

Politechnika Wroclawska,
Zakład Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego

**Biotransformacje hydroksyfosfinianów z
asymetrycznym atomem fosforu**

Paulina Majewska

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Barbary Lejczak

Wrocław 2006

Pragnę serdecznie podziękować
Pani prof. dr hab. Barbarze Lejczak
i Panu prof. dr hab. Pawłowi Kafarskiemu
za pomoc i życzliwość okazaną
w czasie pisania niniejszej pracy.

Niniejsza praca doktorska została wykonana w latach 2002-2006 w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i była częściowo finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego z grantu promotorskiego 3 T09A 007 28.

Prezentowane w tej pracy wyniki zostały częściowo opisane w poniższych publikacjach:

1. Majewska P., Kafarski P., Lejczak B.; Lipase-catalysed resolution of 1-hydroxyethane-P-phenylphosphinates; *Polish J. Chem.*; 79 (2005) str.: 561-566
2. Majewska P., Kafarski P., Lejczak B., Bryndal I., Lis T.; An approach for the synthesis and assignment of absolute configuration of all enantiomers of ethyl hydroxy(phenyl)methane(P-phenyl)phosphinate; *Tetrahedron: Asymmetry*; 17 (2006) str.: 2697 – 2701.
3. Majewska P., Kafarski P., Lejczak B.; Simple and effective method for the deracemization of ethyl 1-hydroxyphosphinate using biocatalysts with lipolytic activity; *Tetrahedron: Asymmetry*; 17 (2006) str.: 2870 – 2875.

Były również prezentowane na konferencjach:

1. XVII Polish Peptide Symposium – Łódź 31.08 – 4.09.2003; P. Majewska, P. Kafarski and B. Lejczak; Lipase-catalysed modifications of P-chiral hydroxyphosphinates. (poster)
2. 29th Conference „Chemistry for agriculture” – Jasenik, Czechy; 9-12.12.2003. P. Majewska, P. Kafarski and B. Lejczak. Enzymatic hydrolysis α -butyryloxyphosphinates with two stereogenic centers. (poster)
3. Biotrans 2005 Symposium – Delft, Holandia; 3-8.07.2005; P. Majewska, E. Żymańczyk-Duda, M. Klimek-Ochab, M. Brzezińska-Rodak, P. Kafarski, B. Lejczak; Alternative of deracemization of ethyl 1-hydroxyphosphinate using biocatalysts of hydrolytic and oxidative activity. (poster)
4. XVIII-th Polish Peptide Symposium – Wrocław, 4-8.09.2005; P. Majewska, E. Żymańczyk-Duda, M. Brzezińska-Rodak, P. Kafarski and B. Lejczak; Microbial transformations of α -hydroxyphosphinates. (poster)

Pozostały dorobek naukowy:

Udział w realizacji grantu: 3 T09A 05427

„Chemoenzymatyczna synteza fosfinianów i fosfonianów zawierających jedno lub dwa centra asymetrii”.

Publikacje:

1. Picur B., Ruchała P., Cierpicki T., Lisowski M., Chliszcz P., Siemion I. Z.; The structure of new cyclolinopeptide CLX; *Arthropods 2001*, ed. D. Konopińska, Wyd. Uniw. Wroc. Sp. z o.o., 1, 6 (2002) str.: 198 – 203.
2. Brzezicka A., Chliszcz P., Lisowski M., Olejarnik M., Ruchała P., Śpiewak K., Siemion I. Z., Picur B.; Cyclic peptides from different flaxes; *Chemistry for agriculture*; eds.: H. Górecki i Z. Dobrzański, Czech - Pol Trade, 3 (2002) str.: 182 – 187.
3. Picur B., Brzezicka A., Chliszcz P., Cebrat M., Lisowski M., Olejarnik M., Ruchała P., Śpiewak K., Siemion I.Z.; Cyclic peptides from different flaxes; *Peptides 2002*, Proc. 27th Eur. Peptide Symposium, eds. Bennedetti E., Pedone C., str. 396 – 397, Edizioni Ziino, Napoli.
4. Klimek-Ochab M., Obojska A., Żymańczyk-Duda E., Brzezińska-Rodak M., Majewska P., Lejczak B.; Characterization of degradative activity of *Verticillium sp.* isolate towards ciliate; *Chemistry for agriculture*; eds.: H. Górecki i Z. Dobrzański, Czech - Pol Trade, 6 (2005) str.: 793 – 797.
5. Żymańczyk-Duda E., Brzezińska-Rodak M., Majewska P., Klimek-Ochab M., Lejczak B.; The influence of permeabilization on the reductive activity of fungi; *Chemistry for agriculture*; eds.: H. Górecki i Z. Dobrzański, Czech - Pol Trade, 6 (2005) str.: 1002 – 1005.
6. Brzezińska-Rodak M., Żymańczyk-Duda E., Majewska P., Lejczak B.; The influence of different *Saccharomyces cerevisiae* whole – cells immobilization methods on their reductive activity in low – water biotransformation media; *Chemistry for agriculture*; eds.: H. Górecki i Z. Dobrzański, Czech - Pol Trade, 7 (2006) str.: 148 – 152.

Konferencje:

1. XVI Polish Peptide Symposium - Przegorzały, Kraków, 1 – 4.09.2001; (poster)
2. The XXX-th International Conference „Chemistry for agriculture” – Jasenik, Czech Republic; 30.11 – 3.12.2004; (poster)
3. The XXX-th International Conference „Chemistry for agriculture” – Jasenik, Czech Republic; 6.11 – 9.12.2005; (poster)

Spis treści

1. Streszczenie.....	1
2. Wstęp.....	5
2.1. Związki fosforoorganiczne zawierające bezpośrednie wiązanie pomiędzy atomem fosforu i atomem węgla.....	6
2.1.1. Naturalne fosfoniany.....	6
2.1.2. Syntetyczne fosfoniany.....	7
2.2. Hydroksyfosfoniany.....	10
2.3. Metody syntezy optycznie czystych hydroksyfosfonianów.....	13
2.3.1. Asymetryczna synteza.....	13
2.3.1.1. Addycja fosfo-aldolowa.....	13
2.3.1.2. Redukcja.....	21
2.3.1.3. Utlenianie.....	25
2.3.1.4. Inne metody.....	28
2.3.2. Biokataliza.....	29
2.3.2.1. Hydroliza acyloksyfosfonianów.....	30
2.3.2.2. Estryfikacja hydroksyfosfonianów.....	33
2.3.2.3. Redukcja ketofosfonianów.....	38
2.3.2.4. Hydroliza epoksyfosfonianów.....	39
2.4. Określanie konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów za pomocą metod NMR.....	40
2.4.1. Chiralne odczynniki derywatyzujące.....	40
2.4.1.1. Kwas α -metoksy- α -trifluorometylofenylooctowy (MTPA).....	41
2.4.1.2. Kwas α -metoksyfenylooctowy (MPA).....	44
2.4.1.3. Inne chiralne odczynniki derywatyzujące.....	47
2.4.2. Chiralne odczynniki solwatujące.....	48
3. Cel pracy.....	49
4. Badania własne.....	51
4.1. Biotransformacje.....	52
4.1.1. Synteza substratów biotransformacji.....	52
4.1.2. Enzymatyczna hydroliza.....	53
4.1.3. Transestryfikacje.....	61
4.1.4. Chemiczne modyfikacje lipaz.....	63
4.1.5. Biotransformacje za pomocą mikroorganizmów lipolitycznych.....	66
4.2. Określenie konfiguracji absolutnej.....	72
4.2.1. Określenie konfiguracji absolutnej 1-hydroksyetano(<i>P</i> -fenylo)fosfinianu etylu oraz 1-hydroksy-2,2-dimetyloetano(<i>P</i> -fenylo)fosfinianu etylu.....	72
4.2.2. Określenie konfiguracji absolutnej 1-hydroksy-1-fenylometano(<i>P</i> -fenylo)fosfinianu etylu.....	79
4.2.3. Określenie konfiguracji absolutnej 1-hydroksy-1-(3,4-dimetoksyfenylo)metano(<i>P</i> -fenylo)fosfinianu etylu.....	82
5. Podsumowanie i wnioski.....	86
6. Materiały i metody.....	90
6.1. Odczynniki.....	91
6.2. Mikroorganizmy i enzymy.....	93
6.3. Oczyszczanie i analiza.....	94
6.3.1. Techniki analityczne.....	94

6.3.2. Techniki preparatywne.....	94
6.4. Synteza substratów reakcji biotransformacji.....	95
6.4.1. Synteza α -hydroksyfosfinianów.....	95
6.4.2. Synteza α -butyryloksyfosfinianów.....	97
6.5. Synteza estrów aktywnych.....	101
6.5.1. Synteza metylosiarczanu <i>p</i> -hydroksyfenyloдимetylosulfoniowego DSP.....	101
6.5.2. Synteza estrów DSP.....	101
6.6. Synteza estrów Mosher`a.....	103
6.7. Przygotowanie biokatalizatorów do reakcji biotransformacji.....	106
6.7.1. Przygotowanie preparatu enzymatycznego z <i>Candida cylindracea</i> do modyfikacji.....	106
6.7.2. Chemiczna modyfikacja lipazy z <i>Candida cylindracea</i>	106
6.7.3. Przygotowanie komórek mikroorganizmów.....	106
6.7.4. Permeabilizacja.....	107
6.7.5. Immobilizacja.....	107
6.8. Reakcje biotransformacji.....	108
6.8.1. Biokatalityczne reakcje hydrolizy w układzie dwufazowym.....	108
6.8.2. Enzymatyczna hydroliza w rozpuszczalniku organicznym.....	108
6.8.3. Enzymatyczna hydroliza w układzie dwufazowym z dodatkami.....	109
6.8.4. Enzymatyczna transestryfikacja.....	109
6.8.5. Modyfikacja środowiska reakcji transestryfikacji.....	109
6.8.6. Hydroliza komórkami mikroorganizmów.....	110
6.9. Przygotowanie α -hydroksyfosfinianów do określenia ich konfiguracji absolutnej.....	111
6.9.1. Próby otrzymania czystych par enancjomerów.....	111
6.9.2. Otrzymanie α -butyryloksyfosfinianów o różnym składzie izomerów.....	111
6.9.3. Chemiczna hydroliza α -hydroksyfosfinianów.....	111
6.9.4. Krystalizacja.....	112
6.10. Metody analityczne.....	113
6.10.1. Oznaczanie zawartości białka w preparatach enzymatycznych metodą Bradford.....	113
6.10.2. Określenie stopnia modyfikacji lipazy.....	113
6.10.3. Określenie aktywności preparatów enzymatycznych.....	114
6.10.4. Określenie stopnia przereagowania.....	114
6.10.5. Określenie nadmiaru enancjomerycznego ee.....	115
7. Literatura.....	116

1. Streszczenie

Optycznie czyste hydroksyfosfiniany zawierające centrum asymetrii na atomie fosforu i α atomie węgla wykazują bardzo interesujące własności biologiczne. Do grupy tej należy lek na nadciśnienie – inhibitor ludzkiej reniny i lek przeciwko AIDS. Opracowanie metody syntezy takich połączeń za pomocą biokatalizy z jak największą czystością enancjomeryczną stanowiło podstawę badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. Badania, w których jako biokatalizatory wykorzystane zostały zarówno preparaty enzymatyczne, jak i mikroorganizmy o aktywności lipolitycznej, przeprowadzone zostały na drodze hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów oraz estryfikacji α -hydroksyfosfinianów, w celu porównania tych metod pod względem aktywności biokatalizatorów i enancjoselektywności katalizowanych reakcji. W opisanych reakcjach wykorzystane zostały lipazy pochodzące z różnych źródeł, m. in. z grzybów np.: *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*; z drożdżaków np.: *Candida cylindracea* oraz z trzustki wieprzowej, a także immobilizowane lipazy z *Pseudomonas cepacia* i *Mucor circinelloides*. Zastosowane zostały również całe komórki mikroorganizmów: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia liquefaciens* i *Acinetobacter baumannii*, których aktywność lipolityczna została wcześniej zbadana w naszym zespole.

Reakcje hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów lipazami zaszły z enancjoselektywnością sięgającą >98% w zależności od użytego substratu i biokatalizatora. Tylko trzy lipazy z *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* i trzustki wieprzowej okazały się efektywnymi biokatalizatorami aktywnymi wobec wszystkich substratów. Substrat posiadający najmniejszy podstawnik (grupę $-\text{CH}_3$) 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu, był hydrolizowany przez wszystkie lipazy. Większość stosowanych lipaz (poza lipazą z *Candida cylindracea*) wykazywała wysoką enancjoselektywność katalizowanej reakcji.

Reakcje hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów katalizowane całymi komórkami mikroorganizmów były znacznie mniej enancjoselektywne. Najlepszy wynik uzyskano w przypadku hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów komórkami szczepu *Bacillus subtilis*. Natomiast hydroliza 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu komórkami szczepów *Acinetobacter baumannii* i *Serratia liquefaciens* nie dała powtarzalnych wyników.

Reakcje estryfikacji α -hydroksyfosfinianów zaszły jedynie dla 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu, natomiast uzyskane nadmiary enancjomeryczne sięgały >98% w zależności od użytej lipazy. Najmniej enancjoselektywnym biokatalizatorem reakcji transestryfikacji okazała się lipaza z *Mucor javanicus*, pomimo swojej wysokiej

aktywności. Natomiast bardzo dobrymi biokatalizatorami są: lipaza z trzustki wieprzowej, immobilizowana lipaza z *Pseudomonas cepacia* oraz immobilizowana lipaza z *Mucor circinelloides*.

Dążąc do zmiany enancjoselektywności lipaz, a tym samym do zmiany konfiguracji absolutnej otrzymanych produktów powyższych reakcji, podjęte zostały próby modyfikowania środowiska reakcji hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów katalizowanej enzymatycznie. Reakcje te przeprowadzono w środowisku organicznym (eter diizopropylowy nasycony wodą). Jako czynniki zapobiegające agregacji białek enzymatycznych zostały zastosowane roztwory soli (LiCl, MgCl₂) oraz tritonu X-100.

Przeprowadzone zostały również modyfikacje środowiska reakcji teansestryfikacji za pomocą zasadowych dodatków takich jak: trietyloamina i pirydyna. Tylko w przypadku zastosowania trietyloaminy zaobserwowano poprawę enancjoselektywności reakcji estryfikacji 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu katalizowanej lipazami z *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* i *Mucor javanicus*.

Podjęte zostały również próby opracowania najlepszej metody przygotowania formy biokatalizatora (całych komórek mikroorganizmów) dla prowadzenia reakcji w układzie dwufazowym (immobilizacja) oraz zwiększenia wydajności reakcji w środowisku wodnym (permeabilizacja). Dzięki immobilizacji komórek mikroorganizmów za pomocą alginianu wapnia można było przeprowadzić biotransformacje w układzie dwufazowym (mieszanka eteru diizopropylowego i *n*-heksanu/ bufor fosforanowy). Zarówno permeabilizacja, jak i immobilizacja komórek mikroorganizmów nie miały znaczącego wpływu na poprawę ich aktywności jako biokatalizatora i enancjoselektywności katalizowanej reakcji.

Postanowiono również sprawdzić jak można sterować enancjoselektywnością lipaz poprzez ich chemiczną modyfikację. Do tego celu zastosowane zostały związki acylujące - estry metylosiarczanu *p*-hydroksyfenylodimetylosulfoniowego, tzw. estry aktywne, posiadające grupy: acetylową, *izo*-butyrylową, 3,5-dinitrobenzoiową i benzoliową. Stosując tę procedurę, otrzymano cztery formy modyfikowanego enzymu, różniące się wprowadzaną grupą hydrofobową. Podczas reakcji hydrolizy 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu zmodyfikowanymi i niezmodyfikowanym enzymem nie zaobserwowano większych zmian w aktywności tych biokatalizatorów i enancjoselektywności katalizowanej reakcji.

Pomiary czystości enancjomerycznej produktów biotransformacji były przeprowadzane za pomocą metod NMR z użyciem chiralnego odczynnika solwującego – chininy lub chiralnej kolumny HPLC.

Określenie konfiguracji absolutnej na atomie węgla przeprowadzone zostało za pomocą metod NMR z zastosowaniem chiralnego odczynnika derywatyzyjnego – kwasu α -metoksy- α -trifluorometylofenylooctowego (MTPA). W przypadku 1-hydroksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu (jedynego substratu, który był ciałem stałym) otrzymano jeden czysty izomer w postaci kryształów nadających się do badań krystalograficznych, w wyniku których określono jego konfigurację absolutną (*R_P,S*). Natomiast określenie konfiguracji absolutnej na atomie fosforu przeprowadzono porównując dane spektroskopowe opisane w literaturze dwóch α -hydroksyfosfinianów z widmami ^1H , ^{13}C i ^{31}P NMR. Podczas analiz widm ^{31}P NMR z chininą okazało się, że zastosowanie tego odczynnika, pozwala określić nie tylko nadmiar enancjomeryczny, ale również konfigurację absolutną na atomie fosforu. Pozwoliło to na określenie konfiguracji absolutnej na atomie fosforu jednego z α -hydroksyfosfonianów nieopisanego dotychczas w literaturze. Metoda wykorzystująca zastosowanie tego chiralnego odczynnika solwującego, w połączeniu z chiralnym odczynnikiem derywatyzyjnym jakim jest MTPA, jest prosta i stosunkowo tania, co stwarza możliwość szerszego zastosowania jej w przyszłości do określania konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów z dwoma centrami asymetrii na atomie węgla i atomie fosforu.

2. Wstęp

2.1. Związki fosforoorganiczne zawierające bezpośrednie wiązanie pomiędzy atomem fosforu i atomem węgla.

Fosfoniany zawierają w swojej strukturze stabilne, kowalencyjne wiązanie C-P, które tylko w nielicznych przypadkach ulega fotolizie,¹ chemicznej hydrolizie, czy rozpadowi termicznemu.² Jednak, pomimo swojej wysokiej odporności chemicznej, wiązanie to ulega biodegradacji. Wiele mikroorganizmów, zarówno bakterie, drożdże jak i grzyby, wykorzystuje związki fosforoorganiczne jako źródło fosforu i węgla.³

Wiele znanych fosfonianów wykazuje aktywność biologiczną, którą zawdzięczają głównie swojej budowie. Należą do nich między innymi fosfonopeptydy. Struktura wiązania fosfonoamidowego podobna jest do tetraedrycznego stanu przejściowego hydrolizy wiązania peptydowego, dzięki czemu fosfonopeptydy mogą być inhibitorami proteaz.⁴

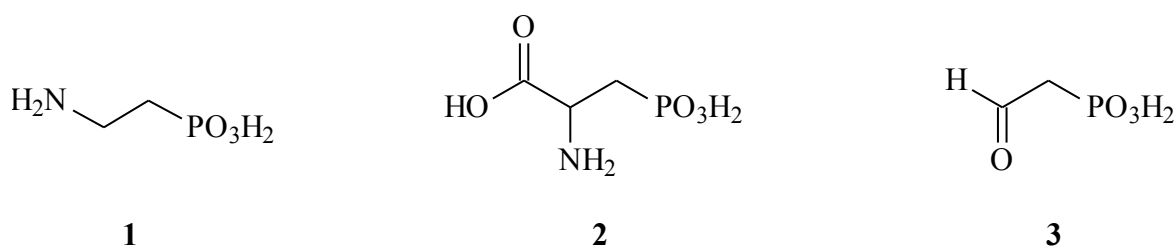
Inny mechanizm inhibicji opiera się na strukturalnym podobieństwie fosfonianów do związków występujących w naturze. Należą do nich między innymi kwasy aminoalkilofosfonowe, które są strukturalnymi analogami aminokwasów i mają hamujący wpływ na enzymy biorące udział w biosyntezie ich naturalnych odpowiedników.

2.1.1. Naturalne fosfoniany.

Odkrycie w 1959 ciliatyny **1** – naturalnego kwasu aminofosfonowego wyizolowanego po raz pierwszy z pierwotniaków występujących w żwaczu owiec,⁵ spowodowało zwiększenie zainteresowania związkami posiadającymi wiązanie węgiel – fosfor. Badania nad tym związkiem wykazały, że wchodzi on w skład fosfonolipidów, które znaleziono u pierwotniaków, jamochłonów, mięczaków,⁶ grzybów niższych,⁷ a nawet u człowieka.⁸

Wkrótce odkryto u zwierząt i mikroorganizmów wiele innych związków fosforoorganicznych pochodzenia naturalnego, posiadających dużą aktywność biologiczną. Można wśród nich znaleźć zarówno związki o właściwościach antybakteryjnych, antywirusowych, herbicydowych, przeciwgrzybiczych, przeciwnowotworowych i innych działających poprzez inhibicję enzymów.⁹

Oprócz wspomnianej już ciliatyny do naturalnych fosfonianów należą również jej biosyntetyczne prekursorzy: wyizolowany z *Zoanthus sociatus* – kwas 2-amino-3-fosfonopropionowy **2**¹⁰ oraz fosfonoacetaldehyd **3** – wyizolowany po raz pierwszy w trakcie badań nad biodegradacją ciliatyny przez *Bacillus cereus*.¹¹

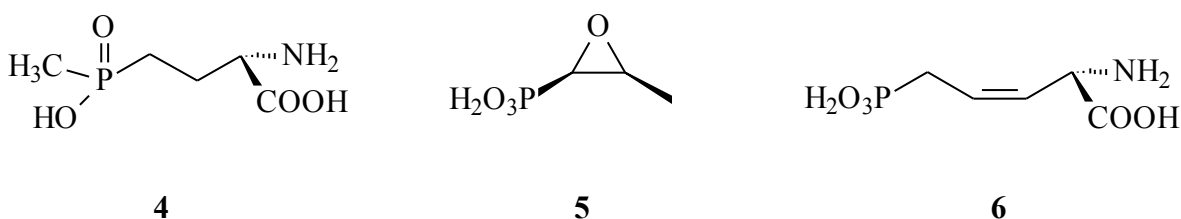


Rysunek 1. Ciliatina i jej biosyntetyczne prekursorzy.

Innym naturalnym fosfonianem, analogiem kwasu glutaminowego, jest L-fosfinotricyna **4**, która poprzez inhibicję syntetazy glutaminowej występującej w komórkach bakterii i roślin wykazuje aktywność antybakteryjną i herbicydową.¹² Wchodzi ona w skład trójpeptydu – bialafosu – otrzymywanego z promieniowców glebowych *Streptomyces viridochromogenes* i *Streptomyces hygroscopicus*.¹³

Bardzo ważnym antybiotykiem o szerokim zastosowaniu jest fosfomycyna **5** wyizolowana ze szczepów *Streptomyces fradiae* i *sp.*¹⁴ Jest ona inhibitorem transferazy pirogronianowej – enzymu biorącego udział w syntezie ściany komórkowej bakterii.¹⁵

Do antybiotyków pochodzenia naturalnego należą również fosfopепtydy zawierające w swojej cząsteczce kwas L-2-amino-5-fosfono-3-*cis*-pentenowy **6**: wyizolowana z komórek *Bacillus subtilis* rizoctycyna, wykazująca właściwości przeciwgrzybicze¹⁶ i produkowana przez *Streptomyces plumbeus* – plumbeomycyna.¹⁷

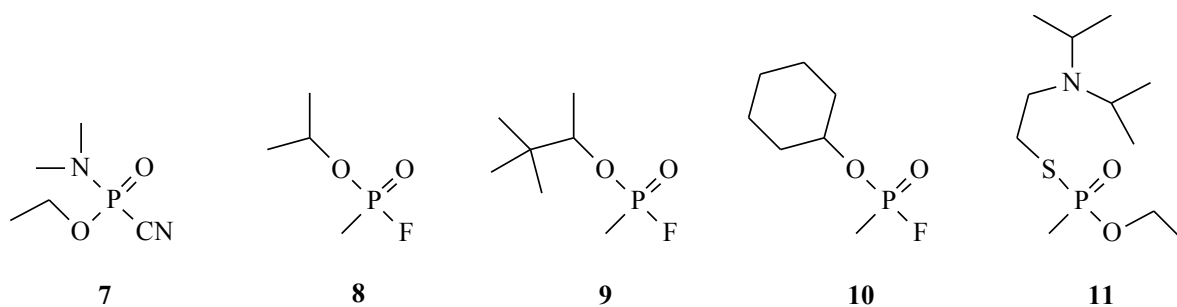


Rysunek 2. Naturalne antybiotyki.

2.1.2. Syntetyczne fosfoniany.

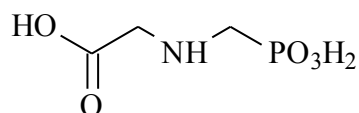
Pierwsze syntetyczne pochodne kwasu fosfonowego zostały otrzymane pod koniec XIX wieku, jednak dopiero odkrycie w roku 1905 reakcji Michaelis`a-Arbuzov`a umożliwiło syntezę fosfonianów na szeroką skalę.¹⁸ W latach 30-tych XX wieku po raz pierwszy w Niemczech otrzymano silnie toksyczne gazy bojowe z grupy paraliżująco – drgawkowych: tabun **7**, sarin **8**, soman **9** i cyklosarin **10**.¹⁹ Kolejnym gazem bojowym podrażniającym układ krwionośny i nerwowy jest VX **11** wyprodukowany po II wojnie światowej. Jest on przykładem jednego z najsilniejszych i inhibitorów acetylocholinoesterazy.²⁰ Produkcja, przechowywanie i używanie broni chemicznej została formalnie zabroniona na mocy

„Konwencji o zakazie broni chemicznej” (Chemical Weapons Convention), która weszła w życie w kwietniu 1997 roku.²¹



Rysunek 3. Gazy bojowe.

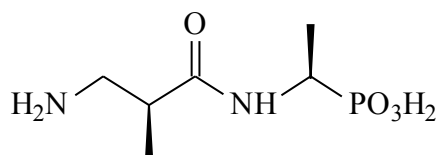
Jednym z bardziej znanych syntetycznych fosfonianów jest glifozot (*N*-fosfonometyloglicyna) **12**, aktywny składnik herbicydu Roundup, którego działanie, opiera się na inhibicji syntetazy EPSP.²²



12

Rysunek 4. Herbicyd.

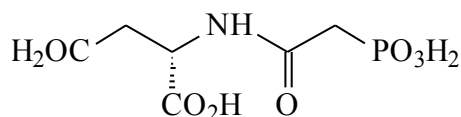
Innym znanym fosfonianem wykazującym aktywność antybakteryjną jest alafosfalina **13** hydrolizowana w komórkach bakterii przez aminopeptydazę do kwasu L-1-aminoetylofosfonowego, który jest inhibitorem racemazy alanylowej – kluczowego enzymu w biosyntezie peptydoglikanów.²³



13

Rysunek 5. Antybiotyk.

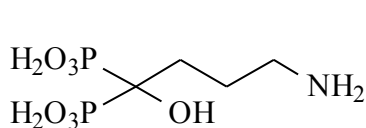
Aminofosfonianem, który dzięki swojej budowie wykazuje inhibicję transkarbamyazy asparaginowej jest kwas *N*-fosfonoacetylo-L-asparaginowy **14**. Poprzez zahamowanie biosyntezy pirymidyn blokuje on proliferację komórek, dzięki czemu wykazuje właściwości przeciwnowotworowe.²⁴



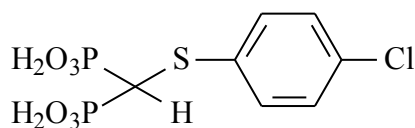
14

Rysunek 6. Kwas *N*-fosfonoacetylo-L-asparaginowy.

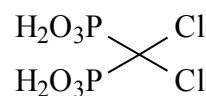
Warto również wspomnieć o związkach, których aktywność biologiczna nie opiera się na inhibicji enzymów. Należą do nich między innymi bisfosfoniany – analogi naturalnego pirofosforanu, które, między innymi, dzięki silnemu powinowactwu do wapnia tworzą bardzo stabilny kompleks z hydroksyapatytem kostnym i przeciwdziałają jego tworzeniu z amorficznego fosforanu wapnia. Dodatkowo, dzięki zahamowaniu działania osteoklastów, zapobiegają zanikaniu tkanki kostnej.²⁵ Bisfosfoniany od dawna wykorzystuje się w leczeniu osteoporozy i innych chorób kości.²⁶ Wśród zarejestrowanych leków znajdują się między innymi: alendronat **15**, tiludronat **16**, clodronat **17**, ibandronat **18**, etidronat **19** i pamidronat **20**.²⁷ Niedawno odkryto również ich działanie przeciwnowotworowe. Zapobiegają one proliferacji komórek rakowych oraz ich adhezji do kości.²⁸



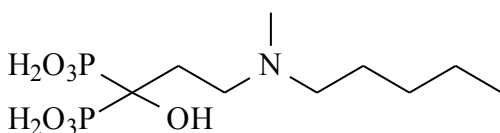
15



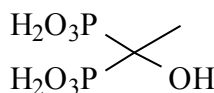
16



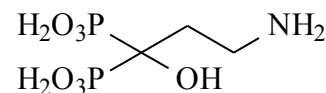
17



18



19



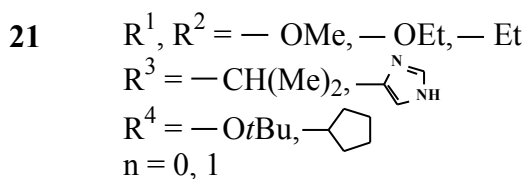
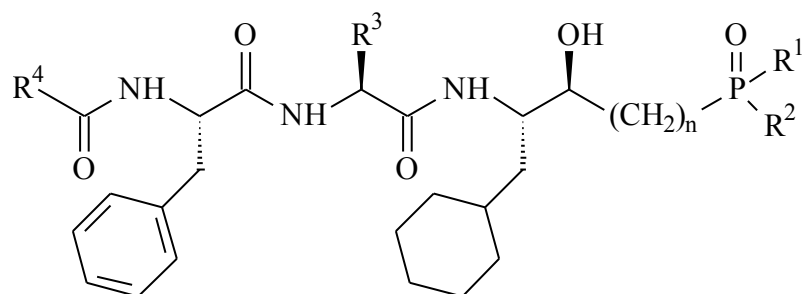
20

Rysunek 7. Bisfosfoniany.

Niektóre bisfosfoniany są stosowane jako inhibitory korozji i jako detergenty. Zastępują one wcześniej używane nieorganiczne fosforany ze względu na większą stabilność, mniejszą podatność na hydrolizę oraz zmiany pH i temperatury.²⁹

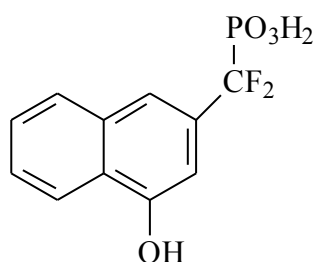
2.2. Hydroksyfosfoniany.

Bardzo interesującymi związkami należącymi do fosfonianów są hydroksyfosfoniany. Dzięki strukturalnemu podobieństwu do naturalnych hydroksykwasów wykazują inhibicję receptorów oddziaływających z tymi substratami.³⁰ Do tej grupy związków należą hydroksyfosfonopeptydy **21** – leki na nadciśnienie. Są one inhibitorami ludzkiej reniny, enzymu katalizującego przekształcenie angiotensynogenu do angiotensyny I, która jest substratem dla enzymu katalizującego jej konwersję do angiotensyny II – hormonu peptydowego podnoszącego ciśnienie tętnicze.^{31, 32}

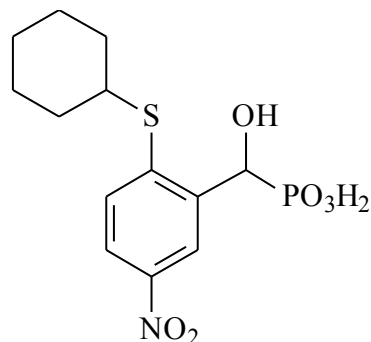


Rysunek 8. Inhibitory reniny.

W grupie tej można również znaleźć inhibitory – związek **22** – białkowej fosfatazy tyrozynowej (PTP), enzymu katalizującego odwracalną fosforolizę nukleozydów. Związki te mają szerokie zastosowanie farmakologiczne, między innymi jako immunosupresory stosowane w transplantacji, a także jako leki przeciwko malarii.³³ Wśród nich są również inhibitory – związek **23** – tyrozynowej fosfatazy CD-45 należącej do rodziny PTP. Enzym ten jest odpowiedzialny za regulację aktywacji komórek i proliferację komórek macierzystych krwi.³⁴



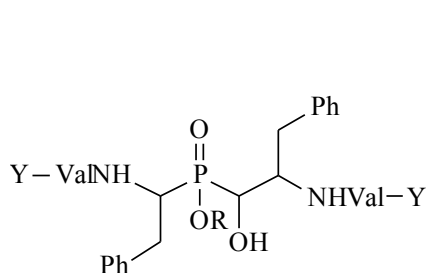
22



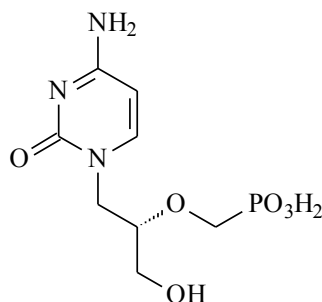
23

Rysunek 9. Inhibitory PTP.

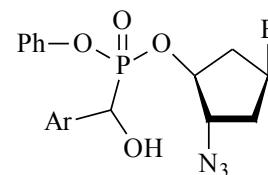
Hydroksyfosfoniany wykazują również wysoką aktywność przeciwwirusową. Przykładem mogą być inhibitory proteazy – związek **24**³⁵ i polimerazy DNA – cidofovir **25**³⁶ i potencjalne inhibitory odwrotnej transkryptyazy – związek **26**³⁷ – wirusa HIV. Cidofovir jest lekiem przeciwwirusowym od dawna stosowanym w medycynie przeciwko cytomegalowirusowi i ospie.³⁸



24 Y = Cbz, Nal
R = H, Et



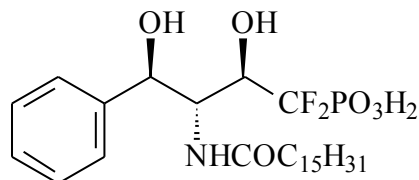
25



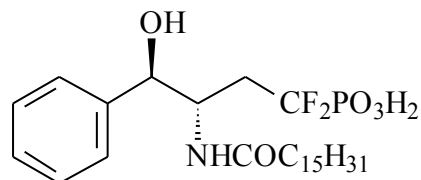
26

Rysunek 10. Inhibitory wirusa HIV.

Hydroksyfosfonowe analogi sfingomieliny **27** i **28** są inhibitorami sfingomielinazy – której metabolitem jest między innymi ceramid. Związek ten jest odpowiedzialny za wzrost i różnicowanie komórek, zahamowanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy.³⁹



27

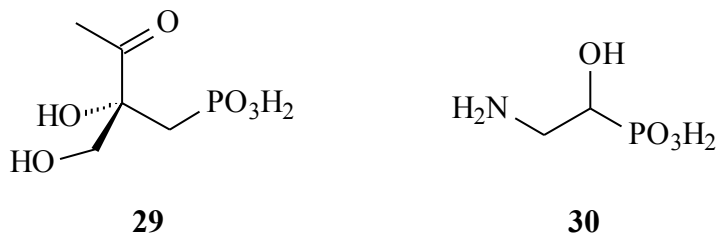


28

Rysunek 11. Inhibitory sfingomielinazy.

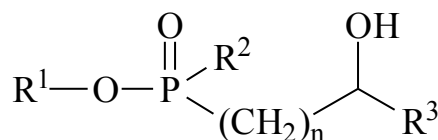
Niektóre z wspomnianych wcześniej bisfosfonianów – leków przeciwko osteoporozie, posiadają w swojej budowie grupę hydroksylową w pozycji α , jak związki: **15**, **18**, **19** i **20** (Rysunek 7). Grupa ta zwiększa powinowactwo bisfosfonianu do hydroksyapatytu.⁴⁰

Przedstawicielami naturalnych hydroksyfosfonianów są między innymi fosfonotriksyna **29**⁴¹ oraz kwas 1-hydroksy-2-aminoetylofosfonowy **30**.⁴²



Rysunek 12. Naturalne hydroksyfosfoniany.

Do hydroksyfosfonianów należą również związki zawierające w swojej cząsteczce dwa wiązania pomiędzy atomem fosforu i atomami węgla (C-P-C) – hydroksyfosfiniany.



$R^1, R^2, R^3 = \text{aryl, alkil}$
 $n = 0, 1, 2 \dots$

Rysunek 13. Hydroksyfosfiniany.

Swojej analogicznej strukturze do hydroksyfosfonianów z jednym wiązaniem P-C zawdzięczają podobną aktywność biologiczną. Są wśród nich zarówno opisane wcześniej inhibitory reniny **21** ($R^1 = -\text{OMe}$, $R^2 = -\text{Et}$, $R^3 = -\text{CH}(\text{Me})_2$, $R^4 = -\text{Cyclopentyl}$, $n = 0$) (Rysunek 8),³² jak i leki przeciwko AIDS **24** (Rysunek 10).³⁵

2.3. Metody syntezy optycznie czystych hydroksyfosfonianów.

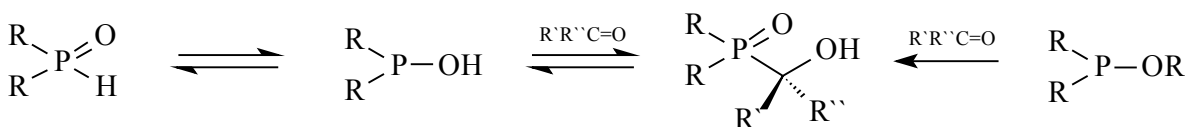
Aktywność biologiczna hydroksyfosfonianów, jak i innych związków zawierających centrum asymetrii, zależy od ich absolutnej konfiguracji. Przykładem mogą być inhibitory reniny. α -Hydroksyfosfono-peptyd **21** ($R^1 = -OEt$, $R^2 = -OEt$, $R^3 = -CH(Me)_2$, $R^4 = -OtBu$, $n = 0$) (Rysunek 8) o konfiguracji (*S*) na α atomie węgla wykazuje bardzo dobrą inhibicję ($IC_{50} = 29$ nM), w przeciwieństwie do izomeru (*R*) – $IC_{50} = 41000$ nM.³²

Istnieją dwie drogi otrzymywania optycznie czystych hydroksyfosfonianów: asymetryczna synteza oraz połączenie syntezy chemicznej i biokatalizy.

2.3.1. Asymetryczna synteza.

Główną metodą otrzymywania hydroksyfosfonianów jest wykorzystywana od dawna fosfonylacja związków karbonylowych (addycja fosfo-aldolowa). Reakcję tę można przeprowadzić na dwa sposoby:

- 1) poprzez addycję fosforynów trialkilowych do związków zawierających grupę karbonylową w obecności katalizatorów protonodonorowych (reakcja Abramova),⁴³
- 2) poprzez reakcję fosforynów dialkilowych ze związkami karbonylowymi w obecności katalizatora zasadowego (reakcja Pudovika).⁴⁴

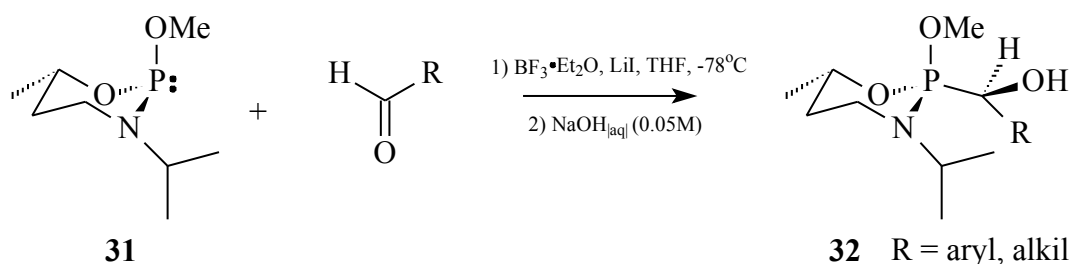


Schemat 1. Asymetryczne reakcje Pudovika i Abramova.

Do otrzymywania optycznie czystych hydroksyfosfonianów wykorzystywane są również inne metody. Między innymi enancjoselektywna redukcja ketofosfonianów oraz enancjoselektywne utlenianie wiązania podwójnego C=C lub karboanionów.

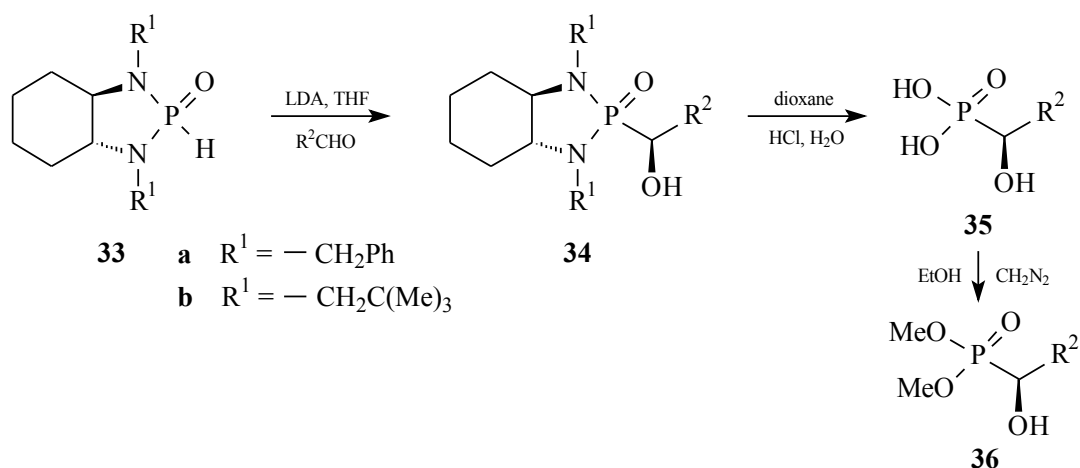
2.3.1.1. Addycja fosfo-aldolowa.

Chiralnym substratem w asymetrycznej addycji fosfo-aldolowej może być chiralny fosforyn (posiadający stereogeniczny atom fosforu) lub fosforyn otrzymywany z chiralnych alkoholi, amino-alkoholi lub amin. Przykładem takiej reakcji jest addycja chiralnego 1,3,2-oksazofosforynu otrzymanego z efedryny do aldehydu w obecności $BF_3 \cdot Et_2O$. W zależności od użytego aldehydu nadmiar diastereoizomeryczny sięgał 4 – 40%.⁴⁵



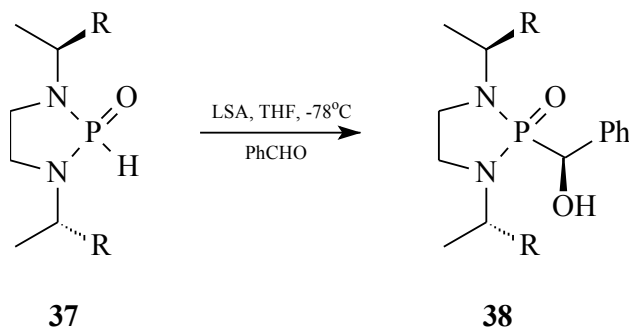
Schemat 2. Asymetryczna reakcja Abramova.

Innym przykładem jest wykorzystanie nieracemicznych diamidów kwasu fosfonowego w addycji fosfo-aldolowej. Spilling i współpracownicy zastosowali między innymi amidofosforyny **33** w reakcjach z różnymi aldehydami. Stereoselektywność tych reakcji zależała głównie od struktury grup alkilowych amidofosforyny **33**. Zdecydowanie lepszym reagentem fosfonylowym okazał się związek **33b**. Nadmiar diastereoizomeryczny związku **34b** sięgał 92% w reakcji **33b** z benzaldehydem w przeciwieństwie do powstającego **34a** w reakcji **33a** z tym samym aldehydem, gdzie stosunek diastereoizomerów wyniósł 1:1.⁴⁶



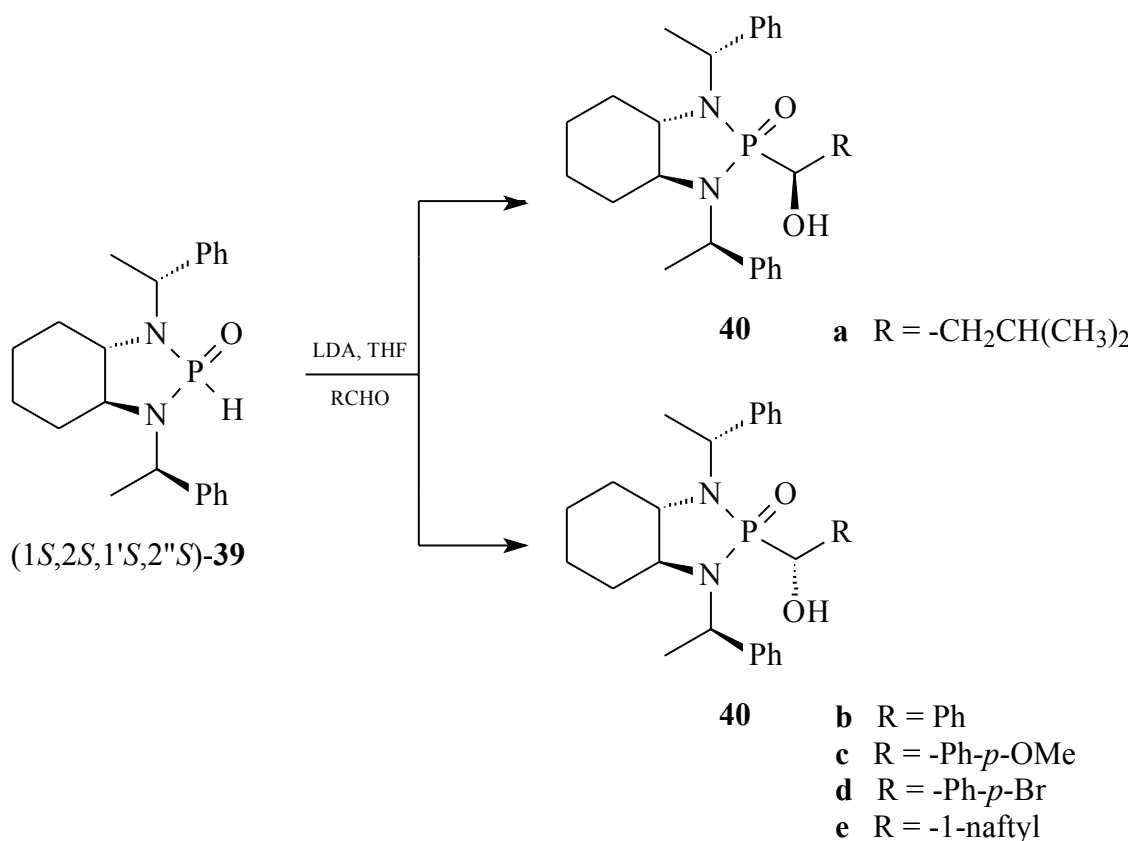
Schemat 3. Zastosowanie amidofosforynów w asymetrycznej syntezie α -hydroksyfosfonianów.

Inny amidofosforyn **37** zastosowali Kee i współpracownicy osiągając najlepsze rezultaty dla $\text{R} = 2\text{-BrC}_6\text{H}_4$ (de = 54%).⁴⁷



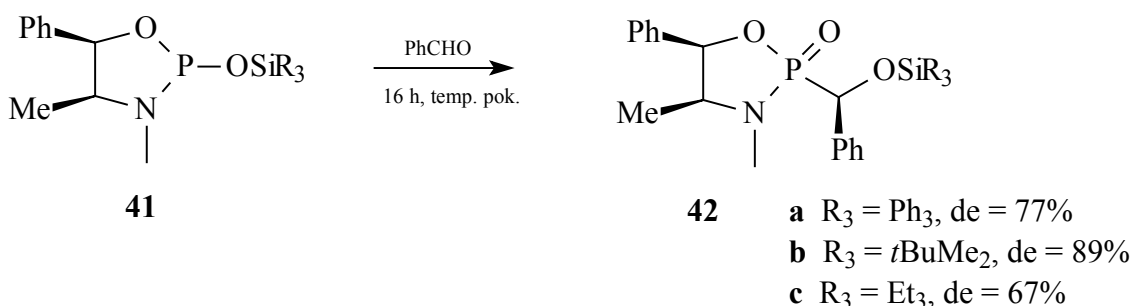
Schemat 4. Asymetryczna reakcja Pudovika z zastosowaniem fosforyny diamidowego.

Podobnie jak w poprzednich dwóch przypadkach de Parrodi i współpracownicy wykorzystali chiralne diamidy w reakcji Pudovika. Użyli oni dwóch izomerów ($1S,2S,1'S,2''S$) i ($1R,2R,1'S,2''S$) fosforynu **39**. Stosując oba izomery uzyskali oni α -hydroksyfosfoniany zarówno o konfiguracji R , jak i S na α atomie węgla (w zależności od użytego fosforynu i aldehydu). W reakcji p -bromoaldehydu z izomerem ($1S,2S,1'S,2''S$) otrzymali związek **40b** o konfiguracji R na α atomie węgla, a stosunek izomeru R do S wynosił 2.6:1. W reakcji tego samego aldehydu z izomerem ($1R,2R,1'S,2''S$) otrzymali związek o konfiguracji S na α atomie węgla (stosunek izomerów: 2.0:1).⁴⁸



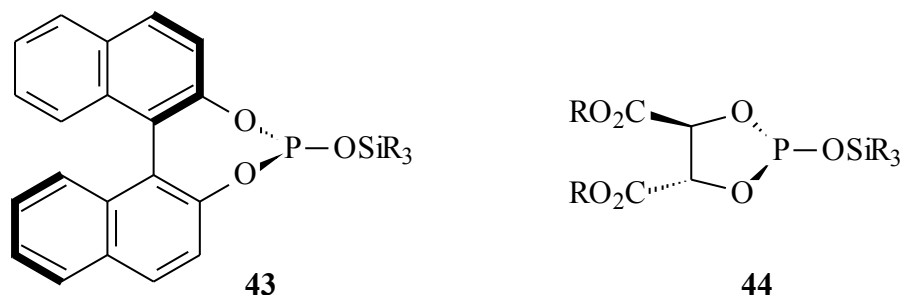
Schemat 5. Reakcja chiralnego amidofosforynu z aldehydami.

Kolejnym przykładem zastosowania chiralnych fosforynów w addycji fosfo-aldolowej jest użycie sililowych pochodnych fosforynów. Kee i współpracownicy otrzymali jeden z izomerów związku **42** z nadmiarem enancjomerycznym sięgającym 87% w zależności od grupy R.⁴⁹



Schemat 6. Zastosowanie chiralnego fosforynu otrzymanego z amino-alkoholi.

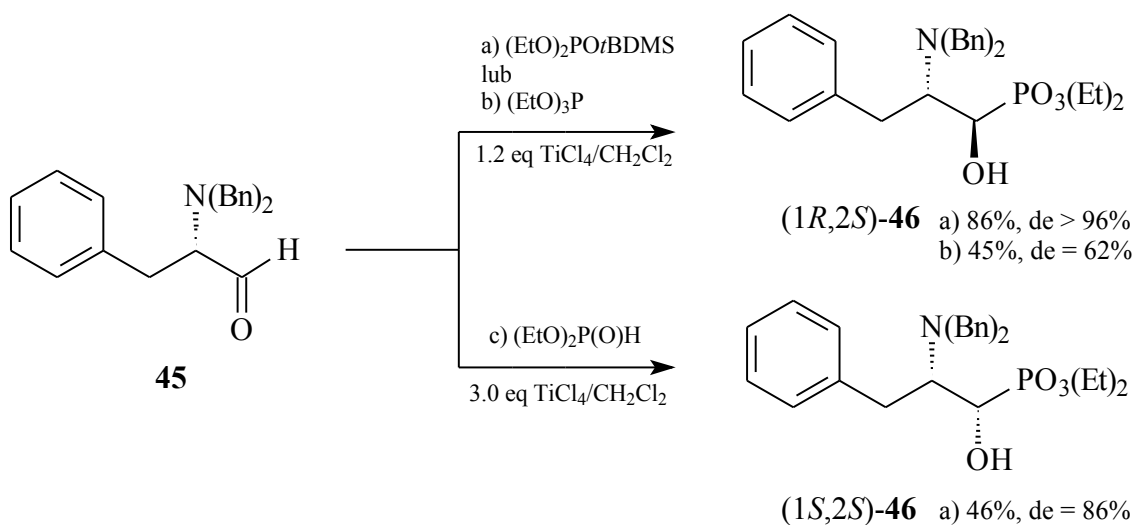
Również inne pochodne sililofosforynów **43**⁵⁰ i **44**⁵¹ (Rys. 14) były stosowane w reakcji z benzaldehydem, jednak z gorszym rezultatem.



Rysunek 14. Chiralne fosforyny powstałe z chiralnych alkoholi.

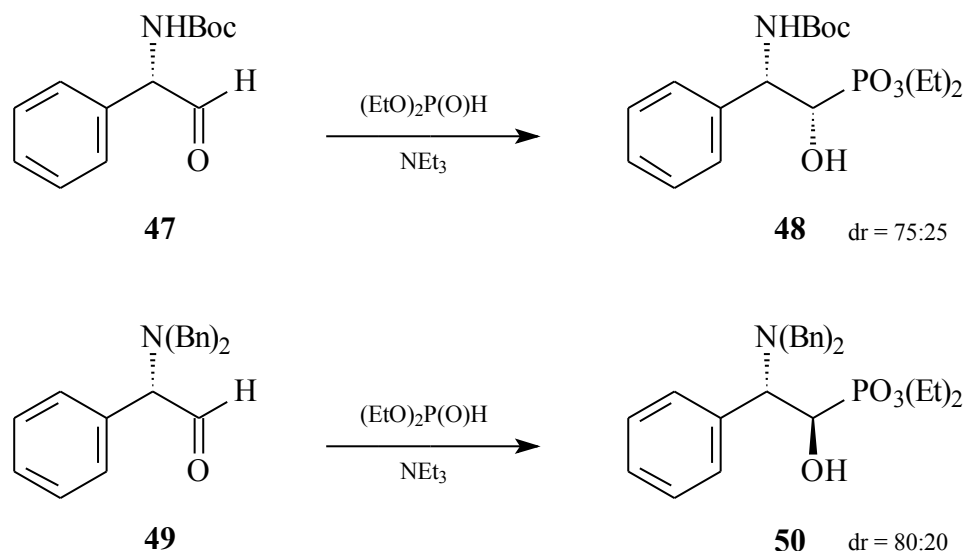
W addycji fosfo-aldolowej często jest stosowany chiralny aldehyd. Przykładem jest reakcja z użyciem aminoaldehydu z centrum stereogenicznym na α atomie węgla.

W zależności od sposobu przeprowadzenia addycji fosfo-aldolowej można sterować jej stereoselektywnością. W reakcji Abramova (*S*)-dibenzylamidoaldehydu **45** z fosforynem trietylowym w obecności TiCl_4 otrzymano głównie izomer (1*R*,2*S*)-**46**, podobnie jak w reakcji z sililofosforynem dietylowym, natomiast w reakcji Pudovika z fosforynem dietylowym otrzymano izomer (1*S*,2*S*)-**46**.⁵²



Schemat 7. Asymetryczne reakcje Abramova i Pudovika.

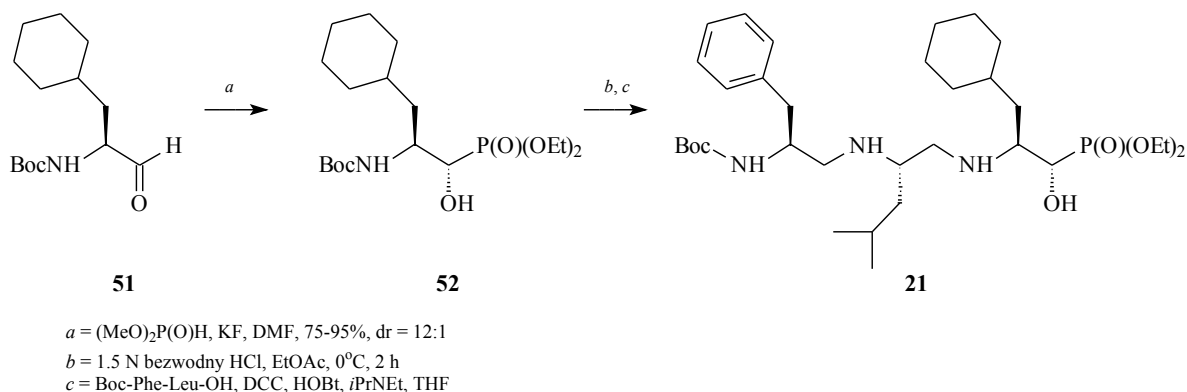
Stereoselektywność reakcji zależy również od podstawników na atomie azotu aminoaldehydów. Na przykład, addycja fosforynu dietylowego do aldehydu *N*-Boc-(*S*)-fenyloglicynowego **47** w obecności trietyloaminy daje (*1S,2S*)-1-hydroksy-2-aminofosfonian **48**,⁵³ natomiast reakcja prowadzona w takich samych warunkach z aldehydem (*S*)-*N,N*-dibenzylfenyloglicynowym **49** daje izomer (*1R,2S*) **50**.⁵⁴



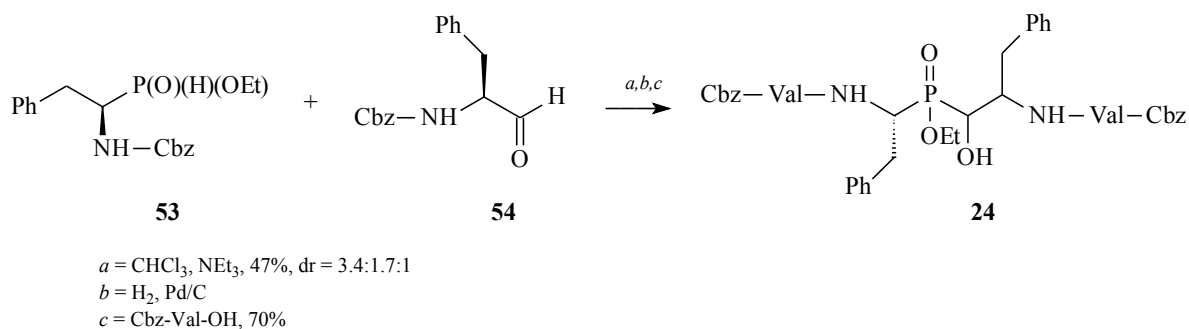
Schemat 8. Zmiana enancjoselektywności addycji fosfo-aldolowej.

Inne pochodne aldehydu *N*-Boc-(*S*)-glicynowego zastosowali również Larchevêque i Pousset⁵⁵ oraz Kafarski i współpracownicy⁵⁶ otrzymując (*1S,2S*)-1-hydroksy-2-aminofosfoniany.

Asymetryczna synteza z wykorzystaniem chiralnych aminoaldehydów została wykorzystana do otrzymania ważnych biologicznie aktywnych związków takich jak: inhibitory reniny **21**⁵⁷ czy inhibitory proteazy HIV **24**.³⁵



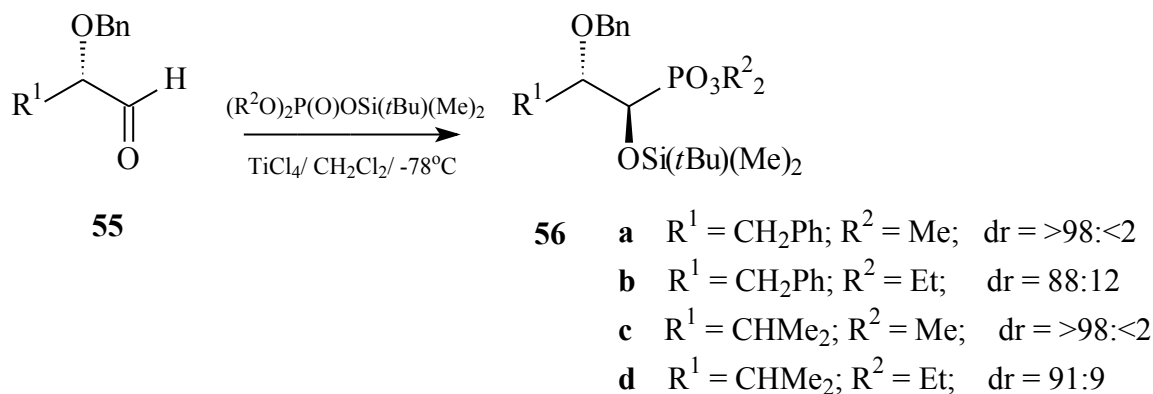
Schemat 9. Synteza inhibitorów reniny.



Schemat 10. Synteza inhibitorów proteazy HIV.

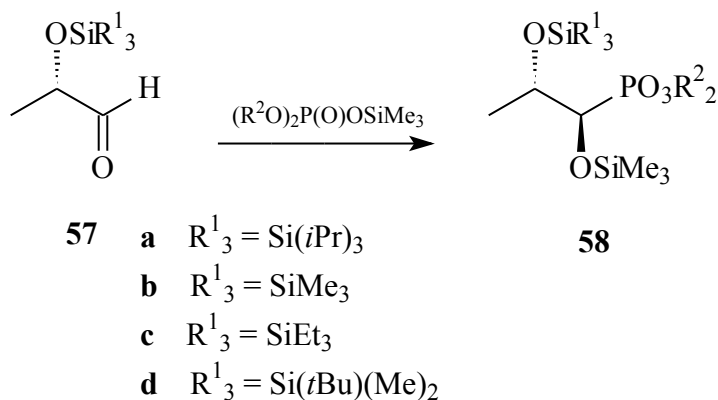
Oprócz aminoaldehydów w asymetrycznej syntezie stosowane są również chiralne pochodne hydroksyaldehydów.

α -Benzyloksyaldehydy **55** zastosował Shibuya w reakcji z *tert*-butyloдимetylosililofosforanami, otrzymując izomery (1*R*,2*S*) **56** z dobrymi rozdzielaniami diastereoizomerycznymi.⁵⁸



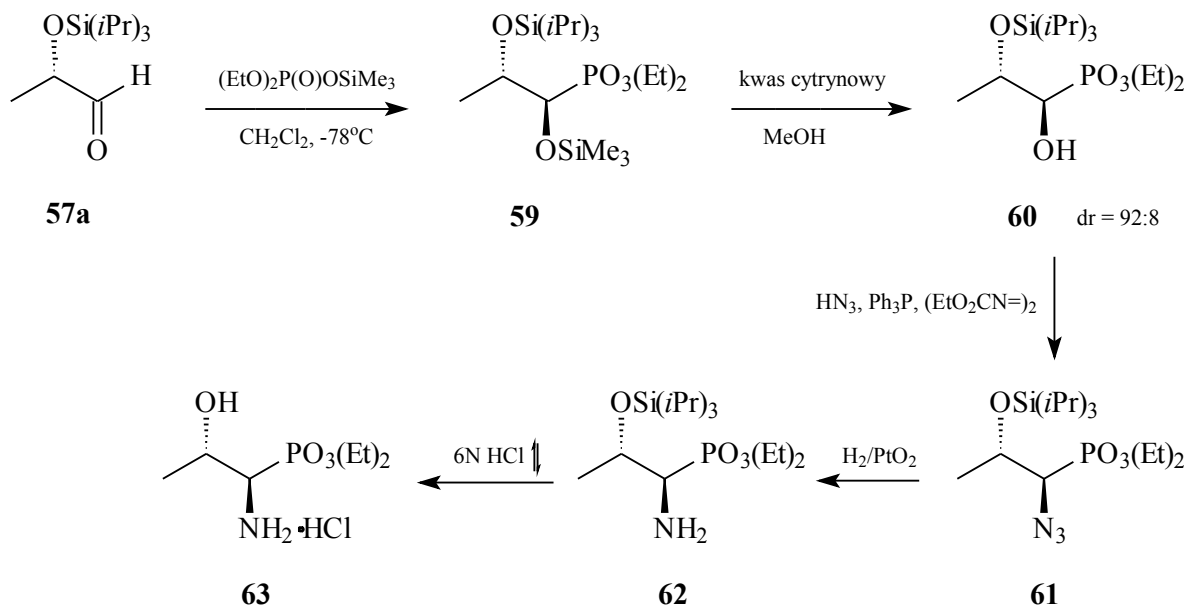
Schemat 11. Zastosowanie asymetrycznych pochodnych hydroksyaldehydów.

Podobną reakcję przeprowadzili Bongini i współpracownicy z zastosowaniem sililowych pochodnych hydroksyaldehydu **57**, otrzymując największy nadmiar diastereoizomeryczny dla tri-*izo*-propylosililowej pochodnej **57a** w reakcji z trimetylosililofosforanem dietylowym (92:8).⁵⁹

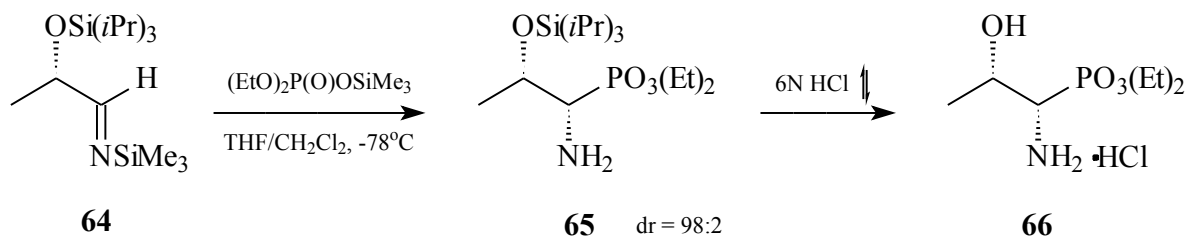


Schemat 12. Sililowe pochodne hydroksyaldehydów.

Powyższa reakcja z użyciem aldehydu **57a** została wykorzystana do otrzymania chlorowodoru (1*R*,2*S*)-fosfonotreoniny **63** (Schemat 13), a gdy zastosowany został izomer *R* aldehydu, otrzymano chlorowoderek (1*S*,2*R*)-fosfonotreoniny. Natomiast izomery (1*S*,2*S*) **66** i (1*R*,2*R*) zostały otrzymane na drodze addycji fosfo-aldolowej trimetylosililofosforynem dietylowym do *N*-trimetylosililo-(*S*)-laktoaldehydu **64** (i jego *R* enancjomeru) z dobrą wydajnością i czystością izomeryczną (Schemat 14).⁶⁰

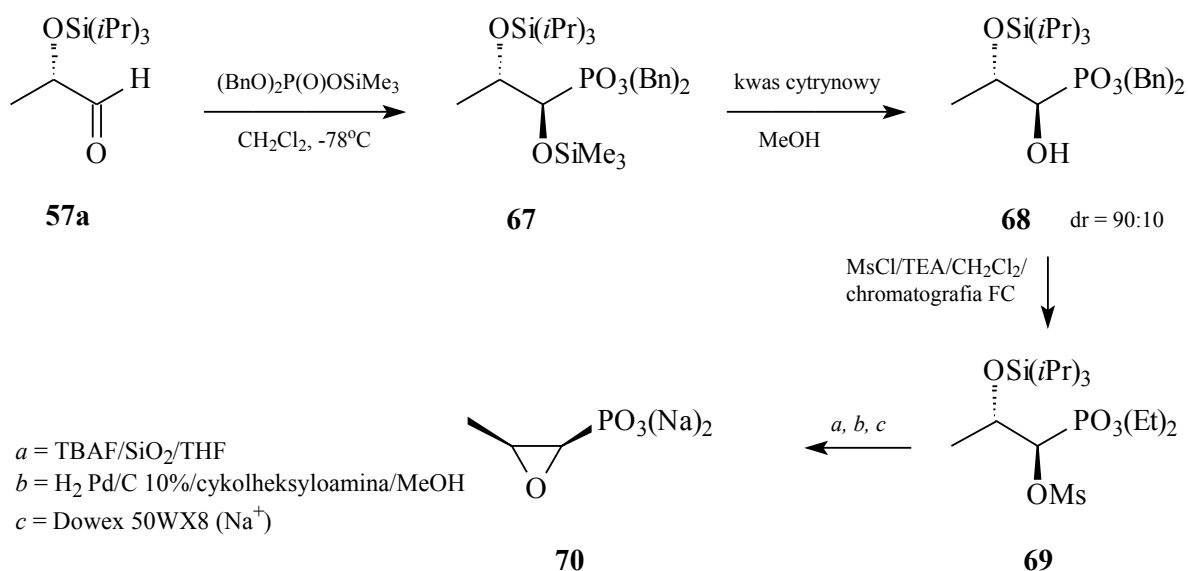


Schemat 13. Synteza chlorowodoru (1*R*,2*S*)-fosfonotreoniny.



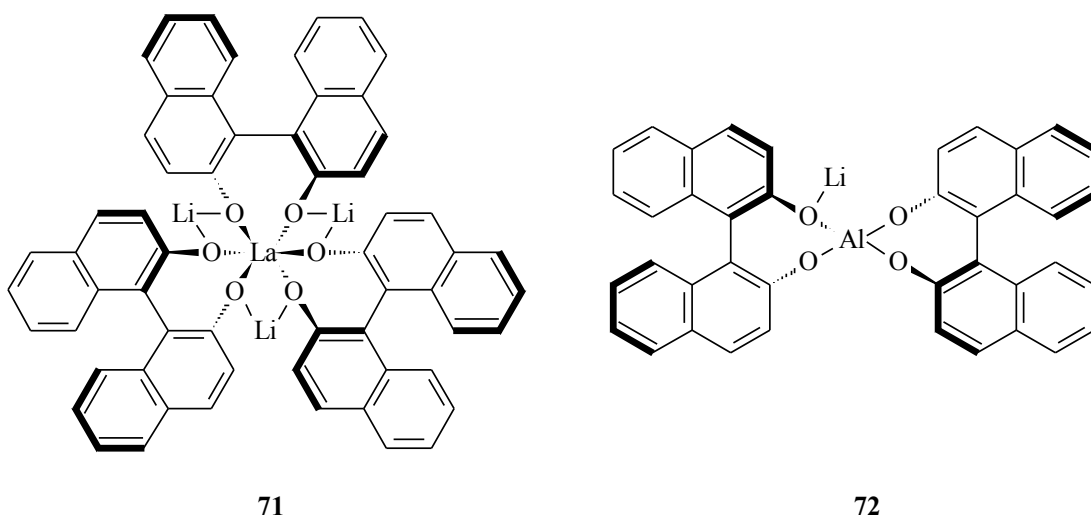
Schemat 14. Synteza chlorowodoru (1*S*,2*S*)-fosfonotreoniny.

Reakcja przedstawiona na schemacie 12 została wykorzystana do otrzymania soli sodowej (1*R*,2*S*) fosfomycyny **70** (Schemat 15) – syntetycznego odpowiednika naturalnego antybiotyku **5** (Rysunek 2).⁶¹



Schemat 15. Synteza soli sodowej fosfomycyny.

Innym rodzajem asymetrycznej syntezy hydroksyfosfonianów jest addycja fosfo-aldolowa z zastosowaniem chiralnych katalizatorów. Ich przykładem mogą być chiralne kompleksy BINOL-u z metalami (Rysunek 15).

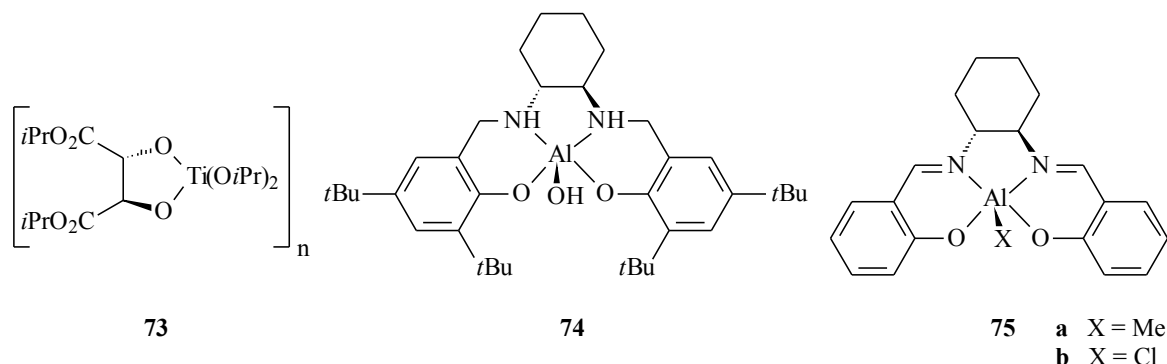


Rysunek 15. Chiralne kompleksy BINOL-u.

Shibasaki i współpracownicy w reakcji fosforinów dimetylowych z aldehydami zastosowali katalizatory (*R*)-LLB **71**⁶² i (*R*)-ALB **72**,⁶³ otrzymując α -hydroksyfosfoniany z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi sięgającymi 95%. Natomiast najlepszym katalizatorem do otrzymania α -hydroksy-*H*-fosfinianów i α, α' -dihydroksyfosfinianów okazał się kompleks (*R*)-ALB **72**.⁶⁴

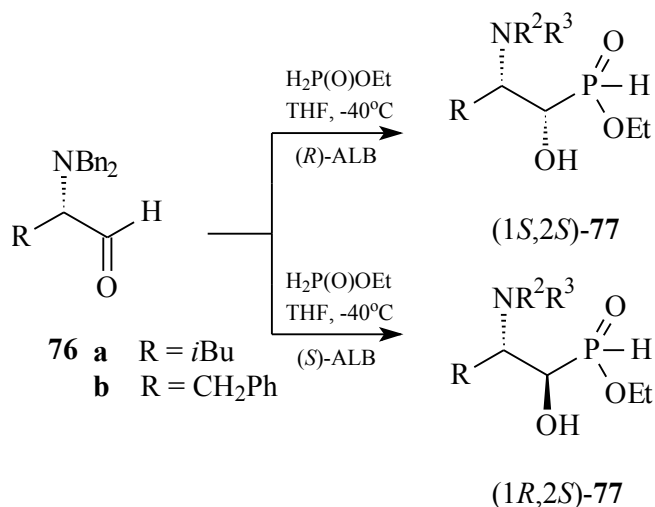
Shibuya i współpracownicy zastosowali między innymi katalizator **73**, otrzymując α -hydroksyfosfoniany z niską enancjoselektywnością (ee ~ 53%).⁶⁵

Kee i współpracownicy otrzymali α -hydroksyfosfoniany o konfiguracji absolutnej (*S*) na α atomie węgla w reakcji fosforynów z *p*-podstawionymi benzaldehydami, katalizowanej przez kompleks **74**,⁶⁶ natomiast enancjomery (*R*), stosując kompleks **75**.⁶⁷



Rysunek 16. Inne chiralne katalizatory.

Dużo lepsze rezultaty osiągnęli Shibuya i współpracownicy stosując w addycji fosfoaldehydowej zarówno chiralny aldehyd jak i chiralny katalizator. Gdy katalizatorem był kompleks (*R*)-ALB **72**, otrzymali główny produkt (*1S,2S*)- β -amino- α -hydroksy-*H*-fosfiniany (**77a** dr = 94:6; **77b** dr = 87:13), natomiast, gdy zastosowali kompleks (*S*)-ALB, otrzymali izomery (*1R,2S*) (**77a** dr = 98:2; **77b** dr = 94:6).⁶⁸



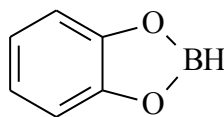
Schemat 16. Asymetryczna fosfonylacja z udziałem chiralnego substratu i chiralnego katalizatora.

2.3.1.2. Redukcja.

Redukcja ketofosfonianów jest jedną z najprostszych metod otrzymywania chiralnych hydroksyfosfonianów. Można ją przeprowadzić, używając chiralnych substratów lub katalizatorów.

Ordóñez i współpracownicy przeprowadzili redukcję chiralnych (*S*)- β -ketofosfonianów **79** do (*2R,3S*)- β -hydroksyfosfonianów **80** (Schemat 17) w obecności różnych reduktorów:

katecholoboranu (CB) **78** (Rysunek 17) oraz borowodorków sodu, litu i cynku, otrzymując najlepsze rezultaty, gdy katalizatorem był katecholoboran (dr >98:2).⁶⁹

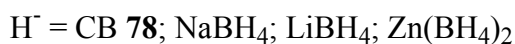
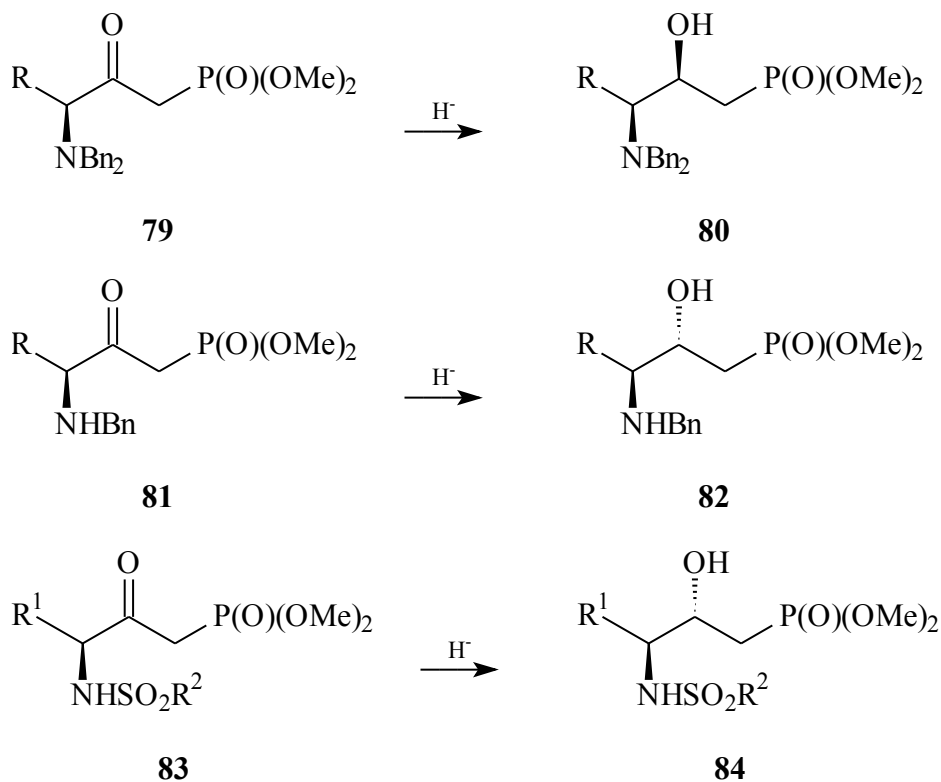


78

Rysunek 17. Katecholoboran.

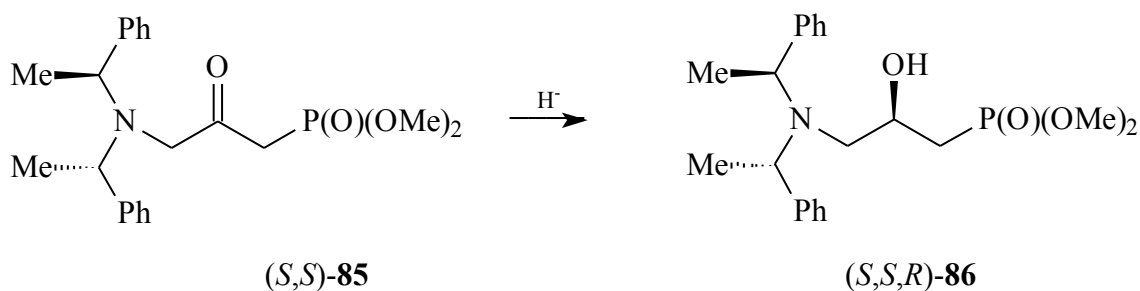
Również dobre rezultaty osiągnęli stosując borowodorek cynku w redukcji β -ketofosfonianów **81** otrzymując (2*S*,3*S*)- β -hydroksyfosfoniany **82**.⁷⁰

Inne pochodne γ -amino- β -ketofosfonianów **83** okazały się gorszymi substratami asymetrycznej syntezy, gdyż rozdział diastereoizomeryczny nie przekraczał 81:19.⁷¹



Schemat 17. Redukcja chiralnych ketofosfonianów.

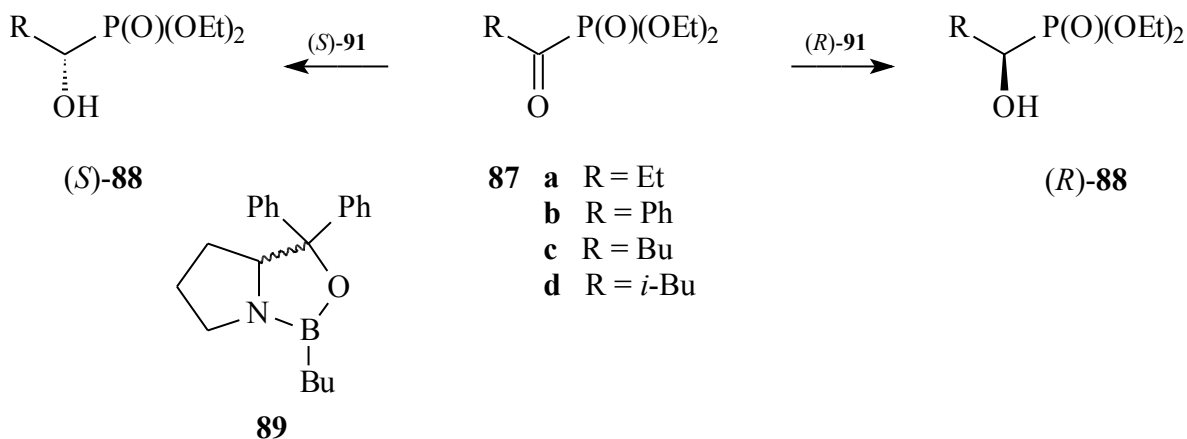
Ordóñez i współpracownicy zastosowali również chiralne aminoketofosfoniany z dwoma centrami stereogenicznymi **85**. Najlepsze rezultaty otrzymali, stosując katalizator CB **78** z dodatkiem LiClO_4 , otrzymując α -hydroksyfosfoniany **86** z konfiguracją zarówno (*S*) jak i (*R*) na α atomie węgla w zależności od użytego ketofosfonianu **85**.⁷²



$H^- = \text{CB } \mathbf{78}; \text{NaBH}_4; \text{LiBH}_4; \text{Zn}(\text{BH}_4)_2$

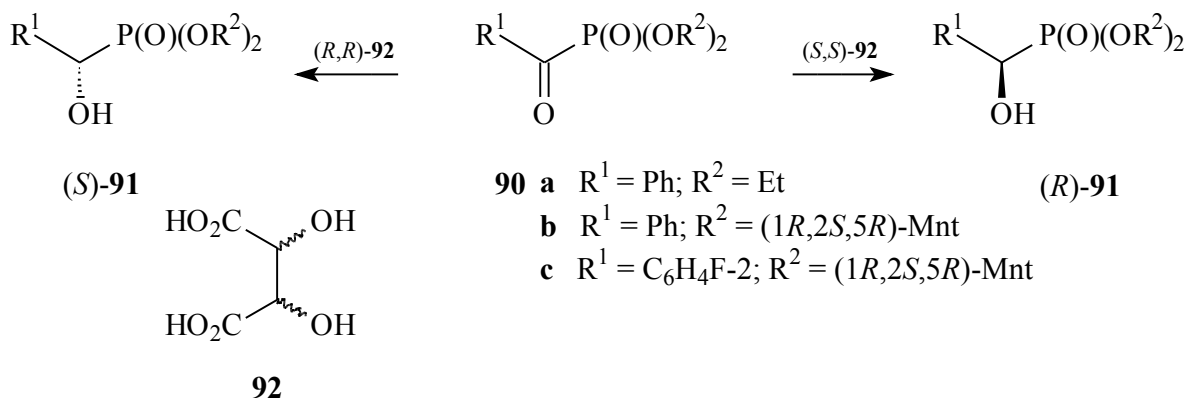
Schemat 18. Redukcja chiralnych ketofosfonianów z dwoma centrami asymetrii.

W wyniku redukcji α -ketofosfonianów **87** boranem w obecności chiralnego katalizatora **89** zostały zsyntetyzowane oba enancjomery α -hydroksyfosfonianów **88** z dobrą wydajnością i stereoselektywnością (53 – 83%).⁷³



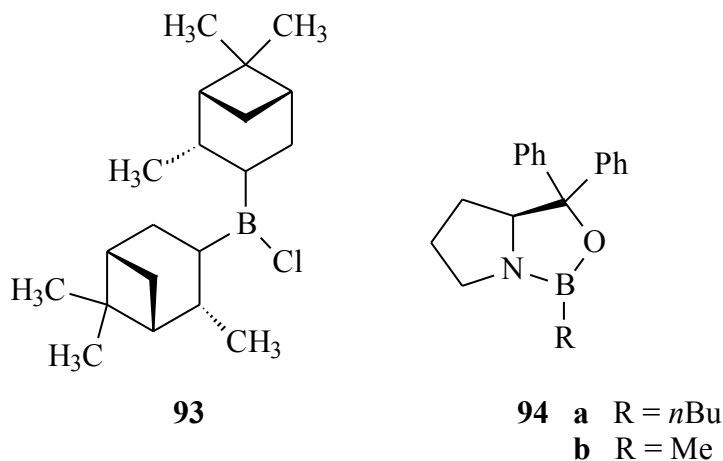
Schemat 19. Zastosowanie chiralnego katalizatora.

Innym chiralnym katalizatorem jest kompleks wodoroboranu sodu z naturalnym kwasem L(+)-winowym (*R,R*)-**92**. Reakcja syntezy α -hydroksyfosfonianów w obecności tego katalizatora zaszła z dobrym nadmiarem izomerycznym sięgającym 93% i w jej wyniku otrzymano izomer o konfiguracji (*S*) na α atomie węgla **91**.⁷⁴ Gdy użyta została (*S,S*) forma tego kwasu, to głównym produktem był izomer (*R*)-**91**.⁷⁵



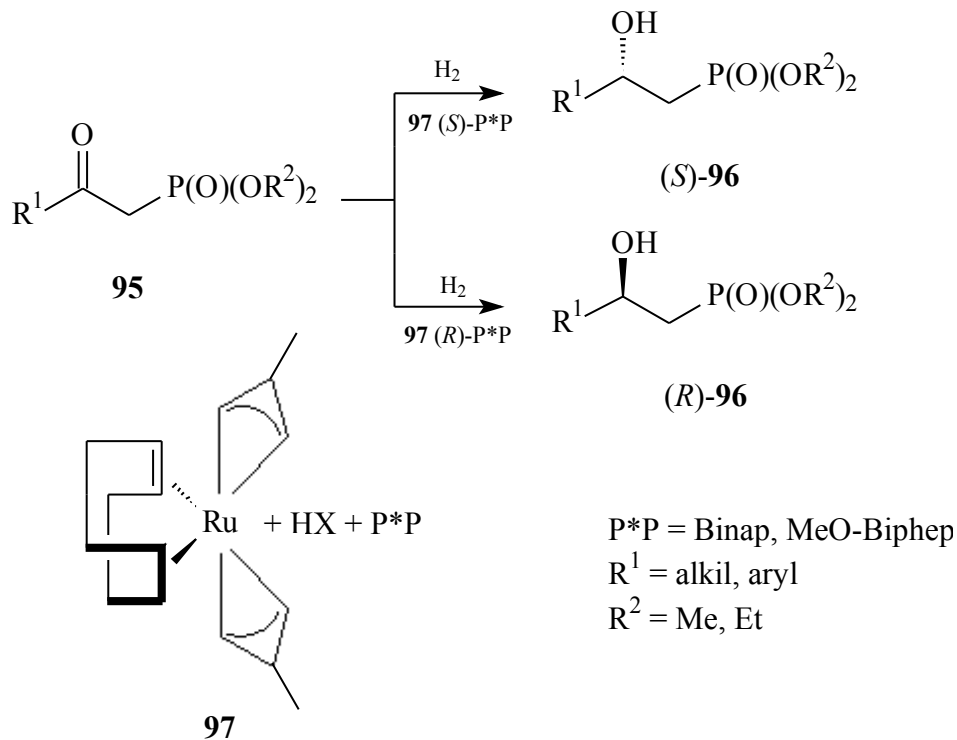
Schemat 20. Chiralny katalizator z dwoma centrami asymetrii.

Związki **91b** i **c** były już wcześniej syntetyzowane tą samą drogą, ale bez użycia chiralnego kompleksu, katalizatorem był wodoroboran sodu, a rozdział izomerów wynosił tylko 3:1.⁷⁶ Asymetryczna redukcja α -ketofosfonianów za pomocą chiralnych katalizatorów **93** i **94a** przebiegła z niską enancjoselektywnością nie przekraczającą 67%, a głównym produktem był enancjomer (*S*). Dużo lepsze rezultaty dało użycie niechiralnego CB **78**, oraz mieszaniny CB i chiralnego katalizatora **94a** (ee = 55 – 99%).^{77, 78, 79}



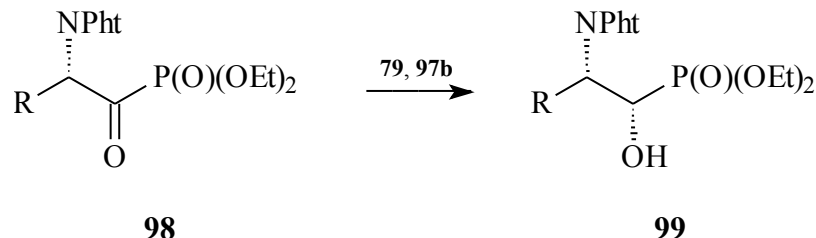
Rysunek 18. Inne chiralne katalizatory.

Bardzo dobrym chiralnym katalizatorem okazał się również kompleks rutenu **97**. W reakcji redukcji β -ketofosfonianów **95** w obecności tego katalizatora otrzymano β -hydroksyfosfoniany **96** (70 – 100%, ee = 90 – 99%).⁸⁰



Schemat 21. Chiralny kompleks rutenu.

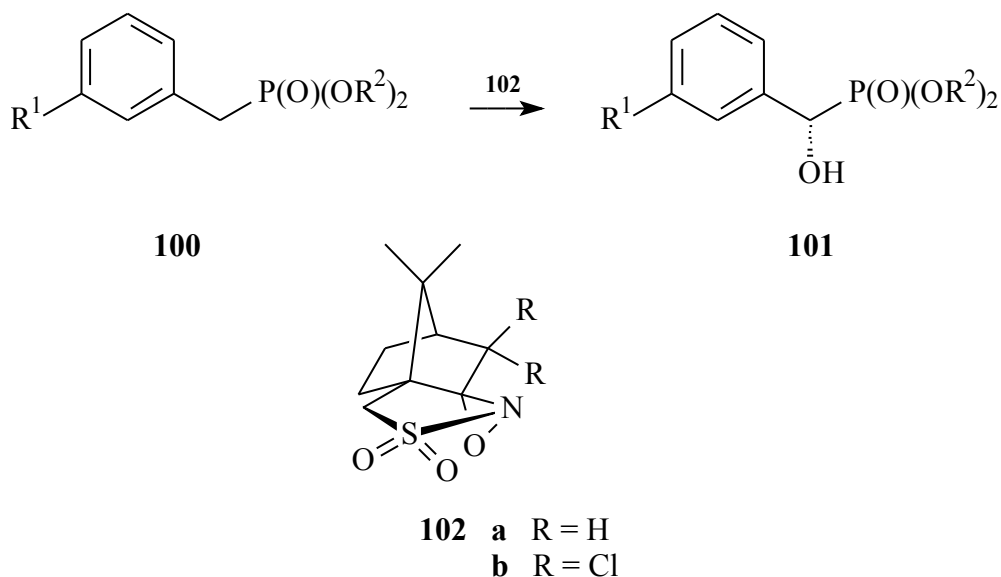
Najlepsze rezultaty osiągnięto, stosując zarówno chiralne ketony jak i chiralne katalizatory. Pollini i współpracownicy zastosowali mieszaninę CB **78** i chiralnego katalizatora **94b** w redukcji aminoketofosfonianu **98**, otrzymując tylko jeden izomer α -hydroksyfosfonianów **99** z bardzo dobrą wydajnością 63 – 77%.⁸¹



Schemat 22. Asymetryczna redukcja z udziałem chiralnego substratu i chiralnego katalizatora.

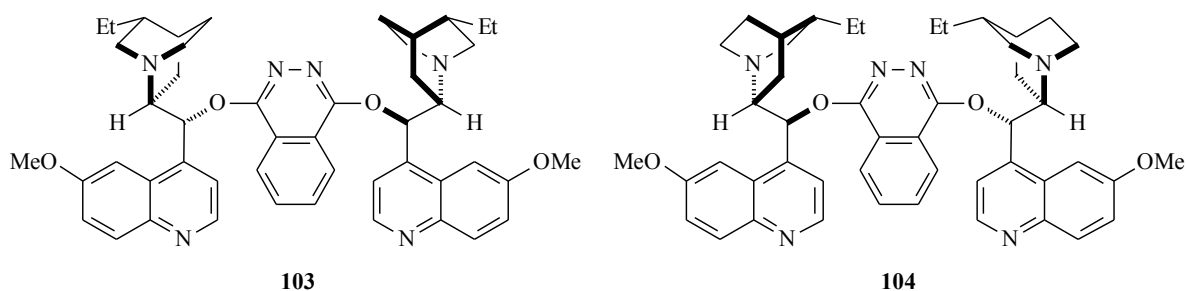
2.3.1.3. Utlenianie.

Reakcji utleniania może ulegać wiązanie podwójne lub karboanion. W obydwu przypadkach stosuje się chiralne katalizatory. Przykładem chiralnych katalizatorów użytych do hydroksylacji benzylofosfonianów **100** są związki **102a** i **b**. Utlenianie tych fosfonianów zaszło z bardzo dobrą enancjoselektywnością, gdy reagentem był związek **102b** w obecności NaHMDS (92 – 98%).^{82, 83}



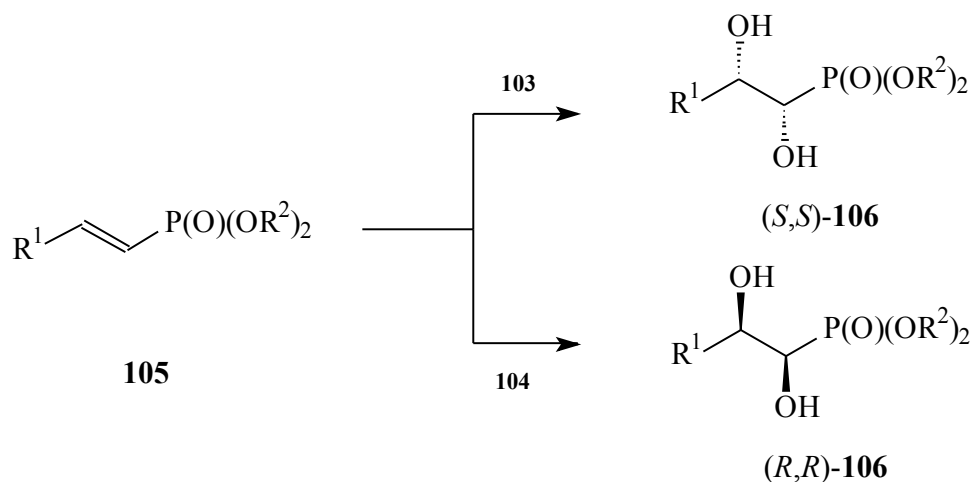
Schemat 23. Utlenianie karboanionów.

Jednymi z najczęściej używanych katalizatorów w reakcji asymetrycznej dihydroksylacji (AD) są komercyjnie dostępne AD-mix- α lub β , w których skład wchodzi między innymi ligandy: (DHQ)₂PHAL **103** lub (DHQD)₂PHAL **104**.⁸⁴



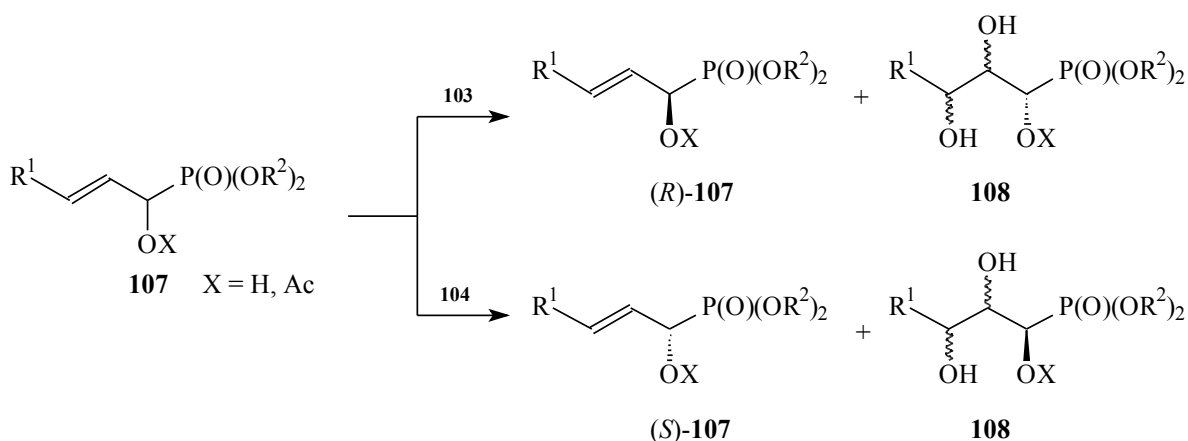
Rysunek 19. AD-mix- α i AD-mix- β

Shibuya i współpracownicy wykorzystali te katalizatory w reakcji dihydroksylacji wiązania podwójnego fosfonianów **105**, otrzymując izomer (1*S*,2*S*)-**106**, gdy użyty był AD-mix- α oraz izomer (1*R*,2*R*)-**106** w obecności AD-mix- β , z dobrymi nadmiarami diastereoizomerycznymi (najczęściej powyżej 90%).^{85, 86}



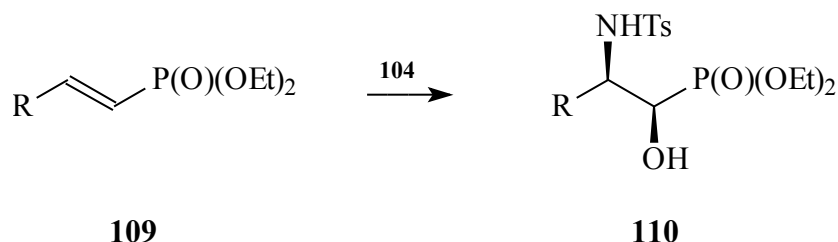
Schemat 24. Asymetryczna dihydroksylacja z udziałem chiralnych katalizatorów.

Gdy reakcja asymetrycznej dihydroksylacji przeprowadzana jest na związkach posiadających w pozycji α tlenową grupę funkcyjną, to następuje rozdział kinetyczny enancjomerów i tylko jeden z nich jest utleniany. Przykładem jest rozdział kinetyczny mieszaniny enancjomerów fosfonianów **107**.⁸⁷



Schemat 25. Rozdział kinetyczny za pomocą asymetrycznej dihydroksylacji (AD).

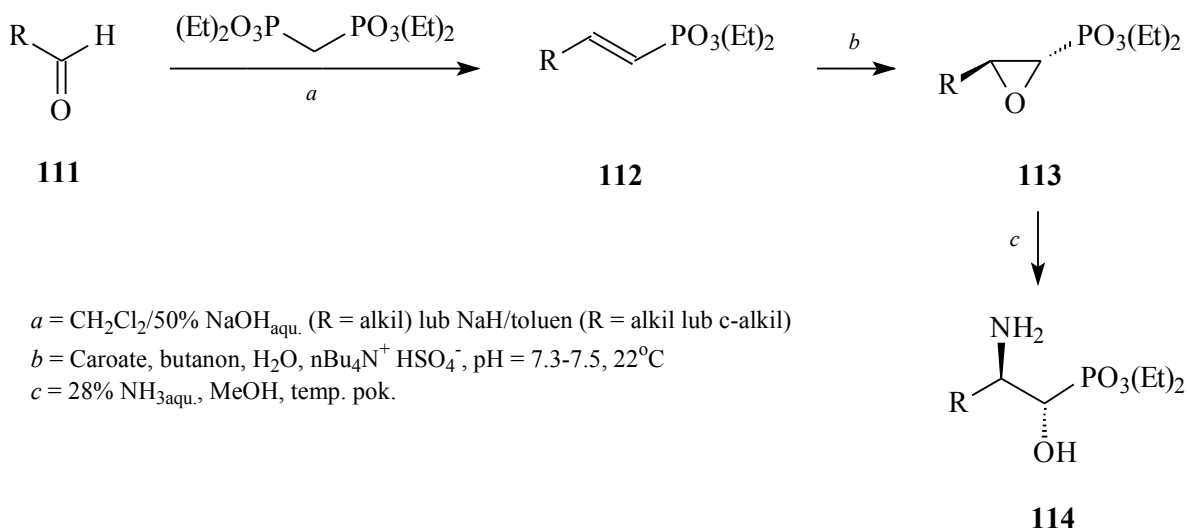
Innym rodzajem utleniania wiązania podwójnego, w którym również używane są asymetryczne induktory (DHQ)₂PHAL **103** i (DHQD)₂PHAL **104**, jest asymetryczna aminohydroksylacja (AA). Reakcję tę, z udziałem mieszaniny składającej się ze: związku **104**, dwuwodnego osmianu potasu, uwodnionej chloraminy-T, rozpuszczonych w mieszaninie alkoholu *t*-butylowego i wody (1:1), przeprowadzili Palmisano i współpracownicy otrzymując β-amino-α-hydroksyfosfoniany **110** z nadmiarem diastereoizomerycznym zależnym od użytego fosfonianu **109**.⁸⁸



Schemat 26. Asymetryczna aminohydroksylacja.

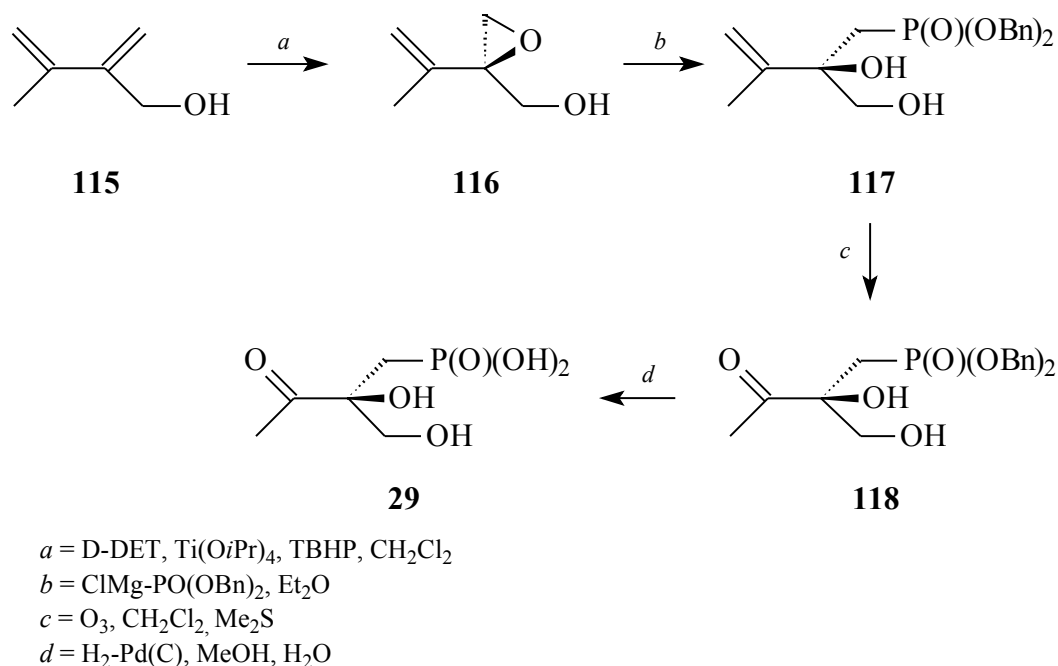
Utlenianie wiązania podwójnego może również prowadzić do otrzymania epoksydów, które następnie są przekształcane do dihydroksyfosfonianów lub aminohydroksyfosfonianów.

Cristau i współpracownicy przeprowadzili syntezę amino-hydroksyfosfonianów **114** na drodze przedstawionej na schemacie 27 z bardzo wysokim nadmiarem diastereoizomerycznym wynoszącym w większości przypadków 100:0, otrzymując głównie diastereoizomer (1*S*,2*R*)-**114** (tylko w jednym przypadku gdy R = -Ph-*o*-OMe powstał głównie diastereoizomer (1*R*,2*S*)).⁸⁹



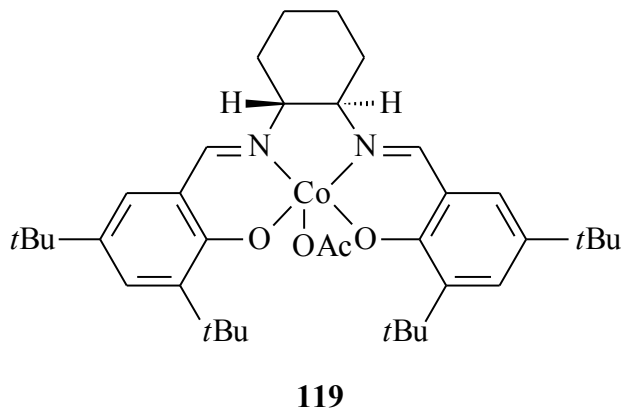
Schemat 27. Asymetryczna epoksydacja.

Asymetryczna epoksydacja wiązania podwójnego została wykorzystana między innymi do syntezy fosfonotriksyny **29** – naturalnego herbicydu.⁹⁰



Schemat 28. Synteza fosfonotriksyny.

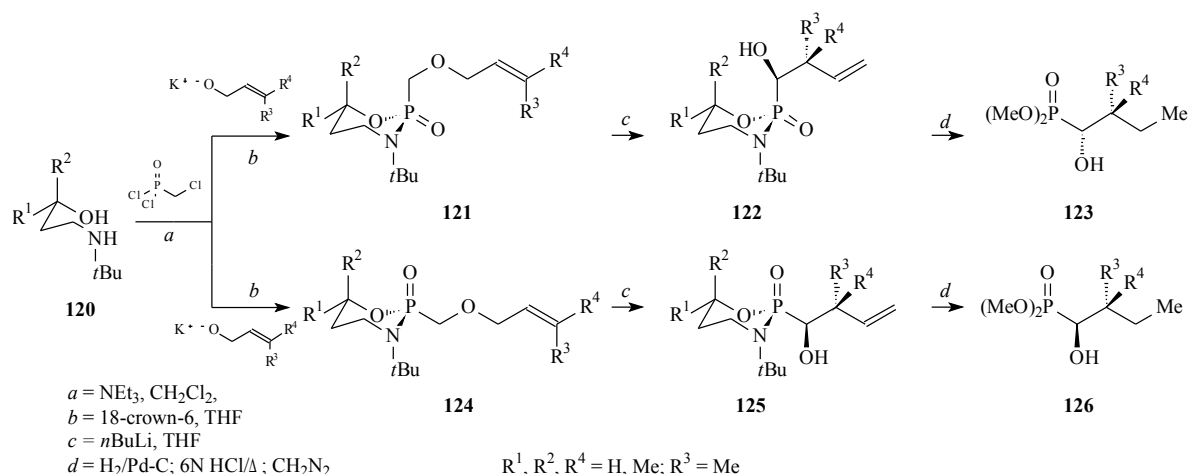
Inną metodą otrzymywania optycznie czystych hydroksyfosfonianów jest epoksydacja wiązania podwójnego, a następnie przeprowadzenie rozdziału kinetycznego mieszaniny racemicznej epoksyfosfonianów za pomocą hydrolizy wiązania epoksydowego jednego z enancjomerów z udziałem chiralnego katalizatora **119**.^{91, 92}



Rysunek 20. Chiralny katalizator rozdziału kinetycznego epoksyfosfonianów.

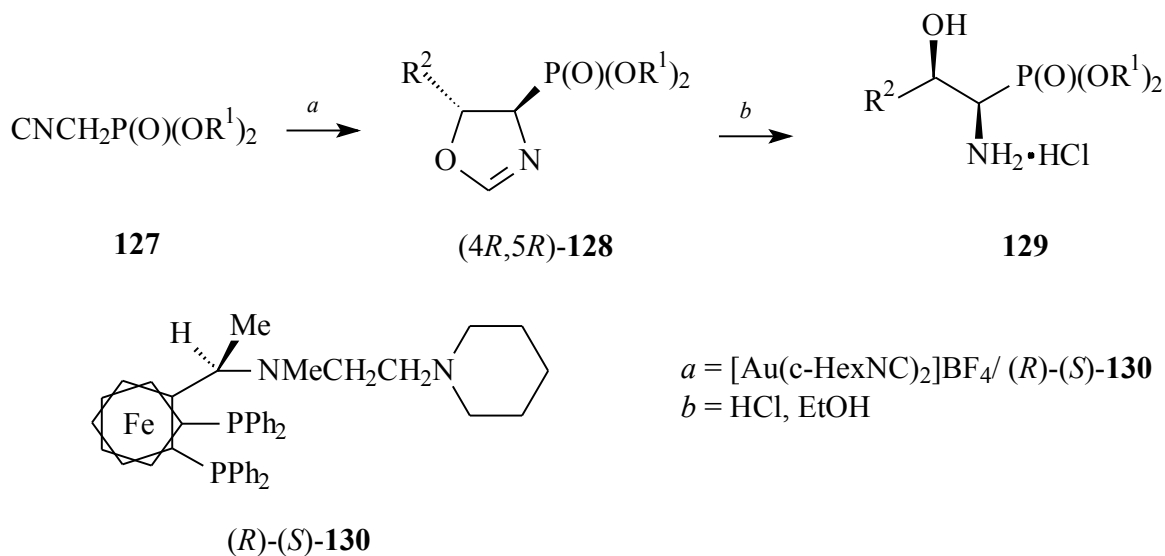
2.3.1.4. Inne metody.

Jedną z pozostałych metod asymetrycznej syntezy jest sigmatropowe przegrupowanie [2,3]-Wittiga. Denmark i Miller wykorzystali tę reakcję do otrzymania dwóch enancjomerów α -hydroksyfosfonianów **123** i **126** z nadmiarem enancjomerycznym sięgającym 100%.⁹³



Schemat 29. Sigmatropowe przegrupowanie [2,3]-Wittiga.

Innym przykładem enancjoselektywnej reakcji jest kondensacja aldolowa (izocyjanometylo)fosfonianów z aldehydami, katalizowana przez chiralne kompleksy żelaza **127**, w wyniku której powstają 1-amino-2-hydroksyfosfoniany **130** z bardzo dobrymi nadmiarami enancjomerycznymi (88 – 96%).⁹⁴



Schemat 30. Kondensacja aldolowa.

2.3.2. Biokataliza.

Biokataliza jest metodą, która coraz częściej zastępuje asymetryczną syntezę ze względu na: wysoką aktywność katalityczną (enzymy przyspieszają reakcje bardziej niż znane katalizatory), ogromny wybór formy katalizatora (można zastosować żywe mikroorganizmy, immobilizowane lub liofilizowane komórki, jak i wyizolowane z nich enzymy) w zależności od przeprowadzanych reakcji (biokataliza może mieć zastosowanie w prawie każdej reakcji chemicznej), wysoką selektywność (zarówno chemo-, regio-, jak i

stereoselektywność) oraz biodegradowalność, która ma szczególne znaczenie w ochronie środowiska.⁹⁵

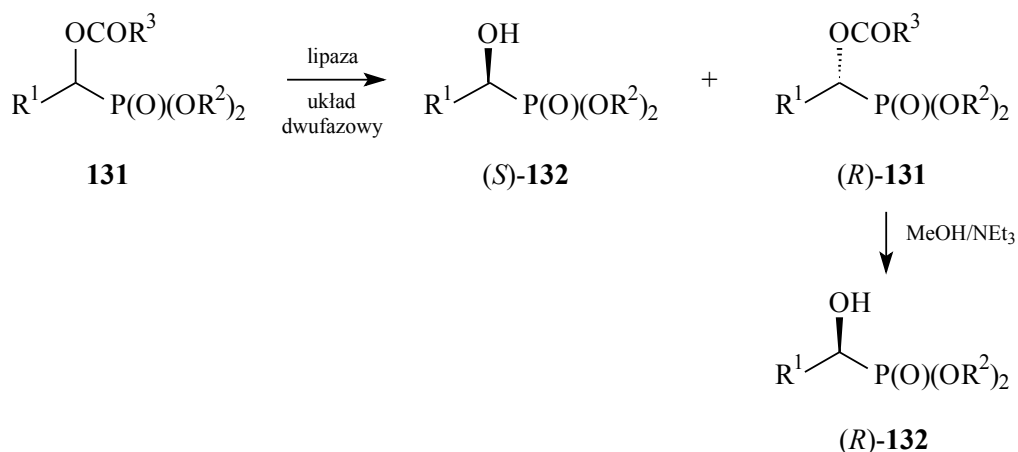
Optycznie czynne hydroksyfosfoniany otrzymać można stosując zarówno całe komórki mikroorganizmów jak i enzymy. Wybór formy biokatalizatora może zależeć od jego dostępności, kosztów i warunków reakcji. Bardzo korzystne z punktu widzenia czystości biokatalizatora jest stosowanie enzymów, jednakże są one drogie, a ich izolacja pracochłonna.⁹⁶

Znanych jest kilka metod biokatalitycznej syntezy asymetrycznych hydroksyfosfonianów:

- 1) Enancjoselektywna hydroliza acyloksyfosfonianów z użyciem enzymów i mikroorganizmów.
- 2) Rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej hydroksyfosfonianów za pomocą estryfikacji.
- 3) Bioredukcja ketofosfonianów za pomocą drożdży piekarniczych i innych mikroorganizmów.
- 4) Hydrolityczne otwarcie pierścienia oksiranowego w podstawionych 1,2-epoksyetanofosfonianach.

2.3.2.1. Hydroliza acyloksyfosfonianów.

Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod w biokatalitycznej syntezie optycznie czystych hydroksyfosfonianów jest enzymatyczna hydroliza. Hammerschmidt i współpracownicy użyli lipazy z *Aspergillus niger* (AP 6) i z *Rhizopus oryzae* (F-AP15) do rozdziału kinetycznego różnych α -acyloksyfosfonianów **131**, otrzymując asymetryczne α -hydroksyfosfoniany **132**. Reakcje te zostały przeprowadzone w układzie dwufazowym (bufor fosforanowy pH = 7.0, mieszanina rozpuszczalników organicznych: heksan/eter *tert*-butylometylowy).^{97, 98}



Schemat 31. Enzymatyczna hydroliza w układzie dwufazowym.

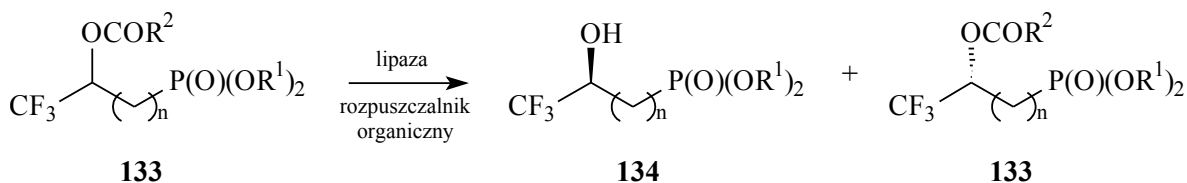
Połączenie chemicznej syntezy i reakcji przedstawionej na schemacie 32 zostało wykorzystane do otrzymania optycznie czystej L-fosfonoseryny i L-fosfonoizoseryny – fosfonowych analogów seryny i izoseryny.⁹⁹

W większości przypadków hydroliza lipazą AP 6 prowadzi do otrzymania izomeru (*S*) α -hydroksyfosfonianów i izomeru (*R*) α -acyloksyfosfonianów, gdyż jest to lipaza specyficzna (podobnie jak lipaza CALB – Rysunek 21) dla izomeru (*S*). Jednak w kilku przypadkach (gdy $R^1 = -CH_2Ph$; $R^2 = -Et$; $R^3 = -Me, -CH_2Cl$) otrzymano izomery o odwrotnej konfiguracji.¹⁰⁰

Hammerschmidt i współpracownicy przeprowadzili hydrolizę α -acyloksyfosfonianów **131**, stosując, oprócz lipaz AP 6 i F-AP15, również inne enzymy: PLE (esteraza z wątroby wieprzowej), PPL (lipaza z trzustki wieprzowej), LNC (lipaza z *Rhizopus*), SAM-I (lipaza z *Pseudomonas fluorescens*), SAM-II (lipaza z *Pseudomonas sp.*). Poza lipazą LNC pozostałe enzymy katalizowały reakcję w kierunku otrzymania izomeru (*R*) α -hydroksyfosfonianów (*R*)-**132**.¹⁰¹

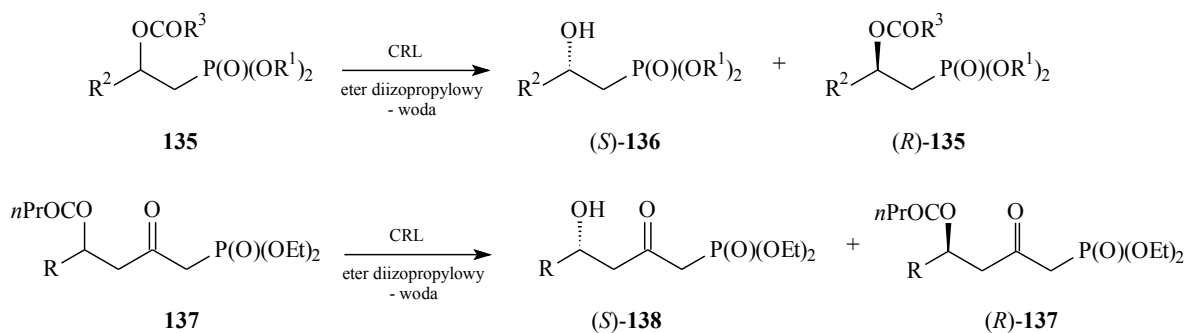
Układ dwufazowy z punktu widzenia mechanizmu działania enzymów jest najlepszym medium enzymatycznej hydrolizy, jednak trudność izolacji produktów reakcji wpłynęła na poszukiwania warunków reakcji przeprowadzanych w środowisku organicznym.

Yuan i współpracownicy przeprowadzili hydrolizę α i β acyloksy(trifluorometyloalkano)fosfonianów **133** z zastosowaniem lipazy z *Candida antarctica* (CALB) i immobilizowanej lipazy z *Mucor miehei* (IM) w mieszaninie rozpuszczalników (toluen lub benzen/ *n*-butanol 1:0.3).¹⁰²



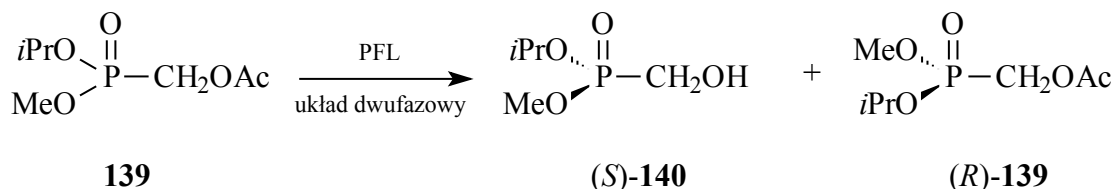
Schemat 32. Enzymatyczna hydroliza w środowisku organicznym.

Ze względu na nukleofilowy charakter powstających hydroksyfosfonianów oraz działanie lipaz w naturze w środowisku wodnym, zastosowanie hydrofobowych rozpuszczalników zmniejsza aktywność tych katalizatorów w reakcji hydrolizy. Zastosowanie hydrofobowego rozpuszczalnika nasyconego roztworem wodnym chlorku magnezu dało niespodziewanie dobre rezultaty w hydrolizie β -acyloksyfosfonianów **135** (ee > 95%)¹⁰³, oraz δ -acyloksy- β -ketofosfonianów **137** (ee = 85.9 – 100%) lipazą CRL (lipaza z *Candida rugosa*) selektywną dla izomerów (*S*).¹⁰⁴ W obu przypadkach został użyty roztwór chlorku magnezu w celu zapobiegnięcia agregacji enzymu.



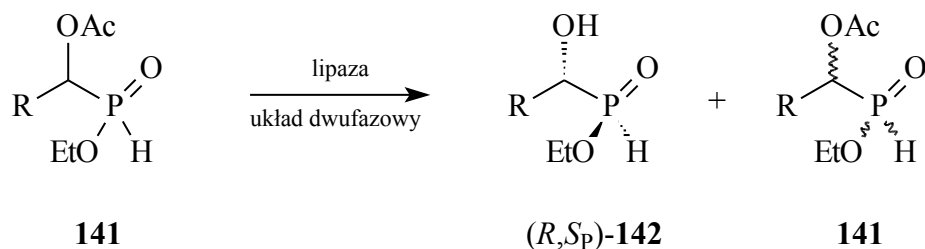
Schemat 33. Enzymatyczna hydroliza w nasyconym wodę eterze diizopropylowym.

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem cieszą się związki z centrum stereogenicznym na atomie fosforu. Pierwszym doniesieniem literaturowym o rozdziale kinetycznym α -acyloksyfosfonianów z zastosowaniem lipazy PFL (lipaza z *Pseudomonas fluorescens*) ze stereogenicznym fosforem jest praca Kiełbasińskiego i współpracowników.¹⁰⁵



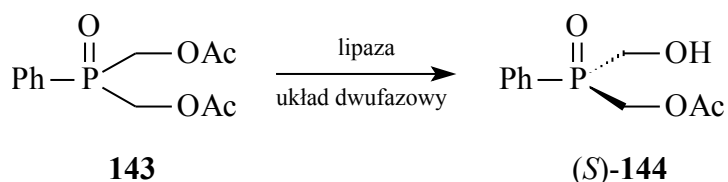
Schemat 34. Rozdział kinetyczny acyloksyfosfonianów z centrum stereogenicznym na atomie fosforu.

Enzymatyczna hydroliza została zastosowana również do rozdziału kinetycznego hydroksyfosfonianów z centrami stereogenicznymi na atomie fosforu i α atomie węgla. W wyniku tej reakcji otrzymany został tylko jeden izomer (R,S_p) każdego α -hydroksy-*H*-fosfinianu **142**.¹⁰⁶



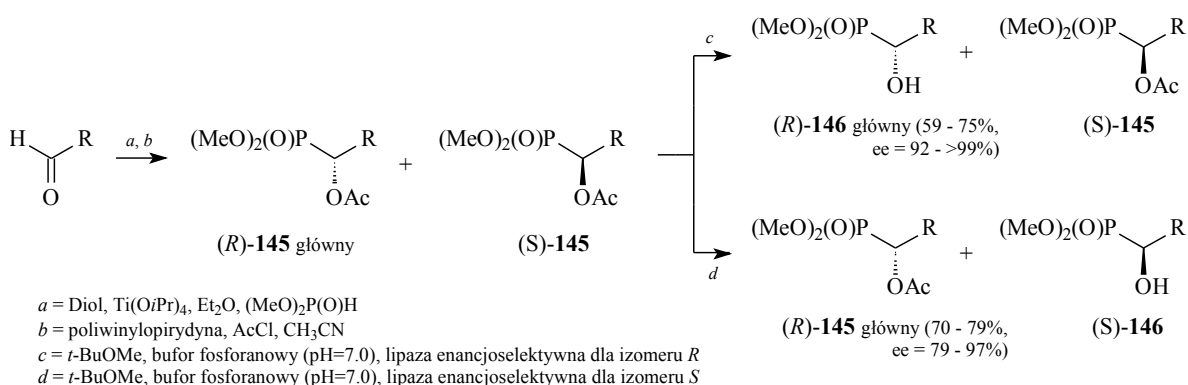
Schemat 35. Rozdział kinetyczny acyloksyfosfonianów z dwoma centrami stereogenicznymi.

Za pomocą enzymatycznej hydrolizy można nie tylko przeprowadzać rozdział kinetyczny mieszaniny racemicznej acyloksyfosfonianów, ale także otrzymać optycznie czyste hydroksyfosfiniany na drodze desymetryzacji prochiralnego substratu. Kiełbasiński i współpracownicy zastosowali tę metodę do otrzymania optycznie czystego tlenku α -hydroksyfosfinowego **144** z asymetrycznym atomem fosforu.¹⁰⁷



Schemat 36. Desymetryzacja.

Bardzo dobre rezultaty dało zastosowanie jednocześnie asymetrycznej syntezy i rozdziálu kinetycznego katalizowanego lipazami. W pierwszym etapie w asymetrycznej reakcji addycji fosforynu dimetylowego do aldehydu zostały zsyntetyzowane nieracemiczne α -acyloksyfosfoniany **145** (ee = 60 – 70%), które następnie hydrolizowano za pomocą lipaz enancjoselektywnych dla izomeru *R* (lipazy: z *Pseudomonas sp.*, PSCII – immobilizowana lipaza z *Pseudomonas cepacia*, AY – lipaza z *Candida rugosa* i z *Pseudomonas sp.* typ B) lub *S* (lipazy: z *Rhizopus arrizhus* i F-AP15). W wyniku połączenia obu metod otrzymane zostały izomery *R* α -hydroksyfosfonianów **146** lub α -acyloksyfosfonianów **145** z bardzo wysokimi wartościami wydajności chemicznej i nadmiaru enancjomerycznego (wydajność reakcji = 59 – 79%, ee = 79 – >99%).¹⁰⁸



Schemat 37. Połączenie asymetrycznej syntezy i biokatalizy.

W reakcjach biokatalitycznej hydrolizy α -butyryloksyalkilofosfonianów znalazły zastosowanie również żywe mikroorganizmy o właściwościach lipolitycznych (*Pseudomonas fluorescens* i *Penicillium citrinum*).¹⁰⁹

2.3.2.2. Estryfikacja hydroksyfosfonianów.

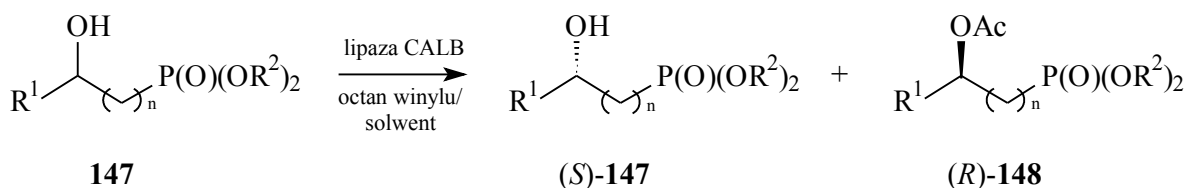
Enzymatyczną estryfikację można przeprowadzić na trzy sposoby: odwracalna estryfikacja kwasem, odwracalna transestryfikacja, nieodwracalna transestryfikacja.¹¹⁰

W enzymatycznym rozdziale mieszanin racemicznych hydroksyfosfonianów stosuje się nieodwracalną transestryfikację głównie za pomocą octanu winylu ze względu na przemianę nietrwałego alkoholu winylowego do aldehydu octowego, co powoduje przesunięcie równowagi reakcji w kierunku powstawania produktów. Znane są również

próby zastosowania innego donoru acetylu – octanu *izo*-propylu z równie dobrymi rezultatami (ee = 90 – 100%).^{111, 112}

Zarówno enancjoselektywność reakcji transestryfikacji jak i szybkość reakcji zależą w dużym stopniu od zastosowanego rozpuszczalnika.¹¹³

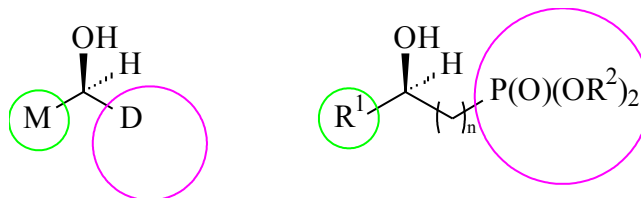
Yuan i współpracownicy przeprowadzili reakcje estryfikacji octanem winylu α -hydroksyfosfonianów **147** (n = 0) z zastosowaniem lipazy CALB otrzymując izomery (*S*) acetyloksyfosfonianów **148** (n = 0) z ee > 95%. Rozpuszczalnikami były benzen lub THF.¹¹⁴



Schemat 38. Rozdział kinetyczny α i β -hydroksyfosfonianów lipazą CALB.

W tych samych warunkach została również przeprowadzona estryfikacja β -hydroksyfosfonianów **147** (n = 1) do (*R*)- β -acyloksyfosfonianów (*R*)-**148** (n = 1) z równie dobrym rezultatem (ee > 95%).

Zgodnie z enancjoselektywną preferencją lipazy CALB estryfikowane są izomery (*S*)- α - i (*R*)- β -hydroksyfosfonianów.¹¹⁴



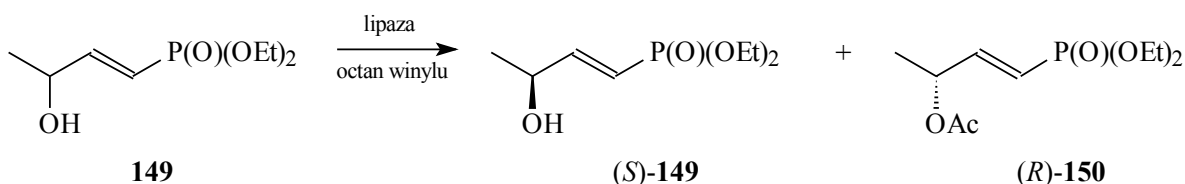
M - mały, D - duży

Rysunek 21. Model enancjopreferencji lipazy CALB.

Model przedstawiony na rysunku 21 ma również zastosowanie do γ i δ -hydroksyfosfonianów dla lipaz selektywnych dla izomeru (*R*).

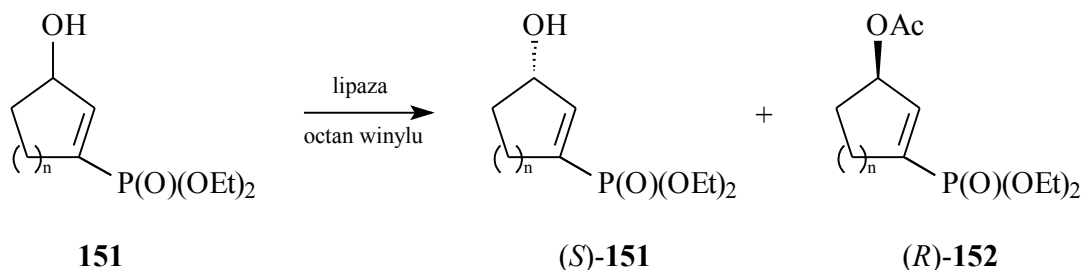
Natomiast Mikołajczyk i współpracownicy przeprowadzili rozdział kinetyczny β -hydroksyfosfonianów **149** z udziałem różnych lipaz (LPL – lipaza z *Pseudomonas aeruginosa*, PS – lipaza z *Pseudomonas cepacia*, AK – lipaza z *Pseudomonas fluorescens* i LIIS – lipaza AIIS), otrzymując estry o konfiguracji (*R*) lub (*S*) w zależności od użytej lipazy.¹¹⁵

Maffei i współpracownicy przeprowadzili reakcje estryfikacji 3-hydroksy-1-butenylofosfonianu dietylu **149** octanem winylu za pomocą różnych lipaz, otrzymując ester **150** o konfiguracji (*R*) niezależnie od użytej lipazy.¹¹⁶



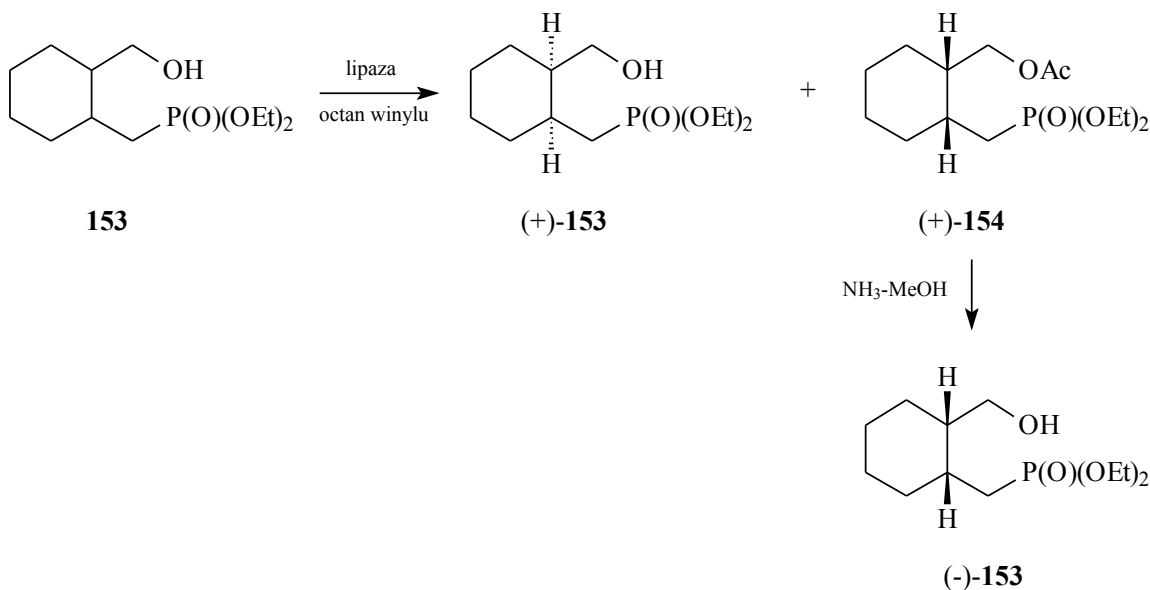
Schemat 39.

Reakcja ta była również przeprowadzona na cyklicznych 3-hydroksy-1-alkenofosfonianach dietylu **151**.¹¹⁷



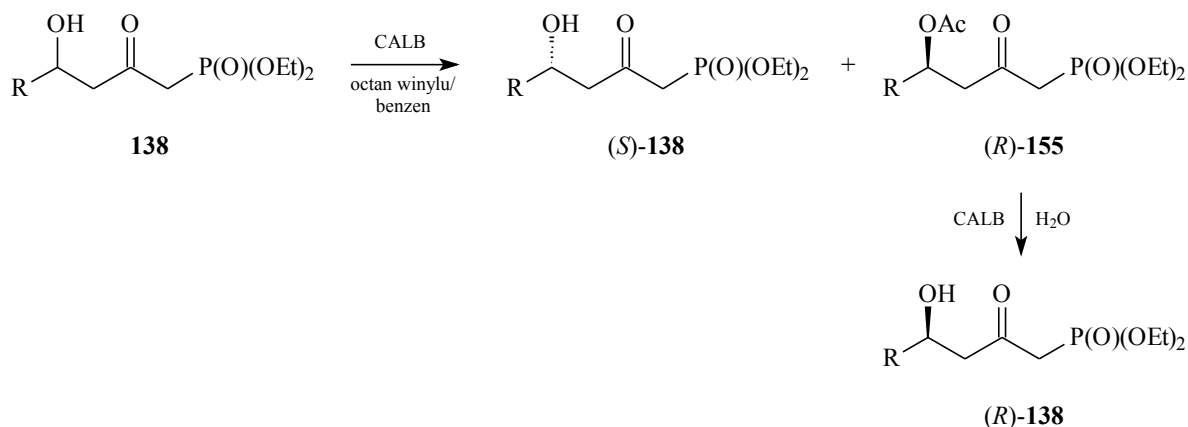
Schemat 40.

Shibuya i współpracownicy przeprowadzili estryfikację innego cyklicznego hydroksyfosfonianu **153** z użyciem lipaz PS i AK otrzymując bardzo dobre rezultaty bez użycia rozpuszczalnika (ee 98 – 99%).¹¹⁸



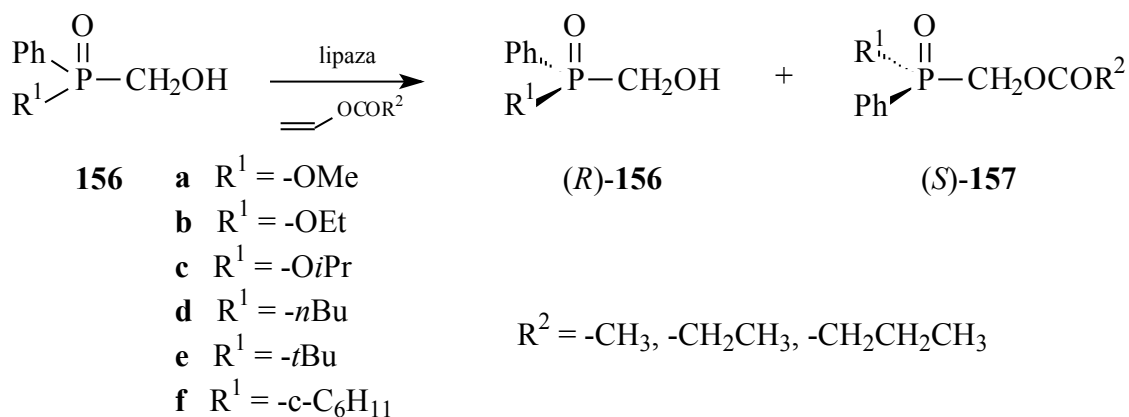
Schemat 41.

Jak już zostało wspomniane (Schemat 33), optycznie czyste δ -hydroksy- β -ketofosfoniany **138** zostały otrzymane na drodze hydrolizy estrów **137**. W tej samej pracy zastosowano również estryfikację δ -hydroksy- β -ketofosfonianów lipazą CALB. Tym sposobem otrzymano izomer (*R*) estru (Schemat 42), który następnie zhydrolizowano tą samą lipazą do (*R*)- δ -hydroksy- β -ketofosfonianu **138**, otrzymując w ten sposób oba izomery (ee = 95 – 99.1%).¹⁰⁴



Schemat 42.

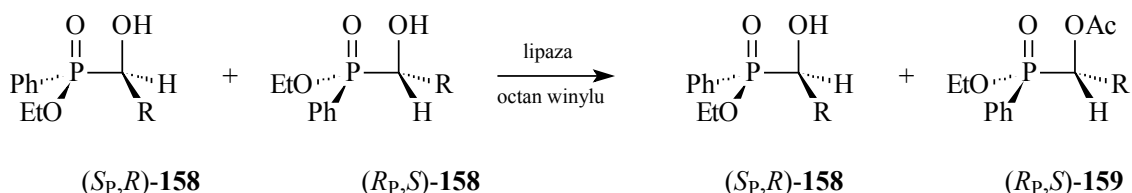
W pierwszej publikacji na temat hydrolizy enzymatycznej, w wyniku której, powstają hydroksyfosfoniany z asymetrycznym atomem fosforu opisany został również rozdział kinetyczny tych związków **156a-c** na drodze transestryfikacji.¹⁰⁵



Schemat 43.

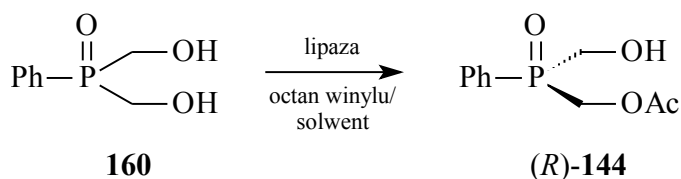
Podobną reakcję transestryfikacji przeprowadzili Shioji i współpracownicy rozdzielając enancjomery tlenków α -hydroksyfosfinowych **156d-f**, stosując lipazy AK i PS. Donorami acylu w tej reakcji były różne estry winylu. Dodatkowo zastosowane zostały tutaj sita molekularne usuwające wodę z środowiska reakcji.¹¹⁹

Transestryfikacja została zastosowana również do rozdziału kinetycznego hydroksyfosfonianów **158** z centrum asymetrii na atomie fosforu i α atomie węgla.¹²⁰ Ponieważ w tym przypadku została źle określona konfiguracja absolutna produktów, to na schemacie 44 zostały narysowane produkty rozdziału kinetycznego takie jakie w rzeczywistości zostały otrzymane. Poprawne określenie konfiguracji absolutnej tych związków zostało szerzej omówione w części eksperymentalnej niniejszej rozprawy doktorskiej (rozdział 4.2.1).



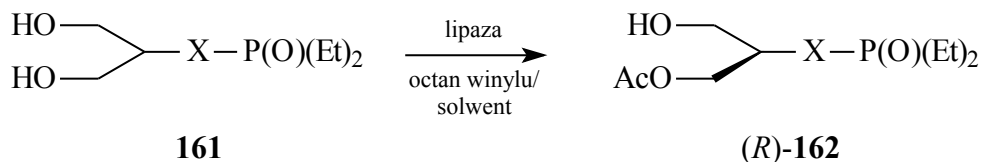
Schemat 44.

Optycznie czysty tlenek α -hydroksyfosfinowy **144** otrzymany został za pomocą desymetryzacji. Wspomniana wcześniej desymetryzacja za pomocą enzymatycznej hydrolizy estru tego związku dała izomer (*S*) (Schemat 36), natomiast za pomocą transestryfikacji otrzymany został izomer przeciwny.¹⁰⁷



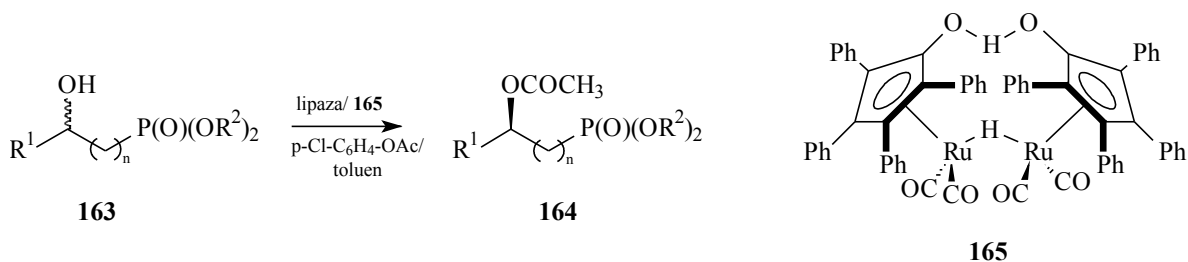
Schemat 45.

Desymetryzacja jest metodą pozwalającą, w przeciwieństwie do rozdziału kinetycznego, na otrzymanie związku z wydajnościami przekraczającymi 50%. Bardzo dobre rezultaty osiągnięto przeprowadzając estyfikację hydroksyfosfonianów **161** (72 – 98%, ee = 70 – 98%).¹²¹



Schemat 46.

Inną metodą pozwalającą na otrzymanie związku z wydajnościami przekraczającymi 50% jest dynamiczny rozdział kinetyczny. Polega on na zastosowaniu czynnika racemizującego nieprzekształcony substrat katalizowanej reakcji. Czynnikiem racemizującym w dynamicznym rozdziale kinetycznym α - i β -hydroksyfosfonianów **163** był kompleks rutenu **165**. Tą metodą otrzymano acyloksyfosfoniany **164** z wydajnością wynoszącą 53 – 87% i ee > 99%.¹²²



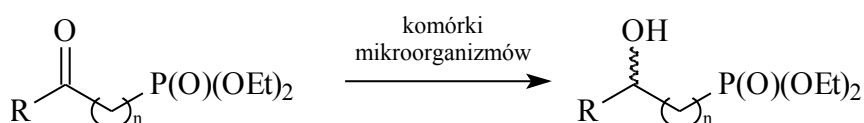
Schemat 47.

2.3.2.3. Redukcja ketofosfonianów.

Biokatalityczna redukcja ketofosfonianów przeprowadzana jest jedynie za pomocą komórek mikroorganizmów, głównie drożdży piekarniczych, których właściwości redukcyjne są dobrze poznane.

Ze względu na dużą niestabilność α -ketofosfonianów w środowisku wodnym nie udało się do tej pory otrzymać α -hydroksyfosfonianów na drodze biokatalitycznej redukcji w środowisku wodnym. Natomiast zastosowanie bezwodnego benzenu dało dobre rezultaty. W takim bezwodnym środowisku zostały otrzymane α -hydroksyfosfoniany **166a** i **b** w reakcji katalizowanej różnymi mikroorganizmami (*Saccharomyces cerevisiae* – drożdże piekarnicze, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Verticillium sp.*).¹²³

Dobre rezultaty osiągnięto natomiast, redukując drożdżami piekarniczymi w środowisku wodnym β - i γ -ketofosfoniany **166c-h**. Podjęte zostały również próby zastosowania warunków beztlenowych oraz zmiany formy katalizatora poprzez immobilizację i permeabilizację komórek. Jednak najlepsze rezultaty osiągnięto, stosując żywe komórki drożdży w warunkach tlenowych.¹²⁴



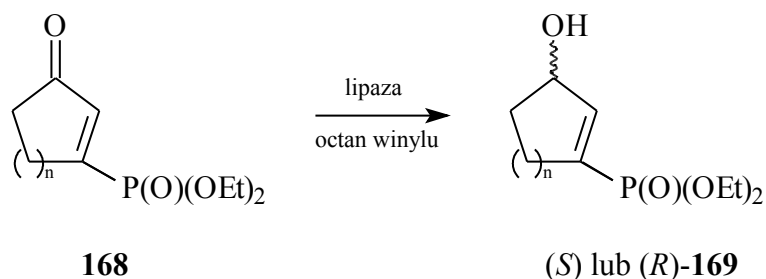
- 166 a** R = -H, n = 0
b R = -CH₃, n = 0
c R = -CH₃, n = 1
d R = -CH₂CH₃, n = 1
e R = -CH₂C₆H₅, n = 1
f R = -CH₂CH₂C₆H₅, n = 1
g R = -C₆H₅, n = 2
h R = -CH(CH₃)₂, n = 2
- (+) lub (-)-**167**

Schemat 48.

Z kolei zastosowanie związków wpływających na aparat enzymatyczny komórki takich jak: chlorooctan etylu i keton metylowinylowy w reakcji redukcji β -ketofosfonianu **166c** drożdżami piekarniczymi spowodowało zmianę enancjoselektywności biokatalizatora (powstał izomer o przeciwnej skręcalności optycznej).¹²⁵

Biokatalityczna redukcja β -ketofosfonianu **166c** była również przeprowadzona z użyciem komórek innych mikroorganizmów. Zastosowano między innymi komórki szczepu *Rhodotorula rubra*¹²⁵ oraz *Geotrichum candidum*.¹¹⁵

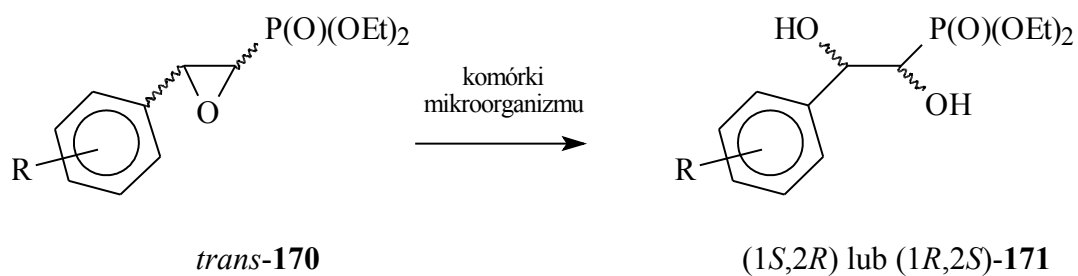
Podjęta została również próba redukcji cyklicznych 3-keto-1-alkenofosfonianów za pomocą żywych komórek drożdży piekarniczych w wodzie, a także suchych komórek oraz proszku acetonowego w układzie dwufazowym.¹²⁶



Schemat 49.

2.3.2.4. Hydroliza epoksyfosfonianów.

Do tej pory ukazała się tylko jedna publikacja na temat biokatalitycznej hydrolizy *trans*-1,2-epoksyfosfonianów **170**, w której otrzymano czyste izomery 1,2-dihydroksyfosfonianów **171** za pomocą komórek *Aspergillus niger*.¹²⁷



Schemat 50.

2.4. Określanie konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów za pomocą metod NMR.

Jak już wcześniej zostało wspomniane, aktywność biologiczna hydroksyfosfonianów zawierających centrum asymetrii zależy od ich budowy przestrzennej. Dlatego ważnym elementem oprócz syntezy asymetrycznych związków, jest określenie ich czystości enancjomerycznej i konfiguracji absolutnej. W ostatnich latach coraz częściej wykorzystywane do tego celu są metody NMR, głównie ze względu na łatwość przygotowania próbki i niewielkie zużycie badanego związku.¹²⁸

Do rozróżnienia enancjomerów metodami NMR są stosowane chiralne odczynniki, które oddziałując z badanym związkiem, pozwalają na zaobserwowanie na widmach NMR różnych wartości przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) sygnałów jąder komplementarnych atomów. Różnice te są wykorzystywane w określaniu konfiguracji absolutnej, natomiast różnice wielkości pól powierzchni tych sygnałów (integracje), pozwalają oznaczyć czystość enancjomeryczną. Do związków stosowanych w tej metodzie należą między innymi: chiralne odczynniki derywatyzujące (CDA), które za pomocą wiązań kowalencyjnych tworzą diastereoizomery, a także chiralne odczynniki solwatuujące (CSA), które oddziałują w sposób niekowalencyjny.¹²⁸

2.4.1. Chiralne odczynniki derywatyzujące.

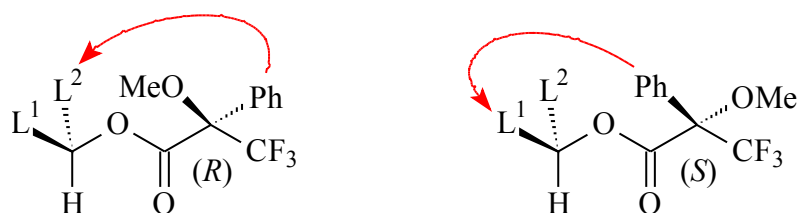
Zastosowanie CDA do określenia konfiguracji absolutnej lub czystości enancjomerycznej wymaga użycia odczynników o bardzo wysokiej czystości optycznej, najlepiej 100%. Reakcja derywatacji musi przebiegać bez zmiany konfiguracji absolutnej badanego związku, nie może też dojść do racemizacji, czy rozdziału kinetycznego prowadzącego do wzbogacenia w jeden z powstających diastereoizomerów.¹²⁹

CDA można użyć zarówno do metody podwójnej, jak i pojedynczej derywatacji. W pierwszym przypadku stosuje się oba enancjomery odczynnika derywatyzującego, lub jeden enancjomer CDA i oba enancjomery badanego związku. W wyniku derywatacji tą metodą otrzymujemy dwie pochodne, które są wobec siebie diastereoizomerami i dzięki temu są one rozróżnialne na widmach NMR.¹²⁸ Derywatacja pojedyncza polega na użyciu jednego enancjomeru CDA i jednego enancjomeru badanego związku, a konfiguracja absolutna może być określana między innymi na podstawie różnicy

przesunięć chemicznych pochodnej powstałej po derywatywacji i niezderwatywowanego związku.^{128, 130}

2.4.1.1. Kwas α -metoksy- α -trifluorometylofenylooctowy (MTPA).

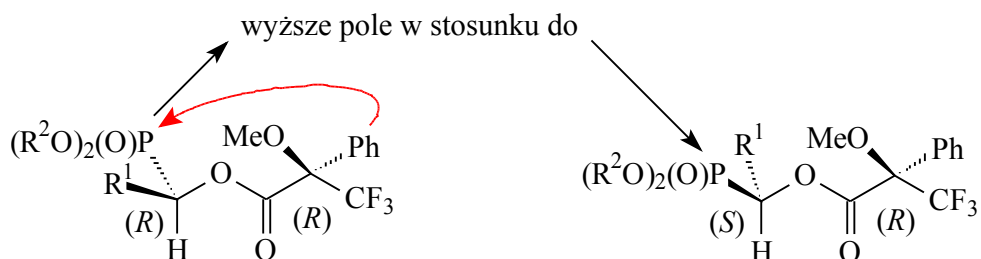
MTPA został po raz pierwszy wykorzystany do określenia konfiguracji absolutnej alkoholi (i amin) drugorzędowych przez Mosher'a i Dale'a (stąd często używana nazwa – odczynnik Mosher'a). W zaproponowanym przez nich modelu dla estru (*R*)-MTPA sygnał obserwowany na widmie NMR, pochodzący od jąder grupy L^2 jest przesuwany w stronę wyższego pola magnetycznego, gdyż znajduje się w zasięgu przesłaniającego oddziaływania grupy fenylowej. W estrze (*S*)-MTPA przesłaniana jest grupa L^1 .¹³¹



Rysunek 22. Model oddziaływania grupy fenylowej na podstawniki w estrach MTPA.

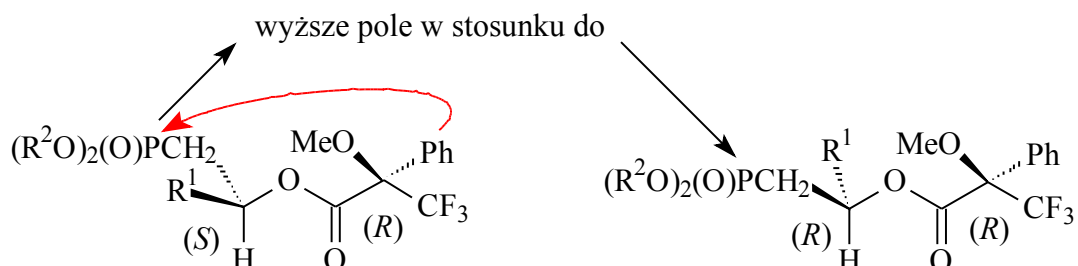
W wyniku derywatywacji kwasem (*R*)-MTPA, otrzymuje się ester o tej samej konfiguracji absolutnej, natomiast zastosowanie chlorku (*R*)-MTPA-Cl prowadzi do otrzymania estru o przeciwnej konfiguracji (*S*), ze względu na zmianę starszeństwa podstawników. Czasami jest to pomijane, co prowadzi do nieprawidłowego określenia konfiguracji absolutnej badanego związku.^{115, 120}

W przypadku zastosowania MTPA do określenia konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów najczęściej wykorzystuje się podwójną derywatyzację. Hammerschmidt i Li po raz pierwszy wykorzystali różnicę w przesunięciach chemicznych sygnałów pochodzących od jąder fosforu grupy fosforylowej na widmach ^{31}P NMR, do określenia konfiguracji absolutnej α -hydroksyfosfonianów. Grupa ta w (*R*)-estrach-(*R*)-MTPA jest przesłaniana, a sygnały pochodzące od tego estru znajdują się w wyższym polu magnetycznym niż sygnały pochodzące od (*S*)-estrów-(*R*)-MTPA.¹³²



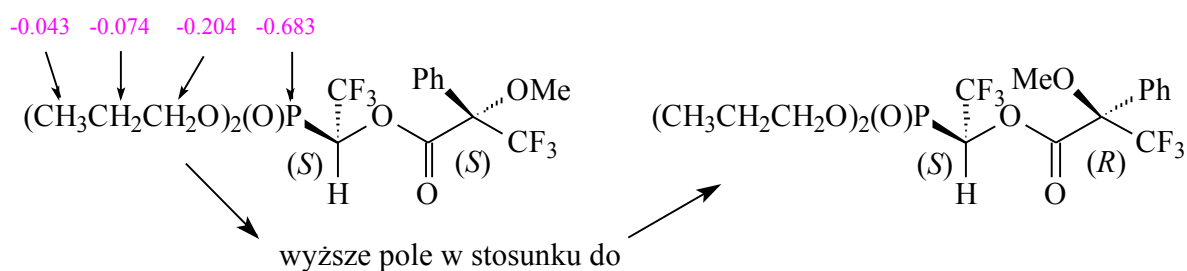
Rysunek 23. Model estrów MTPA α -hydroksyfosfonianów – wpływ grupy fenylowej na jądro fosforu.

W ten sam sposób została określona konfiguracja absolutna β -hydroksyfosfonianów. Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od jąder fosforu grupy fosforylowej w (*S*)-estrach-(*R*)-MTPA znajdują się w wyższym polu niż sygnały pochodzące od (*R*)-estrów-(*R*)-MTPA.^{111, 133} Różnica pomiędzy α - i β -hydroksyfosfonianami wynika jedynie z różnicy w starszeństwie podstawników.



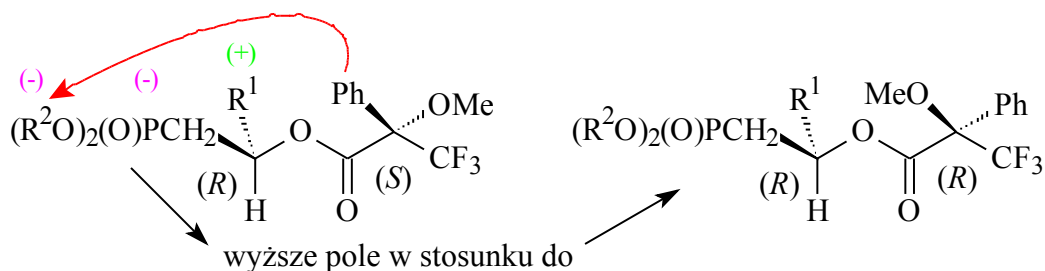
Rysunek 24. Model estrów MTPA β -hydroksyfosfonianów – wpływ grupy fenylowej na jądro fosforu.

Możliwe jest również określenie konfiguracji absolutnej poprzez porównanie przesunięć chemicznych na widmach ^1H NMR protonów grup znajdujących się w części fosfonianowej estrów. Yuan i współpracownicy wykorzystali przesłaniający wpływ grupy fenylowej na protony grup $\text{P}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ pochodzące od estru (*S*)-MTPA-(*S*)- α -hydroksyfosfonianu oraz na jądro atomu fosforu.¹⁰² Zastosowali oni metodę Kusumi-Ohtani, polegającą na obliczaniu różnicy wartości przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od estrów (*S*)- i (*R*)-MTPA. Wartości $\Delta\delta < 0$ obserwujemy dla jąder atomowych grup znajdujących się z przodu względem płaszczyzny utworzonej przez proton α , grupę karbonylową i grupę CF_3 MTPA (zgodnie z rysunkiem 25). Natomiast wartości $\Delta\delta > 0$, dla jąder grup znajdujących się z tyłu tej płaszczyzny.¹³⁴



Rysunek 25. Oddziaływanie grupy fenylowej na protony grupy fosforylowej dla estrów α -hydroksyfosfonianów.

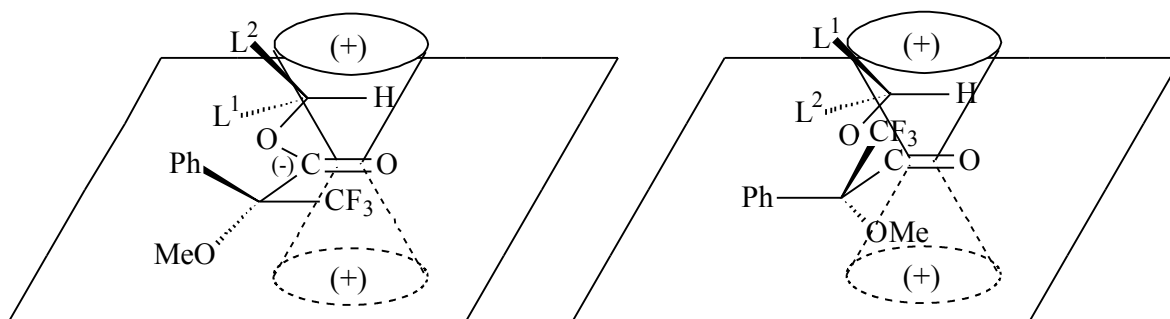
Podobnie określona została konfiguracja absolutna β -hydroksyfosfonianów.^{102, 135}



Rysunek 26. Oddziaływanie grupy fenylowej na protony grupy fosforylowej dla estrów β -hydroksyfosfonianów.

Wykorzystywane mogą być również różnice w wartościach przesunięć chemicznych jąder atomów fluoru grupy fluorometylowej pochodzącej od MTPA, obserwowane na widmach ^{19}F NMR.

Gdy duża grupa funkcyjna L^1 znajduje się po przeciwnej stronie w stosunku do grupy fenylowej, grupa CF_3 jest pod wpływem odsłaniającego działania grupy karbonylowej. Natomiast, gdy duża grupa L^1 jest po tej samej stronie, grupa fenylowa jest odpychana pod wpływem sterycznych oddziaływań z L^1 , w wyniku czego grupa CF_3 jest przesunięta ponad płaszczyznę i znajduje się pod mniejszym wpływem odsłaniającego działania grupy karbonylowej (sygnały na widmach ^{19}F NMR znajdują się w wyższym polu, w stosunku do poprzedniego przypadku).¹³⁶

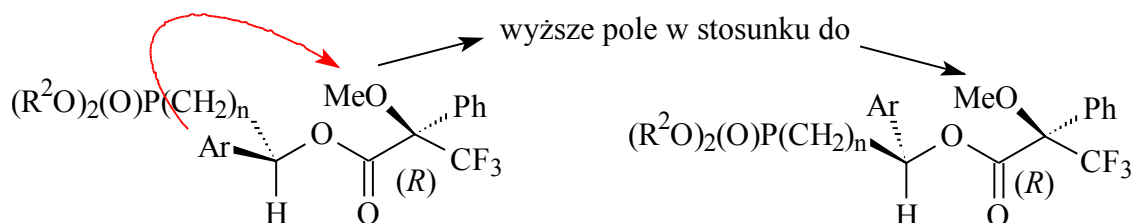


Rysunek 27. Oddziaływanie grupy karbonylowej na jądra fluoru estrów (*R*)-MTPA.

Różnice w wartościach przesunięć chemicznych na widmach ^{19}F NMR estrów MTPA β -hydroksyfosfonianów wykorzystali Mikołajczyk i współpracownicy, jednak określona przez nich konfiguracja absolutna jest błędna, gdyż zastosowali model dla estru (*S*)-MTPA, a prawidłowym modelem, gdy derywatywacja przeprowadzana jest chlorkiem (*S*)-MTPA-Cl, jest model estru (*R*)-MTPA (zmiana starszeństwa podstawników podczas derywatywacji).¹¹⁵

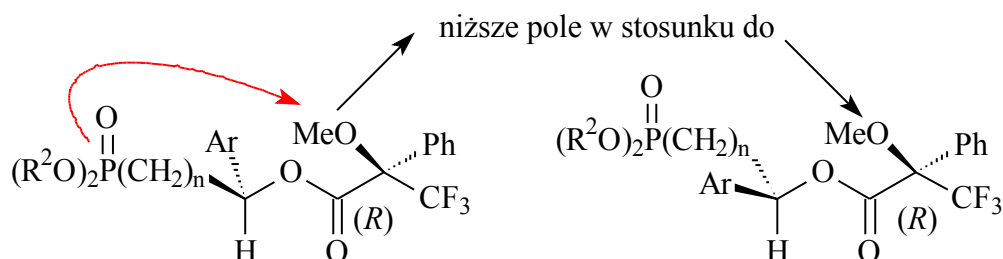
Hammerschmidt i współpracownicy po raz pierwszy wykorzystali również różnice w przesunięciach chemicznych sygnałów pochodzących od protonów grupy metoksylowej. W

przypadku, gdy derywatyzowane są hydroksyfosfoniany posiadające ugrupowanie aryłowe, wykorzystuje się przesłaniające działanie tej grupy na grupę metoksyową.^{101, 137}



Rysunek 28. Wpływ przesłaniający grupy aryłowej na protony metoksyłowe estrów (*R*)-MTPA.

W przypadku, gdy derywatyzowane są hydroksyfosfoniany nie posiadające takich ugrupowań, wykorzystuje się odsłaniający wpływ wiązania P=O¹³⁸ na protony grupy metoksyłowej.¹¹¹



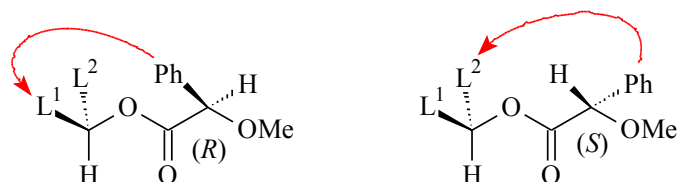
Rysunek 29. Wpływ przesłaniający grupy fosforylowej na protony metoksyłowe estrów (*R*)-MTPA.

Do określania konfiguracji za pomocą MTPA wykorzystuje się zazwyczaj więcej niż jedną wartość diagnostyczną. W najlepszym przypadku określa się oddziaływania względem wszystkich grup estrów MTPA.

2.4.1.2. Kwas α -metoksyfenylooctowy (MPA).

MPA (kwas *O*-metylomigdałowy) podobnie jak MTPA został po raz pierwszy zastosowany do określania konfiguracji absolutnej przez Mosher'a i Dale'a, jednak ze względu na racemizację tworzonych estrów (obecność kwasowego protonu w pozycji α), nie był początkowo chętnie stosowany.¹³¹ Wyeliminowanie tego problemu poprzez optymalizację warunków derywatyzacji, pozwoliło na jego szersze zastosowanie.¹³⁹

W modelu konformacyjnym zaproponowanym przez Trost'a i współpracowników dla estru (*R*)-MPA, grupa L¹ znajduje się w zasięgu przesłaniającego oddziaływania grupy fenylowej, co powoduje, że sygnał pochodzący od jąder tej grupy obserwowany na widmie NMR, jest przesuwany w stronę wyższego pola magnetycznego. W estrze (*S*)-MPA przesłaniana jest grupa L².

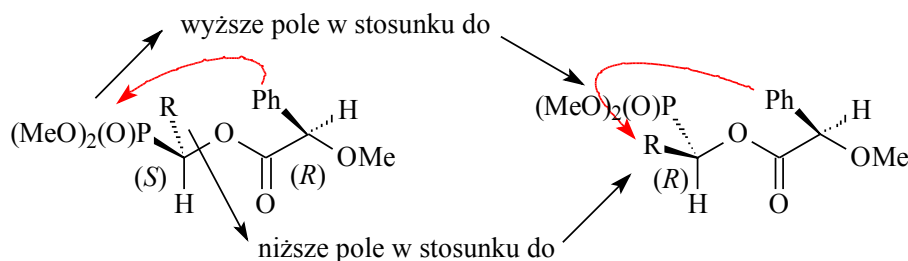


Rysunek 30. Model oddziaływania grupy fenylowej na podstawniki w estrach MPA.

Jak wynika z zastosowanego modelu grupa metoksylowa nie jest grupą diagnostyczną w oznaczaniu konfiguracji absolutnej metodą estrów MPA, gdyż znajduje się w płaszczyźnie grupy karbonylowej i protonu α pochodzącego od badanego alkoholu. Natomiast dla pozostałych grup stosuje się podobne zasady jak dla estrów MTPA.

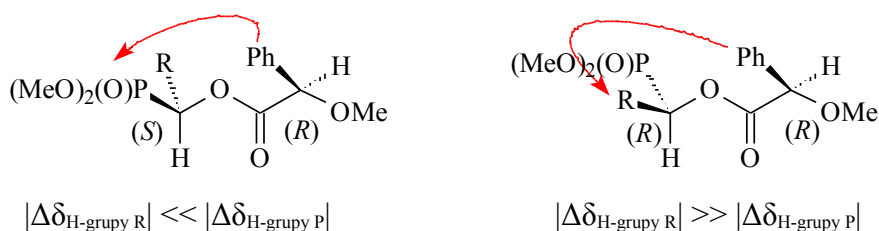
W przypadku zastosowania MPA do określania konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów wykorzystywana była zarówno podwójna jak i pojedyncza derywatywizacja.

Spilling i współpracownicy określili konfigurację absolutną α -hydroksyfosfonianów, wykorzystując różnicę w przesunięciach chemicznych sygnałów pochodzących zarówno od jądra atomu fosforu (analiza widm ^{31}P NMR), jak i protonów grupy fosforylowej i protonów grupy R. Poddali oni derywatywizacji kwasem (*R*)-MPA racemiczne α -hydroksyfosfoniany, w wyniku czego otrzymali mieszaninę estrów (*1S,2'R*) oraz (*1R,2'R*), którą następnie rozdzielili za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym i porównali widma ^1H oraz ^{31}P NMR odseparowanych estrów (*R*)-MPA.¹⁴⁰



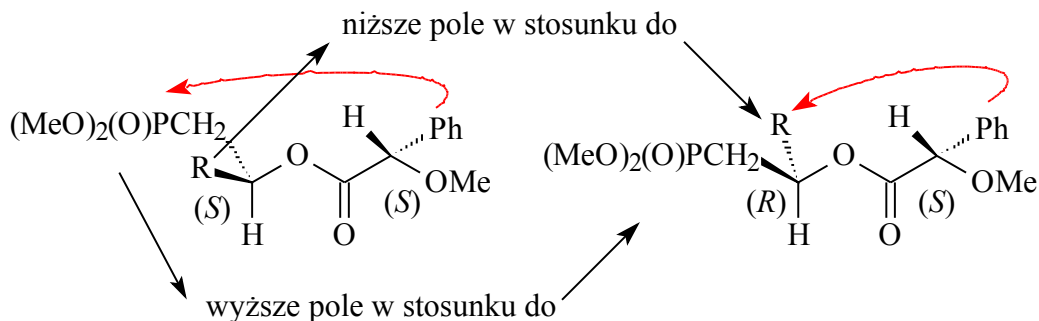
Rysunek 31. Model estrów (*R*)-MPA α -hydroksyfosfonianów.

W tej samej pracy zostały porównane przesunięcia chemiczne na widmach ^1H NMR sygnałów pochodzących od protonów otrzymanych estrów z przesunięciami chemicznymi komplementarnych protonów niezderiwatyzowanego alkoholu (derywatywizacja pojedyncza).¹⁴¹



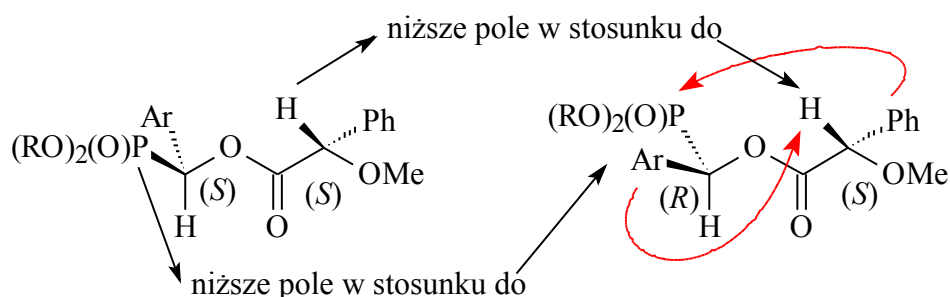
Rysunek 32. Pojedyncza derywatywizacja α -hydroksyfosfonianów.

W podobny sposób, za pomocą zarówno pojedynczej jak i podwójnej derywatywacji konfigurację absolutną α -hydroksyfosfonianów określili Weimer i współpracownicy.^{141, 142} Natomiast podwójna derywatywacja za pomocą (*S*)-MPA metodą Spillinga, została wykorzystana do oznaczenia konfiguracji absolutnej β -hydroksyfosfonianów.^{143, 144}



Rysunek 33. Model estrów (*S*)-MPA β -hydroksyfosfonianów.

Skropeta i Schmidt zastosowali podwójną derywatywację kwasem (*S*)-MPA α -hydroksyfosfonianów zawierających ugrupowanie aryłowe. Został tutaj wykorzystany przesłaniający wpływ tej grupy na proton znajdujący się w pozycji α reszty MPA, a także podobny wpływ grupy fenylowej na jądro fosforu.⁸³



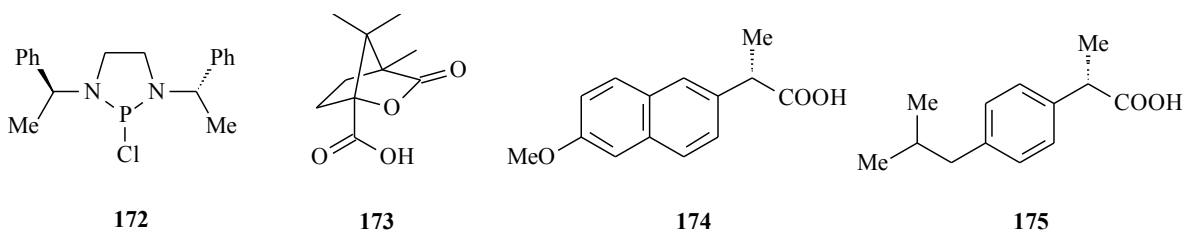
Rysunek 34. Przesłaniający wpływ grupy aryłowej α -hydroksyfosfonianów.

Derywatywacja odczynnikiem MPA została wykorzystana również do określenia konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów z dwiema (lub więcej) grupami funkcyjnymi (aminowymi i hydroksylowymi). Poza hydroksylową grupą znajdującą się w pozycji α , pozostałe grupy (hydroksylowe lub aminowe) były zablokowane. Pozwoliło to na zastosowanie modelu konformacyjnego zaproponowanego przez Trost'a (Rysunek 30).^{56, 145, 146}

W przypadku zastosowania niezablokowanych polifunkcyjnych hydroksyfosfonianów, może zajść derywatywacja wszystkich grup funkcyjnych. Powstałe w ten sposób pochodne zawierają dodatkowe centra asymetrii, co prowadzi do błędnych przypisań. Problem ten został rozwiązany przez stworzenie modeli uwzględniających wpływ wszystkich podstawników aryłowych obecnych w zderywatywowanej pochodnej badanego związku.^{147,}

2.4.1.3. Inne chiralne odczynniki derywatyzujące.

Do określania konfiguracji absolutnej α -hydroksyfosfonianów, Kee i współpracownicy zastosowali diazafosfolidynę **172**. W wyniku derywatywacji tym związkiem obu enancjomerów 1-hydroksy-1-fenylometanofosfonianu dietylu o zdefiniowanej konfiguracji absolutnej, otrzymali pochodne, które następnie analizowali za pomocą widm ^{31}P i ^1H NMR. Zaobserwowano dużą różnicę w przesunięciach chemicznych sygnałów pochodzących od jądra atomowego trójkoordynacyjnego fosforu (III). Dla pochodnej izomeru (*S*) hydroksyfosfonianu sygnały były przesunięte w stronę niższego pola w stosunku do izomeru (*R*). Dodatkowo różnice w wielkości stałych sprzężenia oraz przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od protonu α reszty hydroksyfosfonianowej, okazały się dobrymi parametrami diagnostycznymi ($\delta_{(R)} < \delta_{(S)}$; $\Delta_{(S-R)}J_{\text{HP(III)}} > 0$; $\Delta_{(S-R)}J_{\text{HP(V)}} < 0$). Wykorzystując te zależności określona została konfiguracja absolutna α -hydroksyfosfonianów o nieznannej stereochemii.¹⁴⁹



Rysunek 35. Chiralne odczynniki derywatyzujące.

Innym chiralnym czynnikiem derywatyzującym jest kwas (*S*)-kamfanowy **173**. Meier i współpracownicy zastosowali ten związek do określenia konfiguracji absolutnej α -hydroksyfosfonianów, analizując przesunięcia chemiczne na widmach ^{31}P NMR. Sygnały jąder atomów fosforu pochodnych (*S*)- α -hydroksyfosfonianów znajdowały się w wyższym polu niż sygnały pochodzące od estrów (*R*).¹⁵⁰

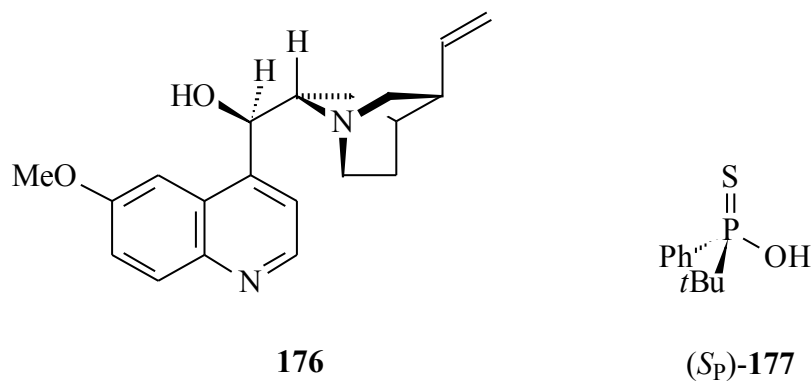
W oznaczaniu konfiguracji absolutnej znalazły również zastosowanie związki będące niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi. Błażewska i Gajda stosując (*S*)-naproksen[®] **174** i (*S*)-ibuprofen[®] **175** do określenia nadmiaru enancjomerycznego hydroksyfosfonianów, zauważyli, że sygnały na widmach ^{31}P NMR pochodzące od jąder fosforu estrów (*S*)- α -hydroksyfosfonianów znajdują się w niższym polu niż sygnały estrów (*R*).¹⁵¹

2.4.2. Chiralne odczynniki solwujące.

CSA są związkami oddziałującymi w sposób niekowalencyjny (np.: poprzez wiązania wodorowe) z badanym związkiem. Ze względu na trudność w zaproponowaniu modelu tych oddziaływań, związki te mają zastosowanie głównie do oznaczania czystości enancjomerycznej, a w mniejszym stopniu do określania konfiguracji absolutnej.

Jednym z takich związków jest chinina **176**, stosowana głównie do określenia nadmiaru enancjomerycznego α - i β -hydroksyfosfonianów.^{66, 152} Lejczak i współpracownicy, wykorzystując chininę właśnie w tym celu, zauważyli, że sygnały na widmach ^{31}P NMR pochodzące od (*R*)- α -hydroksyfosfonianów znajdują się w niższym polu niż sygnały od enancjomeru (*S*).¹⁰⁹ Zaobserwowali również, że dla 1,2-dihydroksyfosfonianów sygnały pochodzące od izomeru (*S,S*) są przesunięte w kierunku wyższego pola w stosunku do izomeru (*R,R*).¹²⁷

Innym chiralnym odczynnikiem solwującym stosowanym podobnie jak chinina głównie do określania nadmiaru enancjomerycznego, jest kwas *tert*-butylofenylofiofosfinowy **177**. Wykorzystywane są jego oba enancjomery (*S_P*) i (*R_P*).^{99, 151} Hammerschmidt i współpracownicy zastosowali izomer (*S_P*) tego związku do określenia konfiguracji absolutnej α - i β -hydroksyfosfonianów.^{153, 154}



Rysunek 36. Chiralne odczynniki solwujące.

Nieśląbnące zainteresowanie związkami fosforoorganicznymi zawierającymi hydroksylową grupę funkcyjną, ze względu na ich właściwości biologiczne, przejawia się w dążeniu zespołów badawczych do syntezy tych związków z jak najlepszymi wydajnościami i czystością enancjomeryczną, a także w uzyskaniu konkretnego izomeru, co wiąże się z zastosowaniem szybkich i łatwych metod określania konfiguracji absolutnej i ee. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się metody NMR z zastosowaniem chiralnych odczynników derywatyzujących: MTPA i MPA, które są z powodzeniem wykorzystywane do określenia konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów.

3. Cel pracy

W chemii organicznej coraz częściej alternatywą asymetrycznej syntezy chemicznej jest biokataliza. W reakcjach biokatalitycznych są stosowane zarówno enzymy (czyste lub podczyszczone preparaty enzymatyczne), jak i całe komórki mikroorganizmów.⁹⁷⁻¹²⁷ W zespole, w którym była prowadzona praca badawcza opisana w niniejszej rozprawie, od lat prowadzone są badania nad otrzymywaniem i właściwościami podstawionych kwasów fosfonowych ze względu na ich potencjalne zastosowanie jako inhibitorów enzymów lub prekursorów innych związków biologicznie aktywnych.^{96, 155, 156} Część z tych badań była poświęcona hydroksyfosfonianom ze względu na ich biologiczne właściwości. Do grupy tej należą zarówno leki na nadciśnienie, przeciwko osteoporozie i przeciwwirusowe. Aktywność tych związków zależy od konfiguracji absolutnej izomeru aktywnego i jego czystości optycznej. Niektóre z tych związków zawierają asymetryczny atom fosforu. Należą do nich między innymi α -hydroksyfosfiniany: **21** – inhibitor reniny (Rysunek 8)³² i **24** – lek przeciwko AIDS (Rysunek 10).³⁵

Do tej pory w naszym zespole opracowane zostały metody otrzymywania optycznie czystych hydroksyfosfonianów w reakcjach enancjoselektywnej hydrolizy acyloksyfosfonianów oraz redukcji oksofosfonianów za pomocą mikroorganizmów.^{109, 123, 124, 125} Wiele zespołów badawczych z powodzeniem otrzymuje hydroksyfosfiniany na drodze biotransformacji z zastosowaniem preparatów enzymatycznych. Lipazy używane zarówno w reakcjach hydrolizy, jak i transestryfikacji, charakteryzują się dobrą enancjoselektywnością oraz szerokim zastosowaniem^{97-108, 111-122}. Jednocześnie na świecie są podejmowane próby zwiększenia zarówno enancjoselektywności, jak i skuteczności lipaz poprzez modyfikację środowiska reakcji,^{103, 104, 157} a także poprzez chemiczną modyfikację preparatów enzymatycznych.¹⁵⁸

Ze względu na ciekawe właściwości biologiczne α -hydroksyfosfinianów z dwoma centrami asymetrii (na atomie węgla i atomie fosforu) postanowiono opracować metodę ich syntezy z jak największą czystością enancjomeryczną.

Cel ten postanowiono zrealizować dwiema drogami:

- 1) Poprzez enancjoselektywną hydrolizę acyloksyfosfinianów za pomocą lipaz (preparatów enzymatycznych) z różnych źródeł oraz mikroorganizmami lipolitycznymi.
- 2) Poprzez enancjoselektywną estryfikację hydroksyfosfinianów lipazami.
- 3) Dodatkowo postanowiono sprawdzić możliwość wpływu na enancjoselektywność zastosowanych biokatalizatorów modyfikując środowisko reakcji, a także poprzez podjęcie prób kowalencyjnej modyfikacji białka enzymatycznego.

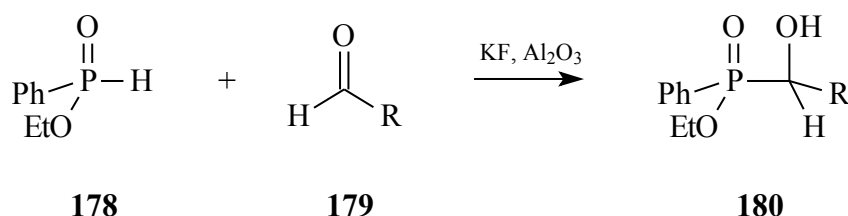
4. Badania własne

4.1. Biotransformacje.

W zespole, w którym wykonywana była niniejsza praca, prowadzone są od dawna badania nad otrzymaniem optycznie czystych hydroksyfosfonianów zarówno na drodze asymetrycznej syntezy⁵⁶ jak i biokatalizy.^{109, 123-125, 127} Do tej pory przeprowadzane były badania nad otrzymaniem hydroksyfosfonianów z jednym¹²³⁻¹²⁵ lub dwoma^{56, 127} centrami stereogenicznymi na atomach węgla. Postanowiono otrzymać optycznie czyste związki zawierające dwa centra chiralności (na atomie węgla i atomie fosforu) i grupę hydroksylową w pozycji α . W tym celu wybrano cztery przykładowe α -hydroksyfosfiniany i ich estry butyrylowe różniące się między sobą jednym podstawnikiem R. Wybrane zostały cztery podstawniki różniące się budową. Dwa z nich są alifatyczne, a dwa aromatyczne, różnią się również wielkością (od prostej grupy metylowej, do bardzo dużej grupy 3,4-dimetoksyfenylowej). Reakcje biotransformacji przeprowadzane z wykorzystaniem tych substratów przeprowadzone zostały zarówno na drodze hydrolizy jak i transestryfikacji z zastosowaniem lipaz i mikroorganizmów lipolitycznych. W trakcie przeprowadzania badań, opisanych w niniejszej pracy, ukazały się publikacje, w których otrzymano optycznie czyste α -hydroksyfosfiniany z dwoma centrami stereogenicznymi, zarówno na drodze enzymatycznej hydrolizy¹⁰⁶, jak i transestryfikacji,¹²⁰ jednak z zastosowaniem innych metod lub enzymów niż wykorzystane w niniejszej pracy.

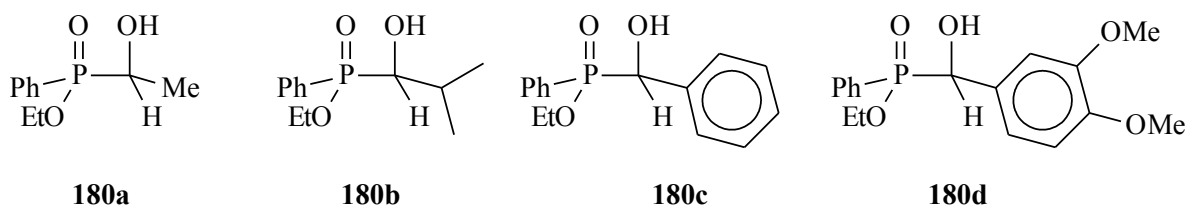
4.1.1. Synteza substratów biotransformacji.

Substratami biokatalitycznych reakcji transestryfikacji były α -hydroksyfosfiniany otrzymane zgodnie z procedurą opisaną przez Texier-Boulet¹⁵⁹ przedstawioną na poniższym schemacie.



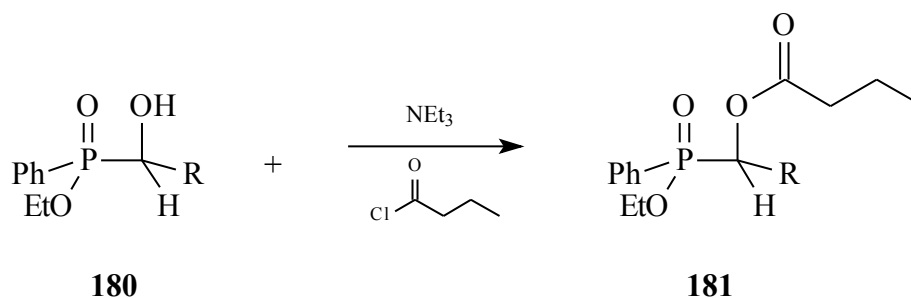
Schemat 51.

Tą metodą zostały zsyntetyzowane cztery α -hydroksyfosfiniany **180** z różnymi grupami R.



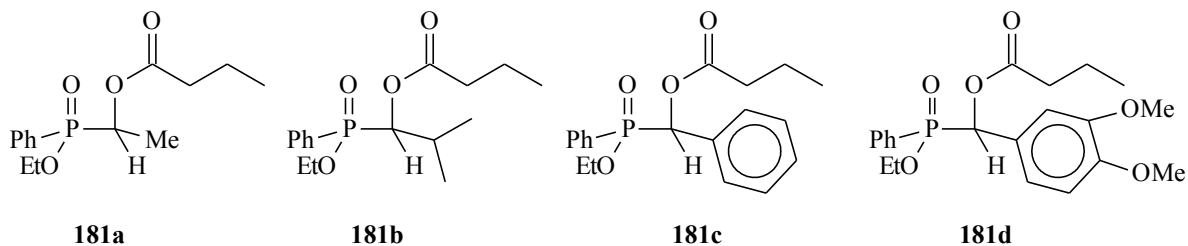
Rysunek 37. Substraty transestryfikacji.

W celu otrzymania substratów wykorzystanych w reakcjach hydrolizy, α -hydroksyfosfiniany **180** otrzymane metodą przedstawioną na schemacie 51, zostały poddane reakcji estryfikacji.



Schemat 52.

W ten sposób otrzymane zostały cztery α -butyryloksyfosfiniany **181** o różnych grupach R.



Rysunek 38. Substraty hydrolizy.

Oczyszczone za pomocą chromatografii kolumnowej α -hydroksyfosfiniany **180** oraz α -butyryloksyfosfiniany **181** w postaci mieszanin racemicznych dwóch par enancjomerów stanowiły substraty w późniejszych reakcjach biotransformacji.

4.1.2. Enzymatyczna hydroliza.

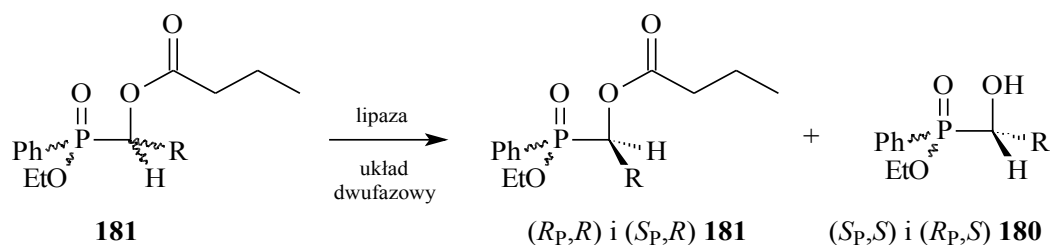
Zastosowanie preparatów enzymatycznych w reakcjach hydrolizy jest często wykorzystywaną metodą w biokatalitycznej syntezie chiralnych hydroksyfosfonianów. Enzymatyczna hydroliza estrów hydroksyfosfonianów ze względu na mechanizm działania lipaz, przeprowadzana była zazwyczaj w układzie dwufazowym (bufor fosforanowy pH = 7.0, mieszanina rozpuszczalników organicznych: heksan/ eter *tert*-butylometylowy).^{97, 98} Modyfikacja środowiska reakcji poprzez zastosowanie hydrofobowych rozpuszczalników

organicznych zmniejsza aktywność tych enzymów w reakcjach hydrolizy. Natomiast zastosowanie hydrofobowego rozpuszczalnika nasyconego roztworem wodnym soli takich jak $MgCl_2$, czy $LiCl$ znacząco zwiększa enancjoselektywność lipaz.¹⁶⁰

W badaniach nad enancjoselektywnością lipaz w reakcjach hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów **181**, zastosowany został zmodyfikowany układ dwufazowy. Zmiana, która została wprowadzona polegała na zastosowaniu zamiast eteru *tert*-butylometylowego, stosowanego przez Hammersmidt'a i współpracowników,^{97, 98} eteru diizopropylowego o podobnej hydrofobowości, natomiast bardziej dostępnego komercyjnie.

W reakcjach enzymatycznych (hydroliza, transestryfikacja) zastosowane zostały lipazy pochodzące z następujących mikroorganizmów: *Candida cylindracea* (CCL), *Aspergillus niger* (ANL), *Rhizopus niveus* (RNL), *Rhizopus species* (RSL), *Mucor javanicus* (MJL), *Penicillium roqueforti* (PRL), oraz lipaza z trzustki wieprzowej (PPL), immobilizowana na Sol-gel-AK lipaza z *Pseudomonas cepacia* (I-PCL) i immobilizowana in situ lipaza z *Mucor circinelloides* (I-MCL). Przed zastosowaniem powyższych lipaz w reakcjach biotransformacji została sprawdzona ich aktywność (mierzona w jednostkach aktywności na mg białka): CCL - 12.8 (U/mg), ANL - 0.020 (U/mg), RNL - 0.002 (U/mg), RSL - 0.002 (U/mg), MJL - 0.007 (U/mg), PRL - 0.002 (U/mg), PPL - 0.010 (U/mg). Dla lipaz immobilizowanych nie można było określić stężenia białka. W związku z tym, dla tych lipaz zmierzona została aktywność w jednostkach na mg preparatu i wynosi ona: I-PCL - 0.0015 (U/mg), I-MCL - 0.0018 (U/mg).

Reakcje hydrolizy lipazami przeprowadzone zostały z zastosowaniem wszystkich zsyntetyzowanych substratów **181** (Schemat 53). Wyniki tych badań zostały przedstawione w tabelach 1-4. Stopień przereagowania oraz ee zostały obliczone na podstawie widm ³¹P NMR z dodatkiem chininy zastosowanej jako czynnik dyskryminacji chiralnej.



Schemat 53.

Tabela 1. Hydroliza enzymatyczna 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** (100 mg lipazy, 0.2 mmol substratu).

lipaza	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
CCL	1	36	57	30	41
	1.5	66	78	21	22
ANL	24	34	41	>98	>98
	95	69	80	40	33
RNL	24	32	32	>98	>98
	95	34	34	>98	>98
RSL	18	46	47	>98	>98
	24	54	54	61	72
	95	65	55	45	74
MJL	24	49	49	>98	>98
	95	46	48	>98	>98
PRL	24	45	47	>98	>98
	95	53	60	73	47
PPL	1	46	47	>98	>98
	24	44	45	>98	>98
I-PCL	24	0	0	-	-
	95	46	10	>98	>98
I-MCL	21	40	40	>98	>98

Tabela 2. Hydroliza enzymatyczna 1-butyryloksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181b** (100 mg lipazy, 0.2 mmol substratu).

lipaza	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
CCL	166	39	53	>98	62
ANL	166	21	41	>98	90
RNL	166	0	0	-	-
RSL	166	0	0	-	-
MJL	166	0	0	-	-
PRL	166	0	0	-	-
PPL	166	32	52	>98	>98
I-PCL	166	0	0	-	-
I-MCL	166	0	0	-	-

Tabela 3. Hydroliza enzymatyczna 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c** (100 mg lipazy, 0.2 mmol substratu).

lipaza	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
CCL	24	48	48	80	83
ANL	48	57	40	32	78
RNL	166	0	0	-	-
RSL	166	0	0	-	-
MJL	166	0	0	-	-
PRL	166	0	0	-	-
PPL	166	22	16	*	6**
I-PCL	166	0	0	-	-
I-MCL	166	0	0	-	-

* - ee < 5%

** - przewaga izomeru (*S_P*,*R*)

Tabela 4. Hydroliza enzymatyczna 1-butyryloksy-1-(3,4-dimetoksyfenylo)metano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181d** (100 mg lipazy, 0.2 mmol substratu).

lipaza	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
CCL	168	44	41	42	52
ANL	22	46	36	54	82
RNL	168	<5	<5	-	-
RSL	168	<5	<5	-	-
MJL	168	0	0	-	-
PRL	168	<5	<5	-	-
PPL	168	25	9	82	*
I-PCL	168	0	0	-	-
I-MCL	168	<5	<5	-	-

* - ee < 5%

Jak wynika z powyższych tabel, jedynie lipazy z *Candida cylindracea* (CCL), *Aspergillus niger* (ANL) i trzustki wieprzowej (PPL) są efektywnymi biokatalizatorami w reakcjach hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów **181**, a ich enancjoselektywność zależy od zastosowanego substratu. Lipazy PPL i ANL wykazują wysoką enancjoselektywność ($\geq 90\%$) wobec substratów: **181a** i **b**. Są to związki z podstawnikiem alifatycznym. Lipaza CCL wykazuje najwyższą enancjoselektywność wobec substratów **181b** i **c**. Tylko związek z niewielką grupą R = -CH₃ (mała zawada steryczna) **181a** był hydrolizowany przez pozostałe zastosowane lipazy, które wykazały bardzo wysoką enancjoselektywność ($>98\%$) wobec tego substratu. Ponieważ reakcje biotransformacji są wykorzystywane w alternatywie do asymetrycznej syntezy, bardzo ważnym czynnikiem jest czas reakcji. Aktywność lipaz (i związany z nią czas reakcji) również zależała od substratu. Wszystkie lipazy były najbardziej aktywne wobec substratu z najmniejszą grupą R **181a** (czas reakcji dla większości lipaz = 1 – 24 h), a najmniej aktywne wobec substratu z dużą zawadą steryczną R = -CH(CH₃)₃ **181b**.

W trakcie przeprowadzanych reakcji hydrolizy α -hydroksyfosfinianów postanowiono sprawdzić wydajność chemiczną otrzymanych produktów. W tym celu wybrano reakcje hydrolizy lipazą z *Candida cylindracea* wszystkich posiadanych substratów. Wyniki tych obliczeń podano w tabeli 5.

Tabela 5. Obliczenia wydajności chemicznej produktów powstających w wyniku reakcji hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów **181** lipazą z *Candida cylindracea* (100 mg lipazy, 0.2 mmol substratu).

substrat	ilość substratu [mg]	ilość produktu [mg]	wydajność reakcji [%]	straty po ekstrakcji [%]	straty po oczyszczaniu [%]
181a	57	6	14	46	62
		8	19	42	50
		11	26	37	16
181b	62	13	27	15	31
		19	40	21	9
		7	15	42	47
181c	69	10	18	39	21
		9	16	51	21
		10	18	32	44
181d	81	16	24	30	21
		18	27	23	22
		19	28	15	17

Jak wynika z tabeli 5 wyniki obliczeń wydajności chemicznej nie są powtarzalne. Wydajność chemiczna jest niewielka (14 – 40%), co jest spowodowane stratami powstałymi w wyniku ekstrakcji (15 – 51%) i oczyszczania produktu (9 – 62%). Dodatkowo obliczenia te były obciążone dużymi błędami, które wynikały z bardzo małych ilości otrzymanych produktów (6 – 19 mg) i czułości wagi ($d = \pm 1$ mg). Ponieważ wyniki te nie są ze sobą kompatybilne w dalszej części pracy nie obliczano wydajności reakcji biotransformacji.

Po analizie wyników badań nad enancjoselektywnością lipaz w układzie dwufazowym do dalszych badań nad modyfikacją środowiska reakcji wybrana została lipaza z *Candida cylindracea* oraz substraty **181a** i **c**, ze względu na niską enancjoselektywność tej lipazy. Ponadto lipaza ta wykazuje wobec obu związków dobrą aktywność (czas reakcji dla **181a** wynosi 1 h, a dla **181c** – 24 h).

Przeprowadzone zostały reakcje hydrolizy w eterze diizopropylowym nasyconym wodą lub roztworami wodnymi soli: LiCl i MgCl₂ metodą opisaną przez Okamoto i Ueji¹⁶⁰ oraz 2% roztworem Tritonu X-100. Związki te zapobiegają agregacji preparatu enzymatycznego i

mają wpływ na poprawę enancjoselektywności. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w tabelach 6 i 7.

Tabela 6. Porównanie hydrolizy enzymatycznej 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** w układzie dwufazowym (Tabela 1) i w rozpuszczalniku organicznym nasyconym wodą lub wodnymi roztworami soli (LiCl lub MgCl₂) lub Tritonu X-100 (100 mg lipazy, 0.036 mmol substratu, 15 µl wody lub wodnego roztworu dodatku).

dodatek	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P,R</i>); (<i>S_P,S</i>)	(<i>R_P,S</i>); (<i>S_P,R</i>)	(<i>S_P,S</i>)	(<i>R_P,S</i>)
brak *	1	36	57	30	41
brak	2	37	63	18	50
MgCl ₂	2	37	65	21	46
LiCl	2	33	61	16	48
Triton X-100	2	37	63	15	45

* – hydroliza w układzie dwufazowym

Tabela 7. Porównanie hydrolizy enzymatycznej 1-butyryloksyfenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c** w układzie dwufazowym (Tabela 3) i w rozpuszczalniku organicznym nasyconym wodą lub wodnymi roztworami soli (LiCl lub MgCl₂) lub Tritonu X-100 (100 mg lipazy, 0.036 mmol substratu, 15 µl wody lub wodnego roztworu dodatku).

dodatek	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P,R</i>); (<i>S_P,S</i>)	(<i>R_P,S</i>); (<i>S_P,R</i>)	(<i>S_P,S</i>)	(<i>R_P,S</i>)
brak *	24	48	48	80	83
brak	168	48	34	28	18
MgCl ₂	168	24	20	11	11
LiCl	168	21	20	18	11
Triton X-100	168	29	23	25	14

* – hydroliza w układzie dwufazowym

Zmiana środowiska reakcji hydrolizy na rozpuszczalnik organiczny nasycony wodą zmniejsza enancjoselektywność lipazy z *Candida cylindracea*, natomiast dodatek soli MgCl₂, LiCl lub Tritonu X-100, nie ma wpływu na poprawę enancjoselektywności. Zastosowanie takiego układu wiąże się dodatkowo ze znacznym spadkiem aktywności lipazy. Pomimo zastosowania ponad pięciokrotnie mniejszej ilości substratu, czas reakcji

wymagał siedmiokrotnego wydłużenia w przypadku reakcji hydrolizy związku **181c**. Ponieważ zaobserwowano znaczny spadek aktywności lipazy w układzie: rozpuszczalnik organiczny nasycony wodą, podjęte zostały również próby hydrolizy w zmodyfikowanym układzie dwufazowym, w którym aktywność lipazy jest znacznie większa, z zastosowaniem wcześniej wykorzystanych związków w celu sprawdzenia ich wpływu na enancjoselektywność lipazy.

Tabela 8. Hydroliza enzymatyczna 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** w układzie dwufazowym z dodatkiem soli (LiCl lub MgCl₂) lub Tritonu X-100 (20 mg lipazy, 0.036 mmol substratu, 1 ml wody lub wodnego roztworu dodatku).

dodatek	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
brak	1	44	60	13	44
MgCl ₂	1	39	67	16	46
LiCl	1	40	64	20	28
Triton X-100	1	47	61	29	58

Tabela 9. Hydroliza enzymatyczna 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c** w układzie dwufazowym z dodatkiem soli (LiCl lub MgCl₂) lub Tritonu X-100 (20 mg lipazy, 0.036 mmol substratu, 1 ml wody lub wodnego roztworu dodatku).

dodatek	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
brak	48	59	59	64	49
MgCl ₂	48	35	30	67	38
LiCl	48	40	37	70	46
Triton X-100	48	71	67	30	34

Niestety użycie powyższych związków w układzie dwufazowym nie spowodowało zwiększenia enancjoselektywności lipazy z *Candida cylindracea*. Natomiast można zauważyć, że dodatek Tritonu X-100 wpływa na zwiększenie aktywności tej lipazy w stosunku do substratu **181c**. Postanowiono sprawdzić, czy dodatek ten zwiększy również szybkość reakcji hydrolizy **181c** lipazą z trzustki wieprzowej (lipaza o niskiej aktywności i enancjoselektywności względem substratu **181c** – Tabela 3). W tym celu przeprowadzona została reakcja w układzie dwufazowym z dodatkiem 2% Tritonu X-100.

Tabela 10. Porównanie hydrolizy enzymatycznej 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c** w układzie dwufazowym bez dodatku (Tabela 3) i z dodatkiem 2% Tritonu X-100 (20 mg lipazy, 0.2 mmol substratu).

dodatek	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
brak	168	22	16	*	6**
Triton X-100	96	54	35	21	22

* - ee < 5%

** - przewaga izomeru (*S_P*,*R*)

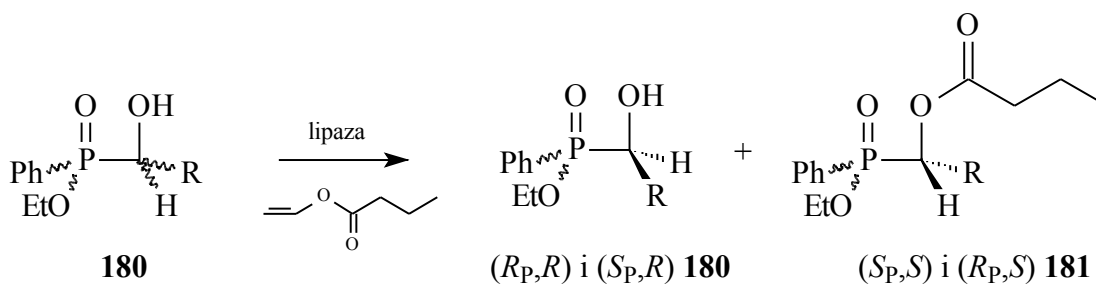
Dodatek Tritonu X-100 znacząco poprawił szybkość reakcji i zwiększył jej enancjoselektywność wobec substratu **181c**.

4.1.3. Transestryfikacje.

Lipazy enzymami są szeroko stosowanymi w reakcjach rozdziału kinetycznego α -hydroksyfosfonianów. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu nieodwracalną transestryfikację z zastosowaniem octanu winylu lub innego donoru acylu.¹¹¹⁻¹²⁰ Badania nad poprawą enancjoselektywności lipaz wskazują, że zastosowanie zasadowych dodatków takich jak: pirydyna, imidazol, czy trietyloamina, ma jednocześnie wpływ na szybkość jak i enancjoselektywność reakcji.¹⁵⁷

Podczas wykonywania pracy badawczej opisaney w niniejszej rozprawie ukazała się publikacja na temat rozdziału kinetycznego α -hydroksyfosfinianów (między innymi związków **180a** i **b**). Zastosowano tam mieszaninę racemiczną jednej pary enancjomerów każdego z substratów. Donorem acylu był octan winylu, oraz użyto innych preparatów enzymatycznych niż przedstawione w niniejszej rozprawie.¹²⁰

Reakcje estryfikacji α -hydroksyfosfinianów **180** (Schemat 54) przeprowadzone zostały zgodnie z procedurą opisaną przez Shioji i współpracowników¹¹⁹ w bezwodnym środowisku organicznym (eter diizopropylowy) z dodatkiem sit molekularnych 3Å, które dodatkowo usuwają wodę. Donorem acylu był maślan winylu. Reakcje zostały przeprowadzone dla wszystkich substratów, ale tylko jeden z nich **180a** był estryfikowany niektórymi lipazami. Stopień przereagowania został obliczony na podstawie widm ³¹P NMR, natomiast ee na podstawie chromatogramów HPLC z chiralną kolumną.



Schemat 54.

Otrzymane wyniki dla związku **180a** przedstawione zostały w tabeli 11.

Tabela 11. Estryfikacje 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180a** (0.023 mmol substratu).

lipaza	ilość lipazy [mg]	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee estru [%]	
			(<i>R_p</i> , <i>R</i>); (<i>S_p</i> , <i>S</i>)	(<i>R_p</i> , <i>S</i>); (<i>S_p</i> , <i>R</i>)	(<i>S_p</i> , <i>S</i>)	(<i>R_p</i> , <i>S</i>)
CCL	200	72	42	44	79	91
ANL	200	168	44	44	>98	91
RNL	200	168	<5	<5	-	-
MJL	20	96	46	48	51	38
PPL	20	24	45	40	>98	>98
I-PCL	20	24	43	26	>98	>98
I-MCL	20	24	47	43	>98	>98

Jak można wywnioskować z powyższej tabeli, lipaza z trzustki wieprzowej (PPL), immobilizowana lipaza z *Pseudomonas cepacia* (I-PCL) oraz immobilizowana lipaza z *Mucor circinelloides* (I-MCL) są bardzo dobrymi biokatalizatorami w reakcjach estryfikacji α -hydroksyfosfinianu **180a**. Lipaza z *Mucor javanicus* (MJL) jest również aktywna wobec tego substratu, ale znacznie mniej enancjoselektywna. Lipazy z *Aspergillus niger* (ANL) i *Candida cylindracea* (CCL) wykazują dużo mniejszą aktywność, a ilość lipazy wymagała 10-krotnego zwiększenia. Natomiast lipaza z *Rhizopus niveus* (RNL) jest wobec tego substratu nieaktywna.

Do dalszych badań nad poprawą enancjoselektywności lipaz za pomocą związków o charakterze zasadowym wybrane zostały lipazy z *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* i *Mucor javanicus*. Wszystkie te lipazy wykazują średnią lub dobrą enancjoselektywność wobec związku **180a**. Zasadowymi dodatkami wybranymi do tych badań były: pirydyna i trietyloamina. Stopień konwersji i ee zostały obliczone tak jak dla reakcji transestryfikacji bez tych związków.

W tabeli 12 porównane zostały wyniki z reakcji transestryfikacji z dodatkami i bez nich.

Tabela 12. Estryfikacje 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180a** bez dodatków i z dodatkami (0.023 mmol substratu, 1eq. dodatku).

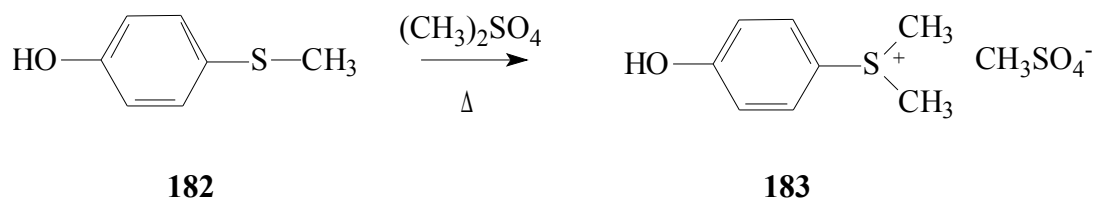
lipaza	ilość lipazy [mg]	dodatek	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee estru [%]	
				(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
CCL	200	-	72	42	44	79	91
	200	NEt₃	72	46	40	90	95
	200	pirydyna	72	41	39	85	79
ANL	200	-	168	44	44	>98	91
	200	NEt₃	168	43	43	>98	93
	200	pirydyna	168	50	53	>98	89
MJL	20	-	96	46	48	51	38
	20	NEt₃	96	50	45	>98	79
	20	pirydyna	96	43	43	47	37

Modyfikacja środowiska reakcji transestryfikacji poprzez dodanie trietyloaminy znacząco poprawiła enancjoselektywność lipaz, natomiast dodanie pirydyny nie ma większego wpływu.

4.1.4. Chemiczne modyfikacje lipaz.

Od kilkunastu lat prowadzone są badania nad chemiczną modyfikacją lipaz w celu zwiększenia ich aktywności bądź enancjoselektywności. Między innymi takie badania podjęli Ueji i współpracownicy.¹⁵⁸ Zastosowali oni chemiczną modyfikację preparatów enzymatycznych za pomocą estrów metylosiarczanu *p*-hydroksyfenylodimetylosulfoniowego DSP (tzw. estrów aktywnych) działających w środowisku wodnym. Estry te są donorami acylu dla wolnych grup aminowych oraz hydroksylowych i poprzez blokowanie tych grup hydrofobowymi podstawnikami, zmieniają hydrofobowość zarówno całej lipazy jak i centrum aktywnego.

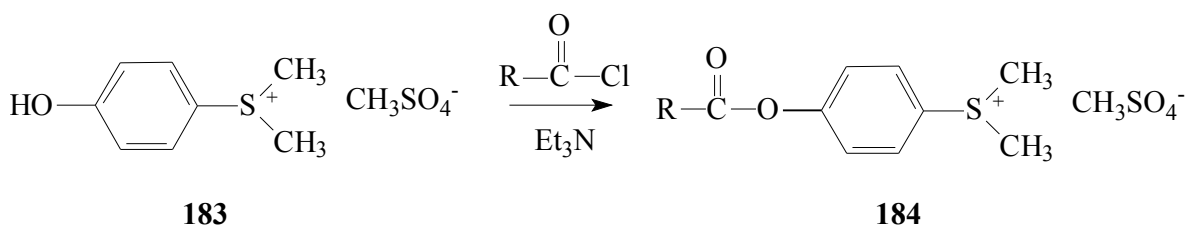
DSP został zsyntetyzowany zgodnie z procedurą opisaną przez Bordwell'a i Boutan'a przedstawioną na schemacie 55.¹⁶¹



Schemat 55.

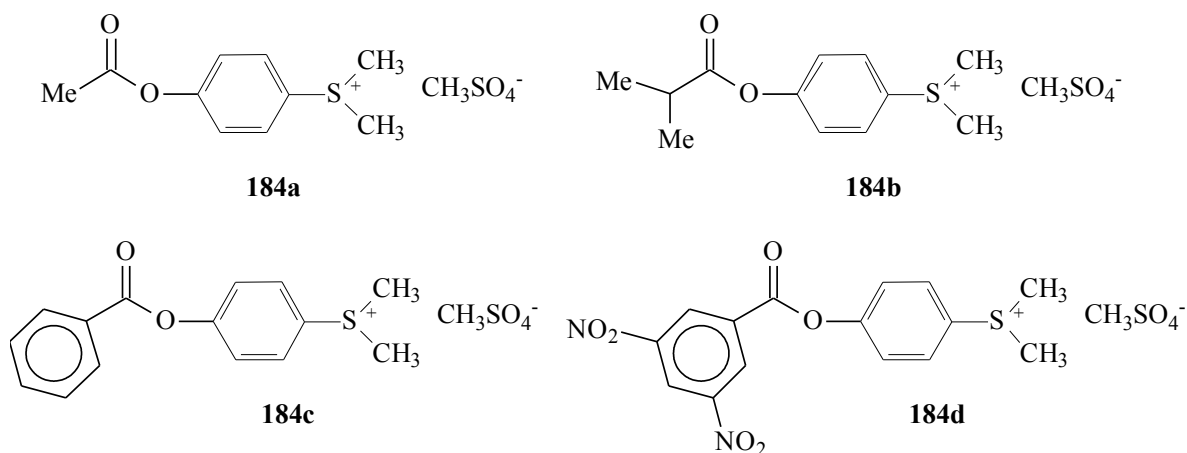
Otrzymany w ten sposób DSP był następnie oczyszczony za pomocą krystalizacji i wykorzystany do otrzymania estrów aktywnych z różnymi grupami hydrofobowymi.

W tym celu zastosowana została metoda opisana przez Okai i współpracowników przedstawiona na schemacie 56.¹⁶²



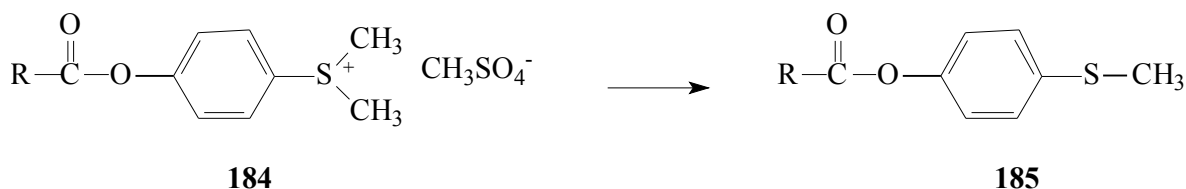
Schemat 56.

Otrzymano w ten sposób cztery estry aktywne przedstawione na rysunku 39.



Rysunek 39. Estry aktywne.

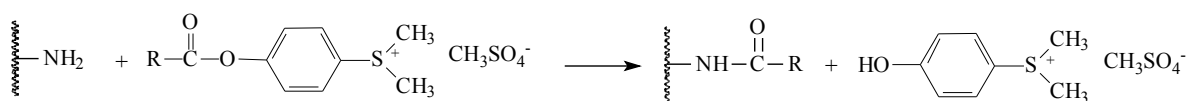
Otrzymane estry aktywne były podczyszczane za pomocą krystalizacji. Ponieważ stopień oczyszczenia nie był zadowalający podjęte zostały próby otrzymania czystych związków innymi metodami, między innymi za pomocą HPLC na preparatywnej kolumnie z odwróconą fazą. Niestety estry aktywne okazały się bardzo nietrwałymi związkami ulegającymi rozpadowi podczas oczyszczania za pomocą chromatografii. Rozpad ten przedstawiono na schemacie 57.



Schemat 57.

W związku z nietrwałością otrzymanych estrów aktywnych, do reakcji modyfikacji lipaz zostały użyte związki podczyszczone za pomocą krystalizacji. Ich czystość została obliczona na podstawie widm ^1H NMR i wynosi odpowiednio: **184a** – 29% (zanieczyszczony chlorowodorkiem trietyloaminy i estrem **185a**); **184b** – 38% (zanieczyszczony chlorowodorkiem trietyloaminy i estrem **185b**); **184c** – 39% (zanieczyszczony chlorowodorkiem trietyloaminy); **184d** – 89% (zanieczyszczony chlorowodorkiem trietyloaminy).

Preparat enzymatyczny z *Candida cylindracea* został podczyszczony za pomocą dializy, a następnie poddany chemicznej modyfikacji metodą opisaną w przez Takahashi i współpracowników.¹⁶³ Schemat działania estrów aktywnych na wolne grupy aminowe i hydroksylowe białka enzymatycznego został przedstawiony na schemacie 58.



Schemat 58.

Za pomocą chemicznej modyfikacji grupami hydrofobowymi (benzoilową, 3,5-dinitrobenzoilową, *izo*-butyrylową i acetylową) otrzymane zostały cztery preparaty enzymatyczne: Z(33)-CCL, Zdn(30)-CCL, *i*-Bu(34)-CCL oraz Ac(12)-CCL (stopień modyfikacji podany w nawiasie). Podczyszczona, niezmodyfikowana lipaza N-CCL oraz zmodyfikowane preparaty enzymatyczne zostały użyte w reakcjach biotransformacji. Przed zastosowaniem powyższych lipaz została sprawdzona ich aktywność. Ponieważ chemiczna modyfikacja preparatu enzymatycznego wpływa na ilość wiązań karbonylowych, wolnych grup hydroksylowych i aminowych, nie znaleziono metody pomiaru zawartości białka, która byłaby niezależna od ilości tych grup i dawała poprawne wyniki. W związku z tym pomiar aktywność mierzono w jednostkach aktywności na mg preparatu enzymatycznego: Z(33)-CCL – 8.77 (U/mg), Zdn(30)-CCL – 6.70 (U/mg), *i*-Bu(34)-CCL – 4.56 (U/mg), Ac(12)-CCL – 6.75 (U/mg) oraz N-CCL – 5.20 (U/mg). Jedynie w przypadku niezmodyfikowanej lipazy była możliwość określenia zawartości białka w preparacie. Aktywność niezmodyfikowanej lipazy na mg białka wynosi: 45.30 (U/mg).

Do reakcji enzymatycznej hydrolizy został wybrany związek **181a**, ze względu na dużą aktywność lipazy z *Candida cylindracea* wobec tego substratu. Wyniki tych reakcji zostały przedstawione w tabeli 13. Stopień przereagowania oraz ee zostały obliczone na podstawie widm ^{31}P NMR z dodatkiem chininy.

Tabela 13. Hydroliza 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** modyfikowanymi lipazami w układzie dwufazowym (0.2 mmol substratu, 20 mg lipazy).

lipaza	czas reakcji [min]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>); (<i>S_P</i> , <i>R</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
N-CCL	40	64	78	11	43
Z(33)-CCL	40	36	60	9	45
Zdn(30)-CCL	40	48	71	21	45
i-Bu(34)-CCL	40	52	78	5	36
Ac(12)-CCL	40	27	47	23	49

Jak widać z tabeli 13 modyfikacja lipazy z *Candida cylindracea* nie polepszyła jej właściwości biokatalitycznych wobec substratu **181a**. Przeprowadzone zostały również próby estryfikacji zmodyfikowanymi lipazami związku **180a**, jednakże żadna z nich nie katalizowała tej reakcji.

4.1.5. Biotransformacje za pomocą mikroorganizmów lipolitycznych.

Do tej pory w literaturze ukazała się jedna publikacja na temat hydrolizy estrów hydroksyfosfosfonianów, w której jako biokatalizatory zostały zastosowane dwa szczepy mikroorganizmów: *Pseudomonas fluorescens* i *Penicillium citrinum*.¹⁰⁹ Zastosowanie w biokatalizie całych komórek mikroorganizmów jest bardzo obiecującą metodą, szczególnie ze względu na niski koszt przeprowadzanych reakcji w porównaniu do reakcji enzymatycznych (pominięcie etapu izolacji i oczyszczania enzymu).

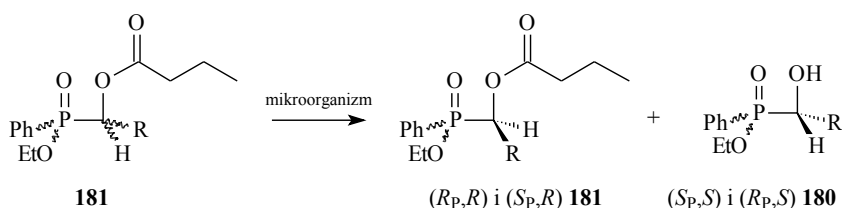
Zastosowanie całych komórek mikroorganizmów wiąże się z zastosowaniem środowiska wodnego, gdyż jest to naturalne środowisko dla procesów zachodzących w komórkach, a próba zmiany na układ dwufazowy, czy rozpuszczalnik organiczny wiąże się ze spadkiem aktywności enzymatycznej. Można to częściowo ograniczyć przeprowadzając immobilizację komórek.

W celu poprawy dostępu substratu do aparatu enzymatycznego komórki można zastosować permeabilizację. Proces ten polega na zwiększeniu przepuszczalności błony komórkowej

poprzez zniszczenie ciągłości jej struktury. Permeabilizacja pozwala na uzyskanie biokatalizatora o znacznie wyższej aktywności niż całe komórki mikroorganizmów.

W badaniach nad enancjoselektywnością reakcji hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów **181** i aktywnością aparatów enzymatycznych znajdujących się w komórkach mikroorganizmów zastosowane zostały cztery szczepy bakterii: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter baumannii* i *Serratia liquefaciens*. Ponieważ aktywność enzymów komórkowych jest ściśle związana z fazą wzrostu, w jakiej znajduje się mikroorganizm, przeprowadzone zostały badania nad określeniem czasu przejścia mikroorganizmów z fazy logarytmicznej do fazy stacjonarnej: *Pseudomonas aeruginosa* – 26 h, *Bacillus subtilis* – 31 h, *Acinetobacter baumannii* – 29 h i *Serratia liquefaciens* – 33 h.

Reakcje hydrolizy katalizowane całymi komórkami mikroorganizmów przeprowadzono na dwóch wybranych substratach **181a** i **c** (Schemat 59) w 0.017 M buforze fosforanowym (pH = 7.00). Wyniki tych badań zostały przedstawione w tabelach 14 i 15. Stopień przereagowania oraz ee zostały obliczone na podstawie widm ^{31}P NMR z dodatkiem chininy.



Schemat 59.

Tabela 14. Hydroliza 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** za pomocą całych komórek mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych (50 μl substratu).

szczep	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>S_p</i> , <i>R</i>); (<i>R_p</i> , <i>S</i>)	(<i>R_p</i> , <i>R</i>); (<i>S_p</i> , <i>S</i>)	(<i>R_p</i> , <i>S</i>)	(<i>S_p</i> , <i>S</i>)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22	20	7	>98	>98
	71	32	17	>98	68
<i>Bacillus subtilis</i>	20	30	33	>98	>98
	24	41	41	>98	79
<i>Acinetobacter baumannii</i>	48	38	36	>98	68
	72	60	43	20	66
<i>Serratia liquefaciens</i>	94	17	9	49	39

Tabela 15. Hydroliza 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c** za pomocą całych komórek mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych (50 μ l substratu).

szczep	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
		(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>S_P</i> , <i>R</i>); (<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48	30	14	62	72
	94	41	27	31	38
<i>Bacillus subtilis</i>	24	49	50	90	90
	72	82	77	24	31
<i>Acinetobacter baumannii</i>	48	33	16	4	33
	72	79	76	19	39
	48	12	5	47*	18
	72	35	20	53*	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	90	44	67	51	66
	168	68	63	11	28
	72	13	10	44*	6**

* - przewaga izomeru (*R_P*,*R*)

** - przewaga izomeru (*S_P*,*R*)

Bardzo dobre rezultaty, zarówno jeżeli chodzi o aktywność, jak i enancjoselektywność, dało zastosowanie komórek szczepu *Bacillus subtilis* w reakcjach hydrolizy obu estrów. Natomiast zastosowanie komórek szczepów *Acinetobacter baumannii* i *Serratia liquefaciens* dało nie tylko gorsze rezultaty dla obu substratów, ale również brak powtarzalności wyników w przypadku hydrolizy związku **181c**.

W celu poprawy dostępu substratów do aparatu enzymatycznego komórki, a przez to szybkości reakcji, zastosowana została permeabilizacja, którą przeprowadzono metodą opisaną przez Serrano i współpracowników.¹⁶⁴

Przeprowadzone zostały badania z wykorzystaniem permeabilizowanych komórek wszystkich posiadanych szczepów na dwóch substratach **181a** i **c**. Wyniki tych badań zostały przedstawione w tabelach 16 i 17. Stopień przereagowania oraz ee zostały obliczone na podstawie widm ³¹P NMR z dodatkiem chininy.

Tabela 16. Hydroliza 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** za pomocą permeabilizowanych komórek mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych (50 μ l substratu).

szczep	modyfikacja	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
			(<i>S_P</i> , <i>R</i>); (<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	22	20	7	>98	>98
	permeabilizacja	48	17	10	>98	43
<i>Bacillus subtilis</i>	-	20	30	33	>98	>98
	permeabilizacja	22	16	22	71	83
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	48	38	36	>98	68
	permeabilizacja	48	30	36	44	50
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	94	17	9	49	39
	permeabilizacja	48	26	24	25	17

Tabela 17. Hydroliza 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c** za pomocą permeabilizowanych komórek mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych (50 μ l substratu).

szczep	modyfikacja	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
			(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>S_P</i> , <i>R</i>); (<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)
<i>Bacillus subtilis</i>	-	24	49	50	90	90
	permeabilizacja	22	44	41	94	89
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	48	12	5	47*	18
	permeabilizacja	48	12	<5	43*	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	72	13	10	44*	6**
	permeabilizacja	90	8	<5	28*	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	94	41	27	31	38
	permeabilizacja	90	48	28	86	84

* - przewaga izomeru (*R_P*,*R*)

** - przewaga izomeru (*S_P*,*R*)

W przypadku zastosowania permeabilizowanych komórek szczepu *Pseudomonas aeruginosa* w reakcji hydrolizy związku **181a** zaobserwowano gorszą aktywność i enancjoselektywność. W przypadku zastosowania związku **181c** aktywność się nie zmieniła, natomiast enancjoselektywność wzrosła. Zastosowanie permeabilizowanych komórek szczepu *Serratia liquefaciens* spowodowało wzrost aktywności tego biokatalizatora wobec substratu **181a**, natomiast spadek wobec substratu **181c**. W pozostałych przypadkach zastosowanie permeabilizowanych komórek nie wpłynęło na aktywność i enancjoselektywność lub je obniżyło.

W celu umożliwienia zastosowania komórek mikroorganizmów w układzie dwufazowym poddano je immobilizacji w alginianie wapnia (mikrokapsułkowanie).¹⁶⁵ Jest to najlepsza metoda immobilizacji umożliwiająca zastosowanie biokatalizatora w układzie dwufazowym.

Przeprowadzone zostały badania nad hydrolizą substratu **181a** z wykorzystaniem immobilizowanych komórek wszystkich posiadanych szczepów w buforze fosforanowym i układzie dwufazowym. Wyniki tych badań zostały przedstawione w tabelach 18 i 19. Stopień przereagowania został obliczony na podstawie widm ³¹P NMR, natomiast ee na podstawie chromatogramów HPLC z chiralną kolumną.

Tabela 18. Hydroliza 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** za pomocą immobilizowanych komórek mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych w buforze fosforanowym (50 μl substratu).

szczep	modyfikacja	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
			(<i>S_P</i> , <i>R</i>); (<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	22	20	7	>98	>98
	immobilizacja	168	12	6	76	38
<i>Bacillus subtilis</i>	-	20	30	33	>98	>98
	immobilizacja	22	35	32	95	>98
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	48	38	36	>98	68
	immobilizacja	168	26	24	95	39
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	94	17	9	49	39
	immobilizacja	168	<5	<5	-	-

Tabela 19. Hydroliza 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181a** za pomocą immobilizowanych komórek mikroorganizmów o właściwościach lipolitycznych w układzie dwufazowym (0.2 mmol substratu).

szczep	modyfikacja	czas reakcji [h]	stopień przereagowania [%]		ee [%]	
			(<i>S_P</i> , <i>R</i>); (<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>R</i>); (<i>S_P</i> , <i>S</i>)	(<i>R_P</i> , <i>S</i>)	(<i>S_P</i> , <i>S</i>)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	71	32	17	>98	68
	immobilizacja	168	51	27	79	45
<i>Bacillus subtilis</i>	-	24	41	41	>98	79
	immobilizacja	168	35	36	81	51
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	48	38	36	>98	68
	immobilizacja	168	48	50	92	95
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	94	17	9	49	39
	immobilizacja	168	22	10	86	32

Hydroliza immobilizowanymi komórkami bakterii w buforze fosforanowym przeprowadzona została w celu sprawdzenia zmian w aktywności tych biokatalizatorów. Jak wynika z tabeli 18 tylko w przypadku immobilizacji komórek szczepu *Bacillus subtilis* nie zaobserwowano zmiany aktywności, natomiast w pozostałych przypadkach proces ten znacznie ją obniżył.

Immobilizacja komórek mikroorganizmów umożliwiła zastosowanie tych biokatalizatorów w układzie dwufazowym, jednakże wiąże się to ze spadkiem aktywności. Enancjoselektywność w większości przypadków została nieznacznie obniżona (tylko w przypadku zastosowania immobilizowanych komórek szczepu *Serratia liquefaciens* zaobserwowano wzrost enancjoselektywności wobec jednej pary enancjomerów (*S_P*,*R*) (*R_P*,*S*) substratu **181a**).

4.2. Określenie konfiguracji absolutnej.

Metody NMR są od dawna wykorzystywane do określenia konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów z jednym centrum stereogenicznym. Najczęściej stosuje się chiralne czynniki derywatyżujące takie jak: kwas α -metoksy- α -trifluorometylofenylooctowy (MTPA) i kwas α -metoksyfenylooctowy (MPA), za pomocą podwójnej derywatacji. Były również podejmowane próby zastosowania tych metod do określenia konfiguracji absolutnej polifunkcyjnych (posiadających więcej niż jedno centrum asymetrii) hydroksyfosfonianów. Jednak ze względu na powstające w ten sposób dodatkowe centra chiralności należy zastosować modele uwzględniające przesłaniająco-odsłaniający wpływ wszystkich podstawników arylowych obecnych w zderywatyżowanej pochodnej badanego związku.^{166, 167}

W przypadku α -hydroksyfosfinianów **180**, można zastosować chiralny odczynnik derywatyżujący, mając na uwadze, że metoda ta umożliwi określenie konfiguracji absolutnej tylko na α atomie węgla. Shioji i współpracownicy wykorzystali chlorek (*R*)-MTPA-Cl do określenia konfiguracji absolutnej jednej pary enancjomerów związku **180a**.¹²⁰ Ta sama metoda, ale z zastosowaniem chlorku (*S*)-MTPA-Cl, została zastosowana do określenia konfiguracji absolutnej na α atomie węgla wszystkich α -hydroksyfosfinianów **180**.

Do określenia konfiguracji absolutnej na atomie fosforu 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180a** oraz 1-hydroksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180b** posłużono się danymi literaturowymi,¹²⁰ konfigurację absolutną jednego izomeru 1-hydroksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180c** określono za pomocą krytalografii, natomiast konfigurację absolutną na atomie fosforu 1-hydroksy-1-(3,4-dimetoksyfenylo)metano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180d** określono na podstawie wyników uzyskanych z widm ³¹P NMR z chininą wszystkich α -hydroksyfosfinianów.

4.2.1. Określenie konfiguracji absolutnej 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu oraz 1-hydroksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu.

W trakcie wykonywania pracy badawczej postanowiono rozdzielić pary enancjomerów (diastereoizomery) wszystkich posiadanych substratów biotransformacji za pomocą chromatografii kolumnowej. W tym celu testowano kilka eluentów. W rozdziale

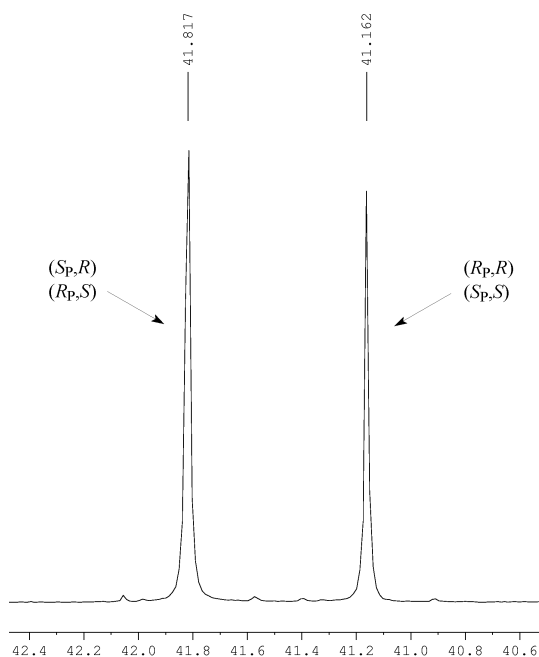
diastereoizomerów związku **181c** najlepszym okazał się eluent trójskładnikowy o składzie: chlorek metylenu:*n*-heksan:octan etylu - 1:1:0.5, który z wydajnością 10% pozwolił otrzymać jedną czystą parę enancjomerów 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c**. Niestety nie udało się uzyskać czystej drugiej pary enancjomerów, ani żadnej pary enancjomerów pozostałych α -butyryloksyfosfinianów. Otrzymano natomiast estry **181** zawierające mieszaniny diastereoizomerów o stosunku innym niż 1:1, które posłużyły do określenia konfiguracji absolutnej na α atomie węgla wszystkich α -hydroksyfosfonianów.

W trakcie wykonywania pracy badawczej opisaney w niniejszej rozprawie ukazała się publikacja na temat rozdziału kinetycznego α -hydroksyfosfinianów (między innymi związków **180a** i **b**). Zastosowano tam mieszaninę racemiczną jednej pary enancjomerów każdego z substratów. Opisane zostały również dane spektroskopowe tej pary enancjomerów obu związków (Rysunek 40).¹²⁰ W publikacji tej błędnie przypisano tym enancjomerom konfigurację (*S_p,S*) i (*R_p,R*). Jak można zauważyć izomery te mają konfigurację (*R_p,S*) i (*S_p,R*). Prawdopodobnie przy określaniu konfiguracji absolutnej pominięto fakt, że podwójne wiązanie P=O, traktuje się jak wiązanie P-O-O- i podstawnik ten ma pierwszeństwo przed podstawnikiem estrowym (pojedynczym wiązaniem P-O-). Ponadto, określając konfigurację absolutną tych izomerów pominięty został fakt, że estryfikacja chlorkiem (*R*)-MTPA-Cl prowadzi do otrzymania estru (*S*)-MTPA.

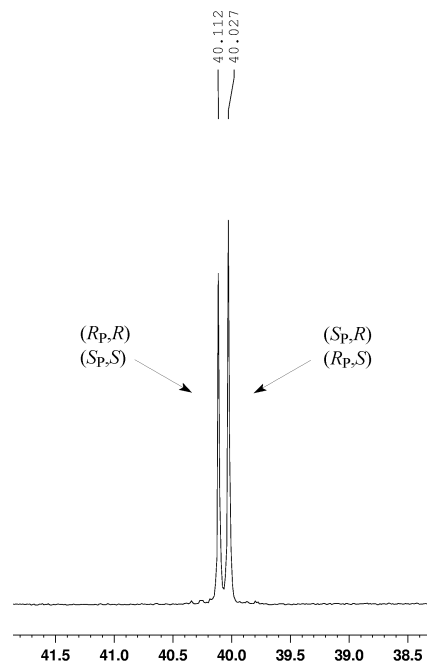


Rysunek 40. Para enancjomerów 180a i b opisana w literaturze.

Posługując się opisanymi w omawianej publikacji danymi spektroskopowymi przypisano konfigurację parom enancjomerów obu związków na widmach ³¹P NMR. Położenie sygnałów na widmach ¹H i ¹³C NMR dla par enancjomerów określonych na rysunkach 41 i 42 jako (*R_p,S*) i (*S_p,R*) pokrywają się z danymi z omawianej publikacji.



Rysunek 41. Widmo ^{31}P NMR 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu.



Rysunek 42. Widmo ^{31}P NMR 1-hydroksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu.

Do określenia konfiguracji absolutnej na α atomie węgla wszystkich α -hydroksyfosfinianów zastosowano chlorek Mosher'a (*S*)-(+)-MTPA-Cl.

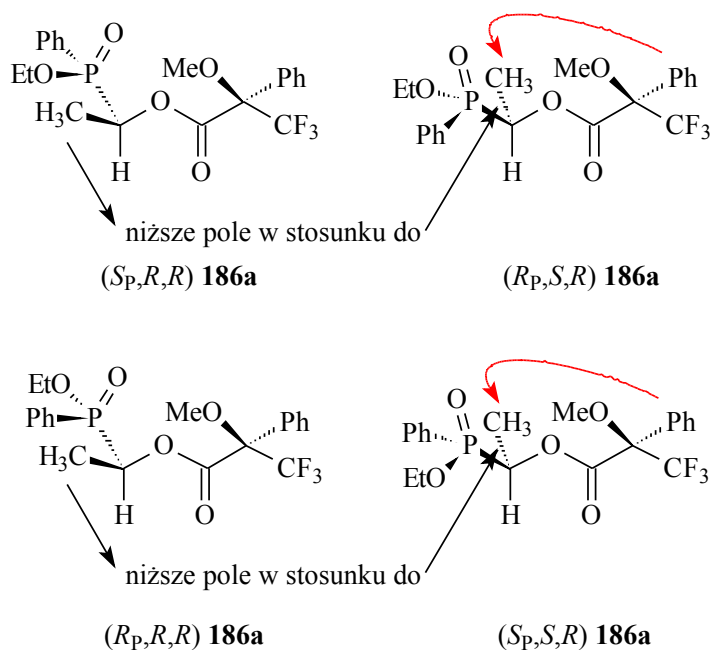
1-Hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu (stosunek molowy izomerów: $(R_p,S):(S_p,R):(R_p,R):(S_p,S) = 0.35:1.00:0.53:0.18$) otrzymany po hydrolizie estru **181a** (składającego się z różnomolowej mieszaniny par enancjomerów) lipazą z *Candida cylindracea* został zestryfikowany za pomocą (*S*)-(+)-MTPA-Cl. Otrzymano w ten sposób cztery izomery estru (*R*)-MTPA **186a**.

Dla potwierdzenia otrzymanych wyników otrzymano dodatkowo cztery izomery estru (*R*)-MTPA **186a** w stosunku molowym izomerów $(R_p,S):(S_p,R):(R_p,R):(S_p,S) = 0.51:1.00:0.80:0.06$. W tym celu zestryfikowano α -hydroksyfosfinian **180a** otrzymany po hydrolizie estru **181a** lipazą z *Rhizopus sp.*

Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od grupy metylowej reszty R ($\text{CH}_3\text{-CH-P}$) estru **186a** wynoszą: $(S_p,S,R) - 1.37$ ppm; $(R_p,R,R) - 1.43$ ppm; $(R_p,S,R) - 1.43$ ppm; $(S_p,R,R) - 1.53$ ppm.

Jak wynika z modelu opracowanego przez Mosher'a sygnały na widmie ^1H NMR pochodzące od grupy metylowej reszty R izomerów o konfiguracji (*S*) znajdują się w wyższych polach niż izomerów (*R*) (Rysunek 43). Izomery estru MTPA pochodzące od każdej pary enancjomerów α -hydroksyfosfonianu były rozpatrywane oddzielnie. Sygnały pochodzące od izomerów (R_p,R,R) oraz (R_p,S,R) pokrywają się i ich $\delta = 1.43$ ppm.

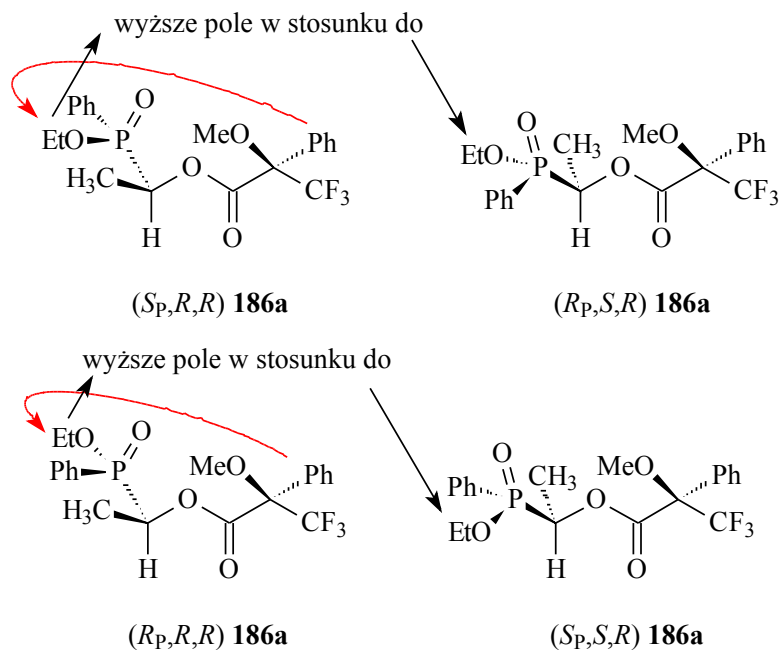
Prawidłowość przypisania tych izomerów jednemu sygnałowi na widmie ^1H NMR została potwierdzona za pomocą widma dwuwymiarowego 2D $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ HMQC.



Rysunek 43.

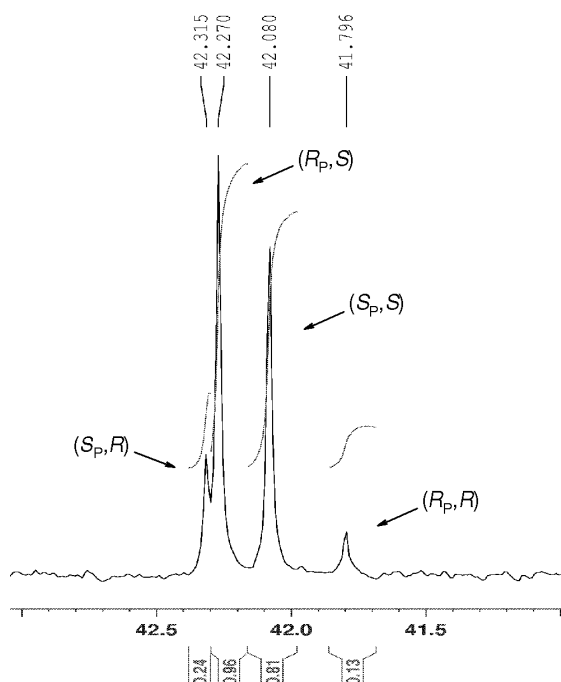
Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od grupy metylowej reszty estrowej ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-P}$) wynoszą odpowiednio: (S_p,S,R) – 1.32 ppm; (R_p,R,R) – 1.27 ppm; (R_p,S,R) – 1.35 ppm; (S_p,R,R) – 1.30 ppm.

Jak wynika z modelu Mosher'a w tym przypadku mamy sytuację odwrotną niż poprzednio. Sygnały na widmie ^1H NMR pochodzące od grupy metylowej reszty estrowej izomerów o konfiguracji (R) znajdują się w wyższych polach niż izomerów (S) (Rysunek 44).

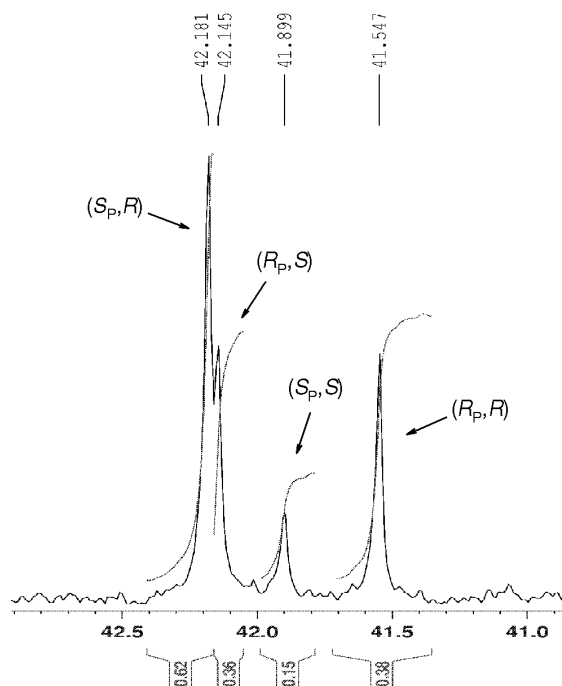


Rysunek 44.

W ten sposób określono konfigurację absolutną wszystkich izomerów związku **180a** i przypisano je odpowiednim sygnałom na widmach ^{31}P NMR z dodatkiem chininy przedstawionych na rysunkach 45 i 46.



Rysunek 45. Hydroliza lipazą z *Rhizopus sp.* – 24 h – widmo ^{31}P NMR **180a** z chininą.



Rysunek 46. Transestryfikacja lipazą z *Mucor javanicus* – 68 h – widmo ^{31}P NMR **180a** z chininą.

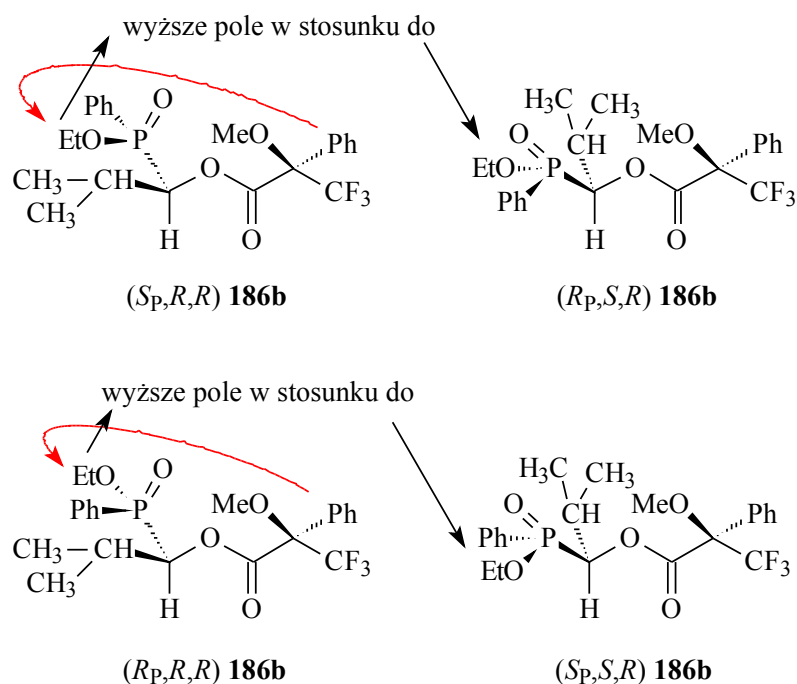
W ten sam sposób określono konfigurację absolutną 1-hydroksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180b**.

W celu otrzymania odpowiedniej mieszaniny izomerów związku **180b**, przeprowadzona została hydroliza różnomolowej mieszaniny diastereoizomerów 1-butyryloksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181b** lipazą z *Candida cylindracea*. Otrzymany α -hydroksyfosfinian **180b** (stosunek molowy izomerów: $(R_p,S):(S_p,R):(R_p,R):(S_p,S) = 2.36:0.44:0.39:0.99$) został oczyszczony za pomocą HPLC (preparatywna kolumna C-18), a następnie zestryfikowany za pomocą (*S*)-(+)-MTPA-Cl. W ten sposób otrzymane zostały cztery diastereoizomery estru (*R*)-(+)-MTPA **186b**.

Ponieważ różnice w zawartości izomerów (S_p,R,R) i (R_p,R,R) są niewielkie (0.44:0.39) dla pewności powtórzone zostały badania z wykorzystaniem niezhydrolizowanego estru **181b** po reakcji z lipazą z *Candida cylindracea*. Ester ten został chemicznie zhydrolizowany za pomocą kwasu siarkowego. Otrzymana w ten sposób mieszanina izomerów o stosunku molowym: $(R_p,S):(S_p,R):(R_p,R):(S_p,S) = 0.18:2.45:1.00:0.35$ α -hydroksyfosfinianu **180b**

została zestyfikowana za pomocą (*S*)-(+)-MTPA-Cl dając cztery diastereoizomery estru (*R*)-MTPA **186b**.

Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od grupy metylowej reszty estrowej ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-P}$) wynoszą odpowiednio: (*S*_P,*S*,*R*) – 1.29 ppm; (*R*_P,*R*,*R*) – 1.248 ppm; (*R*_P,*S*,*R*) – 1.27 ppm; (*S*_P,*R*,*R*) – 1.245 ppm (Rysunek 47). Sygnały pochodzące od izomerów (*R*_P,*R*,*R*) oraz (*S*_P,*R*,*R*) są położone bardzo blisko siebie, jednak są rozdzielone, dlatego też podane zostały wartości przesunięć chemicznych tych sygnałów z dokładnością do trzech miejsc po przecinku. Podobnie będą opisane inne sygnały leżące blisko siebie.

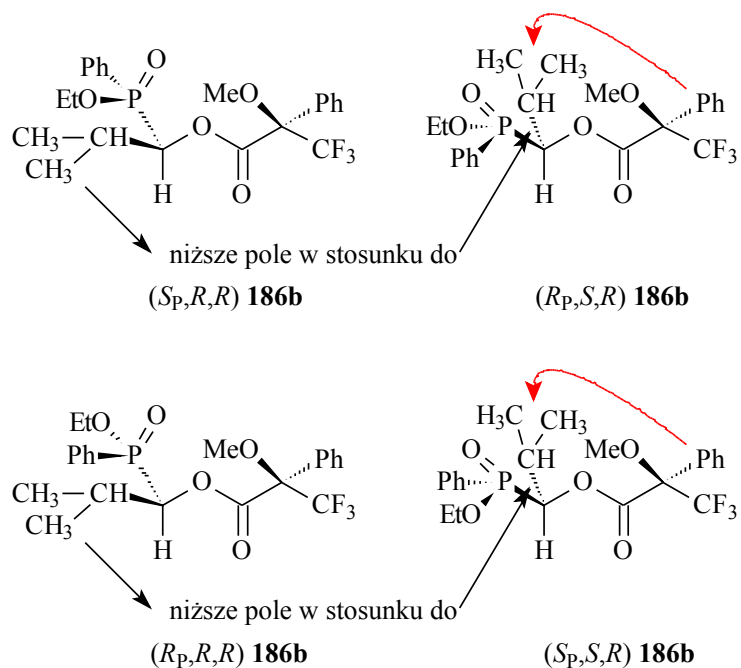


Rysunek 47.

Przesunięcia chemiczne pochodzące od grup metylowych reszty R ($(\text{CH}_3)_2\text{-CH-CH-P}$) wynoszą odpowiednio: grupa $(\text{CH}_3)'$: (*S*_P,*S*,*R*) – 1.00 ppm; (*R*_P,*R*,*R*) – 1.05 ppm; (*R*_P,*S*,*R*) – 0.892 ppm; (*S*_P,*R*,*R*) – 1.04 ppm.

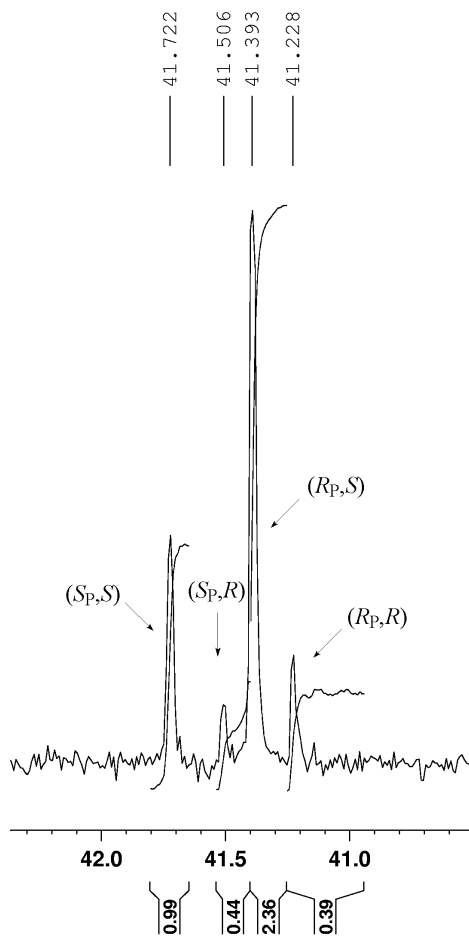
grupa $(\text{CH}_3)''$: (*S*_P,*S*,*R*) – 0.75 ppm; (*R*_P,*R*,*R*) – 0.85 ppm; (*R*_P,*S*,*R*) – 0.889 ppm; (*S*_P,*R*,*R*) – 0.99 ppm.

Model Mosher'a dla tego estru przedstawiony jest na rysunkach 47 i 48.



Rysunek 48.

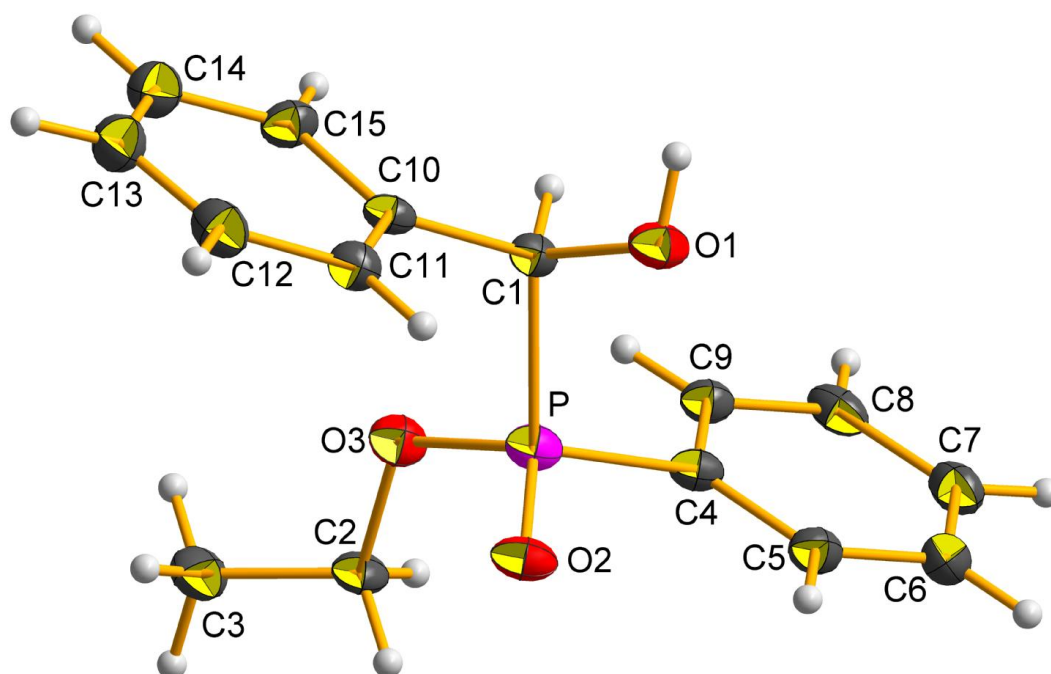
Na rysunku 49 przedstawione zostało widmo ^{31}P NMR i przypisana izomerom 1-hydroksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180b** konfiguracja absolutna.



Rysunek 49. Hydroliza lipazą z *Candida cylindracea* – 7 dni – widmo ^{31}P NMR **180b** z chininą.

4.2.2. Określenie konfiguracji absolutnej 1-hydroksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu.

Oczyszczona para enancjomerów 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181c** została poddana reakcji biotransformacji za pomocą komórek *Bacillus subtilis* (czas: 17 h; stopień konwersji: 35%; ee: 87%). Otrzymany po biotransformacji jeden enancjomer **180c** $\{[\alpha_D] = +2.8, c 1.67, \text{CH}_3\text{Cl}, 23^\circ\text{C}\}$ został oczyszczony za pomocą HPLC (preparatywna kolumna C-18). Po przeprowadzeniu krystalizacji otrzymano kryształy nadające się do badań krystalograficznych. W wyniku tych badań określona została konfiguracja absolutna tego enancjomeru: (*R_P*,*S*).



Rysunek 50.

Konfiguracja na atomie węgla tego izomeru została dodatkowo potwierdzona na podstawie widm ^1H NMR estrów Mosher'a. Metodę tę wykorzystano również do określenia konfiguracji absolutnej na α atomie węgla pozostałych izomerów.

Czysty izomer (*R_P*,*S*) został zestryfikowany za pomocą (*S*)-(+)-MTPA-Cl. Otrzymany w ten sposób ester (*R*)-MTPA **186c** (*R_P*,*S*,*R*) posłużył jako standard.

Następnie pozostała po hydrolizie za pomocą komórek *Bacillus subtilis* mieszanina enancjomerów (*R_P*,*S*) i (*S_P*,*R*) (ee = 36%) **181c** została chemicznie zhydrolizowana za pomocą niewielkiej ilości kwasu siarkowego. Otrzymana w ten sposób mieszanina

enancjomerów (R_p,S) i (S_p,R) **180c** w stosunku molowym (0.47:1.00) została zestyfikowana za pomocą S -(+)-MTPA-Cl. Otrzymano w ten sposób dwa diastereoizomery estru (R)-MTPA **186c** (R_p,S,R) i (S_p,R,R).

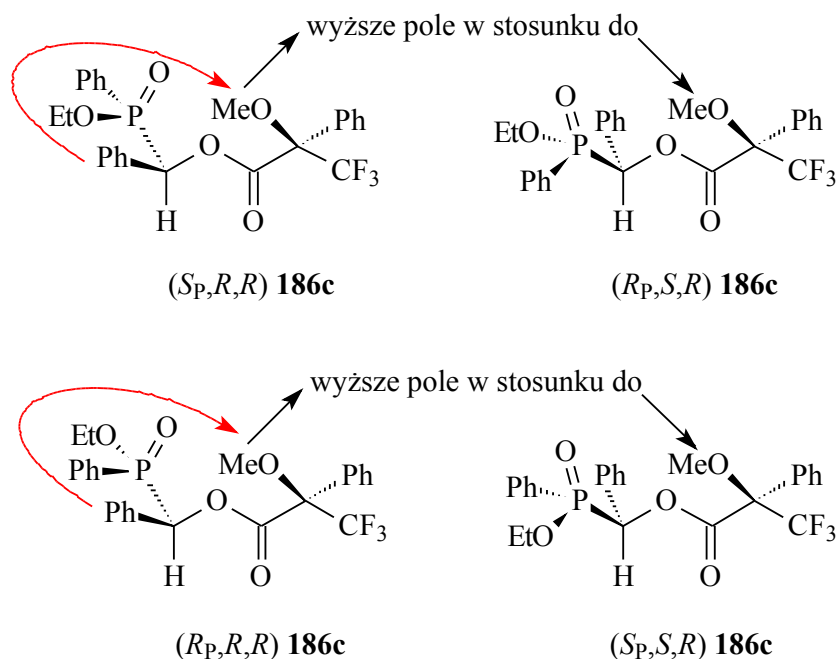
Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od grupy metoksylowej dwóch izomerów estru **186c** wynoszą odpowiednio: (R_p,S,R) – 3.43 ppm; (S_p,R,R) – 3.39 ppm.

Do określenia konfiguracji absolutnej na α atomie węgla pozostałej pary enancjomerów (R_p,R) i (S_p,S) 1-hydroksy-1-fenylometano(P -fenylo)fosfinianu etylu **180c** użyto różnomolowej mieszaniny wszystkich izomerów **180c** ($(R_p,S):(S_p,R):(R_p,R):(S_p,S) = 2.3:1.4:0.5:0.3$) uzyskanej dzięki hydrolizie różnomolowej mieszaniny diastereoizomerów (par enancjomerów) **181c** za pomocą komórek *Bacillus subtilis*. Otrzymany w ten sposób **180c** został zestyfikowany za pomocą (S)-(+)-MTPA-Cl. Otrzymano w ten sposób cztery diastereoizomery estru (R)-MTPA **186c**.

Dodatkowo, dla potwierdzenia wyników z powyższych doświadczeń, przeprowadzona została estryfikacja chlorkiem (S)-(+)-MTPA-Cl różnomolowej mieszaniny izomerów **180c** ($(R_p,S):(S_p,R):(R_p,R):(S_p,S) = 1.00:0.32:0.16:0.60$), uzyskanej po hydrolizie lipazą z *Candida cylindracea* estru **181c** zawierającego różnomolową mieszaninę diastereoizomerów.

Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od grupy metoksylowej (MeO-) pozostałych izomerów estru **186c** wynoszą odpowiednio: (S_p,S,R) – 3.50 ppm; (R_p,R,R) – 3.42 ppm.

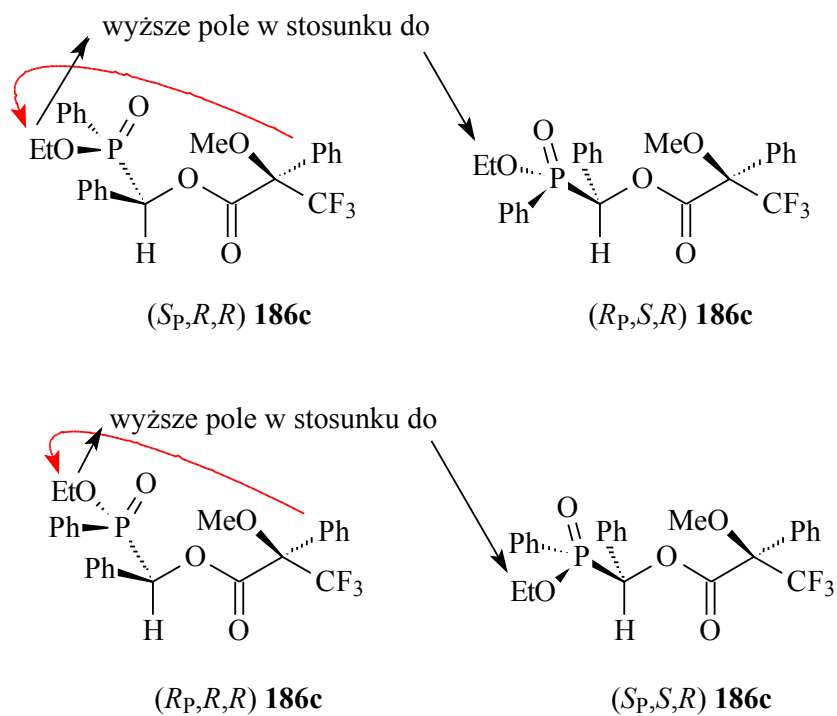
Zgodnie z anizotropowym efektem grupy fenylowej sygnały grup metoksylowych izomerów z konfiguracją (R) na atomie węgla znajdują się w wyższych polach na widmie ^1H NMR w stosunku do izomerów (S) (Rysunek 51).



Rysunek 51.

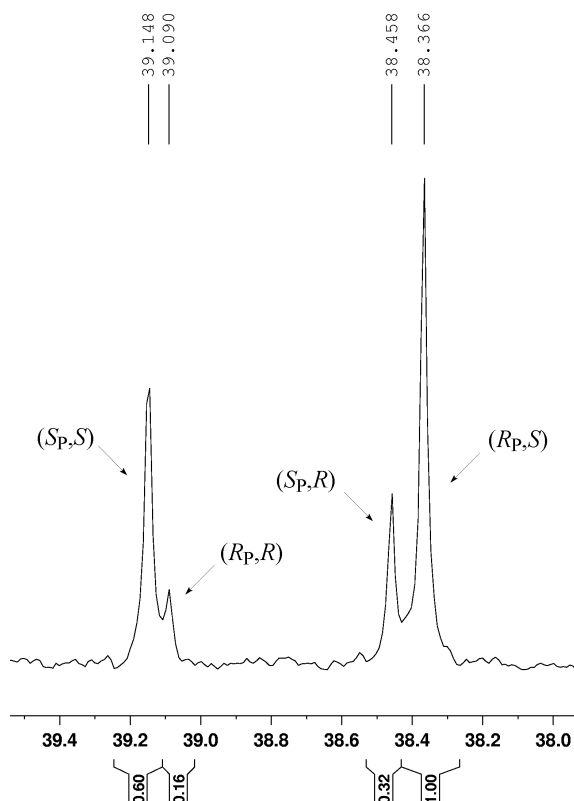
Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od grupy metylowej reszty estrowej (CH_3-CH_2-O-P) wszystkich izomerów estru **186c** wynoszą odpowiednio: (R_P,S,R) – 1.22 ppm; (S_P,R,R) – 1.21 ppm; (S_P,S,R) – 1.23 ppm; (R_P,R,R) – 1.18 ppm.

Model Mosher'a oddziaływań anizotropowych grupy fenylovej reszty estrowej z grupą metylową przedstawiony został na rysunku 52.



Rysunek 52.

Na rysunku 53 przedstawione zostało widmo ^{31}P NMR 1-hydroksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **180c** z chininą i przypisana izomerom konfiguracja absolutna.



Rysunek 53. Hydroliza lipazą z *Candida cylindracea* – 46 h – widmo ^{31}P NMR **180c** z chininą.

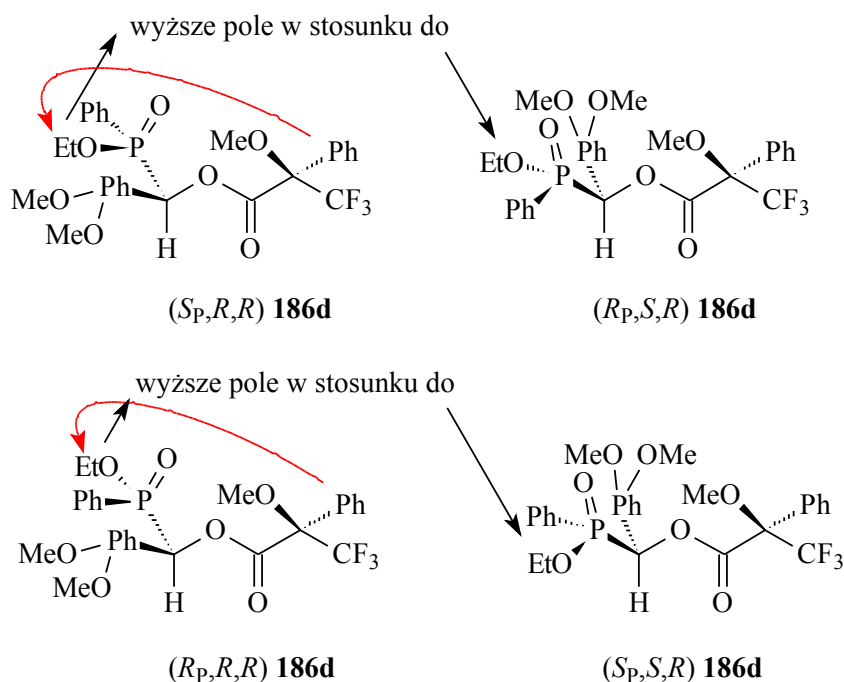
4.2.3. Określenie konfiguracji absolutnej 1-hydroksy-1-(3,4-dimetoksyfenylo)metano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu.

W celu otrzymania odpowiedniej mieszaniny izomerów związku **180d**, przeprowadzona została hydroliza różnomolowej mieszaniny diastereoizomerów 1-butyryloksy-1-(3,4-dimetoksyfenylo)metano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu **181d** lipazą z *Aspergillus niger*. Otrzymany α -hydroksyfosfinian **180d** (stosunek molowy izomerów: $(R_P, S):(S_P, R):(R_P, R):(S_P, S) = 1.20:0.48:0.57:1.10$) został oczyszczony za pomocą HPLC (preparatywna kolumna C-18), a następnie zestryfikowany za pomocą (*S*)-(+)-MTPA-Cl. W ten sposób otrzymane zostały cztery diastereoizomery estru (*R*)-(+)-MTPA **186d**.

Dla potwierdzenia wyników uzyskanych dla tego estru powtórzone zostały badania z wykorzystaniem niezhydrolizowanego estru **181d** po reakcji z lipazą z *Aspergillus niger*. Ester ten został chemicznie zhydrolizowany za pomocą kwasu siarkowego. Otrzymana w ten sposób mieszanina izomerów o stosunku molowym: $(R_P, S):(S_P, R):(R_P, R):(S_P, S) =$

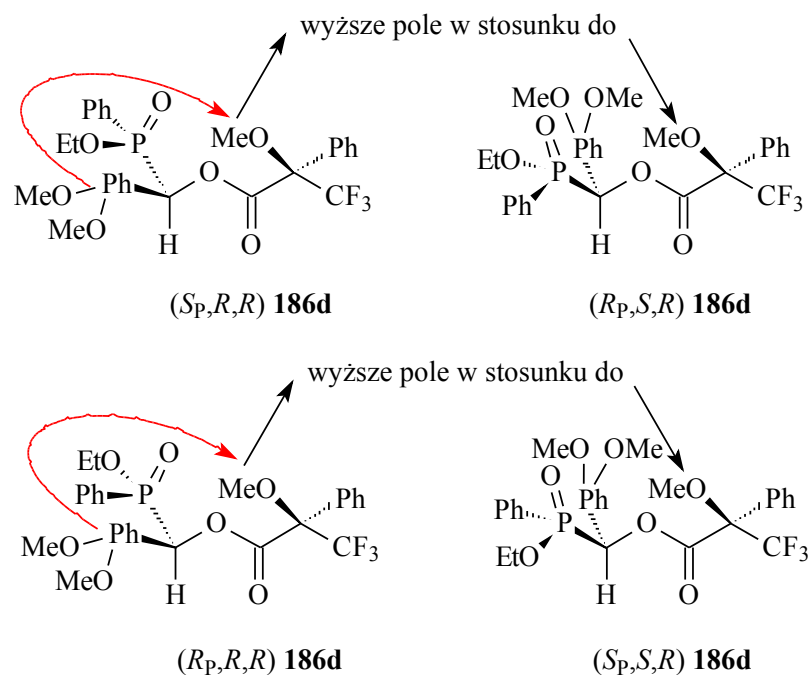
1.00:3.35:2.30:0.85 α -hydroksyfosfinianu **180d** została zestyfikowana za pomocą (*S*)-(+)-MTPA-Cl dając cztery diastereoizomery estru (*R*)-MTPA **186d**.

Sygnaly pochodzące od grupy metylowej reszty estrowej ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-P}$) izomerów o konfiguracji (*R*) znajdują się pod wpływem grupy fenylovej i są przesunięte w stronę wyższego pola w stosunku do sygnalów pochodzących od izomerów (*S*). Przesunięcia chemiczne tych sygnalów wynoszą odpowiednio: (S_P,S,R) – 1.34 ppm; (R_P,S,R) – 1.31 ppm; (S_P,R,R) – 1.29 ppm; (R_P,R,R) – 1.27 ppm.



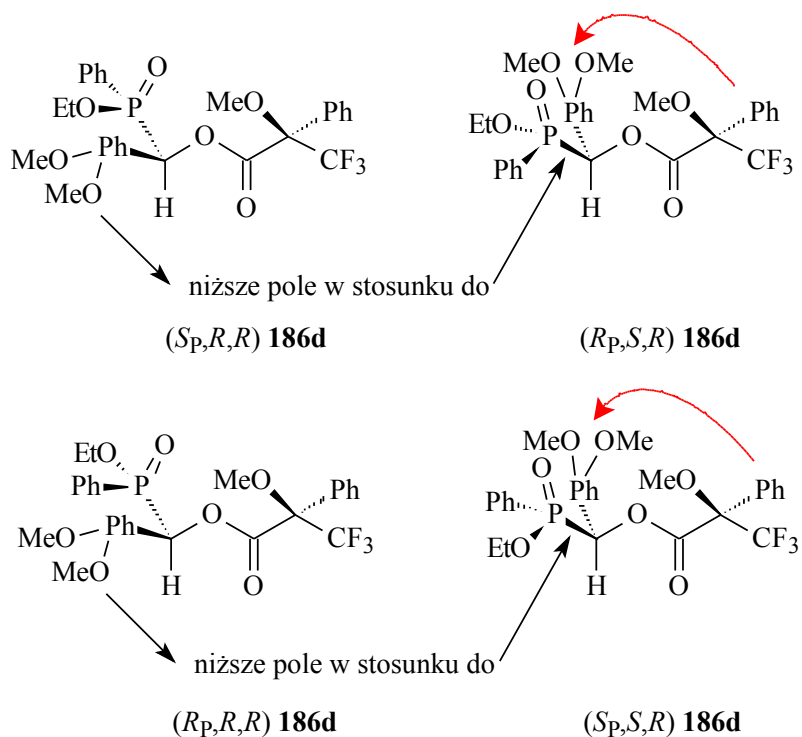
Rysunek 54.

Podobnie sygnaly pochodzące od grupy metoksylovej części estrowej (MeO-CH-) izomerów o konfiguracji (*R*) są przesunięte w stronę wyższego pola w stosunku do sygnalów pochodzących od izomerów (*S*), co jest wynikiem anizotropowego oddziaływania grupy arylovej. Przesunięcia chemiczne tych sygnalów wynoszą: (S_P,S,R) – 3.443 ppm; (R_P,S,R) – 3.440 ppm; (S_P,R,R) – 3.38 ppm; (R_P,R,R) – 3.42 ppm.



Rysunek 55.

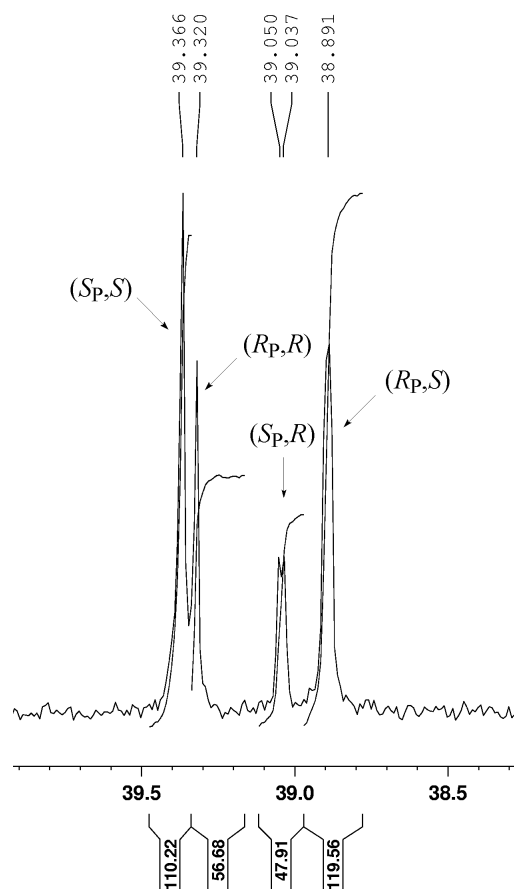
Efekt anizotropowy grupy fenylovej części estrowej wpływa na grupy metoksylove pierścienia aromatycznego, przesuując w stronę wyższych pól sygnały tych grup w izomerach o konfiguracji (*S*) na α atomie węgla. Przesunięcia chemiczne tych sygnałów wynoszą: (MeO-)' : (S_p,S,R) – 3.854 ppm; (R_p,S,R) – 3.847 ppm; (R_p,R,R) – 3.87 ppm; (S_p,R,R) – 3.854 ppm; (MeO-)'': (R_p,S,R) – 3.53 ppm; (S_p,S,R) – 3.52 ppm; (R_p,R,R) – 3.69 ppm; (S_p,R,R) – 3.57 ppm (Rysunek 56).



Rysunek 56.

Sygnaly pochodzące od grupy (MeO-)` izomerów (S_p,S,R) i (S_p,R,R) znajdują się w tym samym miejscu (na widmie widoczny jest tylko jeden sygnał), jednakże nie ma to żadnego wpływu na określenie konfiguracji absolutnej na α atomie węgla.

Porównując widma ^{31}P NMR z chininą wszystkich zanalizowanych do tej pory α -hydroksyfosfinianów **180**, można zauważyć, że sygnały pochodzące od enancjomerów o konfiguracji (R) na atomie fosforu znajdują się w wyższych polach niż sygnały pochodzące od enancjomerów o konfiguracji (S) (Rysunki: 45, 46, 49, 53). Na tej podstawie przypisano konfigurację absolutną na atomie fosforu ostatniego α -hydroksyfosfinianu **180d** (Rysunek 57).



Rysunek 57. Hydroliza lipazą z *Aspergillus niger* – 48 h – widmo ^{31}P NMR 180c z chininą.

5. Podsumowanie i wnioski

Zastosowanie metod biokatalitycznych w syntezie nieracemicznych α -hydroksyfosfinianów zawierających dwa centra stereogeniczne na atomie fosforu i α atomie węgla okazało się obiecującą alternatywą dla czysto chemicznych metod syntezy tego typu związków. Wykorzystane tu zostały zarówno reakcje enzymatycznej transestryfikacji jak i hydrolizy z zastosowaniem różnych biokatalizatorów. W wyniku reakcji biokatalitycznych uzyskano α -hydroksyfosfiniany z czystością enancjomeryczną sięgającą >98%. Najbardziej uniwersalnymi okazały się enzymy z *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* i trzustki wieprzowej, oraz całe komórki bakterii szczepu *Bacillus subtilis*, wykazujące wystarczającą aktywność wobec wszystkich testowanych substratów.

Metody biokatalityczne mogą być z powodzeniem stosowane w syntezie optycznie czystych α -hydroksyfosfonianów z dwoma centrami stereogenicznymi, jednakże należy do każdego substratu dobrać odpowiedni biokatalizator, gdyż enancjoselektywność przeprowadzanych reakcji biotransformacji zależy od budowy substratu i rodzaju zastosowanego biokatalizatora. Lipazy z trzustki wieprzowej i *Aspergillus niger* wykazały dużą enancjoselektywność wobec substratów z alifatyczną grupą R, natomiast enancjoselektywność tych biokatalizatorów wobec substratów z ugrupowaniem aromatycznym wyraźnie spada. Aktywność katalityczna lipaz również zależy od budowy substratu. Reakcje hydrolizy α -butyryloksyfosfinianu z małą grupą R (mała zawada steryczna) zaszły dla wszystkich testowanych lipaz w bardzo krótkim czasie (poza jednym wyjątkiem, gdy katalizatorem była immobilizowana lipaza z *Pseudomonas cepacia* – czas reakcji nie przekraczał 24 h), natomiast dla substratów posiadających dużą grupę R (np.: –CH(CH₃)₂) trudniej jest dobrać biokatalizator (aktywność katalityczna testowanych lipaz była słaba, a czas potrzebny dla zajścia reakcji wynosił 7 dni). Z kolei biokatalizowane reakcje transestryfikacji zachodzą jedynie dla substratu posiadającego małą grupę R.

Niestety metody syntezy z wykorzystaniem biokatalizy stwarzają problemy, szczególnie jeżeli chodzi o otrzymanie produktów z wysoką wydajnością. Próby określenia chemicznej wydajności zakończyły się otrzymaniem niekompatybilnych wyników, które wskazywały na bardzo niską wydajność (14 – 40%). Dodatkowo obliczenia te były obarczone dużymi błędami, które wynikały z bardzo małych ilości otrzymanych produktów (6 – 19 mg) i czułości wagi ($d = \pm 1$ mg). Duże straty w wydajności zostały zaobserwowane w trakcie ekstrakcji produktów biotransformacji (15 – 51%), a także podczas oczyszczania (9 – 62%).

Innym problemem, który pojawił się w trakcie wykonywania badań opisanych w niniejszej pracy było określenie nadmiaru enancjomerycznego i konfiguracji absolutnej produktów

biotransformacji. Zsyntetyzowane α -hydroksyfosfiniany i α -butyryloksyfosfiniany posiadają dwa centra stereogeniczne, co powoduje, że każdy związek składa się z czterech izomerów. Przeprowadzone zostały próby rozdziału diastereoizomerów za pomocą różnych metod: chromatografii kolumnowej z żelom krzemionkowym, HPLC i krystalizacji (jeden ze związków jest ciałem stałym). Tylko chromatografia kolumnowa, w której eluentem była mieszanina trójskładnikowa o składzie: chlorek metylenu:*n*-heksan:octan etylu - 1:1:0.5, okazała się techniką wystarczającą do otrzymania jednej pary enancjomerów 1-butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu z wydajnością 10%. Ponieważ nie udało się rozdzielić enancjomerów pozostałych związków, wszystkie reakcje biotransformacji były przeprowadzane na mieszaninach diastereoizomerów.

Nadmiary enancjomeryczne reakcji hydrolizy były określane za pomocą metody NMR z wykorzystaniem chininy jako chiralnego odczynnika solwującego. Metoda ta dała bardzo dobre rezultaty, gdy stosunek ilości chininy do analizowanego produktu był dobrze dobrany. Niestety w niektórych przypadkach, gdy analizowany był 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu nie udało się osiągnąć dobrej separacji sygnałów na widmie NMR pomimo wielu prób. Największy problem stanowiło określenie ee produktów hydrolizy katalizowanej immobilizowanymi komórkami mikroorganizmów. W tym przypadku zastosowano HPLC z chiralną kolumną. Metoda ta jest bardziej uciążliwa, gdyż sygnały na chromatogramie pochodzące od izomerów α -hydroksyfosfinianu pokrywają się z sygnałami pochodzącymi od izomerów α -butyryloksyfosfinianu i przed jej zastosowaniem należało wcześniej oczyścić produkty reakcji wykorzystując preparatywną HPLC.

Jednak pomimo tych problemów biokataliza może być z powodzeniem stosowana do otrzymania optycznie czystych α -hydroksyfosfonianów. Jest to metoda tania, szczególnie w przypadku zastosowania całych komórek bakterii, przeprowadza się ją w łagodnych warunkach i w niektórych przypadkach jest bardzo szybka. Czas reakcji hydrolizy 1-butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu lipazą z trzustki wieprzowej wyniósł 1 h, a lipazą z *Candida cylindracea* – 1.5 h.

Próby wpływu na enancjoselektywność biokatalizatorów poprzez modyfikację środowiska reakcji hydrolizy α -butyryloksyfosfinianów (dodatek związków zapobiegających agregacji enzymu) i poprzez zmianę formy biokatalizatora (immobilizacja, permeabilizacja komórek) nie przyniosły zadowalających efektów. Natomiast dodanie zasadowego związku jakim jest trietyloamina do reakcji estryfikacji 1-hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinianu etylu znacznie poprawiło enancjoselektywność lipaz z *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* i *Mucor javanicus*.

W trakcie badań nad określeniem konfiguracji absolutnej α -hydroksyfosfinianów okazało się, że zastosowanie chininy jako chiralnego dyskryminatora do określania nadmiarów enancjomerycznych, pozwala na określenie konfiguracji absolutnej na atomie fosforu. Metoda łącząca zastosowanie tego odczynnika z chiralnym odczynnikiem derywatyżującym określającym konfigurację na atomie węgla stwarza możliwość szerszego zastosowania w przyszłości do określania konfiguracji absolutnej hydroksyfosfonianów z dwoma centrami stereogenicznymi: na atomie węgla i atomie fosforu.

6. Materiały i metody

6.1. Odczynniki.

Materiały wykorzystane w niniejszej pracy pochodziły od następujących dostawców:

POCH

tlenek glinu; aldehyd benzoowy; dichlorometan; octan etylu; chloroform; trietyloamina; kwas solny; metanol; acetonitryl; wodorotlenek sodu; bezwodny siarczan magnezu; *n*-heksan; eter dietylowy; wodorofosforan potasu; dwuwodorofosforan potasu; sześciowodny chlorek magnezu; Triton X-100; toluen; sześciowodny chlorek wapnia; kwas ortofosforowy; albumina; bezwodny siarczyn sodu; 2-propanol; *p*-nitrofenol; siedmiowodny siarczan magnezu; siarczan dimetylu; skrobia rozpuszczalna; bulion wzbogacony; odczynniki do HPLC: acetonitryl, *n*-heksan, 2-propanol.

SIGMA

fluorek potasu; kwas boranowy; kwas 3-[*N*-morfolino]propanosulfonowy MOPS; palmitynian *p*-nitrofenolu; tris(hydroksymetylo)aminometan TRIZMA; chlorowodorek tris(hydroksymetylo)aminometanu TRIZMA-HCl; tributyrina, Coomassie Brilliant Blue G-250.

ALDRICH

fenylofosfinian etylu; aldehyd 3,4-dimetoksybenzoowy; chlorek butyrylu; siarczek *p*-hydroksyfenylometylowy; chlorek acetylu; chlorek benzoilu; (*S*)-(+)-chlorek kwasu α -metoksy- α -(trifluorometylo)fenylooctowego MTPA-Cl; 3-dimetyloamino-1-propyloamina; chlorek litu; siarczan amonu; alginian sodu; rozpuszczalniki do NMR: DMSO, deuterowany chloroform.

FLUKA

aldehyd octowy; chlorek izobutyrylu; eter diizopropylowy; maślan winylu; kwas trinitrofenylosulfonowy TNBS; guma arabska.

OXOID

ekstrakt z drożdży; agar.

Pozostałe:

aldehyd izobutylowy – FERAK BERLIN; chlorek 3,5-dinitrobenzoilu - REACHIM; spożywcza oliwa z oliwek.

Niektóre odczynniki wymagały dodatkowego oczyszczenia i/lub suszenia, które wykonano następująco:

pirydyna – destylowano i suszono nad wodorotlenkiem sodu;

chlorek metylenu – suszono nad sitami molekularnymi;

eter diizopropylowy – suszono nad sitami molekularnymi.

Pozostałe odczynniki wykorzystano bez oczyszczania.

6.2. Mikroorganizmy i enzymy.

Szczepy: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia liquefaciens* i *Acinetobacter baumannii* pochodziły z własnej kolekcji i zostały zidentyfikowane w Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Niemcy.

Lipazy były produktami handlowymi i pochodziły od następujących dostawców:

lipaza z *Candida cylindracea* (CCL) – Sigma,

lipaza z *Aspergillus niger* (ANL) – Fluka,

lipaza z *Rhizopus niveus* (RNL) – Fluka,

lipaza z *Rhizopus species* (RSL) – Serva,

lipaza z *Mucor javanicus* (MJL) – Fluka,

lipaza z *Penicillium roqueforti* (PRL) – Fluka,

lipaza z trzustki wieprzowej (PPL) – Sigma,

immobilizowana na Sol-gel-AK lipaza z *Pseudomonas cepacia* (I-PCL) – Fluka,

immobilizowana in situ lipaza z *Mucor circinelloides* (I- MCL) – otrzymana dzięki uprzejmości Pana dr hab. Tadeusza Antczaka z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej.

6.3. Oczyszczanie i analiza.

6.3.1. Techniki analityczne.

- 1) Chromatografię cienkowarstwową TLC wykonywano na płytkach plastikowych pokrytych żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ 0.2 mm firmy Merck.
- 2) Analityczną chromatografię HPLC z chiralną kolumną wykonywano używając kolumnę: CHIRALPAK AD, Diacel (250 x 46 mm).
- 3) Widma magnetycznego rezonansu jądrowego ¹H NMR były rejestrowane przy pomocy spektrometrów: Bruker Avance™ 600 (600.58 MHz) oraz Bruker Avance DRX 300 (300.13 MHz) w rozpuszczalnikach: CDCl₃ i DMSO – przesunięcia chemiczne oznaczono wobec wewnętrznego standardu trimetylosilanu TMS ($\delta = 0.00$ ppm).
- 4) Widma magnetycznego rezonansu jądrowego ³¹P NMR były rejestrowane przy pomocy spektrometrów: Bruker Avance™ 600 (243.12 MHz) oraz Bruker Avance DRX 300 (121.50 MHz) w CDCl₃ – przesunięcia chemiczne oznaczono wobec zewnętrznego standardu 85% kwasu fosforowego ($\delta = 0.00$ ppm).
- 5) Widma magnetycznego rezonansu jądrowego ¹³C NMR były rejestrowane przy pomocy spektrometru Bruker Avance™ 600 (151.02 MHz) w CDCl₃ – przesunięcia chemiczne oznaczono wobec sygnałów rozpuszczalnika ($\delta = 77.23$ ppm).
- 6) Skręcalność optyczną mierzono na polarymetrze polAAr 31 w chloroformie przy długości fali $\lambda = 589$ nm.
- 7) Absorbancję mierzono na spektrofotometrze UV-vis Varian CARY 100 Bio.

6.3.2. Techniki preparatywne.

- 1) Chromatografię kolumnową wykonywano na żelu krzemionkowym - Silica gel 60 (63-230 μ m) firmy Merck.
- 2) Preparatywną chromatografię HPLC wykonywano używając kolumnę: Varian, Dynamax HPLC Column 250 x 21.4 mm, MICROSORB 300-10, C-18.
- 3) Dializę wykonywano w woreczkach dializacyjnych Fisherbrand MWCO 6.000 – 8.000 firmy Fisher Scientific.

6.4. Synteza substratów reakcji biotransformacji.

6.4.1. Synteza α -hydroksyfosfinianów.

Syntezę α -hydroksyfosfonianów wykonywano zgodnie z procedurą opisaną w literaturze:¹⁵⁹ 5g tlenku glinu (Al_2O_3) mieszano z 5 g fluorku potasu i rozcierano w moździercu. Następnie mieszanina 20 mmol fenylofosfinianu etylu i 20 mmol odpowiedniego aldehydu była dodawana do mieszaniny katalizatorów, mieszana bagietką i zostawiana na 48 h w temperaturze pokojowej. Produkt reakcji wmywano z mieszaniny reakcyjnej za pomocą dichlorometanu, rozpuszczalnik odparowywano na wyparce, a produkt oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Eluentem była mieszanina dichlorometanu i octanu etylu (5:3 v/v). Czystość produktu sprawdzano za pomocą TLC (eluent taki sam jak dla chromatografii kolumnowej), ^1H i ^{31}P NMR.

1-Hydroksyetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **180a**:

$R_f = 0.15$, stosunek diastereoizomerów = 5:3, wydajność = 54%

Para enancjomerów (R_P, R) i (S_P, S):

^{31}P NMR δ (ppm): 41.16; ^1H NMR: δ (ppm): 1.43 (dd, $J = 7.1, 16.5$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 4.13–4.20 (m, 3H, CHP i OCH_2), 7.46–7.50 (m, 2H, Ph), 7.55–7.58 (m, 1H, Ph), 7.78–7.85 (m, 2H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 16.43 (CH_2CH_3), 16.53 (d, $J = 6.3$ Hz, CHCH_3), 61.48 (d, $J = 7.3$ Hz, OCH_2), 65.89 (d, $J = 116.5$ Hz, CHP), 128.42 (d, $J = 118.8$ Hz), 128.49, 128.57, 132.43, 132.49, 132.56 (Ph).

Para enancjomerów (R_P, S) i (S_P, R):

^{31}P NMR δ (ppm): 41.82; ^1H NMR: δ (ppm): 1.32 (dd, $J = 6.9, 17.6$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.96–4.06 (m, 2H, OCH_2), 4.13–4.20 (m, 1H CHP), 7.46–7.50 (m, 2H, Ph), 7.55–7.58 (m, 1H, Ph), 7.78–7.85 (m, 2H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 16.57 (d, $J = 5.9$ Hz, CHCH_3), 17.09 (d, $J = 3.4$ Hz, CH_2CH_3), 61.55 (d, $J = 7.5$ Hz, OCH_2), 66.12 (d, $J = 115.5$ Hz, CHP), 127.99 (d, $J = 119.0$ Hz), 128.48, 128.55, 132.56 (2C), 132.63 (Ph).

1-Hydroksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **180b**:

$R_f = 0.30$, stosunek diastereoizomerów = 1:1, wydajność = 42%.

Para enancjomerów (R_P, R) i (S_P, S):

^{31}P NMR δ (ppm): 40.11; ^1H NMR: δ (ppm): 1.00 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CHCHCH_3), 1.01 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CHCHCH_3), 1.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 3.69–3.77 (m, 1H, CHP),

3.89–3.95 (m, 1H, PCHCH), 4.10–4.19 (m, 2H, OCH₂), 7.45–7.50 (m, 2H, Ph), 7.55–7.58 (m, 1H, Ph), 7.80–7.86 (m, 2H, Ph); ¹³C NMR δ (ppm): 16.70 (d, *J* = 5.3 Hz, CHCHCH₃), 18.15 (d, *J* = 7.6 Hz, CHCHCH₃), 20.32 (d, *J* = 7.8 Hz, OCH₂CH₃), 29.77 (d, *J* = 2.9 Hz, PCHCH), 61.33 (d, *J* = 7.4 Hz, OCH₂), 75.29 (d, *J* = 113.4 Hz, CHP), 128.67, 128.75, 129.51 (d, *J* = 118.7 Hz) 132.63 (2C), 132.57 (Ph).

Para enancjomerów (*R_p,S*) i (*S_p,R*):

³¹P NMR δ (ppm): 40.03; ¹H NMR: δ (ppm): 1.01 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, CHCHCH₃), 1.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, CHCHCH₃), 1.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.69–3.77 (m, 1H, CHP), 3.95–4.02 (m, 1H, PCHCH), 4.10–4.19 (m, 2H, OCH₂), 7.45–7.50 (m, 2H, Ph), 7.55–7.58 (m, 1H, Ph), 7.80–7.86 (m, 2H, Ph); ¹³C NMR δ (ppm): 16.74 (d, *J* = 5.3 Hz, CHCHCH₃), 17.47 (d, *J* = 5.9 Hz, CHCHCH₃), 20.45 (d, *J* = 10.1 Hz, OCH₂CH₃), 29.59 (d, *J* = 4.0 Hz, PCHCH), 61.46 (d, *J* = 7.3 Hz, OCH₂), 75.40 (d, *J* = 109.9 Hz, CHP), 128.72, 128.80, 129.62 (d, *J* = 119.0 Hz) 132.41, 132.47, 132.73 (d, *J* = 2.7 Hz) (Ph).

1-Hydroksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **180c**:

R_f = 0.29, stosunek diastereoizomerów = 1:1, wydajność = 51%

Para enancjomerów (*R_p,R*) i (*S_p,S*):

³¹P NMR δ (ppm): 39.56; ¹H NMR: δ (ppm): 1.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH₃), 3.93–4.18 (m, 2H, OCH₂), 5.16 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H, CHP), 7.20–7.26 (m, 5H, Ph), 7.29–7.33 (m, 2H, Ph), 7.40–7.44 (m, 2H, Ph), 7.46–7.49 (m, 1H, Ph); ¹³C NMR δ (ppm): 16.71 (d, *J* = 6.1, CH₃), 62.09 (OCH₂), 73.41 (d, *J* = 111.3, CHP), 127.18, 127.22, 127.92 (d, *J* = 3.1), 128.08, 128.10, 128.25, 132.68 (d, *J* = 2.2), 132.77, 133.06, 136.58 (Ph).

Para enancjomerów (*R_p,S*) i (*S_p,R*):

³¹P NMR δ (ppm): 38.00; ¹H NMR: δ (ppm): 1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 3.93–4.18 (m, 2H, OCH₂), 5.10 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, CHP), 7.20–7.26 (m, 5H, Ph), 7.38–7.41 (m, 2H, Ph), 7.51–7.54 (m, 1H, Ph), 7.61–7.65 (m, 2H, Ph); ¹³C NMR δ (ppm): 16.69 (d, *J* = 6.1, CH₃), 62.05 (OCH₂), 73.79 (d, *J* = 110.3, CHP), 127.47, 127.50, 128.17, 128.24 (d, *J* = 2.4), 128.38, 128.47, 132.77, 132.83, 133.12, 136.28 (Ph).

1-Hydroksy-1-(3,4-metoksyfenylo)metano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **180d**:

R_f = 0.17, stosunek diastereoizomerów = 1:1, wydajność = 38%.

Para enancjomerów (*R_p,R*) i (*S_p,S*):

³¹P NMR δ (ppm): 38.98; ¹H NMR: δ (ppm): 1.32 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, OCH₃), 3.64 (s, 3H, OCH₃), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 3.94–4.18 (m, 2H, OCH₂), 5.12 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, CHP),

6.73–6.82 (m, 3H, Ph), 7.32–7.35 (m, 2H, Ph), 7.44–7.49 (m, 3H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 16.43 (CH_2CH_3), 55.67 (OCH_3), 56.04 (OCH_3), 61.99 (OCH_2), 73.09 (d, $J = 113.1$, CHP), 110.35 (d, $J = 4.2$ Hz), 110.65 (d, $J = 1.9$ Hz), 119.79 (d, $J = 6.3$ Hz), 127.29 (d, $J = 122.3$ Hz), 128.16, 128.34, 128.66, 132.68 (d, $J = 2.1$ Hz), 132.88, 133.13, 148.61 (d, $J = 2.7$ Hz, COCH_3), 148.71 (d, $J = 2.9$ Hz, COCH_3) (Ph).

Para enancjomerów (R_P, S) i (S_P, R):

^{31}P NMR δ (ppm): 37.53; ^1H NMR: δ (ppm): 1.29 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.94–4.18 (m, 2H, OCH_2), 5.05 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, CHP), 6.73–6.82 (m, 3H, Ph), 7.38–7.42 (m, 2H, Ph), 7.52–7.55 (m, 1H, Ph), 7.63–7.66 (m, 2H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 16.39 (CH_2CH_3), 55.79 (OCH_3), 56.04 (OCH_3), 61.94 (OCH_2), 73.43 (d, $J = 112.4$, CHP), 110.56 (d, $J = 4.2$ Hz), 110.76 (d, $J = 1.7$ Hz), 120.17 (d, $J = 6.3$ Hz), 128.06 (d, $J = 110.1$ Hz), 128.24, 128.42, 129.00, 132.62 (d, $J = 2.1$ Hz), 132.94, 133.19, 148.71 (d, $J = 2.9$ Hz, COCH_3), 148.94 (d, $J = 2.5$ Hz, COCH_3) (Ph).

6.4.2. Synteza α -butyryloksyfosfinianów.

Do roztworu 10 mmol α -hydroksyfosfinianu w 100 ml chloroformu w temperaturze łaźni lodowej (0°C) dodawano 10 mmol trietyloaminy, a następnie wkraplano 11 mmol chlorku butyrylu. Mieszanie pozostawiano, mieszając, w temperaturze pokojowej na 24 h. Po skończonej reakcji całość przemywano 100 ml 5% kwasu solnego, 100 ml wody destylowanej, a następnie suszono za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu. Po filtracji rozpuszczalnik odparowywano na wyparce, a produkt oczyszczano za pomocą kolumnowej chromatografii na żelu krzemionkowym. Eluentem była mieszanina dichlorometanu i octanu etylu (5:3 v/v). Czystość produktu sprawdzano za pomocą TLC (eluent taki sam jak dla chromatografii kolumnowej), ^1H , ^{31}P NMR.

1-Butyryloksyetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **181a**:

$R_f = 0.51$, stosunek diastereoizomerów = 1:0.6, wydajność = 45%

Para enancjomerów (R_P, R) i (S_P, S):

^{31}P NMR δ (ppm): 37.53; ^1H NMR: δ (ppm): 0.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.42 (dd, $J = 7.1, 15.5$ Hz, 3H, CHCH_3), 1.47–1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.13–2.23 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.99–4.22 (m, 2H, OCH_2), 5.45–5.50 (m, 1H, CHP), 7.47–7.51 (m, 2H, Ph), 7.57–7.60 (m, 1H, Ph), 7.80–7.84 (m, 2H, Ph); ^{13}C NMR (151.0 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 13.42 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.25 (OCH_2CH_3), 16.47 (d, $J = 6.1$

Hz, CHCH₃), 18.28 (CH₂CH₂CH₃), 36.01 (CH₂CH₂CH₃), 61.40 (d, $J = 6.5$ Hz, OCH₂), 65.94 (d, $J = 123.4$ Hz, CHP), 128.45, 128.53, 132.50, 132.56 (Ph), 132.79 (d, $J = 3.0$ Hz, Ph), 172.36 (CO).

Para enancjomerów (R_P,S) i (S_P,R):

³¹P NMR δ (ppm): 37.11; ¹H NMR: δ (ppm): 0.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H CH₂CH₂CH₃), 1.36 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.42 (dd, $J = 7.1, 15.5$ Hz, 3H, CHCH₃), 1.55–1.61 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.21–2.31 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 3.99–4.22 (m, 2H, OCH₂), 5.31–5.35 (m, 1H, CHP), 7.47–7.51 (m, 2H, Ph), 7.57–7.60 (m, 1H, Ph), 7.80–7.84 (m, 2H, Ph); ¹³C NMR (151.0 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 13.53 (CH₂CH₂CH₃), 14.21 (OCH₂CH₃), 16.58 (d, $J = 5.9$ Hz, CHCH₃), 18.28 (CH₂CH₂CH₃), 36.04 (CH₂CH₂CH₃), 61.54 (d, $J = 6.6$ Hz, OCH₂), 66.81 (d, $J = 121.2$ Hz, CHP), 128.56, 128.64, 132.40, 132.47, 132.84 (Ph), 172.36 (CO).

1-Butyryloksy-2,2-dimetyloetano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **181b**:

$R_f = 0.68$, stosunek diastereoizomerów = 1:1, wydajność = 54%.

Para enancjomerów (R_P,R) i (S_P,S):

³¹P NMR δ (ppm): 37.24; ¹H NMR: δ (ppm): 0.81 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H CH₂CH₂CH₃), 0.93 (d, $J = 6.7$, 3H, CHCH₃), 1.10 (d, $J = 6.8$, 3H, CHCH₃), 1.29 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.56–1.62 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.03–2.32 (m, 3H, CH₂CH₂CH₃, CHCH₃), 3.91–3.98 (m, 2H, OCH₂), 5.28 (dd, $J = 7.2, 7.2$ Hz, 1H, CHP), 7.45–7.49 (m, 2H, Ph), 7.54–7.57 (m, 1H, Ph), 7.78–7.82 (m, 2H, Ph); ¹³C NMR δ (ppm): 13.71 (CH₂CH₂CH₃), 16.61 (d, $J = 6.5$ Hz, CHCH₃), 18.38 (OCH₂CH₃), 18.79 (d, $J = 8.2$ Hz, CHCH₃), 20.03 (d, $J = 6.1$ Hz, CH(CH₃)₂), 28.99 (CH₂CH₂CH₃), 35.92 (CH₂CH₂CH₃), 61.34 (d, $J = 6.3$ Hz, OCH₂), 74.11 (d, $J = 121.3$ Hz, CHP), 128.54, 128.73, 129.83 (d, $J = 77.7$ Hz), 132.52, 132.66 (Ph), 133.83 (d, $J = 2.9$ Hz, Ph), 172.67 (d, $J = 3.9$ Hz, CO).

Para enancjomerów (R_P,S) i (S_P,R):

³¹P NMR δ (ppm): 36.72; ¹H NMR: δ (ppm): 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H CH₂CH₂CH₃), 0.99 (d, $J = 6.8$, 3H, CHCH₃), 1.01 (d, $J = 6.7$, 3H, CHCH₃), 1.33 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.43–1.48 (m, 2H, CH₂CH₂CH₃), 2.03–2.32 (m, 3H, CH₂CH₂CH₃, CHCH₃), 4.08–4.16 (m, 2H, OCH₂), 5.18 (dd, $J = 2.4, 6.4$ Hz, 1H, CHP), 7.45–7.49 (m, 2H, Ph), 7.54–7.57 (m, 1H, Ph), 7.78–7.82 (m, 2H, Ph); ¹³C NMR δ (ppm): 13.83 (CH₂CH₂CH₃), 16.70 (d, $J = 5.8$ Hz, CHCH₃), 18.49 (OCH₂CH₃), 18.59 (d, $J = 6.8$ Hz, CHCH₃), 20.27 (d, $J = 7.7$ Hz, CH(CH₃)₂), 28.83 (CH₂CH₂CH₃), 36.08 (CH₂CH₂CH₃), 61.30 (d, $J = 5.9$ Hz, OCH₂), 74.63 (d, $J = 117.3$ Hz, CHP), 128.62, 128.81, 129.00 (d, $J = 80.1$ Hz), 132.45, 132.60 (Ph), 132.75 (d, $J = 2.2$ Hz, Ph), 172.51 (d, $J = 4.5$ Hz, CO).

1-Butyryloksy-1-fenylometano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **181c**:

$R_f = 0.73$, stosunek diastereoizomerów = 1:1, wydajność = 62%.

Para enancjomerów (R_p,R) i (S_p,S):

^{31}P NMR δ (ppm): 34.93; ^1H NMR: δ (ppm): 0.87 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.28 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.55–1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.32 (td, $J = 4.6, 7.4$ Hz, 2H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.00–4.07 (m, 2H, OCH_2), 6.23 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, CHP), 7.25–7.66 (m, 10H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 13.71 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 16.68 (d, $J = 5.7$ Hz, OCH_2CH_3), 18.45 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 36.17 ($\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 62.12 (d, $J = 6.7$ Hz, OCH_2), 72.99 (d, $J = 117.3$ Hz, CHP), 127.76, 127.78, 127.81, 128.41, 128.49, 128.63, 132.64, 132.71, 132.92, 133.48 (Ph), 172.00 (d, $J = 6.9$ Hz, CO).

Para enancjomerów (R_p,S) i (S_p,R):

^{31}P NMR δ (ppm): 34.52; ^1H NMR: δ (ppm): 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.50–1.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.27 (td, $J = 2.2, 7.4$ Hz, 2H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.00–4.07 (m, 2H, OCH_2), 6.32 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, CHP), 7.25–7.72 (m, 10H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 13.63 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 16.58 (d, $J = 6.3$ Hz, OCH_2CH_3), 18.45 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 36.17 ($\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 61.91 (d, $J = 6.6$ Hz, OCH_2), 72.35 (d, $J = 119.1$ Hz, CHP), 127.99, 128.02, 128.41 (2C), 128.49, 128.62, 132.65, 132.71, 133.90, 133.37 (Ph), 171.94 (d, $J = 7.5$ Hz, CO).

1-Butyryloksy-1-(3,4-metoksyfenylo)metano(*P*-fenylo)fosfinian etylu **181d**:

$R_f = 0.47$, stosunek diastereoizomerów = 1:1, wydajność = 69%.

Para enancjomerów (R_p,R) i (S_p,S):

^{31}P NMR δ (ppm): 34.38; ^1H NMR: δ (ppm): 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.59–1.64 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.35 (td, $J = 2.0, 7.2$ Hz, 2H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 4.01–4.14 (m, 2H, OCH_2), 6.16 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, CHP), 6.74–6.99 (m, 3H, Ph), 7.40–7.74 (m, 5H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 13.70 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 16.73 (d, $J = 5.6$ Hz, OCH_2CH_3), 18.46 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 36.20 ($\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 55.91 (OCH_3), 56.00 (OCH_3), 62.04 (d, $J = 7.1$ Hz, OCH_2), 72.81 (d, $J = 118.9$ Hz, CHP), 111.04 (d, $J = 1.8$ Hz), 111.29 (d, $J = 4.3$ Hz), 120.86 (d, $J = 5.7$ Hz), 125.78, 128.43, 128.52, 128.47 (d, $J = 129.8$ Hz), 132.66, 132.72, 132.85 (d, $J = 3.2$ Hz), 148.87 (d, $J = 2.1$ Hz, COCH_3), 149.40 (d, $J = 2.9$ Hz, COCH_3) (Ph) 172.09 (d, $J = 7.4$ Hz, CO).

Para enancjomerów (R_p,S) i (S_p,R):

^{31}P NMR δ (ppm): 33.83; ^1H NMR: δ (ppm): 0.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.52–1.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.28 (td, $J = 2.9, 7.4$ Hz, 2H, $\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 4.01–4.14 (m, 2H, OCH_2), 6.26 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, *CHP*), 6.74–6.99 (m, 3H, Ph), 7.40–7.74 (m, 5H, Ph); ^{13}C NMR δ (ppm): 13.61 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 16.60 (d, $J = 5.9$ Hz, OCH_2CH_3), 18.49 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 36.22 ($\text{C(O)CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 55.93 (OCH_3), 56.00 (OCH_3), 61.88 (d, $J = 6.6$ Hz, OCH_2), 72.15 (d, $J = 121.0$ Hz, *CHP*), 111.08, 111.40 (d, $J = 4.4$ Hz), 121.11 (d, $J = 5.7$ Hz), 126.93, 128.43, 128.51, 128.62 (d, $J = 128.9$ Hz), 132.72, 132.78, 132.83 (d, $J = 3.1$ Hz), 148.89 (d, $J = 1.8$, Hz, COCH_3), 149.51 (d, $J = 2.8$, Hz, COCH_3) (Ph), 171.95 (d, $J = 7.6$ Hz, CO).

6.5. Synteza estrów aktywnych.

6.5.1. Synteza metylosiarczanu *p*-hydroksyfenylodimetylosulfoniowego DSP.

DSP został zsyntetyzowany zgodnie z procedurą:¹⁶¹ do 0.071 mol (10 mg) siarczku *p*-hydroksyfenylometylowego dodano 0.08 mol siarczku dimetylu, a następnie całość ogrzewano w łaźni wodnej (100°C) pod chłodnicą przez 2 h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną pozostawiono do ochłodzenia, a otrzymany produkt oczyszczono za pomocą krystalizacji z metanolu. Czystość produktu sprawdzono za pomocą widm ¹H NMR.

Metylosiarczan *p*-hydroksyfenylodimetylosulfoniowy **183**:

Wydajność reakcji: 53%.

¹H NMR: δ 3.20 (s, 6H, S-(CH₃)₂), 3.41 (s, 3H, SO₄CH₃), 7.04 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ph), 7.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ph).

6.5.2. Synteza estrów DSP.

Estry DSP zsyntetyzowano zgodnie z literaturą.¹⁶² Do 4.8 mmol (3.5 mg) DSP rozpuszczonego w 100 ml acetonitrylu i ochłodzonego do temp 5°C dodawano 5.1 mmol chlorku kwasowego (odpowiednio: chlorku acetylu, chlorku butyrylu, chlorku benzoilu, chlorku 3,5-dinitrobenzoilu). Po 10 minutach wkraplano 5.1 mmol trietyloaminy, a następnie całość mieszało w temperaturze 5°C przez 48 h. Kryształ chlorku trietyloaminy odsączano, przesącz odparowywano na wyparce rotacyjnej, a produkt oczyszczano za pomocą krystalizacji w octanie etylu. Czystość produktów sprawdzano za pomocą widm ¹H NMR.

Próbie oczyszczenia metylosiarczanu *p*-acetyloksyfenylodimetylosulfoniowego **184a** podjęto za pomocą HPLC (kolumna C-18, gradient: 0% acetonitrylu w wodzie – 7 minut, 0 – 10% acetonitrylu w wodzie – 3 minuty, 10 – 90% 5 minut (czas martwy: 7.5 min), czas retencji **184a**: 12.2 min.

Metylosiarczan *p*-acetyloksyfenylodimetylosulfoniowy **184a**:

Wydajność reakcji: 40%.

^1H NMR δ (ppm): 2.32 (s, 3H, COCH_3), 3.28 (s, 6H, $\text{S}-(\text{CH}_3)_2$), 3.40 (s, 3H, SO_4CH_3), 7.52 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H, Ph), 8.14 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, Ph).

Metylosiarczan *p*-(*i*-butyryloksy)fenylodimetylosulfoniowy **184b**:

Wydajność reakcji: 67%.

^1H NMR δ (ppm): 1.32 (d, 7.0 Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.75–2.87 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.45 (s, 6H, $\text{S}-(\text{CH}_3)_2$), 3.74 (s, 3H, SO_4CH_3), 7.39 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, Ph), 8.17 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, Ph).

Metylosiarczan *p*-benzoiloksyfenylodimetylosulfoniowy **184c**:

Wydajność reakcji: 58%.

^1H NMR δ (ppm): 2.19 (s, 3H, $\text{S}-\text{CH}_3$), 2.52 (s, 3H, $\text{S}-\text{CH}_3$), 3.78 (s, 3H, SO_4CH_3), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Ph), 8.21 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ph), 7.12–7.70 (m, 5H, Ph).

Metylosiarczan *p*-(3,5-dinitrobenzoiloksy)fenylodimetylosulfoniowy **184d**:

Wydajność reakcji: 15%.

^1H NMR δ (ppm): 3.31 (s, 6H, $\text{S}-(\text{CH}_3)_2$), 3.36 (s, 3H, SO_4CH_3), 7.81 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, Ph), 8.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, Ph), 9.08–9.15 (m, 3H, Ph).

6.6. Synteza estrów Mosher`a.

Syntezę estrów MTPA przeprowadzano stosując metodę opisaną przez Dale`a i Mosher`a.¹³¹ Do mieszaniny składającej się z 300 μ l suchego dichlorometanu i 300 μ l suchej pirydyny dodawano 0.10 mmol α -hydroksyfosfinianu i 0.14 mmol (*S*)-(+)-MTPA-Cl. Mieszaninę reakcyjną pozostawiano w temperaturze pokojowej na 3 dni. Po tym czasie dodawano 0.20 mmol 3-dimetyloamino-1-propyloaminy, a po 5 minutach 10 ml eteru dietylowego. Całość przemywano 10 ml 5% kwasu solnego, 10 ml wody destylowanej, a następnie suszono za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu. Po filtracji rozpuszczalnik usuwano poprzez odparowanie, a produkt oczyszczano za pomocą HPLC (kolumna C-18, gradient: 40 – 100% acetonitrylu w wodzie w czasie 18 minut (czas martwy: 7.5 min), czas retencji **186a**: 15.0 min, **186b**: 15.0 min, **186c**: 13.6 min, **186d**: 13.9) i analizowano na widmach ¹H i ³¹P NMR.

Ester **186a**:

(*R_p,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 36.77; ¹H NMR δ (ppm): 1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.43 (dd, $J = 7.1, 15.3$ Hz, 3H, CHCH₃), 3.46 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, OCH₃), 3.92–4.25 (m, 2H, OCH₂), 5.44 – 5.70 (m, 1H, CHP), 7.33–7.78 (m, 10H, Ph);

(*S_p,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 35.62; ¹H NMR δ (ppm): 1.30 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.53 (dd, $J = 7.1, 15.1$ Hz, 3H, CHCH₃), 3.48 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, OCH₃), 3.92–4.25 (m, 2H, OCH₂), 5.44 – 5.70 (m, 1H, CHP), 7.33–7.78 (m, 10H, Ph);

(*R_p,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 36.06; ¹H NMR δ (ppm): 1.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.43 (dd, $J = 7.1, 15.3$ Hz, 3H, CHCH₃), 3.50 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, OCH₃), 3.92–4.25 (m, 2H, OCH₂), 5.44 – 5.70 (m, 1H, CHP), 7.33–7.78 (m, 10H, Ph);

(*S_p,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 36.67; ¹H NMR δ (ppm): 1.32 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.37 (dd, $J = 7.1, 15.8$ Hz, 3H, CHCH₃), 3.42 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, OCH₃), 3.92–4.25 (m, 2H, OCH₂), 5.44 – 5.70 (m, 1H, CHP), 7.33–7.78 (m, 10H, Ph).

Ester **186b**:

(*R_p,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 34.80; ¹H NMR δ (ppm): 0.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CHCHCH₃), 1.05 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CHCHCH₃), 1.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 2.12–2.37 (m, 1H, PCHCH), 3.45 (s, 3H, OCH₃), 3.91–4.19 (m, 2H, OCH₂), 5.54 (dd, $J = 5.2, 10.9$ Hz, 1H, CHP), 7.34–7.82 (m, 10H, Ph);

(*S_P,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 34.36; ¹H NMR δ (ppm): 0.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CHCHCH₃), 1.04 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CHCHCH₃), 1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2.12–2.37 (m, 1H, PCHCH), 3.46 (s, 3H, OCH₃), 3.91–4.19 (m, 2H, OCH₂), 5.39 (dd, *J* = 3.5, 5.0 Hz, 1H, CHP), 7.34–7.82 (m, 10H, Ph);

(*R_P,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 34.31; ¹H NMR δ (ppm): 0.889 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CHCHCH₃), 0.892 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CHCHCH₃), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2.12–2.37 (m, 1H, PCHCH), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 3.91–4.19 (m, 2H, OCH₂), 5.39 (dd, *J* = 3.5, 5.0 Hz, 1H, CHP), 7.34–7.82 (m, 10H, Ph);

(*S_P,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 34.73; ¹H NMR δ (ppm): 0.73 (d, *J* = 5.6 Hz, 3H, CHCHCH₃), 1.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 3H, CHCHCH₃), 1.29 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2.12–2.37 (m, 1H, PCHCH), 3.42 (s, 3H, OCH₃), 3.91–4.19 (m, 2H, OCH₂), 5.56 (dd, *J* = 5.4, 10.8 Hz, 1H, CHP), 7.34–7.82 (m, 10H, Ph).

Ester 186c:

(*R_P,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 32.55; ¹H NMR δ (ppm): 1.26 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.42 (s, 3H, OCH₃), 3.97–4.12 (m, 2H, OCH₂), 6.41 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, CHP), 6.99–7.56 (m, 10H, Ph);

(*S_P,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 32.94; ¹H NMR δ (ppm): 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 3.97–4.12 (m, 2H, OCH₂), 6.51 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, CHP), 6.99–7.56 (m, 10H, Ph);

(*R_P,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 32.80; ¹H NMR δ (ppm): 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.43 (s, 3H, OCH₃), 3.97–4.12 (m, 2H, OCH₂), 6.40 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CHP), 6.99–7.56 (m, 10H, Ph);

(*S_P,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 33.00; ¹H NMR δ (ppm): 1.31 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.50 (s, 3H, OCH₃), 3.97–4.12 (m, 2H, OCH₂), 6.37 (d, *J* = 10.1 Hz, 1H, CHP), 6.99–7.56 (m, 10H, Ph).

Ester 186d:

(*R_P,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 32.72; ¹H NMR δ (ppm): 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.42 (s, 3H, CHOCH₃), 3.69 (s, 3H, PhOCH₃), 3.87 (s, 3H, PhOCH₃), 3.97–4.18 (m, 2H, OCH₂), 6.33 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CHP), 6.73–6.85 (m, 3H, Ph), 7.30–7.64 (m, 10H, Ph);

(*S_P,R,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 32.92; ¹H NMR δ (ppm): 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (s, 3H, PhOCH₃), 3.855 (s, 3H, PhOCH₃), 3.97–4.18 (m, 2H, OCH₂), 6.45 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H, CHP), 6.73–6.85 (m, 3H, Ph), 7.30–7.64 (m, 10H, Ph);

(*R_P,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 32.87; ¹H NMR δ (ppm): 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.440 (s, 3H, OCH₃), 3.53 (s, 3H, PhOCH₃), 3.848 (s, 3H, PhOCH₃), 3.97–4.18 (m, 2H, OCH₂), 6.35 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, CHP), 6.73–6.85 (m, 3H, Ph), 7.30–7.64 (m, 10H, Ph);

(*S_P,S,R*): ³¹P NMR δ (ppm): 33.26; ¹H NMR δ (ppm): 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 3.444 (s, 3H, OCH₃), 3.52 (s, 3H, PhOCH₃), 3.855 (s, 3H, PhOCH₃), 3.97–4.18 (m, 2H, OCH₂), 6.31 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, CHP), 6.73–6.85 (m, 3H, Ph), 7.30–7.64 (m, 10H, Ph).

6.7. Przygotowanie biokatalizatorów do reakcji biotransformacji.

6.7.1. Przygotowanie preparatu enzymatycznego z *Candida cylindracea* do modyfikacji.

Komercyjnie dostępna lipaza z *Candida cylindracea* została podczyszczona poprzez dializę. 10 g preparatu enzymatycznego rozpuszczono w 100 ml wody dejonizowanej. Następnie całość odwirowano w wirówce przez 10 minut (3000 obr/min). Supernatant przeniesiono do woreczków dializacyjnych i pozostawiono w temperaturze 10°C w wodzie dejonizowanej na 72 h, zmieniając wodę co 24 h. Po tym czasie roztwór z woreczków przeniesiono do plastikowego naczynia, zamrożono i zliofilizowano. W ten sposób otrzymano 1.7 g podczyszczonej lipazy.

6.7.2. Chemiczna modyfikacja lipazy z *Candida cylindracea*.

Chemiczną modyfikację lipazy z *Candida cylindracea* przeprowadzano metodą opisaną w literaturze.¹⁶³ Do 0.25 g podczyszczonej lipazy rozpuszczonej w 50 ml 0.1 M buforu boranowego (kwas boranowy/wodorotlenek sodu) o pH 8.0 dodawano 0.5 g odpowiedniego estru aktywnego. Całość pozostawiano, mieszając, w temperaturze 10°C na 24 h. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przenoszono do woreczków dializacyjnych i pozostawiano w temperaturze 10°C w wodzie dejonizowanej na 72 h, zmieniając wodę co 24 h. Po tym czasie roztwór z woreczków przenoszono do plastikowego naczynia, zamrażano i liofilizowano.

6.7.3. Przygotowanie komórek mikroorganizmów.

Mikroorganizmy były przechowywane w temperaturze 4°C na agarze odżywczym.

Do przygotowania komórek mikroorganizmów o wysokiej aktywności lipolitycznej testowano podłoże A opisane w literaturze o składzie: 1% (w/v) skrobi rozpuszczalnej, 0.1% (w/v) ekstraktu z drożdży, 0.5% (w/v) siarczanu amonu (NH₄)₂SO₄, 0.1% (w/v) siedmiowodnego siarczanu magnezu MgSO₄·7H₂O, 0.5% (w/v) węglanu wapnia CaCO₃, 0.2% (w/v) wodorofosforanu potasu K₂HPO₄, 0.1% (w/v) oliwy z oliwek, rozpuszczone w wodzie destylowanej.¹⁰⁹ Jednak ze względu na powstający osad nierozpuszczalnych

fosforanów magnezu i wapnia utrudniający otrzymanie czystych komórek mikroorganizmów, zmodyfikowano to podłoże. Zmodyfikowane podłoże B stosowane do przygotowania biokatalizatora składało się z: 1% (w/v) skrobi rozpuszczalnej, 0.1% (w/v) ekstraktu z drożdży, 0.5% (w/v) siarczanu amonu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% (w/v) wodorofosforanu potasu K_2HPO_4 , 0.01% (v/v) tributyriny w wodzie destylowanej. Mikroorganizmy były inkubowane na podłożu B w 26°C w wytrząsarce (150 obr/min) przez 2 dni, następnie pobierano 3 ml inokulum i inkubowano w takich samych warunkach przez 3 dni. Po tym czasie mikroorganizmy były odwirowywane w wirówce (3000 obr/min) przez 10 minut, a następnie przemywane dwukrotnie 0.017 M buforem fosforanowym (pH 7.0). Tak przygotowany biokatalizator, był od razu wykorzystywany do reakcji biotransformacji.

6.7.4. Permeabilizacja.

Permeabilizację komórek mikroorganizmów przeprowadzano według metody opisanej w literaturze.¹⁶⁴ Przygotowane wcześniej komórki mikroorganizmów były przenoszone do 2 ml 0.017 M buforu fosforanowego (pH 7.0). Do tak przygotowanego biokatalizatora dodawano 100 μl mieszaniny permeabilizującej (o składzie: toluen, etanol, Triton X-100 1:4:0.02). Permeabilizację przeprowadzano przez 4 h. Po tym czasie komórki odwirowywano, przemywano 0.017 M buforem fosforanowym (pH 7.0) i używano do reakcji biotransformacji w buforze fosforanowym.

6.7.5. Immobilizacja.

Immobilizację komórek mikroorganizmów przeprowadzano metodą opisaną przez Khana i współpracowników.¹⁶⁵ Przygotowane do biotransformacji komórki mikroorganizmów zawieszano w 18 ml 0.70 M buforu MOPS (pH 7.8). Uzyskaną zawiesinę mieszano z 18 ml 4% roztworu alginianu sodu. Całość mieszano przez 5 minut, a następnie wkraplano do 250 ml 1% roztworu chlorku wapnia (CaCl_2) i pozostawiano na 45 minut. Po tym czasie otrzymane mikrokapsułki odsączano, przemywano wodą destylowaną i używano do reakcji biotransformacji w buforze lub układzie dwufazowym.

6.8. Reakcje biotransformacji.

Wszystkie reakcje biotransformacji były wykonywane w trzech powtórzeniach.

6.8.1. Biokatalityczne reakcje hydrolizy w układzie dwufazowym.

Układ dwufazowy, w którym przeprowadzano reakcje enzymatycznej hydrolizy wszystkich α -butyryloksyfosfinianów składał się z 3 ml 0.05 M buforu fosforanowego (pH 7.0) i mieszaniny eteru diizopropylowego (0.2 ml) i *n*-heksanu (0.8 ml). Po dodaniu 0.2 mmol substratu i 100 mg lipazy, reakcję przeprowadzano w temperaturze pokojowej na wytrząsarce (150 obr/min). Reakcję przerywano po osiągnięciu stopnia konwersji ok. 50% (maksymalny czas reakcji – 168 h), produkt reakcji ekstrahowano dwukrotnie 15 ml octanu etylu i suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Po filtracji rozpuszczalnik odparowywano, a produkt analizowano wykorzystując widma ^{31}P NMR z dodatkiem chininy.

W ten sam sposób przeprowadzano reakcje biotransformacji immobilizowanymi komórkami mikroorganizmów. Stopień konwersji determinowano na podstawie widm ^{31}P NMR. Produkt oczyszczano za pomocą HPLC (kolumna C-18, gradient: 40 – 100% acetonitrylu w wodzie w czasie 18 minut (czas martwy: 7.5 min), czas retencji **180a**: 8.8 min) i analizowano za pomocą HPLC z chiralną kolumną (CHIRALPAK AD, Diacel, eluent: 4% 2-propanolu w *n*-heksanie, czas retencji **181a**: (S_p,R) – 17.7 min, (S_p,S) – 18.3 min, (R_p,S) – 19.2 min, (R_p,R) – 21.5 min).

6.8.2. Enzymatyczna hydroliza w rozpuszczalniku organicznym.

Modyfikację środowiska reakcji przeprowadzano zmieniając układ dwufazowy na rozpuszczalnik organiczny nasycony wodą lub roztworem soli: MgCl_2 , LiCl lub Tritonu X-100.¹⁶⁰ Do 2 ml eteru diizopropylowego dodawano 15 μl wody destylowanej lub wodnego roztworu soli (2.4 mol LiCl , 1.2 mol MgCl_2) lub 2% Tritonu X-100, 0.036 mmol substratu i 100 mg lipazy. Reakcję przeprowadzano w temperaturze pokojowej na wytrząsarce (150 obr/min). Reakcję przerywano po osiągnięciu stopnia konwersji ok. 50% (maksymalny czas reakcji – 168 h), poprzez odfiltrowanie katalizatora, dodanie 15 ml octanu etylu i suszenie bezwodnym siarczanem magnezu. Po filtracji rozpuszczalnik odparowywano, a produkt analizowano wykorzystując widma ^{31}P NMR z dodatkiem chininy.

6.8.3. Enzymatyczna hydroliza w układzie dwufazowym z dodatkami.

W reakcjach enzymatycznej hydrolizy z zastosowaniem czynników zapobiegających agregacji białka enzymatycznego, wykorzystywano zmodyfikowany układ dwufazowy składający się z 2 ml eteru diizopropylowego i 1 ml wody destylowanej lub wodnego roztworu soli (2.4 mol LiCl, 1.2 mol MgCl₂) lub 2% Tritonu X-100. Po dodaniu 0.036 mmol substratu i 20 mg lipazy, reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej na wytrząsarce (150 obr/min). Reakcję przerywano po osiągnięciu stopnia konwersji ok. 50% (maksymalny czas reakcji – 168 h), produkt reakcji ekstrahowano dwukrotnie 15 ml octanu etylu i suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Po filtracji rozpuszczalnik odparowywano, a produkt analizowano za pomocą widm ³¹P NMR stosując chininę jako chiralny dyskryminator.

6.8.4. Enzymatyczna transestryfikacja.

Reakcje transestryfikacji przeprowadzane zostały zgodnie z literaturą.¹¹⁹ Do 2 ml eteru diizopropylowego dodawano 20 mg sit molekularnych 3Å (o konsystencji pudru), 0.023 mmol substratu, 20 lub 200 mg lipazy i 0.165 mmol maślanu winylu. Reakcję prowadzono w temperaturze 36°C na wytrząsarce (150 obr/min). Reakcję przerywano po osiągnięciu stopnia konwersji ok. 50% (maksymalny czas reakcji – 168 h), poprzez odfiltrowanie katalizatora i sit molekularnych. Następnie do przesączu dodano 15 ml octanu etylu i suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Po filtracji rozpuszczalnik odparowywano, a stopień konwersji analizowano za pomocą widm ³¹P NMR. Następnie produkt oczyszczano za pomocą HPLC (kolumna C-18, gradient: 40 – 70% acetonitrylu w wodzie w czasie 10 minut (czas martwy: 7.5 min), czas retencji **181a**: 11.2 min) i analizowano za pomocą HPLC z chiralną kolumną (CHIRALPAK AD, Diacel, eluent: 10% 2-propanolu w *n*-heksanie, czas retencji **181a**: (*S_p,S*) – 7.6 min, (*R_p,R*) – 8.2 min, (*R_p,S*) – 8.5 min, (*S_p,R*) – 9.7 min).

6.8.5. Modyfikacja środowiska reakcji transestryfikacji.

Do mieszaniny reakcyjnej przygotowanej tak jak dla enzymatycznej transestryfikacji, dodawano 0.023 mmol trietyloaminy lub pirydyny. Reakcję przeprowadzano w takich samych warunkach jak dla reakcji transestryfikacji bez dodatkowych czynników modyfikujących.

6.8.6. Hydroliza komórkami mikroorganizmów.

Przygotowane wcześniej komórki mikroorganizmów przenoszono do 100 ml 0.017 M buforu fosforanowego (pH 7.0). Do tak przygotowanego medium reakcyjnego dodawano 50 μ l substratu i wytrząsano na wytrząsarce (150 obr/min). Reakcję przerywano po osiągnięciu stopnia konwersji ok. 50% (maksymalny czas reakcji – 168 h), produkt reakcji ekstrahowano dwukrotnie 50 ml octanu etylu i suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Po filtracji rozpuszczalnik odparowywano, a produkt analizowano wykorzystując widma ^{31}P NMR z dodatkiem chininy.

W ten sam sposób przeprowadzano reakcje biotransformacji permeabilizowanymi i immobilizowanymi komórkami mikroorganizmów. Produkty reakcji katalizowanych permeabilizowanymi komórkami były analizowane w analogiczny sposób jak produkty otrzymane po hydrolizie całymi komórkami. Natomiast stopień konwersji reakcji biotransformacji immobilizowanymi komórkami analizowano za pomocą widm ^{31}P NMR. Produkt oczyszczano za pomocą HPLC (kolumna C-18, gradient: 40 – 100% acetonitrylu w wodzie w czasie 18 minut (czas martwy: 7.5 min), czas retencji **180a**: 8.8 min) i analizowano za pomocą HPLC z chiralną kolumną (CHIRALPAK AD, Diacel, eluent: 4% 2-propanolu w *n*-heksanie, czas retencji **181a**: (S_P,R) – 17.7 min, (S_P,S) – 18.3 min, (R_P,S) – 19.2 min, (R_P,R) – 21.5 min).

6.9. Przygotowanie α -hydroksyfosfinianów do określenia ich konfiguracji absolutnej.

6.9.1. Próby otrzymania czystych par enancjomerów.

Zsyntetyzowany i oczyszczony α -butyryloksyfosfinian **181** наносono na kolumnę do chromatografii wypełnionej żelem krzemionkowym i eluowano mieszaniną trójskładnikową o składzie: chlorek metylenu:*n*-heksan:octan etylu (1:1:0.5). Po chromatografii otrzymano mieszaninę diastereoizomerów o składzie: **181a** – 1:0.4; **181b** – 1:0.7, **181c** – 1:0.2, **181d** – 1:0.7 oraz jedną czystą parę izomerów (*S_p,R*) i (*R_p,S*) związku **181c** z 10% wydajnością.

6.9.2. Otrzymanie α -butyryloksyfosfinianów o różnym składzie izomerów.

α -Butyryloksyfosfiniany o różnym składzie diastereoizomerów poddano hydrolizie za pomocą lipaz lub całych komórek mikroorganizmów o znanej enancjoselektywności. Po reakcji produkty i nieprzereagowane substraty rozdzielono za pomocą HPLC (kolumna C-18, gradient: 40 – 100% acetonitrylu w wodzie w czasie 18 minut (czas martwy: 7.5 min), czas retencji: **180a** – 8.8 min; **180b** – 9.8 min; **180c** – 9.8 min; **180d** – 9.4 min; **181a** – 11.5 min; **181b** – 12.8 min; **181c** – 12.6 min; **181d** – 11.8 min). Nieprzereagowane α -butyryloksyfosfiniany **181** zostały chemicznie zhydrolizowane za pomocą kwasu siarkowego. Nadmiar enancjomeryczny α -hydroksyfosfinianów **180** określono za pomocą widm ³¹P NMR z dodatkiem chininy.

6.9.3. Chemiczna hydroliza α -hydroksyfosfinianów.

Nieprzereagowany, oczyszczony za pomocą HPLC α -butyryloksyfosfinian, otrzymany po biotransformacji, dodawano do roztworu kwasu siarkowego w metanolu (3 krople kwasu siarkowego rozpuszczone w 3 ml metanolu). Całość pozostawiano, mieszając, na 24 – 72 h, kontrolując postęp reakcji na płytkach TLC stosując eluent: mieszaninę dichlorometanu i octanu etylu (5:3 v/v). Po tym czasie dodawano 20 ml 5% roztworu wodorotlenku sodu, całość ekstrahowano 20 ml octanu etylu, a następnie suszono za pomocą bezwodnego siarczanu magnezu. Rozpuszczalnik odparowywano, produkt oczyszczano na HPLC.

6.9.4. Krystalizacja.

Krystalizację przeprowadzono w cienkiej rurce. Rurka była napelniona do połowy rozpuszczonym związkiem **180c** (jeden izomer) w chlorku metylenu, a następnie kroplami był dodawany heksan i rurka została szczelnie zamknięta. W ten sposób otrzymano kryształy izomeru (*R_p,S*) – **180c** nadające się do badań krystalograficznych.

6.10. Metody analityczne.

6.10.1. Oznaczanie zawartości białka w preparatach enzymatycznych metodą Bradford.

Do oznaczenia zawartości białka metodą Bradford¹⁶⁸ został użyty odczynnik Coomassie Brilliant Blue G-250. 100 mg tego odczynnika rozpuszczono w 100 ml 85% kwasu fosforowego, 50 ml 95% etanolu i 50 ml wody dejonizowanej. Tak przygotowany roztwór macierzysty przechowywano w ciemnej butelce w temp 4°C. Roztwór roboczy przygotowano bezpośrednio przed pomiarami poprzez rozcieńczenie 1 objętości roztworu macierzystego w 4 objętościach wody dejonizowanej. Całość przed użyciem przefiltrowano.

Krzywą wzorcową wykonano za pomocą roztworów albuminy o różnych stężeniach. Pomiarów dokonano na spektrometrze UV-vis dla długości fali: $\lambda = 595$ nm.

Do kuwety pomiarowej przenoszono 2.5 ml roztworu roboczego barwnika dodawano 50 μ l badanego roztworu białka. Po upływie 6 minut mierzono absorbancję względem próby kontrolnej (2.5 ml roztworu roboczego barwnika i 50 μ l wody destylowanej).

6.10.2. Określenie stopnia modyfikacji lipazy.

Stopień modyfikacji był mierzony za pomocą metody TNBS¹⁶³ określającej zawartość wolnych grup aminowych w białku. Niezmodyfikowana lipaza posłużyła za próbę kontrolną. 5 mg lipazy rozpuszczano w 1 ml wody destylowanej, dodawano 6 ml 0.15 M buforu fosforanowego (pH 9.2) i całość inkubowano w temperaturze 50°C przez 5 minut. Następnie dodawano 1 ml 0.2% (w/v) roztworu wodnego kwasu 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowego TNBS i 1 ml 0.03 M Na₂SO₃. Całość pozostawiano na 1 h w temperaturze 50°C. Absorbancja była mierzona na spektrometrze UV-vis dla długości fali: $\lambda = 425$ nm. Stopień modyfikacji obliczano według wzoru:

$$\text{Stopień modyfikacji [\%]} = (1-A/B) \cdot 100$$

A – absorbancja zmodyfikowanej lipazy

B – absorbancja niezmodyfikowanej lipazy

6.10.3. Określenie aktywności preparatów enzymatycznych.

Do określenia aktywności lipaz wykonywano pomiary stopnia hydrolizy palmitynianu *p*-nitrofenolu (pNPP).¹⁶⁹ 10 ml 16.5 mM roztworu pNPP w 2-propanolu zmieszano z 90 ml mieszaniny 0.4% (w/v) Tritonu X-100 i 0.1% (w/v) gumy arabskiej w 50 mM buforu Tris-HCl (pH 8.0). Całość inkubowano w 37°C przez 10 minut. 2 ml tak przygotowanego roztworu, bezpośrednio przed pomiarem przenoszono do kuwety pomiarowej, która następnie była przenoszona do spektrofotometru UV-vis (37°C). Pomiary rozpoczynano w momencie dodania 0.05 ml roztworu enzymu rozpuszczonego w 50 mM buforu Tris-HCl (pH 8.0). Poziom przereagowania był obliczony z równania krzywej zmian absorbancji w czasie. Molowy współczynnik ekstynkcji został obliczony z krzywej standardowej pomiaru absorbancji *p*-nitrofenolu dla jego różnych stężeń.

Jednostką aktywności [U] jest ilość *p*-nitrofenolu [μ mol] powstająca w czasie 1 minuty w trakcie hydrolizy palmitynianu *p*-nitrofenolu lipazą. Aktywność była mierzona w jednostkach na mg białka, lub gdy nie był możliwy pomiar stężenia białka – na mg preparatu enzymatycznego [U/mg].

6.10.4. Określenie stopnia przereagowania.

Stopień przereagowania każdej reakcji biotransformacji był mierzony na podstawie widm ³¹P NMR według wzoru:

$$\text{Stopień przereagowania [\%]} = A/(A+B) \cdot 100$$

A – pole powierzchni pod sygnałem produktu

B – pole powierzchni pod sygnałem substratu.

Ponieważ zarówno hydroksyfosfiniany jak i butyryloksyfosfiniany dają po 2 sygnały na widmach ³¹P NMR pochodzące od par enancjomerów, stopień przereagowania obliczano dla każdej pary enancjomerów osobno.

W przypadku obliczeń stopnia przereagowania z widm ³¹P NMR z chininą (większość obliczeń dla reakcji hydrolizy) $A = A' + A''$, gdzie:

A' – pole powierzchni pod sygnałem jednego enancjomeru produktu

A'' – pole powierzchni pod sygnałem drugiego enancjomeru produktu.

6.10.5. Określenie nadmiaru enancjomerycznego ee.

Nadmiar enancjomeryczny ee obliczono na podstawie widm ^{31}P NMR z chininą lub na podstawie chromatogramów z HPLC z chiralną kolumną.

ee obliczono według następującego wzoru:

$$ee [\%] = (A' - A'') / (A' + A'') \cdot 100$$

gdzie:

A' – pole powierzchni pod sygnałem (na widmie ^{31}P NMR lub na chromatogramie) jednego enancjomeru produktu

A'' – pole powierzchni pod sygnałem (na widmie ^{31}P NMR lub na chromatogramie) drugiego enancjomeru produktu.

7. Literatura

- 1 Murai T., Tomizawa C., *J. Environ. Sci. Health*, **B11** (1976) 185-197
- 2 Freedman L. D., Doak G. O., *Chem. Rev.*, **57** (1957) 479-523
- 3 Kononova S. V., Nesmeyanova M. A., *Biochemistry (Moscow)*, **67** (2002) 184-195
- 4 Mucha A., Kafarski P., *Tetrahedron*, **58** (2002) 5855-5863
- 5 Horiguchi M., Kandatsu M., *Nature*, **184** (1959) 901-902
- 6 Kittredge J. S., Roberts E., *Science*, **164** (1969) 37-42
- 7 Wassef M. K., Hendrix J. W., *Biochim. Biophys. Acta*, **486** (1976) 172-178
- 8 Hasegawa S., Tamari M., Kametaka M., *J. Biochem. (Tokyo)*, **80** (1976) 531-535
- 9 Fields S. C., *Tetrahedron*, **55** (1999) 12237-12273
- 10 Kittredge J. S., Hughes R. R., *Biochemistry*, **3** (1964) 991-996
- 11 La Nauze J. M., Rosenberg H., Shaw D. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **212** (1970) 332-350
- 12 Logusch E.W., Walker D. M. McDonald J. F., Franz J. E., *Biochemistry*, **28** (1989) 3043-3051
- 13 Duke S. O., Dayan F. E., Romagni J. G., Rimando A. M., *Weed Res.*, **40** (2000) 90-111
- 14 Hendlin D., Stapley E. O., Jackson M., Wallick H., Miller A. K., Wolf F. J., Miller T. W., Chaiet L., Kahan F. M., Foltz E. L., Woordruff H. B., Mata J. M., Hernandez S., Mochales S., *Science*, **166** (1969) 122-123
- 15 Hamada M., Honda J., Yoshimuta T., Fumimori T., Okamoto M., Aizawa H., *International Immunopharmacology*, **2** (2002) 511-518
- 16 Kugler M., Loeffler W., Rapp C., Kern A., Jung G., *Arch. Microbiol.*, **153** (1990) 276-281
- 17 Fredenhagen A., Angst C., Peter H. H., *J. Antibiot. (Tokyo)*, **48** (1995) 1043-1045
- 18 Bhattacharya A. K., Thyagarajan G., *Chem. Rev.*, **81** (1981) 415-430
- 19 Hartmann H. M., *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **35** (2002) 347-356
- 20 Morimoto F., Shimazu T., Yoshioka T., *American Journal of Emergency Medicine*, **17** (1999) 493-494
- 21 Kassa J., Vachek J., *Toxicology*, **177** (2002) 179-185
- 22 Boocock M.R., Coggins J.R., *FEBS Lett.*, **154** (1983) 127-133
- 23 Atherton F. R., Hall M. J., Hassall C. H., Lambert R. W., Lloyd W. J., Ringrose P. S., *Antimicrob. Agents & Chemother.*, **15** (1979) 696-705
- 24 Swyryd E. A., Seaver S. S., Stark G. R., *J. Biol. Chem.*, **249** (1974) 6945-6950
- 25 Russell R. G. G., Croucher P. I., Rogers M. J., *Osteoporos. Int.*, **9** (1999) Suppl 2:S66-80
- 26 Woo S.-B., Hellstein J. W., Kalmar J. R., *Ann. Intern. Med.*, **144** (2006) 753-761
- 27 Fleish H., *Endocr. Rev.*, **19** (1998) 80-100
- 28 Clezardin F., *Rev. Rhum.*, [Ed Fr], **69** (2002) 997-1001
- 29 Kálmán E., *Electrochim. Acta*, **46** (2001) 3607-3609
- 30 Kolodiaznyy O. I., *Tetrahedron: Asymm.*, **16** (2005) 3295-3340
- 31 Dellaria J. F., Jr., Maki R. G., Stein H. H., Cohen J., Whittern D., Marsh K., Hoffman D.J., Plattner J. J., Perun T. J., *J. Med. Chem.*, **33** (1990) 534-542.
- 32 Patel D. V., Rielly-Gauvin K., Ryono D. E., Free C. A., Rogers W. L., Smith S. A., DeForrest J. M., Oehl E. W., Petrillo E. W. Jr., *J. Med. Chem.*, **38** (1995) 4557-4569.
- 33 Hlazy S., Ehrhard A., Eggrnspiller A., Berges-Gross V., Danzin C., *Tetrahedron*, **52** (1996) 177-184
- 34 Frechette R., Ackerman C., Beers S., Look R., Moore J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7** (1997) 2169-2172
- 35 Stowasser B., Budt K.-H., Jian-Qi L., Peyman A., Ruppert D., *Tetrahedron Lett.*, **33** (1992) 6625-6628
- 36 Srinivas R. V., Connely M., Fridland A., *Antivir. Res.*, **35** (1997) 23-27
- 37 Szymańska A., Szymczak M., Boryski J., Stawiński J., Kraszewski A., Collu G., Sanna G., Giliberti G., Loddo R., La Colla P., *Bioorg. Med. Chem.*, **14** (2006) 1924-1934
- 38 Snoeck R., Holy A., Dewolf-Peeters C., Van Den Oord J., De Clercq E., Andrei A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46** (2002) 3356-3361
- 39 Yokomatsu T., Murano T., Akiyama T., Koizumi J., Shibuya S., Tsuji Y., Soeda S., Shimeno H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13** (2003) 229-236
- 40 Russell R. G. G., Rogers M. J., *Bone*, **25** (1999) 97-106
- 41 Takahashi E., Kimura T., Nakamura K., Arahira M., Iida M., *J. Antibiot. (Tokyo)*, **48** (1995) 1124-1129
- 42 Korn E. D., Dearborn D. G., Fales H. M., Sokoloski E. A., *J. Biol. Chem.*, **248** (1973) 2257-2259
- 43 Abramov B. C., *Zh. Obshch. Kim.*, **22** (1952) 647-652
- 44 Pudovik A. N., Konovalova J. V., *Synthesis*, (1979) 81-96
- 45 Gordon N. J., Evans S. A., Jr., *J. Org. Chem.*, **58** (1993) 5293-5294
- 46 Blazis V. J., Koeller K. J., Spilling C.D., *J. Org. Chem.*, **60** (1995) 931-940
- 47 Devitt P. G., Kee T. P., *Tetrahedron*, **51** (1995) 10987-10996
- 48 Moreno G. E., Quintero L., Bernès S., de Parrodi C. A., *Tetrahedron Lett.*, **45** (2004) 4245-4248
- 49 Sum V., Davies A.J., Kee T. P., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1992) 1771-1773
- 50 Greene N., Kee T. P., *Synth. Commun.*, **23** (1993) 1651-1657
- 51 Pickersgill I. F., Devitt P. G., Kee T. P., *Synth. Commun.*, **23** (1993) 1643-1650

- 52 Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymm.*, **4** (1993) 1401-1404
- 53 Wróblewski A. E., Piotrowska D. G., *Tetrahedron*, **54** (1998) 8123-8132
- 54 Wróblewski A. E., Piotrowska D. G., *Tetrahedron: Asymm.*, **12** (2001) 2977-2984
- 55 Pousset C., Larchevêque M., *Tetrahedron Lett.*, **43** (2002) 5257-5260
- 56 Drag M., Latajka R., Gumienna-Kontecka E., Kozłowski H., Kafarski P., *Tetrahedron: Asymm.*, **14** (2003) 1837-1845
- 57 Patel D. V., Rielly-Geuvin K., Ryono D. E., *Tetrahedron Lett.*, **31** (1990) 5587-5590
- 58 Yokomatsu T., Yoshida Y., Shibuya S., *J. Org. Chem.*, **59** (1994) 7930-7933
- 59 Bongini A., Camerini R., Panuzio M., Bandini E., Martelli G., Spunta G., *Tetrahedron: Asymm.*, **7** (1996) 3485-3504
- 60 Bongini A., Camerini R., Panunzio M., *Tetrahedron: Asymm.*, **7** (1996) 1467-1476
- 61 Bandini E., Martelli G., Spunta G., Panunzio M., *Tetrahedron: Asymm.*, **6** (1995) 2127-2130
- 62 Sasai H., Bougauchi M., Arai T., Shibasaki M., *Tetrahedron Lett.*, **38** (1997) 2717-2720
- 63 Arai T., Bougauchi M., Sasai H., Shibasaki M., *J. Org. Chem.*, **61** (1996) 2926-2927
- 64 Yamagishi T., Yokomatsu T., Suemune K., Shibuya S., *Tetrahedron*, **55** (1999) 12125-12136
- 65 Yokomatsu T., Yamagishi T., Shibuya S., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, (1997) 1527-1533
- 66 Ward C. V., Jiang M., Kee T. P., *Tetrahedron Lett.*, **41** (2000) 6181-6184
- 67 Duxbury J. P., Cawley A., Thornton-Pett M., Wantz L., Warne J. N. D., Greatrex R., Brown D., Kee T. P., *Tetrahedron Lett.*, **40** (1999) 4403-4406
- 68 Yamagishi T., Suemune K., Yokomatsu T., Shibuya S., *Tetrahedron Lett.*, **42** (2001) 5033-5036
- 69 Ordóñez M., de la Cruz R., Fernández-Zertuche M., Muñoz-Hernández M.-Á., *Tetrahedron: Asymm.*, **13** (2002) 559-562
- 70 Ordóñez M., de la Cruz-Cordero R., Quiñones C., González-Morales A., *Chem. Commun.*, (2004) 672-673
- 71 Ordóñez M., de la Cruz-Cordero R., Fernández-Zertuche M., Muñoz-Hernández M.-Á., Gracia-Barradas O., *Tetrahedron: Asymm.*, **15** (2004) 3035-3043
- 72 Ordóñez M., González-Morales A., Salazar- Fernández H., *Tetrahedron: Asymm.*, **15** (2004) 2719-2725
- 73 Gajda T., *Tetrahedron: Asymm.*, **5** (1994) 1965-1972
- 74 Nesterov V. V., Kolodyazhnyi O. I., *Russ. J. Gen. Chem.*, **75** (2005) 1161-1162
- 75 Nesterov V. V., Kolodyazhnyi O. I., *Tetrahedron: Asymm.*, **17** (2006) 1023-1026
- 76 Kolodyazhnyi O. I., Gulyaiko I. V., *Russ. J. Gen. Chem.*, **73** (2003) 1825-1826
- 77 Meier C., Laux W. H. G., *Tetrahedron: Asymm.*, **7** (1996) 89-94
- 78 Meier C., Laux W. H. G., *Tetrahedron*, **52** (1996) 589-598
- 79 Meier C., Laux W. H. G., *Tetrahedron: Asymm.*, **6** (1995) 1089-1092
- 80 Gautier I., Ratovelomanana-Vidal V., Savignac P., Genêt J.-P., *Tetrahedron Lett.*, **37** (1996) 7721-7724
- 81 Barco A., Benetti S., Bergamini P., De Risi C., Marchetti P., Pollini G. P., Zanirato V., *Tetrahedron Lett.*, **40** (1999) 7705-7708
- 82 Pogatchnik D. M., Wiemer D. F., *Tetrahedron Lett.*, **38** (1997) 3495-3498
- 83 Skropeta D., Schmidt R. R., *Tetrahedron: Asymm.*, **14** (2003) 265-273
- 84 Sharpless K. B., Amberg W., Bennani Y. L., Crispino G. A., Hartung J., Jeong K.-S., Kwong H.-L., Morikawa K., Wang Z.-M., Xu D., Zhang X.-L., *J. Org. Chem.*, **57** (1992) 2768-2771
- 85 Yokomatsu T., Yoshida Y., Suemune K., Yamagishi T., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymm.*, **6** (1995) 365-368
- 86 Yokomatsu T., Yamagishi T., Suemune K., Yoshida Y., Shibuya S., *Tetrahedron*, **54** (1998) 767-780
- 87 Yokomatsu T., Yamagishi T., Sada T., Suemune K., Shibuya S., *Tetrahedron*, **54** (1998) 781-790
- 88 Cravotto G., Giovenzana G. B., Pagliarini R., Palmisano G., Sisti M., *Tetrahedron: Asymm.*, **9** (1998) 745-748
- 89 Cristau H.-J., Pirat J.-L., Drag M., Kafarski P., *Tetrahedron Lett.*, **41** (2000) 9781-9785
- 90 Nakamura K., Yamamura S., *Tetrahedron Lett.*, **38** (1997) 437-438
- 91 Wróblewski A. E., Hałajewska-Wosik A., *Tetrahedron: Asymm.*, **11** (2000) 2053-2055
- 92 Wróblewski A. E., Hałajewska-Wosik A., *Eur. J. Org. Chem.*, (2002) 2758-2763
- 93 Denmark S. E., Miller P. C., *Tetrahedron Lett.*, **36** (1995) 6631-6634
- 94 Sawamura M., Ito Y., Hayashi T., *Tetrahedron Lett.*, **30** (1989) 2247-2250
- 95 Faber K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4th ed., Springer-Verlag, Berlin (2000)
- 96 Kafarski P., Lejczak B., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **29** (2004) 99-104
- 97 Drescher M., Hammerschmidt F., *Tetrahedron*, **53** (1997) 4627-4636
- 98 Wuggenig F., Hammerschmidt F., *Monatsh. Chem.*, **129** (1998) 423-436
- 99 Hammerschmidt F., Lindner W., Wuggenig F., Zarbl E., *Tetrahedron: Asymm.*, **11** (2000) 2955-2964
- 100 Drescher M., Li Y.-F., Hammerschmidt F., *Tetrahedron*, **51** (1995) 4933-4946
- 101 Li Y.-F., Hammerschmidt F., *Tetrahedron: Asymm.*, **4** (1993) 109-120

- 102 Zhang Y., Li J.-F., Yuan C.-Y., *Tetrahedron*, **59** (2003) 473-479
- 103 Zhang Y., Li Z., Yuan C.-Y., *Tetrahedron Lett.*, **43** (2002) 3247-3249
- 104 Zhang Y., Xu C., Li J., Yuan C., *Tetrahedron: Asymm.*, **14** (2003) 63-70
- 105 Kiełbasiński P., Omelańczuk J., Mikołajczyk M., *Tetrahedron: Asymm.*, **9** (1998) 3283-3287
- 106 Yamagishi T., Miyamae T., Yokomatsu T., Shibuya S., *Tetrahedron Lett.*, **45** (2004) 6713-6716
- 107 Kiełbasiński P., Żurawiński R., Albrycht M., Mikołajczyk M., *Tetrahedron: Asymm.*, **14** (2003) 3379-3384
- 108 Rowe B. J., Spilling C. D., *Tetrahedron: Asymm.*, **12** (2001) 1701-1708
- 109 Skwarczyński M., Lejczak B., Kafarski P., *Chirality*, **11** (1999) 109-114
- 110 Andersh P., Fazio F., Haase B., Jakob B., Shneider M. P., *Enzymes in Action*, **1/33** 25-42, eds.: Zwanenburg B., Mikołajczyk M., Kiełbasiński P., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2000)
- 111 Woschek A., Lindner W., Hammerschmidt F., *Adv. Synth. Catal.*, **345** (2003) 1287-1298
- 112 Patel R. N., Banerjee A., Szarka L. J., *Tetrahedron: Asymm.*, **8** (1997) 1055-1059
- 113 Wescott C. R., Kibanov A. M., *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1206** (1994) 1-9
- 114 Zhang Y., Yuan C., Li Z., *Tetrahedron*, **58** (2002) 2973-2978
- 115 Żurawiński R., Nakamura K., Drabowicz J., Kiełbasiński P., Mikołajczyk M., *Tetrahedron: Asymm.*, **12** (2001) 3139-3145
- 116 Attolini M., Iacazio G., Peiffer G., Maffei M., *Tetrahedron Lett.*, **43** (2002) 8547-8549
- 117 Attolini M., Iacazio G., Peiffer G., Charmasson Y., Maffei M., *Tetrahedron: Asymm.*, **15** (2004) 827-830
- 118 Yokomatsu T., Nakabayashi N., Matsumoto K., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymm.*, **6** (1995) 3055-3062
- 119 Shioji K., Ueno Y., Kurauchi Y., Okuma K., *Tetrahedron Lett.*, **42** (2001) 6569-6571
- 120 Shioji K., Toshiro A., Shibata S., Okuma K., *Tetrahedron Lett.*, **44** (2003) 1103-1105
- 121 Yokomatsu T., Sato M., Shibuya S., *Tetrahedron: Asymm.*, **7** (1996) 2743-2754
- 122 Pàmies O., Bäckvall J.-E., *J. Org. Chem.*, **68** (2003) 4815-4818
- 123 Brzezińska-Rodak M., Żymańczyk-Duda E., Kafarski P., Lejczak B., *Biotechnol. Prog.*, **18** (2002) 1287-1291
- 124 Żymańczyk-Duda E., Kafarski P., Lejczak B., *Enzyme Microb. Technol.*, **26** (2000) 265-270
- 125 Żymańczyk-Duda E., Klimek-Ochab M., Kafarski P., Lejczak B., *J. Organomet. Chem.*, **690** (2005) 2593-2596
- 126 Attolini M., Bouguir F., Iacazio G., Peiffer G., Maffei M., *Tetrahedron*, **57** (2001) 537-543
- 127 Mały A., Lejczak B., Kafarski P., *Tetrahedron: Asymm.*, **14** (2003) 1019-1024
- 128 Seco J. M., Quiñoá E., Riguera R., *Chem. Rev.*, **104** (2004) 17-117
- 129 Parker D., *Chem. Rev.*, **91** (1991) 1441-1457
- 130 Seco J. M., Quiñoá E., Riguera R., *Tetrahedron*, **55** (1999) 569-584
- 131 Dale J. A., Mosher H. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **95** (1973) 512-519
- 132 Hammerschmidt F., Li Y.-F., *Tetrahedron*, **50** (1994) 10253-10264
- 133 Kitamura M., Tokunaga M., Noyori R., *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (1995) 2931-2932
- 134 Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., *J. Am. Chem. Soc.*, **113** (1991) 4092-4096
- 135 Kitamura M., Tokunaga M., Pham T., Lubell W. D., Noyori R., *Tetrahedron Lett.*, **36** (1995) 5769-5772
- 136 Sullivan G. R., Dale J. A., Mosher H.S., *J. Org. Chem.*, **38** (1973) 2143-2147
- 137 Eidenhammer G., Hammerschmidt F., *Synthesis*, (1996) 748-754
- 138 Hanessian S., Rogel O., *J. Org. Chem.*, **65** (2000) 2667-2674
- 139 Trost B. M., Belletire J. L., Godleski S., McDougal P. G., Balkovec J. M., *J. Org. Chem.*, **51** (1986) 2370-2374
- 140 Kozłowski J. K., Rath N. P., Spilling C. D., *Tetrahedron*, **51** (1995) 6385-6396
- 141 Cermak D M., Du Y., Wiemer D. F., *J. Org. Chem.*, **64** (1999) 388-393
- 142 Chen X., Wiemer A. J., Hohl R. J., Wiemer D. F., *J. Org. Chem.*, **67** (2002) 9331-9339
- 143 Ordóñez M., González-Morales A., de la Cruz-Cordero R., Fernández-Zertuche M., *Tetrahedron: Asymm.*, **14** (2003) 1775-1779
- 144 González-Morales A., Díaz-Coutiño D., Fernández-Zertuche M., Gracia-Barradas O., Ordóñez M., *Tetrahedron: Asymm.*, **15** (2004) 457-463
- 145 Wróblewski A. E., Piotrowska D. G., *Tetrahedron: Asymm.*, **11** (2000) 2615-2624
- 146 Wróblewski A. E., Balcerzak K. B., *Tetrahedron: Asymm.*, **12** (2001) 427-431
- 147 Freire F., Seco J. M., Quiñoá E., Riguera R., *J. Org. Chem.*, **70** (2005) 3778-3790
- 148 Freire F., Seco J. M., Quiñoá E., Riguera R., *Chem. Eur. J.*, **11** (2005) 5509-5522
- 149 Davies S. R., Mitchell M. C., Cain C. P., Devitt P. G., Taylor R. J., Kee T. P., *J. Organomet. Chem.*, **550** (1998) 29-57
- 150 Meier C., Laux W. H. G., Bats J. W., *Liebigs Ann.* (1995) 1963-1979
- 151 Błażewska K., Gajda T., *Tetrahedron: Asymm.*, **13** (2002) 671-674

- ¹⁵² Żymańczyk-Duda E., Skwarczyński M., Lejczak B., Kafarski P., *Tetrahedron: Asymm.*, **7** (1996) 1277-1280
- ¹⁵³ Drescher M., Felsing S., Hammerschmidt F., Kahlig H., Schmidt S., Wuggenig F., *Phosphorus, Sulphur and Silicon*, **140** (1998) 79-93
- ¹⁵⁴ Hammerschmidt F., Schmidt S., *Phosphorus, Sulphur and Silicon*, **174** (2001) 101-118
- ¹⁵⁵ Kafarski P., Lejczak B., *Phosphorus, Sulphur and Silicon*, **63** (1991) 193-
- ¹⁵⁶ Kafarski P., Lejczak B., *Curr. Med. Chem. – Anti-cancer Agents*, **1** (2001) 301-312
- ¹⁵⁷ Theil F., *Tetrahedron*, **56** (2000) 2905-2919
- ¹⁵⁸ Ueji S., Ueda A., Tanaka H., Watanabe K., Okamoto T., Ebara Y., *Biotechnology Lett.*, **25** (2003) 83-87
- ¹⁵⁹ Texier-Boullet F., Lequitte M., *Tetrahedron Lett.*, **27** (1986) 3515-3516
- ¹⁶⁰ Okamoto T., Ueji S., *Biotechnology Lett.*, **22** (2000) 1169-1171
- ¹⁶¹ Bordwell F. G., Boutan P. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **78** (1956) 87-91
- ¹⁶² Kouge K., Koizumi T., Okai H., Kato T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60** (1987) 2409-2418
- ¹⁶³ Takahashi Y., Tanaka K., Murakami M., Kawanari M., Kawasaki Y., Tasumi K., Okai H., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59** (1995) 809-812
- ¹⁶⁴ Serrano R., Gancedo J. M., Gancedo C., *Eur. J. Biochem.*, **34** (1973) 479-482
- ¹⁶⁵ Green K. D., Gill I. S., Khan J. A., Vulfson E. N., *Biotechnol. Bioeng.*, **49** (1996) 535-543
- ¹⁶⁶ Freire F., Seco J. M., Quiñoá E., Riguera R., *J. Org. Chem.*, **70** (2005) 3778-3790
- ¹⁶⁷ Freire F., Seco J. M., Quiñoá E., Riguera R., *Chem. Eur. J.*, **11** (2005) 5509-5522
- ¹⁶⁸ Bradford M. M., *Anal. Biochem.*, **72** (1976) 248-254
- ¹⁶⁹ Pencreac'h G., Baratti J. C., *Enzyme Microb. Technol.*, **28** (2001) 473-479