(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 890717 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
**PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG**
**PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC**

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 890717

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12P 17/02
C12P 41/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **15.02.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **15.02.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **18.09.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

17.03.1988 CH 1013/88

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Lonza AG,** Gampel/Wallis, Münchensteinerstrasse 38, 4002 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Günther, Joachim,** Switzerland, SVEITSI, (CH)

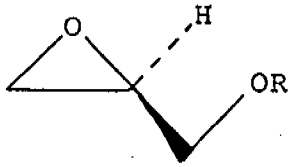
(74) Asiamies - Ombud - Agent

**Kolster Oy Ab,** Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
**Menetelmä (R)-glysidyyliestereiden valmistamiseksi**
**Förfarande för framställning av (R)-glycidylestrar**

# Menetelmä (R)-glysidyyliestereiden valmistamiseksi

Kiraalisten $C_3$-rakenteiden joukossa orgaanisissa synteeseissä on epäsymmetrisillä glyseriinijohdannaisilla tärkeä merkitys. Erityisen monipuolisesti käyttökelpoisia ovat glysidolien johdannaiset, joista (R)-glysidyylibutyraatti (I, R = butyryyli) ja (R)-glysidyylitosylaatti (I, R = p-toluolisulfonyyli) (S)-glysidolin (I, R = H) ja voihapon tai p-toluolisulfonihapon estereitä ovat jo kaupallisesti saatavissa.




(I)

Kirjallisuudessa on kuvattu erityisesti (R)-glysidyylibutyraatin lukuisia käyttötarkoituksia. Nämä koskevat sekä muuttamisia toisiksi kiraalisiksi synteesin rakenneosasiksi, joista mainittakoon (S)-2,3-O-isopropylideeniglyseriinialdehydi [S.K.Kang ja D.S.Shin, Bull. Korean Chem.Soc. 7, 159 (1987)], (S)-1-bromi-2,3-propaanidioli [S.Y.Ko, H.Masamune ja K.B. Sharpless, J.Org.Chem. 52, 667 (1987)], (R)-1,2-propyleeniglykoli [A.Kötz ja K.Richter, J.Prakt.Chem [2] 111, 397 (1925)] ja kiraaliset asyyliglysidyylieetterit [D.E.McClure, B.H.Harrison ja J.J.Baldwin, J.Am.Chem.Soc. 101, 3666 (1979)], että β-salpaajien [D.E.McClure, B.H.Harrison ja J.J.Baldwin, loc.cit.] tai kiraalisten glyseridien (C.A.Lok, J.P.Ward ja D.A.v.Dorp, Chem.Phys.Lipids 16, 115 (1976) valmistusta.

Kaikkiin näihin käyttötarkoituksiin (R)-glysidyylibutyraatti on luonnollisesti sitä arvokkaampi, mitä korkeampi on sen optinen puhtaus ilmaistu lyhenteenä ee, "enantiomeric excess"), koska optisen puhtauden ollessa riittävä voidaan lupua ei-toivottujen enantiomeetrien erillisestä eristämisestä tuotteista.

Tarkoituksenmukaisesti arvot ovat suurempia kuin 95 % ee, siis ei-toivotun enantiomeerin osuus on pienempi kuin 2,5 %. Nykyisin kaupallisesti saatavilla (R)-glysidyylibutyraatin preparaateilla arvot ovat sitä vastoin enimmäkseen ainoastaan alueella n. 85-90 % ee.

Alempien karboksyylihappojen (RS)-glysidyyliesterit ovat valmistettavissa edullisesti tunnettujen menetelmien mukaisesti (RS)-glysidolista ja asyylikloridista tai (RS)-epikloorihydriinistä ja alkalikarboksylaateista, siis halvoista lähtöaineista.

Menetelmissä alempien karboksyylihappojen optisesti puhtaiden glysidyyliestereiden valmistamiseksi lähdetään sen tähden tarkoituksenmukaisesti vastaavista (RS)-glysidyyliestereistä ja suoritetaan näille enantiomeerien erottaminen. Klassiset enantiomeerien erotusmenetelmät vaativat kuitenkin tavallisesti kalliita kiraalisia apuaineita stökiömetrisin määrin sekä useimpia menetelmävaiheita.

Uudempi menetelmä (R)-glysidyyliestereiden [W.E. Ladner ja G.M.Whitesides, J.Am.Chem.Soc. 108, 7250 (1984)] valmistamiseksi käyttää sitä vastoin enantioselektiivistä entsymaattista (RS)-glysidyyliesterien hydrolyysiä sian haimalipaasilla, jolloin ensi sijassa (S)-enantiomeeri hydrolysoituu (R)-glysidoliksi ja karboksylaatiksi, kun taas (R)-enantiomeeri rikastuu jäännökseen ja lopuksi eristetään tästä. Ideaalisissa olosuhteissa pitäisi näin täysin raseemisesta seoksesta, kun tarkalleen 50 %, eli juuri (S)-enantiomeerin osuus, on hydrolysoitunut, saada koko (R)-enantiomeerin osuus optiselta puhtaudeltaan on 100-%:isena ee. Tähän mennessä käytännössä saadut tulokset eroavat kuitenkin huomattavasti näistä arvoista. On osoittautunut, että hydrolysoitumattoman glysidyyliesterin optisen puhtauden maksimi saavutetaan vasta hydrolysoitumisasteen ollessa yli 50 % tai että optinen puhtaus nousee vähitellen jatkuvasti hydrolyysin jatkuessa. 60 %:n hydrolysoitumisella saadut arvot ovat korkeintaan 90 % ee. Tämä puh-

tausaste ei toisaalta ole riittävä moniin käyttötarkoituksiin, toisaalta teknisessä menetelmässä ei ole tyydyttävää, että vähäisesti paremman tuotteen puhtauden vuoksi on tyydyttävä oleellisesti huonompaan saantoon, mikä olisi seurauksena, jos hydrolyysiastetta korotettaisiin.

Keksinnön tarkoituksena on sen tähden alempien karboksyylihappojen (R)-glysidyyliesterien, varsinkin (R)-glysidyylibutyraatin, joilla on korkea optinen puhtaus, edullinen valmistaminen.

Nyt on havaittu, että alempien karboksyylihappojen (RS)-glysidyyliestereissä olevien (S)-enantiomeerien entsymaattisessa hydrolyysissä jäljelle jäävä (R)-enantiomeerin optista puhtautta voidaan oleellisesti parantaa käyttämällä hydrolyysissä mukana rasvahappoja tai niiden vesiliukoisia suoloja pitoisuuksina 0,01 - 2,0 mol/l.

Keksinnön mukaisen menetelmän mukaan valmistettavissa olevia (R)-glysidyyliestereitä ovat 2-6 hiiliatomia sisältävien n-karboksyylihappojen, siis etikkahapon, propionihapon, voihapon, valeriaanihapon ja kapronihapon, edullisesti voihapon, glysidyyliesterit. Entsyyminä käytetään sian haimalipaasia, mucor-lipaasia (mucor miehei'sta) tai amano-P-lipaasia (Amano Pharmaceutical Co. Ltd. Nagoya 460 Japan) (pseudomonasta sp.), edullisesti kuitenkin raakaa sian haimalipaasia.

Lisättyinä rasvahappoina käytetään tarkoituksenmukaisesti tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä monikarboksyylihappoja, jotka sisältävät 4 - 24 hiiliatomia, kuten esim. voihappoa, kapronihappoa, heptaanihappoa, kapryylihappoa, pelargoonihappoa, kapriinihappoa, lauriinihappoa, palmitiinihappoa, steariinihappoa, öljyhappoa, linolihappoa, arakiinihappoa, beheenihappoa, tai näiden vesiliukoisia suoloja, kuten natrium- tai kaliumsuoloja, yksittäin tai seoksena, edullisesti kuitenkin raakaa öljyhappoa.

Hydrolyysi suoritetaan edullisesti sekoittamalla ja ilman lisäliuotinta kaksifaasisysteemissä, joka koostuu

glysidyyliesterifaasista ja vesifaasista, joka sisältää entsyymin, hydrolyysituotteet (R)-glysidolin ja karboksyylihapposuolan sekä lisätyn rasvahapon tai sen vesiliukoisen suolan.

Keksinnön mukaisesti lisättyjen rasvahappojen tai niiden vesiliukoisten suolojen annetut konsentraatiot viittaavat tässä tapauksessa koko reaktiosysteemiin, jossa todelliset konsentraatiot molemmissa faaseissa määräytyvät annetussa pH:ssa kulloisenkin jakautumiskertoimen perusteella.

Lämpötila hydrolyysissä on tarkoituksenmukaisesti 0 - 30°C, edullisesti 0 - 10°C; se pidetään tarkoituksenmukaisesti vakiona termostaatin avulla.

Vesifaasin pH-arvo hydrolyysin aikana on alueella pH 5 - 8, edullisesti 5,8 - 6,5; pH pidetään edullisesti vakiona sopivan laitteen avulla ("pH-staatti"), tarkoituksenmukaisesti lisäämällä jatkuvasti emästä, edullisesti natriumhydroksidin vesiliuosta, jolloin lisätyn emäsmäärän riippuvuus reaktion kestosta merkitään muistiin edullisesti piirturin avulla.

Tarkoituksenmukaisesti hydrolyysi suoritetaan 50-70 %:n hydrolysoitumisasteeseen saakka, mikä tarkoittaa, että 50-70 % koko glysidyyliesterimäärästä on hydrolysoitunut, minkä jälkeen hydrolyysi keskeytetään, esimerkiksi ottamalla hydrolysoitumaton osa, siis (R)-glysidyyliesteri, sopivaan liuottimeen, kuten esimerkiksi dikloorimetaaniin, ja erottamalla tämä vesifaasista. Edullisesti seuraa hydrolyysin keskeytys sen jälkeen, kun hydrolysoitumisaste on 55 - 65 %.

Esimerkkejä

Lisättyjen rasvahappojen tehokkuuden arvioimiseksi määritettiin entsymaattisen hydrolyysin enantioselektiivisyydet kulloinkin ilman rasvahappoa ja rasvahapon kanssa olosuhteiden pysyessä muuten samoina. Lisäksi määritettiin kulloinkin (RS)-glysidyylibutyraatin ja puhtaan (R)-glysi-

dyylibutyraatin hydrolyysin reaktionopeudet samanlaisissa olosuhteissa reaktion alkuun saakka ja näistä muodostettiin osamäärä Q seuraavan yhtälön mukaan:

$$Q = \frac{A - B}{B}$$

jossa A = reaktionopeus (RS)-glysidyylibutyraatin tapauksessa ja B = reaktionopeus (R)-glysidyylibutyraatin tapauksessa. Tämä osamäärä on suora hydrolyysin enantioselektivisyyden mitta; sen arvo on nolla ei-enantioselektiiviselle reaktiolle ja tulee äärettömäksi täysin enantioselektiiviselle reaktiolle. Arvo on helposti määritettävissä, sillä reaktionopeudet valitussa koejärjestelyssä voidaan lukea välittömästi pH-staatin titrauskäyrän noususta ja vain yhden enantiomeerin täytyy olla käytettävissä puhtaassa muodossa. Tuotteiden optisen puhtauden määritys on sitä vastoin hankalampaa, koska se voidaan yleensä tehdä vasta jälkikäsittelyn jälkeen ja määritys (polarimetrisesti) on lisäksi liian epätarkka tässä kiinnostavalla alueella, joka on suurempi kuin 90 % ee.

Esimerkki 1

1000 ml:n reaktioastiassa, jossa on jäähdytysvaippa, jäähdytettiin 100 g (RS)-glysidyylibutyraattia, 400 ml suolatonta vettä ja 6,25 g öljyhappoa (tekninen, 70 % -0,5 °C:n lämpötilaan samalla sekoittaen ja säädettiin pH-arvoon 6,0 2 N natriumhydroksidin vesiliuoksella. Sitten lisättiin 0,5 g sian haimalipaasia (3-4 U/mg, Fluka) ja pH pidettiin alueella 5,9-6,0 2 N NaOH:lla pH-staatin avulla.

Kun seosta oli sekoitettu n. 24 tuntia -0,5 °C:n lämpötilassa, jolloin hydrolysoitumisaste oli 57 %, reaktio keskeytettiin säätämällä pH arvoon 7 ja ravistamalla reaktioseosta 400 ml:ssa dikloorimetaania.

Orgaaninen faasi erotettiin sentrifugoimalla, minkä jälkeen vesifaasia ravisteltiin vielä kaksi kertaa dikloo-

rimetaanin (kulloinkin 100 ml) kanssa. Puhdistetut orgaaniset faasit pestiin 50 ml:lla 10-%:ista natriumvetykarbonaatin vesiliuosta ja kaksi kertaa vedellä (kulloinkin 50 ml) ja kuivattiin sen jälkeen 2 g:lla magnesiumsulfaattia 0,2 g:lla natriumkarbonaattia. Dikloorimetaani tislattiin pois 300 mbar:ssa, minkä jälkeen raakatuote (n. 60 g) jakotislattiin 6 - 7 mbar:ssa vigreux-kolonnissa (l=15 cM). 2,2 g esitisleen jälkeen tislautui pääfraktio 65 °C:n lämpötilassa.

Saanto: 33,6 g (67,2 %, laskettuna enantiomeerista) (R)-(-)-glysidyylibutyraattia

Puhtaus: 99,64 % (GC), ee 95,5 % (HPLC (S)-(-)-1-fenyylietyyliamiinilla tehdyn johdannaisen jälkeen)

$[\alpha]_D^{25} = -31,9°$

Esimerkit 2 - 18

Seuraavat esimerkit suoritettiin käyttäen kulloinkin 10 ml vesifaasia ja 0,576 g (4 mmol) (R)-glysidyylibutyraattia tai 1,15 g (4 mmol (R) + 4 mmol (S)) (RS)-glysidyylibutyraattia ja 50 mg sian haimalipaasia. Annetut osamäärät Q määritettiin yllä mainitulla tavalla.

| Esimerkki | rasvahappolisäys | Lämpötila °C alempi kuin | pH | Q |
|---|---|---|---|---|
| 2 | --- | 4 | 6,0 | 4,3 |
| 3 | Na-kaprylaatti 0,25 M | 4 | 6,5 | 11,1 |
| 4 | Na-hepanaatti 0,05 M | 4 | 6,0 | 10,2 |
| 5 | Na-kapronaatti 0,4 M | 4 | 6,0 | 11,1 |
| 6 | kapriinihappo 4 mg/10 ml | 4 | 5,8 | 17,0 |
| 7 | lauriinihappo 50 mg/10 ml | 4 | 6,3 | 11,8 |
| 8 | öljyhappo 200 µl/10 ml | 4 | 6,3 | 17,0 |
| 9 | pelargoonihappo 50 µl/10 ml | 4 | 6,3 | 11,8 |

| Esimerkki | Na-butyraatti | Q |
|---|---|---|
| 10 | 0,2 M | 6,6 |
| 11 | 0,3 M | 6,7 |
| 12 | 0,4 M | 10,8 |
| 13 | 0,6 M | 11,5 |
| 14 | 0,8 M | 10,9 |
| 15 | 1,0 M | 13,9 |
| 16 | 1,2 M | 22,8 |
| 17 | 1,4 M | 20,4 |
| 18 | 1,6 M | 17,0 |

Esimerkit 19 ja 20

Seuraavat esimerkit suoritettiin kuten esimerkeissä 2 - 18 on kuvattu, kuitenkin niin, että entsyymimäärä oli kulloinkin 10 mg.

| Esimerkki | Entsyymi | Q ilman lisäystä | Q 0,04 M natrium-kapronaatilla |
|---|---|---|---|
| 19 | mucor-lipaasi | 3,2 | 7,6 |
| 20 | amano-P-lipaasi | 2,7 | 6,6 |

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä (R)-glysidyyliestereiden valmistamiseksi 2-6 hiiliatomia sisältävistä n-karboksyylihapoista, t u n n e t t u siitä, että vastaavista raseemisista glysidyyliestereistä hydrolysoidaan enantioselektiivisesti (S)-enantiomeerit lipaasilla, joka on joko sian haimalipaasi, mucor-lipaasi tai amino-P-lipaasi, siten että mukana on 0,01 - 2,0 mol/l 4-24 hiiliatomia sisältäviä rasvahappoja ja/tai niiden vesiliukoisia suoloja.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hydrolyysi suoritetaan kaksifaasisysteemissä, joka koostuu glysidyyliesteristä ja entsyymin vesiliuoksesta, ilman muuta liuotinta.

3. Patenttivaatimusten 1 ja 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hydrolyysi suoritetaan vesifaasin pH-arvon ollessa 5 - 8.

4. Patenttivaatimusten 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hydrolyysi suoritetaan 50 - 70 %:n hydrolysoitumisasteeseen asti.

5. Patenttivaatimusten 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hydrolyysi suoritetaan 0 - 20 °C:n lämpötilassa.

6. Patenttivaatimusten 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lipaasina käytetään sian haimalipaasia.

7. Patenttivaatimusten 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että glysidyyliesterinä käytetään glysidyylibutyraattia.

8. Patenttivaatimusten 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rasvahappona käytetään öljyhappoa.