



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) **263987**

(13) B1

{21} PV 1322-88.R
{22} Přihlášeno 01 03 88

{40} Zveřejněno 16 09 88
{45} Vydáno 15 07 89

{51} Int. Cl. 4
C 07 C 103/46
C 07 C 101/08

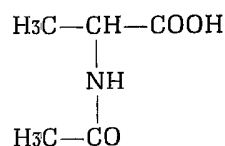
{75}
Autor vynálezu

VANŽURA JIŘÍ RNDr. CSc., HRADEC KRÁLOVÉ, KASAFÍREK
EVŽEN ing. CSc., PRAHA, HRABÁLEK ALEXANDR PharmDr., VINŠOVÁ
JARMILA RNDr. CSc., HRADEC KRÁLOVÉ, KŘEPELKA JIŘÍ ing. CSc.,
PRAHA

{54} Způsob výroby chirálně vysoce čistého N-acetyl-L- α -alaninu nebo
N-acetyl-D- α -alaninu

{57} Řešení se týká způsobu výroby chirálně vysoce čistého N-acetyl-L- α -alaninu nebo N-acetyl-D- α -alaninu acetylací L- nebo D- α -alaninu acetanhydridem ve vodně alkalickém prostředí. Princip zdokonaleného způsobu spočívá v tom, že se acetylace provádí ve vodném roztoku obsahujícím stechiometrické množství anorganické báze jako hydroxidu sodného, vztaženo na volné karboxylové skupiny, acetanhydridem v přebytku 1,1 až 1,5 molu, přidávaným současně s vodným roztokem, při teplotě -10 až -25 °C a hodnotě pH 9,0 až 11,5. Popsaný způsob je jednoduchý a hospodárný, vhodný pro výrobu v průmyslovém měřítku, přičemž racemizace výchozího L- nebo D- α -alaninu je minimální. N-acetyl-L- α -alanin, respektive jeho antipod, je významným meziproduktem syntézy peptidů.

Vynález se týká způsobu výroby chirálně vysoce čistého N-acetyl-L- α -alaninu nebo N-acetyl-D- α -alaninu vzorce



Chirálně čistý acetyl-L-alanin s charakteristickými konstantami:

t. t. = 125 °C;

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -66,2^\circ$ (c = 2; voda)

byl připraven štěpením racemického acetyl-D,L-alaninu acylázou z vepřových ledvin (S. M. Birnbaum, L. Levintow, R. B. Kingsley, J. P. Greenstein: *J. Biol. Chem.* **194**, 455 až 470 /1952/). Dříve provedené pokusy o syntézu vycházející z chirálně čistých reaktantů vedly k částečně racemickým produktům. Tak acetylací L-alaninu acetanhydridem ve vodném roztoku hydroxidu sodného byl získán produkt o t. t. 116 °C,

$[\alpha]_{\text{D}}^{16} = -45,6^\circ$ (c = 5; voda)

(P. Karrer, K. Escher, R. Widmer: *Helv. Chim. Acta* **9**, 301 až 323 /1926/.) Tyto závěry byly potvrzeny Wolfromem a spol. (M. L. Wolfrom, R. U. Lemieux, S. M. Olin: *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2 870 až 2 873 /1949/), kteří připravili chirálně čistší acetyl-L-alanin bez udání výtěžku o t. t. 122 až 123 °C,

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -62^\circ$ (c = 3; voda)

náročnějším čištěním produktu s t. t. 112 až 128 °C,

$[\alpha]_{\text{D}} = -36^\circ$ (c = 2; voda),

získaného rovněž acetylací acetanhydridem, a to na základě zjištění, že racemát je hůře rozpustný v ethylacetátu než opticky čistý izomer.

Tendence k racemizaci N-acetyl-aminokyseliny včetně N-acetyl-L- α -alaninu v přítomnosti 0,1 až 2,0 % volného acetanhydridu je tak značná, že byla využita k totální racemizaci acetylamínokyseliny za zvýšené teploty v průběhu 21 minut s 93% výtěžkem. (M. Karrenbauer, A. Kleemann: *Ger. Offen. DE č. 3 435 095* /1986/; *Ref. Chem. Abstr.* **105**, 227 290e /1986/.)

Pokusy o acetylaci zahříváním v prostředí kyseliny octové vedly k 44% až 61% výtěžku acetylderivátu s totální ztrátou optické aktivity (E. A. Bell.: *J. Chem. Soc.* **1958**, 2 423 až 2 425).

Úspěšná příprava chirálně čistého acetyl-L-alaninu vychází z L-alaninu, který za podmínek Schotten-Baumannovy reakce dává s trojnásobným přebytkem acetylchloridu produkt o t. t. 126 °C a

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65,6^\circ$ (voda, 5,5 mg/ml)

(H. Krebs, W. Schumacher: *Chem. Ber.* **99**, 1 341 až 1346 /1966/) nebo z L-alaninu acetylovaného ketenem ve vodně alkalickém prostředí (G. Franzmann, H. L. Huelsmann: *Ger. Offen. 2 741 081* /1979/; *Ref. Chem. Abstr.* **91**, 103 229z /1979/).

Řada dalších přístupů k získání acetyl-L-alaninu s různou chirální čistotou, jako např. rezoluce racemické směsi pomocí 1-amfetaminu (J. M. Gillingham: *US číslo 3 028 395* /1962/; *Ref. Chem. Abstr.* **57**, 16 742d /1962/), využití asymetrických iontoměničových sorbentů (S. V. Rogozhin, V. A. Davankov, V. V. Korshak, V. Vesa, A. L. Belchich: *Izv. Acad. Nauk. SSSR Ser. Khim.* **1971** /3/, 502 až 508; *Ref. Chem. Abstr.* **75**, 21 557a /1971/), nebo vznik acetyl-L-alaninu ve směsi dalších látek z glukózy působením *Candida tropicalis* OH23 (M. Okuhara, T. Harada: *Biochem. Biophys. Acta* **244**, 16 až 18 /1971/) nemá z hlediska průmyslového využití praktický význam.

Některé z výše uvedených způsobů přípravy acetyl-L-alaninu vedou více či méně k částečné racemizaci, jiné jsou technicky nebo výrobně náročné. Výjimku tvoří technicky jednoduchá acetylace acetylchloridem, jejíž nevýhodou je však nutnost použití značného přebytku ekonomicky i zdravotně nevýhodného acetylchloridu.

Zmíněné nevýhody odstraňuje způsob výroby chirálně vysoce čistého N-acetyl-L- α -alaninu nebo N-acetyl-D- α -alaninu uvedeného vzorce, a to acetylací L- nebo D- α -alaninu acetanhydridem ve vodně alkalickém prostředí, podle vynálezu. Podstata tohoto způsobu spočívá v tom, že se acetylace provádí ve vodném roztoku, obsahujícím stechiometrické množství anorganické báze, například hydroxidu sodného, vztaženo na volné karboxylové skupiny, s výhodou v koncentraci 3,5 až 4,5 M, acetanhydridem, přidávaným v přebytku 1,1 až 1,5 molu současně s vodným roztokem anorganické báze, například hydroxidu sodného, s výhodou v koncentraci 3,5 až 4,5 M, za udržování teploty reakční směsi -10 až -25 °C a hodnoty pH 9,0 až 11,5, načež se po ukončení reakce reakční směs okyslí minerální kyselinou, například sírovou, a reakční produkt se izoluje extrakcí organickým, s vodou omezeně mísitelným rozpouštědlem, například ethylacetátem, odpařením rozpouštědla a krystalizací odparku.

Při provedení způsobu podle vynálezu se roztok výchozí látky v ekvimolárním množství 4 až 6 M roztoku hydroxidu sodného, s hodnotou pH nastavenou na 9,0 až 11,5, nechá při teplotě -10 až -25 °C reagovat s 1,1 až 1,5 molárním přebytkem acetanhydridu, přidávaného postupně, za současného přidávání roztoku hydroxidu sodného v uvedené koncentraci, a to takovou rychlostí,

aby původně nastavené reakční podmínky zůstaly zachovány.

Při popsaném uspořádání acetanhydrid přednostně reaguje s elektronovým párem dusíku aminoskupiny a racemizace na chirálním α -uhlíku aminoskupiny nastává jen minimálně.

Po ukončení acetylce se reakční směs za chlazení na 0 °C okyselí minerální kyselinou, nejlépe sírovou, a žádaný produkt se vyjme do organického rozpouštědla, omezeně mísitelného s vodou, například ethylacetátu. Spojené extrakty se zahustí ve vakuu a získaný odparek snadno krystalizuje ze směsi ethylacetátu s petroletherem. Získá se produkt ve vysoké chemické i optické čistotě, s vysokým výtěžkem 85 až 88 % teorie, s t. t. 125 až 126 °C a

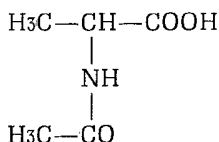
$$[\alpha]_D^{20} = -64,5 \pm 0,5^\circ (c = 1; \text{voda}).$$

Způsob podle vynálezu je výrobně i časově nenáročný, ekonomicky výhodný a dosahuje překvapivě dobrých výsledků, při menších požadavcích na hygienická opatření při manipulaci s acetylačním činidlem.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu jsou uvedeny v následujícím příkladu provedení, který tento způsob pouze ilustruje, ale nijak neomezuje.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby chirálně vysoce čistého N-acetyl-L- α -alaninu nebo N-acetyl-D- α -alaninu vzorce



acetylací L- nebo D- α -alaninu acetanhydridem ve vodně alkalickém prostředí, vyznačující se tím, že se acetylce provádí ve vodném roztoku, obsahujícím stechiometrické množství anorganické báze, například hydroxidu sodného, vztaženo na volné karboxylové skupiny, acetanhydridem, přidávaným v přebytku 1,1 až 1,5 molu současně s vodným roztokem anorganické báze, například hydroxidu sodného, za udržování teploty reakční směsi -10 až -25 °C a hodnoty pH 9,0 až 11,5, načež se po ukončení reakce reakční směs okyselí minerální kyselinou, a reakční produkt se izoluje extrakcí organickým, s vodou omezeně mísitelným rozpouštědlem, odpařením rozpouštědla a krystalizací odparku.

89,1 g L-alaninu suspendovaného v 50 ml vody je za intenzivního míchání smíseno s 250 ml 4 M roztoku hydroxidu sodného při teplotě 1 až 5 °C. Reakční směs je ochlazená na -15 až -20 °C a do reakční směsi je za intenzivního míchání současně přikapáváno 153 g acetanhydridu a 375 ml 4 M vodného roztoku hydroxidu sodného takovou rychlostí, aby se teplota udržela v nastavených mezích a v takovém poměru, aby se pH udrželo v rozmezí 9,5 až 11,5. Po ukončení reakce je reakční směs okyselena kyselinou sírovou a vytřepávána postupně ethylacetátem tak dlouho, dokud je v ethylacetátové vrstvě dokazatelný acetyl-L-alanin. Spojené ethylacetátové podíly jsou po vysušení vakuově zahuštěny při teplotě do 45 °C, zbývající nažloutlý olej rozpuštěn za varu v 600 ml ethylacetátu a po horké filtraci přiveden petroletherem ke krystalizaci. Výtěžek 116 g (88 % teorie) bezbarvých krystalů, t. t. 125 až 126 °C,

$$[\alpha]_D^{20} = -64,8^\circ (c = 1; \text{voda}).$$

Zcela stejně se postupuje při výrobě N-acetyl-D- α -alaninu.