

ESTERE AF GLYCOSIDER AF MONOSACCHARIDER, FREMGANGSMÅDE TIL FREMSTILLING DERAFT SAMT RENSE- ELLER RENGØRINGSMIDDEL INDEHOLDENDE DISSE ESTERE

Resumé af denne opfindelse

5 Opfindelsen angår hidtil ukendte estere af glycosider af monosaccharider, en fremgangsmåde til enzymatisk fremstilling af sådanne forbindelser samt et rens- eller rengøringsmiddel indeholdende forbindelserne.

Baggrund for denne opfindelse

10 Overfladeaktive forbindelser udgør en overordentlig vigtig gruppe af industrielle organiske kemikalier med et bredt anvendelsesområde, f.eks. som detergenter til vaskeformål, som emulgeringsmidler i fødevarer og foderstoffer samt endog som funktionelle hjælpemidler i mange produkter
15 til personlig pleje såsom shampo, fugtighedscremer osv.

På det molekylære niveau er overfladeaktive stoffer grundlæggende betragtet karakteriseret ved tilstedeværelsen af hydrofobe og hydrofile områder inden for de enkelte overfladeaktive molekyler. Denne særlige konstellation kan opnås
20 på adskillige måder, f.eks. ved at kombinere en sulfonsyre-rest, en kvarterniseret ammoniumdel eller en glycerolrest med en alkylkæde, hvilket er tilfældet i henholdsvis lineære alkyloverfladeaktive stoffer, kvarterniserede alkylaminer og monoglycosider. Ved det egentlige "design" af sådanne over-
25 fladeaktive molekyler ofres der megen omtanke på den detaljerede molekylære opbygning af forbindelserne, idet den præcise balance mellem de hydrofile og hydrofobe områder i de overfladeaktive molekyler er vigtige aspekter. Det er også klart, at derudover overvejes mulighederne for reelt at
30 fremstille de overfladeaktive stoffer ved fremgangsmåder, der giver højt udbytte, og på grundlag af råmaterialer, der kan fås til en rimelig pris. Miljøhensyn vedrørende den efterfølgende udledning af det overfladeaktive stof til omgivelserne er endvidere et forhold af afgørende interesse.

35 På grund af disse overvejelser har der i løbet af åre-

ne været stærk interesse for fremstillingen af overfladeaktive molekyler på grundlag af sukkerarter og fedtsyrer, f.eks. sukkerestere. På grund af tilstedeværelsen af hydrofile sukkerregioner og de hydrofobe fedtsyrerester kunne det
5 forventes, at sådanne konjugater ville udvise overfladeaktive egenskaber. Balancen og således konjugaternes præcise egenskaber kan varieres ved ændring af arten af sukker og fedtsyreresterne, materialerne kan fremstilles af særdeles billige råmaterialer, og de overfladeaktive stoffer, der
10 består af og som kan nedbrydes til naturlige bestanddele, vil ikke være skadelige for omgivelserne.

Som et specifikt eksempel på overfladeaktive stoffer henvises til Phillip. J. Coconut stud. 5 (1980) 51, ff., hvori der beskrives kokosnødfedtsyreestere af methylglucopyranosid. I denne artikel nævnes der imidlertid ikke noget
15 om, at disse overfladeaktive stoffer kan anvendes som tilsætningsstoffer i vaskemidler. Som eksempler på specifikke, kommercielt anvendte overfladeaktive stoffer, som er tilsætningsstoffer til vaskemidler, kan nævnes Berol 065 og Berol
20 160 (fedtsyrealkoholethoxylater), der fremstilles af Berol AB, Sverige.

På trods af mange forsøg har syntese og fremstilling af rene sukkerestere på konventionel måde vist sig at være særdeles vanskelig. Dette skyldes bl.a. tilstedeværelsen af
25 adskillige, kemisk ensartede grupper i de suktermolekyler, som følgelig ved behandling med esterificeringsreagenser esterificeres i adskillige stillinger. Følgelig er sukkerestere, der er fremstillet kemisk, sædvanligvis blandinger af forbindelser, som er forskellige med hensyn til esterificeringsgraden og acylgruppernes stilling i kulhydratdelen i
30 produkterne. Idet de kemiske fremgangsmåder til kemisk esterificering yderligere har vist sig at være ganske omkostningsforstærkende, har der indtil videre kun været en meget begrænset anvendelse af sukkerestere, der er fremstillet i
35 industriel målestok.

På grund af de problemer, der er ved kemisk fremstilling af sukkerestere, og disse forbindelsers attraktive

egenskaber som industrielle overfladeaktive midler, er der i løbet af de seneste år rettet megen opmærksomhed mod muligheden for at udnytte enzymer til fremstilling af sukkerestrene. Et afgørende rationale for denne interesse er det forhold, at det er kendt, at enzymer udviser en høj grad af regio- og enantioselektivitet, som måske kan udnyttes til selektiv esterificering af én eller flere hydroxygrupper i suktermolekylerne. Til den enzymatiske fremgangsmåde kan der måske anvendes billige udgangsmaterialer, hvilket derfor kan give billige sukkerestere i store mængder. De enzymer, man kan forestille sig som katalysatorer ved fremgangsmåder af denne art, er primært lipaser, som katalyserer hydrolysen af esterbindinger, og som derfor principielt også katalyserer den omvendte reaktion, dvs. estersyntese.

Forsøgene på at udvikle effektive enzymatiske syntese af sukkerestere har imidlertid hidtil været forgæves. En afgørende årsag til dette uheldige udfald er den store forskel i polaritet mellem de to substrater ved esterificeringsreaktionen - sukkerarten og fedtsyren eller derivatet deraf - og nødvendigheden af at undgå vand i reaktionsmediet for at forskyde den enzymatiske reaktion i retning mod syntese. Der findes således få gode opløsningsmidler til både sukkerarter og fedtsyrer eller derivater deraf, og disse opløsningsmidler vil ofte inaktivere enzymerne.

Disse iboende vanskeligheder ved enzymatisk syntese af sukkerestere er behandlet i de eksempler, der f.eks. er omtalt i USA-patentskrift nr. 4.614.718 og i J. Am. Chem. Soc. 108 (1986), 5638 - 5640 og 6421 - 6422, og 109 (1987), 3977 - 3981. Disse publikationer angår henholdsvis anvendelsen af lipaser til esterificering af sorbitol og sorbital med fedtsyrer og transesterificering fra aktive estere af frie fedtsyrer til langkædede glycosider med lipase. De ringe udbytter, reaktionernes lave selektivitet og de ved de beskrevne fremgangsmåder anvendte opløsningsmidlers toksicitet udelukker imidlertid enhver teknisk anvendelse af de beskrevne fremgangsmåder.

Et formål med denne opfindelse er at tilvejebringe

hidtil ukendte forbindelser.

Et yderligere formål med denne opfindelse er at tilvejebringe overfladeaktive forbindelser med fordelagtige egenskaber.

5 Et yderligere formål med denne opfindelse er at tilvejebringe overfladeaktive forbindelser, der har fordelagtige egenskaber, når de anvendes i vaskemidler.

Et yderligere formål med denne opfindelse er at tilvejebringe rensnings- og rengøringsmiddelsammensætninger med
10 bedre rensnings- og rengøringsvirkninger.

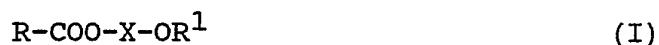
Et yderligere formål med denne opfindelse er at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af estere af glucosider.

Et yderligere formål med denne opfindelse er at
15 tilvejebringe monoestere af glucosider.

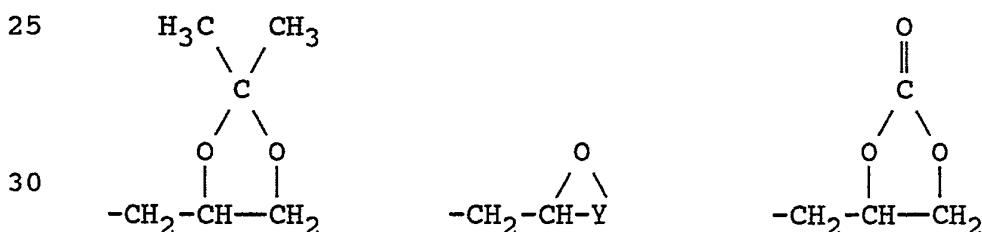
Et yderligere formål med denne opfindelse er at tilvejebringe monoestere af glucosider af monosaccharider.

Detaljeret udøvelse af denne opfindelse

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til
20 fremstilling af estere af glycosider af monosaccharider med den almene formel I



hvor R^1 betegner alkyl med 2 - 6 kulstofatomer, phenyl eller en af grupperne



hvor Y betegner methylen eller ethylen, X betegner en monosacchariddel svarende til glucose eller galactose, der på det terminale, anomeriske kulstofatom bærer gruppen $-OR^1$, og

som på den primære hydroxygruppe bærer en gruppe RCOO-, hvor R betegner alkyl med 4 - 24 kulstofatomer, ved kondensering af en syre eller en ester med den almene formel



5 hvor R er som angivet ovenfor, og R² betegner hydrogen eller lavere alkyl, med et glycosid med den almene formel III



hvor X og R¹ hver er som angivet ovenfor, i nærværelse af en katalysator, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at
10 katalysatoren er en lipase. Den foreliggende opfindelse angår endvidere de hidtil ukendte estere af glycosider af monosaccharider. De tilgrundliggende kulhydrater samt forbindelser med formlen I kan være α - eller β -form.

De ovennævnte alkylgrupper kan være lineære eller for-
15 grenede.

R¹ er fortrinsvis en alkylgruppe. Gruppen R¹ indeholder fortrinsvis 2, 3 eller 4 kulstofatomer. Eksempler på specifikke foretrukne grupper R¹ er ethyl, propyl, isopropyl og butyl, mest foretrukket ethyl og isopropyl.

20 Det formodes, at den nedenfor beskrevne fremgangsmåde er den eneste kendte fremgangsmåde, ved hvilken det er muligt at fremstille acceptable udbytter af monoestere. Monoestere med formlen I har følgelig ikke tidligere været tilgængelige.

25 Det mest foretrukne kulhydrat er glucose.

Foretrukne fedtsyrer svarende til resten R-COO- i formlen I er mættede og umættede fedtsyrer, fortrinsvis indeholdende 6 - 22 kulstofatomer.

30 Eksempler på sådanne fedtsyrer er capronsyre, ω -nanth-syre, caprylsyre, perlagonsyre, caprinsyre, laurinsyre, myristinsyre, palmitinsyre, stearinsyre, arachinsyre, behensyre, cis-9-octadecansyre, cis-cis-9,12-octadecansyre og cis,cis,cis-9,12,15-octadecantriensyre.

Eksempler på specifikke foretrukne forbindelser med formel I er følgende:

Ethyl-6-O-octanoylglucosid, ethyl-6-O-decanoylglucosid, ethyl-6-O-dodecanoylglucosid, ethyl-6-O-tetradecanoylglucosid, ethyl-6-O-hexadecanoylglucosid, ethyl-6-O-octadecanoylglucosid, ethyl-6-O-cis-9-octadecanoylglucosid, isopropyl-6-O-octanoylglucosid, isopropyl-6-O-dodecanoylglucosid og butyl-6-O-octanoylglucosid.

Forbindelser med formel I har overraskende gode virkninger som overfladeaktive midler, hvilket f.eks. kan illustreres ved deres rensnings- og vaskeeffekter, især mod fedt- og proteinforurening. Den foreliggende opfindelse angår følgelig også et rens- eller rengøringsmiddel indeholdende en forbindelse med den almene formel I.

Rengørings- og vaskemidler indeholdende en forbindelse med formel I kan være i en hvilken som helst hensigtsmæssig form såsom pulvere eller væsker.

Typiske eksempler på rengørings- og vaskemidler er vaskemidler (til tøj), opvaskemidler og rensmidler til hårde overflader (hard-surface cleaner). Mere specifikke eksempler er flydende fuldvaskemidler (heavy-duty detergents) (med eller uden "builders") og pulverformige fuldvaskemidler (med eller uden "fosfat-builders").

I rens- og rengøringsmidlerne kan den overfladeaktive forbindelse med formlen I overvejende være af ikke-ionisk art (f.eks. over 80%), eller den kan være en blanding af ikke-ionisk (f.eks. 20 - 80%) og en anden slags overfladeaktiv forbindelse (f.eks. 20 - 80% anionisk, kationisk og/eller zwitterionisk). Eksempler på anioniske er linære alkylbenzensulfonater (LAS), fedtsyrealkoholsulfater, fedtsyrealkoholestersulfater (AES), α -olefinsulfonater (AOS) og sæber.

Flydende og pulverformige vaskemidler kan formuleres analogt med "Frame formulations for liquid/powder heavy-duty detergents" (J. Falbe: Surfactants in Consumer Products. Theory, Technology and Application Springer-Verlag 1987) ved at erstatte hele eller en del af den ikke-ioniske overflade-

aktive forbindelse med en forbindelse med formel I. Flydende fuldvaskemidler kan således foruden forbindelsen med formel I indeholde anioniske overfladeaktive forbindelser, ikke-ioniske overfladeaktive forbindelser, skumregulerende midler, skumforstærkende midler, enzymer, tilsætningsstoffer til vaskemidler for at øge renssevirkningen (builders), formuleringsmidler, optisk hvidt, stabiliseringsmidler, blødgøringsmidler, duftmidler, farvestoffer og vand. På tilsvarende måde kan pulverformede fuldvaskemidler indeholde anioniske overfladeaktive forbindelser, ikke-ioniske overfladeaktive forbindelser, skumregulerende midler, skumforstærkende midler, geleringsmidler, ionbyttere, baser, "co-builders", blegemidler, blegningsaktiveringsmidler, blegningsstabiliseringsmidler, blødgøringsmidler, antiredepositionsmidler, enzymer, optisk hvidt, antikorrosionsmidler, duftmidler, farvestoffer og blåningsmidler, formuleringsmidler, fyldstoffer og vand.

De ekstra gode virkninger af forbindelser med formel I er illustreret i nedenstående eksempel 37.

Det har yderligere overraskende vist sig, at det er muligt i meget høje udbytter at fremstille forbindelser med formel I ved en enzymatisk syntese af sukkerestere, idet der som substrater for den enzymatiske esterificering anvendes et kulhydrat bærende en alkylgruppe med 2 - 6 kulstofatomer eller phenyl på hydroxygruppen på det terminale, anomeriske kulstofatom, og en fri fedtsyre eller en ester deraf som det andet substrat ved reaktionen. Reaktionsprodukterne er sukkerestere, der bærer en alkylgruppe på hydroxygruppen på det anomeriske kulstofatom. Det har overraskende vist sig, og det kunne ikke have været forudset, at en mindre ændring af suktermolekylerne ved de anomeriske kulstofatomer dramatisk forbedre deres egenskaber som substrater og giver høje udbytter og endog regiospecifikke enzymatiske esterificeringer.

Under anvendelse af denne fremgangsmåde er det muligt at fremstille et præparat indeholdende over 80%, fortrinsvis over 90%, endnu mere foretrukket over 90%, af en forbindelse

med formel I. Et sådant præparat har meget gode, overraskende egenskaber som overfladeaktivt middel.

De enzymer, der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge denne opfindelse, er lipaser. De enzymer, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge denne opfindelse, kan anvendes i opløst form, eller enzymet kan om ønsket være immobiliseret. Enzymerne kan også være modificeret ved kemiske eller genetiske metoder for at optimere deres reaktivitet med hensyn til en specifik ønsket reaktion.

10 Eksempler på specifikke enzymer, der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge denne opfindelse, er svinepancreaslipase og mikrobielle lipaser, der f.eks. fås fra stammer af *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Pseudomonas*, *Enterobacterium*, *Chromobacterium*, *Geotricium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Candida* og *Humicola*.
15 Eksempler på foretrukne stammer er *Mucor miehei*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia* og *Humicola lanuginosa*.

Candida antarctica blev den 29. september 1986, 8. december 1986 og 8. december 1986 deponeret hos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM) i overensstemmelse med
20 Budapestkonventionen under deponeringsnumrene henholdsvis DSM 3855, DSM 3908 og DSM 3909.

Pseudomonas cepacia blev den 30. januar 1987 deponeret hos DSM under nr. 3959, og *Humicola lanuginosa* blev den 13. august 1986 og 4. maj 1987 deponeret hos DSM under
25 numrene henholdsvis 3819 og 4109.

Yderligere lipaser kan fås fra *Humicola brevispora*, *brevis* var. *thermoidea* og *insolens*, som den 4. maj 1987, 4. maj 1987 og 1. oktober 1981 blev deponeret hos DSM under numrene henholdsvis 4110, 4111 og 1800.

30 Yderligere lipaser kan fås fra følgende stammer, der er frit tilgængelige for offentligheden fra Centralbureau voor Schimmelculturen (CBS), American Type Culture Collection (ATCC), Agricultural Research Culture Collection (NRRL) og Institute of Fermentation, Osaka (IFO), under de angivne
35 deponeringsnumre: *Candida antarctica*: CBS 5955, ATCC 34888, NRRL Y-8295, CBS 6678, ATCC 28323, CBS 6821 og NRRL Y-7954; *Candida tsukubaensis*: CBS 6389, ATCC 24555 og NRRL Y-7792;

Candida auriculariae: CBS 6379, ATCC 24121 og IFO 1580; Candida humicola: CBS 571, ATCC 14438, IFO 0760, CBS 2041, ATCC 9949, NRRL Y-1266, IFO 0753 og IFO 1527; og Candida foliorum: CBS 5234 og ATCC 18820.

5 Fremgangsmåden ifølge denne opfindelse kan simpelthen udføres ved at blande glycosidet med formel III med en syre eller en ester deraf med formel II i nærværelse af enzymet og omsætningen kan eventuelt udføres i et opløsningsmiddel, i hvilket enzymet udviser den ønskede aktivitet. Fortrinsvis
10 tilsættes der ikke et opløsningsmiddel. Hvis der anvendes et organisk opløsningsmiddel, må det ikke have nogen uønsket virkning på enzymet. Eksempler på sådanne opløsningsmidler er ketoner, carbonhydrider og ethere. Foretrukne midler er pentan, hexan, heptan og 2-butanon.

15 Reaktionsmediet er fortrinsvis ikke-vandigt eller indeholder kun den mængde vand, der er nødvendig for at sikre en god reaktivitet og levetid af det anvendte enzym.

Reaktionstemperaturen er hensigtsmæssigt ca. 20 - 100°C, fortrinsvis ca. 30 - 80°C. Reaktionen udføres for-
20 trinsvis ved lavt tryk, fortrinsvis under 0.05 bar.

Opfindelsen belyses nærmere i eksemplerne 1 - 23, 26 - 30 og 32 - 49.

Generel fremgangsmåde

¹H og ¹³C NMR-spektre blev udskrevet på et Bruker WM
25 400- og et Bruker AM 500-spektrometer med TMS som indre reference. Optisk drejning blev bestemt på et Perkin-Elmer 241-polarimeter under anvendelse af en 1 dm cuvette. Smeltepunkterne er ukorrigerede. HPLC-analyser blev udført på et Shimadzu LC-4A-instrument (refraktiv indexdetektor) under
30 anvendelse af en Merck LiChrosorb NH₂-kolonne og 96% ethanol som elueringsmiddel. De kritiske micellekoncentrationer blev målt på et Krüss-tensiometer K10. Molekylærdestillation blev udført på en KDL 1-enhed fra Leybold-Heraeus. Isopropyl- α -glucopyranosid, n-propyl- β -D-glucopyranosid og phenyl- α -D-
35 glucopyranosid var en gave fra Danmarks Tekniske Højskole,

Afdeling for Organisk Kemi. Præparativ væskekromatografering blev udført på SiO₂ med en gradient af hexan-ethylacetat og methanol som elueringsmiddel.

Eksempel 1

5 Fremstilling af ethyl-6-O-dodecanoyl-D-glucopyranosid

Til en blanding af 578 g rå ethyl-D-glucopyranosid (2,78 mol, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge eksempel 10) og 751 g laurinsyre (3,75 mol) i en reaktor med omrøring ved 70°C sættes 29 g immobiliseret lipase, som er udvundet fra *Candida antarctica* (fremstillet som beskrevet i dansk patentansøgning nr. 3250/88). Omrøringen fortsættes under formindsket tryk (0,05 bar), og estersyntesens fremskriden følges med HPLC. Efter 23 timers forløb fjernes enzymet ved filtrering (ved 70°C). Overskydende fedtsyre fjernes ved gentagen molekylærdestillation (105°C, $4 \cdot 10^{-2}$ mbar), hvilket giver et udbytte på 96% (1050 g) råt produkt sammen med 2% ethyl-D-glycosid og 2% af en blanding af diestere (HPLC-analyse). Det rå produkt renses ved kromatografering. Identifikation ved ¹H NMR-analyse viser en 1:1-blanding af α- og β-anomere (tabel 4).

Eksempel 2

Fremstilling af ethyl-6-O-decanoyl-D-glucopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fås som et råt produkt (1030 g, 93% monoester, 5% ethyl-D-glucopyranosid, 2% diestere) ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 under anvendelse af 625 g ethyl-D-glucopyranosid (3,0 mol), 646 caprinsyre (3,75 mol) og 31,5 g immobiliseret lipase. Reaktionen var afsluttet i løbet af 48 timer. NMR-spektre af det kromatografisk rensede produkt er givet i tabel 4.

Eksempel 3Fremstilling af ethyl-6-O-tetradecanoyl-D-glucopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fås som et råt produkt (1160 g, 93% monoester, 4% ethyl-D-glucopyranosid, 5 3% diestere) ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 under anvendelse af 609 g ethyl-D-glucopyranosid (2,9 mol), 834 g myristinsyre (3,7 mol) og 30,5 g immobiliseret lipase. Reaktionen var afsluttet i løbet af 46 timer. NMR-spektre af det kromatografisk rensede produkt er i overensstemmelse med de 10 ^1H - og ^{13}C NMR-spektre, der er givet for de rene α - og β -anomerer i tabel 4 a/4 b.

Eksempel 4Fremstilling af ethyl-6-O-hexadecanoyl-D-glucopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fås som et råt produkt (1220 g, 91% monoester, 7% ethyl-D-glucopyranosid, 15 2% diestere) ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 under anvendelse af 603 g ethyl-D-glucopyranosid (2,9 mol), 1001 g palmitinsyre (3,91 mol) og 30,5 g immobiliseret lipase. Reaktionen var afsluttet i løbet af 48 timer. NMR-spektre af 20 det kromatografisk rensede produkt er i overensstemmelse med de ^1H - og ^{13}C NMR-spektre, der er givet for de rene α - og β -anomerer i tabel 4 a/4 b.

Eksempel 5Fremstilling af ethyl-6-O-(cis-9-octadecenoyl)-D-glycopyra-
25 nosid

Den i overskriften angivne forbindelse fås som et råt produkt (1305 g, 90% monoester, 5% ethyl-D-glucopyranosid, 5% diestere) ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 under anvendelse af 606 g ethyl-D-glucopyranosid (2,0 mol), 1111 g 30 cis-9-octadecansyre (3,9 mol) og 30,5 g immobiliseret lipase. Reaktionen var afsluttet i løbet af 48 timer.

Eksempel 6Fremstilling af ethyl-6-O-octadecanoyl-D-glucopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fås som et råt produkt (1310 g, 90% monoester, 5% ethyl-D-glucopyranosid, 5 5% diestere) ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 under anvendelse af en reaktionstemperatur på 80°C, 603 g ethyl-D-glucopyranosid (2,9 mol), 1112 g stearinsyre (3,9 mol) og 30 g immobiliseret lipase. Reaktionen var afsluttet i løbet af 48 timer. NMR-spektre af det kromatografisk rensede produkt 10 er i overensstemmelse med de ¹H- og ¹³C NMR-spektre, der er givet for de rene α- og β-anomerer i tabel 4 a/4b.

Eksempel 7Fremstilling af kokosnødliefedtsyre-6-O-esterificeret ethyl-D-glucopyranosid

15 600 g ethyl-D-glucopyranosid (2,9 mol) esterificeres med en blanding af kokosnødliefedtsyrer (indeholdende 1% caprinsyre, 51% laurinsyre, 24% myristinsyre, 13% palmitinsyre, 4% stearinsyre, 5% cis-9-octadecansyre og 2% cis,cis-9,12-octadecansyre i en totalmængde på 3,0 mol) ved den i 20 eksempel 1 beskrevne fremgangsmåde under anvendelse af 30 g immobiliseret lipase som katalysator. Efter 72 timers forløb var reaktionen afsluttet, og udbyttet var 1200 g produkt (91% monoestere, 6% diestere og 3% ethyl-D-glucopyranosid).

Eksempel 825 Fremstilling af ethyl-6-O-otanoyl-D-glucopyranosid

Til en suspension af 500 g ethyl-D-glucopyranosid (2,4 mol, fremstillet ifølge eksempel 10) og 520 g caprylsyre (3,6 mol) i 1000 ml hexan i en reaktor med omrøring ved 70°C (tilbagesvaling) sættes 5 g immobiliseret lipase (Lipozym^{VM}, 30 kommerciel tilgængelig NOVO-lipase, som er fremstillet fra Mucor miehei). Omrøringen fortsættes, og det dannede vand fjernes ved azeotrop destillation. Reaktionens fremskriden følges ved HPLC. Efterhånden som produktet dannes, bliver

suspensionen gradvis en homogen opløsning (efter 12 timers forløb). Efter 52 timers forløb fjernes enzymet ved filtrering, og opløsningsmidlet fjernes i vakuum. Overskydende fedtsyre fjernes ved gentagen molekylærdestillation, hvorved
5 fås 790 g råt produkt (91% monoester, 8% diester og 1% ethyl-D-glucoopyranosid). ^1H - og ^{13}C NMR-spektre af det rensede produkt var i overensstemmelse med spektrene for de rene α - og β -anomere, der er givet i tabel 4 a/4 b.

Eksempel 9

10 Fremstilling af isopropyl-6-O-dodecanoyl-D-glucoopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 under anvendelse af 446 g isopropyl-D-glucoopyranosid (2,01 mol, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge eksempel 11). Efter 24 timers forløb var
15 reaktionen afsluttet, og der blev isoleret 561,1 g råt produkt (73,4% monoester og 9,2% diester).

Eksempel 10

Fremstilling af ethyl-D-glucoopyranosid

500 g glucose (2,78 mol) og 100 g stærk, sur kation-
20 bytter (Amberlyst 15, BDH Chemicals) suspenderes i 2000 ml ethanol (34,3 mol). Blandingen omrøres ved 80°C i 16 timer. Reaktionens fremskriden følges ved HPLC. Ionbytterharpiksen fjernes ved filtrering, og opløsningen behandles med 10 g aktivt kul. Efter filtreringen fjernes ethanolet i vakuum,
25 hvorved fås 578 g ethyl-D-glucoopyranosid (en 1:1-blanding af α - og β -anomere, kvantitativt udbytte) i form af en sirup.

Eksempel 11

Fremstilling af isopropyl-D-glucoopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles i
30 kvantitativt udbytte ved den i eksempel 10 beskrevne fremgangsmåde under anvendelse af 2000 ml isopropanol (26 mol)

og 500 g glucose (2,78 mol).

Eksempel 12 - 17

Fremstilling af 6-O-estere af rene β -D-glucopyranosider

Generel fremgangsmåde:

5 3,0 g ethyl- β -D-glucopyranosid (14 mmol, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge eksempel 24) blev ved 70°C opløst/suspenderet i smeltet fedtsyre (typisk 28 mmol). Der tilsættes immobiliseret lipase (typisk 0,05 Lipozym^{VM}, se eksempel 8) og blandingen omrøres ved reduceret tryk (0,5
10 bar). Reaktionens fremskriden følges ved HPLC. Reaktionsblandingen fortyndes med acetone, og enzymet fjernes ved filtrering. Opløsningsmidlet fjernes i vakuum, og produktet fjernes ved kromatografering på SiO₂. ¹H og ¹³C NMR (se tabel 4 a). Forbindelsen blev karakteriseret yderligere
15 ved bestemmelse af smeltepunkt (smp.), optisk drejning ([α]_D) og kritisk micelle- koncentration (CMC) (angivet i tabel 3).

De eksperimentelle detaljer fra de forskellige eksempler er angivet i tabel 1.

20 TABEL 1

Eksempel	Fedtsyre			Lipozym	Reaktionstid	Udbytte
		g	mmol	g	timer	%
25						
12	Caprylsyre	8,3	58	1,0	240	75
13	Caprinsyre	5,0	28	0,5	64	81
14	Laurinsyre	5,7	28	0,5	24	87
30	15 Myristinsyre	6,6	28	0,5	22	83
16	Palmitinsyre	7,3	28	0,5	40	77
17	Stearinsyre	8,2	28	0,5	76	76

Eksperimentelle detaljer fra fremstillingen af 6-O-estere af
35 rene β -D-glucopyranosider.

Eksempel 18 - 23Fremstilling af 6-O-estere af rene α -D-glucopyranosiderGenerel fremgangsmåde

2,0 g ethyl- α -D-glucopyranosid (9 mmol, fremstillet
 5 ifølge eksempel 25) opløses/suspenderes i smeltet fedtsyre
 (typisk 18 mmol). Der tilsættes immobiliseret lipase (typisk
 0,33 g) som i eksemplerne 12 - 17. ^1H og ^{13}C NMR (se tabel 4
 b). Bestemmelse af smeltepunkter (smp.), optisk drejning
 ($[\alpha]_D$) og kritisk micellekoncentration (CMC) (disse data er
 10 angivet i tabel 3).

De eksperimentelle detaljer fra de forskellige eksem-
 pler er angivet i tabel 2.

TABEL 2

15	Ek- sempel	Fedtsyre		Lipozym	Reak- tionstid	Ud- bytte	
		g	mmol				g
20	18	Caprylsyre	9,3	54	0,67	312	50
	19	Caprinsyre	5,0	27	0,33	192	71
	20	Laurinsyre	3,8	18	0,33	76	71
	21	Myristinsyre	4,4	18	0,33	36	76
	22	Palmitinsyre	4,9	18	0,33	72	74
25	23	Stearinsyre	5,5	18	0,33	52	83

Eksperimentelle detaljer fra fremstillingen af 6-O-estere af
 rene α -D-glucopyranosider.

TABEL 3

Fysiske data af produkterne fra eksemplerne 12 - 23:

5	Ek- sempel	Anomer α el- ler β	Fedtsyre	smp. °C	$[\alpha]_D^{25}$	CMC*
	12	β	Caprylsyre	79-80	-52,4 (c=1.0)	>500
	18	α	Caprylsyre	sirup	70,9 (c=1.1)	>500
10	13	β	Caprinsyre	82-83	-49,7 (c=1.0)	110
	19	α	Caprinsyre	sirup	63,0 (c=1.3)	69
	14	β	Laurinsyre	77-78	-46,7 (c=1.1)	6,9
	20	α	Laurinsyre	sirup	60,7 (c=1.4)	4,7
	15	β	Myristinsyre	82-83	-43,5 (c=1.2)	24
	21	α	Myristinsyre	42-45	54,5 (c=1.3)	2,9
	16	β	Palmitinsyre	90	-42,4 (c=1.0)	4,0
	22	α	Palmitinsyre	46-51	49,9 (c=1.1)	3,9
	17	β	Stearinsyre	93-94	-39,7 (c=1.0)	2,6
20	23	α	Stearinsyre	54-56	48,4 (c=1.1)	**)

*) 10^{-5} mol/l, alle bestemmelser i CHCl_3 .

**) Produktet var for uopløseligt.

Eksempel 24Fremstilling af ethyl- β -D-glucopyranosid

25 Til en suspension af 30 g sølvcarbonat (0,11 mol) sæt-
tes 41,1 g 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromid
(0,1 mol) i små mængder i løbet af 40 minutter. Blandingen
omrøres natten over, fortyndes derefter med 40 ml dichlor-
methan og filtreres gennem celit og aktivt kul. Ved koncen-
30 trering krystalliserer 23,4 g 2,3,4,5-tetra-O-acetyl- β -D-
glucopyranosid (62%).

Ethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-glucopyranosid deacyleres
i løbet af 20 timer ved stuetemperatur med 2 ml 1 M natrium-
methoxid i 80 ml methanol. Blandingen neutraliseres med
35 Amberlite IR-120 (H^+ -form) og koncentrerer i vakuum, hvorved
produktet fås i kvantitativt udbytte i form af et hygros-
kopisk fast stof.

Eksempel 25Fremstilling af ethyl- α -D-gluco-pyranosid

30 g ethyl-D-gluco-pyranosid (fremstillet som beskrevet i eksempel 10) med et anomert forhold $\alpha:\beta = 1:1$ opløses ved
 5 30°C i 400 ml 0,05 M acetatbuffer (pH værdi 4,5). Der tilsættes 50 mg β -glucosidase (fra mandler, Sigma), og blandingen omrøres i en uge. Opløsningen inddampes i vakuum og renses ved kromatografering, hvorved der fås 8,2 g produkt i form af et krystallinsk fast stof (55%).

10 Eksempel 26Fremstilling af isopropyl-6-O-octanoyl- α -D-gluco-pyranosid

Til en omrørt opløsning af 1,1 g isopropyl- α -D-gluco-pyranosid (5 mmol) og 0,9 g carpylsyre (6,25 mmol) i 100 ml 2-butanon sættes 0,5 g immobiliseret lipase (Lipozym^{VM}, se
 15 eksempel 8). Omrøringen fortsættes ved 60°C i 48 timer. Enzy-met fjernes ved filtrering, og opløsningsmidlet fjernes i vakuum efterfulgt af kromatografering, hvorved fås 1,2 g (70% af produktet. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H); 1,19 (d, J = 6,1 Hz, 3H); 1,24 (d, J = 6,2 Hz,
 20 3H); 1,28 (m, 8H); 1,62 (m, 2H); 2,34 (m, 2H); 3,35 (t, J = 9,4 Hz, 1H); 3,50 (dd, J = 4,0 and 9,5 Hz, 1H); 3,73 (t, J = 9,3 Hz, 1H); 3,85 (m, 1H); 3,92 (m, 1H) 4,35 (m, 2H); 4,96 (d, J = 3,9 Hz, 1H).

Eksempel 2725 Fremstilling af n-butyl-6-O-octanoyl- β -D-gluco-pyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles i et udbytte på 25% ifølge den i eksempel 26 beskrevne metode efter 24 timers forløb under anvendelse af 1,0 g (n-butyl)- β -gluco-pyranosid (4,2 mmol) i 50 ml 2-butanon.
 30 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 0,90 (m, 6H); 1,29 (M, 8H); 1,37 (m, 2H); 1,61 (m, 4H); 2,35 (m, 2H); 3,35 (m, 2H); 3,50 (m, 3H); 3,85 (m, 1H); 4,27 (d, J = 8 Hz, 1H); 4,28 (m, 1H); 4,38 (m, 1H).

Eksempel 28Fremstilling af ethyl-6-O-octanoyl- α -D-gluco-
pyranosid

Efter en reaktionstid på 48 timer fremstilles den i
overskriften angivne forbindelse ved fremgangsmåden ifølge
5 eksempel 26 under anvendelse af 0,5 g immobiliseret lipase
fra *Pseudomonas cepacia* (fremstillet som beskrevet i dansk
patentansøgning nr. 3993/87) og 1,04 g ethyl- α -D-gluco-
pyranosid (5 mmol, fremstillet som beskrevet i eksempel 25)
i et udbytte på 70%. ^1H NMR: se tabel 4 b.

10 Eksempel 29Fremstilling af ethyl-6-O-dodecanoyl-D-gluco-
pyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles
ifølge eksempel 1 i løbet af en reaktionstid på 16 timer un-
der anvendelse af 1/10 af de molære mængder og 3,0 g immobi-
15 liseret lipase, der er fremstillet fra en *Humicola lanuginosa*
(fremstillet som beskrevet i PCT-patentansøgning nr. WO
90/00593) som katalysator, hvorved der fås 100 g råt produkt
(indeholdende 83% monoester, 15% diester og 2% D-glyco-
pyranosid).

20 I tabellerne 4 a og 4 b er der angivet ^1H -NMR-data og
 ^{13}C -NMR-data for ethyl-6-O-acylgluco-
pyranosider med formlen I.

TABEL 4 b

		Ethyl-6-O-acyl- α -D-glucopyranosider					
		C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈
5							
	C1	98,3	98,3	98,3	98,0	98,1	98,3
	C2	72,1	72,2	72,2	72,0	71,9	72,1
	C3	74,4	74,5	74,5	74,3	74,1	74,4
10	C4	70,6	70,7	70,6	70,0	70,1	70,6
	C5	69,9	70,0	70,0	69,8	69,7	70,0
	C6	63,7	63,7	63,6	63,1	63,2	63,6
	CH ₃ CH ₂ O-	63,9	63,9	63,9	63,8	63,7	63,9
15	CH ₃ CH ₂ O-	15,0	15,0	15,0	14,9	14,9	15,0
	COO	174,2	174,2	174,2	174,4	174,3	174,2
	H1	4,87	4,87	4,88	4,87	4,87	4,87
20	H2	3,51	3,51	3,51	3,52	3,51	3,51
	H3	3,76	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
	H4	3,35	3,35	3,34	3,34	3,34	3,34
	H5	3,78	3,78	3,77	3,77	3,78	3,77
	H6a	4,32	4,32	4,28	4,31	4,31	4,29
25	H6b	4,37	4,36	4,45	4,31	4,37	4,41
	CH ₃ CH ₂ O- a	3,57	3,57	3,56	3,56	3,56	3,5
	b	3,77	3,77	3,78	3,77	3,77	3,77

30

Kolonnerne i tabellerne 4 a og 4 b giver data for forbindelser, hvori den tilgrundliggende fedtsyre (RCOOH) indeholder 8, 10, 12, 14, 16 og 18 kulstofatomer svarende til søjlerne benævnt henholdsvis C₈, C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ og C₁₈. C₁ - C₆ angiver kulstofatomer i glucosidet, og H1 - H6b angiver hydrogenatomer i glucosidet, for hvilke der i disse tabeller er angivet henholdsvis ¹³C NMR og ¹H NMR.

35

Eksempel 30Fremstilling af ethyl-6-O-octanoyl-D-galactosid

40

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles ved fremgangsmåden ifølge eksempel 12 under anvendelse af 11,5 g ethyl-D-galactosid (56 mmol, fremstillet ifølge eksempel 31), 16 g caprylsyre (11 mmol) og 2 g Lipozym (se eksempel

8). Efter 24 timers forløb udvindes produktet i et udbytte på 80%.

Eksempel 31

Fremstilling af ethyl-D-galactosid

5 Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles ved fremgangsmåden ifølge eksempel 10 under anvendelse af galactose. Produktet (som er en blanding af ethyl-D-galactopyranosid og ethyl-D-galactofuranosid) isoleres i kvantitativt udbytte.

10 Eksempel 32

Fremstilling af 2,3-isopropyliden-glyceryl-6-O-hexadecanoyl- α -D-galactopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles i et udbytte på 70% efter en reaktionstid på 16 timer som beskrevet i eksempel 26.

Eksempel 33

Fremstilling af phenyl-6-O-octanoyl- α -D-glucopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles i et udbytte på 25% efter en reaktionstid på 24 timer som beskrevet i eksempel 27.

Eksempel 34

Fremstilling af propylenglycol-6-O-dodecanoyl-D-glucopyranosid

Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles ved fremgangsmåden ifølge eksempel 1 under anvendelse af 40,0 g propylenglycol-D-glucopyranosid (0,17 mol, fremstillet ifølge eksempel 10) under anvendelse af propylenglycol, 45 g laurinsyre (0,23 mol) og 4 g immobiliseret lipase. Efter en reaktionstid på 48 timer isoleres det rå produkt, som renses

ved kromatografering (udbytte: 16%).

Eksempel 35

Fremstilling af ethyl-6-O-octanoyl- α -D-glucopyranosid ved transesterificering

- 5 Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles ved fremgangsmåden ifølge eksempel 26 under anvendelse af 1,04 g ethyl- α -D-glucopyranosid (5 mmol) og 1,8 g methyloctanoat (11 mmol) som substrater. Efter en reaktionstid på 24 timer isoleres produktet i et udbytte på 10%.

10 Eksempel 36

Fremstilling af (ethyl)-dihexadecanoyl-D-glucopyranosid

- Den i overskriften angivne forbindelse fremstilles ved fremgangsmåden ifølge eksempel 29 under anvendelse af 6 g immobiliseret *Candida antarctica* (se eksempel 1) og fire
 15 gange mængden af laurinsyre (300 g, 1,5 mol). Efter en reaktionstid på 6 døgn viste det rå produkt et indhold af diester på 50% (HPLC-analyse).

Eksempel 37

- Undersøgelserne blev udført i et Terc-O-tometer under
 20 anvendelse af følgende betingelser:

Vasketid:	20 min.	
Temperatur:	25°C	
Vand:	9°dH	
Testmateriale:	EMPA 112 (7 · 7 cm)	
25 Vaskemiddel:	Natriumtriphosphat	1,75 g/l
	Natriummetasilicat	0,40 g/l
	CMC	0,05 g/l
	EDTA	0,01 g/l
	Natriumsulfat	2,00 g/l
30	Tensid	0,60 g/l

Det anvendte tensid var 75% af en ligekædet alkylbenzonsulfonat (LAS, Nansa S80) og 25% af en forbindelse med formel I. De opnåede resultater fremgår af nedenstående tabel 5:

5 TABEL 5

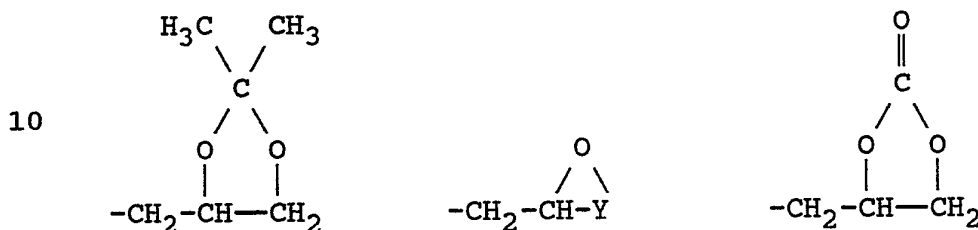
	Testforbindelser	procentvis resterende fedt vægt/vægt
10	Berol 065	2,44
	Berol 160	2,55
	Ethyl-6-O-octanoylglucosid	2,38
	Ethyl-6-O-decanoylglucosid	2,24
15	Ethyl-6-O-dodecanoylglucosid	2,30
	Ethyl-6-O-hexadecanoylglucosid	2,31

Patentkrav

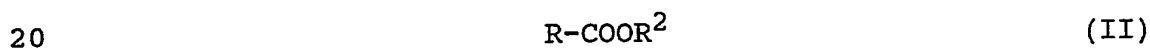
1. Fremgangsmåde til fremstilling af estere af glycosider af monosaccharider med den almene formel I



5 hvor R^1 betegner alkyl med 2 - 6 kulstofatomer, phenyl eller en af grupperne



15 hvor Y betegner methylen eller ethylen, X betegner en monosacchariddel svarende til glucose eller galactose, der på det terminale, anomeriske kulstofatom bærer gruppen $-OR^1$, og som på den primære hydroxygruppe bærer en gruppe $RCOO-$, hvor R betegner alkyl med 4 - 24 kulstofatomer, ved kondensering af en syre eller en ester med den almene formel



hvor R er som angivet ovenfor, og R^2 betegner hydrogen eller lavere alkyl, med et glycosid med den almene formel III



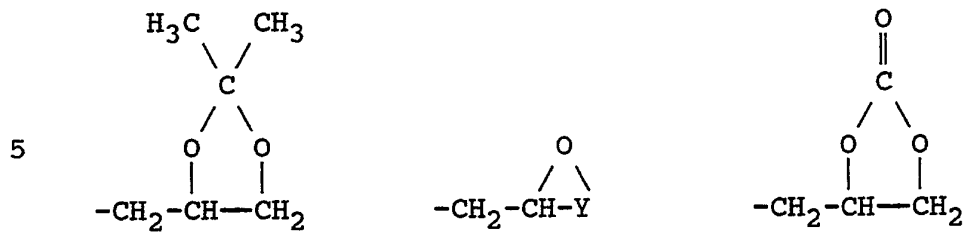
25 hvor X og R^1 hver er som angivet ovenfor, i nærværelse af en katalysator, **kendetegnet ved**, at katalysatoren er en lipase.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, **kendetegnet ved**, at R^1 indeholder 2, 3 eller 4 kulstofatomer og fortrinsvis er ethyl, propyl, isopropyl eller butyl.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, **kendetegnet ved**, at R¹ er ethyl eller isopropyl.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 3, **kendetegnet ved**, at monosaccharidet svarende til delen X er glucose.
- 5 5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 4, **kendetegnet ved**, at gruppen R-COO- indeholder 6 - 22 kulstofatomer, og at gruppen R-COO- fortrinsvis er en rest af capronsyre, ønanthsyre, caprylsyre, perlargonsyre, caprinsyre, laurinsyre, myristinsyre, palmitinsyre, stearinsyre, arachinsyre, behensyre, cis-9-octadecansyre, cis,cis-10 9,12-octadecansyre eller cis,cis,cis-9,12,15-octadecantrien- syre.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 - 5, **kendetegnet ved**, at der fremstilles ethyl-6-0-octanoylglucosid, ethyl-6-0-deca- 15 noylglucosid, ethyl-6-0-dodecanoylglucosid, ethyl-6-0-tetra- decanoylglucosid, ethyl-6-0-hexadecanoylglucosid, ethyl-6-0- octadecanoylglucosid, ethyl-6-0-cis-9-octadecanoylglucosid, isopropyl-6-0-octanoylglucosid, isopropyl-6-0-dodecanoylglu- cosid eller butyl-6-0-octanoylglucosid.
- 20 7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 6, **kendetegnet ved**, at lipasen er en lipase, der kan dannes af arter af Mucor, Humicola, Pseudomonas eller Candi- da.
8. Estere af glycosider af monosaccharider med den almene 25 formel I



hvor R¹ betegner alkyl med 2 - 6 kulstofatomer, phenyl eller en af grupperne



hvor Y betegner methylen eller ethylen, X betegner et mono-
 saccharid svarende til glucose eller galactose, der på det
 10 terminale, anomeriske kulstofatom bærer gruppen $-OR^1$, og som
 på den primære hydroxygruppe bærer en gruppe $RCOO-$, hvor R
 betegner alkyl med 4 - 24 kulstofatomer.

9. Forbindelser ifølge krav 8, **kendetegnet ved**, at R^1
 15 indeholder 2, 3 eller 4 kulstofatomer og fortrinsvis er
 ethyl, propyl, isopropyl eller butyl.

10. Forbindelser ifølge krav 9, **kendetegnet ved**, at R^1 er
 ethyl eller isopropyl.

11. Forbindelser ifølge krav 7 eller 8, **kendetegnet ved**,
 at monosaccharidet svarende til delen X er glucose.

20 12. Forbindelser ifølge et hvilket som helst af kravene
 8 - 11, **kendetegnet ved**, at gruppen $R-COO-$ indeholder 6 - 22
 kulstofatomer, og at gruppen $R-COO-$ fortrinsvis er en rest
 af capronsyre, ønanthsyre, caprylsyre, perlargonsyre,
 caprinsyre, laurinsyre, myristinsyre, palmitinsyre, stearin-
 25 syre, arachinsyre, behensyre, cis-9-octadecansyre, cis,cis-
 9,12-octadecansyre eller cis,cis,cis-9,12,15-octadecantrien-
 syre.

13. Forbindelse ifølge krav 7, **kendetegnet ved**, at den er
 ethyl-6-O-octanoylglucosid, ethyl-6-O-decanoylglucosid,
 30 ethyl-6-O-dodecanoylglucosid, ethyl-6-O-tetradecanoylgluco-

sid, ethyl-6-O-hexadecanoylglucosid, ethyl-6-O-octadecanoylglucosid, ethyl-6-O-cis-9-octadecanoylglucosid, isopropyl-6-O-octanoylglucosid, isopropyl-6-O-dodecanoylglucosid eller butyl-6-O-octanoylglucosid.

5 14. Produkt indeholdende over 80%, fortrinsvis over 90%, mest foretrukket over 95%, af en forbindelse med formel I ifølge krav 8 - 13, fortrinsvis forbindelser ifølge et hvilket som helst af kravene 9 - 13.

15. Rense- eller rengøringsmiddel indeholdende en forbindelse med formel I ifølge krav 8 - 13, fortrinsvis forbindelser ifølge et hvilket som helst af kravene 9 - 13.
10

Skema 1.

