



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

251361

(11) (B1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 07 C 103/48  
C 07 C 103/84

(22) Přihlášeno 02 04 85  
(21) PV 2418-85

(40) Zveřejněno 13 11 86

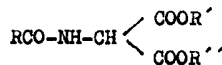
(45) Vydáno 15 03 88

(75)  
Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV ing. CSc., GAJEWSKI KAREL RNDr.,  
JARÝ JIŘÍ prof. ing. DrSc., PRAHA

## (54) Způsob přípravy monoalkylesterů kyseliny acylaminomalonové

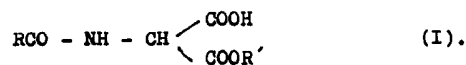
Způsob přípravy monoalkylesterů kyseliny acylaminomalonové hydrolyzou dialkylesterů kyseliny acylaminomalonové obecného vzorce



kde R' a R'' je alkyl s počtem uhlíků C<sub>1</sub> až C<sub>3</sub> a kde R je H, alkyl s počtem uhlíků C<sub>1</sub> až C<sub>11</sub>, fenyl nebo 2-chlorfenyl, 4-chlorfenyl, benzyl, katalyzovanou pomocí esteráz nebo proteináz, který spočívá v tom, že pH reakční směsi se udržuje na optimální hodnotě 7,5 až 8,3 přidávkou uhlíkatu amonného nebo hydrogenuhličitanu alkalického kovu a produkt hydrolysy, monoalkylester kyseliny acylaminomalonové se izoluje po ochlazení na 0 až 5 °C a okyselení minerální kyselinou na pH 1,5 až 3,0 vykrystalováním z reakční směsi. Monoalkylestery kyselin jsou důležitým meziproduktem při výrobě opticky aktivních aminokyselin, například tryptofanu.

Vynález se týká způsobu přípravy monoesterů kyseliny acylaminomalonové enzymovou hydrolýzou kyseliny acylaminomalonové pomocí esteráz nebo proteináz, s výhodou pomocí chymotrypsinu.

Monoestery kyseliny acylaminomalonové obecného vzorce I,



kde R je H, alkyl s počtem uhlíků  $C_1$  až  $C_{11}$ , fenyl, 2-chlorfenyl a 4-chlorfenyl nebo benzyl a kde R' je alkyl s počtem uhlíků  $C_1$  až  $C_3$ , představují mimo jiné /zvláště v případě monoethylsteru kyseliny acetamidomalonové,  $R = \text{CH}_3$  a  $R' = \text{C}_2\text{H}_5$  / důležitý meziprodukt přípravy opticky aktivního tryptofanu.

Dosud známé metody přípravy monoesterů kyseliny acylaminomalonové jsou založeny na parciální hydrolýze příslušných diesterů ve vodném ethanolu /N.F. Albertson: J. Am. Chem. Soc. 70, 1150 /1948/, L. Berlinquet: Can. J. Chem. 32, 31, /1954//, v absolutním ethanolu /H. Hellmann, K. Teichmann, F. Ligens: Chem. Ber. 91, 2427 /1958// a hydrolýze katalyzované sloučeninami typu crownetheru /18-crown-6 v dioxanu D. H. Hunter, R. A. Perry: Synthesis 1977, 37, Synthesis 1981, D. H. Hunter, V. Patel, R. A. Perry: Can. J. Chem. 58, 2271 /1980//.

Zmíněné metody jsou pro průmyslové využití nepřilíš vhodné. Nevhodnost spočívá v nedostačující konverzi hydrolýzy, nízkém výtěžku a nečistém produktu. Při hydrolýze katalyzované 18-crown-6 je sice konverze 100 %, reakce však vyžaduje použití ekvimolárního množství katalyzátoru, který je velmi drahý a jehož regenerace je obtížná.

Výrazně zefektivnění hydrolýzy diesterů kyseliny acylaminomalonové na příslušné monoestery představuje použití enzymů jako specifických katalyzátorů.

U diethylsteru kyseliny acetamidomalonové je popsána /S. G. Cohen, J. Crossley: J. Am. Chem. Soc. 86, 4999 /1964// hydrolýza katalyzovaná  $\alpha$ -chymotrypsinem, která probíhá stereospecificky do prvního stupně za tvorby monoethylsteru kyseliny acetamidomalonové. Tento monoethylster již není dále hydrolýzován, konverze je tedy ve smyslu tvorby monoesteru 100 %.

Doposud používaný způsob izolace enzymovou reakcí vzniklého monoethylsteru kyseliny acetamidomalonové je však příliš složitý a zdlouhavý při nízkém výtěžku reakce. Tento způsob izolace spočívá v okyselení reakční směsi a extrakci monoesteru do organického rozpouštědla. Po vysušení a zfiltrování extraktu jsou rozpouštědla odpařena a monoethylster kyseliny acetamidomalonové je přečištěn krystalizací. Uvedený způsob izolace však není příliš vhodný pro průmyslovou výrobu.

Dosevadní způsoby a jejich nevýhody překonává způsob přípravy monoesterů kyseliny acylaminomalonové obecného vzorce I, kde R a R' mají výše uvedený význam, enzymovou hydrolýzou diesterů acylaminomalonové kyseliny pomocí esteráz nebo proteináz, který spočívá v tom, že hydrolýza se provádí při pH v rozmezí 7,5 až 8,3, které se udržuje přidávkou uhličitanu amonného nebo hydrogenuhličitanu sodného či dreselného, načež se produkt hydrolýzy, monoester kyseliny acylaminomalonové izoluje po ochlazení a okyselení minerální kyselinou na pH 1,5 až 3,0 vykrystalováním z reakční směsi.

Vznikající monoester kyseliny acylaminomalonové lze oddělit ultrafiltrací z reakční směsi a chymotrypsinu je možno využít v dalších opakovaných hydrolýzách. Pro vícenásobné použití chymotrypsinu se alternativně může aplikovat chymotrypsin imobilizovaný některou z používaných technik imobilizace. Hydrolýzu lze provádět  $\alpha$ -chymotrypsinem generovaným přímo v reakční směsi z přidávaného chymotrypsinogenu účinkem stopového množství  $\alpha$ -chymotrypsinu.

Výhodou způsobu podle vynálezu je ve srovnání s dosud známými postupy podstatně jednodušší izolace monoesteru kyseliny acylaminomalonové, kdy produkt parciální hydrolyzy vykristaluje po ochlazení a okyselení reakční směsi ve vysokém výtěžku.

Výhoda způsobu přípravy monoesterů kyseliny acylaminomalonové podle vynálezu spočívá především v jednoduchosti celého postupu, možnosti pracovat pouze s vodnými roztoky, ve 100 % konverzi dané enzymovou katalýzou a s tím spojeným vysokým výtěžkem monoesterů /90 až 95 %/, v čistotě získaného produktu, kdy odpadá při jiných chemických postupech nutná rekrystalizace, která je spojena s možností dekarboxylace krystalovaného monoesteru, a tím se značnými ztrátami a znečištěním produktu.

Výhodou způsobu podle vynálezu je rovněž možnost opětovného použití aplikovaného chymotrypsinu, ať již volného/zarezením ultrafiltrace/ nebo imobilizovaného. K výhodám postupu podle vynálezu je možno přičíst i značnou jednoduchost udržování pH reakční směsi přidávkou uhlíčitanu sodného nebo hydrogenuhlíčitanu draselného či sodného podle čs. AO č. 247444, při kterém nedochází ke zvětšování objemu reakční směsi, což by v opačném případě /při udržování pH pomocí pH statu přidávkou roztoku hydroxidu sodného /snižovalo hmotnostní výtěžek produktu.

Další výhodou postupu podle vynálezu je možnost provádění hydrolyzy přímo surového produktu acylační redukcí isonitrosomalondiesteru na Raney-niklu, kdy surový produkt této redukcce, to je diester kyseliny acylaminomalonové, obsahuje stopy nikelných a hliníkových iontů, které nemají na katalytický účinek chymotrypsinu technologicky významný vliv.

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

#### Příklad 1

Ke 4 dílům hmot. vody obsahující 0,01 % hmot. technického preparátu  $\alpha$ -chymotrypsinu a 0,01 % hmot. chloridu vápenatého se za míchání přidá 1 díl hmot. diethylesteru kyseliny acetamidomalonové. Reakční směs se smíchá při 20 °C, přičemž průběh reakce je snadno kontrolovatelný jednak postupným rozpouštěním diethylesteru kyseliny acetamidomalonové a jednak tvorbou oxidu uhličitého uvolňujícího se při neutralizaci vznikající kyseliny.

Po skončené hydrolyze se reakční směs ochladí na 0 °C až 5 °C a okyselí koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 1,5. Vykristalovaný monoethylester kyseliny acetamidomalonové se odsaje, promyje ledovou vodou a vysuší při 20 °C. Výtěžek čistého produktu, to je monoethylesteru kyseliny acetamidomalonové t.t. 131 až 132 °C, činí 94 %.

#### Příklad 2

Ke 2 dílům hmot. vody obsahující 0,15 % hmot. technického preparátu  $\alpha$ -chymotrypsinu a 0,1 % hmot. chloridu vápenatého se postupně za míchání přidá 1 díl hmot. diethylesteru kyseliny acetamidomalonové a pH reakční směsi se udržuje přidávkou pevného hydrogenuhlíčitanu sodného na hodnotě 7,5 až 8,0.

Po hydrolyze veškerého diethylesteru se 80 % reakční směsi odfiltruje přes ultrafiltr a ke zbytku se přidají opět 2 díly hmot. vody a postupně za míchání 1 díl hmot. diethylesteru kyseliny acetamidomalonové, přičemž pH reakční směsi se udržuje přidávkou hydrogenuhlíčitanu sodného na pH 7,5 až 8,0.

Po úplné konverzi diethylesteru na monoethylester se opět 80 % reakční směsi odfiltruje přes ultrafiltr a celý proces se opakuje. Z jednotlivých filtrátů se po ochlazení na 0 až 5 °C a okyselení kyselinou chlorovodíkovou na pH 1,5 až 2,0 získá 92 až 95 % teoretického výtěžku monoethylesteru kyseliny acetamidomalonové t.t. 132 až 133 °C.

## P ř í k l a d 3

Ke 4 dílům hmot. vody obsahující 0,001 % hmot. technického preparátu  $\alpha$ -chymotrypsinu, 0,05 % hmot. chymotrypsinogenu a 0,05 % hmot. chloridu vápenatého se za míchání přidá 1 díl hmot. hydrogenuhlíčitanu draselného a 2 díly hmot. diethylesteru kyseliny acetamidomalonové. Dále je reakce vedena jako v příkladu 1. Výtěžek čistého produktu, to je monoethylesteru kyseliny acetamidomalonové t.t. 131 až 133 °C, činí 95 %.

## P ř í k l a d 4

Ke 4,5 dílům hmot. vody obsahující 0,01 % hmot. technického preparátu  $\alpha$ -chymotrypsinu a 0,01 % hmot. chloridu vápenatého se za míchání přidá 1 díl hmot. hydrogenuhlíčitanu draselného a 2,5 díly hmot. dimethylesteru kyseliny benzamidomalonové. Dále se postupuje jako v příkladu 1. Získá se 93 % monoethylesteru kyseliny benzamidomalonové t.t. 75 až 76 °C.

## P ř í k l a d 5

K 5 dílům hmot. vody obsahující 0,01 % hmot. technického preparátu  $\alpha$ -chymotrypsinu a 0,01 % hmot. chloridu vápenatého se za míchání přidá 1 díl hmot. hydrogenuhlíčitanu draselného a 2,6 díly hmot. dimethylesteru kyseliny fenylacetylaminomalonové. Dále se postupuje jako v příkladu 1. Získá se 94 % monoethylesteru kyseliny fenylacetylaminomalonové t.t. 128 °C.

## P ř í k l a d 6

K 5 dílům hmot. vody obsahující 0,01 % hmot. technického preparátu  $\alpha$ -chymotrypsinu se za míchání přidá 0,5 dílu hmot. uhlíčitanu smonného a 3 díly hmot. dimethylesteru kyseliny 4-chlorbenzamidomalonové. Dále se postupuje jako v příkladu 1. Získá se 95 % monomethylesteru kyseliny 4-chlorbenzamidomalonové, t.t. 135 až 136 °C.

## P ř í k l a d 7

Stejným postupem jako v příkladu 6 se získá z dimethylesteru kyseliny 2-chlorbenzamidomalonové monomethylester této kyseliny v 94 % výtěžku, t.t. 120 až 122 °C.

## P ř í k l a d 8

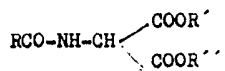
K 5 dílům vody obsahující 25 % hmot. methanolu a 0,01 % hmot. technického preparátu  $\alpha$ -chymotrypsinu se za míchání přidá 1 díl hmot. hydrogenuhlíčitanu draselného a 3,3 díly hmot. dimethylesteru kyseliny dodecylamidomalonové. Dále se postupuje jako v příkladu 1. Získá se 89 % monomethylesteru kyseliny dodecylamidomalonové, t.t. 117 až 118 °C.

## P ř í k l a d 9

Ke 4 dílům hmot. vody obsahující 0,02 % hmot. suspenzního preparátu karboxyl esterasy /EC 3.1.1.1./ z vepřových jater v 3,2 M síranu smonného se za míchání přidá 1 díl hmot. hydrogenuhlíčitanu sodného a 2 díly hmot. dimethylesteru kyseliny formamidomalonové. Reakční směs se míchá při 20 °C a pH 7,0 až 7,6 analogicky jako v příkladu 1. Dále se postupuje jako v příkladu 1. Získá se 90 % monomethylesteru kyseliny formamidomalonové, t.t. 127 až 128 °C.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy monoalkylesterů kyseliny acylaminomalonové hydrolýzou dialkylesterů kyseliny acylaminomalonové obecného vzorce



kde R' a R'' je alkyl s počtem uhlíků C<sub>1</sub> až C<sub>3</sub> a kde R je H, alkyl s počtem uhlíků C<sub>1</sub> až C<sub>11</sub>, fenyl nebo 2-chlorfenyl, 4-chlorfenyl, benzyl, katalyzovanou pomocí esteráz nebo proteínáz, vyznačený tím, že pH reakční směsi se udržuje na optimální hodnotě 7,5 až 8,3 přidávkou uhličitanu amonného nebo hydrogenuhličitanu alkalického kovu a produkt hydrolýzy, monoalkylester kyseliny acylaminomalonové se izoluje po ochlazení na 0 až 5 °C a okyselení minerální kyselinou na pH 1,5 až 3, vykrystalováním z reakční směsi.