

**Badania nad opracowaniem
chemoenzymatycznej syntezy
enantjomerycznie czystych kwasów
3-arylo-4-pentenowych**

**The studies on chemoenzymatic method of
synthesis of enantiomerically pure
3-aryl-4-pentenoic acids**

mgr inż. Anna Brodzka

A-21-6
K-C-130
K-f-138

Praca doktorska
wykonana w Instytucie Chemii Organicznej PAN
w latach 2010 – 2014.

Promotor: Prof. dr hab. inż. Ryszard Ostaszewski

Warszawa 2015

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.373/16



<http://rcin.org.pl>



B. Org. 373/16

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

*Dziękuję również koleżankom i kolegom z Zespołu XX, w szczególności
Małgorzacie Zysk oraz Szymonowi Kłossowskiemu za wiele lat wspólnej
pracy i cenne dyskusje.*

*Dziękuję moim najbliższym – Mężowi Pawłowi, Siostrze Sylwii, Rodzicom
i Teściom 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 Berłożeńskiemu za cenne uwagi dotyczące pracy w laboratorium.

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



*Wiktorowi,
mojemu synowi*

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowej, chemoenzymatycznej metody syntezy enancjomerycznie czystych kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Związki tej klasy stanowią cenne bloki budulcowe w syntezie substancji o udokumentowanej aktywności biologicznej, których działanie jest ściśle związane z konfiguracją absolutną centrów stereogenicznych, znajdujących się w ich strukturze. Niezwykle ważne jest zatem poszukiwanie metod syntezy enancjomerycznie czystych kwasów 3-arylo-4-pentenowych i ich pochodnych.

W pracy przedstawiono wyniki badań nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego i dynamicznego rozdziału kinetycznego wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych. W tym celu przeprowadzono badania nad optymalizacją tych procesów pod względem doboru rozpuszczalnika, donora grupy alkoksylowej, enzymu oraz katalizatora racemizacji (w przypadku dynamicznego rozdziału kinetycznego).

Na podstawie wykonanych badań opracowano rozdział kinetyczny, polegający na enzymatycznej estryfikacji racemicznych kwasów karboksylowych, za pomocą nowatorskich donorów grupy alkoksylowej (ortoestry, acetale, ketale i ortowęglany). Optymalizacja warunków reakcji pozwoliła na otrzymanie odpowiednich enancjomerycznie czystych estrów z wydajnością 50%. Związki te poddano hydrolizie uzyskując odpowiednie kwasy 3-arylo-4-pentenowe z zachowaniem czystości optycznej.

W kolejnym etapie opracowano metodę dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-arylo-4-pentenowych, polegającą na połączeniu enzymatycznego rozdziału kinetycznego z racemizacją substratu *in situ*, za pomocą kompleksów metali przejściowych. Na podstawie tych badań opracowano metodę otrzymywania odpowiednich estrów, a po ich hydrolizie - kwasów w postaci enancjomerycznie czystej, z ilościową wydajnością. Opracowana metodologia jest pierwszą tego typu reakcją syntezy enancjomerycznie czystych kwasów karboksylowych.

Wykonano także wstępne badania, mające na celu próbę wyjaśnienia mechanizmu reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów 3-arylo-4-pentenowych z wykorzystaniem wspomnianych donorów grupy alkoksylowej. Otrzymane wyniki wskazują, iż mechanizm ten może wynikać z promiskuityzmu substratowego stosowanych lipaz.

Przeprowadzono również badania nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego racemicznych kwasów cyklicznych oraz kwasów 3-alkilo-4-pentenowych. Uzyskane wyniki otwierają nowe możliwości w enancjoselektywnej syntezie tego rodzaju związków, pozostających wciąż dużym wyzwaniem syntetycznym.

Zaletami opracowanych procedur jest łatwość wykonania, niski koszt ogólny, wysoka wydajność i enancjoselektywność oraz brak szkodliwego wpływu na środowisko, co jest szczególnie ważne w przypadku syntez związków o przeznaczeniu farmaceutycznym.

Abstract

The aim of this study was to develop a new chemoenzymatic method for the synthesis of enantiomerically pure 3-aryl-4-pentenoic acids. These compounds are valuable building blocks in the synthesis of substances with documented biological activity. This activity is closely related to the absolute configuration of stereogenic centers, located in their structure. Therefore, it is extremely important to develop methods of synthesis of enantiomerically pure 3-aryl-4-pentenoic acids and their derivatives.

In this thesis, the studies on enzymatic kinetic resolution and dynamic kinetic resolution of selected 3-aryl-4-pentenoic acids were presented. To achieve this goal, the optimization of these processes in terms of the applied solvent, alkoxy group donor, an enzyme and a catalyst for racemization (for dynamic kinetic resolution) was performed.

Based on obtained results, kinetic resolution of 3-aryl-4-pentenoic acids was developed. This method is based on the enzymatic esterification of racemic carboxylic acids applying novel alkoxy group donors (orthoesters, acetals, ketals and orthocarbonates). Under optimal conditions the corresponding enantiomerically pure esters were obtained with the highest possible yield for kinetic resolution (50%). After hydrolysis, corresponding 3-aryl-4-pentenoic acids were obtained with identical optical purity.

In a next step, dynamic kinetic resolution of 3-aryl-4-pentenoic acids was developed. This methodology combines enzymatic kinetic resolution with *in situ* racemization of the substrate catalyzed by the transition metal complexes. After optimization, the corresponding esters (after hydrolysis - carboxylic acids) in enantiomerically pure form were obtained with quantitative yield. The developed methodology is the first example of the chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure carboxylic acids.

The initial studies have been also performed to explain the plausible mechanism of enzymatic kinetic resolution of 3-aryl-4-pentenoic acids with applied alkoxy group donors. The obtained results indicate that the product formation may be a result of promiscuous activity of applied hydrolases.

Moreover, the studies on development of dynamic kinetic resolution of racemic cyclic acids and 3-alkyl-4-pentenoic acid were performed. The initial results of these

studies turned out to be very promising regarding the synthesis of this challenging class of compounds.

The major advantages of developed procedures are the simplicity, low cost of the process, high efficiency and excellent enantioselectivity. In addition, the process has no negative impact on the environment, which is crucial for the synthesis of the compounds for pharmaceutical application.

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

1. Brodzka, A.; Koszelewski, D.; Ostaszewski, R.; „*The studies on chemoenzymatic synthesis of Femoxetine*” J. Mol. Catal. B: Enzymatic **2012**, 82, 96-101.
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.

Zgłoszenia patentowe zawierające wyniki ujęte w pracy doktorskiej:

1. Ostaszewski, R.; Cwiklak, 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.; Cwiklak, 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.; Cwiklak, 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.; Cwiklak, 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 skład rozprawy doktorskiej:

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. Kłossowski, 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.

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

Zgłoszenia patentowe zawierające wyniki nie ujęte w pracy doktorskiej:

1. Ostaszewski, R.; Żądło, A.; Zysk, M.; Brodzka, A.; Kłossowski, 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.

Wykaz skrótów stosowanych w niniejszej pracy:

Ac – grupa acylowa – CH ₃ C(O)-	EKR – enzymatyczny rozdział kinetyczny
AOL – lipaza z <i>Aspergillus oryzae</i>	Et – grupa etylowa – C ₂ H ₅
Ar – grupa aromatyczna	FDA – Agencja Żywności i Leków
ASL – lipaza z <i>Aspergillus sp.</i>	GAM – kwas 3-(4-chlorofenylo) glutaramowy
BINAP – (2,2')-bis(difenylofosfino)-1,1'-binaftyl	GLAP – proszek acetonowy z wątroby gęsiej
BKAP – proszek acetonowy z nerki wołowej	HPL – lipaza z trzustki wołowej
BLAP – proszek acetonowy z wątroby wołowej	HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
c – konwersja substratu	JLAP – proszek acetonowy z wątroby jeleniej
CAL-B – lipaza B z <i>Candida antarctica</i>	KR – rozdział kinetyczny
CCL – lipaza z <i>Candida cylindracea</i>	LAP – proszek acetonowy z wątroby
CLAP – proszek acetonowy z wątroby kurzej	LDA – diizopropylamidek litu
CLL – lipaza z <i>Candida lipolytica</i>	Me – grupa metylowa – CH ₃
CRL – lipaza z <i>Candida rugosa</i>	MJL – lipaza z <i>Mucor javanicus</i>
CVL – lipaza z <i>Chromobacterium viscosum</i>	MML – lipaza z <i>Mucor miehei</i>
EKR – enzymatyczny rozdział kinetyczny	NBS – N-bromosukcynoimid
EPC – związki enancjomerycznie czyste	Novozym 435 – immobilizowana lipaza B z <i>Candida antarctica</i>
DCM – dichlorometan	OMe – grupa metoksylova - CH ₃ O-
DIBAL-H – wodorek diizobutyloglinu	Pic – α-pikolina – 2-metylopirydyna
DKR – dynamiczny rozdział kinetyczny	Ph – grupa fenylova – C ₆ H ₅ -
DLAP – proszek acetonowy z wątroby kaczej	PCL – lipaza z <i>Pseudomonas cepacia</i>
DMF – dimetyloformamid	PFL – lipaza z <i>Pseudomonas fluorescens</i>
DMSO – dimetylosulfotlenek	PLAP - proszek acetonowy z wątroby świńskiej
E – enancjoselektywność	PLE – esteraza z wątroby świńskiej
e.e. – nadmiar enancjomeryczny	PPL – lipaza z <i>Porcine pancreas</i>

PRL – lipaza z *Penicillium roqueforti*
PSL – lipaza z *Pseudomonas sp.*
RAL – lipaza z *Rhizopus arrhizus*
RLAP – proszek acetonowy z wątroby króliczej
RML – lipaza z *Rhizomucor miehei*
RNL – lipaza z *Rhizopus niveus*
***t*-Bu** – grupa *tert*-butylowa – (CH₃)₃C-
TBME – eter *tert*-butylo-metylowy
THF – tetrahydrofuran
TLAP – proszek acetonowy z wątroby indyczej
TLC – chromatografia cienkowarstwowa

TMS – grupa trimetylosililowa – (CH₃)₃Si-
TPA – trzypunktowy model oddziaływania Eassona-Stedmana
WGL – lipaza z kielków pszenicy
WLAP – proszek acetonowy z wątroby dziczej
Wyd. – wydajność reakcji

Spis treści

1. Wstęp.....	1
2. Chiralność.....	3
3. Enzymy jako naturalne katalizatory reakcji organicznych.....	6
3.1. Zalety i wady stosowania enzymów.....	7
3.2. Kataliza enzymatyczna.....	9
4. Synteza związków enancjomerycznie czystych.....	10
4.1. Rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej.....	19
4.1.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny.....	19
4.1.1.1. Mechanizm reakcji enzymatycznej estryfikacji.....	22
4.1.1.2. Promiskuityzm hydrolaz.....	24
4.1.1.3. Hydroliza enzymatyczna jako metoda EKR estrów.....	27
4.1.1.4. Enzymatyczna transestryfikacja jako metoda EKR alkoholi.....	28
4.1.1.5. Klasyczna enzymatyczna estryfikacja racemicznych kwasów karboksylowych.....	31
4.1.1.6. Zastosowanie ortoestrów w enzymatycznym rozdziale kinetycznym kwasów karboksylowych.....	32
4.2. Dynamiczny rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej.....	34
4.2.1. Chemoenzymatyczny DKR - tandem metal – enzym.....	37
4.2.1.1. Mechanizmy działania katalizatorów metalicznych.....	41
4.3. Podsumowanie rozdziału.....	49
5. Kwasy 3-arylo-4-pentenowe jako prekursorzy związków biologicznie aktywnych.....	51
6. Badania własne.....	58
6.1. Koncepcja i cel badań.....	58
6.2. Znaczenie kwasów 3-arylo-4-pentenowych.....	60
6.3. Badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	62
6.3.1. Zastosowanie ortoestrów trialkilowych jako nowych donorów grupy alkoksylowej.....	63
6.3.1.1. Badania nad wpływem rozpuszczalnika na reakcję EKR kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	64
6.3.1.2. Badania nad doбором biokatalizatora do reakcji ERK kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	66
6.3.1.3. Badania nad wpływem donora grupy alkoksylowej na reakcję EKR kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	69
6.3.2. Zastosowanie acetalu, ketali i ortowęglanów jako nowych donorów grupy alkoksylowej.....	72
6.4. Badania nad mechanizmem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	76
6.5. Badania nad opracowaniem enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego.....	84
6.5.1. Badania nad doбором rozpuszczalnika.....	85

6.5.2. Badania nad doborem donora grupy alkoksylowej i katalizatora racemizacji	88
6.6. Badania nad opracowaniem rozdziału kinetycznego i dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-(<i>m</i> -metoksyfenylo)-4-pentenowego	97
6.7. Zastosowanie opracowanej metodologii do EKR i EDKR wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych	101
6.8. Zastosowanie opracowanej metodologii do dynamicznego rozdziału kinetycznego innych kwasów karboksylowych	103
7. Wnioski	109
8. Część eksperymentalna	112
8.1. Uwagi ogólne	112
8.2. Badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego	113
8.3. Badania nad mechanizmem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego	118
8.4. Badania nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego	120
8.5. Badania nad opracowaniem rozdziału kinetycznego i dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-(<i>m</i> -metoksyfenylo)-4-pentenowego	121
8.6. Zastosowanie opracowanej metodologii do EKR i EDKR wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych	125
8.7. Zastosowanie opracowanej metodologii do dynamicznego rozdziału kinetycznego innych kwasów karboksylowych	134

1. Wstęp

Rozwój metod prowadzących do otrzymywania enancjomerycznie czystych związków organicznych jest obecnie największym wyzwaniem zarówno z punktu widzenia nauki, jak i przemysłu farmaceutycznego, a nawet spożywczego.

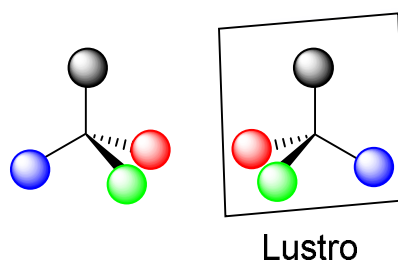
Ważną klasą związków są chiralne, nieracemiczne kwasy karboksylowe oraz ich pochodne. Stanowią one prekursorzy do syntezy leków, kosmetyków oraz związków modelowych do badań biochemicznych. Niestety, wydajne metody otrzymywania enancjomerycznie czystych kwasów karboksylowych wciąż są wyzwaniem dla chemii organicznej. Większość substancji biologicznie czynnych posiada bowiem jedno lub więcej centrów stereogenicznych, a ich aktywność w organizmach żywych jest ściśle związana z ich budową przestrzenną.

Klasyczne metody syntezy związków tej klasy nie zapewniają odpowiedniej czystości enancjomerycznej oraz wydajności. Atrakcyjną metodą otrzymywania omawianych substancji jest biokataliza, ponieważ spełnia wymagania tzw. zielonej chemii, co jest niezbędne przy syntezie związków stosowanych w farmacji czy też chemii. Najczęściej enancjomerycznie czyste kwasy karboksylowe i ich pochodne otrzymywane są na drodze hydrolizy enzymatycznej. Często jednak reakcje te są mało wydajne, a uzyskiwane produkty charakteryzują się niską czystością optyczną. Problem stanowi także środowisko reakcji, którym jest woda. Woda nie jest dobrym rozpuszczalnikiem dla większości związków organicznych, co wymusza stosowanie wysokich rozcieńczeń substratów. Rozwiązaniem może być zmiana środowiska reakcji na rozpuszczalnik organiczny lub mieszaninę wody z takim rozpuszczalnikiem. Inną metodą stosowaną podczas rozdziału kinetycznego racemicznych kwasów karboksylowych jest wykorzystanie reakcji estryfikacji katalizowanej przez enzymy. Jednakże metodologia ta posiada szereg ograniczeń, ponieważ tworząca się podczas reakcji woda hamuje jej przebieg. Kolejnym rozwinięciem tej metody jest wykorzystanie reakcji transestryfikacji. Dodatkowy atut reakcji rozdziału kinetycznego prowadzonego w rozpuszczalnikach organicznych stanowi fakt, iż można ją połączyć z racemizacją substratu *in situ* za pomocą katalizatorów metalicznych, w dużo bardziej wydajny dynamiczny rozdział kinetyczny. Jednakże reakcje chemoenzymatycznego rozdziału dynamicznego chiralnych kwasów karboksylowych nie są znane w literaturze.

W tym kontekście istotnym zagadnieniem wydawało się podjęcie badań nad opracowaniem nowej, chemoenzymatycznej metody syntezy enancjomerycznie czystych kwasów karboksylowych. Narzędziami wybranymi do realizacji założonego celu były reakcje enzymatycznego rozdziału kinetycznego i enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego, polegające na enancjoselektywnej estryfikacji za pomocą nowych donorów grupy alkoksylowej. Produktami tych przemian są estry kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Związki te mogą zostać przekształcone za pomocą prostej transformacji w odpowiednie kwasy karboksylowe z zachowaniem czystości optycznej.

2. Chiralność

Chiralność jest cechą cząsteczek chemicznych wyrażającą się tym, iż są one nienakładalne na swoje odbicia lustrzane (Rysunek 1). Najczęstszą, chociaż nie jedyną przyczyną chiralności cząsteczek organicznych jest obecność w nich atomu węgla związanego z czterema różnymi podstawnikami (centrum stereogeniczne). Cząsteczki chiralne występują w formie dwóch izomerów optycznych – enancjomerów.



Rysunek 1. Enancjomery tego samego związku chemicznego

Do odkrycia istnienia enancjomerów przyczyniły się prace Jeana Baptiste'a Biota (1815 r. – odkrycie czynności optycznej związków organicznych)¹ i Ludwika Pasteura (1848 r. – hipoteza istnienia enancjomerów; rozdzielenie dwóch izomerów optycznych kwasu winowego)². Natomiast teoria chiralności została proklamowana w 1874 r., niezależnie przez Jacobusa van't Hoffa³ i Josepha Le Bela.⁴

W środowisku achiralnym enancjomery posiadają identyczne właściwości fizyczne (gęstość, temperatury wrzenia i topnienia), chemiczne i spektroskopowe (NMR, IR, UV). Odwrotnie sytuacja wygląda natomiast w środowisku chiralnym. Enancjomery reagują z różnymi stałymi szybkości z chiralnymi reagentami oraz skręcają płaszczyznę światła liniowo-spolaryzowanego w przeciwnych kierunkach. Zazwyczaj enancjomery różnią się także odpowiedzią fizjologiczną, gdyż większość receptorów biologicznych jest chiralna. Everhardus Ariëns podzielił enancjomery na eutomery - izomery o pożądanej aktywności fizjologicznej – i distomery, które w najlepszym przypadku są „izomerycznym balastem”, a w najgorszym – wykazują działanie toksyczne⁵.

¹ Barron, L. D., *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, Cambridge University Press, Cambridge 2004

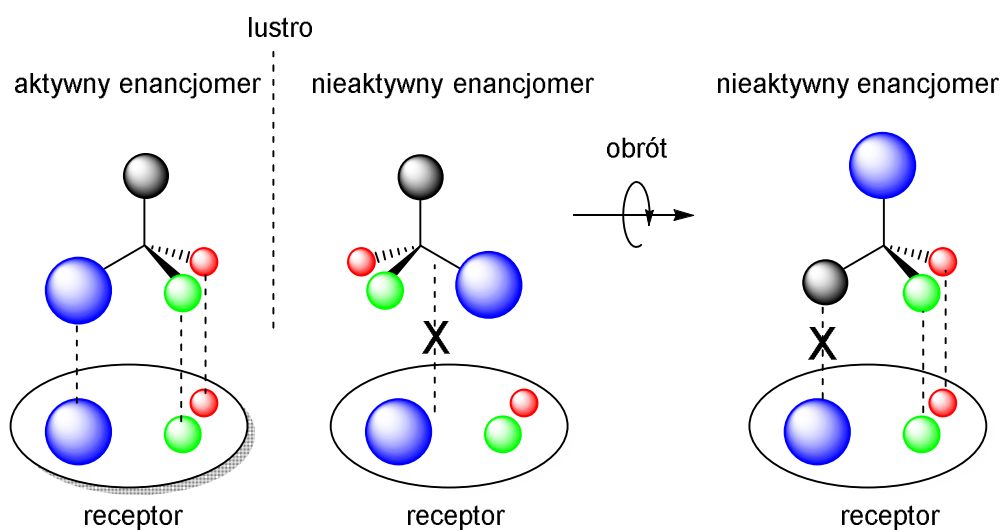
² Gal, J., *Chirality* 2011, 23, 1-16.

³ Van't Hoff, J. H., *Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat.* 1874, 9, 445-454.

⁴ Le Bel, J., A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1874, 22, 337-347.

⁵ Ariëns, E. J., *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1984, 26, 663-668.

Wyjaśnieniem stereoselektywności procesu biologicznego rozpoznania molekularnego jest trzypunktowy model oddziaływania (TPA) zaproponowany w 1933 r. przez Eassona i Stedmana.⁶ Zgodnie z teorią TPA jeden enancjomer chiralnego substratu wiąże się z receptorem w trzech miejscach, natomiast drugi enancjomer nie może już zostać związany z tymi trzema miejscami (Rysunek 2). Oczywiście, wiązanie receptor – substrat wymaga również istotnych zmian konformacyjnych zarówno substratu, jak i receptora, jednakże sama idea TPA jest powszechnie stosowana do wyjaśniania stereoselektywności receptorów⁷.



Rysunek 2. Trzypunktowy model Eassona-Stedmana

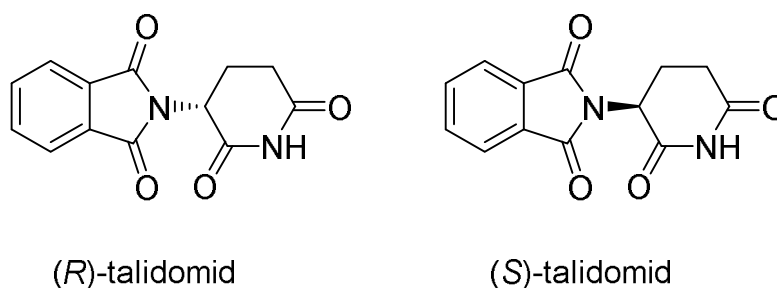
Znaczna większość związków biologicznie czynnych to substancje chiralne, których działanie związane jest ściśle z konfiguracją absolutną centrum stereogenicznego (model TPA). Synteza związków racemicznych, których jeden enancjomer jest mniej aktywny lub nieaktywny jest nieopłacalna. Podawanie farmaceutyku w postaci racematu jest zazwyczaj niepożądane, gdyż wymaga to zastosowania większej dawki substancji aktywnej, aby osiągnąć spodziewany efekt. Ponadto, obecność drugiego enancjomeru może powodować wystąpienie efektów ubocznych, dlatego też stosowanie leków w postaci mieszaniny racemicznej coraz trudniej uzasadnić.

Przykładem związku, którego enancjomery wywołują różną odpowiedź biologiczną jest talidomid (Rysunek 3). Substancja ta w postaci racematu była szeroko stosowana w latach pięćdziesiątych ubiegłego stulecia jako lek przeciwwymiotny i przeciwbólowy

⁶ Easson, E. H.; Stedman, E.; *Biochem. J.* **1933**, *27*, 1256-1266.

⁷ Sundaresan, V.; Abrol, A.; *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1330-1339.

dla kobiet, których ciąża przebiegała z powikłaniami. Jednakże, na początku lat sześćdziesiątych XX wieku, talidomid został wycofany ze względu na silne działanie teratogenne⁸. W trakcie badań nad tym farmaceutykiem okazało się bowiem, iż działanie lecznicze wykazuje tylko (*R*)-talidomid, natomiast enancjomer (*S*) wykazuje działanie hamujące angiogenezę (tworzenie nowych naczyń krwionośnych)⁹.



Rysunek 3. Enancjomery talimidu

W 1992 r. amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) i europejski Komitet ds. Leków Gotowych zastrzegły, iż działanie fizjologiczne każdego enancjomeru produktu farmaceutycznego musi zostać indywidualnie scharakteryzowane.¹⁰ Wnioskodawcy muszą zidentyfikować występowanie chiralności w nowych lekach, podjąć próby rozdzielania stereoizomerów, ocenić wpływ enancjomerów na pożądaną aktywność, a następnie dokonać racjonalnego wyboru odpowiedniej postaci stereoizomerycznej do wprowadzenia na rynek.¹¹ W związku z coraz większymi wymaganiami dotyczącymi czystości optycznej związków biologicznie aktywnych, rośnie zapotrzebowanie na poszukiwanie nowych metod syntezy substancji enancjomerycznie czystych.

⁸ Uhl, K.; Cox, E.; Rogan, R.; Zeldis, J. B.; Hixon, D.; Furlong, L.-A.; Singer, S.; Holliman, T.; Beyer, J.; Woolever, W.; *Drug Safety* **2006**, *29*, 321-329.

⁹ (a) Stephens, T. D.; Bunde, C. J. W.; Fillmore, B. J.; *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *59*, 1489-1499; (b) Franks, M. E.; Macpherson, G. R.; Figg, W. D.; *The Lancet* **2002**, *363*, 1802-1811.

¹⁰ Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Keßeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.

¹¹ Agranat, I.; Caner, H.; Caldwell, J.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 753-768.

3. Enzymy jako naturalne katalizatory reakcji organicznych

Obecnie coraz większą wagę przywiązuje się do rozwiązań technologicznych przyjaznych dla środowiska, w ramach tzw. „zielonej chemii”. Poszukiwanie nowych ekologicznych, bardziej zrównoważonych metod syntezy związków chemicznych jest niezbędne dla nowoczesnej nauki i technologii. Jednocześnie, pożądany jest również rozwój nowych technik syntezy związków optycznie czystych. Oba te wymagania spełniają procesy enzymatyczne.

Enzymy są makrocząsteczkami o strukturze białkowej (wyjątkiem są rybozymy), których działanie polega na przyspieszaniu reakcji chemicznych. Występują one w każdym organizmie żywym, gdzie katalizują reakcje chemiczne, niezbędne do prawidłowego funkcjonowania komórek. Wiele enzymów to białka złożone z części białkowej – apoenzymu i części niebiałkowej – kofaktora. Kofaktorami mogą być cząsteczki nieorganiczne, jony metali lub małowcząsteczkowe związki organiczne. W zależności od chemicznego rodzaju części niebiałkowej oraz mocy wiązania z apoenzymem można wyróżnić dwa typy kofaktorów – koenzymy i grupy prostetyczne. Koenzymami są małe cząsteczki organiczne, które w sposób specyficzny łączą się z apoenzymem, często są wiązane tylko na czas reakcji i uwalniane wraz z jej produktami. Natomiast grupy prostetyczne są silnie (często kowalencyjnie) związane z apoenzymem – to najczęściej jony metali lub małe cząsteczki nieorganiczne bądź organiczne.

Reakcja katalizowana zachodzi w miejscu aktywnym enzymu, czyli w obszarze wiązania substratu i ewentualnych kofaktorów. W enzymach białkowych miejsce aktywne składa się z reszt aminokwasowych, które biorą bezpośredni udział w zachodzącej reakcji. Miejsce aktywne enzymu jest często opisywane jako „szczelina” w strukturze enzymu, w którą wpasowują się substraty biorące udział w reakcji. Pełni ono dwojaką funkcję: selekcionuje cząsteczki, które mogą brać udział w reakcji, a ponadto umożliwia właściwe ułożenie reagentów względem siebie.

Zastosowanie enzymów w syntezie organicznej znane jest od ponad stu lat, a ogromny potencjał tych makrocząsteczek jako katalizatorów jest coraz lepiej poznawany. Wciąż jednak odkrywane są nowe procesy enzymatyczne, które w znacznym stopniu przyczyniają się do rozwoju metod syntezy asymetrycznej. Enzymy są coraz częściej wykorzystywane w syntezie enancjoselektywnej, katalizują one całe spektrum

reakcji. W zależności od typu katalizowanego procesu, biokatalizatory podzielono na sześć klas: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy i ligazy.

3.1. Zalety i wady stosowania enzymów

Kataliza enzymatyczna posiada szereg zalet, które czynią enzymy atrakcyjnymi katalizatorami wielu reakcji organicznych. Biokatalizatory są bardzo wydajne, a procesy przez nie katalizowane przebiegają dużo szybciej, niż reakcje bez udziału enzymu, czy katalizowane chemicznie. W związku z tym, ilość enzymu potrzebnego do przeprowadzenia reakcji w porównaniu do katalizatora chemicznego jest dużo mniejsza (w przypadku katalizatorów chemicznych jest to 0.1-1%_{mol}, dla enzymów – 10^{-3} - 10^{-4} %_{mol}).

Ponadto, reakcje katalizowane enzymatycznie przebiegają w łagodnych warunkach. Zakres działania biokatalizatorów to zazwyczaj pH 5 – 8 i temperatura 20 – 40°C. Łagodne środowisko reakcji minimalizuje ryzyko wystąpienia reakcji ubocznych takich jak rozkład, izomeryzacja, czy racemizacja.

Biokataliza może być zastosowana do szerokiego spektrum reakcji (hydroliza, utlenianie, redukcja, addycja, eliminacja, halogenowanie, karboksylacja, izomeryzacja itp.). Enzymy wykazują wysoką tolerancję substratową dla wielu nienaturalnych substratów i często nie wymagają środowiska wodnego do działania.

Niewątpliwie, zaletą biokatalizatorów jest ich chemo-, regio-, dia- i enancjoselektywność. Chemo-selektywność enzymów polega na oddziaływaniu tylko na jeden rodzaj grup funkcyjnych, podczas gdy inne grupy pozostają niezmienione. Skutkuje to ograniczeniem powstawania produktów ubocznych. Natomiast regio- i diastereoselektywność enzymów jest związana z ich trójwymiarową strukturą. Biokatalizatory posiadają bowiem właściwość odróżniania identycznych chemicznie grup funkcyjnych, które ułożone są w różnych miejscach w tej samej cząsteczce substratu. Enzymy są katalizatorami homochiralnymi, które w różny sposób oddziałują z enancjomerami substratu. Selektowność biokatalizatorów wynika z określonej budowy przestrzennej centrum aktywnego oraz struktury samego enzymu. W reakcji pomiędzy enzymem a racemicznym substratem (S_S , S_R) każdy z enancjomerów tego związku w różny sposób dopasowuje się do centrum aktywnego enzymu. W wyniku tego tworzą się diastereoizomeryczne produkty pośrednie o różnej energii aktywacji, co sprawia, że

jeden enancjomer ulega transformacji szybciej niż drugi. Skutkiem tego jest m. in. rozdział kinetyczny.

Mimo, iż enzymy są katalizatorami wielu różnych reakcji, zastosowanie ich w syntezie organicznej napotyka szereg ograniczeń. Jednym z nich jest medium reakcyjne. Naturalnym środowiskiem biokatalizatorów jest woda, która z kolei nie jest dobrym rozpuszczalnikiem dla wielu reakcji organicznych. Jednakże, w większości przypadków, barierę tę można pokonać, gdyż enzymy potrafią pracować również w warunkach niewodnych, takich jak ciecze jonowe, rozpuszczalniki mieszane, czy rozpuszczalniki organiczne¹². Mimo, iż aktywność biokatalizatorów jest zazwyczaj niższa w środowisku niewodnym, zastosowanie takich warunków często umożliwia przeprowadzenie reakcji, które nie zachodzą w wodzie.

Kolejnym problemem przy wyborze enzymów jako katalizatorów reakcji jest ich wrażliwość na warunki reakcji, takie jak temperatura, pH, czy niektóre reagenty organiczne. Większość biokatalizatorów jest stabilna tylko w określonym zakresie temperatury czy pH, wykroczenie poza te granice powoduje deaktywację katalizatora, najczęściej poprzez denaturację białka.

W przypadku enzymatycznej syntezy enancjoselektywnej ograniczeniem może być również powstawanie tylko określonego enancjomeru produktu. Aby otrzymać związek o przeciwnej konfiguracji, należałoby teoretycznie znaleźć enzym o przeciwnej stereoselektywności. Tylko w niektórych przypadkach możliwe jest znalezienie enancjokomplementarnych enzymów¹³.

Reakcje katalizowane enzymami, które są związane z kofaktorami także stanowią poważne wyzwanie. Większość z tych czynników jest nietrwała i zbyt droga, by stosować je w ilościach stechiometrycznych. Niestety, nie mogą one zostać zastąpione tańszymi odpowiednikami. Mimo wielu prac nad tym zagadnieniem, recyrkulacja kofaktorów nadal stanowi istotne ograniczenie syntezy enzymatycznej.

Wiele procesów enzymatycznych jest także podatnych na inhibicję substratami lub produktami reakcji, która powoduje spadek szybkości reakcji przy wyższych stężeniach substratu lub produktu, co ogranicza wydajność tych przemian. Podczas, gdy inhibicji substratowej można zapobiec stosunkowo łatwo poprzez utrzymanie stężenia

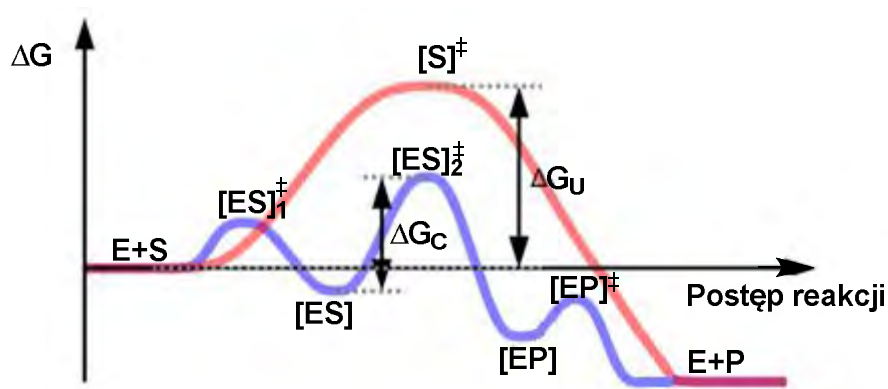
¹² Klibanov, A. M.; *Nature* **2001**, *409*, 241-246.

¹³ Mugford, P. F.; Wagner, U. G.; Jiang, Y.; Faber, K.; Kazlauskas, R. J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8782-8793.

substratu na niskim poziomie (ciągle dozowanie), inhibicja produktem stanowi duzo bardziej skomplikowany problem.

3.2. Kataliza enzymatyczna

Działanie enzymów (E, Wykres 1) polega na zmianie mechanizmu reakcji chemicznej. Biokatalizatory przyspieszają reakcje poprzez obniżenie bariery energetycznej pomiędzy substratem (S) a produktem (P) – energii aktywacji (ΔG). Wykres 1 przedstawia zmiany energii swobodnej dla reakcji katalizowanej (niebieski) i niekatalizowanej (czerwony) przez enzym.



gdzie: E – enzym, S – substrat, P – produkt, [ES] – kompleks enzym-substrat, [EP] – kompleks enzym-produkt; $[ES]^\ddagger$, $[EP]^\ddagger$ – stany przejściowe reakcji enzymatycznej, $[S]^\ddagger$ – stan przejściowy reakcji nieenzymatycznej

Wykres 1. Zmiana energii swobodnej dla reakcji katalizowanej i niekatalizowanej enzymatycznie

W pierwszym etapie reakcji enzymatycznej poprzez stan przejściowy $[ES]_1^\ddagger$ tworzony jest kompleks enzym-substrat [ES], który następnie jest przekształcany w stan przejściowy $[ES]_2^\ddagger$, a ten z kolei ulega przemianie w kompleks enzym-produkt [EP]. Kompleks [EP] poprzez stan przejściowy $[EP]^\ddagger$ rozpada się do produktu [P] i enzymu [E]¹⁴. Połączenie substratu z enzymem stwarza nową drogę reakcji, w której energia stanu przejściowego (ΔG_C) jest niższa niż w przypadku reakcji niekatalizowanej (ΔG_U).

¹⁴ Kirby, A. J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 707-724.

4. Synteza związków enancjomerycznie czystych

W 1980 r. Prof. Seebach wprowadził pojęcie „synteza – EPC” (synteza związków enancjomerycznie czystych)¹⁵, określające wszystkie metody otrzymywania związków enancjomerycznie czystych. Wydajna i nieskomplikowana synteza substancji optycznie czystych stanowi wyzwanie nowoczesnej chemii organicznej. Poszukiwanie nowych metod otrzymywania substancji nieracemicznych jest pożądane nie tylko z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego, ale również spożywczego i perfumeryjnego. Istnieje wiele technik wytwarzania związków optycznie czystych, można jednak wyodrębnić trzy główne podejścia do syntezy EPC¹⁶ (Schemat 1):

- tzw. „*chiral pool*” – użycie związków enancjomerycznie czystych pochodzenia naturalnego jako substratów;

- synteza asymetryczna – wykorzystująca jako źródła chiralności optycznie czyste reagenty (katalizatory lub pomocniki chiralne), które nie są zawarte w produkcie końcowym;

- rozdział racematu – metodami fizycznymi lub chemicznymi.

Pierwsza z ww. metod, „*chiral pool*” (Schemat 1, zielona część), polega na wykorzystaniu naturalnie dostępnych cząsteczek chiralnych o wysokiej czystości optycznej takich jak: węglowodany, α -aminokwasy, terpeny, hydroksykwasy i alkaloidy. Związki te stanowią doskonały blok budulcowy dla bardziej złożonych cząsteczek¹⁷.

Przykładem tego typu syntezy jest otrzymywanie aztreonamu, antybiotyku znanego pod nazwą handlową Azactam. Lek ten należy do grupy monocyklicznych β -laktamaz (monobaktamy) i wykazuje skuteczność przeciw bakteriom Gram-ujemnym¹⁸. Aztreonam jest stosowany głównie w leczeniu przewlekłego zapalenia płuc u osób chorych na mukowiscydozę. Substratem do syntezy tego antybiotyku może być łatwo dostępny aminokwas *L*-treonina (**4.1**), który, w kilku prostych przejściach, może być przekształcony do kluczowego produktu pośredniego aztreonamu (**4.7**), kwasu (*2S-trans*)-3-amino-2-metylo-4-okso-1-acetyldynosulfonowego (**4.6**) (Schemat 2)¹⁹.

¹⁵ Seebach, D.; Hungerbühler, E.; *Synthesis of Enantiomerically Pure Compounds (EPC-Synthesis)* w *Modern Synthetic Methods*, Scheffold, R.; Salle + Sauerländer, Frankfurt **1980**, 94.

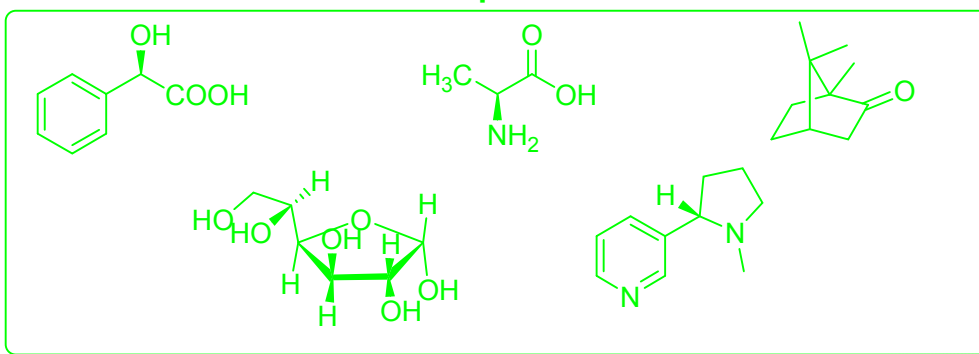
¹⁶ Keith, J. M.; Larrow, J. F.; Jacobsen, E. N.; *Adv. Synth. Catal.* **2001**, 343, 5-26.

¹⁷ Hawkins, J. M.; Watson, T. J. N.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3224-3228.

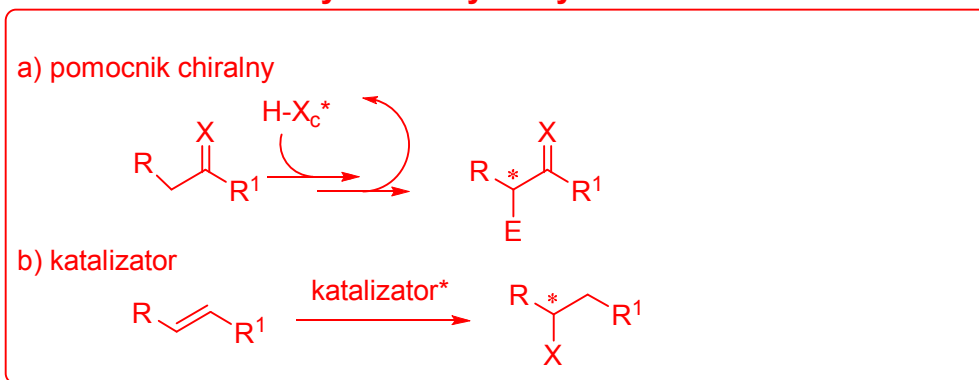
¹⁸ Neu, H.C.; *Am. J. Med.* **1990**, 88 (suppl 3C), 2S-6S.

¹⁹ Epstein, W. W.; Gaudioso, L. A.; *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 176-178.

Chiral pool



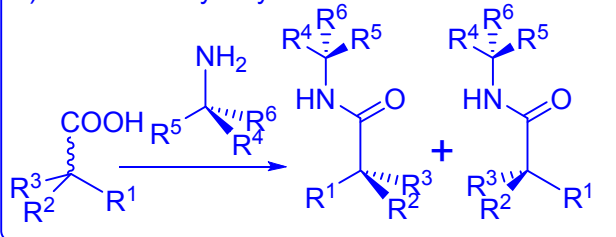
Synteza asymetryczna



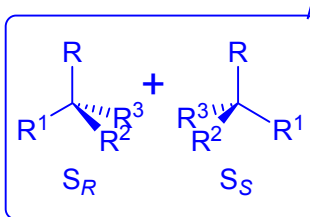
a) krystalizacja



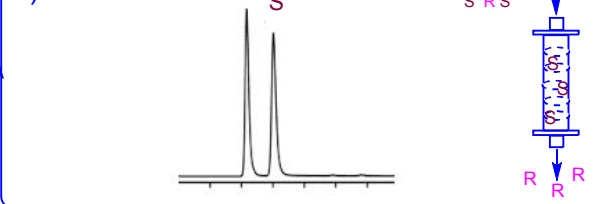
b) rozdział klasyczny



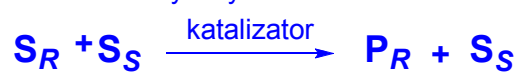
Rozdział racematu



c) chiralna HPLC

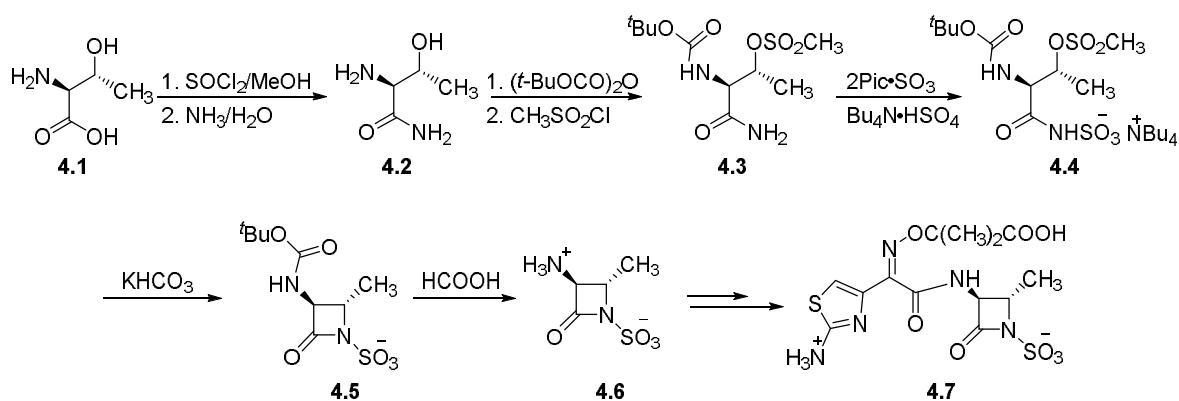


d) rozdział kinetyczny



Schemat 1. Metody syntezy związków enancjomerycznie czystych

W pierwszym etapie syntezy *L*-treoninę (**4.1**) estryfikowano metanolem, a otrzymany ester metylowy – poddano amonolizie, uzyskując amid **4.2**. Następnie grupę aminową związku **4.2** zabezpieczono grupą *tert*-butyloksykarbonylową (Boc), a grupę hydroksylową mesyłowano, otrzymując produkt **4.3**. W kolejnym etapie związek **4.3** poddano reakcji z kompleksem 2-pikoliny i trójtlenku siarki ($2\text{Pic}\cdot\text{SO}_3$) a powstały w ten sposób acylosulfamat **4.4** przekształcono w azetydynon **4.5**. W kolejnym etapie odbezpieczono grupę aminową za pomocą kwasu mrówkowego, otrzymując optycznie czysty produkt **4.6**, który można poddać reakcji sprzęgania otrzymując aztreonam (**4.7**). Podany przykład ilustruje jak z niedrogiego i łatwo dostępnego naturalnego związku chiralnego można uzyskać enancjomerycznie czysty produkt o dużej wartości dodanej.



Schemat 2. Synteza „chiral pool” aztreonamu

Optycznie czyste związki pochodzenia naturalnego mogą być wbudowane w strukturę cząsteczki, zapewniając lub indukując pożądane centrum chiralności podczas syntezy (indukcja chiralna lub diastereoselektywna synteza). Jednakże, strategia „*chiral pool*” jest bardzo przydatna, tylko wtedy, gdy oczekiwany końcowy produkt oraz chiralny substrat mają podobną strukturę.

Kolejnym sposobem otrzymywania EPC jest synteza asymetryczna (Schemat 1, czerwona część), opierająca się na przekształceniu prochiralnych substratów w enancjomerycznie czyste produkty. Metoda ta wykorzystuje reakcje chemiczne, które wprowadzają jeden lub więcej elementów chiralności do cząsteczki substratu w celu otrzymania stereoizomerycznych produktów w niejednakowych ilościach. Asymetryczną indukcję uzyskuje się za pomocą chiralnego pomocnika lub katalizatora.

Zastosowanie pomocników w asymetrycznej syntezie polega na czasowym wprowadzeniu części chiralnej do prochiralnego substratu, generując selektywnie nowe

chiralne elementy. Procedura ta wymaga: wprowadzenia pomocnika, wysokiej diastereoselektywności procesu tworzenia nowych centrów chiralności, rozdzielenia powstałych diastereoizomerów oraz regeneracji pomocnika chiralnego (Schemat 1). Substancje stosowane jako pomocniki muszą być używane w ilości stechiometrycznej, być łatwe do otrzymania i niedrogie. Znane jest szerokie spektrum pomocników chiralnych takich jak: oksazolidynony²⁰ i sultamy²¹, które umożliwiają selektywne przeprowadzenie wielu reakcji. Znaczącą grupą chiralnych pomocników są hydroksyaminy, wykorzystywane w syntezie alkaloidów i bioaktywnych związków zawierających w swej strukturze atom azotu.²²

Jednym z najczęstszych zastosowań chiralnych pomocników jest stereoselektywna reakcja aldolowa. Przykładem tego typu procesu może być synteza soli wapniowej atorwastatyny (nazwa handlowa Lipitor®), leku stosowanego w terapii hipercholesterolemii. Substancja ta wpływa na obniżenie poziomu cholesterolu całkowitego, lipoprotein o niskiej gęstości (tzw. „zły” cholesterol LDL) i triglicerydów oraz powoduje wzrost stężenia lipoprotein o dużej gęstości (tzw. „dobry” cholesterol HDL).²³ Pierwsza enancjoselektywna synteza atorwastatyny (**4.12**) polegała na diastereoselektywnej reakcji aldehydu **4.8** z chiralnym estrem **4.9**, odpowiedzialnym za wprowadzenie jednego z centrów stereogenicznych (Schemat 3).²⁴ W wyniku tej przemiany powstał aldol **4.10** z 97% nadmiarem enancjomerycznym (*e.e.*). Kolejnym etapem była transestryfikacja związku **4.10** (NaOCH₃, MeOH) i następcza kondensacja Claisena z nadmiarem *tert*-butoksyetenolanu litu, w wyniku czego uzyskano δ -hydroksy- β -ketoester, który poddano redukcji trietyloboranem (Et₃B) i borowodorkiem sodu (NaBH₄), hydrolizie zasadowej, a w końcu laktonizacji. Uzyskano lakton **4.11** z 99% nadmiarem enancjomerycznym (*e.e.*).

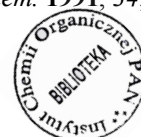
²⁰ Evans, D. A.; Ennis, M. D.; Mathre, D., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1737-1739.

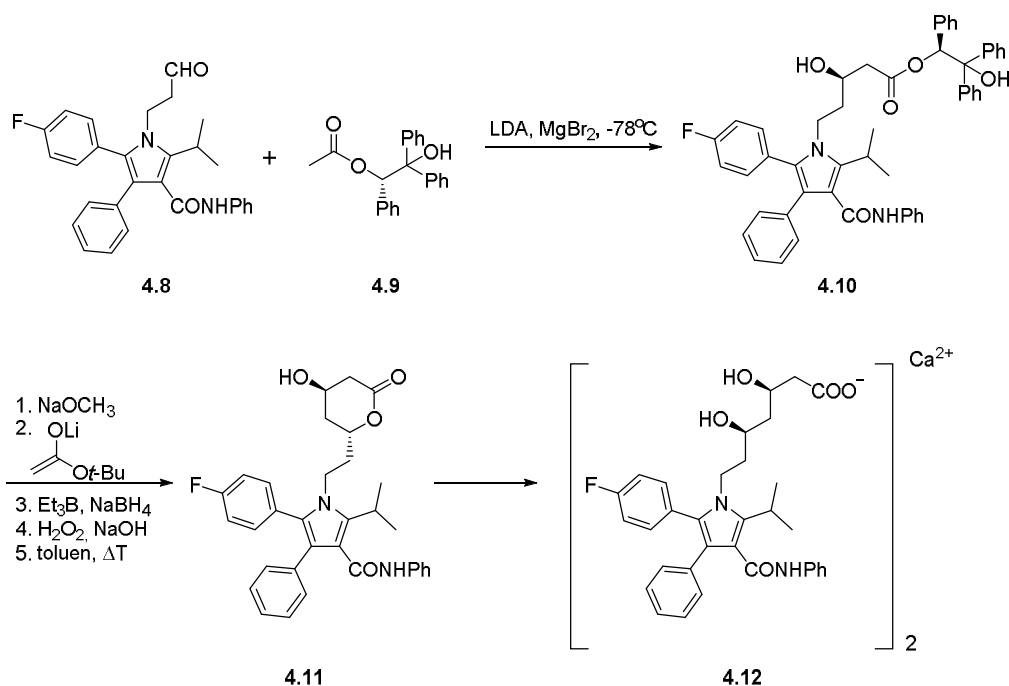
²¹ Oppolzer, W.; Moretti, R.; Thomi, S.; *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5603-5606.

²² (a) Romo, D.; Mayers, A. I.; *Tetrahedron* **1991**, *47*, 9503-9569; (b) Groaning, M. D.; Meyers, A. I.; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9843-9873; (c) Escolano, C.; Amat, M.; Bosh, J.; *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 8198-8207.

²³ Malhotra, H. S.; Goa, K. L.; *Drugs* **2001**, *61*, 1835-1881.

²⁴ Roth, B. D.; Blankley, C. J.; Chucholowski, A. W.; Ferguson, E.; Hoefle, M. L.; Ortwine, D. F.; Newton, R. S.; Sekerke, C. S.; Sliskovic, D. R.; Stratton, C. D.; Wilson, M. W.; *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 357-366.





Schemat 3. Enancjoselektywna synteza atorwastatyny z wykorzystaniem chiralnych pomocników

Asymetryczna synteza z wykorzystaniem chiralnych pomocników była bardzo popularna kilka dekad temu, gdyż pozwala uzyskać pożądany produkt ze 100% nadmiarem enancjomerycznym (*e.e.*) po rozdzieleniu diastereoizomerów. Jednakże, w tej reakcji niezbędna jest stechiometryczna ilość pomocnika chiralnego, a także dwa dodatkowe etapy syntezy – wprowadzenie oraz usunięcie pomocnika, co czyni tę metodologię mało atrakcyjną.

Drugą odmianą syntezy asymetrycznej są reakcje oparte na wykorzystaniu katalizatorów. W tym przypadku chiralność jest przenoszona za pomocą enancjomerycznie czystego katalizatora na niechiralny substrat, co oznacza, że wymagana jest substechiometryczna ilość chiralnej cząsteczki. Oddziaływania katalizatora z substratem są odwracalne, katalizator nie jest zużywany w czasie reakcji i może być użyty w nowym cyklu katalitycznym. Zaletami tej metody jest minimalizacja ilości generowanych odpadów²⁵ oraz multiplikacja chiralności²⁶ - otrzymywana jest stechiometryczna ilość produktu wzbogaconego enancjomerycznie z substechiometrycznej ilości katalizatora. W przeciwieństwie do użycia chiralnych pomocników, w przypadku wykorzystania katalizatorów ilość etapów reakcji jest zredukowana – nie tworzą się produkty pośrednie, związki optycznie czyste powstają

²⁵ (a) Trost, B. M.; *Science* **1991**, 254, 1471-1477 ; (b) Trost, B. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 259-281; (c) Sheldon, R. A.; *Pure Appl. Chem.* **2000**, 72, 1233-1246.

²⁶ Noyori, R.; *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., New York **1994**.

bezpośrednio z prochiralnych substratów, dzięki czemu możliwe jest otrzymanie wielu różnorodnych substancji chiralnych z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi.

Ze względu na rodzaj chiralnego katalizatora, enancjoselektywną katalizę można podzielić na trzy główne typy: biokatalizę, katalizę organometaliczną i organokatalizę.

W przypadku biokatalizy czynnikiem odpowiadającym za przyspieszenie reakcji jest enzym²⁷. Biokatalizatory zapewniają również wysoką chemo-, regio-, diastereo- i enancjoselektywność. Procesy te są prowadzone w łagodnych warunkach, co minimalizuje ryzyko tworzenia się produktów ubocznych. Ich zaletą jest również to, iż są one nieszkodliwe dla środowiska. Kataliza enzymatyczna stanowi praktyczną alternatywę dla tradycyjnej syntezy organicznej, gdyż enzymy mogą współpracować z innymi reagentami, a ich aktywność i specyficzność substratowa może być modyfikowana²⁸.

Najbardziej popularnym w ostatnich latach typem katalizy enancjoselektywnej jest kataliza organometaliczna²⁹. Metoda ta swój sukces zawdzięcza w szczególności powinowactwu metali do tworzenia kompleksów z grupami funkcyjnymi oraz wydajną indukcją asymetryczną tych kompleksów. Chiralne katalizatory metaliczne są używane w bardzo wielu reakcjach, takich jak asymetryczne uwodornianie czy epoksydacja. Pomimo wielu zalet, metoda ta nie jest atrakcyjnym sposobem otrzymywania EPC. Większość kompleksów organometalicznych jest drogich, wymagają do działania ostrych warunków reakcji, a toksyczność metali wpływa negatywnie zarówno na środowisko, jak i na zanieczyszczenie produktu końcowego metalami ciężkimi, co stanowi szczególne utrudnienie w syntezie leków.

Alternatywą dla procesów katalizowanych przez kompleksy metali stała się przyjazna dla środowiska organokataliza. W tym przypadku za przyspieszenie reakcji odpowiadają małe organiczne cząsteczki niezawierające metali³⁰. Mimo iż stosowanie tego typu związków jako katalizatorów jest znane od ponad wieku, intensywny rozwój organokatalizy przypada na ubiegłe dziesięciolecie³¹. Można wyróżnić pięć różnych mechanizmów organokatalizy: poprzez enaminy, jony iminiowe, katalizę przeniesienia fazowego, katalizę zasadami Brønsteda oraz aktywację wiązaniami wodorowymi³².

²⁷ (a) Drauz, K.; Waldmann, H.; Eds. *Enzyme catalysis in organic synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim **2002**; (b) Schramm, V. L.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3029-3030.

²⁸ Nah, J.-W.; Jeong Y.-I.; Cho Ch.-S.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2000**, *75*, 1115-1126.

²⁹ Bolm, C.; Gladysz, J. A.; *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2761-2762.

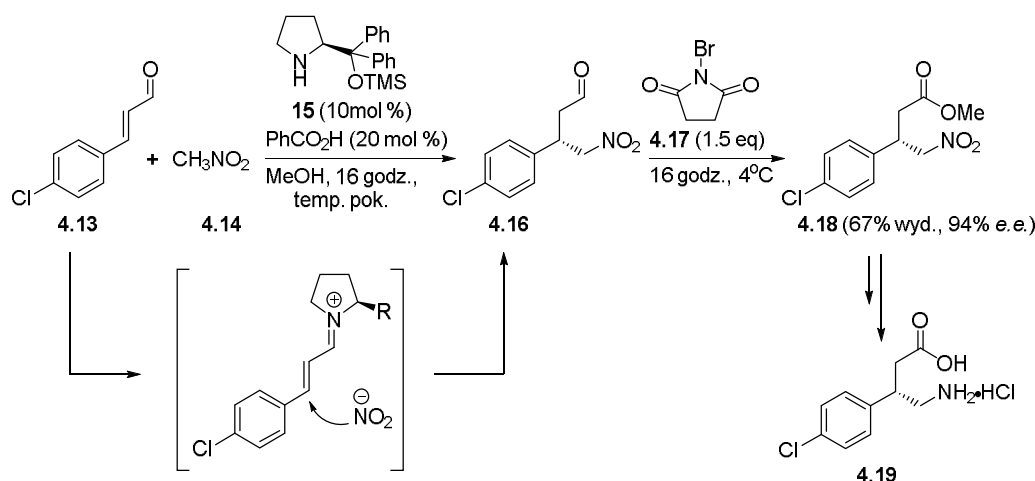
³⁰ (a) Berkessel, A.; Gröger, H.; *Asymmetric Organocatalysis*, Wiley-VCH-Verlag: Weinheim **2005**; (b) Dalko, P. I.; *Enantioselective Organocatalysis*, Wiley-VCH-Verlag: Weinheim **2007**.

³¹ List, B.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1730-1734.

³² Gaunt, M. J.; Johansson, C. C. C.; McNally, A.; Vo, N. T.; *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 8-27.

Zaletami tych katalizatorów w porównaniu do metalokatalizy są niewrażliwość na wilgoć i tlen atmosferyczny oraz łatwość wykonania.

Przykładem syntezy asymetrycznej jest organokataliza z wykorzystaniem chiralnych amin drugorzędowych. Mechanizm reakcji katalizowanej tego typu związkami może być dwojaki, w zależności od użytego substratu: poprzez enaminy lub jony iminiowe. Opracowanie koncepcji jonów iminiowych w latach 90. XX wieku przez zespół MacMillana³³ zapoczątkowało intensywny rozwój badań nad tą metodą. Kataliza jonów iminiowych zapewnia organokatalityczną alternatywę dla tradycyjnej katalizy związków α,β -nienasyconych za pomocą kwasów Lewisa. Kondensacja chiralnej drugorzędowej aminy ze związkiem α,β -nienasyconym powoduje powstanie jonu iminiowego. Ten rodzaj organokatalizy może być wykorzystany do otrzymywania baklofenu, leku stosowanego m. in. w leczeniu stwardnienia rozsianego³⁴. Prezentowana metoda polega na enancjoselektywnej syntezie typu *one-pot* γ -nitroestrów za pomocą organokatalitycznej addycji Michaela nitrometanu (**4.14**) do α,β -nienasyconego aldehydu (**4.13**) i następczej oksydatywnej estryfikacji związku nitrowego **4.16** N-bromosukcynoimidem (**4.17**) (Schemat 4)³⁵. Jako organokatalizatora użyto (*S*)-2-(difenyl-(trimetylosililoksy)-metylo)pirolidyny (**4.15**). W wyniku powyższych przemian otrzymano 3-(4-chlorofenyl)-4-nitromaślan metylu (**4.18**) z 94% nadmiarem enancjomerycznym, który w prosty sposób przekształcono w baklofen (**4.19**).



Schemat 4. Synteza asymetryczna baklofenu.

³³ Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4243-4244.

³⁴ Bowery, N. G.; Hill, D. R.; Hudson, A. L.; Doble, A.; Middlemiss, D. N.; Shaw, J.; Turnbull, M.; *Nature* **1980**, *283*, 92-94.

³⁵ Jensen, K. L.; Poulsen, P. H.; Donslund, B. S.; Morana, F.; Jorgensen, K. A.; *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1516-1519.

Obecnie trwają intensywne badania nad opracowaniem nowych metod katalizy asymetrycznej. Do rozwoju tej techniki przyczyniły się prace profesorów W. S. Knowlesa, R. Noyori i K. B. Sharplessa, którzy za te osiągnięcia zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w 2001 roku. Obecnie poszukuje się nowych, tańszych katalizatorów, co uczyniłoby katalizę asymetryczną bardziej atrakcyjną dla przemysłu.

Trzecią z metod otrzymywania związków optycznie czystych jest rozdział mieszaniny racemicznej (Schemat 1, część niebieska). Pomimo spektakularnego rozwoju katalizy asymetrycznej, separacja enancjomerów jest wciąż najważniejszą przemysłową metodą syntezy EPC. Uzyskanie pojedynczego enancjomeru z mieszaniny racemicznej może być osiągnięte za pomocą tradycyjnych metod separacyjnych lub poprzez wykorzystanie różnic w reaktywności. Najważniejszymi sposobami rozdziału racematu są: krystalizacja, rozdział klasyczny, rozdział chromatograficzny i rozdział kinetyczny (KR).

Jednym z najstarszych sposobów rozdziału enancjomerów jest bezpośrednia krystalizacja. W tym przypadku tylko jeden z stereoizomerów z mieszaniny racemicznej selektywnie krystalizuje w określonych warunkach. Metoda ta polega na zaszczerpieniu przesyconego roztworu mieszaniny racemicznej kryształami jednego z enancjomerów³⁶. Jako pierwszy krystalizuje ten z dwóch enancjomerów, którego kryształ został dodany do roztworu racematu. Metoda ta znalazła zastosowanie m. in. do rozdzielania mieszaniny racemicznej metylodopy³⁷. Podejście to jest jednak ograniczone przez właściwości fizyczne związku poddawanego rozdziałowi. Szacuje się, że tylko około 10% substancji chiralnych wykazuje odpowiedni sposób krystalizacji, pozwalający na zastosowanie tej techniki³⁸. Ponadto jej wadą jest także bardzo trudny dobór warunków krystalizacji.

Kolejnym sposobem rozdziału mieszaniny racemicznej jest tzw. „rozdzielanie klasyczne”, który wymaga użycia stechiometrycznej ilości chiralnego czynnika rozdzielającego (Schemat 1)³⁹. Racemat jest poddawany reakcji z czynnikiem rozdzielającym, w wyniku czego tworzy się para diastereoizomerów. Izomery te posiadają różne właściwości fizyczne, a zatem mogą zostać rozdzielone metodami fizycznymi, np. poprzez krystalizację czy filtrację lub przy wykorzystaniu achiralnej

³⁶ Collet, A.; Brienne, M.-J.; Jacques, J.; *Chem. Rev.* **1980**, *80*, 215-230.

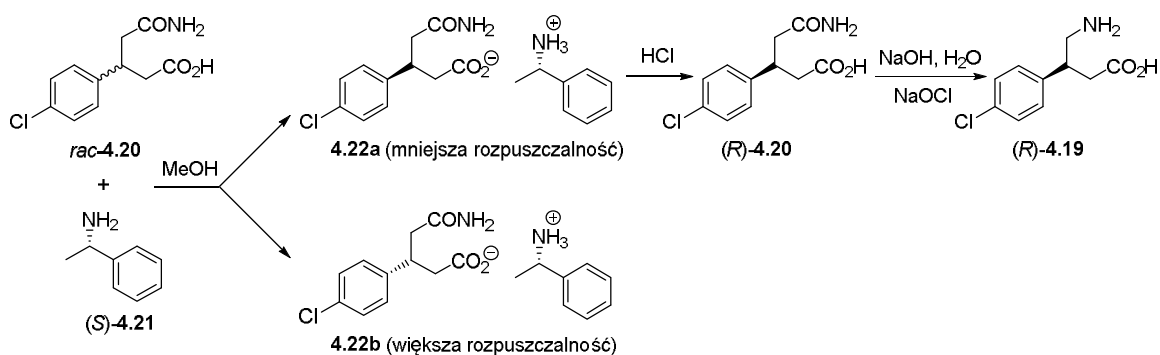
³⁷ Grabowski, E. J. J.; *Chirality* **2005**, *17*, S249-S259.

³⁸ Toda, F.; Ed.; *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods*; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht **2004**.

³⁹ Jacques, J.; Collet, A.; Wilen, S. H.; *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, Krieger Publishing Company, Malabar, **1991**.

chromatografii cieczowej. Po rozdziale substrat jest uwalniany od czynnika rozdzielającego za pomocą oddzielnej reakcji chemicznej.

Omawiana technika jest szczególnie użyteczna w przypadku rozdzielania amin i kwasów karboksylowych. Przykładem reakcji tego typu jest rozdział enancjomerów kwasu 5-amino-3-(4-chlorofenylo)oksopentanowego (GAM, **4.20**, Schemat 5), prekursora baklofenu. Kwas GAM poddano działaniu (*S*)-1-fenyletyloaminy (**4.21**) w wyniku czego otrzymano dwie diastereoizomeryczne sole **4.22a** i **4.22b**.⁴⁰ Związki te różniły się rozpuszczalnością w metanolu, dlatego mogły zostać rozdzielone poprzez krystalizację. Sól (*R,S*) (**4.22a**) jest słabiej rozpuszczalna w alkoholu metylowym, więc wytrąciła się jako pierwsza. Następnie podzieleno na nią kwasem solnym w celu otrzymania kwasu (*R*)-**4.20**, który przekształcono w baklofen (*R*)-**4.19** (99.8 *e.e.*), stosując przegrupowanie Hofmanna.



Schemat 5. Diastereoizomeryczny rozdział kwasu 5-amino-3-(4-chlorofenylo)oksopentanowego

Mieszaninę racemiczną można także poddać rozdzielaniu za pomocą chromatografii chiralnej (Schemat 1). W tym celu należy zastosować chiralne fazy stacjonarne (CSP) lub chiralne dodatki do fazy ruchomej⁴¹. Metoda rozdzielania oparta jest na tworzeniu się przejściowych diastereoizomerycznych kompleksów pomiędzy cząsteczką różnicującą (selektorem), będącą składnikiem CSP lub chiralnej fazy ruchomej, a cząsteczką rozdzielanej substancji (selektandem). Różnica w stabilności tych kompleksów prowadzi do różnicy czasów retencji (mniej stabilny kompleks jest szybciej wymywany z kolumny)⁴². Zasadniczo, rozdział za pomocą chiralnej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) można przeprowadzić zarówno w skali analitycznej,

⁴⁰ Caira, M. R.; Clauss, R.; Nassimbeni, L. R.; Scott, J. L.; Wildervanck, A. F.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1997**, 763-768.

⁴¹ Gübitz, G.; *Chomatographia* **1990**, 30, 555-564.

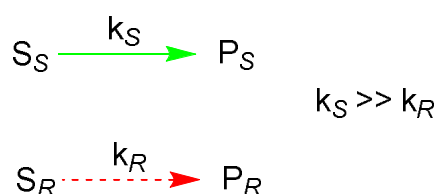
⁴² Davankov, V. A.; *Pure 7 Appl. Chem.* **1997**, 69, 1469-1474.

jak i preparatywnej. W rzeczywistości jednak duże ilości rozpuszczalnika, długi czas rozdzielania i stosunkowo wysokie koszty obsługi chiralnej HPLC stanowią poważne ograniczenie dla skali, w jakiej można ten proces przeprowadzić.

Najważniejszą metodą rozdzielania mieszaniny racemicznej jest rozdział kinetyczny (KR), który opiera się na wykorzystaniu różnicy w szybkościach reakcji obydwu enancjomerów z czynnikiem chiralnym. Takim czynnikiem może być katalizator chemiczny (np. kompleks metalu lub chiralny katalizator organiczny) lub biokatalizator (enzym lub mikroorganizm).

4.1. Rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej

Rozdział kinetyczny racematu jest definiowany jako proces, w którym dwa enancjomery racemicznego substratu (S) są przekształcane w produkt (P) z różnymi stałymi szybkości reakcji (k_R , k_S) (Schemat 6)⁴³.



Schemat 6. Rozdział kinetyczny racematu

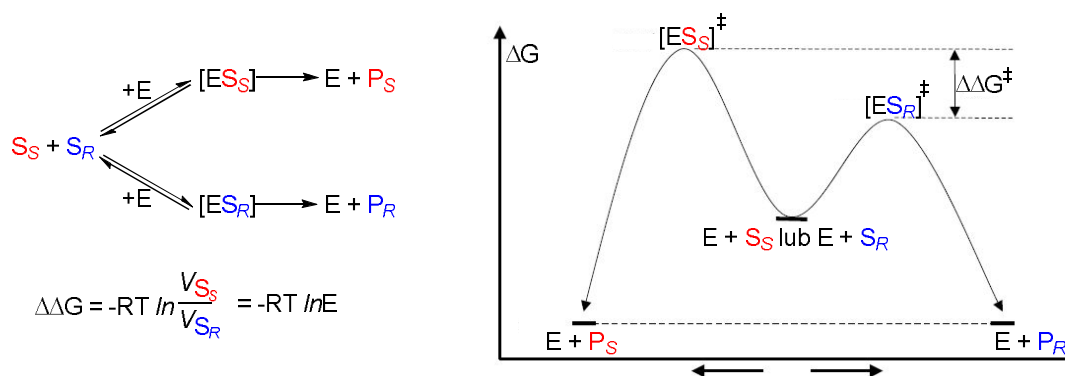
Reakcje rozdzielania kinetycznego mogą być katalizowane za pomocą katalizatorów chemicznych (takich jak kompleksy metali, chiralne organokatalizatory) lub biokatalizatorów (enzymy, mikroorganizmy). Najczęściej stosowanymi katalizatorami KR są enzymy, ze względu na wysoką enancjoselektywność i wydajność procesów przez nie katalizowanych.

4.1.1. Enzymatyczny rozdział kinetyczny

Jak wcześniej wspomniano, w katalitycznym rozdziale kinetycznym dwa enancjomery racemicznego substratu reagują z różnymi stałymi szybkości reakcji, w obecności chiralnego katalizatora. Enzymy są katalizatorami homochiralnymi, więc mogą przeprowadzać reakcje w sposób stereoselektywny. Właściwość ta jest

⁴³ Faber, K.; *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5004-5010.

wykorzystywana w enzymatycznym rozdziale kinetycznym (EKR) mieszaniny racemicznej. Enancjoselektywność biokatalizatorów jest konsekwencją różnicy w energii aktywacji powstawania stanu przejściowego enzym – enancjomer (S) substratu $[ES_S]^\ddagger$ i enzym – enancjomer (R) substratu $[ES_R]^\ddagger$ (Wykres 2)⁴⁴. W reakcji enancjoselektywnej oba enancjomery substratu (S) i (R) konkurują o miejsce aktywne enzymu. W związku z tym, że otoczenie miejsca aktywnego enzymu jest chiralne, tworzą się diastereoizomeryczne kompleksy enzym-substrat $[ES_S]$ i $[ES_R]$ o różnych wartościach energii swobodnej (ΔG) odpowiednich stanów przejściowych $[ES_S]^\ddagger$ i $[ES_R]^\ddagger$. Skutkiem tego jest różnica w energii aktywacji ($\Delta\Delta G^\ddagger$) obu enancjomerycznych substratów, co w konsekwencji sprawia, iż jeden enancjomer ulega przemianie chemicznej szybciej niż drugi.



gdzie: E – enzym; S_S , S_R – enancjomery substratu; P_S , P_R – enancjomery produktu, $[ES_S]^\ddagger$, $[ES_R]^\ddagger$ – stany przejściowe reakcji enzymatycznej, v_{SS} – szybkość powstawania produktu P_S , v_{SR} – szybkość powstawania produktu P_R

Wykres 2. Rozkład energii dla enancjoselektywnej reakcji enzymatycznej

Im większa jest wartość różnicy w energii aktywacji ($\Delta\Delta G^\ddagger$), tym większa jest enancjoselektywność enzymu E , wyrażana jako stosunek szybkości reakcji enancjomerycznych substratów S_S i S_R (odpowiednio v_{S_S} i v_{S_R}). Te wartości są niezwykle istotne, gdyż wyrażają one czystość optyczną produktu.

Ważną cechą enzymatycznego rozdziału kinetycznego dwóch enancjomerów jest enancjoselektywność (E). E jest parametrem bezwymiarowym, niezmiennym w czasie trwania reakcji i opisuje zależność pomiędzy konwersją substratu (c) i nadmiarami enancjomerycznymi substratu ($e.e.s$) oraz produktu ($e.e.p$). Pojęcie enancjoselektywności zostało wprowadzone w 1982 r. przez Siha⁴⁵ na podstawie prac Sharplessa⁴⁶.

⁴⁴ Gotor, V.; Alfonso, I.; Garcia-Urdiales, E.; Ed.; *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim **2008**.

⁴⁵ (a) Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299;

Enancjoselektywność może zostać obliczona odpowiednio dla substratu (Równanie 1) lub produktu (Równanie 2).

Równania 1, 2 i 3. Równania Siha.

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

$$\text{gdzie: } e.e.P = \frac{P_S - P_R}{P_S + P_R}, e.e.S = \frac{S_S - S_R}{S_S + S_R}$$

Powyższe równania nie są jednak spełnione w przypadku bardzo niskich lub bardzo wysokich stopni konwersji, gdzie dokładność pomiaru jest zakłócona. Wówczas do określenia enancjoselektywności stosuje się Równanie 3, które opisuje zależność parametru E jedynie od nadmiarów enancjomerycznych, a nie od konwersji. Wartość enancjoselektywności zależy od wzoru użytego do jej obliczenia, dlatego zawsze należy podać metodę, którą zastosowano w tym celu.

Przyjęto, że procesy, dla których wartość enancjoselektywności nie przekracza 15, są nie do zaakceptowania ze względów praktycznych. Zakres parametru E w przedziale 15-30 uznaje się za umiarkowany do dobrego, natomiast, powyżej 30, jako doskonały⁴⁷. Wartości $E > 200$ nie może być dokładnie określona, ze względu na niedokładność oznaczenia nadmiaru enancjomerycznego (np. za pomocą HPLC), gdyż w tym zakresie nawet bardzo małe odchylenie $e.e.S$ lub $e.e.P$ powoduje znaczącą zmianę wartości enancjoselektywności.

Mechanizm reakcji enzymatycznej różni się od klasycznej katalizy. W przypadku EKR oba enancjomeryczne substraty reagują z różnymi szybkościami, a stosunek stężeń S_R/S_S i P_R/P_S zmienia się w trakcie zachodzenia reakcji i w konsekwencji skład enancjomeryczny substratu oraz produktu staje się funkcją stopnia konwersji.

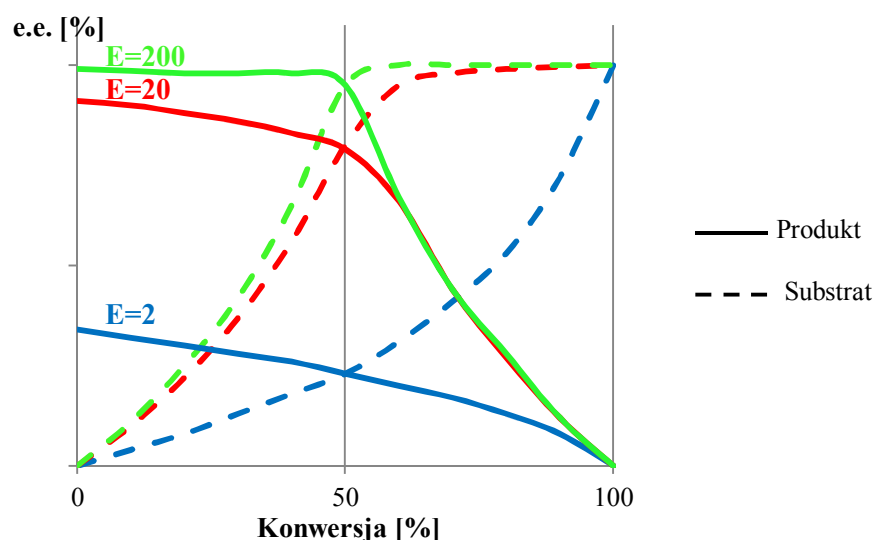
Rysunek 4 przedstawia zależność pomiędzy nadmiarem enancjomerycznym substratu (linia przerywana) i produktu (linia ciągła) a stopniem konwersji dla różnych wartości enancjoselektywności. Wykres pokazuje, iż produkt z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym można uzyskać dla konwersji poniżej 50%. Przekroczenie tej wartości prowadzi do znacznego obniżenia $e.e.$ produktu. Odmienne przedstawia się

(b) Chen, C.-S.; Wu, S.-H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812-2817.

⁴⁶ Martin, V. S.; Woodard, S. S.; Katsuki, T.; Yamada, Y.; Ikeda, M.; Sharpless, K. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6237-6240.

⁴⁷ Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th ed., Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, **2011**.

sytuacja dla substratu, gdzie przekroczenie 50% konwersji przyczynia się do wzrostu czystości optycznej substratu (Rysunek 4).



Rysunek 4. Zależność czystości optycznej (e.e._S; e.e._P) od konwersji

W idealnym rozdziale kinetycznym, jeden z enancjomerów substratu ulega przekształceniu w oczekiwany produkt, podczas gdy drugi pozostaje niezmienny. Powoduje to zatrzymanie reakcji przy konwersji 50%, w wyniku czego otrzymywany jest zarówno substrat, jak i produkt w postaci enancjomerycznie czystej. Jednakże, w większości przypadków, różnica pomiędzy stałymi szybkościami reakcji dwóch enancjomerów nie jest wystarczająco duża, więc aby otrzymać produkt z wysoką enancjoselektywnością, należy zatrzymać reakcję przy konwersji niższej niż 50%.

4.1.1.1. Mechanizm reakcji enzymatycznej estryfikacji

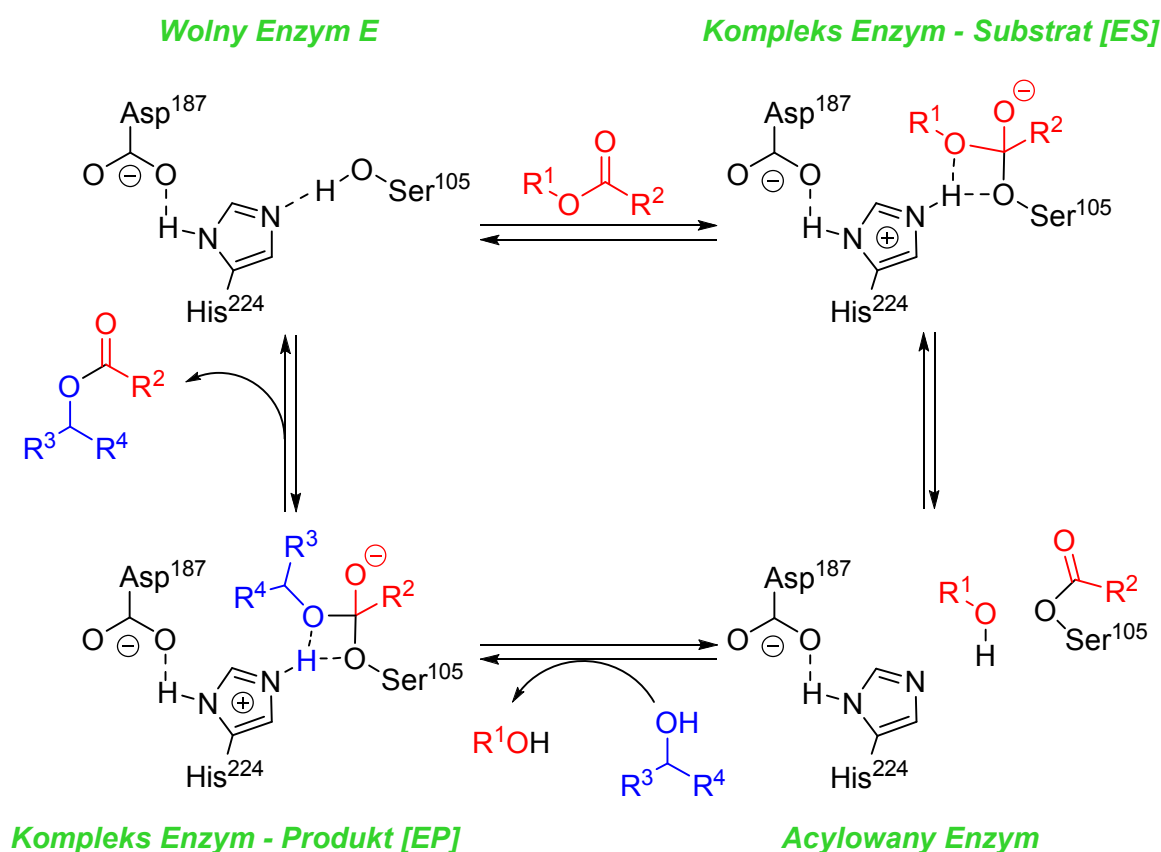
Enzymy są grupą katalizatorów odgrywających największą rolę w rozdziale kinetycznym. Spośród nich, najważniejsze zastosowanie syntetyczne mają biokatalizatory należące do klasy hydrolaz: lipazy, esterazy, amidazy i proteazy. W EKR katalizatory te stosowane są do otrzymywania optycznie czystych alkoholi, estrów, aminokwasów i amidów.

Hydrolazy (EC 3) są klasą enzymów katalizujących reakcje rozpadu wiązań chemicznych z udziałem cząsteczki wody⁴⁸. Charakteryzują się one szeroką

⁴⁸ Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J.; *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2006.

specyficnością substratową, co czyni je atrakcyjnymi dla syntezy organicznej. Enzymy te często wykazują także wysoką stereoselektywność, nawet w stosunku do nienaturalnych substratów. Ponadto, poza hydrolizą, hydrolazy katalizują wiele różnych reakcji, takich jak kondensacja czy alkoholiza. Ważną ich cechą jako reagentów chemicznych jest także to, iż są komercyjnie dostępne, nie wymagają kofaktorów oraz wykazują stabilność w rozpuszczalnikach organicznych. Spośród hydrolaz, lipazy najczęściej znajdują zastosowanie w enzymatycznym rozdziale kinetycznym.

Z mechanistycznego punktu widzenia, lipazy, esterazy i proteazy wykazują podobny mechanizm działania⁴⁹. Triada katalityczna centrum aktywnego wielu lipaz zbudowana jest z kwasu asparaginowego (lub glutaminowego), histydyny i seryny. Przykładowy mechanizm reakcji hydrolizy/estryfikacji katalizowanej przez lipazę B z *Candida antarctica* przedstawiono na Schemacie 7.



Schemat 7. Mechanizm reakcji hydrolizy/estryfikacji katalizowanej przez lipazę B z *Candida antarctica*

⁴⁹ Fersht, A.; *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed., H Freeman & Co, New York 1985.

Reakcje hydrolizy/estryfikacji katalizowane przez lipazy mogą być opisane za pomocą mechanizmu typu ping-pong bi bi,⁵⁰ który opisuje dwu-substratową, dwu-produktową reakcję enzymatyczną⁵¹. W pierwszym etapie następuje związanie substratu z grupami funkcyjnymi łańcuchów bocznych aminokwasów, znajdujących się w centrum aktywnym enzymu – tworzy się tetraedryczny stan przejściowy – kompleks enzym-substrat [ES]. Następnie, w wyniku odłączenia cząsteczki nukleofila R¹OH powstaje produkt pośredni – acylowany enzym. W kolejnym etapie zostaje związany drugi substrat – cząsteczka alkoholu, w wyniku czego powstaje tetraedryczny stan przejściowy – kompleks enzym – produkt [EP]. W efekcie następuje uwolnienie produktu z centrum aktywnego i regeneracja enzymu. Jednak nie jest to jedyny sposób działania enzymów. Zdarza się, iż nie wszystkie aminokwasy triady katalizacyjnej biorą udział w reakcji. Pytaniem otwartym jest kwestia efektywności katalizacyjnej hydrolaz, która może się egzemplifikować w szeregu różnych typach reakcji.

4.1.1.2. Promiskuityzm hydrolaz

Jak uprzednio wspomniano, enzymy cechuje szeroka specyficzność substratowa, często katalizują one reakcje tzw. nienaturalnych substratów. Na początku sądzono, iż właściwość ta dotyczy zaledwie kilku biokatalizatorów, jednak okazało się, iż jest to cecha większości enzymów⁵². Właściwość tą nazwano promiskuityzmem enzymów i zdefiniowano jako zdolność biokatalizatorów do katalizowania dodatkowych procesów, różniących się od naturalnych dla nich reakcji chemicznych⁵³. Promiskuityzm enzymów można podzielić na trzy główne klasy: promiskuityzm warunków reakcji (zdolność do katalizowania reakcji w warunkach nienaturalnych – środowisko bezwodne, ekstremalna temperatura czy pH), promiskuityzm substratowy (wykorzystanie wielu różnych substratów do tego samego typu reakcji chemicznej) i katalityczny (zdolność enzymów do katalizowania różnych typów przekształceń chemicznych)⁵⁴. Promiskuityzm katalityczny może być przypadkowy, czyli katalizowany przez dziki typ enzymu lub

⁵⁰ Anthonsen, H. W.; Hoff, B. H.; Anthosen, T.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2633-2638.

⁵¹ Drauz, K.; Waldmann, H.; ed.; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 2nd ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim **2002**.

⁵² (a) O'Brian, P. J.; Herschlag, D.; *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 91 – 105; (b) Copley, S. D.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 265-272.

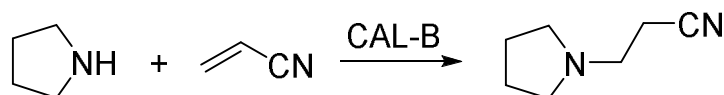
⁵³ Kapoor, M.; Gupta, M. N.; *Proc. Biochem.* **2012**, *47*, 555-569.

⁵⁴ Hult, K.; Berglund, P.; *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238.

indukowany – wywołany przez mutacje enzymu. Większość z reakcji promiskuitycznych może być użyteczna w syntezie organicznej⁵⁵.

Enzymami, które były najszerszej badane pod względem promiskuityzmu są lipazy. Należą one do grupy hydrolaz, a więc naturalnie katalizują reakcje hydrolizy tłuszczów. Katalizatory te wykorzystywane są również w reakcji estryfikacji, acydolizy czy alkoholizy. Wiele z lipaz katalizuje reakcje promiskuityczne, takie jak: tworzenie wiązań węgiel – węgiel, węgiel – heteroatom, heteroatom – heteroatom oraz procesy utleniania. Jedną z najważniejszych transformacji w syntezie organicznej jest tworzenie wiązania C-C. Zazwyczaj tego typu przekształcenia były wykonywane za pomocą aldolaz. Okazało się jednakże, że lipazy również mogą katalizować takie reakcje⁵⁶.

Jednym z przykładów reakcji, które nie są naturalnie katalizowane przez lipazy, jest addycja Michaela. Prof. Gotor opisał addycję amin drugorzędowych do akrylonitrylu w obecności lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B), w wyniku czego powstawał addukt Michaela (Schemat 8)⁵⁷. Reakcja w obecności biokatalizatora zachodziła nawet do 100 razy szybciej niż bez jego udziału. Przeprowadzono także reakcję ze zdenaturowanym enzymem, otrzymując wynik identyczny jak w przypadku procesu niekatalizowanego, co pozwala wnioskować, iż trzeciorzędowa struktura biokatalizatora jest niezbędna do przeprowadzenia tej reakcji.



Schemat 8. Addycja Michaela katalizowana za pomocą lipaz

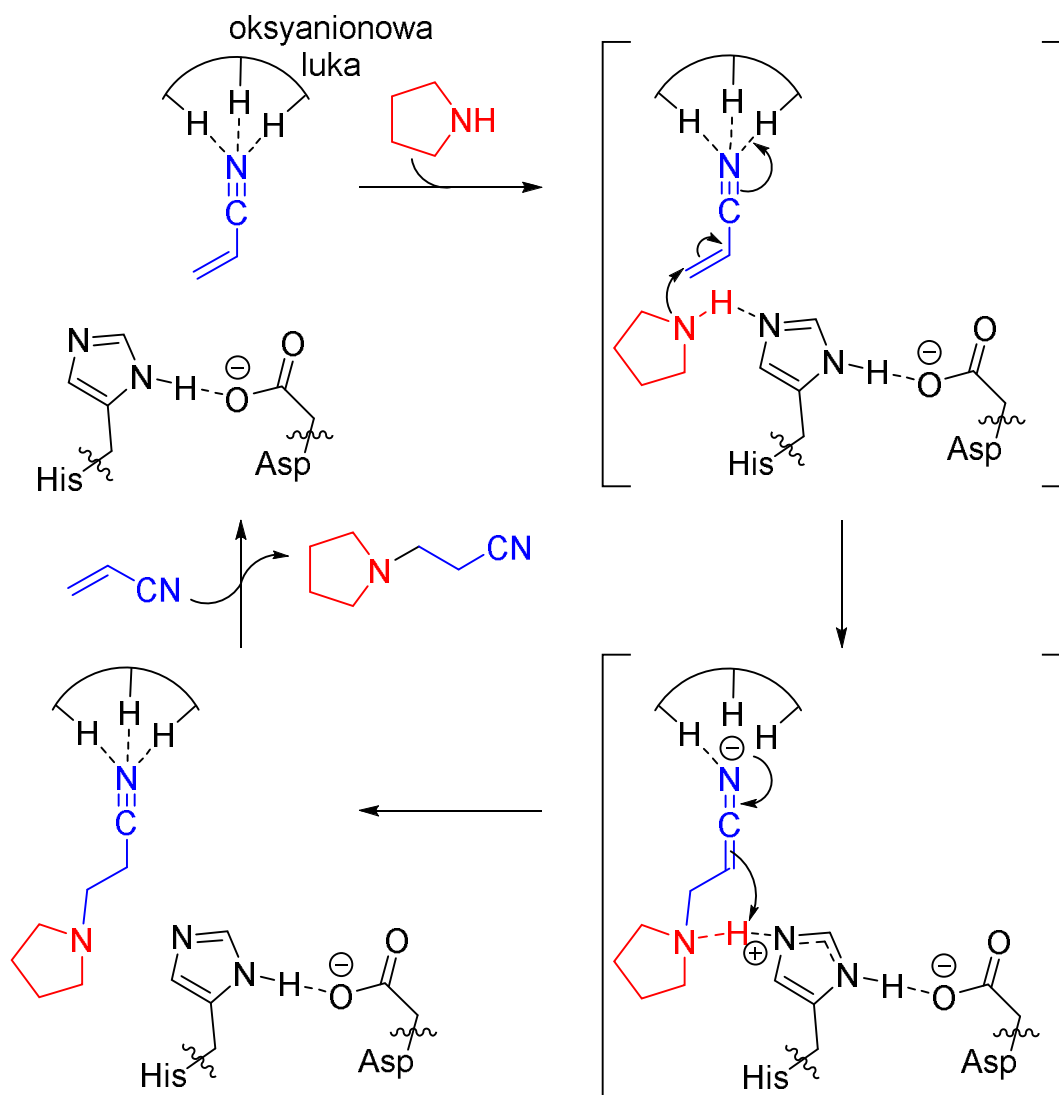
W związku z otrzymanymi wynikami, autorzy zaproponowali mechanizm nowej reakcji (Schemat 9). Zakłada on wykorzystanie tzw. „luki oksyanionowej” w enzymie, która podobnie jak standardowy katalizator reakcji Michaela – kwas Lewisa, przenosi proton z nukleofilowego donora Michaela na węgiel położony w pozycji α w akceptorze Michaela. W miejscu aktywnym hydrolaz serynowych obie omawiane cząsteczki są położone bardzo blisko siebie. Zaproponowany mechanizm zakłada, iż w pierwszym etapie następuje związanie akceptora Michaela (acetonitryl) w miejscu aktywnym enzymu. Oddziaływania nitrylu z luką oksyanionową powoduje wzrost jego

⁵⁵ Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032-6040.

⁵⁶ Kapoor, M.; Gupta, M. N.; *Proc. Biochem.* **2012**, *47*, 555-569.

⁵⁷ Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V.; *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.

elektrofilowości. Następnie zostaje przyłączony nukleofil, w wyniku czego powstaje zwitterjon, który jest stabilizowany zarówno przez lukę oksyanionową, jak i przez parę histydyna – kwas asparaginowy (His-Asp). Para His-Asp katalizuje przeniesienie protonu z nukleofila na węgiel α akrylonitrylu. W kolejnym etapie nowy akceptor Michaela ulega przekształceniu w końcowy produkt. Mimo iż w centrum aktywnym występuje seryna, ten aminokwas nie bierze udziału w omawianej reakcji.



Schemat 9. Proponowany mechanizm addycji Michaela katalizowanej za pomocą lipaz

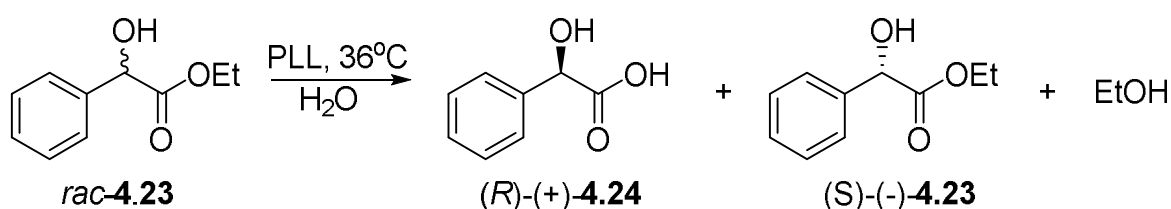
Tego typu mechanizm został także zaobserwowany w przypadku innych reakcji katalizowanych przez lipazy, takich jak: kondensacja aldolowa⁵⁸ czy addycja Markownikowa⁵⁹.

⁵⁸ Li, C.; Feng, X.-W.; Wang, N.; Zhou, Y.-J.; Yu, X.-Q.; *Green Chem.* **2008**, *10*, 616-618.

4.1.1.3. Hydroliza enzymatyczna jako metoda EKR estrów

Jak wcześniej wspomniano, hydrolazy są klasą enzymów najczęściej stosowanych w reakcjach enzymatycznego rozdzielania kinetycznego. Rozdział racematu katalizowany lipazami stanowi jedną z najbardziej atrakcyjnych metod otrzymywania związków enancjomerycznie czystych. Większość tych katalizatorów charakteryzuje się wysoką enancjoselektywnością, co czyni je wyjątkowo przydatnymi w syntezie związków chiralnych.

Zastosowanie enzymów do rozdzielania kinetycznego racematu ma swój początek w 1903 roku⁶⁰. Wówczas to użyto lipazy z wątroby świńskiej (PLL) do rozdzielania racemicznych estrów kwasu migdałowego (Schemat 10). Estry etylowe poddano częściowej hydrolizie enzymatycznej, otrzymując optycznie czynne kwas α -hydroksyfenylooctowy **4.24** (prawoskrętny) oraz nieprzereagowany ester **4.23** (lewoskrętny). Natomiast w przypadku całkowitej hydrolizy, uzyskany kwas migdałowy nie skręcał płaszczyzny światła spolaryzowanego.



Schemat 10. EKR estrów kwasu migdałowego

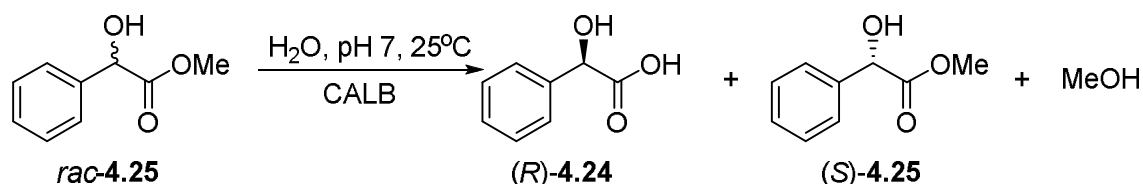
Kwas o najwyższej czystości optycznej (*e.e.* = 38.3%) został otrzymany po zhydrolizowaniu zaledwie 5% substratu. Wraz z postępowaniem hydrolizy estru **4.23**, malała zawartość enancjomeru (*R*) kwasu **4.24** w końcowym produkcie. Szybkość hydrolizy estrów kwasu migdałowego o konfiguracji (*R*) była większa niż estrów o konfiguracji (*S*), w związku z czym substancje te ulegały rozdzielaniu kinetycznemu przy użyciu lipazy PLL.

Wyniki pierwszej opisanego enancjoselektnej hydrolizy enzymatycznej nie spełniają warunków dobrego rozdzielania kinetycznego, jednak dały one podstawę kolejnym badaniom nad rozwojem tej metody.

⁵⁹ Wu, W.-B. Wang, N.; Xu, J.-M.; Wu Q.; Lin, X.-F.; *Chem. Commun.* **2005**, 2348-2350.

⁶⁰ Dakin, H. D.; *J. Physiol.* **1903**, 30, 253-263.

Nowsze badania nad EKR racemicznych estrów pozwalają uzyskać produkty reakcji z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. Przykładem może być hydroliza racemicznych estrów metylowych kwasu α -hydroksyfenylooctowego (**4.25**), za pomocą immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (CAL-B) (Schemat 11)⁶¹.



Schemat 11. ERK estrów kwasu migdałowego za pomocą immobilizowanej CAL-B

Do rozdziału kinetycznego użyto lipazy immobilizowanej na sześciu różnych złożach, reakcje prowadzono w warunkach wodnych przy pH 7, w temperaturze 25°C. Reakcje zatrzymywano przy ok. 10% hydrolizie substratu.

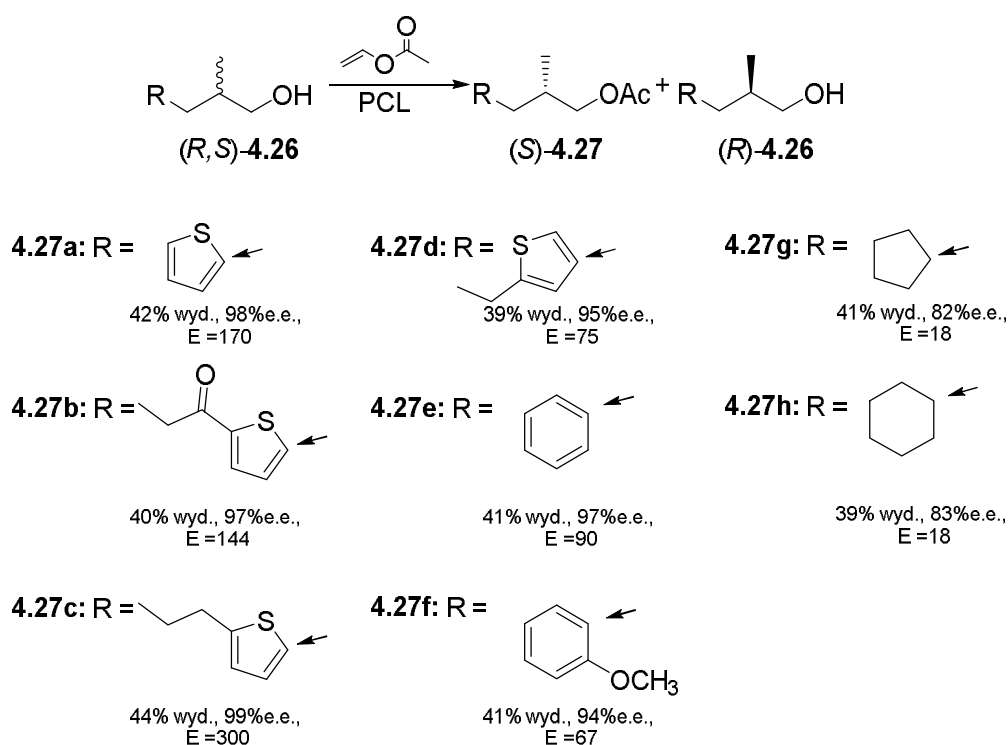
W przypadku wszystkich zastosowanych pochodnych lipazy CAL-B otrzymano produkt o konfiguracji (*R*). W zależności od użytego enzymu, wartości enancjoselektywności różniły się znacząco ($E = 7.4 - 74$). Powyższe dane wskazują jak ważny jest odpowiedni dobór katalizatora dla reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego.

4.1.1.4. Enzymatyczna transestryfikacja jako metoda EKR alkoholi

Duży postęp w rozwoju badań nad EKR miało wprowadzenie rozpuszczalników organicznych jako medium reakcyjnego. Jak wcześniej wspomniano, hydrolazy, a zwłaszcza lipazy są aktywne w rozpuszczalnikach organicznych. Woda nie jest dobrym rozpuszczalnikiem dla większości związków organicznych, co ograniczało dostępność substratów dla enzymatycznego rozdziału kinetycznego. Zmiana medium reakcyjnego umożliwiła wprowadzenie reakcji estryfikacji i transestryfikacji, która jest obecnie dominującą metodą w rozdziale kinetycznym. W obecności odpowiedniego donora grupy acylowej, enzymu, rozpuszczalnika i w optymalnej temperaturze, jeden enancjomer mieszaniny racemicznej może być selektywnie przekształcony w odpowiedni ester, podczas gdy drugi niereaktywny enancjomer pozostaje niezmienny. Bardzo ważne jest, by tak dobrać donor grupy acylowej, aby reakcja transestryfikacji była nieodwracalna.

⁶¹ Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Fuentes, M.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1337-1345.

Substratami dla rozdziału kinetycznego za pomocą reakcji transestryfikacji są najczęściej chiralne alkohole drugorzędowe. ERK homochiralnych alkoholi pierwszorzędowych jest trudny do przeprowadzenia ze względu na niską enancjoselektywność lipaz w kierunku tych substratów. Najbardziej efektywnym enzymem, wykazującym wysoką selektywność dla szerokiej gamy alkoholi pierwszorzędowych jest lipaza z *Pseudomonas capacia* (PCL)⁶². Przeprowadzono badania nad enancjoselektywnością tego enzymu dla alkoholi pierwszorzędowych podstawionych w pozycji 2. grupą metylową, używając octanu winylu jako donora w reakcji transestryfikacji i eteru *tert*-butyloowo-metylowego jako rozpuszczalnika (Schemat 12)⁶³.



Schemat 12. Transestryfikacja alkoholi I-rzędowych za pomocą octanu winylu katalizowana PSL

Spośród wszystkich testowanych substratów najlepsze wyniki pod względem enancjoselektywności i wydajności zostały uzyskane dla rozdziału kinetycznego 3-arylo-2-metylopropan-1-oli (**4.26 a-f**) – enancjoselektywność oscylowała w granicach 67-300, natomiast wartości *E* w przypadku rozdziału alkoholi podstawionych grupami cykloalkilowymi (**4.26 g-h**) były stosunkowo niskie (*E* = 18). Różnica pomiędzy

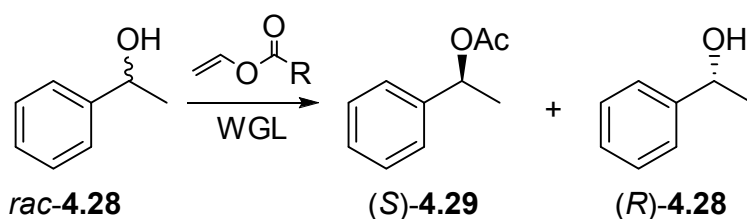
⁶² Genter, C.; Schmid, D. R.; Pleiss, J.; *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2002**, *26*, 57-66.

⁶³ Nordin, O.; Nguyen, B. V.; Vorde, C.; Hedenstrom, E.; Hogberg, H. E.; *J. Chem. Soc.; Perkin Trans I*, **2000**, 367-376.

substratami zawierającymi podstawniki arylowe i cykloalkilowe wskazuje na to, że układy aromatyczne oddziałują z enzymami w sposób uprzywilejowany.

Jak uprzednio wspomniano, alkohole drugorzędowe są najbardziej rozpowszechnionymi substratami w reakcjach enzymatycznego rozdziału kinetycznego katalizowanego lipazami. Powodem tej popularności jest ich ogromne znaczenie w syntezie organicznej, jak również to, że lipazy zazwyczaj wykazują dużo większą enancjoselektywność w reakcjach alkoholi drugorzędowych w porównaniu z pierwszo- i trzeciorzędowymi.

Przykładem może być transestryfikacja 1-fenyletanolu (**4.28**) z udziałem lipazy z kielków pszenicy (Wheat germ lipase WGL)⁶⁴. Zbadano wpływ donora grupy acylowej i rozpuszczalnika na enancjoselektywność reakcji (Schemat 13).



Schemat 13. ERK 1-fenyletanolu katalizowany lipazą z kielków pszenicy

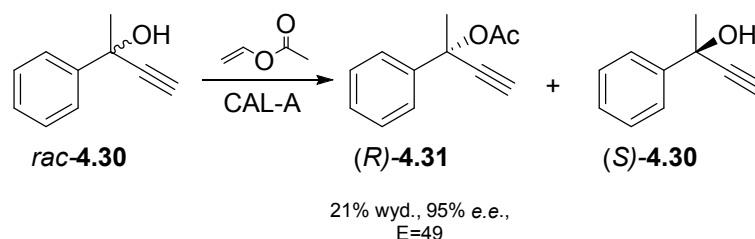
Do enzymatycznego rozdziału kinetycznego użyto czterech donorów grupy acylowej (octan winylu, maślan winylu, kapronian winylu i oktanian winylu) oraz czterech rozpuszczalników o różnej polarności (toluen, *i*-oktan, eter izopropylowy, *n*-heksan). Reakcje prowadzono w temperaturze 40°C przez 72 godziny. Najlepszym medium organicznym dla reakcji transestryfikacji 1-fenyletanolu (**4.28**) octanem winylu katalizowanej przez lipazę z kielków pszenicy (WGL) okazał się *n*-heksan ($c = 27\%$, *e.e.* >99%). W przypadku pozostałych rozpuszczalników nie zaobserwowano powstawania produktu (toluen, *i*-oktan) lub produkt powstawał w niewielkiej ilości (eter izopropylowy) ($c = 4\%$, *e.e.* >99%).

Najczęściej używanymi donorami dla procesów enzymatycznej transestryfikacji są estry winylowe ze względu na nieodwracalność reakcji z ich udziałem. Długość łańcucha donora grupy acylowej wpływa na konwersję oraz na enancjoselektywność rozdziału kinetycznego. Wszystkie zastosowane donory prezentują zbliżony wpływ na konwersję

⁶⁴ Xia, X.; Wang, Y.-H.; Yang, B.; Wang, X.; *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 83-87.

substratu ($c = 27\text{-}32\%$), jednak najlepszy wynik uzyskano dla maślanu winylu ($c = 32\%$, $E > 200$). Przykład ten ukazuje, jak ważna jest optymalizacja procesu EKR.

Podjęto także próby rozdziału kinetycznego alkoholi trzeciorzędowych. Tylko nieliczne hydrolazy wykazują katalityczną aktywność w kierunku tych związków. Głównym utrudnieniem w tym przypadku jest występowanie ubocznych sterycznych oddziaływań alkoholi trzeciorzędowych. Jednym z przykładów enzymatycznego rozdziału kinetycznego tego typu substratów jest transestryfikacja 2-fenyl-3-but-3-yn-2-olu (**4.30**) przy udziale lipazy A z *Candida atratctica* (CAL-A) (Schemat 14)⁶⁵. Jako donora grupy acylowej użyto octanu winylu, reakcję prowadzono w izooktanie, w temperaturze 20°C przez 48 godzin. Jak pokazano na Schemacie 14, uzyskano acylowany produkt **4.31** o konfiguracji (*R*) z wydajnością 21% i 95% nadmiarem enancjomerycznym. Enancjoselektywność reakcji wynosi 49, a więc jest dużo niższa niż w przypadku alkoholi drugorzędowych.



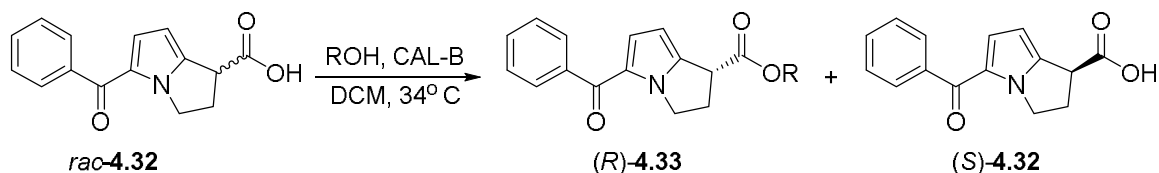
Schemat 14. EKR alkoholi 3-rzędowych

4.1.1.5. Klasyczna enzymatyczna estryfikacja racemicznych kwasów karboksylowych

Enzymatyczna estryfikacja może być również wykorzystana jako metoda rozdziału racemicznych kwasów karboksylowych. Wiele związków z tej klasy stanowi substraty do syntezy farmaceutyków, dlatego też bardzo ważne jest rozwijanie metod pozwalających na otrzymywanie ich w postaci enancjomerycznie czystej. Enzymatyczny rozdział kinetyczny racemicznych kwasów karboksylowych jest reakcją rzadko spotykaną w syntezie organicznej. Przykładem tego typu EKR jest rozdział racemicznego ketorolacu (ToradolTM) (**4.32**), niesteroidowego leku przeciwzapalnego. Biologiczną aktywność

⁶⁵ Krishna, S. H.; Persson, M.; Bornscheuer, U. T.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2693-2696.

posiada tylko enancjomer (*S*) Toradolu, natomiast izomer (*R*) jest nieaktywny⁶⁶. Racemiczny ketorolac (**4.32**) poddano enzymatycznej estryfikacji alkoholami o różnej długości łańcucha, stosując lipazę B z *Candida antarctica* (CAL-B) jako biokatalizator i dichlorometan (DCM) jako rozpuszczalnik (Schemat 15)⁶⁷.



Schemat 15. Estryfikacja ketorolacu różnymi alkoholami za pomocą CAL-B

Dla wszystkich testowanych donorów uzyskano produkt o konfiguracji (*R*). Większość sprawdzanych alkoholi pozwoliła na otrzymanie produktu z bardzo wysoką enancjoselektywnością ($E > 150$), spośród nich najlepsze rezultaty uzyskano dla etanolu, 1-butanolu i 1-tetradodekanolu ($E > 200$). Stosunkowo niska enancjoselektywność cechuje reakcje, w których zastosowano 2-chloroetanol ($E = 21$), alkohol benzylovowy ($E = 14$) i *i*-propanol ($E = 21$). W przypadku enzymatycznego rozdziału kinetycznego za pomocą reakcji estryfikacji bardzo ważnym czynnikiem jest dobór odpowiedniego donora grupy alkoksylowej.

4.1.1.6. Zastosowanie ortoestrów w enzymatycznym rozdziale kinetycznym kwasów karboksylowych

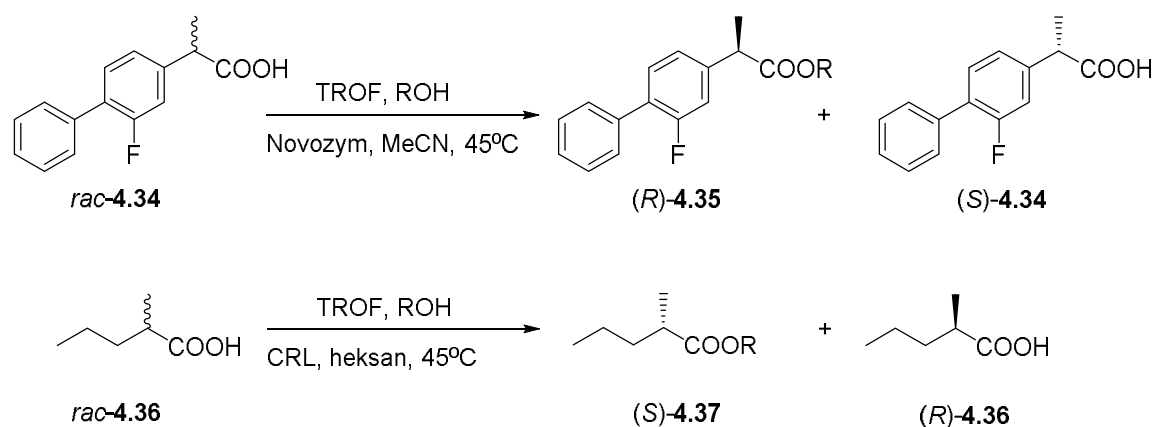
Jak uprzednio wspomniano, jednym z kluczowych elementów w badaniach nad enzymatyczną estryfikacją jest wybór odpowiedniego donora grupy alkoksylowej. Najczęściej w tej roli występują podstawowe substraty stosowane dla reakcji estryfikacji, czyli alkohole. Jednakże związki te nie zawsze pozwalają uzyskać dobry rozdział kinetyczny, ponieważ procesy z ich udziałem są odwracalne. Woda powstająca w reakcji estryfikacji przy wysokim stopniu konwersji, sprzyja hydrolizie enancjomeru preferowanego przez lipazy, a w konsekwencji powoduje obniżenie czystości optycznej powstającego estru i nieprzereagowanego kwasu. W związku z tym, że ten sam enancjomer szybciej ulega przemianie w obu typach reakcji – estryfikacji oraz odwrotnej

⁶⁶ Mroszczak, E.; Comb, D.; Chaplin, M.; Tsina, I.; Tarnowski, T.; Rocha, C.; Tam, Y.; Boyd, A.; Young, J.; Depass, L.; *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 521-539.

⁶⁷ Kim, Y.H.; Cheong, C. S.; Lee, S. H.; Kim, K. S.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1865-1869.

do niej hydrolizie, czystość optyczna nieprzereagowanego substratu gwałtownie spada, gdy konwersja przekracza 50%. W przypadku enzymatycznego rozdzielania kinetycznego racemicznych kwasów karboksylowych niezwykle istotne jest zmniejszenie udziału reakcji odwracalnej, poprzez utrzymywanie zawartości wody na niskim poziomie. Może być to osiągnięte za pomocą metod fizycznych (takich jak stosowanie sit molekularnych, sorpcja wody na membranie polimerowej itp.) lub chemicznych. Sposoby fizyczne posiadają szereg wad oraz ograniczeń aplikacyjnych, stąd metody chemiczne wydają się być dużo bardziej atrakcyjne.

Jedną z nich jest wprowadzenie do medium reakcyjnego ortoestrow. Ortoestry znalazły zastosowanie w enzymatycznym rozdzielaniu kinetycznym w celu zapewnienia nieodwracalności reakcji estryfikacji kwasów karboksylowych alkoholami. W 2001 roku grupa Nicolosi opublikowała badania nad rozdzielaniem racemicznych kwasów karboksylowych za pomocą reakcji estryfikacji z dodatkiem ortoestrow⁶⁸. Naukowcy stwierdzili, iż dodatek ortoestru przesuwa równowagę reakcji w kierunku tworzącego się estru, ponieważ woda powstająca w reakcji estryfikacji jest zużywana do hydrolizy ortoestru. W omawianej pracy jako substraty modelowe zostały użyte racemiczne flurbiprofen (**4.34**) i kwas 2-metylowalerianowy (**4.36**). Związki te poddano enzymatycznej estryfikacji alkoholami z dodatkiem ortomrówczanów trialkilowych (TROF) (Schemat 16).



Schemat 16. Enzymatyczna estryfikacja flurbiprofenu i kwasu 2-metylowalerianowego

Przetestowano następujące ortomrówczany: trimetylu (TMOF), trietylu (TEOF), tripropyłu (TPOF) i tributylu (TBOF). Flurbiprofen (**4.34**) poddano estryfikacji w acetonitrylu w obecności immobilizowanej lipazy B z *Candida antarctica* (Novozym),

⁶⁸ Morrone, R.; Piattelli, M.; Nicolosi, G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1441-1443.

natomiast kwas 2-metylowalerianowy (**4.36**) – w heksanie w obecności lipazy z *Candida rugosa* (CRL). Reakcje estryfikacji alkoholami przeprowadzono z i bez dodatku odpowiednich ortomrówczanów. W przypadku klasycznej estryfikacji (bez ortoestru) kwasu **4.34** otrzymano nieprzereagowany substrat z 80 – 85% nadmiarem enancjomerycznym po około 40 godzinach, natomiast w miarę wydłużania czasu reakcji nadmiar enancjomeryczny spadał. Natomiast, gdy w medium reakcyjnym obecne były ortoestry, wartości *e.e.* wzrastały nawet po wydłużeniu czasu reakcji (a tym samym wzroście konwersji). W przypadku wszystkich przebadanych ortomrówczanów po 140 godzinach inkubacji otrzymano kwas **4.34** z wydajnością 60 – 70% i 95 – 98% nadmiarem enancjomerycznym. Wyniki otrzymane dla kwasu 2-metylowalerianowego (**4.36**) były podobne jak w przypadku flurbiprofenu (**4.34**) dla obu typów reakcji. Najlepszy rozdział kinetyczny badanych kwasów uzyskano, gdy dodano ortomrówczan tributylu do reakcji. Wartości konwersji i nadmiaru enancjomerycznego wynosiły odpowiednio: 65% i 97% dla flurbiprofenu (**4.34**) oraz 70% i >98% dla kwasu 2-metylowalerianowego (**4.36**). Ortoestry zastosowane w rozdziale kinetycznym kwasów karboksylowych minimalizują niepożądany wpływ wody tworzącej się w czasie reakcji. Woda wpływa negatywnie nie tylko na stan równowagi reakcji, lecz także na czystość optyczną nieprzereagowanego substratu, która nie może ulec podwyższeniu poprzez zwykle wydłużenie konwersji. Ortomrówczany wiążą wodę w czasie hydrolizy i tym samym zapobiegają reakcji odwracalnej.

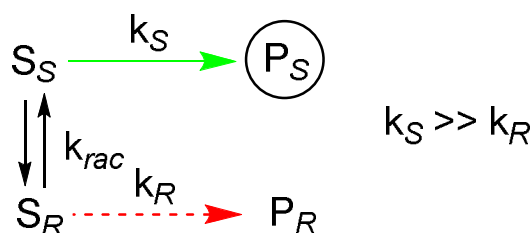
Innymi związkami chemicznymi zapewniającymi utrzymanie wody na niskim poziomie podczas enzymatycznej estryfikacji są węglany dialkylowe⁶⁹ i acetylooctany alkilowe⁷⁰. Substancje te, podobnie jak ortoestry, zużywają powstającą w czasie estryfikacji cząsteczkę wody do hydrolizy, zapewniając nieodwracalność reakcji enzymatycznej.

4.2. Dynamiczny rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej

⁶⁹ Morrone, R.; D'Antona, N.; Lambusta, D.; Nicolosi, G.; *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2010**, *65*, 49-51.

⁷⁰ Jeromin, G. E.; Zoor, A.; *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 925-928.

Pomimo rozwoju badań nad opracowaniem wydajnego rozdziału kinetycznego i uzyskiwaniem coraz lepszych parametrów tej reakcji (wydajność, nadmiar enancjomeryczny, enancjoselektywność), ograniczeniem nie do przewyższenia jest maksymalnie 50% teoretyczna wydajność tego procesu. Aby otrzymać pożądany enancjomer z większą wydajnością, niezbędne jest wykonanie dodatkowych przemian, takich jak izolacja, racemizacja i recykling niechcianego izomeru. Ta bariera rozdziału kinetycznego może być jednak przewyższona poprzez wprowadzenie do reakcji katalizatora zapewniającego racemizację substratu podczas rozdziału. Wówczas taki proces jest nazywany dynamicznym rozdziałem kinetycznym (DKR). Zaletą tej metody jest to, iż cały substrat może ulec przemianie w optycznie czysty produkt. Dynamiczny rozdział kinetyczny jest połączeniem rozdziału kinetycznego z racemizacją *in situ* dwóch enancjomerów (Schemat 17)⁷¹. Poprzez ciągłe utrzymywanie dwóch enancjomerów w równowadze, szybciej reagujący enancjomer nigdy nie będzie usunięty z mieszaniny reakcyjnej.



Schemat 17. Dynamiczny rozdział kinetyczny

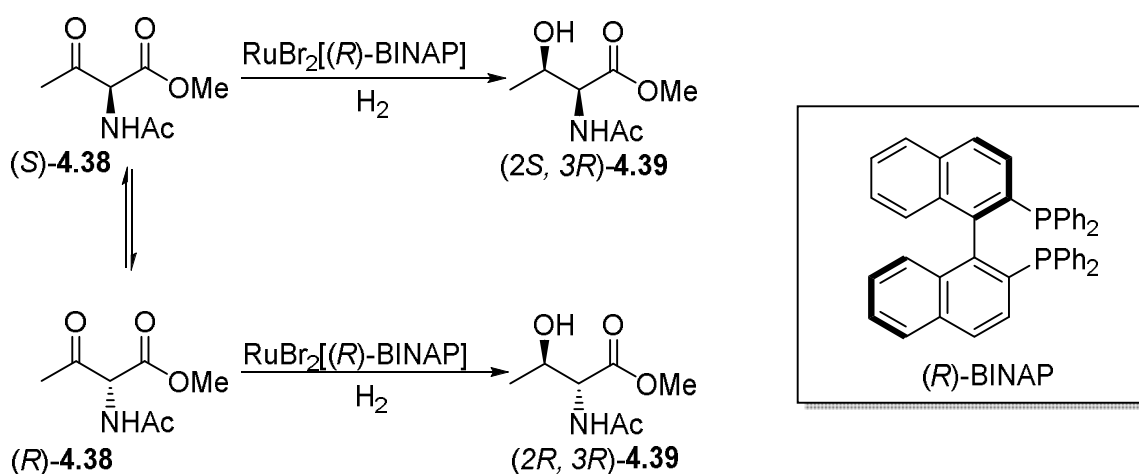
W celu uzyskania dobrego dynamicznego rozdziału kinetycznego muszą zostać spełnione następujące warunki: rozdział kinetyczny musi być wydajny ($k_S \gg k_R$), stała szybkości racemizacji k_{rac} musi być równa lub większa niż stała szybkości przemiany szybciej reagującego enancjomeru (np. $k_S, k_{rac} \geq k_S$). Jednakże w sytuacji, gdy wartość enancjoselektywności E jest bardzo wysoka, k_{rac} może być mniejsza niż k_S . We wszystkich przypadkach stała racemizacji musi być większa niż stała szybkości przemiany drugiego enancjomeru (k_R)⁷². Bardzo ważne jest, aby procesy rozdziału kinetycznego i racemizacji były kompatybilne. Należy tak dobrać środowisko, aby nie zachodziła racemizacja produktu.

⁷¹ Pamies, O.; Backvall, J.-E.; *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247-3261.

⁷² Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Backvall, J.-E.; *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321-331.

Racemizacja substratu może zostać przeprowadzona za pomocą metod chemicznych, biokatalitycznych, a nawet spontanicznie. Termodynamicznie jest to proces faworyzowany, wywołany wzrostem entropii powodowanym mieszanym się dwóch enancjomerów. Racemizację można sklasyfikować w zależności od metody na racemizację termiczną, racemizację katalizowaną zasadowo, racemizację katalizowaną kwasowo, racemizację poprzez tworzenie zasad Schiffa, racemizację katalizowaną enzymatycznie, racemizację poprzez reakcje redoks i reakcje rodnikowe⁷³. Spośród powyższych metod, w DKR mogą zostać zastosowane tylko te metody, które zachodzą jednoetapowo w łagodnych warunkach. Rozdział kinetyczny natomiast może odbywać się z zastosowaniem katalizatorów stosowanych w klasycznym KR.

Dynamiczny rozdział kinetyczny jest stosunkową nową metodą otrzymywania związków optycznie czystych. Pierwszy przykład tego typu reakcji został opisany w 1989 roku przez Prof. Noyori (Schemat 18).⁷⁴



Schemat 18. Pierwsze zastosowanie DKR

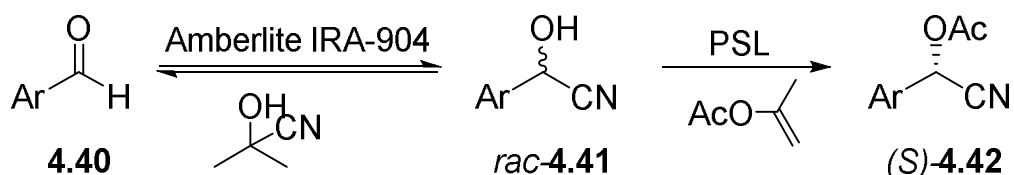
Podstawiony w pozycji 2. β -ketoester **4.38** ulega szybkiej racemizacji poprzez tautomerię keto-enolową. W warunkach stereoselektywnego uwodornienia katalizowanego przez kompleks rutenu z 2,2'-bis(difenylofosfino)-1,1'-binaftylem (BINAP) ($\text{RuBr}_2[(R)\text{-BINAP}]$) w dichlorometanie racemiczny związek **4.38** ulega przemianie w zabezpieczoną *L*-treoninę (**(2S,3R)-4.39**) (98% *e.e.*) i allotreoninę (**(2R,3R)-4.39**)

⁷³ Ebbers, E. J.; Ariaans, G. J. A.; Houbiers, J. P. M.; Bruggink, A.; Zwanenburg, B.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9417-9476.

⁷⁴ Noyori R.; Ikeda, T.; Ohkuma, T.; Widhalm, M.; Kitamura, M.; Takaya, H.; Akutagawa, S.; Sayo, N.; Saito, T.; Taketomi, T.; Kumobayashi, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9134-9135.

z selektywnością syn:anti 99:1 i konwersją 100%. W przypadku tej reakcji dobór substratów jest ograniczony ze względu na labilność konfiguracyjną związków.

Pierwszy enzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny miał miejsce dwa lata później⁷⁵. Wówczas przeprowadzono enzymatyczne acylowanie cyjanohydrin **4.41** do (*S*)-octanów **4.42**, a mniej reaktywny enancjomer ulegał racemizacji *in situ* w odwracalnej reakcji transhydrocyjanowania (Schemat 19).



Schemat 19. Pierwszy enzymatyczny DKR

Aromatyczne aldehydy **4.40** zostały przekształcone w sposób odwracalny w odpowiednie cyjanohydryny **4.41** w reakcji transhydrocyjanowania z acetonocyjanohydryną, katalizowanej za pomocą żywicy anionowymiennej (Amberlite IRA-904). Powstałe w ten sposób racemiczne związki **4.41** zostały poddane enancjoselektywnemu acylowaniu octanem izopropylu w reakcji transestryfikacji, katalizowanej przez lipazę z *Pseudomonas sp.* (PSL), w wyniku czego otrzymano optycznie czyste (*S*)-octany cyjanohydrin **4.42**, z wysokim nadmiarem enancjomerycznym ($c = 64 - 96\%$, $e.e. = 70 - 91\%$). Pierwszy przypadek enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego zapoczątkował rozwój badań nad tą metodą. Obecnie jest to jeden z popularniejszych sposobów syntezy związków optycznie czystych.

4.2.1. Chemoenzymatyczny DKR - tandem metal – enzym

Największy postęp w opracowywaniu dynamicznego rozdziału kinetycznego katalizowanego hydrolazami został osiągnięty, gdy tą metodę połączono z racemizacją substratu *in situ* za pomocą katalizatorów metalicznych. Katalizatory te są kompleksami metali przejściowych, takich jak pallad, ruten, rod, aluminium, wanad czy iryd. W literaturze opisano wiele reakcji racemizacji za pomocą kompleksów metali, jednakże ich połączenie z rozdziałem kinetycznym nie zawsze jest proste do wykonania. Główny problem stanowi kompatybilność enzymu i katalizatora chemicznego, gdyż zazwyczaj te

⁷⁵ Inagaki, M.; Hiratake, J.; Nishioka, T.; Oda, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9360-9361.

dwa katalizatory pracują w całkowicie odmiennych warunkach. Poza tym istnieje ryzyko, że metal będzie interferować z enzymem, co skutkuje słabym rozdziałem. Z drugiej strony, enzym może spowalniać lub nawet inhibować racemizację katalizatorami metalicznymi⁷⁶. Dobór odpowiednich katalizatorów jest zatem elementem kluczowym reakcji DKR.

Przy opracowywaniu chemoenzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego należy również zwrócić uwagę na takie parametry jak: rozpuszczalnik, temperatura oraz dobór pozostałych reagentów. Wybór odpowiedniego środowiska reakcji jest niezwykle istotny nie tylko ze względu na wpływ na reakcję enzymatyczną (estryfikacja, transestryfikacja), ale także na szybkość racemizacji. Aktywność lipaz zazwyczaj wzrasta w rozpuszczalnikach nieprotoczących takich jak: heksan czy etery dialkylowe. Jednakże, w tego typu rozpuszczalnikach racemizacja katalizowana kompleksami metali przejściowych zachodzi powoli ze względu na niską rozpuszczalność tych katalizatorów.

Temperatura jest kolejnym ważnym parametrem wpływającym na DKR. Racemizacja zazwyczaj zachodzi szybciej w wyższych temperaturach, natomiast enzym może ulec denaturacji w takich warunkach. Wyjściem z tej sytuacji może być stosowanie biokatalizatorów immobilizowanych, gdyż osadzenie enzymów na niektórych nośnikach zwiększa ich odporność na wysoką temperaturę.

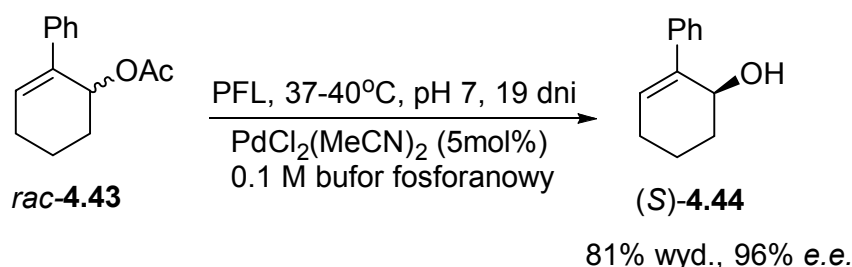
Dobór odpowiednich reagentów reakcji rozdziału kinetycznego jest jednym z ważniejszych zadań przy opracowywaniu dynamicznego rozdziału kinetycznego. Często związki zapewniające bardzo dobry rozdział kinetyczny (np. donory grupy acylowej w enzymatycznej transestryfikacji) nie sprawdzają się w przypadku DKR. Dzieje się tak, ponieważ substancje te mogą oddziaływać z katalizatorami metalicznymi. Planując chemoenzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny, należy zoptymalizować szereg parametrów mających wpływ na wydajność tego procesu.

Pierwszy przykład enzymatycznego rozdziału dynamicznego z zastosowaniem racemizacji katalizowanej metalami przejściowymi został opisany w 1996 roku przez grupę Prof. Williams'a⁷⁷. Cykliczne pochodne octanu allilu (**4.43**) poddano hydrolizie enzymatycznej lipazą z *Pseudomonas fluorescens* (PFL). Nieprzereagowany substrat ulegał racemizacji katalizowanej przez kompleks π -palladu PdCl₂(MeCN)₂ (Schemat 20). W wyniku tej reakcji otrzymano alkohol allilowy **4.44** o konfiguracji (*S*) z wydajnością

⁷⁶ Martin-Matute, B.; Backvall, J.-E.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232.

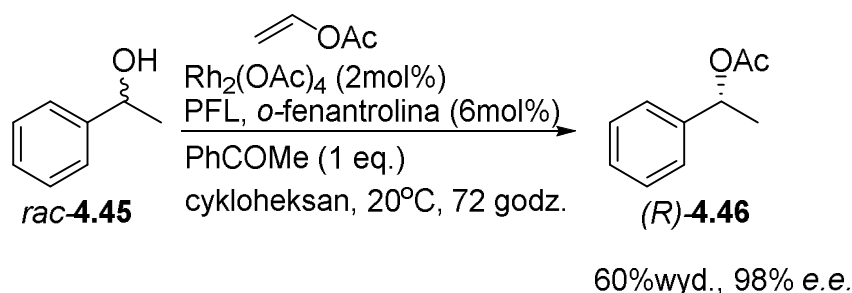
⁷⁷ Allen, J. V.; Williams, J. M. J.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1859-1862.

81% i nadmiarem enancjomerycznym 96%. Pomimo tego, że pierwszy enzymometaliczny DKR nie nadawał się do praktycznego zastosowania (czas reakcji wynosił 19 dni), badania te pokazały możliwość połączenia katalizy kompleksami metali przejściowych z enzymami.



Schemat 20. Pierwszy enzymometaliczny DKR

Nieco później ta sama grupa naukowców opublikowała enzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny alkoholi drugorzędowych niezwiązanych wiązania podwójnego C=C w pozycji α z zastosowaniem racemizacji katalizowanej kompleksami rodu i irydu (Schemat 21).⁷⁸ Mechanizm działania tych katalizatorów polega na odwracalnym przeniesieniu wodoru.



Schemat 21. DKR alkoholi drugorzędowych

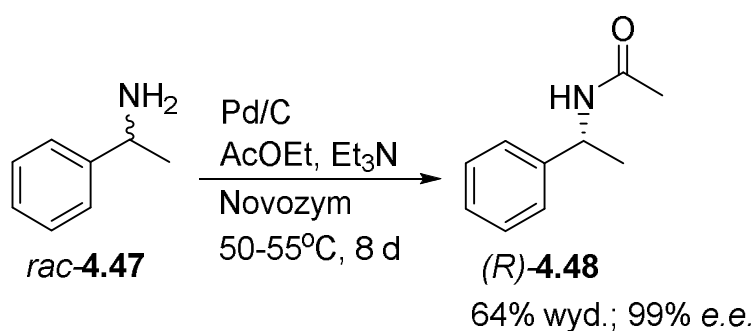
Spośród testowanych katalizatorów metalicznych, najlepsze wyniki otrzymano dla dimeru octanu rodu ($\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$), który w połączeniu z enzymatyczną transestryfikacją octanem winylu katalizowaną przez lipazę z *Pseudomonas fluorescens* (PFL) pozwolił na otrzymanie octanu (*R*)-1-fenyletanolu (**4.46**) z wydajnością 60% i nadmiarem enancjomerycznym 98%. Niestety, metoda ta nie jest wolna od wad, takich jak niska całkowita wydajność DKR oraz potrzeba dodania do medium reakcyjnego *o*-fenantroliny i acetofenonu w celu poprawy wydajności racemizacji. Jednakże, pomimo

⁷⁸ Dinh, P. M.; Howarth, J. A.; Hudnott, A. R.; Williams, J. M. J.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7623-7626.

niedoskonałości tego rozdziału dynamicznego, praca ta jest niezwykle ważna, gdyż ukazuje potencjał zastosowania katalizatorów metalicznych, których działanie polega na przeniesieniu wodoru, jako ogólną metodę racemzacji alkoholi.

Od tego czasu nastąpił rozwój badań nad opracowaniem tego typu katalizatorów⁷⁹.

Równocześnie z opracowaniem enzymatycznego DRK z racemizacją za pomocą kompleksów metali przejściowych pojawiły się doniesienia na temat wykorzystania tej metody do rozdziału chiralnych amin. Pionierem w tej dziedzinie była grupa Prof. Reetz'a, która w 1996 roku poddała racemiczną 1-fenyletyloaminę (**4.47**) enzymatycznemu *N*-acylowaniu octanem etylu katalizowanemu przez Novozym (immobilizowana CAL-B) oraz jednoczesnej racemizacji za pomocą palladu na węglu (Schemat 22)⁸⁰.



Schemat 22. DKR 1-fenyletyloaminy

W wyniku powyższej przemiany otrzymano amid **4.48** o konfiguracji (*R*) z wydajnością 64% i nadmiarem enancjomerycznym 99%. Racemizacja aminy poprzez tautomerię amina – imina katalizowaną przez Pd(0) zachodziła jednak bardzo wolno (czas reakcji 8 dni).

Dynamiczny rozdział kinetyczny amin jest reakcją sprawiającą trudności. Głównym problemem jest brak wydajnych katalizatorów racemizujących aminy. Wynika to z faktu, iż aminy zachowują się jak ligandy silnie koordynujące, a więc mogą powodować inhibicję lub całkowitą deaktywację katalizatora metalicznego. Dodatkowym utrudnieniem przy racemizacji tych związków jest generowanie imin jako produktów pośrednich. Iminy są wysoce reaktywne i biorą udział w reakcjach ubocznych, co skutkuje obniżeniem wydajności reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego pod kątem uzyskania pożądanego produktu.

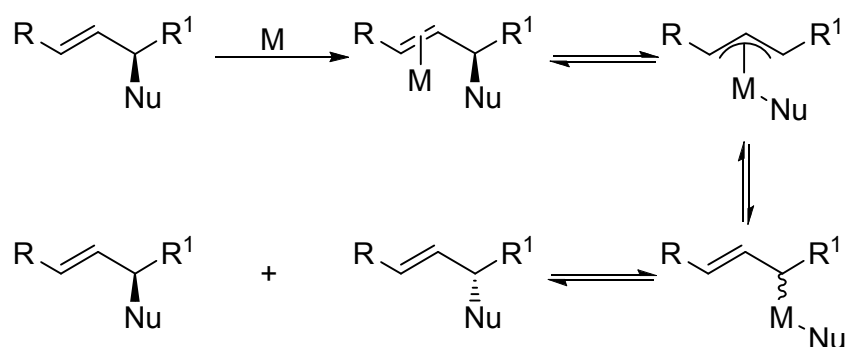
⁷⁹ (a) Bartoszewicz, A.; Ahlsten, N.; Martin-Matute, B; *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7274-7302; (b) Warner, M.; Backvall, J.-E.; *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2545-2555.

⁸⁰ Reetz, M. T.; Schimossek, K.; *Chimia* **1996**, *50*, 668-669.

4.2.1.1. Mechanizmy działania katalizatorów metalicznych

Metale przejściowe katalizują racemizację różnych substratów. W zależności od typu związku poddawanego temu procesowi oraz rodzaju katalizatora, można wyróżnić dwa mechanizmy działania katalizatorów metalicznych: racemizacja poprzez tworzenie kompleksu π -allilowego oraz racemizacja poprzez przeniesienie wodoru.

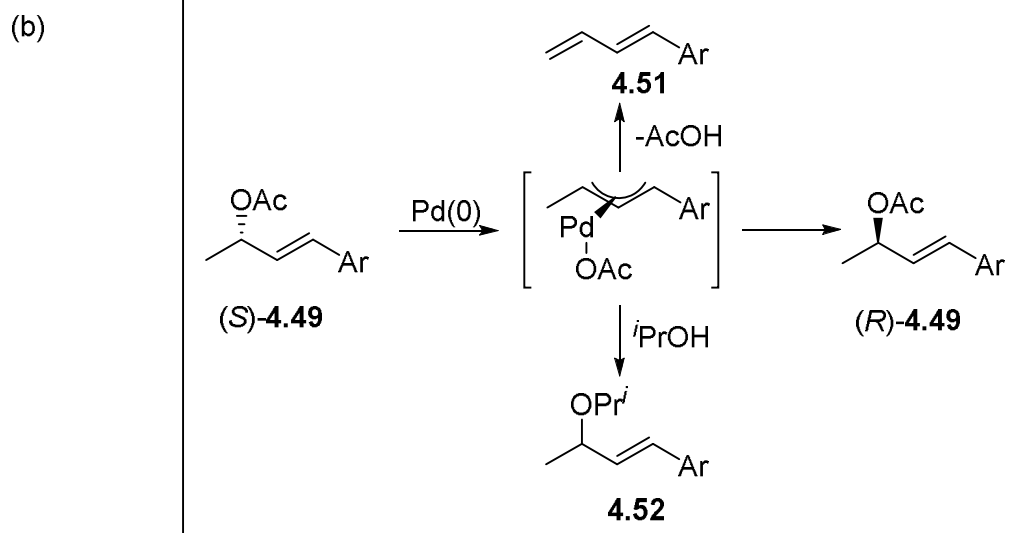
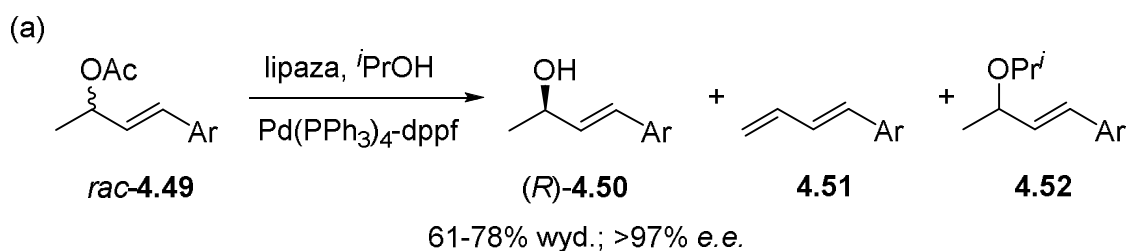
Substraty allilowe (najczęściej allilowe alkohole lub estry) są racemizowane poprzez przegrupowanie [1,3] grupy octanowej (w przypadku estrów) lub hydroksylowej (alkohole). Reakcja kompleksu metalu ze związkami allilowymi skutkuje powstaniem produktu pośredniego π -allilu, który jest w równowadze z oboma enancjomerami substratu (Schemat 23).



Schemat 23. Racemizacja poprzez tworzenie kompleksu π -allilowego

W przypadku racemizacji estrów allilowych najczęściej używa się kompleksów palladowych. Przykładem tego typu transformacji jest dynamiczny rozdział kinetyczny 1,3-dipodstawionych octanów allilowych (4.49) z zastosowaniem immobilizowanych enzymów (lipazy z *Candida actarctica* lub *Pseudomonas cepacia*) oraz kompleksu Pd(PPh₃)₄-dppf (dppf: 1,1'-bis(difenylofosfino)ferrocen) jako katalizatora racemizacji (Schemat 24a)⁸¹. W reakcji użyto również 2-propanolu, który pełni funkcję akceptora grupy acylowej w transestryfikacji, a jego octany można łatwo usunąć po zakończeniu reakcji.

⁸¹ Choi, Y. K.; Suh, J. H.; Lee, D.; Lim, I. T.; Jung, J. Y.; Kim, M.-J.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8423-8424.



Schemat 24. DKR octanów allilu

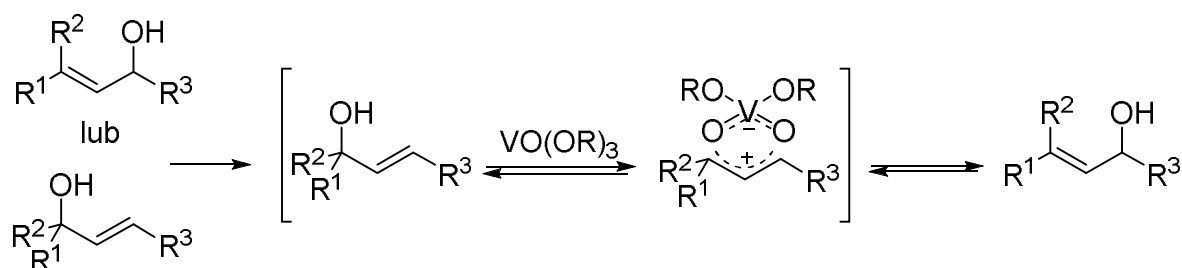
Zaobserwowano, iż podczas racemizacji kompleksem Pd(0) w obecności 2-propanolu zachodzą dwie reakcje uboczne – eliminacji i substytucji, w wyniku których powstają produkty **4.51** i **4.52** (Schemat 24b). Pożądane produkty (alkohol **4.50**) otrzymano z wysoką czystością optyczną (*e.e.* > 97%) w postaci enancjomerów o konfiguracji (*R*) oraz z wydajnością 61 – 78%. Czas reakcji wynosił 1.5 – 3 dni.

Stosunkowo nowym podejściem w dynamicznym rozdziale kinetycznym substratów allilowych jest połączenie acylowania katalizowanego przez lipazy z racemizacją zachodzącą poprzez tworzenie intermediatów wanadanu allilu (Schemat 25). Kompleksy oksowanadu oraz innych metali przejściowych połączonych z tlenem takich jak: wolfram, molibden czy ren od dawna używane są jako katalizatory przegrupowania [1,3] alkoholi allilowych⁸². W wyniku tej reakcji wytwarza się równowaga pomiędzy substratami oraz ich izomerami, a struktura dostarczanego produktu zależy od stabilności termodynamicznej dwóch izomerów. Co więcej, chiralność optycznie czynnych alkoholi allilowych nie zawsze jest zachowana⁸³.

⁸² (a) Chabardes, P.; Kuntz, E.; Varagnat, J.; *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1775-1783; (b) Bellemin-Laponnaz, S.; Le Ny, J. P.; Dedieu, A.; *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 57-64.

⁸³ Akai, S.; *Chem. Lett.* **2014**, *43*, 746-754.

Pierwsze zastosowanie katalizatora oksowanadowego $[\text{VO}(\text{OSiPh}_3)_3]$ w połączeniu z rozdziałem kinetycznym katalizowanym przez lipazę B z *Candida antarctica* (CAL-B) pozwoliło otrzymać estry allilowe z bardzo dobrą wydajnością i nadmiarem enancjomerycznym ($c > 80\%$, $e.e. > 91\%$)⁸⁴. Jednakże wadą tej metody jest ograniczona dostępność substratowa – alkohole allilowe muszą być jednakowo dipodstawione w pozycji allilowej ($R^1 = R^2$), ponieważ wymagana jest rotacja wiązania pojedynczego C-C w trzeciorzędowym intermedacie alkoksylowym). Ewentualnie, R^1 lub R^2 może być wodorem, jeżeli dwa allilowe alkohole tworzone poprzez migrację grupy hydroksylowej są enancjomerami (np. cykliczne octany allilowe).



Schemat 25. Racemizacja alkoholi allilowych przez kompleks oksowanadu

Badania nad opracowaniem wydajnych katalizatorów wanadowych doprowadziły do powstania katalizatora drugiej generacji – fosfonianu wanadylu związanego na polimerze, który zapewnił lepszą racemizację substratów⁸⁵. Niestety, kilkudniowa inkubacja tego katalizatora z lipazą powodowała jego deaktywację. W związku z tym, opracowano trzeci rodzaj katalizatora oksowanadowego, V-MPS, w którym część oksowanadowa jest kowalencyjnie związana z wewnętrzną powierzchnią krzemionki mezoporowatej⁸⁶, co zapewnia jego lepszą stabilność. Połączenie tego katalizatora z lipazą dało doskonały rozdział dynamiczny w odniesieniu do wydajności i nadmiaru enancjomerycznego. V-MPS jest także kompatybilny z lipazami.

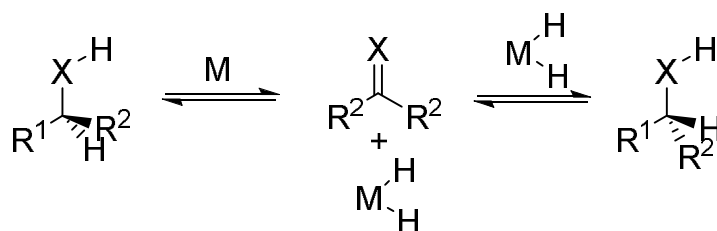
Jak wcześniej wspomniano, drugim mechanizmem racemizacji katalizowanej przez metale przejściowe jest przeniesienie wodoru (Schemat 26). Reakcja ta jest definiowana jako redukcja wiązań wielkokrotnych za pomocą donora wodorowego

⁸⁴ Akai, S.; Tanimoto, K.; Kanao, Y.; Egi, M.; Yamamoto, T.; Kita, Y.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2592-2595.

⁸⁵ Akai, S.; Hanada, R.; Fujiwara, N.; Kita, Y.; Egi, M.; *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4900-4903.

⁸⁶ Egi, M.; Sugiyama, K.; Saneto, M.; Hanada, R.; Kato, K.; Akai, S.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3654-3658.

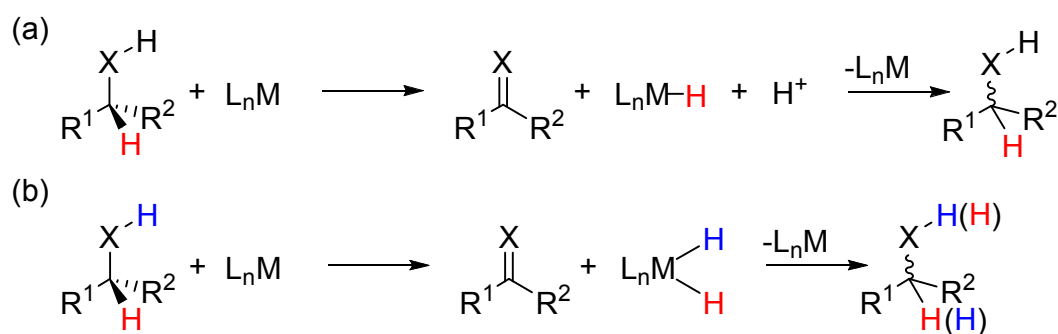
w obecności katalizatora⁸⁷. Rolą katalizatora jest przeniesienie dwóch atomów wodoru z donora na akceptor. Najczęściej technika ta jest stosowana do racemizacji drugorzędowych alkoholi i amin⁸⁸.



Schemat 26. Racemizacja za pomocą przeniesienia wodoru

Ostatnie badania wskazują, że dla powyższej reakcji możliwe są dwie ścieżki, w zależności od tego, jaki rodzaj metalu zastosowano. Dla głównej grupy metali dominującą ścieżką jest bezpośrednie przeniesienie wodoru, natomiast dla metali przejściowych – ścieżka wodorkowa. Do racemizacji substratów w dynamicznym rozdziale kinetycznym stosuje się katalizatory metali przejściowych, w związku z tym tylko ścieżka charakterystyczna dla tych związków zostanie omówiona.

Jak wspomniano wcześniej, metale przejściowe działają za pomocą mechanizmu wodorkowego. Cechą tych katalizatorów jest to, iż kluczowym produktem pośrednim zaangażowanym w reakcję przeniesienia wodoru jest wodorek metalu. W przypadku ścieżki wodorkowej można rozróżnić dwa mechanizmy działania katalizatorów: dla monowodorków metali (Schemat 27a) i dla diwodorków metali (Schemat 27b)⁸⁹.



Schemat 27. Możliwe mechanizmy reakcji przeniesienia wodoru katalizowanej przez metale przejściowe

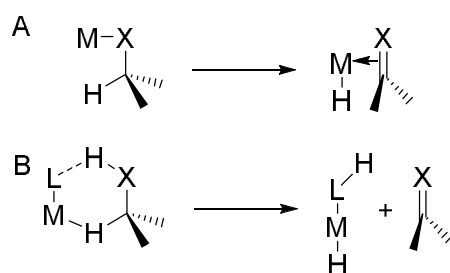
⁸⁷ Zassinovich, G.; Mestroni, G.; Gladiali, S.; *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1051-1069,

⁸⁸ Huerta, F. F.; Minidis, A.; Backvall, J.-E.; *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321-331.

⁸⁹ Pamies, O.; Backvall, J.-E.; *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247-3261.

W pierwszym z prezentowanych mechanizmów tylko jeden atom wodoru (C-H) jest przenoszony z substratu na metal, natomiast w drugim – oba atomy wodoru (C-H i X-H). Mechanizmy te mogą być rozróżnione za pomocą znakowania substratu deuterem. W przypadku mechanizmu monowodorkowego (Schemat 27a), atomy wodoru zachowują swoją tożsamość, podczas gdy w drugim przypadku atomy wodoru będą pomieszane pomiędzy C i X (Schemat 27b).⁹⁰ Eksperymentalnie dowiedziono, że katalizatory rodowe i irydowe preferują mechanizm monowodorkowy, natomiast w przypadku katalizatorów rutenowych racemizacja może zachodzić za pomocą obu typów mechanizmów, w zależności od użytych ligandów.

Mechanizm monowodorkowy może być dalej podzielony na dwie zasadniczo różne ścieżki – wewnątrzsferyczne i zewnątrzsferyczne przeniesienie wodoru. W obu mechanizmach wódz migruje z metalu na węgiel karbonylowy, w wyniku czego tworzy się α -CH. Powstawanie monowodorku metalu z donora wodoru obejmuje tworzenie się alkoholatu metalu, który ulega następnie β -eliminacji, dając M-H (Schemat 28A). W przypadku ww. mechanizmu przeniesienie wodoru zachodzi na wewnętrznej sferze metalu. Proces ten może zachodzić także inaczej, na zewnętrznej sferze metalu i wtedy substrat nie przyłącza się do metalu (Schemat 28B). Przeniesienie wodoru za pomocą tego mechanizmu następuje albo w sposób skoordynowany, albo w dwóch oddzielnych etapach, w których protonowanie substratu poprzedza przeniesienie wodoru. W wielu przypadkach trudno określić, za pomocą którego mechanizmu reakcja zachodzi. Nawet małe modyfikacje ligandu oraz własności elektronowych substratu mogą zmienić mechanizm działania katalizatora.

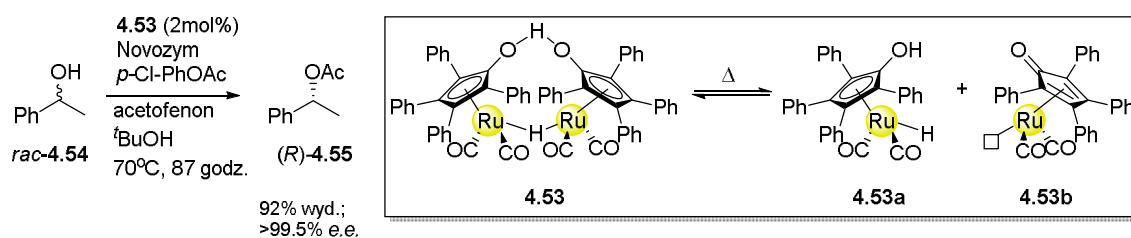


Schemat 28. Typy mechanizmów monowodorkowych

Metale przejściowe katalizujące reakcje przeniesienia wodoru są wykorzystywane do racemizacji alkoholi drugorzędowych i amin. Połączenie tego typu racemizacji z acylowaniem katalizowanym lipazami zostało wprowadzone przez grupę

⁹⁰ Samec, J. S. M.; Backvall, J.-E.; Andersson, P. G.; Barndt, P.; *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 237-248.

Prof. Williamsa w 1996 roku, co zostało wcześniej omówione.⁹¹ Duży wkład w rozwój tej metody i opracowanie nowych wydajnych katalizatorów racemizacji ma grupa Prof. Bäckvalla, która stworzyła pierwszy praktyczny system dynamicznego rozdziału kinetycznego alkoholi drugorzędowych z wykorzystaniem Novozyumu (immobilizowana lipaza B z *Candida antarctica*) oraz dimerycznego kompleksu rutenowego – katalizatora Shvo (**4.53**) (Schemat 29).⁹²



Schemat 29. DKR alkoholi drugorzędowych za pomocą katalizatora Shvo i Novozyumu

W wyniku ww. reakcji z racemicznego 1-fenyletanolu (**4.54**) otrzymano (*R*)-octan 1-fenyletanolu (**4.55**) o wysokiej czystości optycznej (*e.e.* > 99.5%) oraz z dobrą wydajnością (*c* = 92%). Metoda ta okazała się być użyteczną dla rozdziału wielu alkoholi alifatycznych i benzyłowych. Jednakże system ten nie jest wolny od wad. Niezbędna jest dość wysoka temperatura: 70°C, aby kompleks Shvo rozpadł się na dwa monomery **4.53a** i **4.53b**, które uczestniczą w racemizacji poprzez zewnątrzsferyczny mechanizm redoks.⁹³ Ponadto, ze względu na wymaganą aktywację, katalizator Shvo może pracować jedynie z lipazami termostabilnymi, co ogranicza ilość enzymów możliwych do zastosowania w DKR. Kolejnym problemem związanym z zastosowaniem kompleksu **4.53** jest to, iż może być on użyty tylko z aktywowanymi estrami aryłowymi, takimi jak octan *p*-chlorofenyłu, ponieważ proste donory acylowe kolidują z racemizacją, co skutkuje powstawaniem znacznej ilości ketonowych produktów ubocznych. Pomimo tych ograniczeń kompleks Shvo w połączeniu z niektórymi lipazami z powodzeniem katalizuje szereg reakcji DKR β-azydoalkoholi,⁹⁴ benzoin,⁹⁵ β-haloalkoholi⁹⁶,

⁹¹ Dinh, P. M.; Howarth, J. A.; Hudnott, A. R.; Williams, J. M. J.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623-7626.

⁹² Larsson, A. L. E.; Parsson, B. A.; Backvall, J.-E.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211-1212.

⁹³ Conley, B. L.; Pennington-Boggio, M. K.; Boz, E.; Williams, T. J.; *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2294-2312.

⁹⁴ Pamies, O.; Backvall, J.-E.; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4022-4025.

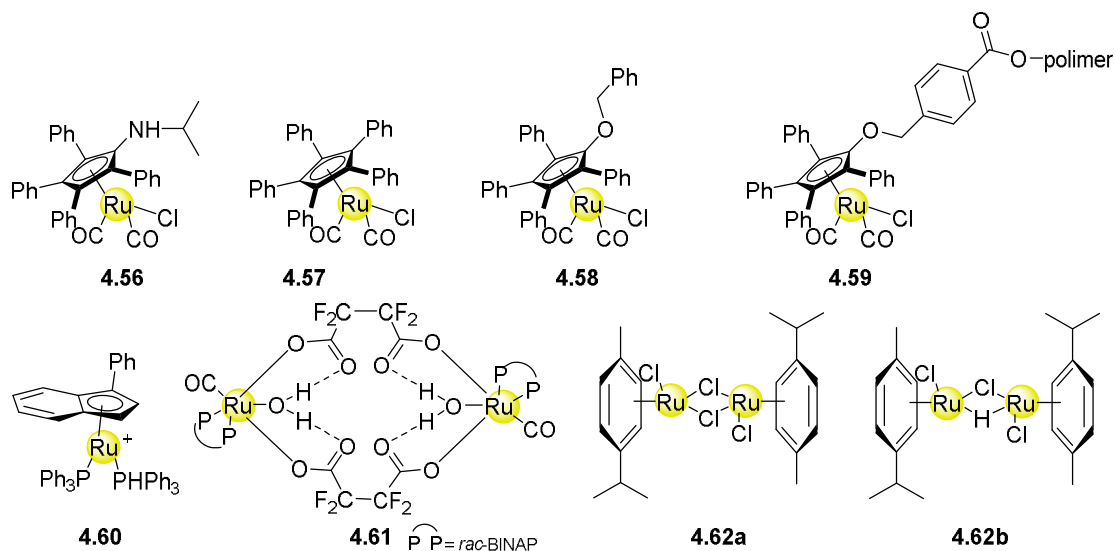
⁹⁵ Hoyos, P.; Fernandez, Sinisterra, J. V.; Alcantara, A. R.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7632-7637.

⁹⁶ Pamies, O.; Bäckvall, J. -E.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9006-9010.

γ -hydroksyamidów⁹⁷, estrów hydroksykwasów⁹⁸, a nawet alkoholi pierwszorzędowych podstawionych w pozycji β ⁹⁹.

Równocześnie trwały prace nad odkryciem bardziej aktywnych katalizatorów, które umożliwiłyby wydajniejszą racemizację substratów w łagodniejszych warunkach i byłyby kompatybilne z szerszą gamą enzymów.

Najliczniejszą grupą katalizatorów działających za pomocą mechanizmu przeniesienia wodoru są kompleksy rutenu (Rysunek 5)¹⁰⁰.



Rysunek 5. Przykłady katalizatorów rutenowych używanych do racemizacji substratów w DKR

Przełom w badaniach nad tego typu kompleksami nastąpił w 2002 roku, kiedy to zsyntetyzowano kompleks 4.56, który zapewnia wydajną racemizację alkoholi drugorzędowych w temperaturze pokojowej¹⁰¹. W przeciwieństwie do katalizatora Shvo, kompleks 4.56 nie wymaga aktywacji za pomocą wysokiej temperatury, aktywowany jest bowiem za pomocą *tert*-butanolanu potasu. Podobnie jest z katalizatorem 4.57, który nawet w niewielkiej ilości (0.5 %_{mol}) jest w stanie zracemizować cały substrat w bardzo krótkim czasie (10 minut)¹⁰². Dalszy rozwój prac nad katalizatorami rutenowymi opartymi na rdzeniu cyklopentadienyłowym doprowadził do powstania katalizatorów

⁹⁷ Fransson, A.-B. L.; Boren, L.; Pamies, O.; Backvall, J.-E.; *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2582-2587.

⁹⁸ (a) Runmo, A.-B. L.; Pamies, O.; Faber, K.; Backvall, J.-E.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2983-2986; (b) Huerta, F. F.; Backvall, J.-E.; *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1209-1212; (c) Kim, M.-J.; Choi, Y. K.; Choi, M. Y.; Kim, M. J.; Park, J.; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4736-4738; (d) Huerta, F. F.; Laxmi, Y. R. S.; Backvall, J.-E.; *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1037-1040.

⁹⁹ (a) Strubing, D.; Krumlinde, P.; Piera, J.; Backvall, J.-E.; *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1577-1581; (b) Atuu, M. R.; Hossain, M. M.; *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3875-3878.

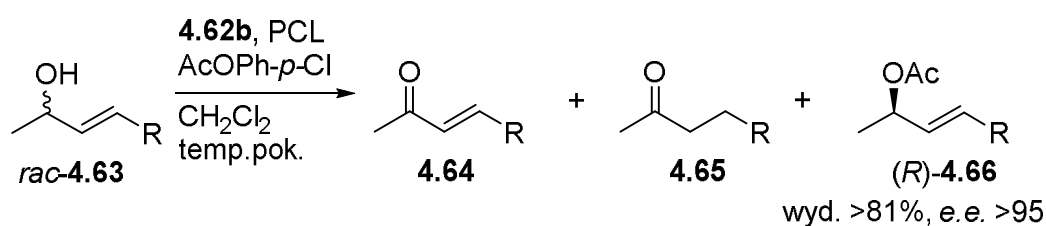
¹⁰⁰ Ahn, Y.; Ko, S.-B.; Kim, M.-J.; Park, J.; *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 647-658.

¹⁰¹ Choi, J. H.; Kim, Y. H.; Nam, S. H.; Shin, S. T.; Kim, M. -J.; Park, J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2373-2376.

¹⁰² Csjernyik, G.; Bogar, K.; Backvall, J.-E.; *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6799-6802.

4.58 i **4.59**, które, w przeciwieństwie do poprzednich kompleksów, są stabilne w atmosferze powietrza¹⁰³. Dodatkowo, osadzenie katalizatora (**4.59**) na polimerze pozwala na jego użycie nawet w trzech cyklach DKR. Kolejnym użytecznym katalizatorem racemizacji jest związek **4.60**. Ten kationowy rutenowy kompleks indenylu jest aktywowany za pomocą łagodnej zasady – węglanu potasu (K₂CO₃). Połączenie tego katalizatora z Novozymem pozwoliło uzyskać bardzo dobry rozdział dynamiczny wielu alkoholi drugorzędowych w temperaturze pokojowej¹⁰⁴. Aktywacja za pomocą K₂CO₃ dotyczy również kompleksu **4.61**. Zastosowanie tego związku w tandemie z CAL-B zaskutkowało otrzymaniem drugorzędowych alkoholi alifatycznych, aromatycznych oraz heterocyklicznych z bardzo dobrymi wydajnościami i wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi¹⁰⁵.

Większość kompleksów rutenu katalizuje racemizację alkoholi drugorzędowych lub ich pochodnych oraz amin. Jednakże znane są także związki tego metalu, które racemizują alkohole allilowe. Racemizacja z użyciem tych katalizatorów zachodzi za pomocą mechanizmu przeniesienia wodoru, a nie jak w przypadku pozostałych substratów allilowych, za pomocą π -kompleksu. Najlepsze rezultaty w DKR alkoholi allilowych w odniesieniu do wydajności i enancjoselektywności dają katalizatory **4.62a** i **4.62b** (Rysunek 5)¹⁰⁶. W 2000 roku grupa koreańskich naukowców przeprowadziła enzymatyczną transestryfikację alkoholi allilowych octanem *p*-chlorofenyłu, katalizowaną immobilizowaną lipazą z *Pseudomonas cepacia* (PCL) z zastosowaniem katalizatora **4.62b** (Schemat 30)¹⁰⁷.



Schemat 30. DKR alkoholi allilowych.

¹⁰³ Kim, N.; Ko, S.-B.; Kwon, M. S.; Kim, M.-J.; Park, J.; *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4523-4526.

¹⁰⁴ Fernandez, J. A.; Manzini, S.; Nolan, S. P.; *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 13132-13135.

¹⁰⁵ van Nispen, S. F. G. M.; van Buijtenen, J.; Vekemans, J. A. J. M.; Meuldijk, J.; Hulshof, L. A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2299-2305.

¹⁰⁶ Kamal, A.; Azhar, M. A.; Krishnaji, T.; Malik, M. S.; Azeeda, S.; *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 569-592.

¹⁰⁷ Lee, D.; Huh, E. A.; Kim, M.-J.; Jung, H. M.; Koh, J. H.; Park, J.; *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2377-2379.

W przypadku wszystkich testowanych substratów, zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych, rozdział był jednakowo dobry i skutkowało otrzymaniem octanów **4.66** o konfiguracji (*R*). Wydajności izolowanych produktów wynosiły od 81 do 88%, a nadmiary enancjomeryczne przewyższały 95%.

4.3. Podsumowanie rozdziału

W rozdziale czwartym scharakteryzowano główne metody syntezy związków optycznie czystych oraz przedstawiono przykłady ich zastosowań. Każdy z prezentowanych sposobów posiada wady i zalety. Wybór odpowiedniej metody syntezy zależy od wielu czynników takich jak: dostępność substratów, skala, koszt, wymagana czystość optyczna czy zastosowanie otrzymanego chiralnego produktu.

Synteza związków chiralnych o stosunkowo wysokiej czystości optycznej w dużej skali, przy niewielkim nakładzie finansowym, może być wykonana za pomocą metody „*chiral pool*”. Niestety, wadą tej techniki jest ograniczony dostęp substratów. Nie wszystkie enancjomerycznie czyste prekursory są dostępne z naturalnych źródeł, a z drugiej strony problem może stanowić także brak odpowiedniego enancjomeru. Na początku lat 90. ubiegłego wieku prawie 80% chiralnych leków pochodziło z naturalnych substratów, natomiast obecnie ilość ta zmniejszyła się do około 25%¹⁰⁸.

Atrakcyjną alternatywą dla techniki „*chiral pool*” jest synteza asymetryczna. Jednak bez względu na to, który wariant syntezy asymetrycznej (z zastosowaniem chiralnego pomocnika lub katalizatora) jest użyty do otrzymywania związków optycznie czystych, problem stanowi wysoki koszt. W przypadku zastosowania chiralnego pomocnika ograniczenie stanowi m. in. niedostępność obu enancjomerów tego reagentu, wieloetapowość reakcji (dodatkowe etapy są niezbędne w celu związania i odłączenia pomocnika z substratem) oraz problemy z usunięciem pomocnika. Ponadto, kataliza asymetryczna nie jest wolna od wad. Syntezy tego typu często wymagają długich procedur, takich jak wybór odpowiedniego katalizatora i optymalizacja parametrów reakcji. Poza tym, produkty syntetyzowane z użyciem chemokatalizatorów często odznaczają się niską czystością optyczną. Z drugiej strony, zaletą syntezy asymetrycznej jest to, iż spełnia ona wymagania dotyczące aplikowania niewielkiej ilości katalizatora, a jednocześnie pozwala na otrzymanie produktu z wysoką wydajnością.

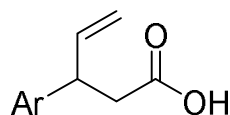
¹⁰⁸ Rouf, A.; Taneja, S. C.; *Chirality* **2014**, *26*, 63-78.

Pomimo ogromnego postępu w rozwoju metod syntezy asymetrycznej, dominującą techniką syntezy związków optycznie czystych zarówno w skali laboratoryjnej, jak i przemysłowej, jest rozdział racematów. Prawie wszystkie metody rozdziału są łatwe do wykonania oraz powiększenia skali. Główną wadą rozdziału kinetycznego jest wydajność reakcji, maksymalnie można otrzymać tylko 50% pożądanego enancjomeru. Ogromnym postępowaniem było więc połączenie rozdziału kinetycznego z racemizacją *in situ* niechcianego enancjomeru, co pozwoliło zwiększyć wydajność tej reakcji nawet do 100%. Spośród wielu metod dynamicznego rozdziału kinetycznego, jedną z najbardziej atrakcyjnych jest chemoenzymatyczny DKR.

Połączenie katalizy enzymatycznej (rozdział racematu) z chemokatalizą (racemizacja) jest atrakcyjną metodą dynamicznego rozdziału kinetycznego alkoholi i ich pochodnych oraz amin. Wiele kompleksów metali przejściowych wykazuje wysoką aktywność katalityczną w racemizacji tych substratów. Dużą popularnością cieszą się kompleksy rutenu, które działają w łagodnych warunkach reakcji i są kompatybilne z wieloma enzymami. To właśnie wybór biokatalizatora określa, jaki typ substratu może zostać poddany rozdziałowi i który enancjomer produktu jest preferowany. Najczęściej używanymi enzymami w DKR są lipazy, ze względu na ich wysoką aktywność i selektywność. Biokatalizatory te są komercyjnie dostępne oraz cechują się termostabilnością i dobrą tolerancją na warunki reakcji organicznych. Wysoka wydajność tych procesów czyni je atrakcyjną alternatywą dla istniejących metod katalizy asymetrycznej. Jednakże większość opracowanych przykładów chemoenzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego dotyczy tylko tych substratów, które łatwo ulegają racemizacji. W literaturze znanych jest wiele przykładów chemoenzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego racemicznych alkoholi oraz amin. Brak jest natomiast doniesień na temat rozdziału racemicznych chiralnych kwasów karboksylowych.

5. Kwasy 3-arylo-4-pentenowe jako prekursory związków biologicznie aktywnych

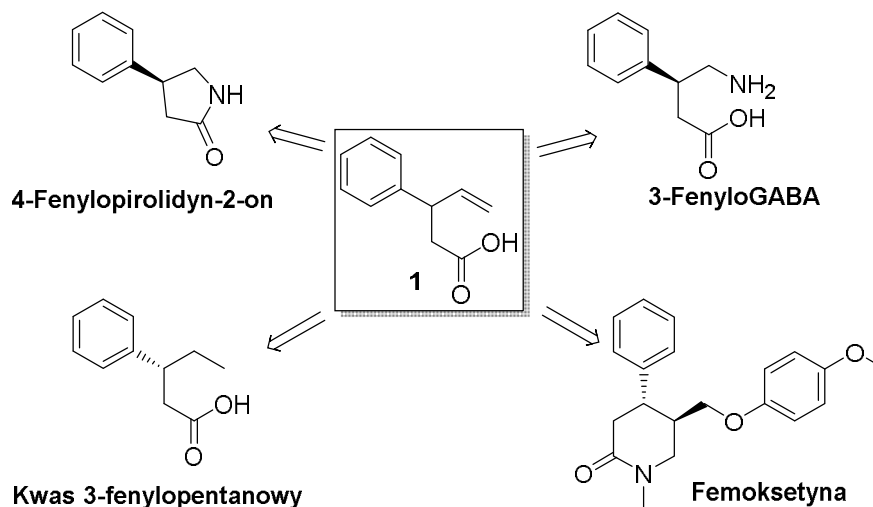
Kwasy 3-arylo-4-pentenowe (**5.1**, Rysunek 6) są klasą związków o ogromnym znaczeniu syntetycznym. Substancje tego typu stanowią cenne bloki budulcowe do syntezy substancji o udokumentowanej aktywności biologicznej.



5.1

Rysunek 6. Struktura kwasu 3-arylo-4-pentenowego

Jednym z najbardziej znanych przykładów kwasów 3-arylo-4-pentenowych jest kwas 3-fenyl-4-pentenowy (**1**). Związek ten stanowi substrat do otrzymywania wielu substancji o znaczeniu biologicznym (Rysunek 7).



Rysunek 7. Znaczenie syntetyczne kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

Enancjomerycznie czysty kwas **1** jest ważnym substratem do syntezy wielu związków biologicznie czynnych, takich jak antydepresant Femoksetyna¹⁰⁹, kwas (*R*)-3-fenylpentanowy – kluczowy substrat w syntezy związku LG 121071, będącego

¹⁰⁹ Tomkins, G.E.; Jackson, J.L.; O'Malley, P.G.; Balden, E.; Santoro, J.E.; *Am. J. Med.* **2001**, *11*, 54-63.

modulatorem receptorów androgenicznych¹¹⁰, czy 3-fenyloGABA. Kwas 4-amino-3-fenylomasłowy (3-fenyloGABA, fenibut) jest lipofilowym analogiem kwasu γ -aminomasłowego (GABA), głównego neuroprzekaźnika o działaniu hamującym w centralnym układzie nerwowym (CNS)¹¹¹. Zaburzenia w syntezie kwasu γ -aminomasłowego w ludzkim organizmie wiążą się z wystąpieniem epilepsji, choroby Huntingtona, Parkinsona¹¹², a także zaburzeń psychicznych, takich jak niepokój czy ból. Bezpośrednie zastosowanie GABA w terapii jest ograniczone ze względu na jego hydrofilową naturę. Ta właściwość powoduje, że związek ten z trudnością przenika przez barierę krew – mózg¹¹³. Fenibut został odkryty i wprowadzony do stosowania klinicznego w Rosji w latach 60. XX wieku. Biologiczna aktywność tego farmaceutyku zależy od jego konfiguracji absolutnej. Enancjomer (*R*) jest dużo bardziej aktywny niż (*S*), a także wykazuje dwukrotnie silniejsze działanie niż racemat¹¹⁴. Kwas 3-fenylo-4-pentenowy (**1**) jest także substratem do syntezy 4-fenylo-pirolid-2-onu. Związki tej klasy są selektywnymi inhibitorami cAMP fosfodiesterazy i mają zastosowanie w terapii choroby niedokrwiennej serca¹¹⁵. Związek ten jest także prekursorem do syntezy analogów kwasu γ -aminomasłowego, które cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na ich ogromne znaczenie dla działania układu nerwowego.

Pozostałe pochodne kwasów 3-arylo-4-pentenowych, zawierające różne podstawniki w pierścieniu benzenowym także stanowią cenne bloki budulcowe do syntezy związków o udokumentowanej aktywności biologicznej (Rysunek 8).

¹¹⁰ (a) Mani, N.S.; Wu, M.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4687-4691; (b) Knoop, A.; Krug, O.; Vincenti, M.; Schanzer, W.; Thevis, M.; *Eur. J. Mass. Spectrom.* **2015**, *21*, 27-36.

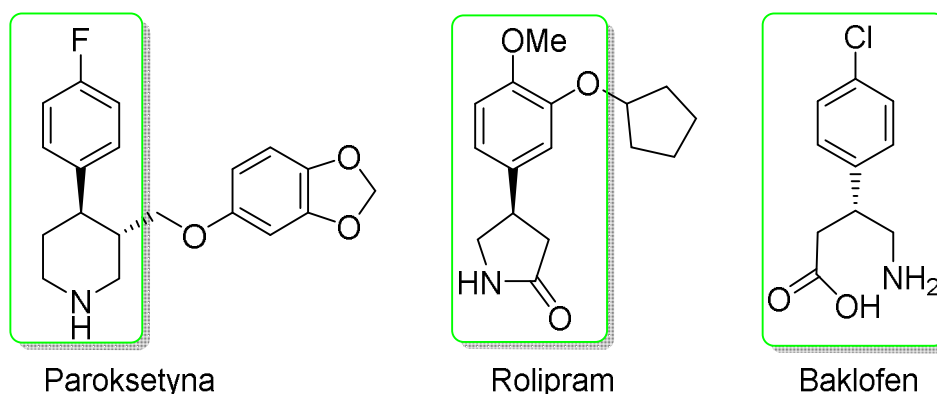
¹¹¹ (a) Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L.; Eds.; *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th ed.; McGraw-Hill: New York **2005**; (b) Leyva-Perez, A.; Garcia-Garcia, P.; Corma, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *126*, 8831-8834.

¹¹² Krogsgaard-Larsen, P.; Scheel-Kruger, J.; Kofod, H.; *GABA-Neurotransmitters: Pharmacochemical, Biochemical and Pharmacological Aspects*, (Eds.) Munksgaard: Copenhagen, **1979**.

¹¹³ Shasoua, V. E.; Jacob, J. N.; Ridge, R.; Campbell, A.; Baldessarini, R. J.; *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 659-664.

¹¹⁴ Dambrova, M.; Zvejniece, L.; Liepinsh, E.; Cirule, H.; Zharkova, O.; Veinberg, G.; Kalvinsh, I.; *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *583*, 128-134.

¹¹⁵ Marivet, M. C.; Bourignon, J. J.; Lugnier, C.; Mann, A.; Stoclet, J. C.; Wermuth, C. G.; *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1450-1457.



Rysunek 8. Pochodne kwasów 3-arylo-4-pentenowych o udokumentowanej aktywności biologicznej

Kwas (*R*)-3-(*p*-fluorofenyl)-4-pentenowy jest substratem do syntezy paroksetyny, selektywnego inhibitora receptora serotoniny stosowanego w leczeniu depresji, zaburzeń obsesyjno-kompulsywnych i paniki¹¹⁶. Z kolei inna pochodna kwasu 3-arylo-4-pentenowego zawierająca podstawniki metoksylowe w pozycji 3. i 4. w pierścieniu aromatycznym może służyć jako blok budulcowy do syntezy rolipramu. Działanie biologiczne tego leku wiąże się z enancjomerem o konfiguracji (*R*). Rolipram jest lekiem przeciwzapalnym, selektywnym inhibitorem fosfodiesterazy-4 (PDE4). Związek ten wykazuje również działanie antydepresyjne, immunosupresyjne i przeciwnowotworowe. Istnieją także wskazania do zastosowania tego leku w terapii stwardnienia rozsianego oraz psychozy¹¹⁷.

Działanie terapeutyczne wykazują także pochodne nieracemicznego kwasu 3-(*p*-chloro)-4-pentenowego. Związkiem tego typu jest baklofen, wspomniany w rozdziale 4 niniejszej pracy. Lek ten jest analogiem kwasu γ -aminomasłowego, a aktywność biologiczna związana jest tylko z enancjomerem (*R*). Związek ten wykazuje działanie spazmolityczne, zmniejsza napięcie mięśni szkieletowych i jest stosowany w terapii m. in. stwardnienia rozsianego, udarów mózgu czy porażenia mózgowego¹¹⁸.

Przytoczone powyżej przykłady związków o działaniu terapeutycznym stanowią jedynie nieliczną grupą optycznie czystych pochodnych kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Niemniej jednak wskazują one, jak ważną klasą substratów są nieracemiczne kwasy 3-arylo-4-pentenowe. Dlatego też tak duże znaczenie ma rozwijanie wydajnych metod syntezy ich enancjomerycznie czystych postaci.

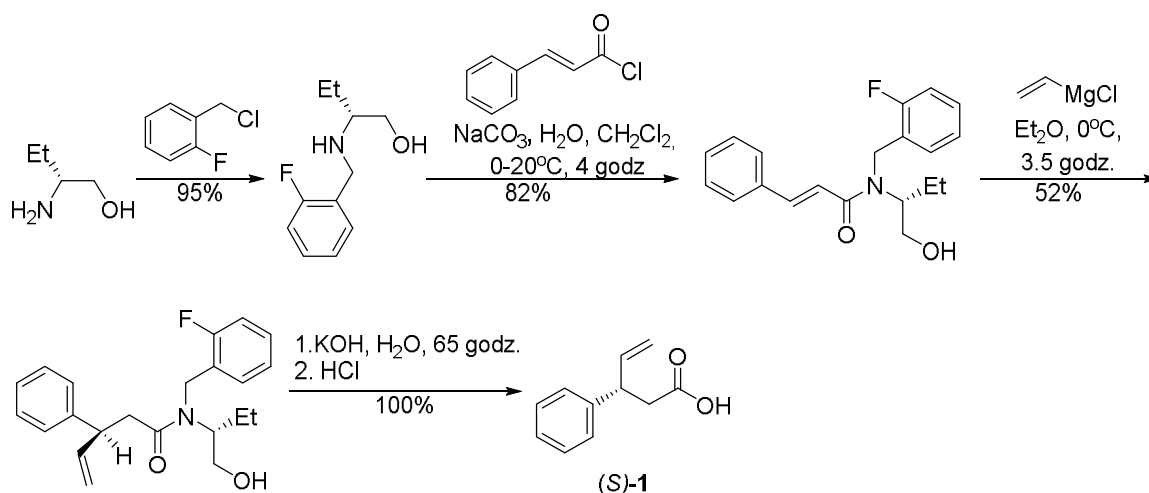
¹¹⁶ Yu, M. S.; Lantos, I.; Peng, Z.-Q.; Lu, J.; Cacchio, T.; *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 5647 – 5651.

¹¹⁷ Tsubogo, T.; Oyamada, H.; Kobayashi, S.; *Nature* **2015**, *520*, 329-332.

¹¹⁸ Bowery, N. G.; Hill, D. R.; Hudson, A. L.; Doble, A.; Middlemiss, D. N.; Shaw, J.; Turnbull, M.; *Nature* **1980**, *283*, 92-94.

Literaturowo znane sposoby otrzymywania tego typu kwasów karboksylowych w postaci nieracemicznej to głównie wieloetapowe syntezy chemiczne. Poniżej zaprezentowano metody otrzymywania optycznie czystych pochodnych kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**).

Jedną z metod polega na enancjoselektywnej addycji reagentów Grignarda do enamidów (Schemat 31)¹¹⁹. Pierwszy etap reakcji polega na alkirowaniu (*R*)-2-aminobutan-1-olu chlorkiem 2-fluorobenzylowym. Otrzymany w ten sposób (*R*)-*N*-(2-fluorobenzyl)-2-aminobutan-1-ol następnie poddano *N*-acylowaniu za pomocą chlorku cynamoilu. Kolejny etap stanowiła reakcja amidu cynamonowego z chlorkiem winylomagnezowym, w wyniku czego powstał (2'*R*,3*S*)-*N*-(1-etylo-2-hydroksy)etylo-*N*-(2-fluorobenzyl)-3-fenylpent-4-enamid z nadmiarem diastereoizomerycznym 93.2%. Podziałanie na ten produkt wodorotlenkiem potasu (KOH) pozwoliło na uzyskanie kwasu (*S*)-3-fenyl-4-pentenowego z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 93.2%.

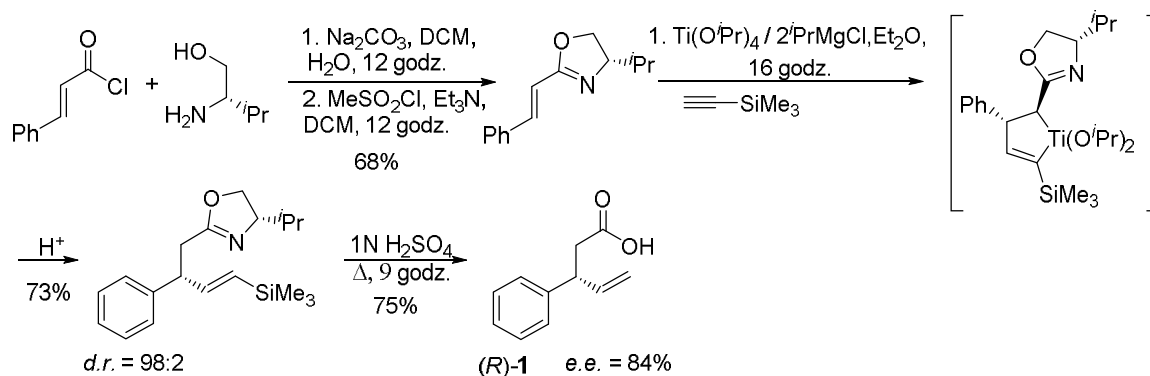


Schemat 31. Chemiczna synteza kwasu (*S*)-3-fenyl-4-pentenowego

Prezentowana metoda syntezy optycznie czystego kwasu **1** jest nieoptymalna. Każdy z etapów wiąże się z obniżeniem wydajności końcowej, szczególnie reakcja Grignarda jest mało wydajna (52%). Poza tym, synteza ta jest także czasochłonna, jedna z przemian zajmuje nawet 65 godzin, a do tego dochodzi konieczność oczyszczania produktów po każdym etapie reakcji. Wadą jest także czystość optyczna uzyskanego kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (*e.e.* = 93.2%).

¹¹⁹ (a) Brown, E.; Deroye, C.; Touet, J.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1605-1614; (b) Touet, J.; Baudouin, S.; Brown, E. *J. Chem. Res. (S)* **1996**, 224-225; (c) Brown, E.; Deroye, C.; Huët, F.; Le Grumelec, C.; Touet, J. *J. Chem. Res. (S)* **1997**, 348-349.

Inna metoda syntezy nieracemicznego kwasu **1** polega na reakcji asymetrycznego sprzężenia kompleksu oksazolina-tytan z acetylenem (Schemat 32)¹²⁰. Na (4*S*)-4-izopropyl-2-(2-fenyl-2-etenyl)-4,5-dihydro-1,3-oksazol otrzymany z (*S*)-walinolu¹²¹ podziałano alkoholanem tytanu (II) (powstałym z tetraizopropoksydanu tytanu Ti(O*i*-Pr)₄ i dwóch równoważników chlorku izopropylomagnezowego (*i*-PrMgCl)), a otrzymany w ten sposób kompleks poddano reakcji sprzężenia z trimetylosililoacetylenem. W wyniku tej przemiany uzyskano (4*S*)-4-izopropyl-2-[(2*R*)-2-fenyl-4-(trimetylosilylo)-3-butenyl]-4,5-dihydro-1,3-oksazol, który następnie zhydrolizowano do kwasu (*R*)-3-fenyl-4-pentenowego o umiarkowanej czystości optycznej (*e.e.* = 84%).



Schemat 32. Reakcja sprzężenia chiralnych oksazolin i acetyleny

Opisana reakcja sprzężenia chiralnych oksazolin z acetylenem i następcza hydroliza produktu także nie jest dogodną metodą syntezy nieracemicznego kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**). Proces ten jest wieloetapowy, poszczególne przekształcenia są czasochłonne i powodują straty wydajności końcowej. Natomiast czystość optyczna produktu nie jest zadowalająca (*e.e.* = 84%).

Z kolei metoda zaproponowana przez grupę Overmana składa się z mniejszej liczby etapów (Schemat 33)¹²². Substratem w tej reakcji jest węglan cynamonowo-metylowy, który poddano reakcji z kompleksem molibdenu (powstający *in situ* z komercyjnie dostępnego heksawęglanu molibdenu i chiralnego ligandu) w obecności mikrofal¹²³. Otrzymany w ten sposób (*R*)-2-(1-fenylalilo)malonian dimetylu ulega dekarboksylacji

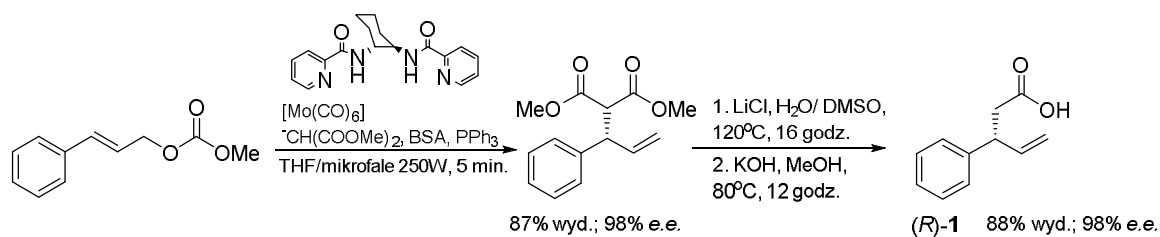
¹²⁰ Mitsui, K.; Sato, T.; Urabe, H.; Sato, F.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 490-492.

¹²¹ Elliott, M. C.; Kruswijk, E.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 3157-3166.

¹²² Ito, T.; Overman, L. E.; Wang, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3272-3273.

¹²³ Kaiser, N.-F. K.; Bremberg, U.; Larhed, M.; Moberg, C.; Hallberg, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3596-3598.

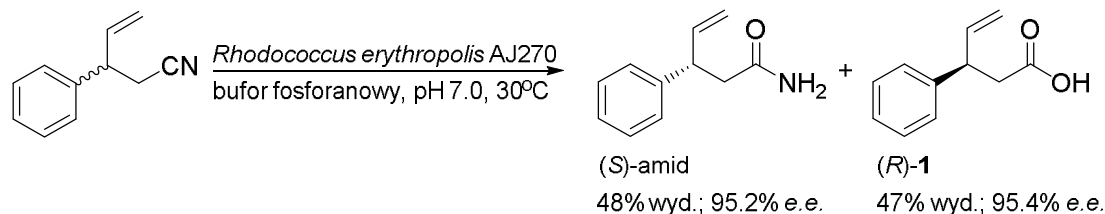
Krapcho (LiCl w wodnym DMSO) oraz następczej hydrolizie do kwasu (*R*)-3-fenylo-4-pentenowego.



Schemat 33. Synteza nieracemicznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

W wyniku powyższej reakcji otrzymano kwas (*R*)-**1** z wydajnością 88% i z wysokim nadmiarem enancjomerycznym ($e.e = 98\%$). Reakcja składa się z dwóch etapów o umiarkowanej wydajności, jednakże wymagane jest użycie stosunkowo drogich reagentów, co wpływa niekorzystnie na jej opłacalność.

Literaturowo znana jest również biokatalityczna metoda syntezy nieracemicznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). Reakcja ta polega na enancjoselektywnej biotransformacji 3-fenylo-4-pentenonitrylu katalizowanej przez *Rhodococcus erythropolis* AJ270. W procesie użyto całych komórek mikroorganizmu, zawierających hydratazę i amidazę nitrylową (Schemat 34)¹²⁴.



Schemat 34. Enancjoselektywna biotransformacja racemicznego 3-fenylo-4-pentenonitrylu

Racemiczny nityl ulega w łagodnych warunkach przekształceniu w optycznie wzbogacony kwas karboksylowy i amid. Hydrataza nitrylowa katalizuje reakcję dość szybko, całkowita konwersja nitrylu do amidu zachodzi w kilka godzin. Z kolei hydroliza amidu do kwasu karboksylowego katalizowana przy udziale amidazy zajmuje nieco dłużej. Po około 15.5 godziny otrzymano kwas (*R*)-**1** z wydajnością 47% i nadmiarem enancjomerycznym 95.4%. Wadą tej reakcji jest niska wydajność. Ponadto, jest ona trudna do przeprowadzenia w laboratorium chemicznym.

¹²⁴ Gao, M.; Wang, D.-X.; Zheng, Q.-Y.; Wang, M.-X.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9532-9535.

Literaturowo znane metody syntezy optycznie czystego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) posiadają szereg wad. W większości są to wieloetapowe, złożone syntezy chemiczne, które charakteryzują się niską wydajnością całkowitą produktu oraz długim czasem reakcji. Czystość optyczna otrzymanego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego nie jest zadowalająca, a reagenty i wykonanie często wiążą się z wysokimi nakładami finansowymi. W związku z dużym znaczeniem aplikacyjnym enancjomerycznie czystego kwasu **1** i jego pochodnych niezbędne jest poszukiwanie wydajnych i opłacalnych metod syntezy tego związku.

6. Badania własne

6.1. Koncepcja i cel badań

Celem wykonywanych badań było opracowanie nowej, chemoenzymatycznej metody syntezy enancjomerycznie czystych kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Substancje te w postaci optycznie czystej są ważnymi substratami do syntezy wielu związków o udokumentowanej aktywności biologicznej. Niestety, literaturowo znane sposoby otrzymywania nieracemicznych kwasów 3-arylo-4-pentenowych w większości przypadków są złożone, wieloetapowe, mało efektywne oraz drogie. Postanowiono zatem przeprowadzić badania nad opracowaniem enzymatycznej metody syntezy omawianych związków. Reakcje tego typu pozwalają na uzyskanie produktów z wysokim nadmiarem enancjomerycznym przy stosunkowo niskim nakładzie finansowym.

W celu realizacji powyższej koncepcji konieczne było opracowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego pochodnych kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Jako substrat modelowy do badań wybrano kwas 3-fenylo-4-pentenowy (**1**). W przedłożonej pracy zaproponowano wykorzystanie kinetycznego rozdziału racematu za pomocą hydrolaz, gdyż jak wykazano w części literaturowej, jest to jedna z najbardziej atrakcyjnych metod otrzymywania związków optycznie czystych. Poza tym, warunki reakcji spełniają wymagania tzw. zielonej chemii, co jest niezbędne przy syntezie związków stosowanych w farmacji. Najczęstszą metodą rozdziału chiralnych pochodnych kwasów karboksylowych jest enzymatyczna hydroliza. Niestety, procesy te zazwyczaj charakteryzują się niską wydajnością i niską enancjoselektywnością. Problem w tym przypadku stanowi również wodne środowisko reakcji. Woda nie jest dobrym rozpuszczalnikiem dla większości związków organicznych. Wydaje się, iż rozpuszczalniki organiczne są bardziej odpowiednie dla tego typu procesów. W związku z powyższym, w celu rozdzielenia racematu należy zastosować reakcję estryfikacji lub transestryfikacji. W literaturze opisano wiele przypadków enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów karboksylowych poprzez hydrolizę ich estrów, natomiast reakcje estryfikacji racemicznych chiralnych kwasów karboksylowych są zdecydowanie mniej rozpowszechnione. Realizacja tego celu wymagała optymalizacji procesu pod względem wyboru właściwego rozpuszczalnika czy biokatalizatora. Niezwykle ważny był dobór odpowiedniego donora grupy alkoksylowej tak, aby reakcja enzymatyczna była

nieodwracalna. Najczęściej w procesach enzymatycznych w roli donorów grupy alkoksylowej wykorzystywane są alkohole, węglany i acetylooctany. W ramach niniejszych badań postanowiono przetestować w tym celu całą gamę związków, takich jak: ortoestry, acetale, ketale, czy ortowęglany.

W prowadzonych badaniach postanowiono wykonać badania nad połączeniem reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego z racemizacją substratu *in situ* za pomocą kompleksów metali przejściowych w dynamiczny rozdział kinetyczny. Przedstawione w części teoretycznej dane literaturowe wskazują, że chemoenzymatyczne metody syntezy optycznie czystych chiralnych kwasów karboksylowych nie są znane.

W trakcie realizacji powyższych zadań spodziewano się napotkać problemy związane z doбором odpowiednich warunków ERK tak, aby można było następnie połączyć tę reakcję z racemizacją metalami przejściowymi. Należało wykonać badania nad optymalizacją DKR pod względem rozpuszczalnika, donora grupy alkoksylowej oraz biokatalizatora, żeby był on kompatybilny z katalizatorami racemizującymi.

Opracowanie wydajnego enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego pochodnych kwasów 3-arylo-4-pentenowych jest ogromnym wyzwaniem. Tego typu kwasy karboksylowe nie były wcześniej poddawane reakcji DKR. Kluczową sprawą jest opracowanie warunków racemizacji substratu. Problem może stanowić wybór odpowiedniego katalizatora metalicznego, który musi być kompatybilny z enzymem, pracować w łagodnych warunkach oraz nie powodować racemizacji produktu.

W niniejszej pracy postanowiono skupić się na opracowaniu metody otrzymywania enancjomerycznie czystych estrów kwasów 3-arylo-4-pentenowych, które jednak można przekształcić w odpowiednie enancjomerycznie czyste kwasy za pomocą prostej transformacji. Aby opracować enzymatyczną syntezę kwasów karboksylowych należałoby posłużyć się reakcją hydrolizy, która jak wcześniej wspomniano jest mało wydajna i nie zapewnia wysokiej czystości optycznej produktów reakcji. Co więcej, trudno byłoby połączyć tę metodę z racemizacją substratu, ze względu na wodne środowisko reakcji (katalizatory metaliczne nie rozpuszczają się w wodzie).

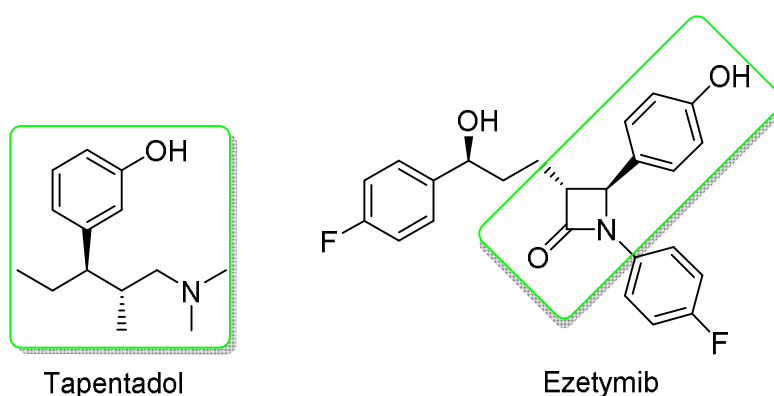
W ramach niniejszej rozprawy przeprowadzono również badania nad wpływem grupy aromatycznej na enzymatyczny rozdział dynamiczny. Reakcji tej poddano chiralne kwasy karboksylowe nie zawierające ugrupowania aromatycznego – pochodne cykliczne i alifatyczne.

Realizacja celów niniejszej pracy wymagała również opracowania metod analitycznych pozwalających określić czystość optyczną otrzymanych produktów. W tym

celu zastosowano głównie wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) na kolumnach chiralnych.

6.2. Znaczenie kwasów 3-arylo-4-pentenowych

W rozdziale 5. opisano znane zastosowania kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Jednakże substancje te w postaci enancjomerycznie czystej można także dostrzec w strukturze innych związków o aktywności biologicznej (Rysunek 9).



Rysunek 9. Możliwe zastosowania kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Przykładem możliwości zastosowania syntetycznego kwasu (*S*)-3-(*p*-metoksyfenilo)-4-pentenowego jest ezetymib, lek stosowany w terapii hipercholesterolemii. Jego działanie opiera się na inhibowaniu absorpcji cholesterolu z jelit.¹²⁵ Uważa się, że ten farmaceutyk może być ważną metodą leczenia pacjentów z hipercholesterolemią oraz cukrzycą, bądź zespołem metabolicznym. Analogi ezetymibu zawierające różne podstawniki w pierścieniu aromatycznym także wykazują aktywność biologiczną¹²⁶. Z kolei kwas zawierający grupę metoksyłową w pozycji *meta* w pierścieniu aromatycznym może być substratem do syntezy tapentadolu. Działanie biologiczne wykazuje enancjomer (*R*) tego związku. Tapentadol należy do nowej grupy leków przeciwbólowych – agonistów receptora opioidowego μ i inhibitorów wychwytu zwrotnego noradrenaliny. Lek ten wykazuje działanie przeciwbólne u pacjentów cierpiących z powodu bólu umiarkowanego do ostrego oraz chronicznego bólu neuropatycznego¹²⁷.

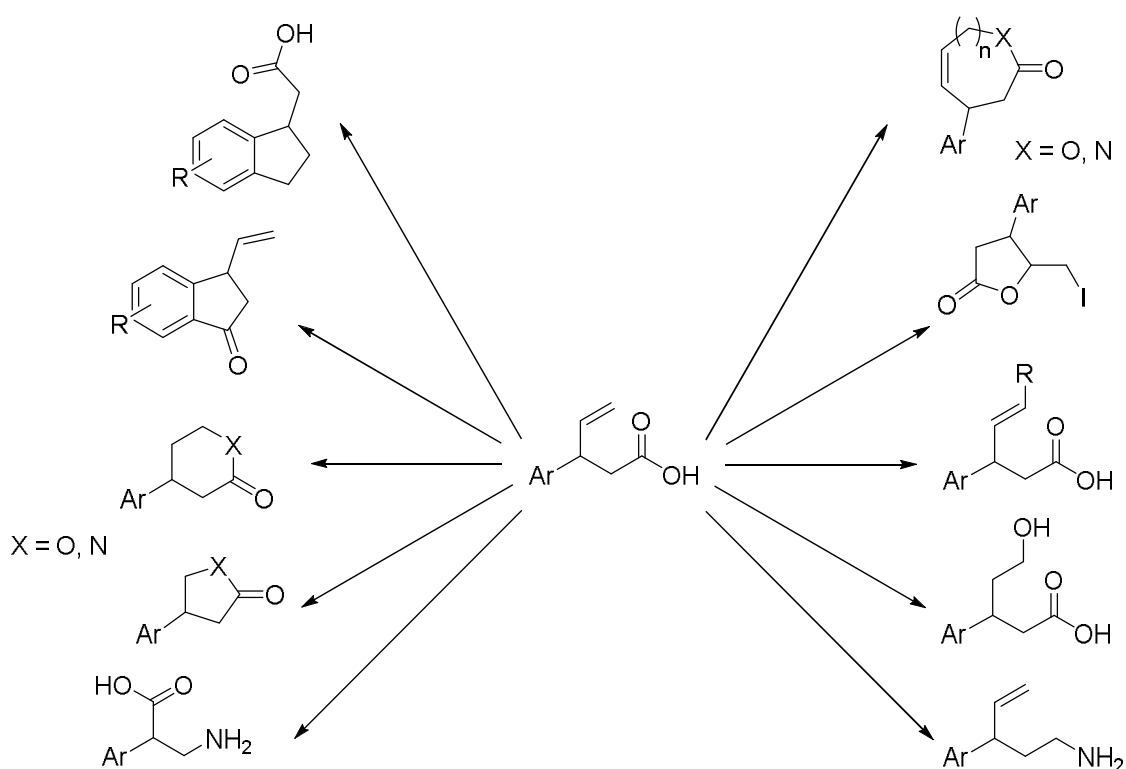
¹²⁵ Clader, J. W.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 243-256.

¹²⁶ (a) Clader, J. W.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 243-256; (b) Cabrera, Z.; Fernandez-Lorente, G.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, 43, 531-536.

¹²⁷ Zhang, Q.; Li, J.-F.; Tian, G.-H.; Zhang, R.-X.; Sun, J.; Suo, J.; Feng, X.; Fang, D.; Jiang, X.-R.; Shen, J.-S.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23, 577-582.

Powyższe farmaceutyki otrzymywane są obecnie na drodze złożonych, wieloetapowych przekształceń chemicznych. Gdyby w tym celu użyto optycznie czystych pochodnych odpowiednich kwasów 3-arylo-4-pentenowych, można by było zmniejszyć liczbę etapów, czyniąc syntezę wydajniejszą, prostszą i tańszą.

Kwasy 3-arylo-4-pentenowe można także poddać wielu reakcjom w celu zmodyfikowania ich struktury tak, aby mogły zostać wykorzystane do syntezy innych klas związków (Rysunek 10).



Rysunek 10. Propozycje modyfikacji kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Kwasy 3-arylo-4-pentenowe można przekształcić w estry lub amidy allilowe, a następnie poddać reakcji metatezy z zamknięciem pierścienia. Uzyskane w ten sposób pochodne cykliczne (laktony lub laktamy) są cennymi substratami do syntezy związków o działaniu biologicznym, tj. antagonisty receptora neurokininy-1 o właściwościach antydepresyjnych, przeciwłękowych i przeciwwymiotnych,¹²⁸ czy antagonisty receptora chemokin (anty-HIV)¹²⁹.

¹²⁸ Elliott J.M., Carlson E.J., Chicchi G.G., Dirat O., Dominguez M., Gerhard U., Jelley R., Jones B., Kurtz, M. M.; Tsao, K. I.; Wheeldon, A.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2929–2932.

¹²⁹ Goble, S.; Mills, S.G.; Yang, L.; Pasternak, A.; WO **2004/092124** A2

Kolejną możliwą transformacją omawianych kwasów karboksylowych może być jodolaktonizacja. Uzyskane w wyniku tej reakcji optycznie czyste γ -butyrolaktony podstawione w pozycji 3 grupą aryłową stanowią bloki budulcowe do syntezy związków naturalnych o właściwościach farmakologicznych, takich jak metylenolaktocyna, antybiotyk o działaniu przeciwnowotworowym.¹³⁰

Modyfikacji można poddać wiązanie podwójne kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Za pomocą reakcji metatezy krzyżowej wiązanie to może ulec wydłużeniu. Inną możliwością jest transformacja w alkohol terminalny. Z drugiej strony, funkcjonalizacja dotyczyć może także części karboksylowej, np. przekształcenie grupy karboksylowej w aminową.

Zaprezentowane struktury (Rysunek 10) są tylko częścią możliwych przemian kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Jednakże przykłady te utwierdzają w przekonaniu, jak ważną klasą związków są omawiane kwasy. Dlatego też niezwykle istotne jest poszukiwanie nowych, wydajnych metod otrzymywania tych substancji w postaci enancjomerycznie czystej.

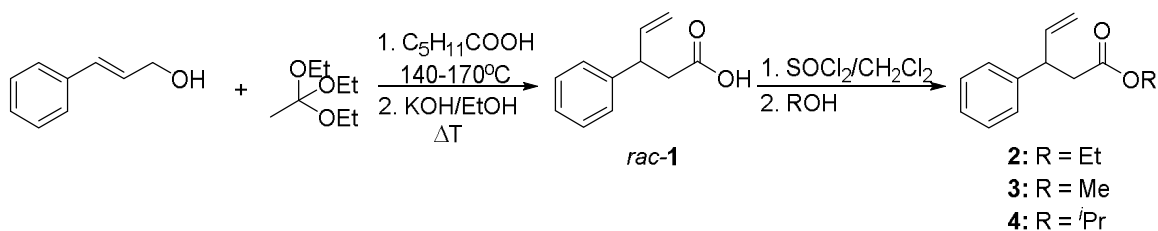
6.3. Badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

Celem pierwszego etapu badań było wyznaczenie warunków reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) z wykorzystaniem reakcji estryfikacji. Koncepcja EKR modelowego kwasu opiera się na zastosowaniu nowych donorów grupy alkoksylowej tak, aby reakcja estryfikacji była nieodwracalna. W tym celu zaproponowano użycie ortoestrów trialkilowych, acetalu i ketali.

W badaniach nad estryfikacją kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) przy wykorzystaniu tego typu donorów grupy alkoksylowej jako katalizatory postanowiono zastosować enzymy oraz proszki acetonowe z organów zwierzęcych wykonane w laboratorium zespołowym. Racemiczny kwas **1** został otrzymany zgodnie z procedurą literaturową z alkoholu cynamonowego i ortoocetanu trietylu z wydajnością 75%¹³¹. Natomiast wzorcowe estry **2**, **3** i **4** otrzymano w reakcji chlorku kwasowego z odpowiednim alkoholem alifatycznym z wydajnościami wynoszącymi odpowiednio 92%, 90% i 37% (Schemat 35).

¹³⁰ Honda, T.; Kimura N.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 77-78.

¹³¹ Bermejo Gonzalez F.; Bartlett P.A.; *Org. Synth.*; **1986**, 64, 175-177.



Schemat 35. Synteza racemicznego kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**) i jego estrów (**2-4**)

6.3.1. Zastosowanie ortoestrów trialkilowych jako nowych donorów grupy alkoksylowej

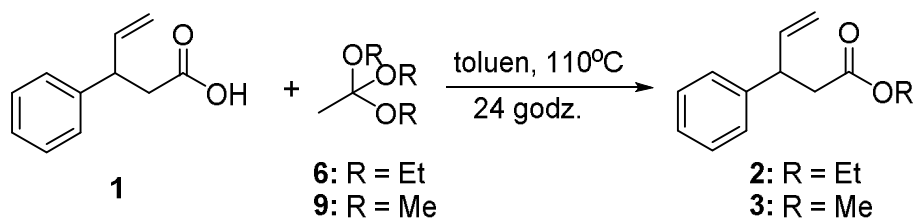
Celem badań było opracowanie nowej, nieodwracalnej metody enzymatycznej estryfikacji chiralnych kwasów karboksylowych. W związku z tym postanowiono zastosować ortoestry trialkilowe jako donory grupy alkoksylowej. Dodatek ortoestru przesunął równowagę reakcji w kierunku tworzącego się estru, ponieważ woda powstająca w reakcji estryfikacji jest zużywana do hydrolizy ortoestru. Ortoestry są reagentami od dawna używanymi do alkilowania kwasów karboksylowych, wśród nich najbardziej popularne są ortomrówczany trialkilowe. Najczęściej tego typu reakcje są katalizowane za pomocą chlorku lub azotanu amonu, chlorku żelaza oraz kwasowych żywic jonowymiennych¹³². Natomiast reakcje pomiędzy ortooctanem trietylu i kwasami karboksylowymi zachodzą bez udziału katalizatora w gotującym toluenie lub bez dodatku rozpuszczalnika¹³³. W niniejszej pracy przeprowadzono reakcję estryfikacji kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**) za pomocą ortoestrów, stosując enzymy jako katalizatory.

Na początku postanowiono zastosować literaturowo znaną metodę estryfikacji kwasów karboksylowych ortoestrami¹³⁴ bez użycia katalizatora do otrzymania racemicznych estrów kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**2 – 4**) (Schemat 36). W tym celu zastosowano odpowiednio ortooctan trietylu (**6**) i trimetylu (**9**) jako donory grupy alkoksylowej, reakcje prowadzono w gotującym się toluenie przez 24 godziny. Ester etylowy kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**2**) otrzymano z wydajnością 11%, natomiast ester metylowy (**3**) – z wydajnością 3%.

¹³² Otera, J.; *Esterification*, Wiley-VCH-Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2003.

¹³³ Trujillo, J. I.; Gopalan, A. S.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7355-7358.

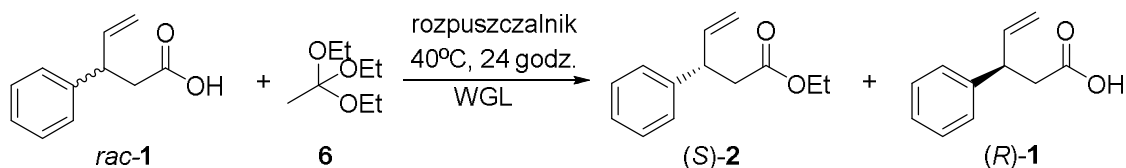
¹³⁴ Trujillo, J. I.; Gopalan, A. S.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7355-7358.



Schemat 36. Synteza racemicznych estrów kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

6.3.1.1. Badania nad wpływem rozpuszczalnika na reakcję EKR kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

Celem tego etapu badań było wyznaczenie warunków reakcji enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**), przy użyciu ortoestrów jako donorów grupy alkoksylowej. Zbadano wpływ rozpuszczalnika na konwersję i enancjoselektywność enzymatycznego rozdziału kinetycznego związku **1** (Schemat 37).



Schemat 37. ERK kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

Jak wspomniano w sekcji 4, dobór odpowiedniego rozpuszczalnika ma ogromne znaczenie przy opracowywaniu reakcji biokatalitycznych. Do badań modelowych użyto lipazy z kielków pszenicy (WGL) oraz ortoocetanu trietylu (**6**) jako donora grupy alkoksylowej. Reakcje prowadzono w temperaturze 40°C przez 24 godziny. Jako rozpuszczalniki organiczne zastosowano: dimetylosulfotlenek (DMSO), dioksan, dimetyloformamid (DMF), acetonitryl, tetrahydrofuran (THF), eter etylowy, eter *tert*-butylo-metylowy (TBME), dichlorometan (DCM), chloroform, toluen oraz heksan. Przeprowadzono także reakcję bez dodatku rozpuszczalnika. Otrzymane wyniki enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu **1** przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ rozpuszczalnika na enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasu **1**

L.p.	Rozpuszczalnik	Log <i>P</i>	Produkt	<i>c</i> [%]	<i>e.e</i> ^b . [%]	<i>E</i> ^c
1.	-	3-	(<i>S</i>)- 2	31	69	7
2.	DMSO	-1.3	(<i>S</i>)- 2	39	14	1
3.	Dioksan	-1.1	(<i>S</i>)- 2	10	45	3
4.	DMF	-1.0	(<i>S</i>)- 2	4	91	23
5.	Acetonitryl	-0.33	(<i>S</i>)- 2	16	96	53
6.	THF	0.49	(<i>S</i>)- 2	16	90	23
7.	Eter etylowy	0.85	(<i>S</i>)- 2	3	21	2
8.	TBME	0.94	(<i>S</i>)- 2	67	41	6
9.	DCM	1.25	(<i>S</i>)- 2	65	50	10
10.	Chloroform	2.0	(<i>S</i>)- 2	27	4	1
11.	Toluen	2.5	(<i>S</i>)- 2	45	93	63
12.	Heksan	3.5	(<i>S</i>)- 2	20	52	4

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **6** (3 mmol), rozpuszczalnik (1.21 ml), WGL (10 mg), 40°C, 24 godz.

^b Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

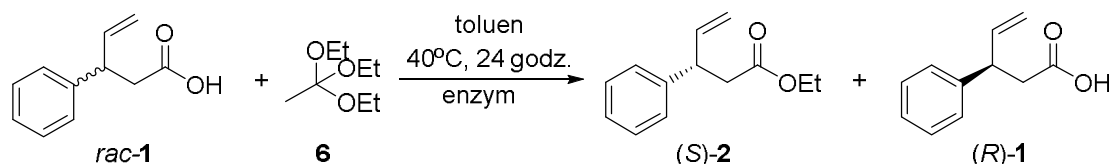
^c Obliczono za pomocą równania: $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.p)]}{\ln[1-c(1-e.e.p)]}$

Wykonane badania wykazały, iż polarność zastosowanego rozpuszczalnika nie miała wpływu na enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**). Najwyższą enancjoselektywność zaobserwowano dla reakcji prowadzonej w toluenie ($E = 63$) (L.p. 11, Tabela 1). Procesy zachodzące w dimetyloformamidzie, tetrahydrofuranie oraz acetonitrylu także charakteryzują się dobrą enancjoselektywnością ($E = 23 - 53$) (L.p. 4, 5, 6, Tabela 1), jednakże w tym przypadku konwersja substratu jest dużo niższa ($c = 4 - 16\%$). Dla pozostałych testowanych rozpuszczalników otrzymano niskie wartości enancjoselektywności ($E = 1 - 10$) (L.p. 2, 3, 7 - 10, 12, Tabela 1). Najlepszą wydajność reakcji zaobserwowano w eterze *tert*-butylo-metylowym, dichlorometanie i toluenie ($c = 45 - 67\%$) (L.p. 8, 9, 11, Tabela 1), jednakże z wyjątkiem toluenu, enancjoselektywność tych przemian była niska ($E = 6 - 10$). Gdy reakcję prowadzono bez dodatku rozpuszczalnika, otrzymano produkt z umiarkowaną wydajnością ($c = 31\%$), jednakże z niską enancjoselektywnością ($E = 7$) (L.p. 1, Tabela 1). We wszystkich przypadkach dominującym produktem był ester etylowy kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**2**) o konfiguracji (*S*), co wykazano porównując odpowiednie czasy retencji uzyskane podczas rozdziału enancjomerów za pomocą chiralnej HPLC.

Stwierdzono, iż najlepszym rozpuszczalnikiem dla reakcji ERK kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) jest toluen.

6.3.1.2. Badania nad doбором biokatalizatora do reakcji ERK kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

Celem kolejnego etapu były badania nad doбором odpowiedniego biokatalizatora w reakcji rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). Wybór katalizatora jest jednym z kluczowych elementów rozdziału kinetycznego. W związku z tym, sprawdzono szesnaście komercyjnie dostępnych lipaz (z: trzustki wieprzowej (*Hog pancreas* lipase, HPL), *Mucor javanicus* (MJL), *Aspergillus oryzae* (AOL), *Penicillium roqueforti* (PRL), *Pseudomonas fluorescens* (PFL), *Aspergillus sp.* (ASL), kielków pszenicy (Wheat germ lipase, WGL), *Rhizopus niveus* (RNL), *Candida antarctica* (CAL), *Candida cylindracea* (CCL), *Rhizopus arrhizus* (RAL), *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Pseudomonas sp.* (PSL), *Mucor miehei* (MML), *Candida rugosa* (CRL), *Candida lipolytica* (CLL)), jedną immobilizowaną lipazę – Novozym 435 (lipaza B z *Candida antarctica*) i jedenaście proszków acetonowych z organów zwierzęcych otrzymanych w laboratorium zespołowym według procedury literaturowej¹³⁵. Przetestowano proszki acetonowe z wątrób: wołowej (BLAP), indyczej (TLAP), świńskiej (PLAP), kaczej (DLAP), kurzej (CLAP), jeleniej (JLAP), króliczej (RLAP), gęskiej (GLAP) i dziczej (WLAP), a także z nerki wołowej (BKAP) oraz esterazę z wątroby świńskiej (PLE). Badania modelowe przeprowadzono w toluenie w 40°C, stosując ortoocetan trietylu (**6**) jako donor grupy alkoksylowej; czas reakcji wynosił 24 godziny (Schemat 38). W celu potwierdzenia wpływu biokatalizatora na reakcję rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) wykonano także eksperyment bez dodatku enzymu. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 2.



Schemat 38. EKR kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

¹³⁵ Adachi, K.; Kobayashi, S.; Ohno, M.; *Chimia* **1986**, *40*, 311-317.

Tabela 2. Wpływ enzymów na reakcję rozdziału kinetycznego kwasu (**1**)

L.p.	Enzym	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^b [%]	E ^c
1.	-	<i>rac</i> - 2	11	-	-
2.	HPL	<i>rac</i> - 2	50	-	-
3.	MJL	(<i>S</i>)- 2	9	86	15
4.	AOL	(<i>S</i>)- 2	15	87	17
5.	PRL	(<i>S</i>)- 2	52	90	76
6.	PFL	(<i>S</i>)- 2	46	75	13
7.	ASL	(<i>S</i>)- 2	23	92	34
8.	WGL	(<i>S</i>)- 2	45	93	63
9.	RNL	(<i>S</i>)- 2	12	82	11
10.	CAL	(<i>S</i>)- 2	29	74	9
11.	CCL	(<i>S</i>)- 2	12	67	5
12.	RAL	(<i>S</i>)- 2	44	77	13
13.	PCL	(<i>S</i>)- 2	15	92	30
14.	PSL	(<i>S</i>)- 2	38	93	50
15.	MML	(<i>S</i>)- 2	41	91	40
16.	CRL	(<i>S</i>)- 2	30	90	29
17.	CLL	(<i>S</i>)- 2	21	81	12
18.	Novozym 435	(<i>S</i>)- 2	57	69	17
19.	BLAP	(<i>S</i>)- 2	24	90	26
20.	TLAP	(<i>S</i>)- 2	54	82	41
21.	PLAP	(<i>S</i>)- 2	43	46	4
22.	CLAP	<i>rac</i> - 2	10	-	-
23.	DLAP	(<i>S</i>)- 2	54	27	2
24.	JLAP	(<i>S</i>)- 2	52	83	32
25.	RLAP	(<i>S</i>)- 2	16	10	1
26.	GLAP	(<i>S</i>)- 2	25	97	82
27.	WLAP	(<i>S</i>)- 2	29	83	15
28.	BKAP	(<i>S</i>)- 2	26	93	37
29.	PLE	(<i>S</i>)- 2	14	83	13

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **6** (3 mmol), toluen (1.21 ml), enzym (10 mg), 40°C, 24 godz.

^b Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

^c Obliczono za pomocą równania: $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.p)]}{\ln[1-c(1-e.e.p)]}$

Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie komercyjne enzymy katalizują reakcję estryfikacji kwasu **1** za pomocą ortoocetanu trietylu (**6**) (L.p. 2 – 18, Tabela 2). Brak obecności biokatalizatora w medium reakcyjnym pozwala uzyskać racemiczny ester **2** z wydajnością 11% (L.p. 1, Tabela 2). Tylko jeden spośród enzymów komercyjnych – HPL, nie wykazuje enancjoselektywności w stosunku do badanego substratu, mimo, iż katalizuje reakcję estryfikacji (konwersja substratu dużo wyższa niż w przypadku reakcji bez katalizatora) ($c = 50\%$, $e.e. = 0$) (L.p. 2, Tabela 2). Siedem spośród badanych lipaz (MJL, PFL, RNL, CAL, CCL, RAL, CLL) wykazuje niską enancjoselektywność ($E = 5 - 15$) (L.p. 3, 6, 9 – 12, 17, Tabela 2), a cztery (AOL, PCL, CRL, Novozym 435) – umiarkowaną ($E = 17 - 30$) (L.p. 4, 13, 16, 18, Tabela 2). Natomiast enancjoselektywność reakcji katalizowanych przez pozostałe komercyjne enzymy jest dobra (dla ASL, PSL, MML) ($E = 44 - 50$) (L.p. 7, 14, 15, Tabela 2) i bardzo dobra (dla WGL, PRL) ($E = 63 - 76$) (L.p. 5, 8, Tabela 2).

W przypadku zastosowania proszków acetonowych jako katalizatorów enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) ortoocetanem trietylu (**6**) dla prawie wszystkich testowanych LAP-ów zaobserwowano efekt katalityczny (L.p. 19-29, Tabela 2). Jedynie proszek acetonowy z wątroby kurzej nie wpływa na przebieg badanej reakcji, uzyskane wyniki nie różnią się od tzw. „ślepej próby” ($c = 10\%$, $e.e. = 0$) (L.p. 22, Tabela 2). Pięć z testowanych proszków acetonowych (PLAP, DLAP, RLAP, WLAP, PLE) wykazuje niską enancjoselektywność ($E = 1 - 15$) (L.p. 21, 23, 25, 27, 29, Tabela 2), cztery (BLAP, TLAP, JLAP, BKAP) – dobrą ($E = 26 - 41$) (L.p. 19, 20, 24, 28, Tabela 2), a jeden (GLAP) – bardzo dobrą ($E = 82$) (L.p. 26, Tabela 2).

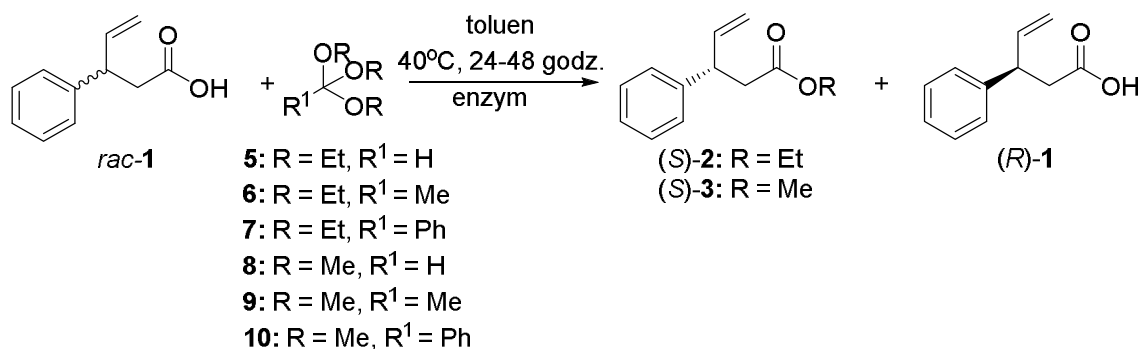
Prawie wszystkie biokatalizatory (poza HPL i CLAP) wykazywały selektywność w kierunku tworzenia produktu o konfiguracji (*S*), co wykazano porównując odpowiednie czasy retencji uzyskane podczas rozdzielania enancjomerów za pomocą chiralnej HPLC. Najbardziej selektywnymi katalizatorami enzymatycznego rozdzielania kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) są lipazy z kielków pszenicy i *Penicillium roqueforti* oraz proszek acetonowy z wątroby kaczej. Spośród tych biokatalizatorów najwyższą konwersję substratu zaobserwowano dla lipazy z *Penicillium roqueforti* ($c = 52\%$), jednakże wiąże się to ze spadkiem nadmiaru enancjomerycznego produktu ($e.e. = 90\%$). Ester **2** z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym otrzymano w reakcji katalizowanej przez GLAP ($e.e. = 97\%$), lecz z kolei w tym przypadku wydajność procesu jest stosunkowo niska ($c = 25\%$).

6.3.1.3. Badania nad wpływem donora grupy alkoksylowej na reakcję EKR kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

Badania nad optymalizacją warunków enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) pozwoliły wyselekcjonować odpowiedni rozpuszczalnik tej reakcji i biokatalizatory. Niewątpliwie, ogromny wpływ na reakcję enzymatycznej estryfikacji kwasów karboksylowych ma dobór donora grupy alkoksylowej. W związku z tym, w kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić wpływ donora grupy alkoksylowej na enancjoselektywność reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu **1**.

W pierwszej kolejności zdecydowano zbadać wpływ długości łańcucha bocznego ortoestrów trialkilowych. Przetestowano następujące ortoestry trietylowe: ortomrówczan (**5**) oraz ortobenzoesan (**7**), wyniki reakcji z ortooctanem (**6**) zaprezentowano w sekcji 6.3.1.2. Następnie postanowiono sprawdzić wpływ długości grupy alkoksylowej na enancjoselektywność EKR kwasu **1**. W tym celu użyto ortoestrów trimetylowych: ortomrówczanu (**8**), ortooctanu (**9**) i ortobenzoesanu (**10**).

Badania modelowe prowadzono w toluenie w temperaturze 40°C w ciągu 24 godzin, stosując wybrane enzymy jako katalizatory reakcji KR (Schemat 39). Zastosowano biokatalizatory, dla których uzyskano najlepsze rezultaty w reakcji z ortooctanem trietylu (**6**) (lipazy z: kielków pszenicy, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus sp.*, *Mucor miehei*, *Candida rugosa* oraz proszek acetonowy z wątroby gęsiej). Ze względu na niską konwersję procesów z ortoestrami trimetylowymi, czas reakcji wydłużono do 48 godzin. Dla każdego z donorów (**5** – **10**) przeprowadzono reakcje bez dodatku biokatalizatora. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 3.



Schemat 39. EKR kwasu **1**

Tabela 3. Wpływ donora grupy alkoksylowej na EKR kwasu **1**

L.p.	Donor	Enzym	Czas [godz]	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^b [%]	<i>E</i> ^c
1.	5	-	24	<i>rac-2</i>	3	-	-
2.	5	WGL	24	(<i>S</i>)- 2	43	71	10
3.	5	PRL	24	(<i>S</i>)- 2	6	89	19
4.	5	ASL	24	(<i>S</i>)- 2	12	68	6
5.	5	MML	24	(<i>S</i>)- 2	3	27	2
6.	5	CRL	24	(<i>S</i>)- 2	6	44	3
7.	7	-	24	<i>rac-2</i>	4	-	-
8.	7	WGL	24	(<i>S</i>)- 2	50	>99	>200
9.	7	PRL	24	(<i>S</i>)- 2	50	>99	>200
10.	7	GLAP	24	(<i>S</i>)- 2	50	>99	>200
11.	8	-	48	<i>rac-3</i>	9	-	-
12.	8	WGL	48	<i>rac-1</i>	0	-	-
13.	8	PRL	48	(<i>S</i>)- 3	9	82	11
14.	8	GLAP	48	(<i>R</i>)- 3	19	16	1
15.	9	-	48	<i>rac-1</i>	0	-	-
16.	9	WGL	48	(<i>S</i>)- 3	17	1	1
17.	9	PRL	48	(<i>S</i>)- 3	9	82	11
18.	9	GLAP	48	(<i>S</i>)- 3	6	2	1
19.	10	-	48	<i>rac-3</i>	4	-	-
20.	10	WGL	48	(<i>S</i>)- 3	50	>99	>200
21.	10	PRL	48	(<i>S</i>)- 3	34	>99	>200
22.	10	GLAP	48	(<i>S</i>)- 3	50	>99	>200

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **5-10** (3 mmol), toluen (1.21 ml), enzym (10 mg), 40°C, 24 – 48 godz.

^b Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

^c Obliczono za pomocą równania: $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.p)]}{\ln[1-c(1-e.e.p)]}$

Uzyskane wyniki pokazują, iż w obrębie ortoestrów trietylowych (L.p. 1-10, Tabela 3 oraz Tabela 2) enancjoselektywność wzrasta wraz z objętością łańcucha bocznego ortoestru. W przypadku zastosowania ortomrówczanu trietylu (**5**) enancjoselektywność reakcji była niska ($E = 2 - 19$) (L.p. 2 – 6, Tabela 3), dużo niższa niż w przypadku ortoocetanu trietylu (**6**) (Tabela 2). Najlepsze wyniki uzyskano dla ortobenzoesu trietylu (**7**), w reakcjach katalizowanych przez wszystkie testowane

enzymy uzyskano idealny rozdział kinetyczny ($c = 50\%$, $e.e. > 99\%$) (L.p. 8 – 10, Tabela 3). Enzymatyczna estryfikacja kwasu 3-fenilo-4-pentenowego (**1**) wszystkimi testowanymi ortoestrami trietylowymi prowadziła do otrzymania estrów etylowych o konfiguracji (*S*) jako głównych produktów, co wykazano porównując odpowiednie czasy retencji uzyskane podczas rozdzielania enancjomerów za pomocą chiralnej HPLC.

Rozpatrując ortoestry trimetylowe (**8 – 10**) jako donory grupy alkoksylowej można zauważyć podobny trend jak dla ortoestrów trietylowych (**5 – 7**), im bardziej rozbudowany sterycznie łańcuch boczny związku, tym lepsza enancjoselektywność (L.p. 11 – 22, Tabela 3). Najlepszy rozdział kinetyczny uzyskano dla ortobenzoesanu trimetylu (**10**) ($c = 34 – 50\%$, $e.e. > 99\%$) (L.p. 20 – 22, Tabela 3). W przypadku ortomrówczanu trimetylu (**8**), gdy jako katalizator zastosowano lipazę z kielków pszenicy (WGL), nie zaobserwowano konwersji substratu (L.p. 12, Tabela 3). Ten sam enzym katalizuje jednak EKR kwasu **1** w obecności ortoocetanu trimetylu (**9**), jednakże enancjoselektywność tego procesu jest znikoma ($E = 1$) (L.p. 12, Tabela 3). Zaskakujący wynik otrzymano dla reakcji estryfikacji kwasu **1** ortomrówczaniem trimetylu (**8**) katalizowanej przez GLAP - uzyskano produkt o konfiguracji (*R*) (L.p. 14, Tabela 3), podczas gdy pozostałe testowane donory i biokatalizatory prowadziły do otrzymania estru o konfiguracji (*S*). W celu uniknięcia błędu reakcję powtórzono, jednak wynik pozostał bez zmian.

Rezultaty przedstawione w Tabeli 3. ukazują również wpływ długości grupy alkoksylowej na enancjoselektywność i wydajność reakcji enzymatycznego rozdzielania kinetycznego kwasu 3-fenilo-4-pentenowego (**1**). Dla wszystkich testowanych enzymów ortoestry trietylowe (**5 – 7**) okazały się być lepszymi donorami grupy alkoksylowej niż ortoestry trimetylowe (**8 – 10**), nawet pomimo dwukrotnego wydłużenia czasu reakcji tych drugich. Stwierdzono, iż najlepszym donorem grupy alkoksylowej w reakcji enzymatycznego rozdzielania kinetycznego jest ortobenzoesan trietylu (**7**). Uzyskane wyniki potwierdzają, jak ważny jest dobór odpowiedniego donora grupy alkoksylowej dla reakcji enzymatycznej estryfikacji. Na konwersję substratu i enancjoselektywność reakcji EKR wpływa zarówno długość łańcucha bocznego ortoestru, jak i rodzaj grupy alkoksylowej.

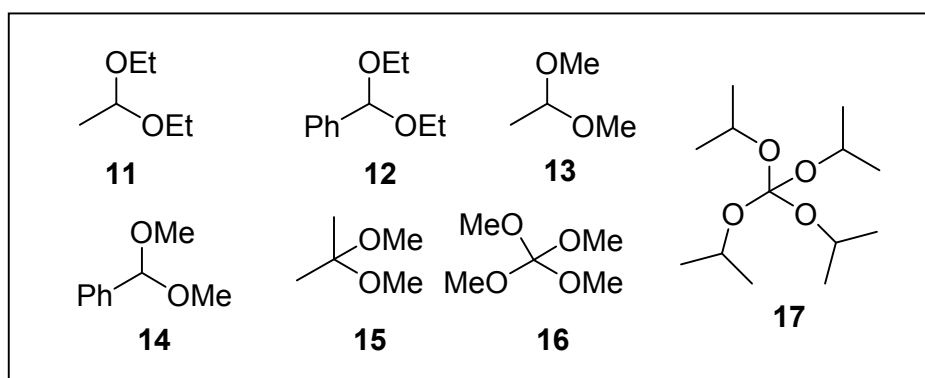
W kolejnym etapie postanowiono sprawdzić przydatność opracowanej metodologii enzymatycznego rozdzielania kinetycznego kwasu **1** do zastosowania praktycznego. W tym celu powiększono skalę jednego z eksperymentów do skali 1-gramowej. Badania modelowe prowadzono w toluenie w temperaturze 40°C, stosując ortoocetan trietylu (**6**) jako donor grupy alkoksylowej i proszek acetonowy z wątroby

gęściej. Czas reakcji wynosił 24 godziny. Niespodziewanie reakcja w większej skali i w tych samych warunkach zachodziła szybciej niż w skali miligramowej, jednak powodowało to spadek czystości optycznej produktu (skala mg: $c = 25\%$, $e.e. = 97\%$, $E = 82$, skala g: $c = 50\%$, $e.e. = 80$, $E = 22$). Skrócenie czasu reakcji do 16 godzin pozwoliło na uzyskanie produktu z bardzo wysokim nadmiarem enancjomerycznym ($e.e.=99\%$) w skali preparatywnej.

6.3.2. Zastosowanie acetalu, ketali i ortowęglanów jako nowych donorów grupy alkoksylowej

Badania nad opracowaniem enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) z wykorzystaniem ortoestrów trialkilowych (**5 – 10**) potwierdziły, iż substancje te mogą być zastosowane jako nowe donory grupy alkoksylowej. W związku z powyższym, postanowiono przeprowadzić badania nad zastosowaniem innej klasy donorów w reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu **1**.

Celem kolejnego etapu prac było sprawdzenie przydatności acetalu, ketali i ortowęglanów w syntezie enancjomerycznie czystych pochodnych kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). Przetestowano acetale dietylowe: 1,1-dietoksyetan (**11**), acetal dietylowy benzaldehydu (**12**), dimetylowe: 1,1-dimetoksyetan (**13**), acetal dimetylowy benzaldehydu (**14**), a także ketal – 2,2-dimetoksypropan (**15**) oraz ortowęglan tetrametylu (**16**) i ortowęglan tetraizopropylu (**17**) (Rysunek 11).



Rysunek 11. Acetale i ketale użyte w reakcji EKR kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**)

Badania modelowe przeprowadzono w warunkach opracowanych dla reakcji z ortoestrami: w toluenie jako rozpuszczalniku, w temperaturze 40°C, w ciągu 24 godzin (donory grupy etoksyłowej) lub 48 godzin (donory grupy metoksyłowej). Dla acetalu **11** przetestowano szereg biokatalizatorów – enzymy komercyjne (lipazy z: kielków pszenicy (WGL), *Penicillium roqueforti* (PRL), *Mucor miehei* (MML), *Aspergillus sp.* (ASL), *Rhizopus niveus* (RNL), *Hog pancreas* (HPL), *Rhizopus arrhizus* (RAL), *Aspergillus oryzae* (AOL), *Pseudomonas cepacia* (PCL), *Candida rugosa* (CRL), *Candida lipolytica* (CLL), *Mucor javanicus* (MJL), *Pseudomonas fluorescens* (PFL), *Pseudomonas sp.* (PSL), *Pseudomonas sp.* Typ B (PSL-B), *Porcine pancreas* (PPL), *Rhizomucor miehei* (RML), *Chromobacterium viscosum* (CVL), a także Papainę i Novozym 435) oraz proszki acetonowe z wątroby zwierzęcej (z gęskiej (GLAP), indyczej (TLAP), świńskiej (PLAP) oraz jeleniej (JLAP)). W przypadku pozostałych donorów grupy alkoksyłowej (**12** – **17**) przeprowadzono reakcje katalizowane przez lipazę z kielków pszenicy, *Penicillium roqueforti* oraz proszek acetonowy z wątroby gęsi. Otrzymane wyniki zamieszczono w Tabeli 4.

Tabela 4. Zastosowanie acetalu i ketali do ERK kwasu **1**

L.p.	Donor	Enzym	Czas [godz]	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^b [%]	E ^c
1.	11	-	24	<i>rac</i> - 2	1	-	-
2.	11	WGL	24	(<i>S</i>)- 2	6	46	3
3.	11	PRL	24	(<i>R</i>)- 2	7	33	2
4.	11	MML	24	(<i>S</i>)- 2	2	98	83
5.	11	ASL	24	(<i>S</i>)- 2	2	>99	200
6.	11	RNL	24	(<i>S</i>)- 2	4	17	2
7.	11	HPL	24	(<i>S</i>)- 2	23	30	2
8.	11	RAL	24	(<i>S</i>)- 2	7	98	106
9.	11	AOL	24	(<i>S</i>)- 2	3	98	102
10.	11	PCL	24	<i>rac</i> - 2	2	-	-
11.	11	CRL	24	(<i>S</i>)- 2	25	12	1
12.	11	CLL	24	(<i>S</i>)- 2	3	98	102
13.	11	MJL	24	(<i>S</i>)- 2	6	18	2
14.	11	PFL	24	(<i>S</i>)- 2	4	98	103
15.	11	PSL	24	(<i>S</i>)- 2	2	98	101

16.	11	PSL-B	24	(S)-2	1	39	2
17.	11	PPL	24	(S)-2	1	98	100
18.	11	RML	24	(S)-2	4	98	103
19.	11	CVL	24	rac-2	2	-	-
20.	11	Papaina	24	(S)-2	7	16	2
21.	11	Novozym	24	rac-2	3	-	-
22.	11	GLAP	24	rac-2	3	-	-
23.	11	TLAP	24	rac-2	1	-	-
24.	11	PLAP	24	(R)-2	1	59	4
25.	11	JLAP	24	rac-2	3	-	-
26.	12	WGL	24	(S)-2	50	>99	>200
27.	12	PRL	24	(S)-2	30	92	35
28.	12	GLAP	24	(S)-2	35	81	15
29.	13	WGL	48	(S)-3	3	88	16
30.	13	PRL	48	(S)-3	2	58	4
31.	13	GLAP	48	(S)-3	1	90	19
32.	14	WGL	48	(S)-3	7	94	38
33.	14	PRL	48	(S)-3	22	99	>200
34.	14	GLAP	48	(S)-3	24	98	140
35.	15	WGL	48	(S)-3	11	89	19
36.	15	PRL	48	(R)-3	1	72	6
37.	15	GLAP	48	(R)-3	1	57	4
38.	16	WGL	48	(S)-3	1	32	2
39.	16	PRL	48	(S)-3	5	68	6
40.	16	GLAP	48	(S)-3	5	65	5
41.	17	WGL	24	(S)-3	31	4	1
42.	17	PRL	24	(S)-3	41	23	2
43.	17	GLAP	24	(S)-3	47	26	2

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **11-17** (3 mmol), toluen (1.21 ml), enzym (10 mg), 40°C, 24 – 48 godz.

^b Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

^c Obliczono za pomocą równania: $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.p)]}{\ln[1-c(1-e.e.p)]}$

Zastosowanie 1,1-dietoksyetanu (**11**) jako donora grupy alkoksyłowej nie zapewniło dobrych wyników rozdzielania kwasu **1**. Mimo iż w obecności kilku

biokatalizatorów (MML, ASL, RAL, AOL, CLL, PFL, PSL, PPL, RML) uzyskano wysoką enancjoselektywność ($E = 83 - 200$), konwersja substratu nie przekroczyła 7% (L.p. 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 18, Tabela 4). Dużo lepsze rezultaty uzyskano dla acetalu dietylowego benzaldehydu (**12**). W zależności od zastosowanego biokatalizatora enancjoselektywność reakcji z użyciem tego donora jest umiarkowana – dla proszku acetonowego z wątroby gęśiej ($E = 15$) (L.p. 28, Tabela 4), dobra – dla lipazy z *Penicillium roqueforti* ($E = 35$) (L.p. 27, Tabela 4) i bardzo dobra – dla lipazy z kielków pszenicy ($E > 200$) (L.p. 26, Tabela 4).

Rozpatrując acetale dimetylowe, najlepszy rozdział kinetyczny uzyskano dla acetalu benzaldehydu (**14**) ($E = 38 - 216$) (L.p. 33 – 35, Tabela 4). Jednakże w przypadku tego donora wydajność reakcji nie przekroczyła 24%. W reakcjach kwasu **1** z 1,1-dimetoksyetanem (**13**) zarówno enancjoselektywność, jak i wydajność były niskie (L.p. 30 – 32, Tabela 4). Podobne rezultaty uzyskano także dla estryfikacji ketalem - 2,2-dimetoksypropanem (**15**). Zastosowanie ortowęglanu tetrametylu (**16**) jako donora także nie dało zadowalających rezultatów – zarówno wydajność, jak i enancjoselektywność tych reakcji była niska (L.p. 38 – 40, Tabela 4).

Reakcje z donorem grupy izopropylowej – ortowęglanem tetraizopropylu (**17**), charakteryzują się dość dobrą wydajnością ($c = 31 - 47\%$), ale bardzo niską enancjoselektywnością, nie przekraczającą 2 (L.p. 41 – 43, Tabela 4). Najlepszy wynik uzyskano dla procesu katalizowanego przez proszek acetonowy z wątroby gęsi (GLAP) ($c = 47\%$, $E = 2$) (L.p. 43, Tabela 4).

W większości reakcji enancjoselektywnych głównymi produktami były estry etylowe (**2**), metylowe (**3**) lub izopropylowe (**4**) kwasu 3-fenylo-4-pentenowego o konfiguracji (*S*), co wykazano porównując odpowiednie czasy retencji uzyskane podczas rozdzielania enancjomerów za pomocą HPLC. W przypadku estryfikacji kwasu **1** acetalem **11** katalizowanej lipazą z *Penicillium roqueforti* i proszkiem acetonowym z wątroby świńskiej otrzymano ester etylowy (*R*)-**2** (L.p. 3, 24, Tabela 4). Odwrócenie konfiguracji zaobserwowano także w reakcjach kwasu **1** z ketalem **15** przy użyciu lipazy z *Penicillium roqueforti* i proszku acetonowego z wątroby gęśiej (L.p. 36, 37, Tabela 4). W przypadku tych przemian, zarówno konwersja substratu, jak i czystość optyczna otrzymanych estrów była bardzo niska.

Uzyskane wyniki wskazują, że acetale i ortowęglany mogą być stosowane jako donory grupy alkoksylowej w reakcji enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). Dane eksperymentalne otrzymane w wyniku reakcji z tymi

związkami potwierdzają, iż budowa donora grupy alkoksylowej oraz długość grupy alkoksylowej wpływają na enancjoselektywność i wydajność enzymatycznej estryfikacji. Podobnie jak w przypadku ortoestrów, im bardziej rozbudowany łańcuch boczny donora, tym lepszy jest rozdział kinetyczny kwasu **1**. Dotyczy to zarówno acetali dietylowych, jak i dimetylowych. W zgodzie z poprzednimi wynikami pozostaje również fakt, iż reakcje prowadzone z użyciem donorów grupy etoksylowej (**11 – 12**) (L.p. 1 28, Tabela 4) charakteryzują się lepszą wydajnością i enancjoselektywnością niż w przypadku donorów grupy metoksylowej (**13 – 16**) (nawet po dwukrotnym wydłużeniu czasu reakcji) (L.p. 29 – 40, Tabela 4) czy izopropylowej (**17**) (L.p. 41 – 43, Tabela 4).

Porównując wyniki otrzymane dla reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) przy zastosowaniu ortoestrów, acetali i ortowęglanów jako donorów grupy alkoksylowej stwierdzono, iż ortoestry są dużo lepszymi donorami grupy alkoksylowej dla estryfikacji kwasów karboksylowych niż acetale, ketale lub ortowęglany.

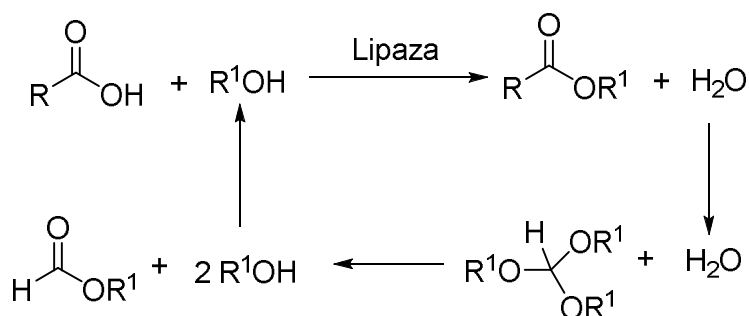
6.4. Badania nad mechanizmem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

W ramach niniejszej rozprawy opracowano enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) z wykorzystaniem nowych donorów grupy alkoksylowej – ortoestrów trialkilowych, acetali dialkilowych i ortowęglanów tetraalkilowych.

W kolejnym etapie pracy postanowiono przeprowadzić badania nad wyjaśnieniem mechanizmu tej opracowanej reakcji. Ortoestry trialkilowe były wcześniej stosowane do enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów karboksylowych,¹³⁶ o czym wspomniano w rozdziale 4. Grupa włoskich badaczy opisała enzymatyczną estryfikację racemicznych kwasów karboksylowych przy zastosowaniu ortomrówczanów trialkilowych. W cytowanej pracy zaproponowano mechanizm badanej reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego. Uczeń stwierdził, iż dodanie ortoestru do mieszaniny reakcyjnej przesunęła równowagę reakcji na rzecz tworzenia się produktu (estru), gdyż tworząca się cząsteczka wody zostaje zużyta do hydrolizy tego reagenta.

¹³⁶ (a) Morrone, R.; Piattelli, M.; Nicolosi, G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1441-1443; (b) Morrone, R.; D'Antona, N.; Nicolosi, G.; *Rasayan J. Chem.* **2008**, *1*, 732-737; (c) Morrone, R.; D'Antona, N.; Lambusta, D.; Nicolosi, G.; *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2010**, *65*, 49-51.

Dzięki temu, reakcja estryfikacji staje się nieodwracalna. Mechanizm ten zakłada, że ortoester ulega hydrolizie, w wyniku której powstaje cząsteczka alkoholu, która w kolejnym etapie bierze udział w enzymatycznej estryfikacji kwasu karboksylowego (Schemat 40).

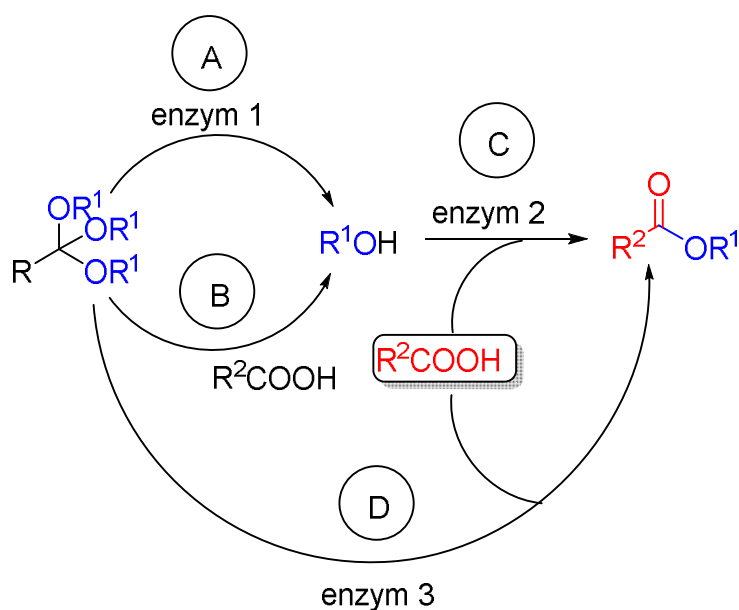


Schemat 40. Mechanizm EKR z udziałem ortoestrów zaproponowany przez grupę Nicolosi

Przedstawione powyżej wyniki badań nad zastosowaniem ortoestrów w reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (rozdział 6.3) wskazują, iż struktura donora jest ściśle związana z enancjoselektywnością i wydajnością reakcji enzymatycznej estryfikacji kwasu **1**. Natomiast mechanizm zaprezentowany na Schemacie 40 nie wyjaśnia wpływu struktury donora grupy alkoksylowej na enancjoselektywność. Według omawianego mechanizmu, zmiana donora grupy alkoksylowej nie powinna zmienić wartości enancjoselektywności reakcji enzymatycznej. Przykładowo, w reakcjach z różnymi ortoestrami trimetylowymi, bezpośrednim substratem w reakcji enzymatycznej estryfikacji byłaby cząsteczka tego samego alkoholu metylowego. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wskazują, iż mechanizm zaprezentowany na Schemacie 40 jest błędny. W związku z tym, postanowiono przeprowadzić badania nad wyjaśnieniem mechanizmu opracowanej reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu **1**.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, iż możliwe są trzy mechanizmy enzymatycznej estryfikacji przy zastosowaniu nowych donorów grupy alkoksylowej (Schemat 41). Pierwsza możliwość (ścieżka A + C) zakłada, że w pierwszym etapie reakcji ortoester trialkilowy jest hydrolizowany przez enzym **1** z wytworzeniem cząsteczki alkoholu, która następnie bierze udział w klasycznej enzymatycznej estryfikacji kwasu karboksylowego. Drugi proponowany mechanizm (ścieżka B + C) różni się tym, że hydroliza ortoestru do alkoholu zachodzi przy udziale

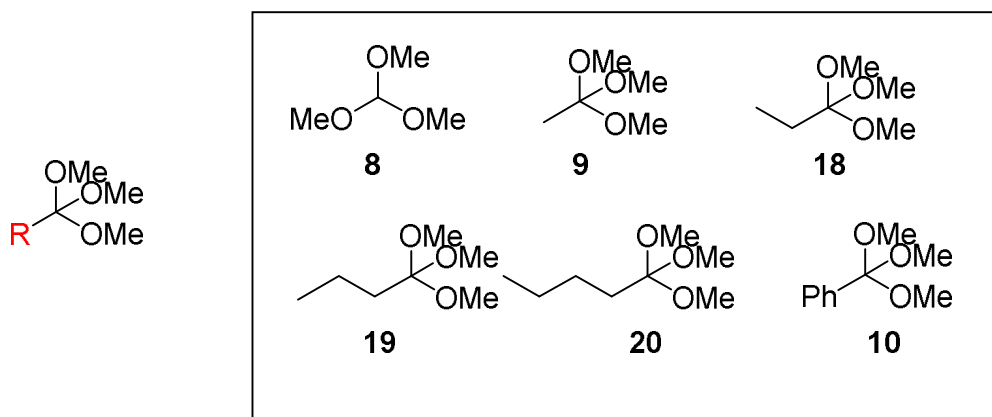
kwasu karboksylowego. Z kolei trzecia możliwość (ścieżka D) polega na tym, iż jeden enzym katalizuje zarówno przemianę ortoestru jak i kwasu karboksylowego.



Schemat 41. Proponowane mechanizmy enzymatycznej estryfikacji

Celem tego etapu badań były próby wyjaśnienia mechanizmu enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) z użyciem ortoestrów, acetalu i ketali. W związku z tym przeprowadzono reakcje enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) za pomocą różnych donorów grupy alkoksylowej. Na początku sprawdzono procedurę klasycznej enzymatycznej estryfikacji kwasu **1** alkoholem metylowym, po czym postanowiono zastosować metodologię opracowaną przez grupę Nicolosi (jako donor grupy alkoksylowej zastosowano ortoester trimetylu z dodatkiem alkoholu metylowego)¹³⁷ i porównać z wynikami badań nad EKR kwasu **1** przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy. W tym celu przeprowadzono reakcje enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) za pomocą ortoestrów trimetylowych o różnej długości łańcucha bocznego (**8 – 10**, **18 – 20**) (Rysunek 12), stosując Novozym 435 jako biokatalizator. Reakcje prowadzono w toluenie w temperaturze 40°C przez 72 godziny. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 5.

¹³⁷ Morrone, R.; Piattelli, M.; Nicolosi, G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1441-1443.



Rysunek 12. Ortoestry trimetylowe użyte w reakcji EKR kwasu **1**

Tabela 5. Enzymatyczna estryfikacja kwasu **1** za pomocą donorów grupy metoksylowej.

L.p.	Donor	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^c [%]	<i>E</i> ^d
1.	MeOH	<i>rac</i> - 3	1	-	-
2. ^b	MeOH + 9	<i>rac</i> - 3	5	-	-
3.	8	(<i>S</i>)- 3	43	57	6
4.	9	(<i>S</i>)- 3	46	46	4
5.	18	(<i>S</i>)- 3	41	81	17
6.	19	(<i>S</i>)- 3	26	47	3
7.	20	(<i>S</i>)- 3	48	60	6
8.	10	(<i>S</i>)- 3	50	99	>200

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **8-20** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), 40°C, 72 godz.

^b Warunki reakcji **1** (1 mmol), **9** (3 mmol), MeOH (0.1 ml), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), 40°C, 72 godz.

^c Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

^d Obliczono za pomocą równania: $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.p)]}{\ln[1-c(1-e.e.p)]}$

Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują, iż prosta enzymatyczna estryfikacja kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) za pomocą alkoholu metylowego (MeOH) pozwala na uzyskanie śladowych ilości racemicznego estru **3** (L.p. 1, Tabela 5). Z kolei zastosowanie procedury enzymatycznego kinetycznego rozdziału kwasów karboksylowych opracowanej przez grupę Nicolosi (ortoocetan trimetylu (**9**) z dodatkiem alkoholu metylowego) wpływa na nieznaczną poprawę konwersji substratu (c = 5%), jednakże nie na enancjoselektywność (L.p. 2, Tabela 5). Metodologia opracowana w ramach niniejszej pracy zaskutkowała otrzymaniem nieracemicznych produktów **3** (L.p. 3-8, Tabela 5). Najpierw przeprowadzono reakcje z ortoestrami alifatycznymi, stopniowo wydłużając

długość łańcucha przy centralnym atomie węgla (L.p. 3 – 7, Tabela 5). Zastosowanie ortomrówczanu trimetylu (**8**) i ortoocetanu trimetylu (**9**) jako donorów grupy alkoksylowej daje podobne rezultaty – dobrą konwersję substratu ($c = 43 - 46\%$), lecz niską enancjoselektywność ($E = (4 - 6)$) (L.p. 3 i 4, Tabela 5). Bardziej sterycznie zatłoczony ortopropionian trimetylu (**16**) pozwala na uzyskanie estru **3** z lepszą enancjoselektywnością ($E = 17$) (L.p. 5, Tabela 5). Jednakże dalsze wydłużanie łańcucha bocznego powoduje spadek wydajności i selektywności ($c = 26 - 48\%$, $E = 3 - 6$) (L.p. 6 i 7, Tabela 5). Z kolei zastosowanie ortobenzoesanu trimetylu (**10**) powoduje ogromny wzrost enancjoselektywności ($c = 50\%$, $E > 200$) (L.p. 8, Tabela 5). W przypadku wszystkich testowanych ortoestrów trimetylowych głównym produktem był ester metylowy kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**3**) o konfiguracji (*S*), co wykazano porównując odpowiednie czasy retencji uzyskane podczas rozdziału enancjomerów za pomocą HPLC.

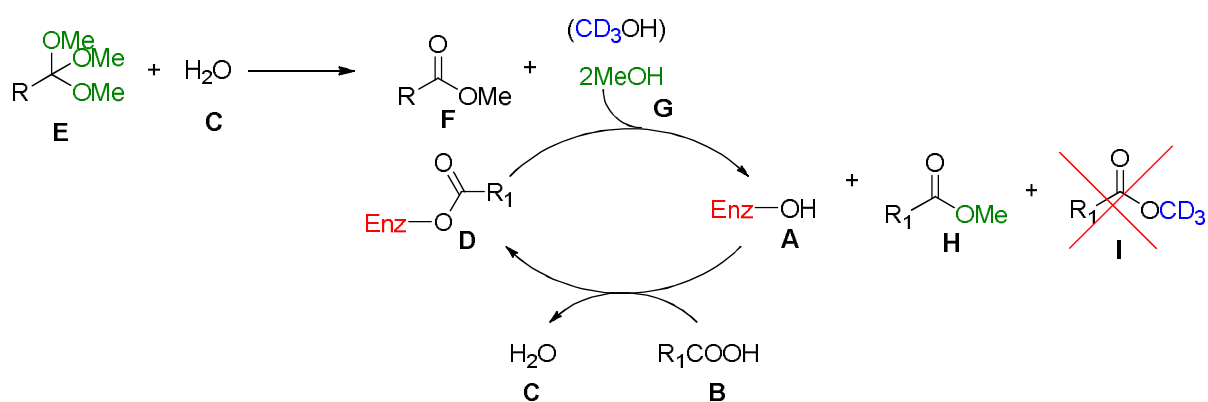
Otrzymane wyniki wskazują, iż zastosowanie ortoestrów alifatycznych jako donorów grupy alkoksylowej w reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) prowadzi do otrzymania produktów z niższą wydajnością i enancjoselektywnością, natomiast obecność grupy fenylowej w strukturze donora zapewnia doskonały rozdział kinetyczny. Porównując wyniki uzyskane dla reakcji z ortoocetanem trimetylu (**9**), przeprowadzonej za pomocą procedury grupy Nicolosi (L.p. 2, Tabela 5) z metodologią opracowaną w ramach tej rozprawy (L.p. 4, Tabela 9) można zauważyć, iż dodatek alkoholu metylowego do mieszaniny reakcyjnej powoduje obniżenie zarówno konwersji substratu, jak i enancjoselektywności procesu.

Analizując uzyskane rezultaty (Tabela 5) stwierdzono, iż struktura donora grupy alkoksylowej jest ściśle związana z enancjoselektywnością enzymatycznej estryfikacji.

Na podstawie wyników enzymatycznego kinetycznego rozdziału kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) rozważono możliwy mechanizm enzymatycznej estryfikacji za pomocą ortoestrów i acetali. Na początku postanowiono wyjaśnić mechanizm, opierając się na tym zaproponowanym przez włoskich naukowców (Schemat 40).¹³⁸ Główną różnicą metodologii opracowanej w ramach niniejszej rozprawy (rozdział 6.3) i literaturowej jest brak dodatku odpowiedniego alkoholu do mieszaniny reakcyjnej, więc mechanizm przedstawiony na Schemacie 40 należy poprawić. W związku z tym postanowiono rozważyć inny możliwy mechanizm hydrolizy ortoestru (ścieżki A+C lub

¹³⁸ Morrone, R.; Piattelli, M.; Nicolosi, G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1441-1443.

B+C, Schemat 41). Rozważany, poprawiony mechanizm zaprezentowano na Schemacie 42. W pierwszym etapie enzymatycznej estryfikacji ortoester **E** może ulegać hydrolizie enzymatycznej (ścieżka A, Schemat 41) lub kwasowej (ścieżka B, Schemat 41) do odpowiedniego estru **F** i dwóch cząsteczek alkoholu **G**. Racemiczny kwas karboksylowy **B** reaguje z grupą hydroksylową seryny znajdującej się w miejscu aktywnym enzymu **A**, w wyniku czego tworzy się kompleks acyl-enzym **D** oraz cząsteczka wody **C**. W kolejnym etapie zachodzi reakcja pomiędzy kompleksem **D**, a cząsteczką alkoholu **G** (powstałą w czasie hydrolizy ortoestru). W wyniku tej przemiany następuje uwolnienie enzymu oraz estru **H**.



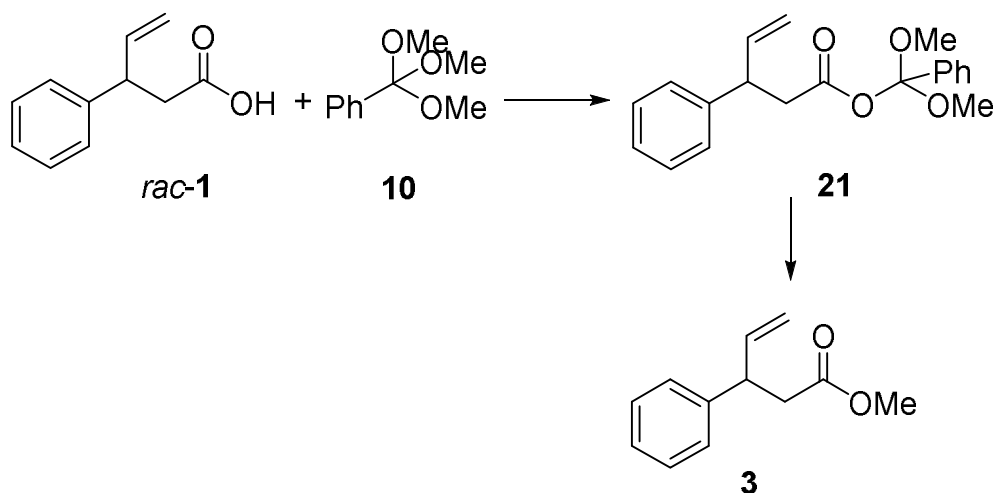
Schemat 42. Rozważany mechanizm enzymatycznej estryfikacji za pomocą ortoestrów

Niestety, zaproponowany na Schemacie 42 mechanizm także nie wyjaśnia zmiany wartości enancjoselektywności w zależności od zastosowanego donora grupy alkoksylowej. Gdyby ten mechanizm był prawidłowy, wówczas długość łańcucha bocznego przy centralnym atomie węgla ortoestru nie miałyby wpływu na enancjoselektywność enzymatycznej estryfikacji, a jedynie mogłyby wpływać na wydajność reakcji (szybkość hydrolizy ortoestrów może być różna). We wszystkich przypadkach substratem w reakcji byłyby cząsteczka tego samego alkoholu **G**.

W celu wyjaśnienia mechanizmu reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasów karboksylowych za pomocą omawianych donorów, postanowiono przeprowadzić reakcję z deuterowanym metanolem. Związek ten dodano do mieszaniny reakcyjnej (kwas 3-fenyl-4-pentenowy (**1**), ortoocetan trimetylu (**8**), toluen, Novozym 435) i przeprowadzono procedurę ERK, zgodnie z opracowanym powyżej protokołem. Gdyby mechanizm enzymatycznej estryfikacji przedstawiony na Schemacie 42 był prawidłowy, wówczas deuterowany alkohol metylowy konkurowałby z metanolem pochodzącym

z hydrolizy ortoestru, w rezultacie czego powstawałyby dwa produkty – ester deuterowany **I** i niedeuterowany **H** (Schemat 42). Produkt otrzymany w wyniku omawianej reakcji poddano analizie za pomocą spektroskopii ^1H NMR. Uzyskane widmo nie wykazało nawet śladowych ilości estru deuterowanego, otrzymano wyłącznie produkt niedeuterowany. Uzyskane wyniki potwierdzają, iż mechanizmy zaprezentowane na Schemacie 41 A i B oraz na Schemacie 42 są wysoce nieprawdopodobne.

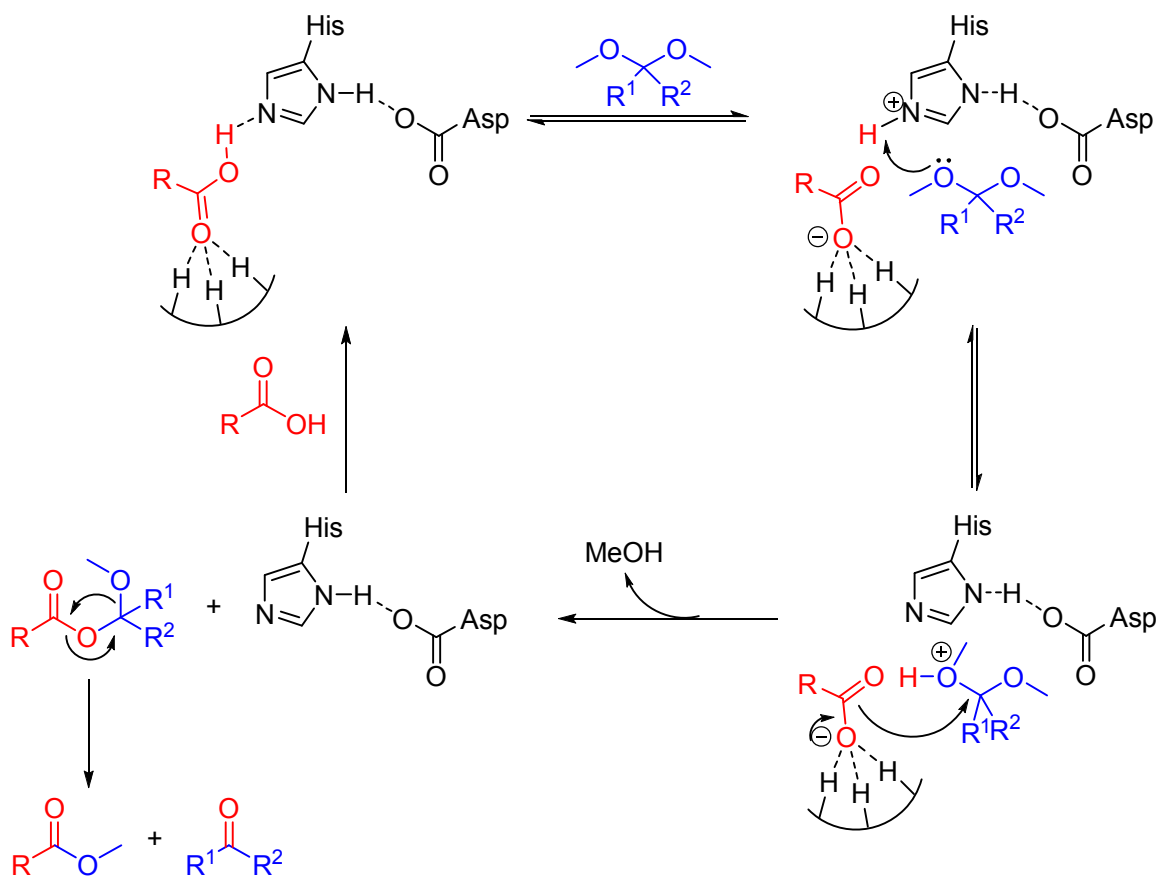
Dane literaturowe wskazują, iż w reakcji ortoestrów trialkilowych z kwasami karboksylowymi w warunkach katalizy kwasowej jako produkt pośredni powstaje odpowiedni karboksylan dialkanoksylowy (**21**)¹³⁹. Postanowiono sprawdzić, czy w warunkach opracowanego rozdziału kinetycznego kwasu **1** także powstaje tego typu produkt pośredni. W związku z tym, przeprowadzono reakcję enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**) z ortobenzoesanem trimetylu (**10**) (Schemat 43). Następnie mieszaninę reakcyjną poddano analizie za pomocą spektrometrii masowej. Otrzymane widmo masowe potwierdza obecność związku **21** w mieszaninie reakcyjnej



Schemat 43. Estryfikacja kwasu **1** za pomocą ortobenzoesanu trimetylu (**10**)

W oparciu o uzyskane wyniki i dane literaturowe zaproponowano mechanizm reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego za pomocą ortoestrów, acetalu i ketali (Schemat 44).

¹³⁹ (a) Kwart, H.; Price, M. B.; *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 5123-5129; (b) DeWolfe, R. H.; Jensen, J. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3264-3268; (c) van Melick, J. E. W.; Scheeren, J. W.; Nivard, R. J. F.; *Recl. Trav. Chim. Pays-B.* **1973**, *92*, 775-787.



Schemat 44. Proponowany mechanizm enzymatycznej estryfikacji kwasów karboksylowych z wykorzystaniem ortoestrów, acetai i ketali

Stwierdzono, iż enzym katalizuje zarówno przemianę kwasu karboksylowego, jak i donora, co wyjaśniałoby wpływ tego ostatniego na enancjoselektywność reakcji EKR. Na podstawie danych literaturowych (promiskuityzm enzymów, sekcja 4.1.1.2) i uzyskanych wyników zaproponowano, iż w enzymatycznej estryfikacji kwasu **1** za pomocą ortoestrów, acetai, ketali i ortowęglanów biorą udział tylko łańcuchy boczne dwóch aminokwasów triady katalitycznej centrum aktywnego – histydyna i kwas asparaginowy. W pierwszym etapie następuje związanie kwasu karboksylowego w miejscu aktywnym enzymu. Atom wodoru z cząsteczki kwasu karboksylowego jest przenoszony przez parę His-Asp i w rezultacie tworzy się jon karboksylanowy. W kolejnym etapie, w centrum aktywnym zostaje związany donor grupy alkoksylowej. Para His-Asp katalizuje przeniesienie protonu z kwasu na drugi substrat. Związki odłączają się od centrum aktywnego enzymu, następuje atak anionu kwasowego na cząsteczkę donora. Po odłączeniu cząsteczki alkoholu powstaje produkt pośredni, który następnie ulega przegrupowaniu, w wyniku czego powstaje pożądany ester.

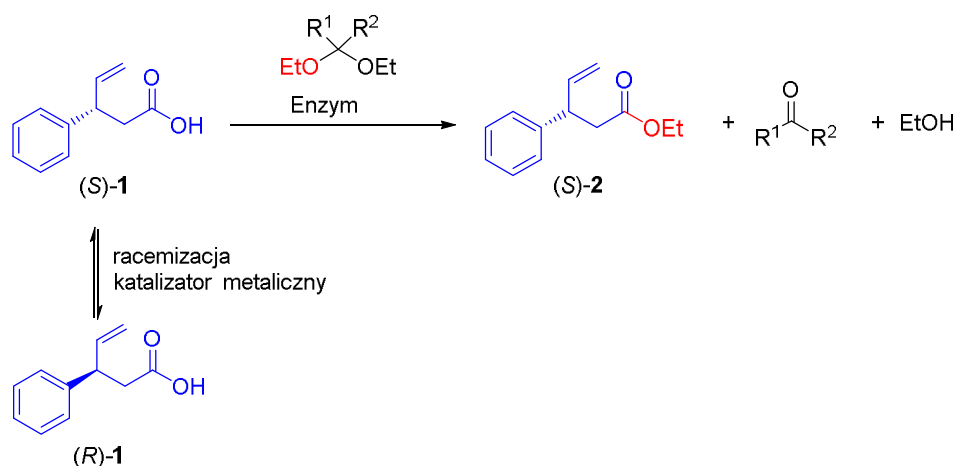
6.5. Badania nad opracowaniem enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

Celem kolejnego etapu badań było opracowanie enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). W rozdziale 6.3 opisano badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu **1**. Rezultaty tej pracy zakończyły się sukcesem. Metodologia ta pozwoliła na otrzymanie enancjomerycznie czystych pochodnych związku **1**. Mimo uzyskania idealnego ERK, metoda ta posiada wadę w postaci ograniczonej wydajności maksymalnej ($c = 50\%$). Zaletą dynamicznego rozdziału kinetycznego jest to, iż cały racemiczny substrat może zostać przekształcony w enancjomerycznie czysty produkt. Niereaktywny w rozdziale kinetycznym enancjomer jest racemizowany i poddawany dalszemu rozdziałowi, co powoduje wzrost wydajności reakcji. Jeżeli racemizacja zachodzi w sposób konkurencyjny do rozdziału kinetycznego, teoretycznie 100% mieszaniny racemicznej może ulec przemianie w jeden enancjomer. Dynamiczny rozdział kinetyczny jest procesem, w którym oba enancjomery substratu znajdują się w ciągłej równowadze. Zatem, racemizacja jest jednym z najważniejszych parametrów, który musi zostać zoptymalizowany.

Opracowanie enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) zachęciło do rozszerzenia tej procedury w rozdział dynamiczny. W związku z tym, postanowiono wprowadzić do reakcji czynnik racemizujący tak, aby uzyskać DKR (Schemat 45). Jedną z najbardziej popularnych metod racemizacji jest użycie katalizatorów metali przejściowych. Jednakże procedura ta została z powodzeniem zastosowana jedynie do rozdziału racemicznych pochodnych alkoholi¹⁴⁰ i amin¹⁴¹. W literaturze nie znaleziono wzmianki na temat dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasów karboksylowych zawierających wiązanie podwójne w pozycji γ za pomocą procedury tandem metal – enzym. Mimo to, w ramach niniejszych badań, postanowiono sprawdzić, czy katalizatory metali przejściowych można zastosować do racemizacji kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**).

¹⁴⁰ (a) Rachwalski, M.; Vermue, N.; Rutjes, F. P. J. T.; *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9268-9282; (b) Lihammar, R.; Millet, R.; Backvall, J.-E.; *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12114-12120; (c) Boren, L.; Martin-Matute, B.; Xu, Y.; Cordova, A.; Backvall, J.-E.; *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 225 – 232.

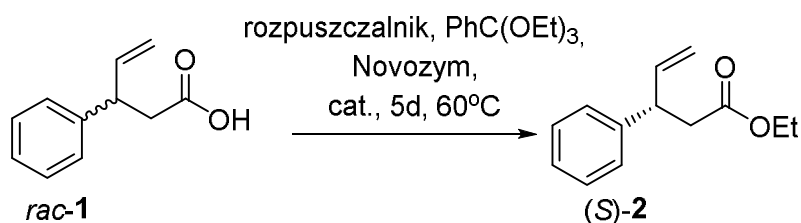
¹⁴¹ Kim, Y.; Park, J.; Kim, M.-J.; *ChemCatChem* **2011**, *3*, 271 – 277.



Schemat 45. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

6.5.1. Badania nad doбором rozpuszczalnika

W pierwszym etapie postanowiono sprawdzić wpływ rozpuszczalnika na wydajność enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu **1**. W tym celu przeprowadzono reakcje w warunkach analogicznych do tych, które zostały opracowane dla KR (rozdział 6.3.1.3), stosując Novozym 435 jako biokatalizator (ze względu na większą stabilność tego enzymu) i ortobenzoesan trietylu (**7**) jako donor grupy alkoksylowej. Procesy prowadzono w różnych rozpuszczalnikach w czasie pięciu dni, w temperaturze 60°C (Schemat 46).

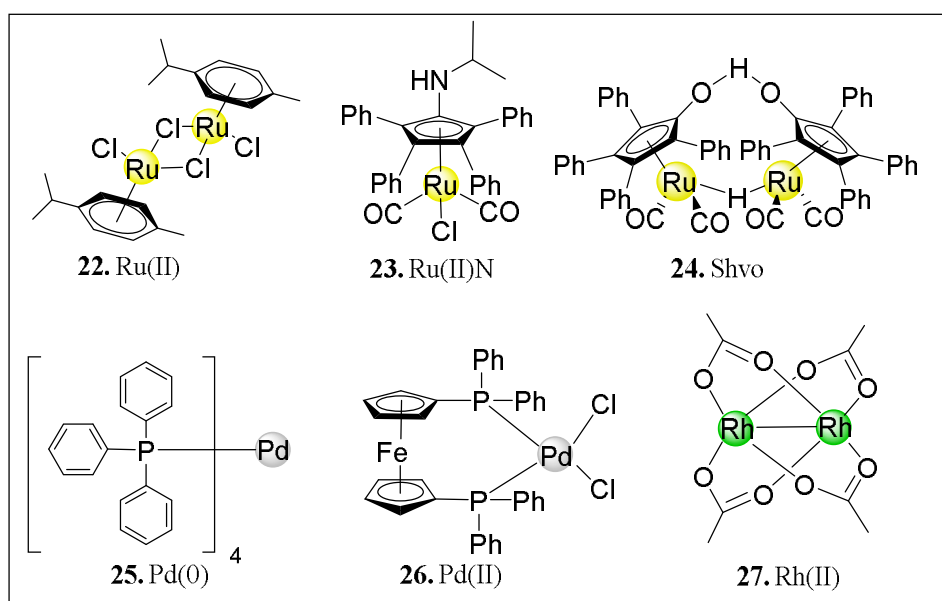


Schemat 46. DKR kwasu **1**

Do mieszaniny reakcyjnej dodano katalityczną ilość kompleksów metali przejściowych jako czynników racemizujących. Opierając się na danych literaturowych, postanowiono sprawdzić przydatność kilku komercyjnie dostępnych kompleksów metali używanych jako czynniki racemizujące w reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego –

dimer dichloro(*p*-cymeno) rutenu (II) (Ru(II)) (22)¹⁴², chlorodikarbonylo(1-(isopropylamino)-2,3,4,5-tetrafenylcyklopentadienyl) ruten (II) (Ru(II)N) (23)¹⁴³, katalizator Shvo (24)¹⁴⁴, tetrakis(trifenylfosfino) pallad (0) (Pd(0)) (25)¹⁴⁵, [1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloro pallad (II) (Pd (II)) (26)¹⁴⁶, dimer octanu rodu (II) (Rh(II)) (27)¹⁴⁷ (Rysunek 13).

W badaniach nad wpływem rozpuszczalnika na wydajność reakcji DKR kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (1) przetestowano następujące rozpuszczalniki: toluen, eter izoamyłowy, eter *tert*-butylo-metyłowy (TBME), dimetyloformamid (DMF), acetonitryl, cykloheksan, dioksan. W celu uniknięcia wątpliwości czy dany kompleks metalu katalizuje reakcję enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (1) przeprowadzono także reakcje w wymienionych rozpuszczalnikach bez dodatku katalizatora. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 6.



Rysunek 13. Katalizatory stosowane do racemizacji kwasu 1

¹⁴² Benaissi, K.; Poliakoff, M.; Thomas, N.R.; *Green Chem.*, 2009, **11**, 617–621.

¹⁴³ Warner, M. C.; Backvall, J.-E.; *Acc. Chem. Res.* **2013**, **46**, 2545 – 2555.

¹⁴⁴ Larsson, A. L. E.; Parsson, B. A.; Backvall, J.-E.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, **36**, 1211-1212.

¹⁴⁵ Kamal, A.; Azhar, M. A.; Krishnaji, T.; Malik, M. S.; Azeeda, S.; *Coord. Chem. Rev.* **2008**, **252**, 569 – 592.

¹⁴⁶ Ahn, Y.; Ko, S.-B.; Kim, M.-J.; Park, J.; *Coord. Chem. Rev.* **2008**, **252**, 647-658.

¹⁴⁷ Dinh, P. M.; Howarth, J. A.; Hudnott, A. R.; Williams, J. M. J., *Tetrahedron Lett.* **1996**, **37**, 7623 – 7626.

Tabela 6. Wpływ rozpuszczalnika na reakcję DKR kwasu **1**

L.p.	Katalizator	Rozpuszczalnik	c [%]
1.	-	Toluen	52
2.	-	Eter izoamyłowy	43
3.	-	TBME	20
4.	Ru (II) (22)	Toluen	88
5.	Ru (II) (22)	Eter izoamyłowy	65
6.	Ru (II) (22)	TBME	46
7.	Pd (0) (25)	Toluen	68
8.	Pd (0) (25)	Eter izoamyłowy	43
9.	Pd (0) (25)	TBME	32
10.	Pd (II) (26)	Toluen	80
11.	Pd (II) (26)	Eter izoamyłowy	63
12.	Pd (II) (26)	TBME	35
13.	Rh (II) (27)	Toluen	>99
14.	Rh (II) (27)	Eter izoamyłowy	87
15.	Rh (II) (27)	TBME	72
16.	Rh (II) (27)	DMF	8
17.	Rh (II) (27)	Acetonitryl	54
18.	Rh (II) (27)	Cykloheksan	75
19.	Rh (II) (27)	Dioksan	0
20.	Rh (II) (27)	-	58

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **7** (3 mmol), rozpuszczalnik (1.21 ml), Novozym (10 mg), katalizator metaliczny (**22** – **27**) (10 %_{mol}), 60°C, 5 dni.

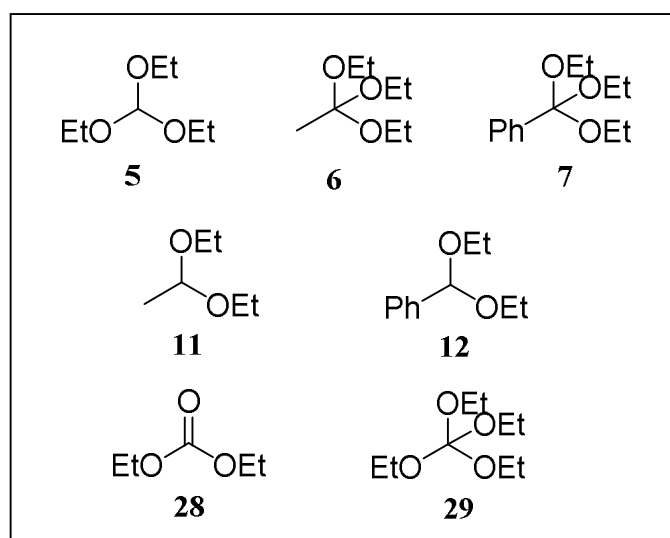
Wyniki uzyskane w ramach powyższych eksperymentów wskazują, iż w przypadku rozdziału kinetycznego (reakcje bez dodatku katalizatora metalicznego) konwersja substratu we wszystkich testowanych rozpuszczalnikach była umiarkowana (c = 20 – 52%) (L.p. 1 – 3, Tabela 6). Dodatek kompleksu metalu przejściowego (**22** – **27**) spowodował wzrost wydajności reakcji estryfikacji kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (L.p. 4 – 19, Tabela 6). Dla wszystkich sprawdzanych katalizatorów najwyższą konwersję odnotowano, gdy środowisko reakcji stanowił toluen (c > 68%) (L.p. 4, 7, 10, 13, Tabela 6). Dobre wyniki otrzymano także dla eteru izoamyłowego (c > 43%) (L.p. 5, 8, 11, 15, Tabela 6), natomiast najniższą konwersję

substratu zaobserwowano w przypadku zastosowania eteru *tert*-butylo-metylowego ($c > 32\%$) (L.p. 6, 9, 12, 16, Tabela 6). Warto podkreślić, iż dla wszystkich testowanych katalizatorów metalicznych, reakcje prowadzone w tych trzech rozpuszczalnikach były bardziej wydajne niż w przypadku rozdziału kinetycznego. Spośród sprawdzanych czynników racemizacji najlepsze rezultaty uzyskano dla dimeru octanu rodu (II) (Rh(II)) (**27**) (L.p. 13 – 15, Tabela 6), w związku z tym postanowiono przetestować w jego obecności jeszcze kilka rozpuszczalników. Przeprowadzono również reakcję bez dodatku rozpuszczalnika organicznego, w tym przypadku konwersja substratu była umiarkowana ($c = 58\%$) (L.p. 20, Tabela 6). Estry etylowe **2** z dobrą wydajnością otrzymano, gdy środowisko reakcji stanowił eter izoamyłowy ($c = 87\%$) (L.p. 14, Tabela 6), eter *tert*-butylo-metylowy ($c = 72\%$) (L.p. 15, Tabela 6), cykloheksan ($c = 75\%$) (L.p. 18, Tabela 10) i acetonitryl ($c = 54\%$) (L.p. 17, Tabela 6). Natomiast dimetyloformamid i dioksan (okazały się być słabymi rozpuszczalnikami dla reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) ($c < 9\%$) (L.p. 16, 19, Tabela 6). Najwyższą konwersję, podobnie jak w przypadku enzymatycznego rozdziału kinetycznego zaobserwowano w toluenie ($c > 99\%$) (L.p. 13, Tabela 6). W związku z tym kolejne eksperymenty przeprowadzono właśnie w tym rozpuszczalniku.

6.5.2. Badania nad doбором donora grupy alkoksyłowej i katalizatora racemizacji

Badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (rozdział 6.3) wykazały, iż jednym z najważniejszych czynników wydajnej enzymatycznej estryfikacji jest dobór odpowiedniego donora grupy alkoksyłowej. Opierając się na wynikach otrzymanych w rozdziale 6.3 postanowiono przetestować wybrane donory w reakcji enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu **1**. W tym celu sprawdzono siedem związków donujących grupę etoksyłową: ortomrówczan trietylu (**5**), ortoocetan trietylu (**6**), ortobenzoestan trietylu (**7**), 1,1-dietoksyetan (**11**), acetali dietylowy benzaldehydu (**12**), węglan tetraetylu (**28**) oraz ortowęglan tetraetylu (**29**) (Rysunek 14). Modelowe reakcje prowadzono w toluenie w temperaturze 60°C w ciągu pięciu dni, stosując Novozym 435 jako biokatalizator oraz kompleksy metali przejściowych (**21** – **26**), zaprezentowane na Rysunku 10. Dla

porównania wykonano również reakcje w analogicznych warunkach, lecz bez dodatku czynnika racemizującego. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 7.



Rysunek 14. Donory grupy etoksylowej

Tabela 7. Dobór donora grupy alkoksylowej w reakcji DRK kwasu 1.

L.p.	Katalizator	Donor	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^b [%]
1.	-	5	(<i>S</i>)-2	13	68
2.	-	6	(<i>S</i>)-2	57	69
3.	-	7	(<i>S</i>)-2	52	97
4.	-	11	<i>rac</i> -2	3	-
5.	-	12	(<i>S</i>)-2	32	81
6.	-	28	<i>rac</i> -2	9	-
7.	-	29	(<i>S</i>)-2	23	29
8.	Ru (II) (22)	5	(<i>S</i>)-2	79	34
9.	Ru (II) (22)	6	(<i>S</i>)-2	81	69
10.	Ru (II) (22)	7	(<i>S</i>)-2	88	>99
11.	Ru (II) (22)	11	<i>rac</i> -2	80	-
12.	Ru (II) (22)	12	(<i>S</i>)-2	97	60
13.	Ru (II) (22)	28	<i>rac</i> -2	56	-
14.	Ru (II) (22)	29	(<i>S</i>)-2	80	>99

15.	Ru(II)N (23)	5	(S)-2	49	66
16.	Ru(II)N (23)	6	rac-2	54	-
17.	Ru(II)N (23)	7	(S)-2	75	90
18.	Ru(II)N (23)	11	(S)-2	46	80
19.	Ru(II)N (23)	12	(S)-2	90	14
20.	Ru(II)N (23)	28	rac-2	45	-
21.	Ru(II)N (23)	29	(S)-2	52	8
22.	Shvo (24)	5	X	45	n.d.
23.	Shvo (24)	6	X	77	n.d.
24.	Shvo (24)	7	X	73	n.d.
25.	Shvo (24)	11	X	56	n.d.
26.	Shvo (24)	12	X	96	n.d.
27.	Shvo (24)	28	X	38	n.d.
28.	Shvo (24)	29	X	61	n.d.
29.	Pd (0) (25)	5	(S)-2	39	>99
30.	Pd (0) (25)	6	(S)-2	72	52
31.	Pd (0) (25)	7	(S)-2	68	99
32.	Pd (0) (25)	11	rac-2	51	-
33.	Pd (0) (25)	12	(S)-2	92	99
34.	Pd (0) (25)	28	rac-2	33	-
35.	Pd (0) (25)	29	(S)-2	68	35
36.	Rh (II) (27)	5	(S)-2	55	>99
37.	Rh (II) (27)	6	(S)-2	84	79
38.	Rh (II) (27)	7	(S)-2	>99	>99
39.	Rh (II) (27)	11	(S)-2	43	91
40.	Rh (II) (27)	12	(S)-2	11	68
41.	Rh (II) (27)	28	(S)-2	48	>99
42.	Rh (II) (27)	29	rac-2	37	-

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **5-29** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), katalizator (**22-27B**) (10%_{mol}), 60°C, 5 dni.

^b Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

Wyniki uzyskane dla reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**) wskazują, iż najgorszymi donorami grupy alkoksylowej dla

tej przemiany są 1,1-dietoksyetan (**11**) oraz węglan dietylu (**28**) – otrzymano niewielkie ilości racemicznego produktu ($c = 3-9$) (L.p. 4, 6, Tabela 7). Zastosowanie ortomrówczanu trietylu (**5**) i ortowęglanu tetraetylu (**29**) pozwoliło otrzymać nieracemiczny ester **2** z niewielkim nadmiarem enancjomerycznym ($e.e. = 29$ i 68%), lecz wydajność tych procesów była niska (L.p. 1, 7, Tabela 7). Nieco lepsze rezultaty otrzymano dla ortoocetanu trietylu (**6**) oraz acetalu dietylowego benzaldehydu (**12**) (L.p. 2, 5, Tabela 7). Najlepszą konwersję substratu oraz nadmiar enancjomeryczny uzyskano, gdy donorem grupy alkoksylowej był ortobenzoesan trietylu (**7**) (L.p. 3, Tabela 7).

Dodatek kompleksu metalu przejściowego do medium reakcyjnego znacząco poprawił wydajność reakcji estryfikacji kwasu **1** oraz czystość optyczną otrzymanych produktów. Dla wszystkich testowanych donorów, kiedy zastosowano dimer dichloro(*p*-cymeno) rutenu (II) (Ru(II)) (**22**) jako katalizator, procesy były dużo wydajniejsze w porównaniu z rozdziałem kinetycznym (L.p. 8 – 14, Tabela 7). Jednakże, podobnie jak w przypadku KR, zastosowanie 1,1-dietoksyetanu (**11**) oraz węglanu dietylu (**28**) spowodowało powstanie produktów racemicznych (L.p. 11, 13, Tabela 7). Stosunkowo dobrą konwersję substratu zanotowano dla ortomrówczanu trietylu (**5**) oraz acetalu dietylowego benzaldehydu (**12**), lecz estry **2** otrzymano z niskim nadmiarem enancjomerycznym (L.p. 8, 12, Tabela 7). Dużo lepsze rezultaty uzyskano w przypadku ortoocetanu trietylu (**6**) ($c = 81$, $e.e. = 69\%$) (L.p. 9, Tabela 7), natomiast najlepszy rozdział zaobserwowano dla ortobenzoesanu trietylu (**7**) ($c = 88\%$, $e.e. > 99\%$) oraz ortowęglanu tetraetylu (**29**) ($c = 80\%$, $e.e. > 99\%$) (L.p. 10, 14, Tabela 7).

Nieco słabsze rezultaty zaobserwowano, gdy zastosowano chlorodikarbonylo(1-(isopropylamino)-2,3,4,5-tetrafenylocyklopentadienylo) ruten (II) (Ru(II)N) (**24**) jako katalizator racemizacji (L.p. 15 – 21, Tabela 7). W przypadku większości przetestowanych donorów, kompleks **24** zapewnił uzyskanie produktów z wyższymi wydajnościami, jednak niższymi nadmiarami enancjomerycznymi w porównaniu z rozdziałem kinetycznym. Podobnie, jak w przypadku większości testowanych katalizatorów, estryfikacja za pomocą węglanu dietylu (**29**) dostarczyła racemicznego produktu **2** (L.p. 20, Tabela 7). Co więcej, racemiczny ester został otrzymany także dla donora **6**, który zazwyczaj zapewniał dobry rozdział dynamiczny (L.p. 16, Tabela 7). Niezadowolające rezultaty objawiające się niską wydajnością lub/oraz niskim nadmiarem enancjomerycznym zaobserwowano w przypadku donorów **5**, **11**, **12** oraz **29** (L.p. 15, 18, 19, 21, Tabela 7). Najbardziej efektywnym związkami donującymi grupę etoksylową był ortobenzoesan trietylu (**7**) ($c = 75\%$, $e.e. = 90\%$) (L.p. 17, Tabela 7).

Kolejnym testowanym katalizatorem był kompleks Shvo (**24**) (L.p. 22 – 28, Tabela 7). Niestety, w przypadku tego związku, dla wszystkich sprawdzanych donorów otrzymano mieszaninę innych produktów niż pożądaný ester **2**, mimo iż w kilku przypadkach konwersja substratu była wysoka (L.p. 23, 24, 26, Tabela 7). Nie ustalano struktury tych związków. Przyczyny uzyskania innych produktów niż spodziewane estry **2** należy upatrywać w samym katalizatorze Shvo. Otóż kompleks ten, jak wspomniano w rozdziale 4.2.1.1, wykazuje aktywność tylko w obecności niektórych donorów (takich jak aktywowane estry aryłowe), w przeciwnym wypadku powstaje znaczna ilość produktów ubocznych.

Reakcje dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**), w których jako czynnik racemizujący zastosowano tetrakis(trifenylofosfino) pallad(0) (Pd(0)) (**25**) pozwoliły uzyskać bardziej zadowalające wyniki (L.p. 29 – 35, Tabela 11). Dla prawie wszystkich testowanych donorów konwersja substratów oraz czystość optyczna uzyskanych produktów były wyższe niż w przypadku rozdziału kinetycznego. Podobnie, jak dla większości kompleksów metali, racemiczny ester **2** otrzymano w reakcji kwasu **1** z donarami **11** i **28** (L.p. 32, 34, Tabela 7). Niezadowalające rezultaty uzyskano także stosując związki **6** i **29** (L.p. 30, 35, Tabela 7). Wysoką czystość optyczną produktu (*e.e.* > 98%) zanotowano w przypadku donorów **5**, **7** i **12** (L.p. 29, 31, 33, Tabela 7), jednakże tylko acetal dietylowy benzaldehydu (**12**) zapewnił dobrą wydajność procesu (*c* = 92%) (L.p. 33, Tabela 7).

Ostatnim testowanym katalizatorem był dimer octanu rodu (Rh(II)) (**27**). Dla większości sprawdzanych donorów zastosowanie tego kompleksu pozwoliło otrzymać najlepsze wyniki zarówno pod względem wydajności, jak i czystości optycznej otrzymanych produktów (L.p. 35 – 42, Tabela 7). Tylko w przypadku jednego czynnika donującego – ortowęglanu tetraetylu (**29**) uzyskano racemiczny ester **2** (L.p. 42, Tabela 7). Z kolei estryfikacja kwasu **1** związkami **6**, **11** oraz **12** pozwoliła na otrzymanie produktu z dobrym nadmiarem enancjomerycznym, jednakże z niską wydajnością (L.p. 37, 39, 40, Tabela 7). Najwyższą czystość optyczną estru etylowego **2** (*e.e.* > 99%) zaobserwowano, gdy reakcje prowadzono w obecności reagentów **5**, **7** oraz **28** (L.p. 36, 38, 41, Tabela 7), lecz w przypadku ortomrówczanu trietylu (**5**) i węglanu dietylu (**27**) konwersja substratu nie przekroczyła 84% (L.p. 36, 41, Tabela 7). Najlepsze rezultaty zarówno pod względem wydajności, jak i czystości optycznej produktu uzyskano, gdy zastosowano ortobenzoestan trietylu (**7**) jako donor grupy alkoksyłowej (*c* > 99%, *e.e.* > 99%) (L.p. 36, Tabela 7).

Zaprezentowane w Tabeli 7 wyniki wskazują, iż najbardziej efektywnym katalizatorem racemizacji w reakcji enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) jest dimer octanu rodu (Rh(II)) (**27**), natomiast najlepszym donorem grupy alkosylowej jest ortobenzoesan trietylu (**7**). Zastosowanie tych reagentów w estryfikacji kwasu **1** przy użyciu Novozymu 435 jako biokatalizatora prowadzi do otrzymania estru etylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**2**) w postaci jednego enancjomeru o konfiguracji (*S*) z wydajnością ilościową.

W kolejnym etapie badań nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) postanowiono sprawdzić wpływ biokatalizatora na wydajność i enancjoselektywność tej reakcji. Opierając się na danych otrzymanych podczas badań nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego (rozdział 6.3) wybrano enzymy, dla których przeprowadzony EKR kwasu **1** był najbardziej efektywny. Reakcje przeprowadzono, stosując pięć donorów grupy alkosylowej: ortoocetan trietylu (**6**), 1,1-dietoksyetan (**11**), ortomrówczan trimetylu (**7**), acetal dimetylowy benzaldehydu (**14**) oraz ortowęglan tetraizopropylu (**17**). Do badań modelowych użyto dimeru octanu rodu (Rh(II)) (**27**) jako katalizatora racemizacji, reakcje prowadzono w toluenie w 60°C przez 5 dni. Przetestowano następujące biokatalizatory: lipazę z *Penicillium roqueforti* (PRL), lipazę z *Rhizopus arrhizus* (RAL), proszek acetonowy z wątroby gęśiej (GLAP) oraz Novozym 435. Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Wpływ enzymu i donora na DKR kwasu **1**

L.p.	Donor	Enzym	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^b [%]
1.	6	Novozym	(<i>S</i>)- 2	84	79
2.	6	GLAP	(<i>S</i>)- 2	80	84
3.	11	Novozym	(<i>S</i>)- 2	43	91
4.	11	PRL	(<i>S</i>)- 2	41	58
5.	11	ARL	(<i>S</i>)- 2	42	82
6.	8	Novozym	(<i>S</i>)- 3	55	>99
7.	8	PRL	(<i>S</i>)- 3	20	94
8.	8	GLAP	(<i>S</i>)- 3	42	87
9.	14	Novozym	(<i>S</i>)- 3	11	68
10.	17	Novozym	(<i>S</i>)- 4	48	70

^a Warunki reakcji: **1** (1 mmol), **6-17** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), **27** (10%mol), 60°C, 5d.

^b Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

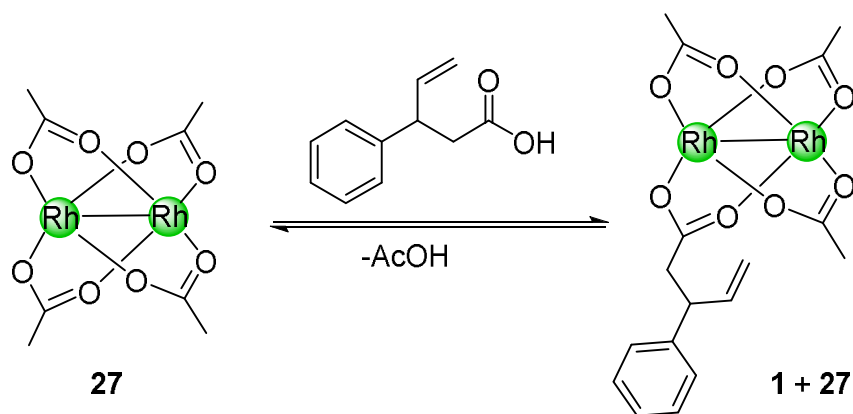
Wyniki przedstawione w Tabeli 8 wskazują, iż dla większości testowanych donorów najlepszym biokatalizatorem w reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu **1** jest Novozym (L.p. 1, 3, 6, 9, Tabela 8). Rozpatrując wpływ donorów grupy alkoksylowej na badaną reakcję, najlepsze rezultaty otrzymano dla ortoocetanu trietylu (**6**) (L.p. 1, 2, Tabela 8). Reakcje z 1,1-dietoksyetanem (**11**) okazały się mało wydajne, konwersja substratu nie przekroczyła 43% (L.p. 3 – 5, Tabela 8). Najwyższą czystość optyczną produktu estryfikacji związkami **11** otrzymano dla reakcji katalizowanej Novozymem (L.p. 3, Tabela 8). Enzym ten okazał się także najlepszy dla estryfikacji kwasu **1** ortomówczanem trimetylu (**8**), otrzymano ester **3** w postaci jednego enancjomeru (*e.e.* > 99%), jednakże wydajność tego procesu była niska (*c* = 55%) (L.p. 6, Tabela 8). Bardzo niska konwersja i umiarkowana czystość optyczna dotyczy także reakcji z acetalem dimetylowym benzaldehydu (**14**) (L.p. 9, Tabela 8). Ortowęglan tetraizopropylu (**17**) także nie okazał się być dobrym donorem dla reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu **1** (L.p. 10, Tabela 8).

W rozdziale 6.5 zaprezentowano badania przeprowadzone nad opracowaniem enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). Optymalizacja tego procesu polegała na doborze odpowiedniego rozpuszczalnika, katalizatora racemizacji, biokatalizatora oraz donora grupy alkoksylowej. Na podstawie otrzymanych wyników opracowano najlepsze warunki DKR kwasu **1**. Są to: toluen jako rozpuszczalnik, ortobenzoesan trietylu (**7**) jako donor grupy alkoksylowej, dimer octanu rodu (Rh(II)) (**27**) jako katalizator racemizacji oraz Novozym 435 jako biokatalizator. Tak opracowane warunki pozwoliły na otrzymanie estru etylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**2**), w postaci pojedynczego enancjomeru o konfiguracji (*S*) (określono porównując czasy retencji enancjomerów rozdzielonych za pomocą chiralnej HPLC) z wydajnością ilościową.

Otrzymany enancjomerycznie czysty ester (*S*)-**2** poddano hydrolizie chemicznej. Celem tych badań było sprawdzenie czy podczas hydrolizy estru nie zachodzi racemizacja. Otrzymany kwas 3-fenylo-4-pentenowy poddano analizie za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze złożem chiralnym. Okazało się, iż uzyskano tylko jeden enancjomer kwasu **1**. Zmierzono również skręcalność właściwą związku **1** w chloroformie. Wartość ta wynosiła $[\alpha]_D^{20} = -18.7^\circ$ (*c* = 1.0) i porównano z wartością literaturową otrzymaną dla enancjomeru (*R*) kwasu 3-fenylo-4-pentenowego -

$[\alpha]_D^{25} = +18.6^\circ$ ($c=1.1$)¹⁴⁸. W wyniku hydrolizy chemicznej enancjomerycznie czystego estru **2** uzyskano kwas (*S*)-**1** o idenetycznej czystości optycznej. Dane te potwierdzają, iż opracowaną metodologię dynamicznego rozdziału kinetycznego można wykorzystać do otrzymywania enancjomerycznie czystych kwasów 3-arylo-4-pentenowych.

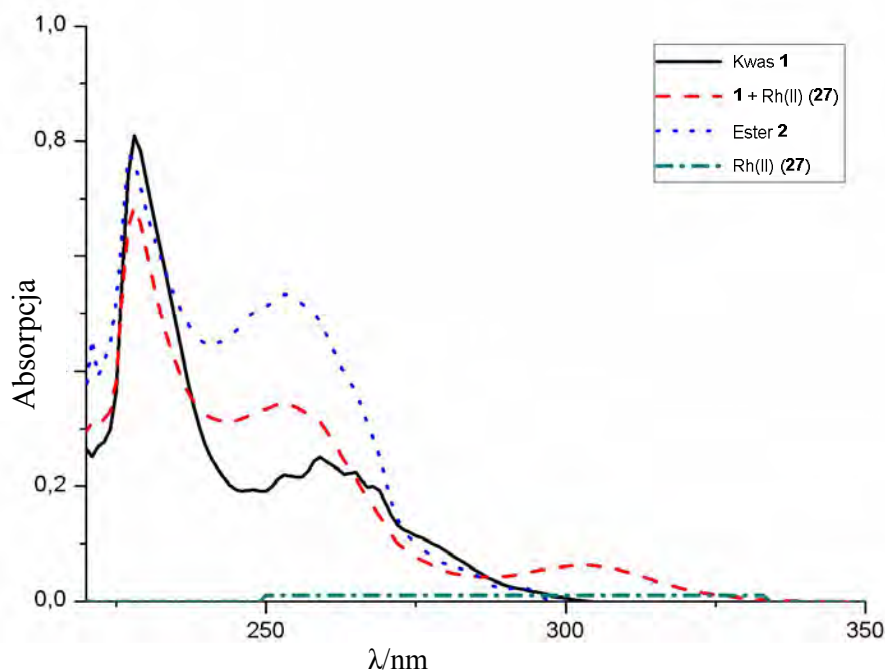
Następnie postanowiono podjąć próby wyjaśnienia mechanizmu racemizacji opracowanej reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż najlepszym katalizatorem racemizacji kwasu **1** jest dimer octanu rodu (II) (**27**). Dane literaturowe wskazują, że ten kompleks rodu (II) w obecności innych kwasów karboksylowych łatwo wymienia pomostowe grupy octanowe,¹⁴⁹ co może tłumaczyć wysoką wydajność katalizatora $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$ (**27**) w DKR kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). Wymiana pomostowych grup octanowych z kwasem **1** (Schemat 47) może zostać potwierdzona za pomocą spektroskopii UV-Vis. Zarejestrowano widmo absorpcji kwasu **1**, kwasu **1** po 1 godzinie mieszania z katalizatorem **27**, wolnego kompleksu **27** oraz estru etylowego **2** w CDCl_3 (Rysunek 15). W przypadku tworzenia się kompleksu Rh(II) z kwasem 3-fenylo-4-pentenowym (**1**) zaobserwowano efekt hipochromowy (spadek intensywności) oraz pojawienie się nowego pasma przy długości fali $\lambda = 308 \text{ nm}$.



Schemat 47. Wymiana grupy octanowej w katalizatorze **27** w reakcji z kwasem **1**

¹⁴⁸ Gao, M.; Wang, D.-X.; Zheng, Q.-Y.; Wang, M.-X.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9532-9535.

¹⁴⁹ (a) Cotton, F. A.; Walton, R. A.; *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, 2nd ed. Oxford Univ. Press: New York **1993**; (b) Garcia-Granda, S.; Lahuerta, P.; Latorre, J.; Martinez, M.; Peris, E.; Sanau, M.; Ubeda, M. A.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 539-544; (c) Lahuerta, P.; Peris, E.; *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 4547-4551; (d) Dobson, A.; Robinson, S. D.; *Platinum Metal Rev.* **1976**, *20*, 56-63.



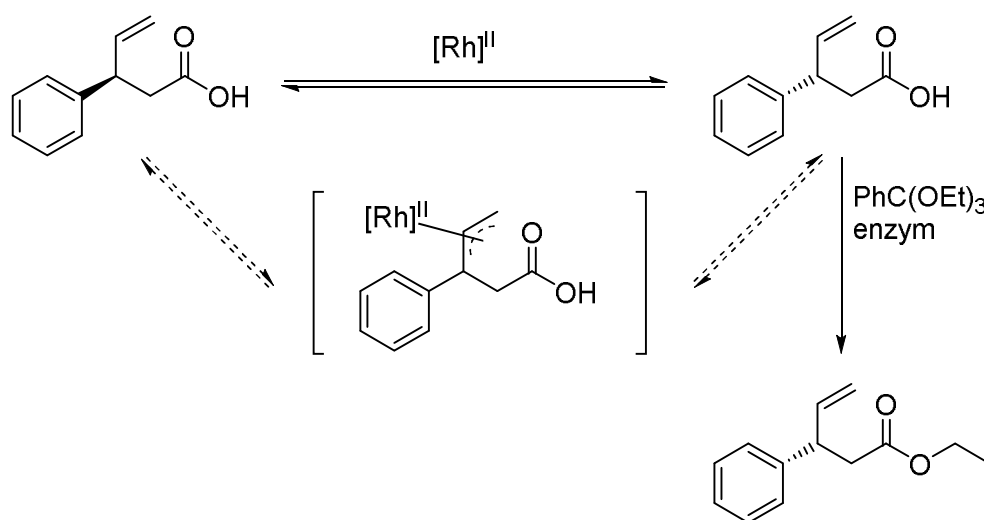
Rysunek 15. Widmo absorpcji kwasu **1**, kompleksu rodu (**27**) oraz kompleksu rodu (**27**) z kwasem **1**

W sekcji 4.2 pokazano, iż kompleks **27** został z powodzeniem zastosowany w rozdziale dynamicznym 1-fenylotanolu.¹⁵⁰ W tym przypadku racemizacja alkoholu zachodziła za pomocą mechanizmu przeniesienia wodoru. Interesujący jest zatem fakt, jaki mechanizm towarzyszy racemizacji kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**). Zazwyczaj substraty zawierające wiązania nienasycone (allilowe alkohole lub estry) są poddawane racemizacji katalizatorami palladowymi, poprzez tworzenie się kompleksów π -allilowych (o czym wspomniano w rozdziale 4.2.1.1). Jednakże alkohole allilowe mogą także ulegać racemizacji zgodnie z mechanizmem przeniesienia wodoru, gdy tego typu katalizatory zostaną zastosowane¹⁵¹ (rozdział 4.2.1.1). W przypadku racemizacji zachodzącej za pomocą mechanizmu przeniesienia wodoru, zazwyczaj wymagany jest dodatek zewnętrznej zasady jako kokatalizatora. Rezultaty opracowanej w ramach niniejszej rozprawy metodologii dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu **1** wskazują, iż racemizacja substratu jest bardzo wydajna, stąd kokatalizator nie jest wymagany. Na podstawie powyższych danych stwierdzono, iż kwas **1** prawdopodobnie racemizuje poprzez tworzenie się rodowego kompleksu π -allilowego (Schemat 48). Oba enancjomery kwasu 3-fenyl-4-pentenowego znajdują się w ciągłej równowadze. Jednocześnie zachodzi reakcja rozdziału kinetycznego – preferowany przez enzym

¹⁵⁰ Dinh, P. M.; Howarth, J. A.; Hudnott, A. R.; Williams, J. M. J.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623-7626.

¹⁵¹ Lee, D.; Huh, E. A.; Kim, M.-J.; Jung, H. M.; Koh, J. H.; Park, J.; *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2377-2379.

izomer (w tym przypadku *S*) ulega enzymatycznej estryfikacji, w wyniku czego powstaje optycznie czysty ester etylowy kwasu 3-fenyl-4-pentenowego. Ważne jest, aby produkt reakcji enzymatycznej nie ulegał racemizacji. W celu określenia wpływu katalizatora Rh(II) na racemizację optycznie czystego estru **2** przeprowadzono eksperyment polegający na inkubowaniu tegoż katalizatora (**27**) z enancjomerycznie czystym estrem (*S*)-**2** w toluenie w temperaturze 60°C przez 24 godziny. Otrzymano ester **2** z identycznym nadmiarem enancjomerycznym (*e.e.* > 99%), co oznacza, iż kompleks **27** nie powoduje racemizacji produktu.



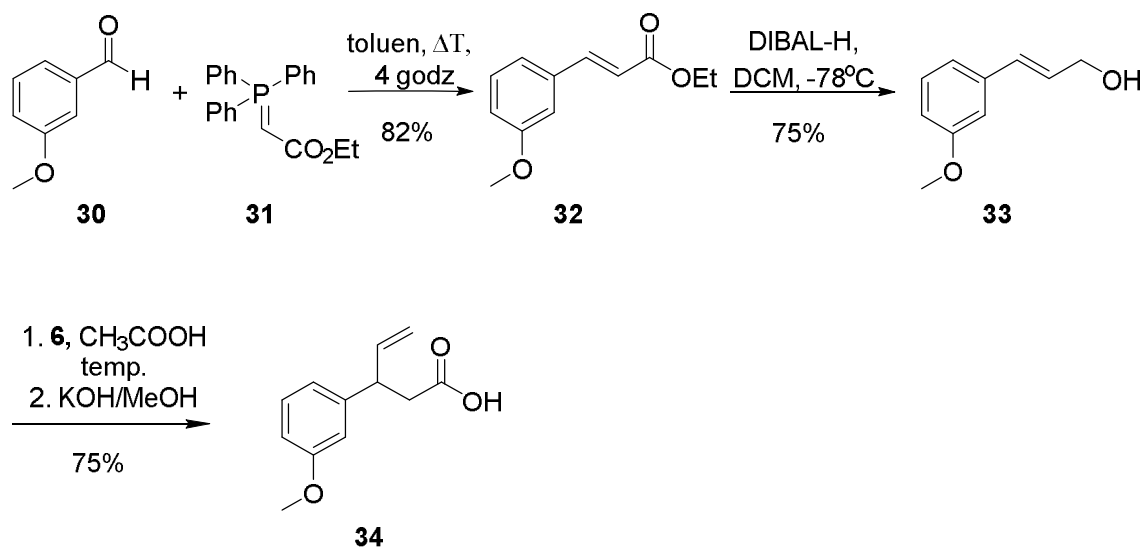
Schemat 48. Proponowany mechanizm DKR kwasu **1**

6.6. Badania nad opracowaniem rozdziału kinetycznego i dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-(*m*-metoksyfenilo)-4-pentenowego

Celem kolejnego etapu badań było zastosowanie opracowanych w rozdziałach 6.3. i 6.5. metodologii do syntezy optycznie czystych pochodnych kwasu 3-(*m*-metoksyfenilo)-4-pentenowego (**34**). Jak wspomniano w rozdziale 6.2, związek ten może służyć do syntezy leku przeciwbólowego, tapentadolu.¹⁵² W celu otrzymania racemicznego kwasu **34** należało opracować metodę syntezy alkoholu 3-(*m*-metoksy)cynamonowego (**33**). Związek **33** postanowiono otrzymać za pomocą

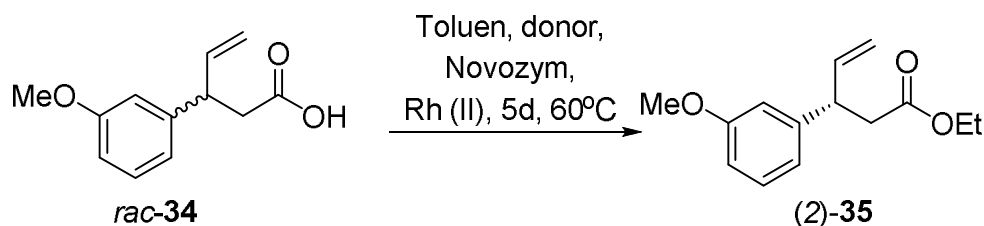
¹⁵² Zhang, Q.; Li, J.-F.; Tian, G.-H.; Zhang, R.-X.; Sun, J.; Suo, J.; Feng, X.; Fang, D.; Jiang, X.-R.; Shen, J.-S.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 577-582.

reakcji olefinowania Wittiga z *m*-anizaldehydem (**30**) i (karboetoksymetyleno)trifenylfosforanu (**31**) oraz następczej redukcji otrzymanego estru **32** za pomocą wodorku diizobutyloglinu (DIBAL-H). Alkohol *m*-metoksycynamonowy (**33**) poddano następnie reakcji z ortoocetanem trietylu (**6**), uzyskując kwas 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowy (**34**) z wydajnością 75% (Schemat 49). Natomiast wzorcowy ester etylowy kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**35**) otrzymano w reakcji chlorku kwasowego z odpowiednim alkoholem z wydajnością wynoszącą 88%.



Schemat 49. Synteza kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**34**)

Otrzymany racemiczny kwas **34** postanowiono poddać reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego i enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego. W tym celu posłużono się procedurami opracowanymi w rozdziale 6.3 i 6.5. Rozdział kinetyczny kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**34**) przeprowadzono w toluenie w temperaturze 60°C , stosując Novozym 435 jako biokatalizator oraz ortobenzoesan trietylu (**7**) jako donor grupy alkoksylowej. Czas reakcji wynosił 5 dni. Z kolei dla reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu **34** postanowiono przetestować różne donory grupy etoksyylowej – ortomrówczan trietylu (**5**), ortoocetan trietylu (**6**), ortobenzoesan trietylu (**7**), 1,1-dietoksyetan (**11**), acetal dietylowy benzaldehydu (**12**) oraz ortowęglan tetraetylu (**29**) (Rysunek 14). Badania modelowe prowadzono w toluenie, w temperaturze 60°C w ciągu 5 dni, stosując Novozym 435 jako biokatalizator oraz dimer octanu rodu (Rh(II)) (**27**) jako katalizator racemizacji (Schemat 50). Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 9.



Schemat 50. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu **34**

Tabela 9. EKR i EDKR kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**34**)

L.p.	Katalizator	Donor	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^c [%]
1. ^b	-	7	(^d)- 34	50	72 (<i>E</i> ^c = 13)
2.	Rh (II) (27)	5	(2)- 34	52	>99
3.	Rh (II) (27)	6	(2)- 34	58	75
4.	Rh (II) (27)	7	(2)- 34	73	62
5.	Rh (II) (27)	11	<i>rac</i> - 34	24	0
6.	Rh (II) (27)	12	(2)- 34	30	3
7.	Rh (II) (27)	29	(2)- 34	82	25

^aWarunki reakcji: **34** (1 mmol), **5-7, 11-12, 29** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), **27** (10%mol), 60°C, 5 dni.

^b Warunki reakcji: **34** (1 mmol), **7** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), 60°C, 5 dni.

^c Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

^d Enancjomer, który został wymyty jako drugi z kolumny HPLC

^e Obliczono za pomocą równania: $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.p)]}{\ln[1-c(1-e.e.p)]}$

Wyniki uzyskane dla enzymatycznej estryfikacji kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**34**) wskazują, iż w przypadku prawie wszystkich testowanych donorów i katalizatorów otrzymano enancjomerycznie wzbogacone produkty **35**. Każda reakcja dostarczyła estru etylowego kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**35**) o tej samej konfiguracji, był to enancjomer o późniejszym czasie retencji, który został wymyty z kolumny HPLC jako drugi (**2**)-**35**. Niestety, brak jest danych literaturowych na temat przypisania konfiguracji estrów **35** do czasów retencji enancjomerów rozdzielonych za pomocą HPLC na kolumnie ze złożem chiralnym.

Reakcja EKR kwasu **34** z zastosowaniem ortobenzoesanu trietylu (**7**) jako donora grupy alkoksylowej okazała się mniej efektywna niż w przypadku kwasu zawierającego niepodstawioną grupę fenylową (**1**). Mimo, iż konwersja substratu jest zadowalająca (*c* = 50%), enancjoselektywność reakcji jest niska (*E* = 13) (L.p. 1, Tabela 9).

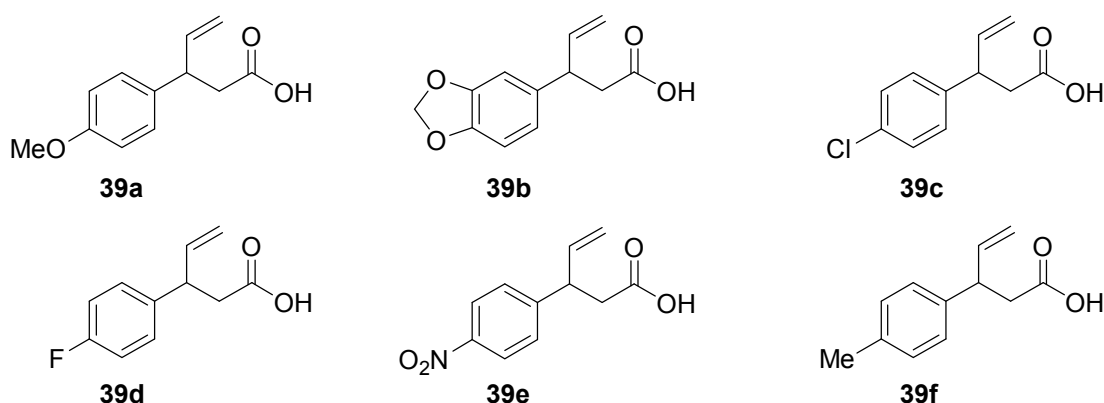
Wprowadzenie do medium reakcyjnego dimeru octanu rodu (Rh(II)) (**27**) spowodowało wzrost wydajności reakcji, lecz również obniżenie czystości optycznej produktu ($c = 73\%$, $e.e. = 62\%$) (L.p. 4, Tabela 9). Z kolei zmiana donora także nie pozwoliła uzyskać tak dobrego dynamicznego rozdziału kinetycznego, jak w przypadku kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (sekcja 6.5). Najwyższą czystość optyczną estru **35** zanotowano, gdy użyto ortomrówczanu trietylu (**5**) jako związku donującego grupę etoksylową ($e.e. > 99\%$), jednakże konwersja substratu wynosiła niewiele ponad 50% (L.p. 2, Tabela 9). Nieco wyższą konwersję zaobserwowano w przypadku ortoocetanu trietylu (**6**) ($c = 58\%$), lecz spowodowało to obniżenie czystości optycznej estru etylowego kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**35**) ($e.e. = 75\%$) (L.p. 3, Tabela 9). Najwyższą wydajność uzyskano dla reakcji, w której zastosowano ortowęglan tetraetylu (**29**) ($c = 82\%$), lecz wówczas uzyskano produkt z niskim nadmiarem enancjomerycznym ($e.e. = 25\%$) (L.p. 7, Tabela 9). Najsłabsze wyniki w odniesieniu zarówno do konwersji substratu, jak i do enancjoselektywności zaobserwowano, gdy donorami grupy etoksylowej były acetale - 1,1-dietoksyetan (**11**) oraz acetal dietylowy benzaldehydu (**12**) (L.p. 5, 6, Tabela 9). Wydajności tych reakcji nie przekroczyły 24%, natomiast uzyskane produkty były niemalże racematami.

Stwierdzono, iż obecność grupy metoksylowej w pozycji *meta* w pierścieniu aromatycznym kwasu 3-arylo-4-pentenowego wpływa na wydajność i enancjoselektywność reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego oraz enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego. Enzymatyczna estryfikacja związku **34** przeprowadzona w analogicznych warunkach jak w przypadku kwasu **1**, dostarczyła enancjomerycznie wzbogaconych produktów **35**, jednak ich czystość optyczna oraz wydajność była niższa niż produktów niepodstawionych (**2**).

Niemniej jednak, otrzymane dane eksperymentalne potwierdziły, iż procedury enzymatycznego rozdziału kinetycznego i enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego opracowane w rozdziałach 6.3 i 6.5 mogą zostać zastosowane do syntezy enancjomerycznie wzbogaconych pochodnych kwasu (**34**).

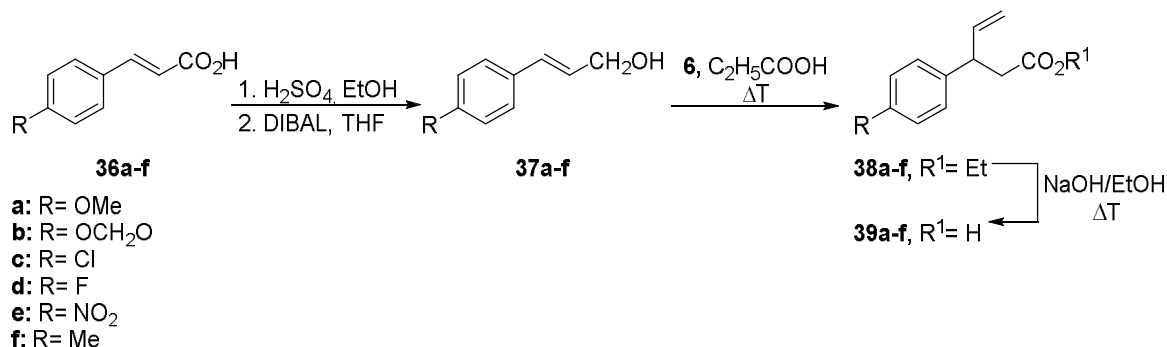
6.7. Zastosowanie opracowanej metodologii do EKR i EDKR wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Celem kolejnego etapu badań było sprawdzenie opracowanych w rozdziałach 6.3 i 6.5 metodologii do enzymatycznego rozdziału kinetycznego i enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych. Do badań modelowych wybrano sześć kwasów o różnych podstawnikach w pozycji 4. w pierścieniu aromatycznym (**39a-f**, Rysunek 16).



Rysunek 16. Struktury wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Przed przystąpieniem do badań nad rozdziałem kwasów **39** należało otrzymać związki te w postaci racemicznej. W tym celu użyto odpowiednich pochodnych kwasu cynamonowego (**36a-f**), które przekształcono w estry etylowe, a następnie poddano redukcji za pomocą DIBAL-H. Uzyskane w ten sposób pochodne alkoholu cynamonowego (**37a-f**) poddano reakcji z ortoocetanem trietylu (**6**), otrzymując estry etylowe kwasów 3-arylo-4-pentenowych (**38a-f**), które w kolejnym etapie zhydrolizowano do kwasów **39** (Schemat 51).



Schemat 51. Synteza wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Następnie otrzymane związki **39** poddano reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego zgodnie z procedurą opracowaną w rozdziale 6.3, stosując ortobenzoesan trietylu (**7**) jako donor grupy alkoksyłowej oraz Novozym 435 jako biokatalizator. Procesy prowadzono w toluenie w temperaturze 60°C przez 5 dni. W analogicznych warunkach przeprowadzono również dynamiczny rozdział kinetyczny związków **39**, dodając do medium reakcyjnego katalizatora racemizacji – dimeru octanu rodu (II) Rh(II) (**27**). Otrzymane wyniki przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. EKR i DKR wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych

L.p.	Kwas	Produkt	c [%]	<i>e.e.</i> ^c [%]	<i>E</i> ^d (dla EKR)
1.	39a	(<i>S</i>)- 38a	29	48	3
2.	39a	(<i>S</i>)- 38a	37	43	n.d. ^e
3.	39b	39b	-	-	-
4.	39b	39b	-	-	-
5.	39c	(<i>S</i>)- 38c	41	92	46
6.	39c	(<i>S</i>)- 38c	78	90	n.d.
7.	39d	(<i>S</i>)- 38d	45	97	160
8.	39d	(<i>S</i>)- 38d	88	95	n.d.
9.	39e	(<i>S</i>)- 38e	48	16	2
10.	39e	(<i>S</i>)- 38e	98	10	n.d.
11.	39f	39f	-	-	-
12.	39f	39f	-	-	-

^a Warunki reakcji EKR: **39** (1 mmol), **7** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), 60°C, 5 dni.

^b Warunki reakcji: **39** (1 mmol), **7** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), **27** (10%mol), 55°C, 5dni

^c Określono za pomocą HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H

^d Obliczono za pomocą równania: $E = \frac{\ln[1-c(1+e.e.p)]}{\ln[1-c(1-e.e.p)]}$

^e – n.d. – nie dotyczy

Wyniki przedstawione w Tabeli 10 wskazują, iż najlepsze rezultaty w odniesieniu do wydajności i nadmiaru enancjomerycznego uzyskano dla kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (**39d**) (L.p. 7, 8, Tabela 10). Dla tej pochodnej otrzymano bardzo dobry rozdział kinetyczny (*c* = 45%, *E* = 160) oraz dynamiczny rozdział kinetyczny (*c* = 88%, *e.e.* = 95%). Zastosowanie pochodnej *para*-chloro (**39c**) zaskutkowało nieco gorszymi rozdziałami zarówno EKR (*c* = 41%, *E* = 46), jak i EDKR (*c* = 78%, *e.e.* = 90%) (L.p. 5, 6, Tabela 10). Z kolei enzymatyczna estryfikacja kwasu podstawionego w pozycji *para* grupą metoksyłową (**39a**) pozwoliła na uzyskanie estru

etylowego z niską wydajnością i czystością optyczną (dla KR: $c = 29\%$, $E = 3$, dla DKR: $c = 37\%$, $e.e. = 43\%$) (L.p. 1, 2, Tabela 10). Dobrą konwersję substratu, lecz niskie nadmiary enancjomeryczne zanotowano dla reakcji kwasu 3-(*p*-nitrofenylo)-4-pentenowego (**39e**) (dla KR: $c = 48\%$, $E = 2$, dla DKR: $c = 98\%$, $e.e. = 10\%$) (L.p. 9, 10, Tabela 10). Natomiast nie zaobserwowano postępu reakcji w przypadku pochodnych kwasów zawierających podstawniki (3,4-metylenodioksy) (**39b**) oraz (*para*-metylo) (**39f**) (L.p. 3 - 4, 11 - 12, Tabela 10).

Zaprezentowane wyniki potwierdzają, że metodologie enzymatycznego rozdziału kinetycznego i enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego opracowane w ramach niniejszej pracy mogą zostać zastosowane do otrzymywania nieracemicznych pochodnych kwasów 3-arylo-4-pentenowych.

Następnie postanowiono sprawdzić użyteczność opracowanego dynamicznego rozdziału kinetycznego do zastosowania w skali preparatywnej. Do badań modelowych użyto racemicznego kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (**39d**). Reakcję DKR przeprowadzono według opracowanej procedury. Po 6 dniach uzyskano ester **38d** z wydajnością 76% i z identycznym jak w małej skali nadmiarem enancjomerycznym ($e.e. = 90\%$).

W kolejnym etapie badań postanowiono otrzymać nieracemicznie kwasy 3-arylo-4-pentenowe (**39a, c-e**). W tym celu uzyskane w reakcji rozdziału kinetycznego i dynamicznego rozdziału kinetycznego enancjomerycznie wzbogacone estry etylowe **38** (Tabela 10) poddano hydrolizie chemicznej. Następnie sprawdzono czystość optyczną otrzymanych kwasów karboksylowych za pomocą HPLC ze złożem chiralnym. Analiza ta potwierdziła, iż reakcja hydrolizy przebiegła z zachowaniem czystości optycznej. Wartości $e.e.$ otrzymanych kwasów **39** były identyczne jak estrów **38** użytych do ich syntezy.

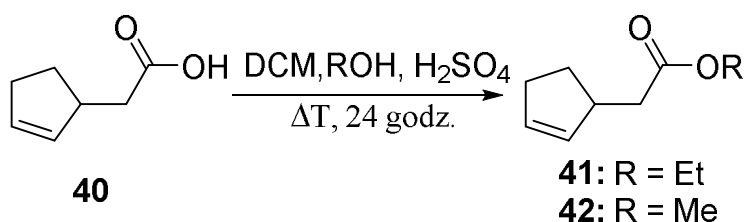
6.8. Zastosowanie opracowanej metodologii do dynamicznego rozdziału kinetycznego innych kwasów karboksylowych

W rozdziale 6.6 i 6.7 pokazano, iż opracowana w rozdziale 6.5 metodologia enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) może być z powodzeniem zastosowana do otrzymywania optycznie wzbogaconych wybranych pochodnych kwasów 3-arylo-4-pentenowych (**34, 39**). W związku z tym,

postanowiono sprawdzić czy procedura ta jest uniwersalna i może posłużyć do rozdziału innych chiralnych, racemicznych kwasów karboksylowych, niezawierających w swej strukturze pierścienia aromatycznego. Jako związek modelowy wybrano komercyjnie dostępny kwas 2-cyklopenteno-1-octowy (**40**) (Schemat 52).

Optycznie czyste pochodne kwasu **40** mają szerokie zastosowanie syntetyczne. Mogą służyć m. in. do otrzymywania antagonisty receptora prostaglandyny D₂ stosowanego w leczeniu kataru alergicznego,¹⁵³ winblastyny i jej analogów, związków używanych w terapii nowotworów, szczególnie białaczki,¹⁵⁴ czy leków antypsychotycznych¹⁵⁵. Niestety synteza enancjomerycznie czystych pochodnych kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (**40**) jest zazwyczaj złożonym, wieloetapowym procesem.

W ramach niniejszej rozprawy postanowiono sprawdzić użyteczność opracowanej w rozdziale 6.5 metodologii dynamicznego rozdziału kinetycznego do otrzymania nieracemicznych pochodnych kwasu **40**. W pierwszym etapie badań otrzymano wzorcowe racemiczne estry etylowe (**41**) i metylowe (**42**) kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego za pomocą estryfikacji kwasu karboksylowego odpowiednim alkoholem katalizowanej kwasem siarkowym (VI) z wydajnościami wynoszącym odpowiednio 82% i 64% (Schemat 52).



Schemat 52. Synteza estrów kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego

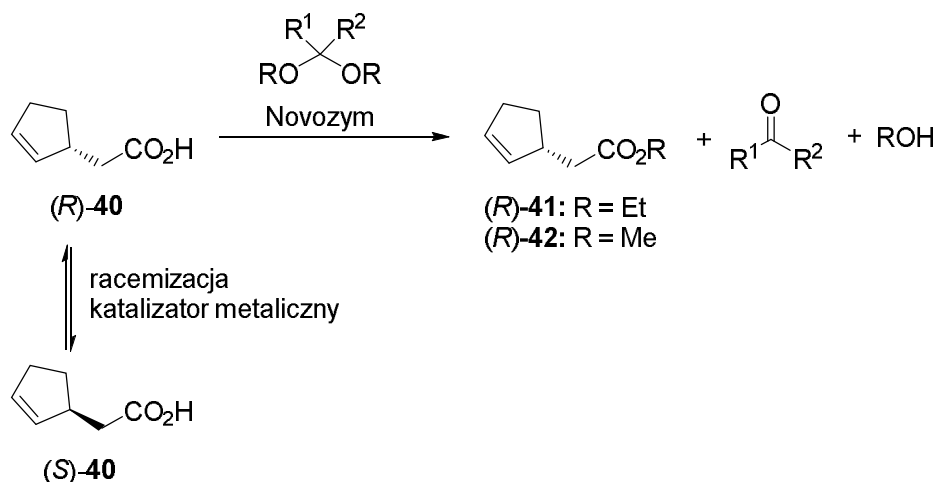
Następnie postanowiono zastosować opracowaną dla kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**1**) metodologię dynamicznego rozdziału kinetycznego do rozdziału kwasu **40**. Badania modelowe przeprowadzono w toluenie, w temperaturze 60°C, w ciągu 7 dni, stosując Novozym 435 jako biokatalizator oraz wybrane donory i kompleksy metali przejściowych (Schemat 53). Przetestowano następujące donory: ortobenzoesan trietylu (**7**) i acetal dimetylowy benzaldehydu (**14**) oraz katalizatory racemizacji: tetrakis(trifenylfosfino)

¹⁵³ Campos, K. R.; Journet, M.; Lee, S.; Grabowski, E. J. J.; Tillyer, R. D.; *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 268-274.

¹⁵⁴ Miyazaki, T.; Yokoshima, S.; Simizu, S.; Osada, H.; Tokuyama, H.; Fukuyama, T.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4737-4740.

¹⁵⁵ Zhang, F.; Song, Z. J.; Tschaen, D.; Volante R. P.; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3775-3777.

pallad (0) (Pd(0)) (**25**), [1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloro pallad (II) (Pd (II)) (**26**) oraz dimer octanu rodu (II) (Rh(II)) (**27**). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 11.



Schemat 53. Dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (**35**)

Tabela 11. DKR kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego

L.p.	Katalizator	Donor	Produkt	c [%]	$[\alpha]_D^{b,c}$
1.	Pd (0) (25)	7	(<i>R</i>)- 41	87	-0.9
2.	Pd (II) (26)	7	(<i>R</i>)- 41	>99	-0.9
3.	Rh (II) (27)	7	(<i>R</i>)- 41	>99	-12.6
4.	Pd (0) (25)	14	(<i>R</i>)- 42	>99	-35.0
5.	Pd (II) (26)	14	(<i>S</i>)- 42	81	+21.5
6.	Rh (II) (27)	14	(<i>R</i>)- 42	87	-28.9

^a Warunki reakcji: **40** (1 mmol), **7** lub **14** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), **25-27** (10%mol), 60°C, 5 dni.

^b c = 1g/100ml, CHCl₃

^c $[\alpha]_D = -96^\circ$ (c = 1.1, CHCl₃)

Niestety, brak jest literaturowych danych na temat metody rozdziału enancjomerów estrów kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (**40**) za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Przetestowano wszystkie dostępne w laboratorium kolumny chiralne, jednak nie udało się opracować metody rozdziału enancjomerów związków **41** i **42**. Dlatego też czystość optyczną badanych substancji podano w postaci skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ roztworów o stężeniu 1.0 w chloroformie. Literaturowa wartość skręcalności właściwej estru metylowego kwasu

2-cyklopenteno-1-octowego (**42**) o konfiguracji (*R*) wynosi -96° ($c = 1.1$, CHCl_3)¹⁵⁶, brak jest danych dotyczących estru etylowego (**41**).

Wyniki rozdziału dynamicznego wskazują, iż dla wszystkich badanych katalizatorów (**25** – **27**) oraz donorów grupy alkoksyłowej uzyskano dobrą konwersję substratu oraz nieracemiczne produkty. W reakcjach z ortobenzoesanem trietylu (**7**) najlepszym katalizatorem racemizacji okazał się dimer octanu rodu (II) (**27**), ester etylowy **41** otrzymano z wydajnością ilościową i z najwyższym nadmiarem enancjomerycznym ($[\alpha]_D = -12.6^\circ$) (L.p. 3, Tabela 11). Z kolei dla drugiego z testowanych donorów – acetalu dimetylowego benzaldehydu (**14**) – najlepszy rozdział uzyskano w przypadku tetrakis(trifenylofosfino) palladu (0) (**25**); konwersja substratu była całkowita, natomiast skręcalność właściwa produktu wynosiła $[\alpha]_D = -35.0^\circ$ (L.p. 4, Tabela 11). W przypadku pozostałych katalizatorów wartości te były nieco niższe (L.p. 5, 6, Tabela 11). Warto zauważyć, że w reakcji z kompleksem palladu (II) (**26**) nastąpiła zmiana konfiguracji produktu, otrzymano ester metylowy kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (**42**) o konfiguracji (*S*) (L.p. 5, Tabela 11).

Opierając się na danych skręcalności właściwej estrów **41** i **42** stwierdzono, iż opracowana w rozdziale 6.5 procedura dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) może zostać z powodzeniem wykorzystana do otrzymania nieracemicznych pochodnych kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (**40**).

W kolejnym etapie badań postanowiono sprawdzić użyteczność opracowanej reakcji enzymatycznej estryfikacji do syntezy nieracemicznych pochodnych komercyjnie dostępnego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (**43**) (Schemat 54).

Celem tych badań było sprawdzenie wpływu obecności grupy aromatycznej w strukturze substratu poddawanego reakcji DKR. Związek **43** jest analogiem kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**), posiadającym grupę metylową w pozycji 3. Jak wspomniano w sekcji 4. niniejszej rozprawy, enzymy wykazują większą enancjoselektywność w kierunku substratów, zawierających ugrupowania aromatyczne, postanowiono zatem sprawdzić, czy opracowana w rozdziale 6.5 metodologia potwierdzi to opinię.

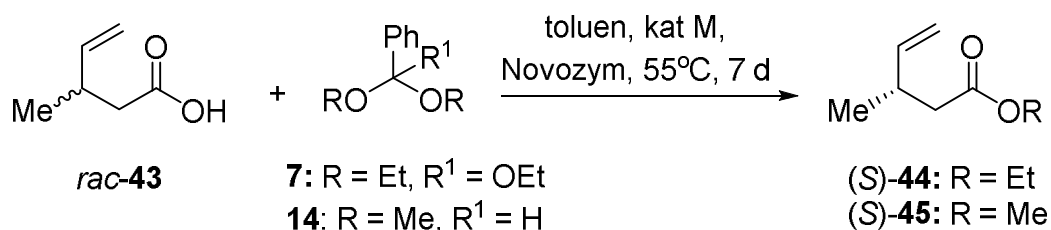
Optycznie czyste pochodne kwasu 3-metylo-4-pentenowego (**43**) są substratami do syntezy związków o działaniu biologicznym m.in. antybiotyków takich jak monesin¹⁵⁷

¹⁵⁶ Miyazaki, T.; Yokoshima, S.; Simizu, S.; Osada, H.; Tokuyama, H.; Fukuyama, T.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4737-4740.

¹⁵⁷ Collum, D. B.; McDonald, J. H.; Stil, W. C.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2118-2120.

czy lasalocid¹⁵⁸, a także leków stosowanych w terapii zakażeń wirusem HIV¹⁵⁹. Dlatego niezwykle ważne jest poszukiwanie metod otrzymywania optycznie czystych pochodnych kwasu **43**.

Podobnie, jak w poprzednich badaniach, prace rozpoczęto od syntezy wzorcowych racemicznych estrów etylowego (**44**) i metylowego (**45**) kwasu 3-metylo-4-pentenowego. Następnie racemiczny kwas **43** poddano reakcji dynamicznego rozdzielania kinetycznego według procedury opisanej w poprzednich rozdziałach. Badania modelowe prowadzono w toluenie, w temperaturze 60°C, w ciągu 7 dni, stosując Novozym 435 jako biokatalizator oraz ortobenzoesan trietylu (**7**) lub acetal dimetylowy benzaldehydu (**14**) jako donory grupy alkoksylowej. Przetestowano trzy katalizatory racemizacji: tetrakis(trifenylofosfino) pallad (0) (Pd(0)) (**25**), [1,1'-bis(difenylofosfino)ferroceno]dichloro pallad (II) (Pd (II)) (**26**) oraz dimer octanu rodu (II) (Rh(II)) (**27**) (Schemat 54). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 12.



Schemat 54. DKR kwasu 3-metylo-4-pentenowego (**43**)

Tabela 12. DKR kwasu 3-metylo-4-pentenowego (**43**)

L.p.	Katalizator	Donor	Produkt	c [%]	$[\alpha]_D^d$
1.	Pd (0) (25)	7	(S)-44	73	-1.6 ^b
2.	Pd (II) (26)	7	(S)-44	47	-4.9 ^c
3.	Rh (II) (27)	7	(S)-44	32	-5.4 ^c
4.	Rh (II) (27)	14	(S)-45	67	-1.8 ^b

^a Warunki reakcji: **43** (1 mmol), **7** lub **14** (3 mmol), toluen (1.21 ml), Novozym (10 mg), **25-27** (10%mol), 60°C, 7 dni.

^b c = 1, CHCl₃

^c c = 0.5g, CHCl₃

^d $[\alpha]_D = +2.5^\circ$ (c = 0.2, CHCl₃) (S)

¹⁵⁸ Wagner, P. J.; Puchalski, A. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6178-6180.

¹⁵⁹ Altman, M. D.; Ali, A.; Reddy, G. S. K. K.; Nalam, M. N. L.; Anjum, S. G.; Cao, H.; Chellappan, S.; Kairys, V.; Fernandes, M. X.; Gilson, M. K.; Schiffer, C. A.; Rana, T. M.; Tidor, B.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6099-6113.

Podobnie, jak w przypadku kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (**40**), dla pochodnych kwasu **43** brak jest literaturowych danych na temat metody rozdziału ich enancjomerów za pomocą HPLC. Przetestowano wszystkie dostępne w laboratorium kolumny chiralne, jednak nie udało się opracować metody rozdziału enancjomerów związków **44** i **45**. Dlatego też czystość optyczną badanych substancji podano w postaci skręcalności właściwej $[\alpha]_D$ roztworów o stężeniu 1.0 lub 0.5 w chloroformie. Literarurowa wartość skręcalności właściwej estru metylowego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (**45**) o konfiguracji (*S*) wynosi $+2.5^\circ$ ($c = 0.2$, CHCl_3)¹⁶⁰, brak jest danych dotyczących estru etylowego (**44**).

Wyniki otrzymane dla reakcji dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (**43**) nie są tak dobre jak dla kwasu zawierającego pierścień aromatyczny w pozycji 3. (**1**). Najwyższą konwersję substratu zaobserwowano dla procesu, w którym rolę donora grupy alkoksylowej pełnił ortobenzoesan trietylu (**7**), a do racemizacji użyto kompleksu palladu (0) (Pd(0)) (**25**) ($c = 73\%$) (L.p. 1, Tabela 12). Jednak dla tego przypadku zanotowano najniższą czystość optyczną uzyskanego estru etylowego (**46**) ($[\alpha]_D = -1.6^\circ$) (L.p. 1, Tabela 12). Rozważając estryfikację za pomocą związku **7**, ester **46**, który najsilniej skręcał płaszczyznę światła spolaryzowanego otrzymano w reakcji katalizowanej kompleksem rodu (Rh(II)) (**27**) ($[\alpha]_D = -5.4^\circ$) (L.p. 3, Tabela 12), lecz konwersja substratu w tym przypadku była niska ($c = 32\%$). Natomiast reakcja z acetalem dimetylowym benzaldehydu (**14**) prowadziła do uzyskania estru metylowego **45** z umiarkowaną wydajnością i czystością optyczną (L.p. 4, Tabela 12).

Mimo otrzymania nienajlepszych rezultatów dla reakcji DKR kwasów **40** i **43** stwierdzono, iż metodologia opracowana w rozdziale 6.5 może zostać zastosowana do syntezy nieracemicznych pochodnych innych kwasów karboksylowych. W celu osiągnięcia lepszych rezultatów należałoby przeprowadzić optymalizację procesu dla każdego z badanych związków.

Niższa czystość optyczna czystość produktów rozdziału dynamicznego kwasów 2-cyklopenteno-1-octowego (**40**) i 3-metylo-4-pentenowego (**43**) potwierdza fakt, iż enzymy wykazują wyższą enancjoselektywność w kierunku substratów zawierających w swej strukturze pierścień aromatyczny (jak w przypadku kwasu 3-fenilo-4-pentenowego).

¹⁶⁰ Hekking, K. F. W.; Waalboer, D. C. J.; Moelands, M. A. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T.; *Adv. Syn. Catal.* **2008**, *350*, 95-106.

7. Wnioski

W niniejszej pracy zaprezentowano wyniki badań nad opracowaniem nowej chemoenzymatycznej metody syntezy enancjomerycznie czystych pochodnych kwasów 3-arylo-4-pentenowych, które stanowią cenny blok budulcowy do syntezy związków o udokumentowanej aktywności biologicznej. Wykonano badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**). W tym celu przeprowadzono badania nad optymalizacją omawianego procesu pod względem rozpuszczalnika, donora grupy alkoksylowej, enzymu oraz katalizatora racemizacji. Dobór odpowiednich warunków EKR jest kluczowy, aby zapewnić wysoką wydajność i enancjoselektywność tych reakcji. Opracowano EKR, polegający na enzymatycznej estryfikacji racemicznych chiralnych kwasów karboksylowych za pomocą nowych donorów grupy alkoksylowej – ortoestrów, acetali, ketali i ortowęglanów. Zastosowanie tego typu reagentów powoduje, iż reakcja estryfikacji jest nieodwracalna, co zapewnia lepszy rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej. W optymalnych warunkach otrzymano ester etylowy kwasu 3-fenylo-4-pentenowego w postaci jednego enancjomeru o konfiguracji (*S*) z najwyższą możliwą wydajnością dla reakcji rozdziału kinetycznego (50%). Hydroliza trgo związku pozwala uzyskać enancjomerycznie czysty kwas 3-fenylo-4-pentenowy. Przeprowadzono również z powodzeniem proces enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu **1** w skali gramowej, co świadczy o tym, iż procedura ta może być wykorzystana w przemyśle.

Wykonano wstępne badania mające na celu próbę wyjaśnienia mechanizmu opracowanej reakcji enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu **1** z wykorzystaniem nowych donorów grupy alkoksylowej. W oparciu o otrzymane wyniki i doniesienia literaturowe na temat promiskuityzmu lipaz, zaproponowano mechanizm enzymatycznej estryfikacji kwasów karboksylowych za pomocą ortoestrów, acetali, ketali i ortowęglanów. Otrzymane wyniki wskazują, iż mechanizm ten może wynikać z promiskuityzmu substratowego stosowanych lipaz.

W kolejnym etapie badań wykonano szereg eksperymentów, których celem było sprawdzenie możliwości uzyskania dynamicznego rozdziału kinetycznego, w reakcji modelowej kwasu 3-fenylo-4-pentenowego z donorami grup alkoksylowych oraz wybranymi katalizatorami metalicznymi. Wykonano badania nad optymalizacją tego procesu, zbadano wpływ rozpuszczalnika, donora grupy alkoksylowej, enzymu oraz

wybranych kompleksów metali na wydajność i enancjoselektywność reakcji DKR. Szczególne znaczenie miał dobór odpowiedniego katalizatora racemizującego, aby był on kompatybilny z biokatalizatorem oraz nie powodował racemizacji produktu. Opracowano metodę dynamicznego rozdziału kinetycznego tegoż kwasu, polegającą na połączeniu enzymatycznego rozdziału kinetycznego z racemizacją substratu *in situ* za pomocą kompleksów metali przejściowych. Po optymalizacji otrzymano odpowiedni ester kwasu (S)-2 w postaci enancjomerycznie czystej z ilościową wydajnością. Hydroliza tego estru dostarczyła kwasu (S)-1 o identycznej czystości optycznej. Należy zwrócić uwagę, iż opracowany chemoenzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny kwasu 1 jest pierwszą tego typu reakcją otrzymywania enancjomerycznie czystych chiralnych kwasów karboksylowych. Do tej pory literaturowo znane są jedynie przypadki DRK pochodnych alkoholi drugorzędowych oraz amin.

Uzyskane wyniki zostały wykorzystane do opracowania metodologii enzymatycznego rozdziału kinetycznego i dynamicznego rozdziału kinetycznego szeregu innych kwasów karboksylowych. Przeprowadzono badania dla kwasów 3-arylo-4-pentenowych zawierających następujące podstawniki *meta*-metoksy, *para*-metoksy, 3,4-metylenodioksy, *para*-chloro, *para*-fluoro, *para*-nitro, *para*-metylo w pierścieniu fenyłowym. Dla większości przypadków otrzymano odpowiednie estry o wysokiej czystości optycznej, które przeprowadzono w odpowiednie kwasy z zachowaniem czystości optycznej. Dane te potwierdziły, iż opracowane procedury EKR i DKR mogą być z powodzeniem zastosowane do syntezy nieracemicznych kwasów 3-arylo-4-pentenowych.

Opracowaną metodologię wykorzystano również do opracowania EKR i DKR racemicznych kwasów cyklicznych (kwas 2-cyklopenteno-1-octowy) oraz kwasów 3-alkilo-4-pentenowych (kwas 3-metylo-4-pentenyowy). Uzyskane wyniki otwierają nowe możliwości w enancjoselektywnej syntezie tego rodzaju związków, pozostających wciąż dużym wyzwaniem syntetycznym.

W ramach niniejszej pracy opracowano nową chemoenzymatyczną metodę syntezy enancjomerycznie czystych kwasów 3-arylo-4-pentenowych oraz ich estrów. Opracowana metodologia umożliwia otrzymanie docelowych produktów z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi. Metoda ta może zostać również zastosowana do rozdziału innych achiralnych i chiralnych kwasów karboksylowych. Zaletami opracowanych procedur jest zastosowanie rozpuszczalników organicznych, jako mediów reakcji, co umożliwiło połączenie dwóch typów katalizy w proces jednoetapowy. Procesy

te charakteryzują się niskimi kosztami ogólnymi, wysokimi wydajnościami i enantjoselektywnościami, bardzo wysoką produktywnością, a także brakiem szkodliwego wpływu na środowisko, co jest szczególnie ważne w przypadku syntez związków o przeznaczeniu farmaceutycznym.

8. Część eksperymentalna

8.1. Uwagi ogólne

Widma NMR zostały wykonane na aparatach Varian Gemini 200 (200 MHz) oraz Varian Gemini 400 (400 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. 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. Analizy elementarne wykonano w Pracowni Analizy Elementarnej Instytutu Chemii Organicznej PAN, używając aparatów Perkin Elmer 240 Elemental Analyzer oraz Heraeus Vario EL III.

Do analiz TLC używano płytek aluminiowych pokrytych Kieselgel 60 F254 firmy Merck. Do preparatywnego rozdzielania 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 gęskiej (GLAP) i proszek acetonowy z wątroby dziczej (WLAP), proszek acetonowy z nerki wołowej (BKAP) oraz esterazę z wątroby świńskiej (PLE).

Reakcje enzymatyczne były przeprowadzane z wykorzystaniem wytrząsarki (Heidolph Promax 1020) wyposażonej w incubator (Heidolph Inkubator 1000).

Do rozdziału enancjomerów metodą HPLC stosowano następujące kolumny chiralne: Chiralcel OD-H, Chiralcel AD-H (\varnothing 4.6 mm x 250 mm, Diacel Chemical Ind., Ltd) oraz Chiralcel OJ (\varnothing 4.6 mm x 250 mm, Diacel Chemical Ind., Ltd). W pracy enancjoselektywność reakcji (E) liczona była ze wzoru (c – konwersja, e_p – nadmiar enancjomeryczny produktu):

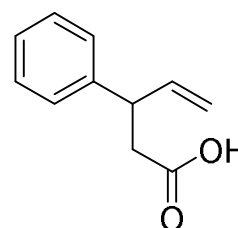
$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + e_p)]}{\ln[1 - c(1 - e_p)]}$$

Wykorzystywane komercyjnie dostępne reagenty, 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.¹⁶¹

8.2. Badania nad opracowaniem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenyl-4-pentenowego

8.2.1. Synteza kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (1)

Mieszaninę alkoholu cynamonowego (33.7 g; 0.25 mol), ortoocetanu trietylowego (6) (46.1 ml; 0.25 mol) i kwasu heksanowego (0.19 ml; 1.5 mmol) ogrzewano na łaźni olejowej w kolbie trój szyjnej zaopatrzonej w termometr i nasadkę Claisena do oddestylowania powstającego etanolu. Alkohol etylowy destylował w 78°C. Po ok.



3 godzinach destylacja zachodziła coraz wolniej. Po upływie tego czasu dodano 0.1 ml kwasu heksanowego. Po 3.5 i 4.5 godz. dodano taką samą porcję kwasu. Temperatura mieszaniny rosła. Po upływie ok. 6 godz. temperatura mieszaniny ustaliła się na poziomie 166°C. Mieszaninę schłodzono, dodano wodorotlenek potasu (19.7 g; 0.35 mol) rozpuszczony w 25 ml wody destylowanej oraz metanol (75 ml). Mieszaninę reakcyjną

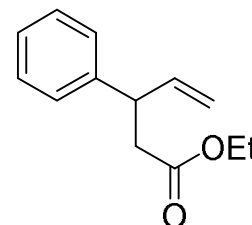
¹⁶¹ Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D.; *Purification of laboratory Chemicals*, 4th ed, Elsevier: Oxford, 2000.

ogrzewano przez 1 godzinę pod chłodnicą zwrotną w atmosferze azotu. Następnie mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej i przemyto eterem etylowym. Nie nastąpił rozdział faz ze względu na obecność metanolu. Odparowano lotne rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie przemyto eterem etylowym. Rozdzielono fazy. Fazę wodną doprowadzono do pH = 1 za pomocą 10% roztworu kwasu solnego. Nastąpił rozdział faz. Fazę wodną ekstrahowano 3-krotnie eterem etylowym. Połączone fazy organiczne przemyto solanką i suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Następnie odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą krystalizacji z heksanu, otrzymując 33g związku w postaci żółtych kryształków z wydajnością 75%; $R_f = 0.6$ (heksan: octan etylu 80:20, obj. :obj.). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 2.74 (dd, $J = 15.0, 7.5$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 15.0, 7.8$ Hz, 1H), 3.90 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.00-5.18 (m, 2H), 5.90-6.10 (m, 1H), 7.19-7.40 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 40.2, 45.5, 115.3, 127.1, 127.8, 128.9, 140.2, 142.2, 178.3. Widmo zgodne z literaturowym¹⁶². Temperatura topnienia = 46°C [lit. 44-46°C]¹⁶³. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel AD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 0.3 ml/min] $t_R(S) = 17.6$ min; $t_R(R) = 19.9$ min.

8.2.2. Synteza estru etylowego kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (2).

Procedura ogólna 1.

Kwas 3-fenyl-4-pentenowy (**1**) (1.73 g, 9.81 mmol) rozpuszczono w chlorku metylenu (3 ml), wkroplono chlorek tionylu (0.72 ml, 9.87 mmol) i mieszano 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie dodano bezwodny etanol (5 ml, 85.6 mmol) i mieszano przez okres 3 godzin w temperaturze pokojowej. Nadmiar rozpuszczalnika



odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.). Otrzymano 1.83 g związku w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 92%. $R_f = 0.8$ (heksan/ octan etylu 95:5; obj. : obj.) $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 1.16 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.70 (dd, $J = 15.0, 7.2$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 15.0, 8.0$ Hz, 1H), 3.86 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.06 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.04-5.09 (m, 2H), 5.98 (ddd, $J = 17.4, 10.2, 7.2$ Hz, 1H), 7.17-7.30 (m, 5H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 14.1, 40.3, 45.6, 60.3,

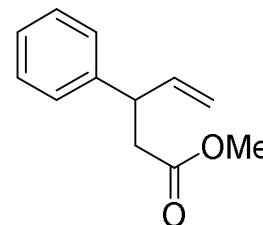
¹⁶² Gao, M.; Wang, D.-X.; Zheng, Q.-Y.; Wang, M.-X.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9532-9535.

¹⁶³ Bermejo Gonzalez F.; Bartlett P.A.; *Org. Synth.*; **1986**, *64*, 175-177.

114.7, 126.6, 127.5, 128.5, 140.2, 142.4, 171.8. Widmo zgodne z literaturowym.¹⁶⁴ Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 1.0 mL/min] $t_R(S) = 5.04$ min; $t_R(R) = 5.91$ min. Analiza elementarna – obliczona C 76,44%, H 7,9%; zbadana C 75,11% H 7,95%.

8.2.3. Synteza estru metylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (3).

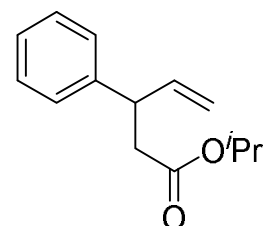
Związek **3** w postaci bezbarwnego oleju otrzymano zgodnie z ogólną procedurą 1, wydajność reakcji 90%; $R_f = 0.5$ (heksan : octan etylu, 9:1; obj. obj.). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.74 (dd, $J = 15.1, 7.7$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 15.1, 7.7$ Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.89 (q, $J = 7.7$ Hz, 1H), 5.01-5.15 (m, 2H), 5.90-6.10 (m, 1H), 7.15-7.38 (m, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 40.4, 45.8, 51.9, 115.1, 127.0, 127.8, 128.9, 140.5, 142.7, 172.6. Widmo zgodne z literaturowym.¹⁶⁵ Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 1.0 mL/min] $t_R(S) = 4.6$ min; $t_R(R) = 5.6$ min.



8.2.4. Synteza estru izopropylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (4).

Związek **4** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 1 z wydajnością 37%.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.11 (d, $J = 7.1$ Hz, 6H), 2.63-2.73 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.84 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H), 5.04-5.09 (m, 2H), 5.93-6.02 (m, 1H), 7.17-7.31 (m, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 22.1, 40.9, 46.1, 68.0, 115.0, 126.9, 128.6, 129.4, 140.6, 142.8, 171.7. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 93:7; $\lambda = 230$ nm; 0.6 mL/min] $t_R(S) = 7.7$ min; $t_R(R) = 8.2$ min.



8.2.5. Procedura ogólna otrzymywania racemicznych estrów kwasów karboksylowych z wykorzystaniem ortoestrów.¹⁶⁶

Procedura ogólna 2.

Do roztworu kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (1 mmol) w toluenie (1.21 ml) dodano odpowiedni ortoocian trialkilowy (3 mmol) i mieszano w temperaturze wrzenia (110°C) przez 24 godziny. Mieszaninę schłodzono i dodano 2M roztwór kwasu solnego (1.1 ml).

¹⁶⁴ Heuger, G.; Kalsow, S.; Gottlich, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1848-1854.

¹⁶⁵ Vedejs, E.; Gingras, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 579-588.

¹⁶⁶ Trujillo, J. I.; Gopalan, A. S.; *Tetrahedron Lett.* 1993, *34*, 7355-7358.

Nastąpił rozdział faz. Fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) (1x) oraz solanką (1x), a następnie suszono 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; obj.: obj.).

8.2.5.1. Synteza racemicznego estru etylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (2)

Związek **2** otrzymano według procedury ogólnej 2 z wydajnością 11%.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 mL/min] t_{R(S)} = 5.04 min; t_{R(R)} = 5.91 min.

8.2.5.2. Synteza racemicznego estru metylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (3)

Związek **3** otrzymano według procedury ogólnej 2 z wydajnością 3%.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 mL/min] t_{R(S)} = 4.6 min; t_{R(R)} = 5.6 min.

8.2.6. Procedura ogólna enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (1) w różnych rozpuszczalnikach

Procedura ogólna 3.

Do roztworu kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (1 mmol) w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym (1.21 ml) dodano ortoocetan trietylu (**6**) (3 mmol) oraz lipazę z kielków pszenicy (10 mg). Całość mieszano przez 24 godziny w temperaturze 40°C. Mieszaninę schłodzono i dodano 2M roztwór kwasu solnego (1.1 ml). Nastąpił rozdział faz. Fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) (1x) oraz solanką (1x), a następnie suszono 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; obj.: obj.).

8.2.6.1. Synteza nieracemicznego estru etylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (2)

Związek **2** otrzymano według procedury ogólnej 3.

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 1.0 mL/min] $t_{\text{R}}(S) = 5.04$ min; $t_{\text{R}}(R) = 5.91$ min.

8.2.7. Procedura ogólna enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (1)

Procedura ogólna 4.

Do roztworu kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (1 mmol) w toluenie (1.21 ml) dodano odpowiedni donor grupy alkoksylowej (3 mmol) oraz odpowiedni enzym (10 mg). Całość mieszano przez 24-48 godziny w temperaturze 40°C. Mieszaninę schłodzono i dodano 2M roztwór kwasu solnego (1.1 ml). Nastąpił rozdział faz. Fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) (1x) oraz solanką (1x), a następnie suszono 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; obj.: obj.).

8.2.7.1. Synteza nieracemicznego estru etylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (2)

Związek **2** otrzymano według procedury ogólnej 4.

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 1.0 mL/min] $t_{\text{R}}(S) = 5.04$ min; $t_{\text{R}}(R) = 5.91$ min.

8.2.7.2. Synteza nieracemicznego estru metylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (3)

Związek **3** otrzymano według procedury ogólnej 4.

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 1.0 mL/min] $t_{\text{R}}(S) = 4.6$ min; $t_{\text{R}}(R) = 5.6$ min.

8.2.7.3. Synteza nieracemicznego estru izopropylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (4)

Związek **4** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 1 z wydajnością 37%.

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 93:7; λ = 230 nm; 0.6 mL/min] $t_{\text{R}}(\text{S})$ = 7.7 min; $t_{\text{R}}(\text{R})$ = 8.2 min.

8.2.8. Enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasu 3-fenylo-4-pentenowego w skali gramowej

Do roztworu kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (10 mmol) w toluenie dodano ortoocetan trietylu (30 mmol) oraz proszek acetonowy z wątroby gęskiej (GLAP) (100 mg). Całość mieszano przez 24 godziny w temperaturze 40°C. Mieszaninę schłodzono i dodano 2M roztwór kwasu solnego. Nastąpił rozdział faz. Fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) (1x) oraz solanką (1x), a następnie suszono 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; obj.: obj.). Otrzymano związek w postaci bezbarwnego oleju z wydajnością 50%. R_{f} = 0.8 (heksan/ octan etylu 95:5; obj. : obj.) ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.16 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 2.70 (dd, J = 15.0, 7.2 Hz, 1H), 2.74 (dd, J = 15.0, 8.0 Hz, 1H), 3.86 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.06 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 5.04-5.09 (m, 2H), 5.98 (ddd, J = 17.4, 10.2, 7.2 Hz, 1H), 7.17-7.30 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 14.1, 40.3, 45.6, 60.3, 114.7, 126.6, 127.5, 128.5, 140.2, 142.4, 171.8. Widmo zgodne z literaturowym¹⁶⁷. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 mL/min] $t_{\text{R}}(\text{S})$ = 5.04 min; $t_{\text{R}}(\text{R})$ = 5.91 min, *e.e.* = 80%. Skrócenie czasu reakcji do 16 godzin, prowadziło do uzyskania związku **2** z *e.e.* = 99%.

8.3. Badania nad mechanizmem enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

8.3.1. Synteza estru metylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**3**) za pomocą procedury Nicolosi¹⁶⁸

Do roztworu kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (1 mmol) w toluenie (1.21 ml) dodano ortoocetan trietylu (**6**) (3 mmol), Novozym 435 (10 mg) oraz 0.1 ml alkoholu metylowego. Całość mieszano przez 72 godziny w temperaturze 40°C. Mieszaninę schłodzono i dodano 2M roztwór kwasu solnego (1.1 ml). Nastąpił rozdział faz. Fazę organiczną

¹⁶⁷ Heuger, G.; Kalsow, S.; Gottlich, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1848-1854.

¹⁶⁸ Morrone, R.; Piattelli, M.; Nicolosi, G.; *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1441-1443.

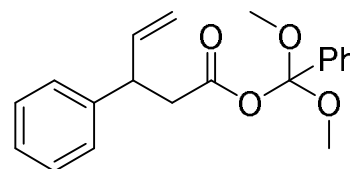
przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) (1x) oraz solanką (1x), a następnie suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.). Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 mL/min] t_R(*S*) = 4.6 min; t_R(*R*) = 5.6 min.

8.3.2. Synteza estru metylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**3**) – reakcja z alkoholem deuterowanym

Do roztworu kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (1 mmol) w toluenie (1.21 ml) dodano ortoocetan trietylu (**6**) (3 mmol), Novozym 435 (10 mg) oraz 0.1 ml deuterowanego alkoholu metylowego. Całość mieszano przez 72 godziny w temperaturze 40°C. Mieszaninę schłodzono i dodano 2M roztwór kwasu solnego (1.1 ml). Nastąpił rozdział faz. Fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) (1x) oraz solanką (1x), a następnie suszono 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; obj.: obj.). ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.74 (dd, *J* = 15.1, 7.7 Hz, 1H), 2.78 (dd, *J* = 15.1, 7.7 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.89 (q, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.01-5.15 (m, 2H), 5.90-6.10 (m, 1H), 7.15-7.38 (m, 5H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 40.4, 45.8, 51.9, 115.1, 127.0, 127.8, 128.9, 140.5, 142.7, 172.6. Widmo zgodne z literaturowym. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 mL/min] t_R(*S*) = 4.6 min; t_R(*R*) = 5.6 min.

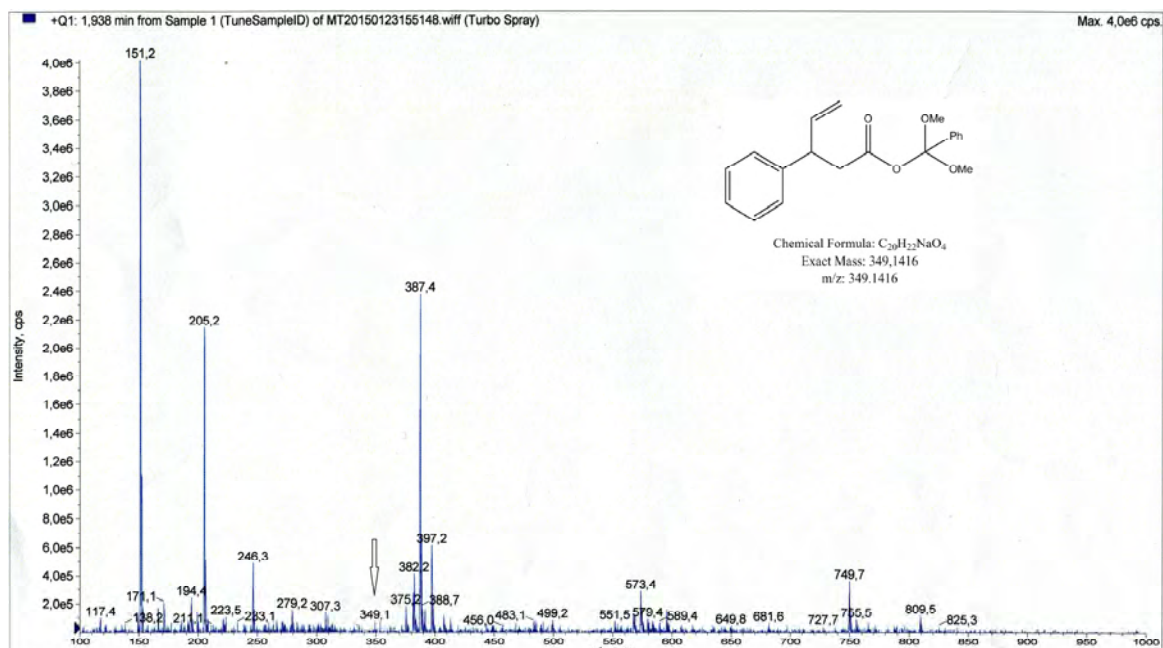
8.3.3. Związek 21

Stwierdzono obecność związku **21** w mieszaninie reakcyjnej uzyskanej według procedury ogólnej 4, stosując ortobenzoesean trimetylu jako donor grupy alkoksylowej.



Wykonano widmo masowe mieszaniny reakcyjnej. Próby

wydzielenia tego związku zakończyły się niepowodzeniem, gdyż ulegał on rozpadowi do estru **3**. LR-MS (ESI, [M+Na]) obliczona dla C₂₀H₂₂O₄Na: 349.1, zbadana: 349.1 m/z.



8.4. Badania nad opracowaniem dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego

8.4.1. Procedura ogólna enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (1)

Procedura ogólna 5.

Do roztworu kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (**1**) (1 mmol) w toluenie dodano odpowiedni donor grupy alkoksylowej (3 mmol), Novozym 435 (10 mg) oraz kompleks metalu przejściowego (**22** – **27**) (10%_{mol}). Całość mieszano przez 5 dni w temperaturze 60°C. Nadmiar reagentów odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.).

4.4.1.1. Synteza nieracemicznego estru etylowego kwasu 3-fenylo-4-pentenowego (2)

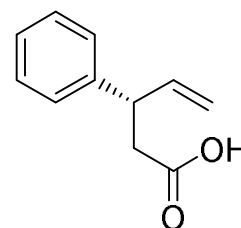
Związek **2** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 5.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OD-H [heksan : iPrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 mL/min] t_{R(S)} = 5.04 min; t_{R(R)} = 5.91 min.

4.4.1.2. Synteza enancjomerycznie czystego kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (*S*)-1

Procedura ogólna 6.

Enancjomerycznie czysty ester etylowy kwasu 3-fenyl-4-pentenowego (**2**) (4 mmol) otrzymany zgodnie z procedurą ogólną 5 rozpuszczono w metanolu (2 ml) i dodano roztwór wodorotlenku potasu (40 mmol) w wodzie (10 ml). Całość mieszano przez 8 godzin w temperaturze pokojowej. Roztwór przemyto eterem etylowym.

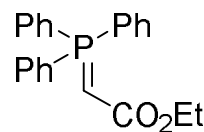


Fazę wodną doprowadzono do pH 2 za pomocą stężonego kwasu solnego. Fazę wodną ekstrahowano eterem etylowym (3 x 20 ml). Połączone fazy organiczne wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano rozpuszczalnik pod obniżonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu. Otrzymano związek **1** z wydajnością 100%. Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel AD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 0.3 ml/min] $t_{\text{R}}(\text{S}) = 17.6$ min; $t_{\text{R}}(\text{R}) = 19.9$ min. $[\alpha]_{\text{D}} = -18.7^\circ$ ($c = 1.0$, CHCl_3). Lit. $[\alpha]_{\text{D}} = +18.6^\circ$ ($c = 1.1$, CHCl_3) (dla enancjomeru *R*)¹⁶⁹.

8.5. Badania nad opracowaniem rozdziału kinetycznego i dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-(*m*-metoksyfenyl)-4-pentenowego

8.5.1. Synteza (karboetoksymetyleno)trifenylfosforanu (odczynnik Wittiga) (**31**)

Bromooctan etylu (200 mmol) dodano do roztworu trifenylofosfiny (1.15 eq., 230 mmol) w toluenie (232 ml) i mieszano w temperaturze wrzenia przez 10 godz. Biały osad odsączono, przemyto toluenem

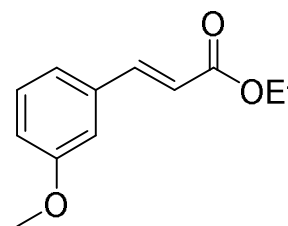


i wysuszono. Następnie w temperaturze 5°C dodano 1M NaOH (290 ml) do roztworu białego osadu w wodzie (1 l) w wyniku czego powstał biały i gumowy osad, który odsączono, przemyto wodą i suszono. Uzyskano produkt **31** z wydajnością 60%. Związek **31** natychmiast użyto do reakcji z *m*-anizaldehydem.

¹⁶⁹ Gao, M.; Wang, D.-X.; Zheng, Q.-Y.; Wang, M.-X.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9532-9535.

8.5.2. Synteza estru etylowego kwasu *m*-metoksycynamonowego (32)

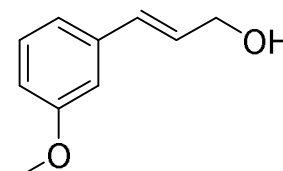
Mieszaninę *m*-anizaldehydu (30) (40 mmol) w bezwodnym toluenie (400 ml) i uzyskanego wcześniej odczynnika Wittiga (31) (60 mmol) mieszano w temperaturze wrzenia przez 4 godz. Po schłodzeniu mieszaniny do temp. pokojowej odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość rozpuszczono w wodzie i



ekstrahowano 3 x octanem etylu. Połączone fazy organiczne przemyto solanką, suszono za pomocą bezwodnego siarczanu sodu (Na₂SO₄). Nadmiar rozpuszczalnika usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu. Uzyskano produkt w postaci oleju z wydajnością 82 %. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.11 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.23 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.45 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.10 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.30 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 14.1, 55.0, 113.2, 116.5, 119.1, 120.7, 130.9, 145.6. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷⁰

8.5.3. Synteza alkoholu *m*-metoksycynamonowego (33)

Roztwór estru 32 (40 mol) w dichlorometanie (0.1 M roztwór) mieszano w temperaturze -78°C, a następnie w ciągu 30 min wkropiono DIBAL-H (3 eq) w toluenie. Całość mieszano przez 2 godz. pozwalając mieszaninie ocieplić się do temperatury



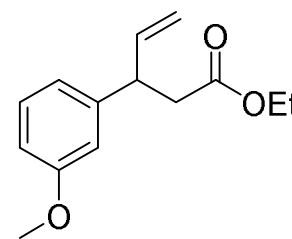
pokojowej, a następnie schłodzono do 0°C i przemyto nasyconym roztworem soli sodowo-potasowej kwasu winowego. Całość mieszano przez 15 min w temp. pokojowej. Warstwę wodną ekstrahowano octanem etylu, połączone fazy suszono bezwodnym Na₂SO₄, a nadmiar rozpuszczalnika odparowano. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu. Uzyskano produkt w postaci żółtego oleju z wydajnością 75%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.41 (br s, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.27 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 6.40 (dt, *J* = 15.9, 5.5 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 15.9, 1H), 6.85 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.03 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.20-7.32 (m, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 55.2, 63.4, 112.5, 113.1, 119.2, 129.1, 129.8, 131.4, 138.5, 159.8. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷¹.

¹⁷⁰ Taber, D. F.; Nelson, C. G.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8973-8974.

¹⁷¹ Vyas, D. J.; Oestreich, M.; *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 568-570.

8.5.4. Synteza kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (34)

Otrzymano alkohol *m*-metoksycynamonowy (8.7 mmol), ortoocetan trietylu (6) (9 mmol) oraz kwas heksanowy (1ml) ogrzewano w kolbie trój szyjnej zaopatrzonej w nasadkę Claisena do oddestylowywania powstającego etanolu. Po 1.5 godziny

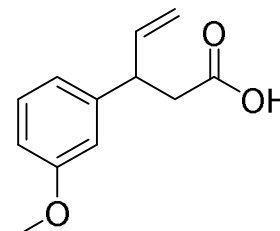


dodano kolejną porcję kwasu octowego (0.1 ml), a następnie kolejno po 2.5, 3.5 godziny dodano taką samą porcję kwasu. Po oddestylowaniu etanolu, temperatura mieszaniny wzrosła ze 90 do 130 °C. Mieszaninę schłodzono i dodano kolejno wodorotlenek potasu rozpuszczony w wodzie destylowanej oraz metanol. Mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 1 godzinę w atmosferze gazu obojętnego. Schłodzono mieszaninę do temperatury pokojowej a następnie przemyto eterem. Fazę wodną doprowadzono do pH 2 za pomocą stężonego kwasu solnego. Fazę wodną ekstrahowano eterem etylowym (3 x 20 ml). Połączone fazy organiczne wysuszone bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano rozpuszczalnik pod obniżonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu. Wydajność reakcji 75%. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) : δ 2.69- 2.73 (dd, *J* = 15.0, 7.2, 1H), 2.75 – 2.78 (dd, *J* = 15.1, 7.5Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.82 (m, 1H), 5.00 – 5.10 (m, 2H), 5.85 – 6.10 (ddd, *J* = 17.1, 10.2, 7.2Hz, 1H), 6.75-6.82 (m, 3H), 7.20-7.26 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 40.4, 45.7, 55.6, 114.3, 115.0, 128.8, 140.5, 141.6, 159.0, 176. Analiza elementarna: obliczona – C 69.89%, H 6.84%; zmierzona – C 69.80% - 69.95%, H 6.86 – 6.90%.

8.5.5. Synteza estru etylowego kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (35)

Związek 34 otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 1 z wydajnością 82%.

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.68 – 2.78 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.85 (m, 1H), 4.06 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.00 – 5.10 (m, 2H), 5.97 (ddd, *J* = 17.1, 10.2, 7.2 Hz, 1H), 6.72-6.80 (m, 3H), 7.20-7.26 (m, 1H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 14.1, 40.3, 43.5, 55.5, 60.4, 113.9, 114.3, 115.7, 129.3, 140.5, 143.6, 159.5, 173.6. Widmo zgodne z



literaturowym.¹⁷² Parametry analizy HPLC: kolumna Daicel Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 ml/min] $t_R(1)$ = 6.40 min; $t_R(2)$ = 8.9 min.

8.5.6. Procedura ogólna enzymatycznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (34)

Procedura ogólna 7.

Do roztworu kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**34**) (1 mmol) w toluenie (1.21 ml) dodano odpowiedni donor grupy alkoksylowej (3 mmol) oraz Novozym 435 (10 mg). Całość mieszano przez 5 dni w temperaturze 40°C. Mieszaninę schłodzono i dodano 2M roztwór kwasu solnego (1.1 ml). Nastąpił rozdział faz. Fazę organiczną przemyto nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu (NaHCO₃) (1x) oraz solanką (1x), a następnie suszono 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; obj.: obj.).

8.5.6.1. Synteza nieracemicznego estru etylowego kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (35)

Związek **35** otrzymano zgodnie z procedura ogólną 7.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna Daicel Chiralcel OD-H [*n*-heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 ml/min] $t_R(1)$ = 6.40 min; $t_R(2)$ = 8.9 min.

8.5.7. Procedura ogólna enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (34)

Procedura ogólna 8.

Do roztworu kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (**34**) (1 mmol) w toluenie dodano odpowiedni donor grupy alkoksylowej (3 mmol), Novozym 435 (10 mg) oraz kompleks metalu przejściowego (**27**) (10%_{mol}). Całość mieszano przez 5 dni w temperaturze 60°C. Nadmiar reagentów odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.).

¹⁷² Xu, Q.-L.; Dai, L.-X.; You, S.-L.; *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2275 – 2282.

8.5.7.1. Synteza nieracemicznego estru etylowego kwasu 3-(*m*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (35)

Związek **35** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 8.

Widma ^1H NMR i ^{13}C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Parametry analizy HPLC: kolumna Daicel Chiralcel OD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 ml/min] $t_{\text{R}}(1)$ = 6.40 min; $t_{\text{R}}(2)$ = 8.9 min.

8.6. Zastosowanie opracowanej metodologii do EKR i EDKR wybranych kwasów 3-arylo-4-pentenowych

8.6.1. Synteza pochodnych alkoholi cynamonowych zawierających podstawniki w pierścieniu aromatycznym

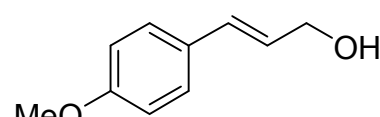
Procedura ogólna 9.

Odpowiednią pochodną kwasu cynamonowego (**36a-f**) (45 mmol) rozpuszczono w chlorku metylenu (15 ml) i dodano etanol (3 eq., 135 mmol) oraz H_2SO_4 (96% w/w, 0.36 ml). Całość mieszano w temperaturze wrzenia przez 24 godziny. Następnie mieszaninę schłodzono do temperatury pokojowej i przemyto wodą (21 ml). Nastąpił rozdział faz. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x). Połączone fazy organiczne przemyto nasyconym wodnym roztworem węgla sodu (Na_2CO_3), wodą i solanką, a następnie suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Nadmiar rozpuszczalnika odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany ester etylowy (40 mmol) rozpuszczono w tetrahydrofuranie (0.1 M roztwór) i mieszano w temperaturze -10°C , a następnie w ciągu 30 min wkroplono DIBAL-H (3eq) w toluenie. Całość mieszano przez 2 godz. W tej temperaturze, a następnie w temp. pokojowej przez 4 godziny. Mieszaninę przemyto wodą, następnie dodano 1M wodny roztwór HCl. Rozdzielono warstwy. Warstwę wodną ekstrahowano eterem dietylowym, połączone fazy suszono bezwodnym MgSO_4 , a nadmiar rozpuszczalnika odparowano. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu.

8.6.1.1. Synteza alkoholu *p*-metokscynamonowego (37a)

Związek **37a** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 9 z wydajnością 78%

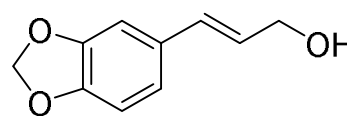
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.60 (s, 1H), 3.81 (s, 3H),



4.33 (dd, $J = 6.0, 1.2$ Hz, 2H), 6.31 (dt, $J = 15.9, 6.0$ Hz, 1H), 6.79–6.85 (m, 2H), 7.12 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.33–7.37 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 55.4, 63.2, 114.3, 126.8, 127.7, 128.9, 132.1, 160.5. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷³.

8.6.1.2. Synteza alkoholu 3,4-(metylenodioksy)cynamonowego (37b)

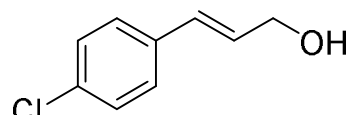
Związek **37b** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 9 z wydajnością 65%



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.68 (s, 1H), 4.30 (dd, $J = 5.8, 1.2$ Hz, 2H), 5.93 (s, 2H), 6.21 (dt, $J = 15.9, 5.8$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 15.9, 1.2$ Hz, 1H), 6.4–6.9 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 64.0, 102.3, 106.8, 108.8, 121.5, 127.1, 131.4, 131.5, 147.7, 149.0. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷⁴.

8.6.1.3. Synteza alkoholu *p*-chlorocynamonowego (37c)

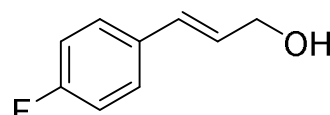
Związek **37c** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 9 z wydajnością 70%



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.75 (s, 1H), 4.30 (dd, $J = 5.4, 1.5$ Hz, 2H), 6.32 (dt, $J = 15.9, 5.7$ Hz, 1H), 6.57 (dt, $J = 15.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.28–7.29 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 63.1, 125.0, 128.4, 129.5, 132.1, 134.4, 136.8. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷⁵.

8.6.1.4. Synteza alkoholu *p*-fluorocynamonowego (37d)

Związek **37d** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 9 z wydajnością 69%



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 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, $J = 16$ Hz, 1H), 6.90 – 7.05 (m, 2H), 7.26 – 7.40 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 63.2, 115.5, 127.3, 129.8, 131.5, 133.1, 163.2. Temperatura topnienia = 56°C [lit. 57°C]¹⁷⁶.

¹⁷³ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempieńska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160–168.

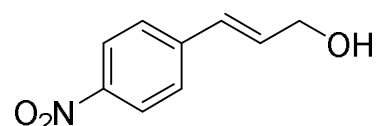
¹⁷⁴ Schobert, R.; Siegfried S.; Gordon, G. J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 2393–239.

¹⁷⁵ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempieńska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160–168.

¹⁷⁶ Salih, R. G.; Shandala, M. Y.; *Collection of Czechoslovak Chem. Comm.*, **1976**, *41*, 262–270.

8.6.1.5. Synteza alkoholu *p*-nitrocynamonowego (37e)

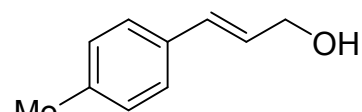
Związek **37e** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 9 z wydajnością 65%.



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.69 (s, 1H), 4.38 (dd, $J = 5.5, 1.2$ Hz, 2H), 6.55 (dt, $J = 15.9, 5.5$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.50 (dd, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 63.1, 124.2, 127.1, 128.3, 133.6, 143.4, 146.8. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷⁷.

8.6.1.6. Synteza alkoholu *p*-metylocynamonowego (37f)

Związek **37f** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 9 z wydajnością 83%



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1.67 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 4.28 (dd, $J = 5.6, 1.2$ Hz, 2H), 6.32 (dt, $J = 15.9, 5.6$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 7.12–7.16 (m, 2H), 7.23–7.30 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 21.3, 63.1, 127.1, 128.5, 129.5, 132.1, 133.5, 138.2. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷⁸.

8.6.2. Synteza estrów etylowych kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Procedura ogólna 10.

Otrzymana odpowiednia pochodna alkoholu cynamonowego **37** (10 mmol), ortoocetan trietylu (**6**) (100 mmol) oraz kwas propionowy (1ml) ogrzewano w kolbie trój szyjnej zaopatrzonej w nasadkę Claisena do oddestylowywania powstającego etanolu. Po 3 godzinach dodano kolejną porcję kwasu octowego (0.1 ml), a następnie kolejno po 3 i 5 godzinach dodano taką samą porcję kwasu. Po 6 godzinach temperatura mieszaniny wzrosła do 166°C i analiza TLC wykazała, że nie ma śladów alkoholu **37**. Mieszaninę schłodzono, a nadmiar ortoocetanu odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu.

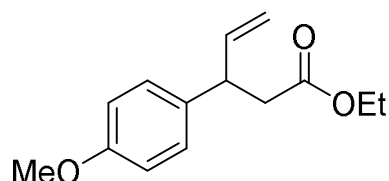
¹⁷⁷ Cignarella, G.; Occelli, E.; Testa, E.; *J. Med. Chem.* **1965**, 8, 326-331.

¹⁷⁸ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempieńska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, 1047, 160-168.

8.6.2.1. Synteza estru etylowego kwasu 3-(*p*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (38a)

Związek 38a otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 10 z wydajnością 82%.

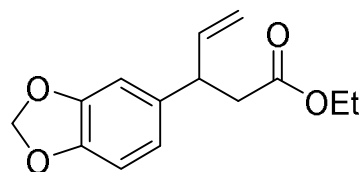
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.65 (dd, *J* = 15.0, 7.8 Hz, 1H), 2.73 (dd, *J* = 15.0, 7.8 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.81 (m, 1H), 4.06 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.04 (dt, *J* = 17.4, 1.2 Hz, 1H), 5.09 (dt, *J* = 11.1, 1.2 Hz, 1H), 5.99 (ddd, *J* = 17.4, 11.1, 6.9 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3, 40.6, 45.0, 55.3, 60.5, 114.1, 114.6, 128.7, 134.6, 140.8, 158.5, 172.1. Widmo zgodne z literaturowym¹⁷⁹. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel OJ-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; λ = 232 nm; 1.0 mL/min] t_R(*S*) = 24.8 min; t_R(*R*) = 30.22 min.



8.6.2.2. Synteza estru etylowego kwasu 3-(3,4-metylenodioksyfenylo)-4-pentenowego (38b)

Związek 38b otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 10 z wydajnością 85%

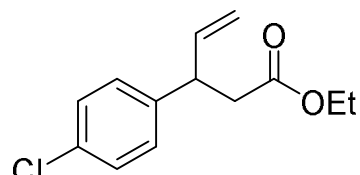
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.18 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.62 (dd, *J* = 15.0, 7.6 Hz, 1H), 2.70 (dd, *J* = 15.0, 8.0 Hz, 1H), 3.78 (q, *J* = 8 Hz, 1H), 4.08 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.03 (dt, *J* = 17.6, 1.2 Hz, 1H), 5.06 (dt, *J* = 11.3, 1.2 Hz, 1H), 5.91 (s, 2H), 5.93 (ddd, *J* = 17.6, 11.3, 6.9 Hz, 1H), 6.65-6.73 (m, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.2, 40.4, 45.2, 60.4, 100.9, 107.9, 108.2, 114.6, 120.5, 136.4, 140.3, 146.2, 147.7, 174.1. Analiza elementarna obliczona dla C₁₄H₁₆O₄: C 67.73, H 6.50; zbadana: C 67.70, H 6.58.



8.6.2.3. Synteza estru etylowego kwasu 3-(*p*-chlorofenylo)-4-pentenowego (38c)

Związek 38c otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 10 z wydajnością 74%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.15 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.63 (dd, *J* = 15.3 Hz, 7.8 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 15.3 Hz, 7.8 Hz, 1H), 3.83 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.07 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.03 (dt, *J* = 17.1 Hz, 1.2 Hz, 1H), 5.09 (dt, *J* = 10.5 Hz, 1.2 Hz, 1H), 5.94 (ddd, *J* = 17.1 Hz, 10.5 Hz, 6.6 Hz; 1H), 7.15 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.4, 40.3,



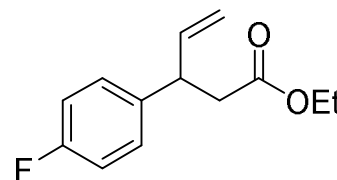
¹⁷⁹ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempieńska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160-168.

45.1, 60.7, 115.4, 128.9, 129.2, 132.6, 140.0, 141.1, 171.8. Widmo zgodne z literaturowym¹⁸⁰.

8.6.2.4. Synteza estru etylowego kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (38d)

Związek **38d** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 10 z wydajnością 87%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.15 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.63 (dd, *J* = 15.3 Hz, 7.8 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 15.3 Hz, 7.8 Hz,

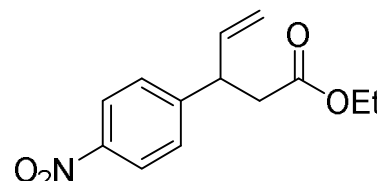


1H), 3.83 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.07 (q, *J* = 7.2 Hz), 5.01 (dt, *J* = 17.1 Hz, 1.2 Hz, 1H), 5.07 (dt, *J* = 10.5 Hz, 1.2 Hz, 1H), 5.94 (ddd, *J* = 17.1 Hz, 10.5 Hz, 6.6 Hz; 1H), 6.94-6.98 (m, 2H), 7.13-7.18 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 40.3, 44.8, 60.4, 114.9, 115.2, 115.4, 129.0, 129.1, 140.1, 160.4, 171.6. Analiza elementarna obliczona dla C₁₃H₁₆FO₂: C 70.25, H 6.80; Zbadana: C 70.10, H 6.80; HRMS (EI): obliczono dla C₁₃H₁₂FO₂ [M]^{•+}, 222.1056, zbadano 222.1055. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralpack AS-H [heksan : *i*PrOH; 97:3; λ = 232 nm; 0.6 mL/min] t_R(*S*) = 6.33 min; t_R(*R*) = 6.73 min.

8.6.2.5. Synteza estru etylowego kwasu 3-(*p*-nitrofenylo)-4-pentenowego (38e)

Związek **38e** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 10 z wydajnością 69%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.71 (dd, *J* = 15.4, 7.6 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 15.4,



7.6 Hz, 1H), 3.90-3.95 (m, 1H), 4.06 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.11 - 5.15 (m, 2H), 5.92 (ddd, *J* = 17.2, 10.3, 8.6 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 39.6, 45.2, 60.6, 116.1, 123.8, 128.5, 138.7, 146.8, 150.0, 171.0. Widmo zgodne z literaturowym¹⁸¹. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel AD-H [heksan : *i*PrOH : AcOH ; 9:1; λ = 232 nm; 0.5 mL/min] t_R(*S*) = 17.0 min; t_R(*R*) = 18.6 min.

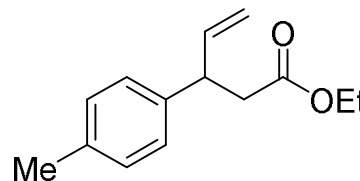
¹⁸⁰ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempnińska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160-168.

¹⁸¹ Miyata, K.; Kutsuna, H.; Kawakami, S.; Kitamura, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4649-4653.

8.6.2.6. Synteza estru etylowego kwasu 3-(*p*-metylofenylo)-4-pentenowego (38f)

Związek **38f** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 10 z wydajnością 80%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.64 (dd, *J* = 15.0, 7.6 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 15.0, 8.0 Hz, 1H), 3.79-3.83 (m, 1H), 4.06 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.02 (dt, *J* = 17.6, 1.2 Hz, 1H), 5.06 (dt, *J* = 11.3, 1.2 Hz, 1H), 5.94 (ddd, *J* = 17.6, 11.3, 6.9 Hz, 1H), 7.09 (s, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 20.9, 40.3, 45.2, 60.3, 114.5, 127.3, 129.2, 136.1, 139.4, 140.4, 171.9. Widmo zgodne z literaturowym¹⁸².



8.6.3. Synteza kwasów 3-arylo-4-pentenowych (39)

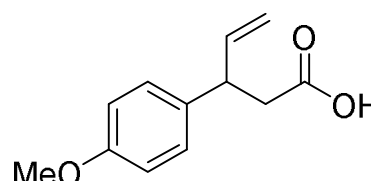
Procedura ogólna 11.

Do otrzymanego estru etylowego kwasu 3-arylo-4-pentenowego (**38**) (4 mmol) dodano kolejno roztwór wodorotlenku potasu (40 mmol) w wodzie (10 ml) oraz metanol (2 ml). Całość mieszano w temperaturze pokojowej przez 5 godzin. Następnie mieszaninę przemyto eterem etylowym. Fazę wodną doprowadzono do pH 2 za pomocą stężonego kwasu solnego. Fazę wodną ekstrahowano eterem etylowym (3 x 20 ml). Połączone fazy organiczne wysuszono bezwodnym siarczanem magnezu i odparowano rozpuszczalnik pod obniżonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu.

8.6.3.1. Synteza kwasu 3-(*p*-metoksyfenylo)-4-pentenowego (39a)

Związek **39a** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 11 z wydajnością 76%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.70 (dd, *J* = 15.6, 7.4 Hz, 1H), 2.78 (dd, *J* = 15.6, 8.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.80 (m, 1H), 5.05 (dt, *J* = 17.4, 1.2 Hz, 1H), 5.09 (dt, *J* = 11.1, 1.2 Hz, 1H), 5.96 (ddd, *J* = 17.4, 11.1, 6.6 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 10.2 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): 40.1, 44.3, 55.2, 114.0, 114.6, 128.5, 134.2, 140.3, 158.4, 178.2. Widmo zgodne z literaturowym¹⁸³.



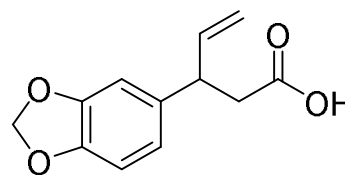
¹⁸² Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempieńska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160-168.

¹⁸³ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempieńska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160-168.

8.6.3.2. Synteza kwasu 3-(3,4-metylenodioksyfenylo)-4-pentenowego (39b)

Związek **39b** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 11 z wydajnością 79%

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.65 – 2.78 (m, 2H), 3.75 – 3,81 (m, 1H), 5.05 - 5.09 (m, 2H), 5.94 (s, 2H), 5.89 – 5.98



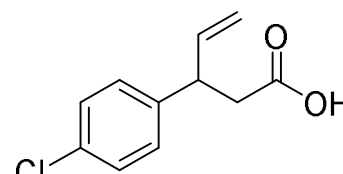
(ddd, $J = 17.2, 11.6, 6.8$ Hz, 2H), 6.66 - 6.75 (m, 3H), 9.21 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 40.4, 44.8, 100.9, 107.9, 108.3, 114.8, 120.5, 135.9, 140.1, 146.3, 147.8, 177.8.

HRMS (EI): obliczono dla: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$ $[\text{M}]^{+\bullet}$, 220.0736, zbadano 220.0744; HRMS (ESI): obliczono dla $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, 219.0652, zbadano 219.0657

8.6.3.3. Synteza kwasu 3-(*p*-chlorofenylo)-4-pentenowego (39c)

Związek **39c** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 11 z wydajnością 79%

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.69 (dd, $J = 15.7, 7.7$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J = 15.7, 7.7$ Hz, 1H), 3.84 (q, $J = 7.5$ Hz,



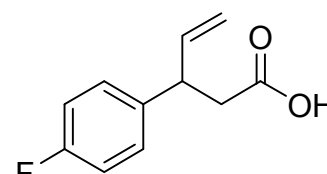
1H), 5.04-5.12 (m, 2H), 5.94 (ddd, $J = 17.1, 10.4, 6.8$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 9.70 (br s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 39.7, 44.4, 115.4, 128.7, 128.9, 132.6, 139.4, 140.5, 177.7. Widmo zgodne z literaturowym¹⁸⁴.

Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel AD-H [heksan : *i*PrOH; 9:1; $\lambda = 232$ nm; 0.5 mL/min] $t_{\text{R}}(\text{S}) = 12.0$ min; $t_{\text{R}}(\text{R}) = 13.9$ min.

8.6.3.4. Synteza kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (39d)

Związek **39d** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 11 z wydajnością 71%

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 2.67 (dd, $J = 15.6, 7.6$ Hz, 1H), 2.77 (dd, $J = 15.7, 7.6$ Hz, 1H), 3.83 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H),



5.02-5.09 (m, 2H), 5.94 (ddd, $J = 17.1, 10.4, 6.7$ Hz, 1H), 6.94-6.99 (m, 2H), 7.00-7.14 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 39.9, 44.3, 115.1, 115.3, 115.5, 128.9, 129.0,

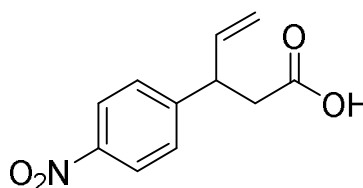
137.7, 137.7, 139.4, 160.4, 162.9, 177.5. LRMS (ESI): obliczono dla $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FO}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 193.06, zbadano: 193.02. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel AD-H [heksan : *i*PrOH : AcOH; 9:1 0.05; $\lambda = 232$ nm; 0.5 mL/min] $t_{\text{R}}(\text{S}) = 6.5$ min; $t_{\text{R}}(\text{R}) = 7.4$ min.

¹⁸⁴ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempnińska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160-168.

8.6.3.5. Synteza kwasu 3-(*p*-nitrofenylo)-4-pentenowego (39e)

Związek **39e** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 11 z wydajnością 75%

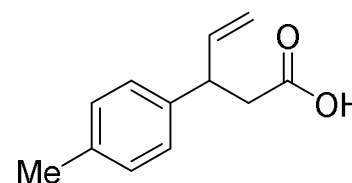
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.75 (dd, *J* = 16.0, 7.6 Hz, 1H), 2.84 (dd, *J* = 15.6, 7.6 Hz, 1H), 3.96 (q, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.08 (dt, *J* = 17.4, 1.2 Hz, 1H), 5.16 (dt, *J* = 11.1, 1.2 Hz, 1H), 5.93 (ddd, *J* = 17.4, 11.1, 6.6 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 39.3, 44.8, 116.4, 123.9, 128.5, 138.4, 142.3, 149.6, 177.1. Analiza elementarna obliczona dla C₁₁H₁₁NO₄: C 59.73, H 5.01, N 6.33; zbadana: C 59.62, H 5.18, N 6.28; HRMS (ESI): obliczona dla C₁₁H₁₀NO₄ [M-H]⁻, 220.0610, zbadana: 220.0615.



8.6.3.6. Synteza kwasu 3-(*p*-metylofenylo)-4-pentenowego (39f)

Związek **39f** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 11 z wydajnością 76%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.31 (s, 3H), 2.71 (dd, *J* = 15.5, 7.4 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 15.4, 7.9 Hz, 1H), 3.82 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.04-5.08 (m, 2H), 5.95 (ddd, *J* = 17.1, 10.0, 6.9 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 10.83 (br s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.99, 39.9, 44.7, 114.7, 127.3, 129.3, 136.3, 139.1, 140.1, 177.6. Widmo zgodne z literaturowym¹⁸⁵. Parametry analizy HPLC: kolumna chiralna Chiralcel AD [heksan : *i*PrOH : AcOH; 9:1:0.05; λ = 232 nm; 0.5 mL/min] t_R(S) = 10.3 min; t_R(R) = 11.9 min.



8.6.4. Enzymatyczny rozdział kinetyczny kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Procedura ogólna 12

Do roztworu kwasu 3-arylo-4-pentenowego (**39**) (1 mmol) w toluenie dodano ortobenzoesan trietylu (3 mmol) oraz Novozym 435 (10 mg). Całość mieszano przez 5 dni w temperaturze 60°C. Nadmiar reagentów odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.).

¹⁸⁵ Wzorek, A.; Gawdzik, B.; Gładkowski, W.; Urbaniak, M.; Barańska, A.; Malińska, M.; Woźniak, K.; Kempieńska, K.; Wietrzyk, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1047*, 160-168.

8.6.4.1. Synteza nieracemicznych kwasów 3-arylo-4-pentenowych (39)

Nieracemiczne związki **39** otrzymano zgodnie z procedurą literaturową 6. Skręcalność właściwa otrzymanych związków: kwas (*S*)-(-)-**39a**: ($[\alpha]_D = -8.2$ (c 1.0 CHCl₃) Lit. (*R*)-(+)-**39a** $[\alpha]_D = +20.0$ (c 2.0, CHCl₃, >99% *ee*)¹⁸⁶; (*S*)-(-)-**39c**: ($[\alpha]_D = -15.6$ (c 1.0, PhH) Lit. (*S*)-(-)-**39c**: $[\alpha]_D = -14.4$ (c 1.39, PhH, 94% *ee*)¹⁸⁷; (*S*)-(-)-**39d**: ($[\alpha]_D = -26.2$ (c 1.0, CHCl₃) Lit. (*R*)-(+)-**39d**: $[\alpha]_D = +21.0$ (c 2.00, CHCl₃, >90.5% *ee*)¹⁸⁸.

8.6.5. Enzymatyczny dynamiczny rozdział kinetyczny kwasów 3-arylo-4-pentenowych

Procedura ogólna 13.

Do roztworu kwasu 3-arylo-4-pentenowego (**39**) (1 mmol) w toluenie dodano ortobenzoesan trietylu (3 mmol), Novozym 435 (10 mg) oraz kompleks dimer octanu rodu (II) (**27**) (10%_{mol}). Całość mieszano przez 5 dni w temperaturze 60°C. Nadmiar reagentów odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.).

8.6.6. DKR kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (39d) w skali preparatywnej

Do roztworu kwasu 3-(*p*-fluorofenylo)-4-pentenowego (39d) (1 mol) w toluenie dodano ortobenzoesan trietylu (3 mol) oraz Novozym 435 (50 mg). Całość mieszano przez 5 dni w temperaturze 60°C. Nadmiar reagentów odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.). otrzymano związek **38d** z wydajnością 76% i z nadmiarem enancjomerycznym 90%. Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio.

¹⁸⁶ Gao, M.; Wang, D.-X.; Zheng, Q.-Y.; Wang, M.-X.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9532-9535.

¹⁸⁷ Brown, E.; Deroye, C.; Touet, J.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1605-1614;

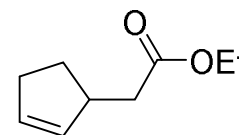
¹⁸⁸ Gao, M.; Wang, D.-X.; Zheng, Q.-Y.; Wang, M.-X.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9532-9535.

8.7. Zastosowanie opracowanej metodologii do dynamicznego rozdziału kinetycznego innych kwasów karboksylowych

8.7.1. Synteza estru etylowego kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (41)

Procedura ogólna 14.

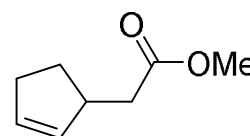
Kwas 2-cyklopenteno-1-octowy (**40**) (15 mmol) rozpuszczono w chlorku metylenu (5 ml) i dodano etanol (3 eq., 45 mmol) oraz H₂SO₄ (96% w/w, 0.12 ml). Całość mieszano w temperaturze wrzenia przez 24 godziny. Następnie mieszninę schłodzono do temperatury pokojowej i przemyto wodą (7 ml). Nastąpił rozdział faz. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x). Połączone fazy organiczne przemyto nasyconym wodnym roztworem węgla sodu (Na₂CO₃), wodą i solanką, a następnie suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Nadmiar rozpuszczalnika odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.). Uzyskano produkt **41** w postaci żółtego oleju z wydajnością 82%.



¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.41–1.46 (m, 1H), 2.0–2.18 (m, 1H), 2.22–2.31 (m, 2H), 2.34–2.42 (m, 2H), 3.05–3.11 (m, 1H), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 5.65–5.69 (m, 1H), 5.74–5.79 (m, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 14.1, 30.1, 32.0, 40.5, 42.3, 60.5, 131.4, 134.3, 173.2. Widmo zgodne z literaturowym.¹⁸⁹

8.7.2. Synteza estru metylowego kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (42)

Związek **42** otrzymano zgodnie z procedurą literaturową 13 z wydajnością 64%.



¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.41–1.48 (m, 1H), 2.04–2.23 (m, 1H), 2.30–2.39 (m, 4H), 3.05–3.12 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 5.64–5.69 (m, 1H), 5.75–5.79 (m, 1H); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 30.2, 32.4, 40.8, 42.6, 52.0, 132.1, 134.2, 173.9. Widmo zgodne z literaturowym.¹⁹⁰

¹⁸⁹ Motherwell, W. B.; Begis, G.; Cladingboel, D. E.; Jerome, L.; Sheppard, T. D. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 6462 – 6476.

¹⁹⁰ Miyazaki, T.; Yokoshima, S.; Simizu, S.; Osada, H.; Tokuyama, H.; Fukuyama, T.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4737 – 4740.

8.7.3. Procedura ogólna enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (40)

Procedura ogólna 15.

Do roztworu kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (40) (1 mmol) w toluenie dodano odpowiedni donor grupy alkoksyłowej (3 mmol), Novozym 435 (10 mg) oraz kompleks metalu przejściowego (22 – 27) (10%_{mol}). Całość mieszano przez 7 dni w temperaturze 60°C. Nadmiar reagentów odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan : octan etylu (99.5 : 0.5; obj.: obj.).

8.7.3.1. Synteza nieracemicznego estru etylowego kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (41)

Związek 41 otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 15.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio.

8.7.3.2. Synteza nieracemicznego estru metylowego kwasu 2-cyklopenteno-1-octowego (42)

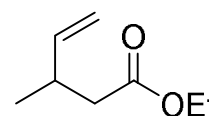
Związek 42 otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 15.

Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zgodne z otrzymanymi uprzednio. Dla enancjomeru (*R*): $[\alpha]_D = -96^\circ$ (*c* = 1.14 g/100ml, CHCl₃).¹⁹¹

8.7.4. Synteza estru etylowego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (44)

Związek 44 otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 14 z wydajnością 65%.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 1.1 (d *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.20–2.31 (m, 2H), 2.65–2.70 (m, 1H), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.89 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H), 4.98 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 5.69–5.79 (m, 1H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 14.2, 20.8, 34.3, 39.1, 60.7, 113.7, 144.5, 172.2. Widmo zgodne z literaturowym.¹⁹²

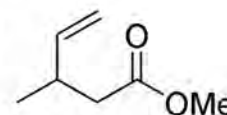


¹⁹¹ Miyazaki, T.; Yokoshima, S.; Simizu, S.; Osada, H.; Tokuyama, H.; Fukuyama, T.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4737 – 4740.

¹⁹² Yu, L.-F.; Hu, H.-N.; Nan, F.-J., *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1448 – 1451.

8.7.5. Synteza estru metylowego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (45)

Związek **45** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 14 z wydajnością 58%.



$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 1.03 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 2.28 (m, 2H), 2.69 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 5.09 (m, 2H), 5.75 (ddd, $J = 17.2, 10.4, 7.0$ Hz, 1H).
 $^{13}\text{CNMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz): δ 20.7, 34.9, 41.3, 51.4, 113.7, 142.4, 172.6. Widmo zgodne z literaturowym.¹⁹³

8.7.6. Procedura ogólna enzymatycznego dynamicznego rozdziału kinetycznego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (43)

Procedura ogólna 16.

Do roztworu kwasu 3-metylo-4-pentenowego (**43**) (1 mmol) w toluenie (1.21 ml) wkroplono odpowiedni donor grupy alkoksyłowej (3 eq; 3 mmol), dodano 10%_{mol} odpowiedniego katalizatora i 10 mg Novozymu. Mieszaninę ogrzewano do temperatury 60°C przez 7 dni. Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczono za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym układem heksan/octan etylu.

8.7.6.1. Synteza nieracemicznego estru etylowego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (44)

Związek **44** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 16.

Widma $^1\text{H NMR}$ i $^{13}\text{C NMR}$ zgodne z otrzymanymi uprzednio.

8.7.6.2. Synteza nieracemicznego estru metylowego kwasu 3-metylo-4-pentenowego (45)

Związek **45** otrzymano zgodnie z procedurą ogólną 16.

Widma $^1\text{H NMR}$ i $^{13}\text{C NMR}$ zgodne z otrzymanymi uprzednio. Dla enancjomeru (S):
 $[\alpha]_{\text{D}} = +2.5^\circ$ ($c = 0.2$ g/100ml, CHCl_3).¹⁹⁴

¹⁹³ Hekking, K. F. W.; Waalboer, D. C. J.; Moelands, M. A. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T.; *Adv. Syn. Catal.* **2008**, *350*, 95 – 106.

¹⁹⁴ Hekking, K. F. W.; Waalboer, D. C. J.; Moelands, M. A. H.; van Delft, F. L.; Rutjes, F. P. J. T.; *Adv. Syn. Catal.* **2008**, *350*, 95 – 106.



Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.373/16



90000000191664