



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

209871
(11) (32)

[51] Int. Cl.³
C 07 C 101/00

[22] Přihlášeno 11 05 76
[21] (PV 3165-76)
[32] [31] [33] Právo přednosti od 12 05 75
(23202 A/75) Itálie

[40] Zveřejněno 31 03 81

[45] Vydáno 15 06 84

[72]
Autor vynálezu

CECERE FRANCESCO, GALLI GIULIANO, DELLA PENNA GINO,
MONTEROTONDO a RAPPUOLI BRUNO, ŘÍM (Itálie)

[73]
Majitel patentu

SNAMPROGETTI S.p.A., MILÁN (Itálie)

(54) Způsob přípravy D-ureidokyselin a odpovídajících D-aminokyselin

1

Vynález se týká způsobu přípravy D-ureidokyselin a odpovídajících D-aminokyselin enzymatickou hydrolýzou substituovaných hydantoinů.

Některé aminokyseliny, mající D-konfiguraci (např. fenylglycin, p-hydroxyfenylglycin), nabyly v poslední době značného významu jako meziprodukty pro přípravu sloučenin používaných v širokém měřítku v průmyslu.

Až dosud používané chemické postupy pro oddělení optických antipodů nebo enantiomerů využívaly kyseliny sulfkafrové.

Kyselina sulfokafrová je látka nanejvýše nákladná, dá se získat jen v nízkém výtěžku a není snadno dostupná, takže výlohy spojené s chemickým postupem jsou velmi vysoké.

Jiný postup spočívá v tom, že se nejprve acyluje racemická aminokyselina, pak ve druhém stupni se selektivně hydrolyzuje acylázovým enzymem D-forma a konečně se izoluje. D-acylázy jsou však poměrně vzácné a vždy znečištěné L-acylázou, takže během hydrolyzačního procesu acylovaného derivátu vznikají nikoli zanedbatelná množství L-antipodu nebo L-enantiomeru, což vede k obdržení produktu majícího malou optickou čistotu.

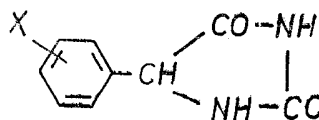
Z popisu k československému patentu č.

2

AO 222 177 je znám postup přípravy L-ureido-aminokyselin a odpovídajících aminokyselin enzymatickou cestou vycházející ze substituovaných hydantoinů, kdy tyto se podrobí enzymatické hydrolýze v rozmezí pH zahrnujícím oblast od 6 do 11. Reakce je vyvinuta směrem k tvorbě finálních levorotačních sloučenin s možností recyklace nehydrolyzované formy.

Nyní bylo zjištěno, že je-li příslušný hydantoin substituován zbytky, které obsahují alespoň jednu aromatickou skupinu vázanou na asymetrický atom uhlíku a reakce se provádí v užším rozmezí pH, probíhá reakce selektivně i kvantitativně do vzniku samotné D-formy.

Podstata způsobu přípravy D-ureidokyselin a odpovídajících D-aminokyselin podle vynálezu spočívá v tom, že se sloučeniny obecného vzorce



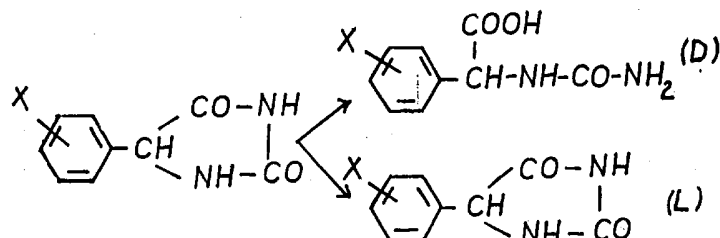
kde

X představuje atom vodíku, skupinu OH nebo OCH₃, podrobí enzymatické hydrolýze s použitím hydropyrimidinové hydrolázy z jater telat, načež se získané ureidokyseliny popřípadě hydrolyzují varem.

Působením hydropyrimidinové hydrolázy

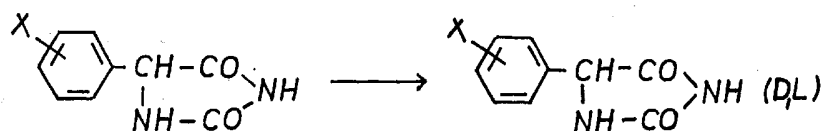
(EC 3522) z jater telat na racemickou formu 5-substituovaných hydantoinů uvedeného obecného vzorce dochází k přísně selektivní hydrolýze D-formy. Hydrolýza se výhodně provádí při pH 8,5, teplota může být udržována mezi 10 a 70 °C, výhodně na 30 stupních Celsia.

Hydrolýza probíhá podle schématu



Poněvadž D-ureido-derivát, který se při hydrolýze tvoří, má kyselou povahu, je nutno udržovat pH na počáteční hodnotě přidávkou alkálií, jak postupuje reakce. Bylo

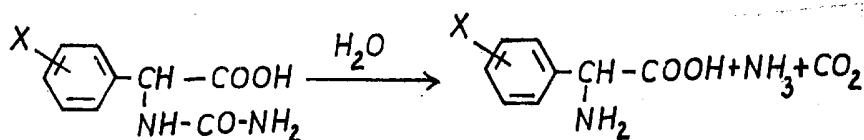
zjištěno, že při výše uvedených hodnotách pH postupuje hydrolýza a zároveň dochází k současné racemizaci zbylého L-hydantoinu podle schématu



Z tohoto důvodu je výsledkem nepřetržitého odstraňování D-hydantoinu vznikající enzymatickou reakcí to, že konečný výtěžek reakce je pouze ureido-derivát v optické D-formě. Rychlost racemizace L-hydantoinu je funkcí jak teploty, tak i pH, a je tím vyšší, čím je vyšší teplota a čím je pH

zásaditější. Avšak při práci při pH v blízkosti 8,5 je rychlost tak vysoká, že nepředstavuje stupeň určující rychlost reakce.

Bylo také nalezeno, že D-ureido-derivát se při rozpuštění ve vodě a zahřátí k varu za určitých podmínek rozkládá podle rovnice



takže dává vznik opticky aktivní kyselině, která může být izolována ve formě o velmi vysoké chemické a optické čistotě. Mimo to se může dosáhnout dalšího technického a ekonomického zlepšení tohoto vynálezu tím, že se enzym okluduje do vláknitých struktur, jak je vyloženo v italském patentu č. 836 462. Tímto způsobem lze enzym použít opakovaně namísto jedenkrát, čímž se snižují pracovní náklady. Kromě toho reakce probíhá čistším způsobem, poněvadž enzymové bílkoviny nezůstávají v reakční směsi.

Účelem dále uvedených příkladů je lepší osvětlení vynálezu, v žádném případě však neznamenají jeho omezení.

Příklad 1

176 g (1 mol) D,L-5-fenylhydantoinu se rozmíchá v 7,5 litrech 0,1 M roztoku kaliumfosfátového pufru při pH 8,5 při 30 °C.

K míchané suspenzi se přidá 125 ml roztoku hydropyrimidinové hydrolázy z jater (celková aktivita 1875 mikromol za minutu při 30 °C, pH 8,5; celkem bílkovin 2,75 g).

Přibližně po 6 hodinách, když se za účelem udržení soustavy při konstantním pH přidalo 250 ml 4 M NaOH, reakce se přerušila a reakční směs se ochladila na 4 °C a pH se upravilo přidávkou 6 N HCl na 5,5.

Během této operace se získala slizovitá

sraženina denaturovaných bílkovin, která se odstředila.

Supernatant znovu ochlazený na 4 °C se upravil přidávkou 6 N HCl na pH 2,5. Během této operace se vysráží krystalický produkt, který se promyje přibližně jedním litrem studené vody a suší do konstantní hmot. Produkt se krystaluje z horké směsi ethanolu a vody v poměru 70/30 obj.

Krystaly (189 gramů, výtěžek 97 %) jsou chromatograficky stejnorodé a na základě IČ a NMR a hmotových spekter a elementární analýzy jde o N-karbamoyl-fenylglycin.

Specifická optická rotační hodnota $(\alpha)_D^{25} = 137^\circ$ ($C = 1\%$ v 1 N NH_4OH) odpovídající zjištěné podle údajů literatury: T. Suzuki, K. Igarashi, K. Hase, Agr. Biol. Chem. **37** (2) 411–416 (1973) pro D (–). N-karbamoyl-fenylglycin.

Příklad 2

Do reaktoru opatřeného termostatickým pláštěm, uváděním dusíku, elektrodou pro odečítání pH a otvorem pro přidávání sody se umístí 10 litrů 0,1 M fosforečnanového ústojného roztoku, který obsahoval hydropyrimidinovou hydrolázu z jater (Celková aktivita: 7500 mikromol za minutu; celkem bílkovin: 11 gramů). Po probublávání dusíkem přibližně během 30 minut se roztok udržovaný na 30 °C doplnil 192 gramy (1 mol) D,L-5-p-hydroxyfenylhydantoinu, zatímco se udržovalo konstantní pH nepřetržitým přidáváním 4 M NaOH. Po 20 hodinách, když spotřeba sody činila 250 ml, provedla se izolace D-(–)-N-karbamoyl-p-hydroxyfenylglycinu podobným způsobem, jaký byl popsán v příkladě 1.

Získaný surový produkt byl krystalován z ethanolu/norhexanu. Tímto způsobem se získalo 152 gramů (72% výtěžek) produktu majícího následující vlastnosti:

Teplota tání: 170 °C; $(\alpha)_D^{20} = -170^\circ$ ($C = 0,5\%$ ve vodě/alkoholu 50/50 obj.).

Struktura produktu byla potvrzena výsledky elementární analýzy, IČ, NMR a hmotovým spektrem ve srovnání s údaji v literatuře J. Eagles, W. M. Laird, E. C. Matais, Biochemical Journal **121**, 425–430 (1971) Sup. Publ. No. SUP 50003, Annex 1, Annex 2.

Příklad 3

206 gramů (1 mol) D,L-5-p-methoxyfenylhydantoinu se rozmíchalo v 10 litrech 0,1 M kaliumfosfátového ústojného roztoku při pH 8,5 obsahujícího hydropyrimidinovou hydrolázu z jater (Celkové aktivity 7500 mikromolů za minutu; celkem bílkovin 11 gramů) při 30 °C.

Hodnota pH se udržovala konstantní nepřetržitým přidáváním 4 M NaOH.

Po 20 hodinách, když se spotřebovalo 250

ml sody, reakce byla ukončena a D-(–)-N-karbamoyl-p-methoxyfenylglycin se izoloval způsobem vyloženým v příkladu 1 ve výtěžku 90 %. Struktura produktu se ověřila elementární analýzou a IČ, NMR a hmotovým spektrem.

Příklad 4

230 ml roztoku hydropyrimidinové hydrolázy z jater, o aktivitě 10800 mikromolů za minutu a mající 3,45 gramů bílkovin, se přidalo k 2,1 kg roztoku 150 gramů triacetylcelulózy v methylenchloridu za udržování intenzivního míchání. Takto získaná emulze byla zvlákněna podle postupu popsaného v italském patentu č. 836 462.

Takto získané vlákno (300 g) se vložilo ve formě jediného přadene do skleněného sloupce (průměru 8 centimetrů a výšky 60 centimetrů) zachycením na obou koncích dvěma třmínky z nerezavějící ocele. Vlákno se promývalo recyklováním 4 litry 0,1 M kaliumfosfátového ústojného roztoku o pH 8,5 tak dlouho, až se neprokazovala enzymatická aktivita v roztoku (4 promytí, celkem 6 hodin).

Sloupec, do kterého bylo vloženo vlákno, se pak zapojil do okruhu s čerpadlem pro recyklování reakční směsi, přičemž kádinka s pláštěm měla elektrodu pro nepřetržitě měření pH a otvor pro přidávání 4 M NaOH řízené pH-statem. Do aparatury se přidalo 5 litrů 0,02 M kaliumfosfátového ústojného roztoku o pH 8,5 a 176 gramů (1 mol) D,L-fenylhydantoinu a přitom se spustilo čerpadlo k obíhání reakční směsi a pH-stat řídil nepřetržitě přidávání sody. Po 6 hodinách při spotřebě 4 M NaOH 250 ml byla reakce přerušena. Reakční směs byla vyjmuta. Vlákno se promývalo 4 litry vody. Reakční směs a promývací vody z vlákna se zahustily ve vakuu přibližně až na 3 litry, ochladily na 2 °C a zpracovaly 6 N HCl na pH 2,5. Po třicetiminutovém zrání se sraženina odfiltrovala a vysušila do konstantní hmotnosti.

Takto získaného produktu bylo 180 gramů (93% výtěžek) a bylo zjištěno, že jde o D-(–)-N-karbamoyl-fenylglycin (t. t. 200 °C; $(\alpha)_D^{20} = -135^\circ$ ($C = 1\%$ v 1 N NH_4OH)).

Příklad 5

K získání D-(–)-N-karbamoyl-p-hydroxyfenylglycinu z D,L-5-para-hydroxyfenylhydantoinu se použilo téže aparatury jako v příkladu 4 s tím rozdílem, že kádinka s pláštěm byla uzavřena a byla opatřena navíc přívodem dusíku. Ze 192 gramů (1 mol) D,L-p-hydroxyfenylhydantoinu se získalo po 60 hodinové reakci postupem popsaným v předchozích příkladech 160 gramů (76% výtěžek) D-(–)-N-karbamoyl-p-hydroxyfenylglycinu [t. t. 200 °C; $(\alpha)_D^{20} = -175^\circ$ ($C = 0,5\%$ v alkohol-vodě 50/50 obj.)].

Příklad 6

Za použití aparatury popsané v příkladě 4 se z 206 gramů (1 mol) D,L-5-p-methoxy-fenylhydantoinu získalo 200 gramů (89% výtěžek) D-(-)-N-karbamoyl-p-methoxyfenylglycinu.

Příklad 7

194 gramů (1 mol) D-(-)-N-karbamoylphenylglycinu získaného postupem popsaným v příkladě 4 se rozmíchalo v 5 litrech vody. Suspenze se upravila přidavkem nasyceného roztoku Na_2CO_3 na pH 4.

Suspenze se zahřívala k varu během 8 hodin, přičemž se upravovala hodnota pH, která stoupala příležitostně z 5 na 4 přidavkem Amberlitu I. R. 120 (H^+). Celkem se přidalo 400 ml pryskyřice.

Z horkého roztoku se oddělila pryskyřice, odpařilo se za sníženého tlaku na objem 1 litru, pak se zchladilo a přidávala se 6 N HCl na pH 2. Získané krystaly byly odfiltrány, promyty vodou a sušeny za sníženého tlaku do konstantní hmotnosti.

Tímto způsobem se získalo 88 gramů (0,045 mol) D-(-)-N-karbamoylphenylglycinu. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -136,9^\circ$. Z matečných louhů to-

hoto produktu po upravení pH na hodnotu 6 a po odpaření za sníženého tlaku se získalo 70 gramů (0,46 mol) D-(-)-fenylglycinu o $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -154^\circ$ ($C = 1\%$ v 1 N HCl).

Struktura látky byla potvrzena elementární analýzou, IČ, NMR a hmotovým spektrem.

Příklad 8

Podobným způsobem, jak bylo vyloženo v příkladu 7, avšak provedením reakce v dusíkové atmosféře se získalo z 210 gramů (1 mol) D-(-)-N-karbamoyl-p-hydroxy-fenylglycinu po 9 hodinovém varu 67% (40% výtěžek) D-(-)-p-hydroxyfenylglycinu o $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -154^\circ$ ($C = 0,5\%$ v 1 N HCl).

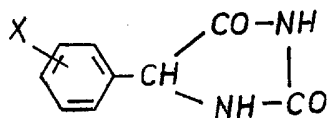
Nezhydrolyzovaného D-(-)-N-karbamoyl-p-hydroxyfenylglycinu bylo 100 gramů (47% výtěžek) o $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -175^\circ$ ($C = 0,5\%$ v ethanol-vodě 50/50 obj.).

Příklad 9

Jak bylo popsáno v příkladu 7, z 224 gramů (1 mol) D-(-)-N-karbamoyl-p-methoxy-fenylglycinu připraveného podle postupu vyloženého v příkladě 8 se obdrželo 80 gramů (44% výtěžek) D-(-)-p-methoxyfenylglycinu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy D-ureidokyselin a odpovídajících D-aminokyselin, vyznačující se tím, že se sloučeniny obecného vzorce



kde X představuje atom vodíku, skupinu OH nebo OCH_3 , podrobí enzymatické hydrolýze při pH 8 až 9 s použitím hydroxypyrimidinové hydrolázy z jater telat, načež se získané ureidokyseliny popřípadě hydrolyzují varem.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že enzymatická hydrolýza se provádí při teplotě 10 až 70°C .