

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY PATENTU TYMCZASOWEGO

120 704

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 25.06.80 (P. 225197)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 08.05.81

Opis patentowy opublikowano: 31.05.1983

Int. Cl.³

C07C 101/16

/C07B 19/00

CZYTELNIA

Urzedu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Arnold Adamiec, Janina Grzegorzewska, Hanna Ksycińska,
Witold Marciniak

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania D-fenyloglicyny

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania D-fenyloglicyny na drodze asymetrycznej hydrolizy N-acylo-DL-fenyloglicyny za pomocą enzymatycznych preparatów zwierzęcych.

D-fenyloglicyna stanowi półprodukt do wytwarzania półsyntetycznych antybiotyków, pochodnych kwasu cefalosporynowego lub penicyloinowego, takich jak na przykład ampicylina. Antybiotyki te wykazują działanie bakteriostatyczne wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Znane sposoby wytwarzania D-fenyloglicyny polegają na rozdzieleniu racemicznej postaci DL-fenyloglicyny metodami fizykochemicznymi jak krystalizacja frakcjonowana według opisu patentowego japońskiego nr 73.91034 z 1973 r. i opisów patentowych RFN nr 2.605.567 i nr 2.612.615 z 1976 r., albo krystalizacja pochodnych diastereoizomerycznych związku racemicznego według opisów patentowych japońskich nr 76-95036 i nr 76-113840 z 1976 r., opisu patentowego brytyjskiego nr 1455710 z 1976 r. lub opisu patentowego RFN nr 2710504 z 1977 r.

Ujemną stroną tych metod stanowi ich mała wybiórczość, gdyż znane procesy rozdzielania racematu DL-fenyloglicyny powodują zanieczyszczenie końcowego produktu L-fenyloglicyną lub innymi związkami stosowanymi do rozdzielenia racemicznej postaci DL-fenyloglicyny.

Bardziej czystą D-fenyloglicynę można otrzymać stosując znane metody hydrolizy amidu fenyloglicyny za pomocą enzymu L-alfa-aminoacyloamidazy pochodzenia bakteryjnego (opis patentowy RFN nr 2.700456 z 1977 r. i japoński nr 78-66493 z 1978 r.). Jednak do uzyskania tego enzymu niezbędne są wyselekcjonowane i wydajne szczepy drobnoustrojów a także odpowiednie urządzenia do ich hodowli.

Okazało się, że z niektórych tkanek i narządów zwierząt rzeźnych, takich jak śledziona, wątroba, nerki, trzustka, płuca, można wyodrębnić aktywne frakcje jako preparaty enzymatyczne swoiście hydrolizujące N-acytylo-DL-fenyloglicynę do D-fenyloglicyny.

Według wynalazku narządy zwierząt rzeźnych, zwłaszcza nerki, poddaje się maceracji roztworem wodnym elektrolitów metali dwuwartościowych np. chlorku kobaltowego o stężeniu 10^{-2} – 10^{-5} mol/litr, korzystnie 5 – 10^{-4} , przy wartości pH roztworu 6,5–8,5, korzystnie 7,2, w temperaturze 0° – 10°C w ciągu 1–5 godzin,

korzystnie 1 godziny. Następnie oddziela się tkankę zwierzęcą, wytrąca z przesączu białka balastowe i po ich oddzieleniu pod działaniem rozpuszczalników organicznych lub soli nieorganicznych z przesączu wytrąca ponownie osad, który jako aktywny preparat enzymatyczny dodaje się do roztworu N-acetylo-DL-fenyloglicyny, zawierającego 10^{-2} – 10^{-5} mol/litr elektrolitów metali dwuwartościowych. Hydrolizę otrzymanej zawiesiny prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 40°C zachowując wartość pH 6,5–8,0, korzystnie 7,2, przy intensywnym mieszaniu, po czym wyodrębnia się N-acetylo-D-fenyloglicynę, z której po hydrolizie w kwaśnym środowisku uzyskuje się czystą, optycznie czynną D-fenyloglicynę z wysoką wydajnością.

Jako rozpuszczalniki organiczne do wytrącania preparatu enzymatycznego stosuje się aceton lub etanol z dodatkiem acetonu, a jako sól nieorganiczną siarczan amonowy.

Sposób wytwarzania D-fenyloglicyny ilustrują poniższe przykłady.

Przykład I. Do 1 kilograma mrożonych, rozdrobnionych nerek zwierzęcych dodano 2 litry wody o temperaturze 5°C z zawartością $5 \cdot 10^{-4}$ mol/litr chlorku kobaltowego i mieszano 1 godzinę. Następnie odwirowano tkankę zwierzęcą i doprowadzono przesącz do wartości pH 5,0. Wytrącony z przesączu osad białek balastowych odwirowano i odrzucono, a pH przesączu doprowadzono do wartości 6,5 za pomocą 12,5% roztworu amoniaku, po czym wysolono mieszaninę siarczanem amonowym i uzyskano osad, który jako aktywny preparat enzymatyczny dodano do 10 litrów 10% roztworu N-acetylo-DL-fenyloglicyny z zawartością $5 \cdot 10^{-4}$ mol/litr elektrolitu metalu dwuwartościowego Co^{+2} . Następnie prowadzono hydrolizę otrzymanej zawiesiny przez 24 godziny w temperaturze 40°C ciągle mieszając i doprowadzając pH do wartości 7,2 roztworem amoniaku. Wytrącony osad L-fenyloglicyny odsączono, przemyto alkoholem i oddzielono ten osad jako produkt uboczny. Połączone przesącze odparowano do objętości 1 litra zakwaszono kwasem siarkowym do wartości pH 1,5 i wytrącono osad N-acetylo-D-fenyloglicyny, który po przemyciu i wysuszeniu poddano kwaśnej hydrolizie za pomocą 2N kwasu solnego. Uzyskano czystą, optycznie czynną D-fenyloglicynę z wydajnością 90%.

Przykład II. Postępowano jak w przykładzie I z następującą zmianą, że do wytrącania preparatu enzymatycznego zastosowano oziębiony aceton do -17°C zamiast użytego w przykładzie I siarczanu amonowego. Otrzymano czystą, optycznie czynną D-fenyloglicynę z wydajnością 92%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania D-fenyloglicyny na drodze enzymatycznej hydrolizy N-acetylo-DL-fenyloglicyny, z n a m i e n n y t y m, że narządy zwierząt rzeźnych zwłaszcza nerki, poddaje się maceracji wodnym roztworem elektrolitów metali dwuwartościowych, takich jak na przykład chlorek kobaltowy, o stężeniu 10^{-2} – 10^{-5} mol/litr, korzystnie $5 \cdot 10^{-4}$, przy wartości pH roztworu 6,5–8,5, korzystnie 7,2, w temperaturze 0 – 10°C w ciągu 1–5 godzin, korzystnie przez 1 godzinę, następnie tkankę zwierzęcą oddziela się i z przesączu wytrąca białka balastowe, a po ich odwirowaniu znowu wytrąca się z przesączu rozpuszczalnikami organicznymi lub wysalą działaniem soli nieorganicznych osad, który jako aktywny preparat enzymatyczny dodaje się do roztworu N-acetylo-DL-fenyloglicyny, zawierającego 10^{-2} – 10^{-5} mol/litr elektrolitów metali dwuwartościowych, po czym prowadzi się hydrolizę otrzymanej zawiesiny przez 24 godziny w temperaturze 40°C przy intensywnym mieszaniu, utrzymując za pomocą roztworu amoniaku wartość pH 6,5–8,0, korzystnie 7,2, następnie z mieszaniny poreakcyjnej wyodrębnia się N-acetylo-D-fenyloglicynę, z której po hydrolizie w kwaśnym środowisku uzyskuje się czystą, optycznie czynną D-fenyloglicynę.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że dla uzyskania aktywnego preparatu enzymatycznego stosuje się jako rozpuszczalniki organiczne oziębiony aceton lub etanol z dodatkiem acetonu, a jako sól nieorganiczną stosuje się siarczan amonowy.