

**Badania nad zastosowaniem układów enzym-
enzym i enzym-metal do syntezy
enantjomerycznie czystych estrów wybranych
kwasów karboksylowych**

**The studies on the application of enzyme-enzyme and
enzyme-metal systems to the synthesis of
enantiomerically pure esters of selected carboxylic acids**



K-9-172
K-C-130

A-21-6
K-C-124

Mgr inż. Małgorzata Zysk

Praca doktorska

wykonana w Instytucie Chemii Organicznej PAN

w latach 2010 – 2014

Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.440/22



10000000110133

Warszawa 2022



B. Org. 440/22

*Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi,
Panu Prof. dr hab. inż. Ryszardowi Ostaszewskiemu
za wybór interesującej tematyki badawczej oraz za wszechstronną pomoc i
cierpliwość podczas realizacji niniejszej pracy.*

*Dziękuję również koleżankom i kolegom z Zespołu XX, w szczególności
Annie Brodzkiej oraz Szymonowi Kłossowskiemu za wiele lat wspólnej pracy
i za nieocenione rady dotyczące syntezy organicznej i biokatalizy.*

Dziękuję mojemu Mężowi Marcinowi za nieustanną motywację i wsparcie.

Szczególnie serdecznie pragnę podziękować dr. Dominikowi Koszelewskiemu za pomoc udzieloną podczas wykonywania badań nad dynamicznym rozdziałem kinetycznym.

Serdecznie podziękowania składam również Panu Wiktorowi Ignacakowi za współpracę i pomoc przy rozwiązywaniu problemów w dziedzinie wysokosprawnej chromatografii cieczowej, a także Panu dr. Stanisławowi Berłożeckiemu za cenne uwagi dotyczące pracy w laboratorium.

Dziękuję Ani Żądło za lata wspólnej pracy i pomoc w syntezie związków.

Serdecznie dziękuję także Dyrektorowi Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie za umożliwienie wykonania pracy doktorskiej.

*Wykonane badania były realizowane w ramach projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”,
Nr projektu: POIG.01.03.01-00-158/09-07.*



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Niniejszą pracę dedykuję moim Synom:

Wojciechowi i Wiktorowi.

Streszczenie

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań nad zastosowaniem układów enzym-enzym i enzym-metal do syntezy estrów wybranych kwasów karboksylowych. Estry te są związkami użytecznymi w przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym, a także ważnymi substratami w syntezie wielu związków biologicznie aktywnych stosowanych w przemyśle farmaceutycznym.

W pierwszej części pracy wykonano badania nad zastosowaniem węglanów dialkilowych jako donorów grupy alkoksylowej w reakcji estryfikacji katalizowanej przez wybrane enzymy. W ramach wykonanych badań oznaczono zależność pomiędzy zawartością wody w mieszaninie reakcyjnej a wydajnością badanej reakcji. Zaproponowano nowy mechanizm enzymatycznej estryfikacji węglanami dialkilowymi, który uwzględnia strukturę węglanu. Oznaczono wpływ enzymów na przebieg badanej reakcji i stwierdzono, że mieszanina pięciu wybranych enzymów katalizuje reakcję o wiele efektywniej niż każdy z tych enzymów oddzielnie. Jest to przykład pierwszego multienzymatycznego systemu, który efektywnie i enancjoselektywnie katalizuje reakcję estryfikacji kwasów karboksylowych.

W drugiej części wykonano badania nad zastosowaniem ortoestrów trialkilowych do estryfikacji pochodnych kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Wykonano badania optymalizacyjne uwzględniające wpływ budowy donora grupy alkoksylowej oraz biokatalizatora na przebieg reakcji. Opracowano warunki enzymatycznego rozdziału kinetycznego (EKR) otrzymując nieracemiczne i enancjomerycznie czyste estry badanych kwasów.

W trzeciej części wykonanych badań opracowaną powyżej metodologię wykorzystano do enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych. Zoptymalizowano warunki EKR dobierając odpowiedni rozpuszczalnik organiczny, biokatalizator oraz donor grupy alkoksylowej. Następnie wykonano badania nad rozszerzeniem opracowanego EKR do enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego (EDKR). W tym celu w pierwszym etapie wykazano, że możliwa jest chemoselektywna racemizacja chiralnego kwasu 3-hydroksy-3-arylopropanowego kompleksami metali grup przejściowych. Natomiast enancjomerycznie czysty ester tego kwasu w tych warunkach nie ulega racemizacji. W kolejnym etapie zoptymalizowano warunki reakcji EDKR, w których otrzymano enancjomerycznie czyste estry z wydajnością dwukrotnie wyższą niż w EKR (powyżej 80%). Jest to pierwszy przykład EDKR racemicznych kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych.

Zaletami opracowanych procedur jest łatwość wydzielenia i oczyszczenia produktu, możliwość regeneracji katalizatora metalicznego i biokatalizatora, niski koszt, wysoka wydajność i enancjoselektywność. Ponadto istnieje możliwość ponownego wykorzystania produktów ubocznych reakcji (odpowiedniego alkoholu alkilowego i estru), czyniąc proces praktycznie bezodpadowym, co jest szczególnie ważne w przypadku syntez w skali technologicznej.

Abstract

In this thesis the studies on the application of enzyme-enzyme and enzyme-metal systems in the synthesis of selected esters are presented. Target esters are valuable compounds in food and cosmetic industry. Moreover, some of them are important building blocks in the synthesis of biologically active compounds.

In the first part of the thesis the studies on application of dialkyl carbonates as alkoxy group donors for the enzymatic esterification of carboxylic acids are shown. The impact of water content on the reaction yield was examined. The alternative mechanism of enzymatic esterification with dialkyl carbonates was proposed. The plausible pathway considered the carbonate structure. The influence of biocatalyst on reaction course was determined. The obtained results indicated that, the mixture of five enzymes is much more effective catalyst of the studied reaction than single enzyme. This is the first example of the multienzymatic system, which effectively and enantioselectively catalyses the enzymatic esterification.

In the second part the studies on the application of trialkyl orthoesters for enzymatic esterification of 3-aryl-4-pentenoic acids are shown. The optimization studies of the process were conducted, considering the influence of the alkoxy group donor structure, biocatalyst, time and temperature on the reaction course. The enantiomerically enriched and enantiopure esters were obtained under developed enzymatic kinetic resolution (EKR) conditions.

In the next part of the thesis, previously developed procedure was used for enzymatic kinetic resolution of racemic 3-hydroxy-3-arylpropanoic acids. The optimization studies were performed, considering the influence of alkoxy group donor structure, biocatalyst, solvent, time and temperature on the reaction course. Subsequently, the developed EKR protocol was extended to enzymatic dynamic kinetic resolution (EDKR) *via* introduction of the racemization catalyst (transition group metal complex). At first, the studies on chemoselective racemization of 3-hydroxy-3-arylpropanoic acid were conducted. Whereas, under the same reaction conditions, the racemization of enantiomerically pure ester of studied acid did not occur. Next, EDKR protocol was optimized, leading to enantiomerically enriched and enantiopure esters with twofold higher yields than in EKR reactions (more than 80%). This is the first example of EDKR of racemic 3-hydroxy-3-arylpropanoic acids.

The major advantages of developed procedures are the simplicity of product isolation and purification, recovery of biocatalyst and metal catalyst, low cost, high efficiency and excellent enantioselectivity. In addition, the possibility of reusability of byproducts (corresponding alkyl alcohol and ester) recycling is crucial for the technological scale synthesis.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej ukazały się w następujących publikacjach:

1. **Zysk, M.;** Zadło, A.; Brodzka, A.; Wisniewska, C.; Ostaszewski, R.; „*The unexpected kinetic effect of enzyme mixture: The case of enzymatic esterification*” J. Mol. Catal. B: Enzymatic **2014**, *102*, 225-229.
2. Koszelewski, D.; **Zysk, M.;** Brodzka, A.; Żądło, A.; Paprocki, D.; Ostaszewski, R.; „*Evaluation of a new protocol for enzymatic dynamic kinetic resolution of 3-hydroxy-3(aryl)propanoic acids*” Org. Biomol. Chem. **2015**, 11014-11020.

Metodologia wykonywanych badań została zastrzeżona w następujących zgłoszeniach patentowych:

1. Ostaszewski, R.; **Ćwiklak, M.;** Wóltańska, A.; Kłossowski, S.; Żądło, A.; 2011, „*Sposób wytwarzania achiralnych i chiralnych, nieracemicznych estrów kwasów karboksylowych*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P.394228
2. Ostaszewski, R.; **Ćwiklak, M.;** Wóltańska, A.; Kłossowski, S.; Żądło, A.; 2011, „*Sposób wytwarzania estrów kwasów karboksylowych z wykorzystaniem mieszaniny enzymów oraz węglanów alkilowych oraz kompozycja znajdująca w nim zastosowanie*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P.394722
3. Ostaszewski, R.; **Ćwiklak, M.;** Wóltańska, A.; Kłossowski, S.; 2011, „*Sposób biokatalitycznego wytwarzania chiralnych, nieracemicznych kwasów i estrów kwasów karboksylowych z zastosowaniem ortoestrów kwasów aromatycznych i związek do stosowania w tym sposobie*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P.394723
4. Ostaszewski, R.; Brodzka, A.; **Ćwiklak, M.;** 2011, „*Sposób wytwarzania nieracemicznych estrów kwasów karboksylowych wykorzystujący enzymy i kompleksy metali*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P.396417

Opublikowane prace, które nie wchodzą w zakres rozprawy doktorskiej:

1. Koszelewski D, **Cwiklak M.**, Ostaszewski R. “*A new chemoenzymatic approach to the synthesis of chiral 4-aryl-1,4-dihydro-2H-isoquinolines via the enzymatic resolution of 2-acetyl-4-phenyl-1,4-dihydro-2H-isoquinolin-3-one*” Tetrahedron: Asymmetry, **2012**, *23*, 1256-1261.

2. Brodzka, A.; Koszelewski, D.; **Cwiklak, M.**; Ostaszewski, R.; „*Studies on the chemoenzymatic synthesis of 3-phenyl-GABA and 4-phenyl-pyrrolid-2-one: the influence of donor of the alkoxy group on enantioselective esterification*” *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 427-433.

3. Klossowski, S., Brodzka, A., **Zysk, M.**, Ostaszewski, R., “*Chemoenzymatic synthesis and application of new, mild-cleavable chiral auxiliary for synthesis of peptidomimetics via Ugi reaction*” *Tetrahedron: Asymmetry*, **2014**, *25*, 435-442

4. Wiśniewska., C.; Koszelewski, D.; **Zysk, M.**; Klossowski, S.; Żądło, A.; Brodzka, A.; Ostaszewski, R.; „*Enzymatic Synergism in the Synthesis of β -ketoesters*” *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *24*, 5432-5437.

5. Koszelewski D., Brodzka A., Żądło A., Paprocki D., Trzepizur D., **Zysk M.**, Ostaszewski R.; “*Dynamic kinetic resolution of 3-aryl-4-pentenoic acids*” *ACS Catal.*, 2016, *6*, 3287–3292.

6. Brodzka A., Koszelewski D., **Zysk M.**, Ostaszewski R.; “*The mechanistic promiscuity of the enzymatic esterification of chiral carboxylic acids*” *Cat. Comm.* **2018**, *106*, 82-86.

Zgłoszenia patentowe zawierające wyniki nie ujęte w pracy doktorskiej:

1. Ostaszewski, R.; Żądło, A.; **Zysk, M.**; Brodzka, A.; Klossowski, S.; 2014, „*Nowe pochodne kumaryny, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie w sposobie wykrywania i/lub oznaczania aktywności katalitycznej i stereoselektywności reakcji hydrolaz*” Polskie zgłoszenie patentowe nr: P 407948.

Ac – grupa acylowa – $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$
AE- analiza elementarna
Ar – grupa aromatyczna
BINAP – (2,2')-bis(difenylofosfino)-1,1'-binaftyl
BKAP – proszek acetonowy z nerki wołowej
BLAP – proszek acetonowy z wątroby wołowej
c – konwersja reakcji
CAL-B – lipaza B z *Candida antarctica*
CLAP – proszek acetonowy z wątroby kurzej
DCM – dichlorometan
DKR – dynamiczny rozdział kinetyczny
DLAP – proszek acetonowy z wątroby kaczej
DMF – dimetyloformamid
DMSO – dimetylosulfotlenek
E – enancjoselektywność
ee – nadmiar enancjomeryczny
EKR – enzymatyczny rozdział kinetyczny
Et – grupa etylowa – C_2H_5
FDA – Agencja Żywności i Leków
GLAP – proszek acetonowy z wątroby gęskiej
HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
JLAP – proszek acetonowy z wątroby jeleniej
KR – rozdział kinetyczny
LAP – proszek acetonowy z wątroby
Me – grupa metylowa – CH_3
OMe – grupa metoksy - $\text{CH}_3\text{O}-$
Ph – grupa fenylowa – C_6H_5-
PLAP - proszek acetonowy z wątroby świńskiej
PLE – esteraza z wątroby świńskiej
RLAP – proszek acetonowy z wątroby króliczej
t-Bu – grupa *tert*-butylowa – $(\text{CH}_3)_3$
Novozym 435 – immobilizowana lipaza B z *Candida antarctica*
TBME – eter *tert*-butylo-metylowy
THF – tetrahydrofuran
TLAP – proszek acetonowy z wątroby indyczej
TLC – chromatografia cienkowarstwowa
TMS – grupa trimetylosililowa – $(\text{CH}_3)_3\text{Si}-$

WLAP – proszek acetonowy z wątroby dziczej
Wyd., W. – wydajność reakcji

Spis treści

1. WSTĘP.....	5
2. ENZYMY W STEREOSELEKTYWNEJ SYNTEZIE ORGANICZNEJ	7
2.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny	10
2.2. Bezpośrednia enzymatyczna estryfikacja kwasów karboksylowych.....	12
2.3. Enzymatyczna desymetryzacja kwasów dikarboksylowych i ich bezwodników	19
2.4. Zastosowanie innych donorów grupy alkoksylowej w enzymatycznej estryfikacji kwasów karboksylowych	21
2.5. Wielozadaniowość enzymów (promiskuityzm) oraz współdziałanie enzymów (efekt synergii i kaskada enzymatyczna)	25
3. DYNAMICZNY ROZDZIAŁ KINETYCZNY	29
3.1. Mechanizmy działania katalizatorów metalicznych	32
3.2. Dynamiczny rozdział kinetyczny alkoholi drugorzędowych.....	35
4. PODSUMOWANIE CZĘŚCI LITERATUROWEJ.....	43
5. BADANIA WŁASNE.....	44
5.1. Koncepcja i cel badań	44
5.2. Zastosowanie enzymatycznej estryfikacji węglanami alkilowymi do syntezy estrów wybranych kwasów karboksylowych.	46
5.2.1. Badania nad oznaczeniem wpływu biokatalizatora na reakcję enzymatycznej estryfikacji węglanami alkilowymi	46
5.2.2. Wpływ wody na wydajność procesu i proponowany mechanizm reakcji	49
5.2.3. Wpływ struktury substratu na przebieg reakcji.....	52
5.2.4. Podsumowanie podrozdziału.....	54
5.3. Enzymatyczna estryfikacja pochodnych kwasu 3-arylo-4-pentenowego	55
5.3.1. Synteza racemicznych pochodnych kwasu 3-arylo-4-pentenowego.....	56
5.3.2. Zastosowanie ortoestrów trietylowych jako donorów grupy alkoksylowej w enzymatycznym rozdziale kinetycznym pochodnych kwasu 3-arylo-4-pentenowego ..	59
5.3.3. Zastosowanie ortoestrów trimetylowych oraz innych donorów grupy metoksylowej	62
5.3.4. Podsumowanie podrozdziału 5.3.....	64
5.4. Badania nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych	65
5.4.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego w enzymatycznej nieodwracalnej estryfikacji.....	67
5.4.2. Badania nad wpływem podstawnika w pierścieniu aromatycznym substratu na EKR kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych	71
5.4.3. Badania nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego	74
5.4.4. Podsumowanie podrozdziału 5.4.....	83
6. WNIOSKI	85
7. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	88
7.1. Uwagi ogólne	88
7.2. Enzymatyczna estryfikacja wybranych kwasów karboksylowych węglanami dialkilowymi	89
7.3. Enzymatyczny rozdział kinetyczny p-podstawionych pochodnych kwasu 3-fenylo-4-pentenowego	95
7.3.1. Synteza racemicznych p-podstawionych pochodnych kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	95
7.3.2. Enzymatyczna estryfikacja p-podstawionych pochodnych kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	100

7.4. Enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasów 3-hydrokso-3-arylopropanowych	101
7.4.1. Synteza racemicznych kwasów 3-hydrokso-3-arylopropanowych	101
7.4.2. Enzymatyczna estryfikacja (EKR) kwasów 3-hydrokso-3-arylopropanowych.	109
7.4.3. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu 3-hydrokso-3-(4-nitrofenilo)- propanowego	110

1. Wstęp

W ostatnich latach w przemyśle chemicznym szczególną uwagę zwraca się na zastosowanie metod syntezy spełniających wymogi tzw. „zielonej chemii”. Niejednokrotnie są to metody na ogół droższe od tych powszechnie stosowanych, zarówno w przypadku medium reakcyjnego jak i katalizatorów danej reakcję w skali przemysłowej. Dlatego kluczowym staje się poszukiwanie nowych, efektywnych, biodegradowalnych katalizatorów oraz takich, które mogą być używane wielokrotnie. Wymagania przemysłu chemicznego, w szczególności biorąc pod uwagę rynek medyczny, dotyczą również syntezy związków o wysokiej czystości optycznej.¹ Grupą katalizatorów posiadających zdolność do przeprowadzania takich przemian są enzymy. Biokataliza stała się alternatywą dla tradycyjnych metod metalo- i organokatalizy w syntezie organicznej². Najczęściej stosowane są enzymy z grupy hydrolaz, które optimum aktywności katalitycznej osiągają w warunkach wodnych. Niesie to za sobą szereg problemów t. j.: regeneracja enzymu, ograniczona rozpuszczalność związków organicznych w wodzie, problematyczne wydzielanie i oczyszczanie produktu reakcji, sterylność środowiska reakcyjnego, utrzymanie stałych warunków reakcji (pH) oraz silniejsze oddziaływanie enzymu z innymi reaktantami np. katalizatorami metalicznymi, które mogą inhibować jego działanie. Rozwiązywanie tych problemów w skali technologicznej niesie za sobą ogromne nakłady finansowe. Alternatywną metodą jest prowadzenie reakcji w rozpuszczalnikach organicznych. Grupą enzymów zdolną do katalizowania reakcji m. in. hydrolizy, estryfikacji i acylowania w takich warunkach są lipazy (należące do grupy hydrolaz). Z punktu widzenia praktycznego zastosowania, zaletą estryfikacji i hydrolizy jest łatwość oddzielenia produktu od substratu. Natomiast istotnym problemem w przypadku estryfikacji jest jej odwracalność. Metoda syntezy estrów, która eliminowałaby ten problem i jednocześnie spełniałaby wymagania „zielonej chemii” byłaby niezwykle wartościowa w zastosowaniach syntetycznych. Opracowanie wydajnej metodologii enzymatycznej estryfikacji byłoby uzupełnieniem znanych metod rozdziałów kinetycznych katalizowanych przez hydrolazy. Natomiast rozszerzenie

¹ (a) M. C. Nunez, M. E. Garcia-Rubino, A. Conejo-Garcia, O. Cruz-Lopez, M. Kimatrai, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. M. Campos, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2064–2074; (b) R. N. Patel, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 659–701; (c) H. Murakami, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *269*, 273–299; (d) R. N. Patel, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* **2006**, *9*, 741–764; (e) Patel, R. N. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1289–1321.

² a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins; *Nature* **2012**, *485*, 185; b) P. Clapés, X. Garrabou; *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2263; c) G. de Gonzalo, A. A. Orden, F. R. Bisogno; *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2598.

procesu EKR (enzymatycznego rozdziału kinetycznego) do EDKR (enzymatycznego, dynamicznego rozdziału kinetycznego) umożliwiłoby przekroczenie 50% wydajności procesu, co jest istotnym ograniczeniem rozdziałów kinetycznych.

2. Enzymy w stereoselektywnej syntezie organicznej

Z uwagi na niesymetryczny charakter układów biologicznych, większość związków atywnych biologicznie jest chiralna, a ich działanie jest ściśle związane z konfiguracją absolutną. Dlatego też asymetryczna synteza organiczna cieszy się niesłabnącym zainteresowaniem od wielu lat. Istnieje szereg metod wykorzystywanych do syntezy enancjomerycznie czystych cząsteczek, które zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Metody wykorzystywane do otrzymywania związków enancjomerycznie czystych.

Metoda	Zalety	Wady	Przykład
pomocnik chiralny	bardzo wysoki <i>ee</i>	dodatkowe etapy (reakcje): wprowadzenia lub usunięcia pomocnika chiralnego	reakcja aldolowa Evansa ³ sultam Oppolzera ⁴
chiralny reagent	bardzo wysoki <i>de</i>	wąski zakres substratów	redukcja BINAL-H ⁵ redukcja Alpine-Borane ⁶
chiralny katalizator	ekonomiczny bardzo wysoki <i>ee</i>	czasochłonna optymalizacja warunków reakcji	organokataliza ⁷ redukcja CBS ⁸ EKR, DKR
fizyczny rozdział enancjomerów	bardzo wysoka czystość enancjomeryczna	wydajność tylko do 50%	hydrolityczny rozdział kinetyczny Jacobsena ⁹ sole diastereomeryczne ¹⁰
chiral pool	<i>ee</i> >99%	wąski zakres substratów ze względu na budowę przestrzenną	aminokwasy ¹¹ cukry ¹²

³A. N. Majid, M. H. V. Zadsirjan; *J. Organomet. Chem.* **2021**, 932, 121629.

⁴L. Zhang, L. Zhu, J. Yang, J. Luo, R. Hong; *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 3890–3900.

⁵J. M. Chong, E. K. Mar; *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 893–896.

⁶M. M. Midland; *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1553–1561

⁷David W. C. MacMillan; *Nature* **2008**, 455, 304–308.

⁸E. J. Corey, C. J. Helal; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 1986–2012.

⁹S. Kemper, P. Hrobárik, M. Kaupp, N. E. Schlörer; *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 12, 4172–4173

¹⁰V. S. Sista, J. von Langermann, H. Lorenz, A. Seidel-Morgenstern; *Cryst. Growth Des.* **2011**, 11, 3761–3768.

¹¹L. M. Waykole, J. J. McKenna, A. Bach, M. Prashad, O. Repič, T. J. Blacklock; *Synth. Com.* **2007**, 9, 1445–1454.

¹²A. J. Wagner, D. Y. Zubarev, A. Aspuru-Guzik, D. G. Blackmond; *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3, 322–328.

Badania wykonane w ramach realizacji niniejszej pracy skupiają się na zastosowaniu enzymów (chiralnych katalizatorów) w procesach EKR i EDKR.

Obecnie bardzo dużą uwagę przywiązuje się do przyjaznych środowisku rozwiązań technologicznych, również w zakresie syntezy organicznej. Nieustannie poszukiwane są nowe, chiralne katalizatory, które umożliwiałyby efektywną syntezę określonego stereoizomeru produktu. Właśnie takimi biokatalizatorami są enzymy, których budowa i funkcje umożliwiają otrzymywanie produktów enancjomerycznie czystych¹³. Wiele enzymów należy do białek złożonych, które składają się z części białkowej i związanej z nią grupy prostetycznej. Grupą prostetyczną może być polisacharyd, lipid, porfiryna lub kation metalu¹⁴. W niektórych enzymach grupa prostetyczna związana jest w sposób odwracalny, wówczas część białkowa nosi nazwę apoenzymu, a niebiałkowa, prostetyczna – koenzymu¹⁵. Również w porównaniu z katalizatorami chemicznymi różnica mas cząsteczkowych jest bardzo duża (1000 Da, enzymy powyżej 10 kDa).

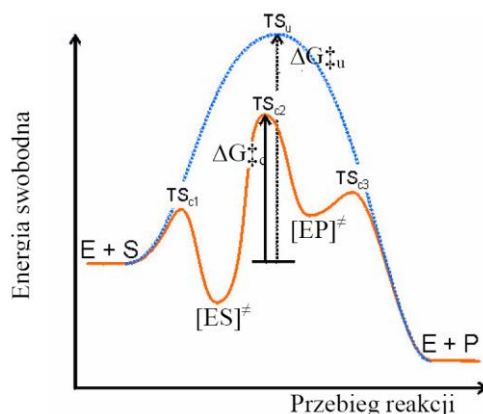
Warunki reakcji katalizowanych przez enzymy są zwykle łagodniejsze w porównaniu do warunków tradycyjnej syntezy organicznej, co jest wynikiem zmiany mechanizmu takiej reakcji. Każda reakcja chemiczna jest scharakteryzowana przez dwie wielkości: stałą równowagi i stałą szybkości reakcji. Siłą napędową każdej reakcji jest zmiana energii swobodnej. Zmianę energii swobodnej dla reakcji katalizowanej i niekatalizowanej enzymatycznie przedstawia Rysunek 1¹⁶. Przedstawia on profil dla spontanicznej reakcji jednoetapowej (kolor niebieski) oraz dla reakcji przebiegającej zgodnie z modelem Michaelis-Menten (kolor czerwony).

¹³ Sh. Shoda, H. Uyama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi; *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2307–2413.

¹⁴ <http://goldbook.iupac.org>

¹⁵ Kafarski P., Lejczak B. *Chemia bioorganiczna*, PWN, Warszawa, **1994**, 11 - 12.

¹⁶a) Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer – Verlag, Berlin, **1997**; b) A. J. Kirby, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 707-724.



gdzie: E – enzym; S – substrat; P – produkt; $[ES]^\ddagger$ - kompleks enzym – substrat (produkt pośredni); $[EP]^\ddagger$ - kompleks enzym – produkt (produkt pośredni); TS_c , TS_u – stany przejściowe odpowiednio: reakcji enzymatycznej i nieenzymatycznej; ΔG^\ddagger - zmiana energii swobodnej – energia aktywacji reakcji.

Rysunek 1. Zmiana energii swobodnej dla reakcji katalizowanej i niekatalizowanej enzymatycznie^{16b}.

W trakcie reakcji enzymatycznej najpierw tworzony jest kompleks enzym – substrat ($[ES]^\ddagger$) poprzez stan przejściowy (TS_{c1} – lokalne maksimum). Następnie kompleks enzym – substrat ulega przemianie w kompleks enzym – produkt ($[EP]^\ddagger$) przez stan przejściowy o najwyższej energii swobodnej (TS_{c2}). Różnica energii pomiędzy energią stanu przejściowego TS_{c2} a energią substratów jest nazywana energią aktywacji reakcji enzymatycznej (ΔG_c^\ddagger). Kompleks enzym – produkt rozpada się do produktu i enzymu przez stan przejściowy TS_{c3} . Należy zaznaczyć, że w przypadku reakcji niekatalizowanej enzymatycznie energia aktywacji jest zdecydowanie wyższa (TS_u).

Enzymy jako katalizatory cechuje szereg zalet, m. in.: wysoka specyficzność substratowa. Są biokatalizatorami chemo-, regio- i enancjoselektywnymi, co wynika z ich budowy¹⁷. Centrum aktywne enzymu zawiera odpowiednio ułożone grupy funkcyjne (grupy boczne L-aminokwasów), które biorą bezpośredni udział w procesie katalitycznym. Ponadto reakcje katalizowane przez enzymy przebiegają w łagodnych warunkach tj.: ciśnienie atmosferyczne, pH ok. 7 i temperatury 20-35°C. Enzymy są homochiralnymi katalizatorami, które rozpoznają poszczególne enancjomery racemicznych substratów, co jest wykorzystywane w enzymatycznym rozdziale kinetycznym.

¹⁷ Dranz H., Waldman M. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley VCH, Weinheim, 2002.

2.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny

Historycznie reakcje EKR-u mają swój początek już w XIX wieku. Louis Pasteur dodał do roztworu winianu amonowego mikroorganizmy z rodzaju *Penicilium glaucum*, które zmetabolizowały („skonsumowały”) tylko jeden z enancjomerów¹⁸. Natomiast ponad 30 lat później Emil Fischer potraktował mieszanę racemiczną (*D*, *L*)-heksozy drożdżami, które metabolizowały enancjomer *D*¹⁹. Niemniej jednak intensywne badania w zakresie biokatalizy rozpoczęły się wiele lat później. Z punktu widzenia chemika idealny rozdział kinetyczny powinien spełniać następujące warunki:

- produkt jest otrzymywany z ilościową wydajnością oraz $ee > 99\%$,
- substrat oraz katalizator powinny być tanie i łatwo dostępne,
- czas reakcji powinien być krótki,
- łatwa izolacja i oczyszczanie produktu,
- reakcja powinna być powtarzalna,
- zakres substratowy powinien być szeroki.

W praktyce jednak najważniejszy jest taki dobór warunków, aby można było łatwo wydzielić substrat, jak i produkt; łatwo dostępny i odnawialny katalizator, a także wysoka enancjoselektywność reakcji²⁰.

Ostatni punkt jest „naturalną” cechą enzymów, ponieważ są one zbudowane z *L*-aminokwasów. Oznacza to, że oddziaływanie enzym-substrat jest oddziaływaniem diastereoizomerycznym. To decyduje o enancjoselektywności i diastereoselektywności reakcji. Jeżeli substratem reakcji jest racemat, czyli równomolowa mieszanina enancjomerów (S_R i S_S)²¹ wtedy głównym produktem reakcji może być tylko jeden z enancjomerów (P_R lub P_S). Nadmiar enancjomeryczny substratu ($e.e._s$) i produktu ($e.e._p$) zgodnie z definicją jest to stosunek różnicy ilości enancjomerów odpowiednio substratu (S_S i S_R) i produktu (P_S i P_R) do ich sumy pomnożony przez 100²².

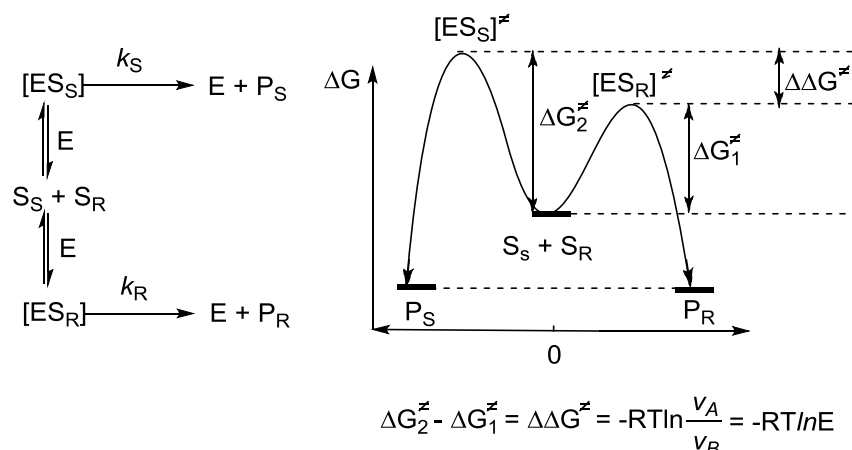
¹⁸C. R. Pasteur *Hebd. Seances Acad. Sci.* **1858**, 46, 615.

¹⁹E. Fischer *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1890**, 23, 370.

²⁰J. M. Keith, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen; *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 5-26.

²¹R. E. Gawley *JOC* **2006**, 71, 2411-2416.

²²H. B. Kagan, J. C. Fiaud; *Top. Stereochem.* **1998**, 18, 249-330;



Schemat 1. Reakcja katalizowana enzymatycznie. Substrat S jest równomolową mieszaniną enancjomerów.

Schemat 1 przedstawia rozkład energii swobodnej dla tworzących się diastereomerycznych produktów pośrednich dla obydwu enancjomerów ($[ES_S]^{\ddagger}$ i $[ES_R]^{\ddagger}$). Z punktu widzenia termodynamiki reakcji enancjoselektywność wynika z różnicy pomiędzy energią aktywacji tworzenia się $[ES_S]^{\ddagger}$ i $[ES_R]^{\ddagger}$.

Enancjoselektywność reakcji enzymatycznej (E) jest parametrem bezwymiarowym i została zdefiniowana przez równania Siha²³:

$$1. E = \frac{\ln [(1-c)(1-e.e_S)]}{\ln [(1-c)(1+e.e_S)]} \quad 2. E = \frac{\ln [1-c(1+e.e_P)]}{\ln [1-c(1-e.e_P)]} \quad 3. E = \frac{\ln \frac{[e.e_P(1-e.e_S)]}{(e.e_P+e.e_S)}}{\ln \frac{[e.e_P(1+e.e_S)]}{(e.e_P+e.e_S)}}$$

$$\text{gdzie: } e.e_P = \frac{P_S - P_R}{P_S + P_R}, \quad e.e_S = \frac{S_S - S_R}{S_S + S_R}$$

Najczęściej wykorzystywane są wzory 1 i 2, które uwzględniają stopień konwersji reakcji c. Jeżeli wyznaczenie konwersji reakcji nie jest możliwe, enancjoselektywność reakcji wyznaczamy ze wzoru 3. Bardzo ważne jest, aby przy obliczeniach podać wzór, z którego korzystano. Wartość E reakcji poniżej 15 oznacza, że ta reakcja ma ograniczone zastosowanie praktyczne. Jeżeli wartość E zawiera się w przedziale 15 – 30 można uznać ją za dobrą, natomiast powyżej 100 za doskonałą.

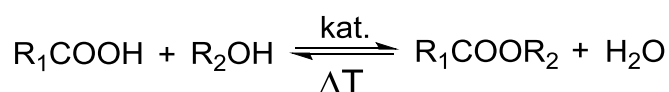
Opisany powyżej EKR ze względu na szerokie spektrum substratowe jest świetnym narzędziem stosowanym w syntezie asymetrycznej. Niemniej jednak ma swoje ograniczenia t. j.: maksymalna wydajność nie może przekroczyć 50%. Problemem jest

²³ a) Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299; b) Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812-2817.

także odwracalność reakcji katalizowanych enzymami, co ma duże znaczenie (szczególnie w skali technologicznej) m. in. w bezpośredniej enzymatycznej estryfikacji kwasów karboksylowych.

2.2. Bezpośrednia enzymatyczna estryfikacja kwasów karboksylowych

Bezpośrednia estryfikacja kwasów jest procesem wymagającym zastosowania drastycznych warunków (katalizator, wysoka temperatura) pod względem technologicznym (Schemat 2). Ponadto woda tworząca się w trakcie reakcji zdecydowanie przesunęła jej równowagę w kierunku substratów. Aby otrzymywać produkty takich reakcji z wysokimi wydajnościami, należy usuwać wodę z mieszaniny reakcyjnej. Można to uzyskać poprzez zastosowanie czynników chemicznych i fizycznych²⁴.



Schemat 2. Estryfikacja kwasów karboksylowych.

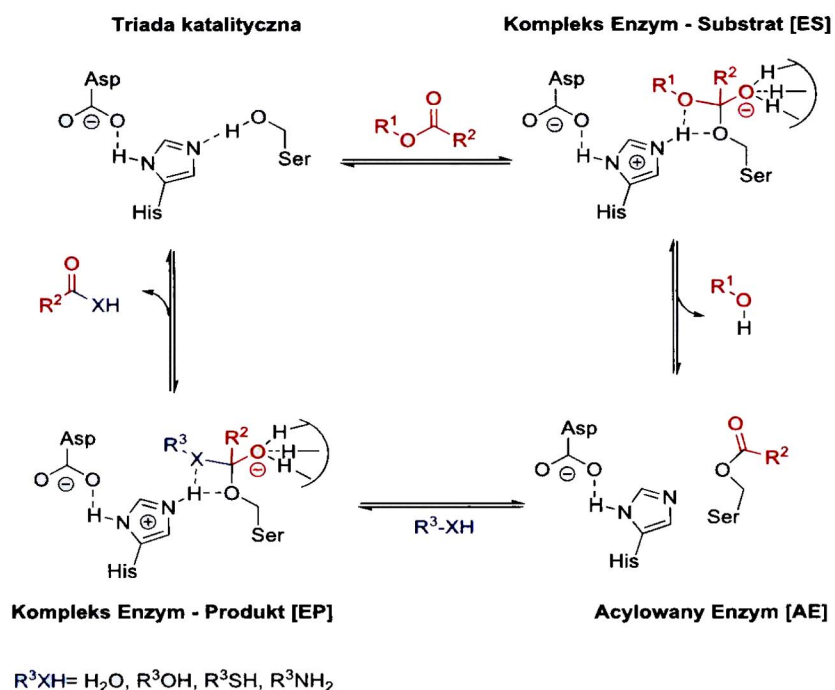
Użycie enzymów do reakcji estryfikacji jest możliwe, ale wymaga zastosowania warunków bezwodnych (rozpuszczalników organicznych). Grupa enzymów zdolnych do przeprowadzania reakcji w takich warunkach są lipazy [EC 3.1.1.3]. W naturze katalizują one hydrolizę triglicerydów do kwasów tłuszczowych i glicerolu, w praktyce stały się najczęściej używanymi enzymami w laboratoryjnej syntezie organicznej oraz przemyśle²⁵. Lipazy są bardziej stabilne i wykazują nowe właściwości katalityczne, takie jak „pamięć molekularna”²⁶, w rozpuszczalnikach organicznych. Szczególne znaczenie miało odkrycie, że selektywność reakcji katalizowanych przez enzymy, w tym substratowa, stereo, regio- i chemoselektywność może ulegać znacznym zmianom w

²⁴ J. Otera, J. Nishikido; *Esterification: Methods, Reactions, and Applications, 2nd Edition*, 2009, Chapter 1, 3-157.

²⁵ a) F. Secundo, G. Carrea; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19-20, 93; b) G. Soberon-Chavez, B. Palmeros; *Crit. Rev. Microbiol.* **1994**, 20, 95; c) A. Ghanem; *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721; d) S. Cherif, S. Mnif, F. Hadrich, S. Abdelkafi, S. Sayadi; *Lipids Health Dis.* **2011**, 10, 221; e) M. Breuer, K. Dittrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788

²⁶ A. M. P. Koskinen, A. M. Klivanov, (eds) *Enzymatic Reactions in Organic Media*, Blackie-Pergamon, London, 1996.

przypadku reakcji prowadzonych w warunkach bezwodnych²⁷. Wynika to m. in. z faktu, że wówczas zmienia ulega struktura przestrzenna białka (enzymu). Obecność wody lub jej brak w medium reakcyjnym może determinować przebieg reakcji enzymatycznej. W warunkach wodnych enzymy takie jak: lipazy, esterazy i proteazy katalizują reakcje hydrolizy estrów do odpowiednich alkoholi i kwasów²⁸. Mechanizm działania triady katalitycznej w reakcji katalizowanej przez enzymy przedstawiono na Schemacie 3.



Schemat 3 Mechanizm działania triady katalitycznej na przykładzie lipazy z *P. aeruginosa*.

W pierwszym etapie reakcji katalizowanej przez lipazę substrat dyfunduje do centrum aktywnego enzymu, w którym oddziałuje z grupami funkcyjnymi triady katalitycznej. Następnie poprzez tetraedryczny stan przejściowy [ES], tworzy się produkt pośredni; acylowany enzym [AE]. W następnym etapie reakcji aktywowany produkt pośredni w warunkach wodnych ($R^3XH=H_2O$) może ulegać hydrolizie, tworząc kolejny tetraeryczny stan przejściowy [EP]. W warunkach bezwodnych dodatek silniejszego nukleofila ($R^3XH= R^3OH, R^3NH_2, R_3SH$) t.j.: alkoholu, aminy czy tiolu prowadzi do powstania produktu reakcji transestryfikacji, aminolizy i tiotransestryfikacji²⁹. Reakcją odwrotną do

²⁷ A. M. Klibanov, *Nature*, **2001**, 409, 241-246.

²⁸ R. D. Schmid, R. Verger *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 1608-1633.

²⁹ M. T. Reetz; *PNAS* **2004**, 101, 5716-5722.



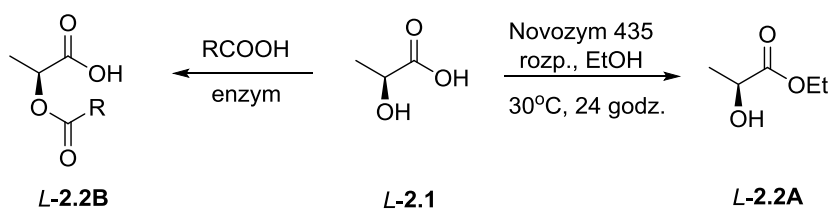
hydrolizy jest reakcja estryfikacji, która wymaga usuwania cząsteczki wody z medium reakcyjnego.

Usuwanie wody w reakcjach enzymatycznych musi być przeprowadzane w łagodnych warunkach, tak aby zachować aktywność enzymu. Jedną z możliwości przesuwania równowagi reakcji w kierunku produktu jest zastosowanie czynników wiążących wodę, którymi są sita molekularne. Użyto ich w reakcji syntezy estrów kwasu akrylowego oraz mono- i disacharydów: *D*-fruktozy, *D*-ksylozy, *D*-glukozy i *D*-maltozy. Reakcje prowadzono w *t*-butanolu, temperaturze 55 °C i w ciągu 48 godzin, natomiast jako katalizator zastosowano immobilizowaną lipazę z *Candida antarctica*. Dodatek sit molekularnych spowodował wzrost wydajności procesu poprzez usuwanie tworzących się cząsteczek wody³⁰. Niemniej jednak autorzy badań w każdej z badanych reakcji otrzymywali kilka produktów monoakrylowania, diakrylowania i triakrylowania.

Duże znaczenie przemysłowe ma enzymatyczna estryfikacja kwasu mlekowego. Estry tego kwasu są bardzo często wykorzystywane jako rozpuszczalniki, które bardzo szybko ulegają biodegradacji. Ponadto kwas mlekowy i jego estry są stosowane w przemyśle kosmetycznym ze względu na właściwości złuszczenia naskórka³¹. Estry te można otrzymać klasycznymi metodami chemicznymi, które jednak nie są efektywne. Kwas mlekowy jest α -hydroksykwasem, zatem zarówno grupa hydroksylowa, jak i karboksylowa mogą zachowywać się jako nukleofile. Przy zastosowaniu metodologii opartej na klasycznej syntezie organicznej zachodzi polimeryzacja kwasu mlekowego. Jest to związane z wysoką temperaturą oraz niskim pH prowadzenia takich reakcji. Zastosowanie lipaz jako katalizatorów do estryfikacji wymagało doboru odpowiednich warunków tej reakcji, tak aby uzyskać produkt niespolimeryzowany. Głównym parametrem wpływającym na efektywność procesu był dobór rozpuszczalnika (Schemat 4).

³⁰ J. Tsukamoto, S. Haebel, G. P. Valenca, M. G. Peter, T. T. Franco; *J. Chem. Tech. Biotech.*, **2008**, 83, 1486 – 1492.

³¹ R. C. Tung, W. F. Bergfeld, A. T. Vidimos, B. K. Remzi; *Am J Clin Dermatol.* **2000**, 2, 81-88.



rozpuszczalnik: aceton, acetonitryl, 1,4-dioksan, tetrahydrofuran, *n*-heksan

Schemat 4. Enzymatyczna estryfikacja kwasu *L*-mlekowego (*L*-2.1).

Mleczan etylu (*L*-2.2A) z największą wydajnością uzyskano w acetonie, który ma dwie, bardzo ważne z technologicznego punktu widzenia, zalety: bardzo dobrze rozpuszczał kwas i nie powodował denaturacji biokatalizatora - immobilizowanej lipazy z *Candida antarctica* (Novozym 435)³². Wyżej opisana estryfikacja kwasu *L*-mlekowego jest stale badana. Odmiennym zagadnieniem jest estryfikacja grupy hydroksylowej kwasu (*L*-mlekowego (Schemat 4, produkt *L*-2.2B). Najczęściej donorem grupy karboksylowej są kwasy tłuszczowe lub pochodne cukrów. Praktycznie w każdym przypadku pojawia się problem polimeryzacji kwasu *L*-mlekowego. Jako substrat używany jest enancjomerycznie czysty kwas *L*-mlekowy³³.

Enzymatyczna estryfikacja kwasów jest również wykorzystywana w syntezie niejonowych biosurfaktantów, zbudowanych z cukrów i kwasów tłuszczowych. Metody chemiczne syntezy są dla tej grupy związków mniej użyteczne, ponieważ charakteryzują się niską regioselektywnością. Jako substraty wykorzystano kwasy tłuszczowe: oleinowy, stearynowy, laurynowy i mirystynowy oraz mono- i dicukry. Uzyskano estry wodorowęglanów i kwasów tłuszczowych z dobrymi wydajnościami i wysoką regioselektywnością. Najlepsze wyniki uzyskano w rozpuszczalnikach o umiarkowanej polarności oraz z zastosowaniem *C*-6-regioselektywnych lipaz immobilizowanych jako biokatalizatorów³⁴.

Do enzymatycznej reakcji estryfikacji można wykorzystywać enzymy o właściwościach proteolitycznych. Przykładem takiego enzymu jest subtylizyna, która także katalizuje estryfikację *N*-zabezpieczonych aminokwasów. W tym przypadku specyficzne tworzenie *C*^α-karboksylo-3-hydroksypropylowych lub 4-hydroksypropylowych estrów

³² S. Hasegawa, M. Azuma, K. Takahashi; *J. Chem. Tech. Biotech.*, **2008**, 83, 1503 – 1510.

³³ a) C. Torres, C. Otero *Part I Enzym Microb Technol.* **1999**, 25, 745–752; b) S. Hasegawa, M. Azuma, K. Takahashi; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, 83, 1503–1510; c) Z. Findrik, G. Németh, L. Gubicza, K. Bélafi-Bakó, Đ. Vasić-Rački; *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2012**, 35, 625–635.

³⁴ Sh. W. Chang, J. F. Shaw; *New Biotech.*, **2009**, 3/4, 109 - 116.

odpowiednich aminokwasów lub peptydów zachodzi w stężonym roztworze 1, 3–propanodiolu lub 1,4-butanodiolu. Specyficzność substratowa subtylizyny w reakcji estryfikacji jest analogiczna do tej w hydrolizie proteolitycznej³⁵. Reakcja estryfikacji jest stereospecyficzna (*D*-aminokwasy nie ulegają estryfikacji) oraz regiospecyficzna (grupy karboksylowe w łańcuchu bocznym aminokwasów nie są estryfikowane). Ponadto ta metoda ma zastosowanie w estryfikacji nie tylko pojedynczych aminokwasów i krótkich peptydów, ale także dla białek takich jak: neurotensyny czy endoteliny. Niezmiernie istotna jest ilość wody dodanej do medium reakcyjnego, ponieważ:

- zbyt mała ilość wody dezaktywuje enzym,
- zbyt duża ilość wody przesunęła równowagę reakcji w stronę substratów.

Zarówno w przypadku pojedynczych aminokwasów, jak i peptydów estry otrzymywano z bardzo dobrymi wydajnościami.

Reakcje estryfikacji mogą zachodzić również bez użycia rozpuszczalnika (solvent – free system, SFS), czego przykładem jest wytwarzanie syntetycznych lubrykantów z kwasów tłuszczowych i alkoholu oleinowego³⁶. Ciekawym przykładem wykorzystania enzymatycznej metody estryfikacji kwasów karboksylowych w systemie SFS jest wytwarzanie poliestrów, które były niegdyś otrzymywane jedynie w procesie fermentacji. Obecnie stosuje się izolowane enzymy, dzięki którym możliwe jest przeprowadzenie reakcji polimeryzacji z wyższą regioselektywnością. Polikondensacja kwasów dikarboksylowych i dioli może być katalizowana przez lipazy. Przykładem takiego procesu jest polikondensacja kwasów dikarboksylowych i dioli katalizowana przez lipazę z *Aspergillus niger*. W celu zwiększenia masy cząsteczkowej poliestrów reakcje prowadzono w próżni oraz stosowano rozpuszczalniki wysokowrzące, m. in. eter difenyłowy. W przypadku polikondensacji kwasów dikarboksylowych i glikoli otrzymywano poliestry o masie cząsteczkowej większej niż 40000 Da. Polikondensacja w systemie SFS w przypadku reagentów alifatycznych dawała znakomite rezultaty w łagodniejszych warunkach niż w przypadku polikondensacji w rozpuszczalnikach organicznych³⁷.

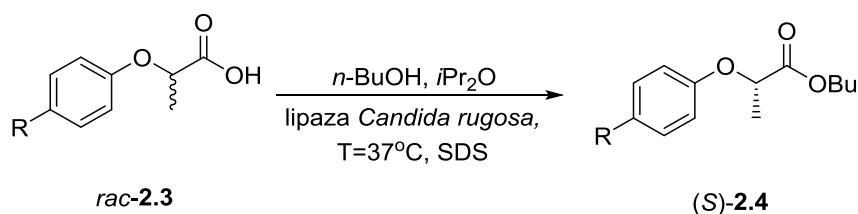
Opisane powyżej reakcje nie są klasycznym przykładem EKR. Użyte substraty tych reakcji są achiralne lub enancjomerycznie czyste, zatem po reakcji ma miejsce retencja konfiguracji na centrum stereogenicznym.

³⁵ Ch. – F. Liu, J. P. Tam; *Org. Lett.*, **2001**, 3, 4157 – 4159.

³⁶ Chaibakhsh N., Rahman M. B. A., Abd – Aziz S., Basri M., Salleh A. B., Rahman R. N. Z. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 36, 1149 – 1155.

³⁷ Sh. Kobayashi; *Macromol. Rapid Comm.*, **2009**, 30, 237 – 266.

Ze względu na ograniczenia (odwracalność) klasycznej estryfikacji enzymatycznej, jej zastosowanie w rozdziale kinetycznym związków biologicznie aktywnych jest niewielkie. Usztywnienie konformacji centrum aktywnego enzymów w rozpuszczalnikach organicznych bardzo często utrudnia dopasowanie enzymu do substratu, przez co katalizowanie reakcji estryfikacji kwasów pochodzenia nienaturalnego staje się bardzo trudne. W takim wypadku kluczowy staje się dodatek odpowiednich substancji, które będą modulowały usztywnienie centrum aktywnego. Przykładem takiej reakcji jest estryfikacja kwasów 2-(4-podstawionych-fenoksy)-propanowych *rac*-**2.3**. Enancjoselektywność tej reakcji katalizowanej lipazami zdecydowanie wzrasta po dodaniu wodnego roztworu soli sodowej siarczanu dodecyłu (SDS) do medium reakcyjnego – eteru *i*-propylowego (Schemat 5)³⁸.



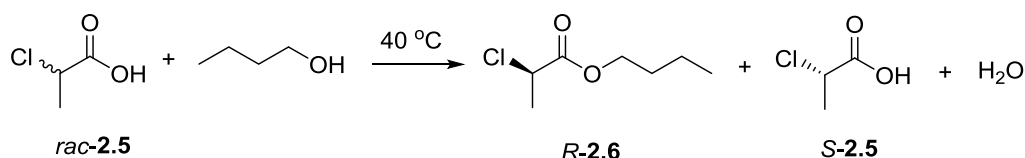
Schemat 5. Enzymatyczna estryfikacja kwasów *rac*-**2.3**.

W tych warunkach wzrasta elastyczność konformacyjna centrum aktywnego enzymu, co zostało potwierdzone przez wykonanie widm ESR (paramagnetycznego rezonansu jądrowego). Enancjoselektywność reakcji prowadzonych bez dodatku SDS była zdecydowanie niższa.

Kolejnym przykładem jest estryfikacja enzymatyczna w cieczach jonowych³⁹, które w tym wypadku zastosowano jako bardziej przyjazne środowisku (w porównaniu do typowych rozpuszczalników organicznych) medium reakcyjne (Schemat 6). Reakcjom estryfikacji *n*-butanolem poddano racemiczny kwas 2-chloropropionowy (*rac*-**2.5**). Jako biokatalizator zastosowano lipazę z *Candida rugosa*. Otrzymano enancjomerycznie wzbogacony ester butylowy kwasu 2-chloropropionowego (*R*-**2.6**).

³⁸M. Nishimura., R. Kudo, R. Matsumi, K. Watanabe, Y. Ebara; *Chem. Lett.*, **2001**, 912 – 913.

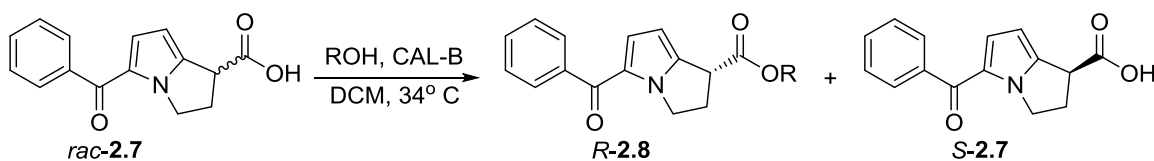
³⁹L. Gubicza, N. Nemestóthy, T. Fráter, K. Bélafi-Bakó; *Green Chemistry*, **2003**, 5, 236–239.



Warunki reakcji:
Lipaza z *Candida rugosa*, rozp. org./ciecz jonowa

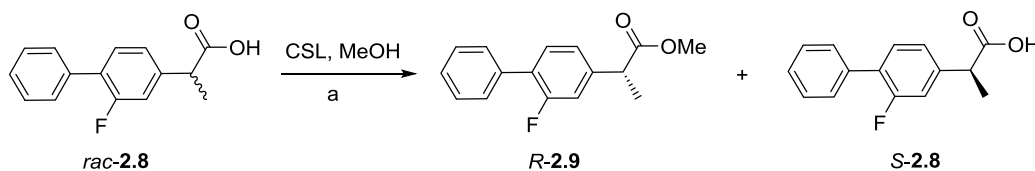
Schemat 6. Estryfikacja kwas *rac*-2-chloropropionowy (*rac*-2.3) w cieczach jonowych

Przykładem zastosowania lipaz w stereokontrolowanej syntezie związków biologicznie aktywnych jest otrzymywanie Ketorolaku (Toradol™) (Schemat 7). Związek ten jest niesteroidowym peptydomimetykiem przeciwzapalnym, będącym inhibitorem cyklooksygenazy.⁴⁰ Jedynie enancjomer (-)-(*S*) Ketorlaku (*S*-2.7) wykazuje pożądaną aktywność biologiczną, podczas gdy enancjomer (*R*) nie wykazuje działania terapeutycznego i może powodować krwawienie z przewodu pokarmowego.⁴¹



Schemat 7. Enzymatyczna estryfikacja *rac*-Ketorlaku.

W celu otrzymania enancjomerycznie czystego (*S*)-Ketorolaku, zastosowano lipazę z *Candida antarctica* do rozdziału kinetycznego mieszaniny racemicznej tego związku.⁴² Biologicznie aktywny Ketorlak otrzymano z 99% nadmiarem enancjomerycznym. Drugim przykładem jest synteza *S*-Fluribuprofenu (*S*-2.8) (Schemat 8)⁴³.



a: ciecz jonowa, 10-48 godz., 50°C

Schemat 8 Enzymatyczna estryfikacja (*rac*)-Fluribuprofenu (*S*, *R*-2.8).

⁴⁰ J. Mee, C. Allison, J. Koshiver, C. Brown, *Pharmacotherapy* **1980**, *6*, 253.

⁴¹ E. Mroszczak, D. Comb, M. Chaplin, I. Tsina, T. Tarnowski, C. Rocha, Y. Tam. A. Boyd, J. Young, L. Depass, *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 521.

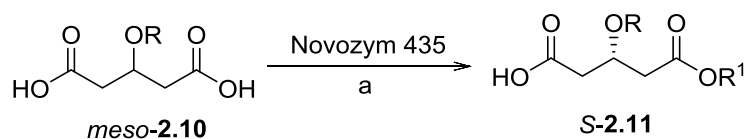
⁴² Y. H. Kim, C. S. Cheng, S. H. Lee, K. S. Kim, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1865.

⁴³ R. Zhao, X. Zhang, L. Zheng, H. Xu, M. Li; *Green Chem. Lett. and Rev.* **2017**, *10*, 23-28.

Reakcje były katalizowane lipazą z *Candida sp.* Czas reakcji zależał od użytej cieczy jonowej. Natomiast wyniki badań były dość intrygujące, ponieważ *S*-Fluribuprofen otrzymano z *ee* wynoszącym 99% przy wydajności 62%, co w reakcji EKR nie jest możliwe.

2.3. Enzymatyczna desymetryzacja kwasów dikarboksylowych i ich bezwodników

Enzymatyczna estryfikacja kwasów dikarboksylowych o strukturze symetrycznej jest często stosowana w reakcjach desymetryzacji odpowiednich *mezo* i prochiralnych pochodnych tych kwasów. Jest to proces nazywany enzymatyczną enancjoselektywną desymetryzacją (EED). Dobrym przykładem EED jest enzymatyczna estryfikacja 3-hydroksykwasu glutarowego (*meso*-**2.10**) alkoholami (Schemat 9)⁴⁴.



a: rozpuszczalnik, 30°C, 24 godz., R¹OH

R=TBS

R¹=Me, Et, *i*-Pr, *n*-Pr, *i*-Bu, *t*-Bu, *n*-Bu

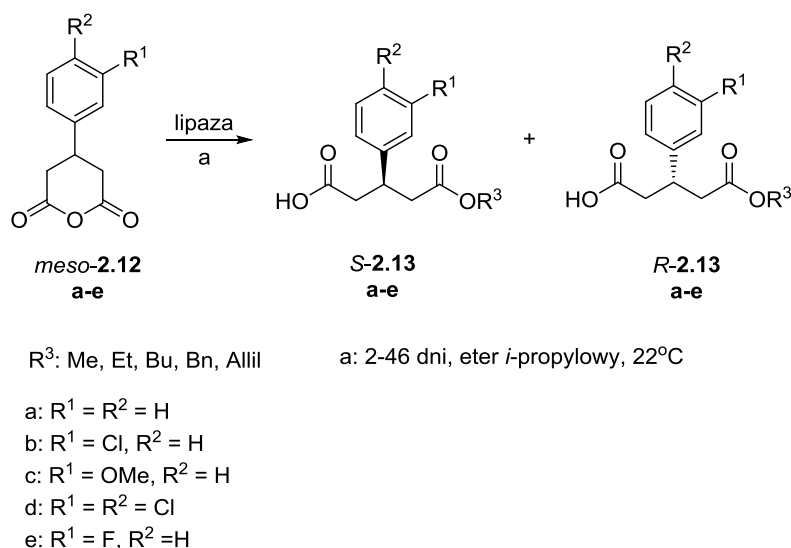
Schemat 9. Estryfikacja 3-hydroksykwasu glutarowego *meso*-**2.10**.

Związek ten stanowi ważny fragment farmakoforu statyn (Atovastatyny i Pitavastatyny)⁴⁵. Omawiana metoda otrzymywania tej klasy związków ma liczne zalety: duże stężenia substratów w medium reakcyjnym, łatwość wydzielenia i oczyszczania produktów reakcji, które można uzyskać z wysoką enancjoselektywnością oraz możliwość regeneracji rozpuszczalników organicznych. Reakcję prowadzono w rozpuszczalniku organicznym z wykorzystaniem Novozymu 435 (Schemat 9). Alkohole wykorzystane jako substraty do reakcji zaproponowano na podstawie badań struktury molekularnej centrum aktywnego enzymu. Wykonane eksperymenty potwierdziły wyniki uzyskane w trakcie modelowania molekularnego: alkohole z dużymi grupami bocznymi

⁴⁴ B. Wang, J. Liu, X. Tang, Ch. Cheng, H. Yu; *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 309–312

⁴⁵ Y. Kawai, R. Sato-Ishida, A. Motoyama, K. Kajinami; *Drug Design, Development and Therapy* **2011**, *5*, 283-297.

nie ulegały reakcji estryfikacji z pochodnymi kwasu glutarowego (cykloheksanol, 2-fenyletanol, fenylometanol). Produkt **S-2.11** z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym (*e.e.*=98%) otrzymano w reakcji z *i*-propanolem i *n*-propanolem. Kolejnym przykładem EED jest estryfikacja bezwodników kwasu 3-aryloglutarowego, zilustrowana na Schemacie 10⁴⁶.



Schemat 10. Enzymatyczna desymetryzacja bezwodników kwasu 3-aryloglutarowego (*meso*-**2.12**).

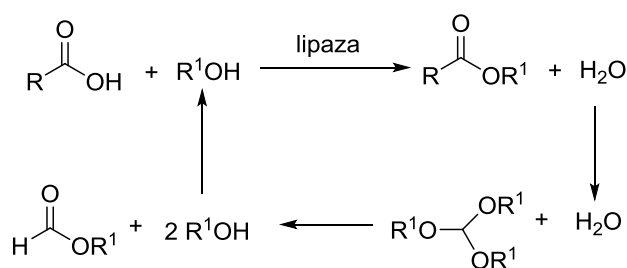
Wykonano badania stosując immobilizowane i natywne enzymy. Uzyskane wyniki wskazały, że kinetyka reakcji katalizowanych enzymami immobilizowanymi była korzystniejsza. Najlepsze rezultaty uzyskano dla niepodstawionego bezwodnika kwasu fenyloglutarowego (*meso*-**2.12a**) jako substratu w eterze *i*-propylowym. Produkt **S-2.13a** otrzymano z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 78% w reakcji katalizowanej Novozymem 435. Natomiast produkt **R-2.13a** z nadmiarem enancjomerycznym 77% w reakcji katalizowanej przez lipazę Amano PS-C. W obydwu przypadkach bezwodnik *meso*-**2.12a** estryfikowano etanolem ($\text{R}^3 = \text{Et}$). W tym przypadku problem odwracalności estryfikacji wyeliminowano poprzez zastosowanie bezwodnika jako substratu reakcji.

⁴⁶ A. Fryszkowska, M. Komar, D. Koszelewski, R. Ostaszewski *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 2475 – 2485.

2.4. Zastosowanie innych donatorów grupy alkoksylowej w enzymatycznej estryfikacji kwasów karboksylowych

Klasyczny wariant enzymatycznej estryfikacji polega na reakcji kwasu karboksylowego i alkoholu, w czasie której powstaje cząsteczka wody. Ze względu na to równowaga procesu przesunięta jest na korzyść substratów, co znacznie ogranicza zastosowanie metody w przemyśle. Dlatego też stosuje się modyfikacje warunków reakcji poprzez wprowadzenie czynników fizycznych (sita molekularne itp.)⁴⁷ oraz chemicznych (np. ortoestrów)⁴⁸.

Problem ten próbował rozwiązać Morrone ponad dwie dekady temu⁴⁹. Zaproponował użycie jako substratów kwasów karboksylowych, alkoholi oraz odpowiednich ortomrówczanów i ortoocetanów. Zgodnie z koncepcją zaproponowaną w literaturze, pokazaną na Schemacie 11, dodatek ortoestru przesuwa równowagę reakcji w kierunku tworzącego się estru, ponieważ woda powstająca w reakcji estryfikacji jest zużywana w reakcji hydrolizy ortoestru. Ponadto w celu zapoczątkowania reakcji do mieszaniny należało dodać odpowiedni alkohol, który reagując z kwasem karboksylowym tworzy odpowiedni ester i cząsteczkę wody.



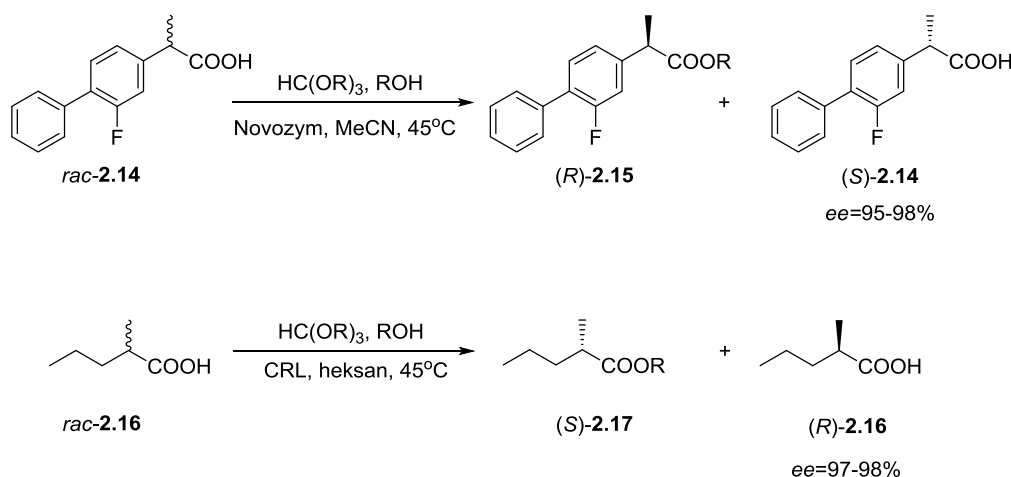
Schemat 11. Przebieg reakcji EKR z wykorzystaniem ortoestrów zaproponowany przez Morrone.

Omówioną metodologię zastosowano do rozdziału kinetycznego mieszanin racemicznych Fluribuprofenu (*rac*-**2.14**) oraz kwasu walerianowego (*rac*-**2.16**) (Schemat 12).

⁴⁷ Van der Waal, J. C.; H. van Bekkum H.; *Journal of Porous Materials* **1998**, 289–303.

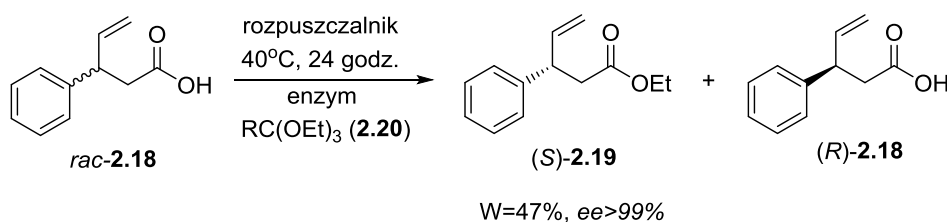
⁴⁸ Mezheritskii, V. V.; Olekhovich, E. P.; Dorofeenko G. N.; *Rus. Chem. Rev.* **1973**, 392–411.

⁴⁹ a) Morrone, R.; Piattelli, M.; Nicolosi, G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1441–1443; b) US Patent 6953678 B1; c) EP Patent 1196622 B1.



Schemat 12. EKR mieszanin racemicznych fluribuprofenu (*R*, *S*-**2.14**) i kwasu walerianowego (*R*, *S*-**2.16**).

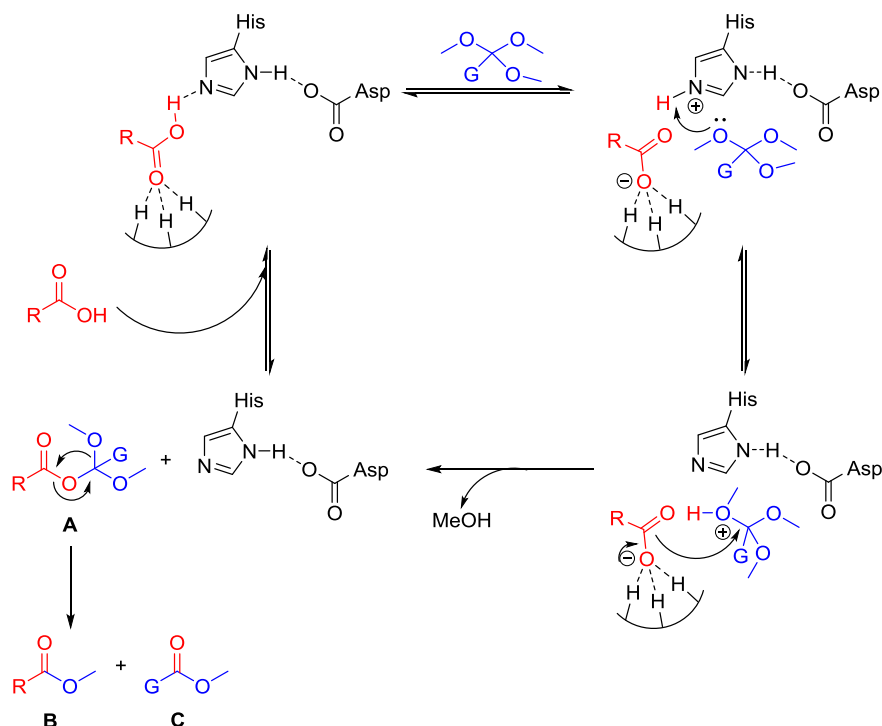
Okazało się, że dodanie ortoestrów do mieszanin reakcyjnych wyraźnie wpływa na kinetykę i enancjoselektywność obu reakcji. W przypadku estryfikacji kwasów alkoholami wartość nadmiaru enancjomerycznego kwasów (*S*)-**2.14** i (*R*)-**2.16** maleje w czasie. Natomiast w przypadku estryfikacji kwasów ortoestrami wartość nadmiaru enancjomerycznego wzrasta w miarę postępu reakcji. Wartość nadmiaru enancjomerycznego kwasu (*S*)-**2.14** wzrasta w przypadku ortoestrów zawierających krótsze łańcuchy alkilowe. Dla kwasu (*R*)-**2.16** najlepsze wyniki uzyskano w reakcji z ortomrówczanem tributylowym. Ponad 10 lat później w zespole XX ICHO PAN opracowano syntezę optycznie czynnych estrów kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**2.18**)⁵⁰. Przeprowadzono optymalizację warunków reakcji badając wpływ: rozpuszczalnika, enzymu i donora grupy alkoksylowej (ortoestru **2.20**) (Schemat 13).



Schemat 13. Enzymatyczna estryfikacja kwasu 3-fenyl-4-pentenowego ortoestrami.

⁵⁰ a) A. Brodzka, D. Koszelewski, R. Ostaszewski; *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* **2012**, 82, 96–101; b) A. Brodzka, D. Koszelewski, M. Cwiklak, R. Ostaszewski; *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, 24, 427-433; c) D. Koszelewski, A. Brodzka, A. Żądło, D. Paprocki, D. Trzepizur, M. Zysk, R. Ostaszewski; *ACS Catal.* **2016**, 6, 3287–3292.

Otrzymano optycznie czysty ester (*S*)-**2.19** (*ee*>99%) i wydajnością 47%. Jednocześnie zauważono, że mechanizm zaproponowany przez Morrone nie jest zgodny z przebiegiem powyższej reakcji, gdyż nie uwzględnia on wpływu podstawnika R w strukturze ortoestru **2.20**. Zaproponowano zatem alternatywny mechanizm przedstawiony na Schemacie 14⁵¹, w którym tylko dwa aminokwasy w triadzie katalitycznej (His i Asp) uczestniczą w estryfikacji enzymatycznej.



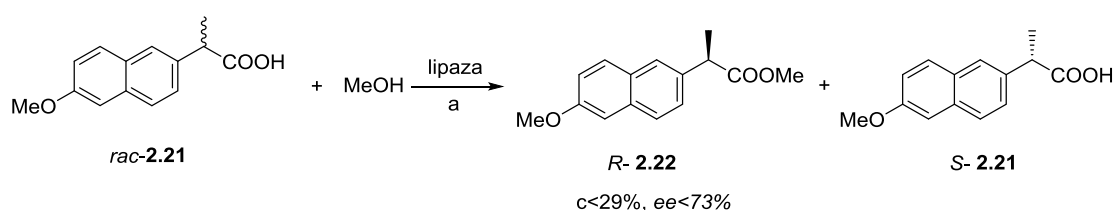
Schemat 14. Proponowany alternatywny mechanizm enzymatycznej estryfikacji ortoestrami.

Proponowany mechanizm zaczyna się od zakotwiczenia kwasu karboksylowego (kolor czerwony) w miejscu aktywnym enzymu (dziura oksyanionowa). Atom wodoru z kwasu karboksylowego jest przenoszony przez parę His-Asp, a więc powstaje anion karboksylanowy. Następnie drugi substrat– ortoester (kolor niebieski), wiąże się ze stroną aktywną enzymu. Para His-Asp katalizuje przeniesienie protonu z kwasu na ortoester. Następnie oba związki są uwalniane z miejsca aktywnego i anion karboksylanowy atakuje zaktywowaną cząsteczkę ortoestru. Po dysocjacji cząsteczki alkoholu powstaje nowy, nietrwały produkt pośredni (**A**), który ulega przegrupowaniu do produktu reakcji (**B**) i estru (**C**). Według autorów badań enzym katalizuje przemianę zarówno kwasu

⁵¹ A. Brodzka, D. Koszelewski, M. Zysk, R. Ostaszewski; *Cat. Comm.* **2018**, *106*, 82-86.

boksylowego, a także ortoestru. Wyjaśniałoby to wpływ struktury donora grup alkoksylowych na enancjoselektywność EKR.

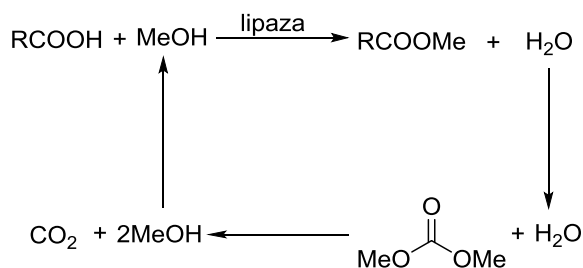
Kolejnym efektywnym i spełniającym wymogi “zielonej chemii” donorem grupy alkoksylowej są węglany. Znane są reakcje kwasów tłuszczowych z węglanami katalizowane przez lipazy⁵². W wyniku reakcji węglanu dietylu z kwasem oleinowym otrzymywano estry etylowe oleinianu z praktycznie ilościową wydajnością. Węglany były również stosowane przez grupę Morrone w enzymatycznym rozdziale kinetycznym jednego z niesteroidowych leków przeciwzapalnych o handlowej nazwie Naproxen (Schemat 15)^{53a}.



a: rozpuszczalnik, 45°C, węglan dialkylowy, 2-7 dni

Schemat 15. EKR mieszaniny racemicznej Naproxenu (*S*, *R*-**2.21**)

Spośród lipaz wykorzystanych do reakcji najbardziej efektywnym biokatalizatorem był (*R*)-stereospecyficzny Novozym 435. Niemniej jednak produkt (*R*)-**2.22** uzyskano z niską enancjoselektywnością zarówno w acetonitrylu, jak i chloroformie (*E*=8). Tak jak w przypadku ortoestrów niezbędny był dodatek alkoholu metylowego w celu zapoczątkowania reakcji. Autorzy zaproponowali przebieg reakcji estryfikacji (Schemat 16), w którym węglan ulega hydrolizie do alkoholu metylowego i dwutlenku węgla.



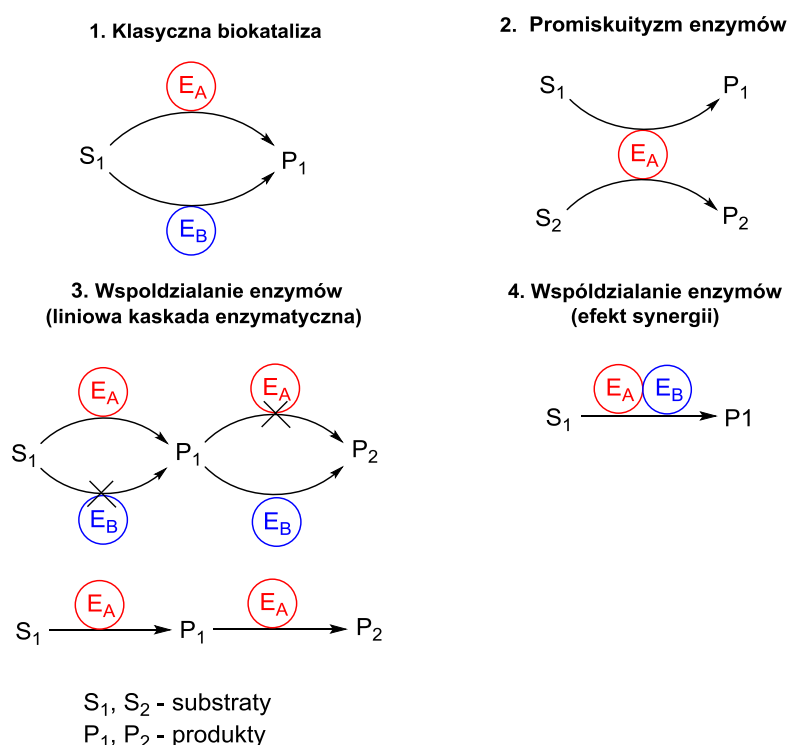
Schemat 16. Przebieg reakcji EKR z wykorzystaniem węglanów zaproponowany przez Morrone.

⁵² D. Pioch, P. Lozano, J. Graille *Biotech. Lett.*, **1991**, *13*, 633 – 636.

⁵³ a) R. Morrone, N. D’Antona, D. Lamberta, G. Nicolosi; *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2010**, *65*, 49-51; b) R. Morrone, N. D’Antona, D. Biondi, D. Lambusta, G. Nicolosi, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2012**, *84*, 173-176.

2.5. Wielozadaniowość enzymów (promiskuityzm) oraz współdziałanie enzymów (efekt synergii i kaskada enzymatyczna)

Klasyczna biokataliza jest bardzo użytecznym narzędziem w syntezie organicznej. Zwykle stanowi jeden z etapów w wieloetapowej syntezie (Rysunek 2.1). Substraty do reakcji enzymatycznych powinny zostać wcześniej oczyszczone, aby uniknąć niepożądanych produktów ubocznych w kolejnych etapach (mogą być inhibitorami)⁵⁴. Od wielu lat naukowcy próbują naśladować naturalne reakcje zachodzące w organizmach żywych poprzez realizację wieloetapowych syntez, wykonywanych w tym samym naczyniu reakcyjnym i tych samych warunkach⁵⁵. Na Rysunku 2 przedstawiono niestandardowe właściwości katalityczne enzymów. Jeden enzym może posiadać, oprócz głównej właściwości katalitycznej, także dodatkowe. Fenomen ten jest znany jako promiskuityzm enzymatyczny⁵⁶ (Rysunek 2.2).



Rysunek 2. Właściwości katalityczne enzymów.

⁵⁴ R. Fontes, J. M. Ribeiro, A. Sillero; *Acta Biochim. Pol.* **2000**, 233-257.

⁵⁵ M. T. Reetz; *Chem. Rec.* **2016**, 16, 2449–2459.

⁵⁶ V. De Luca, L. Mandrich; *Protein Pept. Lett.* **2020**, 27, 400-410.

Właściwość ta może być naturalną funkcją danego enzymu (zmiany na drodze ewolucji) lub może być generowana sztucznie m. in. poprzez inżynierię genetyczną⁵⁷. Należy podkreślić, że każda manipulacja zaburza formę natywną enzymu, co może doprowadzić do dezaktywacji białka⁵⁸. W warunkach laboratoryjnych, promiskuityzm enzymu może być doskonałym punktem startowym w tworzeniu „sztucznych” kaskad enzymatycznych. Jest to związane z dużą liczbą grup funkcyjnych, które mogą tworzyć nowe centra aktywne w wyniku np. punktowych mutacji genetycznych. Promiskuityzm enzymów można podzielić na⁵⁹:

- promiskuityzm katalityczny (zdolność do katalizowania różnych reakcji chemicznych, przebiegających poprzez odmienny produkt pośredni)

Lipazy oprócz swoich naturalnych właściwości katalitycznych posiadają również zdolność tworzenia wiązań C-C. Należy wymienić tutaj takie reakcje jak⁶⁰: kondensacja aldolowa, reakcja Morita-Baylis-Hillmana, addycja Michaela, addycja Markownikowa oraz reakcja Knoevenagla⁶¹. Przykładem promiskuityzmu katalitycznego mogą być także acylazy, które w naturalnych warunkach katalizują hydrolizę *N*-acylo-*D*-aminokwasów, w rozpuszczalnikach organicznych katalizują addycję aza-Michaela⁶².

- promiskuityzm substratowy (akceptowanie więcej niż jednego substratu w reakcji chemicznej przebiegającej przez utworzenie tego samego produktu pośredniego)

Wspomniane wcześniej acylazy są przykładem enzymów wykazujących również promiskuityzm substratowy⁶³. Katalizują nie tylko hydrolizę amidów, ale również hydrolizę estrów,⁶⁴ acylowanie alkoholi⁶⁵ i aminokwasów⁶⁶.

⁵⁷ M.A. DePristo; *HFSP Journal* **2007**, *1*, 94-98.

⁵⁸ A. Babbie, N. Tokuriki, F. Hollfelder; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 200-207.

⁵⁹ K. Hult, P. Berglund; *Trends in Biotechnology* **2007**, *25*, 231-238.

⁶⁰ a) C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874; b) M. Svedendahl, K. Hult and P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988; c) M. T. Reetz, R. Mondiere, J. D. Carballeira, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 1679.

⁶¹ a) W. B. Wu, N. Wang, J. M. Xu, Q. Wu, X. F. Lin, *Chem. Commun.*, **2005**, 2348; b) Y. F. Lai, H. Zheng, S. J. Chai, P. F. Zhang, X. Z. Chen, *Green Chem.*, **2010**, *12*, 1917.

⁶² C. Qian, J.-M. Xu, Q. Wu, D.-S. Lv, X.-F. Lin; *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6100-6104.

⁶³ H.K. Chenault, J. Dahmer, G.M. Whitesides; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6354-6364.

⁶⁴ T. Pohl, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2963-2966.

⁶⁵ a) P. Noheda, G. Garcla, M. C. Pozuelo, B. Herradon; *Tetrahedron: Asymm.* **1996**, *7*, 2801-2804; b) M. Bakker, A. S. Spruijt, F. van Rantwijk and R. A. Sheldon; *Tetrahedron: Asymm.* **2000**, *11*, 1801-1808.

⁶⁶ A. Basso, S. Biffi, L. De Martin, L. Gardossi, P. Linda; *Croatia Chemica Acta* **2001**, *74*, 757-762.

- Promiskuityzm względem warunków reakcji

Przykładem promiskuityzmu względem warunków reakcji jest enzymatyczna reakcja estryfikacji/hydrolizy katalizowana przez lipazy. W przypadku umieszczenia mieszaniny reakcyjnej w środowisku niewodnym, o niskim współczynniku aktywności wody zachodzi reakcja estryfikacji. Natomiast w środowisku o wysokim współczynniku aktywności wody zachodzi reakcja hydrolizy⁶⁷.

Typowym układem, w którym enzymy ze sobą współdziałają jest komórka wraz z zachodzącymi w niej procesami metabolicznymi⁶⁸. Takie układy multienzymatyczne od dawna stanowiły bardzo interesujący i jednocześnie wymagający cel badań. Cel ten został osiągnięty m. in. w syntezie terpenów, alkaloidów, kwasów tłuszczowych oraz cukrów (związków o rozbudowanej strukturze)⁶⁹. W kaskadach enzymatycznych zwykle jeden z enzymów katalizuje jedną reakcję, której produkt jest substratem w kolejnej reakcji (Rysunek 2.3). Zaletą takich multienzymatycznych systemów (z punktu widzenia syntetyka) jest przede wszystkim krótszy czas reakcji, a także ominięcie procesu oczyszczania kolejnych produktów, co znacznie redukuje ilość odpadów⁷⁰.

W literaturze znajduje się kilka przykładów reakcji chemicznych, w których zastosowano dwa enzymy jednocześnie katalizujące badaną reakcję. Istotnym wydaje się zatem próba odpowiedzi na pytanie czy obserwowany efekt katalityczny wynika tylko z ich obecności (a tym samym zwiększenia ilości enzymu w mieszaninie reakcyjnej) czy też z ich bezpośredniego współdziałania- synergii pomiędzy enzymami katalizującymi tą samą reakcję (Rysunek 2.4). Dotychczas w literaturze opisano tylko kilka przypadków synergistycznego oddziaływania pomiędzy enzymami. Zespoły Li⁷¹, Liu⁷² i Huang⁷³ badały reakcje katalizowane przez mieszaninę dwóch enzymów: Lipozemu TL IM oraz Novozymu 435, którą zastosowano w produkcji biodiesla. Zaobserwowano dwukrotny wzrost aktywności katalitycznej enzymów. Podobny efekt w produkcji biodiesla został zaobserwowany przez zespół Lee, który połączył immoblizowane lipazy z *Rhizopus*

⁶⁷ P. Rona; *Biochem. Ztschr.* **1931**, 247, 113-145.

⁶⁸ M. Godoy-Gallardo; C. Labay, V. D. Trikalitis, P. J. Kempen, J. B. Larsen, T. L. Andresen, L. Hosta-Rigau; *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 15907–15921.

⁶⁹ R. Sigrist, B. Zucoloto da Costa, A. J. Marsaioli, L. Gonzaga de Oliveira; *Biotechnology Advances* **2015**, 33, 394–411.

⁷⁰ a) S. Gandomkar, A. Żądło-Dobrowolska, W. Kroutil; *ChemCatChem* **2018**, 11, 225-243; b) N. Losada-Garcia, Z. Cabrera, P. Urrutia, C. Garcia-Sanz, A. Andreu, J. M. Palomo; *Catalysts* **2020**, 10, 1258.

⁷¹ L. Li, W. Du, D. Liu, L. Wang, Z. Li; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, 43, 58-62.

⁷² Y. Liu, Y. Yan, F. Hu, A. Yao, Z. Wang, F. Wie; *AIChE J.* **2010**, 56, 1659-1665.

⁷³ Y. Huang, H. Zheng, Y. Yan; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, 160, 504-515.

oryzae i *Candida rugosa*⁷⁴. Zespół Hirose badał estryfikację glicerolu kwasem linoleinowym przez mieszaninę dwóch enzymów oraz oznaczył odpowiednie stężenia biokatalizatorów w mieszaninie, tak aby otrzymać estry glicerolu z najwyższą wydajnością⁷⁵. Kolejnym przykładem jest połączenie Lipozemu RM IM lub Lipozemu TM IM i Novozymu 435 zastosowane przez zespół Ibrahima w interestryfikacji stearyny palmowej olejem kokosowym. Zaobserwowano również zwiększenie wydajności estryfikacji mieszanin Novozymu 435 oraz lipazy Amano AK. Naukowcy wytłumaczyli to ko-immobilizacją lipazy Amano AK⁷⁶. Efekt synergii zaobserwowano również w procesie hydrolizy celulozy. Autorzy postulowali, że synergia występuje, gdy dwie celulazy hydrolizują różne regiony mikrofibrylu celulozy, tworząc nowe miejsca ataku innych enzymów obecnych w mieszaninie reakcyjnej⁷⁷.

Przy projektowaniu opisanych powyżej układów (systemów) katalitycznych wydaje się być istotne uwzględnienie właściwości fizykochemicznych oddziaływań białko-białko (protein-protein interactions, PPI) w analizowaniu danych eksperymentalnych. Oddziaływania te pełnią istotną rolę w procesach biologicznych, a ich zróżnicowanie wynika ze składu, powinowactwa oraz tymczasowej lub trwałej agregacji⁷⁸. Poniżej przedstawiono główne rodzaje kompleksów białkowych, powstające wskutek oddziaływań białko-białko:

a. kompleksy homo- i heterooligomeryczne.

Oligomery zawierające identyczne lub homologiczne jednostki białkowe mogą być zorganizowane w sposób izologiczny lub heterologiczny⁷⁹ z zachowaniem symetrii strukturalnej⁸⁰. Asocjacja izologiczna polega na oddziaływaniu tej samej strony powierzchni obydwu monomerów, zachowując jednocześnie dwuskrotną oś symetrii. Agregacja heterologiczna natomiast następuje poprzez różne powierzchnie oligomerów z pominięciem cyklicznej symetrii⁸¹.

⁷⁴ D.H. Lee, J.M. Kim, H.Y. Shin, S.W. Kang, S.W. Kim, *Biotechnol. Bioproc. E.* **2006**, *11*, 522-525.

⁷⁵ T. Hirose, Y. Yamauchi-Sato, Y. Arai, S. Negishi; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 35-38.

⁷⁶ N.A. Ibrahim, Z. Guo, X. Xu; *J. Am Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 37-45.

⁷⁷ M. Kostylev, D. Wilson; *Biofuels* **2012**, 61-70.

⁷⁸ I. M. A. Nooren, J. M. Thornton; *The EMBO Journal* **2003**, *22*, 3486-3492.

⁷⁹ J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeaux; *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88-118.

⁸⁰ D. S. Goodsell, A. J. Olson; *Annu Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 105-53.

⁸¹ M. Bertoni, F. Kiefer, M. Biasini, L. Bordoli, T. Schwede; *Sci Rep* **2017**, *7*, 10480.

b. kompleksy obowiązkowe i nie-obowiązkowe.

W przypadku kompleksów obowiązkowych protomery (białkowe jednostki strukturalne) nie istnieją jako stabilne, samodzielne jednostki w warunkach *in vivo*. W przypadku kompleksów nie-obowiązkowych protomery funkcjonują niezależnie i najczęściej są zlokalizowane w różnych miejscach (konieczność jednoczesnej sekrecji w tym samym miejscu): antygen-przeciwciało, ligand receptor, enzym-inhibitor⁸².

c. kompleksy tymczasowe i permanentne.

Powyższy podział wynika z okresu trwania poszczególnych agregatów. Kompleksy permanentne są z reguły trwałe i istnieją jedynie w formie agregatu- poszczególne protomery są niestabilne. Agregaty tymczasowe mogą asocjować i dysocjować w zależności od warunków⁸³.

PPI odgrywają ogromną rolę praktycznie we wszystkich procesach biochemicznych zachodzących w organizmach żywych. Niemniej jednak ich rola w biokatalizie nadal nie jest dokładnie zbadana, a ich potencjał nie jest w pełni wykorzystany.

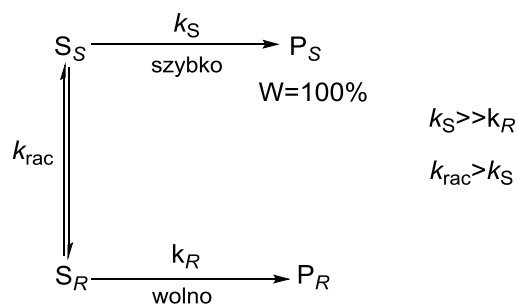
3. Dynamiczny rozdział kinetyczny

Najczęściej wykorzystywaną metodą otrzymywania związków enancjomerycznie czystych wciąż jest rozdział mieszaniny racemicznej. Enzymatyczny rozdział kinetyczny oprócz wielu zalet posiada również zasadniczą wadę; wydajność procesu nie przekracza 50%. Dlatego też prowadzone są badania nad dynamicznym rozdziałem kinetycznym (DKR), w którym ograniczenie wydajności jest wyeliminowane. Proces ten polega na połączeniu racemizacji substratu z rozdziałem kinetycznym (Schemat 17)⁸⁴. Wówczas enancjomerycznie czysty produkt może zostać otrzymany z wydajnością do 100%.

⁸² S. Soner, P. Ozbek, J. I. Garzon, N. Ben-Tal, T. Haliloglu; *PLoS Comput Biol* **2015**, 11, 1004461.

⁸³ J. R. Perkins, I. Diboun, B. H. Dessailly, J. G. Lees, Ch. Orengo; *Structure* **2010**, 10, 1233-1243.

⁸⁴ a) R. Noyori, M. Tokunaga, M. Kitamura; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, 68, 36-56; b) R.S. Ward, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 475-1490; c) U.T. Strauss, U. Felfer, K. Faber; *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 107-117.



Schemat 17. Idea dynamicznego rozdziału kinetycznego (DKR).

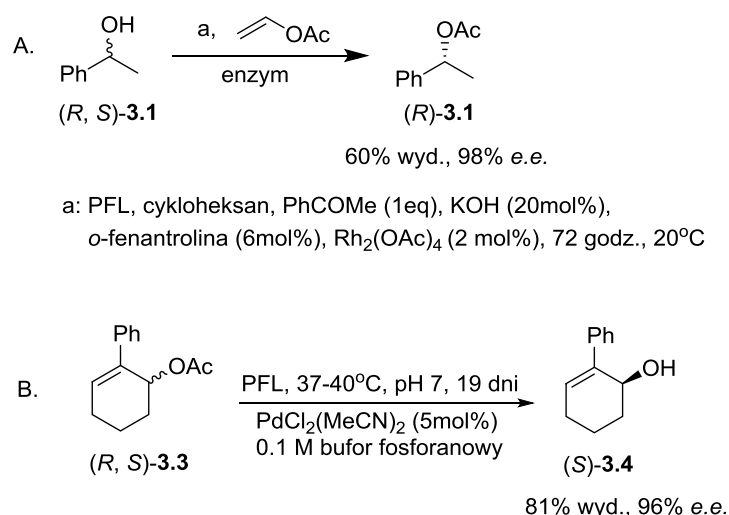
Pierwszy raz termin DKR został użyty przez profesora Noyori w roku 1989⁸⁵, zatem jest to dość młoda (z punktu widzenia syntezy stereokontrolowanej) metodologia. Kluczowym punktem DKR jest racemizacja substratu. Teoretycznie racemizację można przeprowadzić różnymi metodami: racemizacja termiczna, racemizacja w warunkach zasadowych oraz kwaśnych, racemizacja enzymatyczna, racemizacja *via* reakcje redox oraz reakcje rodnikowe⁸⁶. Niemniej jednak najlepsze są metody jednoetapowe oraz przebiegające w stosunkowo łagodnych warunkach.

Szczególnym przypadkiem jest enzymatyczny DKR, w którym wykorzystuje się tandemy metal-enzym. Ten system katalityczny został pierwszy raz użyty w 1996 roku przez Williamsa.⁸⁷ Udowodniono, że jest możliwe połączenie reakcji enzymatycznej z racemizacją substratu przez kompleks metalu zachodzące w jednym naczyniu reakcyjnym. Racemizacja substratu przebiega przez przeniesienie wodoru z jednoczesnym, enzymatycznym acylowaniem jednego z enancjomerów substratu (Schemat 18A).

⁸⁵ R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widhalm, M. Kitamura, H. Takaya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, T. Taketomi, H. Kumobayashi; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9134-9135.

⁸⁶ E. J. Ebbers, G. J. A. Ariaans, J. P. M. Houbiers, A. Bruggink, B. Zwanenburg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9417.

⁸⁷ a) P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623-7626; b) J. V. Allen, J. M. J. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1859-1862.



Schemat 18. Początki enzymatycznego DKR.

Otrzymano acylowany produkt (R) -**3.1** z wysokim nadmiarem enancjomerycznym (98%) i wydajnością (60%). Zwrócono uwagę, że w tradycyjnym KR przy takiej wydajności reakcji, produkt zostałby otrzymany z 67% e.e. Reakcja przedstawiona na Schemacie 18B to druga próba EDKR tej samej grupy badaczy. Tym razem racemizację substratu *via* kompleks π -allilowy połączono z enzymatyczną hydrolizą. Produkt (S) -**3.4** otrzymano z wysokim nadmiarem enancjomerycznym (96%) i bardzo dobrą wydajnością (81%). Jak każda nowa metodologia ta również wymagała optymalizacji warunków oraz odpowiedniego doboru reagentów. Główny problem w reakcjach EDKR zwykle stanowi kompatybilność układu enzym-metal, które znajdują się w jednej mieszaninie reakcyjnej⁸⁸. Oddziaływanie metalu z enzymem może skutkować niską enancjoselektywnością rozdziału kinetycznego. Ponadto enzym może inhibować reakcję racemizacji⁸⁹. Substrat do reakcji EDKR również powinien spełniać określone warunki pod względem struktury chemicznej:

- musi zawierać określone grupy funkcyjne, które umożliwiają racemizację,
- musi być dogodnym substratem do reakcji enzymatycznej- np. hydrolizy/estryfikacji.

Dlatego też reakjom EDKR poddawane są drugorzędowe aminy i alkohole. W niniejszej pracy badania literaturowe zostały przeprowadzone tylko dla alkoholi drugorzędowych.

⁸⁸ R. Stürmer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1173.

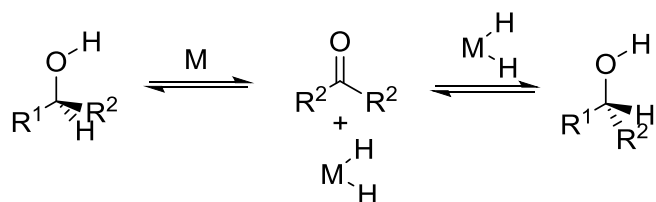
⁸⁹ B. Martin-Matute, J-E. Backvall, *Curr Opin Chem Biol.* **2007**, *11*, 226–232.

W zależności od budowy substratu oraz kompleksu metalu możliwe są różne mechanizmy racemizacji.

3.1. Mechanizmy działania katalizatorów metalicznych

W dynamicznym rozdziale kinetycznym alkoholi drugorzędowych jako czynnik racemizujący używane są kompleksy metali przejściowych. W zależności od mediatora racemizacji i substratu, można wyróżnić trzy mechanizmy działania katalizatorów metalicznych: racemizacja poprzez przeniesienie wodoru, racemizacja poprzez tworzenie kompleksu π -allilowego oraz mechanizm MPVO.

W przypadku kompleksów metali przejściowych racemizacja zachodzi poprzez przeniesienie wodoru (Schemat 19). Reakcja ta jest definiowana jako odwracalna redukcja wiązania podwójnego za pomocą donora wodorowego w obecności katalizatora.⁹⁰ W wyniku dehydrogenacji alkoholu przez kompleks metalu przejściowego powstaje odpowiedni keton i uwodorniony kompleks metalu. Następnie zachodzi readdycja wodorku metalu do prochiralnego ketonu, w wyniku której powstaje racemiczny alkohol. Najczęściej technika ta jest stosowana do racemizacji drugorzędowych alkoholi i amin.⁹¹



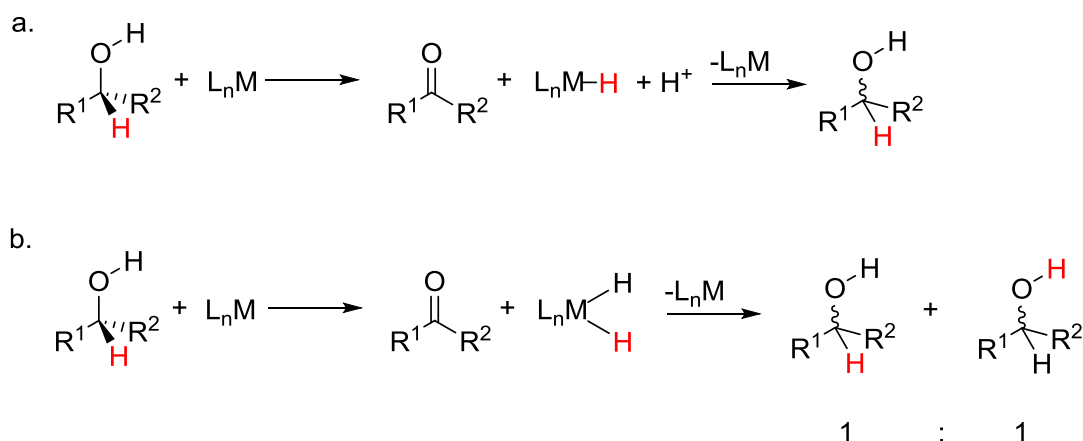
Schemat 19. Racemizacja alkoholi drugorzędowych *via* przeniesienie wodoru.

Cechą tych katalizatorów metalicznych jest to, iż kluczowym produktem pośrednim zaangażowanym w reakcję przeniesienia wodoru jest wodorek metalu. W przypadku ścieżki wodorkowej także można rozróżnić dwa mechanizmy racemizacji: dla monowodorków metali (Schemat 20a) i dla diwodorków metali (Schemat 20b).⁹²

⁹⁰ G. Zassinovich; Mestroni, G.; Gladiali, S.; *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1051-1069.

⁹¹ Huerta, F. F.; Minidis, A.; Backvall, J.-E.; *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 321-331.

⁹² Pamies, O.; Backvall, J.-E.; *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3247-3261.



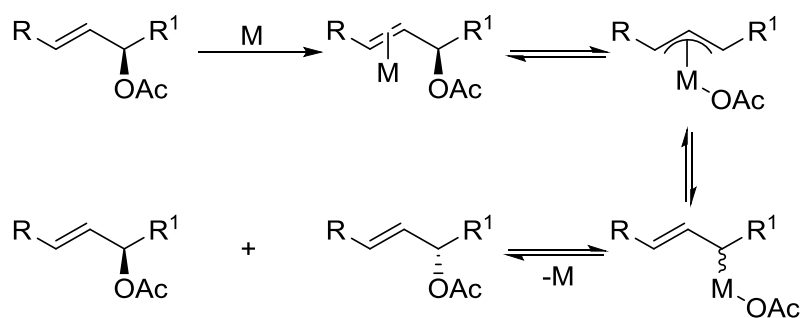
Schemat 20. Możliwe mechanizmy reakcji przeniesienia wodoru katalizowanej przez kompleksy metali przejściowych.

W pierwszym z prezentowanych mechanizmów (właściwym dla kompleksów rutenu, rodu i irydu) tylko jeden atom wodoru (C-H) jest przenoszony z substratu na metal, natomiast w drugim (właściwym tylko dla kompleksów rutenu) – oba atomy wodoru (C-H i O-H). Mechanizmy te rozróżniono za pomocą znakowania substratu deuterem. Założenie mechanizmu monowodorkowego (Schemat 20a) jest takie, że proton pochodzący z wiązania C-H substratu, pozostaje w tym samym wiązaniu również w produkcie. Wynika to z tego, że tylko proton z wiązania C-H tworzy wodorek metalu ($L_n\text{-MH}$). W przypadku mechanizmu diwodorkowego (Schemat 20b) zarówno proton z wiązania C-H, jak i ten z wiązania O-H w trakcie reakcji tworzą diwodorek metalu ($L_n\text{-MHH}$)⁹³. W wielu przypadkach trudno określić za pomocą którego mechanizmu reakcja zachodzi. Nawet niewielkie modyfikacje ligandu oraz struktury elektronowej substratu mogą zmienić mechanizm działania katalizatora.

Substraty allilowe (najczęściej allilowe alkohole lub estry) są racemizowane poprzez przegrupowanie [1,3] grupy octanowej (w przypadku estrów) lub hydroksylowej (alkohole). Reakcja kompleksu metalu ze związkami allilowymi skutkuje powstaniem produktu pośredniego π -allilu, który jest w równowadze z oboma enancjomerami substratu (Schemat 21). Ten mechanizm jest właściwy dla kompleksów palladu⁹⁴.

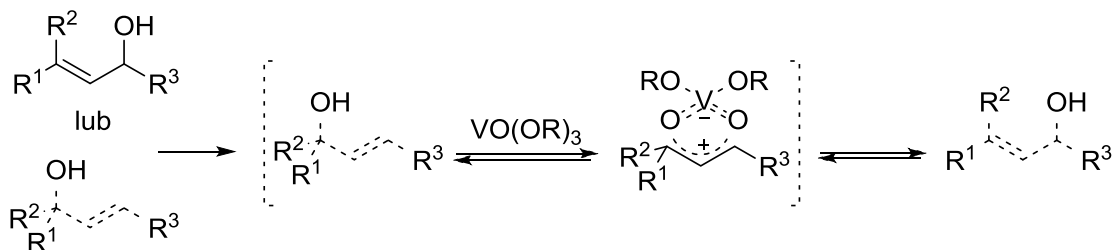
⁹³ Samec, J. S. M.; Backvall, J.-E.; Andersson, P. G.; Barndt, P.; *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 237-248.

⁹⁴ A. Lumbroso, M. L. Cooke, B. Breit. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1890 – 1932.



Schemat 21. Racemizacja substratu poprzez tworzenie kompleksu π -allilowego.

Stosunkowo nowym podejściem w dynamicznym rozdziale kinetycznym substratów allilowych jest połączenie acylowania katalizowanego przez lipazy z racemizacją zachodzącą poprzez tworzenie produktów pośrednich wanadanu allilu (Schemat 22). Kompleksy oksowanadu oraz innych metali przejściowych połączonych z tlenem tj. wolfram, molibden czy ren od dawna są używane jako katalizatory przegrupowania [1,3] alkoholi allilowych⁹⁵. W wyniku tej reakcji wytwarza się równowaga pomiędzy substratami oraz ich izomerami, a struktura otrzymanego produktu zależy od stabilności termodynamicznej dwóch izomerów⁹⁶.



Schemat 22. Racemizacja alkoholi allilowych przez kompleks oksowanadu.

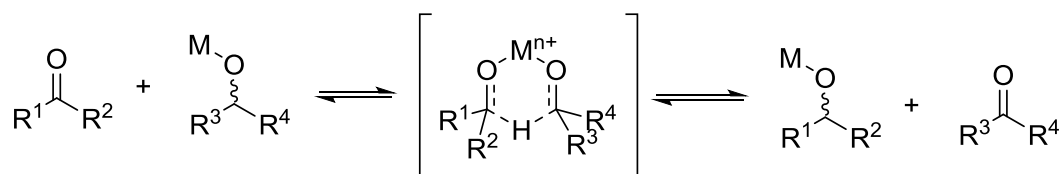
Trzecim sposobem racemizacji alkoholi drugorzędowych jest redukcja Meerwein-Ponndorf-Verley/utlenianie Oppenauera (Schemat 23)⁹⁷. W mechanizmie MPVO bezpośrednie przeniesienie atomu wodoru zachodzi poprzez sześciocząłkowy stan przejściowy, w którym substrat i reduktor/utleniacz są skoordynowane z kationem

⁹⁵ (a) Chabardes, P.; Kuntz, E.; Varagnat, J.; *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1775-1783; (b) Bellemin-Lapponnaz, S.; Le Ny, J. P.; Dedieu, A.; *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 57-64.

⁹⁶ Akai, S.; *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 746-754.

⁹⁷ D. Klomp, T. Maschmeyer, U. Hanefeld, J. A. Peters; *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2088-2093.

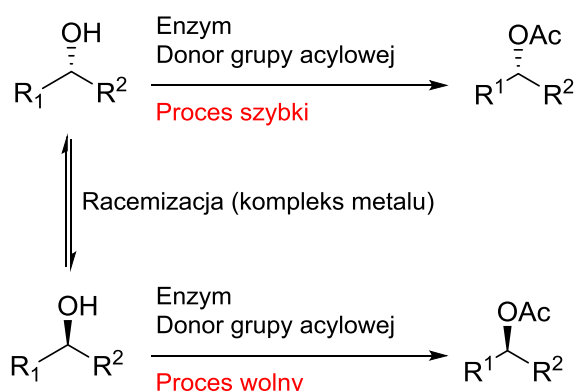
metal. Ten mechanizm jest charakterystyczny dla metali grup głównych. W EDKR stosowany jest tlenek glinu⁹⁸.



Schemat 23. Racemizacja alkoholi drugorzędowych *via* MPVO.

3.2. Dynamiczny rozdział kinetyczny alkoholi drugorzędowych

Klasyczna reakcja enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego alkoholi drugorzędowych polega na racemizacji alkoholu i jednoczesnym, stereoselektywnym acylowaniu grupy alkoksylowej (Schemat 24).



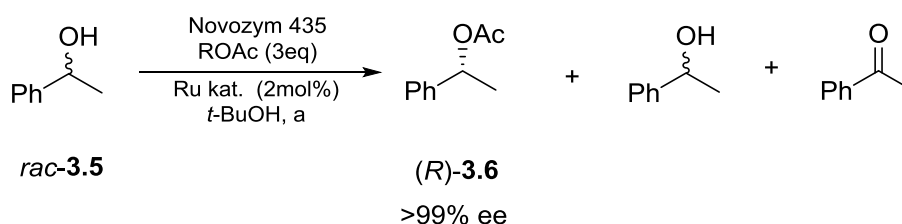
Schemat 24. Chemoenzymatyczny DKR alkoholi drugorzędowych.

W chemoenzymatycznym DKR alkoholi drugorzędowych do racemizacji substratu wykorzystuje się kompleksy rutenu (najczęściej), rodu, irydu oraz glinu. Ostatnio również do tej grupy dołączyły kompleksy żelaza, których podstawową zaletą jest stabilność w warunkach reakcji. Każdy z nich musi być kompatybilny z enzymami katalizującymi rozdział kinetyczny⁹⁹. Dlatego też należy wziąć pod uwagę szereg czynników takich jak: oddziaływanie metalu ze strukturą białkową enzymu czy też dobór odpowiednich warunków (rozpuszczalnik, temperatura).

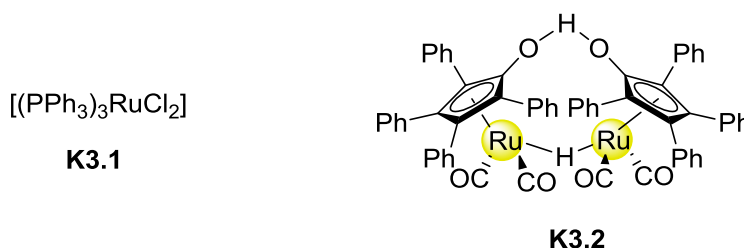
⁹⁸ A. Berkessel, M. L. Sebastian-Ibarz, T. N. M-ller; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6567–6570.

⁹⁹ V. Gotor, I. Alfonso, E. Garcia-Urdiales; *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes* **2008**, Wiley-VCH, 92, 94.

W 1997 roku Bäckvall i współpracownicy opracowali efektywną metodologię chemoenzymatycznego DKRu 1-fenyletanolu (*rac*-**3.5**) (Schemat 25). Kompleks **K3.1** okazał się być niekompatybilny z enzymem. Zastosowanie katalizatora **K3.2** (katalizator Shvo)¹⁰⁰ jako czynnika racemizującego substrat z jednoczesną transestryfikacją octanem katalizowaną przez Novozym 435 pozwoliło otrzymać produkt (*R*)-**3.6** z doskonałym nadmiarem enancjomerycznym (*ee*>99%). Do aktywacji katalizatora **K3.2** niezbędna jest wysoka temperatura reakcji.



a: acetofenon (1eq), 70 °C, pod argonem, 17-87 godz.

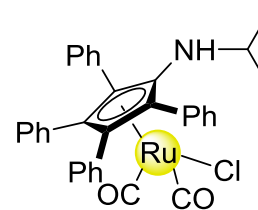
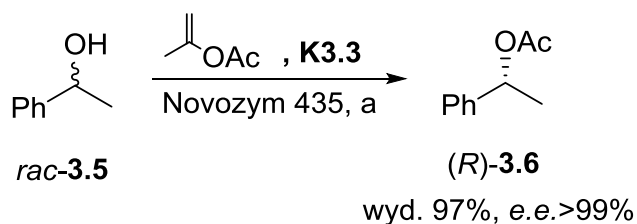


Schemat 25. EDKR 2-fenyletanolu.

W celu uzyskania produktu z najwyższą wydajnością wyselekcjonowano odpowiedni donor grupy acylowej- octan *p*-chlorofenylu, który wykluczył tworzenie się produktów ubocznych oraz nie interferował z katalizatorem. W 1999 roku ta sama grupa przeprowadziła badania optymalizacyjne uwzględniające wpływ rozpuszczalnika i substratu na przebieg reakcji¹⁰¹. Produkty z najlepszymi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi uzyskano w toluenie. Kilka lat później grupa Parka zaproponowała zmodyfikowany i bardziej efektywny katalizator rutenowy **K3.3**, który skutecznie racemizował 1-fenyletanol (*rac*-**3.5**) w temperaturze pokojowej (Schemat 26).

¹⁰⁰ B. L. Conley, M. K. Pennington-Boggio, E. Boz, T. J. Williams; *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2294–2312.

¹⁰¹ a) A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1211–1212; b) B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J. E. Bäckvall; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645.



K3.3

a: 25 °C, 30 godz., Na₂CO₃ albo MS, KO^tBu

Schemat 26. EDKR w temperaturze pokojowej.

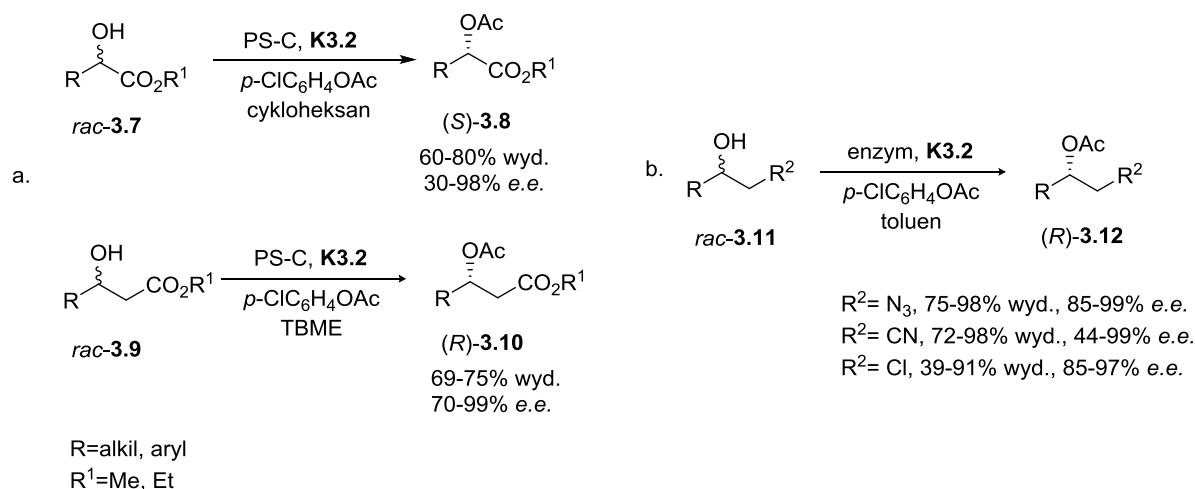
Katalizator **K3.3** wymagał aktywacji *tert*-butanolanem potasu (KO^tBu). Wykazano również, że dodatek węgla sodu lub sit molekularnych (MS) wspomagał racemizację substratu (prawdopodobnie poprzez wiązanie cząsteczki wody pochodzącej z lipazy)¹⁰².

Procedurę EDKRu zastosowano również do syntezy sfunkcjonalizowanych alkoholi drugorzędowych, które stanowią cenne bloki budulcowe w syntezie organicznej (Schemat 27a). Taką grupą substratów są m.in. α -hydroksyestry (*rac*-**3.7**) i β -hydroksyestry (*rac*-**3.9**). Reakcje prowadzono w cykloheksanie (α -hydroksyestry) lub eterze *tert*-butylometylowym (TBME) (β -hydroksyestry), w obecności immobilizowanej lipazy z *Pseudomonas cepacia* (PS-C), jako donor grupy acylowej został użyty *p*-chlorofenylooctan, a jako czynnik racemizujący- katalizator Shvo (**K3.2**)¹⁰³. Zastosowany w tym przypadku katalizator rutenowy nie wymagał dodatku zasady jako drugiego katalizatora. Jest to niezwykle ważne w przypadku β -hydroksyestrów ze względu na możliwość zajścia β -eliminacji w warunkach zasadowych. Otrzymano acylowane estry (*S*)-**3.8** i (*R*)-**3.10** z dobrymi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi dla substratów z grupą arylową. Grupa Parka natomiast przeprowadziła badania nad opracowaniem EDKR β -hydroksymaślanów, uzyskując (w podobnych warunkach jak poprzednio opisane, schemat) odpowiednie acylowane estry z prawie ilościową wydajnością i wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (86-99%)¹⁰⁴.

¹⁰² Choi J. H., Kim Y. H., Nam S. H., Shin S. T., Kim M. J., Park J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2373.

¹⁰³ (a) F. F. Huerta, Y. R. S. Laxmi, J. E. Backvall; *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1037. (b) F. F. Huerta, Y. R. S. Laxmi, J. E. Backvall *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1209.

¹⁰⁴ M. J. Kim, Y. K. Choi, M. J. Kim, J. Park; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4736.



Schemat 27. EDKR racemicznych alkoholi drugorzędowych.

Tę samą procedurę wykorzystano również w syntezie enancjomerycznie czystych azydoalkoholi, 3-hydroksynitryli i haloalkoholi (Schemat 27b)¹⁰⁵. Otrzymano odpowiednie estry z wydajnościami powyżej 70% (dla azydoalkoholi i nitryli) i wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. W przypadku EDKRU haloalkoholi zaobserwowano znaczny spadek wydajności reakcji, gdy substratem były bromoalkohole.

W tym samym czasie grupa Bäckvall zaproponowała również EDKR γ - and δ -hydroksyestrów¹⁰⁶. Są one dogodnymi substratami do syntezy odpowiednich laktonów, które są używane w przemyśle kosmetycznym jako atraktanty oraz feromony¹⁰⁷. Reakcje prowadzono w toluenie, z PS-C i *p*-chlorofenylooctanem jako donorem grupy acylowej. Produkty EDKRU (acylowane estry *t*-butylowe) otrzymano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (95-99%) i wydajnościami od 52% do 91%. Połączenie katalizatora rutenowego i reakcji enzymatycznej ma zastosowanie również w DKR symetrycznych drugorzędowych dioli (jako *meso/dl* mieszanin)¹⁰⁸. Produkty otrzymano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi, niezależnie od substratu (1,2-diole, 1,3-diole i 1,4-diole). Niemniej jednak w reakcjach, w których zastosowano 1,3-diole i 1,4-diole otrzymano produkty z niską diastereoselektywnością.

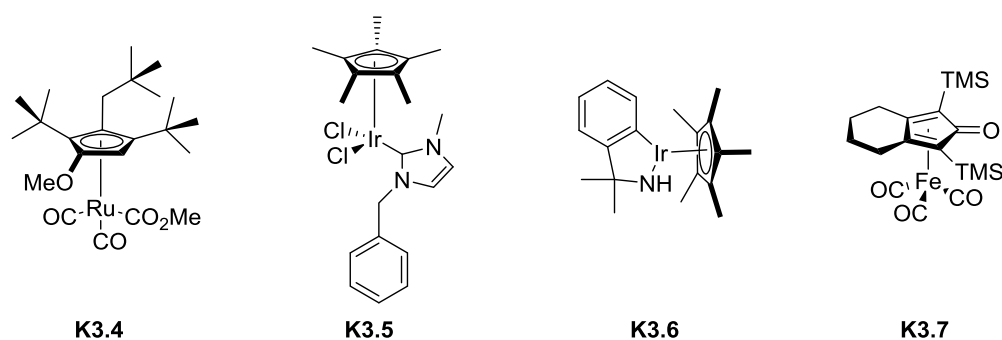
¹⁰⁵ (a) Pamies O., Backvall J. E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1418. (b) Pamies O., Backvall J. E. *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 947. (c) Pamies O., Backvall J. E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9006.

¹⁰⁶ (a) Jung H. M., Koh J. H., Kim M. J., Park J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2487. (b) Pamies O., Backvall J. E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1261.

¹⁰⁷ Wu Y., Esser L., De Brabander J. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4308.

¹⁰⁸ a) B. A. Persson, F. F. Huerta, J. E. Backvall; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5237; b) M. Edin, J. E. Backvall; *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2216.

Następne lata badań nad EDKRem alkoholi drugorzędowych skupiały się głównie na poszukiwaniu nowych, efektywnych katalizatorów racemizacji (Rysunek 3). Głównym celem było stworzenie katalizatora stabilnego w warunkach reakcji i kompatybilnego z enzymem. Badania nad nowymi katalizatorami obejmowały zarówno bezpośrednie modyfikacje ich struktury, jak i ich immobilizację¹⁰⁹.



Rysunek 3. Wybrane kompleksy metali przejściowych stosowanych w EDKR alkoholi drugorzędowych.

Grupa Kima opracowała katalizator **K3.4**, który efektywnie racemizował proste aryłowe alkohole drugorzędowe w temperaturze pokojowej bez dodatku zasady, ale nadal w warunkach gazu obojętnego. Produkty w każdym przypadku otrzymano z bardzo wysoką wydajnością (>87%) i nadmiarem enancjomerycznym (91-99%)¹¹⁰. Kompleksy irydu (**K3.5** i **K3.6**)¹¹¹ zastosowano jako efektywne katalizatory racemizacji do EDKRu alkilowo-aryłowych i dialkilowych alkoholi drugorzędowych. Również w tym przypadku reakcje przebiegały w warunkach gazu obojętnego. Dodatkowo katalizator **K3.6** nie wymagał wysokiej temperatury reakcji. W 2017 roku grupa Bäckvall zaprezentowała pierwszy, niewymagający warunków gazu obojętnego kompleks żelaza **K3.7**¹¹², który w tym samym roku zmodyfikowała grupa Zhou, osiągając podobne rezultaty¹¹³. Katalizator ten efektywnie racemizował benzyłowe i alifatyczne alkohole drugorzędowe. Niemniej jednak wymagał zasadowych warunków reakcji, wysokiej temperatury oraz dodatku *N*-tlenku trimetyloaminy (jako czynnika aktywującego katalizator).

Chemoenzymatyczny DKR wykorzystano również w syntezie chiralnych alkoholi allilowych. Grupa Kima zaproponowała połączenie transestryfikacji racemicznych

¹⁰⁹ O. Langvik, T. Saloranta, D. Yu. Murzin, R. Leino; *ChemCatChem* **2015**, *7*, 4004 – 4015.

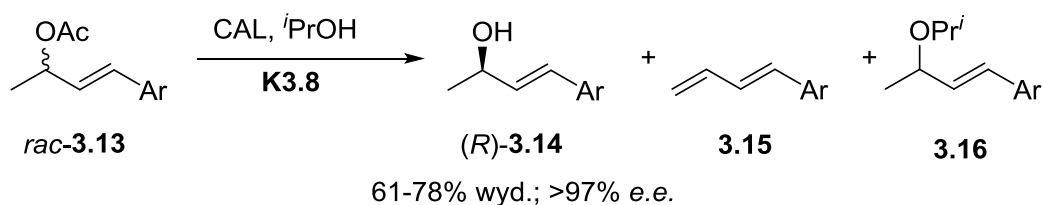
¹¹⁰ I. Yun, J. Y. Park, J. Park, M.-J. Kim; *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 16293–16298.

¹¹¹ a) A. C. Marr, C. L. Pollock, G. C. Saunder; *Organometallics* **2007**, *26*, 3283 – 3285; b) Y. Sato, Y. Kayaki, T. Ikariya; *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 3635–3637.

¹¹² K. P. J. Gustafson, A. Gudmundsson, K. Lewis, J.-E. Bäckvall; *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 1048 – 1051.

¹¹³ Q. Yang, N. Zhang, M. Liu, Sh. Zhou; *Tetrahedron Lett.* **2017**, *58* 2487–2489.

octanów *rac*-**3.13** z jednoczesną ich racemizacją kompleksem palladu (0) (**K3.8**). Zaobserwowano, iż w trakcie reakcji w obecności 2-propanolu zachodziły dwie reakcje uboczne, eliminacji i substytucji, w wyniku których powstawały produkty **3.15** i **3.16** (Schemat 28)¹¹⁴.

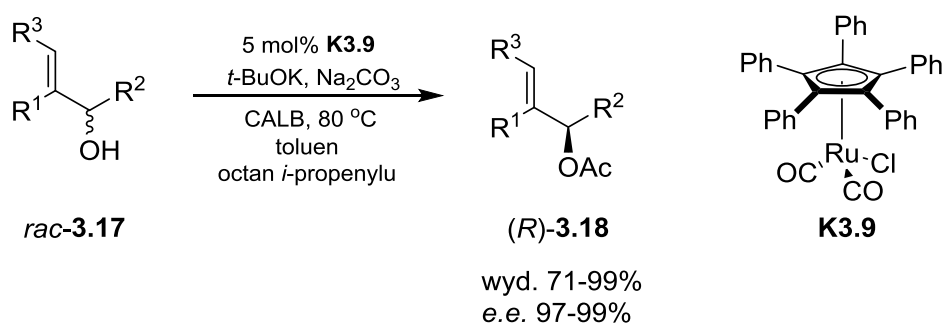


K3.8: Pd(PPh₃)₄-dppf

Schemat 28. EDKR octanów allilu.

Produkt o strukturze *(R)*-**3.14** otrzymano z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (*e.e.* > 97%) oraz z wydajnościami 61 – 78%.

Enancjomerycznie czyste octany alkohole allilowe można również otrzymać w reakcji EDKRU przez acylowanie racemicznych alkoholi allilowych. Racemizacja substratów zachodziła poprzez mechanizm przeniesienia wodoru lub kompleks π -allilowy. W 2007 roku grupa Bäckvalla opracowała EDKR racemicznych alkoholi allilowych *rac*-**3.17** (Schemat 29). Otrzymano enancjomerycznie czyste octany allilowe o konfiguracji *R* (*(R)*-**3.18**) z praktycznie ilościową wydajnością. Octany allilu (*(R)*-**3.18**) poddano następczej reakcji utleniania, w wyniku której otrzymano odpowiednie acyloiny¹¹⁵.



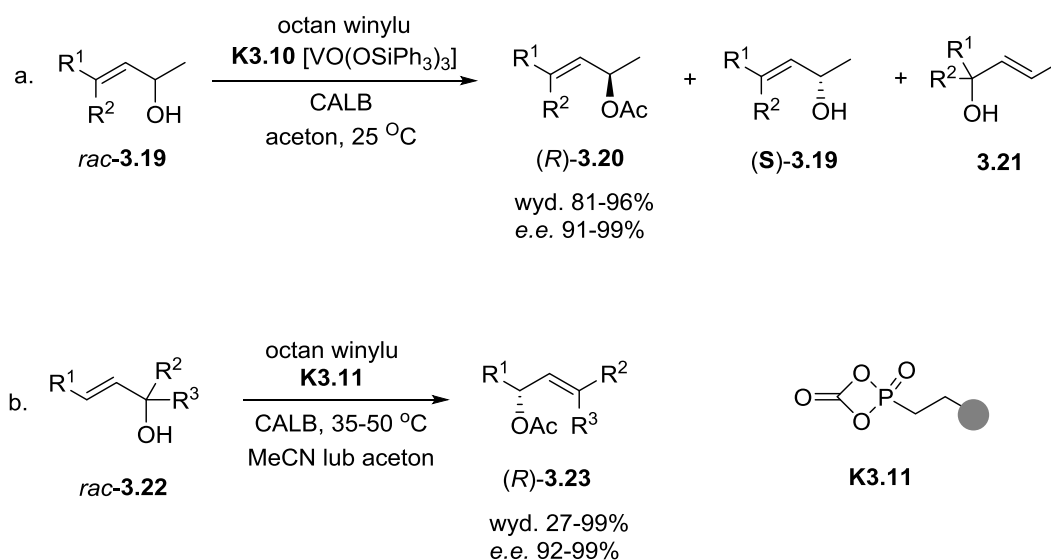
Schemat 29. EDKR race micznych alkoholi allilowych *via* przeniesienie wodoru.

¹¹⁴ Y. K. Choi, J. H. Suh, D. Lee, I. T. Lim, J. Y. Jung, M.-J. Kim; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8423-8424.

¹¹⁵ K. Bogar, P. Hoyos Vidal, A. R. Alcantara Leon, J.-E. Bäckvall; *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3401-3404.

Siedem lat później również grupa Bäckvalla opracowała EDKR stosując jako substraty czwartorzędowe alkohole allilowe, tym razem stosując żywicę jonowymienną jako alternatywny czynnik racemizujący (kataliza kwasowo-zasadowa w układzie heterogenicznym)¹¹⁶. Podobnie jak racemizacja enzymatyczna¹¹⁷ jest to metoda bardziej przyjazna środowisku. Pierwsze doniesienia o stosowaniu żywic do EDKRu pojawiły się w 2005 roku¹¹⁸, ale nadal nie jest to metoda tak powszechnie stosowana jak racemizacja kompleksami metali przejściowych.

Innym podejściem do syntezy optycznie czynnych alkoholi allilowych jest zastosowanie katalizatora oksowanadowego **K3.10** [VO(OSiPh₃)₃] w połączeniu z rozdziałem kinetycznym katalizowanym przez lipazę B z *Candida antarctica* (Schemat 30a).



Schemat 30. EDKR racemicznych alkoholi allilowych *via* kompleks π -allilowy.

Otrzymano estry allilowe z bardzo dobrymi wydajnościami (>81%) i wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (*e.e.*>91%)¹¹⁹. Substraty – alkohole allilowe *rac*-**3.19** były jednakowo dipodstawione w pozycji allilowej ($\text{R}^1=\text{R}^2$). W wyniku wydłużenia czasu reakcji głównym produktem były octany (*R*)-**3.20**. Badania nad opracowaniem efektywnych katalizatorów wanadowych doprowadziły do powstania katalizatora drugiej

¹¹⁶ Ch. Manzuna Sapu, T. Gorbe, R. Lihammar, J.-E. Bäckvall, J. Deska; *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5952 – 5955.

¹¹⁷ J. Popłoński, T. Reiter, W. Kroutil; *ChemCatChem* **2018**, *10*, 763-768.

¹¹⁸ P. Ödman, L. A. Wessjohann, U. T. Bornscheuer; *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9551 – 9555.

¹¹⁹ S. Akai, K. Tanimoto, Kanao, Y.; Egi, M.; Yamamoto, T.; Kita, Y.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2592-2595.

generacji – fosfonianu wanadyli związanego na polimerze **K3.11**, który zapewnił lepszą racemizację substratów¹²⁰ (Schemat 30b). Głównym produktem reakcji były octany (*R*)-**3.23**, które otrzymano z bardzo dobrymi wydajnościami i nadmiarami enancjomerycznymi. Wyjątek stanowił substrat z grupą $R^1 = p$ -metoksyfenyl. Niestety kilkudniowa inkubacja katalizatora **K3.11** z lipazą powodowała jego dezaktywację. W związku z tym opracowano także trzeci rodzaj katalizatora oksowanadowego, V-MPS, w którym część oksowanadowa jest kowalencyjnie związana z wewnętrzną powierzchnią krzemionki mezoporowatej¹²¹, co zapewniło mu większą kompatybilność z enzymem i stabilność w warunkach reakcji.

¹²⁰ Akai, S.; Hanada, R.; Fujiwara, N.; Kita, Y.; Egi, M.; *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4900–4903.

¹²¹ a) Egi, M.; Sugiyama, K.; Saneto, M.; Hanada, R.; Kato, K.; Akai, S.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3654–3658; b) F. Kühn, S. Katsuragi, Yasuhiro Oki, C. Scholz, Sh. Akai, H. Gröger; *Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 2885—2888.

4. Podsumowanie części literaturowej

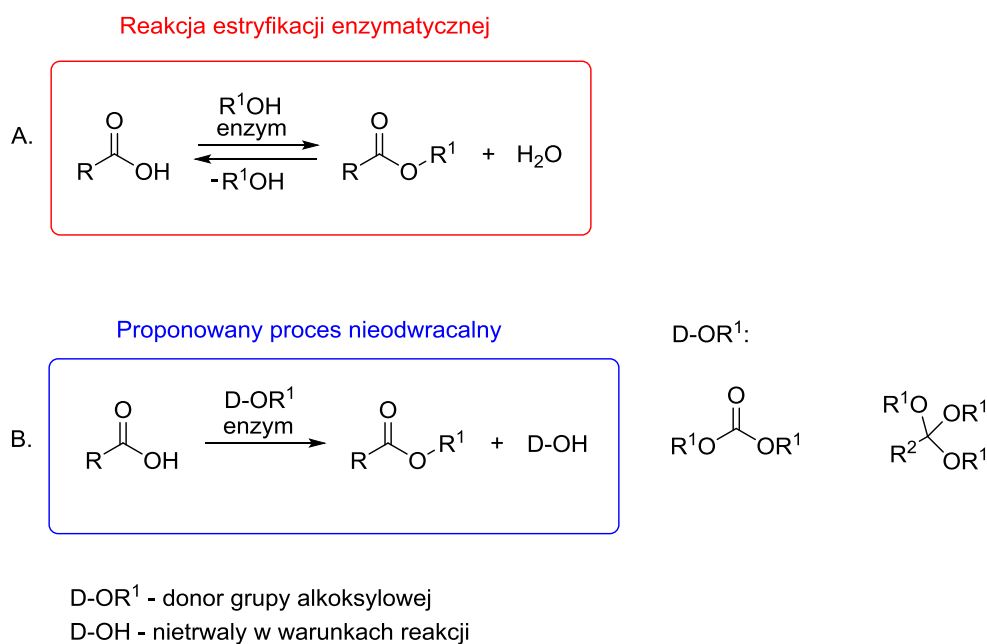
W części literaturowej opisano zastosowanie enzymów w stereoselektywnej syntezie organicznej. Pierwsza część jest poświęcona reakcji enzymatycznej estryfikacji. Jest ona szeroko stosowana w syntezie pochodnych kwasu mlekowego, kwasów tłuszczowych, biosurfaktantów (przemysł spożywczy i kosmetyczny) oraz w produkcji biodiesla. Zasadniczą wadą chemicznej, jak i enzymatycznej estryfikacji jest jej odwracalność. Rozwiązaniem jest zastosowanie czynników fizycznych wiążących wodę powstającą w reakcji np. sit molekularnych. Rozdział kinetyczny wykorzystujący enzymatyczną estryfikację jest stosowany w syntezie chiralnych związków biologicznie aktywnych, niemniej jednak jest to mały udział w porównaniu z enzymatycznym acylowaniem lub hydrolizą. Ciekawym podejściem jest zastosowanie innych donorów grup alkoksylowych t.j. węglanów dialkylowych i ortoestrów. W pierwszych doniesieniach literaturowych stanowiły one czynnik chemiczny usuwający wodę z mieszaniny reakcyjnej.

W drugiej części opisano zastosowanie enzymów w dynamicznym rozdziale kinetycznym alkoholi drugorzędowych. Najczęściej wykorzystywanym systemem jest połączenie enzymatycznego acylowania grupy hydroksylowej z jednoczesną racemizacją substratu. Rekcje acylowania i racemizacji przebiegają na centrum stereogenicznym substratu. Dzięki temu prawdopodobieństwo racemizacji produktu zostaje wyeliminowane. Wśród szeregu metod racemizacji chiralnych substratów stosowanych w EDKR nadal najpopularniejszą jest kataliza kompleksami metali grup przejściowych. Praktycznie w każdym przypadku niezbędna jest optymalizacja warunków reakcji z uwzględnieniem biokatalizatora, rozpuszczalnika oraz katalizatora metalicznego kompatybilnego z enzymem. Badania nad rozwojem EDKR pozwoliły wyeliminować warunki zasadowe reakcji, dodatek akceptora/donora wodoru oraz stworzyć katalizatory stabilne w warunkach reakcji. Niemniej jednak nadal problemem pozostaje regeneracja katalizatora oraz (w niektórych przypadkach) oczyszczanie produktów reakcji. Nie ma doniesień literaturowych na temat EDKR łączącym enzymatyczną estryfikację racemicznych kwasów karboksylowych, które byłyby racemizowane przez katalizatory metaliczne.

5. Badania własne

5.1. Koncepcja i cel badań

Jak pokazano w części literaturowej enzymatyczna estryfikacja kwasów karboksylowych prowadząca do otrzymania estrów tych kwasów jest procesem wymagającym specjalnych warunków ze względu na odwracalność reakcji (Schemat 31A). Oznacza to, że aby przesunąć równowagę reakcji w kierunku tworzenia produktów, należy określić wpływ szeregu czynników na przebieg reakcji modelowych, takich jak: enzym, rozpuszczalnik, temperatura i czas. Stosowane są również czynniki chemiczne i fizyczne usuwające wodę z medium reakcyjnego, co poprawia zarówno wydajność, jak i enancjoselektywność reakcji. Wydawało się interesującym sprawdzenie innych niż alkohole donorów grup alkoksylowych (**D-OR¹**). Ich zastosowanie zmieniłoby charakter procesu na reakcję nieodwracalną, co pokazano na Schemacie 31B.



Schemat 31. Enzymatyczna estryfikacja kwasów karboksylowych alkoholami vs enzymatyczna estryfikacja donorami grup alkoksylowych.

Donorem grupy alkoksylowej mogą być węglany dialkilowe lub ortoestry (**D-OR¹**), które były dotychczas stosowane jako czynniki chemiczne usuwające wodę z mieszaniny reakcyjnej. Zgodnie z przyjętym założeniem (Schemat 31B) w reakcji kwasu

karboksylowego z donorem **D-OR¹** powstawałby odpowiedni ester oraz związek **D-OH**, ulegający nieodwracalnej reakcji następczej. Uzyskanie w tym przypadku pozytywnych rezultatów umożliwiłoby podjęcie kolejnych badań nad rozszerzeniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego do enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego. W procesach takich wymagane jest zastosowanie reagentów racemizujących chiralny substrat. Z przedstawionych danych w części literaturowej dysertacji wynika, że dogodnymi czynnikami racemizującymi są kompleksy metali przejściowych. Do tej pory kompleksy te wykorzystywane były tylko do racemizacji alkoholi drugorzędowych połączonej z ich rozdziałem kinetycznym poprzez acylowanie. Nie ma doniesień literaturowych dotyczących EDKRu z zastosowaniem enzymatycznej estryfikacji kwasów karboksylowych. Opracowanie takiej metodologii doskonale uzupełniłoby już istniejące metody EKRu i EDKRu. Miałoby także duże znaczenie z praktycznego punktu widzenia ze względu na prostotę wydzielenia i oczyszczenia produktów reakcji.

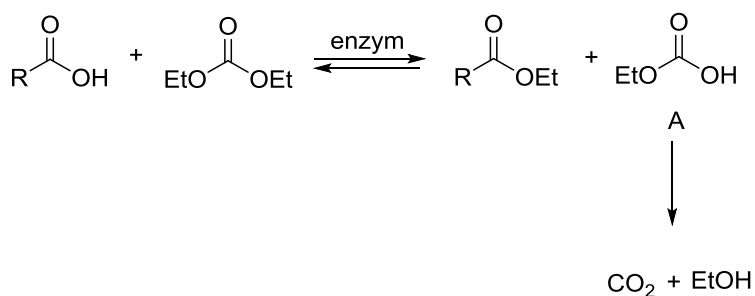
Wyznaczone cele pracy:

1. Wykonanie badań nad zastosowaniem innych niż alkohole donorów grupy alkoksylowej do enzymatycznej estryfikacji wybranych achiralnych i chiralnych kwasów karboksylowych.
2. Badania nad optymalizacją warunków powyższej reakcji uwzględniające wpływ budowy donora (**D-OR¹**), enzymów, rozpuszczalnika, temperatury i czasu.
3. Wykonanie badań potwierdzające lub wykluczające możliwość rozszerzenia rozdziału kinetycznego wybranych kwasów karboksylowych do dynamicznego enzymatycznego rozdziału kinetycznego.

Jako substraty będą wykorzystane achiralne i chiralne, racemiczne kwasy karboksylowe, które są użyteczne w syntezie związków biologicznie aktywnych. W pierwszym etapie zostaną wykonane badania nad sprawdzeniem możliwości wykonania enzymatycznej reakcji estryfikacji z użyciem węglanów dialkilowych i ortoestrów. W następnym etapie zostanie wyznaczony wpływ budowy donora, enzymu, rozpuszczalnika, temperatury i czasu na przebieg tej reakcji. W ostatnim etapie zostanie sprawdzona możliwość zastosowania układów enzym-metal w dynamicznym rozdziale kinetycznym racemicznych kwasów karboksylowych.

5.2. Zastosowanie enzymatycznej estryfikacji węglanami alkilowymi do syntezy estrów wybranych kwasów karboksylowych.

Pierwszy etap badań obejmował zastosowanie węglanów alkilowych do procesu nieodwracalnej enzymatycznej estryfikacji. Związki tej klasy mają dwie zasadnicze zalety: niską temperaturę wrzenia oraz niską cenę. Ideę reakcji przedstawiono na Schemacie 32.

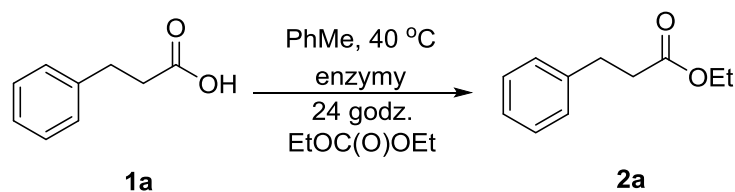


Schemat 32. Idea nieodwracalnej estryfikacji kwasów karboksylowych węglanami.

Założono, że enzym reaguje bezpośrednio z węglanem dając odpowiedni ester oraz drugi produkt **A**, nietrwały w warunkach reakcji, którego rozpad do alkoholu i dwutlenku węgla powinien być siłą napędową procesu. Należy też zwrócić uwagę na fakt, że cały proces składa się z dwóch reakcji, z których każda może być katalizowana przez ten sam lub różne enzymy.

5.2.1. Badania nad oznaczeniem wpływu biokatalizatora na reakcję enzymatycznej estryfikacji węglanami alkilowymi

Do badań modelowych zastosowano kwas 3-fenylpropanowy (**1a**). Dobór odpowiedniego biokatalizatora obejmował 45 komercyjnie dostępnych enzymów, które podzielono na 9 grup (badania przesiewowe opisane w Części eksperymentalnej, Podrozdział 7.2). Każda z grup składała się z enzymów prezentujących różne właściwości katalityczne. Reakcje prowadzono w toluenie, 40 °C i przez 24 godziny (Schemat 33, Procedura Ogólna 1).



Schemat 33. Estryfikacja kwasu **1a** węglanem dietylowym.

Tworzenie się estru etylowego **2a** zaobserwowano jedynie w mieszaninie reakcyjnej z ostatnią z testowanych grup enzymów (nr 9: A: papaina, B: acylaza I z *Aspergillus melleus*, C: lipaza z kielków pszenicy, D: Amano lipaza AK z *Pseudomonas fluorescens*, E: Novozym 435). Ester **2a** otrzymano w tych warunkach z wydajnością 96% (Tabela 1, L.p. 1). Uwzględniając mechanizm reakcji przedstawiony przez Morrone (Część literaturowa, Podrozdział 2.4), cały proces powinien składać się z trzech reakcji cząstkowych (estryfikacji, hydrolizy i dekarboksylacji). Każdy z enzymów (lub jeden z nich) może katalizować wszystkie lub tylko jedną z tych reakcji. Dlatego też przeprowadzono szereg eksperymentów mających na celu określenie wydajności reakcji dla poszczególnych enzymów oraz ich mieszanin- dwóch, trzech lub czterech enzymów. Wyniki zamieszczono w Tabeli 1. Nieoczekiwanie w przypadku zastosowania pojedynczego enzymu nie zaobserwowano tworzenia się produktu (Tabela 1, l.p. 2 – 6). Stwierdzono, że za efekt katalityczny odpowiedzialne są przynajmniej dwa spośród badanej mieszaniny enzymów. Zatem druga seria eksperymentów składała się z reakcji katalizowanej przez dwa enzymy (Tabela 1, l.p. 7 - 16). W sześciu reakcjach ester **2a** został otrzymany z wydajnością wyższą niż 5% (Tabela 1, l.p. 9, 10, 13 – 16). W przypadku mieszaniny zawierającej acylazę I z *Aspergillus melleus* (**B**) i Novozym 435 (**E**) wydajność reakcja była znacząco wyższa (14%, Tabela 1, l.p. 14), niemniej jednak zdecydowanie niższa niż wydajność reakcji katalizowanej przez mieszaninę pięciu enzymów (A, B, C, D, E). Kolejna seria eksperymentów obejmowała mieszaniny 3 enzymów (Tabela 1, l.p. 17 – 26). Podobnie jak w poprzedniej serii istotny wpływ na wydajność reakcji w tym przypadku miała obecność dwóch enzymów: **B** i **E** (Tabela 1, l.p. 19, 24, 25). Produkt **2a** został otrzymany z wydajnością 42%-50%. W serii eksperymentów wykorzystujących 4 enzymy również zaobserwowano kluczowy wpływ dwóch enzymów: acylazy I z *Aspergillus melleus* (**B**) oraz Novozymu 435 (**E**) na przebieg reakcji.

Tabela 1. Estryfikacja kwasu **1a** mieszaniną enzymów (**A, B, C, D, E**).

L.p.	Enzym	W [%]
1.	A, B, C, D, E	96
2.	A	<1
3.	B	<1
4.	C	<1
5.	D	<1
6.	E	<1
7.	A, B	<1
8.	C, D	<1
9.	B, C	5
10.	B, D	5
11.	A, C	<1
12.	A, D	<1
13.	A, E	5
14.	B, E	14
15.	C, E	5
16.	D, E	5
17.	A, B, C	<1
18.	A, B, D	<1
19.	A, B, E	50
20.	A, C, D	<1
21.	A, C, E	13
22.	A, D, E	10
23.	B, C, D	<1
24.	B, C, E	44
25.	B, D, E	42
26.	C, D, E	5
27.	A, B, C, D	<1
28.	A, B, C, E	38
29.	A, B, D, E	66
30.	A, C, D, E	78
31.	B, C, D, E	66
32.	A, B, C, D, F	<1
33.	A, B, C, D, G	<1
34.	A, B, C, D, F, G	10
35.	F, G	<1

^aWarunki reakcji: 6 (1 mmol), PhMe (1ml), EtOC(O)OEt (2 mmol), enzymy (*per* 4 mg), 40°C, 24 godz.

^bA: papaina, B: acylaza I z *Aspergillus melleus*, C: lipaza z kielków pszenicy, D: Amano lipaza AK z *Pseudomonas fluorescens*, E: Novozym 435, F: dezaktywowany Novozym 435, G: lipaza z *Candida antarctica*

Produkt **2a** uzyskano z wydajnościami 38%-78% (Tabela 1, l.p. 28 – 31). Ponadto zaobserwowano, że brak Novozymu 435 zdecydowanie obniża wydajność reakcji (<1%, Tabela 1, l.p. 27), co stanowi przeciwagę do reakcji bez acylazy I z *Aspergillus melleus*, w której odnotowano zwiększenie wydajności w porównaniu do reakcji zawierających

obydwa enzymy (Tabela 1, l.p. 30). W celu ustalenia roli jaką pełni Novozym 435 (lipaza B z *Candida antarctica* zamknięty w matrycy polimerowej) w takich samych warunkach reakcji przeprowadzono eksperymenty zastępując go natywną lipazą z *Candida antarctica*, a w kolejnej reakcji dezaktywowanym Novozymem 435. Zarówno w pierwszym, jak i drugim przypadku otrzymano śladowe ilości estru **2a** (<1%, Tabela 1, l.p. 32 i 33). Natomiast po zastąpieniu Novozymu 435 przez enzym natywny oraz dezaktywowany (w jednym eksperymencie) otrzymano produkt z wydajnością 10% (Tabela 1, l.p. 34). Przedstawione wyniki wskazują, że immobilizacja enzymu ma zasadniczy wpływ na zaobserwowany efekt katalityczny¹²². Przeprowadzono również reakcję z albuminą wołową w celu identyfikacji efektu stabilizującego poprzez obecność innych białek w mieszaninie zamiast enzymów **A**, **B**, **C** i **D**. Zaobserwowano śladowe ilości produktu **2a** (<1%). Podobne rezultaty otrzymano w przypadku zastosowania Novozymu 435 w takiej samej ilości (wagowo: 20mg) jak mieszanina pięciu enzymów (**A**, **B**, **C**, **D** i **E**, całkowita masa=20mg). Zatem zwiększenie ilości białka (czy też samego enzymu) nie jest odpowiedzialne za zaobserwowany efekt katalityczny.

5.2.2. Wpływ wody na wydajność procesu i proponowany mechanizm reakcji

Kolejnym problemem jaki postawiono, było określenie roli wody, która według mechanizmu Morrone ma zasadniczy wpływ na zainicjowanie reakcji. Woda, tworząca się w czasie zainicjowanej przez alkohol alkilowy estryfikacji, hydrolizuje węglan obecny w mieszaninie reakcyjnej. W rezultacie powstaje alkohol alkilowy, który bierze udział w kolejnym cyklu estryfikacji kwasu karboksylowego. Dlatego też wykonano dwa eksperymenty, których przebieg kontrolowano przy użyciu chromatografii gazowej. Analizie poddano dwie mieszaniny reakcyjne:

- A. Mieszanina reakcyjna zawierająca enzymy, toluen, węglan dietylowy oraz kwas karboksylowy **1a**,
- B. Mieszanina reakcyjna zawierająca enzymy, toluen, węglan dietylowy oraz dodatek wody.

¹²² a) Cabrera Z., Fernandez-Lorente G., Fernandez-Lafuente R., Palomo J. M., Guisan J. M. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, 57, 171 – 176; b) A. Tambe, R. Vyasarayani and A. Datla, *Enzyme Eng.*, **2015**, 4, 1000130.

Mieszanki pozostawiono na wytrząsarce w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Etanol w śladowej ilości (<1%) pojawia się jedynie w obecności kwasu karboksylowego **1a** (Mieszanka reakcyjna **A**). Natomiast w mieszaninie reakcyjnej niezawierającej kwasu (Mieszanka reakcyjna **B**) nie został zaobserwowany, co wyklucza jego rolę jako czynnika inicjującego- węglan nie ulega hydrolizie. Jaki zatem wpływ na przebieg reakcji ma obecność wody w mieszaninie reakcyjnej?

Aby odpowiedzieć na powyższe pytanie przeprowadzono serię eksperymentów w celu ustalenia wpływu zawartości wody na przebieg reakcji. Zawartość wody w mieszaninie reakcyjnej wyznaczano bezpośrednio po jej sporządzeniu metodą miareczkowania Karla – Fischera. Ponadto sprawdzono wpływ trifluoroetanolu (TFE) na przebieg reakcji, który podobnie jak woda może wpływać na strukturę enzymu poprzez tworzenie wiązań wodorowych. Wyniki uwzględniające wpływ zawartości wody na przebieg reakcji zamieszczono w Tabeli 2.

Tabela 2. Wpływ zawartości wody oraz TFE na wydajność reakcji estryfikacji.

L.p.	Dodatek	Zawartość wody [%] ^b	W [%]
1.	-	0.080	96
2.	15 μ l H ₂ O	0.094	46
3.	30 μ l H ₂ O	0.153	35
4.	45 μ l H ₂ O	0.115	24
5.	5 mg NaBO ₂ x 4H ₂ O	0.083	81
6.	10 mg NaBO ₂ x 4H ₂ O	0.126	75
7.	15 mg NaBO ₂ x 4H ₂ O	0.082	67
8.	5 mg Na ₂ PO ₄ x 12H ₂ O	0.086	57
9.	10 mg Na ₂ PO ₄ x 12H ₂ O	0.091	43
10.	15 mg Na ₂ PO ₄ x 12H ₂ O	0.099	32
11.	30 μ l TFE	-	41
12.	60 μ l TFE	-	18
13.	90 μ l TFE	-	14

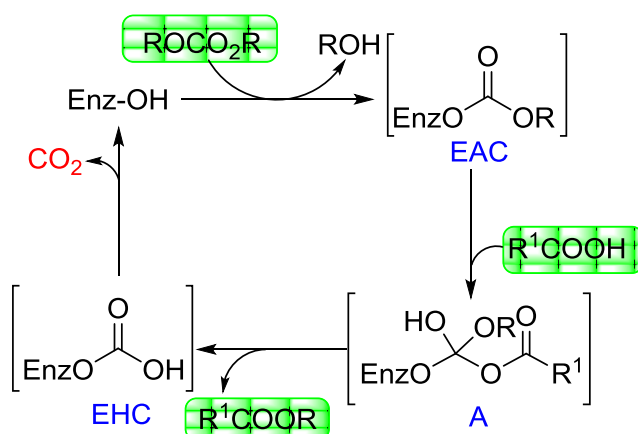
^aWarunki reakcji: **1a** (1 mmol), PhMe (1ml), EtOC(O)OEt (2 mmol), enzymy: A, B, C, D, E (*per* 4 mg), 40°C, 24 godz., dodatek

^bWyznaczony poprzez miareczkowanie mieszaniny reakcyjnej metodą Karla – Fischera w Instytucie Chemii Fizycznej PAN

Dodatek wody (Tabela 2, l.p. 2 – 4), hydratów boranu sodu (Tabela 2, l.p. 5 – 7) oraz hydratów fosforanu sodu (Tabela 2, l.p. 8 – 10) powodował spadek wydajności reakcji. Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku obecności trifluoroetanolu (Tabela 2, l.p. 11 – 13), co prawdopodobnie związane jest z tworzeniem nowych wiązań wodorowych z

enzymami obecnymi w mieszaninie reakcyjnej. Istotną sprawą jest tu również różnica aktywności wody pomiędzy wodą niezwiązaną i związaną w postaci hydratów. W reakcjach zawierających dodatek wody niezwiązanej ester **2a** otrzymano z niższą wydajnością (24-46%, Tabela 2, l.p. 2-4) niż w reakcjach z dodatkiem hydratów (32-81%, Tabela 2, l.p. 5-10).

Analizując powyższe badania zaproponowano inny mechanizm badanej reakcji niż grupa badawcza Morrone, przedstawionego w Rozdziale 2.4. (Schemat 34).



Schemat 34. Proponowany mechanizm reakcji.

W pierwszym etapie wolna grupa hydroksylowa enzymu reaguje z węglanem dialkylowym prowadząc do powstania produktu pośredniego, którym jest kompleks **EAC** oraz odpowiedniego alkoholu alkilowego (proces podobny do tworzenia acylowanego enzymu). Następnie kompleks **EAC** reaguje z kwasem karboksylowym tworząc produkt pośredni **A**, który szybko ulega przekształceniu do odpowiedniego estru produktu pośredniego **EHC**. Kompleks **EHC** ulega reakcji rozpadu do wolnego enzymu i dwutlenku węgla. Uwolnienie cząsteczki dwutlenku węgla jest siłą napędową całego procesu.

Ponieważ najbardziej efektywnym biokatalizatorem badanej reakcji jest mieszanina pięciu enzymów, należy również rozpatrzyć efekt synergii enzymów (lub/i nośnika użytego do immobilizacji), który może być odpowiedzialny za obserwowane przyspieszenie szybkości reakcji. W przypadku katalizatorów nieorganicznych taki efekt zaobserwowano w reakcji kondensacji katalizowanej przez podwójne kompleksy

metali¹²³. W części literaturowej pokazano, że oddziaływania białko-białko (PPI) odgrywają nieocenioną rolę w biochemii oraz biologii molekularnej. Zastosowanie tych oddziaływań i samego efektu synergistycznego na polu reakcji chemicznych katalizowanych przez enzymy stanowi ciekawą koncepcję rozwoju biokatalizy. Merz udowodnił, że w środowisku polarnym oddziaływania białko-rozpuszczalnik mogą współzawodniczyć z oddziaływaniami białko-białko¹²⁴. Zatem oddziaływania enzym-enzym powinny być silniejsze w niepolarnym rozpuszczalniku. Z drugiej strony, Klibanov wykazał, że enzymy w rozpuszczalnikach organicznych działają bardziej efektywnie jeżeli w układzie znajduje się woda¹²⁵. Wyniki przedstawione w Tabeli 2 jednoznacznie pokazują, że systematyczny dodatek wody lub TFE zmniejsza wydajność reakcji, co pozostaje zgodne z badaniami Merza. Większa ilość wody może powodować również szybszą hydrolizę węglanu. Ponadto, w takich warunkach reakcji, produkt (ester) także może ulegać hydrolizie.

5.2.3. Wpływ struktury substratu na przebieg reakcji

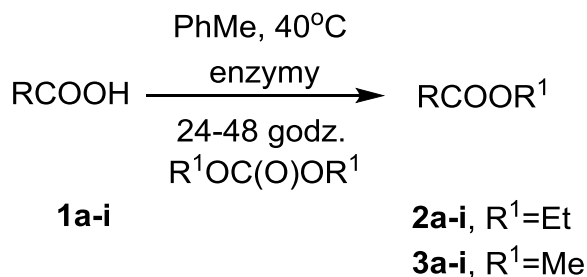
W celu określenia wpływu struktury substratu na przebieg reakcji, do reakcji enzymatycznej estryfikacji węglanami dialkilowymi wybrano kwasy z podstawnikiem aromatycznym oraz o różnej długości i rozgałęzieniu łańcucha alkilowego. Estry tych kwasów są szczególnie użyteczne w przemyśle spożywczym oraz kosmetycznym¹²⁶. Reakcje prowadzono w toluenie w 40 °C (Schemat 35). Jako biokatalizator zastosowano mieszaninę 5 enzymów (A, B, C, D, E). Wyniki zamieszczono w Tabeli 3.

¹²³ A. Sato, Y. Nakamura, T. Maki, K. Ishihara, H. Yamamoto, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 1337.

¹²⁴ D. S. Hartsough, K. M. Merz *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6529.

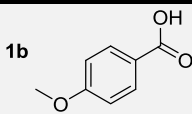
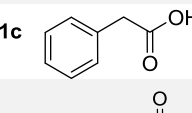
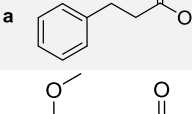
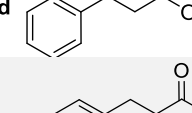
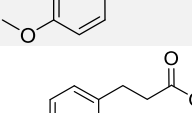
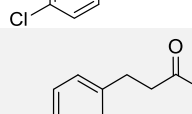
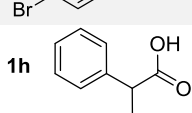
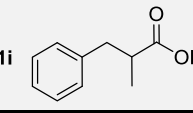
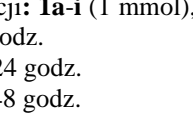
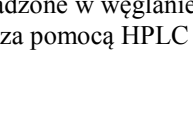
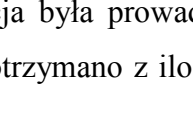


¹²⁵ a) A. M. Klibanov, *Nature* **2001**, 409, 241; b) A. M. P. Koskinen, A. M. Klibanov, *Enzymatic Reactions in Organic Media* Springer, **1996**.

¹²⁶ a) Patent Appl.: WO 2002015691; **2002** b) G. Mosciano; *Organoleptic Characteristics of Flavor Materials: Parfum. Flavor*; **2005**, 6th Edition; c) K. Sunnerheim, A. Nordqvist, G. Nordlander, A. K. Borg-Karlson, C. R. Unelius, B. Bohman, H. Nordenhem, C. Hellqvist, A. Karlén; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, 55, 9365-9372.



Schemat 35. Wpływ struktury kwasów **1a-i** na reakcję estryfikacji węglanami dialkylowymi.

Tabela 3. Estryfikacja kwasów karboksylowych **1a-i** mieszaniną enzymów (A-E).

L.p.	Substrat	R ¹	Prod.	W [%] ^b	W [%] ^c
1.		Me	3b	35	91
2.		Et	2b	46	93
3.		Me	3c	87	100
4.		Et	2c	98	100
5.		Me	3a	89(78) ^d	100(100) ^d
6.		Et	2a	96(86) ^d	100(100) ^d
7.		Me	3d	26	89
8.		Et	2d	75	100
9.		Me	3e	71	100
10.		Et	2e	81	100
11.		Me	3f	67	100
12.		Et	2f	73	100
13.		Me	3g	70	100
14.		Et	2g	72	100
15.		Me	(R)-3h	49 (94% <i>e.e.</i>) ^e	96 (<i>e.e.</i> nb)
16.		Et	2h	71 (<i>e.e.</i> nb)	100 (<i>e.e.</i> nb)
17.		Me	3i	34 (<i>e.e.</i> nb)	92 (<i>e.e.</i> nb)
18.		Et	(R)-2i	64 (55% <i>e.e.</i>) ^e	100 (<i>e.e.</i> nb)

^aWarunki reakcji: **1a-i** (1 mmol), PhMe (1ml), R¹OC(O)OR¹ (2 mmol), enzymy: A, B, C, D, E (*per* 4 mg), 40°C, 24 - 48 godz.

^bCzas reakcji: 24 godz.

^cCzas reakcji: 48 godz.

^dReakcje prowadzone w węglanie bez dodatkowego rozpuszczalnika

^e*e.e.* określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

Każda reakcja była prowadzona przez 24 i 48 godzin. W ciągu 48 godzin większość produktów otrzymano z ilościową wydajnością, oprócz estrów **2b** i **3b** (Tabela 3, l.p. 1,

2), estrów metylowych kwasów **1d**, **1h** i **1i** (Tabela 3, l.p. 7, 15, 17). W przypadku reakcji prowadzonych przez 24 godziny wyniki były zróżnicowane. Estry z najwyższą wydajnością otrzymano podczas estryfikacji kwasów zawierających niepodstawiony pierścień aromatyczny (Tabela 3, l.p. 3 – 6). Wydajność reakcji zdecydowanie rosła wraz z długością łańcucha alkilowego pomiędzy grupą aromatyczną a karboksylową (Tabela 3, l.p. 1-6). Kwasy **1f** i **1g** zawierające pierścień aromatyczny z podstawnikiem elektronoakceptorowym w pozycji *para* ulegały reakcji wolniej (Tabela 3, l.p. 11 – 14) niż kwas **1e** z podstawnikiem elektronodonorowym w tej samej pozycji w pierścieniu (Tabela 3, l.p. 9 i 10). W przypadku kwasu **1d** niska wydajność reakcji prawdopodobnie jest spowodowana zawadą steryczną w pozycji *orto* pierścienia aromatycznego (Tabela 3, l.p. 7), natomiast w przypadku kwasu **1a** małą odległością grupy aromatycznej od centrum reakcji. Zbadano również wpływ rozpuszczalnika na wydajność reakcji. W tym celu przeprowadzono eksperymenty w samym węglanie dialkilowym (Tabela 3, l.p. 5d i 6d). Otrzymano estry **3a** i **2a** z mniejszą wydajnością, co prawdopodobnie związane jest ze zmianą polarności rozpuszczalnika. W ciągu 48 godzin estry **3a** i **2a** otrzymano z ilościową wydajnością, zatem reakcja może być także prowadzona w węglanach jako reaktantach i rozpuszczalnikach. Jest to korzystna sytuacja ze względu na niską toksyczność węglanów. Kolejna seria eksperymentów umożliwiła sprawdzenie enancjoselektywności reakcji. Ester metylowy (*R*)-**3h** otrzymano z 94% *e.e.*, natomiast ester etylowy (*R*)-**2i** z 55% *e.e.* (Tabela 3, l.p. 15^e i 18^e). Stanowi to dobry punkt wyjścia do badań optymalizacyjnych nad opracowaniem EKR tych kwasów.

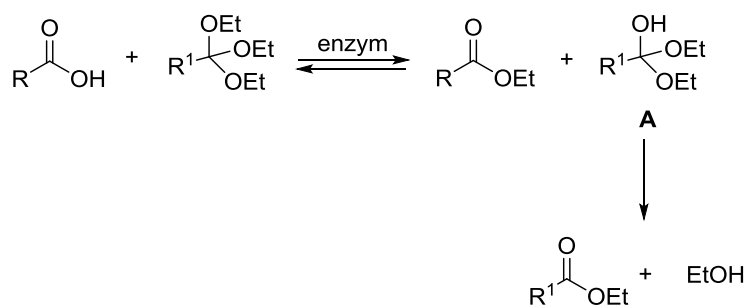
5.2.4. Podsumowanie podrozdziału

Systematyczne badania modelowe wykazały, że efektywnym systemem biokatalitycznym w estryfikacji kwasów karboksylowych węglanami dialkilowymi jest mieszanina pięciu enzymów. Kluczowe znaczenie dla przebiegu reakcji miały dwa enzymy: immobilizowany Novozym 435 oraz natywna acylaza z *Aspergillus oryzae*. Zbadany został również wpływ nośnika użytego do immobilizacji natywnej lipazy z *Candida antarctica* poprzez dezaktywację Novozymu 435. Zaproponowano mechanizm reakcji, w którym węglan jest donorem grupy alkoksylowej. Ponadto wykonano badania określające wpływ wody na aktywność układu biokatalitycznego, a tym samym na wydajność reakcji. Udowodniono, że wraz ze wzrostem zawartości wody w mieszaninie

reakcyjnej wydajność reakcji spada, co jest prawdopodobnie spowodowane hydrolizą produktu reakcji (estru) albo (jeżeli systemem biokatalitycznym jest układ złożony z więcej niż jednego enzymu) osłabieniem oddziaływań enzym-enzym i tym samym zmniejszeniem aktywności układu biokatalitycznego. Zbadano także specyficzność substratową dla badanej mieszaniny enzymów stosując jako substraty pochodne aromatycznych kwasów karboksylowych różniące się długością oraz rozgałęzieniem łańcucha alkilowego pomiędzy grupą aromatyczną a karboksylową. Po 24 godzinach reakcji uzyskano niższe wydajności dla estrów metylowych. Stwierdzono wyraźną selektywność substratową enzymu ze względu na: oddalenie centrum reakcji od pierścienia aromatycznego oraz zmiany podstawników w pierścieniu aromatycznym. Natomiast po 48 godzinach w każdym przypadku produkty reakcji otrzymano z ilościową wydajnością. W reakcji z racemicznymi substratami otrzymano enancjomerycznie wzbogacone estry. Jest to pierwszy systematycznie zbadany multienzymatyczny system, który efektywnie i stereoselektywnie katalizuje reakcję nieodwracalnej estryfikacji węglanami alkilowymi.

5.3. Enzymatyczna estryfikacja pochodnych kwasu 3-arylo-4-pentenowego

Grupą donorów grupy alkoksylowej w enzymatycznej estryfikacji mogą być także ortoestry. Z danych literaturowych wynika, że reakcja pomiędzy kwasami karboksylowymi a ortoestrami przebiega samoistnie, bez czynnika inicjującego lub katalizatora, jednak z reguły z niską wydajnością i w bardzo wysokiej temperaturze¹²⁷. Zatem zastosowanie enzymu może również zwiększyć wydajność reakcji. Ideę procesu przedstawiono na Schemacie 36.



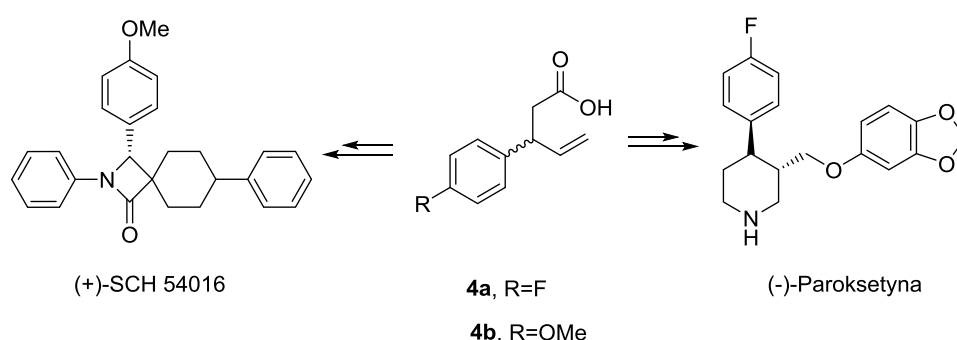
Schemat 36. Idea estryfikacji kwasów karboksylowych ortoestrami.

¹²⁷ Trujillo, J. I.; Gopalan, A. S.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7355-7358.

W tym przypadku dominującym procesem może być enzymatyczna estryfikacja kwasu karboksylowego ortoestrem np. trietylowym, wówczas powinien powstać odpowiedni ester etylowy oraz nietrwały produkt pośredni **A**, który ulega nieodwracalnemu rozpadowi do estru etylowego oraz etanolu.

5.3.1. Synteza racemicznych pochodnych kwasu 3-arylo-4-pentenowego

Jako substraty modelowe do badań wybrano pochodne kwasu 3-arylo-4-pentenowego posiadające podstawniki w pozycji *para* grupy fenylowej. Związki te wybrano ze względu na istotną rolę, jaką pełnią w syntezie szeregu innych związków aktywnych biologicznie. Jeżeli podstawnikiem jest atom fluoru, to związek (**4a**) stanowi cenny substrat do syntezy Paroksetyny, która jest selektywnym inhibitorem receptora serotoniny^{128,129}. Z kolei kwas zawierający grupę metoksyową (**4b**) stanowi substrat do syntezy substancji aktywnej biologicznie (+)-SCH 54016, która ma właściwości obniżające poziom cholesterolu we krwi¹³⁰ (Schemat 37).



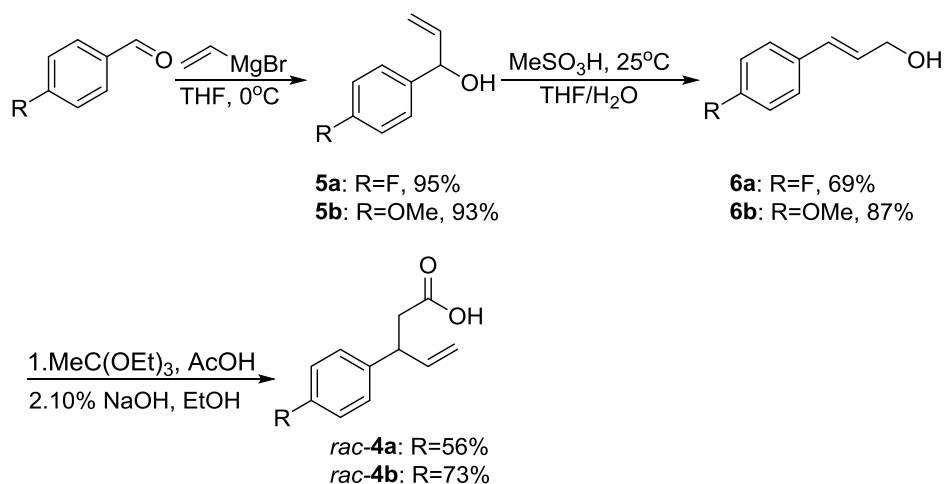
Schemat 37. Kwasy 3-fenylo-4-pentenowe jako prekursorzy związków aktywnych biologicznie.

Pierwszy etap badań obejmował syntezę racemicznych substratów (Schemat 38). W reakcji Grignarda z aldehydu *p*-fluoro- i *p*-metoksybenzoesowego oraz bromku winylomagnezowego otrzymano drugorzędowe alkohole allilowe **5a** i **5b** z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 93% i 95% (Procedura Ogólna 2).

¹²⁸ Liu L. T., Hong P. C., Huang H. L., Chen S. F., Wang C. L. J., Wen Y. S. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 419 – 426.

¹²⁹ Yu M. S., Lantos I., Peng Z. Q., Lu J., Cacchio T. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 5647 – 5651.

¹³⁰ Chen L. Y., Zaks A., Chackalamannil S., Dugar S. *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 8341 – 8343.



Schemat 38. Synteza racemicznych kwasów **4a** i **4b**.

Następnie związki te poddano reakcji izomeryzacji w obecności kwasu metanosulfonowego do alkoholi cynamonowych **6a** oraz **6b** uzyskując produkty z wydajnościami odpowiednio 69% i 87% (Procedura Ogólna 3). Ta reakcja prowadzona w większej skali (> 2g) wymagała optymalizacji, ze względu na znaczny spadek wydajności. Wyniki badań optymalizacyjnych nad reakcją izomeryzacji przedstawiono w Tabeli 4.

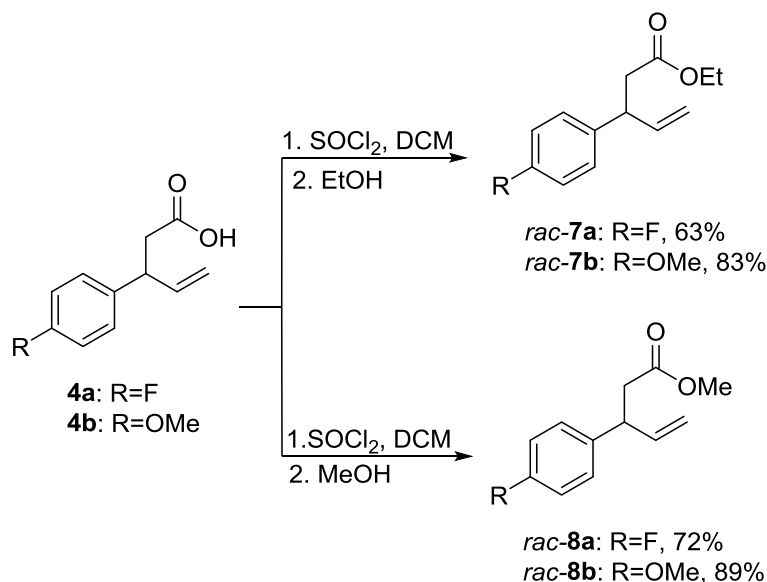
Tabela 4. Badania nad optymalizacją reakcji izomeryzacji alkoholu **5a** i **5b**.

L.p.	Alkohol	skala	THF/woda	kwas [mol/eq]	W [%]
1.	5a	100 mg	4 ml/1 ml	2	69
2.	5a	2 g	20 ml/10 ml	3	63
3.	5b	100 mg	4 ml/1 ml	2	87
4.	5b	2 g	20 ml/10 ml	3	81

Następnie alkohole cynamonowe **6** poddano przegrupowaniu Johnsona-Claisena z ortoocetanem trietylu i otrzymano odpowiednie estry etylowe, które poddano reakcji hydrolizy w warunkach zasadowych uzyskując racemiczne kwasy 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowy (*rac-4a*) i kwas 3-(*p*-metoksyfenylo)-4-pentenowy (*rac-4b*) z wydajnościami całkowitymi wynoszącymi odpowiednio 56% i 73% (Procedura Ogólna 4).

Aby można było opracować metodę oznaczania nadmiaru enancjomerycznego produktów (*e.e.p.*) uzyskanych w wyniku reakcji enzymatycznych za pomocą HPLC niezbędne było wykonanie syntezy racemicznych estrów etylowych i metylowych kwasów *rac-4a* i *rac-*

4b. Estry otrzymano w reakcji chlorku odpowiedniego kwasu z etanolem lub metanolem (Schemat 39). Chlorek kwasowy otrzymano w reakcji kwasu z chlorkiem tionylu w dichlorometanie. Ester *rac-7a* otrzymano z wydajnością 63%, ester *rac-7b* z wydajnością 85% (Procedura Ogólna 5).

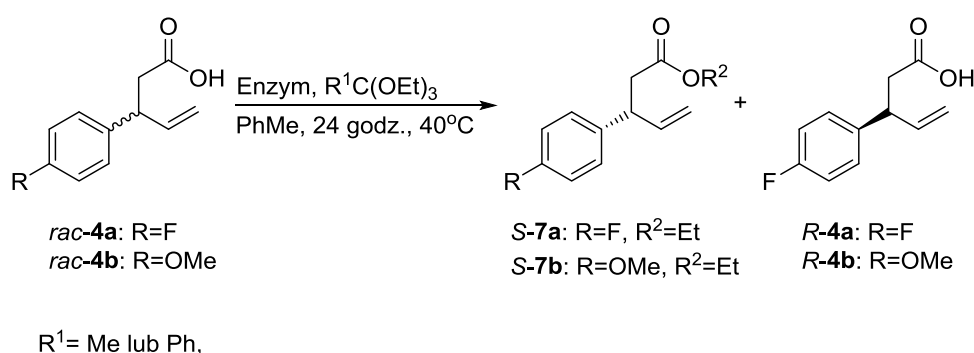


Schemat 39. Synteza racemicznych estrów etylowych **7** i metylowych **8** nienasyconych kwasów **4**.

Dobór odpowiednich warunków analizy chromatograficznej produktów uzyskanych w reakcjach enzymatycznych okazał się problematyczny. Wykonano szereg eksperymentów dla kolumn z dwiema różnymi chiralnymi fazami stacjonarnymi: CHIRALCEL OD–H i CHIRALPAK AS–H firmy Chiralcel®. W przypadku zastosowania kolumny CHIRALPAK OD – H nie wyznaczono odpowiednich warunków podziału pomimo zmiany układu elucyjnego oraz przepływu. W przypadku kolumny CHIRALPAK AS – H duży wpływ na specyficzną metodę miała temperatura otoczenia: zadowalający rozdział enancjomerów estrów estylowych i metylowych kwasów **4a** i **4b** uzyskiwano w temperaturze mniejszej lub równej 25 °C (czasy retencji i warunki analizy chromatograficznej: Część eksperymentalna, Podrozdział 7.3).

5.3.2. Zastosowanie ortoestrów trietylowych jako donorów grupy alkoksylowej w enzymatycznym rozdziale kinetycznym pochodnych kwasu 3-arylo-4-pentenowego

W kolejnej części badań wykonano screening enzymatyczny, w wyniku którego ustalono, że reakcje kwasów *rac-4a* i *rac-4b* z ortoocetanem trietylowym jest katalizowana przez enzymy. Jako rozpuszczalnik wybrano toluen, w którym w temperaturze 40 °C, rozpuszczają się zarówno substraty, jak i produkty reakcji enzymatycznej. Reakcje prowadzono przez 24 godziny (Schemat 40, Procedura Ogólna 7). Jako biokatalizatory reakcji wykorzystano szereg enzymów komercyjnych i wybrane preparaty enzymatyczne w postaci proszków acetonowych z organów zwierzęcych (przygotowanych w Zespole XX ICHO PAN). Uzyskane wyniki zamieszczono w Tabeli 5.



Schemat 40. Enzymatyczna estryfikacja kwasów *rac-4a* i *rac-4b* ortoocetanem trietylu.

Produkt (*S-7a*) uzyskano z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym (47% i 45%) stosując lipazę z *Rhizopus arrhizus* oraz Novozym 435A (Tabela 5, l.p. 7 i 10). Niemniej jednak enancjoselektywność reakcji była niska ($E = 3$). W przypadku wykorzystania lipazy z *Mucor javanicus* nie zaobserwowano konwersji substratu (Tabela 5, l.p. 6). Kolejną serię eksperymentów przeprowadzono stosując proszki acetonowe z organów zwierzęcych (przygotowane w Zespole XX Instytutu Chemii Organicznej PAN). Ester (*S-7a*) otrzymano z wydajnością powyżej 40% (Tabela 5, l.p. 13 – 17) oraz zdecydowanie wyższym nadmiarem enancjomerycznym (84%). Najwyższą enancjoselektywność uzyskano w reakcji katalizowanej przez preparat enzymatyczny wątroby gęsiej (GLAP, $E = 24$) (Tabela 5, l.p. 13).

Tabela 5. Estryfikacja kwasu *rac*-**4a** ortoocetanem trietylu MeC(OEt)₃.

L.p.	Enzym	Prod.	W [%]	<i>e.e.</i> [%] ^b	E [-] ^c
1.	Lipaza z kielków pszenicy	(<i>S</i>)- 7a	13	8	1
2.	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>	(<i>S</i>)- 7a	24	10	1
3.	Lipaza z <i>Pseudomonas roqueforti</i>	(<i>S</i>)- 7a	31	40	3
4.	Lipaza z <i>Mucor miehei</i> imm.	(<i>S</i>)- 7a	38	32	2
5.	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i> imm.	(<i>S</i>)- 7a	35	38	3
6.	Lipaza z <i>Mucor javanicus</i>	(<i>S</i>)- 7a	-	-	-
7.	Lipaza z <i>Rhizopus arrhizus</i>	(<i>S</i>)- 7a	16	47	3
8.	Lipaza z <i>Rhizopus niveus</i>	(<i>S</i>)- 7a	9	19	2
9.	Lipaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	(<i>S</i>)- 7a	26	34	2
10.	Novozym 435A	(<i>S</i>)- 7a	29	45	3
11.	Lipaza z <i>Chromobacterium viscosum</i>	(<i>S</i>)- 7a	26	37	3
12.	Lipaza Amano AK	(<i>S</i>)- 7a	10	25	2
13.	GLAP	(<i>S</i>)- 7a	41	84	24
14.	BKAP	(<i>S</i>)- 7a	40	47	4
15.	BLAP	(<i>S</i>)- 7a	55	68	13
16.	WLAP	(<i>S</i>)- 7a	44	62	7
17.	JLAP	(<i>S</i>)- 7a	48	75	14
18 ^d	Novozym 435	(<i>S</i>)- 7a	45	97	160
19 ^d	GLAP	(<i>S</i>)- 7a	47	99	>200

^aWarunki reakcji: **4a** (0.15 mmol), PhMe (0.60 ml) ortoocetan (0.3 ml), enzym 10 mg, 40°C, 24 godz.

^b*e.e.* określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel AS-H.

^cObliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$.

^dWarunki reakcji: **4a** (0.15 mmol), PhMe (0.60 ml) ortobenzoesan trietylu- PhC(OEt)₃ (0.3 ml), enzym 10 mg, 40°C, 24 godz.

Uwzględniając enancjoselektywność reakcji z ortoocetanami trietylowymi dla najbardziej efektywnych enzymów potwórzono eksperymenty stosując ortomrówczan trietylu. Niestety nie odnotowano enancjoselektywności reakcji większej niż 1. Następnie kwas *rac*-**4a** poddano dodatkowo estryfikacji z użyciem ortobenzoesu trietylu w takich samych warunkach reakcji (Tabela 5, l.p. 18^d i 19^d). Otrzymano ester etylowy (*S*)-**7a** z wydajnością odpowiednio 45% i 47% oraz nadmiarami enancjomerycznymi 97% i 99% (E=160 i E>200) w reakcjach katalizowanych przez Novozym 435 i GLAP. Wynik ten

oraz eksperymenty z użyciem ortomrówczanów zaprzeczają słuszności mechanizmu reakcji podanego przez Morrone, w którym grupa boczna (R^1) ortoestru nie ma wpływu na enancjoselektywność reakcji.

Przeprowadzono również EKR kwasu *rac*-**4b**. Reakcje były prowadzone w toluenie przez 24 godziny. Jako biokatalizatory stosowano enzymy komercyjnie dostępne oraz proszki acetonowe. Wyniki badań zamieszczono w Tabeli 6.

Tabela 6. Estryfikacja kwasu *rac*-**4b** ortoocetanem trietylu $\text{MeC}(\text{OEt})_3$.

L.p.	Enzym	Prod.	W [%]	<i>e.e.</i> [%] ^b	E [-] ^c
1.	Lipaza z kielków pszenicy	(<i>S</i>)- 7b	18	11	1
2.	Lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i> imm.	(<i>S</i>)- 7b	20	10	1
3.	Lipaza z <i>Mucor miehei</i> imm.	(<i>S</i>)- 7b	36	12	1
4.	Lipaza z <i>Pseudomonas roqueforti</i>	(<i>S</i>)- 7b	24	14	1
5.	Lipaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	(<i>S</i>)- 7b	45	26	2
6. ^d	Novozym 435	(<i>S</i>)- 7b	21	48	3
7.	GLAP	(<i>S</i>)- 7b	49	12	1
8.	BLAP	(<i>S</i>)- 7b	48	69	10
9.	BKAP	(<i>S</i>)- 7b	51	49	5
10.	WLAP	(<i>S</i>)- 7b	42	68	9
11.	JLAP	(<i>S</i>)- 7b	34	53	4

^aWarunki reakcji: **4b** (0.15 mmol), PhMe (0.60 ml) ortoocetan trietylu (0.3 ml), enzym 10 mg, 40°C, 24 godz.

^b*e.e.* określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel AS-H

^cObliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$.

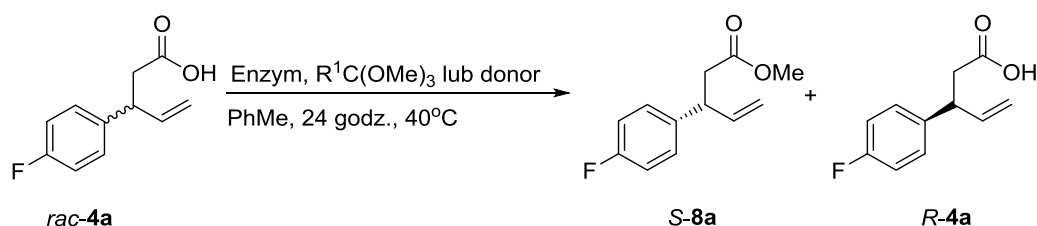
^dWarunki reakcji: **4b** (0.15 mmol), PhMe (0.60 ml) ortobenzoesan trietylu- $\text{PhC}(\text{OEt})_3$ (0.3 ml), enzym 10 mg, 40°C, 24 godz.

Wykorzystanie proszków acetonowych z organów zwierzęcych (AP-ów) jako biokatalizatorów reakcji estryfikacji kwasu posiadającego grupę metoksyłową w pozycji para (**4b**) dało o wiele lepsze rezultaty. Ester (*S*)-**7b** uzyskano z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym (69%) i wydajnością (48%) w reakcji katalizowanej przez preparat enzymatyczny z wątroby wołowej (BLAP, Tabela 6, l.p. 8) w serii eksperymentów z proszkami acetonowymi (Tabela 3, l.p. 7-11). W przypadku enzymów komercyjnych nadmiar enancjomeryczny produktu (*S*)-**7b** nie przekroczył 30% (Tabela 3, l.p. 1-5) w reakcji z ortoocetanem trietylu. Dodatkowo przeprowadzono reakcję z ortobenzoesanem

trietylu katalizowaną przez Novozym 435 (Tabela 6, l.p. 6^d) otrzymując ester (*S*)-**7b** z nadmiarem enancjomerycznym równym 48%.

5.3.3. Zastosowanie ortoestrów trimetylowych oraz innych donorów grupy metoksylovej

Opisane powyżej eksperymenty wskazują, że grupa R¹ w łańcuchu bocznym ortoestru (R¹C(OR²)₃) ma wpływ na enancjoselektywność reakcji. Aby sprawdzić wpływ grupy estrowej R², kolejna część eksperymentów została wykonana z ortoestrami trimetylowymi (R²=Me) oraz innymi donorami grupy metoksylovej (Schemat 41). Reakcje prowadzono w toluenie, 40 °C oraz przez 24 godziny (Procedura Ogólna 8). Do badań wykorzystano jedynie kwas *rac*-**4a**. Wyniki badań zamieszczono w Tabeli 7.



Schemat 41. Estryfikacja kwasu **4a** donorami grupy metoksylovej.

Tabela 7. Estryfikacja kwasu **4a** ortoestrami trimetylu (R¹=Me lub R¹=Ph).

L.p.	Enzym	R ¹ C(OMe) ₃	Prod.	W [%]	<i>e.e.</i> [%] ^b	E [-] ^c
1.	GLAP	R ¹ =Me	(<i>S</i>)- 8a	32	88	22
2.	BKAP	R ¹ =Me	(<i>S</i>)- 8a	10	50	3
3.	BLAP	R ¹ =Me	(<i>S</i>)- 8a	22	69	7
4.	WLAP	R ¹ =Me	(<i>S</i>)- 8a	15	12	1
5.	JLAP	R ¹ =Me	(<i>S</i>)- 8a	26	80	12
6.	JLAP	R ¹ =Ph	(<i>S</i>)- 8a	36	90	31
7.	BLAP	R ¹ =Ph	(<i>S</i>)- 8a	42	82	18
8.	GLAP	R ¹ =Ph	(<i>S</i>)- 8a	42	92	48

^aWarunki reakcji: **4a** (0.15 mmol), PhMe (0.60 ml) ortoester trimetylu (0.3 ml), enzym 10 mg, 40°C, 24 godz.

^b*e.e.* określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel AS-H

^cObliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$.

Jako biokatalizatory zastosowano preparaty enzymatyczne z organów zwierzęcych. Podczas estryfikacji kwasu *rac*-**4a** ortoocetanem trimetylu otrzymano produkt (*S*)-**8a** z niższymi wydajnościami niż w przypadku estryfikacji ortoocetanem trietylu (Tabela 7, l.p. 1 – 5). Nadmiary enancjomeryczne produktu (*S*)-**8a** były zbliżone z wyjątkiem reakcji katalizowanej przez WLAP, gdzie nadmiar enancjomeryczny produktu był zdecydowanie niższy (12%) (Tabela 7, l.p. 4). Do reakcji z ortobenzoesanem trimetylu wybrano trzy najbardziej efektywne biokatalizatory: JLAP, BLAP, GLAP (Tabela 7, l.p. 6 – 8). Produkt (*S*)-**8a** uzyskano z najwyższą enancjoselektywnością w reakcji katalizowanej przez GLAP (Tabela 7, l.p. 8). W pozostałych dwóch przypadkach produkt (*S*)-**8a** otrzymano z niższym nadmiarem enancjomerycznym (Tabela 7, l.p. 6 i 7). Zmiana grupy etylowej na metylową (R^2) w donorze wpłynęła negatywnie na wydajność reakcji (reakcje z ortoocetanem trimetylu), jak i na jej enancjoselektywność (reakcje z ortobenzoesanem trimetylu).

Wracając do mechanizmu zaproponowanego przez Morrone struktura donora grupy alkoksylowej nie powinna mieć wpływu na enancjoselektywność reakcji, ponieważ donor nie reaguje bezpośrednio z enzymem. Donor hydrolizuje do alkoholu, który w katalizowanej przez enzym reakcji z kwasem karboksylowym tworzy odpowiedni ester. Zatem postanowiono sprawdzić również wpływ struktury innych donorów grupy metoksylowej na enancjoselektywność reakcji. Wyniki badań przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Estryfikacja kwasu *rac*-**4a** różnymi donorami grupy alkoksylowej katalizowana przez GLAP.

L.p.	Donor	Prod.	W [%]	<i>e.e.</i> [%] ^b	E [-] ^c
1.	ortoocetan trietylu	(<i>S</i>)- 8a	41	84	24
2.	2,2 - dimetoksypropan	(<i>S</i>)- 8a	3	85	13
3.	ortowęglan tetrametylu	(<i>S</i>)- 8a	15	72	7
4.	1,1 - dimetoksyetan	(<i>S</i>)- 8a	5	79	9
5.	dimetoksybenzyl	(<i>S</i>)- 8a	11	91	24

^aWarunki reakcji: **4a** (0.15 mmol), PhMe (0.60 ml), donor grupy metoksylowej (0.3 ml), GLAP 10 mg, 40°C, 24 godz.

^b*e.e.* określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel AS-H

^cObliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$

Zastosowano cztery różne substraty jako donory grupy metoksylowej: 2,2–dimetoksypropan, ortowęglan tetrametylu, 1,1 – dimetoksyetan oraz dimetoksybenzyl

(Tabela 8, l.p. 2-5). Produkt (*S*)-**8a** został otrzymany z niskimi wydajnościami (>15%) oraz nadmiarami enancjomerycznymi od 72% do 91%.

Zmiana donora spowalnia kinetykę reakcji (niższe wydajności w porównaniu z ortoocetanem trietylu, Tabela 8, l.p. 1), co nie przeczy mechanizmowi Morrone. Zaobserwowano natomiast znaczący spadek enancjoselektywności (Tabela 8, l.p. 2-4). Według proponowanego mechanizmu jest to niemożliwe, gdyż donor grupy alkoksylowej nie reaguje bezpośrednio z kwasem. Uzyskane wyniki wskazują, że enzymy akceptują też inne donory grupy alkoksylowej. Zmiana donora ma decydujący wpływ na enancjoselektywność reakcji.

5.3.4. Podsumowanie podrozdziału 5.3

Wynonano syntezę racemicznych kwasów 3-arylo-4-pentenowych *rac*-**4a** i *rac*-**4b** oraz syntezę estrów etylowych i metylowych tych kwasów. Dla racemicznych estrów *rac*-**7a**, *rac*-**7b**, *rac*-**8a** i *rac*-**8b** opracowano metodę rozdzielania chromatograficznego enancjomerów. Dla racemicznych kwasów *rac*-**4a** i *rac*-**4b** wykonano badania nad opracowaniem metody ich enzymatycznego rozdzielania kinetycznego. Zastosowano enzymatyczną estryfikację kwasów ortoestrami. Parametrem zmiennym reakcji estryfikacji, którego wpływ na enancjoselektywność procesu badano był rodzaj biokatalizatora. W reakcjach, w których substratem był zarówno kwas *rac*-**4a**, jak i *rac*-**4b** lepsze właściwości biokatalityczne wykazywały enzymy uzyskane z organów zwierzęcych w postaci proszków acetonowych. Prawdopodobnie jest to spowodowane mniejszą specyficnością substratową tak pozyskiwanych biokatalizatorów. Ester (*S*)-**7a** uzyskano z najwyższą enancjoselektywnością (>200) w reakcji z ortobenzoesanem trietylu katalizowanej przez GLAP. Ester (*S*)-**7b** otrzymano z najwyższą enancjoselektywnością równą 10 w reakcji katalizowanej przez BLAP, co jest dobrym punktem wyjścia do dalszych badań optymalizacyjnych. Immobilizowane i natywne lipazy dostępne komercyjnie wykazywały zdecydowanie gorsze właściwości katalityczne. Stwierdzono, że ortobenzoesan trietylowy są lepszym donorem grupy etoksylowej niż ortoocetan trietylu. Zastosowanie szeregu analogicznych ortoestrów, acetalii i ortowęglań jako donorów grupy metoksylowej umożliwiło uzyskanie odpowiedniego enancjomerycznie wzbogaconego estru (*S*)-**8a**. Otrzymane wyniki wskazują, że zmiana donora grupy alkoksylowej ma zasadniczy wpływ na enancjoselektywność reakcji.

5.4. Badania nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych

Badania przedstawione w poprzednich rozdziałach wskazują, że reakcja nieodwracalnej enzymatycznej estryfikacji stanowi doskonałe narzędzie do enzymatycznego rozdziału kinetycznego (EKR) racemicznych kwasów karboksylowych. Zarówno zastosowanie ortoestrów, jak i węglanów pozwala uzyskać odpowiednie estry z wysoką wydajnością oraz (w przypadku racemicznych, chiralnych substratów) enancjoselektywnością. Niemniej jednak zdecydowanym ograniczeniem jest w tym przypadku wydajność procesu, która nie przekracza 50%. Dlatego też kolejny etap obejmował wykonanie badań nad dynamicznym rozdziałem kinetycznym racemicznych kwasów karboksylowych.

Do badań wybrano racemiczne kwasy 3-hydroksy-3-arylopropanowe. Enancjomerycznie wzbogacone 3-hydroksyestry i ich pochodne stanowią grupę ważnych syntonów, z których chiralne nieracemiczne estry kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych są prekursorami m. in: fluoksetyny¹³¹, antybiotyków β -laktamowych¹³², inhibitora reduktazy HMG koenzymu A¹³³ oraz chiralnych β -blokerów¹³⁴. Dlatego też synteza chiralnych, nieracemicznych pochodnych tych kwasów jest ważna z punktu widzenia chemii medycznej i farmacji. Dwa najczęściej wykorzystywane podejścia to reakcja aldolowa¹³⁵ oraz katalityczne wodorowanie asymetryczne¹³⁶. Metody enzymatyczne również są eksploatowane, głównie asymetryczna redukcja ketonów¹³⁷ oraz enzymatyczny rozdział kinetyczny racemicznych 3-hydroksyestrów¹³⁸. Znane metody enzymatyczne mają niestety wady. W przypadku redukcji ketonów jest to regeneracja kofaktora oraz małe stężenie substratu (oraz produktu) w medium reakcyjnym. Natomiast w przypadku rozdziału kinetycznego 3-hydroksyestrów jest to możliwość

¹³¹ a) R. Chenevert, G. Fortier, *Chem. Lett.* **1991**, 1603-1606; b) E.J. Corey, G.A. Reichard, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 5207-5210; c) A. Kumar, D. H. Ner, S.Y. Dike, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 1901-1904.

¹³² P. Swaren, I. Massova, J.R. Bellettine, A. Bulychev, L. Maveyraud, L.P. Kotra, M.J. Miller, S. Mobashery, J.P. Samama, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5353-5359.

¹³³ S. Colle, C. Taillefumier, Y. Chapleur, R. Liebl, A. Schmidt, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 1049-1057.

¹³⁴ K. Wunsche, U. Schwaneberg, U.T. Bornscheuer, H.H. Meyer, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 2017-2022.

¹³⁵ a) K. Wadhwa, J. G. Verkade, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 4368-4371; b) C.W. Downey, M.W. Johnson, D.H. Lawrence, A.S. Fleisher, K.J. Tracy, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 5351-5354.

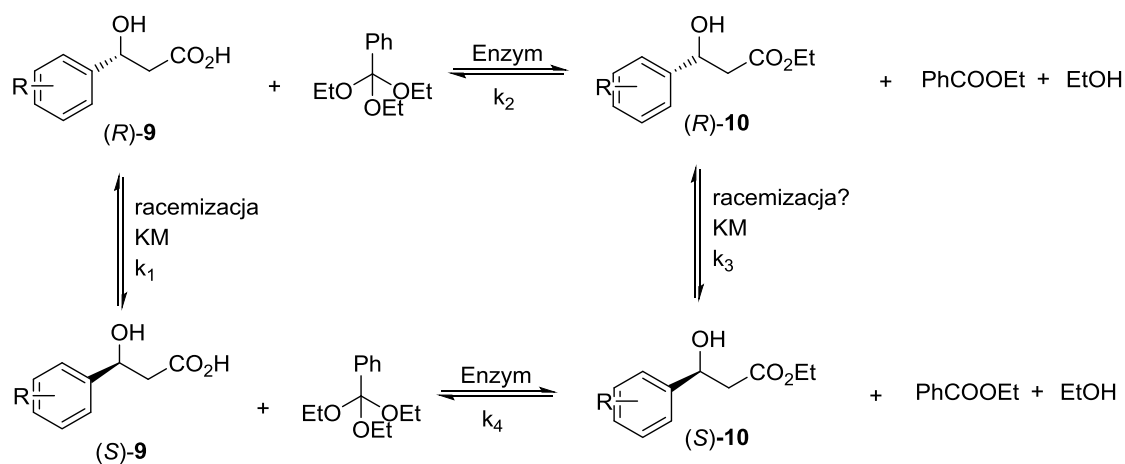
¹³⁶ a) R. Noyori, *Asymmetric Catalysis in Organic Chemistry*, Wiley & Sons, New York, **1994**, pp. 62; b) T. Ireland, G. Grossheimann, J. C. Wieser, P. Knochel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3212-3214.

¹³⁷ S.K. Padhi, D. Titu, N.G. Pandian, A. Chadha, *Tetrahedron* **2006**, 62, 5133-5140.

¹³⁸ a) N.W. Boaz, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4289-4292; b) P. Borowiecki, M. Bretner, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, 24, 925-936.

racemizacji produktu w trakcie odbezpieczania grupy hydroksylowej. Nowa, enzymatyczna metoda pozwalająca ominąć te niedogodności byłaby świetną alternatywą dla istniejących metod chemicznych i enzymatycznych.

Ideą tej metody jest racemizacja kwasu 3-hydroksy-3-aryloopropanowego połączona z enzymatyczną estryfikacją, w której jeden z enancjomerów reaguje szybciej, tak jak w klasycznym EKR (Schemat 42).



KM - kompleks metalu
 k_1, k_2, k_3, k_4 - stałe szybkości reakcji

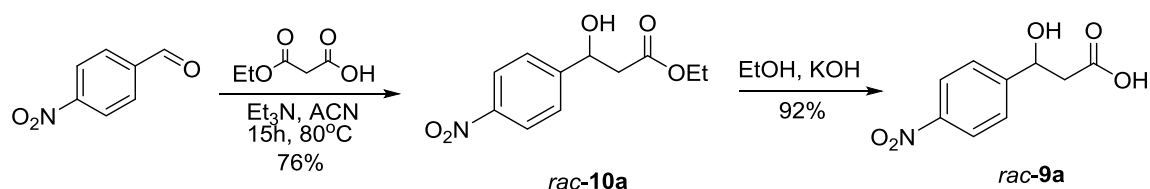
Schemat 42. Idea dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-hydroksy-3-aryloopropanowych.

Badania nad opracowaniem powyższej metodologii podzielono na trzy etapy:

1. Opracowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-hydroksy-3-aryloopropanowych-optimalizacja warunków reakcji oraz dobór biokatalizatora,
2. Badania nad opracowaniem metody racemizacji hydroksykwasów, (tak aby uniknąć racemizacji produktu- hydroksyestru),
3. Badania nad opracowaniem enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-hydroksy-3-fenylopropanowych; optimalizacja warunków reakcji oraz dobór odpowiedniego układu katalitycznego enzym-metal.

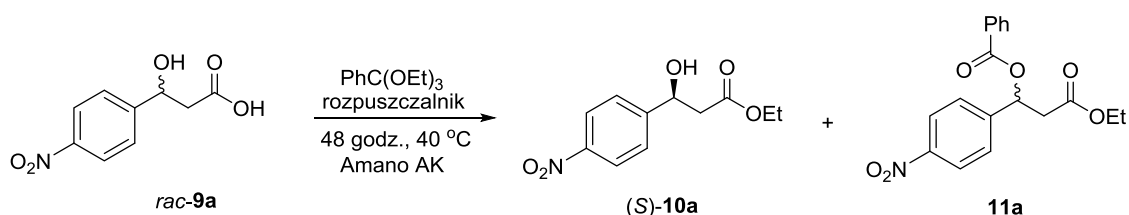
5.4.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego w enzymatycznej nieodwracalnej estryfikacji

Jako związek modelowy do enzymatycznego rozdziału kinetycznego wybrano racemiczny kwas 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowy (*rac-9a*) (Schemat 43), który jest prekursorem leków przeciwnowotworowych¹³⁹ oraz czynnika cytotoksycznego (HSAs)¹⁴⁰. Wykonano syntezę racemicznego kwasu **9a**. W dekarboksylatywnej reakcji aldolowej etapie otrzymano ester **10a** z wydajnością 76%, który następnie poddano reakcji hydrolizy otrzymując kwas **9a** z wydajnością 92% (Schemat 43, Procedury Ogólne 9 i 10).



Schemat 43. Synteza racemicznego kwasu *rac-9a*.

Do EKR kwasu *rac-9a* zastosowano metodologię opracowaną w Rozdziale 5.3. „Badań własnych” opierającą się na nieodwracalnej enzymatycznej estryfikacji ortobenzoesanem trietylu. Donor ten został wybrany nie tylko ze względu na wysoką enancjoselektywność reakcji, w których był stosowany, ale również na wysoką temperaturę wrzenia, co ma kluczowe znaczenie w klasycznym EDKR.



Schemat 44. EKR kwasu *rac-9a*.

¹³⁹ A. J. Lin, R. E. Miller, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 764-770.

¹⁴⁰ R. T. Mulcahy, J. J. Gipp, J. P. Schmidt, C. Joswig, R. F. Borc, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1610-1615.

Substrat **9a** może reagować z ortobenzoesanem trietylowym prowadząc do otrzymania dwóch różnych produktów reakcji: ester etylowy **10a** oraz acylowany ester **11a** (Schemat 44). Warunki reakcji musiały być tak dobrane, aby otrzymać tylko produkt **10a** z wysoką enancjoselektywnością. W pierwszym etapie zbadano wpływ rozpuszczalnika na przebieg reakcji. Jako biokatalizator wybrano lipazę Amano AK. Reakcje prowadzono w temperaturze 40 °C przez 48 godzin. Wyniki zamieszczono w Tabeli 9.

Tabela 9. Wpływ rozpuszczalnika na EKR kwasu *rac*-**9a**.

L.p.	Rozpuszczalnik	Log <i>P</i> (ϵ_r)	Prod.	W ^b [%]	<i>e.e.</i> ^c [%]	E ^d [-]
1.	toluen	2.30 (2.38)	10a ^e	29	51 (<i>S</i>)	5
2.	cycloheksan	2.70 (2.20)	10a ^f	31	82 (<i>S</i>)	14
3.	eter izoamylowy	4.25 (2.80)	10a	37	96 (<i>S</i>)	87
4.	TBME	1.40 (2.60)	10a	37	99 (<i>S</i>)	>200

^aWarunki reakcji: *rac*-**9a** (0.1 mmol), ortobenzoesan trietylu (2 equiv.), rozpuszczalnik (2.0 mL), lipaza Amano AK (10 mg).

^bObliczona dla produktu **10a**.

^cOkreślono za pomocą HPLC (Chiralpak IA) dla produktu **10a**.

^dObliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$.

^ew mieszaninie reakcyjnej zidentyfikowano 5% związku **11a**

^fw mieszaninie reakcyjnej zidentyfikowano 8% związku **11a**

Eksperymenty przeprowadzono w rozpuszczalnikach organicznych różniących się lipofilowością (wartość współczynnika podziału od 1.40 do 4.25), ale o podobnej polarności (niskie wartości stałej dielektrycznej od 2.38 do 2.80). W toluenie ester **10a** otrzymano z umiarkowanym nadmiarem enancjomerycznym (51%) oraz wydajnością (Tabela 9, l.p. 1). Ponadto w reakcji otrzymano też związek **11a** z wydajnością 5%. W cycloheksanie również otrzymano produkt **10a** z wydajnością 31% oraz acylowany ester **11a** z wydajnością 8% (Tabela 9, l.p. 2). Produkt **10a** otrzymano z wyższym nadmiarem enancjomerycznym (82%) niż w toluenie. Dla estru **11a** nie określono konfiguracji. W eterze TBME oraz izoamylowym otrzymano tylko ester **10a** z wydajnością 37% oraz zdecydowanie wyższym nadmiarem enancjomerycznym (Tabela 9, l.p. 3 i 4). Produkt (*S*)-**10a** został otrzymany z najwyższą enancjoselektywnością (>200) w eterze *tert*-butylometylowym (Tabela 9, l.p. 4). Badania wykazały, że zmiana rozpuszczalnika ma ogromny wpływ na enancjoselektywność oraz chemoselektywność reakcji.

Po wyselekcjonowaniu najlepszego rozpuszczalnika, kolejny etap badań obejmował sprawdzenie wpływu donora grupy alkoksylowej na przebieg reakcji. Reakcje

proawdzono w TBME, w 40 °C przez 48 godzin. Jako biokatalizator zastosowano lipazę Amano AK. Wyniki badań zamieszczono w Tabeli 10.

Tabela 10. Wpływ donora grupy alkoksylowej na EKR kwasu *rac*-**9a**.

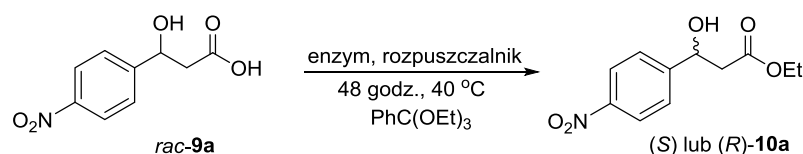
L.p.	Donor grupy alkoksylowej	W[%]	e.e.[%] ^b	E[-] ^c
1.	PhC(OEt) ₂	41	38 (<i>S</i>)	3
2.	C(OEt) ₄	15	90 (<i>S</i>)	22
3.	MeC(OEt) ₃	17	78 (<i>S</i>)	9
4.	PhC(OEt) ₃	37	99 (<i>S</i>)	>200

^aWarunki reakcji: **9a** (0.1 mmol), donor (2 equiv.), TBME (2.0 mL), lipaza Amano AK (10 mg).

^bOkreślono za pomocą HPLC (Chiralpak IA).

^cObliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$.²⁹

W tym celu sprawdzono trzy inne donory: acetal dietylowy benzaldehydu, ortowęglan tetraetylu oraz ortoocetan trietylu (Tabela 10, l.p. 1-3) w TBME. W każdym przypadku ester (*S*)-**10a** otrzymano z niższym nadmiarem enancjomerycznym w porównaniu z reakcją z ortobenzoesanem trietylu (Tabela 10, l.p. 4). W reakcji z acetalem dietylowym benzaldehydu produkt **10a** został otrzymany z podobną wydajnością (41%) ale zdecydowanie niższym nadmiarem enancjomerycznym (38%) (Tabela 10, l.p. 1) w porównaniu z reakcją z ortobenzoesanem trietylu. Zastosowanie ortowęglanu tetraetylu (Tabela 10, l.p. 2) oraz ortoocetanu trietylu (Tabela 10, l.p. 3) spowodowało spadek wydajności reakcji. W każdym przypadku otrzymano tylko jeden produkt- ester (*S*)-**10a**. W przeprowadzonych eksperymentach uzyskano produkt o konfiguracji absolutnej *S*, ustalonej na podstawie pomiaru skręcalności właściwej uzyskanego estru **10a**. Zatem kolejny etap badań obejmował screening, w celu znalezienia biokatalizatora o przeciwnej stereoselektywności (Schemat 45). W screeningu sprawdzono dwadzieścia komercyjnie dostępnych enzymów i proszków acetonowych, z których tylko cztery wykazywały aktywność w EKR kwasu *rac*-**9a**: Novozym 435, immobilizowana lipaza z *Pseudomonas cepacia* (PS-C), lipaza z kielków pszenicy oraz proszek acetonowy z wątroby gęśiej (GLAP). Każdy z tych enzymów został sprawdzony w czterech poprzednio użytych rozpuszczalnikach. Reakcje prowadzono przez 48 godzin w temperaturze 40 °C (Procedura Ogólna 14). Wyniki badań zamieszczono w Tabeli 11.



Schemat 45. Enzymatyczna estryfikacja kwasu **9a**.

Tabela 11. EKR kwasu **9a** katalizowany enzymami *S* i *R*-selektywnymi.

L.p.	Enzym	Rozpuszczalnik	W [%]	<i>e.e.</i> [%] ^b	E [-] ^c
1.	Novozym 435	toluen	41	95 (<i>R</i>)	78
2.	Novozym 435	cykloheksan	39	50 (<i>R</i>)	4
3.	Novozym 435	eter izoamyłowy	43	51(<i>R</i>)	4
4.	Novozym 435	TBME	42	19(<i>R</i>)	-
5.	Amano PS-C	toluen	29	<i>rac</i>	-
6.	Amino PS-C	cykloheksan	28	<i>rac</i>	-
7.	Amano PS-C	eter izoamyłowy	32	31(<i>S</i>)	2
8.	Amano PS-C	TBME	31	76(<i>S</i>)	10
9.	WGL	toluen	22	<i>rac</i>	-
10.	WGL	cykloheksan	19	21(<i>R</i>)	2
11.	WGL	eter izoamyłowy	31	9(<i>R</i>)	1
12.	WGL	TBME	45	<i>rac</i>	-
13.	GLAP	toluen	37	94(<i>R</i>)	56
14.	GLAP	cykloheksan	35	33(<i>R</i>)	2
15.	GLAP	eter izoamyłowy	47	<i>rac</i>	-
16.	GLAP	TBME	39	<i>rac</i>	-

^aWarunki reakcji: **9a** (0.1 mmol), ortobenzoesan trietylu (2 equiv.), rozpuszczalnik (2.0 mL), enzym (natywny 5 mg lub immobilizowany 10 mg).

^bOkreślono za pomocą HPLC (Chiralpak IA).

^c Obliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$.²⁹

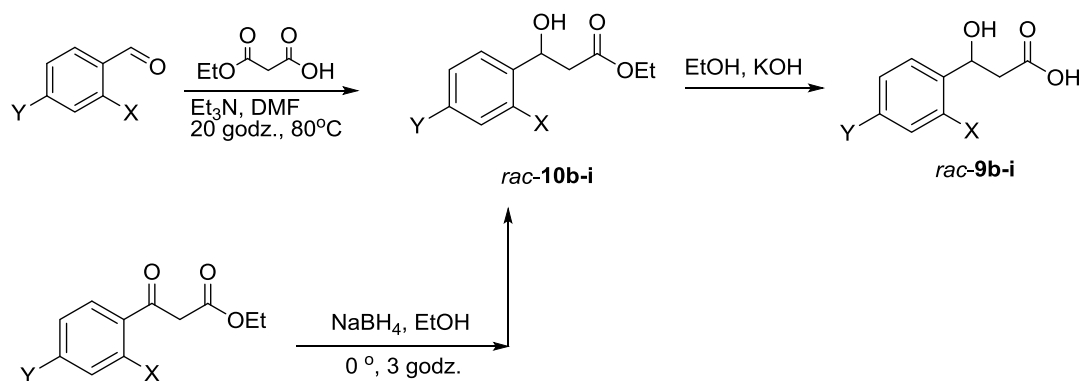
Również w tej serii eksperymentów zaobserwowano znaczący wpływ rozpuszczalnika na przebieg reakcji. W przypadku reakcji prowadzonej w eterze TBME oraz katalizowanej przez Novozym 435 otrzymano produkt (*R*)-**10a** z niskim nadmiarem enancjomerycznym (Tabela 11, l.p. 4, *e.e.* 19%). Zmiana rozpuszczalnika na na eter izoamyłowy lub cykloheksan spowodowała spadek enancjoselektywności reakcji (Tabela 11, l.p. 2 i 3, E=4). Natomiast w przypadku reakcji w toluenie otrzymano ester (*R*)-**10a** z umiarkowaną

enancjoselektywnością- 78 (Tabela 11, l.p. 1). Reakcja została pięciokrotnie powtórzona, za każdym razem z tym samym, przefiltrowanym Novozymem 435. Stwierdzono, że enancjoselektywność reakcji nie uległa zmianie. Lipaza Amano PS-C była najbardziej efektywna w rozpuszczalniku o najmniejszej lipofilowości (Tabela 11, l.p. 8), otrzymano produkt **10a** o konfiguracji *S*. W eterze izoamylovym otrzymano ester (*S*)-**10a** z niskim nadmiarem enancjomerycznym (Tabela 11, l.p. 7), natomiast w cykloheksanie oraz toluenie produkt racemiczny (Tabela 11, l.p. 5 i 6). W reakcjach katalizowanych przez lipazę z kielków pszenicy produkt (*R*)-**10a** otrzymano z najwyższym nadmiarem (21%) i jednocześnie najniższą wydajnością (19%) w cykloheksanie (Tabela 11, l.p. 10). W pozostałych trzech reakcjach otrzymano produkt racemiczny lub z bardzo niskim nadmiarem enancjomerycznym (Tabela 11, l.p. 9, 11 i 12). W reakcjach katalizowanych przez GLAP nieracemiczny produkt otrzymano w cykloheksanie oraz toluenie (Tabela 11, l.p. 13 i 14). Produkt o konfiguracji *R* z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym (94%) został otrzymany w reakcji prowadzonej w toluenie (Tabela 11, l.p. 13). Natomiast w eterach TBME i izoamylovym uzyskano produkt racemiczny, ale z wyższą wydajnością (Tabela 11, l.p. 15 i 16). Z kolei lipaza Amano PS-C była *S*-selektywna, podobnie jak lipaza Amano AK.

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono takie kombinacje enzymu i rozpuszczalnika, dzięki którym można otrzymać produkt *S*- lub *R*-selektywnie.

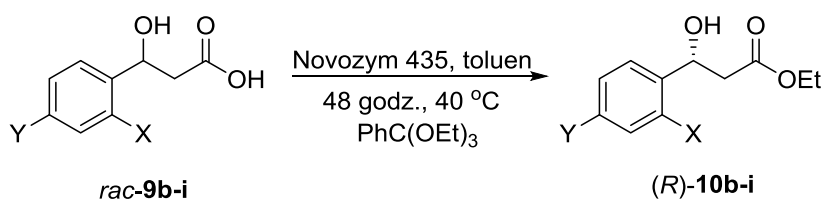
5.4.2. Badania nad wpływem podstawnika w pierścieniu aromatycznym substratu na EKR kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych

Kolejny etap badań obejmował określenie wpływu podstawnika w pierścieniu aromatycznym w kwasach 3-hydroksy-3-arylopropanowych (*rac-9b-i*) na przebieg reakcji EKR. Racemiczne estry *rac-10b-i* otrzymano zgodnie z procedurami Ogólnymi 11, 12 i 13. Natomiast racemiczne kwasy *rac-9b-i* uzyskano w wyniku hydrolizy estrów *rac-10b-i* zgodnie z Procedurą Ogólną 10 (Schemat 46).



Schemat 46. Synteza racemicznych estrów *rac-10b-i* i racemicznych kwasów *rac-9b-i*.

Wykonano serię eksperymentów w toluenie i eterze TBME, stosując jako biokatalizatory: lipazę Amano AK, Novozym 435, immobilizowaną lipazę z *Pseudomonas cepacia* (Amano PS-C), lipazę z kielków pszenicy oraz proszek acetonowy z wątroby gęskiej (GLAP). Estry otrzymano jedynie w reakcjach katalizowanych przez Novozym 435 prowadzonych w toluenie (Schemat 47, Procedura Ogólna 14). W pozostałych mieszaninach reakcyjnych nie zaobserwowano tworzenia się produktu po 72 godzinach. Wyniki przedstawiono w Tabeli 12.



Schemat 47. EKR kwasów **9b-i**.

We wszystkich przypadkach enancjoselektywności reakcji były niewielkie. W przypadku reakcji kwasu 3-hydroksy-3-(2-bromofenylo)-propanowego (**9g**) otrzymano śladowe ilości estru **10g** (Tabela 12, l.p. 6). Ester **10c** otrzymano z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym (83%), ale najniższą wydajnością (Tabela 12, l.p. 2). Estry **10h** i **10i** uzyskano z dobrą wydajnością i umiarkowanym nadmiarem enancjomerycznym (Tabela 12, l.p. 7 i 8). W przypadku kwasów zawierających grupę nitrową w pozycji *orto*, a różniących się podstawnikiem w pozycji *para* pierścienia aromatycznego, zaobserwowano odpowiednio: spadek wydajności i wzrost nadmiaru enancjomerycznego

(kwas *rac-9c*, Tabela 12, l.p. 2) oraz wzrost wydajności i spadek nadmiaru enancjomerycznego (kwasy *rac-9d* i *rac-9e*).

Tabela 12. EKR racemicznych kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych (*rac-9b-i*).

L.p.	Substrat	Produkt	W ^b [%]	<i>e.e.</i> ^c [%] ^b	E[-] ^c
1.	9b , X=H, Y=CN	10b	29	58 (<i>R</i>)	5
2.	9c , Y=X=NO ₂	10c	18	83	13
3.	9d , Y=F, X=NO ₂	10d	42	52	3
4.	9e , Y=CF ₃ , X=NO ₂	10e	31	62	7
5.	9f , X=H, Y=OMe	10f	39	60 (<i>R</i>)	6
6.	9g , Y=H, X=Br	10g	<1	-	-
7.	9h , X=F, Y=H	10h	42	68 (<i>R</i>)	4
8.	9i , X=H, Y=H	10i	45	63 (<i>R</i>)	4

^aWarunki reakcji: 0.1 mmol **9b-i**, ortobenzoesan trietylu 2 equiv., toluen (2.0 mL), Novozym 435 10 mg.

^bOkreślono za pomocą HPLC (Chiralpak IA, Chiralcel OD-H, Chiralcel OB).

^cObliczono: $E = \ln[1 - c(1 + eep)] / \ln[1 - c(1 - eep)]$.

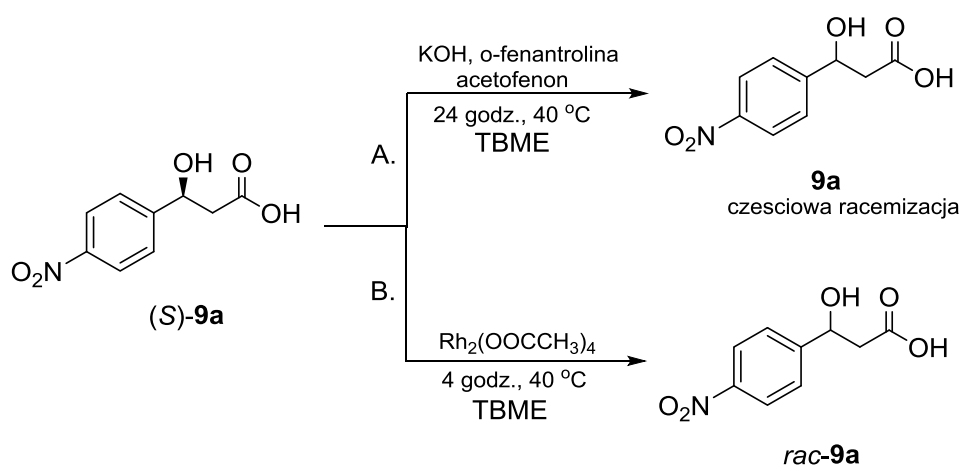
Celem przeprowadzonych badań było wyznaczenie zależności: budowa substratu-enancjoselektywność EKR. Podstawnik w grupie fenyłowej, w odległości przynajmniej pięciu wiązań chemicznych od centrum reakcji, ma fundamentalny wpływ na enancjoselektywność. W wyznaczonych warunkach reakcji EKR kwasy posiadające podstawniki elektronoakceptorowe w pierścieniu aromatycznym były lepiej akceptowane przez enzymy. Jedynie w przypadku kwasu *rac-9a* otrzymano ester etylowy z bardzo dobrą enancjoselektywnością. Ponadto niemniejsze znaczenie ma rozpuszczalnik organiczny oraz biokatalizator, których dobór niejednokrotnie wymaga długich badań optymalizacyjnych.

5.4.3. Badania nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego

W poprzednim rozdziale przedstawiono wyniki badań nad opracowaniem EKR kwasu *rac*-**9a**. Krokiem milowym prowadzonych badań byłoby rozszerzenie opracowanej metodologii do dynamicznego rozdziału kinetycznego. Kluczowym dla procesu byłby odpowiedni dobór katalizatora metalicznego, który racemizowałby substrat (hydroksykwas) a nie racemizowałby produktu (ester tego kwasu). Racemizacja hydroksyestrów jest znanym procesem, natomiast nie są dostępne dane dotyczące racemizacji hydroksykwasów. Proces wydaje się być trudniejszy ze względu na wolną grupę hydroksylową (na której zachodzi racemizacja) zarówno w substracie reakcji, jak i produkcie.

5.4.3.1. Badania nad racemizacją kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego **9a** i jego estru **10a**

Jako związek modelowy został wybrany optycznie czysty kwas (*S*)-3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowy ((*S*)-**9a**, $[\alpha]_D^{20} = -30.2$), który otrzymano w wyniku hydrolizy estru (*S*)-**10a** z wydajnością 93% (Procedura Ogólna 11). Pierwszy etap badań obejmował opracowanie metody racemizacji (Schemat 48).



Schemat 48. Racemizacja kwasu **9a**.

Jak opisano w części literaturowej kompleksy metali stosowane w znanej metodzie EDKR estrów kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych efektywnie katalizują ich racemizację. Zatem ich zastosowanie w badanym procesie jest bezcelowe- produkt również ulegałby racemizacji. W pierwszej kolejności sprawdzono możliwość racemizacji substratu w warunkach zasadowych (Schemat 48A). Stwierdzono, że po 24 godzinach nastąpiła częściowa racemizacja kwasu (S)-**9a** ($[\alpha]_D^{20} = -12.7$). Jako alternatywny czynnik racemizujący zastosowano octan rodu (II), który był stosowany przez grupę Williamsa w enzymatycznym DKR 1-fenylotanolu¹⁴¹. Ten katalizator i jego trifluorooctowe pochodne ulegają reakcjom wymiany ligandów w pozycji aksjalnej¹⁴², np. przez reszty kwasu Moshera¹⁴³. Jako ligandy mogą służyć związki posiadające takie grupy jak: karboksylowa, hydroksylowa oraz aminowa¹⁴⁴. Związki te tworzą również wiązania z niesfunkcjonalizowanymi olefinami¹⁴⁵. Ponadto octan rodu (II) to odczynnik łatwodostępny, umiarkowanie wrażliwy na warunki reakcji oraz (w porównaniu z innymi kompleksami metali) tani. Kwas (S)-**9a** zmieszano z octanem rodu (II) w temperaturze 40 °C w TBME (Schemat 48 B). Całkowita racemizacja substratu (S)-**9a** nastąpiła już po 4 godzinach. Sprawdzono również czy pomiędzy octanem rodu (II) oraz kwasem (S)-**9a** jest możliwe oddziaływanie, n.p. w formie wymiany grupy octanowej na grupę karboksylową.

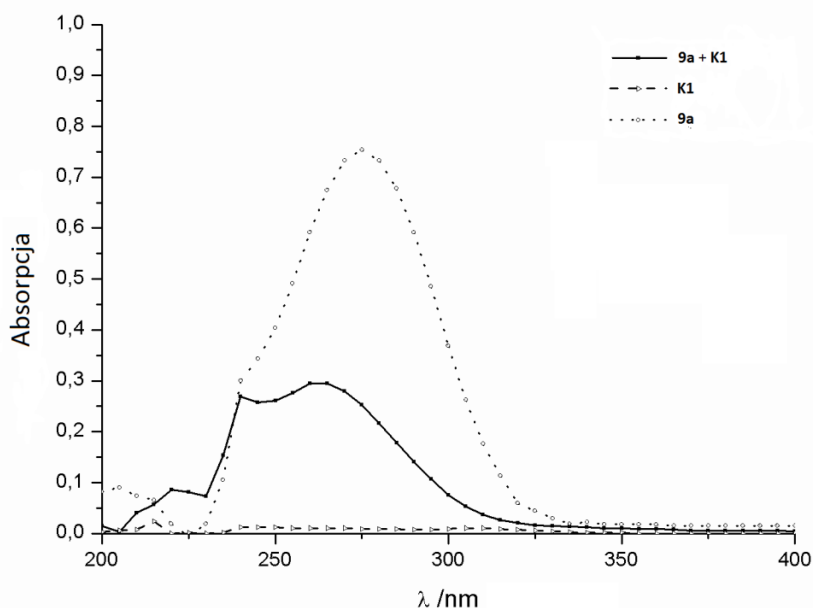
¹⁴¹ P.M. Dinh, J.A. Howarth, A.R. Hudnott, J.M.J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 42, 7623-7626;

¹⁴² a) F. A. Cotton, R. A. Walton, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, 2nd ed.; Oxford Univ. Press: New York, **1993**; b) S. Garcia-Granda, P. Lahuerta, J. Latorre, M. Martinez, E. Peris, M. Sanau, M. A. Ubeda, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 539-544; c) P. Lahuerta, E. Peris, *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 4547; d) J. Kitchens, L. Bear, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1969**, 31, 2415; e) T. R. Jackand J. Powell, *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 2558; f) A. Dobson, S. D. Robinson, *Platinum Metal Rev.* **1976**, 20, 56-63.

¹⁴³ a) F. A. Cotton, L. R. Falvello; *J. Am. Chem. SOC.* **1990**, 112, 8979-8980; b) K. Wypchlo, H. Duddedc; *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 21-30.

¹⁴⁴ a) F. A. Cotton, R. A. Walton; *Multiple Bonds Between Metal Atoms* **1982** John Wiley & Sons, New York; b) T. R. Felthouse *Inorg. Chem.* **1982**, 29, 73; c) E. B. Boyar, S. D. Robinson; *Coord. Chem. Rev.* **1983**, 50, 109.

¹⁴⁵ M. Gerards, G. Snatzke; *Tetrahedron: Asymmetry* **1990**, 221.



Wykres 1. Wykres zmiany absorpcji dla kwasu **9a** i katalizatora **K1**.

Miarodajną i względnie szybką metodą umożliwiającą śledzenie zmian w układzie reakcyjnym jest spektroskopia UV-Vis. Wykonano widma dla trzech roztworów w deuterowanym chloroformie: kwasu (*S*)-**9a**, octanu rodu (II) **K1** oraz mieszaniny obydwu (Wykres 1).

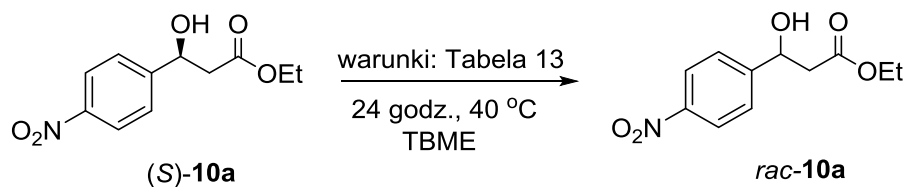
W przypadku roztworu kwasu (*S*)-**9a** maksimum absorpcji znajduje się przy $\lambda = 280$ nm. Dla stężenia 0.01mmol/ml maksymalna wartość absorpcji wynosiła 0.75. Octan rodu (II) w identycznym stężeniu nie wykazuje absorpcji w badanym zakresie długości fali. Natomiast widmo UV-Vis w przypadku mieszaniny obydwu związków jest wyraźnie inne. Można zaobserwować dwie zmiany:

- maksimum absorpcji znajduje się przy długości fali $\lambda=260$ nm,
- znaczące obniżenie wartości absorpcji (0.3 dla stężenia 0.01mmol/ml).

Zatem można przypuszczać, że w roztworze kwasu **9a** i octanu rodu (II) następuje wymiana grupy octanowej ze sfery koordynacyjnej rodu na kwas karboksylowy **9a** (zmiana intensywności pasma oraz przesunięcie maksimum absorpcji- efekt hipsochromowy), co może znacząco wpływać na proces racemizacji kwasu. W przypadku estru takie oddziaływanie jest niemożliwe, gdyż grupa karboksylowa jest zabezpieczona.

Zarówno chiralny kwas **9a**, jak i ester **10a** w standardowych warunkach EDKR mogą ulegać racemizacji na stereogenicznym atomie węgla, który nie ulega reakcji

enzymatycznej. Aby wykluczyć (lub potwierdzić) drugą z możliwości wykonano badania nad racemizacją estru (*S*)-**10a** (Schemat 49, Procedura Ogólna 15). Wyniki przedstawiono w Tabeli 13.



Schemat 49. Racemizacja estru (*S*)-**10a**.

Tabela 13. Racemizacja estru etylowego kwasu (*S*)-3-hydrokso-3-(4-nitrofenylo)-propanowego ((*S*)-**10a**).

Lp.	Warunki ^a	W[%]	ee [%] ^b
1.	Amano AK	>99	99(<i>S</i>)
2.	PhCOMe, <i>o</i> -fenantrolina	97	63(<i>S</i>)
3.	Rh ₂ (OAc) ₄ (K1)	>99	94(<i>S</i>)
4.	Amano AK, K1	>99	99(<i>S</i>)
5.	PhC(OEt) ₃ , Amano AK	>99	99 (<i>S</i>)
6.	PhC(OEt) ₃ , K1	>99	96(<i>S</i>)
7.	PhC(OEt) ₃ , Amano AK, K1	>99	99 (<i>S</i>)

^aWarunki reakcji: 0.1 mmol (*S*)-**11a**, TBME (2.0 mL)

^bOkreślono za pomocą HPLC (Chiralpak IA).

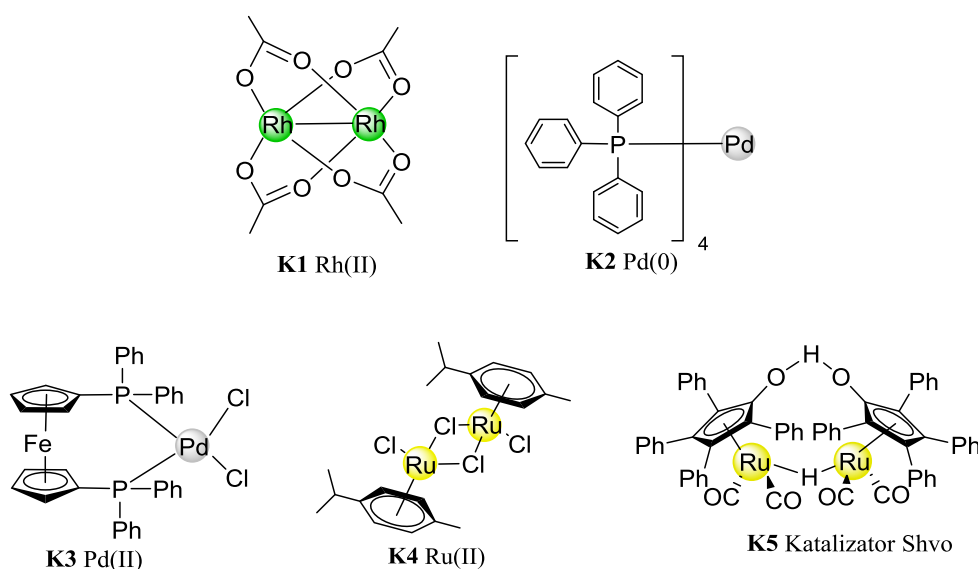
Przy doborze warunków racemizacji uwzględniono wszystkie reagenty, które będą zastosowane do EDKR: octan rodu (II), lipazę Amano AK, TBME oraz ortobenzoesan trietylu. Dodatkowo zbadano czy racemizacja jest katalizowana przez *o*-fenantrolinę w obecności acetofenonu. Racemizację produktu zaobserwowano w tych ostatnich warunkach (Tabela 13, l. p. 2), gdzie otrzymano ester **10a** z 63% *ee*, a także w mieszaninie z samym octanem rodu (Tabela 13, l.p. 3) oraz z octanem rodu (II) i ortobenzoesanem trietylu (Tabela 13, L.p. 6). Lipaza Amano AK nie katalizuje racemizacji estru (*S*)-**10a** (Tabela 13, l.p. 1). Ortobenzoesan trietylu nie ma wpływu na racemizację produktu. Otrzymane wyniki wskazują, że enzym blokuje racemizację estru w mieszaninach z octanem rodu (II) (Tabela 13, l.p. 4 i 7). Być może wynika to z faktu,

że octan rodu (II) oddziałuje n.p. z grupami karboksylowymi lub amidowymi pochodzącymi z enzymu.

Z przeprowadzonych badań wynika, że możliwa jest efektywna racemizacja centrum stereogenicznego na atomie węgla C³ hydroksykwasu bez racemizacji hydroksyestru. Ponadto octan rodu (II) jest kompatybilny z lipazą Amano AK, co oznacza, że można ten układ zastosować w EDKR kwasu *rac*-**9a**.

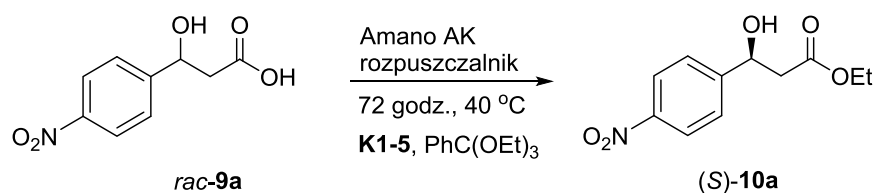
5.4.3.2. *Badania nad opracowaniem warunków, w których możliwy jest dynamiczny rozdziału kinetycznego kwasu rac-9a*

Opracowanie warunków racemizacji kwasu (*S*)-**9a** umożliwiło rozpoczęcie nowego etapu badań, którym było połączenie enzymatycznej estryfikacji kwasu *rac*-**9a** z jednoczesną racemizacją niereaktywnego enancjomeru tego kwasu. Mieszanina reakcyjna składała się z kwasu *rac*-**9a**, wyselekcjonowanego poprzednio, efektywnego biokatalizatora- lipazy Amano AK, ortobenzoesanu trietylu jako donora grupy etoksylovej, rozpuszczalnika oraz kompleksu metalu. Jako czynniki racemizujące sprawdzono następujące katalizatory: Rh₂(OOCCH₃)₄ (**K1**), [Pd(PPh₃)₄]/dppf (**K2**), PdCl₂(dppf) (**K3**) oraz Ru(*p*-cymene)Cl₂]₂ (**K4**) oraz katalizator Shvo (**K5**) (Rysunek 4).



Rysunek 4. Kompleksy metali zastosowane jako czynniki racemizujące.

Reakcje prowadzono przez 72 godziny w 40°C. Czas reakcji został wydłużony w porównaniu do EKR w celu uzyskania lepszej wydajności (Schemat 50, Procedura Ogólna 16).



Schemat 50. EDKR kwasu *rac-9a*.

Tabela 14. Wyniki EDKR kwasu *rac-9a* katalizowany lipazą Amano AK.

L.p.	Kompleks metalu	Rozpuszczalnik	W[%]	<i>e.e.</i> [%] ^b
1.	K1 Rh(II)	toluen	78	48 (<i>S</i>)
2.	K1 Rh(II)	cycloheksan	73	84 (<i>S</i>)
3.	K1 Rh(II)	eter izoamyłowy	67	56 (<i>S</i>)
4.	K1 Rh(II)	TBME	89	99 (<i>S</i>)
5.	K2 Pd(0)	toluen	61	<i>rac</i>
6.	K2 Pd(0)	cycloheksan	69	<i>rac</i>
7.	K2 Pd(0)	eter izoamyłowy	61	24 (<i>S</i>)
8.	K2 Pd(0)	TBME	91	35 (<i>S</i>)
9.	K3 Pd(II)	toluen	68	<i>rac</i>
10.	K3 Pd(II)	cycloheksan	71	<i>rac</i>
11.	K3 Pd(II)	eter izoamyłowy	58	93 (<i>S</i>)
12.	K3 Pd(II)	TBME	88	41 (<i>S</i>)
13.	K4 Ru(II)	toluen	53	<i>rac</i>
14.	K4 Ru(II)	cycloheksan	59	<i>rac</i>
15.	K4 Ru(II)	eter izoamyłowy	70	<i>rac</i>
16.	K4 Ru(II)	TBME	69	55 (<i>S</i>)
17. ^c	K5 kat. Shvo	TBME	82	49 (<i>S</i>)

^aWarunki reakcji: 0.1 mmol **9a**, ortobenzoesan trietylu 2 equiv., rozpuszczalnik (2.0 mL), Amano AK 10 mg, **K1-4** 10mol%.

^bOkreślono za pomocą HPLC (Chiralpak IA).

^cWarunki reakcji: 0.1 mmol **9a**, ortobenzoesan trietylu 2 equiv., rozpuszczalnik (2.0 mL), Amano AK 10 mg, **K5** 10mol%, *t*-BuOK 10 mol%.

Wyniki zamieszczono w Tabeli 14. W pierwszym etapie do jako czynnik racemizujący zastosowano octan rodu (II) (**K1**) (Tabela 14, l.p. 1-4). Niezależnie od rozpuszczalnika produkt **10a** otrzymano z wyższą wydajnością niż w analogicznej reakcji EKR (>66%). Enancjomerycznie czysty ester etylowy **10a** (99% *e.e.*) o konfiguracji *S* otrzymano w TBME (Tabela 14, l.p. 4), co było zgodne z wynikami otrzymanymi w EKR tego kwasu. W reakcjach prowadzonych w toluenie oraz cykloheksanie produkt (*S*)-**10a** otrzymano z podobnym nadmiarem enancjomerycznym jak w EKR (48% i 84%, Tabela 14, lp. 1 i 2). Natomiast znaczący spadek enancjoselektywności zaobserwowano w reakcji prowadzonej w eterze izoamylovym: EKR- *e.e.*=96% (Tabela 9, l.p. 3), EDKR-*e.e.*=56% (Tabela 14, l.p. 3). W kolejnym etapie badań sprawdzono efektywność innych kompleksów metali powszechnie używanych jako czynniki racemizujące w dynamicznym rozdziale kinetycznym (Rysunek 4)¹⁴⁶. W reakcjach z kompleksem palladu (0) (**K2**) w toluenie oraz cykloheksanie otrzymano racemiczny produkt **10a** (Tabela 14, l.p. 5 i 6). Z podobną wydajnością (61%), ale niskim *e.e.* (24%) otrzymano ester (*S*)-**10a** w reakcji prowadzonej w eterze izoamylovym (Tabela 14, l.p. 7). Najwyższą wydajność produktu (91%) oraz nadmiar enancjomeryczny (35%) odnotowano w reakcji prowadzonej w TBME (Tabela 14, l.p. 8). W reakcjach z kompleksem palladu (II) (**K3**) prowadzonych w toluenie również otrzymano produkt racemiczny (Tabela 14, l.p. 9 i 10). Natomiast w reakcji prowadzonej w TBME otrzymano produkt z *e.e.*=41% (Tabela 14, l.p. 12), podczas gdy w reakcji w eterze izoamylovym produkt otrzymano z wysokim *e.e.*=93% (Tabela 14, l.p. 11). Najmniej efektywnym katalizatorem racemizacji (biorąc pod uwagę stereoselektywność reakcji) był kompleks **K4**. Jedynie w reakcji prowadzonej w TBME otrzymano nieracemiczny ester (*S*)-**10a** (*e.e.*=55%) (Tabela 14, l.p. 16), natomiast w pozostałych rozpuszczalnikach otrzymano jedynie produkt racemiczny (Tabela 14, l.p. 13-15). W ostatnim eksperymencie (Tabela 14, l.p. 17) jako czynnik racemizujący zastosowano katalizator Shvo (**K5**), z powodzeniem stosowany w EDKR alkoholi drugorzędowych, w obecności *t*-BuOK, pozostałe warunki reakcji zachowano. Otrzymano ester (*S*)-**10a** z wysoką wydajnością (82%), ale niskim nadmiarem enancjomerycznym (49%). Ta część badań optymalizacyjnych zakończyła się opracowaniem metody otrzymywania estru (*S*)-**10a** z wysoką wydajnością wyizolowanego produktu (89%) oraz bardzo wysokim nadmiarem enancjomerycznym

¹⁴⁶ a) Y. Ahn, S. -B. Ko, M. -J. Kim, J. Park, *Coordin. Chem. Rev.* 2008, **252**, 647-658; b) S. Agrawal, E. Martínez-Castro, R. Marcos, B. Martín-Matute, *Org. Lett.* 2014, **16**, 2256-2259.

(99%), również w skali preparatywnej (Procedura Ogólna 17). Katalizatory metaliczne nie miały wpływu na stereopreferencję enzymów.

Kolejną część badań przeprowadzono dla Novozyму 435- *R*-selektywnego enzymu. Reakcje prowadzono w temperaturze 40°C przez 72 godziny w obecności uprzednio wybranych czynników racemizujących **K1-4** (Schemat 51, Procedura Ogólna 16). Wyniki badań zamieszczono w Tabeli 15.

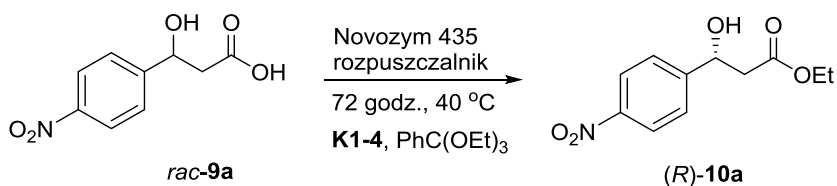


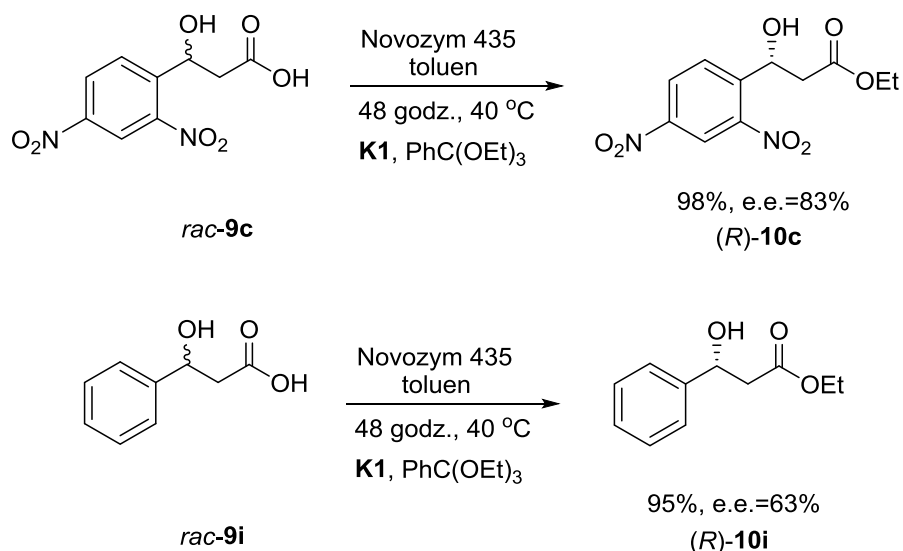
Tabela 15. Wyniki badań nad opracowaniem DKR kwasu *rac*-**9a** katalizowana immobilizowaną lipazą *Candida cylindracea* (Novozym 435).

L.p.	Kompleks metalu	Rozpuszczalnik	W[%]	ee[%] ^b
1.	K1 Rh(II)	toluen	78	97(<i>R</i>)
2.	K1 Rh(II)	cykloheksan	87	48(<i>R</i>)
3.	K1 Rh(II)	eter izoamyłowy	91	50(<i>R</i>)
4.	K1 Rh(II)	TBME	69	9(<i>R</i>)
5.	K2 Pd(0)	toluen	84	45(<i>R</i>)
6.	K2 Pd(0)	cykloheksan	81	51(<i>R</i>)
7.	K2 Pd(0)	eter izoamyłowy	93	26(<i>R</i>)
8.	K2 Pd(0)	TBME	56	23(<i>R</i>)
9.	K3 Pd(II)	toluen	90	51(<i>R</i>)
10.	K3 Pd(II)	cykloheksan	92	<i>rac</i>
11.	K3 Pd(II)	eter izoamyłowy	94	69(<i>R</i>)
12.	K3 Pd(II)	TBME	67	19(<i>R</i>)
13.	K4 Ru(II)	toluen	73	65(<i>R</i>)
14.	K4 Ru(II)	cykloheksan	79	26(<i>R</i>)
15.	K4 Ru(II)	eter izoamyłowy	76	25(<i>R</i>)
16.	K4 Ru(II)	TBME	41	9(<i>R</i>)

^aWarunki reakcji: 0.1 mmol **10a**, ortobenzoesan trietylu 2 equiv., rozpuszczalnik (2.0 mL), Novozym 435 10 mg, **K1-4** 10 mol%.

^bOkreślono za pomocą chiralnego HPLC (Chiralpak IA).

W pierwszym etapie badań jako czynnik racemizujący zastosowano octan rodu (II) **K1**. W reakcji prowadzonej w TBME otrzymano enancjomerycznie wzbogacony produkt (*R*)-**10a** z najniższą wydajnością (69%) oraz nadmiarem enancjomerycznym (9%) (Tabela 15, l.p. 4). W reakcjach prowadzonych w cykloheksanie oraz eterze izoamyłowym produkt (*R*)-**10a** otrzymano z dobrymi wydajnościami (87% i 91%) oraz nadmiarami enancjomerycznymi (48% i 50%) (Tabela 15, l.p. 2 i 3). Produkt z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym (97%) o konfiguracji *R* otrzymano z wydajnością (78%) w reakcji prowadzonej w toluenie (Tabela 15, l.p. 1), co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w EKR kwasu *rac-9a*. W reakcjach z kompleksami palladu (0) (**K2**) i palladu (II) (**K3**) zaobserwowano pewne prawidłowości. Produkt z bardzo dobrymi, podobnymi wydajnościami otrzymano w toluenie, cykloheksanie i eterze izoamyłowym (81%-94%) (Tabela 15, l.p. 5-7 oraz l.p. 9-11). Natomiast produkt (*R*)-**10a** z najniższą wydajnością otrzymano w TBME (Tabela 15, l.p. 8 i 12). W reakcji z katalizatorem **K3** prowadzonej w cykloheksanie otrzymano produkt racemiczny (Tabela 15, l.p. 10), natomiast produkt (*R*)-**10a** z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym (69%) otrzymano w reakcji prowadzonej w eterze izoamyłowym (Tabela 15, l.p. 11). Dla obydwu katalizatorów **K2** i **K3** produkt (*R*)-**10a** otrzymano z umiarkowanym nadmiarem enancjomerycznym w toluenie (45% i 51%, Tabela 15, l.p. 5 i 9) oraz niskim w TBME (23% i 19%, Tabela 15, l.p. 8 i 12). W reakcjach z kompleksem **K4** produkt (*R*)-**10a** z umiarkowaną wydajnością otrzymano w toluenie, cykloheksanie i eterze izoamyłowym (73%-79%, Tabela 15, l.p. 13-15), natomiast z niską w TBME (41%, Tabela 15, l.p. 16). Podobną korelację można zaobserwować w zmianie stereoselektywności reakcji: produktu z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym odnotowano w toluenie (65%, Tabela 15, l.p. 13), z niskim w cykloheksanie i eterze izoamyłowym (26% i 25%, Tabela 15, l.p. 14 i 15) oraz z najniższym w TBME (9%, Tabela 15, l.p. 16). Optymalizacja warunków reakcji w drugiej części badań nad dynamicznym rozdziałem kinetycznym kwasu *rac-9a* umożliwiła otrzymanie enancjomerycznie wzbogaconego estru **10a** o konfiguracji *R* z bardzo dobrą wydajnością oraz nadmiarem enancjomerycznym (97%). Sprawdzone także zastosowanie metody w EDKR dwóch innych kwasów: *rac-9c* (ze względu na dwa podstawniki nitrowe) oraz *rac-9i*, który jest prekursorem Fluoksetyny (nazwa handlowa Prozac). Zastosowano taki sam układ reakcyjny jak w przypadku kwasu *rac-9a*: substrat, enzym- Novozym 435, katalizator metaliczny- **K1**, ortobenzoesan trietylu oraz toluen (Schemat 52, Procedura Ogólna 18).



Czas reakcji był taki sam jak w przypadku EKR tych kwasów i wynosił 48 godzin. Obie reakcje przeprowadzono w skali preparatywnej – 1 mmol substratu. Produkty (*R*)-**10c** i (*R*)-**10i** otrzymano z praktycznie ilościową wydajnością, co oznacza, że octan rodu (II) (**K1**) przyspiesza kinetykę reakcji. Nie wpływa natomiast na jej stereoselektywność – nadmiary enancjomeryczne produktów (*R*)-**10c** i (*R*)-**10i** nie zmieniły się w porównaniu z produktami uzyskanymi w EKR. Tak jak w przypadku EKR, również w EDKR warunki reakcji nie są uniwersalne. W zależności od substratu należy dokonać optymalizacji warunków reakcji.

5.4.4. Podsumowanie podrozdziału 5.4

Wykonano badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych. W ramach tych badań zoptymalizowano warunki EKR dobierając odpowiedni rozpuszczalnik organiczny, biokatalizator oraz donor grupy alkoksylowej. Otrzymano enancjomerycznie wzbogacone (*e.e.* = 52%-83%) estry etylowe kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych **9b-i**. Dla kwasu *rac-9a* opracowano optymalne warunki enzymatycznego rozdziału kinetycznego prowadzące do otrzymania obydwu enancjomerów tego kwasu: *S* w reakcji katalizowanej lipazą Amano AK oraz *R* w reakcji katalizowanej Novozymem 435. Zaobserwowano silny wpływ lipofilowości rozpuszczalnika organicznego, donora grupy alkoksylowej oraz budowy substratu na enancjoselektywność reakcji. W kolejnym etapie zbadano warunki

racemizacji kwasu (*S*)-**9a** oraz jego estru etylowego. Zaobserwowano, że kwas (*S*)-**9a** ulega szybkiej racemizacji katalizowanej przez tetraoctan dirodu (II), natomiast jego ester etylowy nieznacznej (*e.e.*=96%) w mieszaninie zawierającej tylko ten katalizator. Ponadto w mieszaninie zawierającej lipazę Amano AK i tenże katalizator racemizacja estru etylowego (*S*)-**10a** nie zachodzi. Kompleks **K1** został użyty po raz pierwszy jako czynnik efektywnie racemizujący chiralne, nieracemiczne hydroksykwasy W porównaniu do innych kompleksów metali stosowanych w EDKR jest tani i niezbyt wrażliwy na warunki reakcji. Reakcje prowadzono w atmosferze tlenowej, podczas gdy stosowane obecnie katalizatory racemizacji alkoholi lub wymagają atmosfery beztlenowej. Ponadto nie jest inhibitorem stosowanego biokatalizatora. Do badań optymalizacyjnych, uwzględniających rozpuszczalnik organiczny i czynnik racemizujący jako zmienne, wybrano dwa biokatalizatory: *S*-selektywną lipazę Amano AK i *R*-selektywny Novozym 435. Opracowano optymalne warunki dla układu enzym-metal w dynamicznym rozdziale kinetycznym kwasu *rac*-**9a**. Otrzymano obydwie enancjomery estru etylowego z bardzo dobrymi wydajnościami oraz nadmiarami enancjomerycznymi (*S*- W=89%, *e.e.*=99%; *R*- W=78%, *e.e.*=97%). Reakcje wykonano w skali preparatywnej i stwierdzono, że stereoselektywność reakcji nie ulega zmianie. Wykonano również syntezę estrów (*R*)-**10c** i (*R*)-**10i** w skali preparatywnej. Czas reakcji był taki sam jak w przypadku EKR tych kwasów. Produkty otrzymano z wyższą wydajnością w porównaniu z EKR, natomiast nadmiar enancjomeryczny produktów nie uległ zmianie. Zatem octan rodu (II) przyspiesza kinetykę reakcji enzymatycznej estryfikacji, ale nie ma wpływu na jej enancjoselektywność.

6. Wnioski

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań nad zastosowaniem układów enzym-enzym i enzym-metal do estryfikacji wybranych kwasów karboksylowych. W pierwszej części wykonano badania nad zastosowaniem węglanów dialkilowych jako donorów grupy alkoksylowej w estryfikacji kwasu 3-fenylpropanowego (**1a**). W celu wyboru odpowiedniego biokatalizatora wykonano screening enzymatyczny uwzględniający enzymy o różnych właściwościach katalitycznych. Zaobserwowano efekt synergii w jednej z mieszanin enzymów katalizujących badaną reakcję. W celu potwierdzenia synergistycznego działania enzymów przeprowadzono systematyczne badania określające wpływ enzymów na przebieg reakcji. W reakcjach katalizowanych przez każdy z zastosowanych enzymów nie zaobserwowano tworzenia się produktu. W kolejnych eksperymentach sprawdzono wpływ mieszanin dwóch, trzech, czterech i pięciu enzymów, stwierdzając, że produkt uzyskiwany jest z najwyższą wydajnością w przypadku zastosowania mieszaniny pięciu wybranych enzymów. Dodanie do takiej mieszaniny reakcyjnej wody lub trójfluoroetanolu prowadziło do uzyskania estru etylowego kwasu 3-fenylpropanowego (**2a**) z mniejszą wydajnością, co potwierdzało fakt, iż oddziaływanie enzym-enzym są kluczowe dla wysokiej aktywności katalitycznej mieszanin enzymów. Następnie wykonano badania nad określeniem wpływu struktury kwasu karboksylowego (**1a-1i**) na przebieg powyższej reakcji. Zastosowanie tej samej mieszaniny enzymów do estryfikacji różnych kwasów karboksylowych potwierdziło efektywność tego układu katalitycznego. Wykazano że znany mechanizm estryfikacji kwasów karboksylowych węglanami dialkilowymi jest niepoprawny. Zaproponowano mechanizm reakcji, w którym węglan dialkilowy w reakcji z enzymem tworzy aktywowany węglan monoalkilowy (**EAC**) reagujący z kwasem karboksylowym. Siłą napędową tej reakcji jest uwolnienie dwutlenku węgla, w wyniku rozpadu aktywowanego monowęglanu (**D-OH**). Wykazano, że proces enancjoselektywnej enzymatycznej estryfikacji mieszaniną enzymów przebiega efektywnie dla wybranych dwóch racemicznych kwasów karboksylowych: (*rac*)-2-fenylpropanowego (**1h**) i (*rac*)-3-fenyl-2-metylopropanowego (**1i**). Jest to pierwszy multienzymatyczny system, który efektywnie i stereoselektywnie katalizuje reakcję nieodwracalnej estryfikacji węglanami dialkilowymi.

W drugiej części wykonano badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów *p*-fluoro- i *p*-metoksy-3-fenyl-4-pentenowych (*rac*-**4a** i *rac*-**4b**).

W tym celu przeprowadzono screening enzymatyczny w celu wyłonienia najlepszego biokatalizatora, który zastosowano w reakcjach ERK, otrzymując enancjomerycznie wzbogacone estry ((*S*)-**7a-b** i (*S*)-**8a**) (wyniki zostały opublikowane jako część pracy w *ACS Catal.*, **2016**, 6, 3287–3292). Wykazano istotny wpływ donora grupy alkoksyłowej na przebieg reakcji estryfikacji. Wykonane badania wykazały, że przedstawiony w literaturze mechanizm reakcji estryfikacji ortoestrami jest niepoprawny. Zaproponowano alternatywny mechanizm (opublikowany w *Cat. Comm.* **2018**, 106, 82-86), w którym aktywowany ortoester (**D-OH**) po reakcji z kwasem karboksylowym ulega rozpadowi do odpowiedniego estru i alkoholu, co jest dodatkową siłą napędową procesu.

W trzeciej części wykonano badania nad zastosowaniem enzymów oraz ortoestrów do enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-hydrokso-3-(4-nitrofenylo)propanowego (*rac*-**9a**). Do ERK kwasu *rac*-**9a** zastosowano metodologię nieodwracalnej estryfikacji ortoestrami opracowaną w poprzedniej części badań. Wykonano badania optymalizacyjne uwzględniające wpływ rozpuszczalnika, biokatalizatora oraz donora grupy alkoksyłowej. Uzyskano obydwa enancjomery estru etylowego tego kwasu ((*S*)-**10a** i (*R*)-**10a**) z wydajnościami 89% i 78% i nadmiarami enancjomerycznymi 99% i 97%. Zbadano wpływ podstawnika w grupie fenylowej na przebieg reakcji estryfikacji kwasów 3-hydrokso-3-arylopropanowych (*rac*-**9b-i**). Stwierdzono, że najbardziej efektywnym biokatalizatorem był Novozym 435. W wyniku ERK kwasów *rac*-**9b-i** uzyskano enancjomerycznie wzbogacone estry (*R*)-**10b-i**. W kolejnym etapie wyselekcjonowano katalizator metaliczny (**K1**), który chemoselektywnie racemizował kwas (*S*)-**9a**, natomiast nie racemizował estru (*S*)-**10a** w warunkach EDKR. Uzyskane wyniki zastosowano do opracowania dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu (*rac*)-**9a**. Wykonano badania optymalizacyjne uwzględniające wpływ rozpuszczalnika, katalizatora metalicznego (**K1-K5**) oraz enzymu na przebieg i enancjoselektywność reakcji. Wykazano, że można uzyskać enancjomerycznie czyste estry kwasu *rac*-**9a** z wydajnościami przewyższającymi 90%. Opracowaną metodologię zastosowano do syntezy enancjomerycznie czystych estrów (*S*)-**10a**, (*R*)-**10c** i (*R*)-**10i** w skali preparatywnej. Jest to pierwszy przykład EDKR kwasów 3-hydrokso-3-arylopropanowych.

Przeprowadzone badania wykazały, że procesy enzymatycznej estryfikacji achiralnych i chiralnych kwasów karboksylowych można wykonać stosując węglany dialkilowe i ortoestry jako donory grup alkoksyłowych. Jest to przykład nowej aktywności promiskuityzmu katalitycznego lipaz w rozpuszczalnikach organicznych. W przypadku

węglanów dialkylowych reakcje te przebiegają bardziej efektywnie jeśli zastosowane są do nich mieszaniny enzymów (układy enzym-enzym). Natomiast ortoestry zastosowano do ERK chiralnych kwasów karboksylowych. Następnie ta metodologia została rozszerzona do EDKR poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej odpowiednich katalizatorów metalicznych (układy enzym-metal). Zaletami opracowanych procedur jest łatwość wydzielenia i oczyszczenia produktu, możliwość regeneracji katalizatora metalicznego i enzymu, wysoka wydajność i enancjoselektywność, a także zmniejszenie szkodliwego wpływu na środowisko oraz niski koszt ogólny, co jest szczególnie ważne w przypadku syntez związków o przeznaczeniu farmaceutycznym i spożywczym. Opracowana metodologia EKR i EDKR może być szczególnie użyteczna z punktu widzenia technologicznego ze względu na prostotę wydzielenia produktów oraz możliwość ponownego wykorzystania biokatalizatora i katalizatora metalicznego. Które mogą być ponownie wykorzystane w tej reakcji. Jest to spowodowane znikomą rozpuszczalnością enzymów i związków metali przejściowych w mieszaninie reakcyjnej.

7. Część eksperymentalna

7.1. Uwagi ogólne

Widma NMR zostały wykonane na aparatach Varian Gemini 200 (200 MHz), Varian Gemini 400 (400 MHz) oraz Bruker DMX 500 Avance (500 MHz). Widma rejestrowano z TMS jako wzorcem wewnętrznym. Przesunięcia sygnałów (δ) podano w ppm, a stałe sprzężenia (J) w hercach (Hz). Sygnały w widmach protonowego jądrowego rezonansu magnetycznego zostały przypisane dla wybranych związków. Widma masowe wysokiej rozdzielczości zarejestrowano na aparacie API 365 (SCIEX). Analizy elementarne wykonano w Pracowni Analizy Elementarnej Instytutu Chemii Organicznej PAN, używając aparatów Perkin Elmer 240 Elemental Analyzer oraz Heraeus Vario EL III. Widma masowe wysokiej rozdzielczości zostały wyznaczone w zespole prof. Witolda Danikiewicza w Instytucie Chemii Organicznej PAN na spektrometrze Mariner (PerSeptive Biosystems). Do analiz TLC używano płytek aluminiowych pokrytych Kieselgel 60 F254 firmy Merck. Do preparatywnego rozdziału i oczyszczania produktów za pomocą chromatografii cienkowarstwowej używano płytek PTLC pokrytych Kieselgel 60 F254 o grubości 0,25 mm firmy Merck. Oczyszczanie związków za pomocą chromatografii kolumnowej wykonywano używając żelu krzemionkowego Kieselgel 60 (60 mesh, 70-230 mesh i 230-400 mesh) firmy Merck.

W badaniach przesiewowych enzymów stosowano następujące biokatalizatory: lipaza z *Hog pancreas*, lipaza z *Pseudomonas fluorescens*, lipaza z *Aspergillus sp.*, lipaza z kielków pszenicy, lipaza z *Candida antarctica*, lipaza z *Candida cylindracea*, lipaza z *Pseudomonas cepacia*, lipaza z *Mucor miehei*, lipaza z *Candida rugosa*, lipaza z *Chromobacterium viscosum*, lipaza z *Porcine pancreas*, lipaza z *Rhizomucor miehei*, immobilizowaną lipazę – Novozym 435 (lipaza B z *Candida antarctica*), Papainę oraz rekombinowane enzymy z mikroorganizmów: *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Candida lipolitica*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Pseudomonas sp.* Zastosowano także proszki acetonowe z organów zwierzęcych: proszek acetonowy z wątroby wołowej (BLAP), proszek acetonowy z wątroby indyczej (TLAP), proszek acetonowy z wątroby świńskiej (PLAP), proszek acetonowy z wątroby kaczej (DLAP), proszek acetonowy z wątroby kurzej (CLAP), proszek acetonowy z wątroby jeleniej (JLAP), proszek acetonowy z wątroby króliczej (RLAP), proszek acetonowy z

wątroby gęziej (GLAP) i proszek acetonowy z wątroby dziczej (WLAP), proszek acetonowy z nerki wołowej (BKAP) oraz esterazę z wątroby świńskiej (PLE).

Do rozdzielania enancjomerów metodą HPLC stosowano następujące kolumny chiralne: Chiralcel OD-H, Chiralcel OB, Chiralpak IA-H oraz Chiralcel AS-H (Ø 4.6 mm x 250 mm Diacel Chemical Ind., Ltd) wyposażone w pre-kolumny (Ø 4mm×10 mm, 5µm). Chromatograf: LC-6A Varian ProStar wyposażony w detektor UV Varian ProStar 330 oraz analizator Chromatopac C-R6A. Pomiary skręcalności właściwej zostały wykonane na polarymetrach Jasco DIP-360 oraz Jasco P-2000 przy długości fali $\lambda = 589$ nm, przy użyciu kuwety o długości 1.0 cm i pojemności 1.2 ml. Wszystkie reakcje enzymatyczne przeprowadzono w wytrząsarce HeidolphPromax 1020 wyposażonej w inkubator Heidolph Inkubator 1000.

W pracy enancjoselektywność reakcji (E) liczona była ze wzoru (c – konwersja, ee_p – nadmiar enancjomeryczny produktu):

$$E = \frac{\ln[(1 - c \times (1 + ee_p))]}{\ln[1 - c \times (1 - ee_p)]}$$

Wykorzystywane reagenty komercyjnie dostępne, zakupione były w Sigma-Aldrich, TCI lub Alfa Aeser. Jako eluenty do chromatografii kolumnowej i analiz HPLC stosowano heksan, octan etylu, chloroform, metanol oraz wodę, które wcześniej oczyszczono przez destylację. Pozostałe rozpuszczalniki reagenty oczyszczono według ogólnych metod literaturowych.¹⁴⁷

7.2. Enzymatyczna estryfikacja wybranych kwasów karboksylowych węglanami dialkilowymi

Grupy użyte do screeningu enzymatycznego:

1. Lipaza z *Mucor javanicus* (Sigma), Amano Lipaza PS z *Burkholderia cepacia* (Sigma), lipaza z *Rhizopus arrhizus* (Sigma), lipaza lipoproteinowa z *Pseudomonas sp* (Sigma), proteaza z *Aspergillus oryzae* (Sigma).

2. Lipaza z *Penicillium roqueforti* (Sigma), lipaza z *Chromobacterium viscosum* (Sigma), lipaza z *Candida lipolytica* (Sigma), proteaza from *Bacillus amyloliquefaciens* (Sigma), celulaza typ VI z *Trichoderma viride* (Sigma).

¹⁴⁷ W. L. F. Armarego, D. D. Perrin; *Purification of laboratory Chemicals*, 4th ed, Elsevier: Oxford, 2000.

3. Lipaza z *Candida rugosa* (Sigma), lipaza z *Mucor miehei* (Sigma), RLAP, drysylaza z *Basidiomycetes* (Sigma), proteaza z *Bacillus Licheniformis* (Sigma).

4. Lipaza z *Rhizopus oryzae* (Sigma), lipaza typ II ze świńskiej trzustki (Sigma), PLE, BLAP, pektynaza z *Rhizopus sp* (Sigma).

5. Lipaza z *Pseudomonas sp* (Sigma), lipaza z *Pseudomonas fluorescens*, CLAP, BKAP, pektynaza z *Aspergillus niger* (Serva).

6. Lipaza B *Candida antarctica* recomb. *Aspergillus oryzae* (Sigma), lipozym imm. z *Mucor miehei* (Sigma), DLAP, JLAP, aldolaza z mięśnia królika (Sigma),

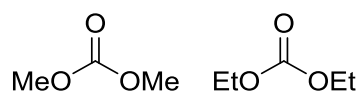
7. Lipase from *Rhizopus niveus* (Sigma), lipase imm. in Sol-Gel-AK from hog pancreas (Fluka), lipase from *Candida cylindracea*, WLAP, esterase from horse liver (Sigma).

8. Lipaza z trzustki wieprzowej (Sigma), lipaza imm. w Sol-Gel-AK z *Mucor miehei* (Fluka), lipaza z *Aspergillus sp*, GLAP, PLAP,

9. **Mieszanina A, B, C, D, E:** lipaza z kielków pszenicy (Fluka), acylaza I z *Aspergillus melleus* (Fluka), Amanolipaza AK z *Pseudomonas fluorescens* (Sigma), Novozym 435 (Novo sp 435A, Novo Industri A/S), papaina (surowy proszek, Merck).

Procedura ogólna 1. Enzymatyczna estryfikacja kwasów karboksylowych węglanami dialkilowymi.

Węglany:

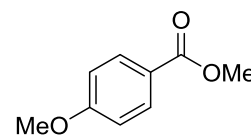


Do roztworu kwasu **1a-i** (0.1 mmol, 1 eq) w toluenie (1 ml) w fiolce (5 ml) dodano odpowiedni węglan dialkilowy (0.3 mmol, 3 eq) i enzymy (po 4 mg każdego enzymu). Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 lub 48 godzin w temperaturze 40 °C w wytrząsarce (200 rpm). Po ochłodzeniu, mieszaninę reakcyjną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (3 x, po 5 ml) i solanką (5 ml). Rozpuszczalnik organiczny usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując odpowiednie estry etylowe **2a-i** i metylowe **3a-i**.

***p*-metoksybenzoesan metylu (3b).** Związek **3b** otrzymano zgodnie

z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 35% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.81 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 7.80-7.84 (m, 2H),

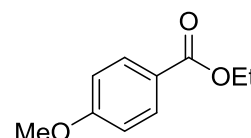
7.96-8.00 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 51.6, 55.5, 113.0, 122.1, 131.8, 163.0, 166.7. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁴⁸.



***p*-metoksybenzoesan etylu (2b).** Związek **2b** otrzymano zgodnie z

Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 46% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.29-1.36 (t, J=7.0Hz, 3H), 3.86 (s, 3H), 4.21-

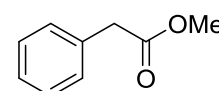
4.32 (q, J=7.0Hz, 2H), 7.78-7.85 (m, 2H), 7.99-8.09 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.4, 55.3, 60.6, 113.3, 122.6, 131.3, 163.1, 166.7. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁴⁸.



Ester metylowy kwasu 2-fenyletanowego (3c). Związek **3c**

otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 87% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 3.69 (s, 2H), 3.78 (s, 3H), 7.24-7.41 (m, 5H). ¹³C

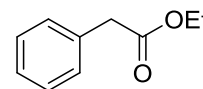
NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 41.3, 52.5, 127.1, 128.5, 129.5, 134.1, 171.9. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁴⁹.



Ester etylowy kwasu 2-fenyletanowego (2c). Związek **2c** otrzymano

zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 98% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.19-1.30 (t, J=7.0Hz, 3H), 3.60 (s, 2H), 4.09-4.21 (q, J=7.0Hz, 2H),

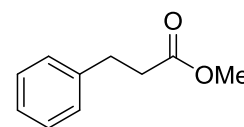
7.22-7.36 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.4, 41.6, 61.0, 127.2, 128.7, 129.1, 134.3, 171.4. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵⁰.



Ester metylowy kwasu 3-fenylpropanowego (3a). Związek **3a**

otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 89% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.61-2.69 (t, 2H, J=7.0Hz);

2.93-3.01 (t, 2H, J=7.0Hz); 3.69 (s, 3H); 7.20-7.39 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 31.3, 36.0, 51.9, 126.6, 128.6, 128.8, 140.5, 173.3. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵¹.



¹⁴⁸ X. F. Wu, Ch. Darcel; *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 8, 1144-1147.

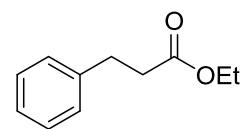
¹⁴⁹ W. R. R. Harker, E. L. Carswell, D. R. Carberry; *Org. Lett.* **2010**, 12, 3712-3715.

¹⁵⁰ Y. B. Kiran, R. Ikeda, N. Sakai, T. Konakahara; *Synthesis* **2010**, 2, 276-278;

¹⁵¹ T. O. Vieira, M. J. Green, H. Alper; *Org. Lett.* **2006**, 8, 6143-6145.

Ester etylowy kwasu 3-fenylopropanowego (2a). Związek **2a**

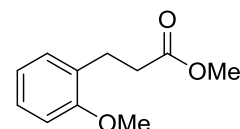
otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 96% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.19-1.27 (t, 3H, J=7.2Hz),



2.57-2.66 (t, 2H, J=7.9Hz), 2.91-2.99 (t, 2H, J=7.9Hz), 4.07-4.18 (q, 2H, J=7.2Hz), 7.18-7.35 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.5, 31.2, 36.3, 60.8, 126.6, 128.7, 130.2, 140.8, 173.0. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵².

Ester metylowy kwasu 3-(o-metoksyfenylo)-propanowego (3d).

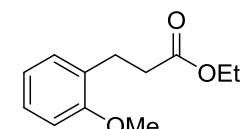
Związek **3d** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 26 (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.55-2.64 (t, 2H,



J=8.2Hz), 2.90-2.98 (t, 2H, J=8.2Hz), 3.63 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 6.82-7.30 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 26.3, 34.5, 55.3, 58.5, 110.4, 120.6, 127.6, 128.8, 130.1, 157.7, 173.6. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵³.

Ester etylowy kwasu 3-(o-metoksyfenylo)-propanowego (2d).

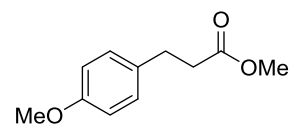
Związek **2d** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 75% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.16-1.25 (t, 3H,



J=7.0Hz), 2.51-2.63 (t, 2H, J=8.2Hz), 2.83-2.90 (t, 2H, J=8.2Hz), 3.78 (s, 3H), 4.07-4.17 (q, 2H, J=7.0Hz), 6.85-7.15 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.5, 26.1, 34.7, 53.0, 61.0, 111.0, 120.2, 127.8, 128.5, 131.1, 158.0, 173.5. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵³.

Ester metylowy 3-(p-metoksyfenylo)-propanowego (3e).

Związek **3e** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 71% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.48-



2.56 (t, 2H, J=8.1Hz), 2.80-2.84 (t, 2H, J=8.1Hz), 3.60 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.62-7.01 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 32.0, 36.2, 54.0, 58.1, 128.3, 129.1, 132.6, 140.1, 173.2. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵⁴.

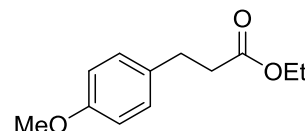
¹⁵² S. J. Pridmore, J. M. J. Williams; *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 7413-7415.

¹⁵³ P. Gomes, C. Gosmini, J. Y. Nedelec, J. Perichon; *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5901-5903.

¹⁵⁴ M. L. Kantam, R. Chakravarti, Ch. V. Reddy, B. Sreedhar, S. Bhargava; *Adv. Syn. Cat.* **2008**, 350, 2544-2550.

Ester etylowy 3-(*p*-metoksyfenylo)-propanowego (2e).

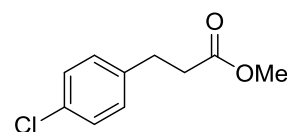
Związek **2e** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 81% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ



1.19-1.27 (t, 3H, J=7.0Hz), 2.51-2.62 (t, 2H, J=8.2Hz), 2.85-2.91 (t, 2H, J=8.2Hz), 3.79 (s, 3H), 4.05-4.19 (q, 2H, J=7.0Hz), 6.80-7.14 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.7, 31.8, 36.0, 53.0, 61.0, 128.5, 129.3, 132.3, 140.0, 173.4. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵⁵.

Ester metylowy 3-(*p*-chlorofenylo)-propanowego (3f). Związek

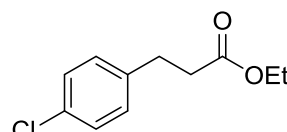
3f otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 67% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.57-2.62 (t, 2H,



J=7.7Hz), 2.87-2.95 (t, 2H, J=7.7Hz), 3.66 (s, 3H), 7.12-7.30 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 30.2, 35.6, 52.0, 128.4, 129.3, 132.0, 139.0, 173.2. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵⁶.

Ester metylowy kwasu 3-(*p*-chlorofenylo)-propanowego (2f).

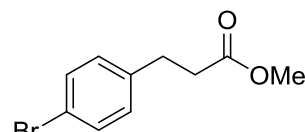
Związek **2f** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 73% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ



1.19-1.27 (t, 3H, J=7.2Hz), 2.55-2.63 (t, 2H, J=7.9Hz), 2.88-2.95 (t, 2H, J=7.9Hz), 4.07-4.17 (q, 2H, J=7.2Hz), 7.11-7.27 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.8, 31.6, 36.0, 60.8, 128.1, 129.0, 132.1, 140.0, 173.0. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵⁷.

Ester metylowy kwasu 3-(*p*-bromofenylo)-propanowego (3g).

Związek **3g** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 70% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ



2.55-2.63 (t, 2H, J=7.6Hz), 2.86-2.94 (t, 2H, J=7.6Hz), 3.65 (s, 3H), 7.06-7.42 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 30.2, 35.4, 51.7, 120.0, 131.5, 139.4, 173.0. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵⁸.

¹⁵⁵ S. J. Pridmore, J. M. J. Williams; *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 7413-7415.

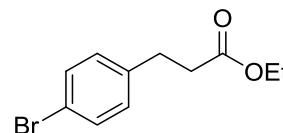
¹⁵⁶ T. O. Vieira, M. J. Green, H. Alper; *Org. Lett.* **2006**, 8, 6143-6145.

¹⁵⁷ S. J. Pridmore, J. M. J. Williams; *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 7413-7415.

¹⁵⁸ P. Sh. Lin, M. Jeganmohan, Ch. H. Cheng; *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 1409-1416.

Ester etylowy kwasu 3-(*p*-bromofenylo)-propanowego (2g).

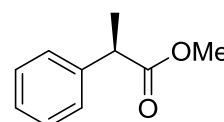
Związek **2g** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 72% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.19-



1.26 (t, 3H, J=7.2Hz), 2.55-2.63 (t, 2H, J=7.6Hz), 2.86-2.94 (t, 2H, J=7.6Hz), 4.06-4.17 (q, 2H, J=7.2Hz), 7.06-7.42 (m, 4H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.2, 30.3, 35.6, 60.5, 120.0, 130.1, 131.5, 139.5, 172.6. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁵⁹.

Ester metylowy kwasu (*R*)-2-fenylopropanowego ((*R*)-3h). Związek

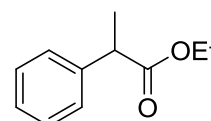
(*R*)-**3h** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 49% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.41-1.43 (d, 3H, J=7.5Hz);



3.58 (s, 3H); 3.61-3.65 (m, 1H), 7.20-7.25 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 18.9, 45.7, 52.3, 125.9, 127.5, 127.8, 128.8, 128.9, 140.9, 175.3. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁶⁰. HPLC: kolumna Chiralcel OD-H heksan/*i*-PrOH=9/1, t_R(1)=4.475min, t_R(2)=4.995min. [α]_D²⁰ = -26.3 (c 0.8, CHCl₃)¹⁶¹.

Ester etylowy kwasu (*rac*)-2-fenylopropanowego (2h). Związek **2h**

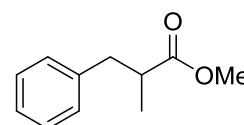
otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 71% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.16-1.24 (t, 3H, J=7.0Hz), 1.45-



1.49 (d, 3H, J=7.5Hz); 3.67-3.72 (m, 1H), 4.10-4.19 (q, J=7.0Hz, 2H) 7.21-7.25 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.1, 18.8, 45.6, 61.3, 127.1, 127.6, 128.1, 140.3, 174.6. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁶².

Ester metylowy kwasu (*rac*)-3-fenylo-2-metylopropanowego (3i).

Związek **3i** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 34% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.06-1.08 (d, 3H,



J=7.5); 2.45-2.65 (m, 2H); 2.90-2.98 (m, 1H); 3.55 (s, 3H), 7.10-7.24 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 17.0, 40.0, 41.7, 51.9, 126.6, 128.6, 128.7, 129.2, 129.3, 139.6, 176.9. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁶³.

¹⁵⁹ S. J. Pridmore, J. M. J. Williams; *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 7413-7415.

¹⁶⁰ Y. B. Kiran, R. Ikeda, N. Sakai, T. Konakahara; *Synthesis* **2010**, *2*, 276-278;

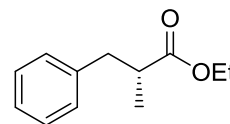
¹⁶¹ Y. Zhang, Z. Han, F. Li, K. Ding, A. Zhang; *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 156-158.

¹⁶² M. Tobisu, R. Nakamura, Y. Kita, N. Chatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3174-3175.

¹⁶³ T. Hintermann, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 2093-2126.

Ester etylowy kwasu (*R*)-3-fenyl-2-metylopropanowego ((*R*)-**2i**).

Związek **2i** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 1 z wydajnością 64% (24 godz.). ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.06-1.08 (d, 3H,



J=7.5); 1.09-1.15 (t, J=7.0Hz, 3H) 2.45-2.65 (m, 2H); 2.90-2.98 (m, 1H); 4.05-4.20 (q, J=7.0Hz, 2H), 7.10-7.24 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.6, 16.9, 40.2, 41.5, 61.2, 126.3, 128.6, 128.9, 129.1, 129.6, 139.2, 176.7. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁶⁴. HPLC: kolumna Chiralcel OD-H, λ = 232 nm, 1.0 mL/min, heksan/i-PrOH=9/1, t_R(1)=4.362min, t_R(2)=5.150min. [α]_D²⁰ = -12.3 (c 1.0, CHCl₃)¹⁶⁵.

7.3. Enzymatyczny rozdział kinetyczny p-podstawionych pochodnych kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

7.3.1. Synteza racemicznych p-podstawionych pochodnych kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

Procedura ogólna 2¹⁶⁶: Reakcja Grignarda z aldehydami.

Do roztworu odczynnika Grignarda w tetrahydrofuranie (13 ml, 1.05 M/THF) dodano 10 ml tetrahydrofuranu i schłodzono do temperatury 0 °C. Następnie do mieszaniny powoli wkroplono utrzymując temperaturę poniżej 5 °C roztwór aldehydu **a** lub **b** (10 mmol) w tetrahydrofuranie (5 ml). Mieszanina reakcyjna była mieszana w temperaturze 0 °C do zaniku substratu (kontrola TLC) – 30 minut, a następnie dodano dodano nasyconego roztworu chlorku amonu (20 ml) i zaobserwowano zmętnienie mieszaniny reakcyjnej. Do mieszaniny dodano eteru (20 ml) i rozdzielono fazy. Fazę wodną ekstrahowano eterem (2 x 20 ml). Fazy organiczne połączono, przemyto solanką, wysuszono (MgSO₄) i zatężono. Analiza NMR surowego produktu potwierdziła, że oczyszczanie nie jest konieczne. Ponadto ewentualny rozdział chromatograficzny na żelu krzemionkowym nie był możliwy ze względu na nietrwałość związków.

¹⁶⁴ P. J. Black, M. G. Edwards, J. M. J. Williams; *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4367-4378

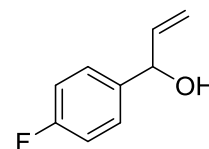
¹⁶⁵ R. E. Deasy, T. S. Moody, A. R. Maguire; *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, 24, 1480-1487.

¹⁶⁶ A. J. Timothy, M. D. Curtis, P. Beak *J. Am. Soc.*, **2001**, 123, 1004 – 1005.

1-(*p*-fluorofenilo)-prop-2-en-1-ol (5a). Związek **5a** otrzymano

zgodnie z Procedurą Ogólną 2 z wydajnością 95%. ¹H NMR (CDCl₃,

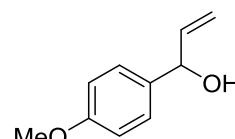
200 MHz) δ 2.10 – 2.20 (br s, 1H), 5.21 – 5.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.22 – 5.24 (dt, *J* = 10.3Hz, *J* = 1.3Hz, 1H), 5.36 – 5.41 (dt, *J* = 17.0Hz, *J* = 1.2Hz, 1H), 6.00 – 6.19 (m, 1H), 7.00 – 7.19 (m, 2H), 7.30 – 7.48 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 74.8, 115.3, 115.4, 115.6, 115.9, 128.3, 128.4, 140.4, 162.3. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁶⁷.



1-(*p*-metoksyfenilo)-prop-2-en-1-ol (5b). Związek **5b** otrzymano

zgodnie z Procedurą Ogólną 2 z wydajnością 95%. ¹H NMR (CDCl₃,

200 MHz) δ 2.15 – 2.22 (br s, 1H), 3.80 (s, 3H), 5.23 – 5.25 (d, *J* = 7.0Hz, 1H), 5.22 – 5.26 (dt, *J* = 10.3Hz, *J* = 1.3Hz, 1H), 5.34 – 5.40 (dt, *J* = 17.1Hz, *J* = 1.3Hz, 1H), 6.00 – 6.20 (m, 1H), 7.00 – 7.17 (m, 2H), 7.31 – 7.46 (m, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 55.6, 75.0, 115.5, 115.6, 115.8, 115.9, 128.2, 128.5, 140.4, 162.5.



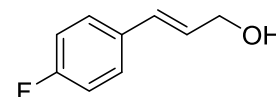
Procedura Ogólna 3¹⁶⁸: Izomeryzacja.

Do roztworu II-rzędowego alkoholu allilowego **5** (6 mmol) w mieszaninie tetrahydrofuran:woda (v/v=4/1, 30 ml) dodano kroplami kwas metanosulfonowy (1.36 ml, 12 mmol, 70 % wodny r-r). Mieszanina reakcyjna była mieszana przez 4 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie dodano nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu (30 ml). Rozdzielono fazy. Fazę wodną ekstrahowano octanem etylu (20 ml x 3). Fazy organiczne połączono, przemyto solanką, wysuszono (Na₂SO₄) i zatężono. Surowy produkt rozdzielono chromatograficznie na żelu krzemionkowym (270 – 400 Mesh, Hex:AcOEt = 8:2 (v/v)).

Alkohol *p*-fluorocynamonowy (6a). Związek **6a** otrzymano

zgodnie z Procedurą Ogólną 3 z wydajnością 63%. ¹H NMR

(CDCl₃, 200 MHz) δ 1.93 – 2.12 (br s, 1H), 4.20 – 4.35 (m, 2H), 6.19 – 6.33 (m, 1H), 6.50 – 6.62 (d, *J* = 16Hz, 1H), 6.90 – 7.05 (m, 2H), 7.26 – 7.40 (m, 2H). *t*_{zmierzona} = 56 °C, *t*_{lit}¹⁶⁹ = 57 °C.



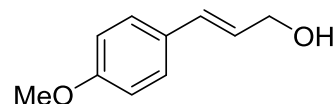
¹⁶⁷ A. J. Timothy, M. D. Curtis, P. Beak *J. Am. Soc.*, **2001**, 123, 1004 – 1005.

¹⁶⁸ R. R. Leleti, B. Hu, M. Prashad, O. Repic; *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 8505 – 8507.

¹⁶⁹ R. G. Salih, M. Y. Shandala; *Collection of Czechoslovak Chem. Comm.*, **1976**, 41, 262 – 270.

Alkohol *p*-metoksycynamonowy (6b). Związek **6b**

otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 3 z wydajnością 87%.



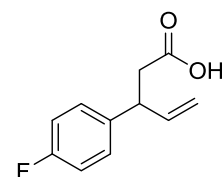
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.90 – 2.12 (br s, 1H), 3.83 (s, 3H), 4.19 – 4.35 (m, 2H), 6.21 – 6.33 (m, 1H), 6.49 – 6.60 (d, $J = 16\text{Hz}$, 1H), 6.92 – 7.07 (m, 2H), 7.23 – 7.38 (m, 2H). $t_{\text{zmierzona}} = 76\text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{lit}}^{170} = 76\text{ }^\circ\text{C}$.

Procedura ogólna 4¹⁷¹: Przegrupowanie Johnsona-Claisena i hydroliza.

Do roztworu alkoholu **6a-b** (6.8 mmol) w ortoocetanie trietylu (10 ml) dodano kwas octowy (0.25 ml). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na mieszadle magnetycznym w temperaturze wrzenia ortoocetanu trietylu aż do zaniku substratu – 5 godzin. Po dwóch godzinach dodano 0.25 ml kwasu octowego, po dwóch godzinach kolejną, identyczną porcję kwasu octowego. Po pięciu godzinach zaobserwowano, że temperatura mieszaniny reakcyjnej utrzymuje stałą wartość. Mieszaninę ostudzono, a następnie odparowano nadmiar ortoocetanu trietylu. Do pozostałości dodano etanol (4 ml), a następnie roztwór wodorotlenku sodu (10%, 3 ml) i mieszano w temperaturze wrzenia przez cztery godziny. Po ostudzeniu mieszaninę reakcyjną ekstrahowano octanem etylu (3 x 5ml). Fazy rozdzielono. Fazę wodną doprowadzono do pH = 1 kwasem solnym (2 M) i ekstrahowano octanem etylu (3 x 10 ml). Fazy organiczne połączono, wysuszono (MgSO_4) i zatężono. Surowy produkt krystalizowano z heksanu.

Kwas 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowy (*rac*-4a). Związek *rac*-4a

został otrzymany zgodnie z Procedurą Ogólną 4 z wydajnością 56%. ^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ 2.70 – 2.74 (dd, $J = 15.6\text{Hz}$, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 2.73 – 2.78 (dd, $J = 15.5\text{Hz}$, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 3.66 – 3.84 (m, 1H),



5.04 – 5.13 (m, 2H), 5.84 – 6.10 (ddd, $J = 16.8\text{Hz}$, $J = 10.5\text{Hz}$, $J = 6.8\text{Hz}$, 1H), 6.83 – 6.89 (m, 2H), 7.08 – 7.13 (m, 2H), 9.10 – 10.20 (br s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ 40.0, 44.3, 114.9, 115.5, 128.8, 134.5, 140.6, 160.0, 177.5. $t_{\text{m}} = 59\text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{lit}}^{172} = 58\text{ }^\circ\text{C} - 60\text{ }^\circ\text{C}$. AE obliczona dla $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FO}_2 - \text{C}$ 68.03%, H 5.71%; zmierzona: C 67.89% - 68.14%, H 5.98%.

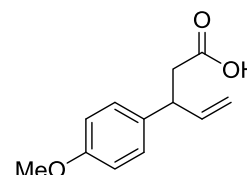
¹⁷⁰ M. G. Tsatsus *Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1968**, 3685 – 3691.

¹⁷¹ G. Heuger, S. Kalsow, R. Göttlich *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 11, 1848 – 1854.

¹⁷² M. Hatsuda, T. Kuroda, M. Seki *Synthetic Comm.*, **2003**, 33, 427 – 434.

Kwas 3-(*p*-metoksyfenylo)-4-pentenowy (*rac*-4b).

Związek *rac*-4b został otrzymany zgodnie z Procedurą Ogólną 4 z wydajnością 73%. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.70 – 2.74 (dd, *J* = 15.6Hz, *J* = 7.5, 1H), 2.74 – 2.78 (dd, *J* = 15.5Hz, *J* = 7.5Hz, 1H), 3.68 – 3.85 (m,



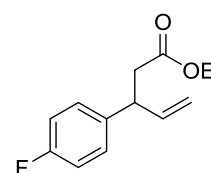
1H), 3.80 (s, 3H), 5.00 – 5.10 (m, 2H), 5.85 – 6.10 (ddd, *J* = 16.5Hz, *J* = 10.8Hz, *J* = 6.8Hz, 1H), 6.83 – 6.89 (m, 2 H), 7.10 – 7.16 (m, 2H), 9.10 – 10.20 (br s, 1H), ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 40.4, 44.7, 55.6, 114.3, 115.0, 128.8, 134.5, 140.6, 159.0, 178.5; *t*_{zmierzona} = 57 °C, *t*_{lit.}¹⁷³ = 58 °C – 59 °C. AE obliczona dla C₁₂H₁₄O₃: C69.89%, H6.84%, O23.27%; zmierzona: C69.80% - 69.95%, H6.86 – 6.90%.

Procedura ogólna 5¹⁷⁴: Synteza estrów etylowych i metylowych kwasów *rac*-4a i *rac*-4b.

Do roztworu kwasu 4a-b (0.15 mmol) w dichlorometanie (0.1 ml) wkroplono chlorek tionylu (0.05 ml) i mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano alkohol (0.3 ml) i mieszano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej (do zaniku substratu). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozdzielono chromatograficznie (żel krzemionkowy 230 – 400 Mesh, eluent Hex:AcOEt = 99.5:0.5 (v/v)).

Ester etylowy kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (*rac*-7a).

Związek *rac*-7a otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 5 z wydajnością 63%. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.16 (t, *J* = 7.2Hz, 3H), 2.70 – 2.74 (dd, *J* = 15.6Hz, *J* = 7.5Hz, 1H), 2.73 – 2.78 (dd, *J* =



15.5Hz, *J* = 7.5Hz, 1H), 3.66 – 3.84 (m, 1H), 4.06 (q, *J* = 7.2Hz, 2H), 5.04 – 5.13 (m, 2H), 5.84 – 6.10 (ddd, *J* = 16.8Hz, *J* = 10.5Hz, *J* = 6.8Hz, 1H), 6.83 – 6.89 (m, 2 H), 7.08 – 7.13 (m, 2H), 9.10 – 10.20 (br s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.1, 40.0, 44.3, 60.3, 114.9, 115.5, 128.8, 134.5, 140.6, 160.0, 177.5. HPLC: kolumna Chiralpak AS-H, *n*-heksan/*i*-PrOH=97:3; λ = 232 nm; 0.6 ml/min *t*_R(S) = 6.39 min., *t*_R(R) = 6.72 min.

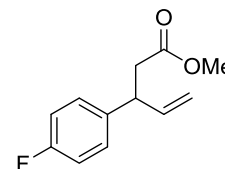
¹⁷³ M. Gao, D. – X. Wang, Q. – Y. Zheng, M. – X. Wang *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 9532 – 9535.

¹⁷⁴ D. Koszelewski *Zastosowanie natywnych i immobilizowanych enzymów w syntezie prekursorów peptydomimetyków*, Praca doktorska, Instytut Chemii Organicznej PAN, Warszawa, **2007**, 84 – 89, 150.

Ester metylowy kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (*rac*-

8a). Związek *rac*-**8a** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 5 z wydajnością 63%. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 2.70 – 2.74 (dd, *J* = 15.6Hz, *J* = 7.5Hz, 1H), 2.73 – 2.78 (dd, *J* = 15.5Hz, *J* = 7.5Hz, 1H),

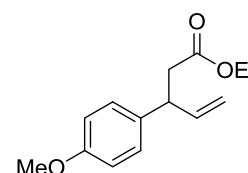
3.66 – 3.84 (m, 1H), 5.04 – 5.13 (m, 2H), 5.84 – 6.10 (ddd, *J* = 16.8Hz, *J* = 10.5Hz, *J* = 6.8Hz, 1H), 6.83 – 6.89 (m, 2 H), 7.08 – 7.13 (m, 2H), 9.10 – 10.20 (br s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.1, 40.0, 44.3, 60.3, 114.9, 115.5, 128.8, 134.5, 140.6, 160.0, 177.5. HPLC: kolumna Chiralpak AS-H, *n*-heksan/*i*-PrOH=97:3; λ = 232 nm; 0.6 ml/min t_R(S) = 6.57 min., t_R(R) = 6.99 min.



Ester etylowy kwasu 3-(*p*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (*rac*-

7b). Związek *rac*-**7b** otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 5 z wydajnością 85%. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz) δ 1.16 (t, *J* = 7.2Hz, 3H), 2.70 – 2.74 (dd, *J* = 15.6Hz, *J* = 7.5Hz, 1H), 2.74 – 2.78 (dd, *J*

= 15.5Hz, *J* = 7.5Hz, 1H), 3.68 – 3.85 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.06 (q, *J* = 7.2Hz, 2H), 5.00 – 5.10 (m, 2H), 5.85 – 6.10 (ddd, *J* = 16.5Hz, *J* = 10.8Hz, *J* = 6.8Hz, 1H), 6.83 – 6.89 (m, 2 H), 7.10 – 7.16 (m, 2H), 9.10 – 10.20 (br s, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) δ 14.1, 40.4, 44.7, 55.6, 60.4, 114.3, 115.0, 128.8, 134.5, 140.6, 159.0, 178.5. HPLC: kolumna Chiralpak AS-H, *n*-heksan/*i*-PrOH=97:3; λ = 232 nm; 0.6 ml/min, t_R(S) = 8.978 min., t_R(R) = 9.227 min.



Procedura ogólna 6: Otrzymywanie racemicznych estrów kwasów karboksylowych z wykorzystaniem ortoocetanu trietylu¹⁷⁵.

Do roztworu kwasu **4a** (1 eq, 0.1 mmol) w toluenie (2 ml) dodano ortoocetan trietylowy (3 eq, 0.3 mmol) i mieszano w temperaturze wrzenia (110°C) przez 24 godziny. Mieszaninę schłodzono i dodano roztwór kwasu solnego (1.1 ml, 2 M). Fazy wodną i organiczną rozdzielono. Fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (15 ml) oraz solanką (15 ml), a następnie wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5/0.5=V/V).

¹⁷⁵ Trujillo, J. I.; Gopalan, A. S.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7355-7358.

Ester etylowy kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (**7a**).

Związek **7a** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 6 z wydajnością

5%. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ 1.16 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 2.70 – 2.74

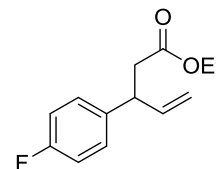
(dd, $J = 15.6\text{Hz}$, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H), 2.73 – 2.78 (dd, $J = 15.5\text{Hz}$, $J =$

7.5Hz, 1H), 3.66 – 3.84 (m, 1H), 4.06 (q, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 5.04 – 5.13 (m, 2H), 5.84 – 6.10

(ddd, $J = 16.8\text{Hz}$, $J = 10.5\text{Hz}$, $J = 6.8\text{Hz}$, 1H), 6.83 – 6.89 (m, 2 H), 7.08 – 7.13 (m, 2H),

9.10 – 10.20 (br s, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ 14.1, 40.0, 44.3, 60.3, 114.9, 115.5,

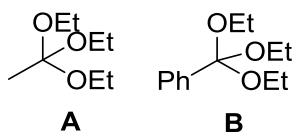
128.8, 134.5, 140.6, 160.0, 177.5.



7.3.2. Enzymatyczna estryfikacja *p*-podstawionych pochodnych kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

Procedura ogólna 7: Enzymatyczna estryfikacja kwasów *rac*-**4a** i *rac*-**4b** ortoestrami trietylu.

Ortoestry:



Do roztworu kwasu **4** (0.1 mmol, 1eq) w toluenie (0.60 ml) wkroplono ortoester trietylu **A** lub **B** (0.3 mmol, 3 eq) i dodano 10 mg enzymu. Mieszaninę ogrzewano w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Po schłodzeniu dodano kwas solny (0.5 ml, 2 M). Warstwę organiczną przemyto nasyconym wodorowęglanem sodu (0.5 ml), solanką (0.5 ml), wysuszono (MgSO_4) i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu (230 – 400 Mesh, Hex:AcOEt; 99.5/0.5=v/v).

Widma NMR enancjomerycznie wzbogaconego estru (*S*)-**7a** i (*S*)-**7b** były zgodne z tymi, które otrzymano dla racematów *rac*-**7a** i *rac*-**7b**.

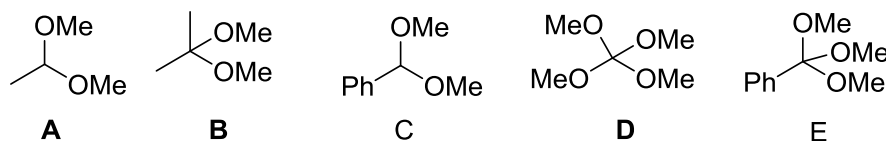
Wyniki pomiarów skręcalności właściwej produktów (*S*)-**7a** i (*S*)-**7b**:

(*S*)-(-)-**7a**: $[\alpha]_D^{20} = -21.8$ (c 1.00, CHCl_3 , 97% *ee*). W celu określenia konfiguracji absolutnej ester (*S*)-(-)-**7a** został zhydrolizowany do kwasu (*S*)-(-)-**4a**: $[\alpha]_D^{20} = -26.2$ (c 1.0, CHCl_3). Lit. (*R*)-(+)-**4a** enancjomer: $[\alpha]_D^{20} = +21.0$ (c 2.00, CHCl_3 , >90.5% *ee*)¹⁷³.

(*S*)-(-)-**7b**: $[\alpha]_D^{20} = -5.7$ (c 1.00, CHCl₃, 48% *ee*). W celu określenia konfiguracji absolutnej ester (*S*)-(-)-**7b** został zhydrolizowany do kwasu (*S*)-(-)-**4b**: $[\alpha]_D^{20} = -8.2$ (c 1.0, CHCl₃). Lit (*R*)-(+)-**4b** enancjomer: $[\alpha]_D^{20} = +20.0$ (c 2.0, CHCl₃, >99% *ee*)¹⁷³.

Procedura ogólna 8: Enzymatyczna estryfikacja kwasu *rac*-4a z wykorzystaniem różnych donorów grupy metoksylowej.

Donory:



Do roztworu kwasu *rac*-**4a** (1 eq, 0.1 mmol) w toluenie (0.60 ml) wkroplono odpowiedni donor grupy metoksylowej **A-E** (3 eq, 0.3 mmol) i dodano 10 mg enzymu. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 40 °C przez 24 godziny. Po schłodzeniu dodano kwas solny (0.5 ml, 2 M). Warstwę organiczną przemyto nasyconym wodorowęglanem sodu (0.5 ml), solanką (0.5 ml), wysuszono (MgSO₄) i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu (230 – 400 Mesh, Hex:AcOEt; 99.5/0.5=v/v).

Widma NMR enancjomerycznie wzbogaconego estru (*S*)-**8a** były zgodne z tymi, które otrzymano dla racematu *rac*-**8a**.

7.4. Enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasów 3-hydrokso-3-arylopropanowych

7.4.1. Synteza racemicznych kwasów 3-hydrokso-3-arylopropanowych

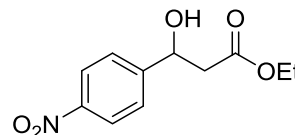
Procedura ogólna 9. Reakcja aldolowa z monoestrem etylowym kwasu malonowego.

Do roztworu estru monoetylowego kwasu malonowego (90 mg, 0.66 mmol) w acetonitrylu (0.4 mL) dodano aldehyd (100mg, 0.66mmol) i mieszano w temperaturze 80°C przez 15 godzin (w atmosferze azotu). Mieszaninę reakcyjną ostudzono i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w mieszaninie rozpuszczalników (10 ml, Et₂O/DCM, 1/1=V/V), przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (10 ml), kwasem solnym (1N, 10 ml), a następnie wysuszono (MgSO₄). Siarczan magnezu odsączono, a fazę organiczną odparowano pod

zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość oczyszczono chromatograficznie na żelu krzemionkowym (AcOEt/Hex; 4/6=v/v).

Ester etylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego (*rac*-10a).

Produkt (*rac*)-10a otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 9 z wydajnością 76%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.26- 1.30 (t, 3H, *J* = 7.8 Hz), 2.68- 2.78 (m, 2H), 4.18- 4.23 (q, 2H, *J* = 7.8 Hz), 5.23- 5.26 (m, 1H), 7.55- 7.59 (m, 2H), 8.20- 8.24 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.07, 42.85, 61.22, 69.31, 123.74, 126.47, 147.36, 149.63, 171.00. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁷⁶. HPLC: kolumna Chiralcel IA; λ = 232 nm, 1.0 mL/min, heksan/*i*-PrOH=9/1 (v/v), t_R(*S*) = 14.65, t_R(*R*) = 16.00.

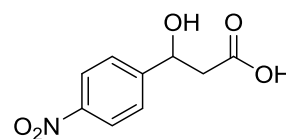


Procedura ogólna 10. Hydroliza estru.

Ester etylowy kwasu *rac*-9a (0.4 g, 1.78 mmol) rozpuszczono w etanolu (1 ml), dodano wodny roztwór wodorotlenku sodu (1 N, 10 ml) i mieszano energicznie w ciągu 3 godzin w temperaturze pokojowej. Etanol usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Fazę wodną przemyto octanem etylu (3x30 ml), następnie wkroplono stężony kwas solny aż do uzyskania pH 2 i ekstrahowano octanem etylu (3x30 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono przez krystalizację z mieszaniny rozpuszczalników (Et₂O/Hex, 1/1=v/v).

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)propanowy (*rac*-9a).

Związek *rac*-9a otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 10 z wydajnością 92% (292 mg) w postaci białych kryształów. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.72-2.75 (m, 2H), 5.20-5.24 (m, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 43.8, 70.3, 124.3, 127.7, 128.7, 144.3, 172.6. Widma NMR zgodne z literaturą¹⁷⁸. tt: 121-123 °C, tt_{Lit} 119-122 °C¹⁸⁰.



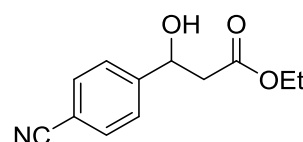
¹⁷⁶Salvi, N. A.; Chattopadhyay, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4918-4922.

Procedura Ogólna 11. Reakcja aldolowa z monoestrem etylowym kwasu malonowego.

Trietyloaminę (0.56 mL, 4.0 mmol, 1 eq) dodano do mieszaniny benzaldehydu (0.42 ml, 4.0 mmol, 1 eq), monoestru etylowego kwasu malonowego (582 mg, 4.4 mmol, 1.1 eq) w DMF (10 ml). Całość mieszano przez 20 godzin w temperaturze 80°C. Związki lotne usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozcieńczono mieszaniną rozpuszczalników (40 ml, Et₂O/DCM, v:v=1:1), przemyto wodnym nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu, a następnie kwasem solnym (15 ml, 1 N). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (MgSO₄) i odparowano w próżni, a pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (eluent: octan etylu/heksan).

Ester etylowy kwasu *rac*-3-(4-cyjanofenylo)-3-hydroksypropanowego (*rac*-10b).

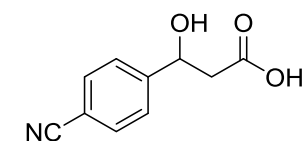
Związek (*rac*)-10b otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 11 z wydajnością 75%



(658 mg) jako bezbarwny olej. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.25 (t, *J* = 8.0 Hz, 3H), 2.66-2.72 (m, 2H), 3.62 (brs, 1H), 4.17 (q, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.15-5.20 (m, 1H), 7.46-7.51 (m, 2H), 7.61-7.66 (m, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.4, 43.2, 61.5, 69.8, 111.7, 126.6, 132.6, 148.0, 172.3. Widma NMR zgodne z literaturowymi¹⁷⁷. HPLC: kolumna Chiralcel OB; heksan/*i*-PrOH=9:1, *t*_R(1)=14.89 min., *t*_R(2)=16.66 min.

Kwas *rac*-3-(4-cyjanofenylo)-3-hydroksypropanowy (*rac*-9b).

Związek (*rac*)-9b otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 10 z wydajnością 93% (278 mg) w postaci białych kryształów. ¹H

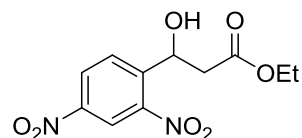


NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.78 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 5.18-5.22 (m, 1H, CH), 7.50 (d, *J* = 8.0 Hz), 7.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 42.2, 68.8, 117.7, 124.4, 128.6, 130.2, 148.7, 172.0. Widma NMR zgodne z danymi literaturowymi¹⁷⁸.

¹⁷⁷ M. A. Fernandez-Ibanez; B. Macia; A. J. Minnaard, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1317-1319.

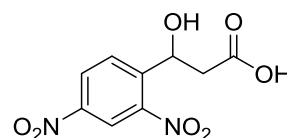
¹⁷⁸ D. Zhu; H. Ankati, C. Mukherjee; V. Yang; E. R Biehl, L. Hua, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2560-2563.

Ester etylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(2,4-dinitrofenylo)-propanowego (*rac*-10c). Związek (*rac*)-10c otrzymano zgodnie



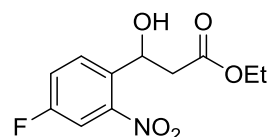
z Procedurą Ogólną 11 z wydajnością 69% (784 mg) w postaci bezbarwnego oleju. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.28 (t, 3H, $J = 8.0$ Hz), 2.62 (dd, $J = 20.0, 12.0$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 20.0, 4.0$ Hz, 1H), 4.00 (br s, 1H), 4.22 (q, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.75 (dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 1H), 8.17-8.19 (m, 1H), 8.47-8.50 (m, 1H), 8.82 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.3, 42.3, 61.8, 66.2, 120.3, 128.0, 130.5, 145.1, 147.4, 172.1. AE obliczona dla $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7$: C 46.48, H 4.26, N 9.86; zmierzona: C 46.52, H 4.19, N 9.75. HRMS (ESI): obliczona dla $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 307.0542, zmierzona: 307.0550. HPLC: kolumna Chiralcel AI, heksan/*i*-PrOH=9/1, czasy retencji: $t_{\text{R}}(1)=24.49$ min., $t_{\text{R}}(2)=29.07$ min.

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-(2,4-dinitrofenylo)-propanowy (9c).



Związek (*rac*)-9c otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 10 z wydajnością 98% (468 mg) w postaci półstałej. ^1H NMR (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ 2.32 (dd, $J = 20.0, 12.0$ Hz, 1H), 2.48 (dd, $J = 20.0, 4.0$ Hz, 1H), 5.34 (br s, 1H), 5.41 (dd, $J = 4.0$ Hz, 1H), 7.90-7.92 (m, 1H), 8.15-8.18 (m, 1H), 8.40 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-}d_6$) δ 42.7, 65.1, 145.2, 146.6, 147.2, 171.9. HRMS (ESI): obliczona dla $\text{C}_9\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 255.0261, zmierzona: 255.0253.

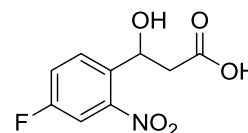
Ester etylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(2-nitro-4-fluorofenylo)-propanowego (10d). Związek (*rac*)-10d otrzymano zgodnie z



Procedurą ogólną 11 z wydajnością 78% (803 mg) w postaci bezbarwnego oleju. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.60 (dd, $J = 16.8, 9.2$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz, 1H), 3.90 (br s, 1H), 4.20 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 5.63 (dd, $J = 3.4, 2.4$ Hz, 1H), 7.34-7.43 (m, 1H), 7.66-7.72 (m, 1H), 7.87-7.94 (m, 1H); ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14.4, 42.6, 61.5, 65.9, 111.9, 112.5, 121.2, 121.6, 130.4, 130.5, 172.6. AE obliczona dla $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_5\text{F}$: C 51.37, H 4.70, N 5.45; zmierzona: C 51.15, H 4.82, N 5.37. HRMS (ESI): obliczona dla $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_5\text{NaF}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 280.0597; zmierzona: 280.0599. HPLC: kolumna Chiralcel OD-H; heksan/*i*-PrOH=9/1; czasy retencji: $t_{\text{R}}(1)=10.91$ min., $t_{\text{R}}(2)=13.73$ min..

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-(2-nitro-4-fluorofenylo)-propanowy

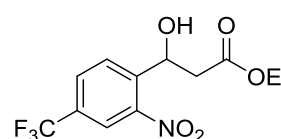
(**9d**). Związek (*rac*)-**9d** otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 10 z wydajnością 94% (306 mg) w postaci półstałej.



$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 2.61 (dd, $J = 16.8, 9.2$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz, 1H), 5.70-5.76 (m, 1H), 7.38-7.42 (m, 1H), 7.62-7.71 (m, 1H), 7.82-7.92 (m, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 42.9, 69.9, 115.5, 127.6, 140.0, 163.5, 172.2. AE obliczona dla $\text{C}_9\text{H}_8\text{FNO}_5$: C 47.17, H 3.52, N 6.11; zmierzona: C 46.82, H 3.78, N 5.96. HRMS (ESI) obliczona dla $\text{C}_9\text{H}_7\text{FNO}_5$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 228.03, zmierzona: 228.0.

Ester etylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(2-nitro-4-trifluorometylofenylo)-propanowego (10e**)**

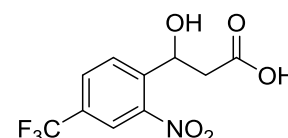
Związek (*rac*)-**10e** otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 11 z wydajnością 72%



(885 mg) w postaci bezbarwnego oleju. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.28 (t, 3H, $J = 8.0$ Hz), 2.62 (dd, $J = 18.0, 10.0$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 18.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.97 (br s, 1H), 4.21 (q, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.70-5.75 (m, 1H), 7.89-7.90 (m, 1H), 8.08-8.13 (m, 1H), 8.25 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 14.4, 42.4, 61.7, 66.1, 122.2, 129.8, 130.5, 172.4. AE obliczona dla $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_5$: C 46.91, H 3.94, N 4.56; zmierzona: C 47.02, H 3.90, N 4.33; HRMS (ESI): obliczona dla $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 330.0565; zmierzona: 330.0559. HPLC: kolumna Chiralcel OB; heksan/*i*-PrOH=9/1; czasy retencji: $t_{\text{R}}(1) = 8.41$ min., $t_{\text{R}}(2) = 10.64$ min..

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-(2-nitro-4-trifluorometylofenylo)-propanowy (9e**)**

Związek (*rac*)-**9e** otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 10 z wydajnością 89% (275 mg) w postaci półstałej.

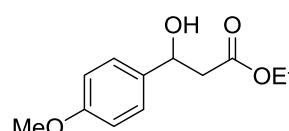


$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 2.71 (dd, $J = 18.0, 10.0$ Hz, 1H), 2.99 (dd, $J = 18.0, 4.0$ Hz, 1H), 4.82 (br s, 1H), 5.75 (dd, $J = 10.0, 4.0$ Hz, 1H), 7.90-7.95 (m, 1H), 8.09-8.14 (m, 1H), 8.25 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 42.5, 69.8, 124.7, 128.8, 132.4, 172.8. HRMS (ESI): obliczona dla $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{F}_3\text{NO}_5$ $[\text{M}-\text{Na}]^-$: 278.0275, zmierzona: 278.0276.

Procedura ogólna 12. Redukcja ketonu.

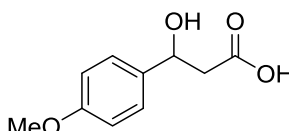
Borowodorek sodu (NaBH₄) (208 mg, 5.05 mmol) dodano do estru etylowego kwasu 3-(4-metoksyfenilo)-3-oksopropanowego (1.11 g, 5.05 mmol) w etanolu (30 ml) w temperaturze 0° C. Po upływie 3 godzin do mieszaniny reakcyjnej dodano nasycony roztwór chlorku amonu (30 ml) i oddzieloną fazę wodną ekstrahowano octanem etylu (3 x 30 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (octan etylu / heksan).

Ester etylowy kwasu *rac*-3-(4-metoksyfenilo)-3-hydroksypropanowego (*rac*-10f). Ester (*rac*)-10f otrzymano



zgodnie Procedurą ogólną 12 z 77% wydajnością (0.85 g) w postaci bezbarwnego oleju. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.64 (dd, *J* = 16.4, 4.0 Hz, 1H), 2.78 (dd, *J* = 16.4, 9.2 Hz, 1H), 3.40 (br s, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.20 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.05 (dd, *J* = 9.2, 4.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 43.3, 55.2, 60.7, 69.7, 113.9, 126.8, 134.8, 159.0, 172.3. Widma ¹H i ¹³C NMR są zgodne z danymi w dostępnej literaturze.¹⁷⁹ HPLC: kolumna Chiralcel OB; heksan/*i*-PrOH=9/1, czasy retencji: *t*_R(*S*)=14.86 min., *t*_R(*R*)=25.78min..

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-(4-metoksyfenilo)-propanowy (*rac*-9f). Związek (*rac*)-9f otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 10

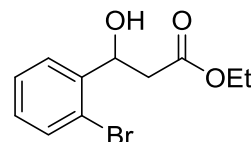


z wydajnością 98% (0.34 g) w postaci białych kryształów. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.70-2.85 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 5.15 (dd, *J* = 4.4, 8.5 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 43.3, 55.6, 114.3, 127.3, 134.6, 177.2. Widma NMR zgodne z literaturowymi¹⁷⁹. t.t.= 81-83°C; *t*_{Lit}=78-82°C¹⁸⁰.

¹⁷⁹ P. G. Cozzi, F. Benfatti, M. G. Capdevila, A. Mignogna; *Chem. Commun.* **2008**, 3317- 3318.

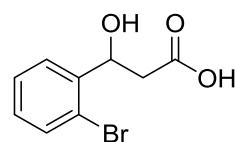
¹⁸⁰ C. W. Downey, M. W. Johnson, D. H. Lawrence; A. S. Fleisher, K. J. Tracy, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 5351-5354.

Ester etylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(2-bromofenylo)-propanowego (*rac*-10g).



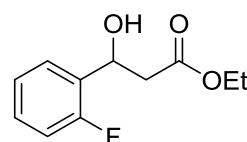
Estery *rac*-10g otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 12 z 72% wydajnością (786mg) w postaci bezbarwnego oleju. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 2.54 (dd, $J = 16.8, 9.8$ Hz, 1H), 2.84 (dd, $J = 16.8, 2.8$ Hz, 1H), 3.65 (br s, 1H), 4.18 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 5.75 (dd, $J = 9.8, 2.8$ Hz, 1H), 7.11-7.14 (m, 1H), 7.29-7.36 (m, 1H), 7.48-7.63 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 14.4, 41.5, 61.2, 69.4, 121.6, 127.5, 128.2, 129.6, 132.4, 141.7, 172.7. Widma NMR zgodne z literaturowymi¹⁸². MS (ESI): obliczona dla $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrO}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 294.9; zmierzona: 295.0. HPLC: kolumna Chiralcel OD-H; heksan/*i*-PrOH=9/1; czasy retencji: $t_{\text{R}}(I) = 7.77$ min., $t_{\text{R}}(2) = 14.56$ min..

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-(2-bromofenylo)-propanowy (9g).



Związek (*rac*)-9g otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 10 z wydajnością 93% (278 mg) w postaci białych kryształów. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 2.62 (dd, $J = 16.8, 10.0$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J = 16.8, 2.6$ Hz, 1H), 5.75 (dd, $J = 9.8, 2.6$ Hz, 1H), 6.15 (br s, 1H), 7.11-7.18 (m, 1H), 7.30-7.40 (m, 1H), 7.50-7.64 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 41.7, 69.4, 121.7, 127.5, 128.2, 129.6, 133.0, 141.3, 177.5. $t_{\text{m}} = 90-91^\circ\text{C}$; $t_{\text{Lit.}} = 89^\circ\text{C}$ ¹⁸¹. MS (ESI): obliczono dla $\text{C}_9\text{H}_8\text{BrO}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 242.9; zmierzono: 242.9.

Ester etylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(2-fluorofenylo)-propanowego (10h).



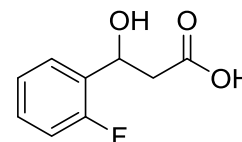
Estery (*rac*)-10h otrzymano zgodnie z Procedurą Ogólną 11 z wydajnością 69% (586 mg) w postaci bezbarwnego oleju. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 2.70-2.82 (m, 2H), 3.62 (br s, 1H), 4.18 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 5.38-5.48 (m, 1H), 6.98-7.38 (m, 3H), 7.52-7.60 (m, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (50 MHz, CDCl_3) δ 14.3, 42.1, 61.2, 64.8, 115.3, 115.7, 124.6, 124.7, 127.4, 127.5, 129.3, 129.5, 129.9, 172.7. Widma NMR zgodne z danymi literaturowymi¹⁸². MS (ESI): obliczono dla $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FO}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 235.1; zmierzono 235.1. HPLC: kolumna Chiralcel OD-H; heksan/*i*-PrOH=9/1; czasy retencji: $t_{\text{R}}(S) = 6.60$ min., $t_{\text{R}}(R) = 9.01$ min..

¹⁸¹Collet, A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1972**, 3857.

¹⁸²Ayil, A. I.; Condom, R.; Wade, T. N.; Guedj, R. *J. Fluorine Chem.* **1979**, *14*, 437-454.

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-(2-fluorofenylo)-propanowy (*rac*-9h).

Związek (*rac*)-9h otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 10 z wydajnością 96% (344 mg) w postaci białych kryształów. ¹H NMR



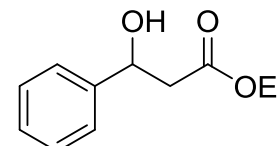
(200 MHz, CDCl₃) δ 2.75-2.82 (m, 2H), 5.38-5.45 (m, 1H), 6.99-7.49 (m, 4H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 42.0, 64.8, 115.4, 115.8, 124.6, 127.4, 129.2, 129.4, 129.5, 129.7, 157.2, 162.1, 177.3. *tt*=70-71°C; *tt*_{Lit}= 68-69°C¹⁸³. MS (ESI): obliczona dla C₉H₈FO₃ [M-H]⁻: 183.04, zmierzona: 183.0.

Procedura ogólna 13. Redukcja ketonu.

Ester etylowy kwasu 3-okso-3-fenylpropanowego (2.4 g, 12.5 mmol) rozpuszczono w etanolu (30 ml), a następnie porcjami dodano borowoderek sodu (425 mg, 12.5mmol) w temperaturze 0° C. Po zakończeniu reakcji (kontrola postępu reakcji- TLC, ok. 3 godzin), wartość pH doprowadzono do 6.0 za pomocą roztworu kwasu solnego (5%). Etanol odparowano pod próżnią i mieszaninę ekstrahowano (DCM, 3x50 ml). Połączone warstwy organiczne wysuszono nad bezwodnym siarczanem magnezu (MgSO₄) i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (octan etylu/heksan).

Ester etylowy kwasu *rac*-3-hydroksy-3-fenylpropanowego

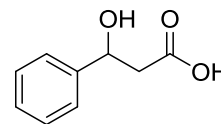
(*rac*-10i). Ester *rac*-10i otrzymano zgodnie z Procedurą ogólną 13 z wydajnością 85% (2,06 g) w postaci bezbarwnego oleju. ¹H



NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz), 2.71 (dd, *J* = 16.4, 4.4 Hz, 1H), 2.74 (dd, *J* = 16.3, 8.3 Hz, 1H), 3.36 (br s, 1H), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz), 5.13 (dd, *J* = 8.3, 4.4 Hz, 1H), 7.30-7.41 (m, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 14.4, 43.6, 61.1, 70.6, 125.9, 128.1, 128.8, 142.8, 172.7. Widma NMR zgodne z danymi w dostępnej literaturze¹⁷⁹. HPLC: kolumna Chiralcel OD-H; heksan/*i*-PrOH=9/1, czasy retencji dla racematu: *t*_R (*S*) = 8.67 min., *t*_R (*R*) = 11.27 min..

¹⁸³M. Leclercq, A. Collet, J. Jacques, *Tetrahedron* **1976**, 32, 821-828.

Kwas *rac*-3-hydroksy-3-fenylopropanowy (9i). Kwas (*rac*)-**9i** został otrzymany zgodnie z Procedurą Ogólną 11 z 99% wydajnością (290 mg) w postaci białych kryształów. t.t.=90-92°C; t.t._{Lit.}=89-90°C¹⁸⁰. ¹H



NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 2.70 (dd, $J = 5.2, 15.3$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 8.2, 15.3$ Hz, 1H), 5.17 (dd, $J = 5.2, 8.2$ Hz, 1H), 7.28-7.41 (m, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 43.7, 70.1, 125.8, 127.1, 128.1, 143.8, 172.4. Widma NMR zgodne z danymi w dostępnej literaturze¹⁸⁰.

7.4.2. Enzymatyczna estryfikacja (EKR) kwasów 3-hydroksy-3-arylopropanowych.

Procedura ogólna 14. Enzymatyczna estryfikacja kwasów *rac*-3-hydroksy-3-arylopropanowych (9a-i).

Do roztworu kwasu *rac*-**9a-i** (0.1 mmol) w rozpuszczalniku organicznym (2 ml, fiolka 5 ml) dodano ortobenzoesan trietylowy (2 equiv.) oraz enzym (forma natywna-5 mg; immobilizowana 10 mg). Reakcję mieszano przez 72 godziny w temperaturze 40°C na wytrząsarce (rpm). Mieszaninę ochłodzono, a następnie odfiltrowano enzym. Frakcje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej, eluent: EtOAc/heksan.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR chiralnych estrów **10a-i** były zgodne z tymi, które otrzymano dla racematów *rac*-**10a-i**.

Wyniki pomiarów skręcalności właściwej produktu (*S*)-**10a** reakcji EKR katalizowanej przez Amano AK w TBME:

(*S*)-(-)-**10a**: $[\alpha]_D^{20} = -59.5$ (c 1.5, CHCl₃, 99% *ee*).

Wyniki pomiarów skręcalności właściwej produktów (*R*)-**10a-i** reakcji EKR katalizowanej przez Novozym 435 w toluenie:

(*R*)-(+)-**10a**: $[\alpha]_D^{20} = +57.5$ (c 1.0, CHCl₃, 95% *ee*); lit. $[\alpha]_D^{20}$ dla (*R*)-enancjomeru: +23.1 (c 1.0, CHCl₃)¹⁸⁴,

(+)-**10b**: $[\alpha]_D^{20} = +23.0$ (c 1.00, CHCl₃, 58% *ee*),

(+)-**10c**: $[\alpha]_D^{20} = +25.2$ (c 1.00, CHCl₃, 83% *ee*),

(+)-**10d**: $[\alpha]_D^{20} = +16.3$ (c 1.00, CHCl₃, 52% *ee*),

(+)-**10e**: $[\alpha]_D^{20} = +12.8$ (c 1.00, CHCl₃, 62% *ee*),

(*R*)-(+)-**10f**: $[\alpha]_D^{20} = +21.5$ (c 1.00, CHCl₃, 60% *ee*); lit. $[\alpha]_D^{20}$ dla (*R*)-enancjomeru: +28.8 (c 1.0, CHCl₃)¹⁸⁵,

(*R*)-(+)-**10h**: $[\alpha]_D^{20} = +34.6$ (c 1.00, CHCl₃, 68% *ee*), lit. $[\alpha]_D^{20}$ dla (*S*)-enancjomeru: -49.7 (c 2.71, CHCl₃)¹⁸⁶,

(*R*)-(+)-**10i**: $[\alpha]_D^{20} = +40.2$ (c 1.00, CHCl₃, 63% *ee*), lit. $[\alpha]_D^{20}$ dla (*R*)-enancjomeru: +48.9 (c 0.89, CHCl₃)¹⁸⁷.

7.4.3. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu 3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego

Procedura Ogólna 15. Racemizacja estru etylowego kwasu (*S*)-3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego ((*S*)-10a**).**

Do roztworu estru (*S*)-**10a** (0.1 mmol) w TBME (2 ml) dodano (Tabela): ortobenzoesan trietylowy (2 mmol), Amano AK (10 mg) oraz octan rodu (II) (**K1**) (10 mol%). Reakcję mieszało przez 24 godziny w temperaturze 40°C na wytrząsarce wyposażonej w inkubator z regulacją temperatury. Mieszaninę ochłodzono, a następnie przefiltrowano. Frakcje lotne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość oczyszczono chromatograficznie, eluent: EtOAc/heksan. Kontrola *e.e.*: HPLC; kolumna Chiralpak IA; heksan/*i*-PrOH=9/1, czasy retencji: t_R (*S*) = 14.65 min., t_R (*R*) = 16.00 min. ¹H NMR (400

¹⁸⁴ C. Xu, C. Yuan; *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 2169 – 2186.

¹⁸⁵ J. Brem, M. Naghi, M.-I. Tosa, Z. Boros, L. Poppe, F.-D. Irimie, C. Paizs; *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, *22*, 1672 – 1679.

¹⁸⁶ N. A. Salvi, S. Chattopadhyay; *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 4918 – 4922.

¹⁸⁷ T. Kitanosono, P. Xu, S. Kobayashi, *Chem. – Asian J.*, **2014**, *9*, 179 – 188.

MHz, CDCl₃) δ 1.26- 1.30 (t, 3H, $J = 8.0$ Hz), 2.68- 2.78 (m, 2H), 4.18- 4.23 (q, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.23- 5.26 (m, 1H), 7.55- 7.59 (m, 2H), 8.20- 8.24 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.07, 42.85, 61.22, 69.31, 123.74, 126.47, 147.36, 149.63, 171.00.

Procedura Ogólna 16. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego (*rac*-9a).

Do roztworu kwasu *rac*-9a (0.1 mmol) w rozpuszczalniku organicznym (2 mL), dodano ortobenzoesan trietylu (2 eq), enzym (natywny 5mg, immobilizowany 10mg) i kompleks metalu (10 mol%). Reakcję mieszano przez 72 godziny w temperaturze 40 °C (wytrząsarka Heidolph Promax 1020 z inkubatorem Heidolph Inkubator 1000). Po zakończeniu reakcji enzym i katalizator odsączono przemywając octanem etylu. Fazy organiczne połączono i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (eluent: octan etylu/heksan). Otrzymano produkt (*S*)-10a lub (*R*)-10a w postaci żółtego oleju.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.26- 1.30 (t, 3H, $J = 8.0$ Hz), 2.68- 2.78 (m, 2H), 4.18- 4.23 (q, 2H, $J = 8.0$ Hz), 5.23- 5.26 (m, 1H), 7.55- 7.59 (m, 2H), 8.20- 8.24 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 14.07, 42.85, 61.22, 69.31, 123.74, 126.47, 147.36, 149.63, 171.00.

Procedura Ogólna 17. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(4-nitrofenylo)-propanowego (*rac*-9a) w skali preparatywnej.

Do roztworu kwasu *rac*-9a (212 mg, 1 mmol) w TBME (20 mL), dodano ortobenzoesan trietylu (2 mmol), Amano AK (50 mg) i octan rodu (II) (**K1**) (10 mol%). Reakcję mieszano przez 72 godziny w temperaturze 40 °C (wytrząsarka Heidolph Promax 1020 z inkubatorem Heidolph Inkubator 1000). Po zakończeniu reakcji enzym i katalizator odsączono przemywając octanem etylu. Fazy organiczne połączono i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (eluent: octan etylu/heksan). Produkt (*S*)-10a otrzymano z wydajnością 94% (225 mg, *e.e.* 99%) w postaci żółtego oleju.

Widma NMR zgodne z racematem *rac*-10a.

Procedura Ogólna 18. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu *rac*-3-hydroksy-3-(2,4-nitrofenylo)-propanowego (*rac*-9c) i kwasu *rac*-3-hydroksy-3-fenylopropanowego (*rac*-9i) w skali preparatywnej.

Do roztworu kwasu *rac*-9c lub *rac*-9i (200 mg, 0.8 mmol) w toluenie (20 mL), dodano ortobenzoesan trietylu (2 mmol), Novozym 435 (90 mg) i K1 (10 mol%). Reakcję mieszano przez 48 godzin w temperaturze 40 °C (wytrząsarka Heidolph Promax 1020 z inkubatorem Heidolph Inkubator 1000). Po zakończeniu reakcji enzym i katalizator odsączono przemywając octanem etylu. Fazy organiczne połączone i odparowano rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej (eluent: octan etylu/heksan). Produkt (*R*)-10c otrzymano z wydajnością 98% (228 mg, *e.e.* 83%) w postaci żółtego oleju. Produkt (*R*)-10i otrzymano z wydajnością 95% (246 mg, *e.e.* 63%) w postaci bezbarwnego oleju.

Widma NMR zgodne z racematami *rac*-10c i *rac*-10i.



B. Org. 440/22

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.440/22



10000000110133