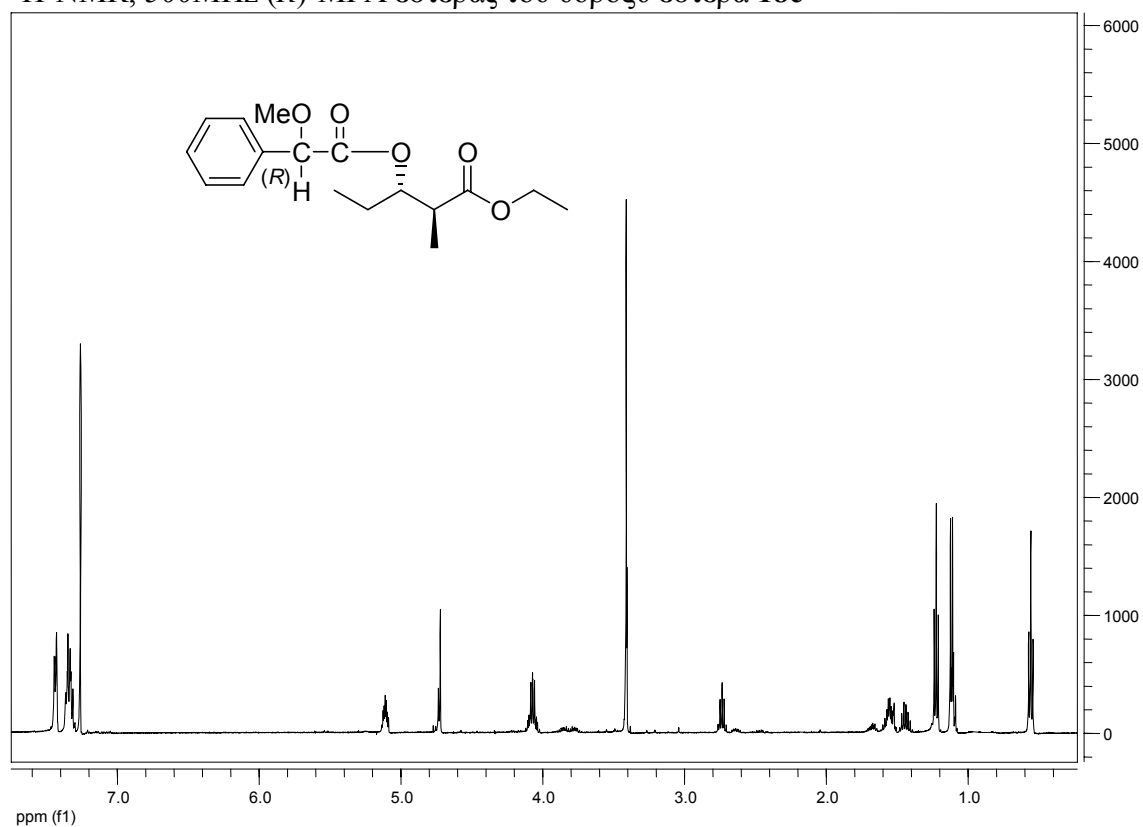
NMR 130

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **17c**



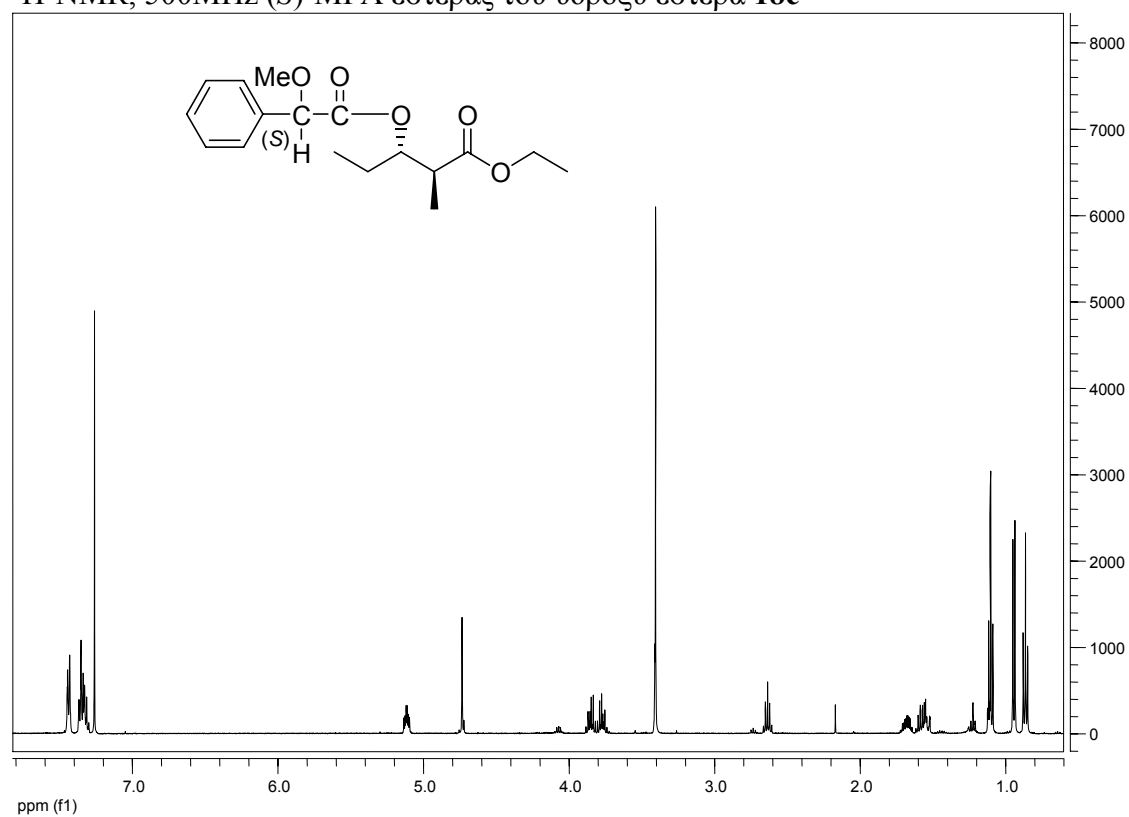
NMR 131

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **18c**



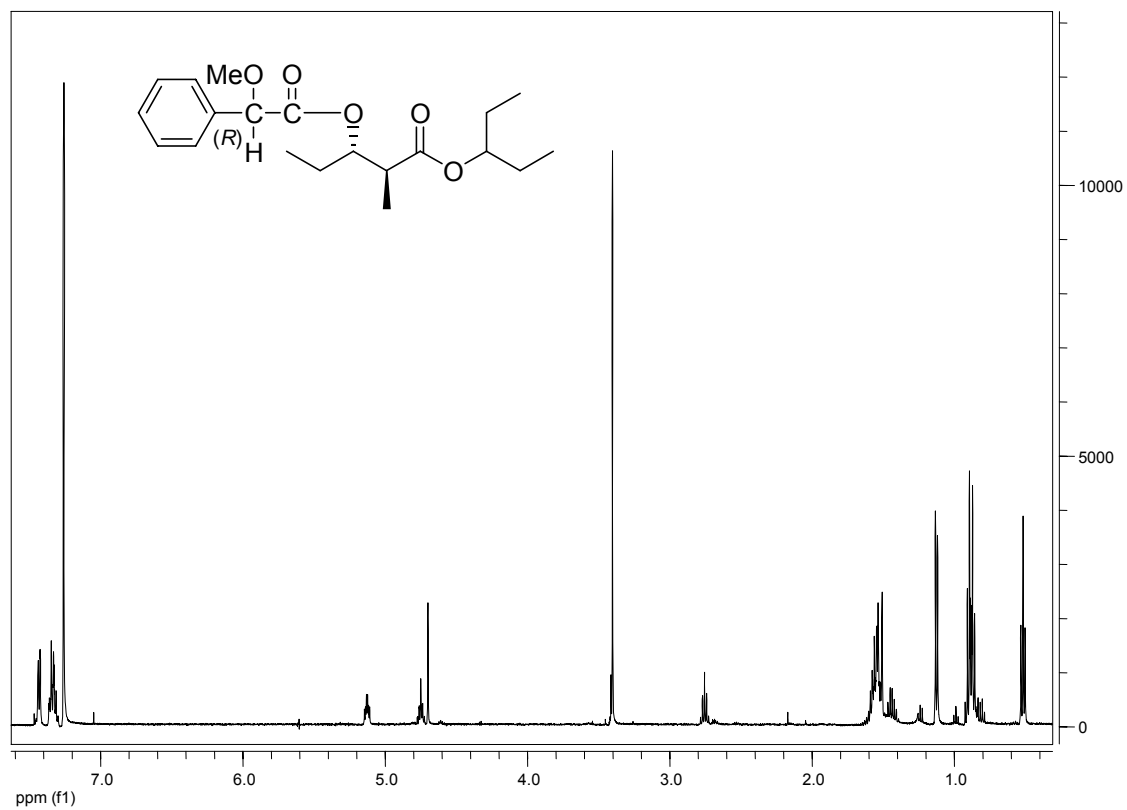
NMR 132

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **18c**



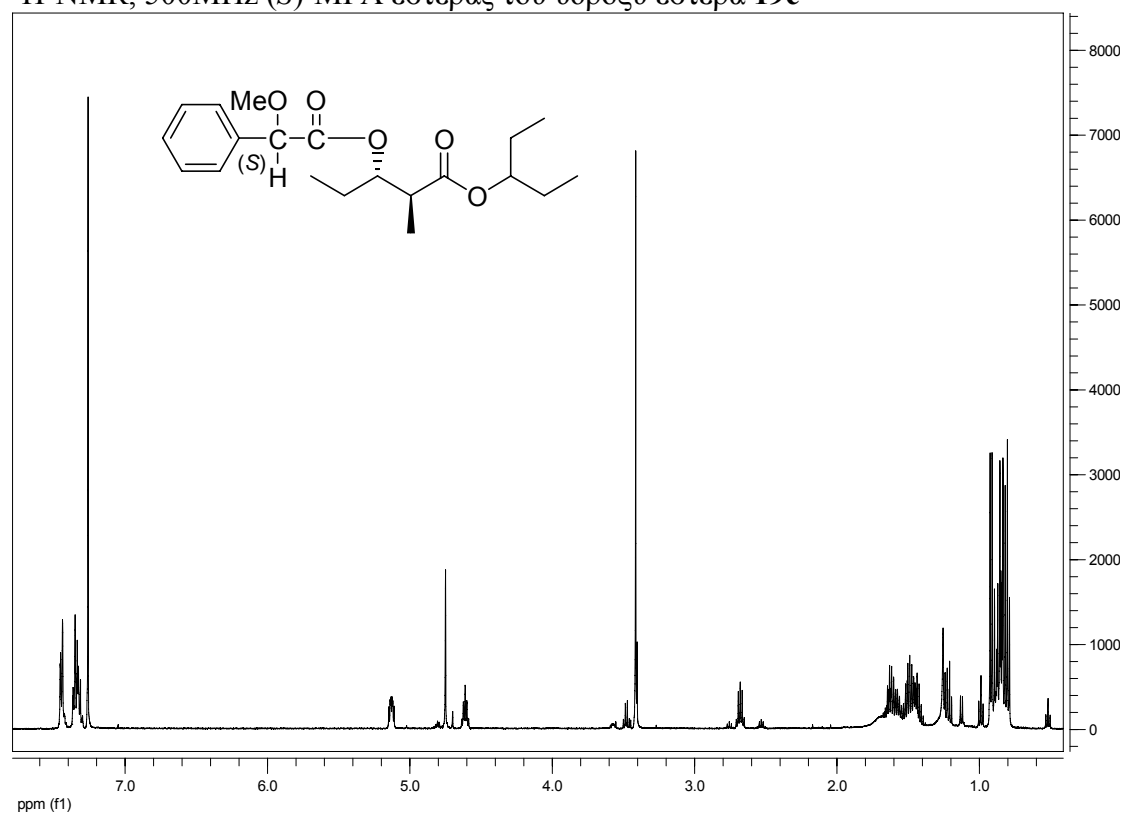
NMR 133

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*R*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **19c**



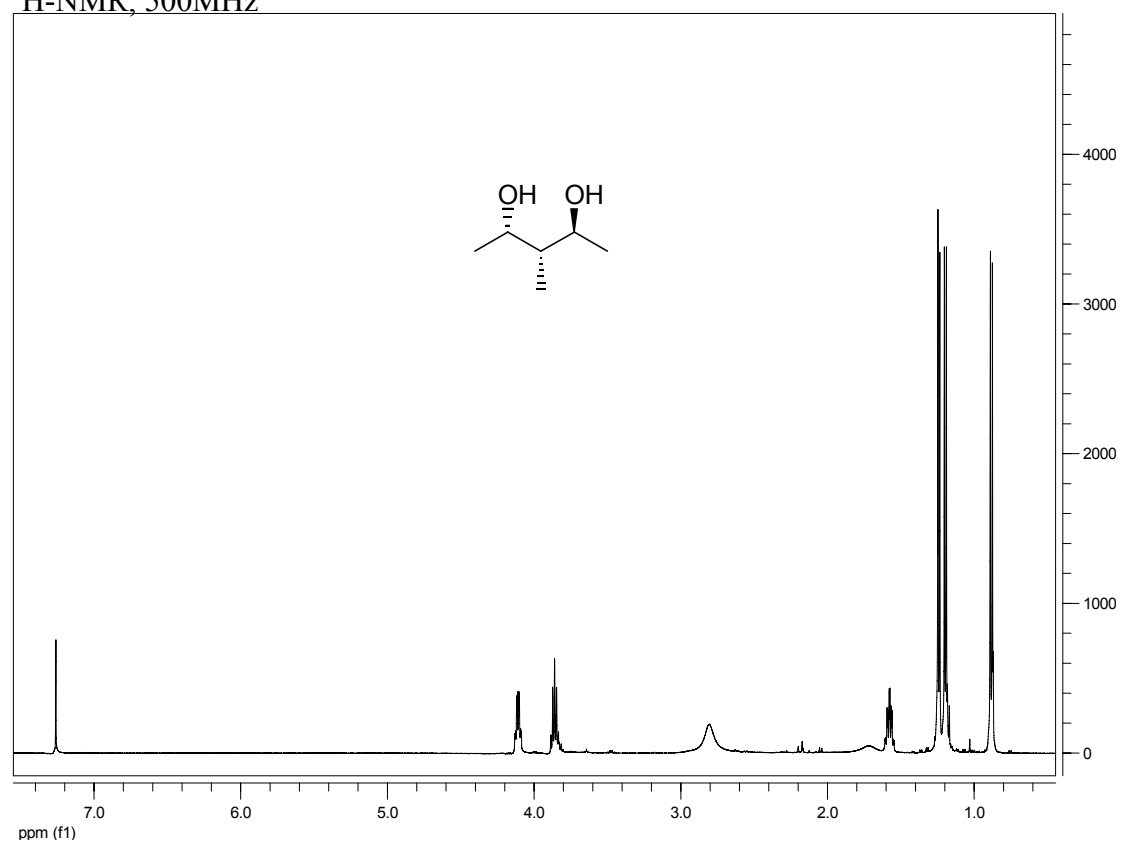
NMR 134

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz (*S*)-MPA εστερας του υδροξυ εστερα **19c**



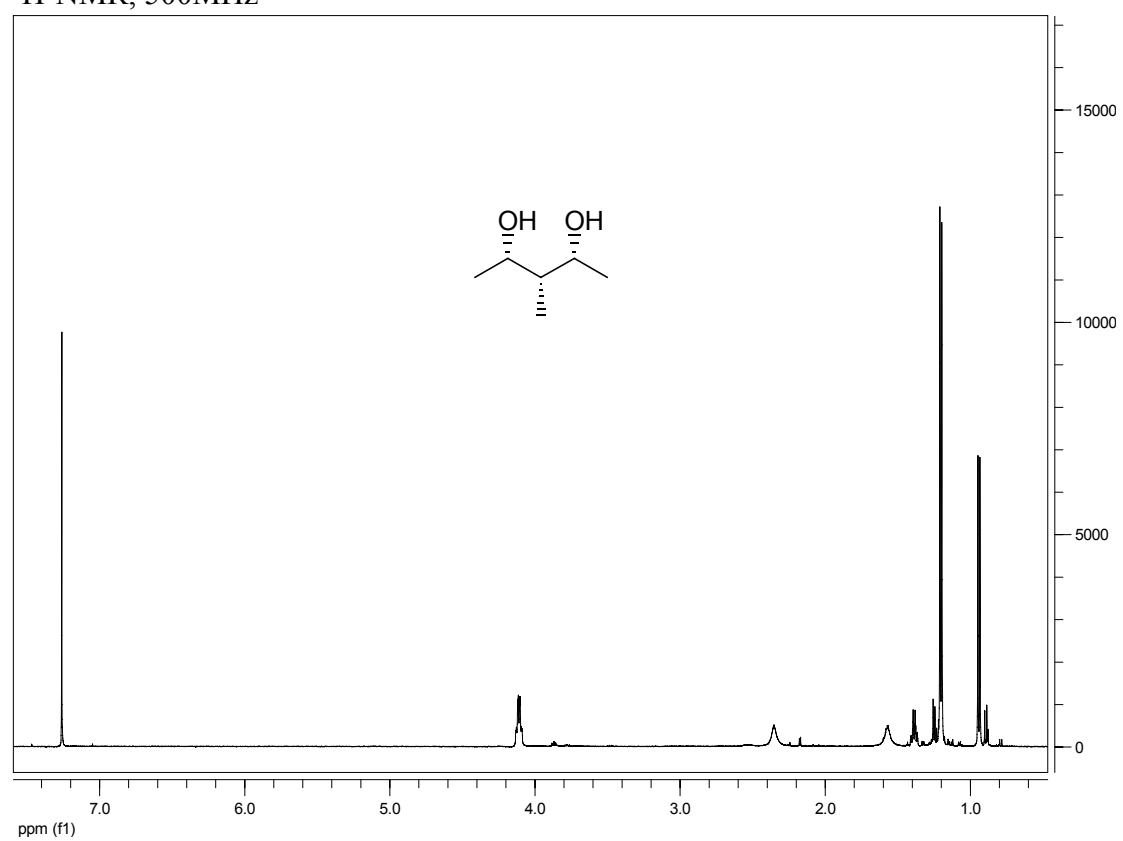
NMR 135

¹H-NMR, 500MHz



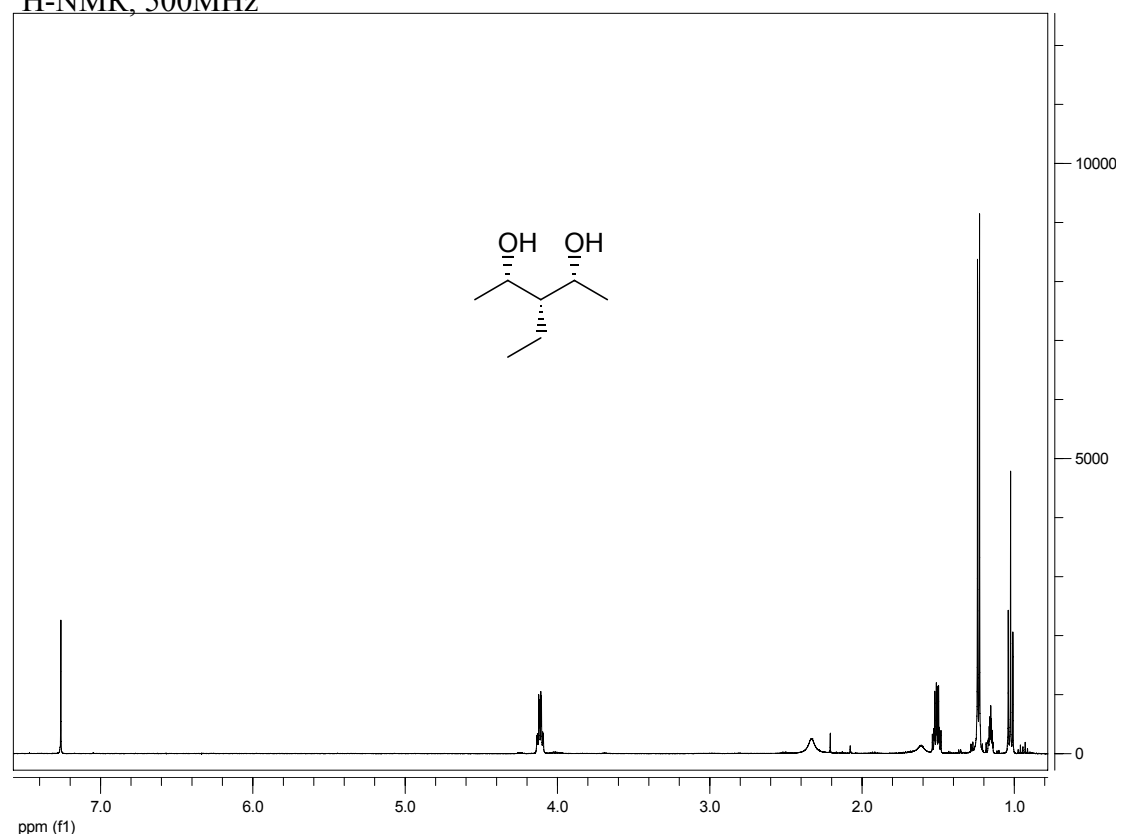
NMR 136

¹H-NMR, 500MHz



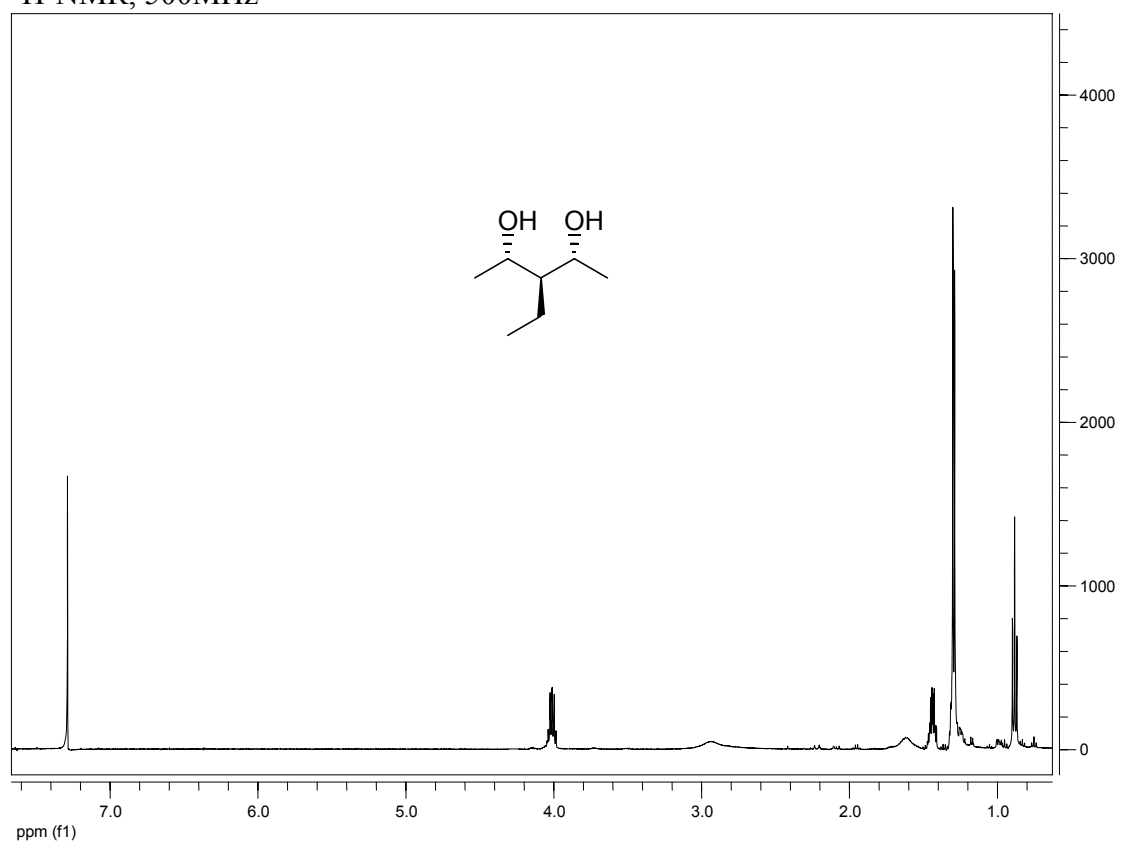
NMR 137

¹H-NMR, 500MHz



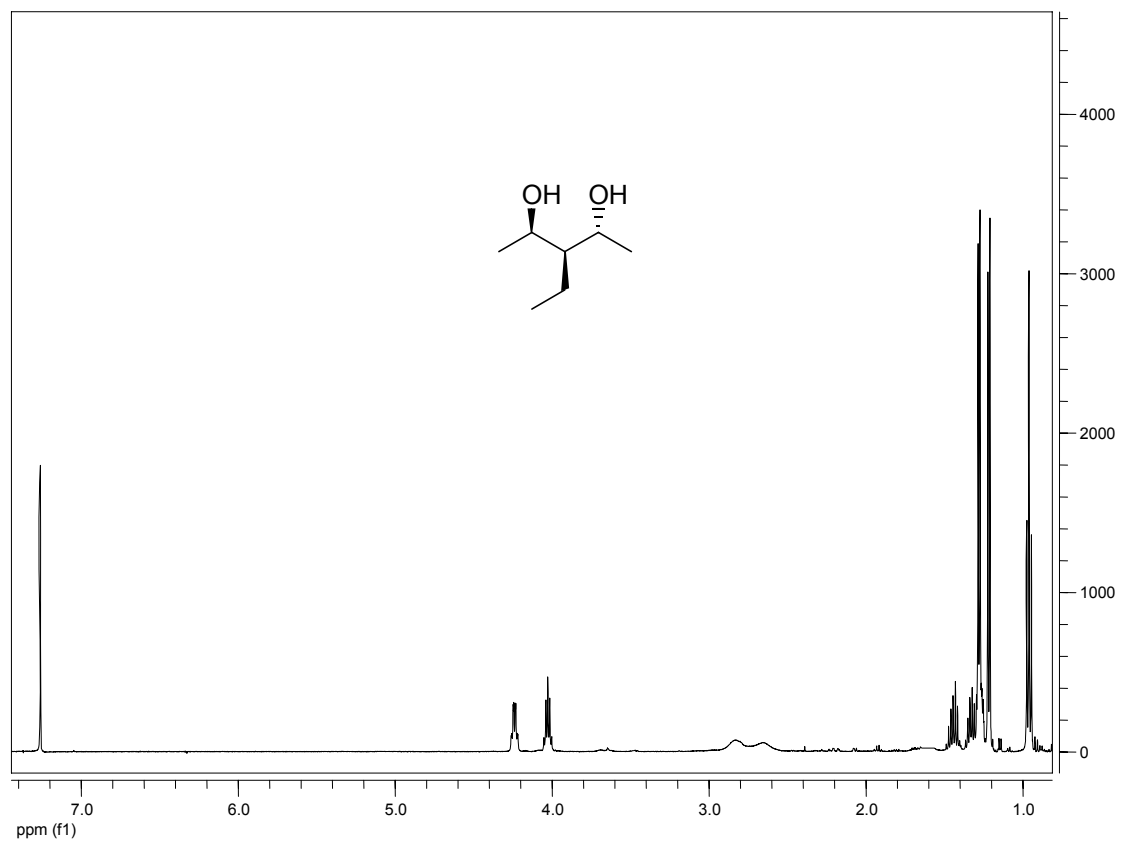
NMR 138

¹H-NMR, 500MHz



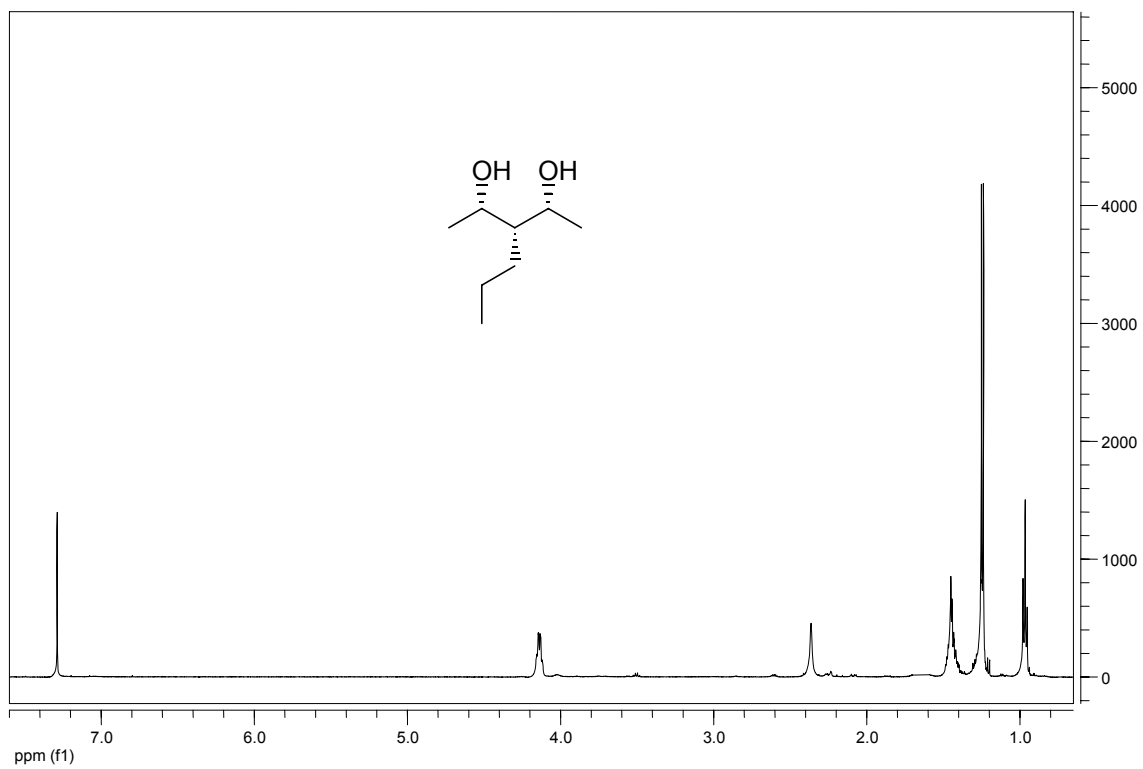
NMR 139

¹H-NMR, 500MHz



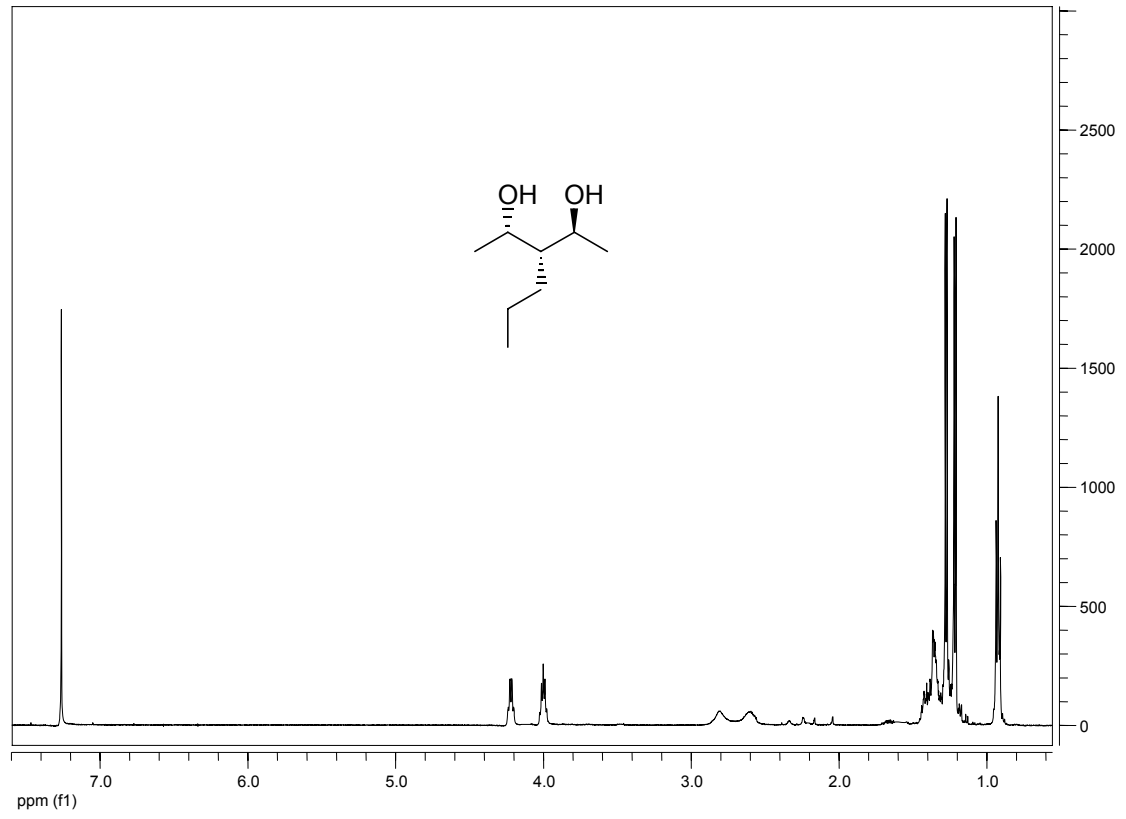
NMR 140

¹H-NMR, 500MHz



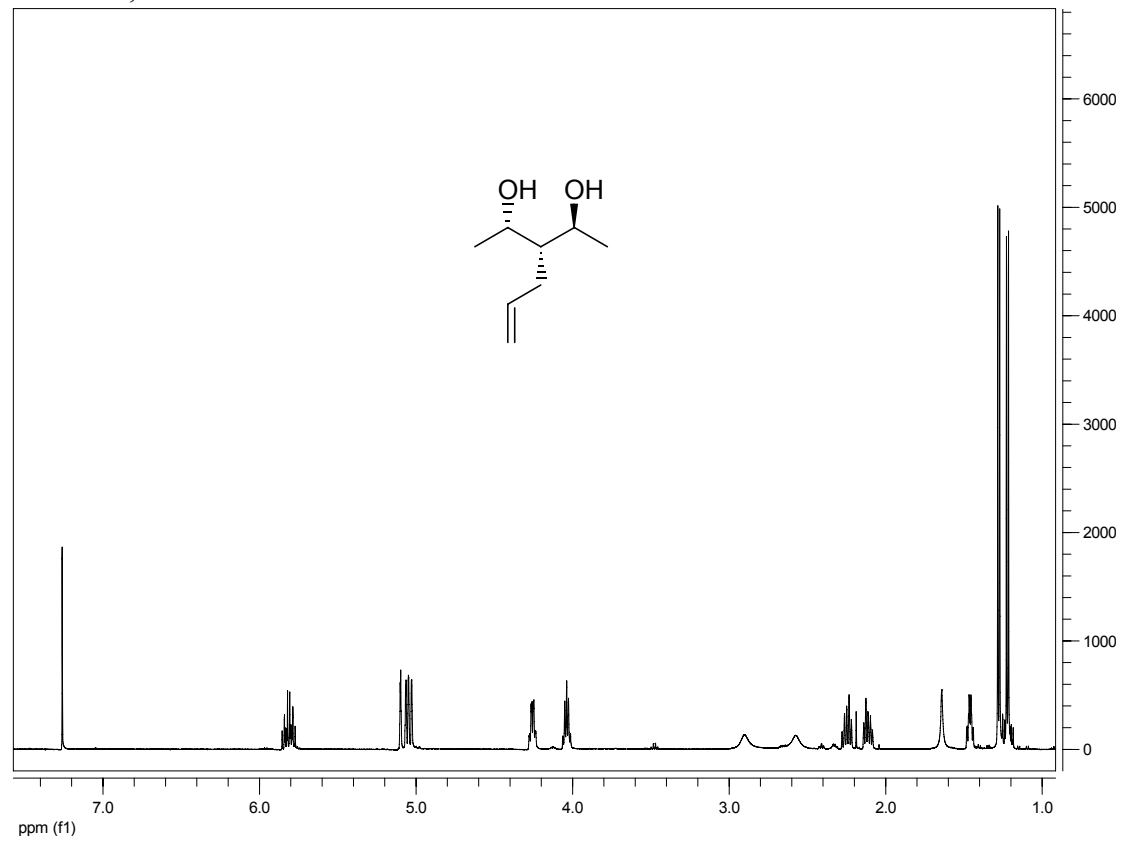
NMR 141

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz



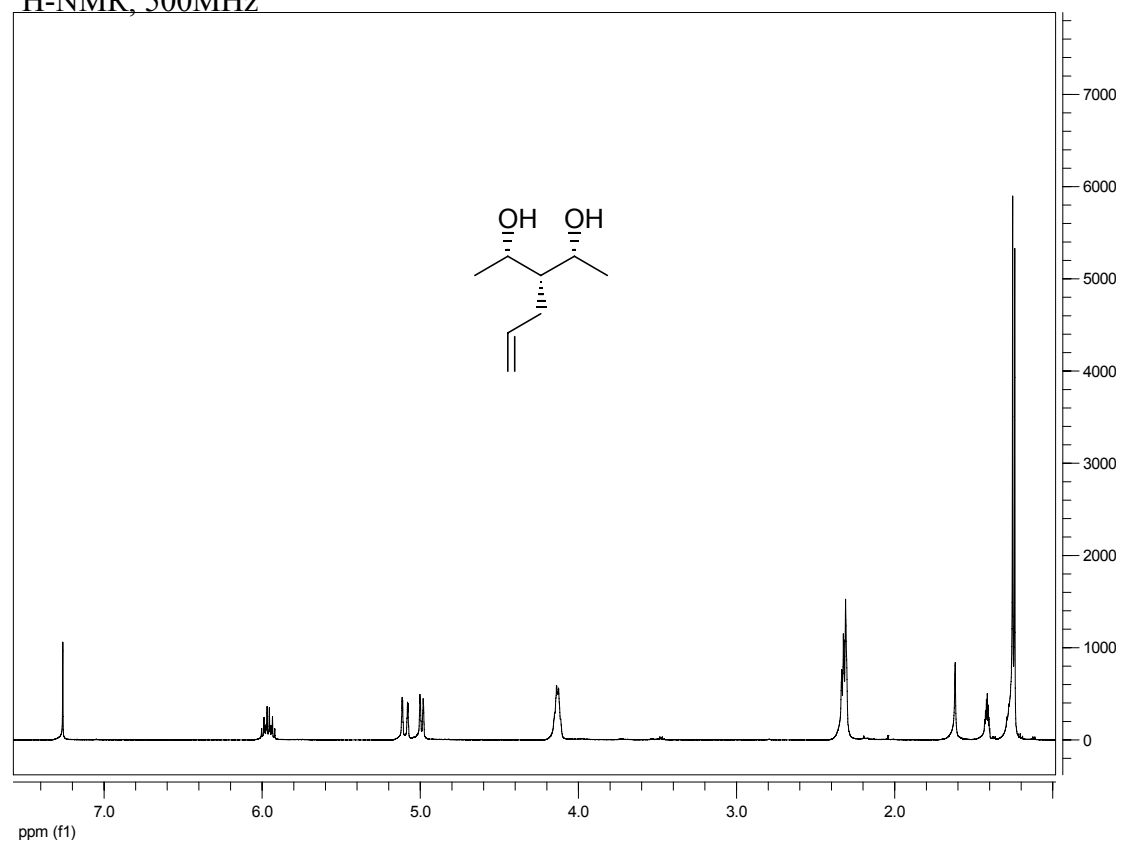
NMR 142

$^1\text{H-NMR}$, 500MHz



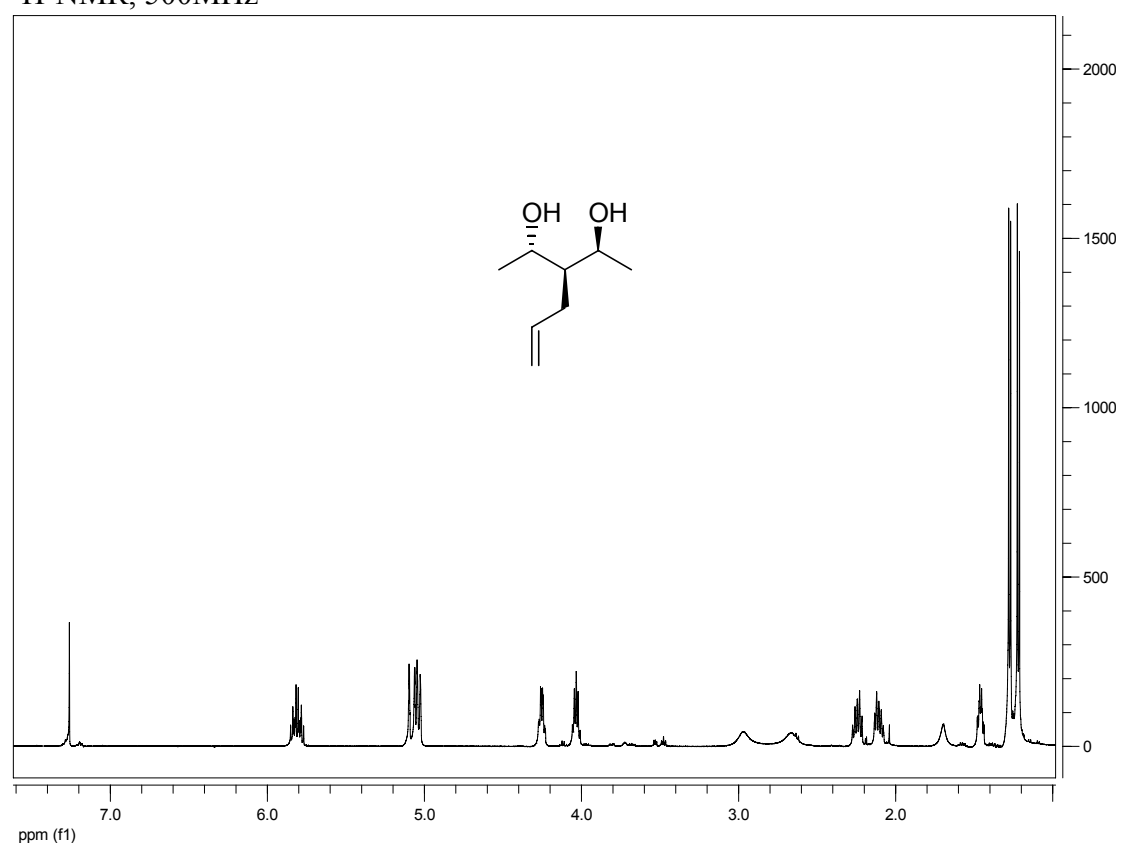
NMR 143

¹H-NMR, 500MHz



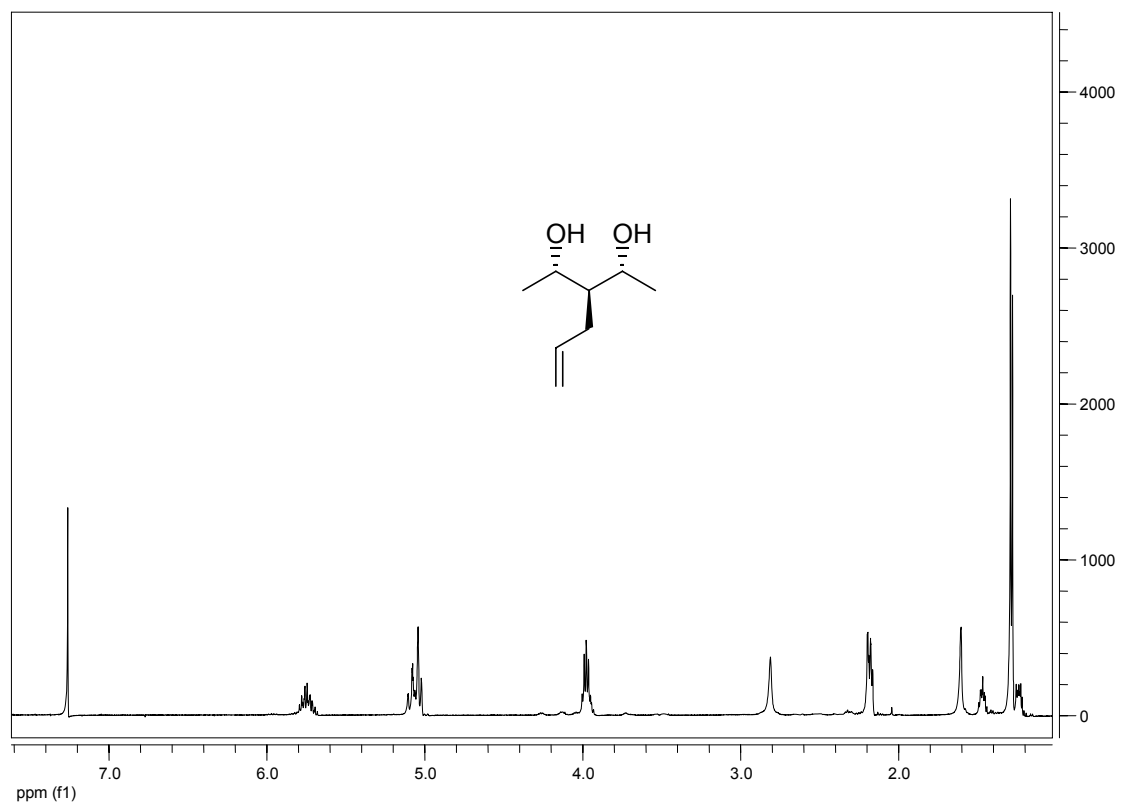
NMR 144

¹H-NMR, 500MHz



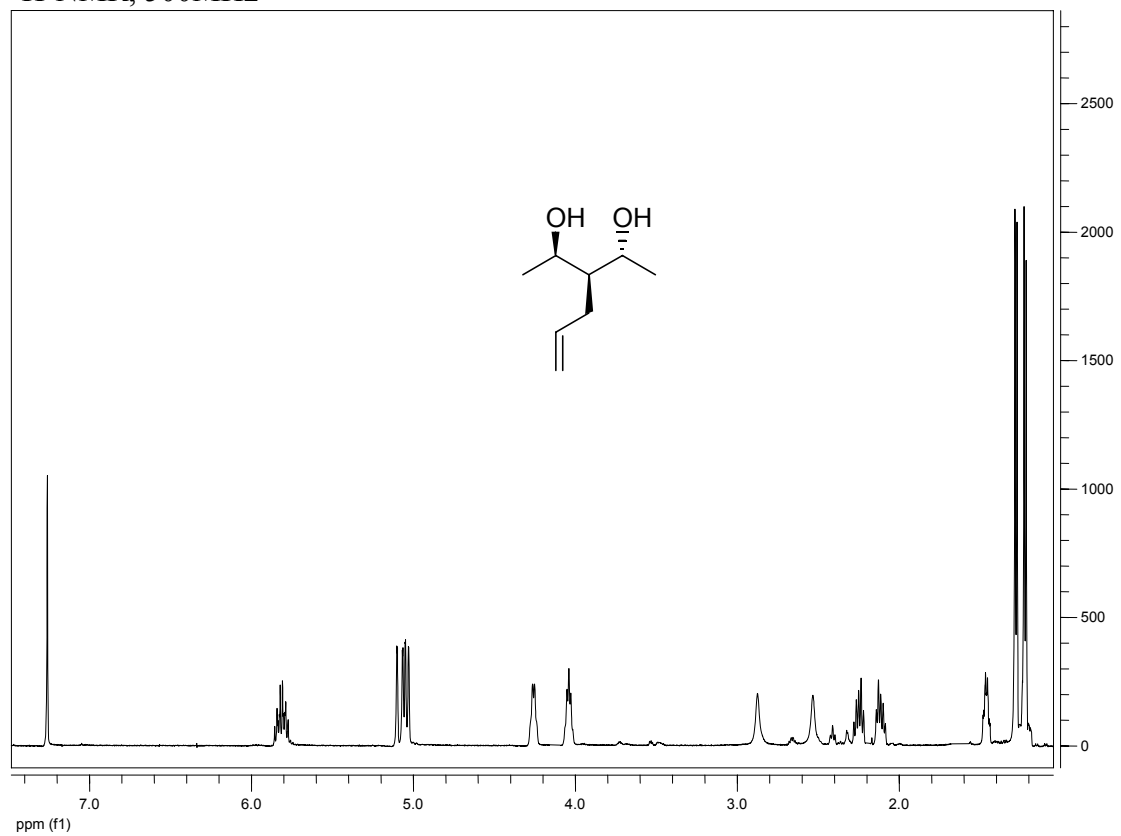
NMR 145

¹H-NMR, 500MHz



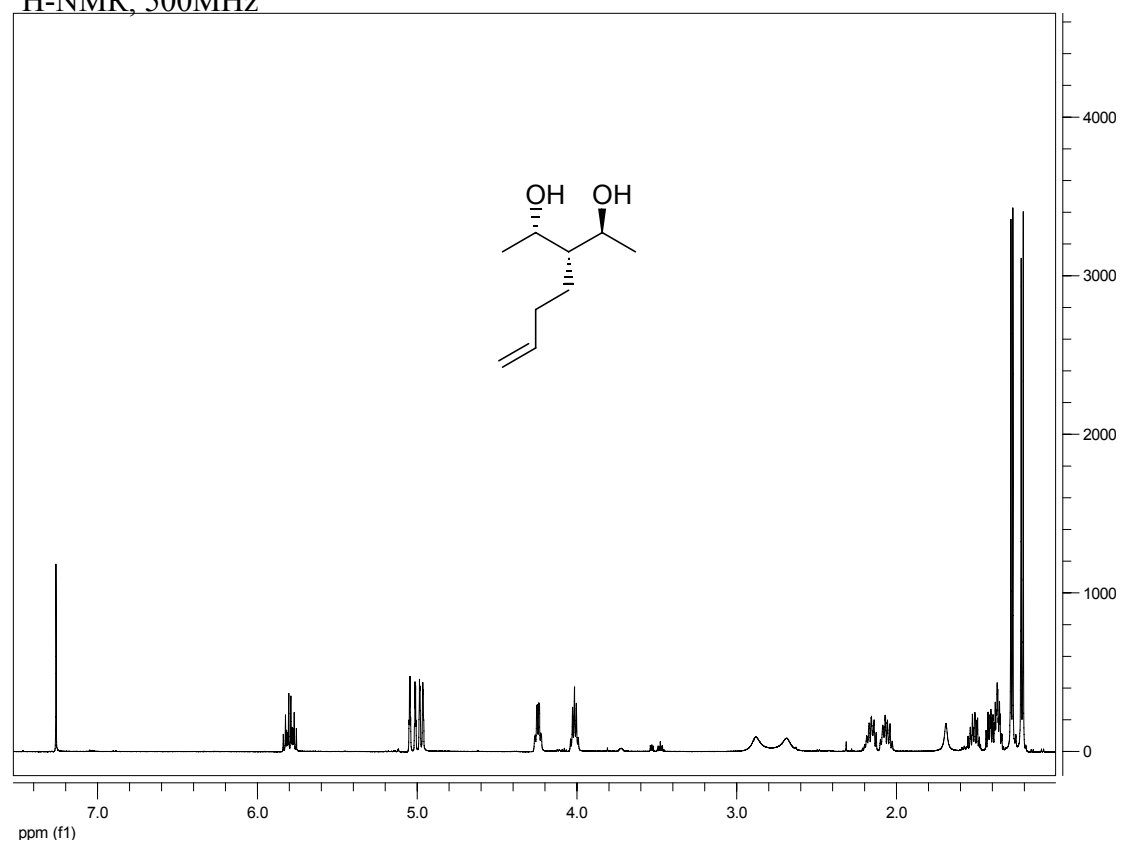
NMR 146

¹H-NMR, 500MHz



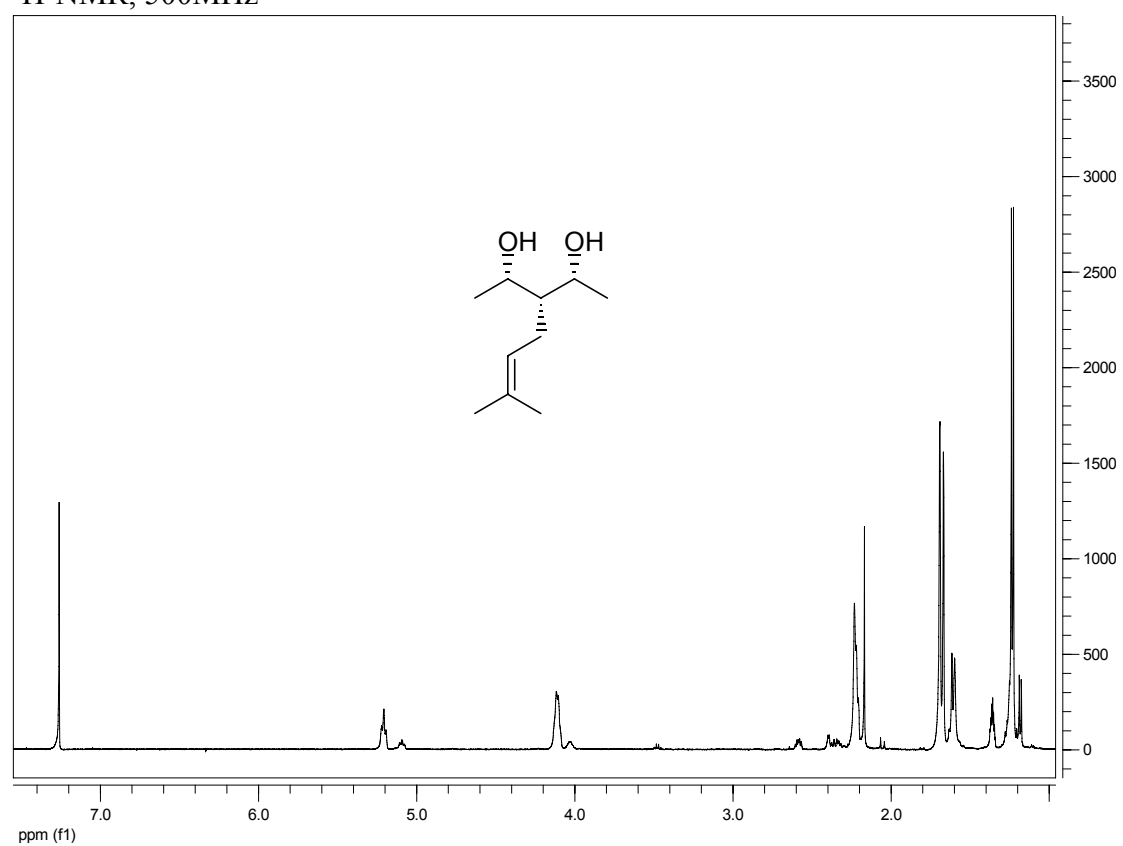
NMR 147

¹H-NMR, 500MHz



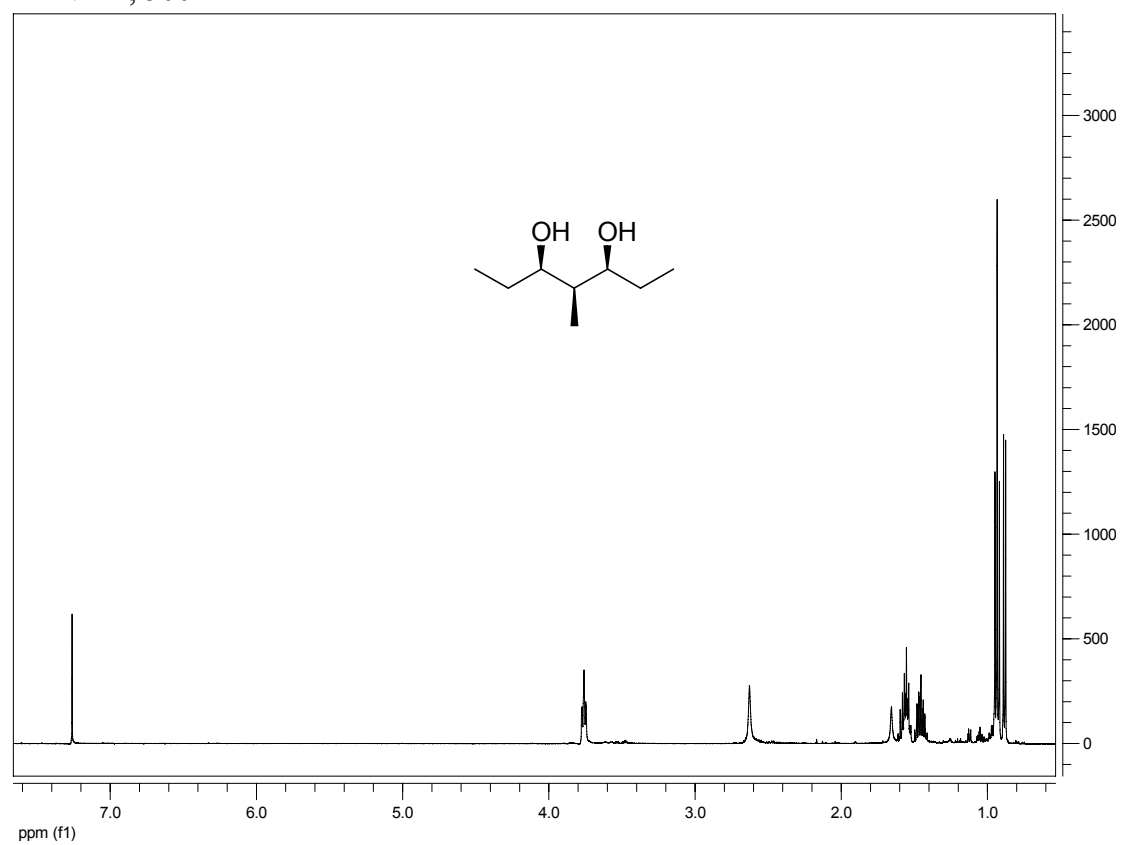
NMR 148

¹H-NMR, 500MHz



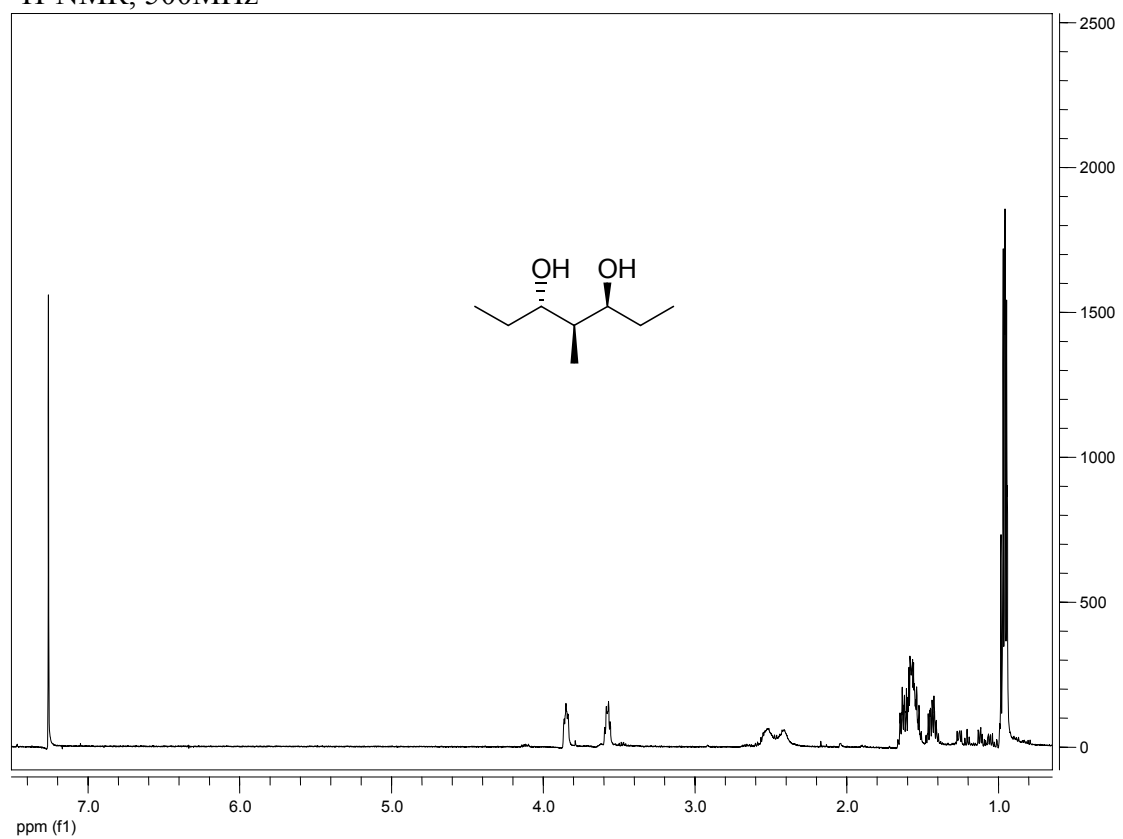
NMR 149

¹H-NMR, 500MHz



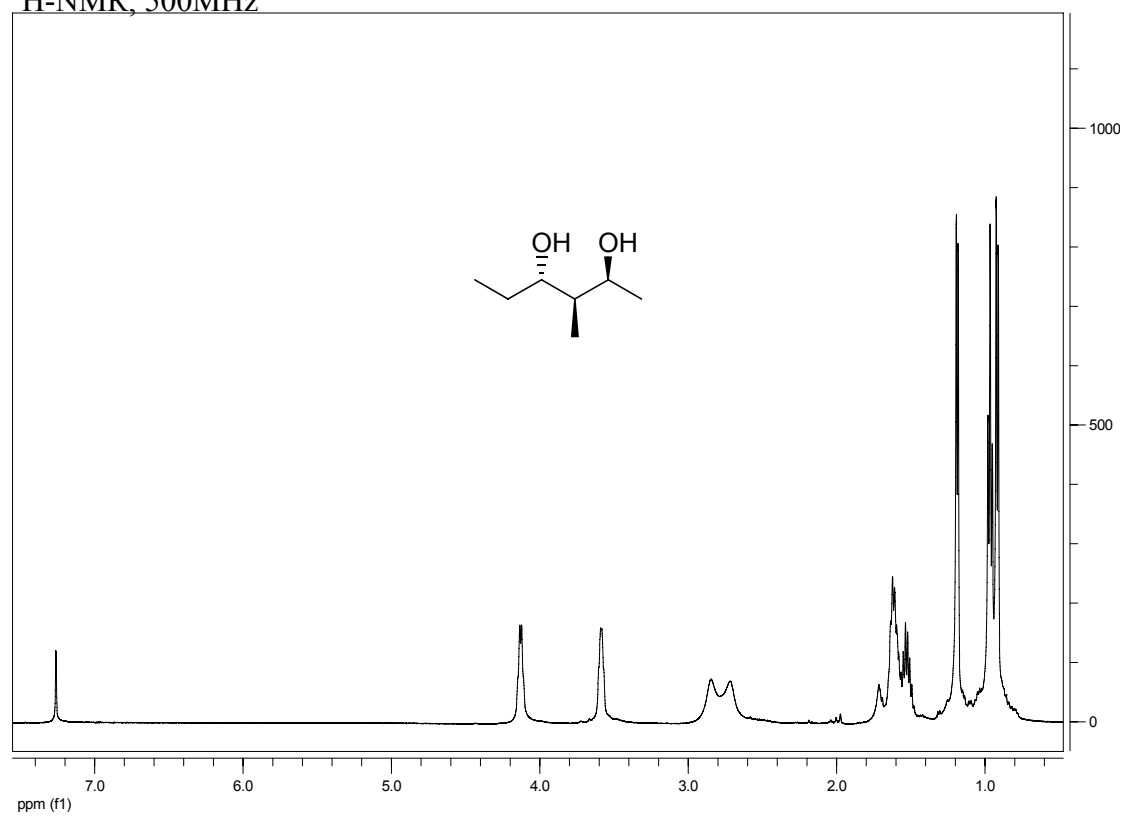
NMR 150

¹H-NMR, 500MHz



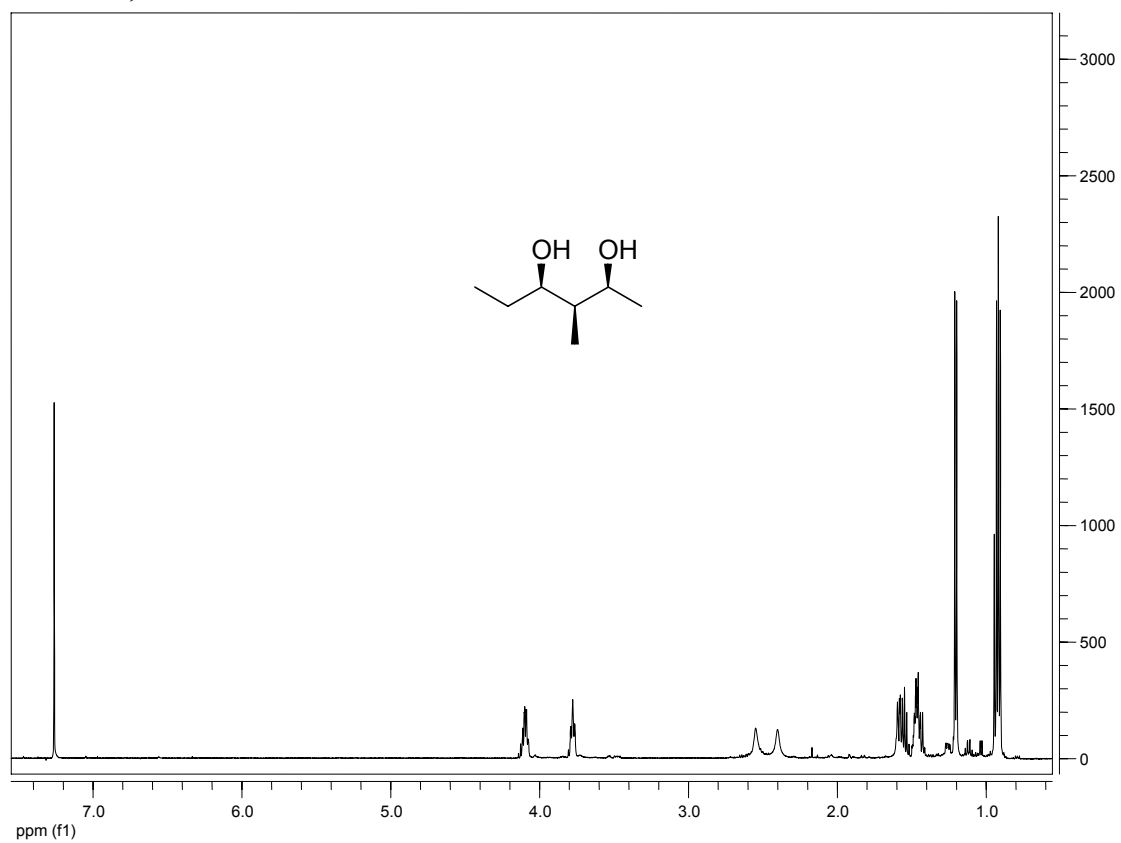
NMR 151

¹H-NMR, 500MHz



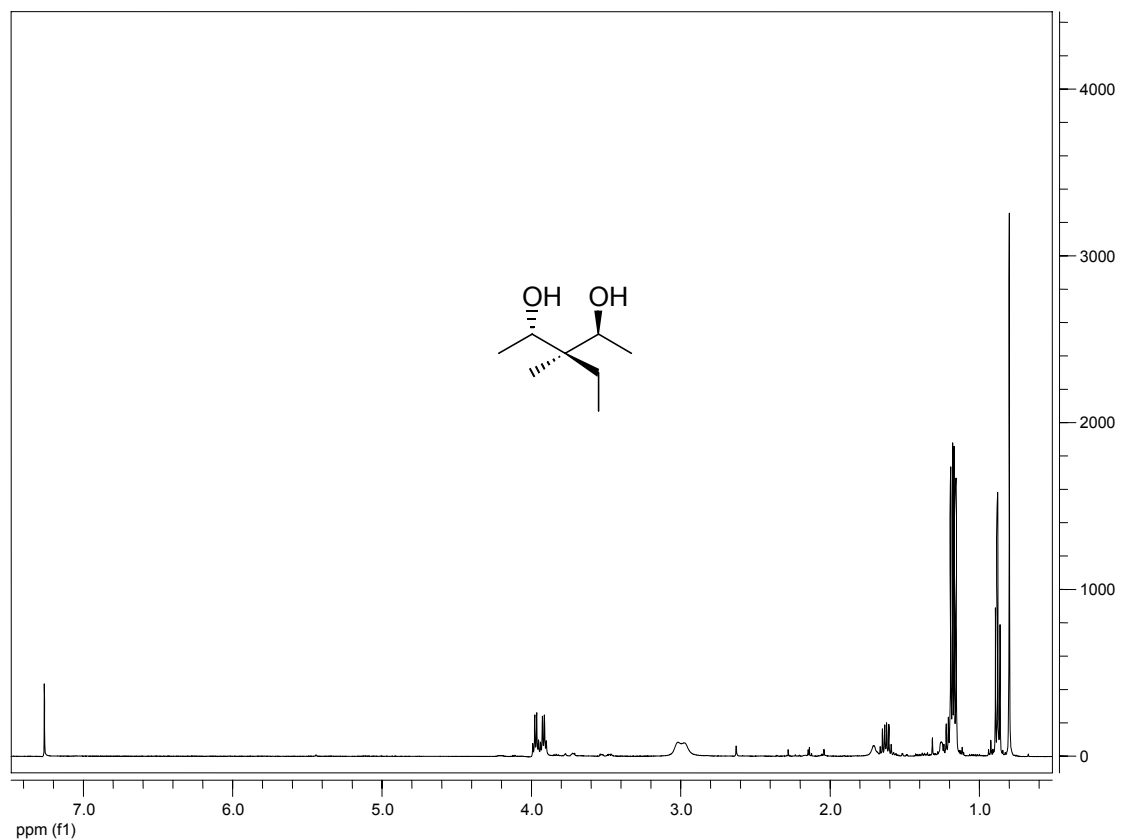
NMR 152

¹H-NMR, 500MHz



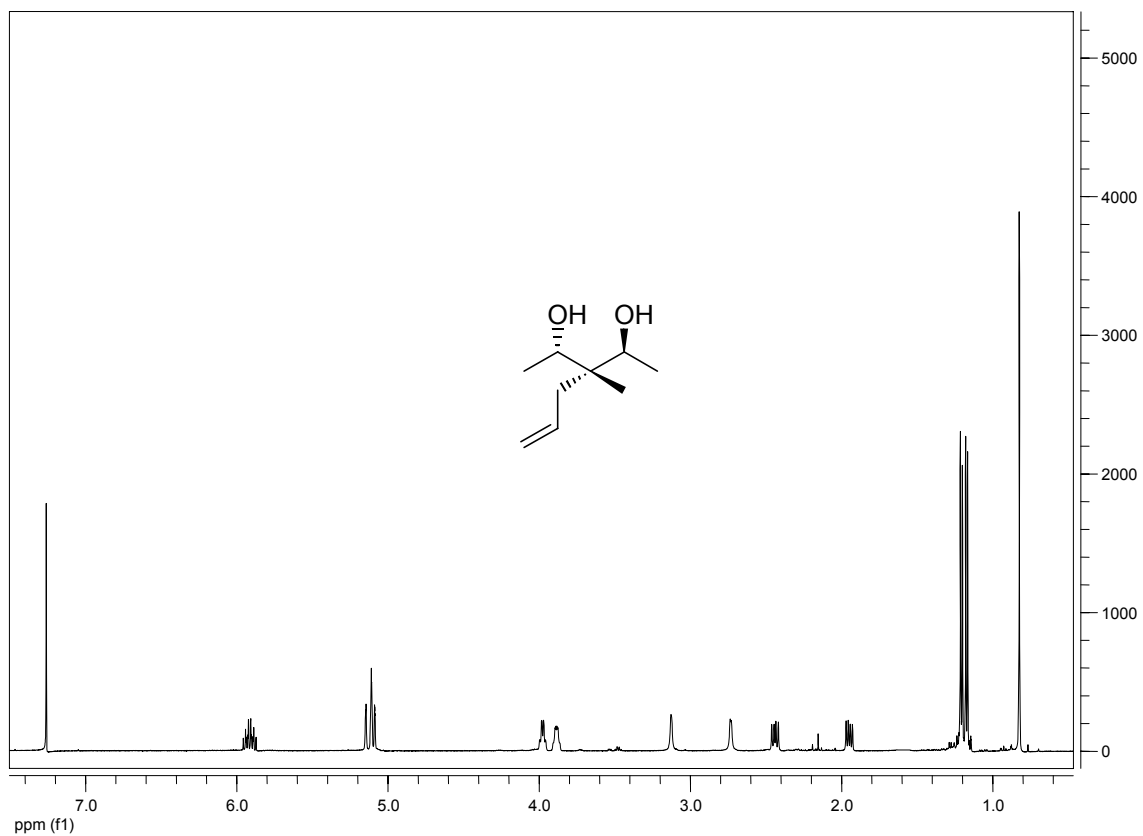
NMR 153

¹H-NMR, 500MHz



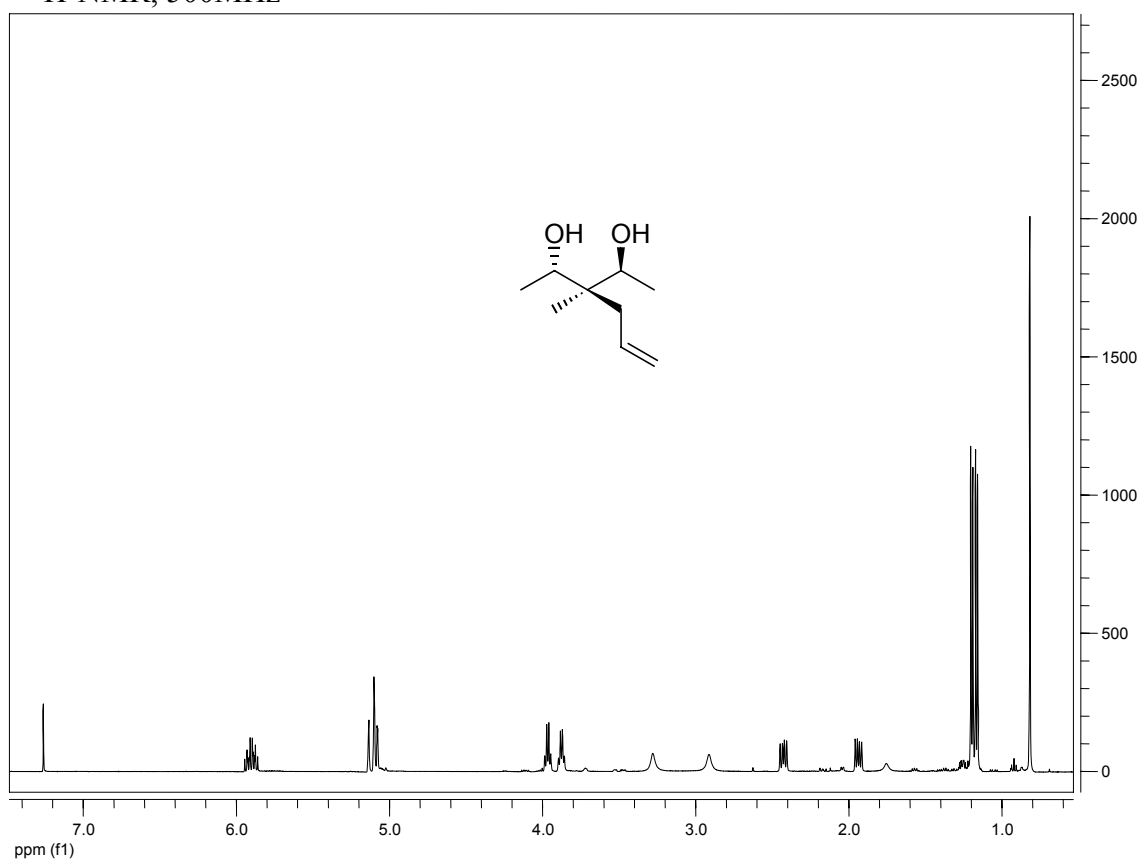
NMR 154

¹H-NMR, 500MHz



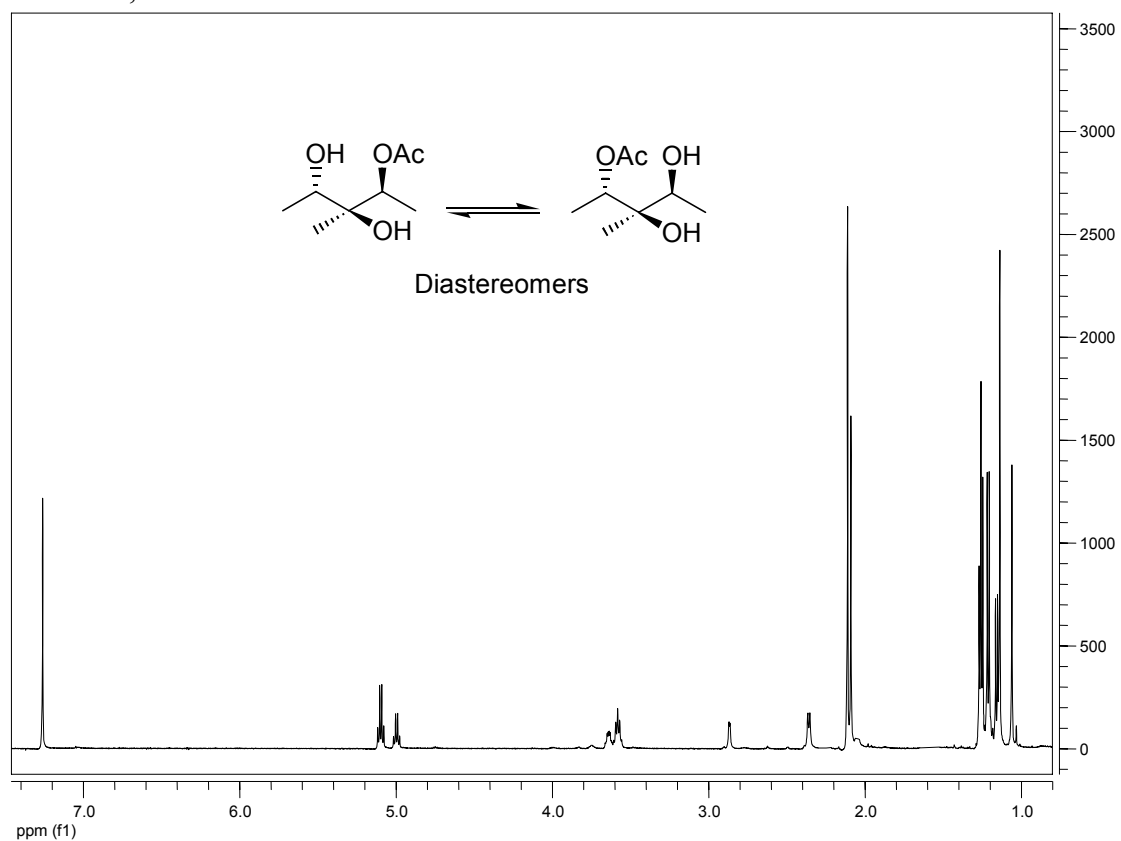
NMR 155

¹H-NMR, 500MHz



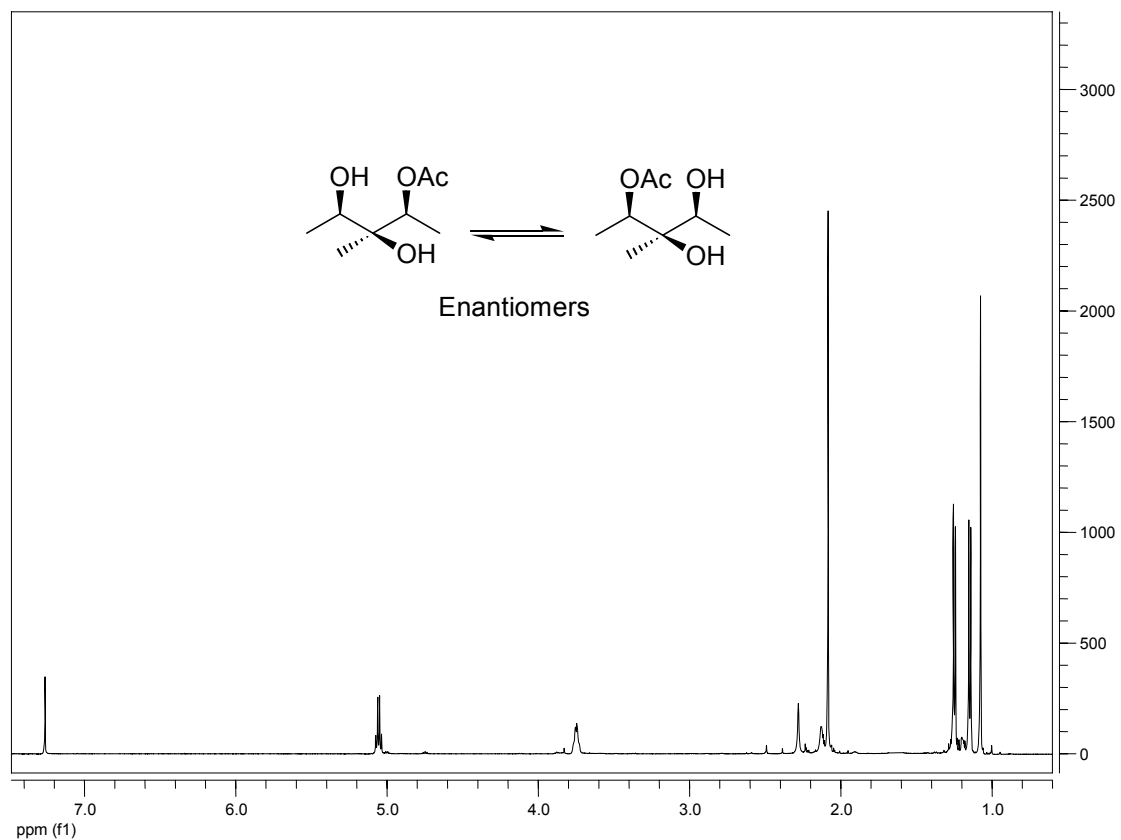
NMR 156

¹H-NMR, 500MHz



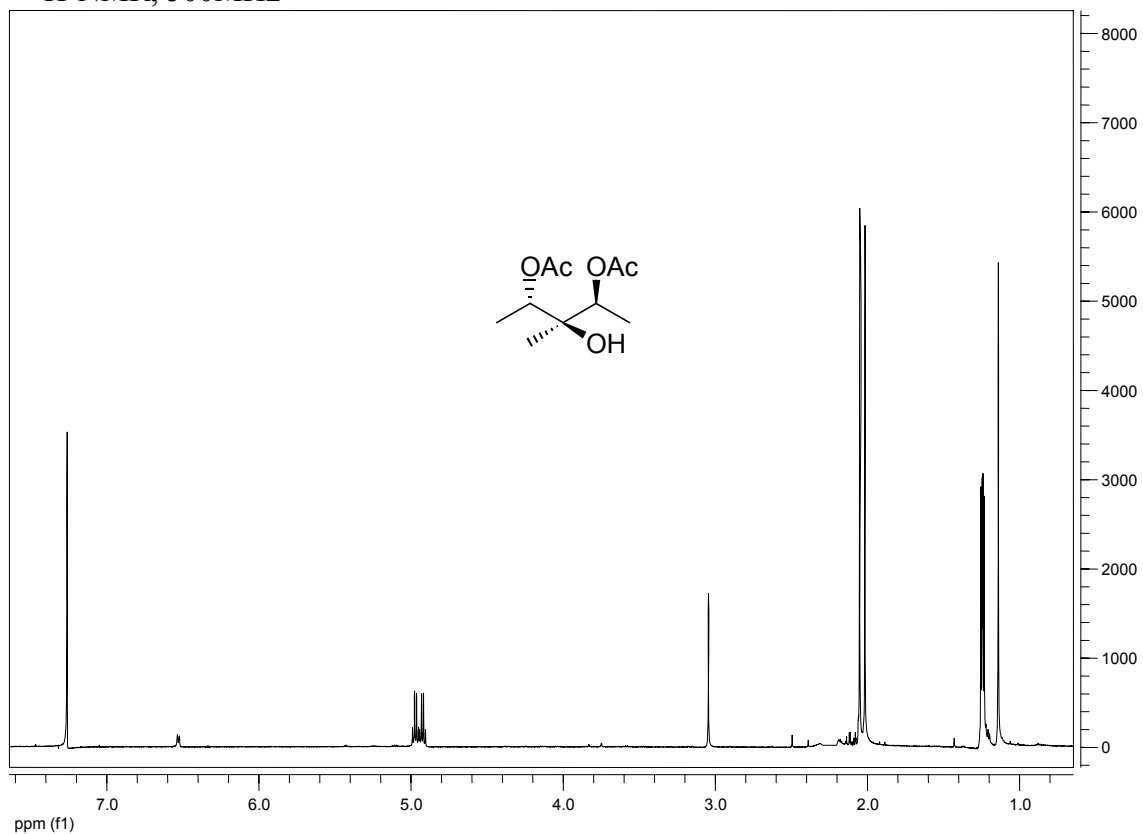
NMR 157

¹H-NMR, 500MHz



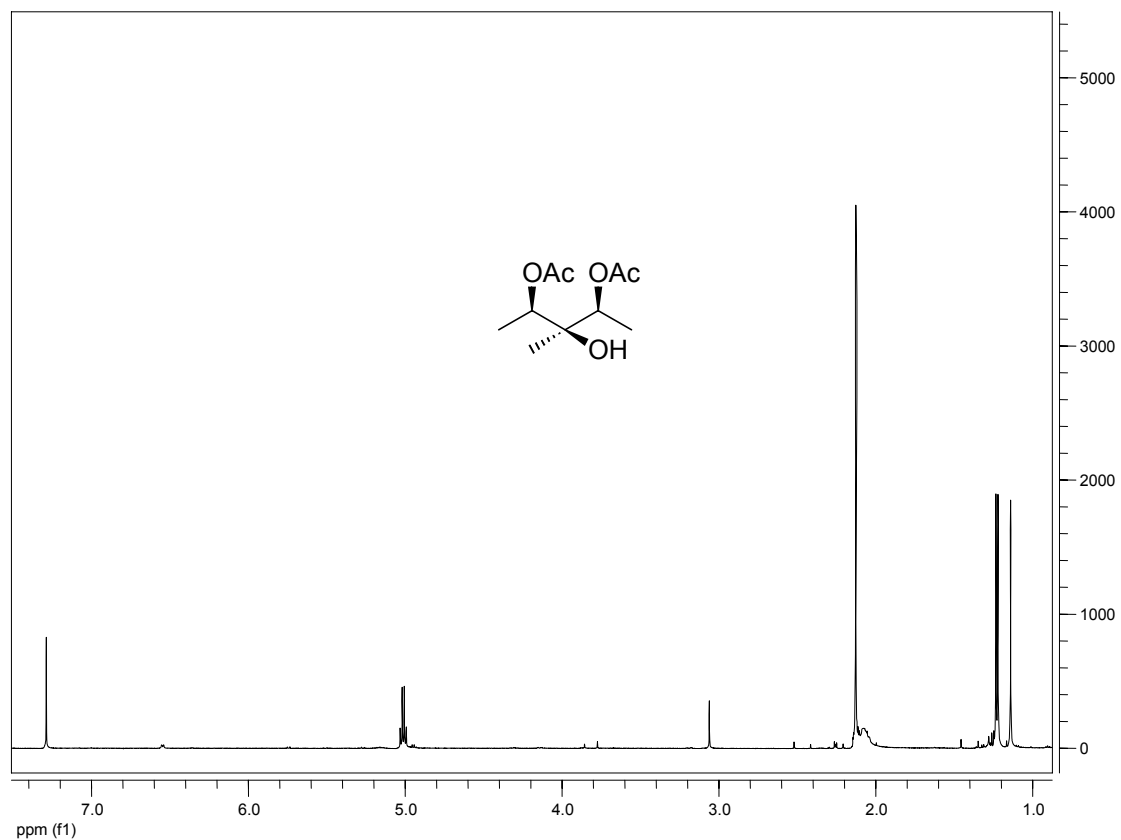
NMR 158

¹H-NMR, 500MHz



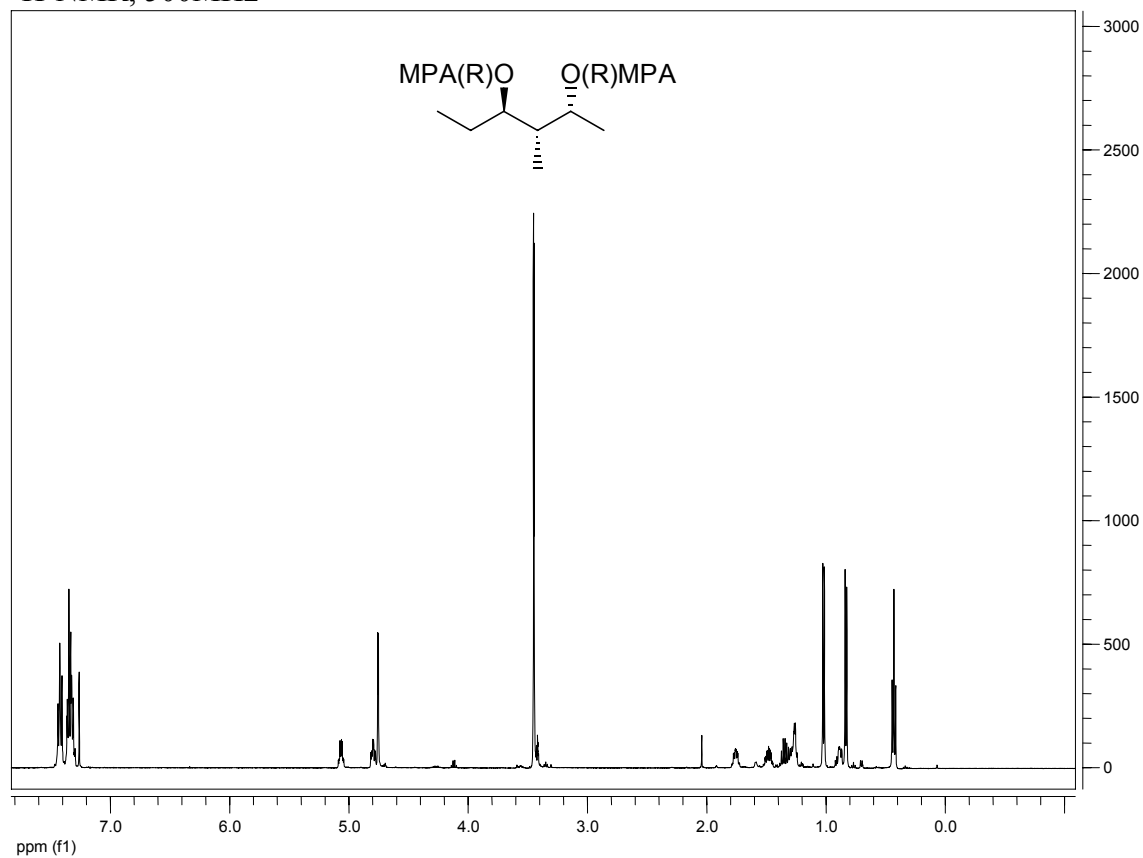
NMR 159

¹H-NMR, 500MHz



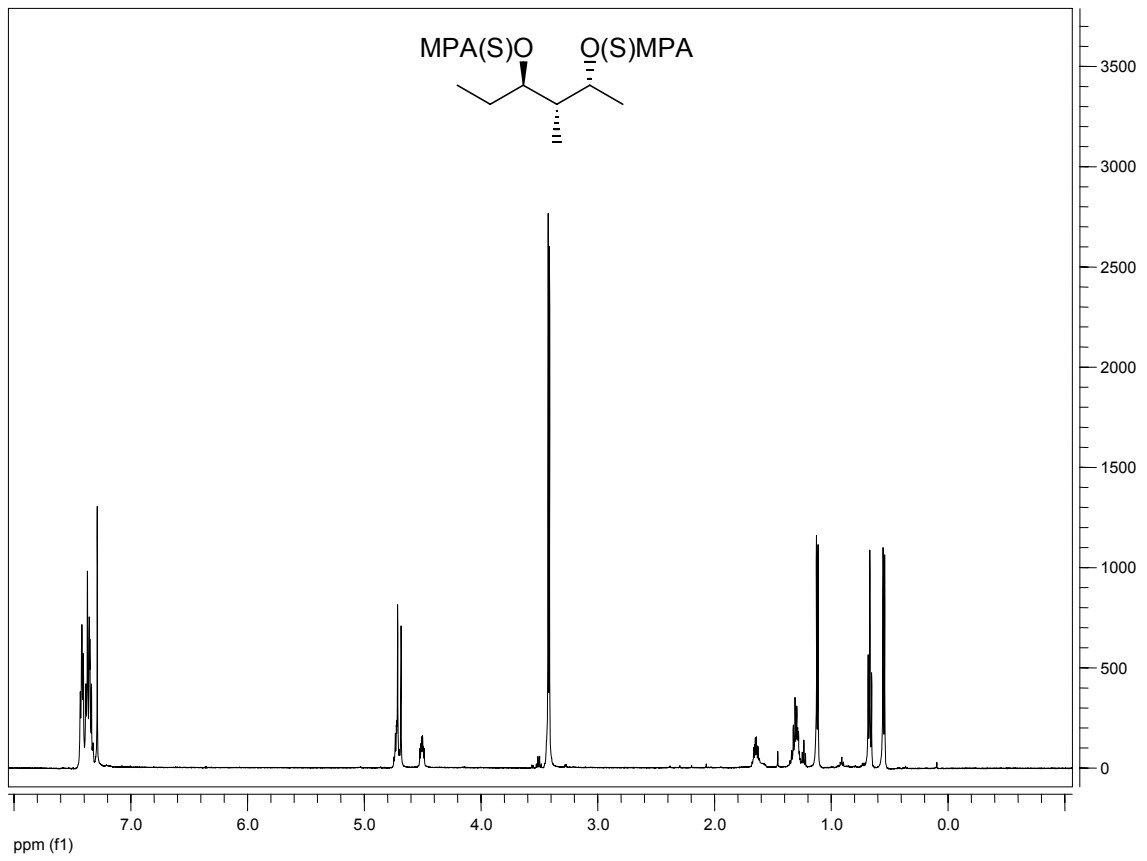
NMR 160

¹H-NMR, 500MHz



NMR 161

¹H-NMR, 500MHz



BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Crossley, R. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8155.
- ² Borman, S. *Chem. Eng. News* **1992**, 5.
- ³ Tatsuta, K.; Hosokawa, S. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4707.
- ⁴ a) Faber, K. *Biotransformation in organic Chemistry*, 3rd Edition, Springer, **1997**.: b) Wong and Whitesides *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series, volume 12
- ⁵ S. G. Neidleman. In *Biocatalysis*. (D. Abramowicz, ed.), pp. 1-24, Van Nostrand Reinhold, New York (1990).
- ⁶ Urdiales, E. G.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313.
- ⁷ C. Crosby. In *Chirality in Industry* (A. N. Collins, G. N. Sheldrake and J. Crosby, eds.), pp. 1-66. Wiley, Chichester (1992).
- ⁸ Davis, B. G.; Boyer, V. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 618.
- ⁹ Schoffers, E.; Golebiowski, A.; Johnson, C. R. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769.
- ¹⁰ Menger, F. M. *Acc. Chem. Res.* **1977**, 44.
- ¹¹ a) Reetz, M. T. ; Jaeger, K. –E. *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 31.; b) Reetz, M. T. ; Becker, M. H.; Kühling, K. M.; Holzwarth, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2647.; c) Arnold, F. H.; Volkov, A. A. *Curr. Opinion Chem. Biol.* **1999**, *3*, 54.; Arnold, F. H, Moore, J. C. (1999) Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution. In: *New Enzymes for Organic Synthesis*, Scheper T (ed) p 1, Springer, Berlin Heidelberg New York.
- ¹² Reetz, M. T.; Jaeger, K. –E. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 407.
- ¹³ a) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature*, **2001**, *409*, 258.; Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. *Science* **2003**, *299*, 1694.
- ¹⁴ Anfinsen, C. B. *Science* **1973**, *181*, 223.
- ¹⁵ Cooke, R.; Kuntz, I. D. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1974**, *3*, 95.
- ¹⁶ Zhou, B.; Copalan, S. A. ; Vanmiddlesworth, F.; Shieh, W.; Sih, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5925.
- ¹⁷ Fauve, A.; Veschambre, H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5215.
- ¹⁸ Lee, S. Y.; Hong, H. J.; Jeon, Y. N.; Won, K.; Kim, T. B. *Org. Process Res. & Dev.* **2004**, *8*, 948.
- ¹⁹ Miya, H.; Kawada, M.; Sugiyama, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 95.

-
- ²⁰ Patel, R. N.; Banerjee, A.; Szarka, L. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1767.
- ²¹ Nakamura, K.; Kawai, Y.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *25*, 2927.
- ²² Kawai, Y.; Takanobe, K.; Tsujimoto, M.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *1*, 147.
- ²³ Fadnavis, N. W.; Kumara, S. V.; Sharfuddin, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 3675.
- ²⁴ Taniguchi, T.; Ogasawara, K. *Chem. Commun.* **1997**, 1399.
- ²⁵ Berezina, N.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1953.
- ²⁶ Allen, J. V.; Williams, J. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1859.
- ²⁷ Dinh, P. M.; Howarth, J. A.; Hudnott, A. R.; Williams, J. M. J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623.
- ²⁸ Bradshaw, C. W.; Fu, H.; Shen, G. J.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526.
- ²⁹ Bradshaw, C. W.; Hummel, W.; Wong, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532.
- ³⁰ Nakamura, K.; Yoneda, T.; Miyai, T.; Ushio, K.; Oka, S.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 2453.
- ³¹ Jones, J. B. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351.
- ³² Velonia, K.; Tsigos, I.; Bouriotis, V.; Smonou, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 65.
- ³³ Wong, C. H.; Whitesides, G. M. "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", Tetrahedron Organic Chemistry Series, London, **1993**.
- ³⁴ Wong, C. H.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890.
- ³⁵ Oppenheimer, N. J.; Kaplan, N. O. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4675.
- ³⁶ Zhao, H.; Donk, W. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 583.
- ³⁷ Shaked, Z.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7104.
- ³⁸ Lamed, R.; Keinan, E.; Zeikus, J. E. *Enzyme Microb. Technol.* **1981**, *3*, 144.
- ³⁹ Wong, C. H.; Drueckhammer, D. G.; Sweers, H. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4028.
- ⁴⁰ a) Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Tohi, K.; Hamada, H. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6799; b) Nakamura, K.; Yamanaka, R. *Chem. Commun.* **2002**, 1782; c) Nakamura, K.; Yamanaka, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2529; d) Parkinson, B. A.; Weaver, P. F. *Nature* **1984**, *309*, 148–149.
- ⁴¹ a) Kambourakis, S.; Rozzell, J. D. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 699; b) Kambourakis, S.; Rozzell, J. D. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 663.

-
- ⁴² a) Patel, R. N.; Banerjee, A.; Howell, J. M.; McNamee, C. G.; Brzozowski, D.; Nanduri, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *4*, 2069.; b) Patel, R. N.; Banerjee, A.; Ko, R. Y.; Howell, J. M.; Li, W. S.; Comezoglu, F. T. *Biotech. Appl. Biochem.* **1994**, *20*, 23.
- ⁴³ Barrish, J. C.; Gordon, E.; Alam, M.; Lin, P. F.; Bisacchi, G. S.; Cheng, P. T. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1758.
- ⁴⁴ Patel, R. N.; Banerjee, A.; McNamee, C.; Brzozowski, D.; Szarka, L. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2547.
- ⁴⁵ Karenewsky, D. S.; Badia, M. C.; Cushman, D. W.; DeForrest, J. M.; Dejneka, T.; Loots, M. J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 204.
- ⁴⁶ Hanson, R. L.; Bembenek, K. S.; Patel, R. N.; Szarka, L. J. *Appl. Microb. Biotechnol.* **1992**, *37*, 599.
- ⁴⁷ Floyd, D. M.; Moquin, R. Y.; Atwal, K. S.; Ahmed, S. Z.; Spergel, S. H.; Gougoutas, J. Z. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5572.
- ⁴⁸ Patel, R. N.; Robinson, R. S.; Szarka, L. J.; Kloss, J.; Thottathil, J. K.; Mueller, R. H. *Enzyme Microb. Technol.* **1991**, *13*, 906.
- ⁴⁹ Patel, R. N.; McNamee, C. G.; Banerjee, A.; Howell, J. M.; Robinson, R. S.; Szarka, L. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 731.
- ⁵⁰ Sit, S. Y.; Parker, R. A.; Motoe, I.; Balsubramanian, H. W.; Cott, C. D.; Brown, P. J. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2982.
- ⁵¹ Patel, R. N.; Banerjee, A.; McNamee, C. G.; Brzozowski, D.; Hanson, R. L.; Szarka, L. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1014.
- ⁵² Patel, R. N.; Banerjee, A.; Chu, L.; Brzozowski, D.; Nanduri, V.; Szarka, L. J. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1998**, *75*, 1473.
- ⁵³ BioCatalytics, Inc., Pasadena CA, USA.
- ⁵⁴ a) Sawada, D.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10521; b) Paterson, I.; Chen, D. Y.-K.; Acena, J. L.; Franklin, A. S. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1513; c) Eustache, F.; Dalko, P. I.; Cossy, J.; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8823.
- ⁵⁵ a) Kobayashi, M.; Higuchi, K.; Murakami, M.; Tajima, Y.; Aoki, S. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2859. b) White, J. D.; Hanselmann, R.; Jackson, R. W.; Porter, W. J.; Ohba, Y.; Tiller, T.; Wang, S. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5217. c) Che, Y.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1249. d) Magnin-Lachaux, M.; Tan, Z.; Liang, B.; Negishi, E.-I. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1425. e) Liou, G. F.; Khosla, C. *Current Opinion*

Chemical Biology **2003**, *7*, 279. f) Hoffmann, R. W. *Angewandte Chemie* **1987**, *26*, 489. g) Paterson, I.; Doughty, V. A.; Florence, G.; Gerlach, K.; McLeod, M. D.; Scott, J. P.; Trieselmann, T., *ACS Symposium Series* **2001**, *783* (Organoboranes for Syntheses), 195-206. h) Chartrain, M.; Salmon, P. M.; Robinson, D. K.; Buckland, B. C. *Current Opinion in Biotechnology* **2000**, *11*, 209. i) Staunton, J.; Weissman, K. J. *Natural Product Reports* **2001**, *18*, 380. j) Hoffmann, R. W.; Helbig, W.; Ladner, W. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3479. k) Vicario, J. L.; Job, A.; Wolberg, M.; Müller, M.; Enders, D. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1023. l) Arai, N.; Chikaraishi, N.; Omura, S.; Kuwajima, I. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2845. m) Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Yalamanchili, G.; Hossain, M. B.; Van der Helm, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7251.

⁵⁶ Eustache, F.; Dalko, J. P.; Cossy, J. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8823.

⁵⁷ Schmitz, F. J.; Gunasekera, S. P.; Yalamanchili, G.; Hossain, M. B.; Van der Helm, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 7251.

⁵⁸ Eustache, F.; Dalko, P. J.; Cossy, J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1263.

⁵⁹ Yamada, T.; Nagata, T.; Sugi, K. D.; Yorozu, K.; Ikeno, T.; Ohtsuka, Y.; Miyazaki, D.; Mukaiyama, T. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4485.

⁶⁰ Vicario, J. L.; Badia, D.; Dominguez, E.; Rodriguez, M.; Carrillo, L. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3754.

⁶¹ Van Draanen, N. A.; Arseniyadis, S.; Crimmins, M. T.; Heathcock, H. C. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2499.

⁶² Wei, H-X.; Jasoni, R. L.; Shao, H.; Hu, J.; Pare, P. W. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11829

⁶³ Evans, D. A.; Nelson, J. V.; Vogel, E.; Taber, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3099.

⁶⁴ a) Mahrwald, R.; Schetter, B. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 281; b) Solsona, J. G.; Nebot, J.; Romea, P.; Urpí, F. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6533.

⁶⁵ Yamamoto, Y.; Maruyama, K. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 4607.

⁶⁶ Heathcock, C. H.; Buse, C. T.; Kleshick, W. A.; Pirrung, M. C.; Sohn, J. E.; Lampe, J. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1066.

⁶⁷ a) Mase, N.; Nakai, Y.; Ohara, N.; Yoda, H.; Takabe, K.; Tanaka, F.; Barbas III, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 734; b) Jankowska, J.; Mlynarski, J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1317; c) Li, H. J.; Tian, H. Y.; Wu, Y. C.; Chen, Y. J.; Liu, L.; Wang, D.;

-
- Li, C. J. *Adv. Synth. & Cat.* **2005**, *347*, 1247; d) Calderón, F.; Fernández, R.; Sánchez, F.; Fernández-Mayoralas, A. *Adv. Synth. & Cat.* **2005**, *347*, 1395.
- ⁶⁸ Marshall, A. J.; Yanik, M. M. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2173.
- ⁶⁹ a) Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T.; Harada, T. *Tetrahedron:Asymmetry* **2003**, *14*, 2659; b) Homann, M. J.; Vail, R. B.; Previte, E.; Tamarez, M.; Morgan, B.; Dodds, D. R.; Zaks, A. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 789.
- ⁷⁰ a) Buisson, D.; Henrot, S.; Larcheveque, M.; Azerad, R. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5033; b) Fauve, A.; Veschambre, H. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5215.
- ⁷¹ Pellissier, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8291–8327.
- ⁷² a) Kalaitzakis, D.; Rozzell, D. J.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Adv. Synth. & Cat.* **2006**, *348*, 1958. b) Kalaitzakis, D.; Rozzell, D. J.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799.
- ⁷³ Chen, Q.; Deng, H.; Zhao, J.; Lu, Y.; He, M.; Zhai, H. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8391.
- ⁷⁴ Corey, E. J.; Suggs, J. W. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *31*, 2647.
- ⁷⁵ Han, J.; Zhang, L. F.; Wan, W. *J. Organomet. Chem.* **2003**, *672*, 86.
- ⁷⁶ a) Chaikin, S. W.; Brown, W. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1949, *71*, 122; b) Toda, F.; Kiyoshige, K.; Yagi, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 320; c) Jorgensen, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *13*, 159.
- ⁷⁷ Kalaitzakis, D.; Rozzell, D. J.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2309.
- ⁷⁸ a) Schmuff, N. R.; Phillips, J. K.; Burkholder, W. E.; Fales, H. M.; Chen, C.-W. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1533; b) Phillips, J. K.; Walgenbach, C. A.; Klein, J. A.; Burkholder, W. E.; Schmuff, N. R.; Fales, H. M. *J. Chem. Ecol.* **1985**, *11*, 1263.
- ⁷⁹ a) Mori, K.; Ebata, T. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 4421; b) Walgenbach, C. A.; Phillips, J. K.; Burkholder, W. E.; King, G. G. S.; Slessor, K. N.; Mori, K. *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13*, 2159.
- ⁸⁰ a) Sato, F.; Takeda, Y.; Uchiyama, H.; Kobayashi, Y. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1132; b) Pilli, R. A.; Murta, M. M.; Russowsk, D.; Boeckelmann, M. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **1991**, *2*, 121.
- ⁸¹ a) Fauve, A.; Veschambre, H. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5037; b) Fujisawa, T.; Mobebe, B. I.; Shimizu, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5567; c) DiBattista, J. P.; Webster, F. X. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 423.

- ⁸² a) παραπομπή 73. b) Mori, K.; Yoshimura, T.; Sugai, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 899; c) Enders, D.; Lohray, B. B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 581; d) Razkin, J.; González, A.; Gil, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 3479; e) Pilli, R. A. V.; Riatto, B. *J. Braz. Chem. Soc.* **1999**, 10, 363; f) Corey, E. J.; Imwinkelried, R.; Pikul, S.; Xiang, Y. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 5493; g) Oppolzer, W.; Darcel, C.; Rochet, P.; Rosset, S.; Brabander, J. D. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1319; h) Eid, C. N.; Konopelski, J. P. *Tetrahedron* **1991**, 47, 975; i) Delas, C.; Szymoniak, J.; Thery, N.; Moïse, C. *Synth. Commun.* **1998**, 28, 2613.
- ⁸³ Wakefield, M. E.; Chambers, B. J. *J. Stored Prod. Res.* **2005**, 41, 145.
- ⁸⁴ Agelopoulos, N.; Birkett, M. A.; Hick, A. J.; Hooper, A. M.; Pickett, J. A.; Pow, E. M.; Smart, L. E.; Smiley, D. W. M.; Wadhams, L. J.; Woodcock, C. M. *J. Pestic Sci.* **1999**, 55, 225.
- ⁸⁵ a) Oppolzer, W.; Rodriguez, I. *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 1282; b) Ramachandran, P. V.; Zou, M.-F.; Brown, H. C. *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 3027.
- ⁸⁶ Heathcock, C. H.; Pirrung, M. C.; Sohn, J. E. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 4294.
- ⁸⁷ Seco, J. M.; Quinoa, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 17–117.
- ⁸⁸ Phillips, J. K.; Miller, S. P. F.; Andersen, J. F.; Fales, H. M.; Burkholder, W. E. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 6145.
- ⁸⁹ Faustini, D. L.; Giese, W. L.; Phillips, J. K.; Burkholder, W. E. *J. Chem. Ecol.* **1982**, 8, 679.
- ⁹⁰ a) Mori, K.; Ishikura, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1263. b) Chong, J. M. *Tetrahedron* **1989**, 45, 623.
- ⁹¹ a) Chong, J. M. *Tetrahedron* **1989**, 45, 623. b) Mori, K.; Ishikura, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 1263. c) Cheskis, B. A.; Moiseenkov, A. M.; Shpiro, N. A.; Stashina, G. A.; Zhulin, V. M. *Bull. Acad. Sci. USSR CH* **1990**, 39, 716. d) Cheskis, B. A.; Shpiro, N. A.; Moiseenkov, A. M. *Bull. Acad. Sci. USSR CH* **1991**, 40, 2205. e) Sugai, T.; Sakuma, D.; Kobayashi, N.; Ohta, H. *Tetrahedron* **1991**, 47, 7237. f) Chu, K. -H.; Zhen, W.; Zhu, X. -Y.; Rosenblum, M. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1173. g) Gu, J. -X.; Li, Z. -Y.; Lin, G. -Q. *Tetrahedron* **1993**, 49, 5805. h) Razkin, J.; González, A.; Gil, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 3479. i) DiBattista, J. P.; Webster, F. X. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 423. j) Gil, P.; Razkin, J.; González, A. *Synthesis* **1998**, 286. k) Puntambekar, H. M.; Naik, D. G. *Synth. Commun.* **1998**, 28, 2399. l) Mateus,

-
- C. R.; Feltrin, M. P.; Costa, A. M.; Coelho, F.; Almeida, W. P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6901.
- ⁹² Plarre, R. *J. Stored Prod. Res.* **1996**, *32*, 275.
- ⁹³ Pellissier, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8291.
- ⁹⁴ Razkin, J.; Gonzalez, A.; Gil, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 3479.
- ⁹⁵ a) Kuwahara, Y.; Fukami, H.; Ishii, S.; Matsumura, F.; Burkholder, W. E. *J. Chem. Ecol.* **1975**, *1*, 413. b) Kuwahara, Y.; Fukami, H.; Howard, R.; Ishii, S.; Matsumura, F.; Burkholder, W. E. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1769.
- ⁹⁶ White, P. R.; Birch, M. C. *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13*, 1695.
- ⁹⁷ Kodama, H.; Ono, M.; Kohno, M.; Ohnishi, A. *J. Chem. Ecol.* **1987**, *13*, 1871.
- ⁹⁸ a) Hoffmann, R. W.; Lander, W. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 4653. b) Hoffmann, R. W.; Lander, W.; Steinbach, K.; Massa, W.; Schmidt, R.; Snatzke, G. *Chem. Ber.* **1981**, *114*, 2786. c) Mori, K.; Ebata, T.; Sakakibara, M. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 709.
- ⁹⁹ a) Mori, K.; Ebata, T. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 4413. b) Mori, K.; Ebata, T. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 4685.
- ¹⁰⁰ a) Oppolzer, W.; Rodriguez, I. *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 1275. b) Oppolzer, W.; Rodriguez, I. *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 1282.
- ¹⁰¹ a) Gil, P.; Razkin, J.; González, A. *Synthesis* **1998**, 386. b) Mori, K.; Sano, S.; Yokoyama, Y.; Bando, M.; Kido, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1135.
- ¹⁰² a) Matteson, D. S.; Man, H-W. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6545. b) Matteson, D. S.; Man, H-W.; Ho, O. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4560.
- ¹⁰³ Bowess, A.; Halsall, T. G.; Jones, E. R. H.; Lemin, A. J. *J. Chem. Soc.* **1953**, 2548,
- ¹⁰⁴ Seco, J. M.; Quinoa, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17.
- ¹⁰⁵ a) Stiles, M.; Winkler, R.; Chang, Y.; Traynor, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3337-3342. b) House, H. O.; Crumrine, D. S.; Teranishi, A. Y.; Olmstead, H. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3310-3324.
- ¹⁰⁶ Heathcock, C. H.; Pirrung, M. C.; Sohn, J. E.; *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4294-4299.
- ¹⁰⁷ McConnell, H. M. *J. Chem. Phys.* **1957**, *27*, 226.
- ¹⁰⁸ Moritz, A. G.; Sheppard, N. *Mol. Phys.* **1962**, *5*, 361.
- ¹⁰⁹ Petit, Y.; Sanner, C.; Larchevêque, M. *Synthesis*, **1988**, 538.
- ¹¹⁰ Fráter, G.; Müller, U.; Günther, W. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1269.
- ¹¹¹ Kahn, M.; Fujita, K. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1137.
- ¹¹² Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512.

-
- ¹¹³ Trost, B. M.; Belletire, J. L.; Godleski, S.; Mcdougal, P. G.; Balkovec, J. M. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2370.
- ¹¹⁴ Seco, J. M.; Quinoa, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17.
- ¹¹⁵ Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2915.
- ¹¹⁶ α) Norcross, R. D.; Paterson, I. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2041. β) Borgos, S. E. F.; Tsan, P.; Sletta, H.; Ellingsen, T. E.; Lancelin, J. –M.; Zotchev, S. B. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2431.
- ¹¹⁷ Bode, S. E.; Wolberg, M.; Müller, M. *Synthesis*, **2006**, *4*, 557.
- ¹¹⁸ Fauve, A.; Veschambre, H. *Biocatalysis* **1990**, *3*, 95.
- ¹¹⁹ Ikeda, H.; Sato, E.; Sugai, T.; Ohta, H. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8113.
- ¹²⁰ (a) Patel, R. N.; Banerjee, A.; McNamee, C, G.; Brzozowski, D.; Hanson, R. L.; Szarka, L. J. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1014. (b) Patel, R. N.; McNamee, C, G.; Banerjee, A.; Szarka, L. J. *Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 52826.
- ¹²¹ Müller, M.; Wolberg, M.; Hummel, W.; Wandrey, C. *Chem. Abstr.* **2001**, *134*, 99679.