

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12P 41/00

C12P 17/06

C12P 17/14

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93121130.1

[45]授权公告日 2000年7月26日

[11]授权公告号 CN 1054882C

[22]申请日 1993.12.17 [24]颁证日 2000.4.28

[21]申请号 93121130.1

[30]优先权

[32]1992.12.21 [33]NL [31]92204043.1

[73]专利权人 杜法尔国际研究公司

地址 荷兰韦斯普

[72]发明人 N·布伊泽 C·G·克卢斯

M·范德兰 G·兰格兰德

G·J·M·沙伦堡

M·C·施诺克

[56]参考文献

EP185429A 1986. 6.25

EP372657A 1990. 6.13

USF4540792 1985. 9.10

TETRAHEDRON LETTERS VOL. 33, NO. 42 1992. 10. 13 M. D. ENNIS ET AL. ENZYMATIC RESOLUTION OF 2 - HYDROXYNETHYL - 1, 4 - BENZODIOXANDE

TETRAHEDRON LETTERS VOL. 33, NO. 42 1992. 10. 13 M. D. ENNIS ET AL THE SYNTHESIS OF (+) - AND (-) FLESINOXAN APPLICATION OF ENZYMATIC RESOLUTION METHODOLOG

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪洋

审查员 董芳

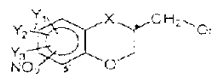
权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 立体选择性制备杂二环醇对映体的酶促方法

[57]摘要

本发明涉及立体选择性制备杂二环醇对映体的酶促方法,其特征在于从其相应的醇外消旋体,通过下述连续反应步骤制备大体纯化的通式(1)对映体:(1)立体选择性酯化,(2)从生成的酯分离醇,(3)水解所述的酯生成相应的醇对映体,和(4)在碱性条件下,转化所述的醇对映体成为起始的外消旋体,以使其重复使用。

本发明还涉及大体纯化的式 I 的醇对映体,应用所述的对映体制备药学活性的哌嗪衍生物,和大体纯化的对映中间体。

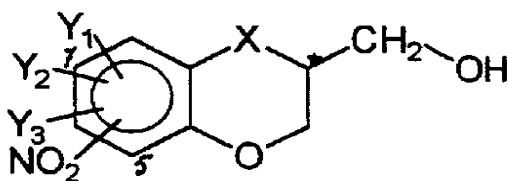


(1)

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 立体选择性制备杂二环醇对映体的酶促方法, 其特征在于通过下述连续反应步骤从其相应的醇外消旋体制备含有对映体纯度超过 95% 的通式(I)的对映体



(I)

其中 X 为 O、S、NH、N(C₁-C₄)烷基或 CH₂;

Y₁、Y₂ 和 Y₃ 各自独立地为氢或选自卤素、C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基、C₁-C₄ 卤代烷基、硝基和氰基的取代基;

NO₂ 取代基连接于双环系统的 5-或 7-位; 且

C*-原子具有 R 或 S 构型;

(i) 在具有立体选择性酯化活性的酶的影响下, 用酰化剂使所述外消旋体酯化;

(ii) 从生成的酯中分离未酯化的化合物, 并分离所需的含有对映体纯度超过 95% 的式 I 醇对映体或其酯;

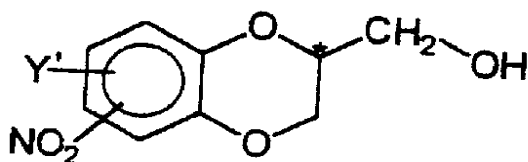
(iii) 使生成的酯水解, 由此转化所述的酯为相应的醇对映体;

且

(iv) 在碱性条件下, 将不需要的醇对映体转化成起始的醇外消旋体, 以使其重复应用。

2. 如权利要求 1 的方法, 其特征在于采用足够强的碱性条件使 (iii) 和 (iv) 的反应步骤结合, 以同时进行酯水解和醇对映体的外消旋作用。

3.根据权利要求 1 或 2 的方法, 其特征在于含有对映体纯度超过 95%的通式(II)对映体是通过权利要求 1 的连续反应步骤制备的,



(II)

其中 Y' 是氢或选自氯、氟和甲基的取代基;

NO₂ 取代基连接在双环系统的 5-或 7-位; 和

C*-原子或是具有 R 构型或是具有 S 构型。

4.权利要求 1 中表示的含有对映体纯度超过 95%的通式 I 的醇对映体, 其中 X 和取代基 Y 具有权利要求 1 中给定的定义,

NO₂ 取代基连接在双环系统的 5-或 7-位; 且

C*-原子具有 R 构型。

说明书

立体选择性制备杂二环 醇对映体的酶促方法

本发明涉及立体选择性制备杂二环醇对映体的酶促方法。本发明还涉及大体上纯化的醇对映体和应用这种对映体制备药学活性的哌嗪衍生物。

各种各样的，例如可用于使用于人或兽医的药物组合物的生物活性物质，在其分子结构中包含手性中心，且因此出现旋光异构体。在现有技术中通常已知的是，经常只有对映体之一存在所需的最适宜的生物活性。在组合物或药剂中存在的其它旋光对映体可引起或提高一些副作用和受体即人体或动物体的负担。通常认为越来越需要以大体纯的对映体形式施用生物活性物质，这些对映体尤其具有所需的生物活性。因此，在药学活性物质的制备方法中外消旋体拆分成其对映体，经常是一个重要的步骤。

利用三种主要的方法将外消旋体拆分成它们各自的对映体。三种方法中的第一种，即，根据不同的物理性质（如结晶结构）拆分，这种方法仅然使用。

最经常使用的第二种方法包括与市售的旋光活性剂反应产生非对映体，该非对映体具有不同的物理性质。因此用例如重结晶的方法可分离按这种方式获得的非对映体，此后，通过化学后处理可再生各个对映体。很明显，由于不能应用和回收昂贵的旋光活性试剂，这种拆

分外消旋体的方法是即费工又费钱的。

最近，在更经济的拆分方法中，使用酶选择性地使外消旋体的一个对映体化学改性，然后使改性的对映体与未改性的对映体分离。例如Bianchi 等人 (J. Org. Chem., 1988, 53, 5531-5534) 曾报道用酸酐作酰化剂在脂酶催化下选择性地酯化外消旋的醇。他们成功地获得了高旋光纯度，即对映体过量 (e.e.) 超过 95% 的一些伯醇和仲醇。事实上，对大多数药物应用需要的对映体应过量至少 95%。尽管Bianchi 及其合作者获得了几种结果，也观察到一些醇没有或不足以立体选择转化，最近在Ennis 等人的两篇出版物 (Tetrahedron Lett., 1992, 33, 6283-6286 和 6287-6290) 中，酶拆分的方法是使用 2-羟甲基-1,4-苯并二噁烷作底物，作者观察到，采用这种方法拆分，不能达到所要求的旋光纯度标准，因此需要重复酶促拆分。

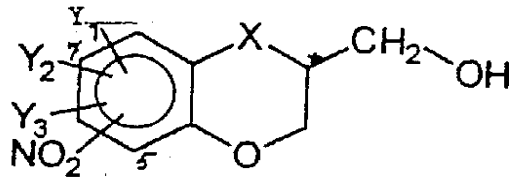
为了从剩余的醇中有利地分离生成的酯，Terao 等人 (Chem. Pharm. Bull., 1989, 37, 1653-1655) 曾用琥珀酸酐生产琥珀酸单酯对映体，该对映体容易彼此分离，采用碱液洗涤未反应的醇对映体。在此方法中，只用很少的努力，所需的活性对映体就能从不需要的非活性的对映体中分离，尽管旋光纯度 (即对映体过量) 的结果一般不能令人满意。仅以一种底物，即 (1-羟乙基) 苯 (一种仲醇) 作底物，通过与琥珀酸酐进行对映选择性酯化酶促拆分外消旋体是令人满意的。

除了醇外消旋体的酶促拆分经常出现无法预知的结果外，通过上述出版物可断定，另一个固有的问题是从其相应的外消旋体中分离所需的醇对映体。事实上，各种外消旋体拆分除了获得所需的对映体，

还获得了通常无用的不需要的旋光对映体。这意味着，至少 50% (通常是昂贵的) 底物应认为是化学废物，或者换句话说，外消旋体拆分的产率，按活性物计最多 50%。这一点通过上述 Ennis 等人的出版物中的表清楚地证实了，该表显示了无论以未转化的醇或转化后的酯形式，最初的外消旋体可提供 50% 的所需对映体。

本发明的一个目的是提供一种立体选择性制备杂二环醇对映体的经济的操作方法。

通过上述定义的酶促方法可达到此目的，根据本发明该方法的特征在于大体上纯化的通式 (I) 的对映体



(I)

其中 X 为 O、S、NH、N(C₁-C₄) 烷基或 CH₂；

Y₁、Y₂ 和 Y₃ 各自独立地为氢或选自卤素、C₁-C₄ 烷基、C₁-C₄ 烷氧基、C₁₋₄ 卤代烷基、硝基和氰基的取代基；

NO₂ 取代基连接于双环系统的 5-或 7-位；且

C*-原子具有 R 或 S 构型；

是通过其相应的醇外消旋体、，由下述连续反应步骤制备的：

(i) 在具有立体选择性酯化活性的酶的影响下，所述外消旋体与酰化剂酰化；

(ii) 从生成的酯中分离未酯化的化合物，并分离所需的大体纯化的式 I 醇对映体或其酯；

(i i i) 使生成的酯水解，由此转化所述的酯为相应的醇对映体；且

(i v) 在碱性条件下，将不需要的醇对映体转化成起始的醇外消旋体，以使其重复应用。

与期望的完全相反，上述碱处理（步骤 i v）的结果是不需要的醇对映体的外消旋作用。因为连接在手性中心（ C^* ）的质子根本不是酸性的，这种现象无法解释。由此获得的醇外消旋体可以再用作起始物进行下一个拆分反应。很明显，从经济上和从环境上的角度看，本发明使酶催化立体选择性制备醇对映体成为可行的方法。

上述酰基化反应适合的酰化剂为将在下文例示的酸酐和乙烯基酯，如乙酸乙烯酯，丙酸乙烯酯，丁酸乙烯酯，异丁酸乙烯酯，等等。

酰化反应优选在含有少量水或含水缓冲液的有机溶剂系统中进行。

最经常使用的酶是可商业上购买的粗固体制备物。这易于其回收。然而，所述的酶也可以以固定的条件例如共价结合或吸附在适合载体上使用。通过采用各种分离相关化合物的已知技术如提取、重结晶、制备柱色谱等，可从生成的酯中分离未酯化的化合物。

上述大体纯化的醇对映体，意为含有对映体纯度（ $e e$ ）起过大约 95% 的醇化合物。如果在本发明的酶促方法中未达到上述对映体纯度，通常通过简单的重结晶方法可以使对映体的纯度改善到所需水平。当然如本文前述，分离所需的大体上纯化的醇对映体还包括重结晶方法，以提高对映体纯度和除去少量杂质。

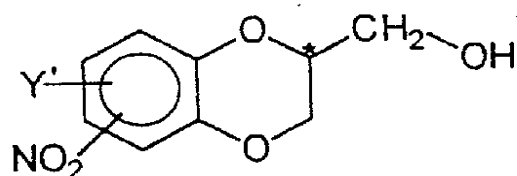
关键的反应步骤，即在碱性条件下不需要醇对映体的外消旋作用，可以容易地在质子惰性和 protic 两种条件下进行。将适合的碱如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂和氢氧化铵等溶于水或含有水混溶有机

溶剂（如醇）的含水溶剂混合物中。用于质子惰性系统的碱的例子为：
 （a）氢化物，例如在质子惰性溶剂如 D M S O 中的氢化钠；（b）
 醇钾，例如在质子惰性溶剂如醚（例如 T H F ）中的叔丁醇钾和甲基
 - 2 - 丁醇钾；和（c）烷基锂和烷基酰胺锂，例如在质子惰性溶剂
 如 T H F 中的甲基锂、各种丁基锂和二异丙基酰胺锂。用酸中和后，
 可以以好的产率回收醇外消旋体，例如通过用适合的有机溶剂从水相
 中提取，然后如果需要，蒸发掉溶剂以备再用。

如上述（i i i）所述，生成酯的水解可方便地在酸性条件或弱
 碱性条件下进行，以避免发生醇对映体的外消旋化。

但是，作为本发明的一个具体实施方案，上述酯的水解和醇对映
 体的外消旋化可以结合。在此方法中，上述反应步骤（i i i）和
 （i v）可被结合，使得通过一个反应步骤获得还原作用。如上述对
 外消旋反应所定义的，足够强的碱性条件对于同时进行两种作用（即，
 同时进行水解和外消旋作用）是需要的。

本发明的方法优选旨在通过进行上文所定义连续反应步骤立体
 选择性制备具有苯并二噁烷结构的大体纯化的醇对映体，即通式（II）
 化合物



(II)

其中 Y' 为氢或选自氟、氯和甲基的取代基；

N O₂ 取代基连接在苯并二噁烷环的 5 - 或 7 - 位；和

C*—原子或是 R 或是 S 构型。

优选使用的酶为固体且因此能够很容易地回收使之重复使用。在上述步骤 (i) 后, 即在酰化步骤完成后, 通过采用适合于此目的的方法 (如简单过滤), 可以方便地进行酶回收。如果使用的酶是结合在适合载体如硅藻土 (见上述 Bianchi 等人的出版物) 或玻璃体上, 也可通过简单过滤回收酶, 如果需要, 然后洗涤滤液去除杂质。

对于使用乙烯酯作为酰化剂优选使用羧酸酐, 因为羧酸酐, 如乙酸酐、丙酸酐、丁酸酐、异丁酸酐或己酸酐, 在适合的酶存在下, 通常具有较好的性能。为了利于未酯化的化合物从生成的酯中分离, 优选使用环羧酸酐, 特别是琥珀酸酐或戊二酸酐。以此方式获得的形成酯, 可容易地从未酯化的化合物中分离, 即在上述条件下用弱碱溶液提取, 此时酯仍然保持完整。

进行立体选择性酯化作用的适合的酶为水解酶, 如天然存在和基因工程得到的脂酶和酯酶。适合的脂酶的例子为: 黑曲霉, 假丝酵母 (*Candida cylindracea*) (例如 Meito[®] MY 30 或 Amano[®] AY), 解脂假丝酵母, *Chromobacterium viscosum*, 白地霉, *Humicola lanuginosa*, 米赫毛霉, 爪哇毛霉 (例如 Amano[®] M), 猪胰腺脂酶, 圆弧青霉, 萎格法尔特氏青霉, *Pseudomonas cepacia* (Amano[®] PS), 荧光假单胞菌 (例如 Amano[®] P), 雪白根霉 (例如 Amano[®] N), 爪哇根霉 (例如 Amano[®] F), 无根根霉和德列马根霉。与 Bianchi 等人的出版物中所提出的相反, 现已发现, 一些脂酶, 特别是假丝酵母 (*Candida cylindracea*) 脂酶对 S 对映体优先。因此上述脂酶能够立体选择性酯化 S 对映体, 结果能得到高产率和高立体化学纯度的剩余的 R 对映体。其它脂酶, 例如荧光假单胞菌和其它许多脂酶, 优选

转化 R 对映体且因此适合于分离同样高产率和高立体化学纯度的 S 对映体。

本发明还涉及如前文表示的通式 I 的大体纯化的醇对映体，其中 X 和取代基 Y 具有前述给定的定义，

NO₂ 取代基连接在双环系统的 5 - 或 7 - 位，和

C* - 原子具有 R 构型。

通过采用本发明的酶促方法，可方便地获得该对映体。本文此后将说明，该对映体在制备一些药理学活性哌嗪衍生物的方法中，可用作关键中间体。

在 *Drugs of the Future* 1988, 13, 31-33 中，描述了 flesinoxan 盐酸盐，一种有效的口服活性 5 - HT_{1A} 激动剂的合成。相应于上述式 II，其中 Y' 为 7 - 氯取代基的外消旋的苯并二噁烷，首先用苯甲酰氯转化以保护其醇功能团。随后催化氢化后与双(氯乙基)胺反应获得外消旋的哌嗪化合物。在此相中，用 (+) - 樟脑磺酸进行哌嗪外消旋体的拆分，几次重结晶后，获得旋光纯的 R - (+) - 对映体。该对映体与 N - (4 - 氯苯甲酰基) 氮丙啶反应，通过苯甲酸酯的皂化作用使羧基去保护，最后用盐酸处理获得所需的大体纯化的 (+) - 对映体，即 flesinoxan · HCl。在上述 Ennis 等人最近的出版物 (*Tetrahedron Lett.*, 1992, 33, 6287 - 6290) 中，描述了 flesinoxan 和其旋光对映体的酶促拆分，这是拆分的最后步骤。在费力的双路酶促方法后，所需的 flesinoxan 可以以令人满意的对映体纯度分离。

从上述明显地看到，所述的 flesinoxan 制备是费力和昂贵的，特别是因为对映体的费力拆分是建立在这样的多步合成方法前期之上的。

很明显，在该合成方法的前期，在拆分中活性物质不可避免的丢失是更不利的。

现已发现，通式 I 的基本纯化的醇对映体可方便地被用作合成药理学活性的哌嗪衍生物的关键中间体，因为避免了在多步合成前期费力的外消旋体拆分作用。

因而，本发明还涉及应用本文前述表示的通式 I 的大体纯化醇对映体，

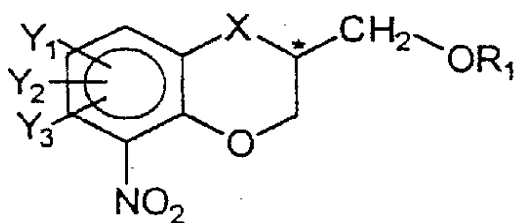
其中 X 和取代基 Y 具有前述给定的定义，

NO_2 取代基连接于双环系统的 5 - 位，和

C^* - 原子具有 R 构型，

通过将所述对映体进行下述反应程序，制备药理学活性的哌嗪衍生物：

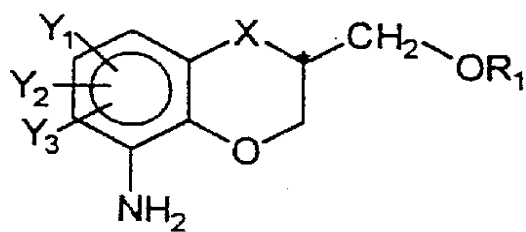
(i) 用适合的羟基保护基游离羟基，同时保持 C^* - 原子的绝对构型，生成下列通式的化合物



(III)

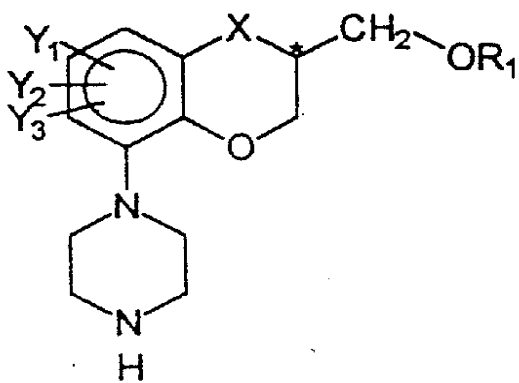
其中 R_1 为羟基保护基；

(ii) 在保持 C^* - 原子绝对构型的同时，硝基取代基还原，以将所述的式 III 大体纯化的对映体转化为下列通式的胺化合物



(IV)

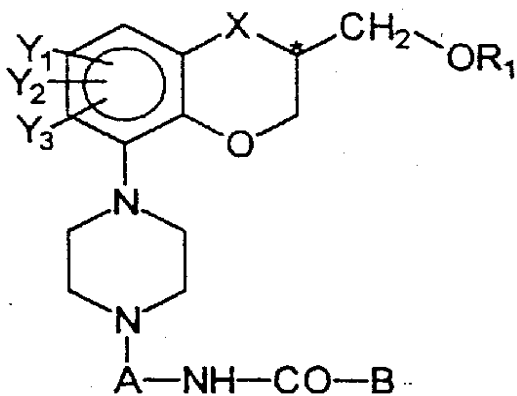
(iii) 转化上述获得的式IV化合物成为下列通式的哌嗪化合物：



(V)

同时保持 C*—原子的绝对构型；

(iv) 保持 C*—原子绝对构型的同时，将所述的式V哌嗪化合物衍生为下列通式的哌嗪衍生物：

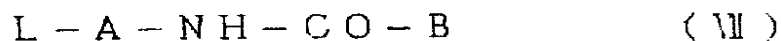


(VI)

其中 A 为直链或支链 C₂ - C₄ 亚烷基，和 B 为苯基或选自噻吩基、吡喃基、呋喃基、吡咯基、吡啶基和吡嗪基的杂环基，其中的基团可被一个或多个选自卤素、C₁ - C₃ 烷基、C₁ - C₃ 卤代烷基、氨基、硝基、羟基、酯化羟基和 C₁ - C₃ 烷氧基的取代基取代，

该方法是通过所述的式 V 哌嗪化合物，或者

(a) 与下列通式的化合物反应



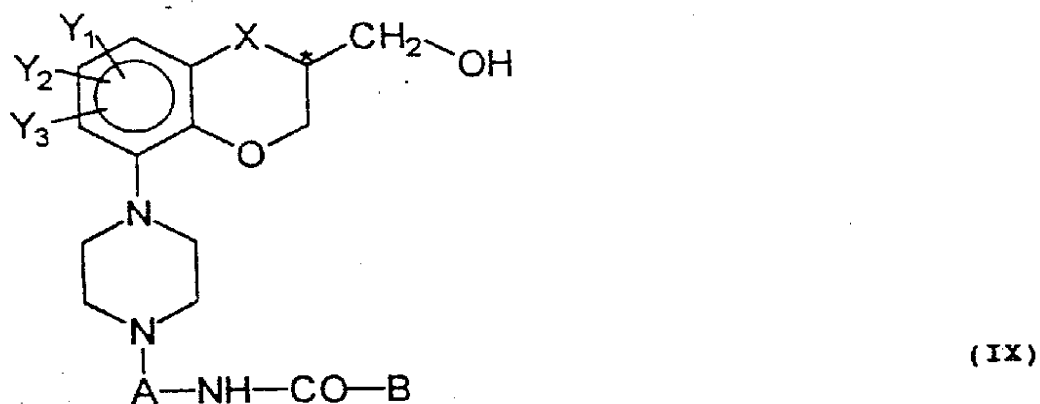
其中 L 为离去基团，优选地选自氯、甲磺酸根和甲苯磺酸根，或者

(b) 与下列通式的化合物反应



生成其中 A 是亚乙基的通式 VI 哌嗪衍生物；且最后

(v) 将所述的式 VI 化合物去保护生成下列通式的游离醇对映体



其中 C*—原子具有 R—构型。

从上所述可以清楚地看出，在保持 C*—原子绝对构型的情况下，可容易地进行上述随后的反应步骤，由此不损害最终哌嗪衍生物的对映体纯度。

通过适合的酯或醚功能团可以保护游离的羟基（反应步骤 i）。适合的羟基保护基的例子为：（三烷基）甲硅烷基，（二烷基）（烷氧基）甲硅烷基，叔（C₄—C₁₂）烷基，（可选择性取代的）苯氧基 [（C₂—C₈）二烷基] 乙基，（C₁—C₄）烷氧基 [（C₂—C₈）二烷基] 甲基，构成（硫）乙缩醛的基团如二—和四氢吡喃—2—基和二—和四氢呋喃—2—基，以及从单一、二—或三—取代的乙酸衍生的构成酯的基团，其中取代基优选选自（C₁—C₁₂）烷基和可选择地具有一个或多个取代基的取代苯基，可选择地具有一个或多个甲基的取代环己烷甲酸或金刚烷甲酸。上述术语烷基包括（C₁—C₈）烷基，（C₂—C₈）链烯基，（C₂—C₈）链炔基，苯基和被一个或多个取代基取代的苯基。上述苯基和苯氧基适合的取代基为：羟基，烷氧基，烷基羰基氧基，氨基，烷基氨基，二烷基氨基，烷基羰基氨基，烷基磺酰氨基，硝基，烷基磺酰基，烷基羰基，卤素，氰基，烷基（其中烷基取代基包含 1 至 5 碳原子），和（C₃—C₁₂）环烷基。

硝基生成氨基的还原作用（步骤 i i），可以方便地在适合的金属催化剂例如 Pd/C 的影响下、在适合的极性有机溶剂例如乙醇中与氢进行。

氨基化合物转化成哌嗪化合物（步骤 i i i）可容易地例如借助双（2—氯乙基）胺、在适合的有机溶剂例如芳香烃如甲苯和氯苯等中

进行。

上述 (i v) 中定义的反应步骤优选如欧洲专利说明书138280中所述，即在惰性有机溶剂或无溶剂中、以及在所述专利说明书中所述的反应条件下进行。

最后羟基的去保护可与适合于酯或醚裂解的反应试剂一起进行。在弱碱或酸性条件下，在保持 C*— 原子绝对构型的情况下，酯可以很容易地被水解。醚的裂解优选借助强酸在有机溶剂中进行。

本发明还涉及上述反应程序中的新中间体，即，前述表示的通式 III 和 IV 的大体纯化的对映体，其中 X 和取代基 Y 具有前述给定的定义，并且 C*— 原子构型与上述式 I 化合物 C*— 原子的 R 构型相应。

本发明最后涉及制备上述通式 IX 的大体纯化的哌嗪衍生物对映体的方法，该方法首先是从其相应的外消旋醇进行本文上述连续的反应步骤制备前述通式 I 的大体纯化的醇对映体（该对映体中 C*— 原子具有 R 构型），接着借助上述定义的反应程序将所述的式 I 化合物转化成所需的哌嗪衍生物。

现在将用下述具体的实施例更详细地说明本发明。

实施例 I

伴随搅拌，在 37 °C 将 1.25 mM (±) - 2, 3 - 二氢 - 5 - 硝基 - 7 - 氯 - 1, 4 - 苯并二噁烷 - 2 - 甲醇 (B D A)、250mM 丙酸酐和 0.2% (w / v) 荧光假单胞菌脂酶 (Amano[®] P) 在 T B M E (叔 - 丁基甲基醚) / 己烷 / 水 (50 / 50 / 0.1 v / v / v) 中的溶液中保温。转化 80% 后 (醇的酯化)，过滤掉酶终止反应。在 Zorbax[®] C - 8 柱上分离出生成的酯和剩下的醇，

采用手性 α -糖蛋白 (AGP) 柱分析剩余醇的对映体量。不经分离还可通过 $^1\text{H-NMR}$ ，采用 (+)-或 (-)-三氟甲基-9-蒎甲醇作为手性拆分溶剂确定剩余醇和生成酯的对映体过量。剩余的醇中含有对映体过量 97.5% 的 S-(-)-醇。

实施例 II

采用实施例 I 中所述的相应方法，用 0.2% (w/v) *Candida cylindracea* 脂酶 (Meito[®] MY) 进行酯化，69% 的醇转化后，停止反应。剩下的醇中含有对映体过量 97.5% 的 R-(+)-醇。如实施例 I 中所述，通过 $^1\text{H-NMR}$ 谱鉴定 R-(+)-醇。测得在乙腈中 R-(+)-BDA 的具体旋光度为： $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +181.1^\circ$ 。

采用相应的方法制备 R-(+)-2,3-二氢-5-硝基-7-甲基-1,4-苯并二噁烷-2-甲醇和 R-(+)-2,3-二氢-5-硝基-1,4-苯并二噁烷-2-甲醇，具有同样高的对映体过量。

实施例 III

在 25℃，伴随搅拌将 250 mM (±)-BDA、500 mM 丁酸酐和 0.5% (w/v) *Candida cylindracea* 脂酶 (Meito[®] MY) 在己烷/乙酸乙酯/水 (50/50/0.2 v/v/v) 中的溶液保温。65% 的醇转化后，停止反应，剩下的醇中含有对映体过量 97.5% 的 R-(+)-醇。

实施例 IV

采用实施例 III 中所述的相应方法，将 250 mM (±)-BDA 分别与 500 mM 异丁酸酐或己酸酐保温。分别转化了 63% 和 60% 的醇后，停止反应，在两种情况下都含有对映体过量 97.5% 的

R- (+) - 醇。

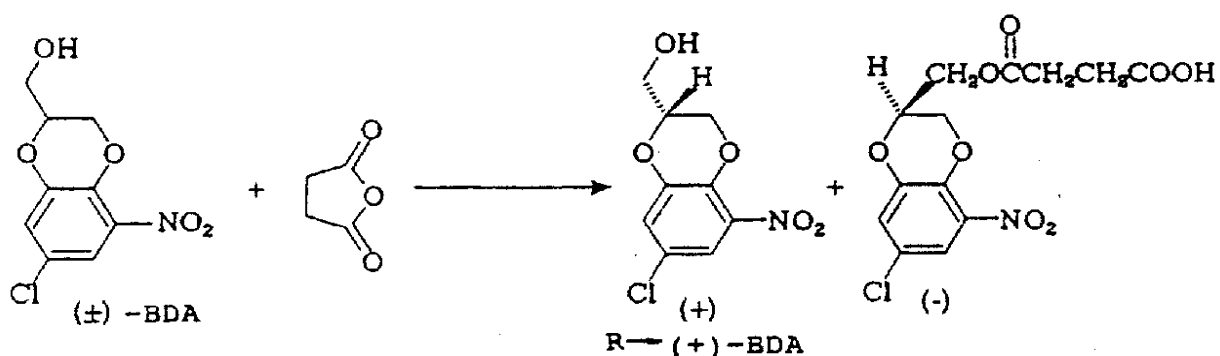
实施例 V

在室温下，伴随搅拌将 350 mM (±) - BDA、600 mM 琥珀酸酐和 2.4% (w/v) *Candida cylindracea* 脂酶 (Meito[®] MY) 在 TBME / 乙腈 / 水 (90 / 10 / 0.6 v/v/v) 中的溶液保温。70% 醇转化后，过滤停止反应。剩下的醇含有对映体过量 98% 的 R- (+) - 对映体。

实施例 IV

对映选择性酯化作用

反应式



将 15.2 kg (±) - BDA、7.6 kg 琥珀酸酐和 3.7 kg *Candida cylindracea* 脂酶 (Meito[®] MY) 在 200 l 叔丁基甲基醚 (MTBE)、17.5 l 乙腈和 925 ml 水的混合物中的溶液，在反应容器中、在室温和氮气氛围下保温。达到 60 - 63% 转化 (HPLC, 大约 20 小时) 后，过滤掉酶终止反应。用 10 l MTBE 洗涤酶两次，并且有机层用 90 l 和 30 l 碳酸盐水溶液 (150g Na₂CO₃ 在 1 l 水中) 连续冲洗。用 10 l MTBE 萃取碳酸盐溶液两次。然后，

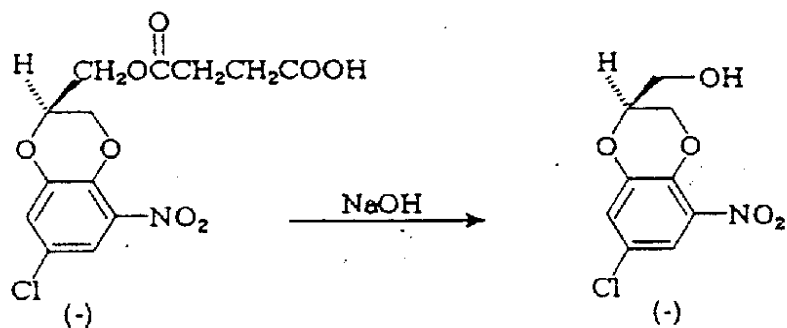
合并的有机层用 3.0 l 水、通过将 4.0 l 3.0% HCl 溶于 1.5 l 水中得到的稀盐酸和 1.0 l 水连续洗涤。在 60 °C 真空下蒸馏掉 MTBE。将结晶残余物 (4.6 kg) 在 60 °C 溶入 1.5 l 9.6% EtOH, 伴随搅拌向此溶液中加入 1.0 l 正己烷。将混合物冷却到大约 10 °C, 搅拌 2 至 10 小时后, 吸出结晶产物, 用 1.0 l 乙醇/己烷 (1.5 / 3.5 v/v) 并用 5 l 正己烷连续洗涤并干燥, 结晶产物是纯 (ee 98%) (+) - 对映体, 即, R - (+) - 2, 3 - 二氢 - 5 - 硝基 - 7 - 氯 - 1, 4 - 苯并二噁烷 - 2 - 甲醇 [R - (+) - BDA]; 产量大约 4 kg。

熔点 116.0 °C; $[\alpha]_D^{25} = +194.8$ °C (c = 4.5; 甲醇)。

实施例 VII

生成的 S - (-) - BDA 酯的皂化作用

反应式



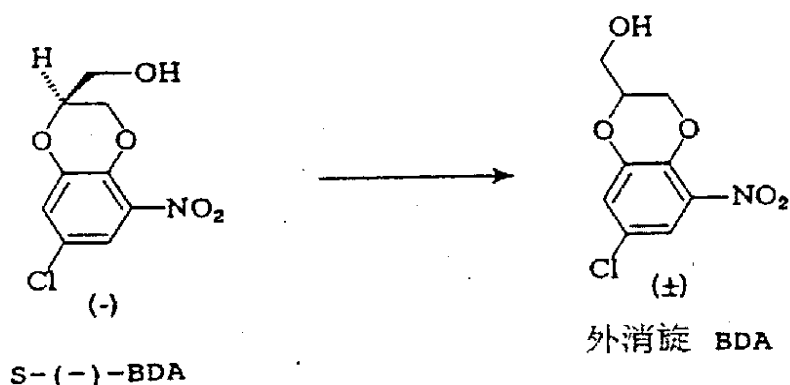
在大约 23 °C 向实施例 VI 实验的合并水层中加入 1.5 l 5.0% NaOH。在 23 °C 搅拌反应混合物大约 1.5 小时, 然后冷却到 5 °C, 接枝后, 在 5 °C 搅拌混合物 3 小时。吸出结晶产物后, 用 6.0 l 水洗涤并干燥以大约 1.0 kg 的产量获得具有过量 S - (-) - BDA 对映

体的产物醇。

实施例Ⅷ

S - (-) - B D A 对映体的外消旋作用

反应式



在氮气和回流下，将实施例Ⅶ获得的 S - (-) - B D A 以 1 kg 的量溶于 6 l 正丙醇中。用大约 15 分钟向此溶液中加入 235 ml 2 N NaOH 水溶液。使溶液回流 1.5 小时。冷却到大约 40 °C 后，加入 47 ml 浓 HCl 溶液（至 pH = 3）。在大约 60 °C 下真空蒸掉丙醇。向残余物中加入 4 l 正己烷，冷却到 20 °C 并伴随缓慢搅拌使该溶液接枝，在 20 °C 搅拌二小时且在 0 °C 过夜后，吸出结晶产物并用 0.5 l 正己烷洗涤两次，然后使结晶产物与 7.5 l 水在大约 70 °C 搅拌 1 小时，冷却至 20 °C 后，加入 350 ml 正己烷并再搅拌一小时，过滤掉结晶产物并用 0.5 l 正己烷洗涤两次。干燥后，以产量 850 g 获得所需的外消旋 B D A；含量 95%；ee = 0。熔点 108.2 °C。

同样通过以二异丙基氨基化锂作为碱、在 THF 作为溶剂下也可完成外消旋步骤：反应温度 40 °C；5.5 小时后外消旋作用完全。

实施例 IX

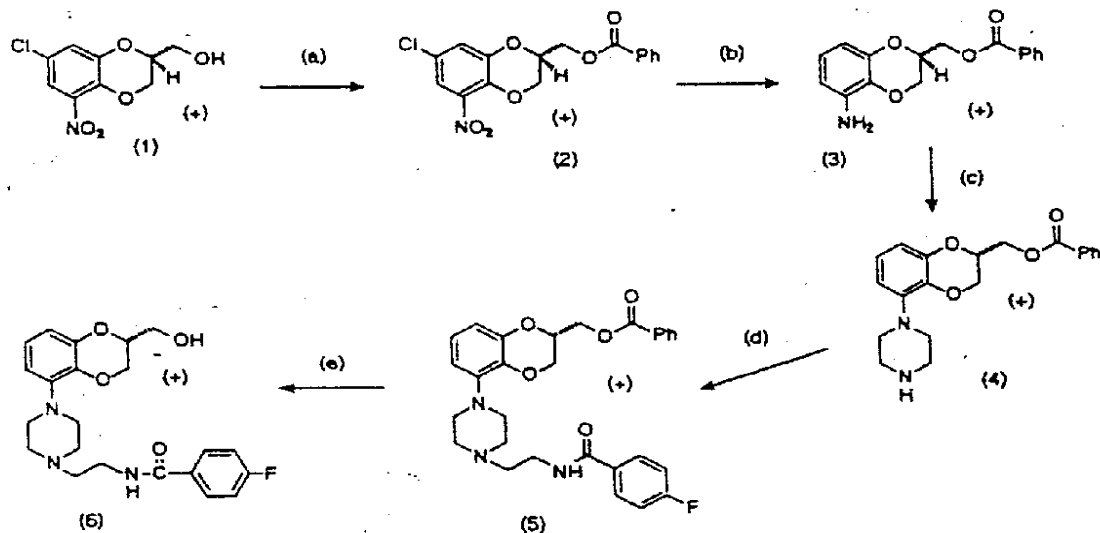
S - (-) - B D A 酯的皂化和同时发生的外消旋作用

向一份在实施例 VI 中获得的碱水层 (由此得到 43.5g (126 mmol) S - (-) - B D A 酯、620ml 碳酸盐水溶液 (150g Na_2CO_3 在 1l 水中) , 150ml 水和 59ml 乙腈) 中加入 250ml 乙醇和 50ml 50% w/v 氢氧化钠水溶液。伴随搅拌回流反应混合物 16 小时。冷却到 40℃ 后, 小心加入 160ml 1.2N 盐酸水溶液 (pH 大约为 5) 。将反应混合物冷却到室温, 此后吸出固体产物, 用水洗涤并干燥。获得对映体过量为 0 的 23.8g 浅棕色 (±) - B D A 。

实施例 X

从 R - (+) - B D A 制备 flesinoxan

反应式



(a) . 在溶剂二氯甲烷中, R - (+) - B D A (1) 与苯甲酰进行苯甲酰化作用生成化合物 (2) 。

向 20 g (0.081 mol) 化合物 (1) 在 250 ml 二氯甲烷和 12 ml 三乙胺中的溶液中, 滴加 10.1 ml (0.086 mol) 苯甲酰氯; 温度为 25 °C。加入 10 ml 水并搅拌 10 分钟后分离液层。用 50 ml 水冲洗有机层, 用 25 ml 二氯甲烷萃取合并的水层。合并有机层, 并在 100 毫巴和 30 °C 蒸发。加入 100 ml 甲苯后, 将产物蒸发至干燥 (10 mbar, 50 °C)。

获得所需的化合物 2, 产率 97.3%, 纯度 97.5%。

TLC (洗脱剂: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{NH}_4\text{OH} = 94 / 5 / 1$): $R_f = 0.71$ 。

(b). 在催化量的 Pd/C 存在下用氢气还原硝基-化合物 (2) 成相应的氨基-化合物 (3); 乙醇为溶剂。

向 6.0 g (16.7 mmol) 化合物 (2) 在 120 ml 乙醇和 40 ml 乙酸乙酯中的溶液中加入 1.50 g Pd/C 制备物 (39.1% Pd/C 10% 和 60.9% 水)。搅拌 5 分钟后, 加入 10.8 g (10 当量) 甲酸铵, 开始在室温下搅拌混合物 1 小时, 然后在 40 °C 搅拌 2 小时。将反应混合物冷却到 20 ~ 25 °C, 滤掉 Pd/C 并用 50 ml 乙醇洗涤。在 100 毫巴和 50 °C 蒸发乙醇。残余物溶于 75 ml 乙酸乙酯和 5 ml 2 N 氢氧化钠水溶液。液层分离后, 用 10 ml 乙酸乙酯萃取水层两次。合并的有机层用 25 ml 水洗涤二次, 并在 100 毫巴和 50 °C 减压至干。在 50 °C 真空干燥后, 获得的所需产物 (3), 纯度为 96.0%, 产率 97.0%。

TLC (见上述): $R_f = 0.67$ 。盐酸盐的熔点: 213 - 223 °C。 $[\alpha]_D^{25} = +65.1^\circ$ ($c = 3.38$; 甲醇)。

(c) 以二甲苯作溶剂用双(2-氯乙基)胺盐酸盐转化氨基化

合物(3)成相应的哌嗪-化合物(4)。

向4.40g(14.8mmol)化合物(3)的50ml二甲苯溶液中加入2.8g(14.8mmol)双(2-氯乙基)胺盐酸盐。在氮气氛下回流反应混合物48小时。将反应混合物冷却至35℃后,加入在25ml 5%碳酸氢钠水溶液中的1.36ml 50%氢氧化钠水溶液。将反应混合物在35℃下搅拌3小时,然后加入10ml 2N氢氧化钠水溶液和20ml水。在35℃搅拌10分钟后,将反应混合物冷却至20-25℃,分离液层。用25ml水洗涤二甲苯层三次。在10mbar和50℃将有机层减压至干(100%乙醇为共沸剂)。获得所需产物(4),纯度85.5%,产率82.3%。

TLC(见上述): $R_f = 0.07$, HCl-盐的熔点: 183-186℃。 $[\alpha]_D^{25} = +63.66^\circ$ ($c = 1.67$; CH₃OH)。

(d)哌嗪化合物(4)与4-氟苯甲酰基氮丙啶反应生成化合物(5)。

将对氟苯甲酰基氮丙啶(53.8g; 325mmol)和200ml甲苯加入到100.7g(284mmol)的化合物(4)中。将反应混合物保持在80℃减压下(旋转蒸发);蒸发150ml。加入100ml甲苯后,如上所述再处理反应混合物2小时。蒸发至干后,将甲醇加入到残余物中并使产物在5℃结晶。吸出产物后,用甲醇(200ml)和己烷(400ml)连续洗涤,并干燥。获得所需化合物5,纯度为82%,产量为105g(71%)。处理母液获得附加量的所需产物。

TLC(见上述): $R_f = 0.59$ 。熔点: 126-127℃
 $[\alpha]_D^{25} = +56^\circ$ 。 ($c = 4.32$; CH₃OH)。

(e) 在 EtOH 中酯 (5) 与 KOH 皂化，随后在 EtOH 中用 HCl 酸化，生成 flesinoxan (6)。

向 104 g (0.2 mol) 化合物 (5) 在 1500 ml 96% 乙醇中的悬浮液中加入 1.4 g (0.25 mol) KOH 在 10 ml 水中的溶液。在 20 - 25 °C 搅拌 3.5 小时后，在 100 mbar 和 50 °C 蒸发乙醇。将水 (500 ml) 和二氯甲烷 (200 ml) 加入到残余物中，并将反应混合物搅拌 5 分钟。分离液层后，水层用 250 ml 二氯甲烷萃取。合并的有机层用 100 ml 水洗涤两次。干燥后，将有机溶液蒸发至剩余体积大约 200 ml。向此残余物中加入 300 ml 乙酸乙酯，并蒸发掉 100 ml 液体。加入 100 ml 正己烷后，使产物在 5 °C 结晶过夜。过滤结晶产物，用 30 ml 冷乙酸乙酯和 200 ml 正己烷连续洗涤，在 30 °C 干燥。获得 Flesinoxan (纯度 78%)，产量 7.3 g。

TLC (见上述)：R_f = 0.67。熔点：183 - 185 °C
[α]_D²⁰ = +27.8° (c = 2.49; CH₃OH)。

实施例 XI

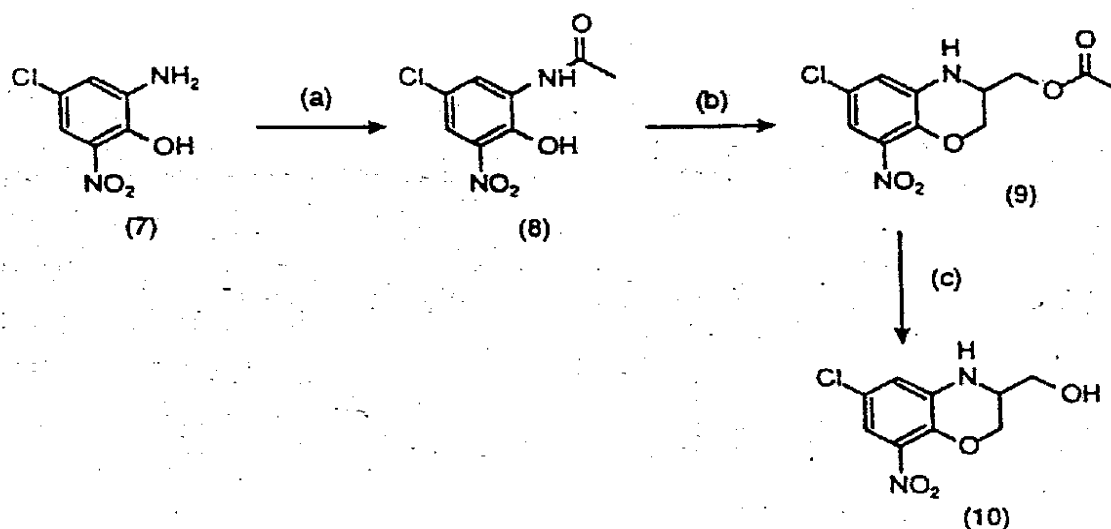
在室温下伴随搅拌将 0.2 M 5-氯-2,3-二氢-7-硝基-1,4-苯并二噁星 (dioxin)-2-甲醇、0.34 M 琥珀酸酐和 2% (w/v) *Candida cylindracea* 脂酶 (Meito MY) 在 TBME/乙腈/水 (90/10/0.3 v/v/v) 中的溶液保温。41% 醇转化后 (用 Zorbax C-柱确定)，过滤终止反应。剩下的醇含有对映体过量 38% (应用 Chiracel®-OD 柱确定) 的 (+)-对映体。

实施例 XII

6-氯-2,3-二氢-8-硝基-1,4-苯并噁嗪-3-甲醇的

制备

反应式：



(a) 搅拌下向 18.5 g (91 mmol) 化合物 (7) 在 50 ml 甲苯中的悬浮液中加入 30 ml (314 mmol) 乙酸酐。

在 100 °C 加热 4 小时后，加入另外 10 ml 的乙酸酐。再连续加热 2 小时。除去热浴后小心加入大约 25 ml 乙醇。冷却到室温后，反应混合物用乙酸乙酯和水处理。有机层用水洗涤两次并用硫酸镁干燥，过滤后真空蒸发溶剂。向 18.23 g 的浅棕色固体中加入 75 ml 乙醇和 80 ml 2 N 氢氧化钠水溶液。在室温下整夜搅拌此暗红色悬浮液。冷却到 0 °C 后，加入 90 ml 2 N 盐酸溶液。吸出固体物质并用水洗涤两次，在室温和常压下干燥后，获得 16.5 g 桔黄色粉末 (8)。

TLC (洗脱剂：乙酸乙酯/石油醚 40 - 65 °C = 50/50)：
R_f = 0.3，熔点：156 - 160 °C。

(b) 向 8 g (34.5 mmol) 化合物 (8) 在 80 ml 甲苯和

8.0 ml 4-甲基-2-吡咯烷酮混合物中的溶液中加入 5.6 g (40 mmol) 碳酸钾粉末。在回流温度下搅拌反应混合物一小时，通过迪安-斯达克榻装置除去水。在大气压下蒸掉甲苯。冷却到 100°C 后，加入 9.3 g (41 mmol) 甲苯磺酸缩水甘油酯。在 120°C 搅拌 4.5 小时后，将悬浮液冷却至室温。用水和乙酸乙酯稀释反应混合物，并用 2 N 盐酸水溶液使 pH 升至 5。水层用乙酸乙酯萃取两次。合并的有机层用盐水洗涤并用硫酸镁干燥，过滤掉硫酸镁后，在真空条件下蒸发溶剂，获得 10.86 g 深棕色油。经中压色谱纯化（洗脱剂：乙酸乙酯/石油醚 40-65°C = 2.5/7.5）得到红色片状的 4.18 g 化合物 (9)。

熔点：76-84°C。

TLC (见上述)：Rf = 0.15。

(c) 向 3 g (10 mmol) 化合物 (9) 在 100 ml 甲醇和 30 ml 水混合物中的悬浮液中加入 1.44 g 碳酸钾粉末。在室温下搅拌 1.5 小时后，用水稀释处理该反应混合物，并用乙酸乙酯萃取两次。合并的有机层用稀盐水洗涤三次并用硫酸镁干燥。过滤掉硫酸镁后，真空蒸发溶剂，获得 2.53 g 桔黄色固体化合物 (10) (NMR)。

TLC (乙酸乙酯/石油醚 40-65°C = 7.5/2.5)：

Rf = 0.3。

¹H-NMR: δ (ppm) 6.99 (d, 1H, 芳香); 6.90 (s, 1H, NH); 6.88 (d, 1H, 芳香); 5.02 (t, 1H, CH₂OH); 4.19 (dd, 1H, OCH₂CH); 4.11 (dd, 1H, OCH₂CH); 3.40/3.50 (群峰, 3H, CHCH₂OH)。

实施例XIII

将0.35 M 6-氯-2,3-二氢-8-硝基-1,4-苯并噁嗪-3-甲醇、0.6 M琥珀酸酐和3.3% (w/v) *Candida cylindracea* 脂酶 (Meito[®] MY) 在TBME/乙腈/水 (90/10/0.6 v/v/v) 中的溶液, 伴随搅拌在室温下保温。转化47%的醇后 (应用Zorbax C-柱确定), 过滤终止反应。剩余的醇中含有对映体过量39%的 (+)-对映体 (应用Chiracel[®] OD柱确定)。

实施例XIV

将0.13 M 2,3-二氢-7-硝基-1,6-苯并二噁星-2-甲醇、0.24 M丁酸酐和2.5% (w/v) 脂酶在二异丙基醚/乙腈/水 (50/50/0.5 v/v/v) 中的溶液, 伴随搅拌在室温下保温。64%的醇转化手, 过滤终止反应。剩余的醇含有对映体过量42.4%的 (+)-对映体。

实施例XV

(+)-2,3-二氢-7-硝基-1,4-苯并二噁星-2-甲醇的外消旋化

向0.1 g (47 mmol) (+)-2,3-二氢-7-硝基-1,4-苯并二噁星-2-甲醇 ($[\alpha]_D^{20} = +65.5$ (c = 0.58, 96%乙醇)) 在1.5 ml乙醇中的溶液中加入0.2 ml (40 mmol) 2 N氢氧化钠溶液。回流1.25小时后, 使反应混合物冷却至室温。用水稀释反应混合物并用乙酸乙酯萃取两次, 有机层用硫酸镁干燥。过滤掉硫酸镁后, 真空下蒸发溶剂, 获得0.1 g 浅棕色固体物质。旋光率 (见上述) 为0, 采用手性 α -糖蛋白 (AGP) 柱分析对映

体过量，结果为 $ee = 0$ 。

采用正丙醇作溶剂，结果反应30小时。

实施例XVI

(+)-5-氯-2,3-二氢-7-硝基-1,4-苯并二噁星-2-甲醇的外消旋

向0.85g (3.46 mmol) (+)-5-氯-2,3-二氢-7-硝基-1,4-苯并二噁星-2-甲醇 ($[\alpha]_D^{20} = +5.5$ (c = 0.4, 乙醇)) 在80 ml乙醇中的溶液中加入15 ml 2 N氢氧化钠水溶液。回流16小时后，使混合物冷却至室温，并如实施例XV所述进行处理。获得的固体物质的旋光率(见上述)为0。在Chiracel-OD柱上的手性分析显示出 $ee = 0$ 。

实施例XVII

(+)-6-氯-2,3-二氢-8-硝基-1,4-苯并噁嗪-3-甲醇

向2g (8.18 mmol) (+)-6-氯-2,3-二氢-8-硝基-1,4-苯并噁嗪-3-甲醇 ($[\alpha]_D^{20} = +1.4$ (c = 0.71, 96%乙醇)) 在50 ml乙醇中的溶液中加入2 N氢氧化钠水溶液。回流3小时后，加入1 ml其它等份的2 N氢氧化钠水溶液。回流32小时后，使反应混合物冷却至室温，并用盐水稀释，水层用乙酸乙酯萃取两次。

合并的有机层用稀盐水洗涤两次并用硫酸镁干燥。过滤掉硫酸镁并真空蒸发溶剂后，获得1.83g 橙棕色固体物质。旋光率为0，并且在Chiracel-OD柱上的手性分析显示出 $ee = 0$ 。

实施例XV III

通过氢化钠的外消旋作用

向 0.2 g (0.8 mmol) R-(+)-BDA 和悬浮于矿物油中的 0.01 g (0.5 当量) 60% 氢化钠的混合物中加入 5 ml DMF。气体停止发生后，在室温搅拌此桔黄色溶液，在 0.75 小时内完成外消旋反应，通过 Chiracel-OD 柱进行分析。

在 THF 溶剂中，同样成功地发生该反应。