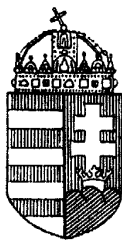


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

203 581 B

(22) Bejelentés napja: 1989.09.01.
(33) JP

(32) 1988.09.02.

(31) 221016/88

(21) 4539/89

(51) Int Cl⁵

C 12 P 17/02

C 12 P 7/62

(41) (42) Közzététel napja: 1990.06.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1991.04.28. SZKV 91/04.

(72) Feltalálók:

Shibatani, Takeji, Kobe-shi, Hyogo-ken
Nakamichi, Katsuhiko, Sakai-shi, Osaka-fu
Matsumae, Hiroaki, Kobe-shi, Hyogo-ken (JP)

(73) Szabadalmaz:

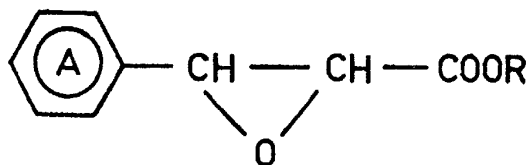
Tanabe Seiyaku Co. Ltd., Osaka (JP)

(54) ÚJ ELJÁRÁS OPTIKAILAG AKTÍV 3-FENIL-GLICIDILSAV-ÉSZTEREK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A 2R, 3S-izomer (I) általános képletű 3-fenil-glicidilsav-észterek előállítására – a képletben az A gyűrű 1–7 szénatomos alkoxycsoporttal helyettesített fenilcsoport, R jelentése 1–7 szénatomos alkilcso-

port – egy racém 3-fenil-glicidilsav-észter 2S, 3R-izomerjét az észterkötés sztereoselektív hidrolizálására képes enzimmel hidrolizálják, és az antipódot a reakcióelegyből izolálják.



(I)

A leírás terjedelme: 7 oldal, 6 ábra

HU 203 581 B

A találmány tárgya új eljárás optikailag aktív (2R,3S)-3-fenil-glicidilsav-észterek előállítására.

Az optikailag aktív (2R,3S)-3-fenil-glicidilsav-észterek fontos köztitermékei a kozorúér-tágító és egyéb gyógyászati hatású készítmények hatóanyagául szolgáló ditiázem-hidrogén-klorid szintetikus előállításának. A korábbiakban az optikailag aktív 3-fenil-glicidilsav-észterek előállítására egy olyan eljárás volt ismert, amelyben metil-transz-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot hidrolizálnak a megfelelő karbonsavvá, és a karbonsavat optikai rezolválással alakítják optikailag aktív aminná, majd ezt észterezik (ezt az eljárást a 13 775/1985 és 13776/1985 számú vizsgálat nélkül közzétett japán szabadalmi leírásokban ismertetik).

A fenti eljárás azonban azzal a hátránnyal jár, hogy számos lépést foglal magában, ennek ellenére a kívánt optikailag foglalt magában, ennek ellenére a kívánt optikailag aktív metil-transz-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát csak kis tisztaságú olajként nyerhető ki.

Intenzív vizsgálatokat folytattunk ennek a hátránnak a megszüntetésére, és egy olyan eljárást találtunk, amellyel a kívánt optikailag aktív 3-fenil-glicidilsav-észterek azonnal a racém-3-fenil-glicidilsav-észterek kristályos formájaként állíthatók elő.

Közelebbről, a találmány szerint egy (I) általános képletű 2R,3S- és 2S,3R-izomerek elegyét tartalmazó 3-fenil-glicidilsav-észtert – a képletben az A gyűrű 1-7 szenatomos alkoxicsoporttal egyszerűen helyettesített fenilcsoport, és R jelentése 1-7 szenatomos alkilcsoport –

a) egy olyan enzimmel reagáltatjuk, amely a racém 3-fenil-glicidilsav-észter észterkötésének sztereoselektív hidrolizálására képes, ezáltal a 2S,3R-izomert sztereoselektíven hidrolizáljuk, majd
b) ennek antipódját elkülönítjük és kigyűjtjük a reakcióelegyből.

Az 1. ábrán a metil-(2R,3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát IR abszorpciós spektrumát mutatjuk be, a 2. ábrán ugyanennek a vegyületnek az NMR spektruma szerepel, míg a 3. ábrán ugyancsak ennek a vegyületnek a tömegspektrumát mutatjuk be.

A találmány szerint racém-3-fenil-glicidilsav-észterként nemcsak a (2S, 3R) izomert és a (2R, 3S) izomert azonos mennyiségben tartalmazó elegyek használhatók, hanem bármely olyan elegy, amely ezeket az optikailag aktív izomereket tartalmazza.

A találmány szerinti eljárásban enzimeként előnyösen hidrolázokhoz tartozó lipázok vagy észterázok használhatók. Ezek az enzimek származhatnak mikroorganizmusból vagy állati vagy növényi sejtekből. Használhatunk olyan enzimeket, amelyeket ezeket a hidrolázokat tartalmazó mikroorganizmus sejtekből, állati sejtekből, vagy növényi sejtekből ismert módon extraháltunk, vagy használhatunk kereskedelmi forgalomban kapható készítményeket is. A találmány szerinti eljárásban használható enzimek példaként említjük a következőket: alkalikus lipáz (Achromobacter eredetű, gyártója: Waki Junyaku), lipáz (Chromobacterium viscosum eredetű, gyártója: Toyo Jozo), lipáz B (Pseudomonas fragi 22-39B eredetű, gyártója: Wako Junyaku), lipáz M „Amano” 10 (Mucor javanicus eredetű, gyár-

tója: Amano Seiyaku), XI típusú lipáz (Rhizopus arrhizus eredetű, gyártója: Sigma, USA), talipáz (Rhizopus delemar eredetű, gyártója: Tanabe Seiyaku), lipáz NK-116 (Rhizopus japonicus eredetű, gyártója: Nagase Sangyo), lipáz N (Rhizopus niveus eredetű, gyártója: Amano Seiyaku), VII típusú lipáz (Candida cylindracea eredetű, gyártója: Sigma, USA), lipáz (sertés-pankreász eredetű, gyártója: Waku Junyaku), észteráz (sertés-máj eredetű, gyártója: Sigma, USA), koleszterin észteráz (Candida rugosa eredetű, gyártója: Nagase Sangyo), stb.

A találmány szerinti eljárásban felhasználható az előbbi enzimeket termelő mikroorganizmusok fermentleve, a fenti fermentléből kigyűjtött mikroorganizmus sejtek, valamint a mikroorganizmus sejtekből nyert feldolgozott készítmény is enzimmásként.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazható mikroorganizmusok azok, amelyek képesek az előzőekben említett hidrolázok termelésére, például olyan mikroorganizmusok, mint penészgombák, baktériumok, élesztők és aktinomiceták. A találmány szerinti eljáráshoz alkalmazható penészgombák között különösen az Absidia, Aspergillus, Fusarium, Gibberella, Mucor, Neurospora, Trichoderma vagy a Rhizopus nemzetséghez tartozókat, a baktériumok közül az Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Providencia, Pseudomonas vagy a Serratia nemzetséghez tartozókat, és az élesztők közül a Candida vagy Saccharomycopsis nemzetséghez tartozókat, az aktinomiceták közül a Nocardia nemzetséghez tartozókat említjük meg. A fenti nemzetségekbe tartozó mikroorganizmusok példaként hozzuk fe a következőket: Absidia corymifera IFO 4009 (NRRL 2982), IFO 4010, Aspergillus ochraceus IFO 4346, Aspergillus terreus IFO 6123 (ATCC 10020), Fusarium oxysporum IFO 5942 és ATCC 659, Fusarium solani IFO 5232, Gibberella funikuroi IFO 5268, Mucor angulimacrosporus IAM 6149, Mucor circinelloides IFO 6746 (ATCC 42258), Mucor flavus IAM 6143, Mucor fragilis IFO 6449, Mucor genevensis IAM 6091, Mucor globosus IFO 6745, Mucor hiemalis OUT 1045 és OUT 1047, Mucor janssenii OUT 4572 és IFO 5382, Mucor javanicus IFO 4569, IFO 4570, IFO 4572 és IFO 5382, Mucor lamprosporus IFO 6337, Mucor petrinsularis IFO 6751, Mucor plumbeus IAM 6117, Mucor praini IAM 6120, Mucor pusillus IAM 6122, Mucor racemosus IFO 4581, Mucor ramannianus IAM 6128, Mucor recurvus IAM 6129, Mucor silvaticus IFO 6753, Mucor spinescens IAM 6071, Mucor subtilissimus IFO 6338, Neurospora crassa IFO 6068 (ATCC 10336), Rhizopus arrhizus IFO 5780 (ATCC 11145), Rhizopus delemar ATCC 34612, Rhizopus japonicus IFO 4758, Trichoderma viride OUT 4208 és IFO 4847, Achromobacter cycloclastes IAM 1013, Alcaligenes faecalis OUT 8030 (ACC 106), Bacillus sphaericus IFO 3525 (ATCC 10208), Bacillus subtilis OUT 8104 és OUT 8106, Brevibacterium ketoglutaricum ATCC 15588, Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511, Corynebacterium hydrocarboclastum ATCC 15592, Corynebacterium primorioxydans ATCC 31015, Providencia alcalifaciens JMC 1673 (ATCC 9886), Pseudomonas

mutabilis ATCC 33015, Serratia liquefaciens ATCC 27592, Serratia marcescens ATCC 13880, ATCC 14764, AZCC 19180, ATCC 21074, AZCC 27117 és ATCC 21212, Candida parapsilosis IFO 0585, Saccharomycopsis lipolytica IFO 0717, IFO 0746 (NRRL Y-1095), IFO 1195, IFO 1209 (NRRL Y-1094) és IFO 1548, Nocardia asteroides IFO 3384 (ATCC 330), IFO 3424 és IFO 3423, Nocardia gardneri ATCC 9604 stb. Ezek a mikroorganizmusok lehetnek vad vagy mutáns törzsek.

Mind a mikroorganizmusokat tartalmazó fermentlevet, mind magukat a mikroorganizmus sejteket szokásos módon nyerhetjük. A mikroorganizmust szokásosan alkalmazott tápközegekben, szénforrást, nitrogénforrást és szokásosan használt szervesen sokat tartalmazó tápközegekben, szobahőmérsékleten vagy melegítés mellett, előnyösen 20–40 °C hőmérsékleten aerob körülmények között, pH = 5–8 értéken tenyésztjük, és kívánt esetben a fermentléből a sejteket ismert módon elkülönítjük és gyűjtjük.

A tenyésztés során az enzimaktivitást fokozhatjuk azzal, ha (I) általános képletű 3-fenil-glicidilsav-észtert adunk a közegbe 0,001 tömeg/térf% feletti mennyiségben, különösen 0,1–1 tömeg/térf% mennyiségben.

A fenti mikroorganizmus sejtekből nyert feldolgozott készítményekként említhetjük például a liofilizált sejteket, az acetonos szárított sejteket, a sejtek önfeltárással nyert terméket, a sejtextraktumokat, az örölt sejterméket, a sejtek ultrahangos kezelésével nyert terméket. A mikroorganizmus sejtek és ezek feldolgozott termékei továbbá ismert módon immobilizálhatók a felhasználás előtt, alkalmazhatjuk például a poliakrilamid módszert, a kén-tartalmú poliszacharid gél módszer (karragén gél módszer), az algin-sav-gél-módszert, valamint az agar-gél-módszert.

A találmány szerinti sztereoselektív hidrolizálási eljárást az enzimek a racém (I) általános képletű 3-fenil-glicidilsav-észterrel megfelelő oldószerben való reagáltatásával végezzük.

A szubsztrát koncentrációja előnyösen 0,05–20 tömeg/térf.%, még előnyösebben 0,5–5 tömeg/térf.%, a reagáltatást célszerűen szobahőmérsékleten vagy melegítés mellett, előnyösen 10 és 50 °C között, még előnyösebben 25 és 40 °C között végezzük. A reagáltatás során előnyösen a reakcióelegy pH értékét 5 és 10 között, előnyösen 6 és 9 között tartjuk. Ebben az esetben, mivel a szubsztrátok nagyobb része nehezen oldódik vízben, előnyösen kétfázisú oldószerrendszerben végezzük a reagáltatást, amely rendszer vízből vagy vizes oldatból és egy szerves oldószerből áll. Szerves oldószerként alkalmazhatunk például szén-tetrakloridot, kloroformot, diklór-metánt, triklór-etilént, klór-benzolt, benzolt, toluolt, xilolt, terc-butil-metil-étert, diizopropil-étert, dietil-étert, metil-ziobutyl-ketont, metil-etil-ketont, etil-acetátot, butil-acetát, n-propil-alkoholt, izopropil-alkoholt, n-butil-alkoholt, terc-butil-alkoholt, különösen előnyös az etil-acetát, a szén-tetraklorid és a toluol alkalmazása. Ha enzimek forrásként fermentlevet vagy mikroorganizmus sejteket alkalmazunk, a fenti reakciót célszerűen felületaktív szer jelenlétében hajtjuk végre, hogy a re-

akcióidőt lerövidítsük és az optikailag aktív (I) általános képletű 3-fenil-glicidilsav-észter hozamát növeljük. Felületaktív szerként alkalmazhatunk például cetil-piridinium-bromidot, cetil-trimetil-ammónium-bromidot, polietilén-glikolt, poli(oxi-etilén)-oktil-fenil-étert. A felületaktív szert előnyösen a reakcióelegy teljes mennyiségére számított 0,0001–0,1% mennyiségben alkalmazzuk.

A kapott reakcióelegyből az optikailag aktív (I) általános képletű 3-fenil-glicidilsav-észtert ismert módon könnyen elkülöníthetjük. Például, ha a hidrolizálási reakciót kétfázisú víz-szerves oldószer rendszerben végezzük, az (I) általános képletű 3-fenil-glicidilsav-észter egyik optikailag aktív vízomere hidrolizál, és a vizes fázisba megy át, míg a másik optikailag aktív izomer, amelyet a reakció nem érint, a szerves oldószerben marad. Így az optikailag aktív 3-fenil-glicidilsav-észter kristályos formában kinyerhető a szerves oldószeres fázis elkülönítésével és bepárlásával.

A találmány szerinti eljárással az optikailag aktív (I) általános képletű 3-fenil-glicidilsav-észterek rövid eljárással és mégis nagy tisztaságú kristályok formájában előállíthatók, így ez az eljárás nagyüzemi eljárásra előnyös.

A következő példákban „%” megjelölésen mindenütt tömeg%térfogat%-ot értünk.

1. Példa

500 ml térfogatú rázólabikba 50 ml pH = 7,0 értékű, 0,5% glükózt, 1% peptont, 1% húskivonatot, 1,25% élesztőkivonatot és 0,5% nátrium-kloridot tartalmazó tápközeget mérünk, majd ezt 120 °C hőmérsékleten 10 percig sterilizzuk. A tápközeget egy platinakacsnyí Serratia marcescens ATCC 27117-tel beoltjuk, és a tenyésztést 30 °C hőmérsékleten, 20 órán át rázatás mellett végezzük. 5,4 liter fenti tenyészetből centrifugálással kinyert mikroorganizmus sejteket fiziológiás NaCl-oldatban szuszpendálunk, és a sejteket ismét kicentrifugáljuk. A kapott sejteket 1,8 liter 10 mmól/literes, 0,01% cetil-trimetil-ammónium-bromidot tartalmazó, pH = 7,5-ös foszfátpufferben szuszpendáljuk, majd hozzáadjuk 7,2 g racém metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot tartalmazó 1,8 liter szén-tetrakloridhoz. A sztereoselektív hidrolízist 30 °C hőmérsékleten 3 napon át végezzük, minek során a metil-(2S, 3R)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát teljesen hidrolizált. A szén-tetrakloridos fázist elkülönítjük, majd vákuumban bepároljuk. Így 3,0 g metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot nyerünk nyers kristályok formájában. A 3,0 g nyers kristályhoz 10 ml izopropil-alkoholt adunk, az elegyet 80 °C hőmérsékleten keverés mellett 20 percig melegítve oldattá alakítjuk, majd 80 °C-ról 20 °C-ra fokozatosan, 3 óra alatt hűtjük le. Az elegyet ezután 1 órára jégbe hűtjük, és a kicsapódott kristályokat kiszűrjük. Így 2,9 g kristályos metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot nyerünk.

O.p.: 87–88 °C.

$[\alpha]_D^{20}$: -207,03° (c = 1, metanol)

Tisztaság: 100%

Elemzési eredmények:

számított: C% = 63,45, H% = 5,81, O% = 30,74;

talált: C% = 63,44, H% = 5,80, O% = 30,76.

IR spektrum: lásd az 1. ábrán
NMR spektrum: lásd a 2. ábrán
Tömegspektrum: lásd a 3. ábrán

2. Példa

Az 1. példában leírt tápközeget az I. táblázatban felsorolt baktériumok valamelyikével beoltjuk, és 30 °C hőmérsékleten 20 órán át tenyésztjük. A mikroorganizmus sejteket 45 ml fenti tápközegből centrifugálással kigyűjtjük, fiziológias NaCl-oldatban szuszpendáljuk, majd ismét centrifugáljuk. A sejteket 15 ml 10 mmól/literes, 0,01% cetil-trimetil-ammónium-bromidot tartalmazó, pH = 7,5-ös foszfátpufferben szuszpendáljuk, majd hozzáadjuk 60 mg racém metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot tartalmazó 15 ml szén-tetrakloridhoz. A sztereoselektív hidrolízist 30 °C hőmérsékleten 3 napig végezzük. A reagáltatást követően a szén-tetrakloridos fázist elkülönítjük, és a metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot kinyerjük. Ennek az izomernek a mennyiségét az I. táblázatban bemutatjuk. Az elkülönített szerves fázisban lényegében nem találunk (2S, 3R)-izomert.

A fenti optikai izomer mennyiségi meghatározását nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással végeztük, királis OJ Φ sejten, 4,6 x 250 mm-es oszlopon (gyártó: Dixel Kagaku Kogyo K.K.).

A meghatározás körülményei a következők:

Az oszlop hőmérséklete: 40 °C

Oldószer: n-hexán és izopropil-alkohol 9:1 arányú elegye

Aramlási sebesség: 1,0 ml/perc

Detektálás: 254 nm (a detektálhatóság határa: 10 mg)

A kapott metil-2R,3S-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát kromatogramját a 4. ábrán mutatjuk be. Összehasonlításként az 5. ábrán bemutatjuk a racém metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát kromatogramját.

I Táblázat

Alkalmazott mikroorganizmus	(2R,3D) izomer tartalom (mg/ml Cl ₄)
Achromobacter cycloclastes IAM 1013	0,8
Alcaligenes faecalis OUT 8030	0,7
Bacillus sphaericus IFO 3525	0,7
Bacillus subtilis OUT 8104	0,8
Brevibacterium ketoglutamicum ATCC 15588	0,7
Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511	1,8
Corynebacterium primorioxidans ATCC 31015	1,8
Providencia alcalifaciens JCM 1673	1,8
Pseudomonas mutabilis ATCC 31014	1,8
Pseudomonas putida ATCC 17453	1,8
Serratia liquefaciens ATCC 27592	1,6
Serratia marcescens ATCC 27117	1,8

3. Példa

500 ml térfogatú rázólabikba 50 ml pH = 6,2-

es, 1% glükózt, 0,5% peptont, 0,3% maláta-kivonatot tartalmazó tápközeget mérünk, és 120 °C hőmérsékleten 10 percig sterilizzuk. A tápközeget a II. táblázatban felsorolt tenyészcombok vagy élesztők valamelyikének egy platinakacsnyi mennyiségével beoltjuk, és penészgomba alkalmazása esetén 27 °C hőmérsékleten 68 órán át végzett rázatással, élesztő esetén 27 °C-on 20 órán át végzett rázatással végezzük a tenyésztést. A fenti fermentlé 45 ml-éhez 60 mg racém metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot tartalmazó 15 ml szén-tetrakloridot adunk, majd az elegyhez hozzáadjuk még az elegy mennyiségére számított 0,001% cetil-trimetil-ammónium-bromidot, és 30 °C hőmérsékleten 3 napig végezzük a sztereoselektív hidrolízist. A reagáltatás befejezése után a szén-tetrakloridos fázist elkülönítjük, hogy a metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát tartalmú elegyét nyerjük. A szén-tetrakloridos fázisban a (2R, 3S) izomer mennyisége a II. táblázatban megadott, (2S, 3R) izomer, azaz az antipód, lényegében nincs a reakcióelegyben.

A termék kromatogramja a metil-(2R,3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát izomernek megfelelő csúcsot mutat, amelynek retenciósideje azonos a 2. példa szerint nyert termékével.

II. Táblázat

Alkalmazott mikroorganizmus	(2R,3S) izomer tartalom (mg/ml CCl ₄)
Absidia corymbifera IFO 4010	0,8
Asperigillus ochraceus IFO 4346	0,8
Asperigillus terreus IFO 6123	1,3
Fusarium oxysporum IFO 5942	0,8
Fusarium solani IFO 5232	0,7
Gibberella fujikuroi IFO 5268	0,8
Mucor globosus, IFO 6745	1,8
Mucor lamprosporus IFO 6337	1,8
Mucor silvaticus IFO 6753	1,8
Neurospora crassa IFO 6068	0,7
Rhizopus arrhizus IFO 5780	1,8
Rhizopus japonicus IFO 4758	1,8
Trichoderma viride OUT 4208	0,7
Candida parapsilosis IFO 0585	0,8
Saccharomycopsis lipolytica IFO 0717	1,8

4. Példa

500 ml térfogatú rázólabikba 50 ml pH = 7,3-as, 0,4% glükózt, 0,4% élesztő-kivonatot és 1,0% maláta-extraktumot tartalmazó tápközeget mérünk, és 120 °C hőmérsékleten 10 percig sterilizzuk. A tápközeget a III. táblázatban felsorolt aktionicek valamelyikéből egy platina kacsnyi mennyiséggel beoltjuk, és a tenyésztést rázatás mellett 27 °C hőmérsékleten 68 órán át folytatjuk. 45 ml fenti fermentléhez 15 ml 60 mg racém metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát-tartalmú szén-tetrakloridot adunk, majd az elegyhez hozzáadjuk az elegy mennyiségére számított 0,001% cetil-trimetil-ammónium-bromidot, és a sztereoselektív hidrolízist 30 °C hőmérsékleten 3 napon át folytatjuk. Ezt követően a metil-

(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát tartalmú reakcióelegy kinyerésére a szén-tetrakloridos fázist elkülönítjük. A szén-tetrakloridos fázis (2R, 3S)-izomer tartalmát a III. táblázatban mutatjuk be, az elegy lényegében nem tartalmaz (2S, 3R)-izomert.

A termék kromatogramja metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát csúcsot mutat, amelynek retenciósi ideje azonos a 2. példa termékével.

III. Táblázat

Alkalmazott mikroorganizmus	(2R, 3S) izomer tartalom (mg/ml CCl ₄)
Nocardia asteroides IFO 3384	1,3
Nocardia gardneri ATCC 9604	0,8

IV. Táblázat

Alkalmazott enzim (100 egység)	(2R, 3S) izomer tartalom (mg/ml CCl ₄)
Alkálikus lipáz	(Achromobacter eredetű, gyártó: Wako Junyaku) 0,7
Lipáz	(Chromobacterium viscosum eredetű, gyártó: Toyo Jozo) 0,7
Lipáz B	(Pseudomonas flagi 22-39B eredetű, gyártó: Wako Junyaku) 0,7
Lipáz M "Amano" 10	(Mucor javanicus eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,6
Lipáz XI típus	(Rhizopus arrhizus eredetű, gyártó: Sigma, USA) 1,8
Talipáz	(Rhizopus delemar eredetű, gyártó: Tanabe Seiyaku) 1,8
Lipáz NK-116	(Rhizopus japonicus eredetű, gyártó: Nagase Sangyo) 1,8
Lipáz	(Rhizopus nibius eredetű, gyártó: Nagase Sangyo) 1,8
Lipáz VII típus	(Candida cylindracea eredetű, gyártó: Sigma) 1,6
Lipáz	(Sertés-pankreasz eredetű, gyártó: Wako Junyaku) 0,7
Észteráz	(Sertés-máj eredetű, gyártó: Sigma, USA) 0,7
Koleszterin észteráz	(Candida rugosa eredetű, gyártó: Nagase Sangyo) 1,6

6. Példa

Az V. táblázatban felsorolt lipáz enzimek mindegyikéből 10 mg-ot 1 ml 100 mmól/literes foszfát-pufferben szuszpendálunk, a szuszpenzió pH-ját az enzim optimumára állítjuk, majd mindegyikhez hozzáadunk 4 mg racém metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot tartalmazó 1 ml szén-tetrakloridot. A sztereoselektív hidrolízist 30 °C hőmérsékleten 1 napon át végezzük. A reagáltatás befejezése után a

5. Példa

A IV. táblázatban felsorolt lipázok és észterázok mindegyikét 1 ml 10 mmól/literes foszfát-pufferben felszuszpendáljuk, pH-jukat az adott enzim optimumára állítjuk, majd mindegyikéhez hozzáadunk 4 mg racém-metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot tartalmazó 1 ml szén-tetrakloridot, és sztereoselektív hidrolízist végzünk 30 °C hőmérsékleten 2 napon át. Ezt követően a szén-tetrakloridos fázisokat elkülönítjük a metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát tartalmú elegy kinyerésére, a (2R, 3S)-izomer tartalmát a IV. táblázatban ismertetjük. A szén-tetrakloridos fázis lényegében nem tartalmaz (2S, 3R)-izomert. A termék kromatogramja metil-2-(2R,3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát csúcsot mutat, amelynek retenciósi ideje azonos a 2. példa szerint nyert termékével.

metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát-tartalmú elegy kinyerésére a szén-tetrakloridos fázist elkülönítjük. A szén-tetrakloridos fázis (2R, 3S)-izomer tartalmát az V. táblázatban mutatjuk be, az elegy lényegében nem tartalmaz (2S, 3R)-izomert. A termék kromatogramja metil-(2R, 2S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát csúcsot mutat, amelynek retenciósi ideje azonos a 2. példa szerint nyert termékével.

V. Táblázat

Alkalmazott enzim (10 mg/ml)	(2R, 3S) izomer (tartalom (mg/ml CCl ₄))
Palatáz A	(Aspergillus niger eredetű, gyártó: Novo) 1,2
Lipáz AY	(Candida cylindracea eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,3
Lipáz OF-360	(Candida cylindracea eredetű, gyártó: Meito Sangyo) 1,8
Lipáz CE	(Humicola lanuginosa eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,2
Palatáz M	(Mucor miehei eredetű, gyártó: Novo) 1,7
Lipáz P	(Pseudomonas fluorescens eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,6
Lipáz CES	(Pseudomonas sp eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,7
Lipáz YS	(Pseudomonas sp eredet, gyártó: Amano Seiyaku) 1,3
Lipáz	(Rhizopus chinensis eredetű, gyártó: Yuki-jirushi) 1,2
Lipáz (Sa- iken) 100	(Rhizopus japonicus eredetű, gyártó: Nagase Sangyo) 1,8
Lipáz P	(Rhizopus javanicus eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,2
Lipáz B	(Pseudomonas frag:22-39B eredetű, gyártó: Wako Junyaku) 1,2
Lipáz LP	(Chromobacterium viscosum eredetű, gyártó: Toyo Jozo) 0,7
Lipáz M	(Mucor javanicus eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,7
Talipáz	(Rhizopus delemar eredetű, gyártó: Tanabe Seiyaku) 1,6
Lipáz N	(Rhizopus niveus eredetű, gyártó: Amano Seiyaku) 1,6

7. Példa

40

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

500 ml 0,5 mol/literes pH = 7,5-ös, 5 g/liter lipáz OF-360-at (Candida cylindracea eredetű, gyártó: Meito Sangyo) tartalmazó foszfát-pufferbe 100 g racém metil-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot tartalmazó 500 ml toluolt adunk, a vizes fázist és a toluolos fázist 600 fordulat/perc sebességgel keverve elegyítjük, hogy a sztereoszelektív hidrolízis lejártszódjon.

45

A reagáltatást 6 órán át folytatjuk, majd a toluolos fázist elkülönítjük, és vákuumban bepároljuk. Így 42,5 g metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot nyerünk nyers kristályok formájában.

50

A 42,5 g nyers kristályhoz 140 ml izopropil-alkoholt adunk, az elegyet 80 °C hőmérsékleten 20 perces keveréssel oldjuk, majd fokozatosan, 3 óra alatt 80 °C-ról 20 °C-ra hűtjük, ezután 1 órára jégbe hűtjük, és a kicsapódott kristályokat kiszűrjük. Így 40,2 g kristályos metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidátot nyerünk.

55

Op: 87-88 °C

[α]_D²⁰ = -206,4° (c = 1, metanol)

Tisztaság: 99%.

60

1. Eljárás az (I) általános képletű 3-fenil-glicidil-sav-észterek 2R, 3S-aktív izomerjeinek előállítására – a képletben az A gyűrű 1–7 szénatomos alkoxi-csoporttal egyszerűen helyettesített fenilcsoport, R jelentése 1–7 szénatomos alkilcsoport –, *azzal jellemezve*, hogy

i) egy (I) általános képletű 2R, 3S- és 2S, 3R-izomerek elegyét tartalmazó racém 3-fenil-glicidil-sav-észtert olyan enzimmel reagáltatunk, amely az észterkötések sztereoszelektív hidrolizálására képes, ezzel 2S, 3R-izomert sztereoszelektíven hidrolizáljuk, és

ii) a 2R, 3S-izomert elkülönítjük és kigyűjtjük a reakcióelegyből.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy észteráz vagy lipáz enzimet alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás 1–7 szénatomos alkil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási anyagot és enzimet alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás metil-(2R, 3S)-3-(4-metoxi-fenil)-glicidát előállítására, *azzal jellemezve*, hogy megfelelő kiindulási anyagot és enzi-

65

met alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a sztereoszelektív hidrolízist az enzimnek és a 2R, 3S- és 2S, 3R-izomereket tartalmazó racém-3-fenil-glicidilsav-észternek oldószerben való reagáltatásával végezzük.

6. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimforrásként az adott enzimet termelő mikroorganizmus tenyészetét, a tenyészetből kigyűjtött mikroorganizmus sejteket vagy ezekből feldolgozott terméket alkalmazunk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az Absidia, Aspergillus, Fusarium, Gibberella, Mucor, Neurospora, Rhizopus, Trichoderma, Achromobacter, Alcaligenes, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Providencia, Pseudomonas, Serratia, Candida, Saccharomycopsis vagy a Nocardia nemzetséghez tartozó mikroorga-

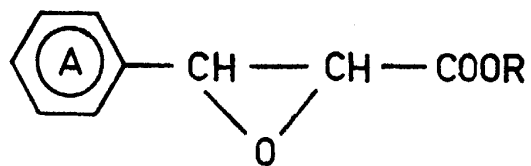
nizmust alkalmazunk.

8. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 0,05–20 tömeg/térf% szubsztrát koncentrációt alkalmazunk.

5 9. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reagáltatást vízből vagy vizes oldatból és szerves oldószerből álló kétfázisú oldószerrendszerben hajtjuk végre.

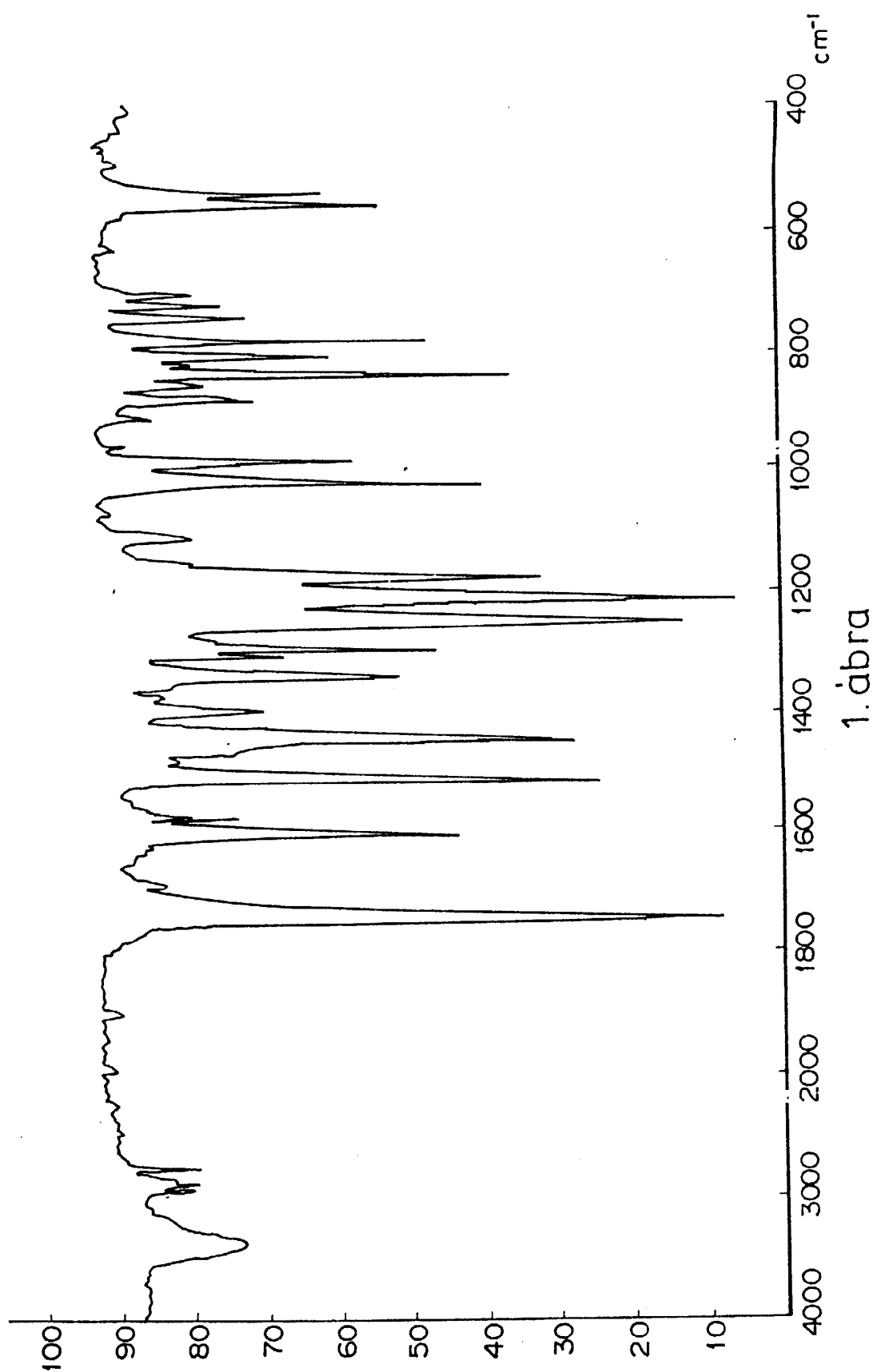
10 10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szerves oldószerként szén-tetrakloridot, kloroformot, diklór-metánt, triklór-etilént, klór-benzolt, benzolt, toluolt, xilolt, terc-butil-metil-étert, diizopropil-étert, dietil-étert, metil-izobutil-ketont, metil-etil-ketont, etil-acetátot, butil-acetátot, n-propil-alkoholt, izopropil-alkoholt, n-butil-alkoholt vagy terc-butil-alkoholt alkalmazunk.

15

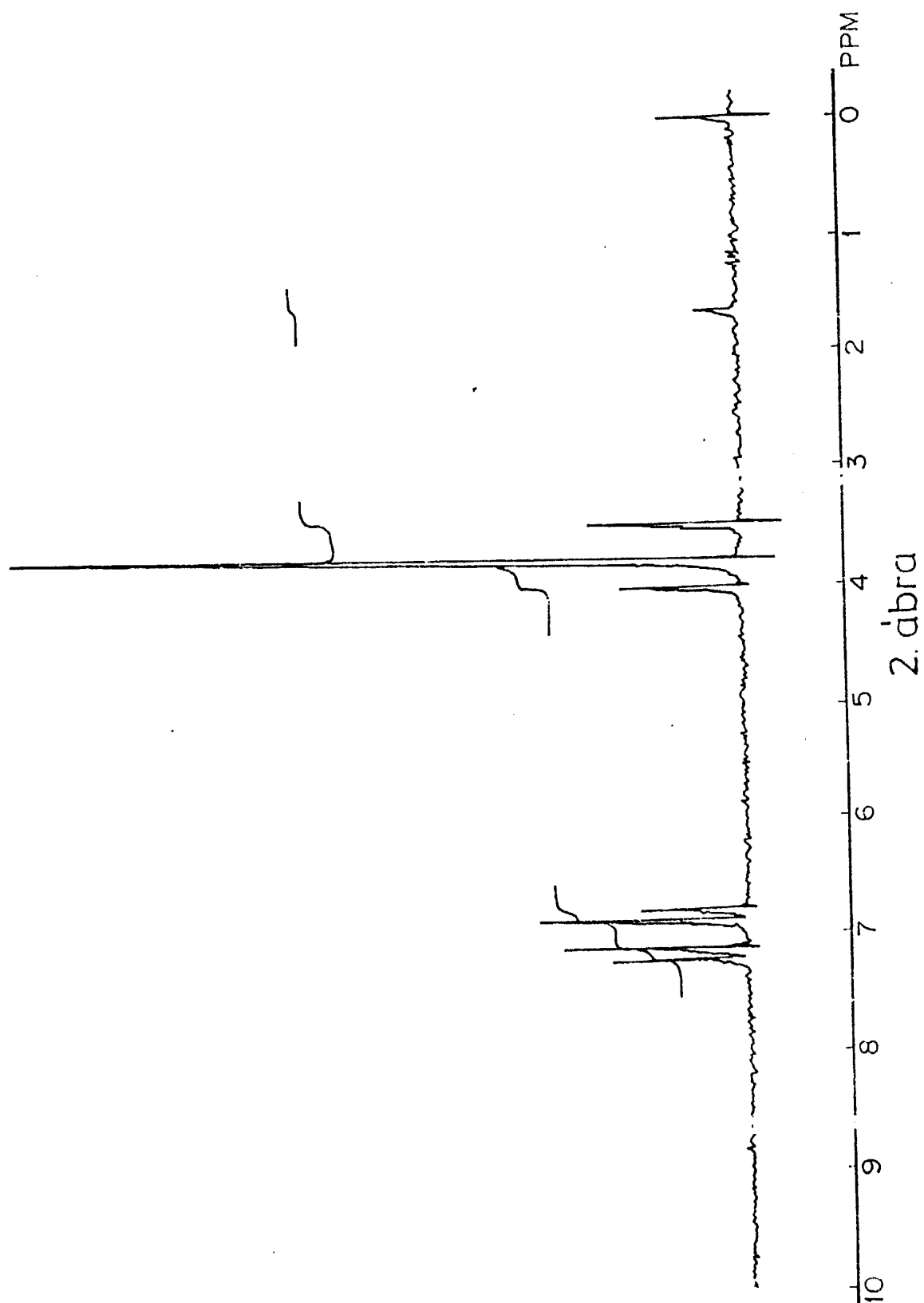


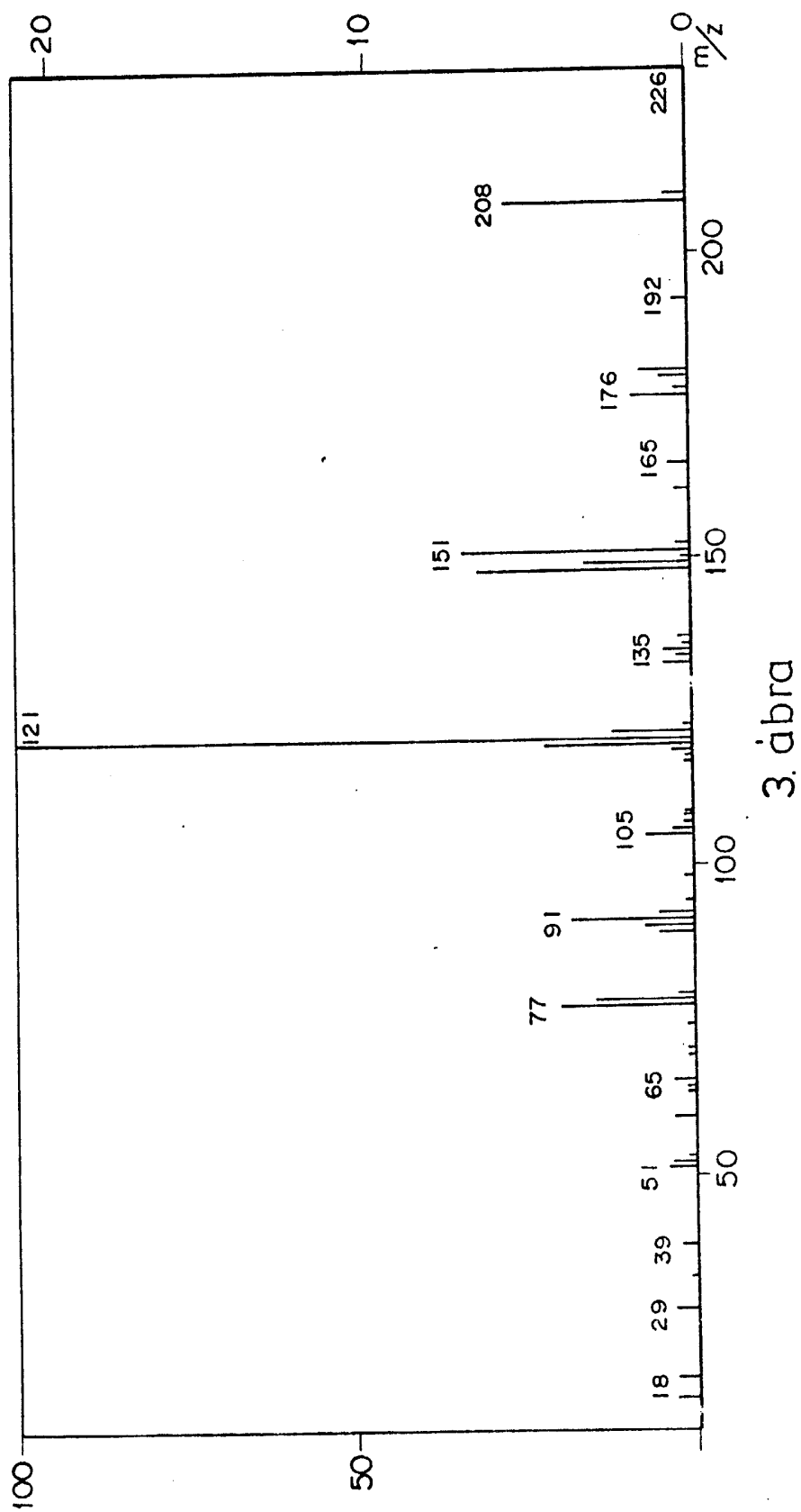
(I)

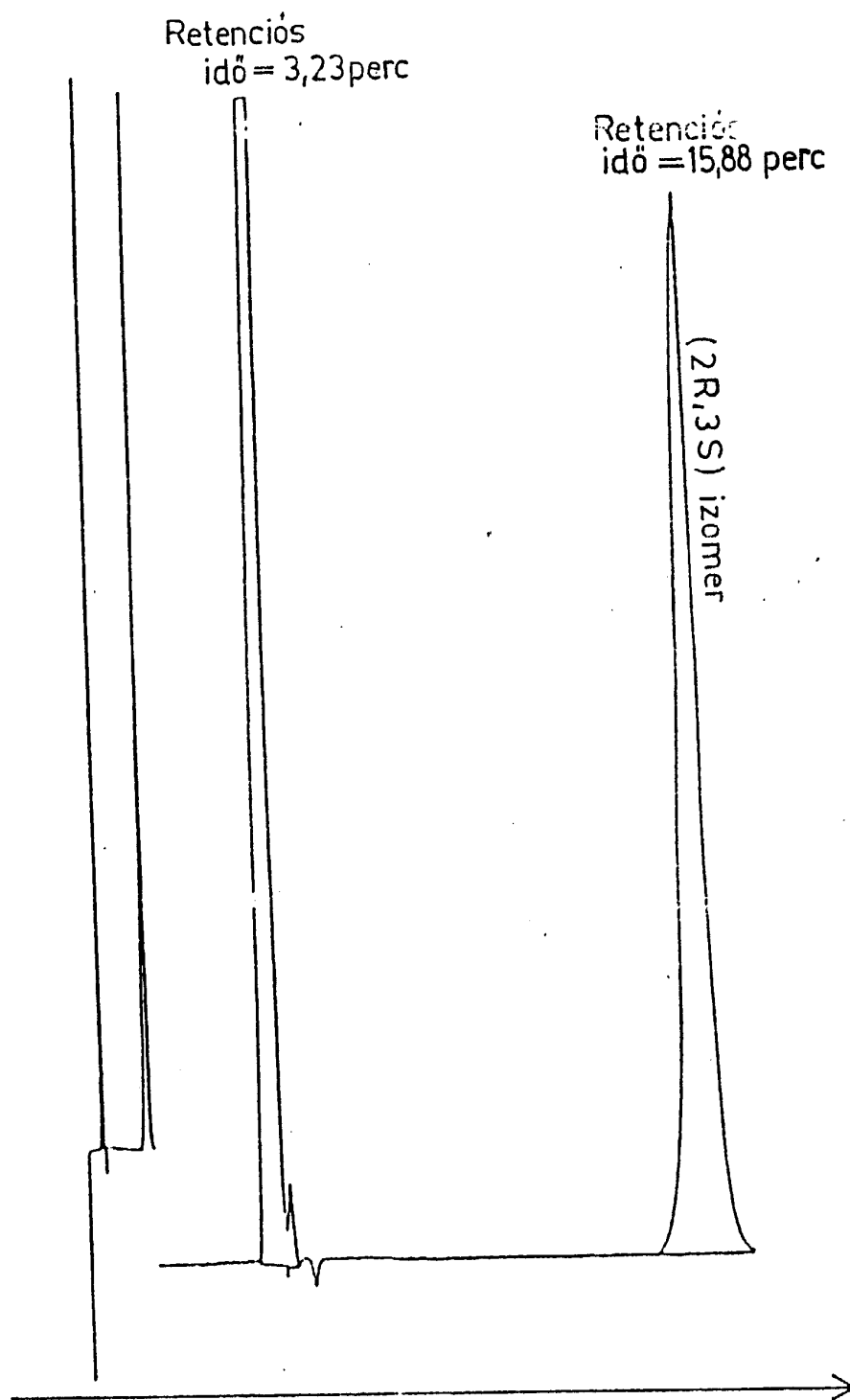
HU 203 581 B
Int. Cl⁵: C12P 17/02, C12P 7/62



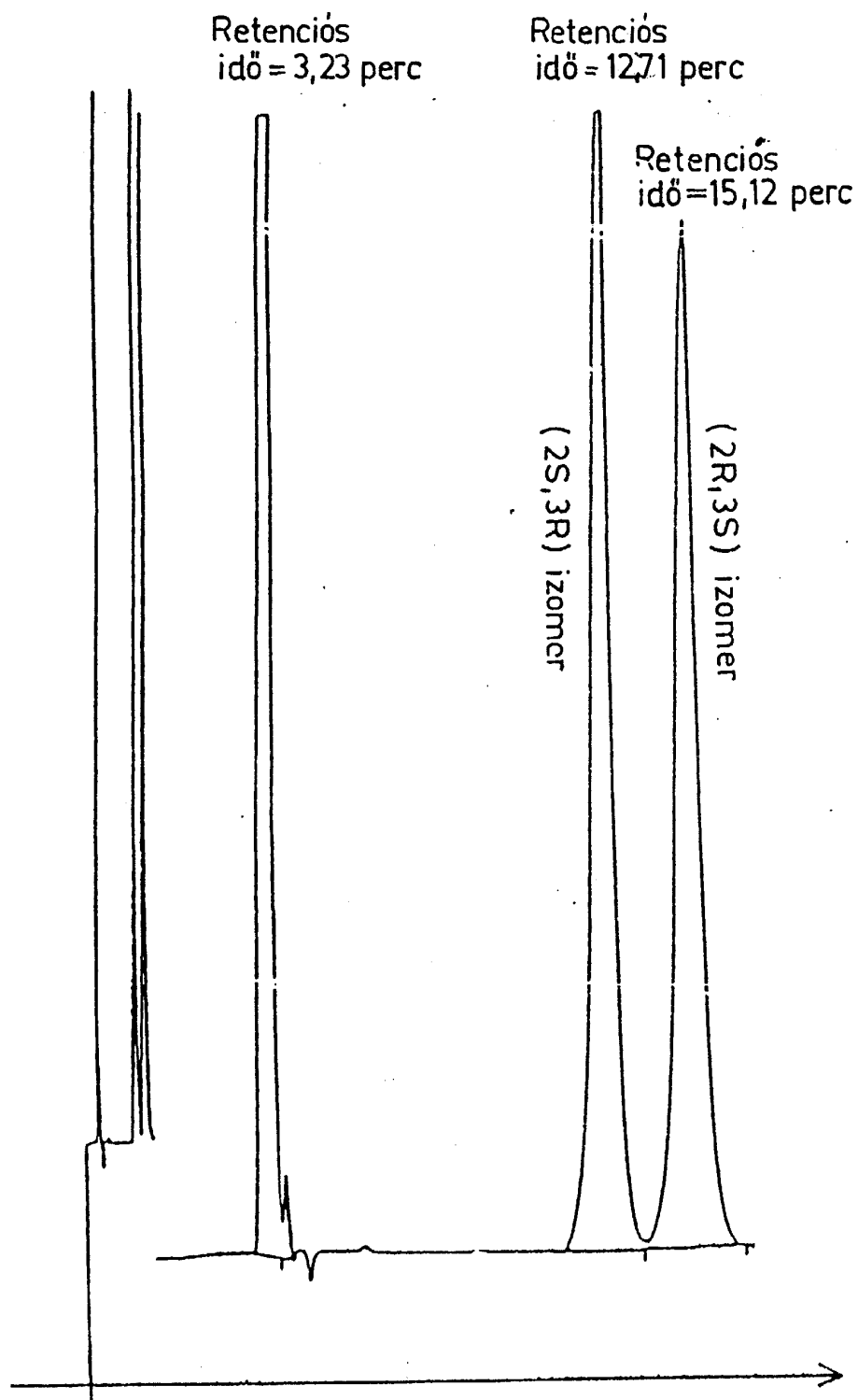
HU 203 581 B
Int. Cl⁵: C 12 P 17/02, C 12 P 7/62







4. ábra



5. ábra