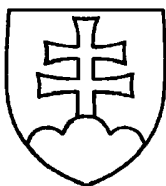


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 03.11.92
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 706 039
(32) Dátum priority: 27.02.85
(33) Krajina priority: US
(43) Dátum zverejnenia: 08.02.95
(86) Číslo PCT:

(21) Číslo dokumentu:

3297-92

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 C 69/612,
C 07 B 55/00,
57/00

(71) Prihlasovateľ: Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Klibanov Alexander Dr., Boston, MA, US;
Kircher Gerald Dipl.Ing., Dr., Linz, AT;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob výroby opticky čistých esterov kyselín (+)-R-2-fenoxypriónových**

(57) Anotácia:

V priebehu spôsobu výroby opticky čistých kyselín (+)-R-2-fenoxypriónových sa vytvorí reakčná zmes z racemickej kyseliny 2-halogénpropiónovej, primárneho alkoholu, napríklad metanolu, etanolu, n-propanolu alebo n-butanolu a stereospecifickej lipázy, napríklad z kvasinky *Candida cylindracea*, zo slinivky bravčovej, z pšeničných klíčkov, z *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delamar*, *Chromobacterium viscosum*, *Aspergillus niger*, čelade *Mucor* a *Pseudomonas* v organickom prostredí, napríklad v hexáne, benzéne, chloroforme, dichlórmétáne, petroleteri alebo toluéne za podmienok, v ktorých lipáza prednostne katalyzuje esterifikáciu kyseliny (+)-R-2-halogénpropiónovej. Neesterifikovaná kyselina (-)-S-halogénpropiónová sa oddelí od esteru kyseliny (+)-R-halogénpropiónovej, kyselina (-)-S-2-halogén-propiónová sa uvedie do reakcie s fenolom za bazických podmienok za vzniku kyseliny (+)-R-2-fenoxypriónovej a aby sa získal opticky čistý ester kyseliny (+)-R-2-fenoxypriónovej sa kyselina (+)-R-2-fenoxypriónová esterifikuje.

Způsob výroby opticky čistých kyselin (+)-R-2-fenoxypionových

Oblast vynálezu

Vynález se týká způsobu výroby opticky čistých kyselin (+)-R-2-fenoxypionových.

Dosavadní stav techniky

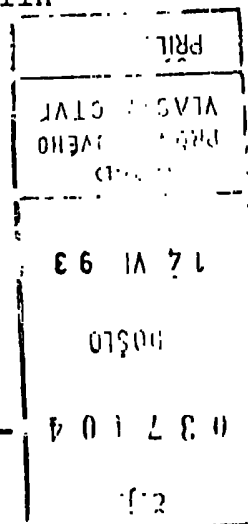
2 - fenoxypionové kyseliny a jejich estery jsou široce používány jako herbicidy. Pouze R - optické isomery těchto sloučenin jsou biologicky účinné. Aby bylo možno zvýšit biologickou účinnost herbicidů a snížit jejich dávky a vedlejší účinky, je žádoucí užívat samotný R - isomer a nikoliv racemickou směs.

2 - fenoxypionové kyseliny se obvykle syntetizují z 2 - halogenpropionové kyseliny (2 - chlorpropionové nebo 2 - brompropionové) a z fenolů. V případě, že se jako výchozí latky užijí opticky čisté 2 - halogenpropionové kyseliny, získá se opticky čistá kyselina 2 - fenoxypionová.

Protože však téměř všechny způsoby výroby 2 - halogenpropionových kyselin poskytují racemické směsi, je nutno optické isomery od sebe oddělit až po získání výsledných látek. Racemické směsi 2 - halogenpropionových kyselin je od sebe možno oddělit chemicky nebo enzymaticky. Chemické způsoby dělení, například frakční krystalizace, jsou obvykle velmi pracné, neefektivní a náročné na čas. Až dosud známým enzymatickým způsobem je asymetrická hydrolyza esterů uvedených kyselin ve vodě, katalyzovaná lipázou.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří způsob výroby opticky čistých kyselin (+) - R - 2 - fenoxypionových, v y - z n a č u j í c í c h s e t í m, že se



- a) vytvoří reakční směs z racemické kyseliny 2-halogenpropionové, primárního alkoholu, například methanolu, ethanolu, n-propanolu nebo n-butanolu a stereospecifické lipázy, například z kvasinky *Candida cylindracea*, ze slinivky vepře, z pšeničných klíčků, z *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delamar*, *Chromobacterium viscosum*, *Aspergillus niger*, čeledí *Mucor* a *Pseudomonas* v organickém prostředí, například v hexanu, benzenu, chloroformu, dichlormethanu, petroléteru nebo toluenu za podmínek, v nichž lipáza přednostně katalyzuje esterifikaci kyseliny (+) - R - 2 - halogenpropionové,
- b) neesterifikována kyselina (-) - S - halogenpropionová se oddělí od esteru kyseliny (+) - R - halogenpropionové,
- c) kyselina (-) - S - 2 - halogenpropionová se uvede do reakce s fenolem za bazických podmínek za vzniku (+) - R - 2 - fenoxypionové kyseliny a
- d) k získání opticky čistého esteru (+) - R - 2 - fenoxypionové kyseliny se kyselina (+) - R - 2 - fenoxypionová esterifikuje.

K selektivní katalyze esterifikace se užije stereospecifická lipáza, čímž dojde k selektivní esterifikaci pouze jednoho z opticky čistých isomerů racemické kyseliny 2- halogenpropionové. Tuto selektivní esterifikaci je možno provádět v organickém rozpouštědle, protože stereospecifická lipáza může působit ve v podstatě bezvodém prostředí při katalyze esterifikace jednoho z optických isomerů v racemické směsi 2- halogenpropionových

kyselin. Esterifikovaný optický isomer je pak možno oddělit snadno od neesterifikovaného optického isomeru a tak získat jeden z uvedených isomerů. Oddělený esterifikovaný isomer je možno používat jako takový nebo je možno ester opět hadrolyzovat a tak získat čistý isomer kyseliny 2-halogenpropionové.

Vynález je založen na zjištění, že stereospecifická lipáza může působit v bezvodém prostředí (organickém) katalyzu asymetrické esterifikace 2-halogenpropionových kyselin. Například lipáza z kvasinek *Candida cylindracea* přednostně katalyzuje esterifikaci kyseliny (+) - R - 2 - halogenpropionové v organických rozpouštědlech.

Vzhledem k účinnosti enzymu v takových systémech je možno užít lipázu katalyzovanou asymetrickou esterifikací k dělení racemických 2-halogenpropionových kyselin v organickém ~~rozpouštědle~~ prostředí.

Při dělení racemických 2-halogenpropionových kyselin lipázou katalyzovanou asymetrickou esterifikací se v organickém rozpouštědle vytvoří směs racemické kyseliny 2-halogenpropionové, alkoholu a stereospecifické lipázy. Je možno užít kyselinu 2-chlorpropionovou nebo kyselinu 2-brompropionovou. Jako alkoholu je možno užít jakéhokoliv alkoholu, který reaguje s kyselinou 2-halogenpropionovou za vzniku esteru. Výhodnými alkoholy jsou primární alifatické alkoholy, například methanol, ethanol, n-propanol, n-butanol.

Organické rozpouštědlo je možno zvolit z řady organických rozpouštědel. Vhodnými rozpouštědly jsou hexan, benzen, chloroform, dichlormethyl, petroléter a toluen. Rozpouštědlo může být v podstatě bezvodé.

Stereospecifickou lipázou může být jakákoliv lipáza (Z.C. 3.1.1.3). Výhodnou lipázou pro selektivní esterifikace R - isomeru 2 - halogenpropionových kyselin je lipáza z kvasinky *Candida cylindracea*. Je možno užít také lipázu z pankreatu vepře, avšak účinnost a selektivita tohoto enzymu není tak vysoká jako v případě lipázy z *C. cylindracea* v organickém prostředí. Dalšími vhodnými lipázami jsou lipáza z pšeničných klíčků a lipázy z *Rhizopus arrhacus*, *Geotrichus candidum*, *Rhizopus delamar*, *Chromobacterium viscosum* (všechny Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), *Aspergillus niger*, *Mucor* a species *Pseudomonas* (Amano International Enzyme Company, Troy, Virginia).

Komerční prostředky z obsahem lipázy obvykle obsahují určité množství vody spolu s enzymem. Zdá se, že enzym musí být alespoň do určité míry hydratován, protože zcela dehydratované prostředky nejsou v prostředí organického rozpouštědla účinné. Enzym se tedy k tomuto rozpouštědлу přidává v hydratovaném stavu.

Esterifikační reakce se nechá probíhat tak dlouho, že se požadované množství optického isomeru kyseliny 2 - halogenpropionové převede na ester. Žádoucí je dosáhnout co nejvyššího chemického a optického výtěžku. V případě, že požadovaným produktem je esterifikovaný optický isomer, měla by být reakce zastavena před dosažením 50 % přeměny. V případě, že požadovaným produktem je kyselina, mělo by dojít k přeměně vyšší než 50 %. Stupeň přeměny na ester je možno sledovat běžnými způsoby, například plynovou chromatografií.

Nezreagovaný isomer 2 - halogenpropionové kyseliny a esterifikovaný isomer je možno od sebe oddělit jakým-

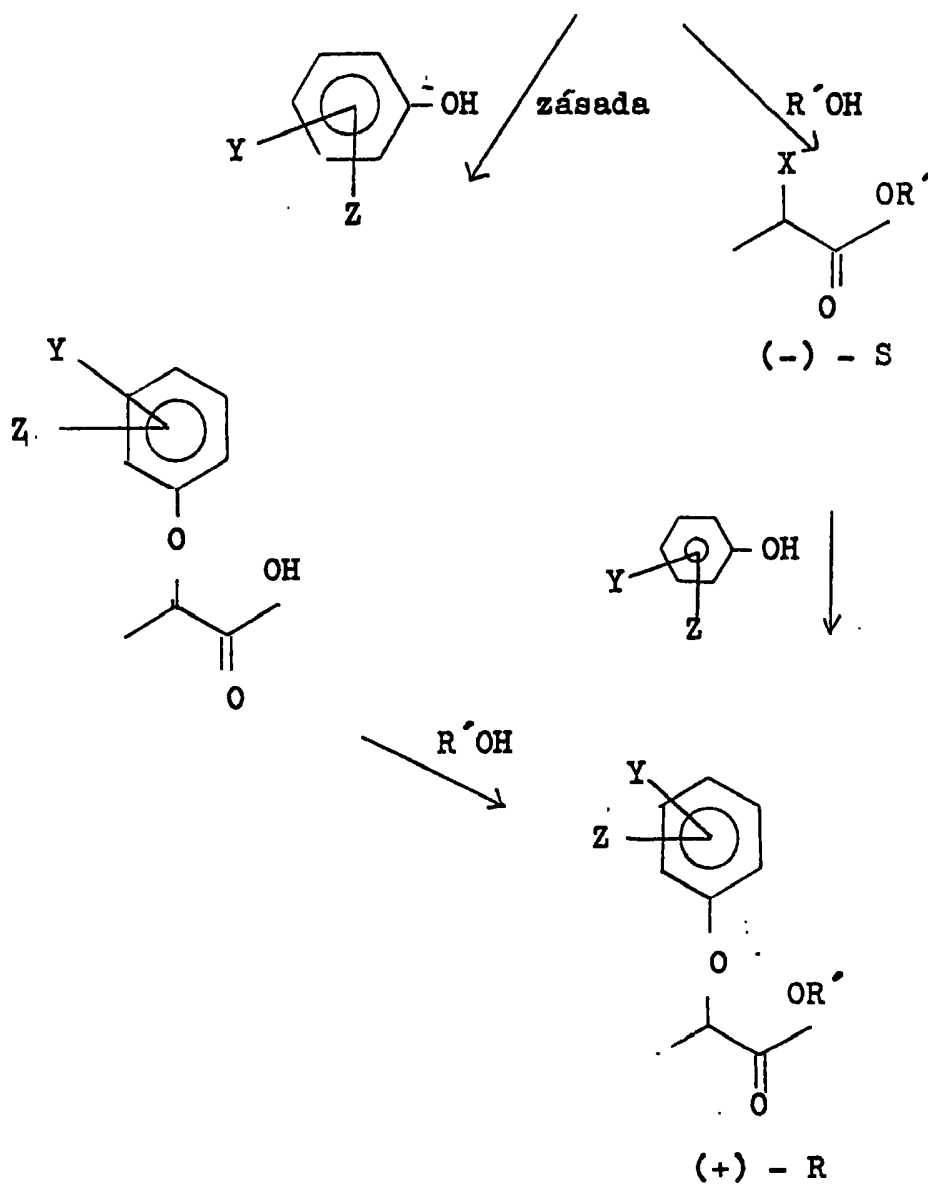
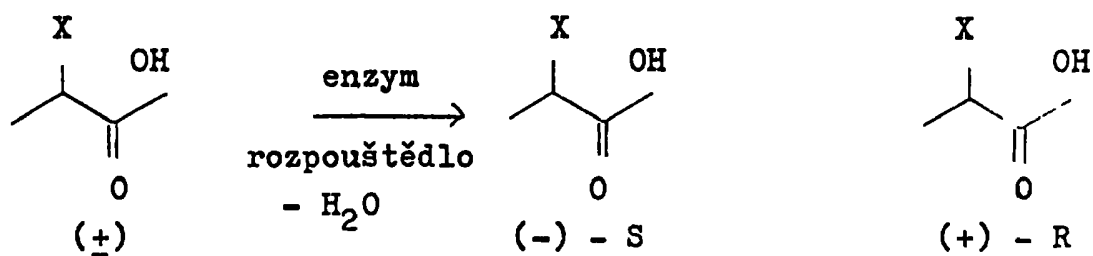
koliv vhodným způsobem pro oddělení esteru od kyseliny, například chromatografií nebo extrakcí vodou. Tímto způsobem se získá jeden z optických isomerů kyseliny. Oddělený ester je pak možno hydrolyzovat za vzniku odpovídajícího optického isomeru 2 - halogenpropionové kyseliny.

V případě, že požadovaným produktem je nezreagovaný isomer, je možno esterifikovaný isomer hydrolyzovat a racemizovat za vzniku racemické směsi kyselin 2 - halogenpropionových, kterou je pak možno opět dělit. Postup je možno opakovat do přeměny prakticky veškerého množství směsi na požadovaný isomer. Běžný způsob hydrolyzy, vhodný pro hydrolyzu a racemizaci, je dále popsán v souvislosti s popisem výroby kyselin 2 - fenoxypionových.

2 - halogenpropionové kyseliny jsou meziprodukty pro výrobu 2 - fenoxypionových kyselin, které jsou cennými herbicidy. Způsobem podle vynálezu lze získat opticky čistý S - isomer 2 - halogenpropionové kyseliny, který lze užít k syntéze čisté kyseliny (+) - R - 2 - fenoxypionové, což je biologicky účinný isomer této sloučeniny. V následujícím schematu je zřejmá syntéza této ~~isomerní~~ formy herbicidu.

Substituentem je pro X buď Cl nebo Br. ROH je alkohol k esterifikaci kyseliny. R znamená s výhodou nižší alkyl jako methyl, ethyl, n - propyl, n - butyl. Substituenty Y a Z fenylového kruhu jsou určeny k označení řady substituovaných fenolů, vhodných pro použití k výrobě odpovídajících 2 - fenoxypionových kyselin. Jde například o atomy halogenu, alkylové zbytky jako methyl, ethyl apod., hydroxyskupiny a nitroskupiny.

racemizace a hydrolýza



Příkladem substituovaných fenolů mohou být 2,4 - dichlorfenol, 4 - chlorfenol, 2 - methyl - 4 - chlorfenol a 2, 4,5 - trichlorfenol.

Při syntéze R enantiomeru 2 - fenoxypionových kyselin je zapotřebí užít S - enantiomeru 2 - halogenpropionových kyselin jako meziproduktů. Jak je ~~na~~ naznačeno ve schematu, je stereospecifická lipáza enzymem, který katalyzuje přednostně esterifikaci pouze jednoho isomeru kyseliny 2 - halogenpropionové. Jak již bylo svrchu uvedeno, má požadovanou specifčnost lipáza z *Candida cylindracea*. Organické prostředí, použité k provádění reakce může obsahovat kterékoliv ze svrchu uvedených rozpouštědek.

Po přeměně R - isomeru na ester se pak ester oddělí od nezureagovaného S - isomeru. S - isomer se pak uvede do reakce s fenolem za přítomnosti zásady za vzniku kyseliny 2 - fenoxypionové. Při reakci S - isomeru kyseliny 2 - halogenpropionové a fenolu dochází k inverzi na chirálním uhlíkovém atomu v poloze 2 za vzniku R - isomeru 2 - fenoxypionové kyseliny. V případě potřeby je možno esterifikovat výsledný R - isomer kyseliny 2 - fenoxypionové. Dalším možným způsobem pro získání esteru R - isomeru kyseliny 2 - fenoxypionové je esterifikace S - isomeru 2 - halogenpropionové kyseliny s následnou reakcí esterifikované kyseliny s fenolem.

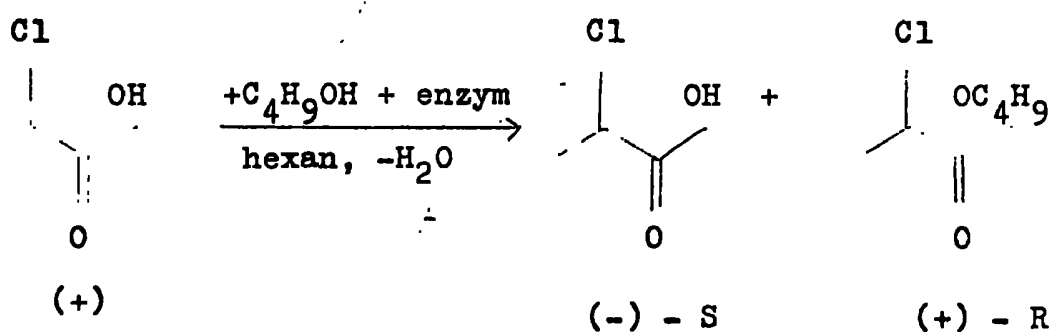
Vynález bude osvětlen následujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

P ř í k l a d 1

Dělení kyseliny 2 - chlorpropionové

Dělení kyseliny 2 - chlorpropionové probíhá podle následující rovnice:



4,34 g, (0,04 molu) 2 - chlorpropionové kyseliny s 11,0 ml 1 - butanolu (0,12 molu) se rozpustí ve 400ml hexanu a přidá se 2,0 g, (5 mg/ml) lipázy z Candida cylindracea. Reakční směs se energicky míchá při teplotě 30° C. Stupeň přeměny byl sledován plynovou chromatografií.

K izolaci esteru se reakce zastaví, jakmile se vytvoří 42 % teoretického množství esteru (po 6 hodinách). Roztok se zfiltruje a filtrát se čtyřikrát promyje 0,4 M NaHCO₃ a pak třikrát vodou.

Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým a odpa-

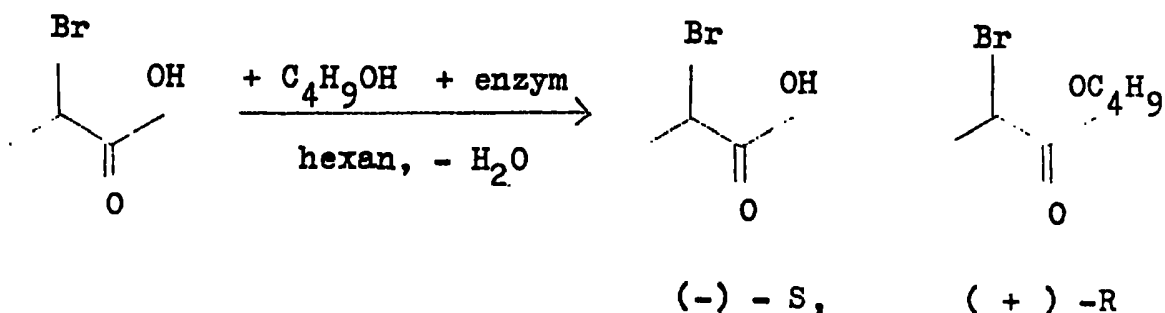
ří se na rotačním odpařovači. Pak se odparek destiluje při tlaku 1,3 kPa. Tímto způsobem se při teplotě 71° - 73° C získá 2,4 g butyl (+) - R - 2 - chlorpropionátu ve výtěžku 86,8 % teoretického množství. Čistota esteru byla 98,7 % při sledování plynovou chromatografií, specifická otáčivost $[\alpha]_D^{23} = + 7,48^\circ$ (c = 1, CHCl₃).

K izolaci kyseliny se reakce provádí při použití stejného množství výchozích látek, avšak zastaví se, jakmile se vytvoří 68 % esteru (po době 14,6 hodin). Po filtraci se filtrát promyje čtyřikrát vždy 0,5 M roztokem NaHCO₃. Vodná fáze se promyje dichlormethanem a pak se okyslí 6 N kyselinou chlorovodíkovou na pH 1,5 a pak se znovu čtyřikrát extrahuje dichlormethanem. Organické frakce se slíjí, vysuší se síranem hořečnatým, rozpouštědlo se odpaří a surová kyselina se destiluje (teplota varu 81° až 83° C při tlaku 1,4 kPa). Tímto způsobem se ve výtěžku 95,7 % získá 1,33 g kyseliny (-) - S - 2 - chlorpropionové o čistotě 98,3 % (plynová chromatografie), specifická otáčivost je $[\alpha]_D^{23} = - 15,1^\circ$ (c = 1, CHCl₃). Podle literárních údajů (W.Gaffield a W.G.Galetta, Tetrahedron 27 (1971)) odpovídá tato hodnota 95 % přebytku enantiomeru.

P ř í k l a d 2

Dělení kyseliny 2 - brompropionové

Dělení kyseliny 2 - brompropionové je možno znázornit následujícím vztahem:



Při použití téhož postupu jako v případě kyseliny 2 - chlorpropionové v příkladu 1 byly získány pro kyselinu 2 - brompropionovou následující výsledky:

Při použití 6,1 g (0,04 molu) kyseliny 2 - brompropionové, 11 ml (0,12 molu) 1 - butanolu a 400 ml hexanu a 2,0 g lipázy z *Candida Cylindraces* byl po 6 hodinách stupeň přeměny 45 %. V tomto okamžiku byla reakce zastavena a ester byl izolován způsobem podle příkladu 1.

Butyl (+) - S - 2 - brompropionát : teplota varu 84° až 86°C při tlaku 1,4 kPa, výtěžek 3,31 g (88,2 %), čistota 97,4 (G.C.), $I \propto I^{23} = + 18,4^\circ$ ($c = 1$, CHCl_3)

Při použití téhož množství výchozích látek byl proveden obdobný postup, reakce byla zastavena po tvorbě 78 % esteru za 14,5 hodin (jak bylo popsáno pro izolaci kyseliny 2 - chlorpropionové.

(-) - S - 2 - brompropionová kyselina: teplota varu 97° až 98°C při tlaku 14 kPa,

výtěžek 1,29 g (96,1 %), čisto-
ta 98,7 % (G.C.), $[\alpha]_D^{23} = -26,4^\circ$
($c = 1$, CHCl_3), ee = 99,8 %

V dalších příkladech bylo dělení s úspěchem prováděno v toluenu, petroléteru, methylchloridu, chloroformu a éteru.

P ř í k l a d 3

Racemizační postup

Aby bylo možno přivádět zpět do reakční směsi butyl (+) - R - 2 - brompropionát, nežádoucí enantiomer pro syntézu kyseliny 2 - fenoxypropionové, byl ester současně hydrolyzován a racemizován následujícím způsobem:

1,0 g (4,78 molu) butyl (+) - R - 2 - brompropionátu se přidá k 5 ml HBr (48 %) a roztok se míchá 14 hodin při teplotě 90°C . Po zchlazení na teplotu místnosti se reakční směs extrahuje dichlormethanem. Organická fáze se vysuší síranem hořečnatým a odpaří. Odparek je možno identifikovat jako kyselinu 2 - brompropionovou (čistota 96,5 % při plynové chromatografii), produkt nemá optickou rotaci. Svrchu uvedeným způsobem je možno hydrolyzovat R - butylester a současně dosáhnout racemizace vytvářené kyseliny. Výtěžek racemické kyseliny byl 0,68 g (93 %).

Lipázou katalyzovaná asymetrická esterifikace v organickém prostředí je prostředkem pro získání optických isomerů 2 - halogenpropionových kyselin, které je

možno užít k syntetizování opticky čistých (+) - R - 2 - fenoxypionových kyselin, které jsou cennými herbicidy.

P ř í k l a d 4

Dělení kyseliny 2 - brompropionové lipázou ze slinivky vepře

3,06 g, 0,02 molu kyseliny 2 - brompropionové a 3,7 ml 0,4 molu 1 - butanolu se rozpustí ve 200 ml hexanu a přidají se 2 g lipázy ze slinivky vepře.

Reakční směs se energicky míchá při teplotě 30° C, stupeň přeměny se sleduje pomocí plynové chromatografie (G.C.). Po 50 hodinách, kdy se vytvoří 55 % esteru se reakce zastaví k izolaci kyseliny.

Po filtraci se filtrát čtyřikrát extrahuje nasyceným roztokem uhličitanu sodného. Vodná fáze se okyselí zředěnou kyselinou sírovou a čtyřikrát se extrahuje etherem.

Organické frakce se spojí, vysuší se síranem sodným a odpaří a získaná surová kyselina se destiluje (teplota varu 115° C při tlaku 5, kPa).

Tímto způsobem se získá 1,13 g kyseliny (-) - S - 2 - brompropionové se specifickým otáčením $[\alpha]_D^{20} = -21,3^\circ$ (c = 1, chloroform). Výtěžek je 81,1 %.

P ř í k l a d 5

43,8 g, 0,307 molu 4 - chlor - 2 - methyľfenolu se rozpustí při teplotě místnosti za míchání ve 20 ml vody z obsahem 12,3 g, 0,308 molu hydroxidu sodného. K roztoku se při teplotě 90° C přidá roztok 33,3 molu kyseliny (-) - S - chlorpropionové s optickou otáčivostí $I_0^{20} = -16,1^{\circ}$ (c = 1, chloroform) a 12,3 g, 0,308 molu hydroxidu sodného v 15 ml vody v průběhu 1 hodiny a po kapkách, načež se roztok přestane zahřívát.

Po zchlazení na teplotu místnosti se směs upraví kyselinou sírovou na pH 7 a pak se roztok extrahuje 4 x 80 ml xylenu.

Pak se opět pH upraví zředěnou kyselinou sírovou na hodnotu 2 až 3 a kyselina, která se částečně vyloučí jako olej se extrahuje 4 x 80 ml xylenu. Organické fáze se spojí, vysuší se síranem sodným a rozpouštědlo se oddestiluje. Jako odparek se získá požadovaná kyselina.

Ve výtěžku 85,4 % teoretického množství se získá 56,3 g kyseliny R - (+) - 2 - (4 - chlor - 2 - methyľfenoxy) propionové. $I_0^{20} = +12,0^{\circ}$ (c = 1, chloroform), čistota 96 % (G.C.).

P ř í k l a d 6

43,8 g 0,307 molu 4 - chlor - 2 - methyľfenolu se za míchání při teplotě místnosti rozpustí ve 20 ml vody, obsahující 12,3 g 0,308 molu hydroxidu sodného. K tomu

to roztoku se při teplotě 90° C přidá roztok 47,0 g, 0,307 molu kyseliny S - (-) - brompropionové s optickou otáčivostí $[\alpha]_D^{20} = - 27,8^\circ$ (c = 1, chloroform) a 12,3 g, 0,308 molu hydroxidu sodného v 15 ml vody v průběhu 1 hodiny po kapkách, pak se roztok přestane zahřívat.

Reakční směs se zpracovává způsobem, který byl popsán v příkladu 4.

Ve výtěžku 90,4 % teoretického množství se tímto způsobem získá 59,6 g kyseliny R - (+) - 2 - (4 - chlor - 2 - methylofenoxi) propionové. $[\alpha]_D^{20} = + 12,7^\circ$ (c = 1, chloroform), čistota 97,2 % (G.C.).

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby opticky čistých kyselin (+) -
R - 2 - fenoxypionových, v y z n a č u j í c í c h
s e t í m, že se

- a) vytvoří reakční směs z racemické kyseliny 2 -
halogenpropionové, primárního alkoholu, napří-
klad methanolu, ethanolu, n - propanolu nebo
n - butanolu a stereospecifické lipázy, napří-
klad z kvasinky *Candida cylindracea*, ze slini-
vky vepře, z pšeničných klíčků, z *Rhizopus arr-*
hizus, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delamar*,
Chromobacterium viscosum, *aspergillus niger*,
čeledi *Mucor* a *Pseudomonas* v organickém pros-
tředí, například v hexanu, benzenu, chloroformu,
dichlormethanu, petroléteru nebo toluenu
za podmínek, v nichž lipáza přednostně kataly-
zuje esterifikaci kyseliny (+) - R - 2 - ha-
logenpropionové,
- b) neesterifikovaná kyselina (-) - S - halogen-
propionová se oddělí od esteru kyseliny (+)
- R - halogenpropionové,
- c) kyselina (-) - S - 2 - halogenpropionová se uve-
de do reakce s fenolem za bazických podmínek
za vzniku (+) - R - 2 - fenoxypionové ky-
seliny a
- d) k získání opticky čistého esteru (+) - R - 2
- fenoxypionové kyseliny se kyselina (+)
- R - 2 - fenoxypionová esterifikuje.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že se jako kyselina 2 - halogen -
propionová užije kyselina 2 - chlorpropionová nebo 2 -
brompropionová.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že se jako stereospecifické lipázy užije
lipázy z Candida cylindracea.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že se

d) hydrolyzuje ester kyseliny (+) - R - 2 - halo-
genpropionové a

e) racemizuje se výsledná kyselina (+) - R - 2
- halogenpropionová za vzniku racemické kyse-
liny 2 - halogenpropionové a stupeň a) až e)
se opakuje až do přeměny veškeré 2 - halogen-
propionové kyseliny na kyselinu (+) - R - 2
- fenoxypionovou.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í
s e t í m, že se

esterifikovaný isomer hydrolyzuje a racemi-
zuje rozpuštěním ve vodné koncentrované kyse-
lině HX, v níž X je tentýž halogen jako v
kyselině 2 - halogenpropionové a výsledný roz-
tok se zahřívá na teplotu 50° až 100° C.