



Lublin, 15.05.2016

RECENZJA

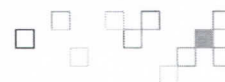
pracy doktorskiej mgr Anny Dzielak, zatytułowanej "Synteza wielofunkcyjnych aminofosfinianów w trójskładnikowej reakcji fosfa-Mannicha", wykonanej w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dr hab. Artura Muchy, prof. PWR

Opracowywanie nowych metodologii syntezy związków organicznych jest jednym z najważniejszych zadań współczesnej chemii organicznej. Wiąże się to z dużym i ciągle pogłębiającym się zapotrzebowaniem na związki organiczne, które znalazły zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu a także w życiu codziennym. To stwierdzenie jest jak najbardziej prawdziwe w przypadku związków fosforoorganicznych, które wykorzystywane są jako substraty, reagenty bądź substancje pomocnicze w syntezie organicznej lecz także jako środki biobójcze, środki ochrony roślin, uniepalniacze, plastyfikatory, substancje smarne, środki zapobiegające tworzeniu się kamienia kotłowego itd. Tak duże zapotrzebowanie rodzi konieczność opracowywania wydajnych, ekonomicznych a przede wszystkim przyjaznych dla środowiska metod syntezy związków organicznych. Jednym z możliwych rozwiązań jest wykorzystanie reakcji multikomponentowych. Jest to szczególny rodzaj przekształceń, w których używane są co najmniej trzy substraty. Prosta analiza pozwala stwierdzić, iż tworzenie produktu docelowego zachodzi na drodze co najmniej dwóch reakcji, które mają miejsce w tym samym naczyniu reakcyjnym. Główną zaletą tego podejścia jest możliwość tworzenia w pojedynczym procesie skomplikowanych związków organicznych z bardzo prostych substratów, co pozwala zaoszczędzić zarówno czas jak i obniżyć koszt takiej syntezy, chociażby poprzez zmniejszenie zużycia rozpuszczalników. Wydaje się więc, iż decyzja podjęta przez Doktorantkę dotycząca wprowadzenia reakcji multikomponentowych jako narzędzia syntezy związków fosforoorganicznych jest jak najbardziej zasadna i godna pochwały, pomimo pewnego rozpoznania tematu przez inne zespoły badawcze.

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska ma klasyczny podział. Początek to studium literaturowe, następnie badania własne, podsumowanie, część eksperymentalna oraz wykaz cytowanej literatury. Studium literaturowe to dość obszerny przegląd chemii organicznej, od ogólnego opisu związków organicznych, poprzez reakcje multikomponentowe, na reakcjach indukowanych promieniowaniem mikrofalowym kończąc. W pierwszej części studium literaturowego Autorka w bardzo skrótowy sposób przedstawiła wykorzystanie związków fosforoorganicznych w syntezie organicznej, biologii i przemyśle. Omówienie ich zastosowania w syntezie zostało ograniczone do wymienienia reakcji Wittiga oraz katalizatorów Grubbsa. Opis zastosowań w biologii bazował na opisie fosforowych analogów aminokwasów i ich zdolnościom modyfikacji aktywności enzymów hydrolitycznych, zapobieganiu utracie masy kostnej czy inhibicji acetylocholinesterazy. Opis zastosowania przemysłowego związków fosforoorganicznych koncentrował się na zdolnościach niektórych związków do chelatowania kationów, co zapobiega tworzeniu się kamienia kotłowego oraz wykorzystaniu innych związków jako uniepalniacze czy plastyfikatory.

Dруга część studium literaturowego została poświęcona omówieniu reakcji multikomponentowych, ich podziału ze względu na użyty substrat czy też ze względu na typ reakcji zachodzącej w danej





mieszanie. Autorka w tym miejscu omówiła najbardziej znane reakcje wieloskładnikowe, takie jak reakcja Ugiego, Passeriniego, Hantscha czy Biginellogo. W tej części przedstawione zostały również najnowsze trendy w opracowywaniu nowych reakcji wieloskładnikowych, jak również możliwości jakie dają te reakcje w syntezie skomplikowanych związków organicznych, w tym tych posiadających właściwości biologiczne. Doktorantka omówiła także w tym miejscu doniesienia literaturowe dotyczące wykorzystania reakcji multikomponentowych w syntezie związków fosforoorganicznych skupiając się głównie na reakcjach Ugiego, Passeriniego, amidoalkilowania i reakcji fosfa-Mannicha.

Część trzecia studium literaturowego poświęcona została omówieniu wykorzystania promieniowania mikrofalowego w syntezie związków fosforoorganicznych. Bazując na dostępnych danych literaturowych Doktorantka omówiła użycie promieniowania mikrofalowego w szeregu reakcjach z chemii fosforoorganicznej, takich jak reakcja Wittiga, reakcja Michaelisa-Arbuzowa, reakcja Hirao, reakcja fosfa-Michaela czy reakcja Pudowika. Omawiane przez Autorkę przykłady prowadzą do konkluzji, iż zastosowanie promieniowania mikrofalowania jako źródła ciepła pozwala nie tylko osiągnąć ten sam wynik w znacznie krótszym czasie ale w niektórych przypadkach wręcz umożliwia zajście reakcji, która w klasycznych warunkach nie zachodzi.

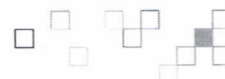
Kontynuując omawianie wykorzystania promieniowania mikrofalowego Doktorantka bardzo hasłowo przedstawiła jego zastosowanie w reakcjach multikomponentowych aby następnie omówić kilka przykładów reakcji multikomponentowych prowadzących do związków fosforoorganicznych, indukowanych za pomocą promieniowania mikrofalowego.

Opis badań własnych Doktorantka rozpoczęła od przedstawienia założeń własnej pracy doktorskiej, które dotyczyły opracowania możliwie uniwersalnej metody syntezy kwasów α -aminofosfinowych na drodze trójskładnikowej reakcji prowadzącej poprzez etap addycji fosfa-Mannicha związków typu $>P(O)H$ do generowanych *in situ* imin z odpowiednich związków karbonylowych i pierwszo bądź drugorzędowych amin. Potrzebę dostępu do szerokiej gamy tego typu połączeń Autorka uzasadnia między innymi posiadaniem przez nie potencjalnych właściwości bioaktywnych, gdyż struktura kwasu α -aminofosfinowego imituje tetraedryczny stan przejściowy reakcji hydrolizy wiązania peptydowego, co może zostać wykorzystane przy projektowaniu leku blokującego kluczowe czynności życiowe czynników chorobotwórczych.

Przed przystąpieniem do omawiania wyników badań własnych Doktorantka opisuje znane w literaturze metody syntezy kwasów α -amino-*H*-fosfinowych, gdyż są to związki wyjściowe bo prowadzonych przez Autorkę badań właściwych. Opis najważniejszych metod prowadzi do konkluzji, iż związki te najłatwiej jest otrzymać wykorzystując kwas podfosforawy H_3PO_2 bądź jego sól, który w reakcji z generowanymi *in situ* iminami prowadzi do pożądaných substratów.

Właściwą część badań własnych Doktorantka przedstawiła w kilku podrozdziałach, które były podzielone ze względu na rodzaj użytej do reakcji aminy, w kolejności omawiania były to aminokwasy, aminy alifatyczne oraz aminy aromatyczne. Taki podział okazał się konieczny, gdyż, jak się okazało, każda z tych klas związków zachowywała się odmiennie w warunkach reakcji multikomponentowej.

Próby użycia aminokwasów zawierających grupy $\alpha-NH_2$ prowadziły generalnie do utworzenia skomplikowanej mieszaniny reakcyjnej, dlatego też konieczna była optymalizacja tej reakcji. Z drugiej strony, aminokwasy zawierające drugorzędowe grupy aminowe ulegały trójkomponentowej reakcji z kwasem α -amino-*H*-fosfinowym i formaldehydem tworząc odpowiednie produkty z dobrymi wydajnościami. Na tym etapie badań Doktorantka podjęła próbę zbadania składu typowej mieszaniny reakcyjnej powstałej w wyniku użycia aminokwasu posiadającego grupę NH_2 . Okazało się, iż w badanych warunkach kwas α -amino-*H*-fosfinowy ulegał kilku konkurencyjnym reakcjom. Poza właściwą trójkomponentową reakcją fosfa-Mannicha, kwas ten ulegał także utlenieniu do odpowiedniego kwasu fosfonowego, addycji do formaldehydu oraz, co ciekawe, ulegał reakcji z formaldehydem tworząc odpowiednią iminę, która w następnym etapie ulegała dimeryzacji na drodze reakcji fosfa-Mannicha. Determinacja Doktorantki w ustalaniu struktury produktów tak skomplikowanej reakcji jest godna pochwały.



Pomimo dość niesprzyjających wyników Autorka zdecydowała się otrzymać serię adduktów modelowego kwasu α -amino-*H*-fosfinowy z różnymi aminokwasami a następnie zbadać ich aktywność jako inhibitory aminopeptydaz. Zdaniem Doktorantki, badane związki wykazywały przeciętną aktywność hamującą działanie aminopeptydaz.

Dla porównania, Doktorantka przeprowadziła syntezę wybranych adduktów wykorzystując *N*-benzylowane aminokwasy oraz 1,3,5-triazyny będące adduktami aminokwasów i formaldehydu. W obu przypadkach wydajności adduktów były dużo wyższe od wydajności uzyskiwanych w przypadku użycia aminokwasów posiadających grupę NH_2 .

W drugiej części swoich badań Doktorantka zajęła się opracowaniem trójkomponentowej reakcji fosfa-Mannicha wykorzystując aminy alifatyczne jako substraty. Ze względu na niską selektywność reakcji trójkomponentowych z użyciem aminokwasów z grupą NH_2 Doktorantka wybrane do badań pierwszorzędowe aminy postanowiła tymczasowo przekształcić w odpowiednie drugorzędowe benzyloaminy. Optymalizacja warunków reakcji trójkomponentowej pozwoliła Autorce otrzymać szereg kwasów α -alkilobenzyloaminofosfinowych, które w następnym etapie zostały poddane deprotekcji, co prowadziło do utworzenia docelowych kwasów α -alkiloaminometylofosfinowych. Na tym etapie Doktorantka napotkała problem związany z wydzielaniem otrzymanych docelowych związków, gdyż większość z nich nie była krystaliczna. Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej pozwoliło rozwiązać ten problem.

Oprócz drugorzędowych benzyloamin, otrzymano także serię kwasów aminofosfinowych wywodzących się z symetrycznych diamin: dimetyloaminy, dietyloaminy czy piperydyny. Otrzymane w tym rozdziale związki zostały sprawdzone pod kątem aktywności biologicznej wobec ureazy.

Trzeci rozdział badań własnych poświęcony był optymalizacji reakcji trójkomponentowej fosfa-Mannicha dla amin aromatycznych. Analogicznie do pierwszorzędowych amin alifatycznych, Doktorantka przekształciła pierwszorzędowe aminy aromatyczne w odpowiednie drugorzędowe benzyloaminy, które wykorzystwała w reakcji trójkomponentowej. Co ciekawe, aminy te właściwie nie ulegały badanej reakcji dlatego też Doktorantka postanowiła wykorzystać promieniowanie mikrofalowe jako alternatywną metodę dostarczania energii do reakcji. Przeprowadzone przez Autorkę wstępne badania wskazywały, iż reakcje prowadzone z użyciem promieniowania mikrofalowego pozwoliły na otrzymanie pożądaných produktów z wyższymi wydajnościami jednak nadal znaczna część kwasu *H*-fosfinowego ulegała reakcjom ubocznym. Wobec tego, Doktorantka przeprowadziła dalszą optymalizację tej reakcji trójkomponentowej, zmieniając głównie rozpuszczalnik co pozwoliło wysunąć hipotezę, iż niska selektywność reakcji w kierunku reakcji fosfa-Michaela wynika z obecności w wodzie środowisku reakcji. W tym rozdziale znaczną część badań Doktorantka poświęciła na ustalenie, jakie warunki, oprócz obecności wody, wpływają na tworzenie się produktów ubocznych, głównie adduktu formaldehydu i kwasu *H*-fosfinowego. Pomimo tych wysiłków nie udało się tak dopracować warunków reakcji aby przesunąć selektywność reakcji w kierunku tworzenia się pożądanego kwasu α -aminofosfinowego.

Zreferowana powyżej praca doktorska mgr Anny Dziełak jest próbą wykorzystania bardzo nowoczesnego narzędzia, jakim jest synteza multikomponentowa, w syntezie związków fosforoorganicznych będących analogami aminokwasów. Ze względu na swoje właściwości, związki te mogłyby znaleźć zastosowanie jako czynniki modyfikujące aktywność enzymów w czynnikach chorobotwórczych a przez to eliminację ich szkodliwego wpływu na organizm ludzki. Z tego też względu należy pomysł ten uznać za wnoszący znaczny wkład w chemię związków fosforoorganicznych. Niestety, pewne niedociągnięcia obniżają ogólnie pozytywny odbiór pracy doktorskiej.

Pierwsza i najważniejsza sprawa to język i słownictwo, którego używa Doktorantka w Swojej pracy doktorskiej. Wiele ze sformułowań stosowanych przez Doktorantkę jest co najmniej niefortunnych, jak chociażby: „kompleksy katalityczne”, „zasięg syntetyczny”, „reszty boczne”, „wydłużone pseudopeptydy”, „komponent fosforowy”, „składnik budowy błon komórkowych”, „utworzona struktura iminowa”, „komponent P-H”, „powszechniejsza ścieżka”, „opublikował wyniki eksperymentów syntetycznych”, „cenny intermediat”,



„minimalna ścieżka syntetyczna”, „pseudoaminokwasowy szkielet”, „rozbudowane struktury o wszechstronnych możliwościach aplikacyjnych”, „aminokwas karboksylowy” i tak dalej. Kolejna sprawa to żargon, który przebija w całym tekście. Sformułowania takie jak: „prowadząca do oczekiwanej struktury”, „N-deprotekcja”, „grupa benzhydrylowa była hydrolizowana”, „wprowadzenie grupy fosfinotlenkowej”, „kataliza trifluorometylosulfonianem iterbu”, „N-chronione aminokwasy H-fosfinowe”, „duży nadmiar formaldehydu skutkował N-metylowaniem grupy aminowej”, „N-końcowa grupa ochronna”, „skutkowało preparatywnym otrzymaniem i łatwym wydzieleniem produktu kondensacji”, „redukcyjne aminowanie glicyną p-hydroksybenzaldehydu”, „ulepszyć wydajność”, „deprotekcja N-końca produktu”, „nieodblokowany albo częściowo odblokowany związek”, „kondensowano z formaldehydem”, „utleniony substrat fosfinowy”, „nie przyniósł efektu syntetycznego”, „katalizowana palladem redukcyjna hydrogenoliza”, „zaobserwowano konwersję powyżej 70%”, „najwyższe przereagowanie”, „zanalizowano za pomocą metod spektroskopowych”, „pierwszy pik to nieprzereagowana amina”, „uzyskano wydajność preparatywną w zakresie”, „produkty wytrącono z metanolu”, „N-odblokowane produkty”, „użycie stosunku reagentów”, „czyste struktury”, „grupa aminowa monopodstawiona alifatycznym łańcuchem prostym” i tak dalej.

Co więcej, styl pisarski zastosowany przez Autorkę w pracy doktorskiej należałoby chyba określić jako nieadekwatny do tego typu publikacji. Podam tutaj trzy przykłady:

„Po wielogodzinnym ogrzewaniu, analiza NMR nie wykazała postępu reakcji. Z sukcesem zastosowano dodatek stężonego kwasu solnego. Przeprowadzono kilka prób, w wyniku których oszacowano, że stosowanie jednego ekwiwalentu HCl daje najlepsze rezultaty.”

„Dodatkowo, w wyizolowanych strukturach stwierdzano możliwość N-metylowania, co prowadziło do produktów 5, 10 oraz 12.”

„Zastosowanie acetonitrylu pozwoliło na satysfakcjonującą konwersję do produktu kondensacji 79, największą spośród wszystkich przebadanych rozpuszczalników.”

Niestety, większość pracy napisana jest w ten sposób co w znacznym stopniu utrudnia pozyskiwanie informacji przez czytającego.

Poza tymi głównymi zarzutami dotyczącymi strony edytorskiej chciałbym wspomnieć również o takich klasycznych niedociągnięciach, jak stosowanie niepolskich skrótów: RT zamiast t. pok., h zamiast godz., refluks zamiast t. wrz. czy też nadmierne stosowanie skrótów w tekście (stosowanie MW jako rzeczownika). Niefortunne jest również notoryczne stosowanie stwierdzenia „otrzymano produkty z wydajnością ...” czy też „otrzymano produkt z 90% wydajnością”. W tekście znaleźć też można wiele literówek, co chyba każe zastanowić się nad starannością przygotowanej pracy.

Pomijając kwestie stylistyczno-edytorskie mam kilka wątpliwości dotyczących treści zamieszczonych przez Autorkę w pracy doktorskiej. Analizując studium literaturowe miałem wrażenie, iż Doktorantka miała dylemat z określeniem tematu studium literaturowego co przełożyło się na chęć opowiedzenia o wszystkim. Rozdział poświęcony ogólnej charakterystyce i zastosowaniu związków fosforoorganicznych mógłby z powodzeniem być pominięty i streszczony we wstępie. Rozdział dotyczący indukcji mikrofalowej z kolei mógłby zostać włączony w główny rozdział poświęcony reakcjom multikomponentowym, gdyż poza innym źródłem energii nie ma w nim żadnych nowości legitymizujących wyodrębnienie tego materiału. Ewentualnie, użyteczność promieniowania mikrofalowego mogła zostać omówiona podczas omawiania wyników własnych badań. Brakowało mi także nieco krytycyzmu podczas omawiania przykładów literaturowych. Dotyczy to zwłaszcza rozdziału dotyczącego omówienia mechanizmu reakcji fosfa-Mannicha. Doktorantka przedstawiła dwa możliwe mechanizmy, jednak nie pokusiła się o krytyczną ich analizę, zwłaszcza że jeden z nich wygląda mocno nieprawdopodobnie.

Analizując część poświęconą omówieniu badań własnych miałem na początku problem z określeniem, gdzie zaczyna się materiał bazujący na wynikach otrzymanych przez Autorkę w trakcie studiów doktoranckich. Zakładając, iż studia doktoranckie trwają 4 lata należy uznać rozdział 6.1, w którym Autorka cytuje własne prace (314 i 315) za omówienie wyników już znanych badań. W takim razie należałoby



dokładnie przedstawić te wyniki i wskazać na konkretny cel dalszych badań, co niestety nie miało miejsca. Kolejną niedogodnością utrudniającą analizę wyników było dość mocne ich zakamuflowanie. Doktorantka niby omawia uzyskane przez siebie wyniki, jednak czyni to w sposób mocno enigmatyczny, bez przedstawiania jakichkolwiek szczegółów. Dotyczy to zwłaszcza początku rozdziału dotyczącego badań własnych, dopiero wyniki dotyczące użycia promieniowania mikrofalowego zostały przedstawione w odpowiedni sposób w postaci tabel i wykresów. Podobnie jest ze schematami – niby są narysowane ale znalezienie jakichkolwiek szczegółów na nich jest najczęściej niemożliwe.

Analizując omawiane wyniki nasuwają mi się pewne pytania, odpowiedzi na które nie udało mi się znaleźć w pracy. Po pierwsze, Doktorantka uparcie trzyma się kwasów *H*-fosfinowych jako substratów. Wiadomym jest, że nie są to najbardziej wdzięczne związki do badań, chociażby ze względu na trudności z izolacją i oczyszczaniem. Jednak w żadnym momencie Doktorantka nie pokusiła się o wykorzystanie pochodnych kwasów *H*-fosfinowych, jak choćby estrów. Oczywiście wymagałoby to przeprowadzenia hydrolizy w ostatnim etapie, jednak być może pozwoliłoby to uniknąć problemów z selektywnością reakcji i eliminacją reakcji ubocznych. Dodatkową korzyścią byłaby możliwość porównania skłonności obu substratów fosforoorganicznych do brania udziału w reakcji trójkomponentowej.

Druga kwestia dotyczy optymalizacji warunków reakcji. W pewnym momencie Doktorantka stwierdza, iż największym problemem jest obecność wody w środowisku reakcji. Z tego co zauważyłem, woda jest dodawana do mieszaniny reakcyjnej pod postacią stężonego kwasu solnego, tak więc Doktorantka już na starcie niejako zmniejsza szanse na zajście tej reakcji. Dziwne jest, iż Autorka nie próbowała wykorzystać inny kwas nieorganiczny, jak chociażby H_2SO_4 czy też HBF_4 jako katalizator w badanej reakcji. Doktorantka próbowała co prawda używać kwasu Lewisa jako katalizatora, z całkiem obiecującymi wynikami, ale chyba trochę za wcześnie z niego zrezygnowała.

Trzecia kwestia dotyczy badań nad aktywnością biologiczną otrzymanych związków. Z reguły aktywność biologiczna związku badana jest w odniesieniu do jakiegoś modelowego związku. Tutaj nie ma czegoś takiego, więc trudno jednoznacznie określić na ile te produkty mogą być potencjalnymi modulatorami aktywności enzymów. Dotyczy to zwłaszcza aktywności wobec ureaz. W badaniach nad aktywnością biologiczną otrzymanych przez Doktorantkę związków dziwi również podział związków na dwie grupy i użycie do dwóch całkowicie różnych badań enzymatycznych. Czy nie lepiej byłoby całą pulę związków przebadać pod kątem aktywności wobec obu enzymów?

Na koniec jeszcze kwestia części eksperymentalnej. Zwyczajowo pożądane jest podanie pełnej analizy związku organicznego, czyli nie tylko 1H NMR ale także ^{13}C , ^{31}P , spektrometrii mas czy chociażby koloru i współczynnika retencji. Doktorantka chyba podeszła do tej sprawy dość frywolnie. Zakładając, że niektóre z tych związków są znane dobrze byłoby przynajmniej podać odnośnik literaturowy, gdzie taką analizę można byłoby znaleźć.

Pomimo tych krytycznych uwag jestem zdania, iż praca mgr Anny Dziełak zasługuje na pozytywne zakończenie zwłaszcza iż podjęła się Ona rozwiązania bardzo aktualnego problemu badawczego. Dlatego też będę wnoszył do Rady Naukowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie niniejszej rozprawy do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Łączę wyrazy szacunku