

Politechnika Warszawska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii Środków
Lecznicych i Kosmetyków

**Redukcja β -ketosulfonów za pomocą
drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.**

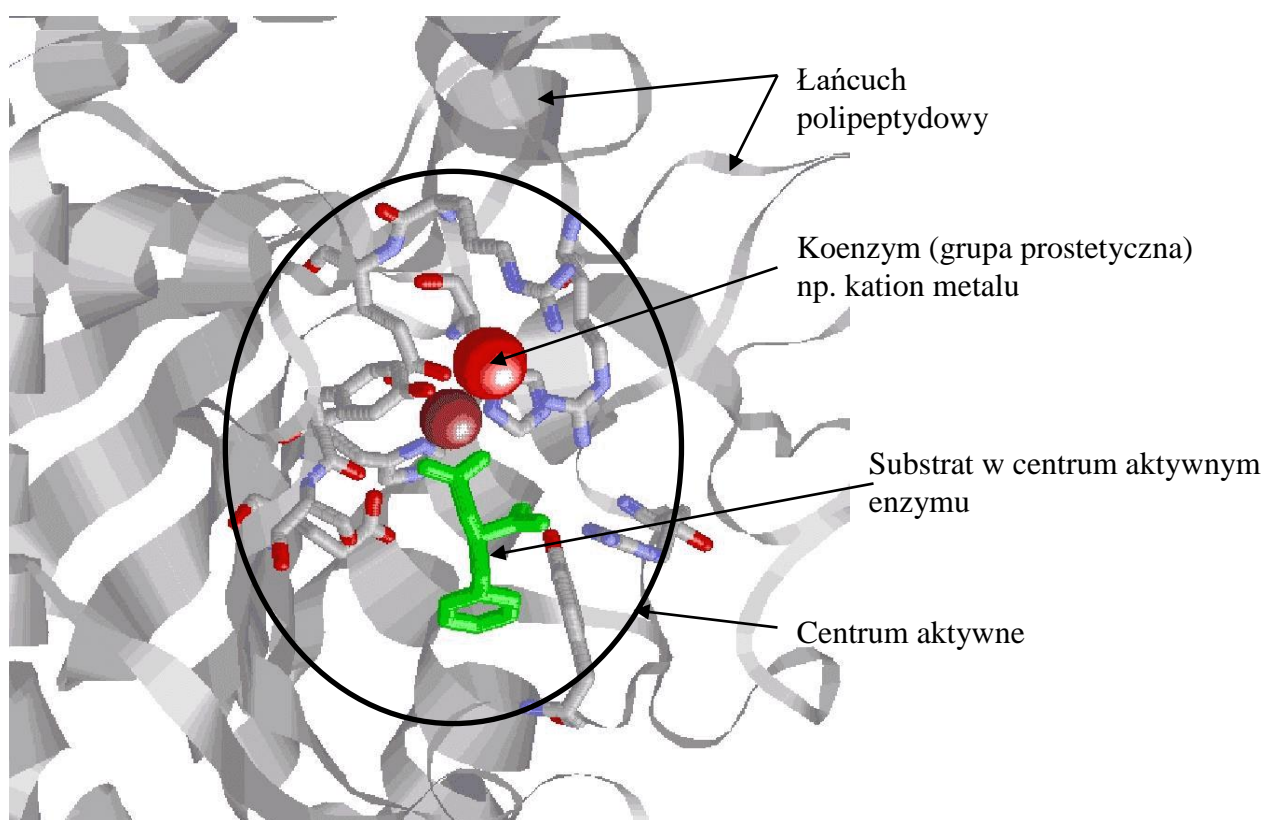
Opracował:
Dr hab. inż. Zbigniew Ochal prof. PW

Wstęp

Reakcje chemiczne w większości przypadków prowadzi się w obecności katalizatorów mających na celu przyspieszenie reakcji, umożliwienie otrzymania pożądanego produktu. Katalizatory można podzielić na dwie zasadnicze grupy:

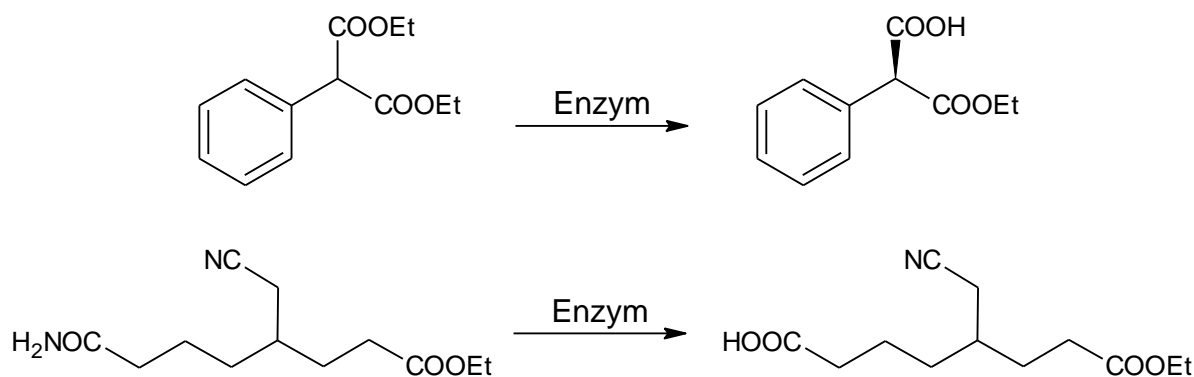
- katalizatory chemiczne
- oraz biokatalizatory

Bardzo interesującą grupą katalizatorów są biokatalizatory, czyli enzymy. Enzymy są to białka zdolne do katalizowania reakcji chemicznych. Miejscem gdzie zachodzi reakcja jest centrum aktywne powstałe przez odpowiednie pofałdowanie łańcucha polipeptydowego. Wiele enzymów należy do białek złożonych, w skład których oprócz części białkowej wchodzi grupa prostetyczna. Grupę prostetyczną może stanowić kation metalu, polisacharyd, lipid lub porfiryne. W niektórych enzymach grupa prostetyczna związana jest w sposób odwracalny i wówczas część białkowa nosi nazwę apoenzymu, a grupa prostetyczna – koenzymu.



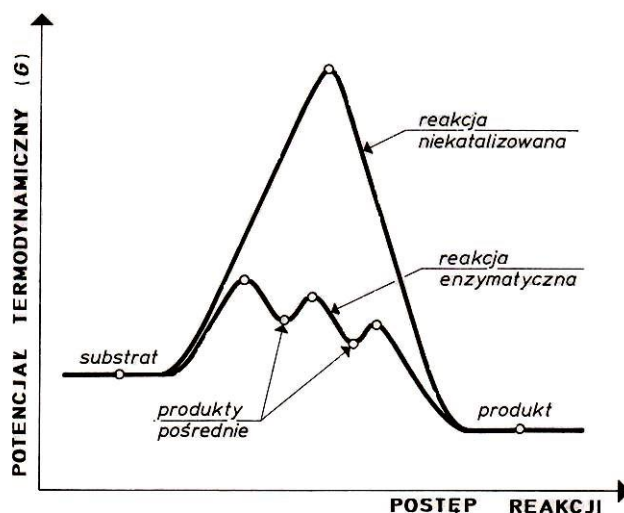
Rysunek 1. Enzym

Źródłem enzymów mogą być mikroorganizmy (bakterie, grzyby mikroskopowe), komórki roślinne oraz zwierzęce. Reakcje z wykorzystaniem enzymów jako katalizatorów można prowadzić: z wydzielonym i oczyszczonym enzymem, jak również z naniesionym na stały nośnik – mówimy wtedy o enzymie immobilizowanym. Trzecim sposobem prowadzenia reakcji enzymatycznej jest wykorzystanie całych komórek mikroorganizmów. Naturalnym środowiskiem, w którym znajdują się enzymy w organizmach żywych jest woda. Z tego też powodu reakcje enzymatyczne należałoby prowadzić właśnie w roztworze wodnym, w temperaturze około 20-40°C, i pH około 5,5-8. Wydzielenie enzymu a także jego immobilizacja na stałym nośniku umożliwia przeprowadzanie reakcji w rozpuszczalnikach organicznych, w temperaturze poniżej 20°C oraz powyżej 40°C, a także w innych zakresach pH. Możliwość prowadzenia reakcji w rozpuszczalnikach organicznych zwiększyła zakres zastosowania ich w reakcjach chemicznych oraz możliwość wielokrotnego wykorzystania.



Zastosowanie biotransformacji (reakcji enzymatycznych z wykorzystaniem czystych enzymów lub całych komórek) umożliwiło prowadzenie wielu reakcji w łagodnych warunkach jak również dało szansę na otrzymanie wielu związków niemożliwych do otrzymania na drodze chemicznej. Przykładami tutaj mogą być:

Każdy katalizator, więc również enzym działa w ten sposób, że obniża energię aktywacji reakcji, nie wpływając na różnicę jej potencjału termodynamicznego. Enzym zwykle prowadzi reakcję przez szereg etapów, charakteryzujących się stanami przejściowymi o niższych energiach.

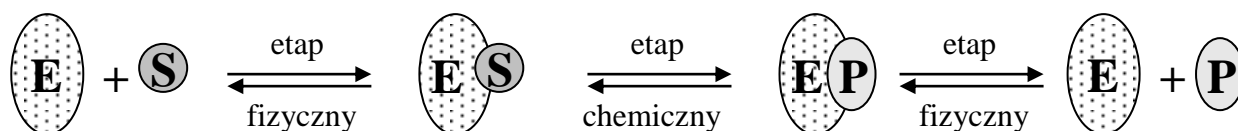


Efekty katalityczne osiągnięte w reakcjach enzymatycznych są bardzo duże, reakcja jest przyspieszana od 10^9 do 10^{15} razy w stosunku do odpowiedniej niekatalizowanej reakcji chemicznej. Średnio około 1000 moli substratu reaguje z molem enzymu w ciągu jednej minuty, przy czym niektóre enzymy osiągają wartość 10^7 moli substratu na mol enzymu.

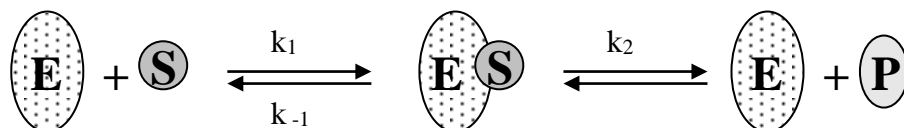
W procesie katalizy enzymatycznej możemy wyróżnić:

- procesy fizyczne takie jak dyfuzję substratu do centrum aktywnego enzymu oraz uwolnienie produktu z centrum aktywnego.
- proces chemiczny, czyli reakcję zachodzącą w centrum aktywnym enzymu prowadzącą do otrzymania produktu.

Schematycznie proces katalizy enzymatycznej można przedstawić następująco:



Najwolniejszymi etapami w reakcji enzymatycznej są etapy fizyczne, czyli dyfuzja substratu do centrum aktywnego oraz uwalnianie z niego produktu. Z tego też powodu schemat można uprościć do dwóch przejść. Stałe szybkości reakcji k_1 i k_2 opisują odpowiednio:



k_1 – szybkość dyfuzji substratu do centrum aktywnego enzymu,

k_2 – szybkość reakcji chemicznej (przekształcenia substratu w produkt) oraz szybkość uwalniania się uzyskanego produktu z enzymu.

Przyjmuje się, że reakcja enzymatyczna zachodzi według jednego z czterech poniższych mechanizmów lub ich kombinacji. Tak więc, przyspieszenie reakcji enzymatycznej dokonuje się poprzez:

- Katalizę przez zbliżenie reagujących cząsteczek
- Katalizę przez utworzenie kowalencyjnych produktów pośrednich z enzymem
- Katalizę kwasowo-zasadową
- Katalizę przez odpowiednią deformację cząsteczki substratu

Enzymy ze względu na katalizowane przez nie reakcje zostały podzielone na sześć klas:

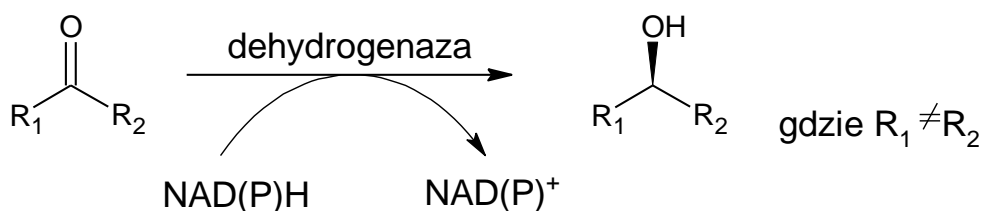
1. Oksyreduktazy – katalizujące reakcje utleniania i redukcji.
2. Transferazy – katalizujące reakcje przenoszenia grup funkcyjnych z cząsteczki donora do cząsteczki akceptora.
3. Hydrolazy – specjalna grupa transferaz, która katalizuje przenoszenie grupy funkcyjnej z cząsteczki donora do cząsteczki wody; enzymy te katalizują hydrolizę wiązań estrowych, eterowych, glikozydowych, amidowych itp.
4. Liazy – katalizują reakcję addycji wody, amoniaku lub dwutlenku węgla do wiązań podwójnych lub reakcje odwrotne.
5. Izomerazy – katalizują wzajemne przekształcanie jednych izomerów w drugie (izomerów optycznych, konstytucyjnych, geometrycznych, enolu w keton itp.).
6. Ligazy – katalizują reakcję łączenia dwóch substratów, w wyniku czego powstają wiązania C – O, C – S, C – N, C – C.

Reakcje redukcji za pomocą drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*)

Podstawowym sposobem wykorzystania drożdży w chemii jest redukcja grupy karbonylowej ketonów w wyniku, czego otrzymywany jest jeden z enancjomerów optycznie czynnego drugorzędowego alkoholu. Drożdże jako biokatalizatory posiadają wiele zalet:

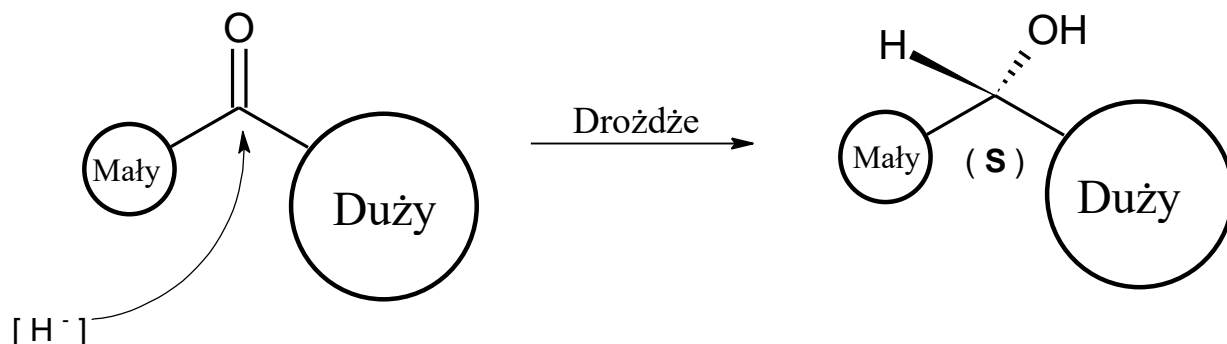
- do reakcji można używać całe komórki drożdżowe bez wyodrębniania enzymów
- nie wymagają szczególnych pożywek w czasie reakcji oraz można stosować je w postaci liofilizowanej (suchej)
- w czasie reakcji rzadko ulegają zakażeniu innymi mikroorganizmami, dlatego nie trzeba dbać o sterylne warunki
- drożdże redukują związki zarówno w środowisku lekko kwaśnym i obojętnym
- można prowadzić reakcje w rozpuszczalnikach organicznych
- nie wymagają one stosowania kofaktora
- są tanie i łatwo dostępne

W drożdżach oprócz enzymów katalizujących redukcję grupy karbonylowej jest jeszcze wiele innych enzymów. Reakcja redukcji katalizowana jest przez dehydrogenazy, a dokładniej dla grupy karbonylowej jest to dehydrogenaza alkoholowa. Dehydrogenazy należą do enzymów z grupy oksyreduktaz i wymagają stosowania kofaktora. Kofaktor jest to niewielka w stosunku do enzymu cząsteczka organiczna wymagana podczas reakcji enzymatycznej i należąca do rodziny koenzymów. Kofaktorami wymaganymi podczas redukcji grupy karbonylowej przez dehydrogenazy jest dwunukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH) lub jego fosforan (NADPH). Obecność NADH lub NADPH konieczna jest gdyż są one przenośnikami anionu wodorkowego, który atakuje węgiel grupy karbonylowej związku związanego w centrum aktywnym dehydrogenazy. Ogólny mechanizm reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę jest następujący:



W przypadku wykorzystania drożdży piekarniczych nie jest konieczne dodawanie kofaktora, ponieważ znajduje się on w komórkach tego mikroorganizmu. Podczas reakcji redukcji do układu reakcyjnego dodaje się etanolu lub metanolu, który powoduje regenerację kofaktora. Regeneracja ta następuje poprzez utlenienie alkoholu do aldehydu a następnie do kwasu, w wyniku, czego otrzymujemy zprotonowaną formę kofaktora, który może być ponownie wykorzystany w reakcji redukcji ketonu.

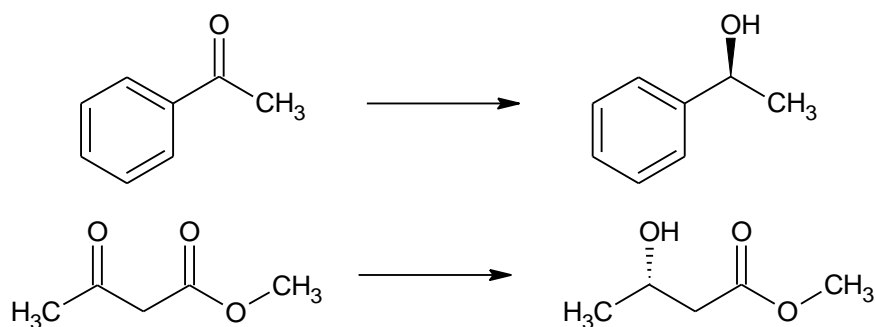
Redukcja grupy karbonylowej w ketonach i jego pochodnych z wykorzystaniem drożdży, najczęściej zachodzi zgodnie z regułą Preloga. Reguła ta mówi, iż redukcja grupy karbonylowej w ketonach zawierających po jednej stronie mały podstawnik a po drugiej duży, zachodzi od strony *re* cząsteczki i prowadzi do otrzymania alkoholu o konfiguracji absolutnej *S*.



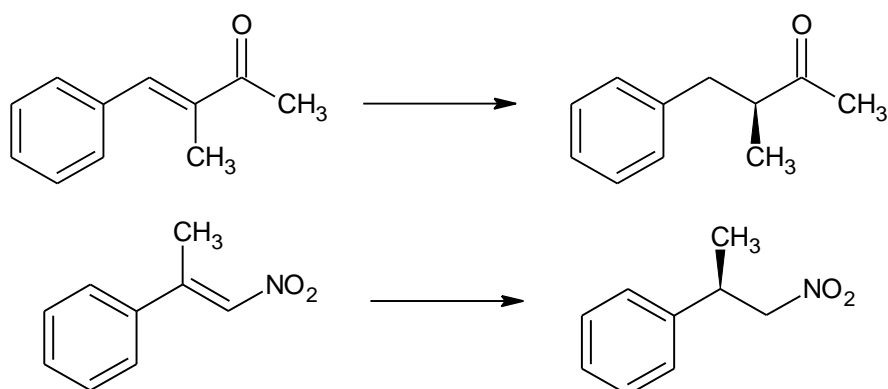
Jednak jak w każdej regule zdarzają się wyjątki i otrzymujemy produkt o przeciwnej konfiguracji. Przykładem niespełniającym tej reguły jest α -chloroacetofenon – redukcja tego związku prowadzi do otrzymania (*R*)-2-chloro-1-fenyletanolu. Reguła ta nie sprawdza się dla związków, w których różnica pomiędzy podstawnikami po obu stronach grupy karbonylowej jest nieduża.

Obecność w drożdżach piekarniczych dużej ilości dehydrogenaz powoduje, iż mogą one redukować wiele związków zawierających grupę karbonylową. Redukcji może ulegać także wiązanie podwójne węgiel – węgiel (C=C) oraz grupa nitrowa (NO₂). Poniżej zostały przedstawione przykłady bioredukcji z wykorzystaniem drożdży piekarniczych dla poszczególnych grup związków:

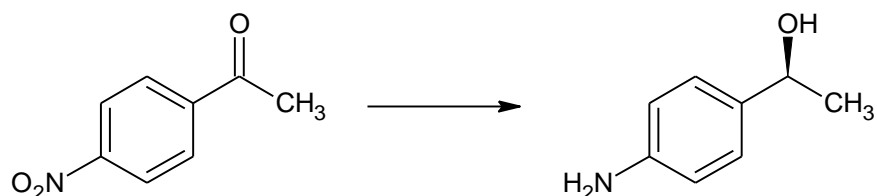
- Redukcja grupy karbonylowej w ketonach, β -ketoestrach, α -ketoestrach, α -hydroksyketonach, α -ketokwasach, α -ketoamidach, β -ketopochodnych siarkowych oraz β -diketonach



- Redukcja wiązania podwójnego węgiel – węgiel w α,β -nienasyconych aldehydach, ketonach i związkach nitro.



- Redukcja grupy nitrowej i karbonylowej w pochodnych nitrobenzenu



Tak samo jak w przypadku enzymów reakcje z wykorzystaniem drożdży piekarniczych można prowadzić zarówno w roztworze wodnym jak i rozpuszczalniku organicznym. Istnieje wiele możliwości prowadzenia reakcji w roztworze wodnym. Pierwszym z nich i najprostszym jest wprowadzenie drożdży do wody a następnie dodanie substratu rozpuszczonego w wodzie lub etanolu. W przypadku zastosowania etanolu do rozpuszczenia substratu możemy użyć mniejszej ilości drożdży ze względu na regenerację kofaktora. Gdy rozpuszczalnikiem substratu jest woda musimy użyć nadmiaru drożdży, ponieważ nie następuje regeneracja NAD(P)H. Drugim ze sposobów jest użycie zamiast wody roztworu wodnego glukozy lub sacharozy (dodatkiem do tego roztworu mogą być sole nieorganiczne takie jak: fosforany (V), azotany (V), będące składnikami mineralnymi tego podłoża). W tym przypadku również można użyć wodę lub etanol do rozpuszczenia substratu. Bardzo istotnymi czynnikami podczas prowadzenia reakcji z wykorzystaniem drożdży w roztworze wodnym jest to, iż prowadzi się ich wcześniejszą inkubację (około 30 minut) bez substratu oraz to, że ilość etanolu nie może przekroczyć 10%, ponieważ wpływa to na zamieranie komórek drożdżowych. Wszystkie te reakcje prowadzi się w temperaturze pokojowej lub 30°C oraz w warunkach tlenowych. Użycie etanolu nie wynika tylko z faktu, iż chcemy regenerować kofaktor ale również, dlatego że związki organiczne w większości przypadków

nie rozpuszczają się w wodzie. Rozpuszczalnikami stosowanymi w przypadku, gdy etanol jest zbyt mało polarnym rozpuszczalnikiem są dimetylosulfotlenek (DMSO) lub dimetyloformamid (DMF).

Prowadzenie reakcji redukcji z wykorzystaniem drożdży piekarniczych w rozpuszczalniku organicznym wymaga użycia ich w nadmiarze, ponieważ nie będzie następować regeneracja kofaktora. Rozpuszczalnikami stosowanymi w tej reakcji są: heksan, eter metyloowo-t-butylowy, eter dietylowy, toluen itp. Dobór odpowiedniego rozpuszczalnika do reakcji odbywa się na drodze eksperymentalnej porównując konwersję substratu w produkt, wydajność reakcji, oraz nadmiar enancjomeryczny uzyskany z danym rozpuszczalnikiem.

Redukcja grupy karbonylowej w ketonie prowadzi do otrzymania drugorzędowego alkoholu posiadającego asymetryczny atom węgla, (gdy podstawniki po obu stronach grupy karbonylowej są różne). W wyniku tej redukcji można otrzymać produkt racemiczny lub jeden z enancjomerów. Racemiczny drugorzędowy alkohol otrzymuje się najczęściej w wyniku redukcji chemicznej (np. NaBH_4), a optycznie czynny w wyniku redukcji biochemicznej lub chemicznej w środowisku chiralnym. W celu sprawdzenia selektywności reakcji enzymatycznej (w tym przypadku redukcji) wyznacza się tak zwany nadmiar enancjomeryczny. Nadmiar enancjomeryczny (ee) jest to stosunek ilości jednego enancjomeru pomniejszony o drugi z enancjomerów do sumy tych dwóch izomerów optycznych.

$$ee = \frac{Q - P}{Q + P} \times 100\%$$

gdzie:

ee – nadmiar enancjomeryczny wyznaczony w procentach

Q – ilość enancjomeru będącego w przewadze

P – ilość drugiego enancjomeru

Do wyznaczenia nadmiaru enancjomerycznego z powyższego wzoru wykorzystuje się metody chromatograficzne tzn. HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa z kolumną chiralną lub GC – chromatografia gazowa również z kolumną chiralną.

Istnieje również możliwość wyznaczenia ee na podstawie skręcalności światła spolaryzowanego:

$$ee = \frac{[\alpha]_D^{25} \text{ pom.}}{[\alpha]_D^{25} \text{ lit.}} \times 100\%$$

gdzie:

$[\alpha]_D^{25}$ *pom.* - wartość skręcalności właściwej światła spolaryzowanego badanego związku w temperaturze 25°C i przy długości światła 589nm, (czyli zakres D).

$[\alpha]_D^{25}$ *lit.* - wartość skręcalności właściwej światła spolaryzowanego określona w tych samych warunkach dla związku o nadmiarze enancjomerycznym $ee=100\%$. Najczęściej jest to wartość literaturowa.

Bardzo istotną własnością optycznie czynnych związków jest konfiguracja absolutna na asymetrycznym atomie. Istnieje wiele metod określania konfiguracji absolutnej np.:

- Krystalografia (rentgenografia)
- polarymetria (met. porównania optycznego)
- Metody chiralooptyczne
- Met. chemiczne korelacji struktury
- Techniki z wykorzystaniem NMR

Najprostszą z tych metod jest polarymetria, która polega na porównaniu znaku skręcalności właściwej z danymi literaturowymi. Dla przykładu skręcalność właściwa dla czystego optycznie (*S*)-(+)-3-hydroksybutanianu etylu wynosi $[\alpha]_D = +43,5^\circ$ ($c = 1,0$ CHCl_3), otrzymując produkt po redukcji drożdżami piekarniczymi o wartości skręcalności właściwej dodatniej możemy stwierdzić, iż dominującą konfiguracją absolutną produktu jest enancjomer *S*. Wybierając inny mikroorganizm do redukcji możemy otrzymać w przewodzie enancjomer *R*. Stwierdzimy to na podstawie właśnie znaku skręcalności światła spolaryzowanego – wartość ta będzie miała znak dla $[\alpha]_D$ ujemny.

Określanie konfiguracji absolutnej za pomocą porównania znaku skręcalności światła spolaryzowanego ma jedną poważną wadę. Związek, któremu chcemy przypisać konfigurację absolutną musi mieć określoną wcześniej konfigurację absolutną i podaną wartość skręcalności właściwej światła spolaryzowanego.

Przegląd metod wyznaczania struktury przestrzennej

związków chemicznych

Na obecnym poziomie rozwoju nauki dysponujemy szerokim zakresem metod fizykochemicznych pozwalających jednoznacznie ustalić strukturę przestrzenną związku. Do najczęściej stosowanych zalicza się rentgenografię, metody chiralooptyczne oraz metodę porównania optycznego, rzadziej znajduje zastosowanie metoda korelacji konfiguracji absolutnej na drodze chemicznej.

1) **Rentgenografia** ^[5] wykorzystuje zjawisko dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego na atomach w sieci krystalicznej. Uzyskujemy dzięki temu, charakterystyczny dla danej substancji obraz, zwany rentgenogramem, który poddany analizie umożliwia określenie konfiguracji absolutnej badanego związku. Niestety metoda ta wymaga stosowania monokryształów dobrej jakości i skomplikowanej aparatury, która nie zawsze jest dostępna w laboratoriach chemicznych, ponadto do prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników badań konieczna jest dogłębna wiedza teoretyczna i wieloletnie doświadczenie w tej technice badawczej.

2) **Metody chiralooptyczne** ^[6-9] należą do grupy fizykochemicznych metod badania struktury związków organicznych. Opierają się one na pomiarze dyspersji skręcalności optycznej (ORD) i na zjawisku dichroizmu kołowego (CD).

W technice ORD wykorzystujemy promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane kołowo, którego składowe: lewostronna i prawostronna oddziałują z optycznie czynnym, nie absorbującym środowiskiem, w różny sposób. Badając przebieg zmienności wartości skręcalności optycznej w funkcji długości fali otrzymujemy charakterystyczne dla danej substancji widmo, na podstawie którego możemy ustalić konfigurację absolutną związku.

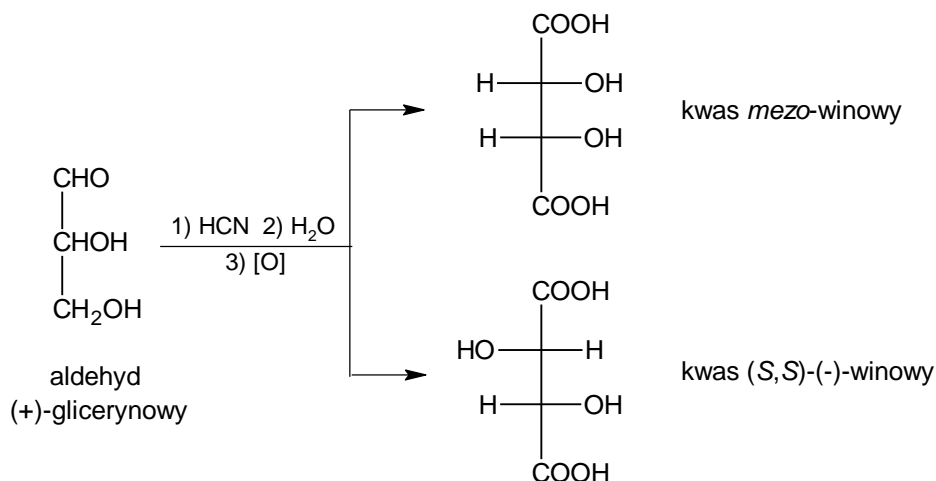
Technika CD, podobnie jak ORD wykorzystuje promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane kołowo. Składowe tego promieniowania w kontakcie z ośrodkiem optycznie czynnym ulegają absorpcji, przy czym stopień absorpcji dla składowej lewostronnej i prawostronnej nie jest jednakowy. Rejestrując zmiany absorpcji w funkcji długości fali użytego promieniowania, otrzymujemy widmo. Po ustaleniu znaku efektu Cottona i zastosowaniu odpowiednich modeli matematycznych możemy na jego podstawie ustalić konfigurację absolutną związku.

Metody chiralooptyczne mogą być stosowane zarówno do związków w stanie stałym, ciekłym jak i gazowym, pod warunkiem, że mają one w swej strukturze co najmniej dwa ugrupowania chromoforowe. Warunek ten jest konieczny, gdyż analiza widma wymaga stosowania modeli matematycznych np. modelu odwzorującego oddziaływanie dwóch oscylatorów. Jeżeli cząstka nie posiada takich grup, trzeba przeprowadzić derywatyzację. Niestety, jak pokazuje praktyka, widma uzyskane tą metodą są bardzo często złożone i trudne w interpretacji. Wymagają dodatkowych obliczeń, a ponadto są podatne na wszelkiego rodzaju zmiany konformacyjne zachodzące w układzie.

3) **Metoda porównania optycznego** ^[10] opiera się na sformułowanych przez Czugajewa regułach korelujących zmiany wartości skręcalności optycznej związków ze zmianami budowy cząsteczki. Badacz ten stwierdził, iż w szeregach homologicznych wartość skręcalności molowej jest w przybliżeniu stała oraz, że im dalej od centrum chiralności występują zmiany w strukturze cząsteczki tym mniejszy mają one wpływ na wartość skręcalności optycznej. W oparciu o wyżej wymienione zasady udało się min. ustalić konfigurację absolutną wielu α -halogenopodstawionych kwasów, znając bowiem strukturę i skręcalność optyczną kwasu (+)- α -chloropropionowego (konfiguracja (*R*)) możemy poprzez analogię stwierdzić, że kwas (+)- α -chloromasłowy również będzie miał konfigurację (*R*).

Metoda porównania optycznego pozwala z bardzo dużym prawdopodobieństwem określić konfigurację absolutną wielu związków optycznie czynnych. Prawdopodobieństwo prawidłowego przypisania struktury przestrzennej w obrębie centrum chiralnego jest tym większe im liczniejsza jest grupa pochodnych w oparciu o które wyciągamy wnioski. Nie bez znaczenia jest również odpowiedni dobór pochodnych, nie można bowiem porównywać związków chlorowanych z alkoholami gdyż te ostatnie posiadają wolną grupę hydroksylową i wykazują dużą skłonność do asocjacji co wpływa na wartość skręcalności optycznej.

4) **Korelacja konfiguracji absolutnej metodami chemicznymi** ^[10]. W metodzie tej związek A, którego konfiguracji poszukujemy zostaje przekształcony na drodze chemicznej w pochodną B o uprzednio ustalonej strukturze przestrzennej i skręcalności właściwej. Zakładając, że zastosowane reakcje chemiczne biegły z całkowitą retencją konfiguracji, bądź też z jej inwersją przy czym wynik stereochemiczny reakcji jest dokładnie znany, można na podstawie badań polarymetrycznych przypisać konfigurację absolutną badanemu związkowi. Metoda ta była stosowana min. w badaniach mających na celu ustalenia struktury aldehydu (+)-glicerynowego (rys.1). Związek ten został przekształcony za pomocą szeregu reakcji chemicznych w kwas winowy, którego budowa była już dokładnie poznana..



rys.1 Chemiczna korelacja konfiguracji absolutnej aldehydu (+)-glicerynowego

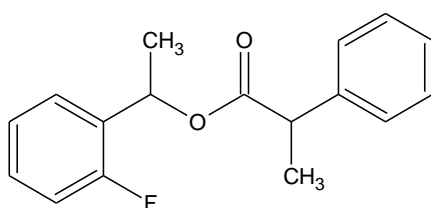
Na podstawie badań polarymetrycznych stwierdzono, że w mieszaninie poreakcyjnej powstał kwas (S,S)-(-)-winowy (kwas mezo-winowy nie skręca płaszczyzny światła). Ponieważ wszystkie zastosowane reakcje (synteza cyjanohydryny, hydroliza cyjanohydryny oraz utlenianie grupy hydroksylowej) zachodziły poza centrum chiralnym nie powodowały więc zmiany konfiguracji absolutnej aldehydu, można więc z całą pewnością stwierdzić, że badany aldehyd miał taką samą konfigurację jak powstały kwas (S,S)-(-)-winowy.

1.0 Ustalanie czystości optycznej i konfiguracji absolutnej związków optycznie czynnych za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.

Spektroskopia NMR^[3] jest jedną z najczęściej stosowanych metod służących do identyfikacji związków chemicznych. Kiedy w 1948 r. zaobserwowano po raz pierwszy zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego nikt nie przypuszczał, iż urządzenia bazujące na tym efekcie staną się wkrótce podstawowym narzędziem pracy wielu naukowców. Sukces tej metody wynika przede wszystkim z jej uniwersalności. Za jej pomocą możemy bowiem określić budowę wszystkich związków posiadających w swym szkielecie pierwiastki o właściwościach magnetycznych tzn. takich, których jądro atomowe ma niezerową wartość spinu ($I \neq 0$).

Pierwsze doniesienia o możliwości wykorzystania tej techniki badawczej do ustalenia czystości optycznej, a następnie konfiguracji absolutnej pojawiły się w latach sześćdziesiątych XX wieku. Fundamentalne dla rozwoju tej techniki badania przeprowadzili Morton Raban i Kurt Minslow z Uniwersytetu Princeton. Zastosowali oni

NMR przy badaniu składu mieszaniny diastereoizomerów estru 1-(o-fluorofenilo)etylowego kwasu 2-fenylpropionowego (rys.2), a następnie porównali otrzymany wynik z danymi uzyskanymi za pomocą g.l.c. Okazało się, że stosunek diastereoizomerów określony na podstawie widma NMR wynosił 68/32 i był bardzo zbliżony do wartości otrzymanej za pomocą chromatografii 67/33. Wyniki tego eksperymentu jednoznacznie potwierdziły poprawność tej metody badawczej.



rys.2

W ciągu kolejnych lat metoda ta była udoskonalana i rozwijana przez wielu badaczy, przeprowadzone badania wykazały, że za jej pomocą można wyznaczać nie tylko czystość optyczną związków, ale również ich konfigurację absolutną. Od tamtej pory pojawiło się wiele koncepcji realizacji pomiaru, które w konsekwencji przyczyniły się do wyodrębnienia dwóch podstawowych technik badawczych; techniki z użyciem rozpuszczalnika chiralnego oraz techniki „derywatywacyjnej”.

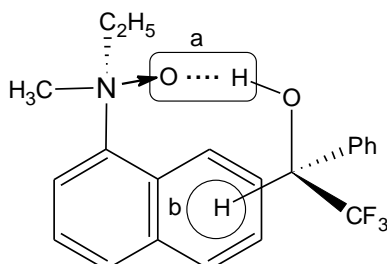
1.1 Technika z użyciem rozpuszczalnika chiralnego ^[10, 11].

Cząsteczki związków chemicznych mogą oddziaływać z rozpuszczalnikiem w roztworach np. za pomocą wiązań wodorowych, oddziaływań o charakterze dipol-dipol czy też dipol-dipol indukowany. Oddziaływania te w dużej mierze zależą od charakteru związku chemicznego, jego struktury jak również od właściwości zastosowanego rozpuszczalnika. Inaczej będą one wyglądały dla związków optycznie czynnych rozpuszczonych w rozpuszczalniku chiralnym, a inaczej gdy ten sam związek zostanie rozpuszczony w rozpuszczalniku achiralnym. Podobnie enancjomer (R) substancji optycznie czynnej będzie solwatowany w rozpuszczalniku chiralnym o konfiguracji

absolutnej (R) w innym stopniu niż enancjomer (S) tego samego związku. Na podstawie tych różnic można za pomocą techniki magnetycznego rezonansu jądrowego ustalić jaką konfigurację absolutną ma dany związek.

W tym celu należy sporządzić roztwór badanej substancji optycznie czynnej w optycznie czynnym i racemicznym. Następnie zarejestrować widma NMR dla obu mieszanin, obliczyć na podstawie odpowiednich modeli różnicę w przesunięciach chemicznych dla poszczególnych podstawników i w oparciu o te dane ustalić konfigurację absolutną związku. Jeżeli dostępne są oba enancjomery badanego związku, można je rozpuścić tylko w rozpuszczalniku chiralnym, następnie zarejestrować ich widma i porównując przesunięcia chemiczne określić konfiguracje absolutne.

Za pomocą tej metody udało się określić konfigurację absolutną *N*-tlenku *N*-etylo-*N*-metylo-1-naftyloaminy przy zastosowaniu jako rozpuszczalnika (*S*)-(+)-2,2,2-trifluoro-1-fenyletanolu. Badania wykazały, że w roztworze tego związku powstaje solwat (rys.3) stabilizowany przez wiązanie wodorowe (a) tworzące się między grupą hydroksylową rozpuszczalnika i atomem tlenu *N*-tlenku oraz oddziaływanie (b) wodoru grupy metinowej z elektronami π pierścienia aromatycznego.



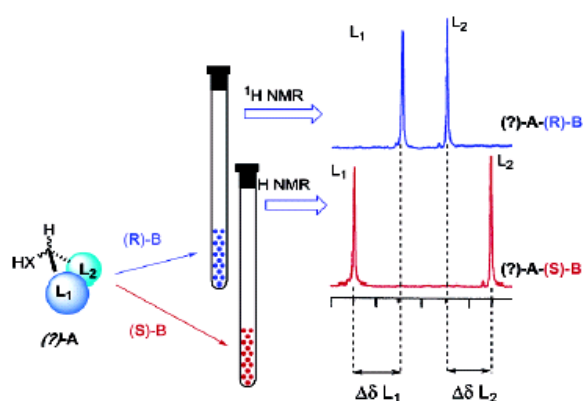
rys.3 Solwat (*S*)- *N*-tlenku *N*-etylo-*N*-metylo-1-naftyloaminy
i (*S*)-(+)-2,2,2-trifluoro-1-fenyletanolu

W solwacie *N*-tlenku o konfiguracji *S* grupa etylowa tlenu i pierścień fenylowy rozpuszczalnika są położone względem siebie w pozycji *cis* co w konsekwencji powoduje, że sygnał protonów grupy etylowej jest przesunięty na widmie ^1H NMR o ok. 0,02 ppm w porównaniu z sygnałem tych samych protonów w enancjomerze (*R*) *N*-tlenku. Na tej podstawie można było ustalić konfigurację absolutną tego związku.

Niestety rozpuszczalniki chiralne w bardzo małym stopniu różnicuje przesunięcia chemiczne. Uzyskane widma są więc trudne w interpretacji i istnieje możliwość błędnego przypisania konfiguracji, ponadto nie została opracowana uniwersalna procedura, umożliwiająca ustalanie stereochemii różnego rodzaju związków. Nie bez znaczenia jest również fakt, iż rozpuszczalniki te mają zazwyczaj wysoką cenę. Wszystkie te czynniki sprawiają, że obecnie metoda ta nie jest już praktycznie stosowana do badania struktury przestrzennej związków, natomiast znajduje jeszcze zastosowanie przy badaniu czystości optycznej.

1.2 Technika „derywatyzyjna” .

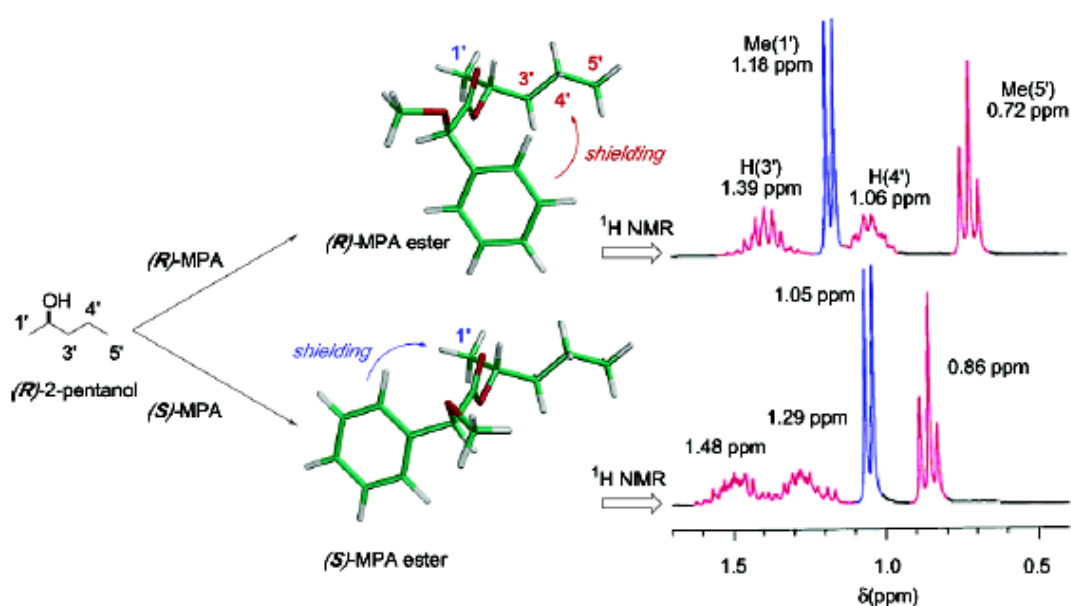
Niewątpliwie najpowszechniej stosowaną i dającą najlepsze rezultaty techniką ustalania konfiguracji absolutnej związków, za pomocą NMR jest opracowana przez Minslowa i Rabana ^[5,6], a następnie rozwinięta i udoskonalona przez Moshera ^[12,12] technika podwójnej derywatyzyjacji. W metodzie tej przekształca się badany związek (?) -A o nieznannej konfiguracji w odpowiednią pochodną, w reakcji z enancjomerami (*S*) i (*R*) asymetrycznej substancji pomocniczej B, odpowiedzialnej za zróżnicowanie przesunięć chemicznych (rys.4). W rezultacie otrzymuje się dwa diastereoizomery (?) -A-(*R*)-B i (?) -A-(*S*)-B dla których następnie rejestruje się widmo NMR.



rys.4 Podwójna derywatyzyjacja związku o nieznannej stereochemii z dwoma enancjomerami reagenta pomocniczego^[9]

W przypadku pochodnej (?) -A-(*R*)-B silnie przysłaniane są protony w podstawniku L₁ w skutek czego ich sygnał pojawia się na widmie NMR przy niższych wartościach przesunięć chemicznych niż sygnał tych samych protonów w pochodnej (?) -A-(*S*)-B, wynika

a więc różnica przesunięć definiowana jako $\Delta\delta^{(R-S)}L_1 = \delta(R)L_1 - \delta(S)L_1$ jest mniejsza od zera. Inaczej wygląda sytuacja w przypadku protonów podstawnika L_2 . W tym wypadku atomy wodoru są przysłaniane w pochodnej (?) -A-(S)-B natomiast nie są przysłaniane w pochodnej (?) -A-(R)-B, a więc $\Delta\delta^{(R-S)}L_2 = \delta(R)L_2 - \delta(S)L_2$ jest większa od zera. Na podstawie obliczonych w ten sposób różnic w przesunięciach chemicznych i w oparciu o odpowiedni model konformerowy można ustalić stereochemię badanego związku. Metoda ta jest stosowana do badania struktury I rz. β -chiralnych alkoholi, II rz. alkoholi, I rz. amin optycznie czynnych oraz α -podstawionych kwasów karboksylowych.



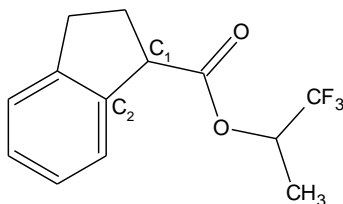
rys.5 Wyznaczanie konfiguracji absolutnej (*R*)-2-pentanolu z zastosowaniem techniki podwójnej derywatywacji z enancjomerami kwasu α -metoksyfenylooctowego [9].

Rysunek 5 przedstawia przykładowe widmo ^1H NMR zarejestrowane dla diastereoizomerycznych estrów (*R*)-2-pentanolu z enancjomerami (*R*) i (*S*) kwasu 2-metoksyfenylooctowego. W przypadku pochodnej z (*R*)-MPA można zaobserwować, że sygnały protonów w pozycjach 3', 4', 5' są położone przy niższych wartościach przesunięć chemicznych niż ma to miejsce w pochodnej z (*S*)-MPA. Jest to spowodowane silnym ekranowaniem tych atomów przez pierścień fenyłowy reagenta pomocniczego. Sytuacja wygląda inaczej w przypadku pochodnej z (*S*)-MPA. W tym diastereoizomerze silniej ekranowane są protony w pozycji 1' co powoduje, że ich sygnał na widmie położony jest przy niższych wartościach przesunięć chemicznych niż ma to miejsce w pochodnej z (*R*)-MPA. Jeśli obliczymy różnicę przesunięć chemicznych definiowanych jako $\Delta\delta^{(R-S)}L_x =$

$\delta(R)L_x - \delta(S)L_x$ to okaże się, że $\Delta\delta_{3,(R-S)} = -0,09$ ppm, $\Delta\delta_{4,(R-S)} = -0,23$ ppm, $\Delta\delta_{5,(R-S)} = -0,14$ ppm, a więc różnice przesunięć chemicznych wszystkich tych podstawników są mniejsze od zera ($\Delta\delta_{3,4,5,(R-S)} < 0$), natomiast różnica przesunięć chemicznych obliczona dla wodorów w pozycji 1' wynosi $\Delta\delta_{1,(R-S)} = +0,13$ i jest większa od zera ($\Delta\delta_{1,(R-S)} > 0$). Na podstawie znaków obliczonych wartości, posługując się odpowiednim modelem konformerowym dla MPA (rys.16) można stwierdzić, iż alkohol miał konfigurację (R).

1.3 Charakterystyka reagenta pomocniczego.

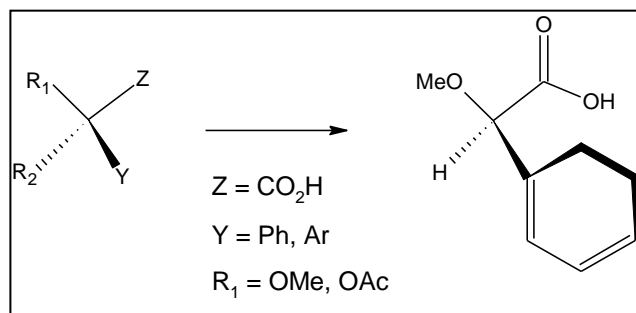
Atrakcyjność metody ustalania stereochemii związków chemicznych za pomocą NMR sprawiła, iż zaczęto się zastanawiać jakie związki mogą być stosowane jako reagenty pomocnicze? Mosher i Dale ^[13] przebadali szereg kwasów karboksylowych o bardzo zróżnicowanej budowie, pod kątem ich przydatności w wyznaczaniu konfiguracji absolutnej alkoholi i wykazali, że np. kwasy α -chlorooctowy, α -fenoksyoctowy, α -naftoksyoctowy nie powodują zróżnicowania przesunięć chemicznych podstawników w alkoholu, natomiast kwasy α -metoksy-(o-chlorofenylo)octowy, kwas migdałowy i kwas α -t-butylofenylooctowy dawały bardzo dobre rezultaty. Ponadto stwierdzili oni, że reagent, w którym zablokowano rotację pierścienia fenyłowego wokół wiązania C₁-C₂



(rys.7) traci zdolność różnicowania przesunięć chemicznych.

rys.7 Związek z zablokowaną rotacją pierścienia fenyłowego

Analiza wyników ich pracy sugeruje, że reagentem pomocniczym może być substancja optycznie czynna zawierająca w swej strukturze ugrupowanie funkcyjne Z umożliwiające przeprowadzenie reakcji chemicznej z badanym związkiem, podstawnik R₁ o dużej polarności lub znacznej objętości stabilizujący jeden z konformerów oraz labilną grupę Y odpowiedzialną za odpowiednio zorientowany w przestrzeni magnetyczny efekt anizotropowy (rys.8).

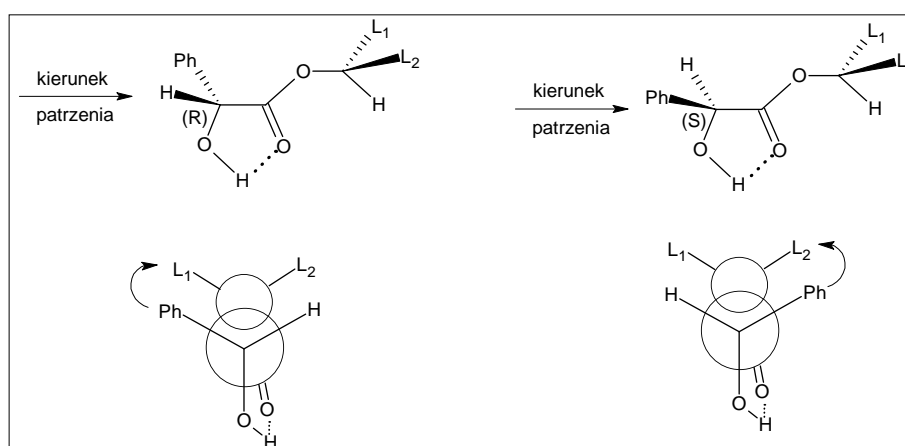


rys.8 Model reagenta pomocniczego

1.4 Charakterystyka najczęściej stosowanych reagentów pomocniczych wywodzących się z kwasu migdałowego.

a) Kwas migdałowy

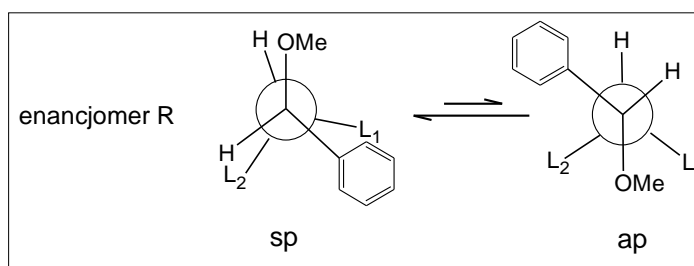
Estry tego kwasu istnieją w roztworach głównie w postaci konformeru synperiplanarnego (rys.9), który jest stabilizowany przez wiązanie wodorowe tworzące się między grupą hydroksylową, a tlenem grupy karbonylowej. Kwas ten jest stosowany przy wyznaczaniu konfiguracji absolutnej alkoholi. Główną wadą ograniczającą jego szersze wykorzystanie jest skłonność do racemizacji.



rys.9 Model konformery estrów kwasu migdałowego, stosowany przy ustalaniu stereochemii alkoholi optycznie czynnych.

b) Kwas 2-metoksyfenylooctowy (MPA)

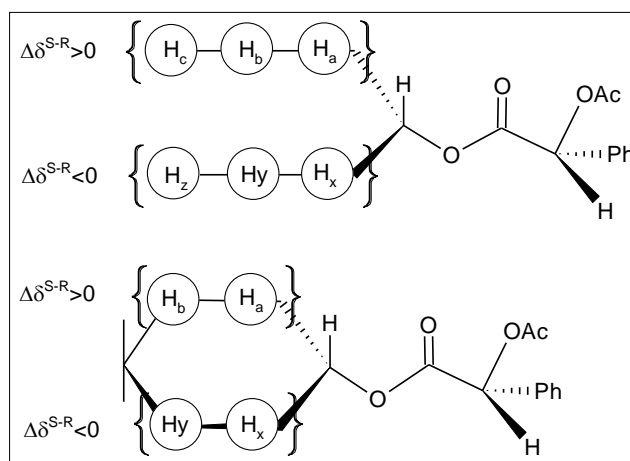
Jest stosowany do wyznaczania konfiguracji absolutnej II rz. alkoholi i I rz. amin optycznie czynnych. Jego pochodne występują w postaci dwóch konformarów (rys.10) ap i sp, przy czym w przypadku estrów bardziej stabilny jest konformer sp, natomiast w amidach obserwuje się większą trwałość konformera ap.



rys.10 Równowaga konformery estrów kwasu MPA

c) O-acylowany kwas migdałowy (OAM)

Reagent ten jest stosowany do wyznaczania konfiguracji absolutnej alkoholi o dużym zatłoczeniu sterycznym np. cyklitoli z rozbudowanymi podstawnikami. Jego model konformerowy jest bardzo zbliżony do modelu kwasu MPA (rys.11) i zakłada, że najbardziej stabilny energetycznie jest konformer sp i to właśnie jego sygnał dominuje na widmie NMR.

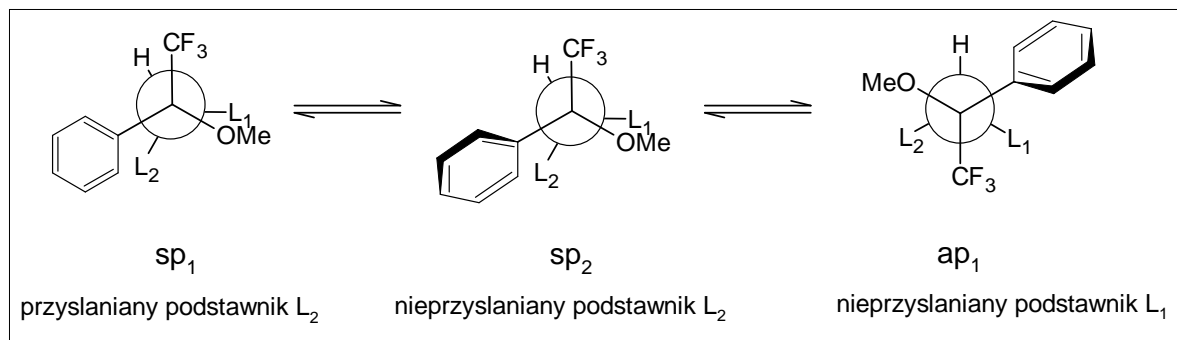


rys.11 Model konformerowy dla estrów OAM

d) Kwas metoksytrifluorometylofenylooctowy (MTPA)

Kwas ten, podobne jak kwas MPA, jest stosowany do badania stereochemii II rz. alkoholi, I rz. amin, β -aminoalkoholi i α -aminokwasów. Jednak w przeciwieństwie do niego daje zazwyczaj mniejsze różnicowanie przesunięć chemicznych, co jest wynikiem bardziej złożonych równowag konformerowych. W roztworach tego kwasu występują trzy niemal równocenne energetycznie konformery: sp_1 i sp_2 , w którym wiązanie $C\alpha-CF_3$ jest synperiplanarne do tlenu grupy karbonylowej (inna jest tylko orientacja pierścienia fenyłowego) i konformer ap_1 , w którym wiązania te są w pozycji anti (rys.12). Ponieważ efekt przysłaniania i odsłaniania podstawnika L_2 w konformerach sp_1 i sp_2 wzajemnie się znosi, na widmie NMR będzie uwidocznił się sygnał pochodzący głównie od konformeru ap_1 .

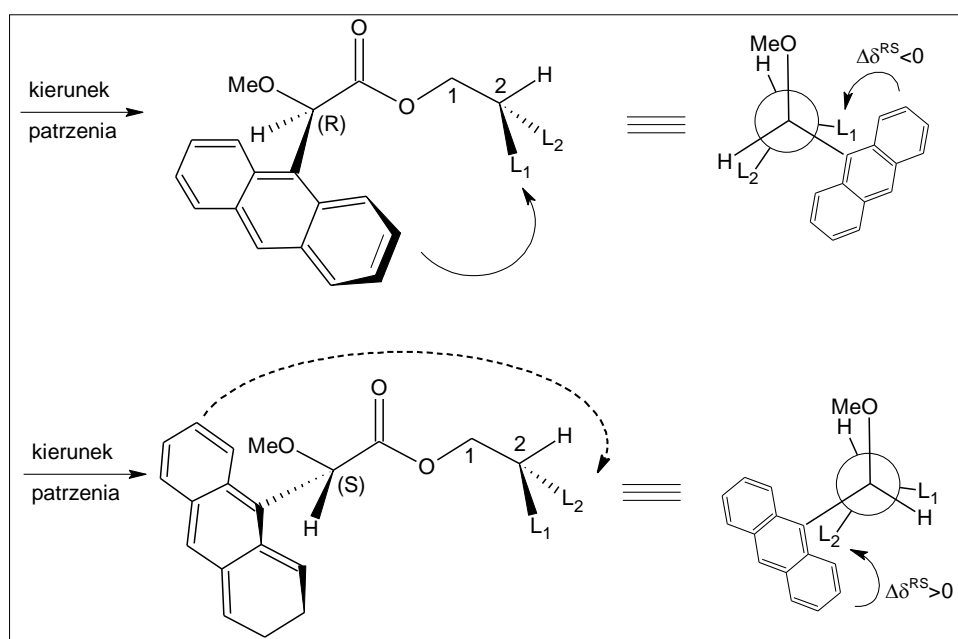
Niewątpliwymi zaletami tego kwasu są duża stabilność, brak skłonności do racemizacji oraz możliwość wykorzystania spektroskopii ^{19}F NMR przy ustalaniu konfiguracji absolutnej.



rys.12 Model równowagi konformerowej estrów kwasu (R)-MTPA.

e) Kwas 9-antrylometoksyoctowy (9-AMA)

Kwas ten ze względu na rozmiar układu aromatycznego nadaje się do wyznaczania konfiguracji absolutnej β -chiralnych I rz. alkoholi. Jego estry występują w roztworach, głównie w postaci konformeru sp-a/a, w którym grupa MeO jest w pozycji synperiplanarnej do grupy karbonylowej, wiązanie C2-H jest anti w stosunku do wiązania O-C1, a wiązanie C1-C2 jest anti do O-COR. W przypadku estrów z (R)-9-AMA obserwuje się silniejsze przysłanianie podstawnika L₁, natomiast w estrze z (S)-9-AMA silniej jest przysłaniany podstawnik L₂ (rys.13). Pochodna tego kwasu czyli kwas 2-(9-antrylo)-2-hydroksyoctowy jest stosowana do wyznaczania stereochemii α -chiralnych kwasów karboksylowych.



rys.13 Model konformerowy dla 9-AMA

1.5 Podsumowanie

Technika ustalania konfiguracji absolutnej związków chemicznych za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu protonowego jest niewątpliwie jedną z najszybciej rozwijających się technik badawczych. Sukces tej metody wynika z jej prostoty, uniwersalności i stosunkowo niskich kosztów wykonania badania. Pozwala ona w większości wypadków zidentyfikować w sposób szybki i jednoznaczny strukturę I rz., II rz. alkoholi, I rz. amin, α -podstawionych kwasów karboksylowych i aminokwasów. Wyjątkiem są związki o dużym zatłoczeniu sterycznym, które zaburzają charakterystyczne dla reagentów pomocniczych równowagi konformerowe. Należy również zaznaczyć, iż pochodne kwasu migdałowego nie są jedyną grupą związków używanych przy wyznaczaniu konfiguracji absolutnej substancji optycznie czynnych. Coraz częściej stosuje się również ester metylowy fenyloglicyny (PGME), amid dimetylowy fenyloglicyny (PGDA) lub diole np. 1,1'-binaftylen-8,8'-diol (BNDO) i inne. Wszystkie te odczynniki umożliwiają ustalenie konfiguracji absolutnej α -chiralnych kwasów karboksylowych.

Duża ilość publikacji poświęconych tej tematyce pozwala wysnuć przypuszczenie, iż w niedługim czasie nowo otrzymane reagenty zróżnicowania przesunąć chemicznych umożliwią analizę innych związków niż dotąd badane optycznie czynne alkohole, aminy, aminokwasy, α -chiralne kwasy karboksylowe i sulfotlenki.

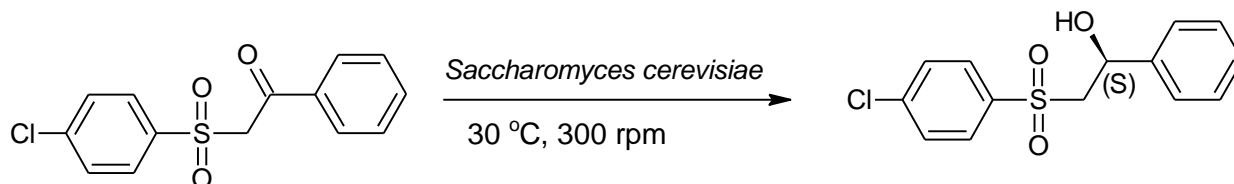
Cel ćwiczenia

Celem niniejszego ćwiczenia jest wykonanie reakcji bio redukcji grupy karbonylowej w modelowym związku, jakim jest 2-(4-chlorofenylosulfonylo)-1-fenyletanon z wykorzystaniem drożdży piekarniczych. Porównanie skuteczności prowadzenia tych reakcji w roztworze wodnym jak i rozpuszczalniku organicznym. Określenie konfiguracji absolutnej otrzymanego produktu jak również jego nadmiaru enancjomerycznego. Parametrami wpływającymi na wydajność reakcji oraz nadmiar enancjomeryczny są:

- środowisko reakcji – roztwór wodny, rozpuszczalnik organiczny
- stosunek biomasy mikroorganizmu do ilości substratu
- czas reakcji
- temperatura prowadzenia reakcji
- stosunek substancji pomocniczych np. etanol, woda

Wykonanie

Redukcja 2-(4-chlorofenylosulfonyl)-1-fenyletanonu za pomocą drożdży w roztworze wodnym



W kolbie stożkowej umieścić 250 ml wody a następnie dodać 20 g drożdży piekarniczych. Zawartość dobrze wymieszać i umieścić na wytrząsarce w temperaturze 30°C na 30 minut. Do zawiesiny drożdży dodać następnie 0,5 g β-ketosulfonu rozpuszczonego w 2,5 ml etanolu. Całość ponownie umieścić na wytrząsarce w temperaturze 30°C. Próbki pobierać, co 30 minut przez pierwszą godzinę, a następnie, co 45 minut przez kolejne 3 godziny. Po 4h prowadzenia reakcji do zawiesiny drożdży należy dodać 50ml octanu etylu i wytrząsać przez 30 minut, a następnie dodać celit® i sączyć pod zmniejszonym ciśnieniem. Rozdzielić fazy, po czym fazę wodną ekstrahować 3 × 70 ml octanem etylu. Połączone fazy organiczne suszyć siarczanem magnezu. Odparować rozpuszczalnik na wyparce, a otrzymaną mieszaninę poreakcyjną rozdzielić na kolumnie chromatograficznej.

Pobieranie próbek:

Plastikową pipetką pobrać z mieszaniny reakcyjnej około 1 ml zawiesiny i wprowadzić do fiołki, następnie dodać 2,0 ml octanu etylu. Przeprowadzić ‘mini ekstrakcję’ za pomocą pipetki plastikowej. Pobrać fazę organiczną i przenieść do drugiej fiołki. Znajdującą się w fiołce fazę organiczną suszyć siarczanem magnezu. Roztwór nad siarczanu pobierać pipetką Pasteura (szklana) z nawiniętą watką na koniec pipety do trzeciej z fiołek.

Redukcja 2-(4-chlorofenylosulfonyl)-1-fenyletanonu za pomocą drożdży w rozpuszczalniku organicznym.

W kolbie stożkowej umieścić 0,5 g β-ketosulfonu i rozpuścić w 250 ml heksanu. Do roztworu następnie dodać 20 g drożdży piekarniczych oraz 16 ml wody destylowanej. Kolbę z mieszaniną reakcyjną umieścić na wytrząsarce w temperaturze 30°C. Próbki pobierać, co 30 minut przez pierwszą godzinę, a następnie, co 45 minut przez kolejne 3 godziny. Po 4h prowadzenia reakcji odsączyć drożdże pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie przemyć je dwukrotnie 50 ml heksanu. Przesącz suszyć siarczanem magnezu. Odsączyć środek suszący a następnie odparować

rozpuszczalnik na wyparce. Otrzymaną mieszaninę poreakcyjną rozdzielić na kolumnie chromatograficznej.

Pobieranie próbki:

Pipetką Pasteura (szklaną) pobrać z mieszaniny reakcyjnej 1,0 ml roztworu znajdującego się nad drożdżami do fiołki i rozcieńczyć 1,0 ml octanu etylu. Roztwór w fiołce suszyć siarczanem magnezu. Roztwór z siarczanu pobierać pipetką Pasteura (szklana) z nawiniętą watką na koniec pipety do trzeciej z fiołek.

Opracowanie wyników

Do każdej z pobranej próbki zostanie wykonana analiza chromatografii gazowej (GC). Na podstawie chromatogramów należy wskazać sygnał 2-(4-chlorofenylosulfonylo)-1-fenyletanolu, jak również wykreślić wykres zależności zawartości produktu w mieszaninie reakcyjnej do czasu i użytego rozpuszczalnika. Na podstawie zebranych wyników należy sformułować wnioski. We wnioskach muszą znaleźć się dane dotyczące nadmiaru enancjomerycznego i konfiguracji absolutnej otrzymanego produktu. Kolejne grupy korzystając z wyników swoich poprzedników będą miały za zadanie wykonać wykresy:

- zawartości produktu w mieszaninie reakcyjnej od czasu i temperatury
- zawartości produktu w mieszaninie reakcyjnej od czasu i użytej biomasy drożdży

Literatura:

1. P. Kafarski, B. Lejczak, „*Chemia bioorganiczna*” PWN Warszawa 1994
2. K. Faber, „*Biotransformations in organic chemistry*” Springer 1997
3. S. Servi, *Synthesis*, **1990**, 1-25
4. P. Besse, S. Ciblat, J. Canet, Y. Troin, H. Veschambre, *Tetrahedron: Asymmetry* 10, **1999**, 2213–2224
5. Z. Trzaska-Durski, H. Trzaska-Durska „Podstawy krystalografii” Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej 2003 Warszawa
6. P. Crabbe „Metody chiralooptyczne w chemii” PWN 1974 Warszawa
7. W. Zieliński, A. Rajcy „Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków

organicznych.” WNT 2000 Warszawa, 420

8. I.Z. Siemion „Biostereochemia” PWN 1986 Warszawa
9. M. Raban, K. Mislow, *Tetrahedron Lett.*, 1965, **48**, 4249
10. M. Raban, K. Mislow, *Tetrahedron Lett.*, 1966, **33**, 3961
11. J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* 1968, **90**, 3732
12. J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* 1973, **95**, 512
13. J. Manuel, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem. Rev.* 2004, **104**, 17-117