



УКРАЇНА

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВО(19) UA (11) 26382 (13) C1
(51) C 07 C 255/16, 253/08ОПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД

(54) ЕНАНТИОСЕЛЕКТИВНИЙ СПОСІБ ОТРИМАННЯ S-ЕНАНТИОМЕРУ ОПТИЧНО АКТИВНОГО ЦΙΑНГІДРИНУ

1

(21) 93003017
(22) 18.06.93
(24) 30.08.99
(31) A 2174/91
(32) 31.10.91
(33) AT
(46) 30.08.99. Бюл. № 5
(56) JACS, 1991, 113, 6992-6996.
(72) Грінгль Херфрід (АТ), Клемпір Норберт (АТ), Пехлауер Петер (АТ)
(73) ДСМ ХЕМІ ЛІНЦ ГМБХ (АТ)
(57) 1. Энантиоселективный способ получения S-энантиомера оптически активного циангидрина взаимодействием соответствующего альдегида или метилкетона с донором цианогруппы общей формулы $R_1R_2C(OH)(CN)$, где R_1, R_2 - алкильный остаток, в присутствии фермента с выделением образовавшегося циангидрина из реакционной смеси, отличающийся тем,

2

что в качестве фермента используют S-оксинитриллиазу с активностью по меньшей мере 500, предпочтительно 500-2000 ME, и процесс ведут в среде разбавителя при pH 3-5.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве донора цианогруппы используют ацетонциангидрин.

3. Способ по любому из пп. 1 и 2, отличающийся тем, что в качестве разбавителя используют водный разбавитель.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что в качестве S-оксинитриллиазы используют S-оксинитриллиазу из рода *Hevea Brasiliensis* или *Sorghum bicolor*.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что выделение и очистку циангидрина осуществляют хроматографированием.

Изобретение касается ферментного способа энантиоселективного получения оптически активных циангидринов из альдегида или несимметричного кетона и донора цианогруппы при воздействии оксинитриллиазы.

Циангидрины являются ценными продуктами для синтеза альфа-оксикислот, которые используются при получении биологически активных веществ, например, фармацевтических активных веществ, витаминов, а также пиретроидных соединений.

В J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 6992-6996 описан способ получения R-циангидринов реакцией обмена ароматических или алифатических альдегидов с ацетонциангидрином в присутствии D-оксинитриллазы. Чтобы получить обогащенный энантиомерами продукт, процесс необходимо проводить в присутствии органического, не смешивающегося с водой растворителя, так как один водный раствор приводит к рацемизации продукта.

Заявителем неожиданно был найден энантиоселективный способ получения S-

(19) UA (11) 26382 (13) C1

энантиомера оптически активного циангидрина, при котором образуются продукты с высокой оптической чистотой и при котором не нужно использовать цианитоводородную кислоту и органический растворитель. S-циангидрины, произведенные от алифатических альдегидов, могут таким образом быть получены при помощи S-оксинитриллизаы.

Предметом изобретения является энантиоселективный способ получения S-энантиомера оптически активного циангидрина путем реакции обмена между альдегидом или несимметричным кетоном и донором цианогруппы, который отличается тем, что проводится реакция обмена между альдегидом или кетоном в разбавителе в присутствии S-оксинитриллизаы и донором цианогруппы, после чего осуществляется выделение образующегося циангидрина из реакционной смеси.

В качестве исходных материалов в предложенном в изобретении способе используются альдегид или несимметричный кетон, донор цианогруппы, оксинитриллизаа и разбавитель.

В качестве альдегида используют алифатические или ароматические альдегиды. В качестве кетона используют метилкетон.

В качестве донора цианогруппы применяется циангидрин общей формулы $R_1R_2C(OH)(CN)$, в которой R_1 и R_2 независимо друг от друга означают алкильный остаток.

Получение донора цианогруппы может осуществляться известными способами.

В качестве оксинитриллизаы применяется S-оксинитриллизаа, например, из рода *Sorghum bicolor* и *Hevea brasiliensis*. Наиболее подходящей оказалась оксинитриллизаа из рода *Hevea brasiliensis*. Оксинитриллизаа может при этом использоваться в очищенном или в неочищенном виде, как сама по себе или в иммобилизированной форме. Подготовка и очистка оксинитриллизаы может осуществляться, например, осаждением с сульфатом аммония и последующей фильтрацией через гель, как это показано в работе D. Selmer et al., *Physiologia Plantarum* 75 (1989), 97-101.

Способ согласно изобретению осуществляют в разбавителе. Особенно предпочтительным оказалось проводить реакцию обмена в водном разбавителе без добавок органических растворителей, которые сильно гасят активность фермента, причем, это неожиданно, не происходит рацемизации продукта. Однако предложен-

ный способ может также проводиться и в органическом разбавителе или в присутствии органического растворителя. Органический растворитель может при этом служить как соразтворитель в водной системе или как растворитель в двухфазовой системе, например, в мембранном реакторе. В качестве органических разбавителей могут использоваться алифатические или ароматические углеводороды, галогенированные в соответствующих случаях; спирты; простые эфиры; сложные эфиры.

В качестве органического соразтворителя могут использоваться смешивающиеся с водой органические растворители, как например, спирты, а в качестве растворителей в составе двухфазовой системы — несмешивающиеся с водой органические растворители, как например, алифатические или ароматические углеводороды, галогенированные при необходимости, а также простые и сложные эфиры. В качестве водного разбавителя используется вода, водный солевой или водный буферный раствор. Предпочтение отдается водному буферному раствору и особенно такому, который содержит цитрат натрия. Величина pH должна при этом быть ниже 7, предпочтительнее от 3 до 5.

На 1 г альдегида или несимметричного кетона добавляют примерно от 150 до 300 г разбавителя и оксинитриллизау в количестве по меньшей мере 500, предпочтительно от 500 до 2000 ME активности.

На моль используемой альдегидной или кетонной группы используется не менее 1 моль, а предпочтительнее от 1 до 2 моль донора цианогруппы.

Процесс проводят путем встряхивания или перемешивания реакционной смеси при температуре примерно от 0 до температуры дезактивирования оксинитриллизаы, предпочтительнее при температуре от 20 до 30°C.

При этом цианогруппа донора переходит к атому карбонильного углерода используемого альдегида или кетона и образуется преимущественно S-энантиомер оптически активного циангидрина, соответствующего используемому альдегиду или кетону. За ходом реакции следят методом газовой хроматографии.

После окончания реакции образовавшийся циангидрин экстрагируют из реакционной смеси при помощи органического растворителя, который не смешивается с водой, например, алифатическими или ароматическими, при необходимости галогенированными углеводородами, такими как пентан, гексан, бензол, толуол,

метиленхлорид, хлороформ, хлорбензолы, простыми эфирами, такими как диэтиловым эфиром, диизопропиловым эфиром или сложными эфирами, например, этиловым эфиром уксусной кислоты или смесями таких растворителей. Если чистота экстрагированного продукта недостаточна, то затем может следовать операция очистки. Очистка может осуществляться каким-либо известным способом, но лучше всего ее проводить методом хроматографии.

В соответствии с предпочтительной формой осуществления производят встряхивание при комнатной температуре смеси из примерно 100 мг альдегида в водном буферном растворе в количестве от 15 до 30 г с pH равной примерно 4, содержащем цитрат натрия, вместе с 2 молями ацетонциангидрина на каждый моль используемой альдегидной или кетонной группы и оксинитриллизой из *Nevea Brasiliensis* активностью 200 МЕ. За ходом реакции следят методом газовой хроматографии. После окончания реакции реакционную смесь экстрагируют метиленхлоридом, органическую фазу высушивают и упаривают. Последующую очистку остатка можно осуществлять методом колоночной хроматографии.

Пример 1. 100 мг капрональдегида (1 ммоль) растворяют в 20 мл 0,1 молярного цитратного буфера с величиной pH равной 4, к раствору добавляют 1 г ферментного неочищенного изолята с активностью 100 МЕ на грамм в виде высушенного лиофильной сушкой порошка, полученного в соответствии с методом D. Selmar et al., *Physiologica Plantarum* 75 (1989), 97-101, и 168 мг ацетонциангидрина (2 ммоль), и встряхивают смесь в устройстве для встряхивания в течение 2 часов при комнатной температуре. За ходом реакции следят с помощью газовой хроматографии. После окончания реакции трехкратно экстрагируют по 25 мл метиленхлорида. Органические фазы объеди-

няют, сушат над сульфатом натрия и растворитель отгоняют в ротаторном испарителе.

При этом получают 114 мг, что составляет 90% от теоретического выхода, S-капрональдегидциангидрина с чистотой энантиомера 84%.

Пример 2. Осуществляют взаимодействие между 80 мг бензальдегида (0,75 ммоль) и 128 мг ацетонциангидрина (1,5 ммоль), как это описано в примере 1, в 15 мл 0,1 молярного цитратного буфера (pH 4) и 1 г описанного в примере 1 ферментного изолята.

При этом получают 45 мг, что составляет 45% от теоретического выхода, S-бензальдегидциангидрина с чистотой энантиомера 94%.

Определение оптической чистоты образующихся альдегидциангидринов осуществляют газохроматографическим методом на капиллярной колонке через метилкарбонат в соответствии с методом J.W. Westley et al., *J. Org. Chem.* 33 (1968), 3978-3980.

Определение оптической чистоты кетонциангидринов осуществляют газохроматографическим методом на хиральной разделительной фазе в соответствии с методом V. Schuig et al., *Ang. Chemie* 102 (1990), 969-986.

Пример 3. 100 мг метилпропилкетона (1,16 ммоль) растворяют в 15 мл 0,1 молярного цитратного буфера с значением pH 4, смешивают с 0,6 неочищенного ферментного изолята с активностью 100 МЕ на грамм в виде высушенного при вымораживании порошка (получен по D. Selmar и др. *Physiologica Plantarum* 75, 1989, 97-101) и с 198 мг ацетонциангидрина (2,32 ммоль) и встряхивают 2 ч при комнатной температуре. Реакцию контролируют с помощью газовой хроматографии. После установления равновесия газохроматографический анализ показан 40% метилпропилкетонциангидрина с энантиомерной чистотой 61%.

Упорядник

Техред М. Келемеш

Коректор М. Самборська

Замовлення 504

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

