

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **226309**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **407242**

(22) Data zgłoszenia: **18.02.2014**

(51) Int.Cl.
C12P 7/26 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania (R)-flawanonu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

24.11.2014 BUP 24/14

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.07.2017 WUP 07/17

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL
MONIKA DYMARSKA, Środa Śląska, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
AGNIESZKA LEŚNIAK, Chelstówek, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Olszewska

PL 226309 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania (*R*)-flawanonu o wzorze 2.

Wynalazek może znaleźć zastosowanie do wytwarzania prekursorów wielu antyoksydantów mogących służyć jako konserwanty w przemyśle spożywczym oraz jako składnik środków farmaceutycznych.

Izolowane z roślin flawanony: pinocembryna, pinostrobin, hesperetyna oraz naryngenina są monochiralne i mają konfigurację *S* (González-Cortazar, M.; Maldonado-Abarca, A.M.; Jiménez-Ferrer, E.; Marquina, S.; Ventura-Zapata, E.; Zamilpa, A.; Tortoriello, J.; Herrera-Ruiz, M., (2013) Iso-sakuranetin-5-*O*-rutinoside: A New Flavanone with Antidepressant Activity Isolated from *Salvia elegans* Vahl. *Molecules*, 18, 13260–13270; T. Morikawa, K. Funakoshi, K. Ninomiya, D. Yasuda, K. Miyagawa, H. Matsuda, M. Yoshikawa, (2008) Medicinal Foodstuffs. XXXIV. Structures of new prenylchalcones and prenylflavanones with TNF- α and aminopeptidase N inhibitory activities from *Boesenbergia rotunda*. *Chem. Pharm. Bull.* 56, (7) 956–962).

Naturalne flavan-4-ole przy atomie węgla nr 2 również posiadają konfigurację *S*, natomiast grupa hydroksylowa obecna przy węglu nr 4 jest usytuowana w położeniu *trans* w stosunku do podstawnika fenolowego (Halbwirth, H.; Kahl, S.; Jaeger, W.; Reznicek, G.; Forkmann, G.; Stich, K. (2006) Synthesis of (¹⁴C)-labeled 5-deoxyflavonoids and their application in the study of dihydroflavonol/leucoanthocyanidin interconversion by dihydroflavonol 4-reductase. *Plant Sci.* 170, 587–595; Halbwirth H. The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11:595–621). Takie wzajemne położenie podstawników przy 2 i 4 atomie węgla jest opisywane w literaturze dla wielu aktywnych biologicznie związków takich jak: luteoforol, apiforol (E.C. Bate-Smith; Luteoforol (3',4,4',5,7-pentahydroxyflavan) in *Sorghum vulgare* L. *Phytochemistry*, 8, 1969, 1803–1810; F. Spinelli, J.-B. Speakman, W. Rademacher, H. Halbwirth, K. Stich, G. Costa; Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 2005, 112, 133–142) oraz glikozydów: abacopterin I, Triphyllin A, Eruberin B (H. Wei, G. Wu, D. Shi, S. Song, X. Zhang, Y. Lei, J. Ruan; Total flavan glycoside from *Abacopteris penangiana* rhizomes and its acid hydrolysate: Characterisation and antibenign prostatic hyperplasia potential. *Food Chemistry* 134 (2012) 1959–1966; J. Jiang, L. Tian, L. Wang, Y. Liu, Y. Chen; Phenolic compounds from the fern *Glaphyroidopsis erubescens* (Hook.) Ching. *Biochemical Systematics and Ecology* 50 (2013) 136–138).

Związki flawonoidowe mogą chronić organizm człowieka przed chorobami układu krążenia (Bettini V., Fraccaro A., Legrenzi E. 1978. Effect of a flavonoid (4-methylesculetol) on the response of isolated calf hepatic arteries to angiotensin II. *Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale*, 53, 938–941; Hodgson J.M., Puddey I.B., Burke V., Beilin L.J., Jordan N. 1999. Effects on blood pressure of drinking green and black tea. *Journal of Hypertension*, 17, 457–463). Antyoksydacyjne właściwości flawonoidów przejawiają się również w zdolności tych związków do unieczynniania już wytworzonych wolnych rodników tlenowych oraz chelatowaniu jonów metali ciężkich (Chun H., Ohnishi Y, Shindo K., Misawa N., Furukawa K., Horinouchi S. 2003. Biotransformation of flavone and flavanone by *Streptomyces lividans* cells carrying shuffled biphenyl dioxygenase genes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 113–121; Di Majo D., Giammanco M., La Guardia M., Tripoli E., Giammanco S., Finotti E. 2005. Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. *Food Research International*, 38, 1161–1166).

Hepatoprotekcyjne działanie flawonoidów zapobiega pojawieniu się najczęściej występujących schorzeń wątroby, takich jak zapalenie, cholestaza, marskość, uszkodzenia polekowe, nowotwory (Chin Y.W., Lim S.W., Kim Y.C., Choi S.Z., Lee K.R. 2004. Hepatoprotective flavonol glycosides from the aerial parts of *Rodgersia podophylla*. *Planta Medica*, 70, 576–577; Singab A.N., Youssef D.T., Noaman E., Kotb S. 2005. Hepatoprotective effect of flavonol glycosides rich fraction from Egyptian *Vicia calcarata* Desf. Against CCl₄-induced liver damage in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 28, 791–798).

Znany jest sposób otrzymywania (*R*)-flawanonu na drodze enancjoselektywnego rozdzielania estrów oksymów (\pm)-flawanonu z zastosowaniem lipaz (Izumi, T. and Suenaga, K. (1997), Enzymatic resolution of flavanone oximes. *J. Heterocyclic Chem.*, 34: 1535–1538). (*R*)-flawanon w wyniku utlenienia tlenkiem manganu(IV) substratu jakim był (*2R,4R*)-*cis*-flawan-4-olu. Alkohol uzyskano natomiast zarówno w wyniku enzymatycznej estryfikacji odpowiednich alkoholi (T. Izumi, T. Hino, A. Kasahara,

(1992) Enzymatic kinetic resolution of flavanone and *cis*-4-acetoxyflavan. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1265–1267), jak i enancjoselektywnej hydrolizy odpowiednich estrów (S. Ramadas and G.L.D. Krupadanam, (2004) Enantioselective acylation of (\pm)-*cis*-flavan-4-ols catalyzed by lipase from *Candida cylindracea* (CCL) and the synthesis of enantiopure flavan-4-ones. *Tetrahedron: Asymmetry* 15, 3381–3391).

Znany jest również sposób otrzymywania (*R*)-flawanonu w wyniku enancjoselektywnej redukcji (*S*)-flawanonu w mieszaninie (\pm)-flawanonu w kulturze drożdży piekarskich. W wyniku tego procesu możliwe jest uzyskanie (*R*)-flawanonu z wydajnością 51% i nadmiarem enancjomerycznym równym 20% (T. Izumi, T. Hino, A. Kasahara; Enzymatic kinetic resolution of flavanone and *cis*-4-acetoxyflavan. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1992, 1265–1267).

Istota wynalazku polega na tym, że enancjoselektywne utlenienie jednego z enancjomerów mieszaniny racemicznej substratu, którym jest (\pm)-*trans*-flawan-4-ol, do (*R*)-flawanonu, prowadzi się przy użyciu wodnej kultury szczepu *Yarrowia lipolytica* KCh 71, przy ciągłym wstrząsaniu reagentów. Produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie. Otrzymuje się (*R*)-flawanon, z wydajnością procesu 38% oraz pozostałości będące zanieczyszczeniami.

Korzystne jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze od 15 do 35°C.

Korzystnie także jest gdy rozpuszczalnikiem organicznym jest chloroform.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie (+)-(*R*)-flawanon z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 85%, w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Przykład. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Yarrowia lipolytica* KCh 71. Po 48 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg (\pm)-*trans*-flawan-4-olu, o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ acetonu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez trzy dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem, osusza bezwodnym siarczanem magnezu, po czym odparowuje się rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny acetonu i heksanu w stosunku 4:1. (*R*)-flawanon znajduje się we frakcjach o niższej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 38 mg (+)-(*R*)-flawanon (wydajność 38%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi.

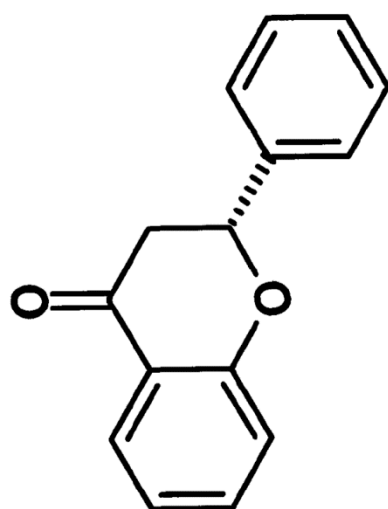
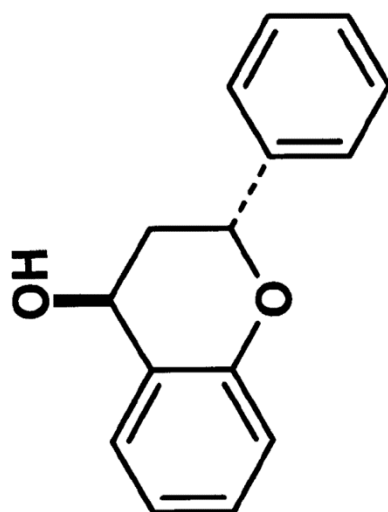
(+)-(*R*)-flawanon (bezbarwne kryształy); $[\alpha]_D^{20} = +54.8^\circ$ (c = 0.8, CHCl₃) (85% ee) (lit. $[\alpha]_D^{25} = +66.5^\circ$ (c = 0.48, CHCl₃), 98% ee; (T. Izumi, T. Hino, A. Kasahara; Enzymatic kinetic resolution of flavanone and *cis*-4-acetoxyflavan. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1992, 1265–1267). ¹H NMR (600 MHz) (CDCl₃) δ (ppm): 2,91 (dd, 1H, *J* = 16,9; 3,0 Hz, H-3e); 3,11 (dd, 1H, *J* = 16,9, 13,2 Hz, H-3a); 5,49 (dd, 1H, *J* = 13,2; 3,0 Hz, H-2a); 7,05–7,08 (m, 2H, H-6 and H-8), 7,34–7,59 (m, 6H, H-7, H-2', H-3', H-4', H-5' and H-6'), 7,95 (dd, 1H, *J* = 8,1; 1,8 Hz, H-5).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ = 44,7 (C-3), 75,6 (C-2), 118,1 (C-8), 120,0 (C-4a), 121,6 (C-6), 126,1 (C-2' and C-6'), 127,1 (C-5), 128,7 (C-4'), 128,9 (C-3' and C-5'), 136,1 (C-7), 138,8 (C-1'), 161,6 (C-8a), 191,8 (C-4).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania (*R*)-flawanonu, o wzorze 2, **znamienny tym**, że do przygotowanej pożywki wprowadza się szczep *Yarrowia lipolytica* KCh 71 i w momencie osiągnięcia przez szczep końcowej fazy logarytmicznego wzrostu, dodaje się (\pm)-*trans*-flawan-4-olu o wzorze 1, w ilości 20 mg na 100 ml pożywki, przy czym proces transformacji mikrobiologicznej prowadzi się wodną kulturą szczepu przy ciągłym wstrząsaniu, w wyniku czego, przy udziale systemu enzymatycznego szczepu, następuje utlenienie grupy hydroksylowej jednego z enancjomerów substratu, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie, w wyniku czego otrzymuje się (*R*)-flawanon z 38% wydajnością.
2. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze od 15 do 35°C.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że rozpuszczalnikiem organicznym jest chloroform.

Rysunki

**(R)-flawanon****Wzór 2*****trans*-flawan-4-ol****Wzór 1**