

KATARZYNA DĄBKOWSKA
KRZYSZTOF W. SZEWCZYK
ANNA PIASECKA

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Kinetyczny rozdział enancjomerów kwasu migdałowego w reaktorze kolumnowym

Wprowadzenie

Otrzymywanie enancjomerycznie czystych substancji leczniczych jest obecnie wielkim wyzwaniem dla przemysłu farmaceutycznego i chemicznego ze względu na często różne właściwości farmakologiczne enancjomerów tego samego związku chemicznego. Bardzo popularną metodą stosowaną do otrzymywania czystych enancjomerów jest rozdział kinetyczny. Wykorzystuje on różnice w szybkości reakcji poszczególnych enancjomerów z wybranym reagentem i pozwala na jednoczesne otrzymanie dwóch enancjomerów tego samego związku o dużej czystości optycznej i z dużą wydajnością.

Czyste enancjomery kwasu migdałowego (kwasu α -hydroksyfenylooctowego) i ich pochodne są cennymi materiałami znajdującymi szereg zastosowań jako substraty, półprodukty lub czynniki rozdzielające w syntezie substancji biologicznie czynnych, w tym farmaceutyków [1–3]. Opracowane dotychczas sposoby pozyskiwania tych wartościowych związków prowadzą głównie do otrzymania kwasu (*R*)-migdałowego. Próby otrzymania enancjomeru *S* nie przyniosły dotychczas satysfakcjonujących rezultatów [4, 5]. Najbardziej obiecującą metodą jest rozdział kinetyczny jednak informacje dotyczące wykorzystania tej reakcji do rozdzielania enancjomerów kwasu migdałowego są niekompletne.

Przedmiotem badań był kinetyczny rozdział enancjomerów kwasu migdałowego (KM) na drodze transestryfikacji octanem winylu (OW). Na podstawie wcześniejszych badań prowadzonych w reaktorze okresowym stwierdzono, że przebieg reakcji można opisać kinetyką *Bi Bi Ping Pong* [6]. Niniejsze badania posłużyły zweryfikowaniu poprawności opracowanego modelu matematycznego oraz określeniu reżimu decydującego o przebiegu przemiany w reaktorze kolumnowym.

Materiały i metody

Enzym i odczynniki chemiczne. Stosowaną w badaniach lipazę z *Burkholderia cepacia* (*Amano PS*) zakupiono w koncernie *Sigma-Aldrich*. Enzym ten posiada aktywność równą 30 130 U, wyznaczoną metodą MIS. Charakterystyka oraz źródło pochodzenia odczynników chemicznych używanych do badań została omówiona w pracy [6].

Metody analityczne. Przebieg oraz enancjoselektywność badanej reakcji monitorowano z użyciem HPLC wyposażonego w analityczną kolumnę chiralną *Chiralcel OD*. Warunki prowadzenia analiz były zgodne z przedstawionymi w publikacji [6].

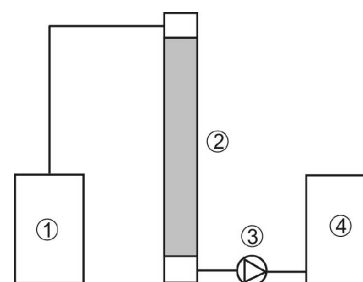
Metody numeryczne. Wyznaczenie parametrów kinetycznych opierało się na poszukiwaniu minimum funkcji wielu zmiennych, którą był sumaryczny błąd bezwzględny (ϵ) dopa-

sowania obliczeń modelowych ($C_{P,obl}$; $C_{(S)-KM,obl}$) do danych doświadczalnych (C_P ; $C_{(S)-KM}$):

$$\epsilon = \sum_j [(C_{P,j} - C_{P,obl})^2 + (C_{(S)-KM,j} - C_{(S)-KM,obl})^2] \quad (1)$$

Całkowanie równań kinetycznych przeprowadzono metodą *Rungego-Kutty* czwartego rzędu, a do znalezienia minimum funkcji zastosowano bezgradientową metodę iteracyjną.

Układ badawczy i metodyka badań. Schemat układu użytego do badań kinetycznego rozdziału enancjomerów w reaktorze kolumnowym przedstawiono na rys. 1.



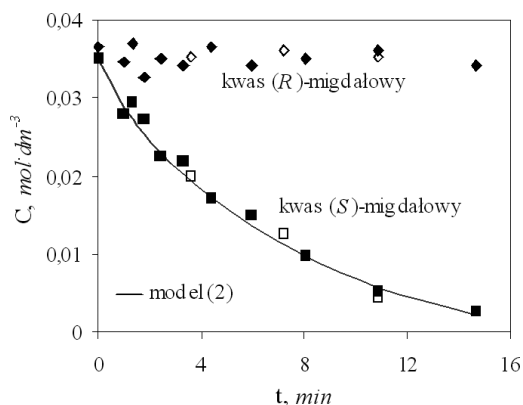
Rys. 1. Schemat układu badawczego (opis w tekście)

W skład zestawu wchodził szklany zbiornik – 1 zawierający rozpuszczone w eterze diizopropylowym odpowiednie ilości substratów (kwasu migdałowego oraz octanu winylu), szklana kolumna ($0,6 \times 7,0 \text{ cm}^2$) – 2 wypełniona natywną lipazą z *Burkholderia cepacia*, pompa perystaltyczna – 3 oraz szklany zbiornik zawierający mieszaninę poreakcyjną – 4. Wszystkie elementy zestawu były ze sobą szczelnie połączone za pomocą węży polipropylenowych. Gwarantowało to identyczny przepływ mieszaniny na wlocie oraz na wylocie z kolumny przy zastosowaniu tylko jednej pompy perystaltycznej.

Badania prowadzono w temperaturze pokojowej ($24\text{--}26^\circ\text{C}$), którą kontrolowano za pomocą termometru rtęciowego umieszczonego w pobliżu układu reakcyjnego. Użyto różnych przepływów mieszaniny reakcyjnej przez kolumnę ($0,08\text{--}1,21 \text{ ml min}^{-1}$) oraz czterech ilości umieszczonego w kolumnie enzymu (200, 400, 600 i 1000 mg), co dawało różny czas przebywania mieszaniny reakcyjnej w reaktorze ($0,33\text{--}24,4 \text{ min}$). W celu zbadania kinetyki reakcji stosowano cztery różne początkowe stężenia racemicznego kwasu migdałowego ($0,03$; $0,05$; $0,07$ i $0,10 \text{ M}$) oraz octanu winylu. We wszystkich reakcjach zachowano stały stosunek molowy OW:KM równy 10:1.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 2 przedstawiono przykładowy przebieg badanej reakcji transestryfikacji. Naniesiono na nim jednocześnie dane doświadczalne otrzymane dla różnych szybkości przepływu



Rys. 2. Przebieg badanej reakcji transestryfikacji oraz porównanie krzywej modelowej (2) z danymi doświadczalnymi

(znaczniki pełne) oraz dla różnych ilości enzymu (znaczniki puste). Jak można zauważyć układają się one na jednej krzywej. Podobne wyniki otrzymano dla wszystkich użytych stężeń początkowych substratu.

Podobnie jak w przypadku reakcji prowadzonej w reaktorze okresowym [6, 7] użyta lipaza wykazuje w zastosowanych warunkach wysoką selektywność w stosunku do enancjomeru *S* kwasu migdałowego. Na przedstawionym rysunku można zauważyć, że w miarę przebiegu reakcji w mieszaninie ubywa tylko kwasu (*S*)-migdałowego. Po całkowitym jego przereagowaniu reakcja praktycznie zatrzymuje się, a jej wynikiem jest mieszanina pojedynczych enancjomerów: nieprzereagowanego substratu (kwasu (*R*)-migdałowego) oraz produktu acyloowania (kwasu (*S*)-*O*-acetylmigdałowego). Związki te różnią się właściwościami chemicznymi i fizycznymi, zatem mogą być od siebie oddzielone na drodze konwencjonalnych metod fizykochemicznych.

Modelowanie matematyczne badanego procesu przeprowadzono tylko dla przemiany kwasu (*S*)-migdałowego, ponieważ tylko ten enancjomer ulegał reakcji transestryfikacji octanem winylu. Wpływ przemiany enancjomeru *R* na przebieg procesu został pominięty.

Mając na uwadze wcześniejsze badania prowadzone z użyciem 0,03 M początkowego stężenia kwasu migdałowego i czterech różnych stężeń octanu winylu [6] przebieg badanej reakcji opisano prostym modelem *Bi Bi Ping Pong* [8]. Wyznaczone dla reakcji prowadzonej w reaktorze kolumnowym parametry kinetyczne tego modelu zależały jednak od stężenia kwasu migdałowego w strumieniu wlotowym. Stwierdzono, że obliczone wartości stałej *Michaelisa* dla kwasu migdałowego rosną wraz ze wzrostem stężenia substratu, co wyklucza efekty dyspersji wzdłużnej oraz oporów dyfuzyjnych w złożu enzymu. Z tego względu rozważono możliwość inhibicji enzymu substratami i produktami reakcji. Charakterystyczną cechą reakcji katalizowanych lipazami jest inhibicja kompetycyjna alkoholem [8, 9]. W przypadku badanej reakcji najlepsze rezultaty otrzymano jednak dla modelu *Bi Bi Ping Pong* uwzględniającego nie tylko kompetycyjną inhibicję kwasem migdałowym, ale także niekompetycyjną inhibicję produktem reakcji, opisaną równaniem [8]:

$$r = \frac{r_{max}}{1 + \frac{K_{OW}}{C_{OW}} \left(1 + \frac{C_{(S)-KM}}{K_{i,(S)-KM}} \right) + \frac{K_{(S)-KM}}{C_{(S)-KM}} + \frac{C_P}{K_{i,P}}} \quad (2)$$

gdzie r_{max} jest szybkością maksymalną, K_{OW} i $K_{(S)-KM}$ oznaczają stałe *Michaelisa* dla kwasu (*S*)-migdałowego ((*S*)-*KM*) i octanu winylu (*OW*) zaś $K_{i,(S)-KM}$ i $K_{i,P}$ to stałe inhibicji kwasem migdałowym oraz produktem reakcji.

W tablicy 1 przedstawione zostały parametry kinetyczne równania 2. Nie zależą one od użytych w reakcji początkowych stężeń substratów.

Tablica 1
Parametry kinetyczne modelu *Bi Bi Ping Pong* z inhibicją substratem i produktem

$C_{0,(S)-KM}$, [mol·dm ⁻³]	0,015	0,025	0,035	0,05	średnio
r_{max} , [mol·dm ⁻³ ·min ⁻¹]	0,47	0,38	0,39	0,42	0,42
$K_{(S)-KM}$, [mol·dm ⁻³]	1,00	0,96	1,01	0,97	0,99
K_{OW} , [mol·dm ⁻³]	5,98	5,87	6,05	5,92	5,96
$K_{i,(S)-KM}$, [mol·dm ⁻³]	0,031	0,023	0,025	0,029	0,027
$K_{i,P}$, [mol·dm ⁻³]	0,00019	0,00023	0,00015	0,00017	0,00019
ϵ	$8,87 \cdot 10^{-6}$	$3,53 \cdot 10^{-6}$	$1,29 \cdot 10^{-5}$	$3,34 \cdot 10^{-5}$	

Na rys. 2 przedstawiono przykładowe porównanie danych doświadczalnych z krzywą modelową (2) otrzymaną z użyciem średnich wartości parametrów kinetycznych. Dobrą zgodność modelu z danymi doświadczalnymi otrzymano dla wszystkich początkowych stężeń substratu. W tablicy 1 zestawiono błędy bezwzględne dopasowania modelu do danych doświadczalnych.

Podsumowanie i wnioski

1. W wyniku katalizowanej lipazą z *Burkholderia cepacia* transestryfikacji kwasu migdałowego octanem winylu prowadzonej w reaktorze kolumnowym reakcja ulega tylko kwas (*S*)-migdałowy.
2. Reakcja biegnie zgodnie z kinetyką *Bi Bi Ping Pong* uwzględniającą kompetycyjną inhibicję kwasem migdałowym oraz niekompetycyjną inhibicję produktem reakcji.
3. Wyniki wskazują, że o przebiegu reakcji decyduje jej kinetyka, a nie zjawiska dyspersji wzdłużnej lub oporów dyfuzyjnych.

LITERATURA

1. O. Hernandez-Justin, M. Tereni, G. Pagani, J.L. Garbia, J.M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, et al: Enzyme Microb. Technol. **25**, 336 (1999).
2. K. Sakai, R. Sakurai, A. Yuzawa, Y. Kobayashi, K. Saigo: Tetrahedron Asymm. **14**, 1631 (2003).
3. J.P. Surivet, J. M. Vatele: Tetrahedron Lett. **39**, 9681 (1998).
4. G.D. Yadav, P. Siakumar: Biochem. Eng. J. **19**, 101 (2004).
5. F. Jourdain, T. Hirokawa, T. Kogane: Tetrahedron Lett. **40**, 2307 (1999).
6. K. Dąbkowska K.W. Szewczyk: Chem. Proc. Eng. **28**, 795 (2007).
7. K. Dąbkowska K.W. Szewczyk: J. Biotechnol. **131**, 79 (2007).
8. A.G. Marangoni: Enzyme kinetics. A modern approach, New Jersey, J. Wiley & Sons Inc., (2003).
9. R. Zhou, J-H. Xu: Biochem. Eng. J. **23**, 11 (2005).