Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τμήμα Χημείας

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Α) Σύνθεση α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών με Oxone®/$AlCl_3$ σε υδατικό περιβάλλον

Β) Στερεοεκλεκτικές βιοαναγωγές α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων από NADPH-εξαρτώμενες κετοredουκτάσες

Κατσουλάκης Νικόλαος

Υπεύθυνη Καθηγήτρια Σμόνου Ιουλία

Ηράκλειο, 2021

University of Crete

Department of Chemistry

Master thesis

A) Synthesis of α-substituted, α-chloro-β-keto esters and 1,3 diketones by Oxone®/$AlCl_3$ in aqueous media

B) Stereoselective reduction of α-substituted-α-chloro-β-keto ester, catalysed by NADPH- dependent ketoreductases

Katsoulakis Nikolaos

Supervisor Professor Smonou Ioulia

Heraklion, 2021

Εξεταστική Επιτροπή

Σμόνου Ιουλία

Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παυλίδης Ιωάννης

Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Στρατάκης Εμμανουήλ

Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας-Βιοκατάλυσης του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Χημεία», με ειδίκευση Οργανική Χημεία.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την στήριξη τους και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια, σε αυτήν την απαιτητική περίοδο της ζωής μου. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, όπου με τη δική τους ξεχωριστή στήριξη με βοήθησαν να υλοποιήσω το σκοπό μου.

Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κ. Σμόνου Ιουλία, πάνω απ' όλα για την άψογη συνεργασία, τη στήριξη, την εμπιστοσύνη, την επιστημονική καθοδήγηση και την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω στο εργαστήριο της τόσο την πτυχιακή μου εργασία όσο και τη μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Καθηγητές κ. Παυλίδη Ιωάννη και κ. Στρατάκη Εμμανουήλ που παρά τον περιορισμένο τους χρόνο δέχτηκαν να αποτελέσουν την εξεταστική μου επιτροπή.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα τωρινά αλλά και παλαιότερα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια, τη στήριξη τους τόσο σε φιλικό όσο και σε επιστημονικό επίπεδο. Συγκεκριμένα τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μελαμπιανάκη Σοφία, Μυρτολλάρη Καμέλα, Χατζούδη Απόστολο, της προπτυχιακή φοιτήτρια Χριστοφορίδου Ιωάννα, ενώ ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα και φίλο Γιαννόπουλο Βασίλειο για την τεράστια βοήθεια που μου έδωσε όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του τομέα για την πολύ καλή συνεργασία, καθώς και όλη την ερευνητική ομάδα του κ. Παυλίδη και ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Καλούδη Νικόλαο για την άψογη συνεργασία και σημαντική βοήθεια του.

Βιογραφικό Σημείωμα

Ονοματεπώνυμο: Κατσουλάκης Νικόλαος

Ημ/νία Γέννησης: 15 Μαρτίου 1996

Τόπος Γέννησης: Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Email: katsoulakis.nikos@outlook.com.gr, chemp1026@edu.chemistry.uoc.gr

Εκπαίδευση

2019-σήμερα: Υποψήφιος μεταπτυχιακός φοιτητής στον τομέα της Οργανικής Χημείας στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστήμιου Κρήτης, υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

2014-2018: Πτυχιούχος του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Βαθμός: Λίαν Καλώς (7.52/10)

2018: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας με τίτλο: «Μελέτη της υδρολυτικής δράσης του νέου θερμοανθεκτικού ενζύμου, EstDZ2, με βουτυρικούς αρυλο εστέρες» στο εργαστήριο Βιοκατάλυσης-Οργανικής Χημείας υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Ιουλίας Σμόνου.

Ακαδημαϊκή Εμπειρία

2018: Πρακτική άσκηση στο 5^{ο} Γενικό Λύκειο Ηρακλείου.

2019-2020: Βοηθός Προπτυχιακού Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ι και ΙΙ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ξένες Γλώσσες

- Γνώση της Αγγλικής γλώσσας σε επίπεδο Lower (Michigan Examination, EDEXCEL Lower)
- Γνώση της Ιταλικής γλώσσας σε επίπεδο B2 (State Certificate of Italian Language Tutoring)

Συμμετοχή σε Συνέδρια/Ημερίδες

19-22 Ιουλίου 2021: Giannopoulos, V.; **Katsoulakis N.**; Smonou, I. Chemoenzymatic synthesis of valuable chiral intermediates: β-hydroxy-α-amido esters and β-hydroxy-α-cyanoalkyl esters, Biotrans 2021, Graz, Austria (Ηλεκτρονικά αναρτημένη εργασία).

13-16 Σεπτεμβρίου 2021: **Katsoulakis N.**; Myrtollari K.; Zarafeta D.; Pavlidis I.; Smonou I. Activity and specificity studies of the new thermostable esterase EstDZ2.
MECP 2021, Aachen, Germany (Ηλεκτρονικά αναρτημένη εργασία).

Δημοσιεύσεις

- Myrtollari, K.; **Katsoulakis, N**.; Zarafeta, D.; Pavlidis, I. V.; Skretas, G.; Smonou, I. Activity and Specificity Studies of the New Thermostable Esterase EstDZ2. Bioorg. Chem. 2020, 104 (August), 104214. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104214.

- Giannopoulos V., **Katsoulakis N**., Smonou I. Synthesis of α,α-Dichloro-β-Keto Esters and 1,3- Diketones by Oxone ® /$AlCl_3$ in Aqueous Media. *Manuscript in Preparation*

Curriculum Vitae

Full name: Katsoulakis Nikolaos

Date of birth: 15 March 1996

Place of birth: Heraklion Crete, Greece

Email: katsoulakis.nikos@outlook.com.gr, chemp1026@edu.chemistry.uoc.gr

Education

2019-present	M.Sc in Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete. Supervisor Associate. Professor I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete.
2014-2018	B.Sc in Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete Grade: Very good (7.52/10.0)
2018	Senior undergraduate Diploma Thesis entitled *"Study of the hydrolytic activity of the new thermo-resistant enzyme, EstDZ2 with various substituted-phenyl butyrates"* elaborated under the supervision of Assoc. Professor I. Smonou, Department of Chemistry, University of Crete.

Experience

2018	Practical internship in 5th High school of Heraklion.
2019-2020	Laboratory Assistant in Organic Chemistry Undergraduate Laboratory I and II

Language skills

- English to the level of Lower (Michigan Examination, EDEXCEL Lower)
- Italian to the level of B2 (State Certificate of Italian Language Tutoring)

Participation in conferences

- Giannopoulos, V.; **Katsoulakis N.**; Smonou, I. Chemoenzymatic synthesis of valuable chiral intermediates: β-hydroxy-α-amido esters and β-hydroxy-α-cyanoalkyl esters, Biotrans 2021, Graz, Austria

- **Katsoulakis N.**; Myrtollari K.; Zarafeta D.; Pavlidis I.; Smonou I. Activity and specificity studies of the new thermostable esterase EstDZ2. MECP 2021, Aachen, Germany

Publications

- Myrtollari, K.; **Katsoulakis, N**.; Zarafeta, D.; Pavlidis, I. V.; Skretas, G.; Smonou, I. Activity and Specificity Studies of the New Thermostable Esterase EstDZ2. Bioorg. Chem. 2020, 104 (August), 104214. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104214.

- Giannopoulos V., **Katsoulakis N**., Smonou I. Synthesis of α,α-Dichloro-β-Keto Esters and 1,3- Diketones by Oxone ® /$AlCl_3$ in Aqueous Media. *Manuscript in Preparation*

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη μιας νέας συνθετικής μεθόδου χλωρίωσης σε α-θέση, α-υποκατεστημένων β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών με τη χρήση του οξειδωτικού συστήματος Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό διάλυμα, αλλά και η μελέτη στερεοεκλεκτικών ενζυμικών αναγωγών α-υποκατεστημενων-α-χλωριωμενων-β-κετο εστέρων με σκοπό τη σύνθεση ενώσεων που αποτελούν χειρόμορφα ενδιάμεσα – δομικές μονάδες για τη σύνθεση φαρμακευτικών και φυσικών προϊόντων.

Στο πρώτο μέρος παρουσιάζεται η μελέτη μιας νέας συνθετικής μεθόδου χλωρίωσης προς το σχηματισμό 11 διαφορετικών α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων και 2-υποκατεστημένων-2-χλωρο-1,3-δικετονών με τη χρήση του συστήματος Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό περιβάλλον κάτω από ήπιες συνθήκες. Οι α-χλωριωμένες δικαρβόνυλο ενώσεις αποτελούν μόρια υψηλού ενδιαφέροντος λόγω των πολλαπλών εφαρμογών που βρίσκουν τόσο στον τομέα της φαρμακευτικής, όσο και στον τομέα της επιστήμης υλικών.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφεται η ενζυμική σύνθεση οπτικά ενεργών α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-υδρόξυ εστέρων με τη χρήση μιας σειράς NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών . Τα περισσότερα ένζυμα έδειξαν εξαιρετική δραστικότητα, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις ο σχηματισμός των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρων πραγματοποιήθηκε με αρκετά καλή στερεοεκλεκτικότητα.

Λέξεις κλειδιά: α-χλωρίωση, χειρόμορφα ενδιάμεσα, κετορεδουκτάσες, στερεοεκλεκτική αναγωγή, α-υποκατεστημένοι-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρες, 2-υποκατεστημένες-2-χλωρο-1,3 δικετόνες

Abstract

The subject of the present thesis is the study of a new synthetic method for a-chlorination of α-substituted-β-keto esters and 2-substituted-1,3-diketones with an oxidative system of Oxone/$AlCl_3$ in aqueous media and the study of stereoselective enzymatic reduction of α-substituted-α-chloro-β-keto esters, compounds that constitute chiral intermediates and building blocks for the synthesis of pharmaceutical products.

In the first part, the study of a new synthetic chlorination method of 11 α-substituted-β-keto esters and 2-substituted-1,3-diketones with the system of Oxone/$AlCl_3$ in aqueous media and under mild conditions is presented. The a-chloro dicarbonyl compounds have attracted the attention in recent years due to their applications in pharmacy and materials science.

In the second part, the stereoselective bioreduction of α-substituted-α-chloro-β-keto esters using various isolated NADPH-dependent ketoreductases for the synthesis of optically pure α-substituted-α-chloro-β-hydroxy esters is presented. Most of the enzymes which were screened showed excellent activity and pretty good stereoselectivity.

Keywords: α-chlorination, chiral intermediates, ketoreductases, stereoselective reduction, α-substituted-α-chloro-β-hydroxy esters, 2-substituted-2-chloro-1,3-diketones

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα Υπογραφών…….....i
Ευχαριστίες…….…...ii
Βιογραφικό σημείωμα στα Ελληνικά……iii
Βιογραφικό σημείωμα στα Αγγλικά……...v
Περίληψη στα Ελληνικά……...vii
Περίληψη στα Αγγλικά……...viii
Περιεχόμενα……..ix

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Χρήση και σπουδαιότητα αλογονωμένων ενώσεων……2
1.2 Χρήση και σπουδαιότητα α-χλωριωμένων 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεων……3
1.3 Άλλες συνθετικές μέθοδοι α-χλωρίωσης 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεων……...4
1.4 Στόχος της παρούσας εργασίας……7
1.5 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων……..8
1.6 Πειραματικό μέρος…….……18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Πράσινη χημεία και Βιοκατάλυση……..31
2.2 Παραδείγματα βιοκαταλυτικών διεργασιών……...33
2.2.1 Χημειοενζυματική διαδικασία για τη σύνθεση της Pregabalin……...33
2.2.2 Μία διαδικασία τριών ενζύμων για ένα ενδιάμεσο της Ατορβαστατίνης……...34
2.2.3 Ενζυμική σύνθεση της Σιταγλιπτίνης……...…35
2.3 Ένζυμα……...….36
2.3.1 Γενικές πληροφορίες……...….36
2.3.2 Ταξινόμηση ενζύμων και ονοματολογία…….……37
2.3.3 Αλκοολικές Αφυδρογονάσες- Κετορεδουκτάσες……..…..38
2.3.4 Καταλυτικός μηχανισμός – Στερεοχημεία……...…39
2.3.5 Εφαρμογές των κετορεδουκτασών στην ασύμμετρη σύνθεση……..…..42
2.4 Σπουδαιότητα και εφαρμογές α-χλωρο και α,α-διχλωρο-β-υδροξυ εστέρων……..45

2.5 Στόχος της παρούσας εργασίας……...49
2.6 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων……50
2.7 Πειραματικό μέρος…….63

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Φάσματα ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR και αέριας χρωματοφραφίας (GC)……69

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Παράθεση βιβλιογραφίας……...……113

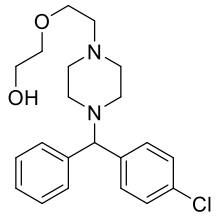
Κεφάλαιο 1

Κεφάλαιο 1

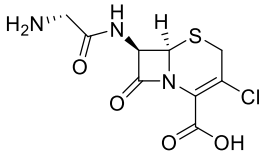
1.1 Χρήση και σπουδαιότητα αλογονωμένων-χλωριωμένων ενώσεων

Όπως είναι ευρέως γνωστό τα τελευταία χρόνια η ύπαρξη ενός ατόμου αλογόνου σε μία οργανική ένωση μπορεί να προσδώσει εξαιρετικά χρήσιμες ιδιότητες καθιστώντας την αναπόσπαστο κομμάτι σε διάφορους τομείς, όπως είναι η βιομηχανία τροφίμων, η επιστήμη υλικών, η βιομηχανία αγροχημικών με κυριότερους όμως αυτούς της επιστήμης της Ιατρικής και της φαρμακευτικής βιομηχανίας.[1] Δίνοντας λοιπόν ένα μεγαλύτερο ενδιαφέρον στον τομέα της υγείας αξίζει να αναφερθεί ότι τα αλογόνα που συναντώνται περισσότερο στα φάρμακα να είναι τόσο το ***χλώριο (Cl)***, όσο και το φθόριο (F), με το χλώριο να υπερτερεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό.[2] Η εφαρμογή αλογόνων στην φαρμακευτική και ιατρική χημεία είναι ένας από τους πιο αναπτυσσόμενους και ενδιαφέροντες τομείς της χημείας λόγω των σημαντικών ιδιοτήτων των αλογόνων πάνω στην ανάπτυξη των φαρμάκων.[1,3,4]

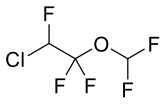
Όπως προαναφέρθηκε, το άτομο του χλωρίου είναι αυτό που συναντάται περισσότερο συχνά στα φάρμακα συγκριτικά με τα υπόλοιπα αλογόνα καταλαμβάνοντας την 6η θέση στη κατάταξη μετά τα άτομα του άνθρακα (C), υδρογόνου (H), οξυγόνου (O), αζώτου (N) και του θείου (S). Το άτομο του φθορίου (F) βρίσκεται στην 7η θέση με τα φώσφορο (P), βρώμιο (Br) και ιώδιο (I) να είναι τα κύρια στοιχεία τα οποία συμπληρώνουν τη δεκάδα στη σύνθεση φαρμάκων.[2,5] Για να γίνει αντιληπτό το πόσο καθοριστικό ρόλο παίζει το άτομο του χλωρίου στη φαρμακευτική χημεία είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής περισσότερο από το 88% των φαρμακευτικών προϊόντων εξαρτάται από τη χημεία του χλωρίου για τη σύνθεση φαρμάκων τα οποία είναι γνωστά για την καταπολέμηση ασθενειών της καρδιοαγγειακής νόσου, του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μεταβολισμού, του αναπνευστικού συστήματος, των φλεγμονών, του μυοσκελετικού συστήματος και των ορμονών. Μερικές μόνο από τις ιδιότητες οι οποίες καθιστούν το άτομο του χλωρίου τόσο ιδιαίτερο είναι η βελτίωση της βιολογικής δραστικότητας διαφόρων μορίων, η αύξηση της βιολογικής σταθερότητας, η αύξηση της λιποφιλικότητας ενός μορίου κ.α. Μερικά μόνο από τα πιο γνωστά παραδείγματα φαρμακευτικών προϊόντων τα οποία περιέχουν χλώριο είναι το Atarax το οποίο θεραπεύει ασθένειες του νευρικού συστήματος, το Ceclor το οποίο δρα κατά των φλεγμονών, το Imodium το οποίο σχετίζεται με το μεταβολισμό και το Enflurance το οποίο θεραπεύει επίσης ασθένειες του νευρικού συστήματος κ.ά. (Σχήμα 1). [2]



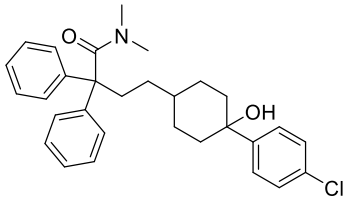
Atarax



Ceclor



Enflurance



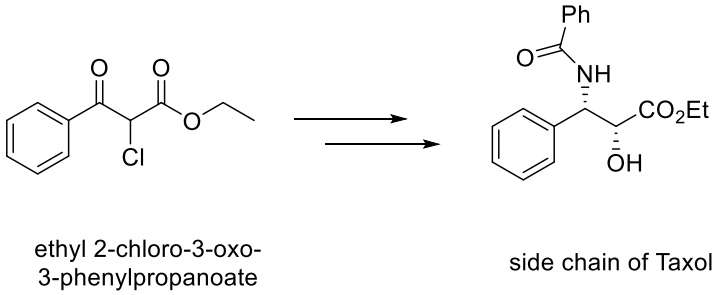
Imodium

Σχήμα 1. Τέσσερα εγκεκριμένα φάρμακα από τον FDA τα οποία περιέχουν το άτομο του χλωρίου.

1.2 Χρήση και σπουδαιότητα α-χλωριωμένων 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεων

Εδώ και αρκετά χρόνια οι α-χλωριωμένες καρβονυλικές ενώσεις έχουν λάβει ιδιαίτερη προσοχή λόγω των πολλαπλών εφαρμογών που βρίσκουν στην οργανική σύνθεση. Η υψηλή δραστικότητα των ενώσεων αυτών τις καθιστά κατάλληλες να αντιδρούν με ένα αρκετά μεγάλο αριθμό πυρηνόφιλων παρέχοντας έτσι μία ποικιλία χρήσιμων ενώσεων, οι οποίες μπορεί να είναι πρόδρομες ενώσεις τόσο στον τομέα της φαρμακευτικής, όσο και στον τομέα της επιστήμης υλικών. [6,7,8] Στις μέρες μας, περίπου το 26% των φαρμακευτικών προϊόντων που παρασκευάζονται περιέχουν χλώριο. Επιπλέον λόγω της ικανότητας του ατόμου του χλωρίου να βελτιώνει την από του στόματος κατάποση, τη διαπερατότητα του φραγμού αίματος-εγκεφάλου, τη μεταβολική και τη χημική σταθερότητα, οι φαρμακευτικά ενεργές χλωριωμένες ενώσεις παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη φαρμακευτική χημεία, καθιστώντας τις πρώτες σε πωλήσεις.[9,10]

Ένα παράδειγμα αποτελεί ο 2-χλωρο-3-οξο φαινυλοπροπιονικός αιθυλεστέρας ο οποίος αποτελεί πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό της πλευρικής αλυσίδας του Taxol (Σχήμα 2), το οποίο έχει αναδειχθεί ως φάρμακο για τη θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος των ωοθηκών και του μαστού. [11]

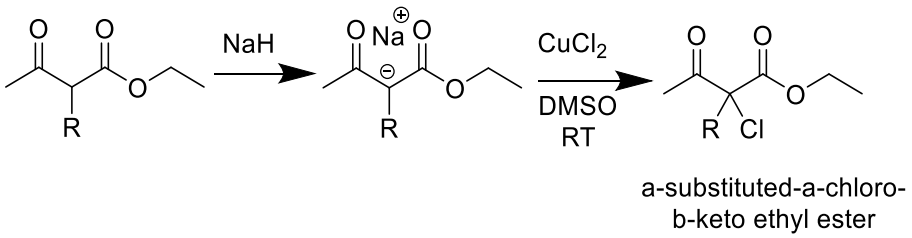


Σχήμα 2. Απεικόνιση του 2-χλωρο-3-οξο φαινυλοπροπιονικού αιθυλεστέρα ως πρόδρομο μόριο για την σύνθεση της πλευρικής αλυσίδας του Taxol.

1.3 Συνθετικές μέθοδοι α-χλωρίωσης 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων

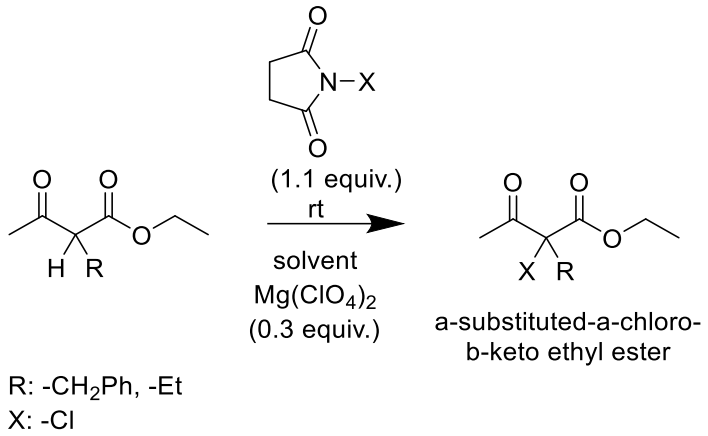
Λόγω της χρησιμότητας των α-χλωριωμένων 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεων τόσο παλαιότερα όσο και τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αρκετά μεγάλο ενδιαφέρον ως προς τη σύνθεση τέτοιων ενώσεων.[12] Παρακάτω παρουσιάζονται μερικές από τις μεθόδους σύνθεσης.

Μία από τις παλαιότερες και σπουδαιότερες συνθετικές μεθόδους που παρουσιάστηκε το 1993 από την ομάδα του Dai, από το Ινστιτούτο Οργανικής Χημείας στη Σανγκάη, ήταν η αλογόνωση με $NaH/CuCl_2$ σε α-θέση δικαρβονυλικών ενώσεων των οποίων το ένα μέρος αποτελούνταν από μία εστερική ομάδα (Σχήμα 3). Το ενδιαφέρον της ομάδας κέντρισε το γεγονός ότι παρά το ότι η χρήση αλογονιδίων μετάλλου είναι ευρέως γνωστή για την αλογόνωση κετονών, αλδεϋδών και άλλων καρβονυλικών ενώσεων, οι μέθοδοι α-αλογόνωσης εστέρων ήταν σπάνιοι.[13]



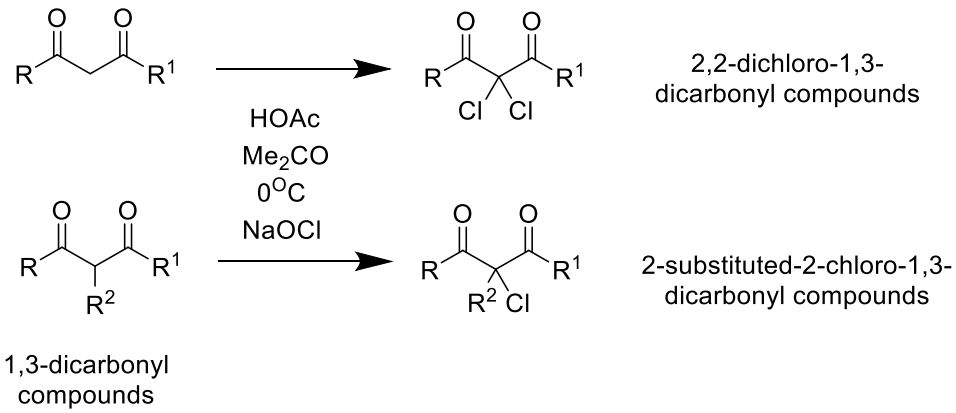
Σχήμα 3. Αντίδραση α-χλωρίωσης α-υποκατεστημένου β-κετο αιθυλεστέρα με χρήση $NaH/CuCl_2$.[13]

Μία άλλη μέθοδος χλωρίωσης σε α-θέση α-υποκατεστημένων β-κετο εστέρων παρουσιάστηκε το 2002 από την ομάδα του Yang από το Πανεπιστήμιο του Χονγκ Κονγκ, η οποία προτείνει τη χρήση N-χλωροσουκινιμιδίου (NCS) ως μέσο χλωρίωσης με καταλύτη $Mg(ClO_4)_2$ σε διαλύτη είτε ακετονιτρίλιο είτε οξικό αιθυλεστέρα (Σχήμα 4).[14]



Σχήμα 4. Αντίδραση α-χλωρίωσης β-κετο αιθυλεστέρων με τη χρήση N-χλωροσουκινιμιδίου (NCS) καταλυόμενη από $Mg(ClO_4)_2$.[14]

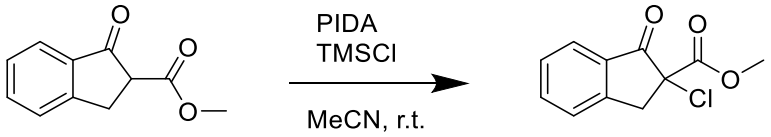
Ακόμα μία σπουδαία έρευνα δημοσιεύτηκε το 2005 από την ομάδα του Weinreb, από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου της Πενσυλβάνια, όπου παρουσιάζει τη χλωρίωση μη υποκατεστημένων και α-υποκατεστημένων δικαρβόνυλο ενώσεων όπως 1,3-δικετονών, β-κέτο εστέρων και 1,3-διεστέρων προς σχηματισμό διχλωριωμένων και μονοχλωριωμένων παραγώγων αντίστοιχα. Για την αντίδραση απαιτείται NaOCl σε ένα σύστημα ακετόνης/οξικού οξέος σε θερμοκρασία 0 ^{o}C (Σχήμα 5).[15]



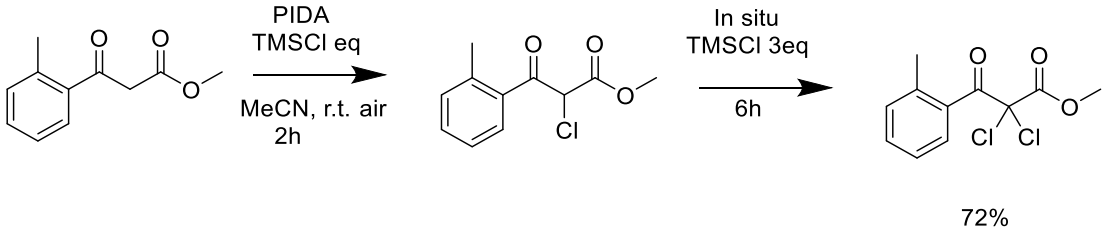
Σχήμα 5. Αντίδραση χλωρίωσης α-υποκατεστημένων και μη 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεων με τη χρήση NaOCl σε $HOAc/Me_2CO$.[15]

Τέλος, μία πρόσφατη και εξαιρετικά ενδιαφέρουσα μελέτη δημοσιεύτηκε το 2016 από την ομάδα των Su και Hu από την Κίνα, οι οποίοι ασχολήθηκαν με την α-μονοχλωρίωση α-υποκατεστημένων 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων (Σχήμα 6), την α-διχλωρίωση α-μη υποκατεστημένων 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων αλλά και την

α-μονοχλωρίωση α-μη υποκατεστημένων 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων (Σχήμα 7), κάτι το οποίο θεωρείται αρκετά δύσκολο να επιτευχθεί στον τομέα της οργανικής σύνθεσης. Σκοπός της ομάδας ήταν η αποφυγή της κουραστικής επεξεργασίας και των χρονοβόρων αντιδράσεων που υπήρχαν βιβλιογραφικά. Τα αντιδραστήρια που επιλέχθηκαν ήταν το $PhI(OAc)_2$: PIDA ως οξειδωτικό, και το τριμεθυλο σίλυλο χλωρίδιο (TMSCl) ως πηγή χλωρίου.[16]



Σχήμα 6. Αντίδραση α-χλωρίωσης α-μονο υποκατεστημένου β-κετο εστέρα με τη χρήση PIDA/TMSCl.[16]



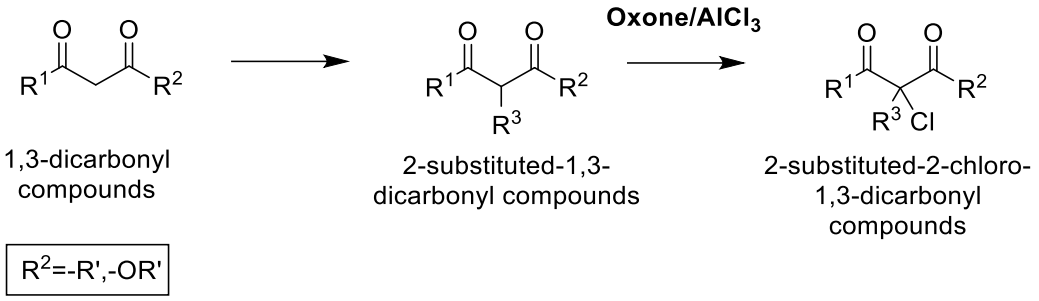
Σχήμα 7. Αντίδραση σταδιακής διχλωρίωσης α-μη υποκατεστημένου β-κετο εστέρα.[16]

1.4 Στόχος της παρούσας εργασίας

Δεδομένης της σπουδαιότητας των χλωριωμένων οργανικών ενώσεων και συγκεκριμένα των α-χλωριωμένων 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων με βάση τα όσα προαναφέρθηκαν, μελετήθηκε η αντίδραση χλωρίωσης σε α-θέση, α-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών και β-κετο εστέρων. Παρά την ύπαρξη αρκετά μεγάλης ποικιλίας αντιδράσεων και συνδυασμού αντιδραστηρίων για την χλωρίωση σε α-θέση δικαρβονυλικών ενώσεων, υπάρχουν αρκετοί λόγοι που οδηγούν στην ανάγκη εύρεσης περισσότερο εύκολων, αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών. Οι λόγοι αυτοί που οδήγησαν στην εύρεση μίας νέας πιο φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου χλωρίωσης, είναι η αποφυγή χρήσης δαπανηρών και τοξικών αντιδραστηρίων που δημιουργούν επικίνδυνα για το περιβάλλον απόβλητα, τα οποία απαιτούν χρονοβόρα και κουραστική επεξεργασία. Έτσι λοιπόν βασιζόμενοι τόσο σε προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας η οποία παρουσιάζει τη διχλωρίωση σε α-θέση μη υποκατεστημένων 1,3-δικαρβονυλικών ενώσεων,[17] αλλά και εμπνεόμενοι βιβλιογραφικά από παρόμοιες έρευνες, όπως αυτή της ομάδας του Narender από το CSIR-Indian Institute of Chemical Technology και του Zhou από το Zhejiang Shuren University, οι οποίοι ασχολήθηκαν με την αντίδραση χλωρίωσης σε α-θέση κετονών και 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεων με τη χρήση άλατος Oxone και χλωριούχου αμμωνίου NH_4Cl[18,19], ασχοληθήκαμε με τη μελέτη μιας νέας πιο φιλικής προς το περιβάλλον διεργασίας χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Oxone ($2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$) και το τριχλωριούχο αργιλίο $AlCl_3$ ως πηγή χλωρίου σε υδατικό περιβάλλον υπό ήπιες συνθήκες.

Σχεδιασμός μεθόδου

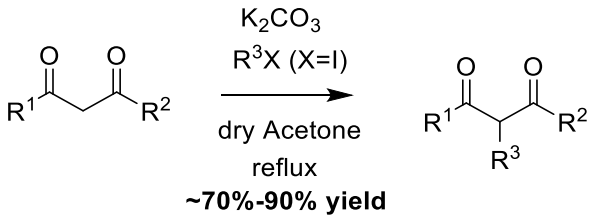
- Πρώτο στόχο αποτελεί η σύνθεση των προς μελέτη υποστρωμάτων: α-υποκατεστημένων β-κετο εστέρων και 2-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών από απλούς β-κέτο εστέρες και 1,3-δικετόνες αντίστοιχα (Σχήμα 8).
- Ακολουθεί η μελέτη της νέας αντίδρασης χλωρίωσης με Oxone/$AlCl_3$ με σκοπό την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης για κάθε ένα υπόστρωμα ξεχωριστά.



Σχήμα 8. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου που θα αναπτυχθεί στην παρούσα εργασία με σκοπό τη σύνθεση των χλωριωμένων παραγώγων.

1.5 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων

Αρχικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση α-αλκυλο-β-κετο εστέρων και α-αλκυλο-1,3-δικετονών. Με βάση προηγούμενη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας, η σύνθεση τέτοιων υποστρωμάτων επιτεύχθηκε με μία απλή αντίδραση αλκυλίωσης παρουσία ανθρακικού καλίου (K_2CO_3), με το αντίστοιχο αλκυλαλογονίδιο, η οποία οδήγησε στον σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος με πολύ καλή απόδοση (Σχήμα 9). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 17 διαφορετικά υποστρώματα, μερικά από τα οποία δεν έδωσαν αξιόλογα ποσοστά μετατροπής στο επόμενο στάδιο της αντίδρασης χλωρίωσης, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζονται στα αποτελέσματα.

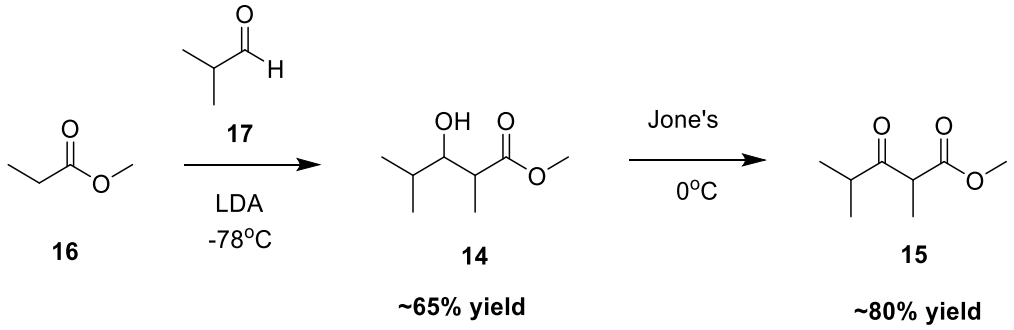


1: R^1 = Me, R^2 = OMe, R^3 = Me
2: R^1 = Me, R^2 = OEt, R^3 = Me
3: R^1 = Ph, R^2 = OMe, R^3 = Me
7: R^1 = Et, R^2 = OMe, R^3 = Me
8: R^1 = Ph, R^2 = Me, R^3 = Me
9: R^1 = Ph, R^2 = Me, R^3 = Et
10: R^1 = Me, R^2 = Me, R^3 = Me

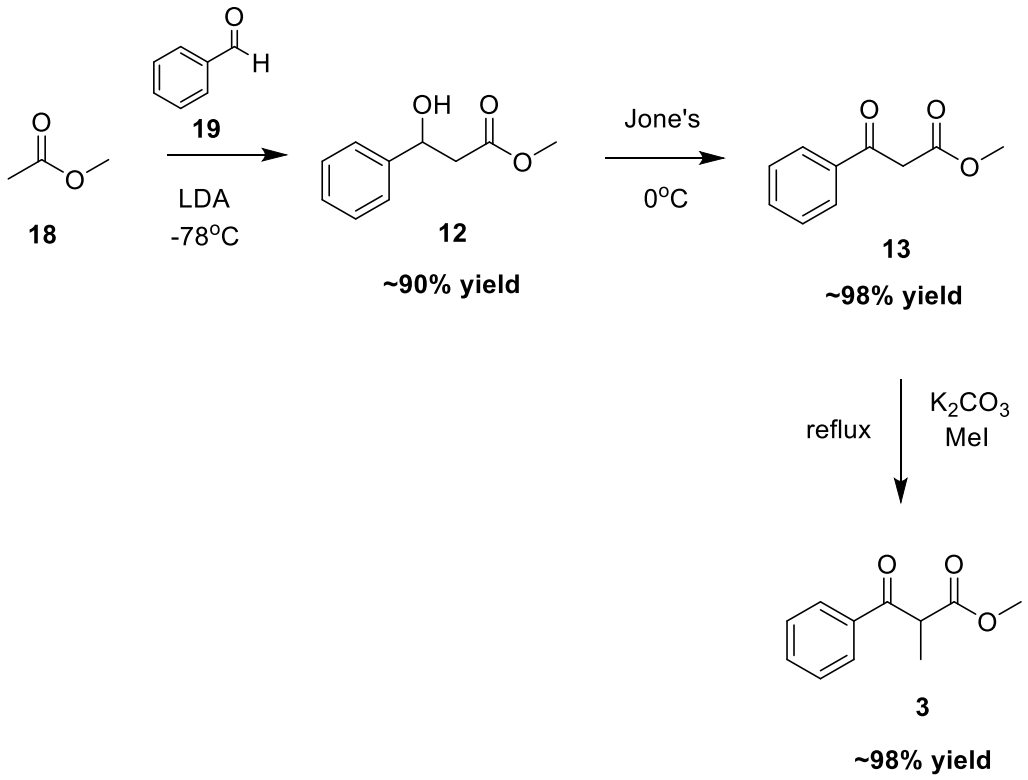
Σχήμα 9. Σύνθεση α-αλκυλο β-κετο εστέρων και α-αλκυλο 1,3 δικετονών.

Αξίζει να σημειωθεί ότι από τα υποστρώματα που μελετήθηκαν δύο ήταν αυτά που παρασκευάστηκαν είτε με διαφορετικό τρόπο είτε με μερικά επιπλέον συνθετικά βήματα. Το ένα είναι ο 2,4-μέθυλο-3-οξο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας (**15**), ο οποίος

σχηματίστηκε μέσω αλδολικής συμπύκνωσης παρουσία της κατάλληλης αλδεϋδης και στη συνέχεια με οξείδωση με το αντιδραστήριο Jone's προς το επιθυμητό οξειδωμένο προϊόν (Σχήμα 10). Το δεύτερο υπόστρωμα είναι ο 2-μέθυλο-3-οξο φαινυλο-προπιονικός μεθυλεστέρας (**3**) ο οποίος σχηματίστηκε μέσω αλδολικής συμπύκνωσης παρουσία της κατάλληλης αλδεύδης, στη συνέχεια με οξείδωση με το αντίδραστήριο Jone's προς τον αντίστοιχο β-κέτο εστέρα (**13**), ενώ τέλος ακολούθησε η αντίδραση αλκυλίωσης σε α-θέση (Σχήμα 11).



Σχήμα 10. Σύνθεση 2-μεθυλο-3-οξο-4-μεθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα **15**.



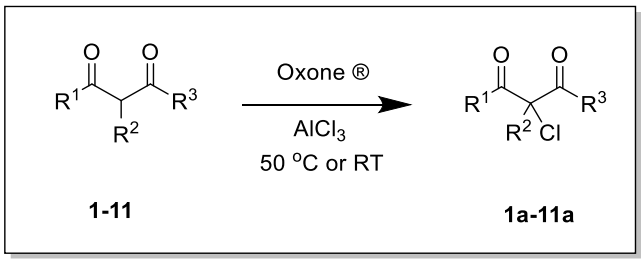
Σχήμα 11. Σύνθεση 2-μεθυλο-3-οξο φαινυλο-προπιονικού μεθυλεστέρα **3**.

Το σύστημα Oxone®/$AlCl_3$ σε υδατικό περιβάλλον ως ένα νέο σύστημα για τη χλωρίωση α-υποκατεστημένων-β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών

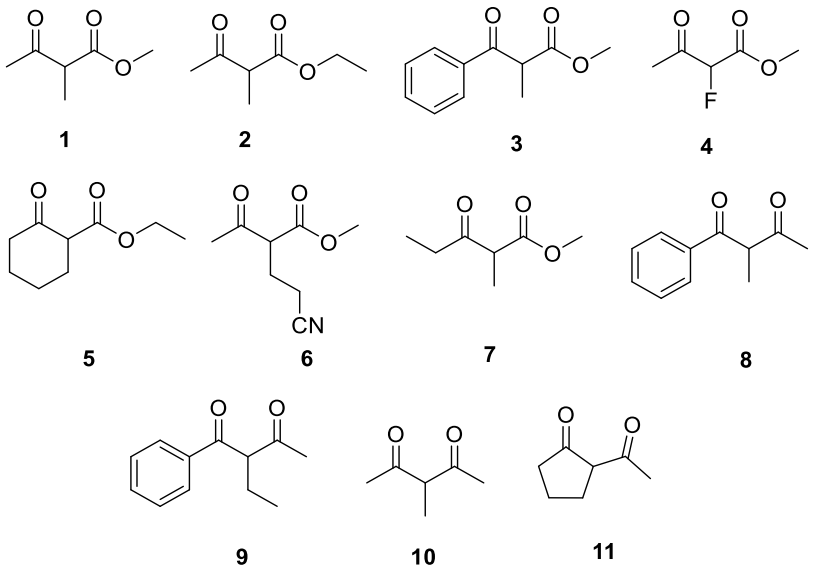
Η χρήση του άλατος Oxone, $2KHSO_5 \cdot KHSO_4 \cdot K_2SO_4$, στην οργανική σύνθεση, ως οξειδωτικό μέσο, διευρύνεται ταχύτατα τα τελευταία χρόνια λόγω του ότι αποτελεί ένα εύχρηστο, σταθερό, υδατοδιαλυτό, μη τοξικό και αρκετά οικονομικό αντιδραστήριο. Παρότι λοιπόν, το Oxone χρησιμοποιείται ευρέως καταλύοντας μία τεράστια ποικιλία αντιδράσεων οξείδωσης[20], δεν έχει μελετηθεί αρκετά η χρήση του σε αντιδράσεις χλωρίωσης. Δύο βιβλιογραφικά γνωστά παραδείγματα χλωρίωσης παρουσία του συστήματος Oxone/NH_4Cl που αναφέρθηκαν παραπάνω , μελετήθηκε από την ομάδα του Narender αλλά και την ομάδα του Zhou.[18,19]

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται η απευθείας σύνθεση α-υποκατεστημένων α-χλωρο-β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών, χρησιμοποιώντας το σύστημα Oxone/$AlCl_3$ σε υδατικό περιβάλλον, υπό ήπιες συνθήκες (Σχήμα 12).

α)



β)

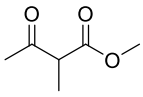
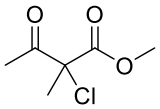
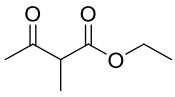
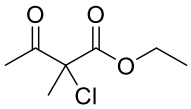
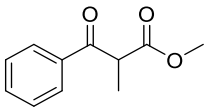
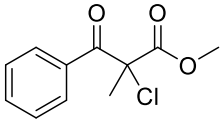


Σχήμα 12. α) Σχηματική αναπαράσταση της χλωρίωσης σε α-θέση, α-υποκατεστημένων β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών. β) Παράθεση των 1,3-δικαρβόνυλο ενώσεων **1-11**.

Αυτή η αρκετά απλή αντίδραση, με ένα και μόνο βήμα σε υδατικό διάλυμα, είναι μία εξαιρετικής μετατροπής, σύντομη και από τις πιο φιλικές για το περιβάλλον μέθοδος, για τη σύνθεση τέτοιου είδους χλωριωμένων ενώσεων.

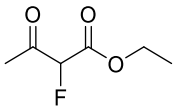
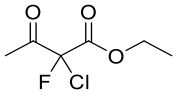
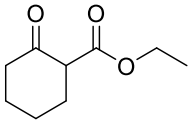
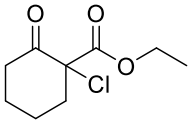
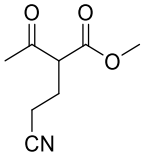
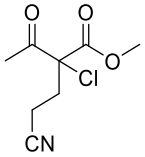
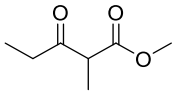
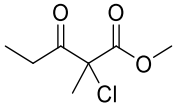
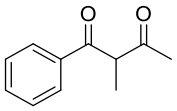
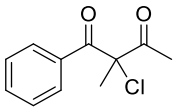
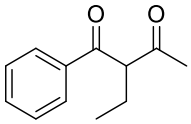
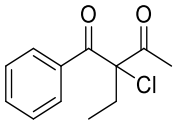
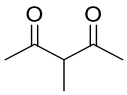
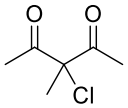
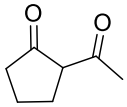
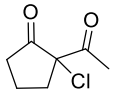
Σε πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας είχε βρεθεί οτι η αντίδραση αντίστοιχων β-κέτο εστέρων και 1,3 δικετονών με Oxone σε υδατικό διάλυμα, απουσία $AlCl_3$ δεν επιφέρει καμία αντίδραση μετά από 24 ώρες. Ετσι αποφασίστηκε η πραγματοποίηση της αντίδρασης του κετο εστέρα **1,** με την προσθήκη του συστήματος Oxone/$AlCl_3$ με ισοδύναμα 2.1 και 2.3 αντίστοιχα και συγκέντρωση υποστρώματος 20 mM σε θερμοκρασία δωματίου. Τα συγκεκριμένα ισοδύναμα και οι συνθήκες της αντίδρασης είναι βασισμένα σε προηγούμενες μελέτες.[17] Η πρώτη προσπάθεια οδήγησε στο σχηματισμό του επιθυμητού προϊόντος **1a** με εξαιρετική μετατροπή >99%. Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο, μελετήθηκε μία σειρά αντιδράσεων χλωρίωσης διαφορετικών β-κετο εστέρων και 1,3 δικετονών **1-11**, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1, προς τα αντίστοιχα χλωριωμένα προϊόντα **1a-11a** με πολύ καλές έως εξαιρετικές μετατροπές. Σημειώνεται πως δεν υπήρξε κάποιο πρόβλημα λόγω μη διαλυτότητας των αρχικών υποστρωμάτων στο νερό.

Πίνακας 1. Μελέτη χλωρίωσης σε α-θέση, α υποκατεστημένων β-κετο εστέρων και 1,3 δικετονών με τη χρήση του συστήματος Oxone/$AlCl_3$.

Περίπτωση	*Υπόστρωμα*	*Oxone (eq)*	*$AlCl_3$ (eq)*	*Χρόνος*	*Μετατροπή[α,γ] (%)*	*Απόδοση (%)*	*Προϊόν*
1	 **1**	2.1	2.3	2.5h	100%	70%	 **1a**
2	 **2**	2.1	2.3	5h	100%	70%	 **2a**
3	 **3**	2.4	2.7	24h	93%	60%	 **3a**

Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα.

Ο πίνακας συνεχίζεται από την προηγούμενη σελίδα.

Περίπτωση	*Υπόστρωμα*	*Oxone (eq)*	*$AlCl_3$ (eq)*	*Χρόνος*	*Μετατροπή[α,γ] (%)*	*Απόδοση (%)*	*Προϊόν*
4	 **4**	2.1	2.3	5h	95%	60%	 **4a**
5	 **5**	2.3	2.5	2h	100%	85%	 **5a**
6	 **6**	2.6	2.9	36h	100%[β]	45%	 **6a**
7	 **7**	2,4	2,7	24h	90%	45%	 **7a**
8	 **8**	2.1	2.3	5h	100%	100%	 **8a**
9	 **9**	2.6	2.8	24h	95%	60%	 **9a**
10	 **10**	2.1	2.3	2.5h	95%[β]	30%	 **10a**
11	 **11**	1.3	1.5	45min	100%[β]	30%	 **11a**

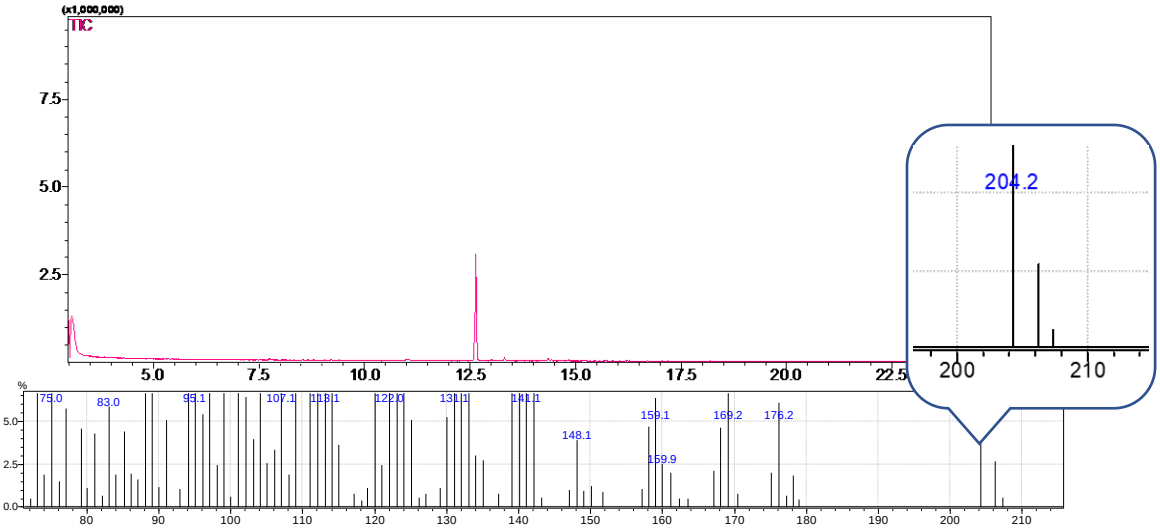
[α] Θερμοκρασία αντίδρασης 50 ºC. [β] Θερμοκρασία αντίδρασης RT. [γ]Το ποσοστό μετατροπής προσδιορίστηκε με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματόμετρο μάζας (GC-MS) και φασματοσκοπίας ^{1}H NMR.

Όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, οι μετατροπές ήταν υψηλές σε όλες τις περιπτώσεις >90%, ενώ οι χρόνοι της αντίδρασης κυμαίνονταν από 45 λεπτά έως και 36 ώρες. Στόχος της μελέτης ήταν η δοκιμή διαφορετικών υποστρωμάτων, εξάγοντας έτσι ορισμένα συμπεράσματα για τη νέα αυτή αντίδραση χλωρίωσης. Στον Πίνακα περιλαμβάνονται 7 διαφορετικοί α-υποκατεστημένοι β-κετο εστέρες **1-7** και 4 διφορετικές 2-υποκατεστημένες 1,3-δικετόνες **8-11**. Συγκεκριμένα, με τους α-

υποκατεστημένους β-κέτο εστέρες παρατηρούμε ότι στις περιπτώσεις **1** και **2** με τα αρχικά ισοδύναμα η μετατροπή ήταν 100%, με την διαφορά ότι στην περίπτωση 2 όπου η εστερική ομάδα είναι κατά έναν άνθρακα μεγαλύτερη η αντίδραση διήρκησε 2.5 ώρες παραπάνω σε σχέση με την περίπτωση 1 στις ίδιες συνθήκες. Παρατηρώντας την περίπτωση **3** όπου συγκριτικά με την **1,** τη θέση της μεθυλομάδας έχει πάρει ένα φαινύλιο, βλέπουμε ότι απαιτείται μία μικρή αύξηση στα ισοδύναμα του συστήματος Oxone/$AlCl_3$ σε 2.4 και 2.7 αντίστοιχα, με σκοπό τη λήψη του καλύτερου ποσοστού μετατροπής το οποίο είναι 93%. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τα αρχικά ισοδύναμα η αντίδραση είχε ποσοστό μετατροπής 80% στις 24 ώρες, ενώ με προσθήκη περισσότερων ισοδύναμων από αυτά που αναγράφονται στον Πίνακα 1 το ποσοστό δεν μεταβλήθηκε. Στην περίπτωση **4** όπου ο υποκαταστάτης σε α-θέση είναι πλέον ένα αλογόνο και συγκεκριμένα το φθόριο -F, δεν παρατηρείται κάποιο αισθητά διαφορετικό αποτέλεσμα εν συγκρίσει με την περίπτωση 2, όπου ο υποκαταστάτης είναι μία μέθυλο ομάδα, καθώς σε ίδιο χρόνο αντίδρασης το ποσοστό μετατροπής διαφέρει μόνο 5%. Να σημειωθεί ότι σε περισσότερες ώρες αντίδρασης και με περισσότερα ισοδύναμα δεν σημειώθηκε κάποια αύξηση του ποσοστού μετατροπής. Στην περίπτωση **5**, παρατηρείται εξαιρετική μετατροπή σε μόλις 2 ώρες αντίδρασης με μικρή μόνο αύξηση των ισοδυνάμων. Παρακάτω παρατίθενται το χρωματογράφημα και το φάσμα μαζών της ένωσης **5a** (MB = 204.65) στις 2 ώρες (Σχήμα 13). Η βασική κορυφή εμφανίζεται σε m/z = 204.2. Παρατηρείται επίσης ότι κοντά στη βασική κορυφή εμφανίζονται δύο μικρότερες κορυφές, μία η οποία οφείλεται στο ισότοπο του χλωρίου ^{37}Cl και η αντίστοιχη $[M+1]^+$.

α)

β)



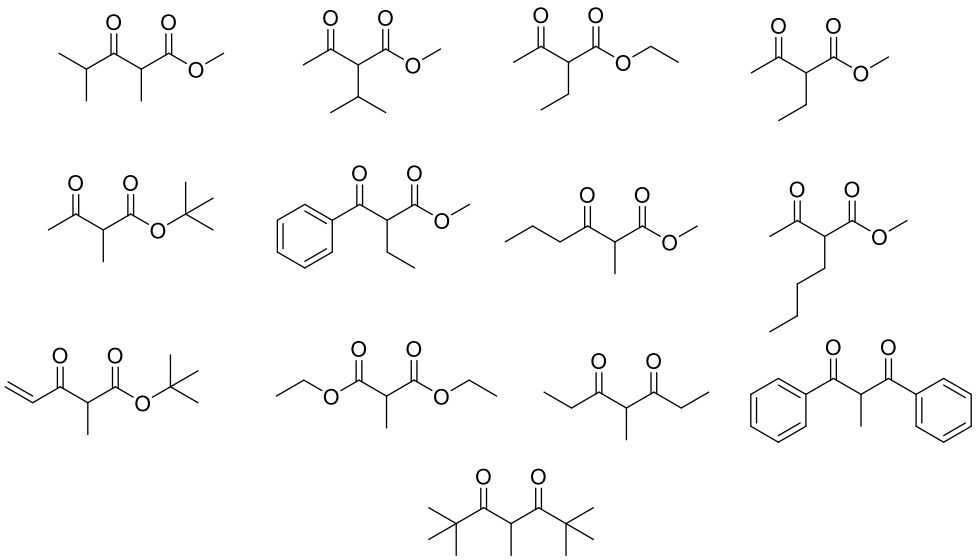
Σχήμα 13. (α) Αεριοχρωματογραφική ανάλυση της ένωσης **5a** στις δύο ώρες της αντίδρασης χλωρίωσης με Oxone/$AlCl_3$. (β) Φάσμα μάζας της ένωσης **5a**.

Στον κετο εστέρα **6** απαιτήθηκαν τόσο αυξημένα ισοδύναμα του συστήματος Oxone/$AlCl_3$ όσο και χρόνος αντίδρασης για την ολοκλήρωση της χλωρίωσης. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην ύπαρξη στην α-θέση του αρκετά ογκώδους υποκαταστάτη της προπιονιτριλο ομάδας. Κάτι διαφορετικό που παρατηρείται στη συγκεκριμένη αντίδραση είναι ότι πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας δεν παρατηρήθηκε κάποια ουσιώδης αύξηση της μετατροπής. Στον κετο εστέρα **7** ο οποίος στο κέτο τμήμα του φέρει ένα επιπλέον άτομο άνθρακα σε σχέση με τον εστέρα **1** απαιτήθηκε ελάχιστη αύξηση των ισοδύναμων του συστήματος Oxone/$AlCl_3$ ενώ η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε 24 ώρες. Αξίζει λοιπόν να σημειωθεί ότι το ποσοστό μετατροπής της συγκεκριμένης αντίδρασης χλωρίωσης δεν εξαρτάται μόνο από τον υποκαταστάτη στην α θέση χλωρίωσης, όπως πιθανότατα αναμενόταν, αλλά και αλλά και από τους υποκαταστάτες τόσο στο εστερικό όσο και στο κέτο τμήμα του κετο-εστέρα, με αποτέλεσμα το κάθε υπόστρωμα να είναι ξεχωριστό.

Με βάση τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα χλωρίωσης για τους α-υποκατεστημένους β-κετο εστέρες **1-7**, μελετήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο σε μία σειρά α-υποκατεστημένων 1,3-δικετονών, **8-11**. Προς ευχαρίστηση μας, οι α-αλκυλο δικετόνες με το νέο αυτό σύστημα Oxone/$AlCl_3$, μετατράπηκαν αποκλειστικά και με πολύ καλές έως εξαιρετικές μετατροπές στις αντίστοιχες 2-χλώρο-2-αλκυλο 1,3-δικετόνες **8a-11a**. Στην περίπτωση **8** όπου σημειώθηκαν ίσως τα καλύτερα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, παρατηρήθηκε πλήρης μετατροπή σε 5 ώρες με απόδοση 100% με τη χρήση των αρχικών ισοδυνάμων. Στην περίπτωση της δικετόνης **9** απαιτήθηκαν αυξημένα ισοδύναμα Oxone και $AlCl_3$, λόγω της αρκετά ογκώδους αίθυλο ομάδας σε α-θέση, με την αντίδραση να φτάνει στο μέγιστο ποσοστό μετατροπής 95% σε 24 ώρες. Στην περίπτωση **10** σημειώθηκε πολύ καλή μετατροπή στις 2.5 ώρες με ποσοστό μετατροπής 95%, ενώ σε περισσότερο χρόνο αντίδρασης είτε με αύξηση των ισοδυνάμων είτε με την μεταβολή της θερμοκρασίας στους 40 ^{o}C-50 ^{o}C, παρατηρούνταν η εμφάνιση νέων απροσδιόριστων κορυφών μέσω του GC-MS πιθανότατα λόγω αλλοίωσης του υποστρώματος. Στην δικετόνη **11** παρατηρείται μείωση των απαιτούμενων ισοδυνάμων κάτι που δεν συναντάται σε καμία από τις προηγούμενες περιπτώσεις. Αξίζει να σημειωθεί όμως, ότι παρά την ελάττωση των ισοδυνάμων η αντίδραση ολοκληρώνεται σε μόλις 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Παρατηρώντας τον Πίνακα 1, στις περισσότερες περιπτώσεις φαίνεται ότι οι αποδόσεις κυμαίνονται από καλές έως εξαιρετικές με καλύτερη την περίπτωση **8** όπου το προϊόν απομονώθηκε με απλή εκχύλιση και χωρίς χρωματογραφικό καθαρισμό, ενώ υπάρχουν και δύο εξαιρέσεις στις περιπτώσεις **10** και **11,** όπου οι αποδόσεις είναι αρκετά χαμηλές λόγω της αστάθειας των υποστρωμάτων και της δυσκολίας απομόνωσης των προϊόντων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, δοκιμάστηκαν αρκετά ακόμα υποστρώματα με το νέο σύστημα αντιδραστηρίων Oxone/$AlCl_3$ τα οποία όμως δεν παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Οι λόγοι είναι τα πολύ χαμηλά ποσοστά μετατροπής και απόδοσης τα οποία οφείλονται στην όχι τόσο καλή διαλυτότητα των υποστρωμάτων σε υδατικό περιβάλλον. Τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 14.



Σχήμα 14. α-Υποκατεστημένες δικαρβόνυλο ενώσεις που δοκιμάστηκαν με το σύστημα χλωρίωσης Oxone / $AlCl_3$.

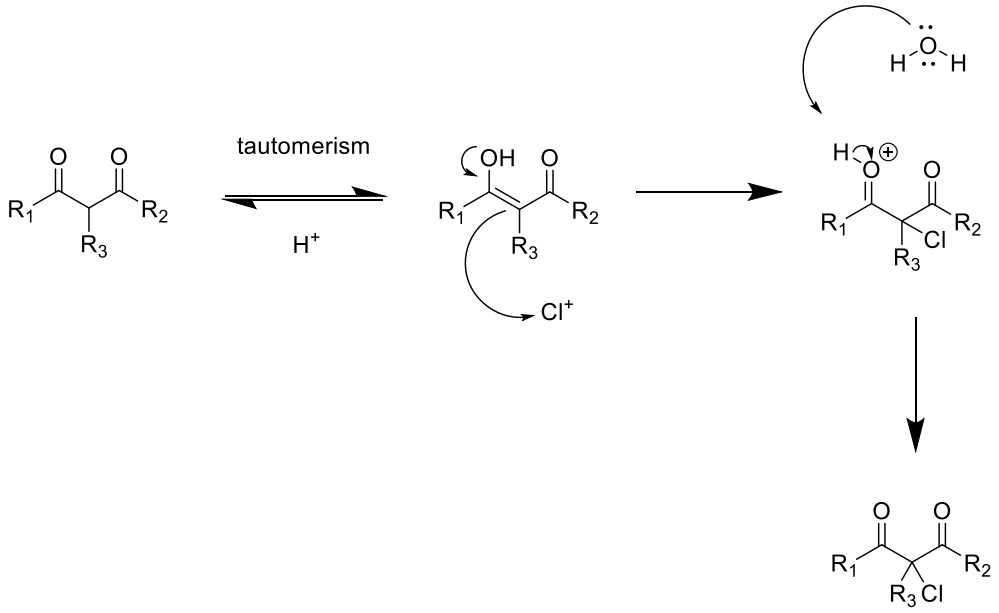
Μηχανιστική προσέγγιση της αντίδρασης.

Μία πιθανή μηχανιστική προσέγγιση της χλωρίωσης σε α-θέση, α-υποκατεστημένων 1,3 δικαρβόνυλο ενώσεων παρουσιάζεται στο Σχήμα 15.

$$AlCl_{3(s)} + 6H_2O_{(l)} \longrightarrow [Al(H_2O)_6]^{3+}{}_{(aq)} + 3Cl^-{}_{(aq)}$$

$$[Al(H_2O)_6]^{3+} \rightleftharpoons [Al(H_2O)_5(OH)]^{+2} + H^+$$

$$\mathbf{HSO_4^- + HSO_5^- + Cl^- \longrightarrow 2SO_4^{-2} + Cl^+ + H_2O}$$



Σχήμα 15. Προτεινόμενος μηχανισμός αντίδρασης χλωρίωσης.

Το αρχικό βήμα της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός των ανιόντων χλωρίου Cl^- και συμπλόκων του Al με έξι H_2O, τα οποία προκύπτουν από την αντίδραση του $AlCl_3$ με το H_2O. Η καθοριστική αντίδραση για τον μηχανισμό είναι μία οξειδοαναγωγική αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα παρουσία του άλατος Oxone και των ανιόντων χλωρίου Cl^-. Στη συγκεκριμένη αντίδραση προκαλείται οξείδωση του Cl^- σε Cl^+ ενώ το άλας Oxone ανάγεται προς SO_4^{-2}.[21] Ακολούθως όπως φαίνεται στο Σχήμα 15, το ταυτομερές της ένωσης πραγματοποιεί μία πυρηνόφιλη προσβολή από τον α-άνθρακα στο κατιόν χλωρίου Cl^+. Τέλος, πραγματοποιείται μία αυθόρμητη απόσπαση υδρογόνου H^+ από τα μόρια νερού του διαλύματος σχηματίζοντας έτσι την επιθυμητή ένωση.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε μία εξαιρετικά αποτελεσματική, ήπια και εύκολη μέθοδος για τη σύνθεση απλών α-υποκατεστημένων α-χλώρο β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών, χρησιμοποιώντας φθηνά, μη τοξικά αντιδραστήρια, σε υδατικό μέσο. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο χρόνος αντίδρασης κυμαινόταν στις 4-5 ώρες, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι στις περισσότερες αντιδράσεις δεν υπήρχαν παραπροϊόντα. Η αντίδραση που περιγράφηκε, μπορεί να αποτελέσει μία αρκετά φιλική προς το περιβάλλον πολύτιμη εναλλακτική μέθοδο για την σύνθεση τέτοιου είδους ενώσεων.

1.6 Πειραματικό μέρος

Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αγοράστηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka. Στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης ξηρό τετραϋδοφουράνιο (THF), η ξήρανση έγινε με απόσταξη παρουσία μεταλλικού Na ως ξηραντικού και βενζοφαινόνης ως δείκτη, σε συσκευή Soxhlet. Επίσης στις αντιδράσεις που χρησιμοποιήθηκε ξηρή διϊσοπροπυλαμίνη, παρασκευάστηκε με απόσταξη παρουσία NaOH και μοριακών κοσκίνων. Επίσης η ξηρή βενζαλδεύδη και ισοβουτυραλδεύδη που χρησιμοποιήθηκαν, παρασκευάστηκαν με απόσταξη παρουσία μοριακών κοσκίνων και στη συνέχεια διατήρηση αυτών σε θερμοκρασία από 0 ^{o}C ως -8 ^{o}C.

Όργανα και αντιδραστήρια

Ο προσδιορισμός της δομής των μορίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων ^{1}H NMR, ^{19}F NMR και ^{13}C NMR που ελήφθησαν σε φασματόμετρα 300MHz και 500MHz της εταιρίας Bruker, χρησιμοποιώντας τετραμέθυλο σιλάνιο (TMS) σαν σήμα αναφοράς και $CDCl_3$ ως διαλύτη (7.26 ppm για ^{1}H και 77.16 ppm για ^{13}C).

Η πορεία των αντιδράσεων χλωρίωσης σε α-θέση των α-υποκατεστημένων 1,3 δικαρβόνυλο ενώσεων μελετήθηκε με συσκευή αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματογράφο μάζας (GC-MS) μοντέλου Shimadzu GC-MS QP5050 εφοδιασμένο με τριχοειδή στήλη Supelco (MDN-5, 30nm x 0.25mm, 0.25μm film thickness) και ανιχνευτή μάζας χημικού ιοντισμού (5971A MS).

Για τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 F_{254} της εταιρίας EMD Millipore. Ο καθαρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Flash column chromatograph) χρησιμοποιώντας silica gel 60, particle size 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM) ως υλικό πλήρωσης.

Γενικές συνθετικές μέθοδοι

I. Αντίδραση χλωρίωσης σε α-θέση, β-κετο εστέρων και 1,3 δικετονών με χρήση του συστήματος Oxone/$AlCl_3$.

Σε σφαιρική φιάλη στην οποία έχουν προστεθεί 10 ml απιονισμένου νερού προστίθενται 0.18 mmol (20 mM) του β-κετο εστέρα ή της 1,3 δικετόνης και το διάλυμα αναδεύεται είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 50 ^{o}C, για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται προσεκτικά 0.40 mmol άλατος Oxone και τέλος προστίθενται 0.84 mmol τριχλωριούχου αργυλίου $AlCl_3$ με το μείγμα να αναδεύεται μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρακολουθείται είτε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είτε μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματογράφο μάζας. Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από προσθήκη υδατικού διαλύματος άλατος Rochelle (τρυγικό καλιονάτριο) για την πλήρη διάλυση αλάτων του $AlCl_3$, ενώ ακολουθεί εκχύλιση του διαλύματος με 40 ml μείγματος διαιθυλαιθέρα/οξικού αιθυλεστέρα (1/1). Ακολουθεί ξήρανση με $MgSO_4$ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό κενό. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος επιτυγχάνεται με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 30%-100%.

II. Αντίδραση αλκυλίωσης σε α-θέση, β-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε 10 ml άνυδρης ακετόνης προστίθενται 7.5 mmol της 1,3 δικετόνης ή του β-κετο εστέρα και 7 mmol, προξηραμένου σε αντλία ελαττωμένης πίεσης, ανθρακικού καλίου (K_2CO_3). Το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εν συνεχεία προστίθενται, σε διάρκεια 2 λεπτών, 9.2 mmol του κατάλληλου αλκυλοϊωδιδίου. Το μείγμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού και αφήνεται υπό ανάδευση για 20 ώρες μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία παρατηρείται είτε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είτε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας. Μετά τη συμπύκνωση του μείγματος, προστίθενται 15 ml διαίθυλαιθέρα. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό, για την απομάκρυνση των αλάτων και ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Τα προϊόντα που προκύπτουν μπορεί να χρειάζονται καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 70%-90%.

III. Αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης με LDA

Κάτω από ατμόσφαιρα αζώτου και σε ξηρό THF (10 ml) διαλύεται διϊσοπροπυλαμίνη (4.13 mmol). Έπειτα στους 0 ºC, προστίθεται στάγδην BuLi (1.6 M σε εξάνιο, 4.13 mmol). Το μείγμα αναδεύεται στους 0 ºC για περίπου 15 λεπτά και στη συνέχεια ψύχεται στους -78 ºC. Ακολουθεί η προσθήκη του κατάλληλου εστέρα (2.6 mmol) σε ξηρό THF (3-4ml) στάγδην και ανάδευση για άλλα 20 λεπτά, ενώ στη συνέχεια προστίθεται στάγδην η κατάλληλη αλδεΰδη (3.87 mmol) και το μείγμα αναδεύεται για ακόμη 20 λεπτά στους -78 ºC. Ακολούθως η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά και φτάνει στους 0 ºC μέχρι την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η οποία ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από προσθήκη αιθέρα (60 ml) και πραγματοποιείται εκχύλιση του διαλύματος με κορεσμένο διάλυμα NH_4Cl (20 ml), κορεσμένο διάλυμα NaCl (20 ml) και νερό (20 ml). Ακολουθεί ξήρανση με $MgSO_4$ και απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη υπό κενό. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος επιτυγχάνεται με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 65%-90%.

IV. Αντίδραση οξείδωσης Jones για τη σύνθεση β-κετο εστέρων

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται ο β-υδρόξυ εστέρας (2.0 mmol) σε 2-3 ml ακετόνης και το διάλυμα ψύχεται στους 0 ºC με ανάδευση. Έπειτα προστίθεται στάγδην διάλυμα αντιδραστηρίου Jones (730 μl) σε 1 ml ακετόνης και το μείγμα αναδεύεται μέχρι το τέλος της αντίδρασης (έλεγχος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας). Για την απομόνωση του προϊόντος προστίθεται 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=8 και το μείγμα αναδεύεται μέχρι την πλήρη διάλυση των χρωμικών αλάτων. Το προϊόν απομονώνεται έπειτα από τρεις εκχυλίσεις με διαιθυλαιθέρα (50 ml), η οργανική φάση ξηραίνεται σε $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό. Περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος επιτυγχάνεται με χρωματογραφία στήλης. Απόδοση 80%-98%.

Σύνθεση υποστρωμάτων

Σύνθεση α-αλκυλο-β-κετο εστέρων και 1,3 δικετονών

Σύνθεση του **2-μεθυλο-3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (1)**

Η σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (**1**) επιτεύχθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 800 μl (7.5 mmol) 3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα, 570 μl (9.225 mmol) ιωδομεθανίου και 970 mg (7 mmol) ανθρακικού καλίου. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petr. Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 70%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.73 (s, 3H), 3.51 (q, 7.2Hz 1H), 2.23 (s, 3H), 1.34 (d, 7.2Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 203.7, 171.1, 53.6, 52.6, 28.6, 12.9

Σύνθεση του **2-μεθυλο-3-οξο φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα (3)**

Η σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα (**3**) επιτεύχθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 400 mg (2.24 mmol) 3-οξο φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα, 170 μl (2.76 mmol) ιωδομεθανίου και 288 mg (2.09 mmol) ανθρακικού καλίου. Το προϊόν απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 100%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.96-7.99 (m, 2H), 7.56-7.62 (m, 1H), 7.46-7.51 (m, 2H), 4.41 (q, 7.08Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 1.50 (d, 7.08Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 195.9, 171.4, 135.9, 133.7, 128.9, 128.7, 52.6, 48.2, 14.0

Σύνθεση του **2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (7)**

Η σύνθεση του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**7**) επιτεύχθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 300 mg (2.31 mmol) 3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα, 175 μl (2.84 mmol) ιωδομεθανίου και 306 mg (2.21 mmol) ανθρακικού

καλίου. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petr. Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 88%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.72 (s, 3H), 3.54 (q, 7.14Hz, 1H), 2.44-2.68 (m, 2H), 1.34 (d, 7.17, 3H), 1.06 (t, 7.23Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 206.5, 171.3, 52.6, 52.5, 34.8, 13.1, 7.8

Σύνθεση της **2-μεθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (8)**

Η σύνθεση της 2-μεθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (**8**) επιτεύχθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 300 mg (1.84 mmol) 1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης, 142 μl (2.31mmol) ιωδομεθανίου και 243 mg (1.77 mmol) ανθρακικού καλίου. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petr. Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 70%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.96-7.99 (m, 2H), 7.57-7.63 (m, 1H), 7.46-7.52 (m, 2H), 4.49 (q, 6.99Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 1.46 (d, 6.99Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 205.2, 197.5, 136.1, 133.83, 130.3, 129.9, 129.0, 128.8, 128.6, 128.4, 57.0, 28.0, 13.7.

Σύνθεση της **2-αιθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (9)**

Η σύνθεση της 2-αιθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (**9**) επιτεύχθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 300 mg (1.84 mmol) 1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης, 186 μl (2.31 mmol) ιωδοαιθανίου και 243 mg (1.77 mmol) ανθρακικού καλίου. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petr. Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 70%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.97-8.0 (m, 2H), 7.57-7.62 (m, 1H), 7.46-7.51 (m, 2H), 4.35 (t, 7.08Hz, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.92-2.10 (m, 2H), 0.94 (t, 7.44Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 204.7, 196.7, 136.7, 133.8, 129.0, 128.8, 65.3, 27.9, 22.6, 12.3

Σύνθεση της **3-μεθυλο-πενταν-2,4-διόνης (10)**

Η σύνθεση της 3-μεθυλο-πενταν-2,4-διόνης (**10**) επιτεύχθηκε σύμφωνα με τη γενική μέθοδο ΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 300 mg (3 mmol) πενταν-2,4-διόνης, 228 μl (3,69 mmol) ιωδομεθανίου και 397 mg (2.88 mmol) ανθρακικού καλίου. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petr. Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 70%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.66 (q, 7.08Hz, 1H keto), 2.18 (s, 6H keto), 2.11 (s, 6H enol), 1.83 (s, 3H enol), 1.33 (d, 7.08Hz, 3H keto)

^{13}C NMR (500MHz; $CDCl_3$; Me4Si): δ 205.2, 190.6, 105.0, 62.2, 28.8, 26.2, 23.5, 21.3, 13.1, 12.7

Σύνθεση β-υδροξυ εστέρων και α-υποκατεστημένων-β-υδροξυ εστέρων

Σύνθεση του **3-υδρόξυ-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (12)**

Η σύνθεση του 3-υδρόξυ-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (**12**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο ΙΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 1.07 ml (13.5 mmol) οξικού μεθυλεστέρα, 1.38 ml (13.5 mmol) βενζαλδεϋδης, 3.0 ml (21.6 mmol) ξηρής διισοπροπυλαμίνης και 13.5 ml (21.6 mmol) BuLi. Το προϊόν αυτό απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 95%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.28-7.38 (m, 5H), 5.11-517 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.23 (d.br, J = 3.4 Hz, 1H), 2.67-2.82 (m, 2H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 172.9, 142.6, 128.7, 128.0, 125.8, 70.4, 52.0, 43.3

Σύνθεση του **3-υδροξυ-2,4-μεθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (14)**

Η σύνθεση του 3-υδρόξυ-2,4-μεθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**14**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο ΙΙΙ. Χρησιμοποιήθηκαν 529 μl (5.5 mmol) προπιονικού μεθυλεστέρα, 500 μl (5.5 mmol) ισοβουτυραλδεϋδης, 1.38 ml (9.9 mmol) ξηρής διισοπροπυλαμίνης

και 6.2 ml (9.9 mmol) BuLi. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 65%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.71 (s, 3H), 3.38-3.56 (dd, J_1= 8.1 Hz, J_2= 3.5 Hz, 1H=.38, 2.62-2.72 (m, 1H), 2.24 (d.br, 1H), 1.62-1.77 (m, 1H), 1.17-1.22 (m, 3H), 0.9-1.02 (qd, J_1= 14.0 Hz, J_2 = 6.6 Hz, 6H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 177.2, 177.0, 78.4, 52.0, 51.9, 42.7, 41.8, 31.1, 30.7, 19.9, 19.2, 18.8, 16.5, 14.9, 10.3

Σύνθεση β-κετο εστέρων

Σύνθεση του **3-οξο-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (13)**

Η σύνθεση του 3-οξο-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (**13**) έγινε με οξείδωση του 3-υδρόξυ-3-φαινυλο προπιονικού μεθυλεστέρα (**12**) σύμφωνα με τη γενική μέθοδο IV. Χρησιμοποιήθηκαν 300 mg (1.88 mmol) του β-υδροξυ εστέρα και 675 μl αντιδραστηρίου Jones. Το προϊόν αυτό απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 98%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.41-7.96 (m, $5H_{keto-enol}$), 5.68 (s, $1H_{enol}$), 4.01 (s, $2H_{keto}$), 3.80 (s, $3H_{enol}$), 3.75 (s, $3H_{keto}$)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 192.5 (keto), 171.6 (enol), 168.1 (keto), 136.0, 133.9, 133.5, 131.4, 128.9, 128.7,128.6, 126.2 (keto-enol), 87.2 (enol), 52.6 (keto), 51.5 (enol), 45.8 (keto)

Σύνθεση του **3-οξο-2,4-μεθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (15)**

Η σύνθεση του 3-οξο-2,4-μεθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**15**) έγινε με οξείδωση του 3-υδρόξυ-2,4-μεθυλο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**14**) σύμφωνα με τη γενική μέθοδο IV. Χρησιμοποιήθηκαν 1 g (5.55 mmol) του β-υδροξυ εστέρα και 2 ml αντιδραστηρίου Jones. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 35:1) Απόδοση 80%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.69-3.73 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.78-2.86 (m, 1H), 1.33 (d, 7.1Hz, 3H), 1.11-1.13 (m, 6H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 209.9, 171.2, 52.5, 50.7, 40.3, 18.6, 18.3, 13.3

Σύνθεση α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-κετο εστέρων και 1,3-δικετονών

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (1a)**

Η σύνθεση του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (**1a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 50 mg (0.38 mmol) του 2-μεθυλο-3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (**1**), 496 mg (0.81 mmol) άλατος Oxone και 118 mg (0.88 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 70%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.83 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 1.83 (s, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 199.0, 168.7, 70.7, 53.9, 25.4, 24.5

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (2a)**

Η σύνθεση του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (**2a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 70 mg (0.49 mmol) του 2-μεθυλο-3-οξο βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (**2**), 628 mg (1.02 mmol) άλατος Oxone και 149 mg (1.12 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 70%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.23-4.32 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 1.30 (t, 7.1Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 198.9, 168.2, 70.9, 63.2, 25.4, 24.4, 14.0

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα (3a)**

Η σύνθεση του του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα (**3a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 70 mg (0.36 mmol) του 2-μεθυλο-3-οξο φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα (**3**), 538 mg (0.87 mmol) άλατος Oxone και 129 mg (0.97 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 60%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.42-7.99 (m, 5H), 3.74 (s, 3H), 2.01 (s, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 189.3, 170.0, 133.7, 133.2, 129.6, 128.7, 68.6, 54.0, 26.3

Σύνθεση του **2-φθορο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (4a)**

Η σύνθεση του 2-φθορο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (**4a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 70 mg (0.47 mmol) του 2-φθορο-2-οξο βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (**4**), 611 mg (0.99 mmol) άλατος Oxone και 195 mg (1.08 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 60%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.38 (q, J=7.1Hz, 2H), 2.46 (d, J=2.6Hz, 3H), 1.36 (t, 7.1Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 193.8, 162.6, 162.4, 102.0, 99.9, 64.4, 24.0, 14.0

^{19}F NMR (500Hz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ -122.96

Σύνθεση του **1-χλωρο-2-οξο κυκλοέξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (5a)**

Η σύνθεση του 1-χλωρο-2-οξο κυκλοέξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**5a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 80 mg (0.47 mmol) του 2-οξο κυκλοέξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (**5**), 665 mg (1.08 mmol) άλατος Oxone και 156 mg (1.18 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν

της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 85%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.26-4.33 (m, 2H), 1.72-2.90 (m, 6H), 1.29-1.33 (m, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 199.8, 167.4, 73.6, 63.0, 39.8, 39.0, 26.9, 22.3, 14.0

Σύνθεση του **2-προπιονιτριλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (6a)**

Η σύνθεση του 2-προπιονιτριλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (**6a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 20 mg (0.12 mmol) του 2-προπιονιτριλο-2-οξο βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (**6**), 189 mg (0.31 mmol) άλατος Oxone και 46 mg (0.34 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 25:1) Απόδοση 45%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.88 (s, 3H), 2.48-2.63 (m, 4H), 2.38 (s, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 197.1, 166.9, 118.3, 73.1, 54.5, 32.3, 25.8, 13.0

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (7a)**

Η σύνθεση του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**7a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 60 mg (0.42 mmol) του 2-μεθυλο-3-οξο πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (**7**), 620 mg (1.01 mmol) άλατος Oxone και 150 mg (1.13 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 45:1) Απόδοση 45%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.82 (s, 3H), 2.62-2.89 (m, 2H), 1.84 (s, 3H), 1.12 (t, 7.2Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 202.4, 168.9, 70.7, 53.9, 31.1, 24.8, 8.4

Σύνθεση της **2-χλωρο-2-μεθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (8a)**

Η σύνθεση της 2-χλωρο-2-μεθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (**8a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 80 mg (0.45 mmol) της 2-μεθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (**8**), 587 mg (0.95 mmol) άλατος Oxone και 138 mg (1.04 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προϊόν αυτό απομονώθηκε χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 100%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.42-7.93 (m, 5H), 2.39 (s, 3H), 1.95 (s, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 201.6, 192.0, 133.8, 133.3, 130.0, 128.7, 75.2, 25.9, 25.4

Σύνθεση της **2-χλωρο-2-αιθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (9a)**

Η σύνθεση της 2-χλωρο-2-αιθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (**9a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 80 mg (0.42 mmol) της 2-αιθυλο-1-φαινυλοβουταν-1,3-διόνης (**9**), 672 mg (1.09 mmol) άλατος Oxone και 156 mg (1.18 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 60%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.41-7.92 (m, 5H), 2.35-2.43 (m, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.0 (t, 7.4Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 200.8, 191.8, 134.0, 133.7, 129.7, 128.7, 81.1, 30.7, 26.7, 8.6

Σύνθεση της **3-χλωρο-3-μεθυλο πενταν-2,4-διόνης (10a)**

Η σύνθεση της 3-χλωρο-3-μεθυλο πενταν-2,4-διόνης (**10a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 40 mg (0.35 mmol) της 3-μεθυλο πενταν-2,4-διόνης (**10**), 452 mg (0.74 mmol) άλατος Oxone και 107 mg (0.81 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 45:1) Απόδοση 30%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 2.36 (s, 6H), 1.75 (s, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 201.3, 75.8, 25.7, 23.6

Σύνθεση της **2-ακετυλο-2-χλωρο κυκλοπεντανόνης (11a)**

Η σύνθεση της 2-ακετυλο-2-χλωρο κυκλοπεντανόνης (**11a**) επιτεύχθηκε με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 80 mg (0.63 mmol) της 2-ακετυλο κυκλοπεντανόνης (**11**), 507 mg (0.82 mmol) άλατος Oxone και 127 mg (0.95 mmol) $AlCl_3$. Η συγκέντρωση του διαλύματος ήταν 20mM. Το προιόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης.(Petroleum Ether/ EtOAc, v/v 40:1) Απόδοση 30%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 2.76-2.86 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 1.96-2.58 (m, 5H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 207.9, 201.7, 74.0, 36.4, 36.1, 27.3, 18.7

Κεφάλαιο 2

2.1 Πράσινη χημεία και Βιοκατάλυση

Τις τελευταίες δεκαετίες και συγκεκριμένα από τα μέσα της δεκαετίας του 1980, υπήρχε μία αυξανόμενη ανησυχία σχετικά με τις άφθονες ποσότητες αποβλήτων που παράγονταν από τη χημική βιομηχανία. Έτσι, ήταν απαραίτητη μία μετάβαση από τις παραδοσιακές έννοιες της αποτελεσματικότητας και επιλεκτικότητας της αντίδρασης οι οποίες επικεντρώνονται σε μεγάλο βαθμός στη χημική απόδοση, σε νέες οι οποίες αξιοποιούν στο έπακρο τη χρήση πρώτων υλών, περιορίζουν την παραγωγή αποβλήτων και αποφεύγουν τη χρήση τοξικών και επιβλαβών αντιδραστηρίων.[22] Λόγω λοιπόν της ανάγκης για μια εναλλακτική και καθαρότερη χημεία προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η παραγωγή αποβλήτων, οδηγηθήκαμε στον όρο «πράσινη χημεία». Ο όρος αυτός μπορεί να οριστεί και συνοπτικά ως:

Η Πράσινη Χημεία κατά προτίμηση χρησιμοποιεί πρώτες ύλες, εξαλείφει, απορρίπτει και αποφεύγει τη χρήση τοξικών και/ή επικίνδυνων αντιδραστηρίων και διαλυτών κατά την παρασκευή χημικών προϊόντων.[23]

Ο όρος «πράσινη χημεία», ο οποίος αρχικά αναφερόταν ως «καθαρή χημεία», έγινε ευρέως αποδεκτός στα μέσα της δεκαετίας του 1990 από τον Anastas και τους συνεργάτες της Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA) και εμπεριέχει 12 αρχές όπως αυτές ορίστηκαν από τους Anastas και Warner.[24]

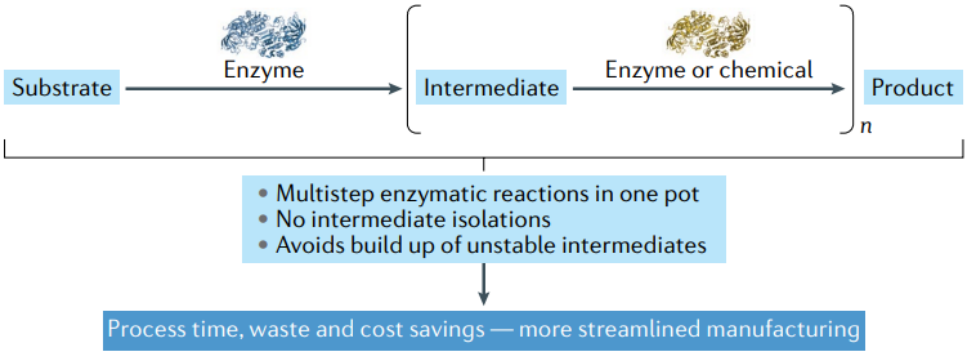
Με τον όρο ***βιοκατάλυση*** ορίζεται η χρήση ενζύμων και μικροοργανισμών ως καταλύτες με σκοπό χημικές μετατροπές. Ο όρος αυτός αποτελεί τη ραχοκοκαλιά της Βιοτεχνολογίας, η οποία ενώ έχει μία παλιά και ξεχωριστή ιστορία καθώς από αρχαιοτάτων χρόνων λαμβάνει χώρα στη ζυθοποιία και στη μαγειρική, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Τα τελευταία χρόνια η βιοκατάλυση, χρησιμοποιείται στη φαρμακοβιομηχανία για την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων ή των ενδιαμέσων τους (π.χ. αντιβιοτικά, στατίνες και οπτικώς καθαρά δομικά στοιχεία), ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας (π.χ. αμινοξέα και βιταμίνες), προσθέτων τροφίμων (π.χ. γλυκαντικά, λιπίδια κ.α.) ακόμη και πρόδρομων ενώσεων για τη σύνθεση πολυμερών. Το γεγονός αυτό καθιστά τη Βιοτεχνολογία και τη Βιοκατάλυση από τις πιο ανεπτυγμένες τεχνολογίες των τελευταίων ετών οι οποίες συμβάλουν σημαντικά σε τομείς όπως είναι η υγεία και το περιβάλλον.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία αρκετά μεγάλη αύξηση του ενδιαφέροντος γύρω από την συμβολή της βιοκατάλυσης στην μοντέρνα Οργανική Σύνθεση τόσο από την ακαδημαϊκή κοινότητα όσο και από τη βιομηχανία. Αυτό οφείλεται στην ανάγκη για τη σύνθεση πολύτιμων ενώσεων με υψηλή οπτική καθαρότητα [>99% διαστερεομερική (de) και εναντιομερική (ee) περίσσεια] και υψηλές χημικές αποδόσεις. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σύνθεση αυτών των ενώσεων είναι η χρήση οικονομικών και αποδοτικών μεθοδολογιών σύνθεσης οι οποίες πρέπει να είναι περιβαλλοντικά αποδεκτές. Στην πραγματοποίηση αυτών των στόχων ο τομέας της Βιοκατάλυσης φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο, καθώς φαίνεται να συμβάλει ουσιαστικά στη μεταβολή των παραγωγικών προτύπων και στην υιοθέτηση των αρχών της Πράσινης Χημείας.

Η κύρια ιδιότητα των οργανικών ενώσεων απο την οποία εξαρτάται η βιολογική τους δραστικότητα είναι η οπτική καθαρότητα. Λόγω την δυνατότητας μέσω της βιοκατάλυσης να συντίθενται οπτικώς ενεργά φαρμακευτικά ενδιάμεσα και άλλες πολύτιμες ενώσεις, η φαρμακευτική βιομηχανία έχει υιοθετήσει σε αρκετές περιπτώσεις κρίσιμα βιοκαταλυτικά στάδια στη σύνθεση τέτοιων ενώσεων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη πολιτική και κοινωνική απαίτηση για τη χρήση φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών, αλλά και τα αυστηρά μέτρα που υιοθετήθηκαν από την Διεύθυνση Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ, από την οποία εγκρίνονται μόνο φάρμακα που έχουν συντεθεί σε εναντιομερικώς καθαρή μορφή, έρχεται να επιβεβαιώσει τον αναγκαίο και σπουδαίο ρόλο της βιοκατάλυσης στη σύνθεση διαφόρων οργανικών ενώσεων.[25]

Μερικοί λόγοι ακόμα και ίσως οι βασικότεροι για την ραγδαία αύξηση του ενδιαφέροντος γύρο από τον τομέα της βιοκατάλυσης είναι η χρήση ανεπτυγμένων εργαλείων για την ανακάλυψη ενζύμων σε συνδυασμό με την εύρεση νέων τεχνικών υψηλής απόδοσης για την βελτιστοποίηση τους. Αναγκαίο είναι να σημειωθεί ότι η υιοθέτηση της βιοκατάλυσης από τη φαρμακευτική βιομηχανία πραγματοποιήθηκε λόγο των καινοτόμων εργαλείων στην πρωτεϊνική μηχανική, τα οποία επιτρέπουν τη βελτιστοποίηση του καταλύτη όπως είναι η de novo σύνθεση[26] και η κατευθυνόμενη εξέλιξη[27,28], συμπεριλαμβάνοντας βέβαια την εργαστηριακή ανάπτυξη αλλά και τον υπολογιστικό σχεδιασμό. Για τη σπουδαιότητα άλλωστε αυτών των ανακαλύψεων δόθηκε και το βραβείο Nobel Χημείας το 2018 στην Frances Arnold , καθηγήτρια στο California Institute of Technology.[29] Κατανοώντας τη βαρύτητα της ραγδαίας αυτής

εξέλιξης είναι λογικό να παρατηρείται μεγάλη ανάπτυξη και σε άλλους σημαντικούς τομείς της βιοκατάλυσης. Ένας από του σπουδαιότερους αποτελείται από τη διαδικασία με το όνομα ‘’Biocatalytic cascade’’ (βιοκαταλυτική αλληλουχία) η οποία τυπικά διαθέτει δύο ή περισσότερα βήματα με τουλάχιστον ένα ενζυμικό μετασχηματισμό, χωρίς ενδιάμεσες απομονώσεις (Σχήμα 16). Η βιοκατάλυση είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τις συγκεκριμένες διαδικασίες καθώς σχετικά με τα φυσικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, πλέον μπορούν να σχεδιαστούν μη φυσικές βιοκαταλυτικές αλληλουχίες που συμβάλλουν στη σύνθεση πολύπλοκών στόχων.[30]

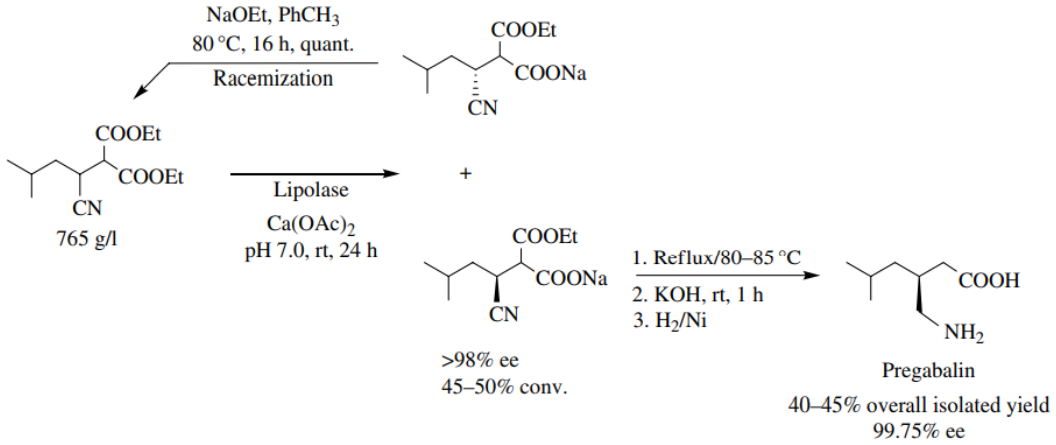


Σχήμα 16. Σχηματική απεικόνιση μιάς βιολογικής αλληλουχίας.[30]

2.2 Παραδείγματα βιοκαταλυτικών διεργασιών

2.2.1 Χημειοενζυματική διαδικασία για τη σύνθεση της Pregabalin

Η συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε από ομάδα επιστημόνων της εταιρίας Pfizer, οι οποίοι περιέγραψαν μία χημειοενζυμική διαδικασία δεύτερης γενιάς για την παρασκευή της Πρεγκαμπαλίνης (**20**) (Σχήμα 17), του δραστικού συστατικού του φαρμάκου με την εμπορική ονομασία Lyrica, όπου χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της επιληψίας, του νευροπαθητικού πόνου, της ινομυαλγίας, του συνδρόμου ανήσυχων ποδιών και της γενικευμένης διαταραχής άγχους. Η συγκεκριμένη διαδικασία παρουσιάζει τεράστια βελτίωση σε σύγκριση με τις προ υπάρχουσες, καθώς το ανεπιθύμητο εναντιομερές θα μπορούσε εύκολα να ρακεμοποιηθεί και να ξαναχρησιμοποιηθεί. Το βασικό ενζυμικό βήμα πραγματοποιήθηκε με μία φτηνή και άμεσα διαθέσιμη λιπάση. Με την παρούσα διαδικασία παρατηρήθηκε μία δραματική μείωση των οργανικών διαλυτών, αύξηση της απόδοσης και υποπενταπλασιασμό του συντελεστή Ε από 86 σε 17 σε σχέση με τη διαδικασία παραγωγής της πρώτης γενιάς.[31]



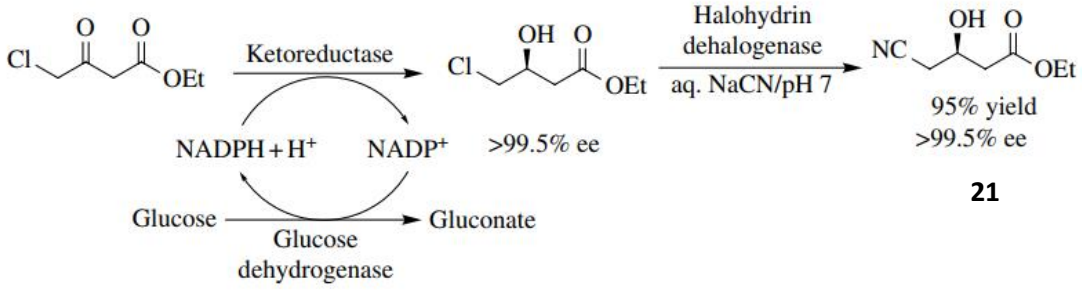
20

Σχήμα 17. Χημειοενζυμική διαδικασία της Πρεγκαμπαλίνης.[32]

2.2.2 Μία διαδικασία τριών ενζύμων για ένα ενδιάμεσο της Ατορβαστατίνης

Οι επιστήμονες της εταιρίας Codexis ανέπτυξαν και παρουσίασαν μία νέα πράσινη διαδικασία τριών ενζύμων για τη σύνθεση μιας ενδιάμεσης ένωσης κλειδί (**21**) για την παρασκευή της ατορβαστατίνης, ενός δραστικού συστατικού του φαρμάκου Lipitor, το οποίο συμβάλει στη μείωση της χοληστερίνης (Σχήμα 18). Σε πρώτο στάδιο ο χλωρο-υποκατεστημένος κετο-εστέρας υφίσταται μία εκλεκτική αναγωγή η οποία πραγματοποιείται από μία κετορεδουκτάση (KRED). Η συγκεκριμένη κατηγορία ενζύμων απαιτεί την παρουσία συμπαράγοντα όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι το $NADP^+$, ο οποίος λόγω του αυξημένου κόστους του ανακυκλώνεται και χρησιμοποιείται εκ νέου από το σύστημα της αντίδρασης. Η αναγέννηση του συμπαράγοντα πραγματοποιείται μέσω ενός συστήματος όπου η γλυκόζη δρα ως δότης υδρογόνου με τη βοήθεια του ενζύμου αφυδρογονάση της γλυκόζης (GDH) προς σχηματισμό του NADPH. Στο δεύτερο στάδιο χρησιμοποιείται το τρίτο ένζυμο για το συγκεκριμένο ενζυμικό μονοπάτι μια halohydrin dehalogenase (HHDH). Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει μία πυρηνόφιλη υποκατάσταση χλωριδίου με μία κυανο ομάδα σε ουδέτερο pH και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όλες οι προηγούμενες διαδικασίες οι οποίες λάμβαναν χώρα χρησιμοποιούσαν μία απλή αντίδραση υποκατάστασης S_N2 προς το σχηματισμό του κυανο-υποκατεστημένου ενδιαμέσου σε αλκαλικό διάλυμα και σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες, ένα στάδιο το οποίο οδηγούσε στο σχηματικό αρκετών παραπροϊόντων λόγω της ευαισθησίας τόσο του υποστρώματος όσο και του προϊόντος στις συνθήκες αυτές. Δεδομένων λοιπόν των

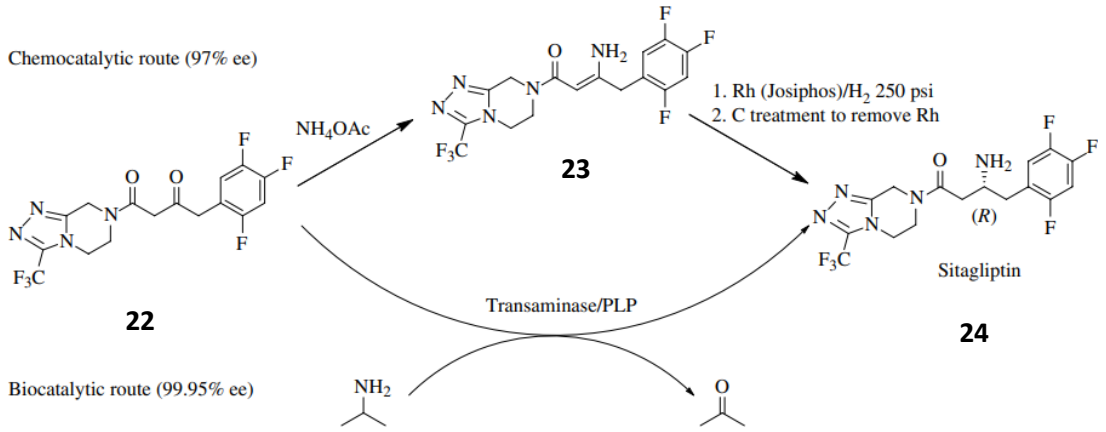
παραπροϊόντων που δημιουργούνται δια μέσου της χημικής διαδικασίας, είναι λογικό ότι απαιτείται μία περισσότερο χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία για την απομόνωση και ανάκτηση του προϊόντος το οποίο θα είναι ποιοτικά αποδεκτό. Συνοψίζοντας η διαδικασία της Codexis είναι ένα εξαιρετικό παράδειγμα σχεδίασης μιας βιοκαταλυτικής διαδικασίας για τη σύνθεση ενός σημαντικού φαρμακευτικού ενδιαμέσου.[33,34]



Σχήμα 18. Μία ενζυμική διαδικασία δύο σταδίων για το σχηματισμό ενδιαμέσου της Ατορβαστατίνης.[32]

2.2.3 Ενζυμική σύνθεση της Σιταγλιπτίνης

Ένα άλλο παράδειγμα είναι η ενζυμική σύνθεση της Σιταγλιπτίνης (**24**) (Σχήμα 19), ενός φαρμάκου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Η σύνθεση του αναπτύχθηκε από τις ερευνητικές ομάδες των εταιριών Merck και Codexis με σκοπό τη αντικατάσταση της καταλυόμενης από καταλύτη Rh και υψηλής πίεσης αντίδρασης ασύμμετρης υδρογόνωσης μιας εναμίνης (**23**). Στη συγκεκριμένη σύνθεση πραγματοποιείται μία αναγωγική αμίνωση μίας κετόνης (**22**) με τη χρήση μίας (*R*)-εκλεκτικής τρανσαμινάσης παρουσία ισοπροπυλαμίνης. Σε σύγκριση με τη διαδικασία ασύμμετρης υδρογόνωσης καταλυόμενης με ρόδιο, η βιοκαταλυτική διαδικασία παρουσίασε καλύτερο ποσοστό εναντιοεκλεκτικότητας (>99.95% *ee*), 10-13% αύξηση στο ποσοστό της απόδοσης και 53% αύξηση στην παραγωγικότητα (kg/l/day). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των συνολικών αποβλήτων κατά 19%, την εξάλειψη των βαρέων μετάλλων αλλά και την απαλλαγή από την ανάγκη για εξειδικευμένο εξοπλισμό υδρογόνωσης υψηλής πίεσης.[35]



Σχήμα 19. Χημειοκαταλυτική και βιοκαταλυτική διαδικασία για τη σύνθεση της Σιταγλιπτίνης (24).[32]

2.3 Ένζυμα

2.3.1 Γενικές πληροφορίες

Τα ένζυμα είναι αποτελεσματικοί βιολογικοί καταλύτες οι οποίοι εμφανίζουν ορισμένα ιδιαίτερα θετικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα έναντι των συμβατικών χημικών καταλυτών. Συγκεκριμένα τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή δραστικότητα με ταχύτερο ρυθμό αντίδρασης της τάξης 10^{12} σε σχέση με τις χημικά καταλυόμενες αντιδράσεις, είναι περιβαλλοντικά αποδεκτά καθώς είναι απολύτως βιοδιασπώμενα, δρουν κάτω από ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH μειώνοντας έτσι τις ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις, είναι συμβατά μεταξύ τους, δρουν αποτελεσματικά σε οργανικούς διαλύτες και έχουν την ικανότητα να καταλύουν ένα μεγάλο εύρος τόσο αντιδράσεων όσο και υποστρωμάτων.[36,37] Τα παραπάνω λοιπόν είναι μερικά μόνο από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που καθιστούν τα ένζυμα τόσο ελκυστικά στον τομέα της Οργανικής σύνθεσης καθώς το σημαντικότερο πλεονέκτημα θεωρείται η ικανότητα τους να καταλύουν χημικές αντιδράσεις με υψηλή εκλεκτικότητα. Η εκλεκτικότητα αυτή μπορεί να μεταφραστεί σε ***χημειο-***, ***τοπο-***, ***διαστερεο-*** και ***εναντιο-εκλεκτικότητα*** και είναι μία ιδιότητα η οποία καθορίζεται τόσο από τη μοριακή δομή όσο και από τη βιολογική προέλευση των ενζύμων. Παρακάτω αναλύονται εκτενέστερα τα είδη αυτά.[38]

1. *Χημειοεκλεκτικότητα*

Η ικανότητα των ενζύμων να δρουν εκλεκτικά σε ένα μόνο τύπο λειτουργικής ομάδας, όπου άλλες ευαίσθητες λειτουργικές ομάδες υπό συνθήκες χημικής κατάλυσης θα αντιδρούσαν σε κάποιο βαθμό τα καθιστά σημαντικό κομμάτι της οργανικής σύνθεσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή απαλλαγμένων από παραπροϊόντα ενώσεων.

2. *Τοποεκλεκτικότητα*

Η περίπλοκη τρισδιάστατη δομή είναι αυτή που καθιστά τα ένζυμα ικανά να επιλέγουν μεταξύ όμοιων λειτουργικών ομάδων που βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις πάνω σε ένα υπόστρωμα.

3. *Διαστερεοεκλεκτικότητα*

Η ικανότητα των ενζύμων να διακρίνουν ένα από τα διαστερεομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.

4. *Εναντιοεκλεκτικότητα*

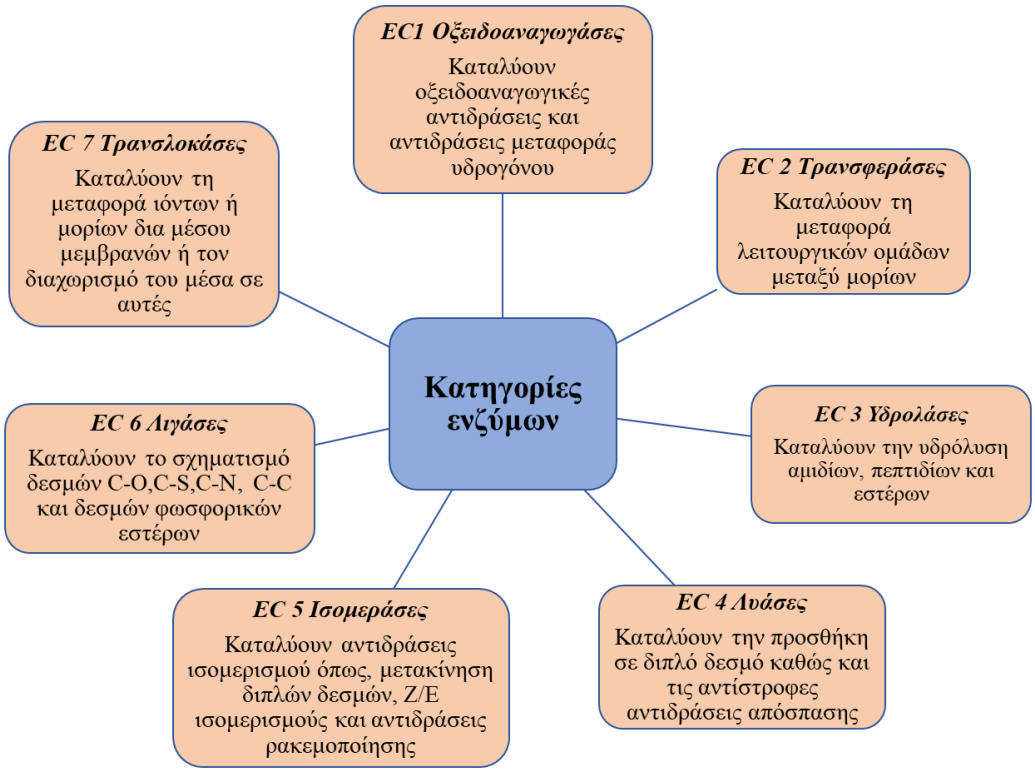
Η ικανότητα των ενζύμων να διακρίνουν ένα από τα εναντιομερή ενός ρακεμικού μίγματος ή μία από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του ίδιου μορίου.

2.3.2 Ταξινόμηση ενζύμων και ονοματολογία

Η πρώτη ιδέα για την ονοματολογία των ενζύμων παρουσιάστηκε στο Διεθνές Συνέδριο της Βιοχημείας στις Βρυξέλλες, ενώ το 1961 δημοσιεύτηκε η πρώτη έκδοση αυτών. Το 1992, στο Διεθνές Συνέδριο Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας δημοσιεύτηκε η έκτη έκδοση η οποία περιελάμβανε 3196 ένζυμα. Τα τελευταία χρόνια γίνεται κατανοητό ότι ο αριθμός αυτός έχει πολλαπλασιαστεί, καθώς με την εξέληξη της βιοτεχνολογίας, όπου δίνεται η δυνατότητα του πρωτεϊνικού σχεδιασμού και της κατευθυνόμενης εξέλιξης είναι εφικτή η τροποποίηση και η βελτιστοποίηση των ήδη υπαρχουσών ενζύμων αλλά και η ανακάλυψη νέων. Η ταξινόμηση των ενζύμων ακολουθεί τον αριθμό EC και πραγματοποιείται με βάση τις καταλυόμενες αντιδράσεις.[39,40] Αρχικά τα ένζυμα ήταν κατηγοριοποιημένα σε έξι κατηγορίες οι οποίες είναι οι οξειδορεδουκτάσες, οι τρανσφεράσες, οι υδρολάσες, οι λυάσες, οι ισομεράσες και οι λιγκάσες, όμως τον Αύγουστο του 2018 στην λίστα αυτή προστέθηκε μία ακόμα κατηγορία οι τρανσλοκάσες (EC 7).[41] Ο αριθμός EC A.B.C.D αποτελείται

από τέσσερα ψηφία τα οποία υποδηλώνουν τη φύση της αντίδρασης που καταλύεται, το είδος της αντίδρασης, τη φύση των υποστρωμάτων και την μοναδικότητα του κάθε ενζύμου.[42,38]

Στο Σχήμα 20 παρουσιάζονται οι κατηγορίες των ενζύμων αλλά και μερικές πληροφορίες για τις αντιδράσεις που καταλύουν.



Σχήμα 20. Ταξινόμηση ενζύμων

2.3.3 Αλκοολικές Αφυδρογονάσες- Κετορεδουκτάσες

Οι αλκοολικές αφυδρογονάσες (ADH) οι οποίες ονομάζονται επίσης καρβόνυλο αναγωγάσες ή κετορεδουκτάσες (KRED) είναι ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγωγή καρβονυλικών ομάδων (αλδεϋδών ή κετονών) προς τις αντίστοιχες αλκοόλες. Στην περίπτωση προχειρόμορφων καρβονυλικών υποστρωμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί μία στερεοεκλεκτική αναγωγή με βαθμό εναντιοκαθαρότητας της δευτεροταγούς αλκοόλης ανάλογο της στερεοεκλεκτικότητας του ενζύμου. [43]

Οι αλοολικές αφυδρογονάσες-κετορεδουκτάσες είναι ένζυμα εξαρτώμενα από συνένζυμα όπως τα NADH ή NADPH τα οποία δρουν ως αναγωγικό. Παρά το γεγονός ότι η χρήση τέτοιων συνενζύμων δεν είναι ιδιαίτερα ελκυστική λόγω κόστους, έχει

καθιερωθεί η χρήση τους ακόμα και σε μεγάλη κλίμακα λόγω της διαθεσιμότητας διαδικασιών ανακύκλωσης τους όπου βάση έχουν οικονομικά αντιδραστήρια.[38]

Τα συγκεκριμένα ένζυμα χωρίζονται κυρίως σε τέσσερις οικογένειες[44]:

i) Τις αφυδρογονάσες/αναγωγάσες βραχείας αλυσίδας (SDR), οι οποίες είναι ένζυμα τα οποία είναι αποτελεσματικά σε μία μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων και στην πλειοψηφία τους δεν εξαρτώνται από κάποιο μεταλλικό συμπαράγοντα.

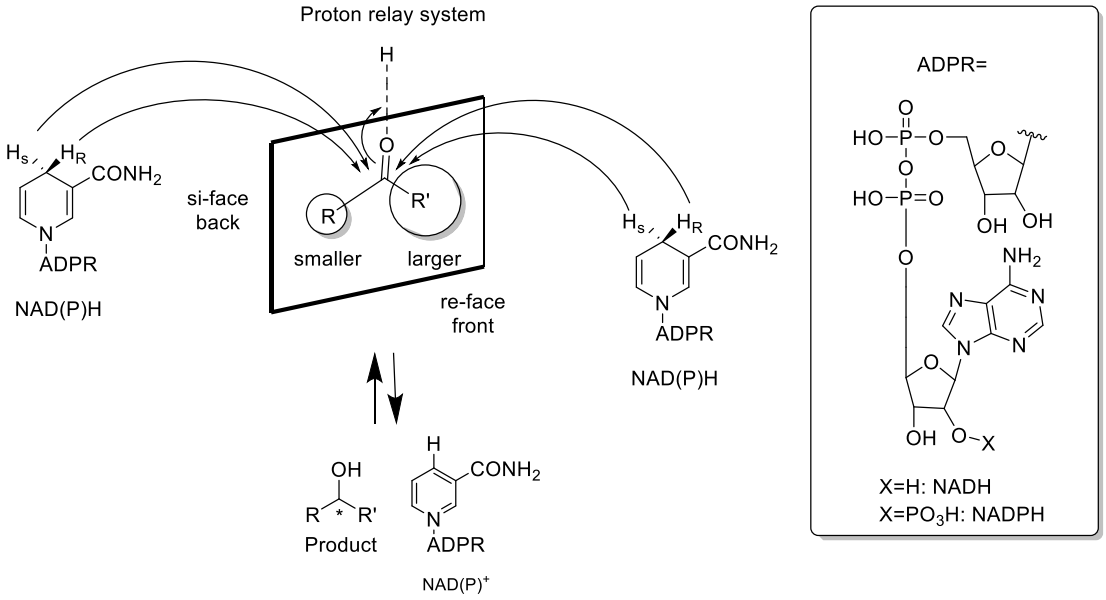
ii) Τις αφυδρογονάσες/αναγωγάσες μεσαίας αλυσίδας (MDR), οι οποίες είναι ένζυμα τα οποία απαιτούν την παρουσία του μετάλλου ψευδαργύρου το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της καρβόνυλο ομάδας του ενζύμου.

iii) Τις αφυδρογονάσες/αναγωγάσες μακράς αλυσίδας (LDR), οι οποίες είναι ένζυμα τα οποία αποτελούν ετερογενή οικογένεια πρωτεϊνών χωρίς την καθολική εξάρτηση μετάλλων και δέχονται υποστρώματα όπως πολυόλες, συμπεριλαμβανομένων πολλών ειδών σακχάρων.

iv) Τις αλδο-κετο αναγωγάσες (AKR) οι οποίες εμπλέκονται συχνά σε βιολογικές διεργασίες και είναι αποτελεσματικές σε ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων.

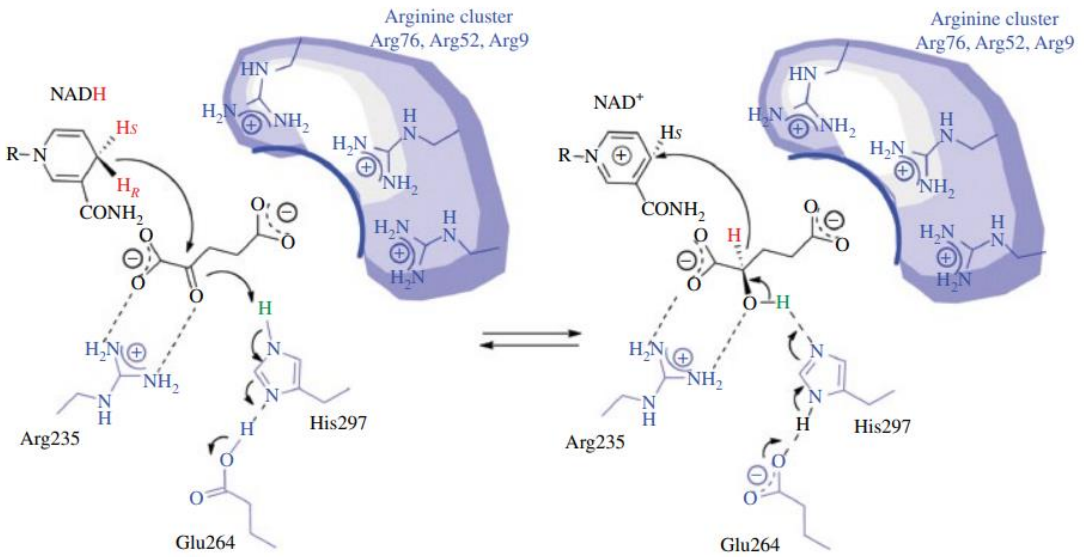
2.3.4 Καταλυτικός μηχανισμός - Στερεοχημεία

Όσον αφορά τη στερεοχημεία του μηχανισμού NAD(P)H- εξαρτώμενων αφυδρογονασών είναι γνωστή καθώς έχει μελετηθεί εκτενώς και αποτελείται από 4 διαφορετικές διεργασίες για τη μεταφορά ενός υδριδίου από το συνένζυμο στο υπόστρωμα (Σχήμα 21). Το υδρίδιο μπορεί να προσβάλει είτε την si- είτε την re-πλευρά της ομάδας του καρβονυλίου ανάλογα με τον προσανατολισμό της σύνδεσης του υποστρώματος με το ένζυμο, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των (*R*) και (*S*) αλκοολών, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, το ένζυμο μπορεί να μεταφέρει είτε το pro-(*R*) είτε το pro-(*S*) υδρίδιο του συνενζύμου NAD(P)H ανάλογα με το είδος του. Εν συνεχεία και για να ολοκληρωθεί η αναγωγή, ένα πρωτόνιο μεταφέρεται στο οξυγόνο του καρβονυλίου, από τα μόρια νερού του διαλύτη.[32,45]



Σχήμα 21. Μεταφορά υδριδίου από το συνένζυμο NAD(P)H στον καρβονυλικό άνθρακα του υποστρώματος μέσω του συστήματος μεταφοράς πρωτονίου.

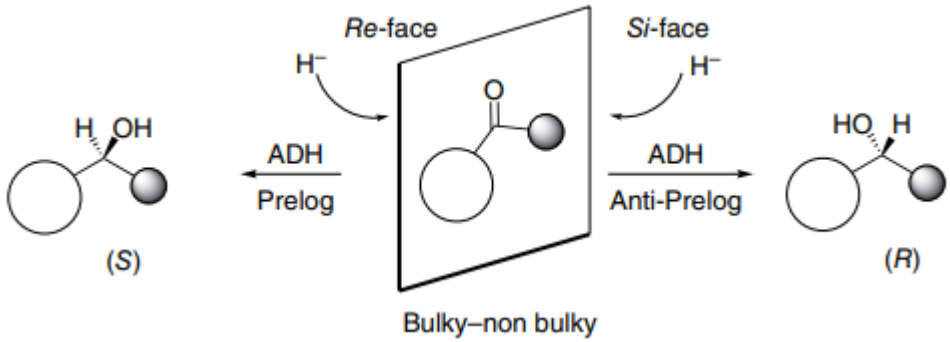
Παρακάτω παρουσιάζεται ένα παράδειγμα μεταφοράς του pro-(*R*) υδριδίου από το συνένζυμο NADH στη si-πλευρά του υποστρώματος στο οποίο χρησιμοποιείται το ένζυμο (*R*)-2-υδροξυγλουταρική αφυδρογονάση (HGDH). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 22 το ένζυμο HGDH καταλύει την αναγωγή του 2-οξογλουταρικού με το αμινοξύ Arg235 να αλληλεπιδρά με την μία από τις δύο καρβοξυλικές και την καρβονυλική ομάδα του υποστρώματος παίζοντας ρόλο τόσο στη σύνδεση όσο και στην ενεργοποίηση του υποστρώματος. Από την άλλη πλευρά η γ-καρβοξυλική ομάδα φαίνεται να είναι σταθεροποιημένη μέσω αλληλεπιδράσεων με μία ομάδα αργινίνης η οποία αποτελείται από τα αμινοξέα Arg9, Arg52 και Arg76. Το σύστημα μεταφοράς πρωτονίων όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο στην συγκεκριμένη περίπτωση αποτελείται από τα αμινοξέα Glu264 και His297 και επιτρέπει στο αμινοξύ His297 να δράσει σαν οξεοβασικός καταλύτης. Έτσι, το pro-(*R*) υδρίδιο του συνενζύμου μεταφέρεται στην καρβόνυλο ομάδα του υποστρώματος από την si-πλευρά οδηγώντας στη σύνθεση του (*R*)-2-υδρόξυγλουταρικού.[46]



Σχήμα 22. Σχηματική απεικόνιση μεταφοράς υδριδίου μεταξύ υποστρώματος- συνενζύμου και πρωτονίου από το ενεργό κέντρο της NADH-εξαρτώμενης (*R*)-2-υδροξυγλουταρικής αφυδρογονάσης.[32]

Κανόνας του Prelog

Όπως είναι γνωστό το στερεοχημικό αποτέλεσμα της αναγωγικής αντίδρασης για ένα μεγάλο αριθμό αλκοολικών αφυδρογονασών μπορεί να προβλεφθεί από έναν απλό κανόνα, τον λεγόμενο "*κανόνα του Prelog*". Σύμφωνα με τον κανόνα αυτόν μία αφυδρογονάση μεταφέρει το υδρίδιο από την re-πλευρά της προχειρόμορφης κετόνης που φέρει ένα μικρό (S) και ένα μεγάλο (L) υποκαταστάτη, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται εκλεκτικά η (*S*)-αλκοόλη (Σχήμα 23). Αν και οι περισσότερες αφυδρογονάσες υπακούουν στον κανόνα αυτόν, τα τελευταία χρόνια έχει προκύψει ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων με αντίθετη εκλεκτικότητα, κυρίως λόγω της δυνατότητας μεταλλάξεων και πρόσβασης σε νέες πηγές ενζύμων, διαδικασίες οι οποίες έχουν ανοίξει την πόρτα για την αξιοποίηση των αρκετά χρήσιμων συμπληρωματικών από πλευράς στερεοεκλεκτικότητας αναγωγών.[47,48]



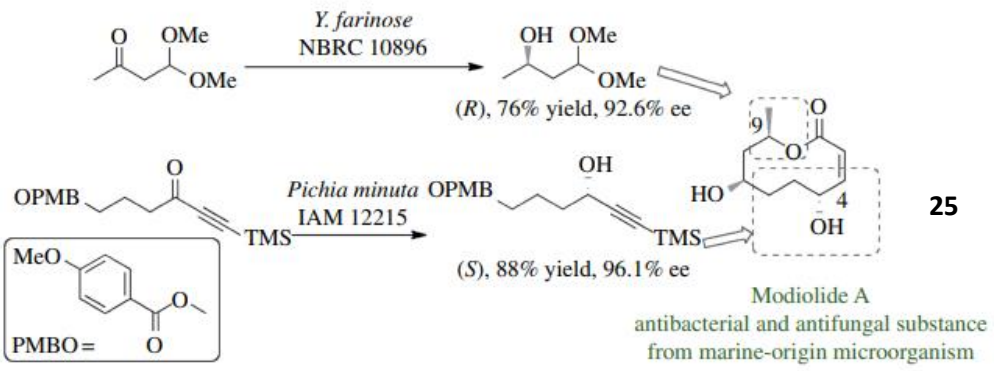
Σχήμα 23. Στερεοεκλεκτική αναγωγή, καρβόνυλο ένωσης με τη χρήση μίας αλκοολικής αφυδρογονάσης, ακολουθώντας είτε "Prelog" είτε "anti-Prelog" εκλεκτικότητα.[43]

2.3.5 Εφαρμογές των κετοredουκτασών στην ασύμμετρη σύνθεση

Η σύνθεση χειρόμορφων δευτεροταγών αλκοολών οι οποίες αποτελούν βασικά δομικά ενδιάμεσα, είναι μείζονος σημασίας στη φαρμακευτική χημεία, στη σύνθεση βιοδραστικών μορίων και ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας αλλά και στη βιομηχανία των αγροχημικών. Όπως είναι ήδη γνωστό η ικανότητα των κετοredουκτασών να συνθέτουν οπτικά καθαρές ενώσεις τις καθιστά αναπόσπαστο κομμάτι στη σύνθεση φαρμάκων και φυσικών προϊόντων. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα εφαρμογής των κετοredουκτασών στην σύνθεση φαρμακευτικών ενώσεων.

Σύνθεση του Modiolide A

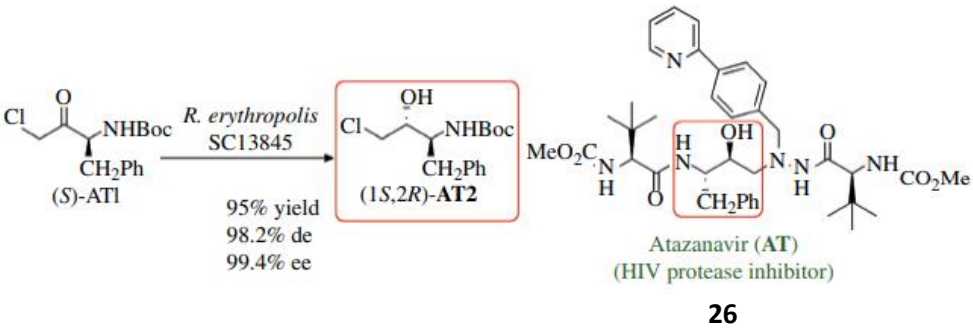
Το Modiolide A (**25**) είναι μια δεκαμελής λακτόνη η οποία προέρχεται από θαλάσσιο μικροοργανισμό και φέρει αντιβακτηριακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες. Η σύνθεση της πραγματοποιείται μέσω δύο ενζυμικών αναγωγών με την συμμετοχή των μικροοργανισμών *Pichia minuta* IAM 12215 και *Yamadazyma farinose* NBRC 10869 με αρκετά καλή απόδοση και εναντιοεκλεκτικότητα και στις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 24).[49]



Σχήμα 24. Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης του Modiolide A (25).[32]

Σύνθεση του Atazanavir

Το Atazanavir (**26**) δρα ως ισχυρός αναστολέας της πρωτεάσης του HIV. Η πρωτεάση HIV-1 είναι ένα ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τον κύκλο ζωής του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV-1). Με την αναστολή της πρωτεάσης HIV-1 σταματά η αντιγραφή του HIV καθιστώντας την έτσι ένα ελκυστικό στόχο για την μελέτη νέων διαδικασιών χημειοθεραπείας (Σχήμα 25).[50]

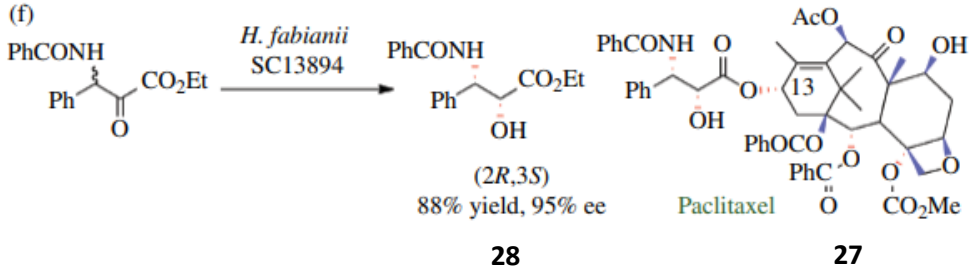


Σχήμα 25. Κύριο στάδιο σύνθεσης της Atazanavir μέσω στερεοεκλεκτικής αναγωγής με τον μικροοργανισμό *R.erythropolis* SC 13845.[32]

Σύνθεση του Paclitaxel

Το Paclitaxel (**27**) είναι ένα σύνθετο πολυκυκλικό διτερπένιο, το οποίο επιδεικνύει ένα μοναδικό τρόπο δράσης κατά των πρωτεϊνών οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη διαίρεση των κυττάρων. Το Paclitaxel είναι εγκεκριμένο από τον FDA για την θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών και του μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Βασικό πρόδρομο στάδιο για τη σύνθεση του Paclitaxel είναι η σύνθεση μιας χειρόμορφης πλευρικής

αλυσίδας (**28**) η οποία πραγματοποιείται μέσω ενζυμικής αναγωγής με τη χρήση του μικροοργανισμού *H. Fabianni* SC13894 (Σχήμα 26).[51]



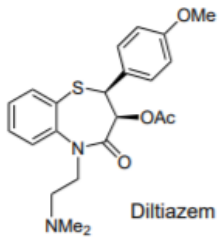
Σχήμα 26. Κύριο στάδιο σύνθεσης της πλευρικής αλυσίδας του Paclitaxel μέσω στερεοεκλεκτικής αναγωγής με τον μικροοργανισμό *H. fabianni* SC13894.[32]

ΣΤΕΡΕΟΕΚΛΕΚΤΙΚΕΣ ΑΝΑΓΩΓΕΣ α-ΥΠΟΚΑΤΕΣΤΗΜΕΝΩΝ-α-ΧΛΩΡΟ-β-ΚΕΤΟ ΕΣΤΕΡΩΝ ΑΠΟ NADPH-ΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΚΕΤΟΡΕΔΟΥΚΤΑΣΕΣ

2.4 Σπουδαιότητα και εφαρμογές των α-χλωρο και α,α-διχλωρο-β-υδροξυ εστέρων

Η στερεοεκλεκτική αναγωγή α-χλωρο και α,α-διχλωρο-β-κετο εστέρων είναι μία εξαιρετικά ενδιαφέρουσα αντίδραση καθώς μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση οπτικά ενεργών α-χλωρο και α,α-διχλωρο β-υδροξυ εστέρων, ενώσεων οι οποίες αποτελούν αναπόσπαστο εργαλείο στη σύγχρονη συνθετική χημεία. Οι ενώσεις αυτές έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αποτελούν ενδιάμεσες ενώσεις κλειδιά για την παρασκευή αρκετών βιολογικά ενεργών προϊόντων όπως το Diltiazem[52] και το Taxol[11,53] καθώς επίσης και των 2,3-επόξυ εστέρων οι οποίοι αποτελούν επίσης βασικά ενδιάμεσα για τη σύνθεση άλλων φαρμακευτικών και φυσικών προϊόντων. Ένας ακόμα λόγος ο οποίος καθιστά εξαιρετικά χρήσιμες τις συγκεκριμένες ενώσεις είναι η δυνατότητα μετατροπής τους σε α-αμινο-β-υδροξυ οξέα με απλή υποκατάσταση του ατόμου του χλωρίου.

Ένα σημαντικό παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση του Diltiazem (**29**), το οποίο είναι ένας τυπικός αναστολέας διαύλων ασβεστίου και χρησιμοποιείται συνήθως για τη θεραπεία της στηθάγχης και της υπέρτασης (Σχήμα 27).

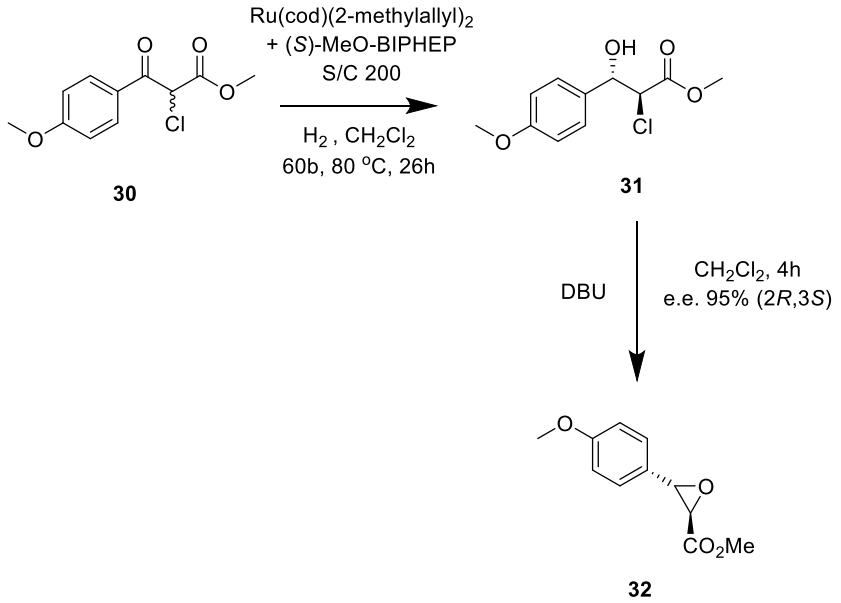


29

Σχήμα 27. Σχηματική απεικόνιση του Diltiazem

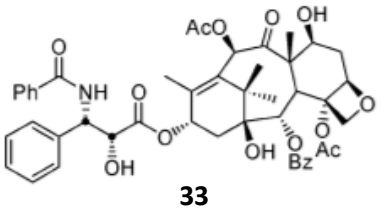
Απαραίτητο είναι να αναφερθεί ότι μόνο το (+)-(2*S*,3*S*)-ισομερές παρουσιάζει αυτήν την αγγειοδιασταλτική δραστικότητα, καθιστώντας απαραίτητο να διατίθεται στην αγορά σε οπτικά καθαρή μορφή. Πολλά μονοπάτια έχουν διερευνηθεί για την συγκεκριμένη σύνθεση, όμως η προσέγγιση μέσω της σύνθεσης του (2*S*,3*S*)-3-(4-μεθόξυφαίνυλο) γλυκιδικό (**32**) ως ενδιάμεσο είναι το περισσότερο πρακτικό και

αποτελεσματικό μονοπάτι. Λόγω της σπουδαιότητας της συγκεκριμένης ένωσης, πολλές είναι οι προτεινόμενες διαδικασίες για τη σύνθεση της παραπάνω ένωσης όπως ασύμμετρες εποξειδώσεις, αλδολικές αντιδράσεις, ασύμμετρες αναγωγές κ.ά..[52] Στο Σχήμα 28 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα όπου ο σχηματισμός του επιθυμητού ενδιαμέσου προέρχεται από μία αντίδραση στερεοεκλεκτικής αναγωγής του ρακεμικού α-χλωρο-β-κετο εστέρα (**30**) χρησιμοποιώντας ένα καταλύτη ρουθινίου και μία αντίδραση ενδομοριακού σχηματισμού εποξειδίου με DBU (1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene).[54]



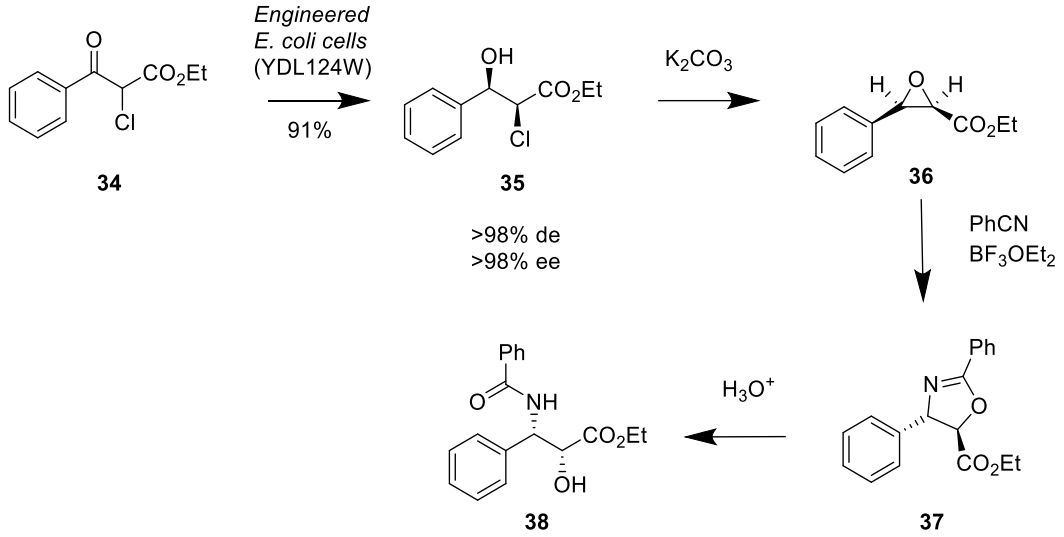
Σχήμα 28. Σύνθεση του ενδιαμέσου **32** μέσω δυναμικού κινητικού διαχωρισμού της ένωσης **30**.[54]

Ακόμα ένα αρκετά ενδιαφέρον παράδειγμα αποτελεί η σύνθεση του Taxol (**33**), το οποίο έχει αναδειχθεί ως φάρμακο για τη θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου όπως είναι ο καρκίνος των ωοθηκών και του μαστού (Σχήμα 29).[53]



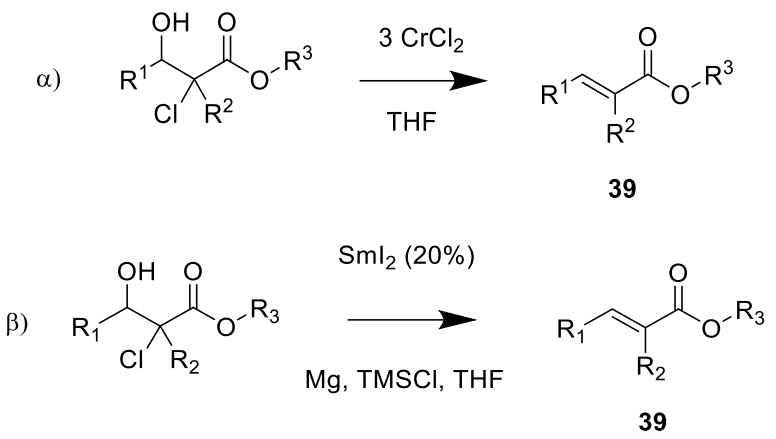
Σχήμα 29. Σχηματική απεικόνιση του Taxol.

Λόγω του ότι οι ποσότητες οι οποίες είναι δυνατόν να απομονωθούν μέσω φυσικών πηγών έχουν αποδειχθεί ανεπαρκείς στο να καλυφθεί η εμπορική ζήτηση, το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην εύρεση νέων ημι-συνθετικών μεθόδων. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον από μεριάς βιολογικής δραστικότητας του Taxol βρίσκεται στο κομμάτι της (2*R*,3*S*)-N-βενζοϋλο-φαινυλο-ισοσερίνης, της πλευρικής αλυσίδας. Βασικό στάδιο για τη σύνθεση της πλευρικής ομάδας αποτελεί η εκλεκτική ενζυμική αναγωγή του α-χλωρο-β-κετο φαινυλοπροπιονικού αιθυλεστέρα (**34**) προς το σχηματισμό του επιθυμητού οπτικά καθαρού α-χλωρο-β-υδροξυ φαινυλοπροπιονικού αιθυλεστέρα (**35**). Στο Σχήμα 30 παρουσιάζεται η συνθετική πορεία προς το σχηματισμό της πλευρικής αλυσίδας τουTaxol.[11]



Σχήμα 30. Συνθετική πορεία της πλευρικής αλυσίδας του φαρμάκου Taxol (**33**).[50]

Επιπροσθέτως, ακόμα ένας λόγος που καθιστά τους α-χλωρο και α-υποκατεστημένους-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρες σημαντικές ενώσεις είναι ότι μπορούν να δράσουν ως ενδιάμεσα προς το στερεοεκλεκτικό σχηματισμό α,β-ακόρεστων εστέρων (**39**), οι οποίοι αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για το σχηματισμό πολυλειτουργικών μορίων στην οργανική χημεία. Γενικά υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για τον σχηματισμό τέτοιου είδους ενώσεων με τις περισσότερες όμως να δίνουν μίγμα διαστερεομερών και χαμηλές αποδόσεις. Στο Σχήμα 31 παρουσιάζονται δύο παραδείγματα παρασκευής (Ε)-α,β-ακόρεστων εστέρων α) με διχλωριούχο χρώμιο και β) διιωδιούχο σαμάριο.[55–57]



Σχήμα 31. α) Σύνθεση (Ε)-α,β ακόρεστου εστέρα (**39**) α) με τη χρήση διιωδιούχου σαμαρίου (SmI_2)[56] και β) με τη χρήση διχλωριούχου χρωμίου ($CrCl_2$).[55]

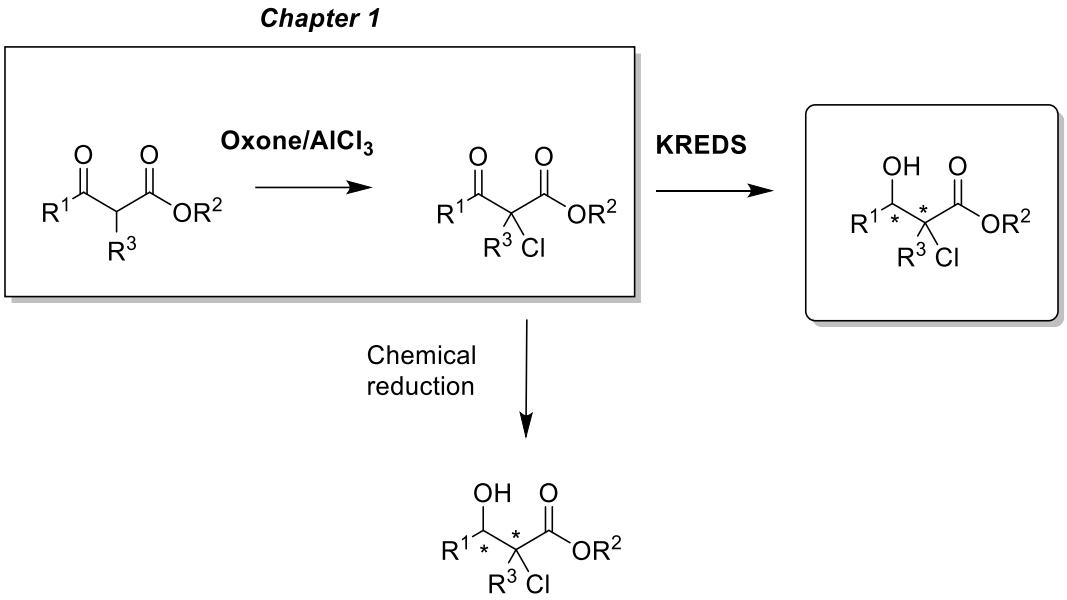
2.5 Στόχος της παρούσας εργασίας

Δεδομένης της χρησιμότητας των α-υποκατεστημένων α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρων αλλά και της συμβολής της βιοκατάλυσης στην σύνθεση οπτικά καθαρών ενώσεων, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της ενζυμικής αναγωγής α-υποκατεστημένων α-χλωρο-β-κετο εστέρων με τη χρήση διαφορετικών απομονωμένων NADPH-εξαρτώμενων κετοredουκτασών. Η εργασία αυτή, έχει βασιστεί σε μία πρόσφατη μελέτη της ερευνητικής μας ομάδας στην οποία περιγράφεται η ενζυμική σύνθεση α,α-διχλωρο-β-υδροξυ εστέρων.[17]

Σχεδιασμός μεθόδου

- Πρώτο στόχο αποτελεί η σύνθεση των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων από απλούς εστέρες όπως αναφέρθηκε και υλοποιήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας.
- Ακολουθεί η χημική αναγωγή των χλωριωμένων κετο εστέρων για τον σχηματισμό του ρακεμικού μίγματος των αντίστοιχων χλωριωμένων υδροξυ εστέρων που θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για την παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης με αέρια χρωματογραφία.
- Επόμενος στόχος είναι η εκλεκτική αναγωγή των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων με τη χρήση μιας σειράς διαφορετικών NADPH-εξαρτώμενων κετοredουκτασών με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα των ενζύμων να ανάγουν τα συγκεκριμένα υποστρώματα καθώς επίσης και η ενάντιο- και διαστερεοεκλεκτικότητα της ενζυμικά καταλυόμενης αναγωγής.

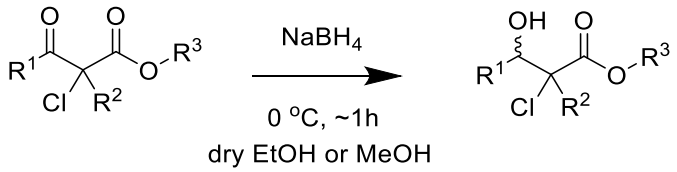
Η σύνθεση τέτοιου είδους υποστρωμάτων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τους λόγους που προαναφέρθηκαν. Στο Σχήμα 32 παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας των α-υποκατεστημένων α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρων από τους αντίστοιχους β-κετο εστέρες.



Σχήμα 32. Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-υδρόξυ εστέρων από τους αντίστοιχους α-υποκατεστημένους-β-κετο εστέρες.

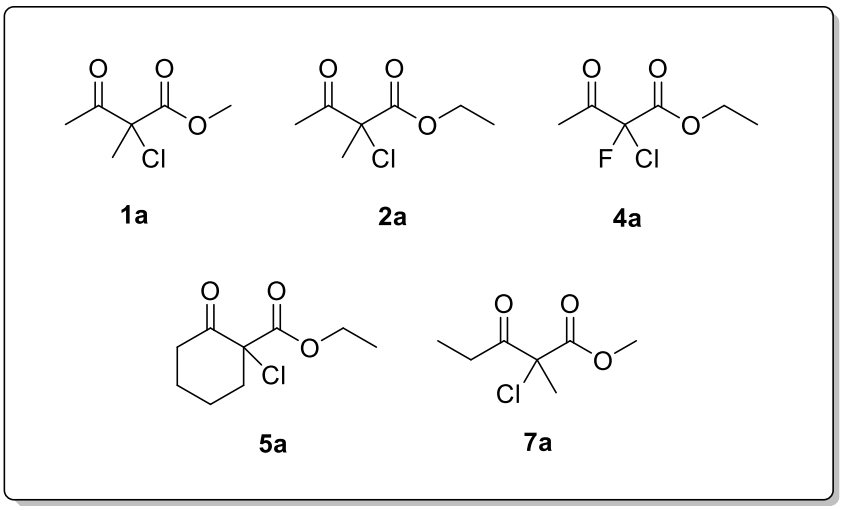
2.6 Ανάλυση και συζήτηση αποτελεσμάτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 1, η σύνθεση των α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων πραγματοποιήθηκε με τη νέα μέθοδο χλωρίωσης χρησιμοποιώντας τα αντιδραστήρια Oxone/$AlCl_3$. Έπειτα λοιπόν από τη σύνθεση των χλωριωμένων κετο εστέρων, σειρά έχει η παρασκευή του ρακεμικού μίγματος των β-υδροξυ εστέρων με απλή χημική αναγωγή με τη χρήση του βοροϋδριδίου του νατρίου $NaBH_4$ (Σχήμα 33). Σκοπός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπο για την παρακολούθηση της αντίδρασης και τον διαχωρισμό των τεσσάρων παραγόμενων στερεοϊσομερών μέσω αέριας χρωματογραφίας. Ο διαστερεομερικός λόγος και τα ποσοστά μετατροπής προσδιορίστηκαν με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας με την τριχοειδή στήλη γενικής χρήσης HP-5 (30m×0.32mm×0.25μm, 5% diphenyl και 95% dimethylpolysiloxane-Nonpolar), την μεσαίας πολικότητας στήλη DB-200 (30m×0.25mm×0.25μm fused with silica, mild polarity), και τη χειρόμορφη στήλη CP-Chiralsil Dex CB (25m×0.25mm×0.25μm).



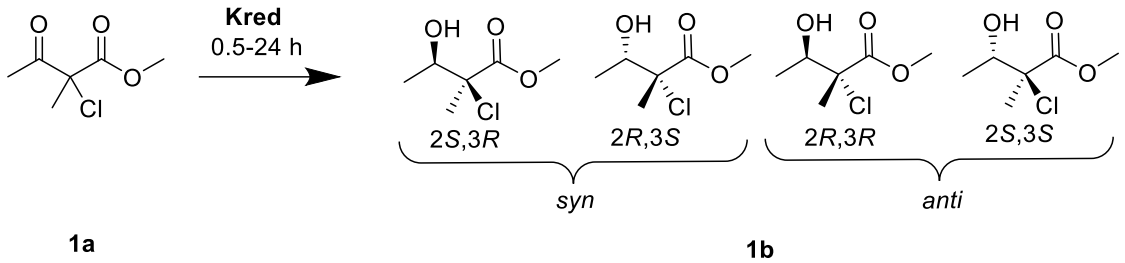
Σχήμα 33. Γενική αντίδραση χημικής αναγωγής των α-υποκατεστημενων α-χλωρο-β-κετο εστέρων με $NaBH_4$.

Τα υποστρώματα στα οποία πραγματοποιήθηκε χημική αναγωγή παρουσιάζονται στο Σχήμα 34.



Σχήμα 34. Σχηματική απεικόνιση των προς αναγωγή α-υποκατεστημένων α-χλωρο-β-κετο-εστέρων.

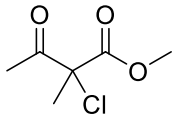
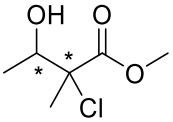
Η ένωση που επιλέχθηκε να μελετηθεί πρώτη, είναι ο 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκός μεθυλεστέρας **1a**. Αρχικά παρασκευάστηκε ο αντίστοιχος υδρόξυ εστέρας με απλή χημική αναγωγή ως πρότυπο για την παρακολούθηση της αντίδρασης. Ο εστέρας **1a**, όπως και όλα τα υποστρώματα τα οποία δοκιμάστηκαν, τέθηκαν σε έλεγχο σταθερότητας στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.9, 37 ^{o}C). Εφόσον επιβεβαιώθηκε η σταθερότητα του υποστρώματος στις 24 ώρες, πραγματοποιήθηκε μία σειρά ενζυμικών αναγωγών με διαφορετικές NADPH-εξαρτώμενες κετορεδουκτάσες.



Σχήμα 35. Όλα τα πιθανά στερεοϊσομερή του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (**1b**).

Δοκιμάστηκε ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ενζύμων, ωστόσο δεν έδωσαν όλα το επιθυμητό αποτέλεσμα. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **1a** με κετορεδουκτάσες.

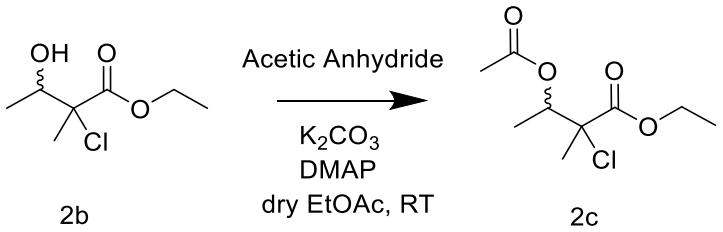
Υπόστρωμα	**KRED**	**Αναλογία διαστερεομερών %[α]**				**Χρόνος αντίδρασης**	**Ποσοστό μετατροπής %[α]**	**Προϊόν**
		syn		***anti***				
		A	B	C	D			
 **1a**	101	27	13	37	22	30 min	>99	 **1b**
	114	42	16	35	6	30 min	>99	
	131	60	-	37	2	24 h	95	
	A1C	-	43	6	51	4 h	97	
	A1D	-	45	4	51	2 h	>99	

[α] Τα A, B, C και D αντιστοιχούν στα στερεοισομερή με τη σειρά που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας.

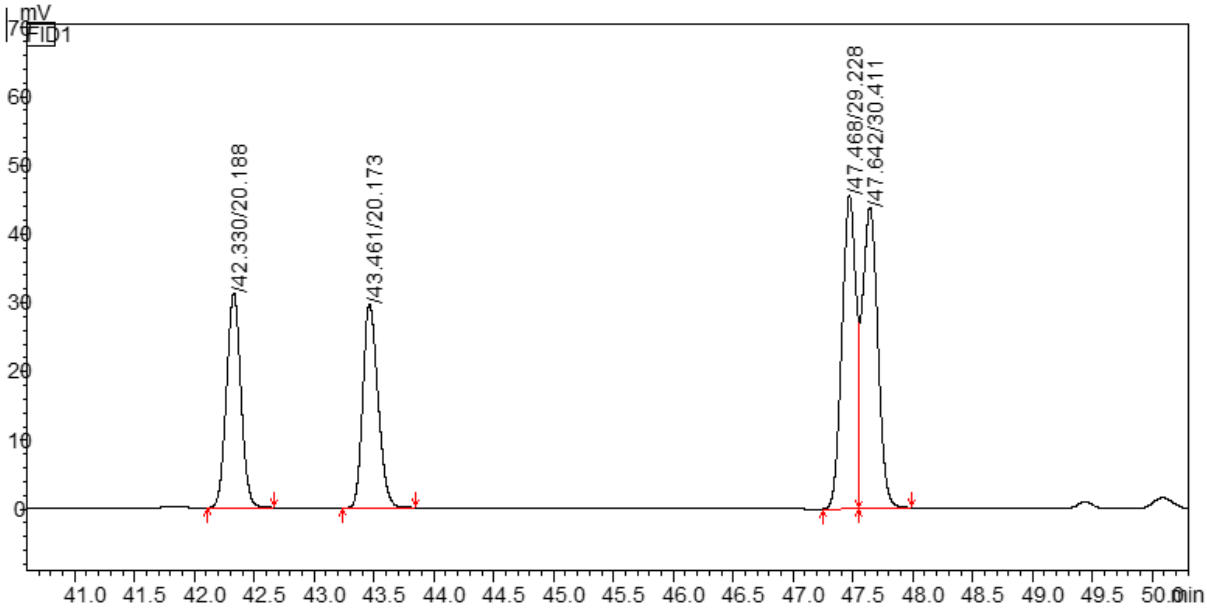
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα εμφανίζουν εξαιρετική δραστικότητα για το υπόστρωμα **1a**, ενώ φαίνεται να μην εμφανίζουν τόσο καλή στερεοεκλεκτικότητα. Τα ένζυμα 101 και 114 κατέλυσαν την αναγωγή ταχύτατα (30 λεπτά) δίνοντας όμως και τα τέσσερα στερεοϊσομερή, ενώ τα ένζυμα 131, A1C και A1D έδειξαν χαμηλότερη δραστικότητα (2 - 24 ώρες) και οδήγησαν σε τρία από τα τέσσερα στερεοϊσομερή. Ακολούθως, για να προσδιοριστεί η σχετική στερεοδομή των προϊόντων και να διευκρινιστεί ποιό ζεύγος ανήκει στα *syn* και ποιό στα *anti* διαστερεομερή, έγινε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία, ενώ πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασμάτων ^{1}H NMR της ένωσης **1b** και του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού βενζυλεστέρα της βιβλιογραφίας.[58]

Συγκρίνοντας έτσι αρχικά τη μετατόπιση των πρωτονίων του μεθυλίου του α-άνθρακα από το φάσμα ^{1}H NMR του (2*R*,3*R*)-2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού βενζυλεστέρα [*δ, 1.76* (s, 3H)] και του εστέρα 1b [*δ, 1.74* (s, 3H)] και στη συνέχεια συσχετίζοντας τα ποσοστά των διαστερεομερών ζευγών με βάση τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα ^{1}H NMR, θεωρούμε ότι οι κορυφές **A** και **B** όπως αυτές εξέρχονται από τη στήλη ανήκουν στα ***syn*** διαστερεομερή ενώ οι κορυφές **C** και **D** ανήκουν στα ***anti***.

Το επόμενο υπόστρωμα το οποίο μελετήθηκε είναι ο 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκός αιθυλεστέρας **2a.** Αξίζει να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο υπόστρωμα δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των τεσσάρων παραγόμενων στερεοϊσομερών ούτε μέσω αέριας αλλά ούτε μέσω υγρής χρωματογραφίας με καμία από τις διαθέσιμες χειρόμορφες κολώνες. Έτσι λοιπόν για την επίλυση του προβλήματος και τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των στερεοϊσομερών ήταν απαραίτητη η παραγοντοποίηση των υδρόξυ υποστρωμάτων με οξικό ανυδρίτη, κάτι που βοήθησε στον καλύτερο διαχωρισμό των στερεοϊσομερών (Σχήμα 36). Γενικότερα είναι γνωστό ότι όσο μεγαλύτερο-ογκωδέστερο είναι το προϊόν της παραγοντοποίησης τόσο περισσότερες πιθανότητες υπάρχουν να διαχωριστούν χρωματογραφικά τα εναντιομερή με χρήση χειρόμορφης κολώνας.



Σχήμα 36. Σχηματική απεικόνιση προστασίας της ένωσης **2b** με οξικό ανυδρίτη.



Σχήμα 37. Απεικόνιση των τεσσάρων στερεοϊσομερων του ρακεμικού μίγματος της ένωσης **2c**, σύμφωνα με το χρόνο κατακράτησης στη χειρόμορφη τριχοειδή στήλη στήλη CP-Chiralsil Dex CB.

Δοκιμάστηκε ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ενζύμων, ωστόσο δεν έδωσαν όλα το επιθυμητό αποτέλεσμα. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **2a** με κετοredουκτάσες.

Υπόστρωμα	**KRED**	**Αναλογία διαστερεομερών %[α]**				**Χρόνος αντίδρασης**	**Ποσοστό μετατροπής %[α]**	**Προϊόν**
		anti		***syn***				
		A	B	C	D			
	101	42	10	43	4	30 min	>99	
	119	42	1	57	-	30 min	>99	
	A1D	19	47	-	34	2 h	98	
	106	53		47		8 h	93	
	112	48		52		30 min	>99	
2a	114	44		56		30 min	>99	**2b**
	123	48		52		30 min	>99	
	131	38		62		6 h	70	

[α] Τα A, B, C και D αντιστοιχούν στα στερεοισομερή με τη σειρά που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας.

Στον Πίνακα 3 περιλαμβάνονται όλα τα ένζυμα τα οποία μελετήθηκαν για την αναγωγή του κετο εστέρα **2a**. Όπως είναι εμφανές, για τα ένζυμα 101, 119 και A1D

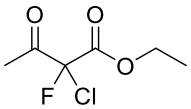
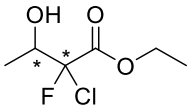
αναγράφονται ξεχωριστά τα ποσοστά των τεσσάρων στερεοϊσομερών, ενώ για τα υπόλοιπα ένζυμα αναγράφονται τα ποσοστά των ζευγών των διαστερεομερών. Αυτό διότι ενδεικτικά επιλέχθηκαν τα προϊόντα τριών ενζυμικών αναγωγών στα οποία πραγματοποιήθηκε η διαδικασία παραγοντοποίησης. Τα κριτήρια με βάση τα οποία επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες ενζυμικές αντιδράσεις είναι ο λόγος των διαστερεομερικών ζευγών, ο χρόνος και η καθαρότητα της αντίδρασης.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα καταλήγουμε στο συμπέρασμα, ότι τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζουν και σε αυτό τον α-χλωρο κετο εστέρα υψηλή δραστικότητα με πολύ καλά έως εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής τις περισσότερες φορές. Ένα από τα καλύτερα αποτελέσματα τα οποία αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα οφείλεται στην KRED 119, όπου παρατηρείται εξαιρετικό ποσοστό μετατροπής (>99%) σε 30 λεπτά ενώ σχηματίζονται κυρίως δύο από τα τέσσερα στερεοϊσομερή τα A και C (με τη σειρά που εξέρχονται από τη στήλη αέριας χρωματογραφίας). Αξίζει να σημειωθεί ότι το κάθε στερεοϊσομερές ανήκει σε διαφορετικό ζεύγος διαστερεομερών, δίνοντας έτσι πολύ υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα (99% ee) μεταξύ των ενώσεων του εκάστοτε ζεύγους. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής των προϊόντων και για να διευκρινιστεί ποιό ζεύγος ανήκει στα *syn* και ποιό στα *anti* διαστερεομερή, έγινε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία ενώ πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασμάτων ^{1}H NMR της ένωσης **2b** και του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού βενζυλεστέρα της βιβλιογραφίας.[58] Συγκρίνοντας έτσι αρχικά τη μετατόπιση των πρωτονίων του μεθυλίου του α-άνθρακα από το φάσμα ^{1}H NMR του (2*R*,3*R*)-2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού βενζυλεστέρα [*δ, 1.76* (s, 3H)] και του εστέρα **2b** [*δ, 1.74* (s, 3H)] και στη συνέχεια συσχετίζοντας τα ποσοστά των διαστερεομερών ζευγών με βάση τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα ^{1}H NMR, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι κορυφές **A** και **B** όπως αυτές εξέρχονται από τη στήλη ανήκουν στα ***anti*** διαστερεομερή ενώ οι κορυφές **C** και **D** ανήκουν στα ***syn***.

Ακολούθως μελετήθηκε η ενζυμική αναγωγή του 2-φθορο-2-χλωρο-3-οξο βουτανοϊκού αιθυλεστέρα **4a**. Όπως είναι γνωστό οι συγκεκριμένες ενώσεις έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον εδώ και αρκετά χρόνια, καθώς πρόκειται για χρήσιμα συνθετικά ενδιάμεσα για το σχηματισμό διαφόρων οπτικά ενεργών φθοριωμένων ενώσεων οι οποίες έχουν ιδιαίτερη θέση στη βιομηχανία των φαρμάκων και των

αγροχημικών.[59,60] Ο εστέρας **4a** όπως και όλα τα υποστρώματα τα οποία δοκιμάστηκαν, τέθηκαν σε έλεγχο σταθερότητας στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.9, 37 ^{o}C) και παρατηρήθηκε αρχικά μερική αλλοίωση του σε 1.5 ώρες, ενώ μετά από 5 ώρες είχε καταστραφεί πλήρως. Λόγω λοιπόν της ευαισθησίας του υποστρώματος στις συνθήκες αυτές, γίνεται κατανοητό ότι για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων είναι αναγκαίο η αντίδραση να ολοκληρώνεται σε χρόνο μικρότερο της 1.5 ώρας. Εφόσον προσδιορίστηκε η διάρκεια σταθερότητας του υποστρώματος, πραγματοποιήθηκε μία σειρά ενζυμικών αναγωγών με διαφορετικές NADPH-εξαρτώμενες κετοredουκτάσες. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα καλύτερα αποτελέσματα των ενζυμικών αναγωγών.

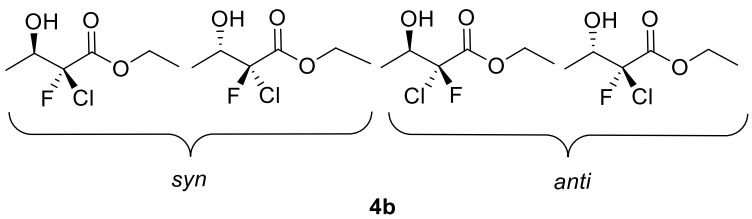
Πίνακας 4. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **4a** με κετοredουκτάσες.

Υπόστρωμα	**KRED**	**Αναλογία διαστερεομερών % [α]**				**Χρόνος αντίδρασης**	**Ποσοστό μετατροπής % [α]**	**Προϊόν**
		syn		***anti***				
		A	B	C	D			
	101	46		54		30 min	>99	
	103	-	51	49	-	30 min	>99	
	106	-	55	45	-	30 min	>99	
	108	50		50		30 min	>99	
	112	-	41	51	8	30 min	>99	
	114	1	38	49	12	30 min	>99	
4a	119	50		50		30 min	>99	**4b**
	121	3	41	48	9	30 min	>99	
	123	1	30	49	12	30 min	>99	
	131	55	45	-	-	30 min	>99	
	A1C	45	-	5	50	30 min	>99	
	A1D	45	-	5	50	30 min	>99	

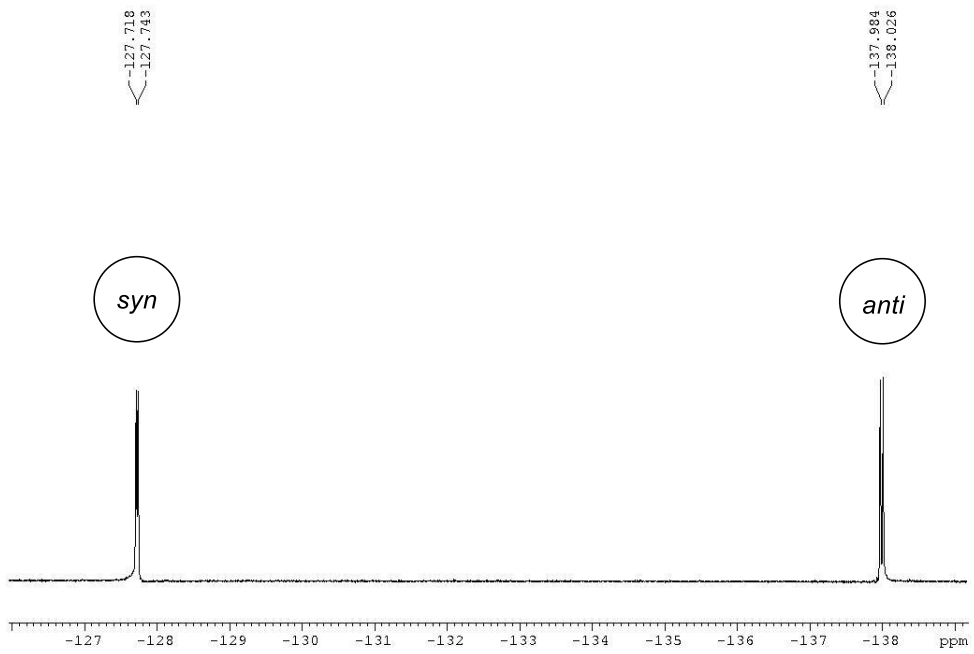
[α] Τα A, B, C και D αντιστοιχούν στα στερεοισομερή με τη σειρά που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 γίνεται αντιληπτό ότι όλα τα ένζυμα εμφανίζουν εξαιρετική δραστικότητα και επιτυγχάνουν πλήρη μετατροπή σε μόλις 30 λεπτά. Δεδομένου ότι το υπόστρωμα υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες της αντίδρασης εμφανίζει αλλοίωση μετά από παραμονή 1.5 ώρας, προκύπτει το συμπέρασμα ότι όλα τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί είναι αξιόπιστα. Από τις κετοredουκτάσες που

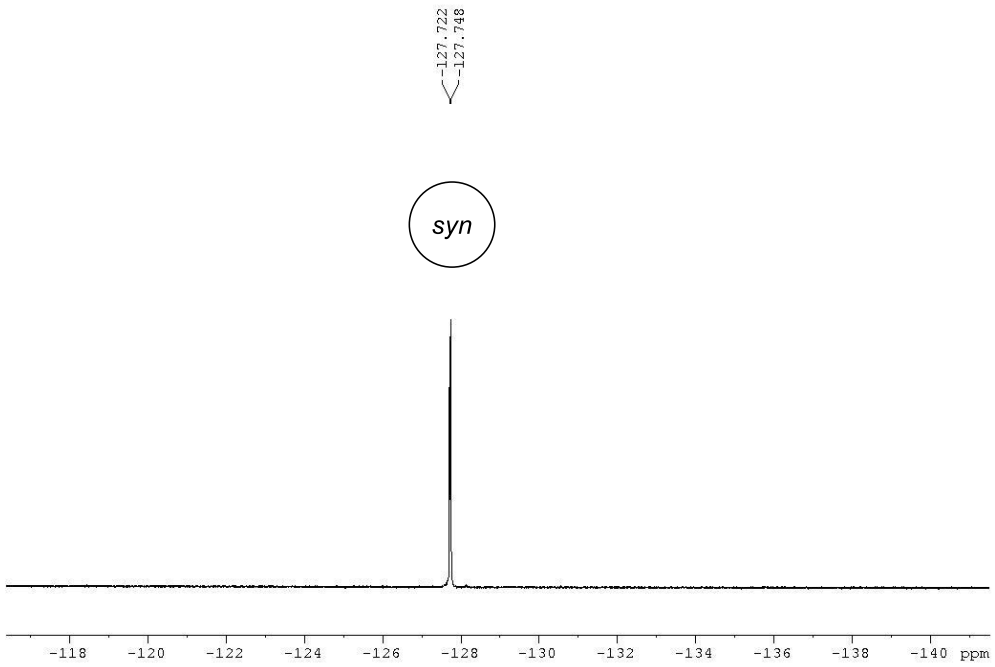
χρησιμοποιήθηκαν φαίνεται πως οι **103** και **106** κατέλυσαν την αντίδραση με εξαιρετική εκλεκτικότητα, δεδομένου οτι οδηγούν στο σχηματισμό δύο μόνο στερεοϊσομερών, το κάθε ένα από τα οποία ανήκει σε διαφορετικό ζεύγος διαστερεομενών, παρέχοντας έτσι εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99% *ee*) . Ακόμα ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον αποτέλεσμα φαίνεται να προκύπτει από την αναγωγή με την κετοredουκτάση **131**. Η κετοredουκτάση 131 καταλύει την αντίδραση της αναγωγής με εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα (>99% *de*) . Θέλοντας στη συνέχεια να προσδιοριστεί η σχετική στερεοδομή του συγκεκριμένου προϊόντος, βασιζόμενοι πάντα στη βιβλιογραφία καταλήξαμε ότι η KRED 131 σχηματίζει εκλεκτικά μόνο τα ***syn*** προϊόντα. Το παραπάνω συμπέρασμα προέκυψε μετά από σύγκριση των φασμάτων ^{19}F μεταξύ του ρακεμικού μίγματος του εστέρα **4b** (Σχήμα 39) (^{19}F NMR: *δ -127.7, -138.0*), του σχηματιζόμενου προϊόντος από την ενζυμική αναγωγή (Σχήμα 40) (^{19}F NMR: *δ -127.7*) και του βιβλιογραφικά δεδομένου (2*S*,3*R*)-2-φθορο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού τερτ-βουτυλεστέρα (^{19}F NMR: *δ -137.6*) ο οποίος φέρει την διαμόρφωση ***anti***. Έτσι με βάση μία παλαιότερη δημοσίευση του Kazutaka Shibatomi και της ομάδας του, και με τη βοήθεια πάντα της αέριας χρωματογραφίας (GC) και της φασματοσκοπίας NMR διαπιστώθηκε ότι καθώς η μετατόπιση του σήματος του φθορίου των προϊόντων **4b** από την ενζυμική αναγωγή δεν συμπίπτει με αυτή του εστέρα της βιβλιογραφίας, πρόκειται για τα ***syn*** διαστερομερή.[59]



Σχήμα 38. Όλα τα πιθανά στερεοϊσομερή του α-φθορο-α-χλωρο-β-υδροξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα **4b.**



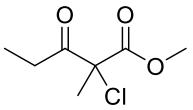
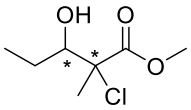
Σχήμα 39. Φάσμα ^{19}F NMR του ρακεμικού μίγματος του α-φθορο-α-χλωρο-β-υδροξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα **4b**.



Σχήμα 40. Φάσμα ^{19}F NMR του α-φθορο-α-χλωρο-β-υδροξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα **4b** προϊόντος από την ενζυμική αναγωγή με την κετορεδουκτάση 131.

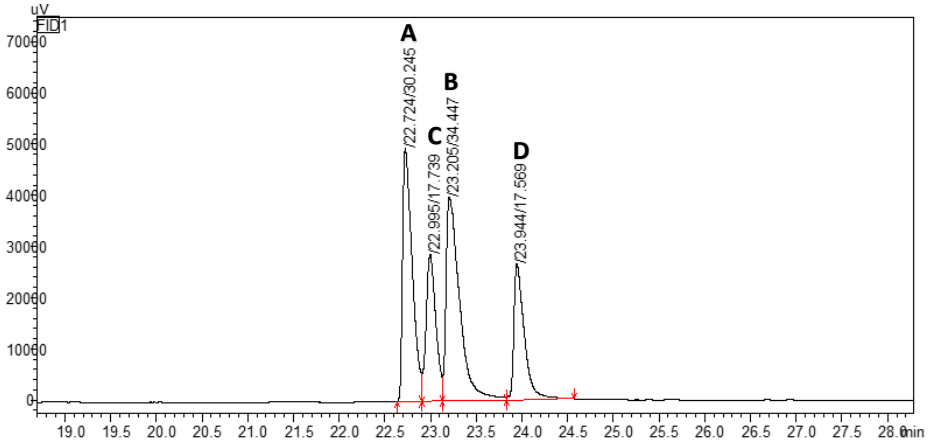
Το επόμενο υπόστρωμα το οποίο μελετήθηκε είναι ο 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο πεντανοϊκός μεθυλεστέρας **7a**. Ο εστέρας **7a** τέθηκε σε έλεγχο σταθερότητας στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.9, 37 ºC), και επιβεβαιώθηκε η σταθερότητά του ακόμα και μετά από 24 ώρες. Εφόσον προσδιορίστηκε η διάρκεια σταθερότητας του υποστρώματος, πραγματοποιήθηκε μία σειρά ενζυμικών αναγωγών με διαφορετικές NADPH-εξαρτώμενες κετοredουκτάσες. Στον Πίνακα 5 παρατίθενται τα καλύτερα απότελέσματα των ενζυμικών αναγωγών.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **7a** με κετοredουκτάσες.

Υπόστρωμα	**KRED**	**Αναλογία διαστερεομερών % [α]**				**Χρόνος αντίδρασης**	**Ποσοστό μετατροπής % [α]**	**Προϊόν**
		syn		***anti***				
		A	B	C	D			
 **7a**	**101**	48	-	52	-	30 min	>99	 **7b**
	112	45	-	55	-	30 min	>99	
	114	45	15	38	2	2 h	>99	
	121	46	9	43	2	3 h	>99	
	123	47	4	48	1	1.5 h	>99	

[α] Τα A, B, C και D αντιστοιχούν στα στερεοισομερή (βλ. Σχήμα 41). Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας.

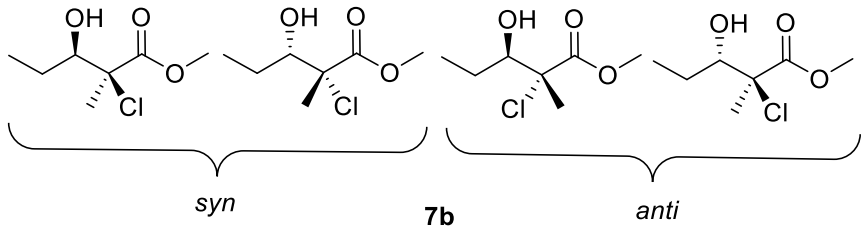
Παρατηρώντας τον Πίνακα 5 φαίνεται οτι και τα πέντε αυτά ένζυμα εμφανίζουν εξαιρετική δραστικότητα σε αρκετά μικρό χρονικό διάστημα (30 λεπτά έως 3 ώρες). Τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από τις από τις ενζυμικές αναγωγές των KREDs **101** και **112,** οι οποίες οδήγησαν στον εκλεκτικό σχηματισμό μόνο δύο στερεοϊσομερών, όπου το ένα ανήκει στο ζεύγος των *syn* διαστερεομερών και το άλλο στο *anti*, με εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99% *ee*). Τα ένζυμα 114, 121 και 123 οδήγησαν στον σχηματισμό και των τεσσάρων στεροϊσομερών, με το μεγαλύτερο ποσοστό να ανήκει στις κορυφές A και B (όπως εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη), οι οποίες ανήκουν και στα δύο ζεύγη διαστερεομερών. Στο Σχήμα 41 παρατίθεται το χρωματογράφημα του ρακεμικού μίγματος του υδρόξυ εστέρα **7b** με χρήση χειρόμορφης κολώνας.



Σχήμα 41. Απεικόνιση των τεσσάρων στερεοϊσομερων του μίγματος των δύο διαστερεομερών της ένωσης **7b**, σύμφωνα με το χρόνο κατακράτησης στη χειρόμορφη τριχοειδή στήλη CP-Chiralsil Dex CB.

.

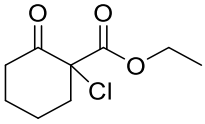
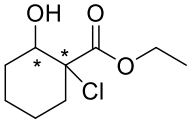
Παρατηρώντας το χρωματογράφημα του ρακεμικού μείγματος (Σχήμα 41) και με τη βοήθεια της ολοκλήρωσης της εκάστοτε κορυφής κατανοούμε ότι οι κορυφές A και B ανήκουν στο ένα ζεύγος διαστερεομερών και οι C και D στο άλλο. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει καθώς μετά τη χημική αναγωγή ενώσεων που περιέχουν περισσότερα του ενός στερεογονικά κέντρα, είναι απαραίτητο οι εναντιομερείς ενώσεις κάθε ζεύγους διαστερεομερών να βρίσκονται στην ίδια αναλογία. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της σχετικής στερεοδομής και για να διευκρινιστεί ποιό ζεύγος ανήκει στα syn και ποιό στα anti διαστερεομερή, έγινε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία, ενώ πραγματοποιήθηκε σύγκριση των φασμάτων ^{1}H NMR του προϊόντος **7b** και του 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ πεντανοϊκού βενζυλεστέρα της βιβλιογραφίας.[58] Συγκρίνοντας έτσι αρχικά τη μετατόπιση των πρωτονίων του μεθυλίου του α-άνθρακα από το φάσμα ^{1}H NMR του (2*R*,3*R*)-2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ πεντανοϊκού βενζυλεστέρα [*δ, 1.75* (s, 3H)] και του ρακεμικού μίγματος του εστέρα **7b** [*δ, 1.73 (s, 3H), 1.70* (s, 3H)] και στη συνέχεια συσχετίζοντας τα ποσοστά των διαστερεομερών ζευγών με βάση τα αέροχρωματογραφήματα και τα φάσματα ^{1}H NMR, εξάγεται το συμπέρασμα ότι πολύ πιθανόν οι κορυφές **A** και **B** να ανήκουν στα ***syn*** διαστερεομερή ενώ οι κορυφές **C** και **D** ανήκουν στα ***anti***.



Σχήμα 42. Όλα τα πιθανά στερεοϊσομερή του α-μεθυλο-α-χλωρο-β-υδροξυ πεντανοϊκού μεθυλεστέρα **7b**.

Το τελευταίο υπόστρωμα το οποίο μελετήθηκε είναι ο 1-χλωρο-2-οξο κυκλοέξανο-1-καρβοξυλικός αιθυλεστέρας **5a.** Ο εστέρας **5a** όπως και όλα τα προηγούμενα υποστρώματα τα οποία δοκιμάστηκαν, τέθηκαν σε έλεγχο σταθερότητας στις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.9, 37 ^{o}C) και παρατηρήθηκε αρχικά μερική αλλοίωση του στις 2.5 ώρες, ενώ μετά από παραμονή 5 ωρών είχε καταστραφεί πλήρως. Λόγω λοιπόν της ευαισθησίας του υποστρώματος στις συνθήκες αυτές, γίνεται κατανοητό ότι για τη λήψη αξιόπιστων αποτελεσμάτων ήταν αναγκαίο η αντίδραση να ολοκληρώνεται σε χρονικό διάστημα μικρότερο των 2.5 ωρών. Ακόμα αξίζει να σημειωθεί ότι στο συγκεκριμένο υπόστρωμα δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός των τεσσάρων παραγόμενων στερεοϊσομερών μέσω αέριας ή υγρής χρωματογραφίας με καμία από τις διαθέσιμες χειρόμορφες κολώνες, αλλά ούτε και με τη μέθοδο της παραγοντοποίησης με οξικό ανυδρίτη. Παρ'όλα αυτά ήταν δυνατή η λήψη αποτελεσμάτων διαστερεοεκλεκτικότητας, καθώς ήταν εφικτός ο διαχωρισμός των διαστερεομερών με τη χρήση της μεσαίας πολικότητας στήλης DB-200 (30m×0.25mm×0.25μm). Στον Πίνακα 6 παρατίθενται τα καλύτερα απότελέσματα των ενζυμικών αναγωγών.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα ενζυμικών αναγωγών του εστέρα **5a** με κετοredουκτάσες.

Υπόστρωμα	**KRED**	**Αναλογία διαστερεομερών % [α]**		**Χρόνος αντίδρασης**	**Ποσοστό μετατροπής % [α]**	**Προϊόν**
		A	B			
 **5a**	**101**	88	12	2h	>99	 **5b**
	112	78	22	1h	>99	
	114	45	55	2h	95	
	121	56	44	1.5h	>99	
	123	73	27	2h	98	

[α] Τα A και B αντιστοιχούν στα διαστερεομερικά ζεύγη με τη σειρά που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη. Τα ποσοστά προσδιορίστηκαν με χρήση αέριας χρωματογραφίας.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 6 όλα τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν εμφανίζουν εξαιρετική δραστικότητα (95-99% μετατροπή). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χρόνος ολοκλήρωσης της αντίδρασης δεν ξεπερνά τις 2.5 ώρες στις οποίες παρατηρείται η αλλοίωση του υποστρώματος, επομένως ότι αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν είναι απόλυτα αξιόπιστα. Μεταξύ των πέντε ενζύμων του Πίνακα 6 η κετορεδουκτάση **101** αποδείχτηκε οτι εκτός από δραστικός βιοκαταλύτης ενφανίζει και πολύ καλή διαστερεοεκλεκτικότητα (76% *de*). Στη σειρά ως προς την διαστερεοεκλεκτικότητα ακολουθούν τα ένζυμα 112 και 123 με εξίσου πολύ καλή δραστικότητα και αρκετά καλή διαστερεοεκλεκτικότητα.

Ακόμα ένα υπόστρωμα το οποίο δοκιμάστηκε ήταν ο 2-μεθυλο-2-χλωρο-3-οξο φαινυλοπροπιονικός μεθυλεστέρας **3a**. Παρά το ιδιαίτερο ενδιαφέρον το οποίο έχει η συγκεκριμένη ένωση λόγω της παρουσίας της φαίνυλο ομάδας, δεν ήταν δυνατή η μελέτη της, εξαιτίας της μειωμένης διαλυτότητας της σε υδατικό περιβάλλον.

Συμπερασματικά, επιτεύχθηκε για πρώτη φορά η ενζυμικά καταλυόμενη αναγωγή α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-κετο εστέρων προς τους αντίστοιχους α-υποκατεστημένους-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρες με τη χρήση μιας σειράς NADPH-εξαρτώμενων κετορεδουκτασών. Τα συγκεκριμένα ένζυμα αποδείχτηκαν αποτελεσματικοί βιοκαταλύτες για τέτοιου είδους υποστρώματα καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις παρουσιάζουν εξαιρετική δραστηκότητα σε μόλις 30 λεπτά και αρκετά καλή στερεοεκλεκτικότητα. Πιο συγκεκριμένα, ένα από τα καλύτερα αποτελέσματα αποτελεί η εξαιρετική μετατροπή του κέτο εστέρα **2a** στον αντίστοιχο υδρόξυ εστέρα **2b** από την ενζυμική αναγωγή με την κετορεδουκτάση **119**, όπου κατά κύριο λόγο σχηματίζονται μόνο δύο από τα τέσσερα στερεοϊσομερή τα οποία ανήκουν και στα δύο ζεύγη διαστερεομερών παρέχοντας έτσι εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (~99% *ee*). Ακόμα, ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα επιτεύχθηκε με την εξαιρετική μετατροπή της ένωσης **4a** στον αντίστοιχο υδρόξυ εστέρα **4b** με τη χρήση της κετορεδουκτάσης **131**, όπου στην προκειμένη περίπτωση σχηματίζεται μόνο το ένα ζεύγος διαστερεομερών προσδίνοντας έτσι εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα (>99% *de*). Τέλος, ακόμα ένα αρκετά ενδιαφέρον αποτέλεσμα σημειώθηκε με τη σύνθεση του υποστρώματος **7b** χρησιμοποιώντας τις κετορεδουκτάσες **101** και **112** όπου έδειξαν εξαιρετική δραστικότητα μόλις σε 30 λεπτά οδηγώντας στο σχηματισμό δύο μόνο στερεοισομερών με εξαιρετική εναντιοεκλεκτικότητα (>99% *ee*).

2.7 Πειραματικό μέρος

Ένζυμα και αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αγοράστηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Merck, Riedel και Fluka.

Οι κετορεδουκτάσες που χρησιμοποιήθηκαν είναι απομονωμένα εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα της εταιρίας Biocatalytics και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το συνένζυμο NADPH είναι της εταιρίας Johnson Matthey ενώ η αφυδρογονάση της γλυκόζης, GDH αγοράστηκε από τις εταιρίες Evocatal και Johnson Matthey.

Όργανα και διατάξεις

Ο προσδιορισμός της δομής των μορίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια φασμάτων ^{1}H NMR, ^{19}F NMR και ^{13}C NMR που ελήφθησαν σε φασματόμετρα 300MHz και 500MHz της εταιρίας Bruker, χρησιμοποιώντας τετραμέθυλο σιλάνιο (TMS) σαν σήμα αναφοράς και $CDCl_3$ ως διαλύτη (7.26 ppm για ^{1}H και 77.16 ppm για ^{13}C).

Η πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων παρακολουθήθηκε με τους αέριους χρωματογράφους Shimadzu 2014 και Shimadzu Nexis GC-2030 με ανιχνευτή FID. Για την παρακολούθηση των αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες HP-5 capillary (30m×0.32mm×0.25μm, 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane-Nonpolar) και DB-200 (30m×0.25mm×0.25μm fused with silica, mild polarity), ενώ για τον διαχωρισμό των στερεοϊσομερών χρησιμοποιήθηκε η χειρόμορφη στήλη CP-Chiralsil Dex CB (25m×0.25mm×0.25μm).

Για τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 F_{254} της εταιρίας EMD Millipore. Ο καθαρισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης (Flash column chromatograph) χρησιμοποιώντας silica gel 60, particle size 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM) ως υλικό πλήρωσης.

Γενικές συνθετικές μέθοδοι

I. Αναγωγή καρβόνυλο ενώσεων με $NaBH_4$

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.33 mmol $NaBH_4$ σε 4 ml είτε άνυδρης μεθανόλης είτε απόλυτης αιθανόλης. Το διάλυμα ψύχεται στους 0 ^oC και προστίθενται υπό ισχυρή ανάδευση, 1 mmol καρβονυλικής ένωσης σε 1 ml μεθανόλης ή αιθανόλης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται στους 0 ^oC και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη 1 ml κορεσμένου διαλύματος NH_4Cl και απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό. Στο υπόλειμμα προστίθεται νερό και εκχυλίζεται τρεις φορές με οξικό αιθυλεστέρα. Τέλος η οργανική φάση ξηραίνεται με $MgSO_4$ και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση.

II. Προστασία αλκοολών με οξικό ανυδρίτη

Σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική εφοδιασμένη με μαγνητικό αναδευτήρα, προστίθενται υπό ατμόσφαιρα αζώτου 1 mmol αλκοόλης σε 6 ml άνυδρου οξικού αιθυλεστέρα. Ακολούθως προστίθενται 4 mmol άνυδρου K_2CO_3, 2 mmol απεσταγμένου οξικού ανυδρίτη και καταλυτική ποσότητα (5% mmol) διμεθυλοάμινοπυριδίνη (DMAP). Το μίγμα τη αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα αραιώνεται με οξικό αιθυλεστέρα και εκχυλίζεται με κορεσμένο διάλυμα $NaHCO_3$, για την εξουδετέρωση της περίσσειας του ανυδρίτη. Η οργανική στοιβάδα ξηραίνεται με $MgSO_4$ και ο ακέτυλο εστέρας λαμβάνεται με απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό.

III. Ενζυμική αναγωγή

Σε 5 mg α-υποκατεστημένου-α-χλωρο-β-κετο εστέρα (25 mM) προστίθενται 980 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (200 mM, pH 6.9), 20 μl DMSO, γλυκόζη (100 mM, 18 mg) και η αντίστοιχη κετοredουκτάση (2 mg/ml). Ακολουθεί η προσθήκη του NADPH (2.5 mM, 2 mg) και της αφυδρογονάσης της γλυκόζης (GDH, 1mg/ml). Η αντίδραση αναδεύεται στους 37 ^oC σε θερμοκυκλοποιητή και η πορεία της παρακολουθείται με αέριο χρωματογράφο έπειτα από εκχύλιση του δείγματος με οξικό αιθυλεστέρα.

Σύνθεση υποστρωμάτων

Σύνθεση α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρων

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού μεθυλεστέρα (1b)**

Η παρασκευή επιτεύχθηκε με αναγωγή με $NaBH_4$ σύμφωνα με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 50 mg του εστέρα **1a** (0.30 mmol) και 3.8 mg $NaBH_4$ (0.1 mmol). Η μετατροπή επιτεύχθηκε σε ποσοστό 100% σε μόλις 45 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώνεται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 65%. Μίγμα διαστερεομερών 48:52 (*anti:syn*)

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.16-4.26 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.28 (s.br 1H), 1.737 (s, 3H *anti*), 1.690 (s, 3H *syn*), 1,29 (d, J= 6.4Hz, 3H *anti*), 1.24 (d, J= 6.3 Hz 3H *syn*)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 171.6, 171.4, 74.0, 72.3, 72.0, 71.3, 53.43, 53.39, 23.3, 22.3, 17.6, 17.4

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (2b)**

Η παρασκευή επιτεύχθηκε με αναγωγή με $NaBH_4$ σύμφωνα με τη γενική μέθοδο Ι. Χρησιμοποιήθηκαν 30 mg του εστέρα **2a** (0.17 mmol) και 2.1 mg $NaBH_4$ (0.06 mmol). Η μετατροπή επιτεύχθηκε σε ποσοστό 100% σε μόλις 40 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης απομονώνεται χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Απόδοση 82%. Μίγμα διαστερεομερών 46:54 (*anti:syn*)

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.16-4.30 (m, 3H anti-syn) 2.26 (s.br 1H), 1.73 (s, 3H *anti*), 1.69 (s, 3H *syn*), 1.13-1.34 (m, 6H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 170.9, 170.7, 73.9, 72.1, 71.8, 71.3, 62.4, 62.3, 23.0, 22.2, 17.4, 17.3, 13.9

Σύνθεση του **2-φθορο-2-χλωρο-3-υδροξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (4b)**

Η παρασκευή επιτεύχθηκε με αναγωγή με $NaBH_4$ σύμφωνα με τη γενική μέθοδο I. Χρησιμοποιήθηκαν 40 mg του εστέρα **4a** (0.22 mmol) και 2.8 mg $NaBH_4$ (0.07 mmol). Στη συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης απόλυτη αιθανόλη. Η μετατροπή επιτεύχθηκε σε ποσοστό 100% σε μόλις 40 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hexane/EtOAc v/v 35:1). Απόδοση 62%. Μίγμα διαστερεομερών 46:54 (anti:syn)

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.25-4.40 (m, 3H), 2.66 και 2.23 (s.br 1H), 1.35-1.46 (m, 6H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 165.5, 165.2, 107.6, 105.9, 105.6, 103.8, 72.0, 71.9, 71.3, 71.1, 63.6, 63.5, 16.42, 16.40, 15.8, 15.7, 14.04, 14.03

^{19}F NMR (470MHz; CDCl3; Me4Si): δ -138.00 (d, J=19.4Hz *anti*), -127.73 (d, J=11.9Hz *syn*)

Σύνθεση του **1-χλωρο-2-υδροξυ κυκλοέξανο-1-καρβοξυλικού αιθυλεστέρα (5b)**

Η παρασκευή επιτεύχθηκε με αναγωγή με $NaBH_4$ σύμφωνα με τη γενική μέθοδο I. Χρησιμοποιήθηκαν 40 mg του εστέρα **5a** (0.21 mmol) και 2.7 mg $NaBH_4$ (0.07 mmol). Η μετατροπή επιτεύχθηκε σε ποσοστό 100% σε μόλις 40 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hexane/EtOAc v/v 35:1). Απόδοση 70%.

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.27 (q, J= 7.1Hz, 2H), 4.02-4.06 (m, 1H), 1.53-2.32 (m, 8H), 1.32 (t, J= 7.1Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 171.2, 75.5, 72.3, 62.6, 62.3, 35.3, 29.7, 23.2, 20.1, 14.1, 14.0

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ πεντανοϊκού μεθυλεστέρα (7b)**

Η παρασκευή επιτεύχθηκε με αναγωγή με $NaBH_4$ σύμφωνα με τη γενική μέθοδο I. Χρησιμοποιήθηκαν 40 mg του εστέρα **7a** (0.22 mmol) και 2.8 mg $NaBH_4$ (0.07 mmol). Η μετατροπή επιτεύχθηκε σε ποσοστό 100% σε μόλις 30 λεπτά. Το προϊόν της

αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hexane/EtOAc v/v 40:1). Απόδοση 76%. Μίγμα διαστερεομερών 36:64 (*anti:syn*)

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 3.85-3.92 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 1.73 (s, 3H anti), 1.70 (s, 3H syn), 1,36-1.58 και 1.77-1.79 (m, 2H), 1.05 (t, J= 7.3Hz, 3H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 171.7, 171.4, 77.9, 77.6, 73.9, 71.3, 53.4, 24.9, 24.4, 23.0, 22.6, 11.1, 11.0

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-υδροξυ φαινυλοπροπιονικού μεθυλεστέρα (3b)**

Η παρασκευή επιτεύχθηκε με αναγωγή με $NaBH_4$ σύμφωνα με τη γενική μέθοδο I. Χρησιμοποιήθηκαν 30 mg του εστέρα **3a** (0.13 mmol) και 1.7 mg $NaBH_4$ (0.04 mmol). Η μετατροπή επιτεύχθηκε σε ποσοστό 100% σε μόλις 45 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Hexane/EtOAc v/v 40:1). Απόδοση 70%. Μίγμα διαστερεομερών 46:54

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 7.32-7.44 (m, 5H), 5.21 (s, 1H), 3.82 (s, 1.4H), 3.80 (s, 1.6H), 2.80 (s.br 1H), 1.66 (s, 1.6H), 1.60 (s, 1.8H)

^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 171.5, 171.1, 137.5, 137.2, 128.8, 128.6, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9, 77.93, 77.89, 73.6, 69.7, 53.45, 53.43, 22.9, 22.0

Προστασία α-υποκατεστημένων-α-χλωρο-β-υδροξυ εστέρων με οξικό ανυδρίτη

Σύνθεση του **2-μεθυλο-2-χλωρο-3-ακετοξυ βουτανοϊκού αιθυλεστέρα (2c)**

Η προστασία του υδρόξυ εστέρα **2b** με οξικό ανυδρίτη επιτεύχθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο II. Χρησιμοποιήθηκαν 15 mg του υδρόξυ εστέρα **2b** (0.083 mmol), 16 μl οξικού ανυδρίτη (0.167 mmol), 46.1 mg K_2CO_3 (0.33 mmol) και καταλυτική ποσότητα DMAP. Η μετατροπή επιτεύχθηκε σε ποσοστό 100% σε 24 ώρες. Το προϊόν της αντίδρασης καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (Petr. Ether/EtOAc v/v 40:1). Απόδοση 80%. Μίγμα διαστερεομερών 44:56 (*anti:syn*)

^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 5.38-5.46 (m, 1H), 4.17-4.29 (m, 2H), 2.07 (s, 3H syn) 2.03 (s, 3H anti), 1.72 (s, 3H anti), 1.71 (s, 3H syn), 1.24-1.35 (m, 6H)

Ενζυμική Αναγωγή

Αναγωγή του υδροξυ εστέρα **4b** με την κετορεδουκτάση 131

Η αναγωγή του εστέρα **4b** με την κετορεδουκτάση 131 επιτεύχθηκε σύμφωνα με την μέθοδο ΙΙΙ. Το προϊόν της αντίδρασης σχηματίστηκε με εξαιρετική απόδοση χωρίς περαιτέρω καθαρισμό και με εξαιρετική διαστερεοεκλεκτικότητα (>99% *de*, 10% *ee*, >99% απόδοση).

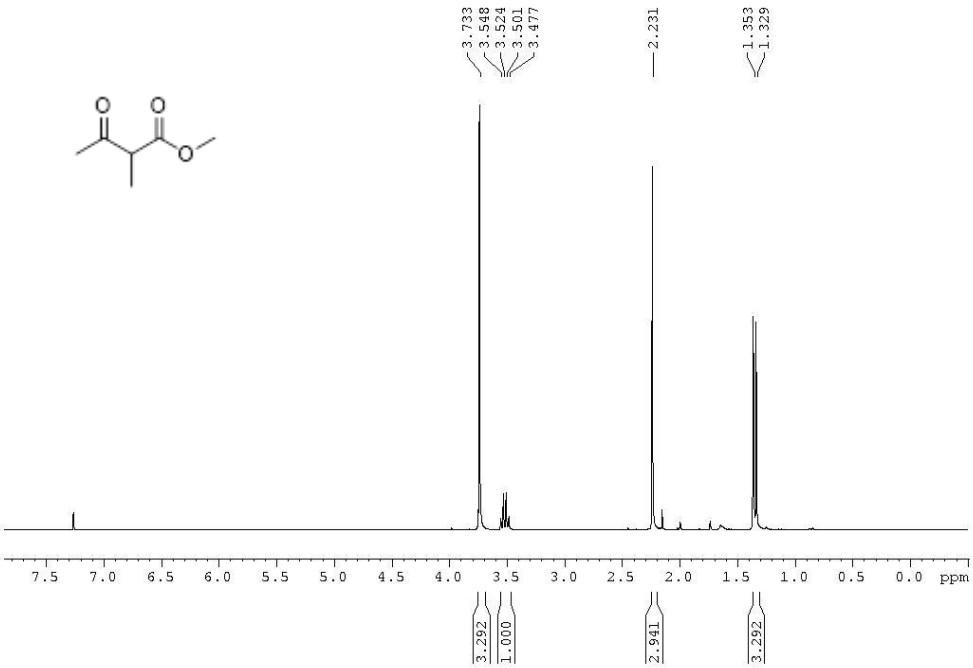
^{1}H NMR (300MHz; $CDCl_3$; Me_4Si): δ 4.34-4.40 (m, 2H), 4.27-4.33 (qd, J_1= 6.1 Hz, J_2= 12.75 Hz, 1H), 2.62 (s,br 1H), 1.36-1.39 (m, 6H)

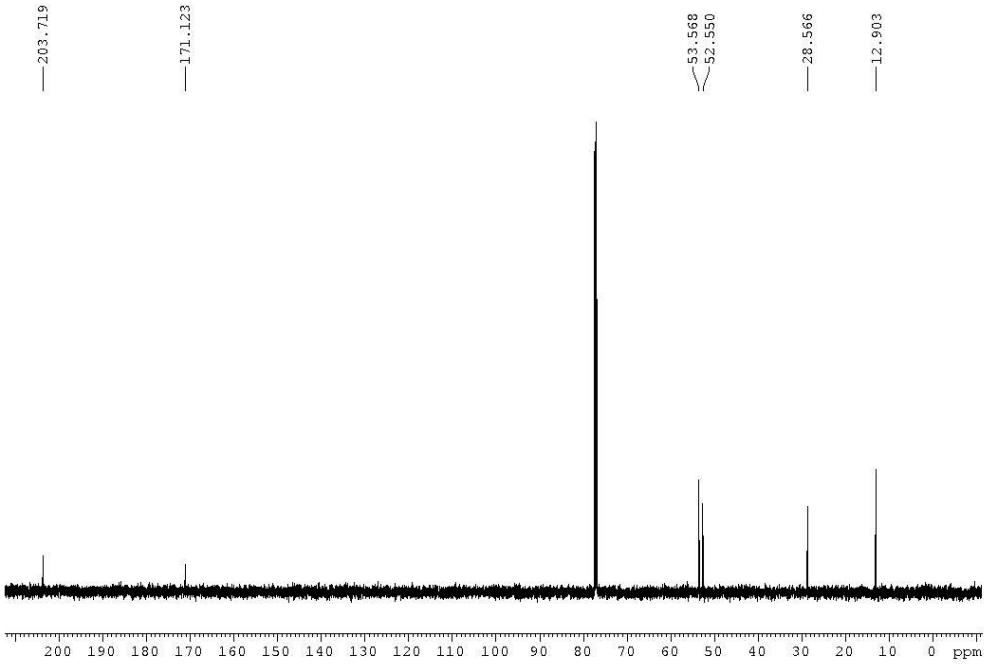
^{13}C NMR (500MHz; CDCl3; Me4Si): δ 165.4, 165.2, 107.6, 105.6, 71.3, 71.1, 63.6, 16.4, 14.0

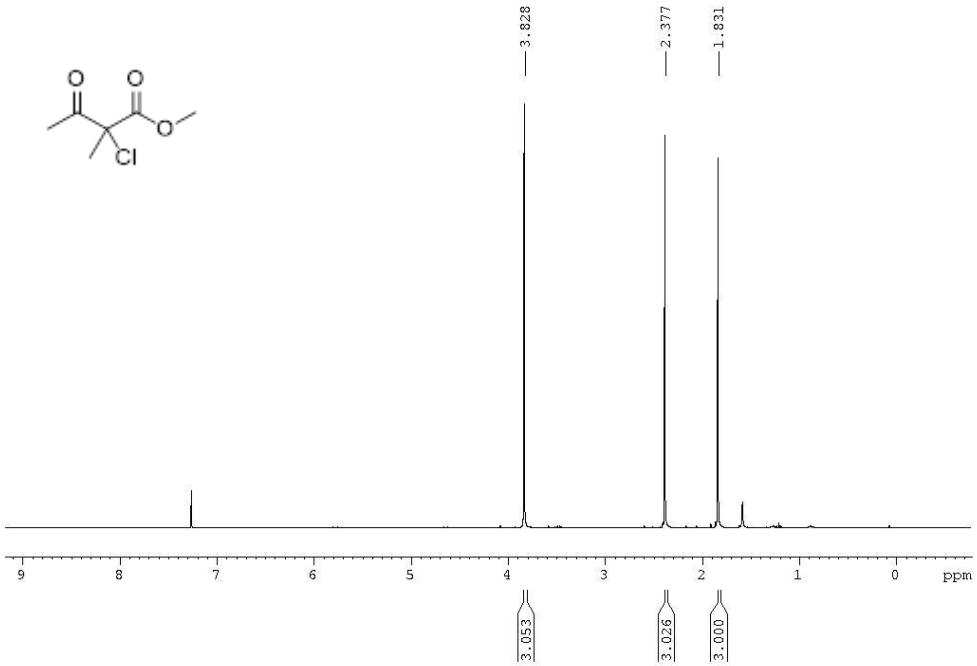
^{19}F NMR (470MHz; CDCl3; Me4Si): δ -127.73 (d, J= 11.9 Hz)

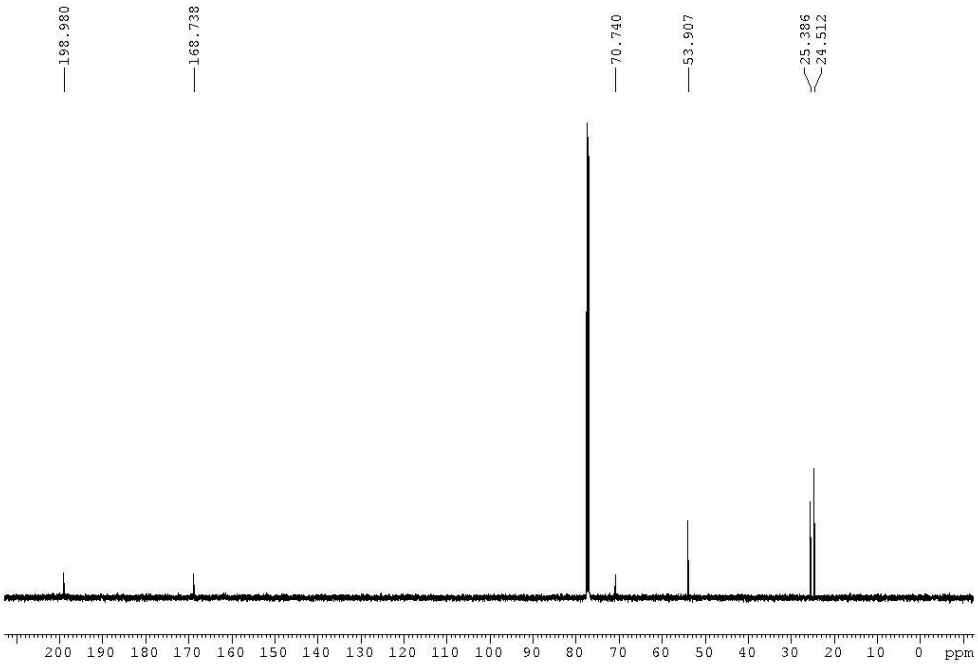
Παράρτημα

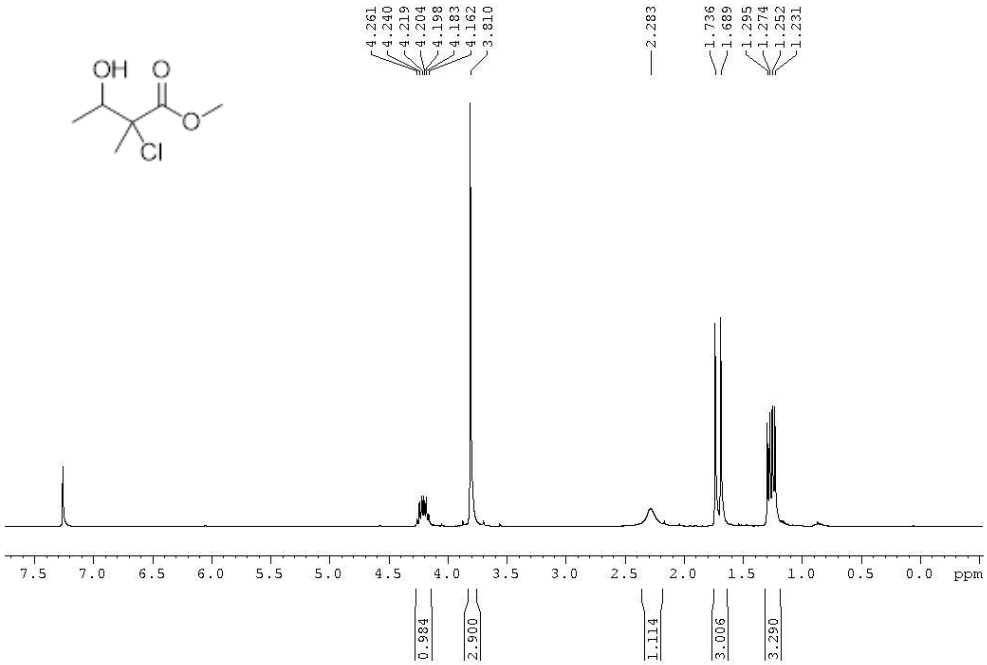
Φάσματα ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, ^{19}F-NMR

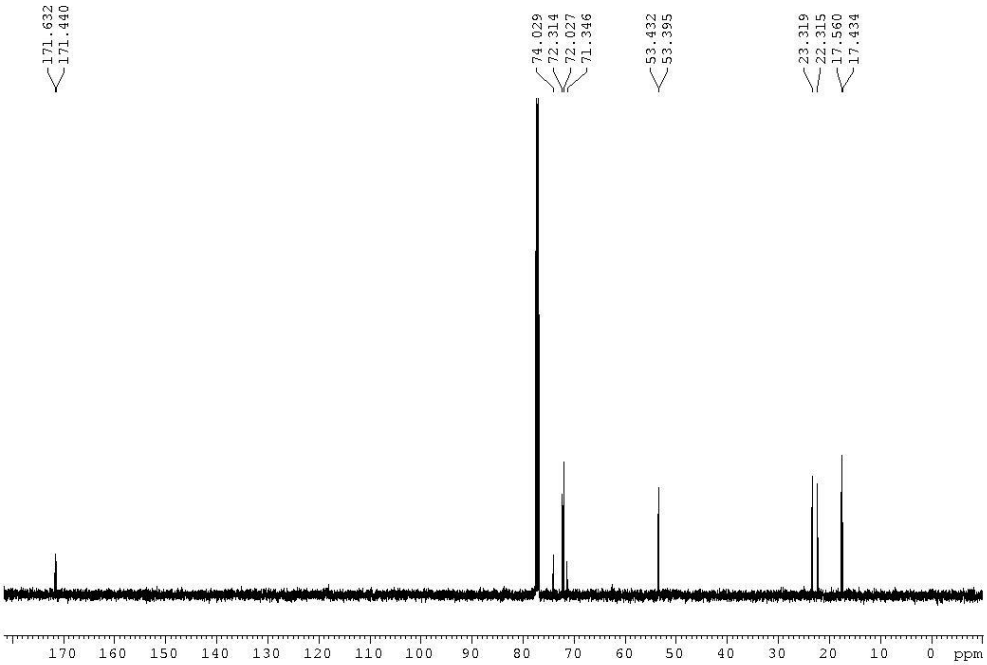

3.733
3.548
3.524
3.501
3.477
2.231
1.353
1.329
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
3.292
1.000
2.941
3.292

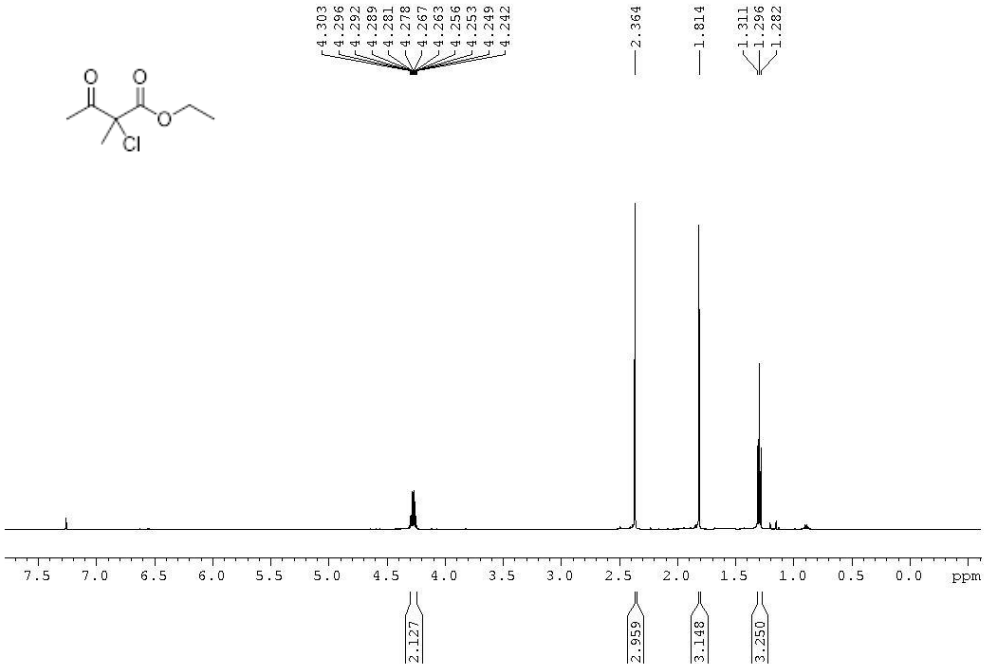

203.719
171.123
53.568
52.550
28.566
12.903
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

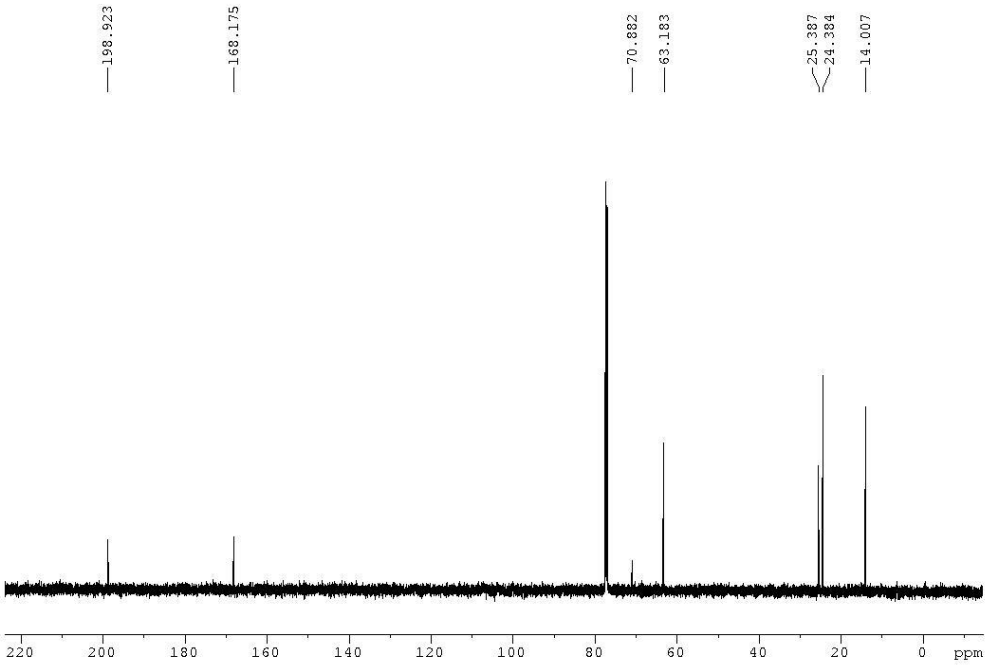

3.828
2.377
1.831
O
O
O
Cl
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
3.053
3.026
3.000

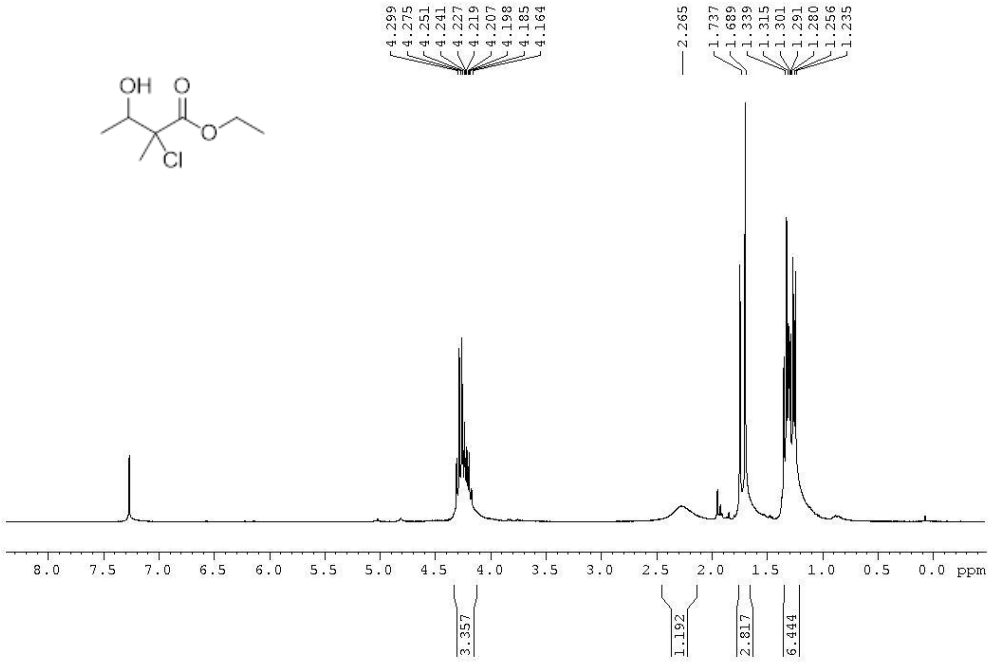

198.980
168.738
70.740
53.907
25.386
24.512
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

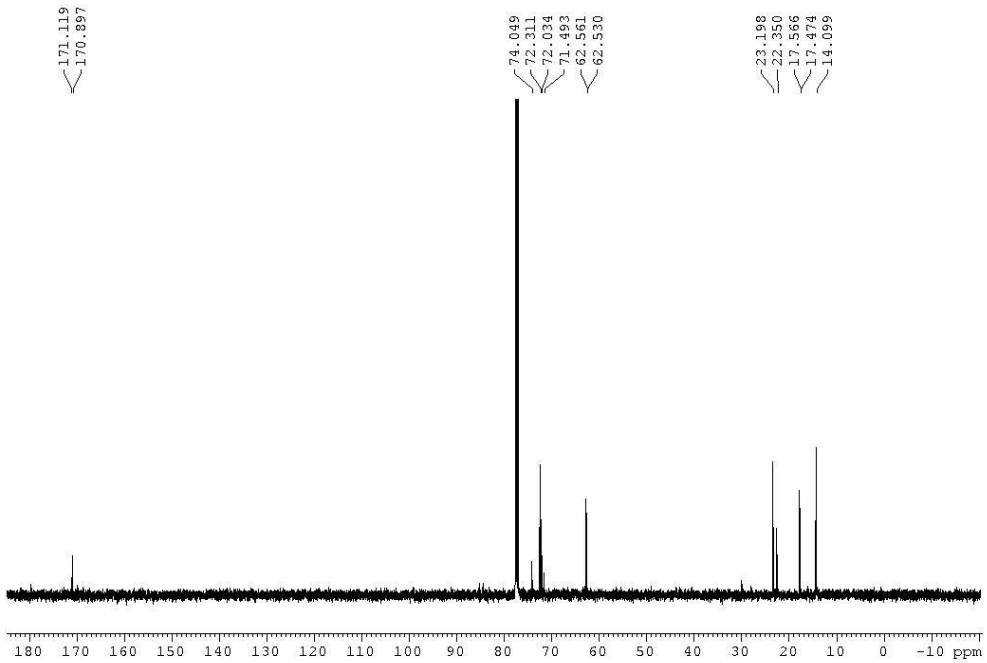

OH
O
O
Cl
4.261
4.240
4.219
4.204
4.198
4.183
4.162
3.810
2.283
1.736
1.689
1.295
1.274
1.252
1.231
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
0.984
2.900
1.114
3.006
3.290

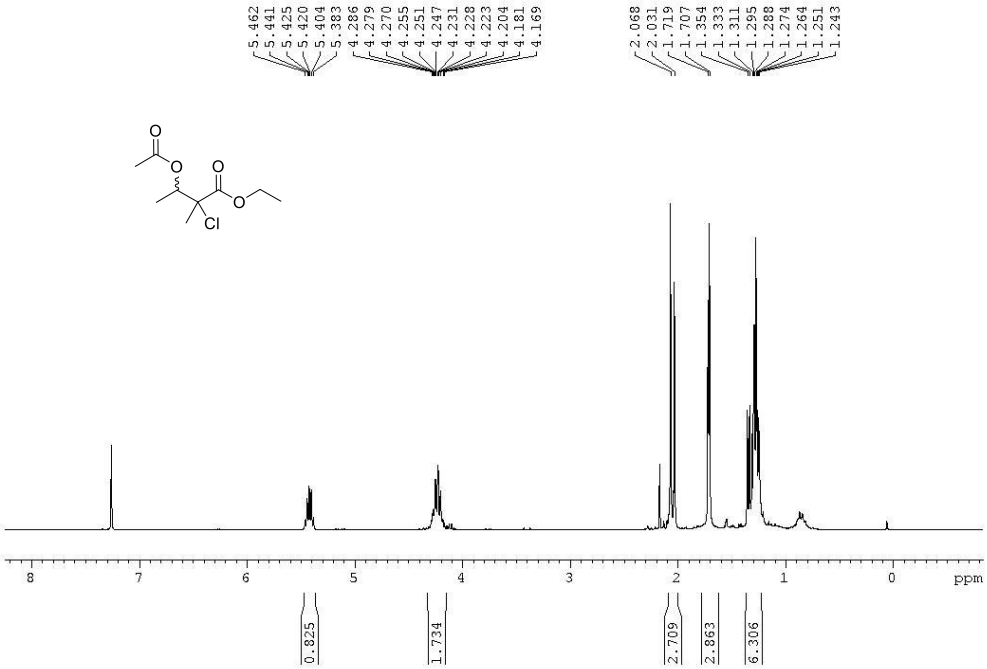

171.632
171.440
74.029
72.314
72.027
71.346
53.432
53.395
23.319
22.315
17.560
17.434
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

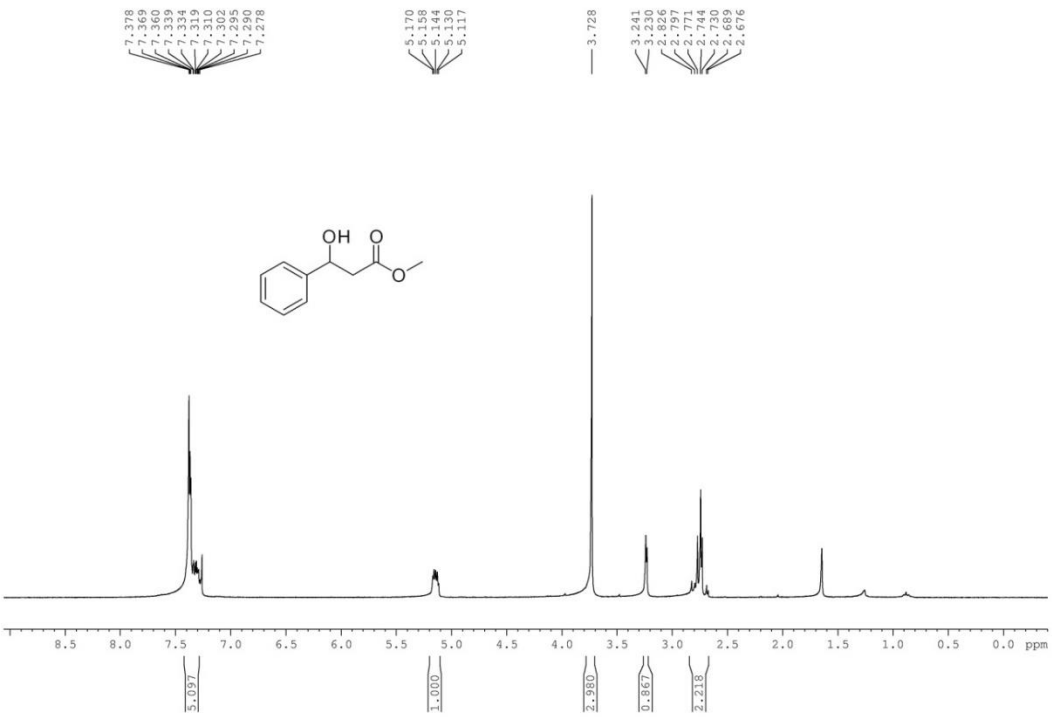

4.303
4.296
4.292
4.289
4.281
4.278
4.267
4.263
4.256
4.253
4.249
4.242
2.364
1.814
1.311
1.296
1.282
O
O
O
Cl
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
2.127
2.959
3.148
3.250

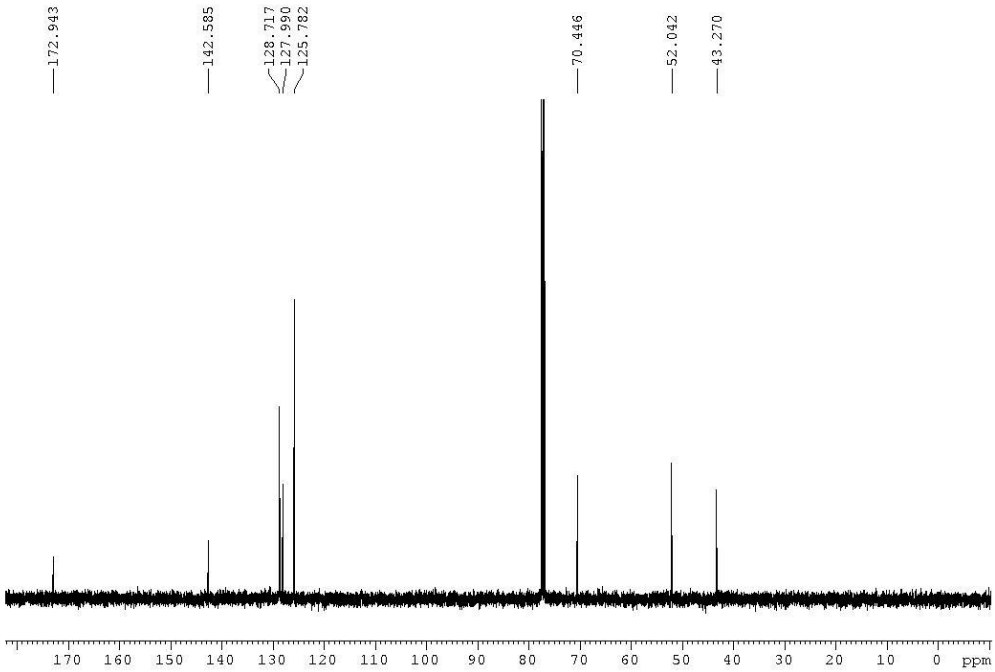

198.923
168.175
70.882
63.183
25.387
24.384
14.007
220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm

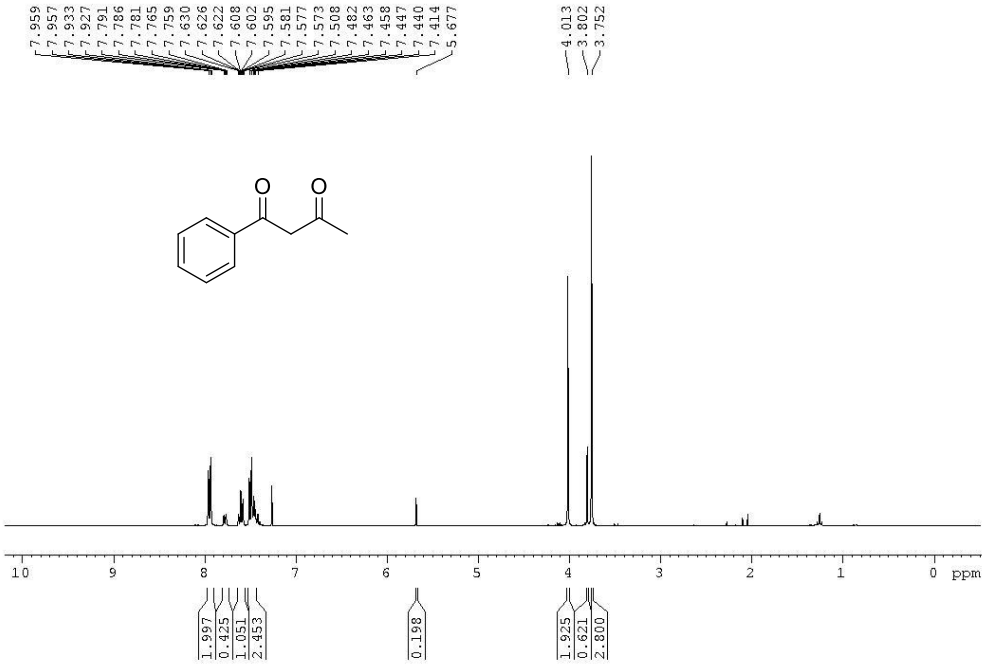

OH
O
O
Cl
4.299
4.275
4.251
4.241
4.227
4.219
4.207
4.198
4.185
4.164
2.265
1.737
1.689
1.339
1.315
1.301
1.291
1.280
1.256
1.235
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
3.357
1.192
2.817
6.444

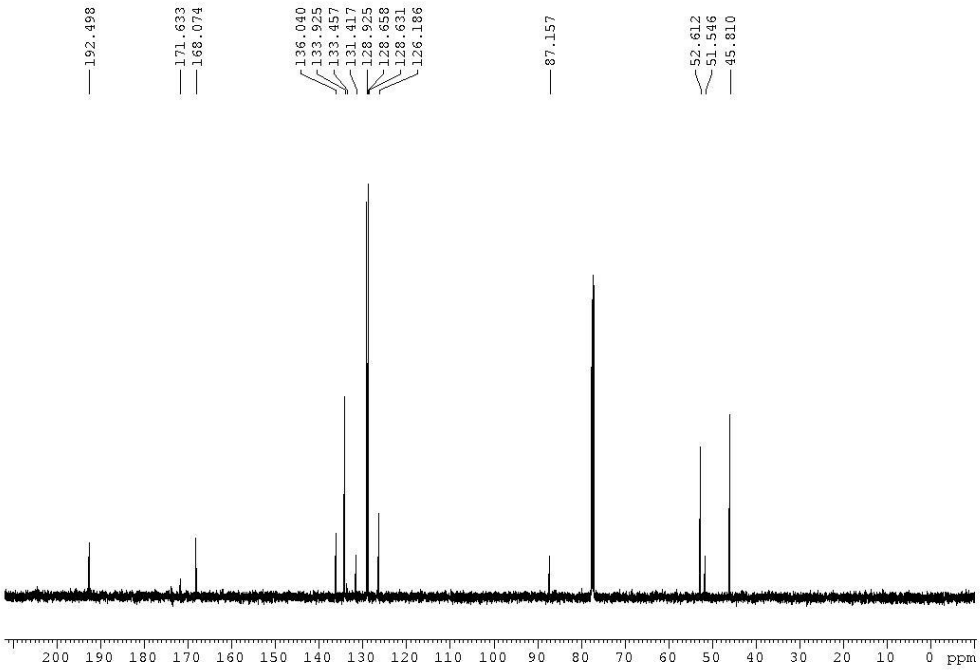

171.119
170.897
74.049
72.311
72.034
71.493
62.561
62.530
23.198
22.350
17.566
17.474
14.099
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10 ppm

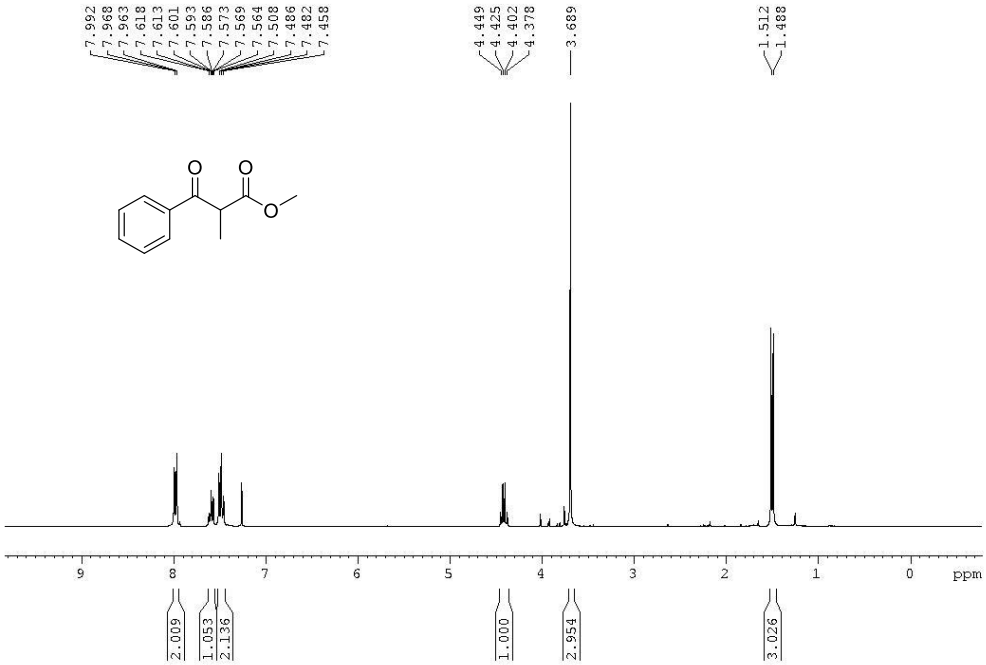

5.462
5.441
5.425
5.420
5.404
5.383
4.286
4.279
4.270
4.255
4.251
4.247
4.231
4.228
4.223
4.204
4.181
4.169
2.068
2.031
1.719
1.707
1.354
1.333
1.311
1.295
1.288
1.274
1.264
1.251
1.243
O
O
O
O
Cl
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
0.825
1.734
2.709
2.863
6.306

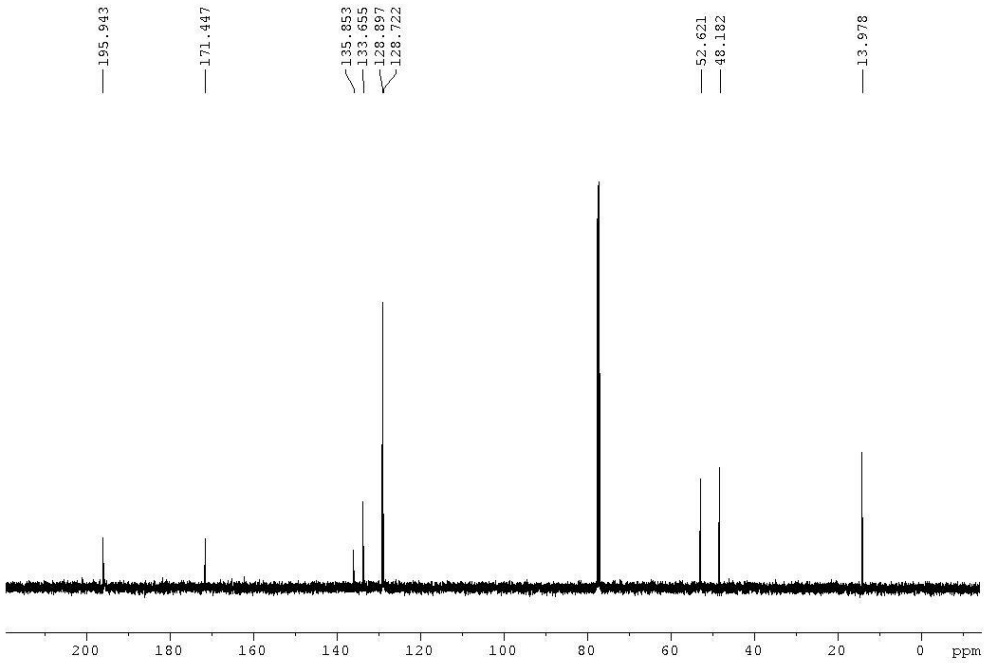

7.378
7.369
7.360
7.339
7.334
7.319
7.310
7.302
7.295
7.290
7.278
5.170
5.158
5.144
5.130
5.117
3.728
3.241
3.230
2.826
2.797
2.771
2.744
2.730
2.689
2.676
OH
O
O
8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
3.097
1.000
2.980
0.867
2.218

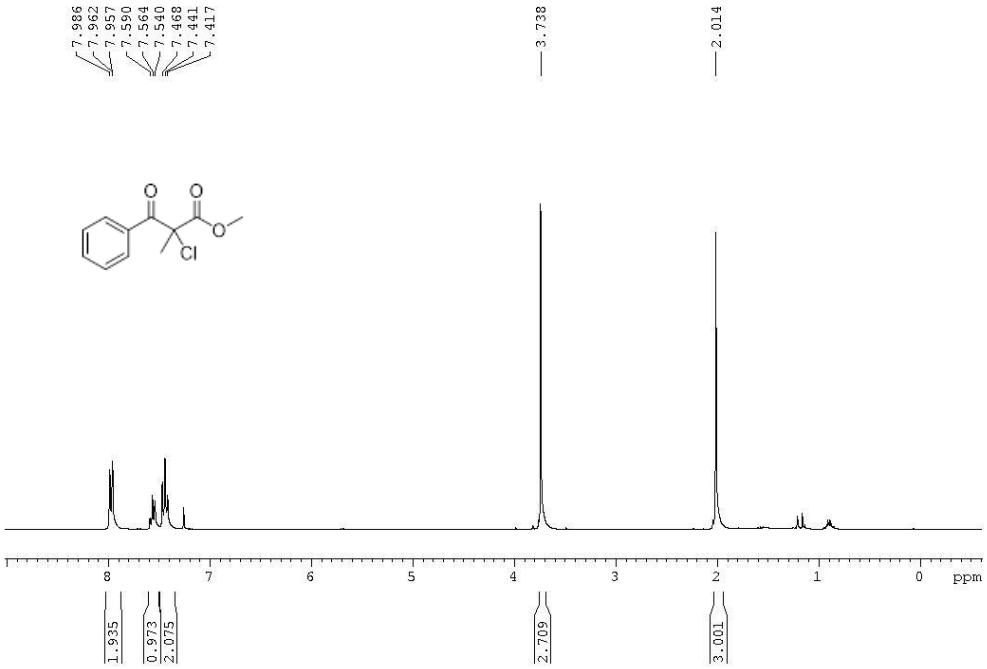

172.943
142.585
128.717
127.990
125.782
70.446
52.042
43.270
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

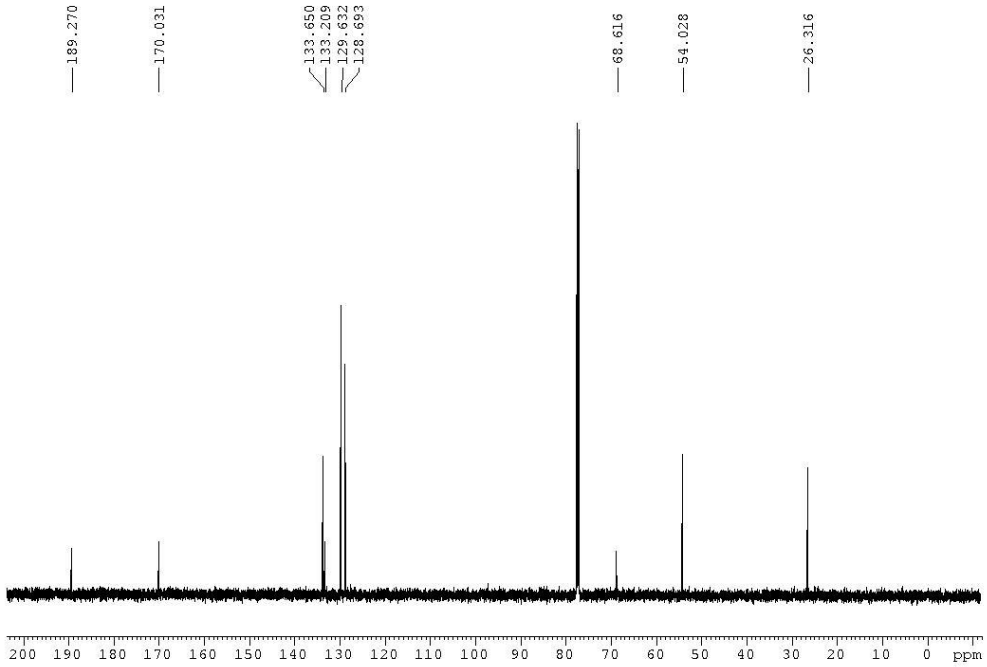

7.959
7.957
7.933
7.927
7.791
7.786
7.781
7.765
7.759
7.630
7.626
7.622
7.608
7.602
7.595
7.581
7.577
7.573
7.508
7.482
7.463
7.458
7.447
7.440
7.414
5.677
4.013
3.802
3.752
O
O
10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0 ppm
1.997
0.425
1.051
2.453
0.198
1.925
0.621
2.800

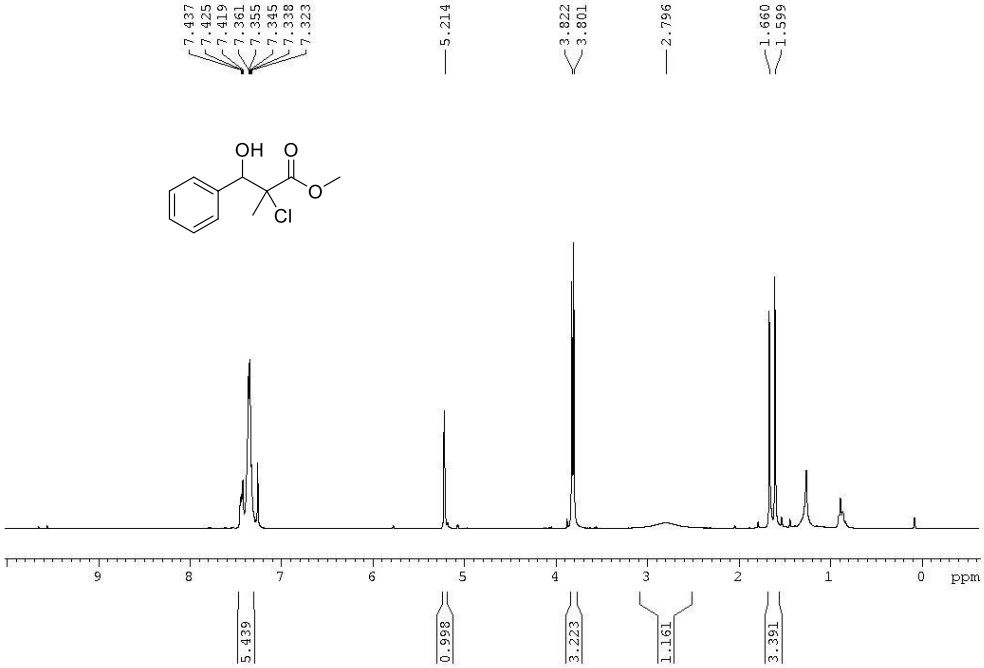

192.498
171.633
168.074
136.040
133.925
133.457
131.417
128.925
128.658
128.631
126.186
87.157
52.612
51.546
45.810
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

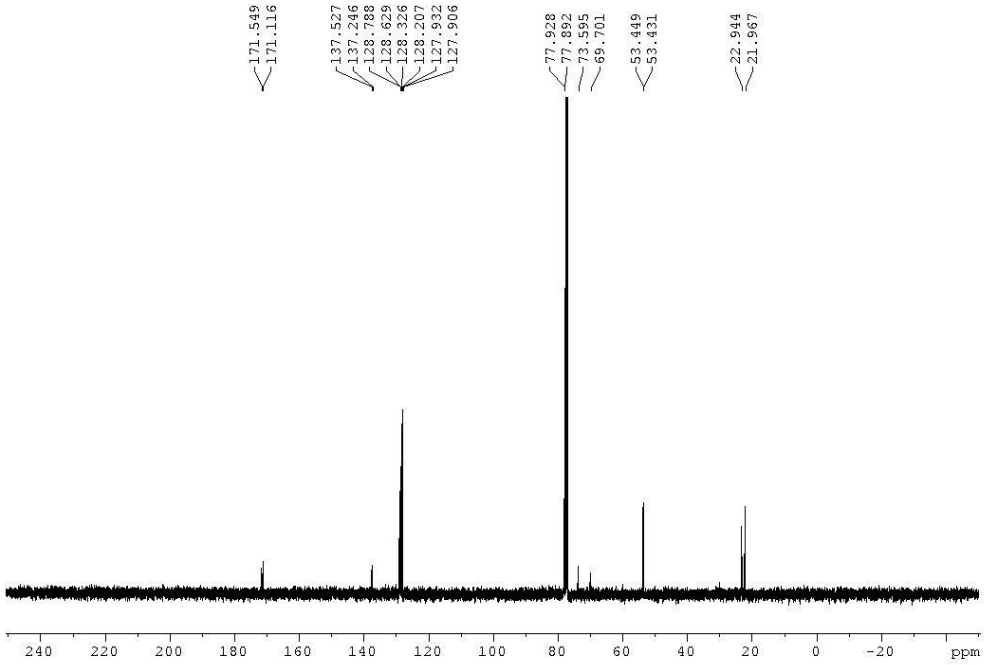

7.992
7.968
7.963
7.618
7.613
7.601
7.593
7.586
7.573
7.569
7.564
7.508
7.486
7.482
7.458
4.449
4.425
4.402
4.378
3.689
1.512
1.488
O
O
O
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
2.009
1.053
2.136
1.000
2.954
3.026

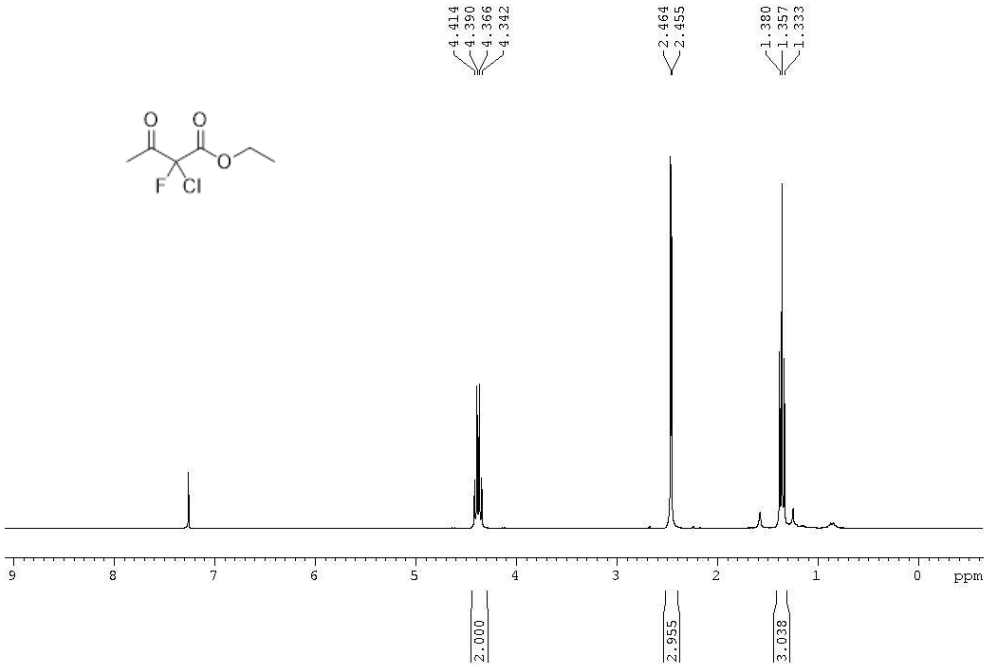

195.943
171.447
135.853
133.655
128.897
128.722
52.621
48.182
13.978
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm

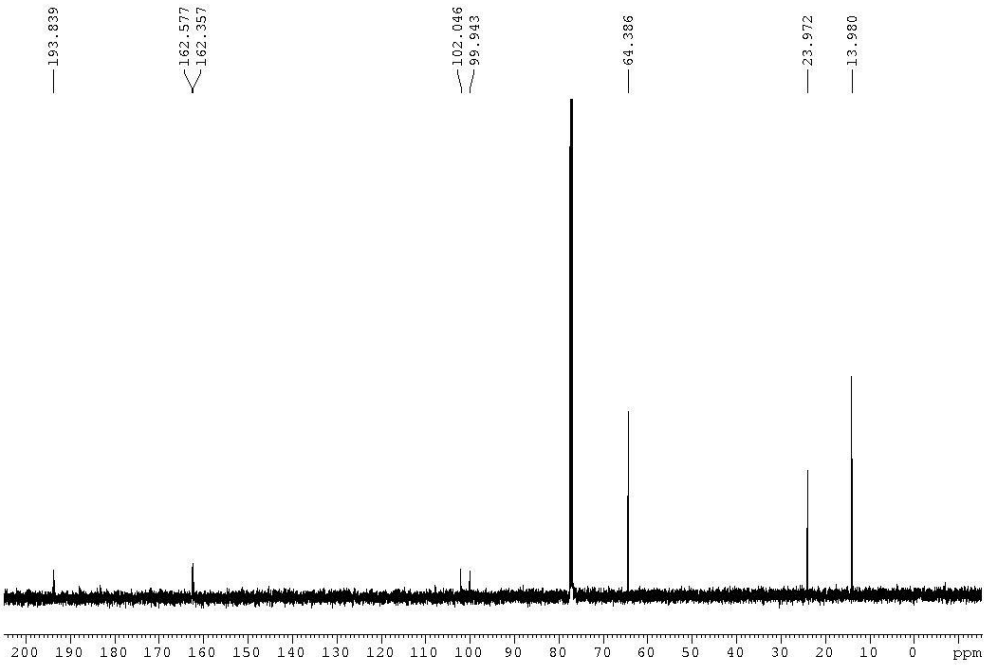

7.986
7.962
7.957
7.590
7.564
7.540
7.468
7.441
7.417
3.738
2.014
O
O
O
Cl
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.935
0.973
2.075
2.709
3.001

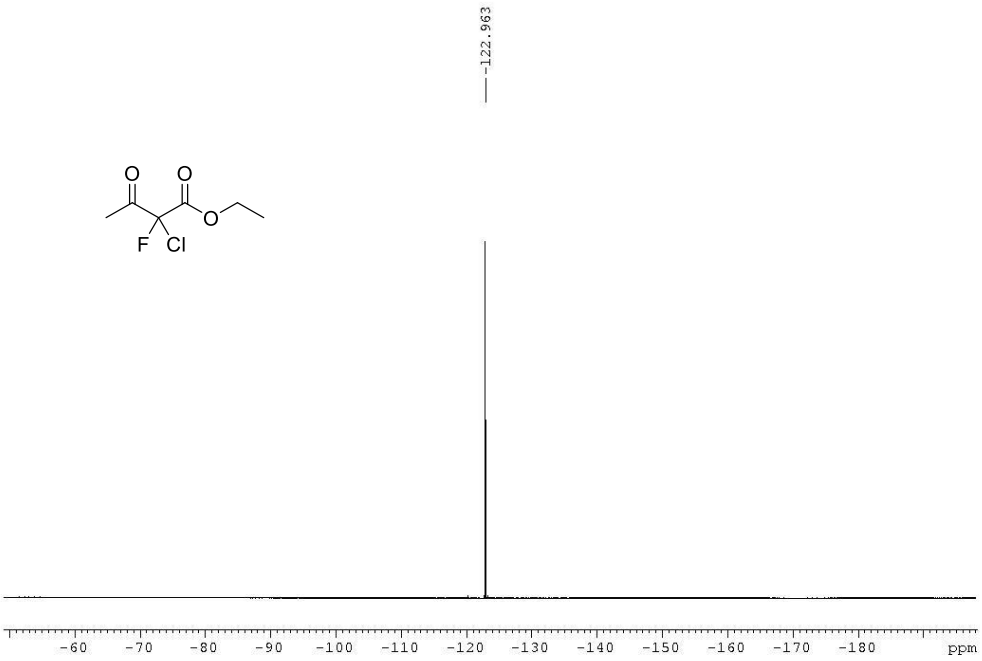

189.270
170.031
133.650
133.209
129.632
128.693
68.616
54.028
26.316
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

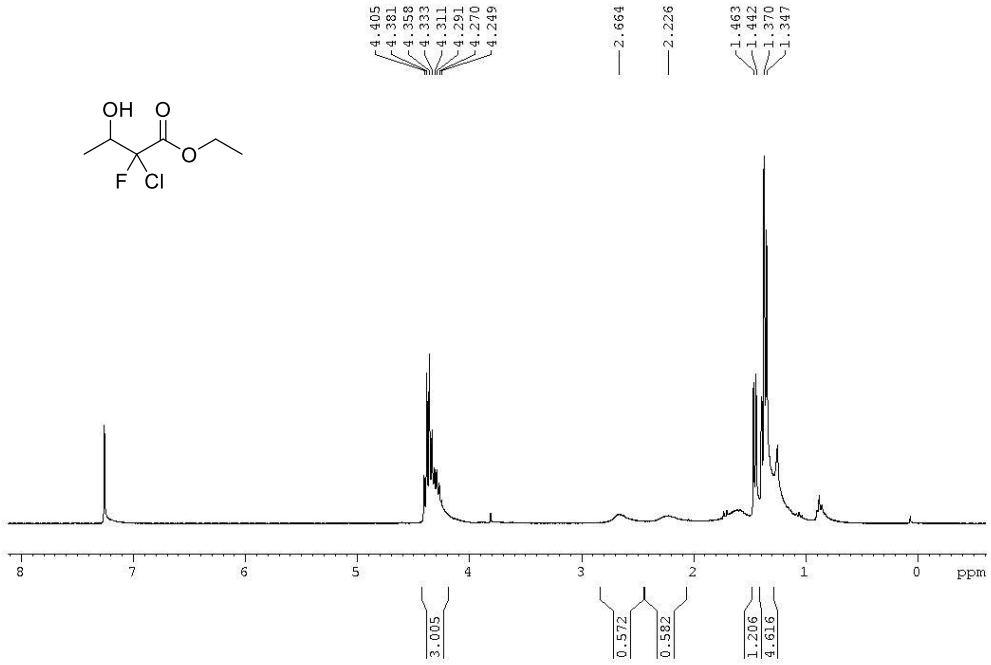

7.437
7.425
7.419
7.361
7.355
7.345
7.338
7.323
5.214
3.822
3.801
2.796
1.660
1.599
OH
O
O
Cl
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
5.439
0.998
3.223
1.161
3.391

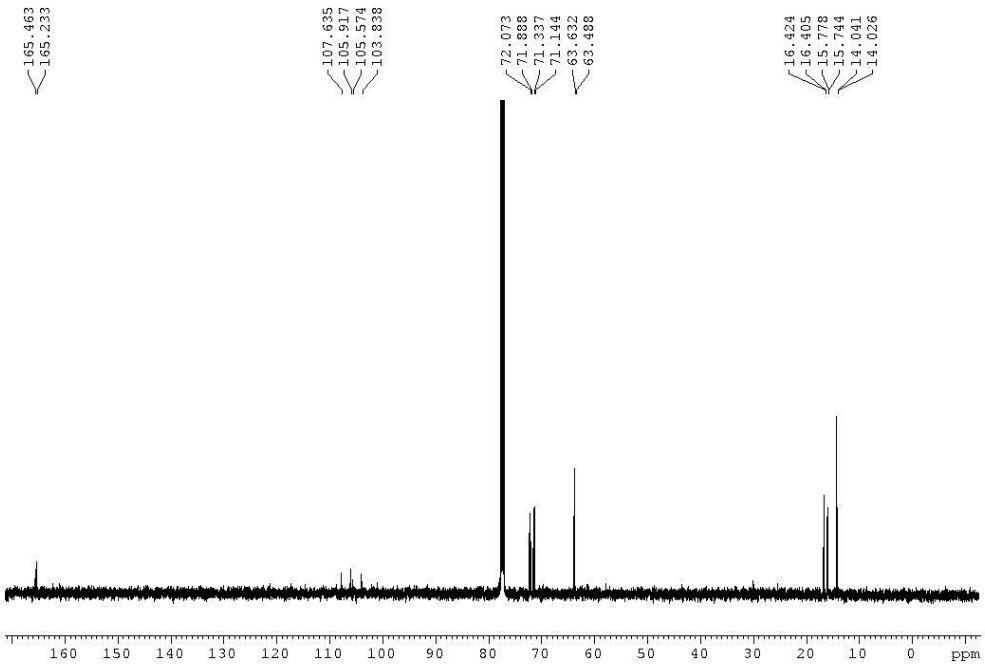

171.549
171.116
137.527
137.246
128.788
128.629
128.326
128.207
127.932
127.906
77.928
77.892
73.595
69.701
53.449
53.431
22.944
21.967
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
ppm

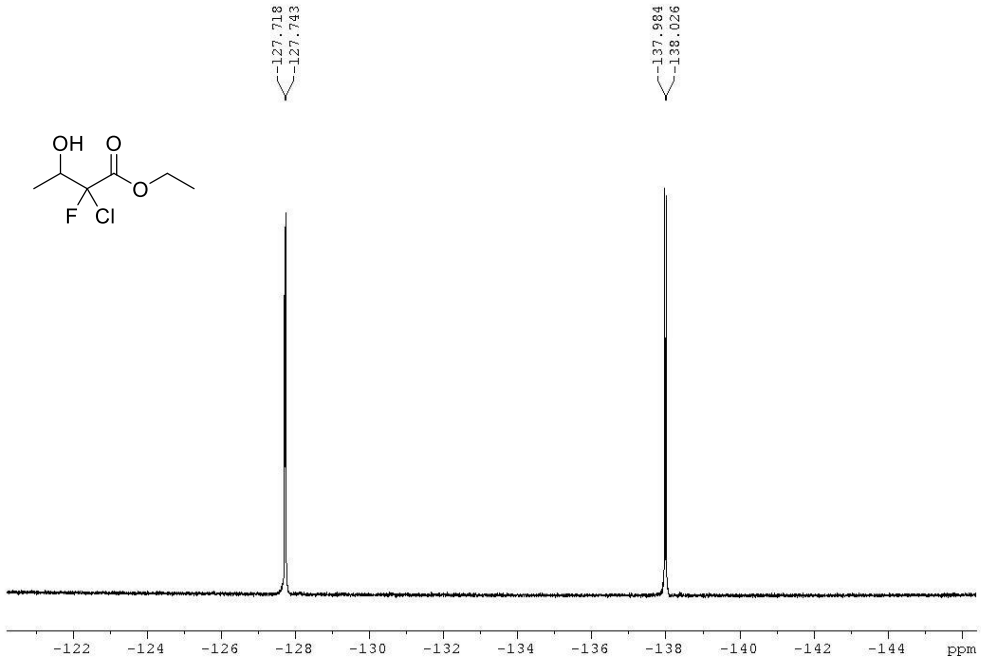

4.414
4.390
4.366
4.342
2.464
2.455
1.380
1.357
1.333
O
O
O
F
Cl
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
2.000
2.955
3.038

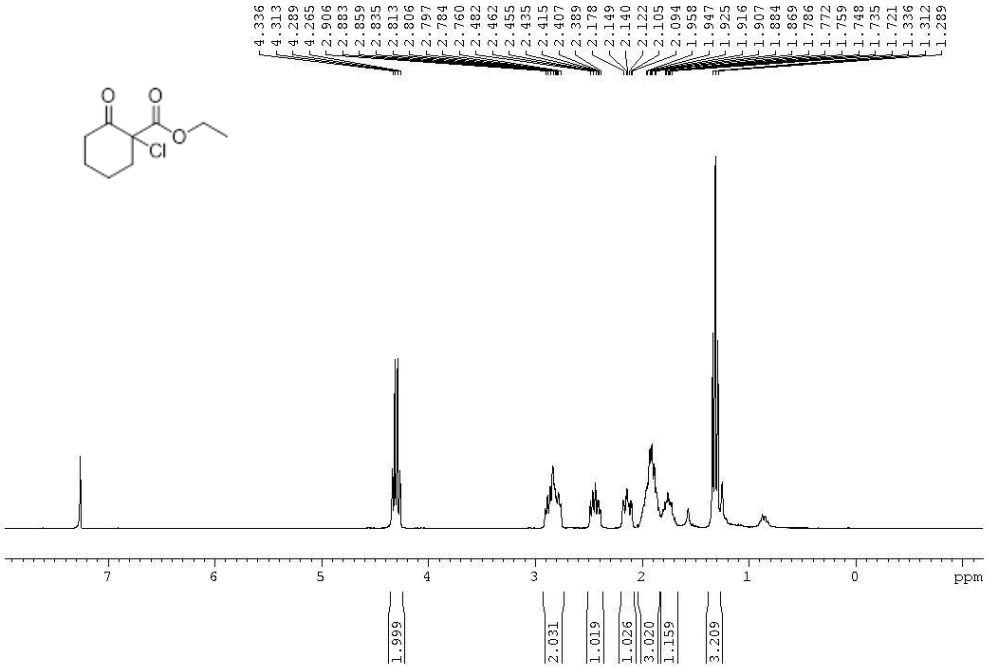

193.839
162.577
162.357
102.046
99.943
64.386
23.972
13.980
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

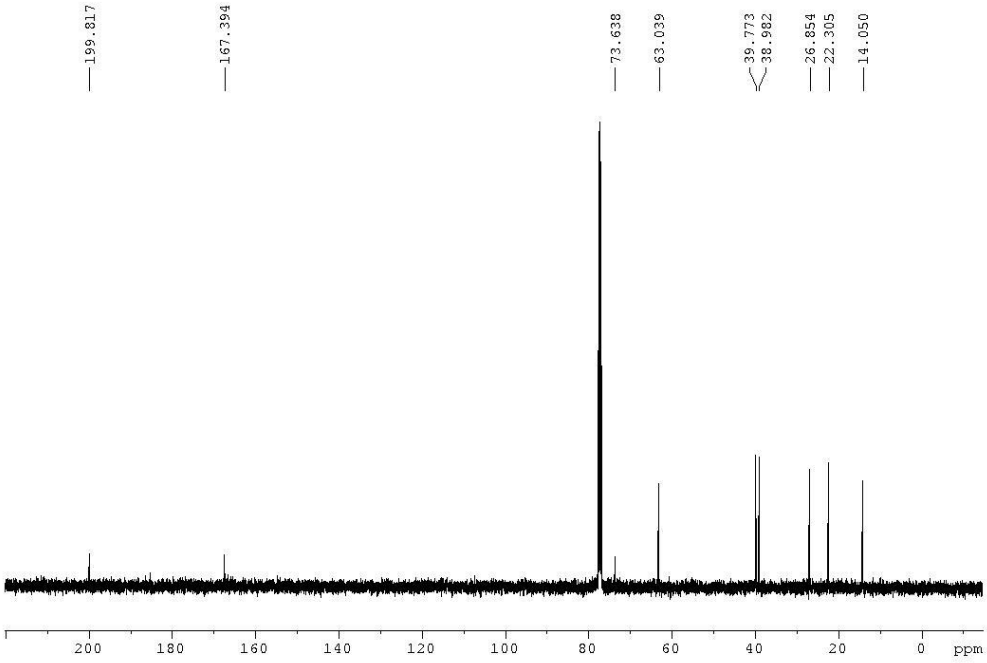

-122.963
O
O
O
F
Cl
-60
-70
-80
-90
-100
-110
-120
-130
-140
-150
-160
-170
-180
ppm

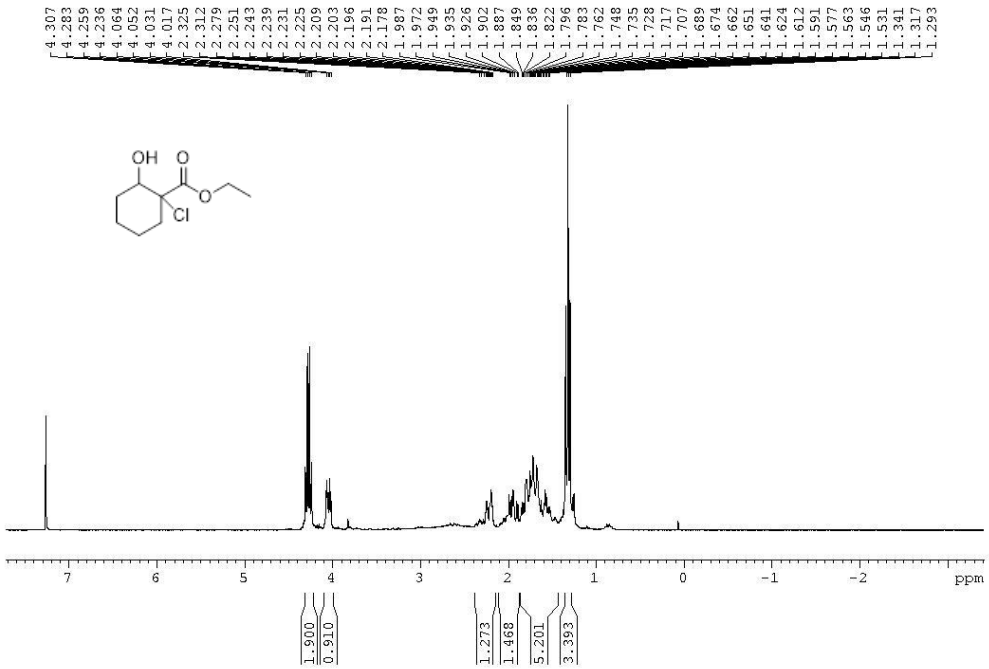

OH
O
O
F
Cl
4.405
4.381
4.358
4.333
4.311
4.291
4.270
4.249
2.664
2.226
1.463
1.442
1.370
1.347
3.005
0.572
0.582
1.206
4.616
ppm

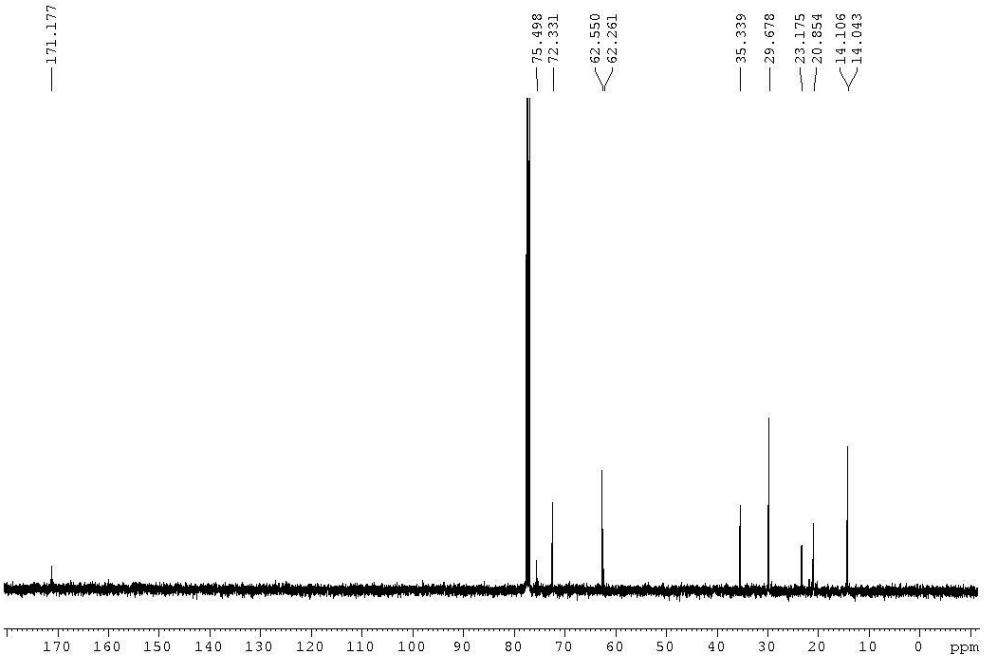

165.463
165.233
107.635
105.917
105.574
103.838
72.073
71.888
71.337
71.144
63.632
63.488
16.424
16.405
15.778
15.744
14.041
14.026
ppm

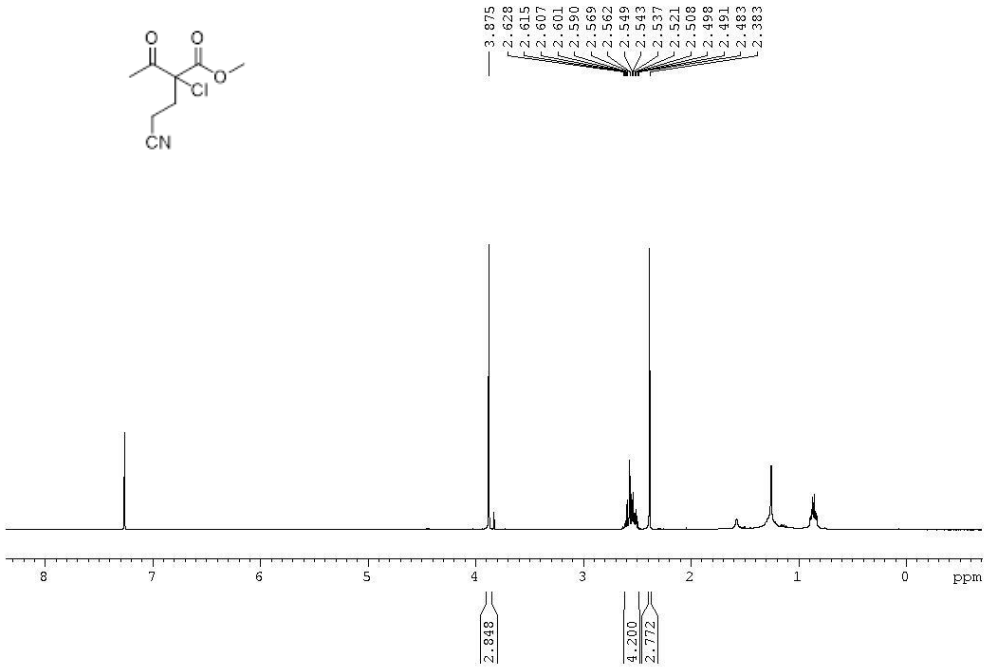

-127.718
-127.743
-137.984
-138.026
OH
O
O
F
Cl
-122
-124
-126
-128
-130
-132
-134
-136
-138
-140
-142
-144
ppm

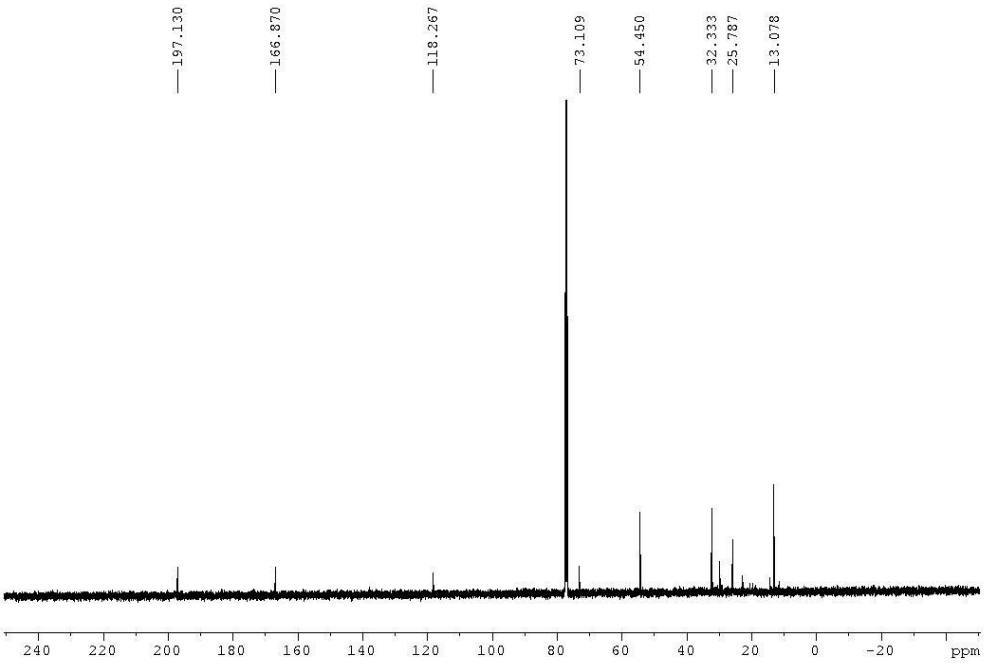

4.336
4.313
4.289
4.265
2.906
2.883
2.859
2.835
2.813
2.806
2.797
2.784
2.760
2.482
2.462
2.455
2.435
2.415
2.407
2.389
2.178
2.149
2.140
2.122
2.105
2.094
1.958
1.947
1.925
1.916
1.907
1.884
1.869
1.786
1.772
1.759
1.748
1.735
1.721
1.336
1.312
1.289
O
O
O
Cl
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.999
2.031
1.019
1.026
3.020
1.159
3.209

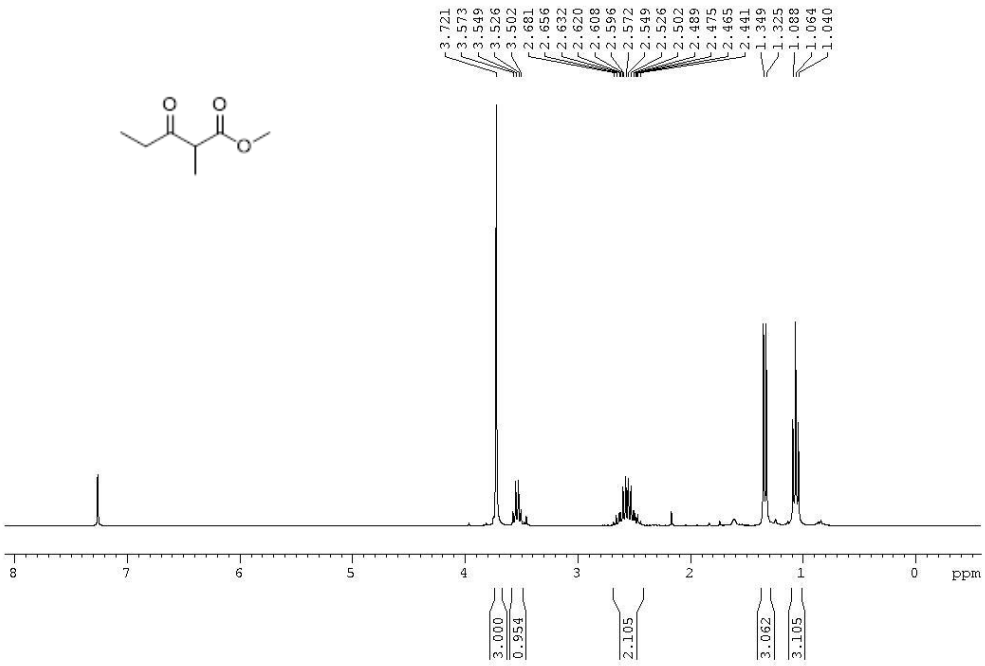

199.817
167.394
73.638
63.039
39.773
38.982
26.854
22.305
14.050
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm

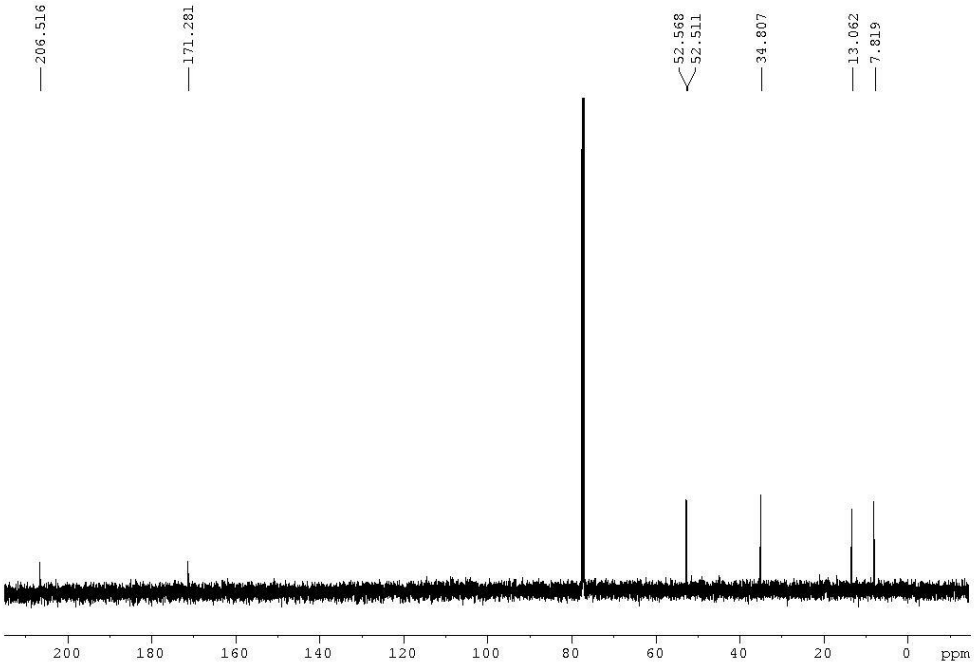

4.307
4.283
4.259
4.236
4.064
4.052
4.031
4.017
2.325
2.312
2.279
2.251
2.243
2.239
2.231
2.225
2.209
2.203
2.196
2.191
2.178
1.987
1.972
1.949
1.935
1.926
1.902
1.887
1.849
1.836
1.822
1.796
1.783
1.762
1.748
1.735
1.728
1.717
1.707
1.689
1.674
1.662
1.651
1.641
1.624
1.612
1.591
1.577
1.563
1.546
1.531
1.341
1.317
1.293
OH
O
O
Cl
7
6
5
4
3
2
1
0
-1
-2
ppm
1.900
0.910
1.273
1.468
5.201
3.393

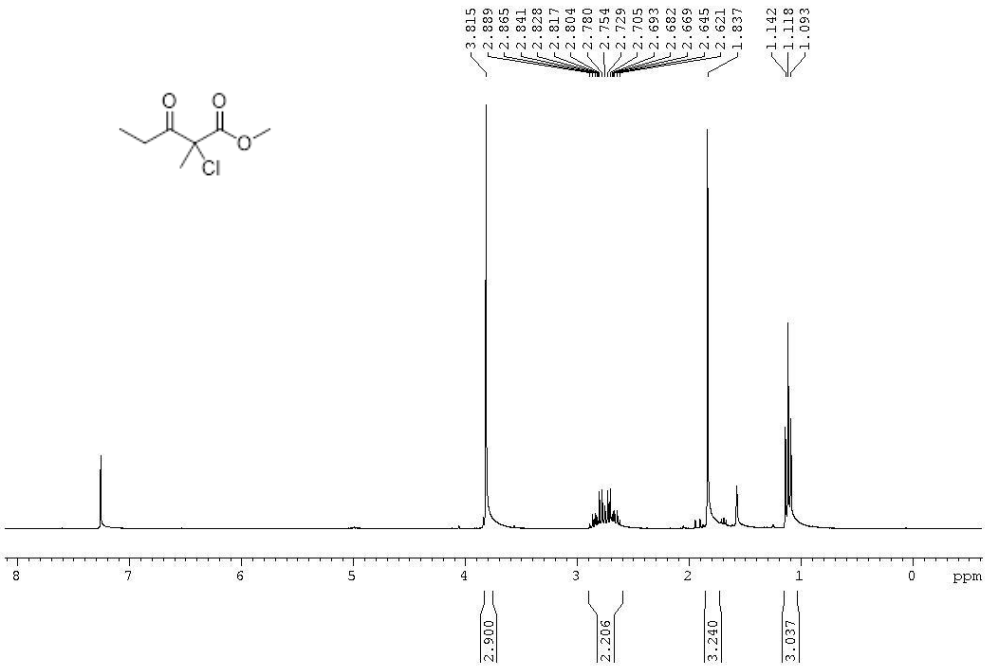

171.177
75.498
72.331
62.550
62.261
35.339
29.678
23.175
20.854
14.106
14.043
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

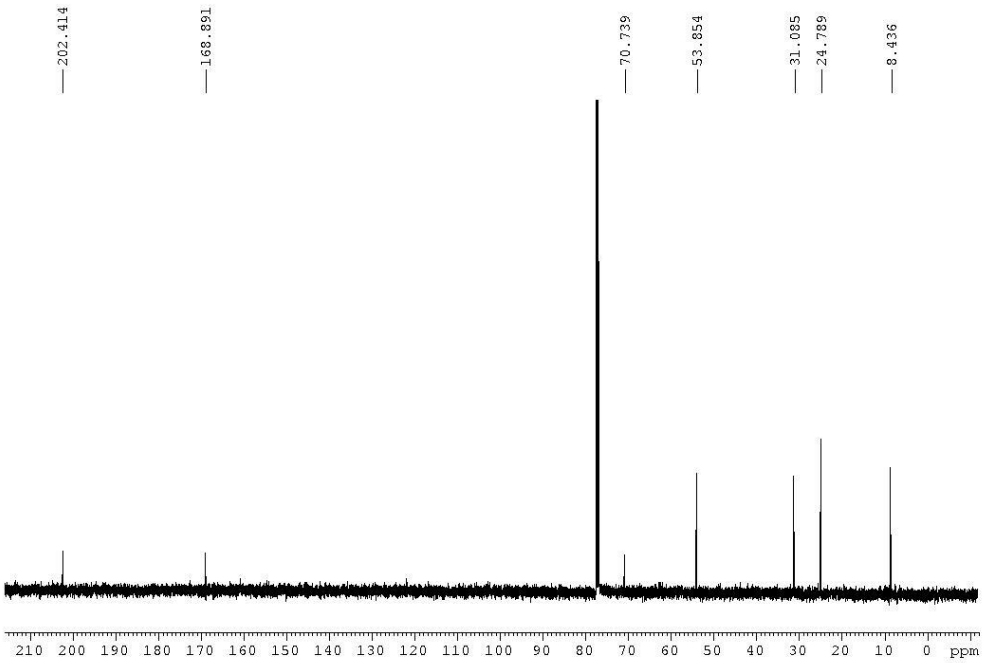

3.875
2.628
2.615
2.607
2.601
2.590
2.569
2.562
2.549
2.543
2.537
2.521
2.508
2.498
2.491
2.483
2.383
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
2.848
4.200
2.772

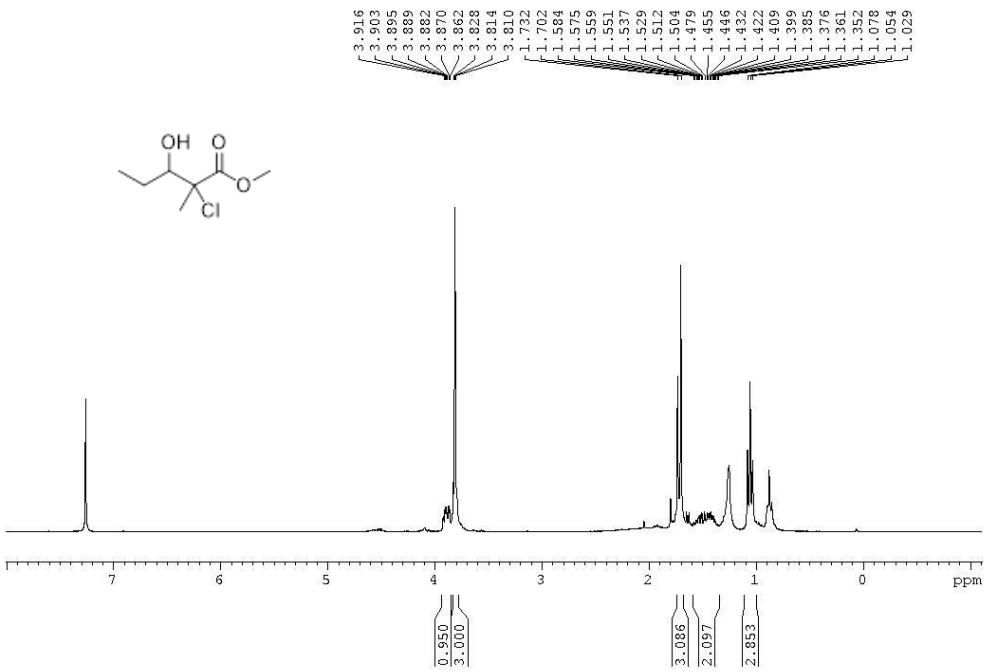

197.130
166.870
118.267
73.109
54.450
32.333
25.787
13.078
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
ppm

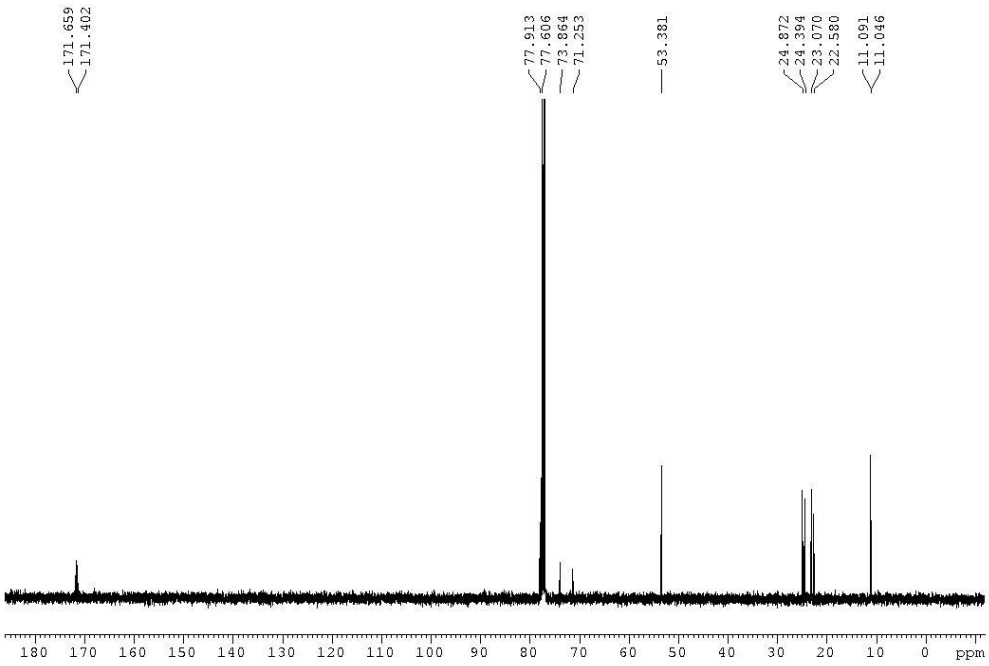

3.721
3.573
3.549
3.526
3.502
2.681
2.656
2.632
2.620
2.608
2.596
2.572
2.549
2.526
2.502
2.489
2.475
2.465
2.441
1.349
1.325
1.088
1.064
1.040
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
3.000
0.954
2.105
3.062
3.105

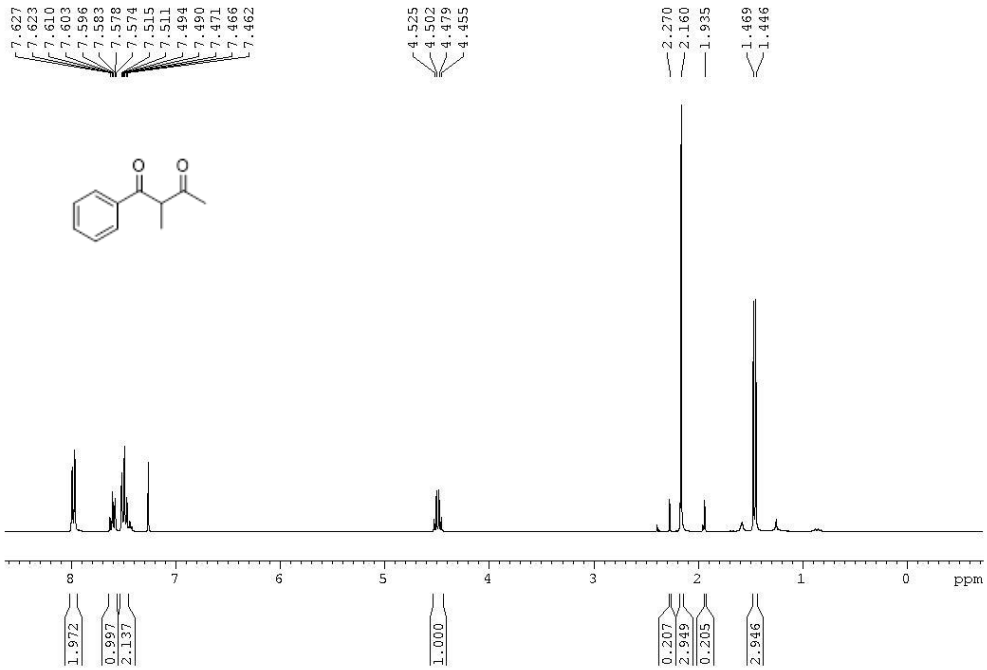

206.516
171.281
52.568
52.511
34.807
13.062
7.819
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm

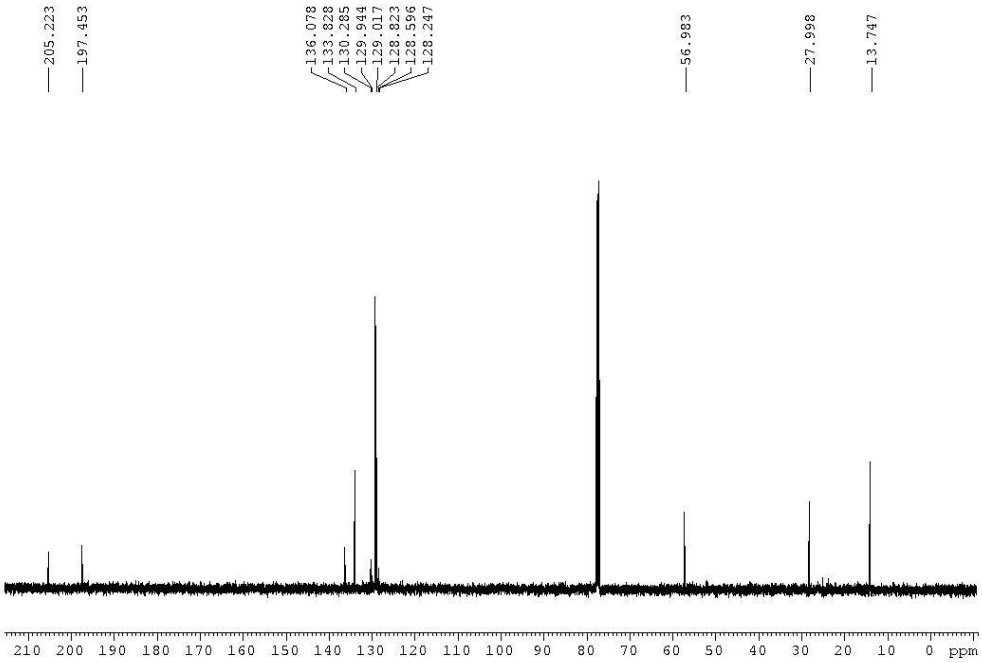

3.815
2.889
2.865
2.841
2.828
2.817
2.804
2.780
2.754
2.729
2.705
2.693
2.682
2.669
2.645
2.621
1.837
1.142
1.118
1.093
O
O
O
Cl
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
2.900
2.206
3.240
3.037

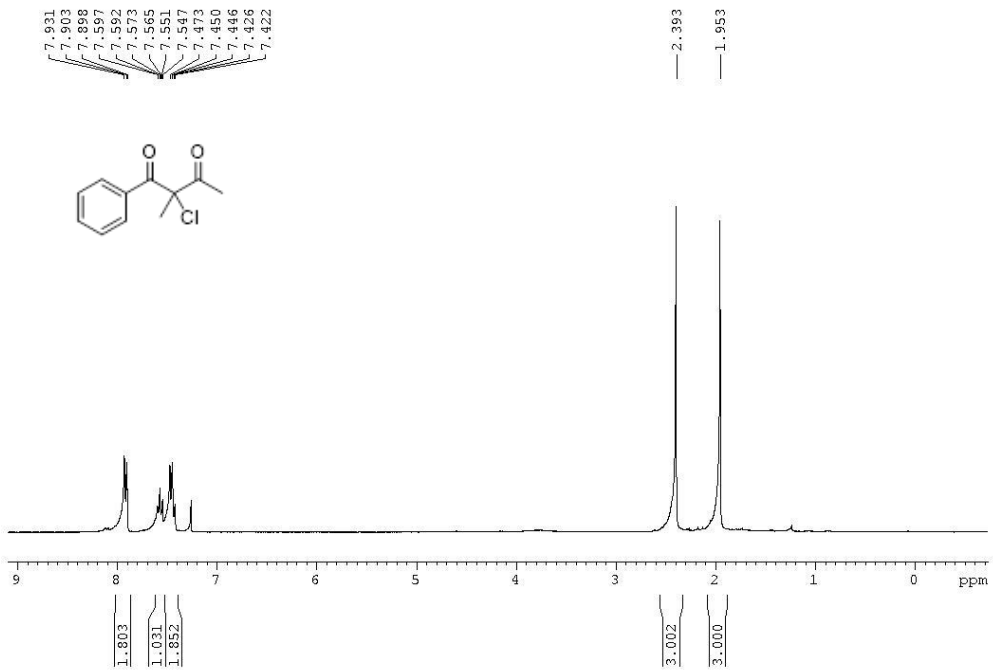

202.414
168.891
70.739
53.854
31.085
24.789
8.436
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

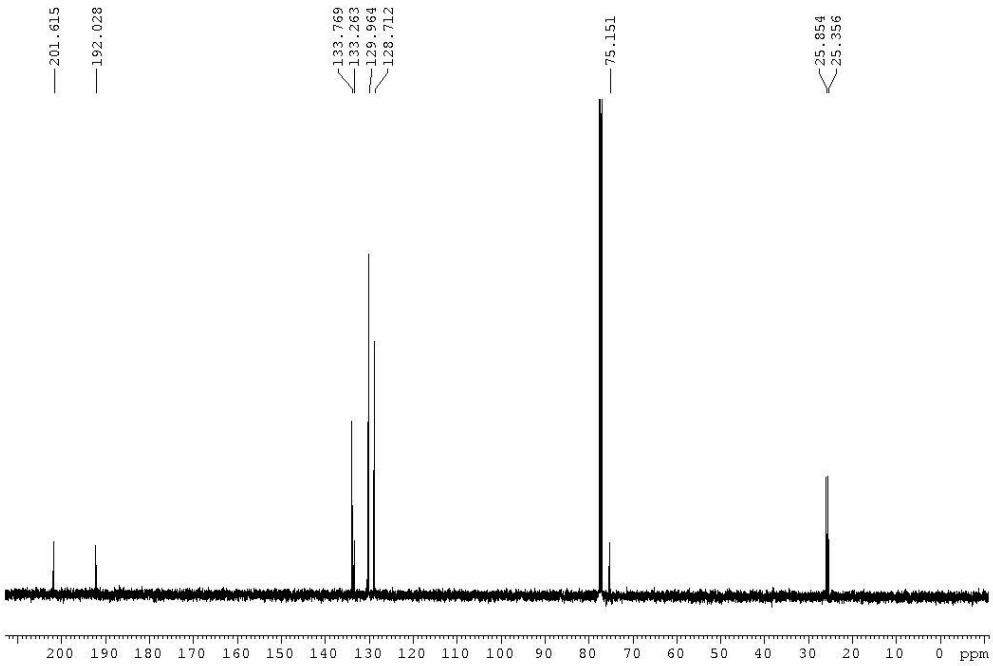

3.916
3.903
3.895
3.889
3.882
3.870
3.862
3.828
3.814
3.810
1.732
1.702
1.584
1.575
1.559
1.551
1.537
1.529
1.512
1.504
1.479
1.455
1.446
1.432
1.422
1.409
1.399
1.385
1.376
1.361
1.352
1.078
1.054
1.029
OH
O
O
Cl
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
0.950
3.000
3.086
2.097
2.853

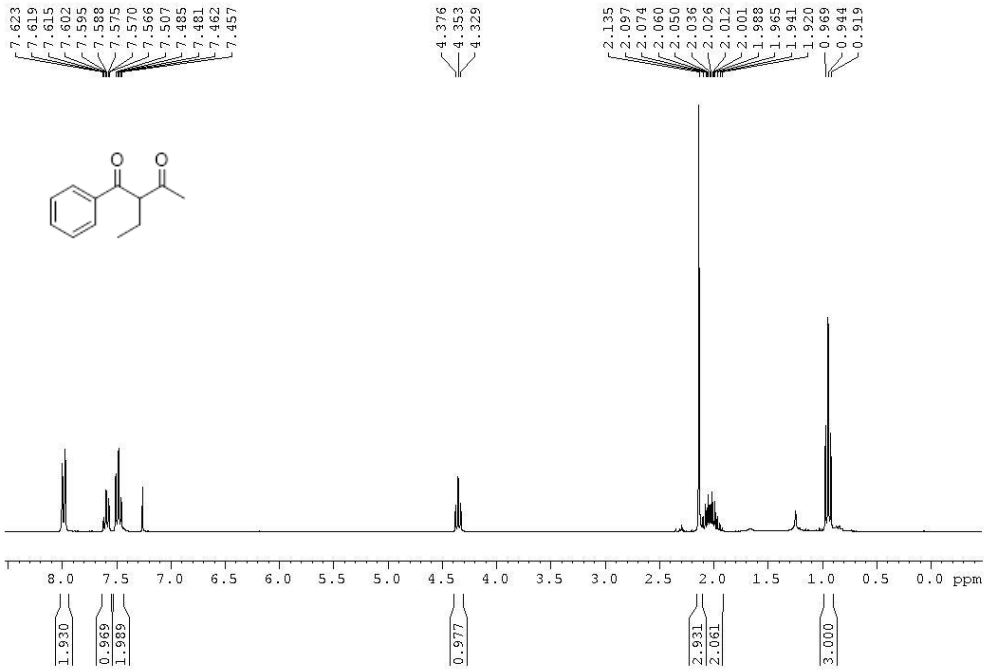

171.659
171.402
77.913
77.606
73.864
71.253
53.381
24.872
24.394
23.070
22.580
11.091
11.046
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

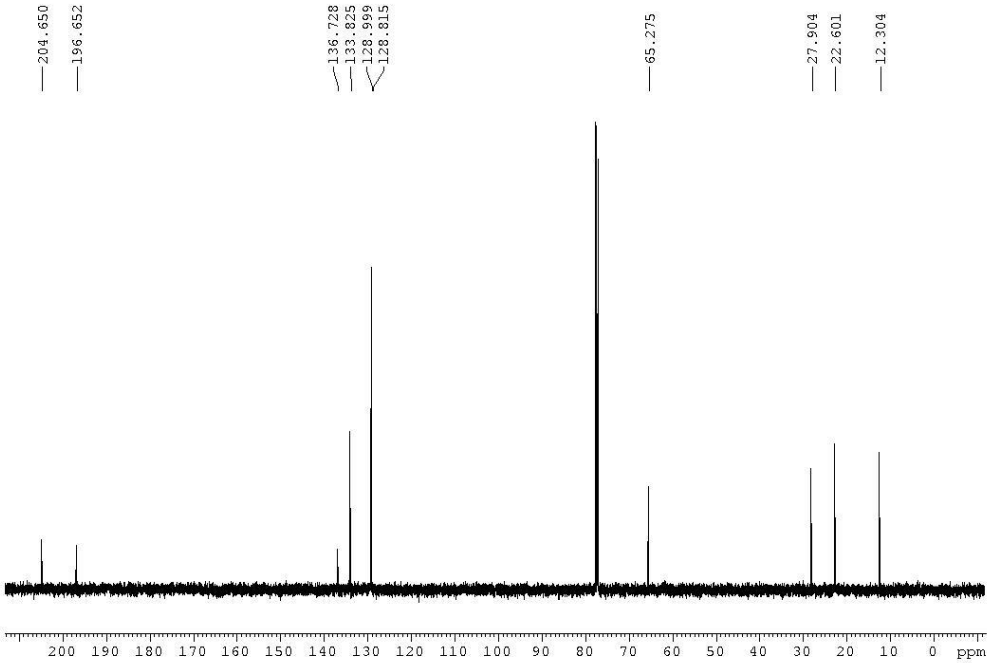

7.627
7.623
7.610
7.603
7.596
7.583
7.578
7.574
7.515
7.511
7.494
7.490
7.471
7.466
7.462
4.525
4.502
4.479
4.455
2.270
2.160
1.935
1.469
1.446
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.972
0.997
2.137
1.000
0.207
2.949
0.205
2.946

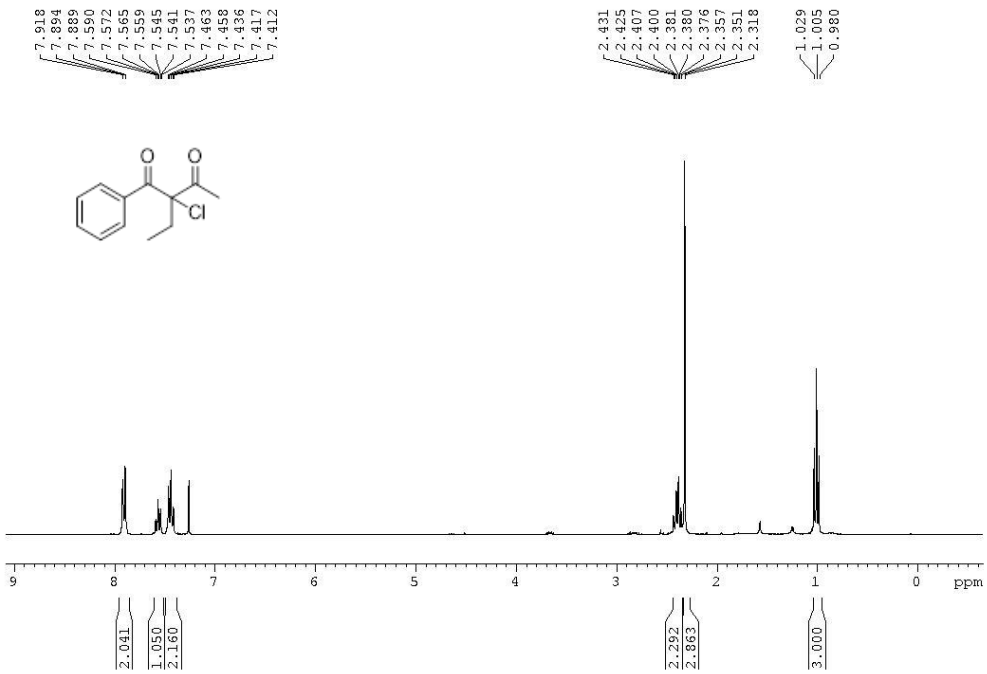

205.223
197.453
136.078
133.828
130.285
129.944
129.017
128.823
128.596
128.247
56.983
27.998
13.747
210
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

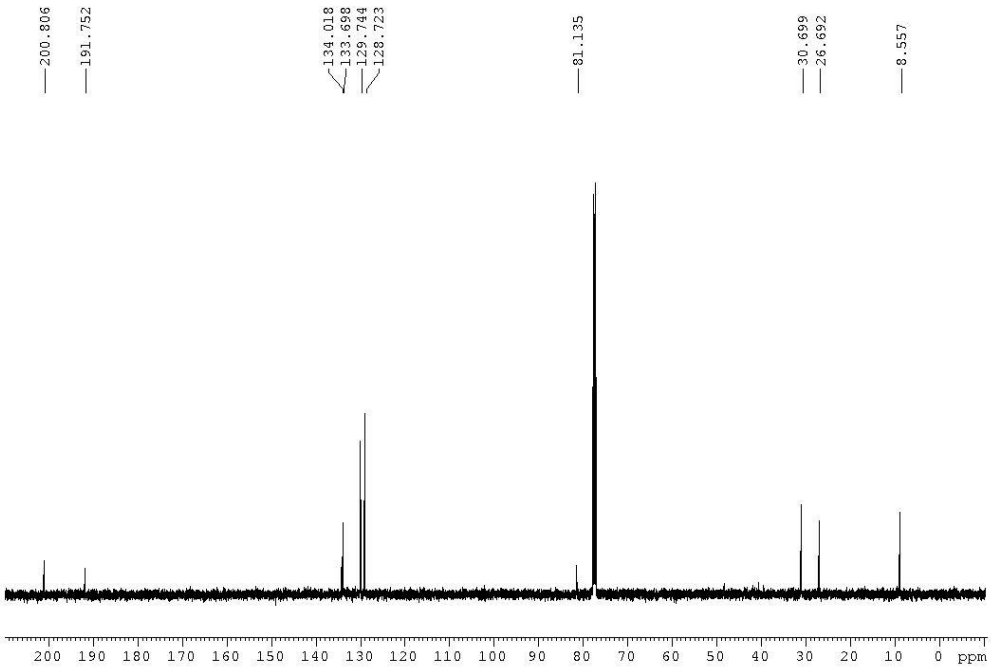

7.931
7.903
7.898
7.597
7.592
7.573
7.565
7.551
7.547
7.473
7.450
7.446
7.426
7.422
2.393
1.953
O
O
Cl
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.803
1.031
1.852
3.002
3.000

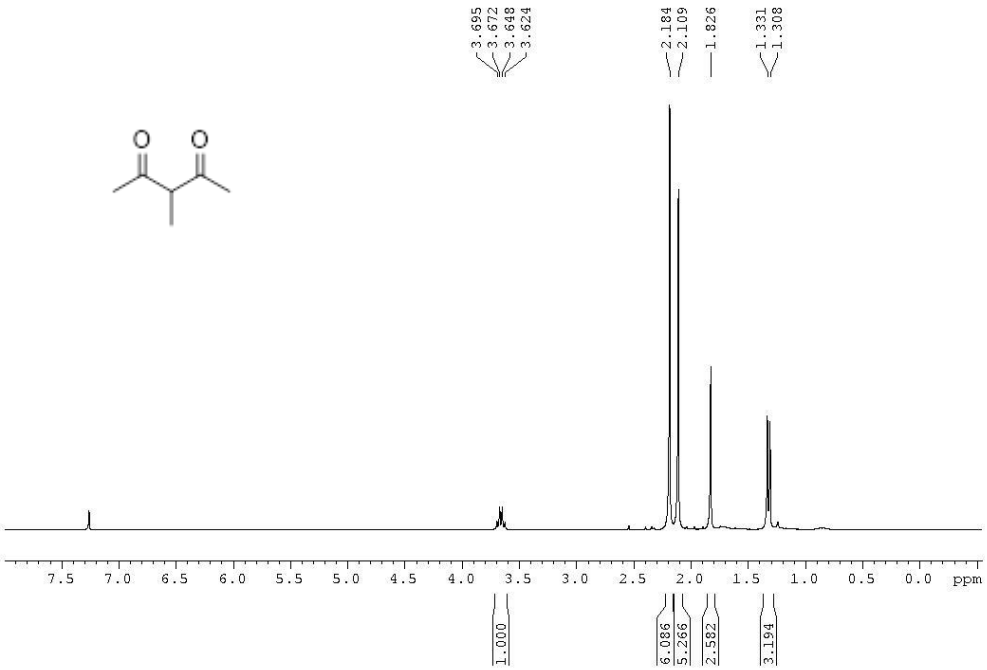

201.615
192.028
133.769
133.263
129.964
128.712
75.151
25.854
25.356
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

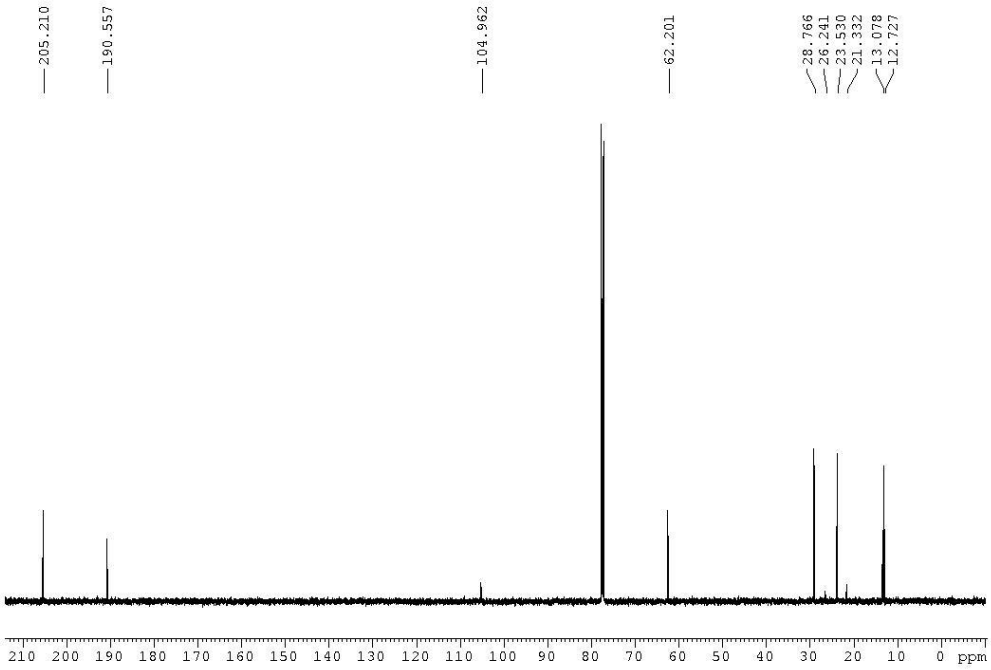

7.623
7.619
7.615
7.602
7.595
7.588
7.575
7.570
7.566
7.507
7.485
7.481
7.462
7.457
4.376
4.353
4.329
2.135
2.097
2.074
2.060
2.050
2.036
2.026
2.012
2.001
1.988
1.965
1.941
1.920
0.969
0.944
0.919
O
O
8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
1.930
0.969
1.989
0.977
2.931
2.061
3.000

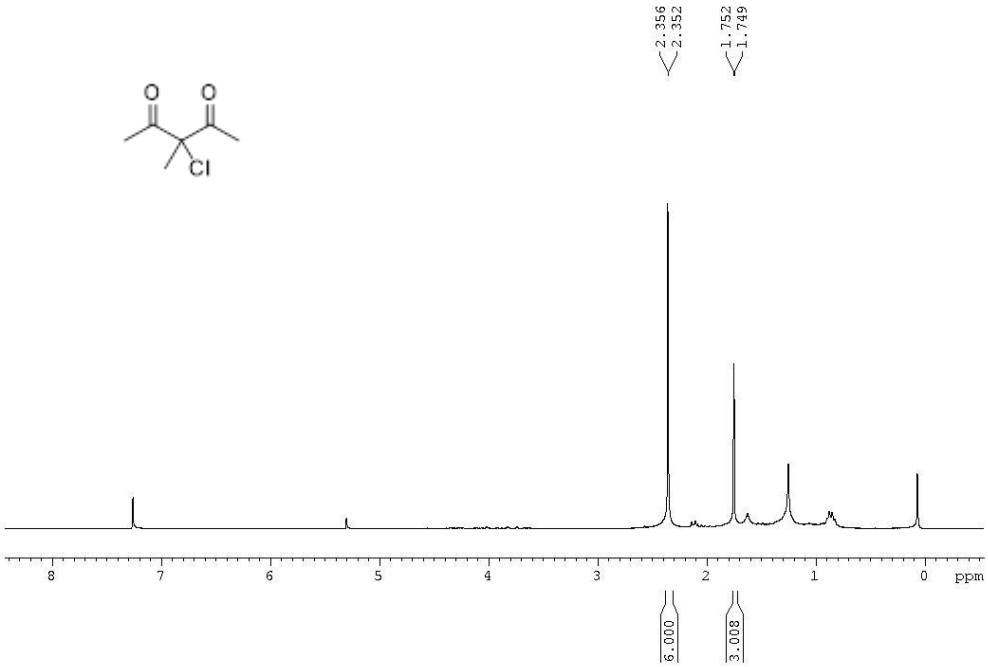

204.650
196.652
136.728
133.825
128.999
128.815
65.275
27.904
22.601
12.304
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

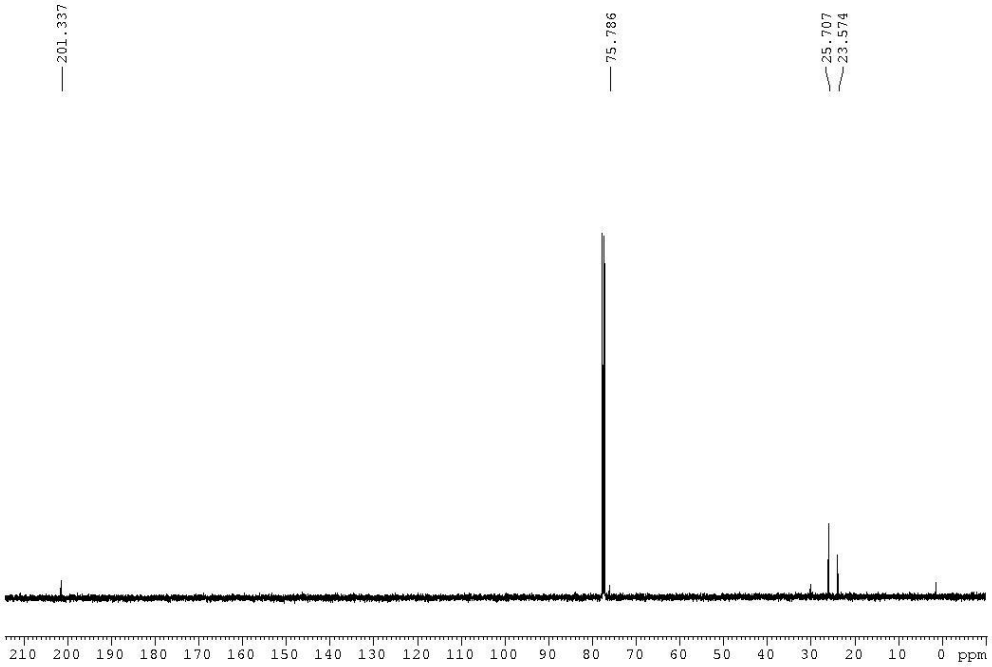

7.918
7.894
7.889
7.590
7.572
7.565
7.559
7.545
7.541
7.537
7.463
7.458
7.436
7.417
7.412
2.431
2.425
2.407
2.400
2.381
2.380
2.376
2.357
2.351
2.318
1.029
1.005
0.980
O
O
Cl
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
2.041
1.050
2.160
2.292
2.863
3.000

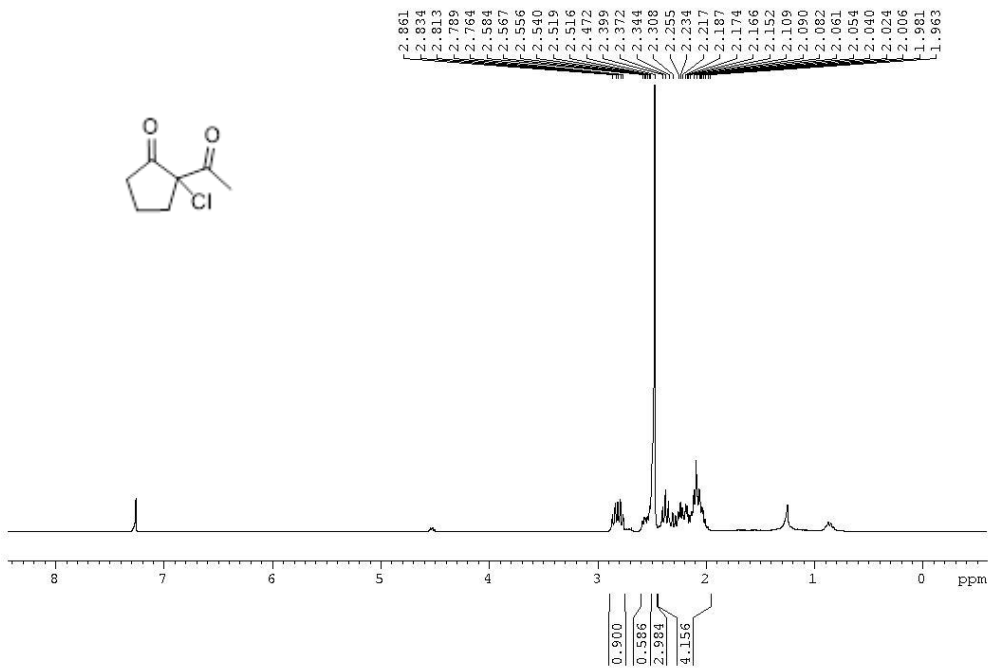

200.806
191.752
134.018
133.698
129.744
128.723
81.135
30.699
26.692
8.557
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

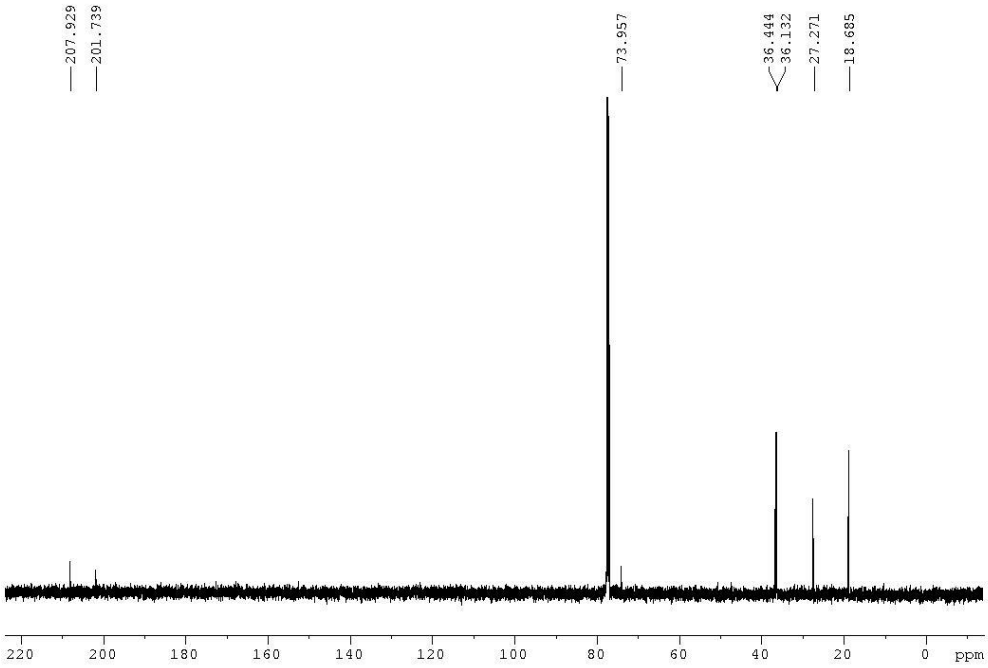

3.695
3.672
3.648
3.624
2.184
2.109
1.826
1.331
1.308
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
1.000
6.086
5.266
2.582
3.194

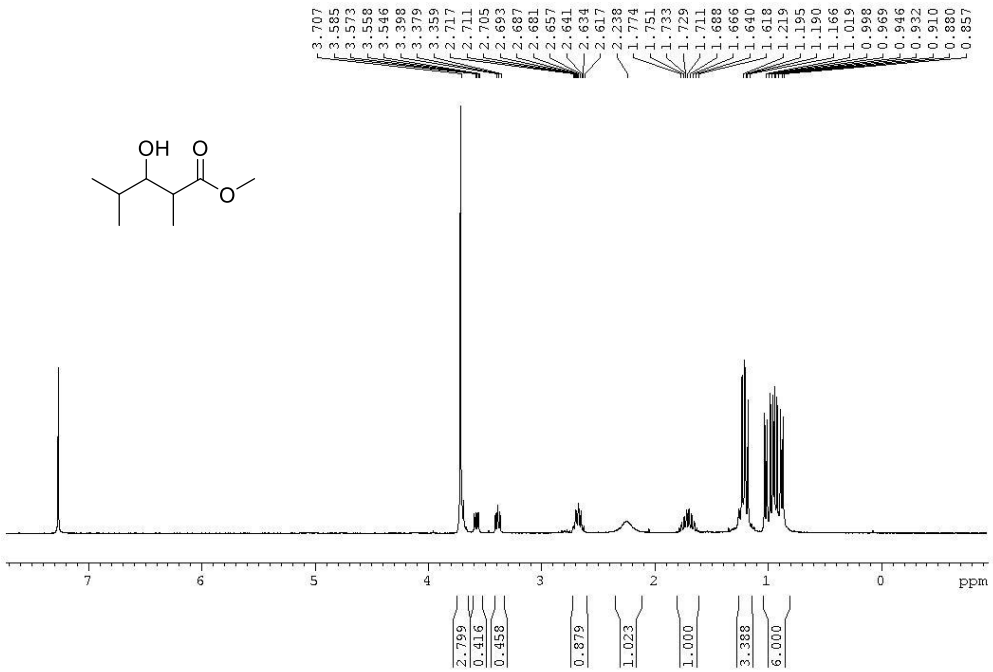

205.210
190.557
104.962
62.201
28.766
26.241
23.530
21.332
13.078
12.727
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

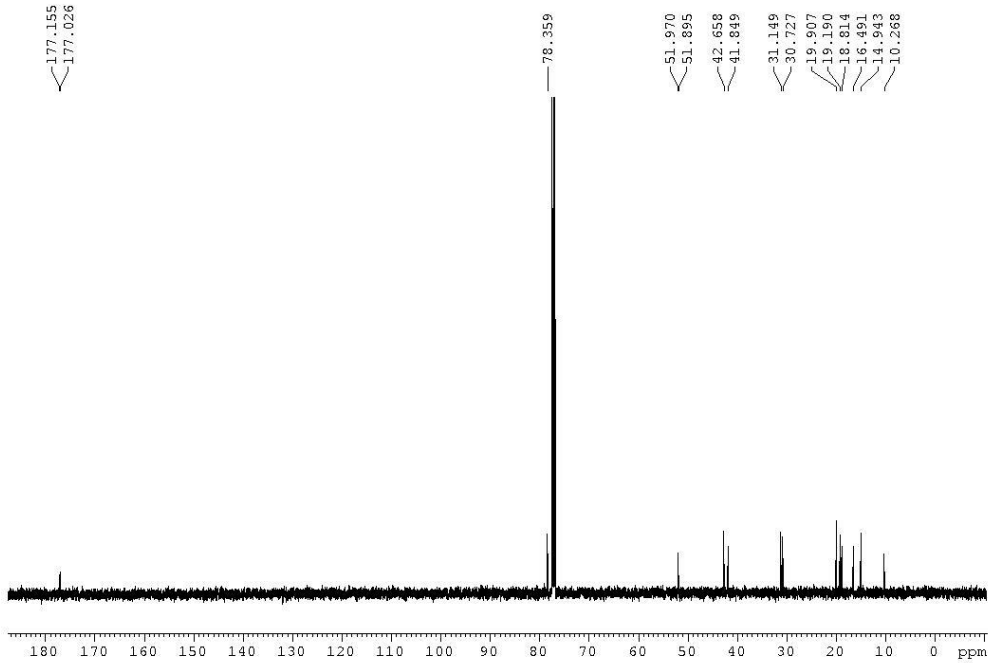

2.356
2.352
1.752
1.749
O
O
Cl
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
6.000
3.008

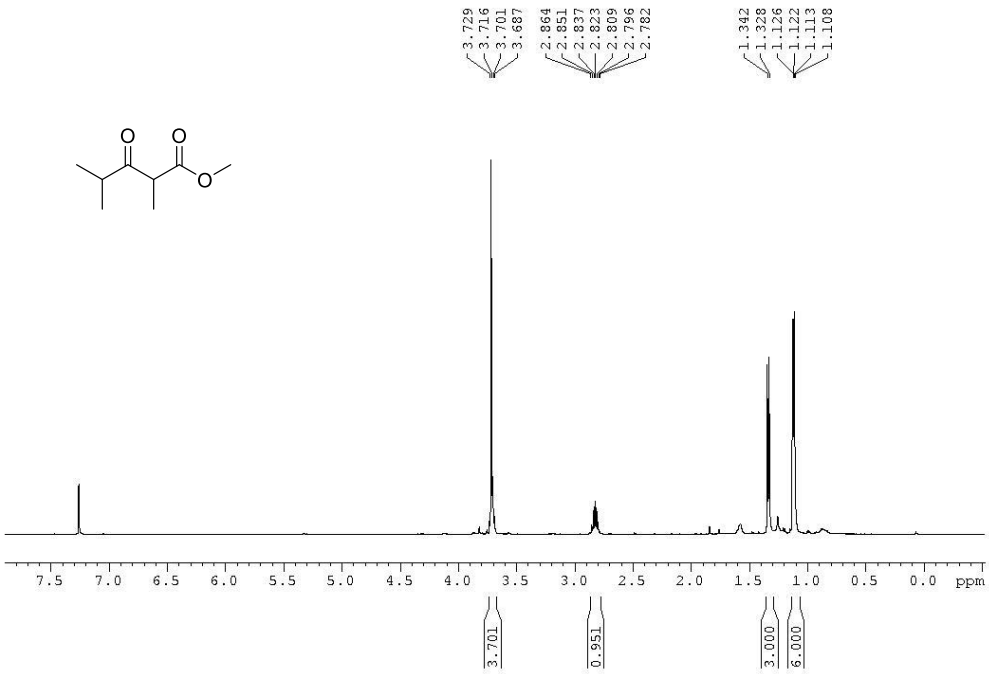

201.337
75.786
25.707
23.574
210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

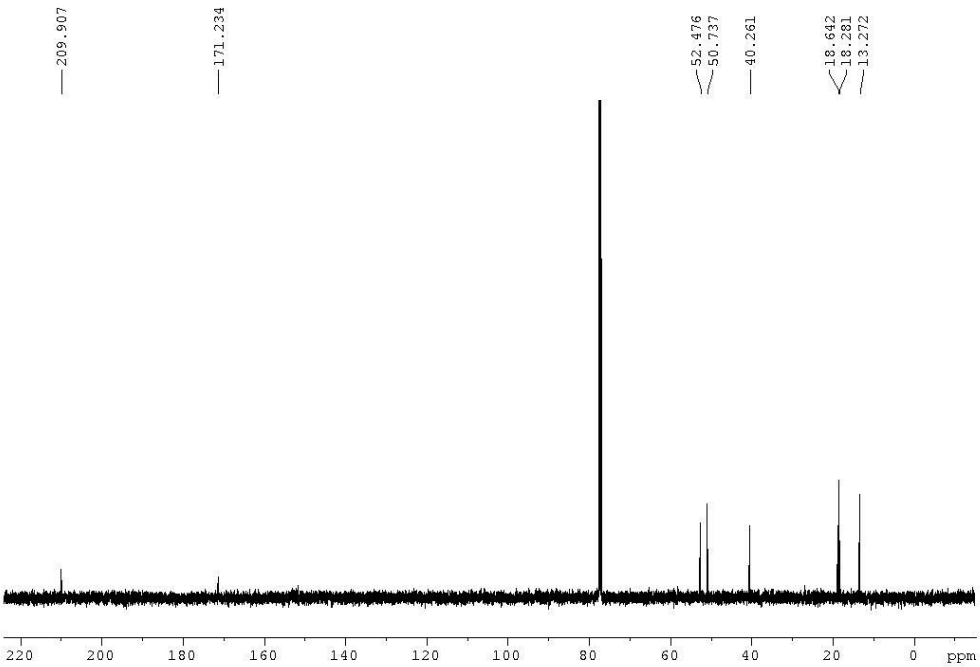

2.861
2.834
2.813
2.789
2.764
2.584
2.567
2.556
2.540
2.519
2.516
2.472
2.399
2.372
2.344
2.308
2.255
2.234
2.217
2.187
2.174
2.166
2.152
2.109
2.090
2.082
2.061
2.054
2.040
2.024
2.006
1.981
1.963
O
O
Cl
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
0.900
0.586
2.984
4.156

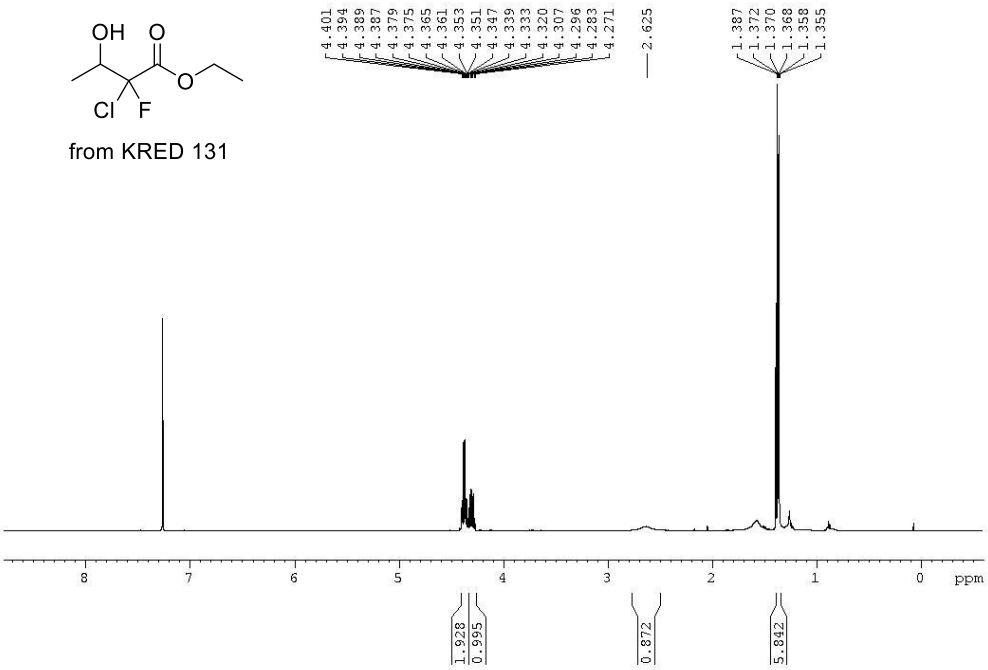

207.929
201.739
73.957
36.444
36.132
27.271
18.685
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ppm

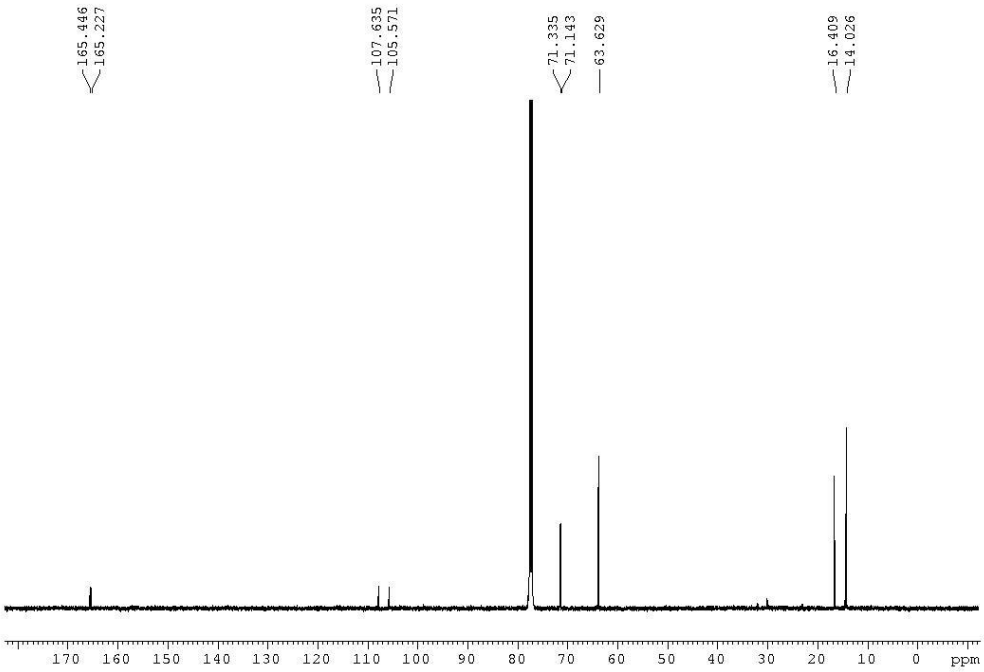

3.707
3.585
3.573
3.558
3.546
3.398
3.379
3.359
2.717
2.711
2.705
2.693
2.687
2.681
2.657
2.641
2.634
2.617
2.238
1.774
1.751
1.733
1.729
1.711
1.688
1.666
1.640
1.618
1.219
1.195
1.190
1.166
1.019
0.998
0.969
0.946
0.932
0.910
0.880
0.857
OH
O
O
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
2.799
0.416
0.458
0.879
1.023
1.000
3.388
6.000


177.155
177.026
78.359
51.970
51.895
42.658
41.849
31.149
30.727
19.907
19.190
18.814
16.491
14.943
10.268
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

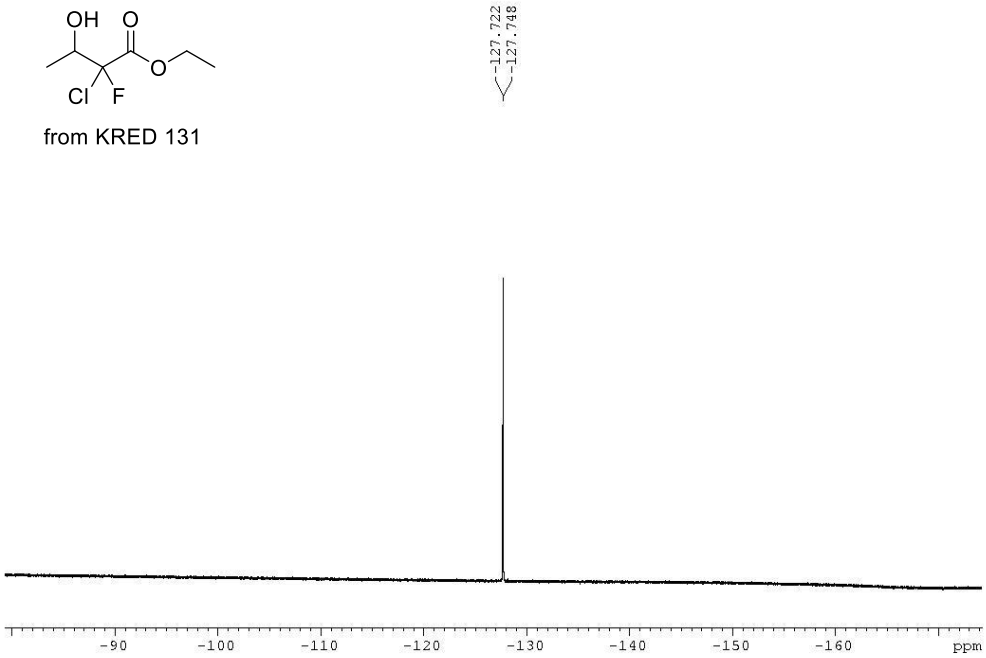

3.729
3.716
3.701
3.687
2.864
2.851
2.837
2.823
2.809
2.796
2.782
1.342
1.328
1.126
1.122
1.113
1.108
O
O
O
7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
3.701
0.951
3.000
6.000


209.907
171.234
52.476
50.737
40.261
18.642
18.281
13.272
220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 0 ppm


OH
O
O
Cl
F
from KRED 131
4.401
4.394
4.389
4.387
4.379
4.375
4.365
4.361
4.353
4.351
4.347
4.339
4.333
4.320
4.307
4.296
4.283
4.271
2.625
1.387
1.372
1.370
1.368
1.358
1.355
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm
1.928
0.995
0.872
5.842

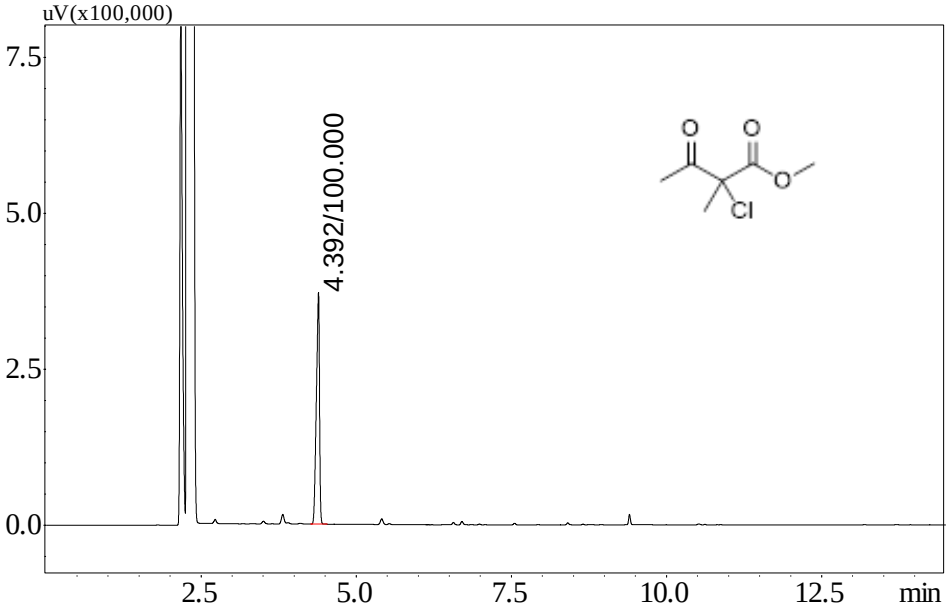

165.446
165.227
107.635
105.571
71.335
71.143
63.629
16.409
14.026
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

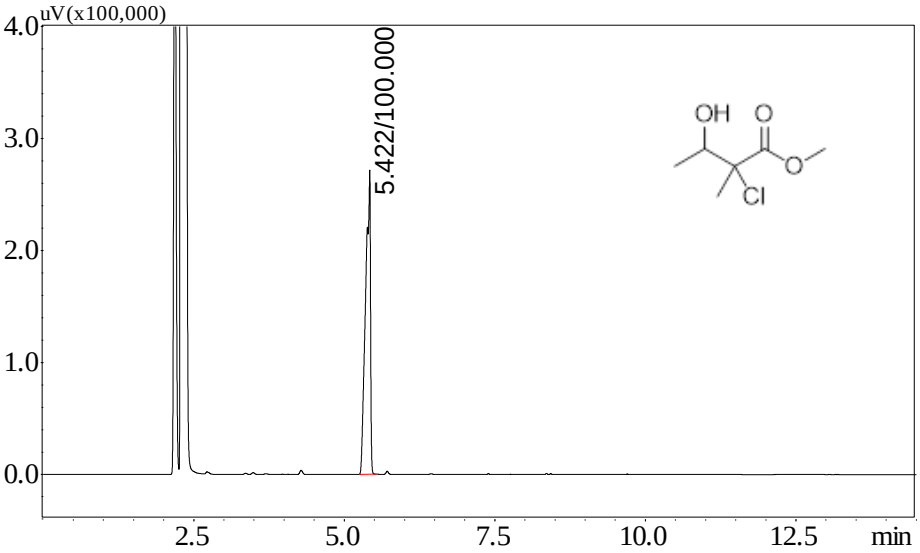
from KRED 131

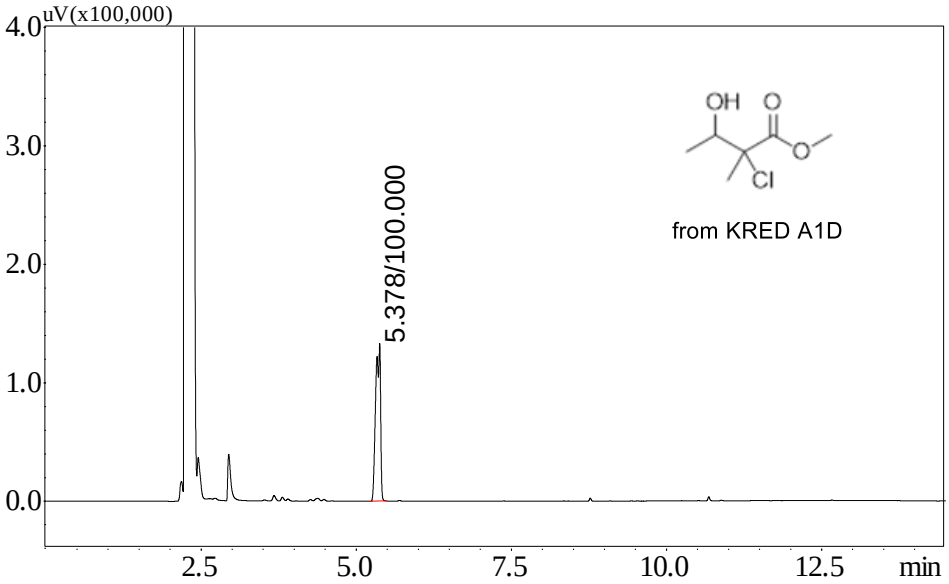


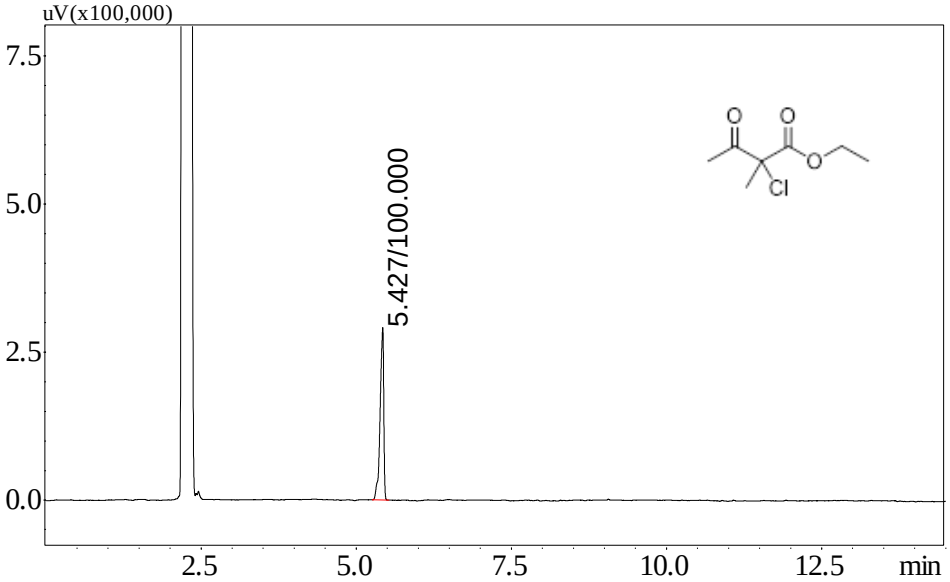
Παράρτημα

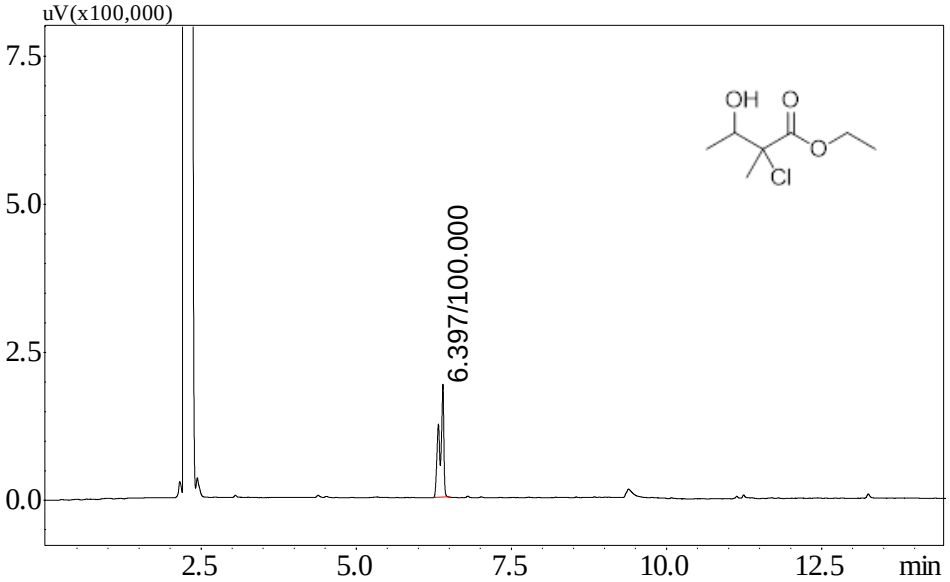
Αναλύσεις με αέρια χρωματογραφία με χρήση απλής κολώνας

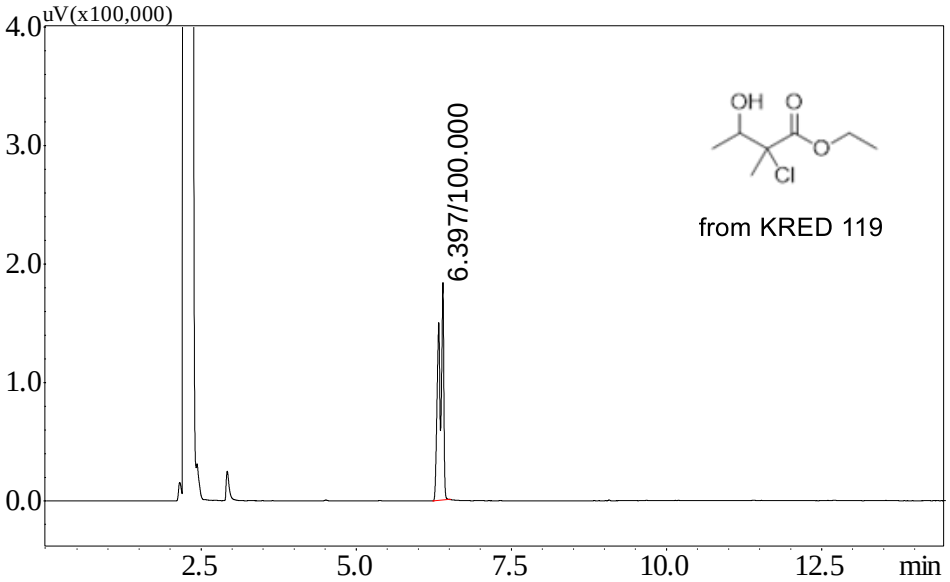

uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
4.392/100.000
O
O
O
Cl
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

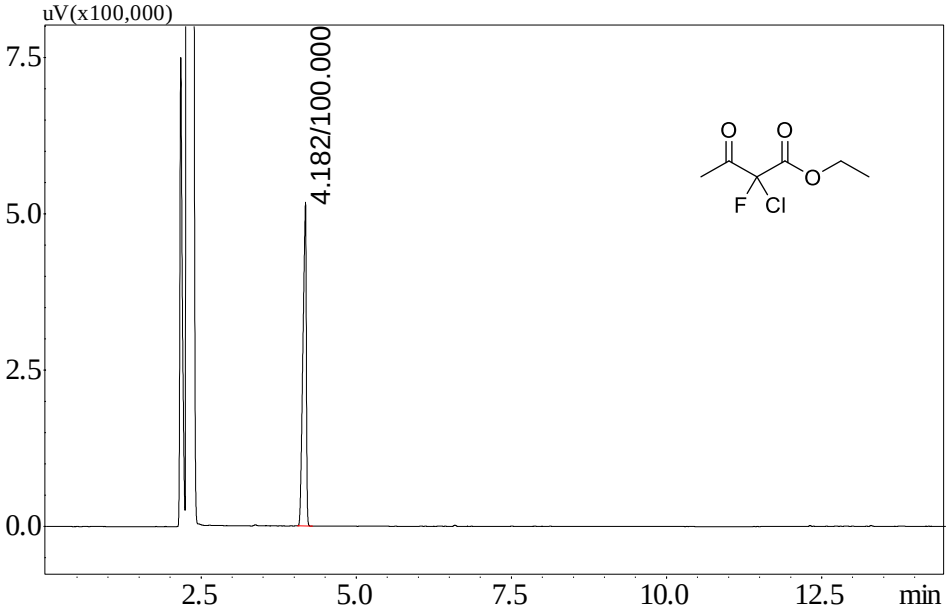

uV(x100,000)
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
5.422/100.000
OH
O
O
Cl
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

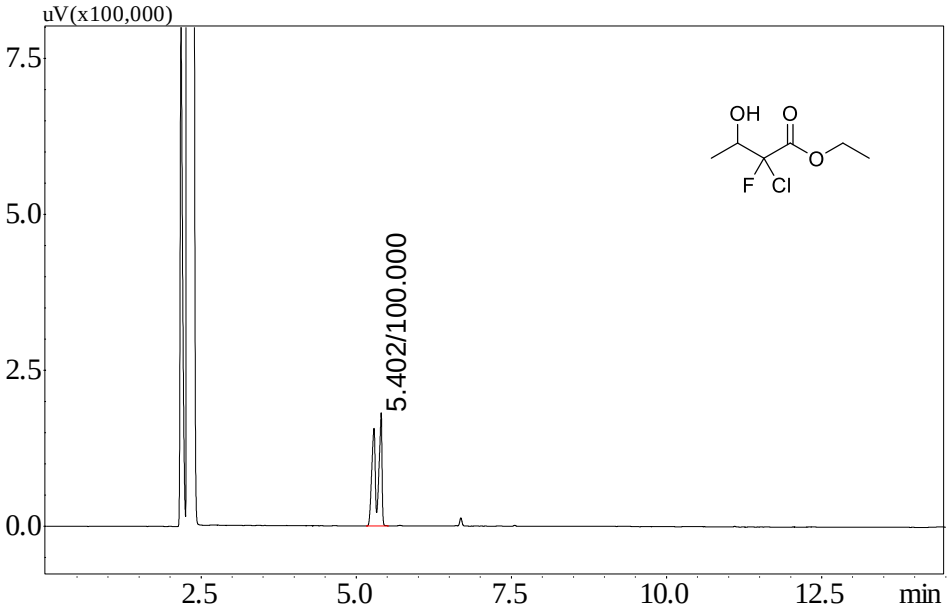

uV(x100,000)
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
5.378/100.000
OH
O
O
Cl
from KRED A1D
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

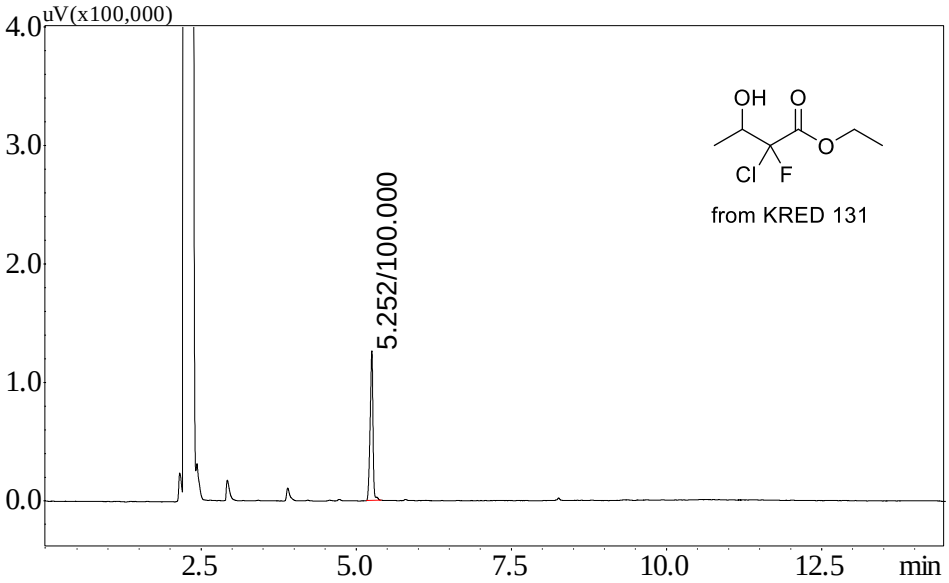

uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
5.427/100.000
O
O
O
Cl
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

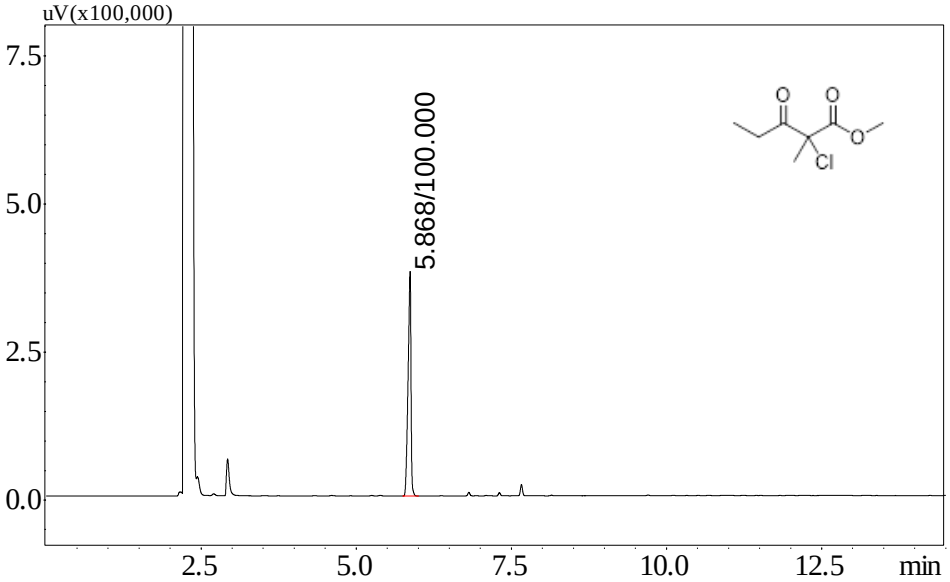

uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
6.397/100.000
OH
O
O
Cl
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

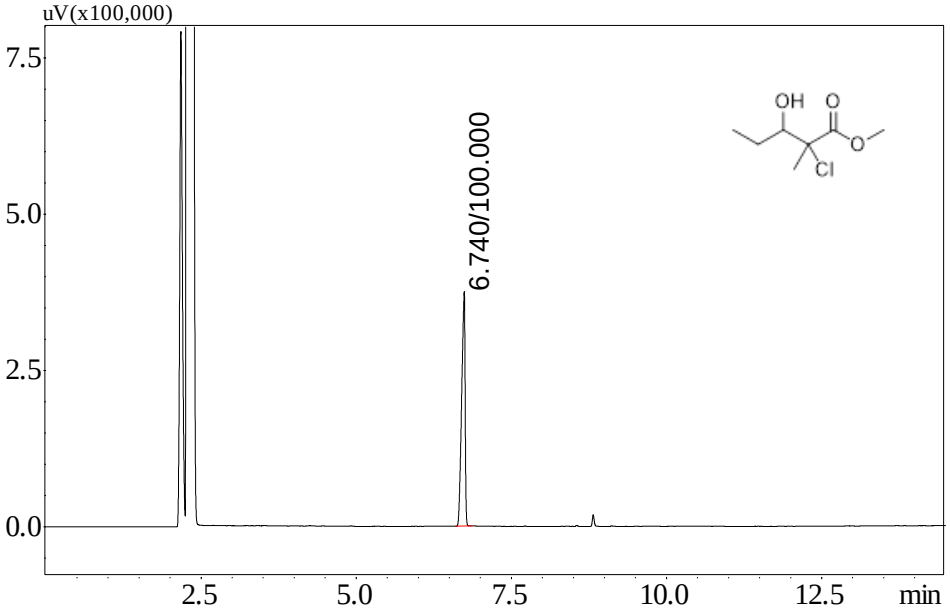

uV(x100,000)
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
6.397/100.000
OH
O
O
Cl
from KRED 119
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

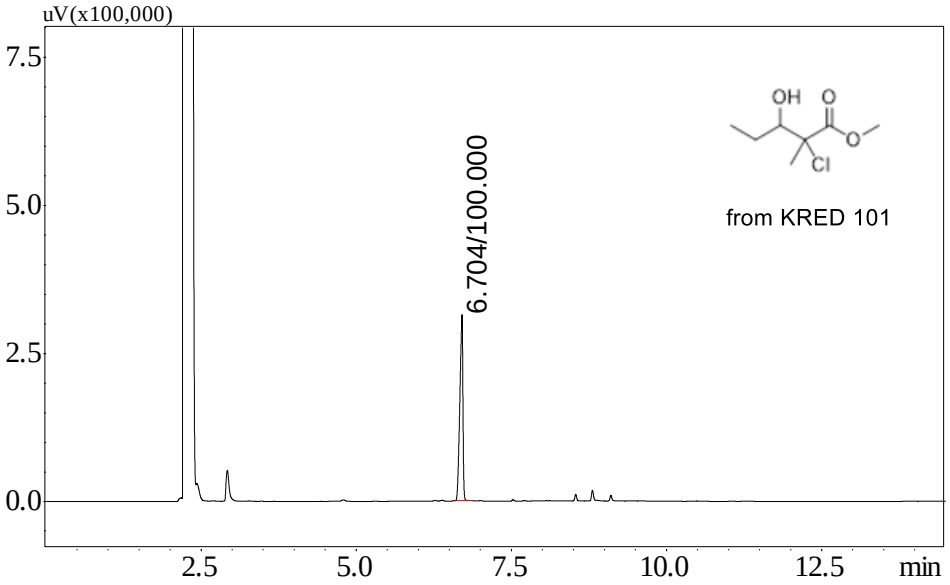

uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
4.182/100.000
O
O
O
F
Cl
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

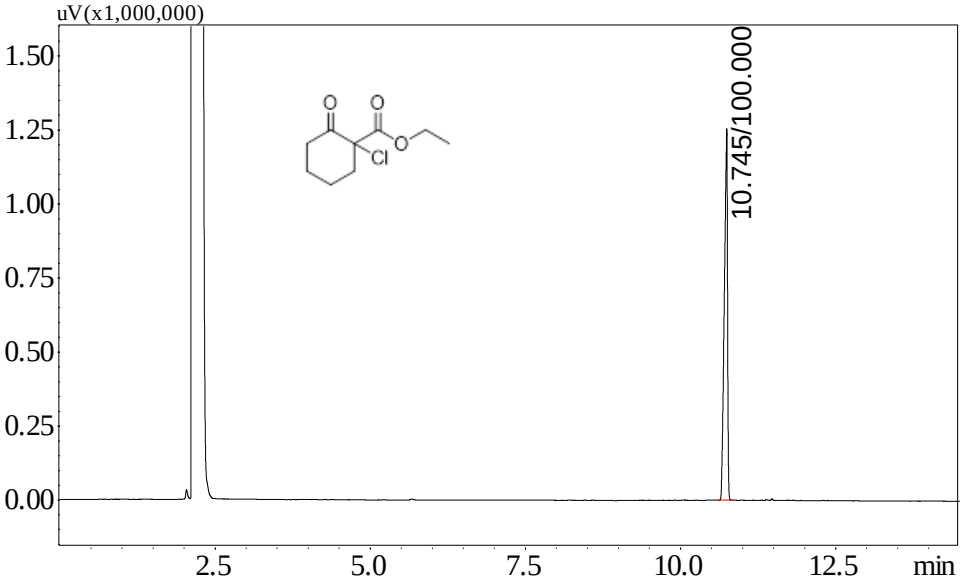

uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
5.402/100.000
OH
O
O
F
Cl
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

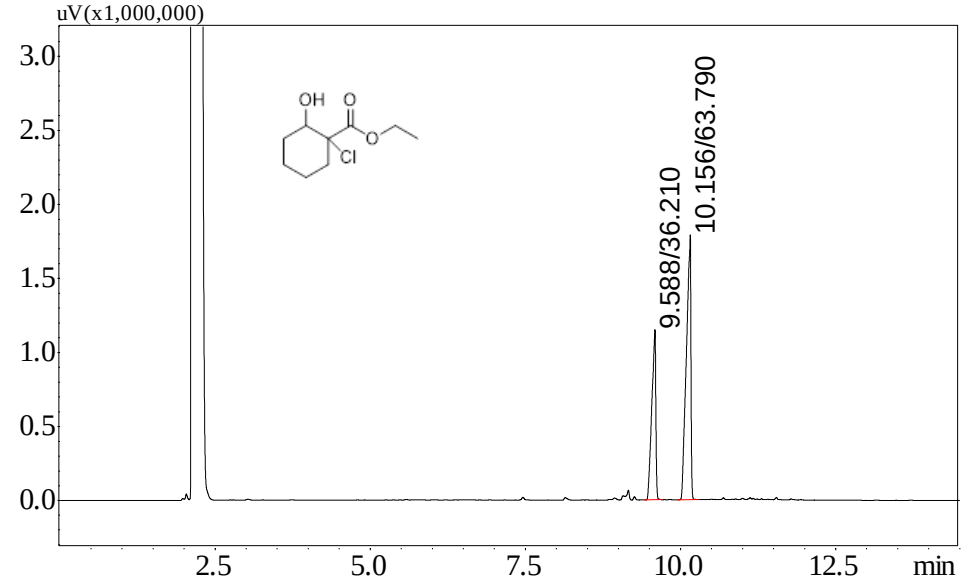

uV(x100,000)
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
5.252/100.000
OH
O
O
Cl
F
from KRED 131
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

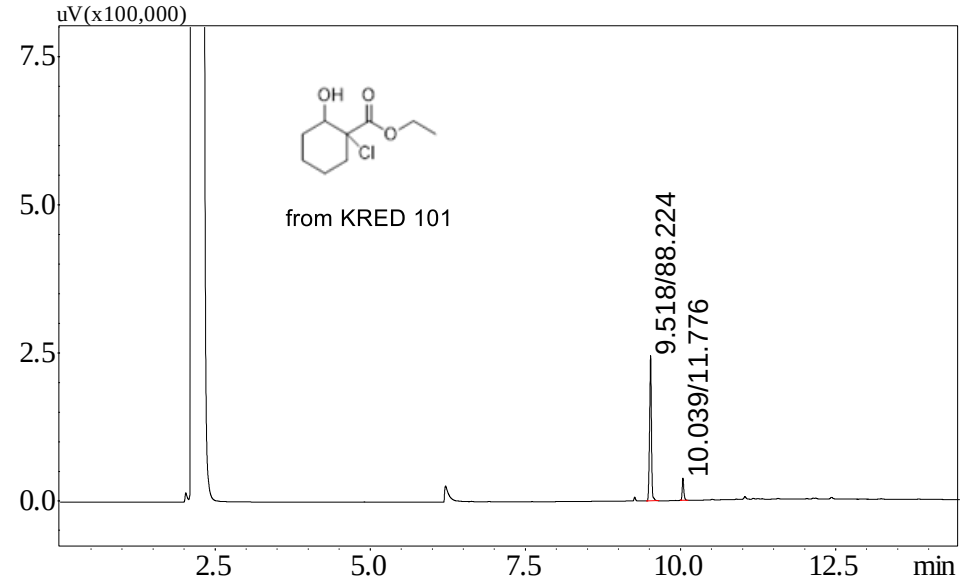

uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
5.868/100.000
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min


uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
6.740/100.000
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min


uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
6.704/100.000
from KRED 101
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

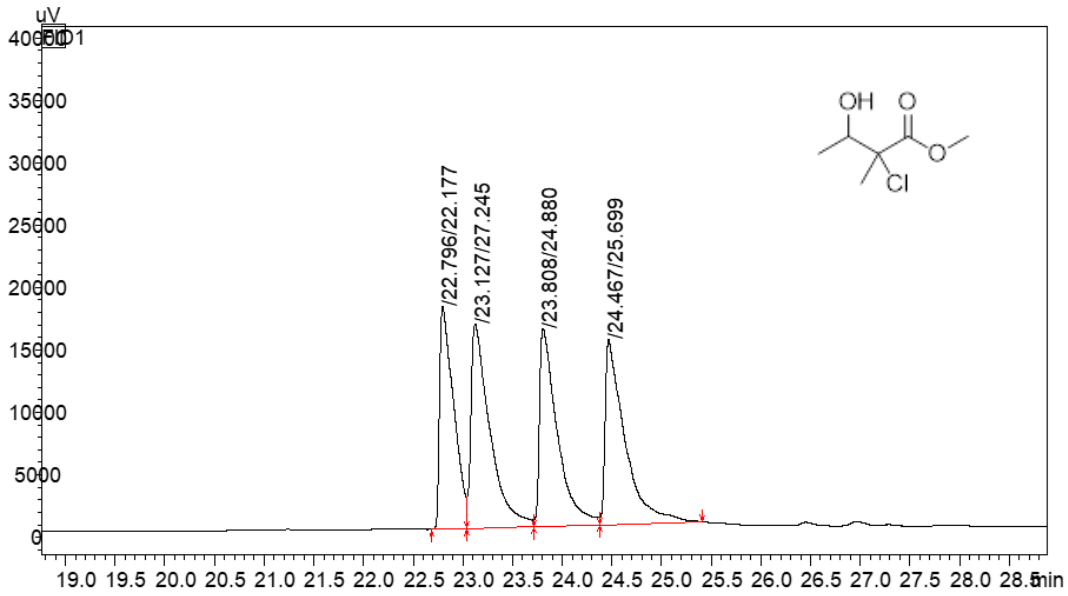

uV(x1,000,000)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10.745/100.000
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

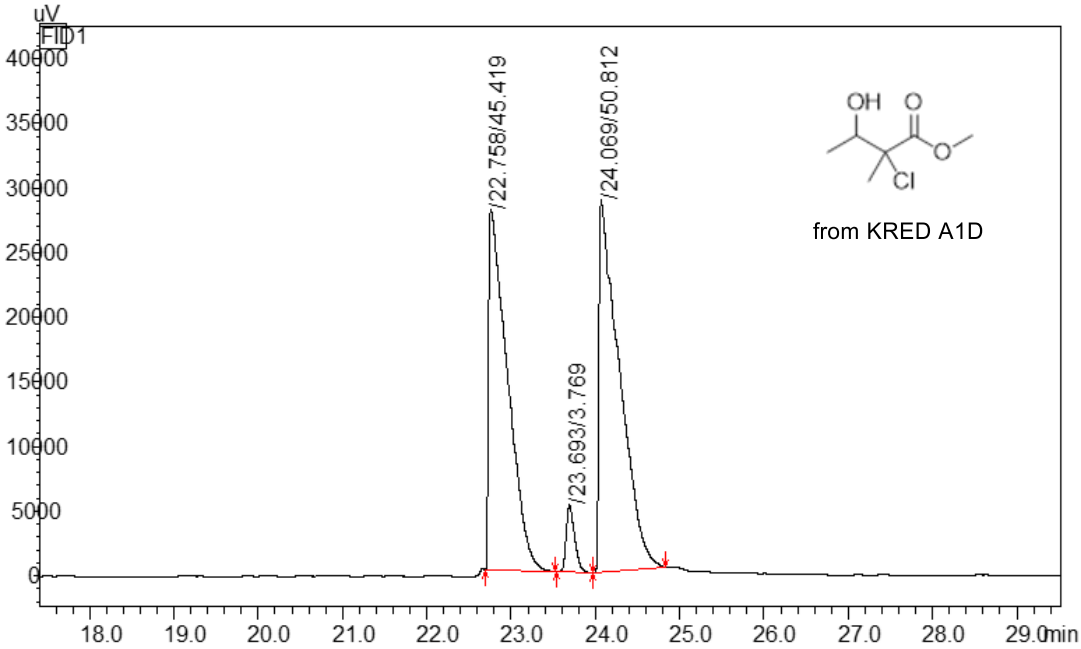

uV(x1,000,000)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
9.588/36.210
10.156/63.790
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

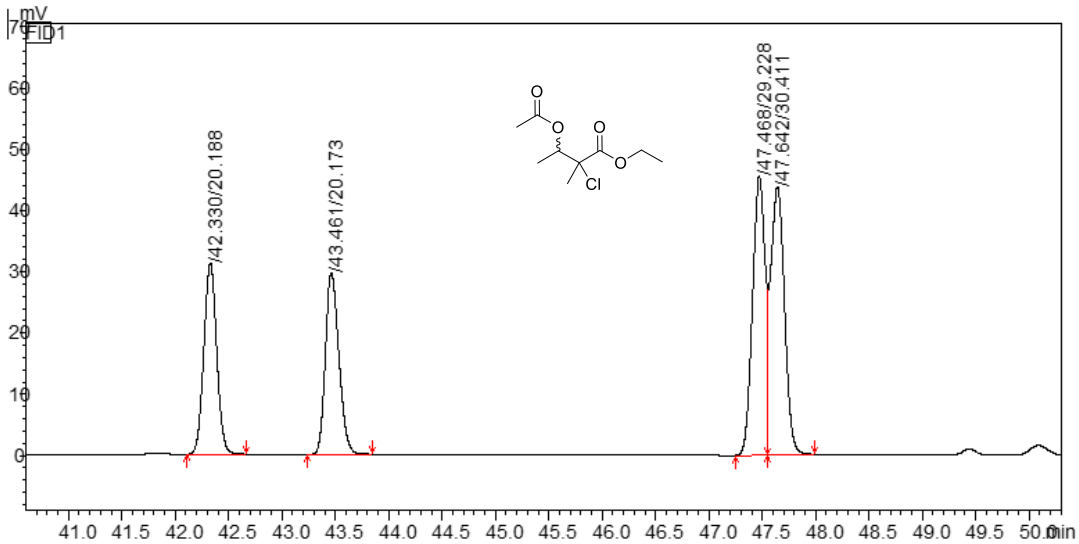

uV(x100,000)
7.5
5.0
2.5
0.0
from KRED 101
9.518/88.224
10.039/11.776
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
min

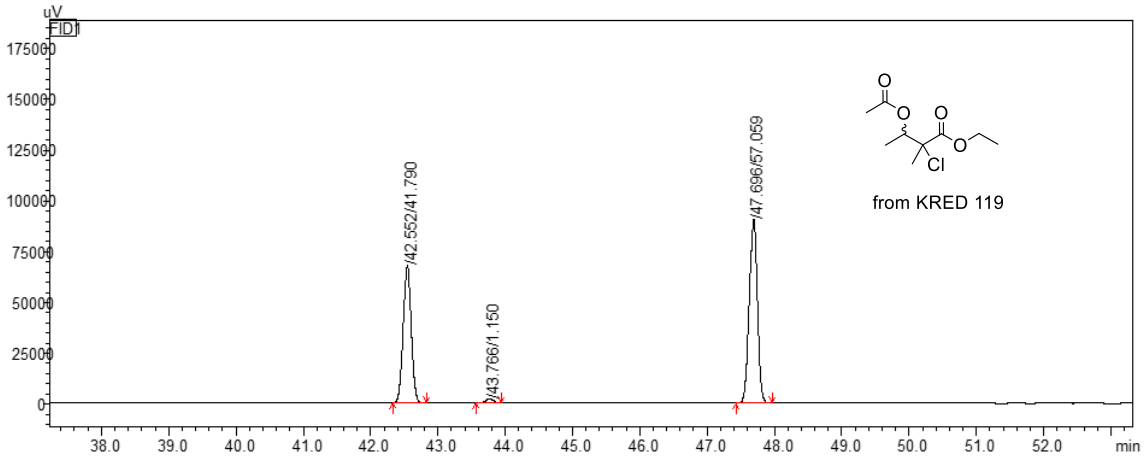
Αναλύσεις με αέρια χρωματογραφία με χρήση

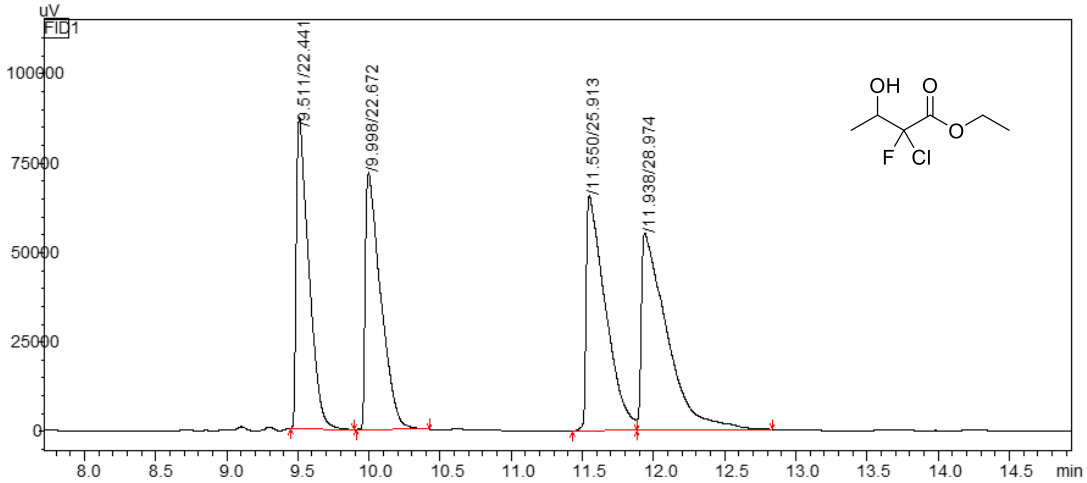
Χειρόμορφης κολώνας

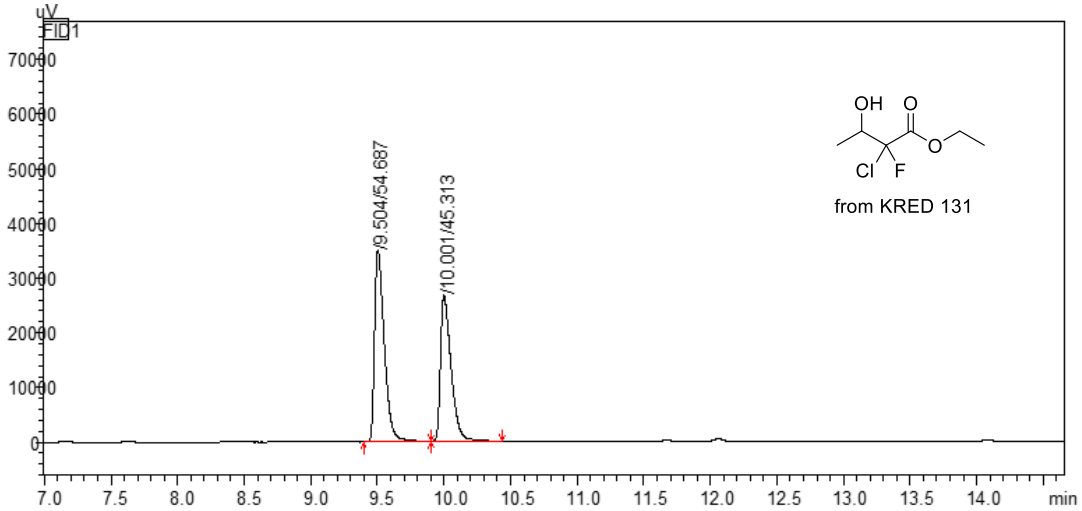

uV
FID1
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
/22.796/22.177
/23.127/27.245
/23.808/24.880
/24.467/25.699
OH
O
O
Cl
19.0 19.5 20.0 20.5 21.0 21.5 22.0 22.5 23.0 23.5 24.0 24.5 25.0 25.5 26.0 26.5 27.0 27.5 28.0 28.5 min

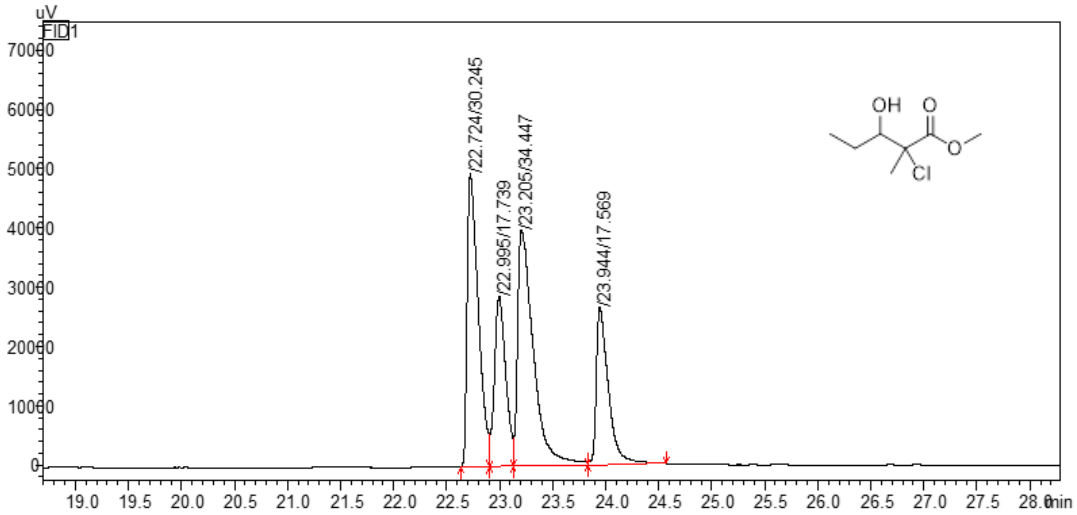

uV
FID1
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
/22.758/45.419
/23.693/3.769
/24.069/50.812
OH
O
O
Cl
from KRED A1D
18.0 19.0 20.0 21.0 22.0 23.0 24.0 25.0 26.0 27.0 28.0 29.0 min

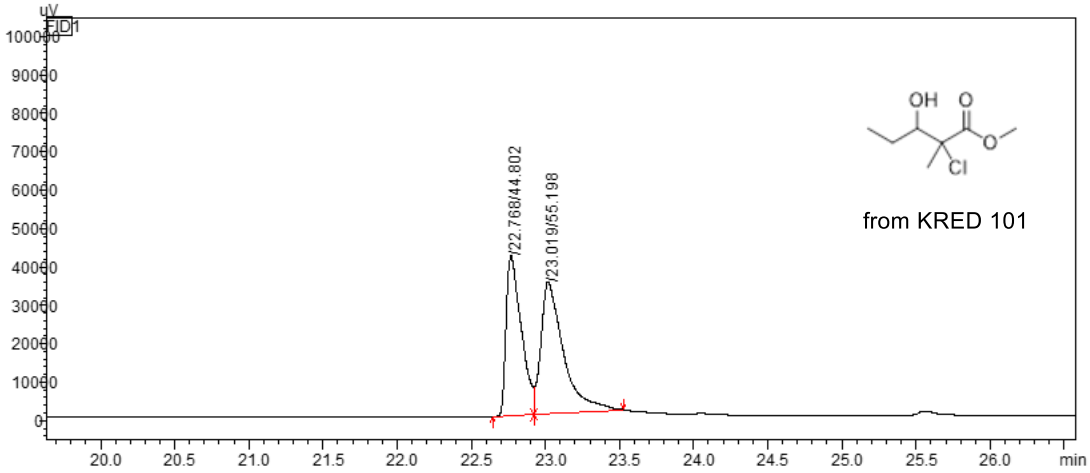

mV
FID1
42.330/20.188
43.461/20.173
47.468/29.228
47.642/30.411
Cl
min


uV
FID1
42.552/41.790
43.766/1.150
47.696/57.059
Cl
from KRED 119
min


uV
FID1
100000
75000
50000
25000
0
9.511/22.441
9.998/22.672
11.550/25.913
11.938/28.974
OH
O
O
F
Cl
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
12.5
13.0
13.5
14.0
14.5
min


uV
FID1
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
9.504/54.687
10.001/45.313
OH
O
O
Cl
F
from KRED 131
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
10.0
10.5
11.0
11.5
12.0
12.5
13.0
13.5
14.0
min


uV
FID1
22.724/30.245
22.995/17.739
23.205/34.447
23.944/17.569
OH
O
O
Cl
min


uV
FID1
22.768/44.802
23.019/55.198
OH
O
O
Cl
from KRED 101
min

Βιβλιογραφία

(1) Böhm, H.-J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M. Fluorine in Medicinal Chemistry. *ChemBioChem* **2004**, *5* (5), 637–643. https://doi.org/10.1002/cbic.200301023.

(2) Fang, W. Y.; Ravindar, L.; Rakesh, K. P.; Manukumar, H. M.; Shantharam, C. S.; Alharbi, N. S.; Qin, H. L. Synthetic Approaches and Pharmaceutical Applications of Chloro-Containing Molecules for Drug Discovery: A Critical Review. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *173*, 117–153. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.063.

(3) Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerger, A. C.; Boeckler, F. M. Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (4), 1363–1388. https://doi.org/10.1021/jm3012068.

(4) Muller, K.; Faeh, C.; Diederich, F. Fluorine in Pharmaceuticals: Looking Beyond Intuition. *Science (80-.).* **2007**, *317* (5846), 1881–1886. https://doi.org/10.1126/science.1131943.

(5) Hernandes, M.; Cavalcanti, S. M.; Moreira, D. R.; de Azevedo Junior, W.; Leite, A. C. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design. *Curr. Drug Targets* **2010**, *11* (3), 303–314. https://doi.org/10.2174/138945010790711996.

(6) Goswami, P.; Baruah, A.; Das, B. Design and Application of 2,2-Dibromodimedone as Organic Brominating Reagent for Asymmetric Bromination of 1,3-Dicarbonyl Compounds and Ketones Catalysed by Chiral Amino Acids. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351* (10), 1483–1487. https://doi.org/10.1002/adsc.200900138.

(7) Vella, F. Fundamentals of Medicinal Chemistry: Thomas, G. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2004**, *32* (3), 211–211. https://doi.org/10.1002/bmb.2004.494032039997.

(8) De Kimpe, Norbert; Verhe, R. *A-Haloketones, a-Haloaldehydes and a-Haloimines*; 1988.

(9) Gómez-Martínez, M.; Alonso, D. A.; Pastor, I. M.; Guillena, G.; Baeza, A. Organocatalyzed Assembly of Chlorinated Quaternary Stereogenic Centers. *Asian J. Org. Chem.* **2016**, *5* (12), 1428–1437. https://doi.org/10.1002/ajoc.201600404.

(10) Zheng, L.-S.; Phansavath, P.; Ratovelomanana-Vidal, V. Synthesis of Enantioenriched α,α-Dichloro- and α,α-Difluoro-β-Hydroxy Esters and Amides by Ruthenium-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation. *Org. Lett.* **2018**, *20* (17), 5107–5111. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b01943.

(11) Feske, B. D.; Kaluzna, I. A.; Stewart, J. D. Enantiodivergent, Biocatalytic Routes to Both Taxol Side Chain Antipodes. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (23), 9654–9657. https://doi.org/10.1021/jo0516077.

(12) Richard, L. C. Comprehensive Organic Transformations; John Wiley and Sons, Inc, 1999; pp 715–718.

(13) Shi, X.; Dai, L. Mild Halogenation of Stabilized Ester Enolates by Cupric Halides. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (17), 4596–4598. https://doi.org/10.1021/jo00069a020.

(14) Yang, D.; Yan, Y.-L.; Lui, B. Mild α-Halogenation Reactions of 1,3-Dicarbonyl Compounds Catalyzed by Lewis Acids. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (21), 7429–7431. https://doi.org/10.1021/jo026025t.

(15) Meketa, M. L.; Mahajan, Y. R.; Weinreb, S. M. An Efficacious Method for the Halogenation of β-Dicarbonyl Compounds under Mildly Acidic Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (28), 4749–4751. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.05.055.

(16) Chong, S.; Su, Y.; Wu, L.; Zhang, W.; Ma, J.; Chen, X.; Huang, D.; Wang, K.-H.; Hu, Y. Trimethylchlorosilane-Mediated Mild α-Chlorination of 1,3-Dicarbonyl Compounds Promoted by Phenyliodonium Diacetate. *Synthesis (Stuttg).* **2016**, *48* (09), 1359–1370. https://doi.org/10.1055/s-0035-1561572.

(17) Giannopoulos V., Katsoulakis N., Smonou. I. Synthesis of α,α-Dichloro-β-Keto Esters and 1,3- Diketones by Oxone ® /$AlCl_3$ in Aqueous Media. *Manuscript in Preparation*

(18) Swamy, P.; Kumar, M. A.; Reddy, M. M.; Narender, N. Mild and Efficient α-Chlorination of Carbonyl Compounds Using Ammonium Chloride and Oxone (2KHSO 5 ·KHSO 4 ·K 2 SO 4). *Chem. Lett.* **2012**, *41* (4), 432–434. https://doi.org/10.1246/cl.2012.432.

(19) Zhou, Z. S.; Li, L.; He, X. H. A Simple and Convenient Method for Direct α-Chlorination of Ketones with Ammonium Chloride and Oxone®. *Chinese Chem. Lett.* **2012**, *23* (11), 1213–1216. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2012.09.014.

(20) Hussain, H.; Green, I. R.; Ahmed, I. Journey Describing Applications of Oxone in Synthetic Chemistry. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (5), 3329–3371. https://doi.org/10.1021/cr3004373.

(21) Zolfigol, M. A.; Bagherzadeh, M.; Mallakpour, S.; Chehardoli, G.; Kolvari, E.; Choghamarani, A. G.; Koukabi, N. Mild and Heterogeneous Oxidation of Urazoles to Their Corresponding Triazolinediones via in Situ Generation Cl+ Using Silica Sulfuric Acid/KClO3 or Silica Chloride/Oxone System. *Catal. Commun.* **2007**, *8* (3), 256–260. https://doi.org/10.1016/j.catcom.2006.04.006.

(22) Sheldon, R. A. Selective Catalytic Synthesis of Fine Chemicals: Opportunities and Trends. *J. Mol. Catal. A Chem.* **1996**, *107* (1–3), 75–83. https://doi.org/10.1016/1381-1169(95)00229-4.

(23) Sheldon, R. A. Fundamentals of Green Chemistry: Efficiency in Reaction Design. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (4), 1437–1451. https://doi.org/10.1039/c1cs15219j.

(24) Anastas, P. T., Warner, J. C., eds. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press, 1998.

(25) Tang, W. L.; Zhao, H. Industrial Biotechnology: Tools and Applications.

Biotechnol. J. **2009**, *4* (12), 1725–1739. https://doi.org/10.1002/biot.200900127.

(26) Risso, V. A.; Martinez-Rodriguez, S.; Candel, A. M.; Krüger, D. M.; Pantoja-Uceda, D.; Ortega-Muñoz, M.; Santoyo-Gonzalez, F.; Gaucher, E. A.; Kamerlin, S. C. L.; Bruix, M.; Gavira, J. A.; Sanchez-Ruiz, J. M. De Novo Active Sites for Resurrected Precambrian Enzymes. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 16113. https://doi.org/10.1038/ncomms16113.

(27) Arnold, F. H. Design by Directed Evolution. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (3), 125–131. https://doi.org/10.1021/ar960017f.

(28) Arnold, F. H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (16), 4143–4148. https://doi.org/10.1002/anie.201708408.

(29) Jones, C. W. Another Nobel Prize for Catalysis: Frances Arnold in 2018. *ACS Catal.* **2018**, *8* (11), 10913–10913. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b04266.

(30) Bell, E. L.; Finnigan, W.; France, S. P.; Green, A. P.; Hayes, M. A.; Hepworth, L. J.; Lovelock, S. L.; Niikura, H.; Osuna, S.; Romero, E.; Ryan, K. S.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Biocatalysis. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, *1* (1), 46. https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z.

(31) Martinez, C. A.; Hu, S.; Dumond, Y.; Tao, J.; Kelleher, P.; Tully, L. Development of a Chemoenzymatic Manufacturing Process for Pregabalin. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12* (3), 392–398. https://doi.org/10.1021/op7002248.

(32) Patel, R. N. *GREEN BIOCATALYSIS*; Patel, R. N., Ed.; John Wiley and Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2016. https://doi.org/10.1016/S0166-2481(08)70186-7.

(33) Fox, R. J.; Davis, S. C.; Mundorff, E. C.; Newman, L. M.; Gavrilovic, V.; Ma, S. K.; Chung, L. M.; Ching, C.; Tam, S.; Muley, S.; Grate, J.; Gruber, J.; Whitman, J. C.; Sheldon, R. A.; Huisman, G. W. Improving Catalytic Function by ProSAR-Driven Enzyme Evolution. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25* (3), 338–344. https://doi.org/10.1038/nbt1286.

(34) Ma, S. K.; Gruber, J.; Davis, C.; Newman, L.; Gray, D.; Wang, A.; Grate, J.; Huisman, G. W.; Sheldon, R. A. A Green-by-Design Biocatalytic Process for Atorvastatin Intermediate. *Green Chem.* **2010**, *12* (1), 81–86. https://doi.org/10.1039/b919115c.

(35) Savile, C. K.; Janey, J. M.; Mundorff, E. C.; Moore, J. C.; Tam, S.; Jarvis, W. R.; Colbeck, J. C.; Krebber, A.; Fleitz, F. J.; Brands, J.; Devine, P. N.; Huisman, G. W.; Hughes, G. J. Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. *Science (80-.).* **2010**, *329* (5989), 305–309. https://doi.org/10.1126/science.1188934.

(36) Davis, B. G.; Boyer, V. Biocatalysis and Enzymes in Organic Synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (6), 618–640. https://doi.org/10.1039/b003667f.

(37) Abedi, D.; Zhang, L.; Pyne, M.; Perry Chou, C. *Enzyme Biocatalysis*; Illanes, A., Ed.; Elsevier, 2011. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00003-3.

(38) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2011. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6.

(39) McDonald, A. G.; Tipton, K. F. Fifty-Five Years of Enzyme Classification: Advances and Difficulties. *FEBS J.* **2014**, *281* (2), 583–592. https://doi.org/10.1111/febs.12530.

(40) McDonald, A. G.; Boyce, S.; Tipton, K. F. ExplorEnz: The Primary Source of the IUBMB Enzyme List. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (SUPPL. 1), 593–597. https://doi.org/10.1093/nar/gkn582.

(41) Bansode, R. S.; Tas, R.; Tanriover, O. O.; IOTC; Alam, K. M.; Ashfiqur Rahman, J. M.; Tasnim, A.; Akther, A.; Mathijsen, D.; Sadouskaya, K.; Division, C. T.; Chen, Y. H.; Chen, S. H.; Lin, I. C.; Buterin, V.; Gu, Y.; Hou, D.; Wu, X.; Tao, J.; Zhang, Y.; Hasan, H.; AlHadhrami, E.; AlDhaheri, A.; Salah, K.; Jayaraman, R.; Within, C.; Text, T.; Communications, P.; Documents, P.; Documents, E.; Documents, I.; Formats, N.; IEEE; Periodicals, I.; Ferdous, M. S.; Nicoletti, B.; Hasan, M. G.; Sharif, K. I.; Miraz, M. H. Translocases EC 7: A New EC Class. *Comput. Ind. Eng.* **2018**, *2* (January), 6.

(42) Porto de Souza Vandenberghe, L.; Karp, S. G.; Binder Pagnoncelli, M. G.; von Linsingen Tavares, M.; Libardi Junior, N.; Valladares Diestra, K.; Viesser, J. A.; Soccol, C. R. Classification of Enzymes and Catalytic Properties. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals*; Elsevier, 2020; pp 11–30. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819820-9.00002-8.

(43) *Biocatalysis for Practitioners*; de Gonzalo, G., Lavandera, I., Eds.; Wiley, 2021. https://doi.org/10.1002/9783527824465.

(44) An, J.; Nie, Y.; Xu, Y. Structural Insights into Alcohol Dehydrogenases Catalyzing Asymmetric Reductions. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019**, *39* (3), 366–379. https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1566205.

(45) Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. Recent Progress in Biocatalysis for Asymmetric Oxidation and Reduction. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20* (5), 513–557. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2008.12.035.

(46) Martins Berta M., Macedo-Ribeiro Sandra, Bresser Julia, Buckel Wolfgang, M. A. Structural Basis for Stereo-Specific Catalysis InNAD+-Dependent (R)-2-Hydroxyglutarate Dehydrogenasefrom Acidaminococcus Fermentans.Pdf. 2005, pp 269–281. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2008.12.035.

(47) Itoh, N. Use of the Anti-Prelog Stereospecific Alcohol Dehydrogenase from Leifsonia and Pseudomonas for Producing Chiral Alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98* (9), 3889–3904. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5619-5.

(48) Prelog, V. Specification of the Stereospecificity of Some Oxido-Reductases by Diamond Lattice Sections. *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9* (1), 119–130. https://doi.org/10.1351/pac196409010119.

(49) Matsuda, M.; Yamazaki, T.; Fuhshuku, K.; Sugai, T. First Total Synthesis of Modiolide A, Based on the Whole-Cell Yeast-Catalyzed Asymmetric Reduction of a Propargyl Ketone. *Tetrahedron* **2007**, *63* (36), 8752–8760. https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.06.038.

(50) Patel, R. N.; Chu, L.; Mueller, R. Diastereoselective Microbial Reduction of (S)-[3-Chloro-2-Oxo-1- (Phenylmethyl)Propyl]Carbamic Acid, 1,1-Dimethylethyl

Ester. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14* (20), 3105–3109. https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2003.07.016.

(51) Patel, R. N.; Banerjee, A.; Howell, J. M.; McNamee, C. G.; Brozozowski, D.; Mirfakhrae, D.; Nanduri, V.; Thottathil, J. K.; Szarka, L. J. Microbial Synthesis of (2R,3S)-(−)-N-Benzoyl-3-Phenyl Isoserine Ethyl Ester-a Taxol Side-Chain Synthon. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4* (9), 2069–2084. https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)82256-9.

(52) Imashiro, R.; Kuroda, T. Highly Enantioselective Mukaiyama Aldol Reaction of Aα-Dichloro Ketene Silyl Acetal: An Efficient Synthesis of a Key Intermediate for Diltiazem. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (3), 974–979. https://doi.org/10.1021/jo026361+.

(53) Wuts, P. G. .; Gu, R. L.; Northuis, J. M. Synthesis of (2 R ,3 S)-Isobutyl Phenylisoserinate, the Taxol ® Side Chain, from Ethyl Benzoylacetate. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11* (10), 2117–2123. https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)00172-5.

(54) Mordant, C.; Caño de Andrade, C.; Touati, R.; Ratovelomanana-Vidal, V.; Hassine, B. Ben; Genêt, J.-P. Stereoselective Synthesis of Diltiazem via Dynamic Kinetic Resolution. *Synthesis (Stuttg)*. **2003**, No. 15, 2405–2409. https://doi.org/10.1055/s-2003-42397.

(55) Concellón, J. M.; Rodríguez-Solla, H.; Méjica, C. An Efficient Synthesis of (E)-α,β-Unsaturated Ketones and Esters with Total Stereoselectivity by Using Chromium Dichloride. *Tetrahedron* **2006**, *62* (14), 3292–3300. https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.01.052.

(56) Concellón, J.; Rodríguez-Solla, H.; Concellón, C.; Díaz-Pardo, A.; Llavona, R. A Convenient Synthesis of (E)-α,β-Unsaturated Esters with Total Stereoselectivity Promoted by Catalytic Samarium Diiodide. *Synlett* **2011**, *2011* (02), 262–264. https://doi.org/10.1055/s-0030-1259089.

(57) Concellón, J. M.; Huerta, M.; Llavona, R. Synthesis of (Z)-α-Chloro-α,β-Unsaturated Esters with Complete Stereoselectivity Promoted by Samarium Diiodide. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (24), 4665–4667. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.04.101.

(58) Inoue, Munenobu; Abe, Miho; Kagawa, T. Highly Diastereoselective Preparation of δ-Hydroxy-β-Ketoester Derivatives and Their Optically Active Substances. Tosoh Corp., Japan; Sagami Chemical Research Center 2009.

(59) Shibatomi, K.; Narayama, A.; Soga, Y.; Muto, T.; Iwasa, S. Enantioselective Gem -Chlorofluorination of Active Methylene Compounds Using a Chiral Spiro Oxazoline Ligand. *Org. Lett.* **2011**, *13* (11), 2944–2947. https://doi.org/10.1021/ol201007e.

(60) Frantz, R.; Hintermann, L.; Perseghini, M.; Broggini, D.; Togni, A. Titanium-Catalyzed Stereoselective Geminal Heterodihalogenation of β-Ketoesters. *Org. Lett.* **2003**, *5* (10), 1709–1712. https://doi.org/10.1021/ol0343459.