Primjena kolinijevog eutektičnog otapala u lipazom kataliziranoj sintezi butil-acetata

Vukšić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:163167

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij – Biotehnologija

Martina Vukšić
6505/BT

PRIMJENA KOLINIJEVOG EUTEKTIČNOG OTAPALA U LIPAZOM KATALIZIRANOJ SINTEZI BUTIL-ACETATA

Modul: Biotransformacije
Mentorica: izv.prof. dr.sc. Ivana Radojčić Redovniković

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

PRIMJENA KOLINIJEVOG EUTEKTIČNOG OTAPALA U LIPAZOM KATALIZIRANOJ SINTEZI BUTIL-ACETATA

Martina Vukšić, 6505/BT

Sažetak: Eutektična otapala predstavljaju novu generaciju nehlapljivih i stabilnih otapala koja se posljednjih godina intenzivno proučavaju kao zamjena za tradicionalna i škodljiva otapala u procesima organske sinteze i biokatalize. Također imaju izrazitu važnost u uspostavljanju novih visokoučinkovitih i održivih procesa proizvodnje industrijski važnih kemikalija u području kemijske tehnologije i biotehnologije. Upravo zato, cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost sinteze butil-acetata u kolinijevom eutektičnom otapalu kako bi se pridonijelo razvoju ekološki prihvatljivog postupka sinteze kratkolančanih estera.

Ključne riječi: butil-acetat, eutektična otapala, esterifikacija, lipaza

Rad sadrži: 28 stranica, 12 slika, 2 tablice, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo, asistent

Rad predan: rujan 2015.

DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate study Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for technology and application of cells and biotransformations

APPLICATION OF CHOLINIUM-BASED DEEP EUTECTIC SOLVENT TO LIPASE-CATALYZED BUTYL ACETATE SYNTHESIS

Martina Vukšić, 6505/BT

Abstract: Eutectic solvents represent the new generation of non-volatile and stable solvents which have been intensively studied for the past few years as possible replacement for conventional molecular solvents in organic chemistry. They are especially important in establishing of new highly productive and sustainable processes for the production of industrially important compounds in the field of chemical technology and biotechnology. Therefore, the aim of this work was to study the possibility of butyl acetate synthesis in cholinium-based eutectic solvents in order to contribute to development of ecologically acceptable process for short ester synthesis.

Keywords: butyl acetate, deep eutectic solvents, esterification, lipase
Thesis contains: 28 pages, 12 figures, 2 tables, 32 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: Assoc. prof. Ivana Radojčić Redovniković
Tehnical support and assistance: Ph.D. Marina Cvjetko Bubalo, Assistant
Thesis delivered: September 2015.

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA 2
2.1.1. Princip rada plinskog kromatografa 2
2.1.2. Instrumentacija plinske kromatografije 2
2.1.3. Izbor plina nosioca (pokretna faza) 4
2.1.4. Ubrizgavanja uzorka i izmjena ventila 5
2.1.5. Pećnice 6
2.1.6. Detektori 6
2.1.7. Primjena plinske kromatografije 8
2.2. PRIMJENA LIPAZA U ORGANSKOJ KEMIJI 8
2.2.1. Hidroliza estera i karbonata 9
2.2.2. Esterifikacija i transesterifikacija 10
2.2.3. Enzimske reakcije aminolize i amonolize 12
3. EKSPERIMENTALNI DIO 14
3.1. MATERIJALI 14
3.1.1. Kemikalije 14
3.1.2. Oprema 14
3.2. METODE RADA 15
3.2.1. Sinteza eutektičnog otapala kolin-klorid:etilen-glikol 15
3.2.2. Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata 15
3.2.2.1. Određivanje koncentracije butil-acetata 15
3.2.2.2. Sinteza butil-acetata 17
4. REZULTATI I RASPRAVA 19
4.1. Priprava eutektičnog otapala 19
4.2. Sinteza butil-acetata 20
5. ZAKLJUČCI 24
6. LITERATURA 25

1. UVOD

Zbog sve više negativnih učinaka industrije na vodu, zrak i tlo, donose se novi zakoni i odredbe čiji je cilj zaštita okoliša i ljudi od štetnih utjecaja različitih kemikalija. Upravo zato, potiče se razvoj novih spojeva i otapala koja su manje štetna za ljudsko zdravlje i okoliš.

Na nužnost smanjenja primjene štetnih organskih otapala i reagensa sveprisutnih u industriji, ukazuje nam *zelena* kemija, program implementacije održivog razvoja u kemijskoj tehnologiji. Prema smjernicama *zelene* kemije, idealno otapalo treba biti netoksično, kemijski i fizički stabilno, jednostavno za rukovanje, treba imati nisku hlapljivost te mogućnost višekratne uporabe. Posljednjih se godina kao nova *zelena* otapala intenzivno proučavaju eutektična otapala. Zbog svojih idealnih karakteristika zadovoljavaju većinu smjernica *zelene* kemije, a odlikuju ih: neznatna hlapljivost, nezapaljivost, velika toplinska, kemijska i elektrokemijska stabilnost te posebice mogućnosti reciklacije. Također, zbog velikog broja mogućih struktura ovih otapala, te samim time i njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, eutektična otapala pokazala su se prikladnima za raznovrsnu uporabu u organskoj kemiji, (bio)katalitičkim procesima te procesima ekstrakcije i separacije organskih i anorganskih komponenata.

Zbog važnosti kratkolančanih estera u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost primjene eutektičnih otapala u lipazom kataliziranoj sintezi kratkolančanog estera butil-acetata acilacijom *n*-butanola s anhidridom octene kiseline.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

2.1.1. Princip rada

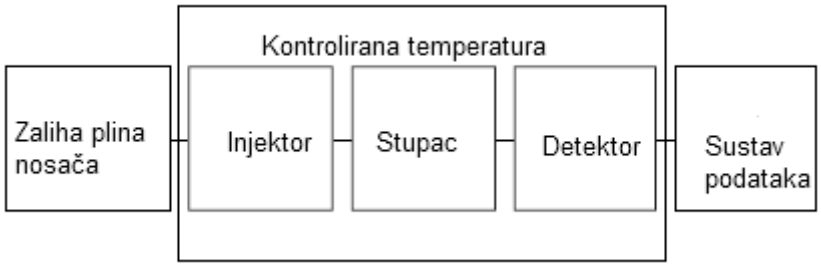
Rad plinskog kromatografa temelji se na uvođenju ispitivane smjese strujom inertnog plina u kromatografsku kolonu u kojoj se sastojci razdjeljuju između nepokretne (adsorbens) i pokretne faze (plin nosioc). Prilikom pokretanja uzorka kroz kolonu plin nosioc ne smije reagirati ni s uzorkom, niti sa stacionarnom fazom, tj. vrlo je važno da je kemijski inertan. Upravo zato se kao plin nosioc najčešće koristi dušik, helij, vodik ili argon. Važna komponenta plinskog kromatografa je detektor, uređaj koji količinu eluiranog sastojka kao funkciju vremena registrira u obliku kromatograma. Na kromatogramu se pokretna faza prikazuje kao osnovna linija, na kojoj se potom ispisuju krivulje eluiranja za svaki odijeljeni sastojak koji izlazi iz kolone (Thompson, 1977).

2.1.2. Instrumentacija plinske kromatografije

U plinskoj kromatografiji plin nosioc, koji je mobilna faza, eluira sastojke smjese iz kolone napunjene nepokretnom fazom. Za razliku od tekućinske kromatografije, u plinskoj kromatografiji analit ne reagira s pokretnom fazom pa zbog toga njegova brzina kretanja kroz kolonu ne ovisi o kemijskoj strukturi pokretne faze. Nepokretna faza je u plinskoj adsorpcijskoj kromatografiji čvrsta tvar velike specifične površine na kojoj se adsorbiraju analizirani sastojci. U adsorpcijskoj kromatografiji sastojci uzorka odjeljuju se zbog razlika u položaju ravnoteže koja se uspostavlja između plinovitog sastojka uzorka i plinovite čvrste površine nepokretne faze. Primjena plinske adsorpcijske kromatografije ograničena je na plinovite spojeve male molekularne mase kao što su: ugljikov dioksid, kisik, dušik i ugljikovodici. Polarniji sastojci zadržavaju se polutrajno na čvrstoj površini, što najčešće sužava primjenu čvrstih adsorbensa za plinsko-kromatografska odjeljivanja. Nepokretna faza je u plinsko-tekućinskoj kromatografiji tekućina, nanesena na površinu čvrstog nosača

adsorpcijom ili kemijskim vezanjem. Brzinu prolaza analita kroz kolonu određuje njegov omjer raspodjele između pokretne plinovite faze i imobilizirane tekuće faze (Skoog i sur., 1999).

Ključni dijelovi plinske kromatografije uključuju: izvor plina kao pokretnu fazu, uređaj za ubacivanje uzorka (injektor), kolonu u kojoj se odvija razdvajanje komponenata, pećnicu za termostatiranje kolone, detektor te računalo za snimanje i prikaz kromatograma (slika 1) (Eiceman, 2006).



Slika 1. Blok dijagram plinskog kromatografa (Eiceman, 2006).

Kolona se može smatrati ključnom komponentom plinskog kromatografa. Postoje dva tipa kolona: kapilarne i punjene. Danas se preferiraju kapilarne kolone jer bez pakiranja mogu biti uže i duže, što dovodi do bolje učinkovitosti separacije. U kapilarnim kolonama nepokretna je faza jednoliki sloj tekućine debljine nekoliko desetinki milimetra kojim je jednoliko prevučena unutrašnja stijenka cijevi. Nepokretna faza nanesena je tako da osigura što veću dodirnu površinu s pokretnom fazom, a izrađuje se iz posebno obrađene dijatomejske zemlje (ostaci jednostaničnih biljaka iz nekadašnjih jezera i mora). Kapilarne kolone se izrađuju od nehrđajućeg čelika, plastike, aluminija ili stakla tako da je stijenka staklene cijevi nagrižena jakom plinovitom klorovodičnom kiselinom ili kalijevim fluorovodikom kako bi se dobila grublja površina na koju će se bolje vezati nepokretna faza. Duljina kolone može iznositi od nekoliko metara pa sve do 100 metara. Najpoznatije su kapilarne kolone izvučene iz posebno pročišćenog kvarca koji sadrži minimalne količine metalnih oksida (Skoog i sur., 1999).

Punjene kolone se rade od metalnih ili staklenih cijevi. Obično su 2 - 3 m dugačke te unutarnjeg promjera 2 - 4 mm. Pakirane su čvrstim potpornim materijalom prevučenim tankim slojem nepokretne tekuće faze čiji je odabir često ključan za uspjeh separacije.

Identifikacija nepokretne faze temelji se na interakcijama otopljene supstance sa tekućom fazom i potom na mjerenju karakterisitka retencije topljive supstance.
Neke od nepokretnih faza su: polidimetil siloksan, fenil-polidimetil siloksan, trifluoropropil-polidimetil siloksan, cijanopropil-polidimetil siloksan te polietilen-glikol, a mogu biti združene ili unakrsno povezane (Skoog i sur., 1999).

Da bi kolone stale u pećnicu za termostatiranje, formirane su kao zavojnice promjera 10 - 30 cm. Važna varijabla kolone je temperatura koja mora biti kontrolirana do u nekoliko desetina stupnja. Optimalna temperatura kolone ovisi o točki vrenja uzorka i traženom stupnju separacije. Temperatura jednaka toj točki, rezultira razumnom vremenu elucije (2 - 30 min) (Eiceman, 2006).

2.1.3. Izbor plina nosioca (pokretna faza)

Pokretna faza se zove plin nosioc koji mora biti kemijski inertan. On je ključan, ali i ograničavajući aspekt u separaciji. Sredstvo je za pokretanje sastavnih dijelova uzorka kroz kolonu, a izbor potencijalnih plinova je ograničen. Štoviše, plin nosioc posjeduje svojstva koja ponekad mogu otežati analizu. Za razliku od tekućinske kromatografije, gdje postoji širok izbor sastava pokretne faze, kod separacija plinskom kromatografijom se jako malo može postići promjenom njenog sastava, a to naposljetku utječe na koeficijent razdvajanja ili faktor separacije (Eiceman i sur., 1998).

Kao plin nosioc najčešće se koristi helij, zatim argon, dušik i vodik. Za regulaciju i mjerenje brzine protoka, na dovod plina nosioca postavljaju se regulatori tlaka, ventili i mjerači protoka, a često i molekularna sita koja služe za uklanjanje vode i ostalih nečistoća (Skoog i sur., 1999). Jedna od poteškoća u plinskoj kromatografiji je stlačivost plina nosioca i sljedstven utjecaj na mogućnost separacije. Kad se temperatura kolone s konstantnim tlakom poveća, prosječna brzina protoka u koloni se smanji zahvaljujući povećanoj viskoznosti pokretne faze u proporcionalnim, ali nelinearnim načelima. Pod takvim uvjetima, mogu opadati brzina separacije i učinkovitost (Eiceman i sur., 1998).

2.1.4. Ubrizgavanja uzorka i izmjena ventila

Kromatografski proces započinje kada se uzorak uvede u kolonu, idealno bez ometanja protoka u samoj koloni. Kromatografski rezultati će biti reproducibilni ukoliko je uzorkovanje postignuto sa minimumom promjena u tlaku ili u protoku plina nosioca odnosno pokretne faze. Dostavljanje uzorka u kolonu treba biti kontrolirano, reproducibilno i brzo. Kako bi se postigla visoka učinkovitost kolone, uzorak mora biti prikladne veličine. Sporo ubrizgavanje ili preveliki uzorci dovode do širenja vrpci i slabe rezolucije (Grob,1987).

Za smještanje uzorka u kolonu, koriste se kalibrirane mikrošprice pomoću kojih se tekući uzorci ubrizgavaju kroz gumenu ili silikonsku membranu u otvor sa zagrijanim uzorkom lociranim na vrhu kolone. Bio uzorak tekući ili kruti, on ispari i vrati se u kolonu. Za uobičajeno pakirane kolone, veličina uzorka se kreće od nekoliko desetina µl do 20 µl. Ubrizgavanje je zgodna i generalno učinkovita metoda iako postoje određene mane:

- curenje uzorka zbog istrošenosti plastične pregrade;
- moguće trovanje plinom zbog prisutnosti nečistoća;
- raspadanje uzorka zbog termalnog isparavanja;
- uvođenje određenih reaktivnih materijala u kolonu (Grob i sur., 1979).

Uzorci plina se mogu injektirati u kolonu uz pomoć plinonepropusne šprice ili rotirajućeih ventila za prebacivanje plina. Takvi precizni ventili omogućavaju da se uzorak plina izmjeri u preciznom volumenu i uvede u protok plina nosioca bez prekidanja protoka kolone (Pratt i Purnell, 1960).

Druga metoda unošenja uzorka uključuje pirolizu, kojom se čvrste tvari bez prisustva kisika i vode zagrijavaju velikom brzinom do točke termalne razgradnje. Na pretjerano velikim temperaturama od 600 °C, supstance kao što su prirodni ili sintetički polimeri, termalno se raspadaju na malu molekularnu težinu tj. na stabilne supstance koje omogućavaju kromatografski profil, jedinstven za određene materijale (Wang i Burleson, 1999).

2.1.5. Pećnice

Tekućine ili krutine moraju se prevesti u stanje pare i tako održavati kroz separaciju plinskom kromatografijom. Zato je većina plinskih kromatografa opremljena pećnicama tako da se kolona održava na temperaturama od 40 - 350 °C. Danas, temperaturno programirane pećnice omogućavaju separacije kemikalija koje šire raspon tlakova pare u pojedinačnim analizama. Konvencionalne pećnice, nepromjenjene desetljećima, sadrže otporni namotaj žice koji zrači u njihov unutrašnji volumen. Grijanje iz izvora otporne žice se širi kroz volumen pećnice uz pomoć ventilatora pričvršćenog na električni motor. Terimstor ili termoelektrična baterija unutar pećnice predstavlja dio za reguliranje njene temperature. Nastojanje da se stvore izotermalni uvjeti kao što je nepostojanje termalnog gradijenta unutar volumena pećnice, esencijalno je za reproducibilnu kromatografiju i kriterij je za procjenu dobro dizajnirane pećnice (Eiceman i sur., 1998).

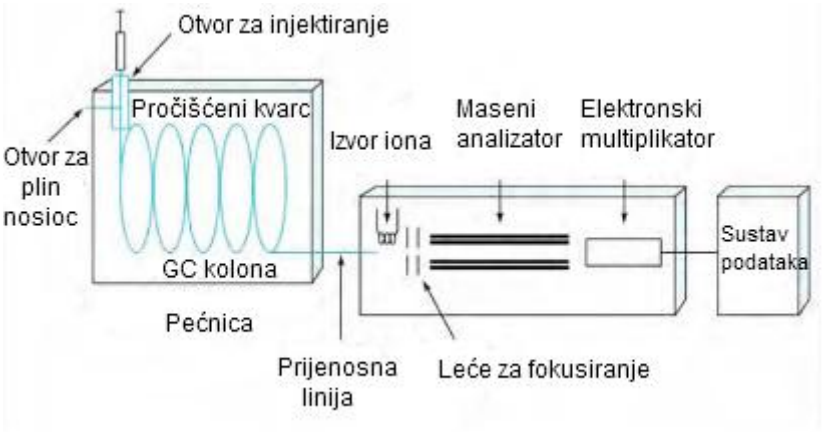
2.1.6. Detektori

Uzorak iz kolone dolazi na detektor gdje je sastav plina nosioca karakteriziran kroz jedan od nekoliko mogućih kemijskih ili fizičkih svojstava molekula. Oslonac u plinskoj kromatografiji (eng. *Gas Chromatography, GC*) predstavljaju: plamenoionizacijski detektor (eng. *Flame Ionization Detector, FID*), detektor toplinske vodljivosti (eng. *Thermal Conductivity Detector, TCD*) te detektor apsorpcije elektrona (eng. *Electron Capture Detector, ECD*). Ostali komercijalno dostupni detektori uključuju fotoionizacijski detektor (eng. *Photoionization Detector, PID*), termičko-ionizacijski detektor (eng. *Thermal Ionization Detector, TID*) te detektor emisije atoma (eng. *Atomic Emission Detector, AED*), iako su oni manje prevladavajući (Karasek, Field, 1977).

FID se temelji na formiranju iona plina iz organskih molekula izgorenih u plamenu vodika i zraka. Stabilan je prema promjenama u protoku i temperaturi, ima veliko područje linearnosti odziva, osjetljiv je na sve organske spojeve, jednostavan je za rukovanje i brzog je odziva. TCD se temelji na promjenama toplinske vodljivosti struje plina nositelja koja nastaje zbog prisutnosti analita. ECD je baziran na sposobnosti nekih molekula da privuku ili uklone termalizirane elektrone. Primjeri gdje je ECD izabran za detekciju specifičnih kemijskih vrsta

preko određene interferirajuće skupine su: halogenirani ugljikovodici iz zraka za oceanografska istraživanja, klorobutanol u mišjem tkivu i tekućinama, organoklorove komponente u mliječnim produktima, pesticidi i ostali organokloridi u vodi (Aguilar i sur., 1977).

Maseni spektometri mogu se smatrati idealnim detektorima za identifikaciju uzroka i rješavanje problema degradacije. Kombinacija plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (eng. *Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS*) (slika 2) koristi se za identifikaciju tisuća komponenata prisutnih u prirodnom i biološkom sustavu (mirisnih i okusnih komponenata hrane, onečišćivača vode) kao i u medicinskoj dijagnostici (proučavanje komponenata lijekova). Također se koristi za dobivanje informacija o nekompletno razdvojenim komponentama (Andresen i sur., 1996).



Slika 2. Tipični kapilarni GC/MS sustav (Skoog i sur., 1999).

Prema literaturi, karakteristike idealnog detektora su:

- adekvatna osjetljivost koja rangira od 10^{-8} - 10^{-15} grama otopljenje supstance po sekundi;
- brzi odziv na male promjene koncentracija sastojaka tijekom njihove elucije iz kolone;
- linearan i jednolik odziv za mnoge kemijske spojeve;
- dobra stabilnost i reproducibilnost;
- temperaturni raspon od sobne temperature do minimalno 400 °C;
- kratko vrijeme odgovora ovisno o brzini protoka;
- visoka pouzdanost i lakoća upotrebe (Skoog i sur., 1999).

2.1.7. Primjena plinske kromatografije

Prije svega, plinski kromatograf se koristi za provođenje separacija. Metode plinske kromatografije su nenadmašne kad se apliciraju na kompleksne organske, metal-organske, te biokemijske spojeve načinjene od isparavajućih supstanci. Druga uloga plinskog kromatografa je sama analiza. Kod kvalitativne analize, koristi se za uspostavljanje čistoće organskih komponenata, a djelotvoran je i za procjenu učinkovitosti procedura pročišćavanja. Također potvrđuje prisutnost ili odsutnost neke komponente. Vrijeme zadržavanja služi za kvalitativnu identifikaciju, a visine ili površine pikova daju kvantitativne podatke o uzorku (Eiceman i sur., 1998).

2.2. PRIMJENA LIPAZA U ORGANSKOJ KEMIJI

Primjena enzima u pripravi različitih komercijalno zanimljivih spojeva važno je područje organske i bioorganske kemije. Hidrolaze su najčešće korišteni enzimi zbog svog prihvaćanja širokog spektra supstrata i izvrsne stabilnosti, a mnogo njih je i komercijalno dostupno. Aktivne su pri blagim reakcijskim uvjetima i nemaju potrebu za kofaktorima. Najpoznatiji i najkorisniji enzimi iz skupine hidrolaza za asimetričnu sintezu su lipaze (Wiktelius, 2005). Primjena lipaza uključuje kinetičku rezoluciju racemičnih alkohola, estera, kiselina ili amina (Ghanem i Aboul-Eneir, 2004), kao i asimetričnu sintezu prokiralnih komponenata (Garcia-Urdiales, 2005). Također se koriste u regioselektivnoj esterifikaciji ili transesterifikaciji multifunkcionalnih komponenata kao npr. u kemoenzimskoj sintezi nukleozidnih derivata (Ferrero i Gotor, 2000).

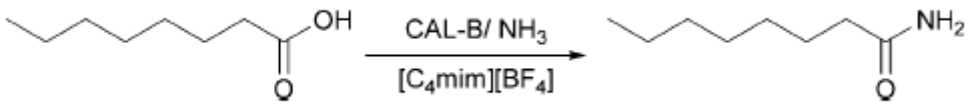
Jedan od ozbiljnih nedostataka upotrebe enzima u vodenim organskim sintezama je slaba topljivost organskih komponenata s više od 4 ugljikova atoma. Voda je također nepovoljno otapalo za većinu primjena u industrijskoj kemiji zbog nestabilnosti mnogih organskih komponenata u vodenoj okolini. Stoga, primjena nekonvencionalnih otapala (organska otapala, ionske kapljevine, eutektična otapala, superkritični ugljikov dioksid, fluorirana otapala i dr.) ima nekoliko prednosti:

- jednostavnije izdvajanje produkata s višim prinosima;
- mogućnost korištenja nepolarnih supstrata;
- smanjena moućnost sporednih reakcija;
- veća termodinamička aktivnost (Klibanov, 2001).

Ova alternativna otapala mogu se u enzimskom sustavu koristiti na tri različita načina:

- kao kootapalo u vodenoj fazi;
- kao čisto otapalo;
- kao dvofazni sustav zajedno s ostalim otapalima.

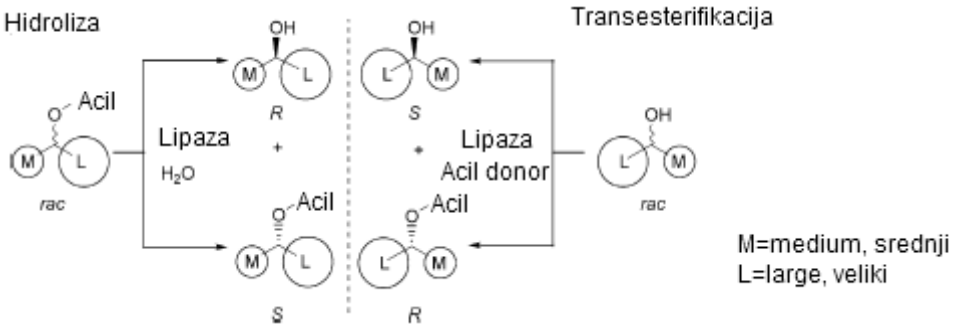
Jedan od prvih primjera primjene ionskih kapljevina je bila sinteza oktanamida (Madeira Lau, 2000) reakcijom oktanske kiseline i amonijaka uz pomoć lipaze B izolirane iz *Candida antarctica* kao biokatalizatora (slika 3).



Slika 3. Sinteza oktanamida (Gotor- Fernández, Gotor, 2007).

2.2.1. Hidroliza estera i karbonata

Danas je enzimska transesterifikacija proces koji se široko primjenjuje za pripremu kiralnih komponenata. No, enzimska hidroliza (prirodna reakcija lipaza) također je korisna u rezoluciji racemičnih smjesa ili pripravi kiralnih spojeva iz prokiralnih komponenata. Postoje reakcije enzimske hidrolize koje su od velike koristi za sintezu farmaceutika ili njihovih intermedijera poput *β*-adrenergičnih blokatora (npr. propanolol) koji su sintetizirani kemoenzimskim metodama gdje je ključni korak enzimska hidroliza. Glavni razlog za pripremu ovih aminoalkohola u optički čistom obliku je zadržavanje ovih farmaceutika u (*S*)-enantiomeru (Gotor, 2002). Hidroliza i transesterifikacija mogu biti komplementarni procesi za rezoluciju sekundarnih alkohola (slika 4) gdje (*R*)-izomer u oba procesa reagira brže nego (*S*)-izomer (Kazlauskas i sur., 1991).



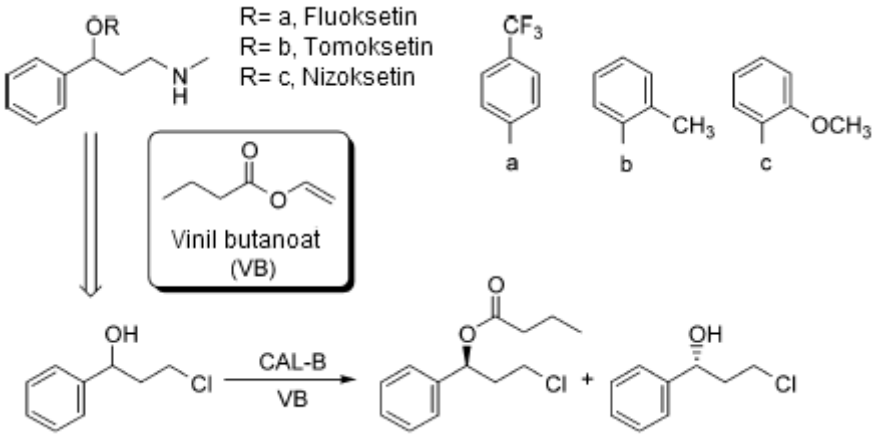
Slika 4. Simetrija hidrolize i transesterifikacije (Gotor- Fernández i Gotor, 2007).

Kod enzimske hidrolize karbonata, praktičan primjer je kemoenzimska sinteza (*S*)-zoplikona, hipnotika visoke učinkovitosti i niske toksičnosti, a hidroliza se odvija uz pomoć lipaza kao biokatalizatora (Fernández-Solares i sur., 2002).

2.2.2. Esterifikacija i transesterifikacija

Reakcije enzimske transesterifikacije su šire primjenjene od reakcija esterifikacije u procesu asimetrične sinteze, pri čemu je acilacija alkohola uz pomoć lipaza najraširenija proces u biokatalizi (Faber, 2004).

Nekoliko je reprezentativnih primjera acilacije alkohola gdje je enzimska transesterifikacija ključni korak u sintezi kiralnih farmaceutika. Tri antidepresiva: fluoksetin, tomoksetin i nizoksetin, sintetizirana su iz racemične smjese 3-kloro-1-fenilpropan-1-ola enzimskom transesterifikacijom u heksanu uz pomoć vinil-butanoata kao donora acilne skupine i CAL-B kao biokatalizatora (Liu i sur., 2000) (slika 5).



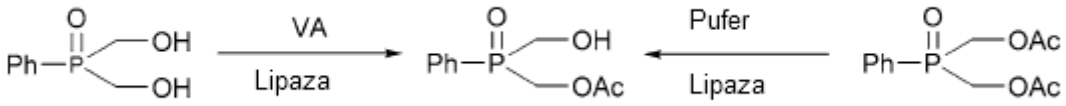
Slika 5. Enzimska transesterifikacija farmaceutskih intermedijera (Gotor- Fernández i Gotor, 2007).

Ove farmaceutike također je moguće pripraviti otapanjem 3-hidroksi-3-fenilpropanonitrila kao početnog materijala uz pomoć lipaze izolirane iz *Pseudomonas cepacia* i vinil-acetata kao acil donora (Kamal i sur., 2002).

Kinetička rezolucija je korisna metoda za očuvanje enantiomerne čistoće komponenata, pri čemu je značajan nedostatak maksimalni prinos od 50 %. Ovo ograničenje se može popraviti dinamičkom kinetičkom rezolucijom u kojoj sporije reagirajući enantiomer racemizira tijekom procesa. Ova procedura može dovesti do pojedinačnog enantiomera kao produkta 100%-tnog prinosa (Pàmies, Backvall, 2003).

Enzimska rezolucija alkohola odvija se uz prisustvo cikličkog anhidrida a kao produkt se održava kiselina koja može odmah biti odvojena od alkohola ekstrakcijom tekuće-tekuće (Bouzemi i sur., 2004). Ova strategija se primjenjuje u otapanju ključnih intermedijera u sintezi (-)-paroksetina koji se koristi u tretiranju ljudskih bolesti kao što je depresija.

Kod enzimske asimetrične sinteze prokiralnog fosfin oksida (Kielbasinki i sur., 2003), kiralni centar je fosforov atom, a prokiralna komponenta je bis(hidroksimetil)fenil-fosfin oksid. Asimetrična sinteza se odvija lipazom kataliziranom reakcijom acetilacije sa vinil-acetatom kao donorom acilne skupine u organskim otapalima ili enzimskom hidrolizom odgovarajućeg diacetata u fosfatnom puferu i otopini (slika 6).



Slika 6. Enzimska asimetrična sinteza prokiralnog fosfin oksida (Gotor- Fernández i Gotor, 2007).

Kiralni 1,2- i 1,3-aminoalkoholi su dokazano funkcionalno aktivna klasa komponenata široke primjene u medicinskoj kemiji. Od velike važnosti je enzimska transesterifikacija cis-(1*S*,2*R*)-aminoindan-2-ola (Luna i sur., 1999), ključne komponente indinavira koji je inhibitor proteaze HIV virusa.

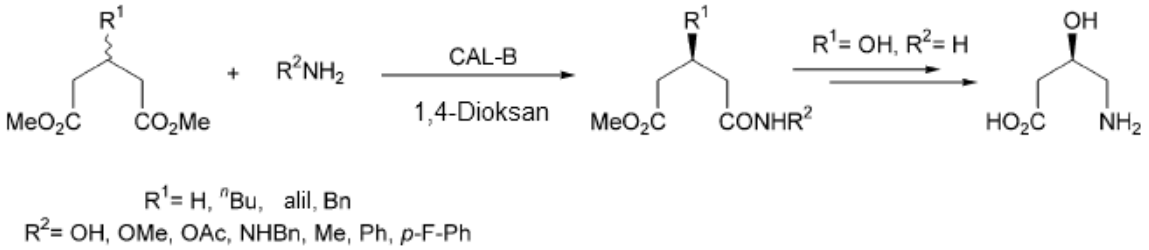
2.2.3. Enzimske reakcije aminolize i amonolize

Priprema amina lipazom kataliziranom enantioselektivnom acilacijom može biti postignuta pod blagim uvjetima, uz netoksične reagense, jednostavne eksperimentalne procedure te uz reciklaciju biokatalizatora. Lipaze, upravo zbog jako niske amidazne aktivnosti, najučinkovitije su hidrolaze za katalizu acilacije amina i amonijaka.

Za acilaciju amina obično se koristi etil-acetat, u mnogim slučajevima i kao donor acilne skupine, ali i kao otapalo. Ostali acilirajući agensi kao što su alkil metoksi-acetati su također korisni, dok vinilni esteri (najbolji reagensi za otapanje alkohola), zbog svoje visoke reaktivnosti nisu odgovarajući za otapanje primarnih amina.

Otapanje sekundarnih amina predstavlja veće poteškoće od otapanja primarnih. Ciklički sekundarni amini su strukturno lakši za otapanje od acikličkih komponeneta (Alfonso, Gotor, 2004).

Aminoliza dimetil-3-hidroksiglutarata s aminima i amonijakom u prisutnosti CAL-B (slika 7), rezultirala je isključivo odgovarajućim monoamidom (*S*) konfiguracije koji se koristi za pripremu biološki zanimljive *β*-aminokiseline (*R*)-3-hidroksi-4-aminobutanske kiseline (López-García i sur., 2003).



Slika 7. Sinteza (*R*)-3-hidroksi-4-aminobutanske kiseline amonolitičkom asimetričnom sintezom (Gotor- Fernández i Gotor, 2007)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Anhidrid octene kiseline, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- Butil-acetat, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- *n*- Butanol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- Etilen-glikol, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

- Kolin-klorid, p.a. Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Novozym 435 (lipaza B izolirana iz *Candida antarctica* imobilizirana na makroporoznim poliakrilnim kuglicama sa sadržajem vode 1-2 w/w%) - Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD.

U radu je kao organsko otapalo korišten *n*-heptan. Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

3.1.2. Oprema

- Homogenizator, Tehnica, Železniki, Slovenija

- Magnetska miješalica s grijanjem, RTC Basic, IKA Werke, Njemačka

- Plinski kromatograf s masenom spektroskopijom, Shimadzu, Japan

3.2. METODE RADA

3.2.1. Sinteza eutektičnog otapala *kolin-klorid:etilen-glikol*

U tikvici s okruglim dnom kolin-klorid (1 mol) se pomiješa s donorom vodika (etilen-glikol) (2 mol) (tablica 1) i reakcijska smjesa se zagrije do 80 °C pomoću vodene kupelji uz neprestano miješanje tijekom 3 sata. Dobiveno je eutektično otapalo kolin-klorid:etilen-glikol (ChCl:Etgl) u obliku prozirne kapljevine. Prije daljnje primjene, eutektično otapalo se suši tijekom 8 sati u visokom vakuumu te se čuva u eksikatoru napunjenom silikagelom. Također je pripravljena i tercijarna smjesa kolin-klorid:etilen-glikol:voda ($ChCl:Etgl_{1mol\ H2O}$) (tablica 1).

Tablica 1. Sintetizirana eutektična otapala

Donor vodika	Eutektično otapalo	Molarni omjer komponenata	Kratica
Etilen-glikol	Kolin-klorid:Etilen-glikol	1:2	ChCl:Etgl
Etilen-glikol	Kolin-klorid:Etilen-glikol:Voda	1:2:1	$ChCl:Etgl_{1mol\ H2O}$

3.2.2. Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata

3.2.2.1. Određivanje koncentracije butil-acetata

Kvalitativna i kvantitativna analiza sinteze butil-acetata provedena je pomoću plinske kromatografije s masenom spektroskopijom.

Kromatografski uvjeti

Kromatografska kolona: Rxi_5Si/MS: 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 mm

Pokretna faza: He

Protok: 109,6 mL min^{-1}

Detektor: maseni spektrometar s elektrosprej ionizacijom (temperatura izvora iona 200 °C; temperatura sučelja 150 °C)

Temperatura kolone: 55 °C

Injektor i detektor: 250 °C

Vrijeme trajanja analize: 3 min

Vrijeme izlaženja butil-acetata iznosi 2,7 minute.

Izrada baždarnog dijagrama

Prirede se otopine butil-acetata u *n*-heptanu tako da koncentracije redom iznose 0,0005; 0,001; 0,003; 0,005; 0,008 i 0,01 mol L^{-1}. Izmjerene vrijednosti površine kromatografskog pika nanesu se na ordinatu, a na apscisu se nanose pripadajuće vrijednosti koncentracija. Pomoću računala se nacrta dijagram ovisnosti množinske koncentracije butil-acetata o površini ispod pika te se prema jednadžbi pravca izračunavaju nepoznate koncentracije butil-acetata u uzorcima.

Koncentracija butil-acetata tijekom sinteze u organskom otapalu *n*-heptanu računa se izravno prema jednadžbi pravca dobivenoj iz baždarnog dijagrama, dok se koncentracija butil-acetata c_p (mol L^{-1}) tijekom sinteze u eutektičnom otapalu računa prema jednadžbi:

$$c_P = c_{n-hep\tan} \cdot \left(1 + \frac{1}{K_P}\right) \qquad [1]$$

gdje je $c_{n\text{-}heptan}$ ravnotežna koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu (mol L^{-1}), a K_P koeficijent razdjeljenja butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala.

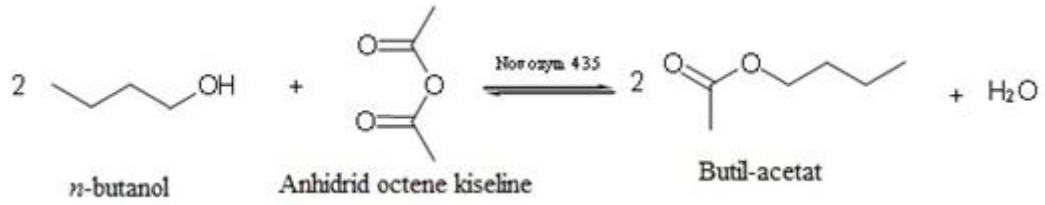
Koeficijent razdjeljenja butil-acetata (K_P) *n*-heptan/eutektično otapalo određuje se prema sljedećem protokolu:

U staklenu kivetu doda se 1 µL eutektičnog otapala, 1 µL *n*-heptana i 6,6µL (0,05mmol) butil-acetata. Uzorak se miješa na vorteksu (2.000 okretaj min^{-1}) tijekom 3 min pri temperaturi 25 °C. Koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu određuje se plinskom kromatografijom, a koeficijent razdjeljenja K_P izračunava se kao omjer ravnotežne koncentracije butil-acetata u *n*-heptanu i eutektičnom otapalu prema jednadžbi:

$$K_P = \frac{c_{n-hep\,\tan}}{c_{IL}} \qquad [2]$$

gdje je $c_{n\text{-}heptan}$ koncentracija butil-acetata u *n*-heptanu (mol L^{-1}), a c_{IL} koncentracija butil-acetata u eutektičnom otapalu (mol L^{-1}).

3.2.2.2. Sinteza butil-acetata



Slika 8 . Lipazom katalizirana sinteza butil-acetata aciliranjem *n*-butanola s anhidridom octene kiseline.

U epruvetu se doda 1972,26 µL otapala (*n*-heptan, odnosno eutektično otapalo), 9,44 µL (0,05 mol L^{-1}) anhidrida octene kiseline i 18,3 µL (0,1 mol L^{-1}) *n*-butanola. Reakcija započinje dodavanjem 5 mg pripravka Novozym 435 (slika 8). Kod provođenja reakcije u *n*-heptanu, u odabranim vremenskim intervalima uzima se 50 µL reakcijske smjese i izravno analizira plinskom kromatografijom. Kod provođenja reakcije u eutektičnom otapalu, u odabranim vremenskim intervalima izuzima se 50 µL reakcijske smjese iz koje se butil-acetat ekstrahira s 50 µL *n*-heptana, uz snažno miješanje na vorteksu (2.000 okretaj min^{-1}) kroz 3 min, a heptanski ekstrakt se analizira plinskom kromatografijom.

Kako bi se usporedila uspješnost esterifikacije u različitim otapalima, za reakciju u pojedinom otapalu izračuna se iskorištenje, volumetrijska produktivnost esterifikacije te specifična produktivnosti enzima.

Iskorištenje procesa esterifikacije η (%) izračuna se prema jednadžbi:

$$\eta = \frac{c_E}{c_T} \cdot 100 \qquad [3]$$

gdje c_E predstavlja izmjerenu koncentraciju butil-acatata (mol L^{-1}), a c_T teoretski moguću koncentraciju butil-acetata (mol L^{-1}).

Volumetrijska produktivnost $V_{Pesterifikacija}$ (μmol L^{-1} min^{-1}) esterifikacije računa se prema jednadžbi:

$$V_P = \frac{c_{p2} - c_{P1}}{t} \qquad [4]$$

gdje c_{P1} predstavlja početnu molarnu koncentraciju butil-acetata (μmol L^{-1}), c_{P2} molarnu koncentraciju butil-acetata na kraju procesa (μmol L^{-1}), a t vrijeme trajanja procesa (min).

Specifična produktivnost enzima V_E (μmol mg^{-1} min^{-1}) računa se prema jednadžbi:

$$V_E = \frac{n_{P2} - n_{P1}}{m_E \cdot t} \qquad [5]$$

gdje n_{P1} predstavlja početnu množinu butil-acetata (μmol), n_{P2} množinu butil-acetata na kraju procesa (μmol), m_E masu pripravka Novozym 435 (mg), a t vrijeme trajanja procesa (min).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Eutektična otapala predstavljaju novu generaciju stabilnih i nehlapljivih otapala koja se u zadnje vrijeme intenzivno proučavaju u svrhu zamjene tradicionalnih i škodljivih otapala u procesima organske sinteze i (bio)katalize. Njihova primjena u proizvodnji industrijski važnih kemikalija predmet je mnogih znanstvenih istraživanja na području kemijske tehnologije i biotehnologije. S druge strane, kratkolančani esteri od iznimne su važnosti u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji zbog svog karakterističnog okusa i mirisa. Budući da je kemijska sinteza istih nepovoljna, kako s ekonomskog, tako i s ekološkog stajališta, sve se više ispituje njihova proizvodnja pomoću enzima.

Stoga, cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost sinteze butil-acetata u organskom i eutektičnom otapalu kako bi se pridonijelo razvoju ekološki prihvatljivog postupka sinteze kratkolančanih estera. Kao mogući medij za sintezu butil-acetata u radu je ispitano bezvodno eutektično otapalo (ChCl:Etgl) i eutektično otapalo s određenim molarnim udjelom vode (ChCl:Etgl$_{1mol\ H2O}$). Za usporedbu, reakcija je provedena u organskom otapalu *n*-heptanu. Reakcija sinteze butil-acetata odvijala se aciliranjem *n*-butanola s anhidridom octene kiseline uz lipazu B izoliranu iz *Candida antarctica* (pripravak Novozym 435).

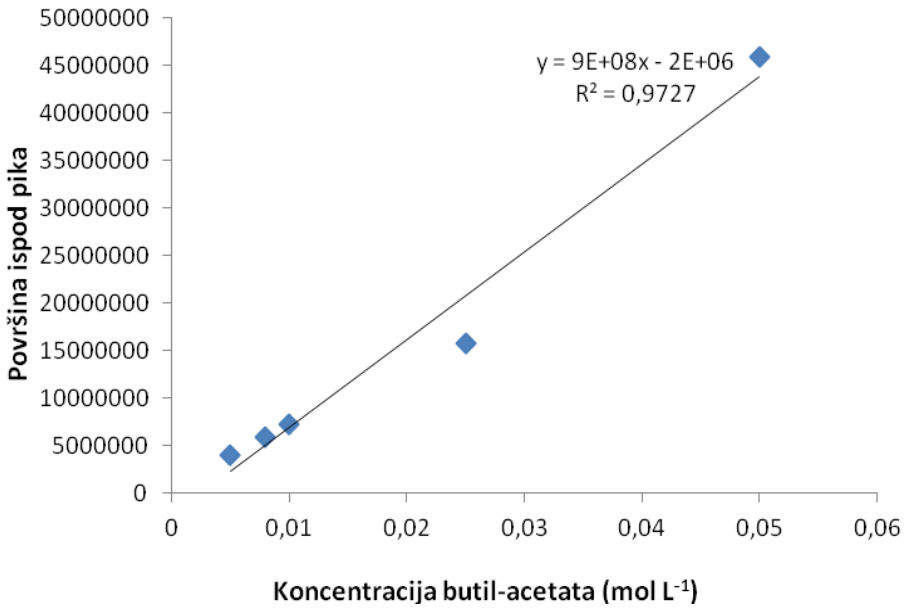
4.1. Priprava eutektičnog otapala

Priprava eutektičnog otapala ChCl:Etgl odvijala se jednostavnim postupkom u kojem se polazni supstrati, kolin-klorid i etilen-glikol koji je donor vodika, pomiješaju u molarnom omjeru 1:2, a reakcija sinteze odvija se laganim zagrijavanjem uz miješanje sve dok se ne dobije homogena viskozna kapljevina. Dobiveno otapalo se potom sušilo u visokom vakuumu i čuvalo u eksikatoru prije daljnje upotrebe. Za potrebe provođenja sinteze butil-acetata, također je pripravljeno eutektično otapalo s određenim molarnim udjelom vode ChCl:Etgl$_{1mol\ H2O}$ (kolin-klorid:etilen-glikol:voda=1:2:1).

4.2. Sinteza butil-acetata

Reakcijom esterifikacije *n*-butanola i anhidrida octene kiseline provedene u eutektičnom otapalu (bezvodnom te uz dodatak vode) i *n*-heptanu (organsko otapalo), dobiven je butil-acetat, uz lipazu B izoliranu iz *Candida antarctica* kao katalizator. Reakcijska smjesa (2 ml) sadržavala je i 0,05 mol L^{-1} anhidrida octene kiseline te 0,1 mol L^{-1}*n*-butanola otopljenih u otapalu, a reakcija je započeta dodatkom 5 mg pripravka Novozym 435. Reakcijska smjesa intenzivno je miješana na vorteksu pri sobnoj temperaturi, a tijek reakcije praćen je izdvajanjem uzorka i analizom uz pomoć plinske kromatografije.

Prethodno je izrađen baždarni dijagram butil-acetata prema kojem je provedena kvantitativna analiza produkta (slika 9). Kako bi se izračunala koncentracija butil-acetata u eutektičnom otapalu, određen je koeficijent razdjeljenja butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala (K_P), a vrijednosti su prikazane u tablici 2.

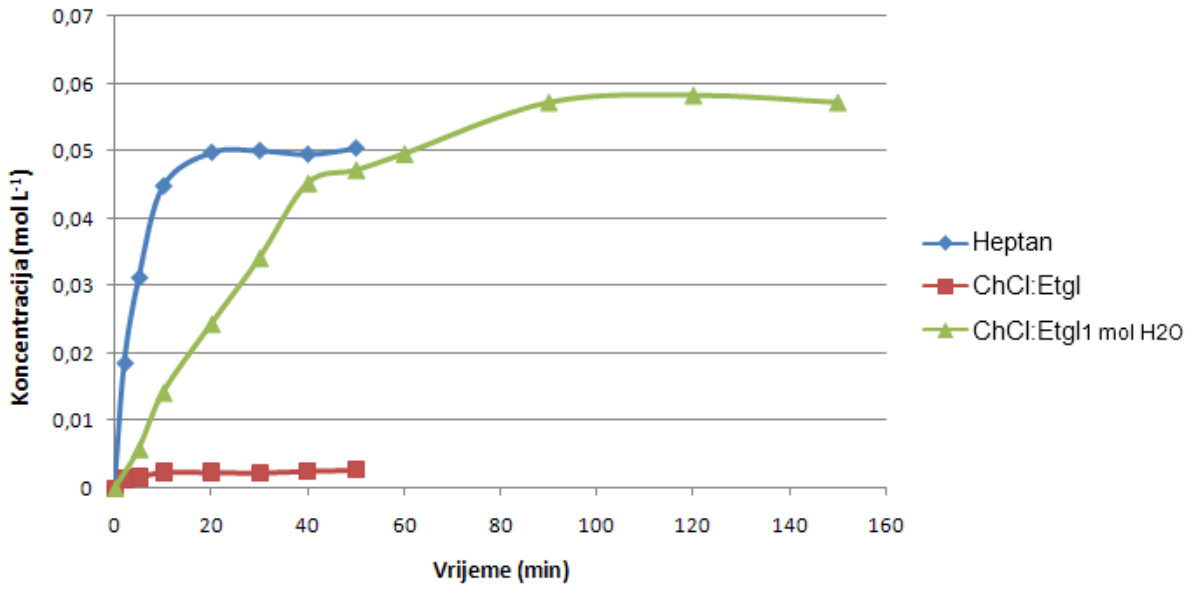


Slika 9. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije butil-acetata.

Tablica 2. Koeficijent razdjeljenja butil-acetata između *n*-heptana i eutektičnog otapala (K_P)

Eutektična smjesa	Kratica	Kp
Kolin-klorid:Etilen-glikol (molarni omjer 1:2)	ChCl:Etgl	1,4
Kolin-klorid:Etilen-glikol:Voda (molarni omjer 1:2:1)	ChCl:Etgl$_{1\ mol\ H2O}$	1,22

Tijek esterifikacije u eutektičnom otapalu i *n*-heptanu prikazan je na slici 10. Provedene su i reakcije bez prisustva enzima kako bi se provjerilo moguće djelovanje eutektičnog otapala kao katalizatora, ali nije primijećeno nastajanje produkta unutar reakcijskih vremena korištenih u ovom istraživanju. Kao najlošiji medij pokazalo se bezvodno eutektično otapalo (ChCl:Etgl), pri čemu su zabilježene koncentracije produkta manje od 0,01 mol L^{-1}. Malo veće koncentarcije produkta od 0,05 mol L^{-1} zabilježene su u reakciji provedenoj u *n*-heptanu kao organskom otapalu, a najveće koncentracije produkta od gotovo 0,06 mol L^{-1} postignute su dodatkom određene količine vode eutektičnom otapalu (ChCl:Etgl$_{1mol\ H2O}$).

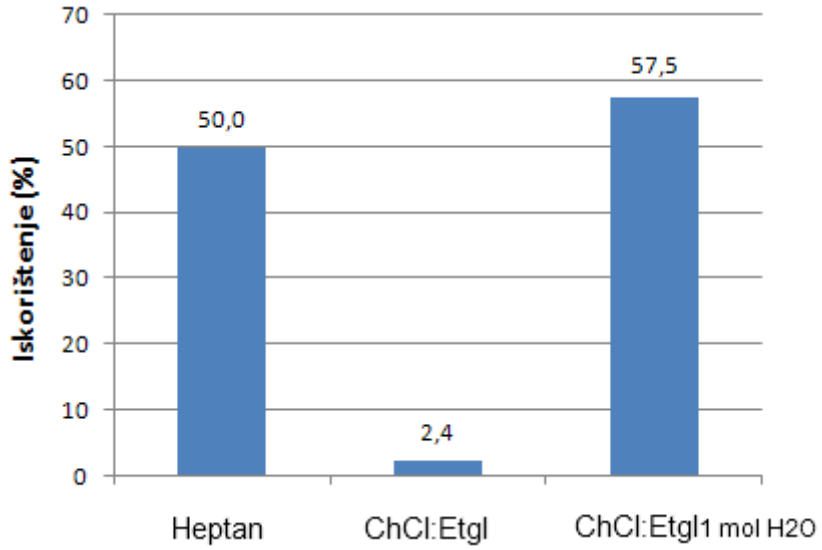


Slika 10. Tijek esterifikacije lipazom katalizirane sinteze butil-acetata u heptanu, bezvodnom eutektičnom otapalu kolin-klorid:etilen-glikol (ChCl:Etgl) (1:2, n) te u istoimenom eutektičnom otapalu s određenim molarnim udjelom vode (ChCl:Etgl$_{1mol\ H2O}$). Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} anhidrida octene kiseline; 0,1 mol L^{-1} *n*-butanola; 5 mg Novozym 435; 25 °C. Podaci su izraženi kao srednje vrijednosti.

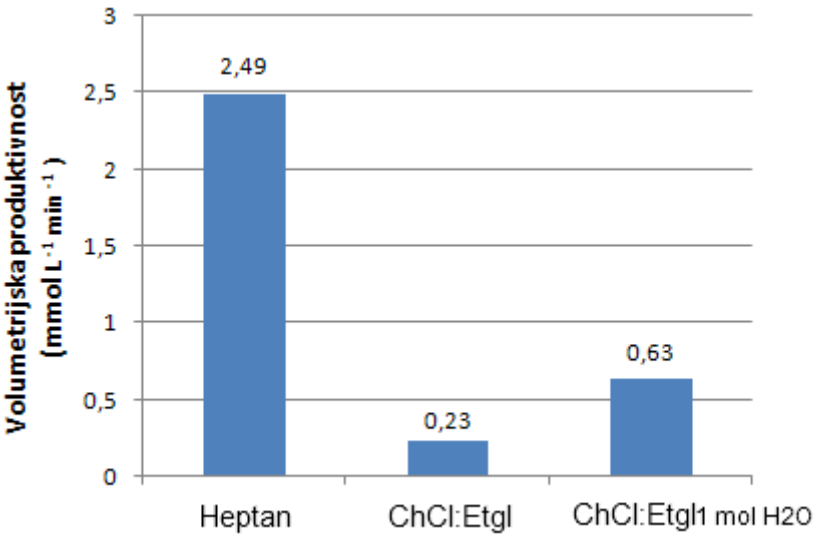
Radi bolje interpretacije rezultata, prema jednadžbama [3] i [4] izračunata su iskorištenja i volumetrijske produktivnosti esterifikacije u pojedinom otapalu, a rezultati su prikazani na slikama 11 i 12. Najbolje iskorištenje postignuto je u eutektičnom otapalu s određenim molarnim udjelom vode ($ChCl:Etgl_{1mol\ H2O}$, η = 57,5 %), a samo nešto niže (η = 50,0 %) ostvareno je u *n*-heptanu. Najlošije iskorištenje od samo 2,4 % pokazalo je bezvodno eutektično otapalo (ChCl:Etgl). Rezultati iskorištenja upućuju da se dodatkom vode eutektičnom otapalu može znatno utjecati na pomak ravnoteže ispitivane reakcije prema nastajanju produkta u odnosu na *n*-heptan i bezvodno eutektično otapalo.

Najveća volumetrijska produktivnost postignuta je u heptanu (Vp = 2,49 mmol $Lmin^{-1}$), nakon čega slijede eutektična otapala $ChCl:Etgl_{1mol\ H2O}$ (Vp = 0,63 mmol $Lmin^{-1}$) i ChCl:Etgl (Vp = 0,23 mmol $Lmin^{-1}$).

Istu slabu aktivnost lipaze unutar bezvodnog eutektičnog otapala *kolin-klorid:urea* (u molarnom omjeru komponenata 1:2) i lakaze unutar eutektičnog otapala *kolin-klorid:jabučna kiselina* (u molarnom omjeru komponenata 1:1) dobili su Durand i sur. (2013) i Choi i sur. (2011). Tu pojavu objasnili su ukrućivanjem proteina u mediju s niskim udjelom vode te također „zarobljavanjem“ supstrata unutar strukture eutektičnog otapala budući da s njegovim komponentama može tvoriti vodikove veze. Durand i sur. (2013) također su primjetili da je dodatkom jakog protičnog otapala poput vode, moguće znatno povećati iskorištenje alkoholize fenolnih estera u eutektičnom otapalu *kolin-klorid:urea*. Taj značajni porast iskorištenja objasnili su slabljenjem vodikovih veza između supstrata i eutektičnog otapala zbog dodatka protičnog otapala (vode) koje stvara izrazito jake vodikove veze s komponentama eutektičnog otapala, oslobađajući tako molekule supstrata iz mreže vodikovih veza. Supstrati *n*-butanol i anhidrid octene kiseline koji su korišteni u ovom radu, mogu djelovati i kao donori i kao akceptori vodika te prisutni u eutektičnom otapalu mogu stvarati snažne veze sa komponentama otapala i tako postati „nedostupni“ enzimu.



Slika 11. Iskorištenje esterifikacije lipazom katalizirane sinteze butil-acetata u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} anhidrida octene kiseline; 0,1 mol L^{-1} *n*-butanola; 5 mg Novozym 435; 25 °C. Podaci su uzeti kao srednje vrijednosti.



Slika 12. Volumetrijska produktivnost esterifikacije lipazom katalizirane sinteze butil-acetata u različitim otapalima. Reakcijski uvjeti: 0,05 mol L^{-1} anhidrida octene kiseline; 0,1 mol L^{-1} *n*-butanola; 5 mg Novozym 435; 25 °C.

Na temelju dobivenih rezultata prikazanih u ovom radu, može se zaključiti da bezvodna kolinijeva eutektična otapala nisu pogodna otapala za lipazom kataliziranu sintezu butil-acetata. Međutim, dodatkom vode eutektičnom otapalu, moguće je znatno poboljšati aktivnost enzima te utjecati na pomak ravnoteže kemijske reakcije prema nastajanju produkta.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je mogućnost primjene ekološki prihvatljivih eutektičnih otapala u lipazom kataliziranoj sintezi industrijski važnog kratkolančanog estera butil-acetata. Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Eutektično otapalo kolin-klorid:etilen-glikol (ChCl:Etgl) pripravljeno je zagrijavanjem i miješanjem kolin-klorida i etilen-glikola u molarnom omjeru 1:2. Također je pripravljeno i eutektično otapalo s određenim molarnim udjelom vode (kolin-klorid:etilen-glikol:voda=1:2:1, ChCl:$Etgl_{1mol\ H2O}$).

2. Uspoređujući sintezu butil-acetata uz lipazu B izoliranu iz *Candida antarctica* u *n*-heptanu i eutektičnom otapalu, *n*-heptan se pokazao kao pogodnije otapalo dok je u eutektičnom otapalu (ChCl:Etgl) uočena slaba enzimska aktivnost.

3. Dodatkom određene količine vode eutektičnom otapalu (ChCl:$Etgl_{1mol\ H2O}$), uočena je veća enzimska aktivnost kao i veće iskorištenje reakcije od onoga zabilježenog kod bezvodnog eutektičnog otapala, pri čemu su zabilježene vrijednosti slične onima zabilježenim tijekom provođenja reakcije u *n*-heptanu.

4. Racionalnim odabirom eutektičnih otapala moguće je utjecati na aktivnost enzima i kemijsku ravnotežu esterifikacije.

6. LITERATURA

Aguilar, C., Borrull, F., Marce, R.M. (1997) Determination of Pesticides in Environmental Waters by Solid-phase Extraction and Gas Chromatography with Electron-capture and Mass-spectrometry Detection. *J. Chromatogr*. *A*. **771**, 221–231.

Alfonso, I., Gotor, V. (2004) Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polifunctional substrates. *Chem. Soc*. *Rev*. **33**, 201–209.

Andresen, B.D., Eckels, J.D., Kimmons, J.F., Myers, D.W. (1996) Portable Gas Chromatograph–Mass Spectrometer. *US Appl*. 525-530.

Bouzemi, N., Debbeche, H., Aribi-Zouiou, L., Fiaud, J.C. (2004) On the use of succinic anhydride as acylating agent for practical resolution of aryl-alkyl alcohols through lipase-catalysed acylation. *Tetrahedron Lett*. **45**, 627–630.

Choi, Y.H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Witkamp, G.J., Verpoorte, R. (2011) *Plant Phys*. **156**, 1701-1705.

Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Dubreucq, E., Lortie, R., Villeneuve, P. (2013) *Green Chem*. **15**, 2275-2282.

Eiceman, G.A. (2006) Instrumentation of Gas Chromatography. In RA Meyers, Ed. Encyclopedia of Analytical Chemistry.

Eiceman, G.A., Hill, Jr., H.H., Gardea-Torresday, J. (1998) Gas Chromatography. *Anal. Chem. Fundam. Rev*. **70**, 321 R–339 R.

Faber, K. (2004) Biotransformations in Organic Chemistry. Springer-Verlag: Heidelberg.

Fernández-Solares, L., Díaz, M., Brieva, R., Sánchez, V.M., Bayod, M., Gotor, V. (2002) Enzymatic resolution of new carbonate intermediates for the synthesis of _S_-_±_-zopiclone. *Tetrahedron: Asymmetry*. **13**, 2577–2582.

Ferrero, M., Gotor, V. (2000) Biocatalytic selective modifications of conventional nucleosides, carbocyclic nucleosides and C-nucleosides. *Chem. Rev*. **100**, 4319–4347.

García-Urdiales, E., Alfonso, I.,Gotor, V. (2005) Enantioselective desymmetrization in organic synthesis. *Chem. Rev*. **105**, 313–354.

Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y. (2004) Lipase mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*. **15**, 3331–3351.

Gotor-Fernandez, V., Gotor, V. (2007) Use of Lipases in Organic Synthesis. **18**, 301-313.

Gotor, V. (2002) Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals. *Org. Proc. Res. Dev*. **6**, 420–426.

Grob, K. (1987) On-column Injection in *Capillary GC*. A. Huethig, Heidelberg.

Grob, Jr., K., Neukom, H.P. (1979) The Influence of Syringe Needle on the Precision and Accuracy of Vaporizing GC Injections. *J. High Res. Chrom. Chrom. Commun.* **2**, 15–21.

Kamal, A., Khanna, G.B.R., Ramu, R. (2002) Chemoenzymatic synthesis of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: lipase catalysed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles. *Tetrahedron: Asymmetry*. **13**, 2039–2051.

Karasek, F.W., Field, L.R. (1977) Ionization Detectors in Gas Chromatography. *Res./Dev*. **28**, 42–44.

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**, 2656–2665.

Kielbasinski, P., Zurawinski, R., Albrycht, M., Mikolajczyk, M. (2003) The first enzymatic desymmetrizations of prochiral phosphine oxides. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**, 3379–3384.

Klibanov, A.M. (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241–246.

Liu, H.L., Helge, B., Anthonsen, T. (2000) Chemoenzymatic synthesis of the non-tricyclic antidepressants Fluoxetine, Tomoxetine and Nisoxetine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 1767–1769.

Luna, A., Maestro, A., Astorga, C., Gotor, V. (1999) Enzymatic resolution of _±_-*cis* and _±_-*trans*-1-aminoindan-2-ol and _±_-*cis* and _±_-*trans*-2-aminoindan-1-ol *Tetrahedron: Asymmetry* **10**, 1969–1977.

López-García, M., Alfonso, I., Gotor, V. (2003) Desymmetrization of dimethyl 3-substituted glutarates through enzymatic ammonolysis and aminolysis reactions. *Tetrahedron: Asymmetry* **14**, 603–609.

Madeira Lau, R., Rantwijk, F.V., Seddon, K.R., Sheldon, R.A. (2000) Lipase-catalyzed reaction in ionic liquids. *Org. Lett.* **2**, 4189–4191.

Pàmies, O., Bäckvall, J.E. (2003) Combination of enzymes and metal catalysis. A powerful approach in asymmetric catalysis. *Chem. Rev.* **103**, 3247–3262.

Pratt, G.L., Purnell, J.H. (1960) Sampling valve for use in gas chromatographic analysis of the products of gaseous reactions. *Anal. Chem.* **32**, 1213.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (1999) Principles of instrumental analysis, gas chromatography, 788-808.

Thompson, B. (1977) Fundamentals of gas analysis by gas chromatography. Varian Associates, Inc., Palo Alto, CA.

Wang, F.C.Y., Burleson, A.D. (1999) The development of pyrolysis fast gas chromatography for analysis of synthetic polymers. *J. Chromatogr. A.* **833** (1), 111–119.

Wiktelius, D. (2005) Lipases - Enzymes for biocatalytic asymmetric synthesis. *Synlett* 2111–2114.