

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236850**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426353**

(22) Data zgłoszenia: **17.07.2018**

(51) Int.Cl.
C07C 49/82 (2006.01)
C12P 7/02 (2006.01)
C12P 7/26 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(54)

**2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon
i sposób jednoczesnego otrzymywania
2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu
i 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

27.01.2020 BUP 03/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.02.2021 WUP 04/21

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JOANNA KOZŁOWSKA, Rawicz, PL
MIROŚLAW ANIOŁ, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Anna Kasperowicz

PL 236850 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon o wzorze 3 przedstawiony na rysunku.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób jednoczesnego otrzymywania 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu i 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu.

Wynalazek może mieć zastosowanie w przemyśle spożywczym jako substancja słodząca i farmaceutycznym jako składnik leku przeciwnowotworowego.

Znana jest metoda otrzymywania 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu w wyniku reakcji redukcji 2-hydroksy-4'-metylochalkonu z użyciem tosyłanu hydrazyny w obecności węgla potasu (Shang X. et al., *Tetrahedron*, 2015, 71, 8187–8193).

Znany jest również sposób otrzymywania pochodnych *trans*-chalkonu w wyniku mikrobiologicznych przekształceń polegający na redukcji wiązania C=C chalkonu (Stompor M. et al., *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016, 100, 8371–8384). Znany jest także sposób otrzymywania hydroksydihydrochalkonów z flawanonu na drodze mikrobiologicznych przekształceń w kulturach grzybów strzępkowych (Kostrzewa-Susłow E. et al. P *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2008, 52–53. 34–39).

W dostępnej literaturze brak doniesień na temat 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu i jego sposobu otrzymywania.

Istota wynalazku polega na tym, że mikrobiologiczne przekształcenie substratu, którym jest 2-hydroksy-4'-metylochalkon, prowadzi się za pomocą systemu enzymatycznego szczepu bakterii z rodzaju *Rhodococcus* albo *Gordonia*, przy czym substrat dodaje się po upływie od 40 do 56 godzin, a reakcję prowadzi się w temperaturze od 20 do 32°C. Mieszaninę transformacyjną ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, ekstrakt osusza się za pomocą środka suszącego. Następnie rozpuszczalnik odparowuje się, a surowy ekstrakt oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej.

Korzystnie jest gdy szczepem jest *Rhodococcus* sp. DSM 364.

Korzystnie także jest gdy szczepem jest *Gordonia* sp. DSM 44456.

Korzystnie również jest, gdy substrat dodaje się po upływie 48 godzin.

Korzystnie jest także, gdy proces redukcji prowadzi się wodną kulturą, przy ciągłym mieszaniu, w temperaturze od 20 do 32°C.

Dodatkowo korzystnie jest, gdy rozpuszczalnikiem organicznym jest octan etylu.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego bakterii z rodzaju *Rhodococcus* otrzymuje się znany 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon o wzorze 2, z wydajnością izolowaną 33,9% i 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon o wzorze 3 z wydajnością izolowaną 16,4%, w temperaturze pokojowej, przy ciśnieniu atmosferycznym, w środowisku wodnym i w pH bliskim obojętnego. W przypadku działania układu enzymatycznego bakterii z rodzaju *Gordonia* otrzymuje się znany 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon o wzorze 2, z wydajnością izolowaną 34,8% i 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon o wzorze 3 z wydajnością izolowaną 12,7%.

Sposób wykonania objaśniony w poniższych przykładach.

Przykład 1

Do trzech kolb płaskodennych o pojemności 2000 cm³, w których znajduje się po 300 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 1% peptobaku, 0,2% ekstraktu drożdżowego, 0,2% hydrolizatu kazeiny, 0,6% chlorku sodu, 2% glukozy, wprowadza się szczep *Rhodococcus* sp. DSM 364. Po 48 godzinach wzrostu dodaje się do każdej kolby po 30 mg 2-hydroksy-4'-metylochalkonu, o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ acetonu. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu przez 96 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie uzyskany roztwór transformacyjny ekstrahuje się trzykrotnie octanem etylu, osusza za pomocą siarczanu (VI) sodu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymuje się 279,6 mg surowego produktu, który oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent mieszaninę heksan : octan etylu w stosunku objętościowym 5:2. Na tej drodze otrzymuje się 30,8 mg 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu o wzorze 2, z wydajnością 33,9% i 15,9 mg 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu o wzorze 3 z wydajnością 16,4%.

Przykład 2

Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że do pożywki wprowadza się szczep *Gordonia* sp. DSM 44456. Otrzymuje się 267,5 mg surowego produktu, który oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent mieszaninę heksan : octan etylu w stosunku objętościowym 5:2. Na tej

drodze otrzymuje się 31,6 mg 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu o wzorze 2, z wydajnością 34,8% i 12,3 mg 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu o wzorze 3 z wydajnością 12,7%.

Dane spektroskopowe otrzymanych związków są następujące:

Znany 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon:

^1H NMR (600 MHz, chloroform-*d*) δ 8,12 (s, 1H, 2-OH), 7,90–7,86 (m, AA'BB', 2H, H-2', H-6'), 7,24 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7,14–7,08 (m, 2H, H-4, H-6), 6,94–6,89 (m, 1H', H-3), 6,88–6,82 (m, 1H, H-5), 3,45–3,41 (m, 2H, 2H- α), 3,05–3,01 (m, 2H, 2H- β), 2,40 (s, 3H, -CH₃).

^{13}C NMR (150 MHz, chloroform-*d*) δ 201,83 (C=O), 154,72 (C-2), 144,92 (C-4'), 133,71 (C-1'), 130,71 (C-6), 129,47 (C-3', C-5'), 128,60 (C-2', C-6'), 128,08 (C-4), 128,02 (C-1), 120,75 (C-5), 117,68 (C-3), 40,48 (C- α), 23,50 (C- β), 21,85 (-C₃H₃).

HR ESI-MS m/z : 241,1223 [M+H]⁺; obliczona dla C₁₆H₁₆O₂ [M+H]⁺ 241,1223

2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon

^1H NMR (600 MHz, chloroform-*d*) δ 7,89–7,83 (m, AA'BB', 2H, H-2', H-6'), 7,75 (s, 1H, 2-OH), 7,26–7,21 (m, AA'BB', 2H, H-3', H-5'), 6,79 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H-6), 6,62 (d, $J = 3,0$ Hz, 1H, H-3), 6,58 (dd, $J = 8,5, 3,0$ Hz, 1H, H-5), 4,77 (s, 1H, 4-OH), 3,42–3,38 (m, 2H, 2H- α), 2,98–2,94 (m, 2H, 2H- β), 2,40 (s, 3H, -CH₃)

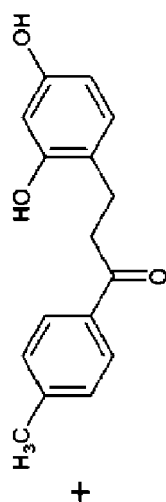
^{13}C NMR (150 MHz, chloroform-*d*) δ 201,68 (C=O), 149,48 (C-4), 148,36 (C-2), 144,97 (C-4'), 133,69 (C-1'), 129,49 (C-3', C-5'), 129,24 (C-1), 128,60 (C-2', C-6'), 118,54 (C-6), 116,92 (C-3), 114,76 (C-5), 40,37 (C- α), 23,60 (C- β), 21,85 (-C₃H₃).

HR ESI-MS m/z : 257,1173 [M+H]⁺; obliczona dla C₁₆H₁₆O₃ [M+H]⁺ 257,1172

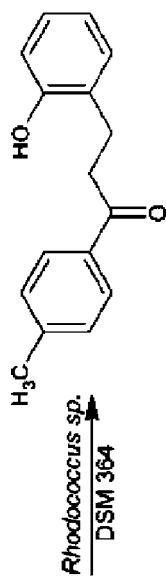
Zastrzeżenia patentowe

1. 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkon o wzorze 3 przedstawiony na rysunku.
2. Sposób otrzymywania 2-hydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu, w którym jako substrat stosuje się 2-hydroksy-4'-metylochalkon i 2,4-dihydroksy-4'-metylo- α,β -dihydrochalkonu, **znamienny tym**, że mikrobiologiczne przekształcenie 2-hydroksy-4'-metylochalkonu o wzorze 1, prowadzi się za pomocą systemu enzymatycznego szczepu bakterii z rodzaju *Rhodococcus* albo *Gordonia*, przy czym substrat dodaje się po upływie od 40 do 56 godzin a reakcję prowadzi się w temperaturze od 20 do 32°C, po czym mieszaninę transformacyjną ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, po czym ekstrakt osusza się za pomocą środka suszącego, rozpuszczalnik odparowuje się a następnie surowy produkt oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej.
3. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję redukcji prowadzi się za pomocą szczepu *Rhodococcus sp.* DSM 364.
4. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję redukcji prowadzi się za pomocą szczepu *Gordonia sp.* DSM 44456.
5. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że substrat dodaje się po upływie 48 godzin.
6. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję redukcji prowadzi się wodną kulturą, przy ciągłym mieszaniu.
7. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcję redukcji prowadzi się w temperaturze od 20 do 32°C.
8. Sposób, według zastrz. 2, **znamienny tym**, że rozpuszczalnikiem organicznym jest octan etylu.

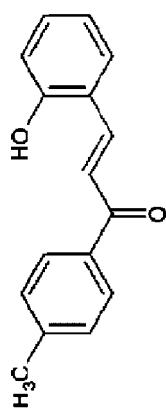
Rysunki



WZÓR 3



WZÓR 2



WZÓR 1