

Racém (Z)-2,3-epoxibutanol-származékok enzimkatalizált kinetikus rezolválása

Kinetic Resolution of Racemic (Z)-2,3-epoxybutanol Derivatives

FARKAS Ferenc¹, BATTANCS Melinda¹, THURNER Angelika²,
SIMÁNDI Béla³, POPPE László⁴, FAIGL Ferenc²

¹ BME Szerves Kémiai Technológia Tanszék, H-1111 Budapest, Budafoki út 8.

² MTA Szerves Kémiai Technológia Tanszéki Kutatócsoport, H-1111 Budapest, Budafoki út 8.,

³ BME Vegyipari Műveletek Tanszék, H-1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3.,

⁴ BME Szerves Kémia Tanszék, H-1111 Budapest, Szt. Gellért tér 4.

ABSTRACT

A new enzyme catalysed kinetic resolution of cis-4-benzyloxy-2,3-epoxybutanol and cis-4-trityloxy-2,3-epoxybutanol has been reported. In the first case an efficient and scalable separation of the optically active alcohol from its ester derivative has been solved with liquid-liquid and solid-liquid extraction methods using commercial organic solvents and supercritical carbon dioxide. Enantiomeric enrichment of the optically active cis-4-trityloxy-2,3-epoxybutanol acetate was accomplished by selective crystallization of the racemic part of the ester. Optically pure oxiranol has been obtained by the enzyme catalysed hydrolysis of the acetate derivatives, too.

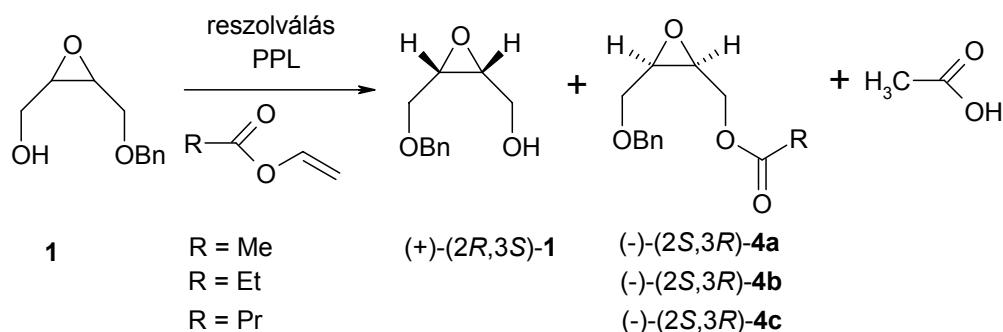
ELŐZMÉNYEK

Az optikailag aktív oxiránok fontos gyógyszeripari intermedierek. Az Andeno-DSM cég például több tonnás méretben hajtja végre a 2-hidroximetiloxirán rezolválását [1]. A 2,3-diszubsztituált oxiránok fémorganikus vegyületek által indukált sztereoselektív átrendeződési reakcióival optikailag aktív alkohol-, oxetán- és *cisz*-but-2-én-1,4-diol-származékokat állíthatunk elő [2-4]. Ezek a vegyületek olyan biológiailag aktív vegyületek szintézisének kiinduló anyagai lehetnek, mint az Oxetanocin A [5]. Optikailag aktív oxiránokat többféle módon állítottak már elő, ezek közül az egyik legismertebb a Sharpless oxidáció, mikor allil-alkoholokat oxidálnak *terc*-butil-hidroperoxiddal, titán-izopropoxid és királis katalizátor jelenlétében [6]. Egy korábbi közleményünkben beszámoltunk két, amino-csoportot tartalmazó oxirano-éter diasztereomer sóképzéses rezolválásáról. A módszer hátránya, hogy minden amino-oxirán-származék rezolválására új eljárást kell kidolgozni. A probléma megoldása a (Z)-4-benziloxi-2,3-epoxibutanol (**1**) optikai izomerjeinek szétválasztása lehet, ugyanis az enantiomertiszta **1**-vegyületből előállíthatunk számos optikailag aktív oxiranil-étert. Azt tapasztaltuk azonban, hogy a kutatócsoport számára szükséges (Z)-1-benziloxi-4-trifenilmetoxi-2,3-epoxibután (**2**) az **1** alkohol tritilezésével nem állítható elő, valószínűleg a tritilcsoport nagy térkitöltése miatt. A fordított sorrendű reakció, vagyis a *cisz*-2-butén-1,4-diol monotritilezését követő epoxidálás, és a kapott (Z)-4-tritiloxi-2,3-epoxibutanol (**3**) benzilezése jó hozammal szolgáltatja a **2** vegyületet. Emiatt célul tűztük ki mind a racém **1**, mind pedig a racém **2** alkohol enzimkatalizált szelektív észterezésével történő rezolválásának vizsgálatát.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A racém **1**-alkoholt irodalomból ismert úton állítottuk elő a kereskedelemben kapható *cisz*-2-butén-1,4-diolból kiindulva nátrium-hidrides monoalkoholát-képzést követő benzilbromidos reakcióval, majd *meta*-klórperbenzoesavas oxidációval. A megfelelő szelektivitású enzim kiválasztásához modellkísérleteket hajtottunk végre. A következő enzimeket teszteltük 20 mg-os reakciókban: *Amano lipázok* (AK, AZ, F, M, PS és R), *Novozym 435*, *Lipase IM 20*, *Lipase TL IM*, *porcine liver észteráz*, *Candida rugosa lipáz*, *Pseudomas fluorescens lipáz*, *α -kimotripszin*, *papain*, *Candida cylindraceae lipáz* és *porcine pancreatic lipáz*. Acilező ágensként vinil acetátot használtunk hexán oldószerben. Királis állófázisú kolonnán végzett gázkromatográfiás vizsgálattal követtük a reakciókat. A **2a** acetát termelésének és a maradék **1** alkohol ee értékeinek összehason-

lítása után a *porcine pancreatic lipáz* (PPL) bizonyult a legaktívabb és legjobb enantioszelektivitású katalizátornak, ezért a további optimalizálási reakciókat ezzel az enzimmal végeztük el (1. ábra).

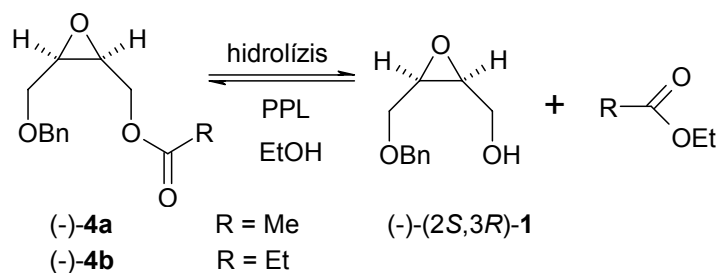


1. ábra

Az 1 alkohol PPL katalizált kinetikus rezolválása. Az alkohol abszolút konfigurációja irodalomból ismert [7]

Az enzim kiválasztása után a reakció oldószerfüggését vizsgáltuk. Számos oldószert kipróbáltunk (kloroform, diklórmetán, aceton, hexán, vinilacetát, tetrahydrofurán/hexán, ciklohexán, toluol, etil-acetát, acetonitril, tetrahydrofurán, dietil-éter), a legjobb eredményt tetrahydrofurán-hexán 1:1 arányú oldószerkelettel kaptuk. Végül azt vizsgáltuk, hogy hogyan függ a rezolválás az acilező ágénstől (vinil-acetát, vinil-propionát és vinil-butirát, 1. ábra). A reakció a vinil-butirát esetén a leggyorsabb, 2 óra alatt értük el az 50%-os konverziót, míg vinil-acetát esetén ehhez 3 óra kellett. A reakció enantioszelektivitása viszont nem függött az acilcsoport minőségétől.

Részletesen tanulmányoztuk az előállított optikailag aktív észterek (**4a-b**) enzimkatalizált alkoholizisét is. Megállapítottuk, hogy a PPL által katalizált alkoholizis jóval lassabban megy végbe, mint az észteresítés, 48 óra alatt 75%-os konverziót értünk el. A PPL enzim mind az észteresítés, mind az alkoholizis során a (2S,3R)-**1** enantiomer reakcióit preferálja, így gyakorlatilag enantiomertiszta (ee>99) (-)-**1** alkoholt kaphatunk az alkoholizis után.



2. ábra

A (-)-4a és (-)-4b észterek alkoholizise

Az **1** alkohol és a **4a-c** észterek oszlopkromatográfiával jól elválaszthatók, de ennek alkalmazása többgrammos méretben elég hosszadalmas. Ezért különböző extrakciós módszerekkel vizsgáltuk az enantiomerek elválaszthatóságát. Elsőként a hexán/vizes-metanol kétfázisú rendszert használtunk, feltételezve, hogy az apolárisabb észter az apoláris hexánban dúsul fel. A metanol/víz arányt változtatva sorozatkísérleteket hajtottunk végre és megállapítottuk, hogy a legjobb szelektivitás metanol/víz 1:9 (v/v) összetételű elegynél érhető el. Az extrakciót **1** és **4a** keverékéből kiindulva többgrammos méretben megismételtük úgy, hogy a keveréket feloldottuk a vizes metanolban, és az oldatot ötször extraháltuk hexánnal. A hexános fázis 95:5 arányban tartalmazta a **4a** és **1** elegyét. Ezt a fázist extraháltuk metanol/víz eleggyel, így 57%-os termeléssel nyertük ki a tiszta **4a** acetátot. Az eredeti vizes metanolos oldatból 75%-os hozammal kaptuk a tiszta **1** alkoholt.

A folyadék-szilárd extrakciós elválasztási módszert **1** és **4b** keverékének példáján mutatjuk be. Az elválasztás azon alapul, hogy a szilárd hordozók különbözőképpen adszorbeálják a poláris **1** alkoholt és az apoláris

4b észtert. Ezért, az enzim kiszűrését követően a szűrletbe különböző szilárd hordozóanyagokat (Szilikagél, Celit, Perfil, Florisil) szuszpendáltunk és az oldószert lepároltuk, majd a szilárd maradékot hexánnal kevertük és újra szűrtük. A **4b** propionátot a hexános szűrletből nyertük ki, az **1** alkoholt a szilárd fázisról mostuk le diklórmetánnal. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Ebből látható, hogy szilikagél hordozó esetén 69%-os termeléssel kapjuk meg a tiszta **4b** propionátot, celit hordozó alkalmazásakor pedig 55% termeléssel nyerhetjük az ugyancsak tiszta **1** alkoholt.

1. táblázat

A hexános és diklórmetános oldat összetétele szilárd-folyadék extrakció esetén

Hordozó (1g)		Perfil	Florisil	Celit	Szilikagél
Kiindulási elegy	1 (g)	0,1900	0,1900	0,1900	0,1900
	4b (g)	0,3100	0,3100	0,3100	0,3100
Hexános oldat	1 (g)	0,0662	0,0482	0,0687	0,2131
	4b (g)	0,2638	0,2418	0,2954	----
Diklórmetános oldat	1 (g)	0,1187	0,1057	0,1041	0,0754
	4b (g)	0,0313	0,0143	----	0,0780

Közismert, hogy a szuperkritikus szén-dioxid a hexánhoz hasonló oldóképességű apoláris oldószert, így az észtereket (**4a-c**) szuperkritikus extrakcióval is ki lehet nyerni. A módszert először **1** és **4a** szétválasztására próbáltuk ki 39 °C-on és különböző nyomásokon (90 bar, 160 bar), de az elválasztás nem volt kellő hatékonyságú. Sokkal jobb eredmény értünk el amikor acetát helyett propionátot alkalmaztunk, ugyanis az acilcsoport szénláncának növelésével nő a polaritáskülönbség az alkohol és az észter között. Az enzimatis reakcióból származó, **1** és **4b** keverékét tartalmazó reakcióelegyet szilikagélre pároltuk, majd extraktor csöbe töltöttük és szuperkritikus szén-dioxiddal 33 °C-on, 100 bar nyomáson extraháltuk. A szilárd fázist metanollal extrahálva kaptuk meg az alkoholt. Mind az **1** alkoholt, mind a **4b** észtert jó hozammal és jó enantioszelektivitással nyertük ki (2. táblázat). Megjegyzendő, hogy szuperkritikus széndioxidban végzett enzimatis reakciók ismertek az irodalomból, de az általunk kidolgozott elválasztási módszer az első példa arra, hogy a reszolválás eredményeként kapott alkohol/észter keverékét szuperkritikus állapotú széndioxiddal választjuk szét.

2. táblázat

*Az **1** alkohol és **4b** észter szétválasztása szuperkritikus extrakcióval*

	Kiindulási keverék	I. Extraktum (CO ₂)	II. Extraktum (CO ₂)	Maradék (MeOH)
Tömeg (g)	2,13	1,01	0,17	0,81
Alkohol 1 (%)	38	7	17	97
Propionát 4b (%)	62	93	83	3

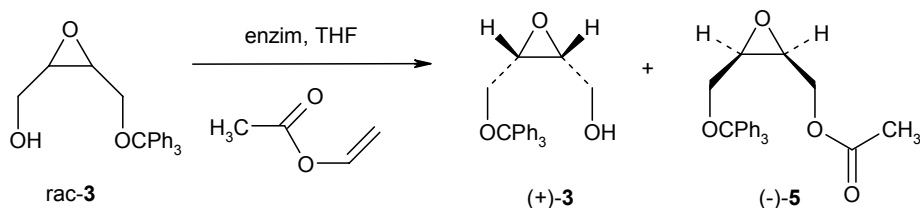
A racém **3** epoxialkohol előállítása hasonló az előzőhöz, azzal a különbséggel, hogy itt a nátriumhidrides sóképzés után tritilkloriddal reagáltattuk az alkoholátot. A **3** alkohol enantiomerjeinek elválasztására legmegfelelőbb enzim kiválasztása céljából ugyancsak tesztreakciókat hajtottunk végre az **1** esetben is vizsgált lipáz enzimekkel. Ebben az esetben tetrahydrofuranban vinil-acetátot alkalmaztunk acilezőszerként és a reakciótermékeket (**3**, **5**) királis állófázisú HPLC-vel analizáltuk. A legjobb eredményeket a *Lipozim TL IM* és *Amano Lipáz PS* enzimekkel értük el. Preparatív méretben először a *Lipozim TL IM* enzimet próbáltuk ki, optimális oldószernek a tetrahydrofuran és vinil-acetát 2 : 1 arányú elegye bizonyult (3. táblázat).

3. táblázat

*A **3** alkohol észtersítése Lipozim TL IM enzim jelenlétében*

idő (óra)	5 észter (mol%)	3 alkohol (mol%)	3 alkohol ee (%)
5	48	52	66
7	51	49	80
18	75	25	100

A táblázatból látható, hogy akkor érünk el jó enantioszelektivitást, ha az alkohol több mint 50%-át észtereszítjük. Az Amano Lipáz PS használata esetén hasonló körülmények között jobb enantioszelektivitást érünk el, 24 óra reakcióidő után 51%-os konverzióval képződött az **5** acetát, míg a reagálatlan alkohol enantiomertisztasága ee 93% volt.



3. ábra

A (Z)-4-tritiloxi-2,3-epoxibutanol (**3**) enzimkatalizált kinetikus rezolválása

A **3** alkoholt és az **5** acetátot oszlopkromatográfiával választottuk szét, a szuperkritikus extrakció itt nem vezetett eredményre. Lipozim TL IM enzim használatakor a (-)-**5** acetát enantiomertisztasága (ee) 80% volt, ezért átkristályosítással próbáltunk enantiomerdúsulást elérni. Megállapítottuk, hogy az etanolból kiszűrt kristály csaknem racém, míg a szűrletben gyakorlatilag enantiomertiszta (-)-**5** maradt (ee > 99%). Az **5** acetát erős racemátképző hajlamát a racém (op.: 121-122 °C) és az optikailag tiszta (op.: 39-41 °C) formák közötti jelentős olvadáspont-különbség is jelzi.

Az optikailag tiszta (-)-**3** alkoholt a (-)-**5** észter enzimkatalizált hidrolízisével állítottuk elő, ugyanis a báziskatalizált hidrolízisnél az oxirángyűrű felnyílhat. Az optimalizálás során kiderült, hogy Amano Lipáz PS enzim jelenlétében, acetonitril és foszfát-puffer keverékében a hidrolízis sebessége függ a lipáz/észter aránytól, és a hőmérséklettől is (4. táblázat).

4. táblázat

A (-)-**5** észter hidrolízise különböző mennyiségű Amano Lipase PS jelenlétében

Amano Lipase PS/(-)- 5 [mol/mol]	Reakció idő [nap]	Hőmérséklet [°C]	Termelés (-)- 3 [%]	(-)- 3 ee [%]
0.9	8	23-25	71.4 ^a (56) ^b	100
1.7	5	23-25	91.2 ^a (68) ^b	100
0.9	5	35-40	93.2 ^a (77) ^b	100

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatásokat az OTKA támogatásával, a CNR (Firenze)-MTA kétoldalú együttműködés keretében végeztük (OTKA projektek száma: T 048362 és T 42805).

IRODALOMI HIVATKOZÁSOK

- [1] W.E. Ladner, G.M. Whitesides: *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7250 (1984).
- [2] A. Mordini, S. Bindi, S. Pecchi, A. Degl'Innocenti, G. Reginato, A. Serci: *J. Org. Chem.*, **61**, 4374 (1996).
- [3] A. Thurner, F. Faigl, L. Tőke, A. Mordini, M. Vallachi, G. Reginato, G. Czira: *Tetrahedron*, **57**, 8173.(2001)
- [4] A. Thurner,; F. Faigl,; A. Mordini,; A. Bigi,; G. Reginato,;L. Tőke, *Tetrahedron*, **54**, 11597 (1998).
- [5] D.M. Huryn, M. Okabe: *Chemical Reviews*, **92** (8), 1745 (1992).
- [6] Y. Gao, R.M. Hanson, J.M. Klunder, S.Y. Ko, H. Masamune, K.B. Sharpless: *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5765 (1987).
- [7] F. Faigl, A. Thurner, G. Tárkányi, J. Kovári, A. Mordini: *Tetrahedron: Asymetry*, **13**, 59 (2002).