

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.04.077>

УДК 547.783

Д.В. Присяжнюк, <https://orcid.org/0000-0003-3286-4316>

О.О. Колодяжна, <https://orcid.org/0000-0002-2438-5895>

А.О. Колодяжна, <https://orcid.org/0000-0002-7990-7830>

О.О. Файзієв

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України ім. В.П. Кухаря, Київ

E-mail: oikol123@bpci.kiev.ua, Ghettohaddius@gmail.com

Визначення абсолютної конфігурації дигідроінденолів методами ферментативного аналізу та хіральної ВЕРХ

Представлено членом-кореспондентом НАН України О.І. Колодяжним

*Рацемічні 1,2-дигідроінденоли розділено на енантиомери за допомогою кінетичної контрольованої естерифікації в присутності біокатализатора *Burkholderia seracida* lipase (BCL). Досліджено також ферментативне розділення ацетатів галогендигідроінденолів гідролізом у присутності іммобілізованої на діатомітних ліпазах *Candida antarctica* В. Для визначення абсолютної конфігурації стереоізомерів галогендигідроінденолів використовували хіральний ВЕРХ-аналіз у поєднанні з ферментативною кінетичною дерацемізацією із застосуванням правила Казлаускаса, а також рентгеноструктурного аналізу для деяких сполук. Сумісне використання декількох методів підвищує надійність у визначенні абсолютної конфігурації досліджуваних сполук.*

Ключові слова: ферментативна дерацемізація, *Burkholderia seracida* lipase, абсолютна конфігурація, правило Казлаускаса, хіральна ВЕРХ.

Хіральна ВЕРХ має низку переваг, оскільки вона дає можливість у короткий час визначити оптичну чистоту сполук та здійснювати препаративний поділ енантиомерів у варіанті з 100 % ee [1, 2]. Крім того, одна з привабливих особливостей хіральної ВЕРХ — це можливість за її допомогою визначити структуру природних молекул. Біологічні сполуки часто містять декілька стереоцентрів, і в цих ситуаціях класичні підходи можуть потребувати кількох складних стадій. Завдання встановлення абсолютної конфігурації також може бути ефективно досягнуто з використанням хіральної ВЕРХ, оскільки її можна виконати в одну стадію, починаючи з порівняння часу утримання невідомого синтетичного або природного зразка з часом утримання еталонних енантиомерів, абсолютна конфігурація яких відома.

Цитування: Присяжнюк Д.В., Колодяжна О.О., Колодяжна А.О., Файзієв О.О. Визначення абсолютної конфігурації дигідроінденолів методами ферментативного аналізу та хіральної ВЕРХ. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2022. № 4. С. 77–86. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2022.04.077>

Ми досліджували можливість встановлювати з використанням хіральної ВЕРХ абсолютну конфігурацію оптично активних галогендигідроінденолів, які є компонентами різних біологічно активних сполук. Ці сполуки є синтетичними блоками для створення фармацевтичних препаратів, інсектицидів, пептидних нуклеїнових кислот і біорегуляторів. Наприклад, індинавір – це пероральний препарат, який використовується для лікування інфекції вірусу імунодефіциту людини [3]. *Цис*- і *транс*-індандіоли, а також аміноіндандіоли є ключовими хіральними синтонами в синтезі індинавіру [4, 5]. Іншим важливим фармацевтичним продуктом на основі інданів є ладостигіл, який використовується для лікування хвороб Альцгеймера та Паркінсона, що може уповільнити розвиток клінічних ознак протягом відносно короткого часу [6].

Відомості про синтез хіральних галогенінденолів вкрай обмежені, хоча синтезу та властивостям цих сполук присвячені патенти [7]. Наприклад, у промисловому способі отримання хірального синтетичного блока індинавіру – (1*S*,2*R*)-*цис*-аміноінданолу використовують бактеріальні клітини *Rhodococcus* sp. У синтезі ладостигілу, який містить фрагмент індану, використовували металокомплексні каталізатори, такі як RuCl₂-(PPh₃) (фероценілоксазолідин-фосфін) асиметричне гідрування інденонів з хіральним каталізатором Ru-PEG-BsDPEN, а також каталізатор RuCl[(1*S*,2*S*)-*p*-tosyl-N-CH(C₆H₅)CH(C₆H₅)-NH₂] (ETA, 6-*p*-Cumene)/Bu₄NBr та інші [6].

Становило інтерес отримання енантімерно чистих галогенінденолів методом ферментативного поділу цих біологічно активних сполук ліпазою *Burkholderia cepacia*, яка раніше для цієї мети не використовувалася. Згідно з вимогами Управління із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США (FDA), сучасні фармпрепарати можуть патентуватися, а в багатьох випадках застосовуватися лише в енантімерно чистій формі з однозначно встановленою абсолютною конфігурацією [10]. Тому розробка зручних експрес-методів для визначення абсолютної конфігурації дигідроінденолів є, безперечно, цікавим і корисним з практичного погляду завданням. Велике значення в цьому випадку має надійність визначень абсолютної конфігурації, тому що трапляються помилки під час їх виконання. У тому числі були допущені помилки під час визначення конфігурації деяких галогендигідроінденолів. Досі існують розбіжності у визначенні стереохімії (*S*)-4-бром-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олу, (*R*)-5-бром-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олу, (*R*)-5-хлор-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олу [7–9].

Ми для визначення абсолютної конфігурації галоген-1,2-дигідроінденолів застосовували методи хіральної ВЕРХ, ферментативного аналізу дигідроінденолів і рентгеноструктурного аналізу. Методи біокаталітичного поділу та хіральної ВЕРХ мають багато спільного. Насамперед вони дають змогу передбачити, яким чином відбуватиметься дерацемізація вторинного спирту. У разі використання хіральної колонки Chiralcell (*S*)-спирти міцніше утримуються хіральною нерухомою фазою і тому першим елююється спирт, що має конфігурацію (*R*). Це відбувається тому, що (*S*)-вторинний спирт утворює міцний водневий зв'язок з хіральним цукром, що міститься в нерухомій фазі [11, 12]. У разі ферментативної етерифікації вторинних спиртів, каталізованих ліпазами, в реакцію естерифікації переважно вступає (*R*)-спирт і утворюється (*R*)-естер, а (*S*)-спирт не прореагував, внаслідок чого реакційна суміш може бути легко розділена колонковою хроматографією. Згідно з правилом Казлаускаса, енантіоселективність ферментативної дерацемізації повинна бути пропорційна різниці в розмірах між великим (L) і середнім (M) замісниками в субстраті. Фізична сутність правила Казлаускаса визначається структурою активного центру ліпази, яка має

дві порожнини – одна більша, інша менша, відповідно до яких відбувається укладання субстрату в активний центр. Відповідно до структури активного центру відбувається орієнтація вторинного спирту в ході естерифікації та гідролізу відповідних естерів [13–15].

Поділ галоген-1,2-дигідроінден-1-олів на енантіомери здійснювали ацилюванням вініл-ацетатом в умовах кінетичного контролю в присутності *Burkholderia cepacia* lipase (BCL). Реакцію доводили до 50 %-ї конверсії, потім реакцію зупиняли фільтрацією біокатализатора. Отриману суміш спирту, що не прореагував, та ацетату розділили колонковою хроматографією. Для проведення кінетичної трансестерифікації галогенінденолів найкращим розчинником виявився *трет*-бутилметиловий ефір (МТБЕ), а біокатализатором – *Burkholderia cepacia*, при температурі 35 °С. У цьому випадку завершення реакції при 50 % конверсії призводило до ацилювання тільки (*R*)-енантіомера рацемічної суміші. В результаті був отриманий дигідроінденол (*S*)-конфігурації, що не прореагував, і ацил інданол конфігурації (*R*) з високим хімічним виходом і високим енантіомерним надлишком (*ee*). У результаті подальшого гідролізу (*R*)-ацил дигідроінденолу утворився дигідроінденол конфігурації (*R*). Таким чином, були отримані обидва (*S*)- та (*R*)-енантіомери галоген-1,2-дигідроінденолів (схеми 1, 2 і таблиця).

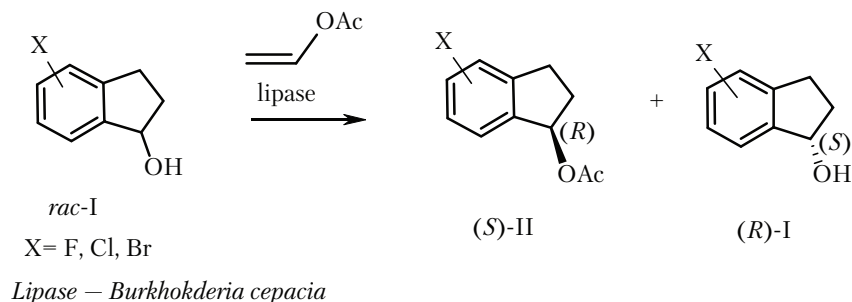


Схема 1

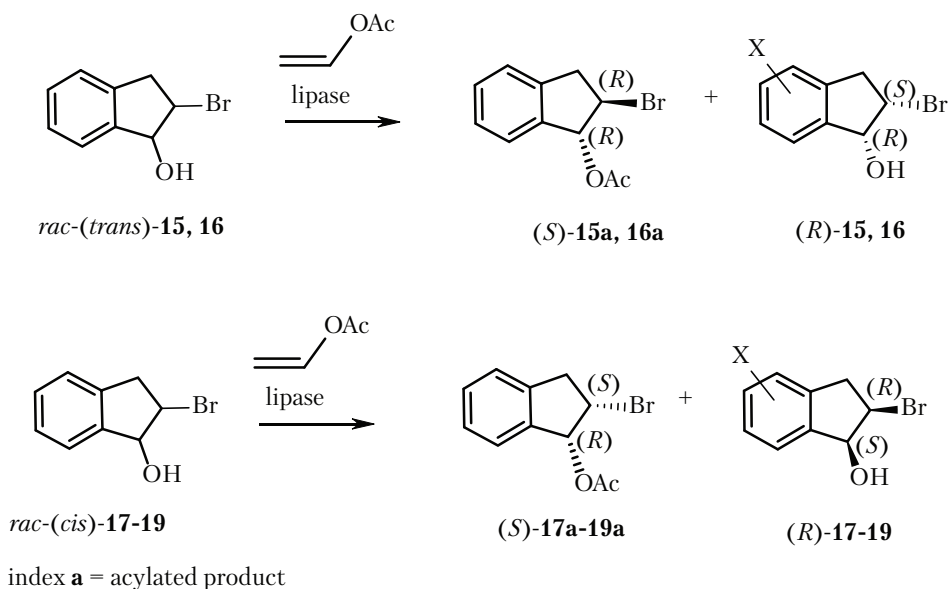


Схема 2

Реакцію кінетичного ферментативного гідролізу ацилінденолу проводили також у двофазній системі буферним розчином з рН 7,2 у середовищі МТБЕ в присутності біокатализатора NovoZim 435[®] (CALB) при температурі 45 °С. Реакцію завершували, досягнувши 50 % конверсії, що забезпечило поділ стереомерів рацемічної суміші з високим хімічним виходом і високою енантіомерною чистотою. У результаті подальшого гідролізу (*S*)-ацил дигідроінденолу, що не прореагував, утворився дигідроінденол (*S*)-конфігурації (схема 3).

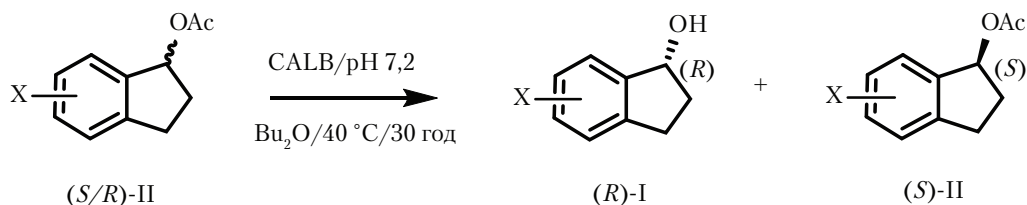


Схема 3

Novozym 435[®] (іммобілізована *Candida antarctica* ліпаза) має термостійкі властивості, тому ми дослідили вплив температури реакції на енантіомерний надлишок продукту за тих самих умов з використанням дізопропілового ефіру (ІРЕ) як розчинника. Зниження температури реакції до 30 °С не мало помітного впливу на енантіоселективність або швидкість реакції.

В оптимальних умовах оброблення ацетату NovoZym 435[®] у дибутиловому ефірі протягом 30 год при 40 °С призводило до перетворення (*rac*)-ацетату в (1*S*,2*S*)-інденол з виходом 49 % та 92 % *ee* відповідно (див. схему 2) [16].

Таким чином, усі зразки фтор-, хлор-, бромдигідроінденолів були розділені на (*S*)- та (*R*)-енантіомери, виділені та охарактеризовані фізико-хімічними методами. Деякі з отриманих нами сполук раніше були синтезовані методами металокомплексного каталізу, хоча і з нижчою енантіомерною чистотою [9]. Потім рацемічні та енантіомерно чисті (*S*)- і (*R*)-енантіомери були досліджені методом хіральної ВЕРХ. Порівняння стереохімічних властивостей сполук, отриманих нами шляхом ферментативного поділу, хіральної ВЕРХ, а також описаних у літературі показало однозначність визначень абсолютної конфігурації в усіх випадках. Результати цих досліджень проілюстровані на рисунку на прикладі (*rac*)-, (*S*)- та (*R*)-5-хлор-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олів. Як і належить, рацемат представлено у вигляді двох піків (*S*)- і (*R*)-енантіомерів, а також одиночних піків розділених енантіомерів. Цей експеримент підтвердив, що ацилювання вторинного спирту вінілацетатом, що каталізується ліпазою *Burkholderia cepacia*, є строго (*R*)-селективним. Крім того, підтверджено однозначність поділу енантіомерів на хіральній колонці Chiralcel OJ-H: (*S*)-енантіомер сильніше утримується стаціонарною фазою, ніж (*R*)-енантіомер. Крім того, як впливає з аналізу хроматограм, зображених на рисунку, поділ рацемічних 2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олів є надзвичайно ефективним і дає практично чисті (*S*)- та (*R*)-енантіомери. Розроблена методологія є простим доступом до обох (1*S*,2*S*)- і (1*R*,2*R*)-енантіомерів галогендигідроінденолів з високим ступенем оптичної чистоти.

Були отримані фтор-, хлор- і бром-1,2-дигідроінденоли як безбарвні кристалічні речовини, структура яких і хімічна чистота підтверджені різними фізико-хімічними методами — ЯМР, СR-MS, ВЕРХ. Оптична чистота додатково встановлена за допомогою дериватизації кислотою Мошера та хіральної рідинної хроматографії і загалом була на рівні 96—99 % *ee*.

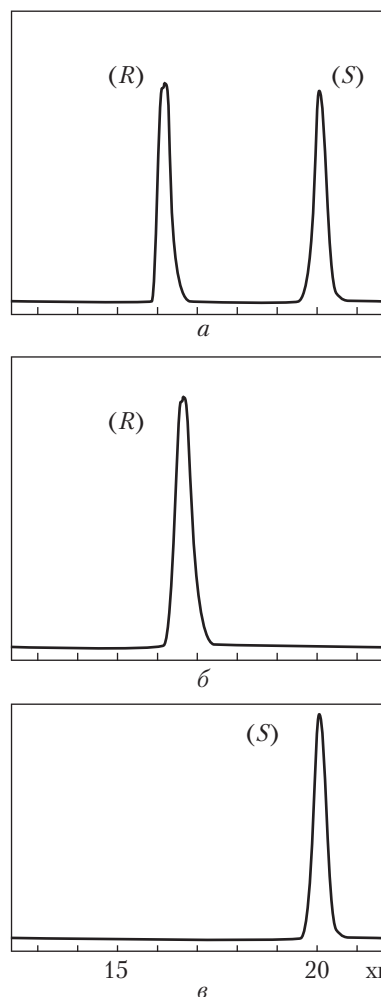
Оскільки визначення абсолютної конфігурації традиційно обмежується відносно трудомістким методом рентгенівської кристалографії, розробка альтернативних методів аналізу оптично активних речовин для визначення абсолютної конфігурації буде дуже корисною. Важливим аспектом методу хіральної ВЕРХ є те, що його можна використовувати для визначення абсолютної конфігурації навіть для неочищеної суміші енантіомерів. Ми застосували цей метод для визначення абсолютної конфігурації галоген-1,2-дигідроінденолів і очікуємо, що він буде в цілому застосовний до різноманітних п'ятичленних циклічних сполук (як дигідроінденолів, так і похідних циклопентану (див. рисунок).

Як видно з результатів, наведених в таблиці, ферментативне кінетичне розділення є надійним методом для визначення абсолютної конфігурації вторинних спиртів та амінів. Результати ферментативного кінетичного розділення підтверджені рентгеноструктурним аналізом *цис*- і *транс*-стереоізомерів 2-бром-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олів **17–20**. Ці сполуки містять важкий елемент — атом бром, що дає змогу визначити конфігурації цих сполук методом рентгеноструктурного аналізу.

Висновок. Методами ензиматичного кінетичного поділу, хіральної ВЕРХ та рентгеноструктурного аналізу визначено абсолютну конфігурацію низки дигідроінденолів. Отримані результати повністю узгоджуються між собою і свідчать про те, що запропонована нами методологія сумісного використання ферментативного аналізу рацемічної суміші, правила Казлаускаса та хіральної ВЕРХ є надійним методом, який можна застосовувати в рутинній роботі з п'ятичленними вторинними спиртами.

Експериментальна частина. Спектри ^1H ЯМР та ^{13}C ЯМР реєстрували у розчиннику CDCl_3 на спектрометрі 500 МГц при температурі навколишнього середовища. Хімічні зрушення (δ) показані у м.ч. щодо TMS як внутрішній стандарт. Використовували хроматограф Agilent Technologies 1200 з хіральною колонкою Chiralcel OJ-H з нерухомою фазою *трис*(4-метилбензоат)целюлози, нанесений на силікагель 5 мкм.

Мультиплетність сигналів показано як с (синглет), д (дублет), дд (дублет дублету), тд (триплет дублетів), т (триплет), м (мультиплет), ш (широкий). Константи спінового зв'язку J вказані у герцах. Усі реагенти та розчинники використовувалися без спеціального очищення, якщо не вказано інше. Колонкову хроматографію проводили на силікагелі 60 (70–230 меш) з використанням зазначених елюентів. Оптичні обертання вимірювали на поляриметрі Перкін-Елмер 241 (лінія натрію D при 20 °C). Точки топлен-



Хроматограма поділу 5-хлор-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олу на енантіомери: а — рацемату; б — (*R*)-**11**; в — (*S*)-**12** (хіральна колонка Chiralcel OJ-H (250 × 4,6 мм, із селектором целюлози *трис*(4-метилбензоатом), нанесеним на 5 мкм силікагель)

ня не коригувалися. Всі реакції проводили у висушеному на вогні або висушеному в сушильній камері скляному посуді з перемішуванням на магнітній мішалці. Ліпаза з *Burkholderia seracida* (Amano PS) була придбана у Amano Pharmaceutical (Японія). За перебігом реакцій стежили за допомогою аналітичної тонкошарової хроматографії (ТШХ) на скляних пластинах силікагель 60 F254 (Мерк, Німеччина), продукти візуалізували анісальдегідом або УФ. Чистоту всіх сполук перевіряли за допомогою ТШХ та ЯМР-вимірювань.

Ферментативне кінетичне розділення галогенінденолів.

(S)-4-Фтор-2,3-дигідро-1H-інден-1-ол (типовий експеримент).

А. Ферментативне ацилювання. Розчин рацемічного 2,3-дигідро-1H-інден-1-олу (0,01 моль), ліпазу *Burkholderia seracida* (0,1 г), вінілацетату (3 мл) у МТБЕ (3 мл) перемішували при температурі 24 °С. Ацилювання інденолу контролювали за допомогою ТШХ та ЯМР. Реакційну суміш перемішували до 50 % конверсії вихідного спирту, що займає приблизно 18 год. Потім реакційну суміш фільтрували, упарювали у вакуумі, отриману речовину хроматографували на колонці з силікагелем з використанням елюенту — гексан-етил-

Визначення абсолютної конфігурації галоген-1,2 дигідроінденолів — 

| Сполука | X | Y | Т. топ., °С | Конфігурація | $[\alpha]_D^{20}$ | τ , хв | ВЕРХ | Примітки |
|---------|------|------|-------------|--------------|--------------------|--------------------|------|----------|
| 3 | 4-F | H | 100 | S | +17,0 ^a | 18,5 | c | — |
| 4 | 4-F | H | 100 | R | -17,0 ^a | 15,2 | c | — |
| 5 | 5-F | H | 100 | S | +17,0 ^a | 17,83 | c | — |
| 6 | 5-F | H | 100 | R | -17,0 ^a | 14,69 | c | — |
| 7 | 6-F | H | 100 | S | +14,9 ^a | 14,1 | c | h |
| 8 | 6-F | H | 100 | R | -15,9 | 12,8 | c | — |
| 9 | 4-Cl | H | 105 | S | +20,0 ^a | 10,58 | d | — |
| 10 | 4-Cl | H | 105 | R | -20,0 ^a | 9,24 ^b | d | — |
| 11 | 5-Cl | H | 105 | S | +28,0 ^a | 20,03 | d | i |
| 12 | 5-Cl | H | 105 | R | -28,0 ^a | 16,17 ^c | d | j |
| 13 | 4-Br | H | 85 | S | +19,0 ^a | 10,58 | c | k |
| 14 | 4-Br | H | 102 | R | -18,9 ^a | 9,24 ^b | c | — |
| 15 | 5-Br | H | 100 | S | +20,0 ^a | 11,2 | e | — |
| 16 | 5-Br | H | 85 | R | -25,0 ^a | 9,9 | e | l |
| 17 | 4-H | 2-Br | 113 | 1S,2S | +63,2 ^a | 18,06 | f | m |
| 18 | 4-H | 2-Br | 116 | 1R,2R | -61,5 ^a | 12,43 | f | m |
| 19 | 4-H | 2-Br | 103 | 1S,2R | +61,5 ^a | 12,44 | g | m |
| 20 | 4-H | 2-Br | 113 | 1R,2S | -53,1 ^a | 17,98 | g | m |

^{a-g} Умови роздільної здатності ВЕРХ: хіральна колонка Chiralcel OJ-H (250 × 4,6 мм) із селектором целюлози *трис*(4-метилбензоат), нанесеним на 5 мкм силікагелю: ^a CHCl₃, C = 0,1; ^b EtOH, C = 0,1; ^c Hexan-i-Pr₂O 97 : 3; ^d Hexan-i-Pr₂O-MeOH 95 : 2,5 : 2,5; ^e Hexan-i-Pr₂O 97 : 3; ^f Hexan-i-Pr₂O 90 : 10; ^g Hexan-i-Pr₂O 80 : 20; ^h $[\alpha]_D^{20} = +14,9$ (с 5,6, CHCl₃) [9]; ⁱ $[\alpha]_D^{20} = +14,8$ (с 7,3, CHCl₃) [9]; ^j $[\alpha]_D^{20} = -9,2$ (с 8,3, CHCl₃) [15]; ^k $[\alpha]_D^{25} = +15,8$ (с 1,0, CHCl₃) [9]; ^l $[\alpha]_D^{22} = -19,6$ (с 1,0, CHCl₃); ^m раніше описані нами в роботі [14].

ацетат-етанол (95 : 5–3 : 1). Одержували (*R*)-4-фтор-дигідроінденол ацетат з виходом 46 % і (*S*)-4-фтор-1,2-дигідроінденол, що не прореагував, з виходом 48 %, який перекристалізували з толуолу. Вихід кристалізованого (*S*)-4-фтор-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-олу 42 %.

$[\alpha]_D^{20}$: +17,0 (С 1, CHCl_3).

^1H ЯМР (CDCl_3): δ = 1,35 (м, 1H), 2,00 (м, 1H), 2,55 (м, 1H), 2,80 (м, 1H), 3,15 (м, 1H), 5,20 (кв, J = 6,0 Гц, 1H), 6,90 (м, 1H), 7,30 (д, J = 9,0 Гц, 1H), 7,45 (м, 1H).

^{13}C ЯМР (CDCl_3): δ = 24,54, 40,50, 70,73, 115,9 (д, J = 20,0 Гц), 117,9 (д, J = 20,5 Гц), 129,7 (д, J = 8,5 Гц), 144,8, 149,9 (д, J = 7,5 Гц), 164,5 (д, J = 250,0 Гц).

Б. (*R*)-4-Фтор-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-ол. Отриманий у попередньому експерименті після хроматографічного поділу ацетат (0,01 моль) гідролізували обробленням розчином поташу (2 г) у 20 мл метанолу при перемішуванні та кімнатній температурі. За перебігом гідролізу стежили за допомогою ТШХ. Розчинник упарили у вакуумі, залишок екстрагували етилацетатом. Потім екстракт упарили і залишок перекристалізували з толуолу. В результаті отримали чистий (*R*)-4-фтор-2,3-дигідро-1*H*-інден-1-ол з виходом ~45 %.

$[\alpha]_D^{20}$: -17,0 (С 1, CHCl_3).

^1H ЯМР (CDCl_3): δ = 1,4 (м, 1H), 1,90 (м, 1H), 2,55 (м, 1H), 2,85 (м, 1H), 3,10 (м, 1H), 5,25 (кв, J = 6,0 Гц, 1H), 6,95 (м, 1H), 7,30 (д, J = 9,0 Гц, 1H), 7,35 (м, 1H).

^{13}C ЯМР (CDCl_3): δ = 24,50, 40,45, 70,70, 115,8 (д, J = 20,0 Гц,), 118,0 (д, J = 20,5 Гц,), 129,0 (д, J = 8,5 Гц,), 145,0, 140,0 (д, J = 7,5 Гц,), 165,0 (д, J = 250,0 Гц).

Кінетичний поділ ферментативним гідролізом рацемічних галоген-2,3-дигідро-1*H*-інденол ацетатів (типовий експеримент).

(*S*)-4-Бром-2,3-дигідро-1*H*-інденол. (*Rac*)-4-Бром-2,3-дигідро-1*H*-інденол 1-ацетат (5 ммоль) гідролізували у фосфатно-буферному водному розчині при постійному рН 7,2 з використанням ліпази *Burkholderia cepacia* (0,2 г) при перемішуванні та кімнатній температурі. Гідроліз контролювали за допомогою ТШХ та ^1H ЯМР. Далі ліпазу фільтрували та промивали метиленхлоридом. Розчинник упарювали. У залишку отримали суміш (*R*)-4-бром-2,3-дигідро-1*H*-інденол 1-ацетату та (*S*)-4-бром-2,3-дигідро-1*H*-інденолу, яку екстрагували етилацетатом. Потім екстракт упарили. Отриману суміш продуктів розділили на хроматографічній колонці з силікагелем. Елюенти: гексан—етилацетат—етанол (95 : 5 : 1), перекристалізували з толуолу. Вихід 42 %, т. топ. 100 °С, $[\alpha]_D^{20}$ = -20,00 (С = 1, CDCl_3). Співвідношення енантіомерів 98 : 2 визначали за допомогою ВЕРХ з використанням колонки Chiralcel OJ-H (95 % гексан/2пропанол, потік 1,0 мл/хв). *tR* 9,5 хв (мінорний); *tR* 11,1 хв (мажорний).

^1H ЯМР (CDCl_3): δ = 1,75 (с, 1H, OH), 1,81 (м, 1H), 2,50 (м, 1H), 2,75 (м, 1H), 3,10 (м, 1H), 3,12–3,03 (м, 1H), 5,25 (кв, J = 6,0 Гц, 1H), 7,35 (м, 1H), 7,35 (м, 1H), 7,45 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (CDCl_3): δ = 31,8, 35,9, 78,5, 120,6, 124,2, 129,6, 132,0, 144,6, 147,5.

GSMS: 213,1000; 194,9020

(*R*)-4-Бром-2,3-дигідро-1*H*-інденол (*S*). Отриманий гідролізом (*R*)-ацетату обробкою поташем, як описано вище.

Вихід 42 %, т. топ. 100 °С, $[\alpha]_D^{20}$ = +20,00 (С = 1, CDCl_3).

^1H ЯМР (CDCl_3): δ = 1,75 (с, 1H, OH), 1,81 (м, 1H), 2,50 (м, 1H), 2,75 (м, 1H), 3,10 (м, 1H), 3,12–3,03 (м, 1H), 5,25 (кв, J = 6,0 Гц, 1H), 7,35 (м, 1H), 7,35 (м, 1H), 7,45 (м, 2H).

^{13}C ЯМР (CDCl_3): δ = 31,8, 35,9, 78,5, 120,6, 124,2, 129,6, 132,0, 144,6, 147,5.

GSMS: 213,1000; 194,9020.

Хроматографічне визначення абсолютної конфігурації. Зразки розчиняли в рухомій фазі при концентрації 0,1 мг/мл. Як рухливу фазу використовували *n*-гексан з модифікатором (метенол, діізопропіловий ефір) різної концентрації. Всі розчини фільтрували (0,45 мм) і дегазували в ультразвуковій ванні перед використанням. Швидкість рухомого потоку фази становила 0,5 мл/хв. УФ-детектування проводили за 230 нм. Хроматографію виконували при 25 °С, якщо не зазначено інше, для визначення температурної залежності енантіорозділення. Після кожної зміни температури або складу рухомої фази колонку врівноважували рухомою фазою протягом не менше 2 год перед введенням нового зразка. Час порожнього стану колонки (t_0) визначали шляхом введення *n*-гексану та реєстрації першого відхилення базової лінії. До кожного хроматографічного експерименту проводили подвійні ін'єкції (див. таблицю).

^1H , ^{13}C ЯМР спектри сполук **3–16** описані в раніше опублікованій нами роботі [6], спектри сполук **17–20** — у статті [16]. Результати ВЕРХ, GR-MS зведені в таблиці. Рентгеноструктурний аналіз сполук **15–18** описаний нами у статті [6].

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Roussel C., Del Rio A., Pierrot-Sanders J., Piras P., Vanthuyn N. Chiral liquid chromatography contribution to the determination of the absolute configuration of enantiomers. *J. Chromatogr. A*. 2004. **1037**. P. 311–328. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.065>
2. Liu F., Boross P.I., Wang Y.-F., Tozser J., Louis J.M., Harrison R.W., Weber I.T. Kinetic, stability, and structural changes in high-resolution crystal structures of HIV-1 Protease with drug-resistant mutations L24I, I50V, and G73S. *J. Mol. Biol.* 2005. **354**. P. 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.095>
3. Shankar S.S., Dubé M.P., Gorski J.C., Klaunig J.E., Steinberg H.O. Indinavir impairs endothelial function in healthy HIV-negative men. *Am. Heart J.* 2005. **150**. P. 933. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2005.06.005>
4. Igarashi Y., Otsutomo S., Harada M., Nakano S. Enzymatic resolution of indene bromohydrin acetate using immobilized lipase. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1997. **8**. P. 2833–2837. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(97\)00351-0](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(97)00351-0)
5. Weinstock M., Luques L., Bejar C., Shoham S. Ladostigil, a novel multifunctional drug for the treatment of dementia co-morbid with depression. *J. Neural Transm.* 2006. Suppl. **70**. P. 443–446. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_67
6. Prysiashnuk D.V., Kolodiazhna O.O., Kolodiazhnyi O.I. Enzymatic deracemization of halogenated dihydroindenols and dihydroindenediols substituted in benzene ring. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.* 2020. № 3. P. 71–81. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.03.071>
7. Kišić A., Stephan M., Mohar B. *ansa*-Ruthenium(II) complexes of $\text{R}_2\text{NSO}_2\text{DPEN}-(\text{CH}_2)_n(\eta^6\text{-aryl})$ conjugate ligands for asymmetric transfer hydrogenation of aryl ketones. *Adv. Synth. Catal.* 2015. **357**. P. 2540–2546. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500288>
8. Yoshimatsu S., Yamada A., Nakata K. Silylative kinetic resolution of racemic 1-indanol derivatives catalyzed by chiral guanidine. *J. Org. Chem.* 2018. **83**. P. 452–458. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02493>
9. Falconnet A., Magre M., Maity B., Cavallo L., Rueping M.. Asymmetric magnesium-catalyzed hydroboration by metal-ligand cooperative catalysis. *Angew. Chem.* 2019. **58**. P. 17567–17571. <https://doi.org/10.1002/anie.201908012>
10. FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. *Chirality*. 1992. **4**. P. 338–340. <https://doi.org/10.1002/chir.530040513>
11. Chiral liquid chromatography: Lough W.J. (Ed.). New York: Blackie/Chapman and Hall, 1989. 285 p.
12. Pirkle W.H., Pochapsky T.C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers. *Chem. Rev.* 1989. **89**. P. 347–362. <https://doi.org/10.1021/cr00092a006>
13. Kazlauskas R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* 1991. **56**. P. 2656–2665. <https://doi.org/10.1021/jo00008a016>

14. Prsyazhnik D.V., Rusanov E.B., Kolodiaznyi O.I. The absolute configuration of 2-bromo-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-ols. *Synth. Commun.* 2021. **51**. P. 3023–3031. <https://doi.org/10.1080/00397911.2021.1960378>
15. Seco J.M., Quiñoá E., Riguera R. The assignment of absolute configuration by NMR. *Chem. Rev.* 2004. **104**. P. 17–117. <https://doi.org/10.1021/cr000665j>
16. Kolodiazna O.O., Prsyazhnik D.V., Kolodiazna A.O., Kolodiaznyi O.I. Synthesis of optically active vicinal fluorocyclopentanols and fluorocyclopentanamines by enzymatic deracemization. *Arkivoc.* 2022. **3**. P. 14–26. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p011.634>

Надійшло до редакції 02.05.2022

REFERENCES

1. Rouse, I. C., Del Rio, A., Pierrot-Sanders, J., Piras, P. & Vanthuyne, N. (2004). Chiral liquid chromatography contribution to the determination of the absolute configuration of enantiomers. *J. Chromatogr. A*, 1037, pp. 311–328. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.065>
2. Liu, F., Boross, P. I., Wang, Y. -F., Tozser, J., Louis, J. M., Harrison, R. W. & Weber, I. T. (2005). Kinetic, stability, and structural changes in high-resolution crystal structures of HIV-1 protease with drug-resistant mutations L24I, I50V, and G73S. *J. Mol. Biol.*, 354, pp. 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.095>
3. Shankar, S. S., Dubé, M. P., Gorski, J. C., Klaunig, J. E. & Steinberg, H. O. (2005). Indinavir impairs endothelial function in healthy HIV-negative men. *Am. Heart J.*, 150, pp. 933. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2005.06.005>
4. Igarashi, Y., Otsutomo, S., Harada, M. & Nakano, S. (1997). Enzymatic resolution of indene bromohydrin acetate using immobilized lipase. *Tetrahedron: Asymmetry*, 8, pp. 2833–2837. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(97\)00351-0](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(97)00351-0)
5. Weinstock, M., Luques, L., Bejar, C. & Shoham, S. (2006). Ladostigil, a novel multifunctional drug for the treatment of dementia co-morbid with depression. *J. Neural Transm., Suppl.* 70, pp. 443–446. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_67
6. Prsyazhnik, D. V., Kolodiazna, O. O. & Kolodiaznyi, O. I. (2020). Enzymatic deracemization of halogenated dihydroindenols and dihydroindenediols substituted in benzene ring. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 3, pp. 71–81. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.03.071>
7. Kišić, A., Stephan, M. & Mohar, B. (2015). *ansa*-Ruthenium(II) complexes of R₂NSO₂DPEN-(CH₂)_n(η⁶-aryl) conjugate ligands for asymmetric transfer hydrogenation of aryl ketones. *Adv. Synth. Catal.*, 357, pp. 2540–2546. <https://doi.org/10.1002/adsc.201500288>
8. Yoshimatsu, S., Yamada, A. & Nakata, K. (2018). Silylative kinetic resolution of racemic 1-indanol derivatives catalyzed by chiral guanidine. *J. Org. Chem.*, 83, pp. 452–458. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02493>
9. Falconnet, A., Magre, M., Maity, B., Cavallo, L. & Rueping, M. (2019). Asymmetric magnesium-catalyzed hydroboration by metal-ligand cooperative catalysis. *Angew. Chem.*, 58, pp. 17567–17571. <https://doi.org/10.1002/anie.201908012>
10. FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. (1992). *Chirality*, 4, pp. 338–340. <https://doi.org/10.1002/chir.530040513>
11. Lough, W. J. (Ed.). (1989). *Chiral liquid chromatography*. New York: Blackie/Chapman and Hall.
12. Pirkle, W. H. & Pochapsky, T. C. (1989). Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatography separation of enantiomers. *Chem. Rev.*, 89, pp. 347–362. <https://doi.org/10.1021/cr00092a006>
13. Kazlauskas, R. J., Weissfloch, A. N. E., Rappaport, A. T. & Cuccia, L. A. (1991). A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.*, 56, pp. 2656–2665. <https://doi.org/10.1021/jo00008a016>
14. Prsyazhnik, D. V., Rusanov, E. B. & Kolodiaznyi, O. I. (2021). The absolute configuration of 2-bromo-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-ols. *Synth. Commun.*, 51, pp. 3023–3031. <https://doi.org/10.1080/00397911.2021.1960378>
15. Seco, J. M., Quiñoá, E. & Riguera, R. (2004). The assignment of absolute configuration by NMR. *Chem. Rev.*, 104, 17–117. <https://doi.org/10.1021/cr000665j>
16. Kolodiazna, O. O., Prsyazhnik, D. V., Kolodiazna, A. O. & Kolodiaznyi, O. I. (2022). Synthesis of optically active vicinal fluorocyclopentanols and fluorocyclopentanamines by enzymatic deracemization. *Arkivoc*, 3, pp. 14–26. <https://doi.org/10.24820/ark.5550190.p011.634>

Received 02.05.2022

D.V. Prysiazhnuk, <https://orcid.org/0000-0003-3286-4316>

O.O. Kolodyazhna, <https://orcid.org/0000-0002-2438-5895>

A.O. Kolodyazhna, <https://orcid.org/0000-0002-7990-7830>

O.O. Файзієв

V.P. Kukhar Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: oikol123@bpci.kiev.ua, Ghettothaddius@gmail.com

DETERMINATION OF ABSOLUTE CONFIGURATION OF DIHYDROINDENOLS BY ENZYMATIC ANALYSIS AND CHIRAL HPLC

Racemic 1,2-dihydroindenols were resolved into enantiomers using kinetically controlled esterification in the presence of *Burkholderia cepacia* lipase (BCL) biocatalyst. The resolution of halodihydroindenol acetates to enantiomers by enzymatic hydrolysis in the presence of *Candida Antarctica* B lipases immobilized on diatomite was also studied. To determine the absolute configuration of stereoisomers of halodihydroindenols, chiral HPLC analysis was used in combination with enzymatic analysis. The combined use of several methods increases the reliability in determining the absolute configuration of the studied compounds.

Keywords: enzymatic deracemization, *Burkholderia cepacia* lipase, absolute configuration, Kazlauskas rule, chiral HPLC.