

Záró szakmai beszámoló az „Enantiomerek és diasztereomerek elválasztása szuperkritikus állapotú oldószerekben” című, K72861 számú OTKA támogatott projektről

A szakmai zárójelentésben az eredeti munkatervben meghatározott pontok szerint rendszereztük az elvégzett munkát. Részletesen megadjuk az eltéréseket a munkatervtől. A folyóiratcikkben már publikált eredményeket csak röviden, a jelenleg publikálás alatt álló eredményeket valamivel részletesebben mutatjuk be és megadjuk a közlés várható legmagasabb formáját.

Vegyületek rövidítései:

Rövidítés	Név	Rövidítés	Név
AB	<i>S</i> -2-aminobutanol	EtOAc	etil-acetát
BAB	<i>S</i> -benzilamino-1-butanol	FEA	<i>R</i> -fenil-etil-amin
BS	<i>R,R</i> -borkősav	IBU	<i>R</i> -ibuprofén
CALB	<i>Candida antarctica</i> lipáz B	LAK	4-benzil-2-azetidion
CCH	<i>transz</i> -2-ciano-ciklohexanol	MTBE	metil-terc-butyl-éter
CHD	<i>transz</i> -1,2-ciklohexán-diol	PE	1-fenil-etanol
CKS	<i>cisz</i> -krizantémsav	PIRI	terc-butyl-3-fenil-4-hidroxi-pirrolidin-1-karboxilát
CO ₂	szén-dioxid	THF	tetrahidrofurán
CPS	<i>cisz</i> -permetrinsav		

1. Diasztereomersó-képzési egyensúly mérése nagynyomású szén-dioxid alatt

Diasztereomersó-képzési egyensúly szuperkritikus szén-dioxidban történő vizsgálatáról a szakirodalom a munkánkat megelőzően nem számolt be. A mérések elvégzéséhez kialakítottunk egy nagynyomású mérőrendszert, amelyben a szakaszos kevert reaktort (nyomás és hőmérséklet állandóan tartása mellett) folyamatos, kevert tartályreaktor üzemeltetésre átváltva mintát lehet venni tetszőleges időközönként a reakcióelegyből. Jellemzően hosszú, akár két hetes reakcióidők is szükségesek voltak a mérések során, ezért a gáztömör kialakítás meghatározó szempont volt a reaktor kialakításakor. A megfelelő keveredés biztosítása a mosási lépés során kihívást jelentett, de a végső kialakításban turbulens keveredést tudunk biztosítani, és a mosás során a kimosódási hatások jól leírható az ideális kevert tartályreaktor modelljével. A tartózkodási idő eloszlás

mérése és matematikai leírása nemcsak a mérőberendezés minősítése miatt fontos, hanem a termelés adatok kiértékelése során is felhasználtuk az elért kimosódási hatásfokot.

A fluid fázisból vett minták enantiomer tisztaságát gázkromatográfiás módszerrel határoztuk meg, valamint a gázkromatográfiás eredményeket felhasználtuk az anyagmérleg felállításában. A reaktorban hosszú mosás után visszamaradó, zömmel diasztereomert tartalmazó szilárd fázist porröntgen diffrakcióval (XRD), szükség esetén termoanalitikai módszerekkel, valamint minden esetben gázkromatográfiával vizsgáltuk, hogy komplex képet kapjunk az összetétel és enantiomer tisztaság mellett a keletkező kristályos fázisokról is.

A különböző, beállított nyomáson és hőmérsékleten felvett enantiomer tisztaság – idő lefutási görbék alapján a reakciók kinetikai lefutásáról alkottunk képet. Egyensúlyi reakción alapuló modellt állítottunk fel. Azt feltételezzük, hogy a hőmérséklet és a nyomás is befolyásolja a reakciósebességet (a hőmérséklet emelése az Arrhenius-egyenletnek megfelelően növeli a reakciósebességet; a nyomás növelésével nő adott hőmérsékleten a komponensek oldhatósága és így a koncentráció az oldószerben; a sóképzési reakció feltételezhető negatív aktiválási térfogata miatt a nyomás emelése a reakciósebességi együtthatók értékét növeli) és az egyensúlyi enantiomer arányt a sóban (a hőmérséklet emelése a termikusan stabilabb diasztereomer só keletkezésének kedvez; a nyomás emelése a kisebb csomagolási térfogatú diasztereomer só képződésének kedvez).

Az 1.1-1.5 alpontokban minimum négy diasztereomer só képződési rendszer vizsgálatát és a fenil-etil-amin (FEA) szén-dioxidban történő átalakulását terveztük. Az F-kinolinból nem tudtunk megfelelő tisztaságú racém anyagot előállítani. A tetramizolt pedig a rendelkezésre álló királis gázkromatográfiás rendszereken nem volt megvalósítható, ezért ezek helyett a racém vegyületek helyett alternatív mintapéldákat kerestünk, ami vegyület pár szempontból a tervezettől kismértékű eltérést jelent. A megvalósult munkában a FEA részletes vizsgálata mellett (J. Thermal Anal. Cal. 111(1) 567-574, 2013) az IBU-FEA (J. Supercrit. Fluids 69, 113-116, 2012), CPS-FEA, CPS-BAB, CKS-BAB, CHD-BS részletes vizsgálatát és számos egyéb rendszer tesztelését végeztük el. A CPS és CKS alapú rendszerekről az összefoglaló közlemény kézirat elkészült és hamarosan beküldjük.

Vizsgálataink arra utaltak, hogy az új kristályszerkezet a FEA és a szuperkritikus szén-dioxid reakciója során képződik, és azonos a FEA és az atmoszferikus szén-dioxid reakciójából képződött vegyülettel. Noha a FEA légköri szén-dioxidra érzékeny mivolta jól ismert, az így képződött vegyület szerkezete az irodalomban nem volt elérhető. Részletes analitikai vizsgálatokkal – differenciális pásztázó kalorimetria (DSC), szimultán termogravimetria és differenciális termikus analízis (TG/DTA) in situ tömegspektroszkópiás fejlődőgáz-analízissel (TG/DTA-EGA-MS), termogravimetriával csatolt Fourier-transzformációs infravörös spektroszkópiával (TG-FTIR) – sikerült azonosítani a vegyületet. A FEA reagál egy szén-dioxid molekulával, majd az így képződött karbamát származék sőt képez egy újabb FEA molekulával;

a képződött vegyület IUPAC megnevezése (1*R*)-1-feniletánamínium ((1*R*)-1-feniletil)karbamát. Racém FEA-ből kiindulva egy csupán sztereokémiájában különböző vegyület keletkezik.

Az IBU - FEA resolválási rendszer esetén a reakcióidő a vizsgált tartományban (1,5–92 óra) jelentősen befolyásolja a reakció lefutását, mintegy 72 óra után azonban hatása csökken. A hőmérséklet hatása szintén jelentős a vizsgált 25–80 °C tartományban: optimuma 35 °C környékén található, 45 °C fölött azonban – az IBU oldhatóságának drasztikus csökkenése miatt – gyakorlatilag nem végezhető el a resolválás. Szuperkritikus szén-dioxidban azonos kristályszerkezetben kristályosodik a diasztereomer só, mint vákuumbepárlás során. A szén-dioxidban végbemenő reakcióból a reakció egyensúly elérésekor jó termeléssel magasabb enantiomer tisztaságú termék nyerhető ($ee > 60\%$), mint a hagyományos mintaelőkészítést követő optimalizált szuperkritikus extrakció alkalmazásával ($ee < 50\%$).

A cisz-permetrinsav (CPS) resolválását két resolválószerrel, (*R*)-fenil-etil-aminnal (FEA) és (+)-(benzilamino)-1-butanollal (BAB), vizsgáltuk. [A BAB kereskedelmi forgalomban nem kapható, azt (+)-aminobutanolból és benzaldehidből hidrogénezéssel szintetizálta dr. Hegedűs László (BME SZKT), GC-MS mérések alapján $>97\%$ tisztaságban.] A CPS-FEA párnál, amely atmoszférikus mintaelőkészítés utáni $scCO_2$ -s extrakcióval jó elválasztást eredményezett (ee 30–50% körülményektől függően mind az extraktumban, mind a raffinátumban rövid (<1 óra) kísérleti idő esetén, teljesen racém termékek keletkeztek szuperkritikus szén-dioxidban. Idővel a vákuumbepárlással előkészített minta enantiomer tisztaság értékei is csökkennek. A vákuumbepárlással készített minták XRD felvételei eltértek, míg a $scCO_2$ -ben előállított minták felvételei megegyeztek az egykristály szerkezetekből generált XRD diffraktogramokkal. A CPS - BAB resolválási rendszer, amelyben az $ee < 7\%$ atmoszférikus mintaelőkészítést követő szuperkritikus extrakciós (SFE) elválasztás esetén, jó enantioszelektivitást mutatott a $scCO_2$ -ben történő diasztereomer só képzéssel ($ee > 40\%$ az extraktumban, $ee \approx 90\%$ a raffinátumban 20 óra után, ami egy resolválási lépésben kiemelkedően hatékonynak számít). A jelenség magyarázata feltételezésünk szerint az, hogy amíg FEA resolválószerrel kinetikus kontrol esetén kapunk jó elválasztást és a két diasztereomer só stabilitása közel megegyezik szén-dioxidban, addig BAB resolválószer esetén a két diasztereomer só képződési sebessége közel azonos, azonban stabilitásuk eltér, ezért a termodinamikai kontroll a megfelelő a hatékony elválasztáshoz.

A cisz-krizantémsav (CKS) resolválását sikeresen elvégeztük szén-dioxidban BAB-bal, de FEA-val és aminobutanollal (AB) nem értünk el számottevő elválasztást semmilyen nyomás-hőmérséklet beállítás mellett sem. A reakció rendkívül érzékeny mind a nyomás (80 – 200 bar) mind a hőmérséklet (26 – 55 °C) beállításokra, aminek az oka az oldhatósági viszonyok változása (lásd. 2. munkatervi pont). Királis elválasztást csak 150 bar nyomás és 50 °C hőmérséklet értékek alatt sikerült elérnünk. Optimumnak tekinthető a 80–100 bar nyomás és a 33–35 °C hőmérséklettartomány. Ekkor mindkét enantiomer $\sim 50\%$ -os ee értékkel nyerhető ki.

A transz-1,2-ciklohexándiol (CHD) resolválását *L*-(*R,R*)-borkősav (BS) resolválószerrel vizsgáltuk. A diasztereomer komplex nem képződik kimutatható mértékben meg szén-dioxidban,

aminek véleményünk szerint az az oka, hogy a BS oldhatatlannak tekinthető szén-dioxidban, ezért a komplexképzéshez szilárd fázisú reakcióra lenne szükség, aminek a sebessége nagyon kicsi. A vákuumbepárlással előkészített minták azonban a nyomástól és a hőmérséklettől függően eltérő egyensúlyi állapot felé mozdulnak el szén-dioxid oldószerben. Az enantiomer tisztaság időfüggése a különböző nyomáson végzett kísérletekben eltér, a nyomás és a hőmérséklet kölcsönhatása jelentős. 100 bar nyomáson a hőmérsékletnek nem mutatható ki hatása 33-63 °C hőmérséklettartományban ($ee \approx 70\%$, megegyezik a vákuumbepárlással történő mintaelőkészítés során keletkező elreagálatlan enantiomer ee értékével), 150 bar nyomáson 63 °C hőmérsékleten az extraktum ee értéke az idővel folyamatosan csökken 30 % alá, míg 33 és 48 °C tartományban 70%. 200 bar nyomáson 33 °C-on a fluid fázisban az ee értéke időben állandó és 70%, 43°C-on 4 óra alatt 40-45%-ig, 20 óra alatt 35%-ig csökken. 30 % körüli ee értéket mértünk hosszabb idő elteltével 48 °C és 63 °C hőmérsékleteken is. Az eredmények különösen érdekesek, ha összevetjük a rövid idejű (20-40 perc) szuperkritikus szén-dioxidos extrakciós rezolválás illetve frakcionált extrakció optimalizálása során kapott eredményeinkkel (Tetrahedron-Asymmetry 19, 1587-1592, 2008; Ind. Eng. Chem. Res. 49:(19), 9349-9354, 2010), ahol azt kaptuk, hogy 100 bar nyomáson az extraktum enantiomer tisztasága közel független a hőmérséklettől 33-63 °C tartományban, 200 bar nyomáson a hőmérséklet emelésével 33-63°C tartományban az extraktum ee értéke csökken (62%-ról 40%-ra) és hosszú idejű extrakcióval 200 bar nyomáson 73 °C felett a diasztereomer komplexből a visszamaradt enantiomer extrahálható. Az egyensúlyi mérések tehát alátámasztják azt a pályázat megírásakor felállított hipotézisünket, hogy a szuperkritikus extrakciós rezolválás során tapasztalt nyomás – hőmérséklet hatás oka a rendszer $scCO_2$ közegben létező, nyomás és hőmérsékletfüggő egyensúlya felé történő elmozdulás.

2. Oldhatóságbeli különbségek mérése és modellezése

Az oldhatóság mérése és matematikai leírása minden szuperkritikus oldószerben végzett művelet megértéséhez szükséges, ezért a szakirodalomban számos módszer ismert. A laboratóriumunkban a statikus-szintetikus és a dinamikus oldhatóság mérési technikákat alakítottuk ki és alkalmaztuk az összes vizsgált vegyület esetében, hiszen már a megfelelő bemérések meghatározásához elengedhetetlen az oldhatósági viszonyok feltérképezése. A biner elegyek méréseitől a terner elegyek mérése felé haladtunk, valamint megfigyeltünk a komplex reakcióelegyek viselkedését látóüveges cellában. Általánosítható eredmény, hogy a diasztereomer sók oldhatósága tiszta szén-dioxidban a kimutathatósági határ alatt, van abban az esetben, ha a rezolválószer önmagában sem oldódik szén-dioxidban (CPS-FEA, IBU-FEA, CKS-FEA, CHD-BS). Abban az esetben, ha a diasztereomert alkotó mindkét vegyület oldható külön-külön a szén-dioxidban (oldószerelegyen), akkor is minimum egy nagyságrend különbség van az egyedi komponensek és a diasztereomer só oldhatósága között (CPS-BAB, CKS-BAB). A diasztereomer sók megfelelő oldószer – szén-dioxid elegyen feloldhatóak (oldószer tartalom <20%). A diasztereomerek kis oldhatósága miatt az egymással diasztereomer viszonyban álló sók oldhatósága között csak kivételes esetben tudunk a mérési pontosságon belül különbséget tenni (*R*-CPS-*R*-FEA só oldhatósága minimum kétszerese 140 bar nyomáson és 40

°C hőmérsékleten, mint az *S-CPS-R-FEA* sóé metanol – szén-dioxid elegyben). Valójában a mérés technika nem ad arra választ, hogy a disszociációs fokot, vagy magának a diasztereomer sónak az oldhatóságát mérjük, azonban ennek elkülönítése az elméleti háttér megértése miatt fontos –ha egyáltalán lehetséges- és nem a gyakorlati alkalmazhatóság miatt.

Az enzimkatalizált kinetikus reszolválások szubsztrátjai és termékei közül az alkoholok és a keletkező acetát termékeik oldhatósága közel azonos, az acetátoké kissé nagyobb (CHD és acetátjai, CCH és acetátja, PE és acetátja, PIRI és acetátja). A nyomás és hőmérséklet változtatásával az oldhatóságok aránya nem változott jelentősen. A 4-fenil-2-azetidion szubsztrát és az (*R*)-fenilalanin termék oldhatóság több mint egy nagyságrend különbséget mutat a vizsgált 90-210 bar nyomás és 33-80 °C hőmérséklet tartományban, ezért az extrakciós elválasztásuk ígéretes. Az oldhatósági adatokat nem függetlenül, hanem az enantiomer-elválasztási módszert leíró közleményekben publikáltuk, illetve fogjuk publikálni.

A mérési adatokra először empirikus modelleket (Chrastil-egyenlet, Yu és Joyuban-egyenletek) illesztettünk. Az állapotegyenletekkel történő leírás első lépésben a Phase Equilibria 2000, a Sandler és a GPEC (Global Phase Equilibrium Calculations) szoftverek összehangolt alkalmazásával kíséreltük meg a kísérleti oldhatósági adatokra történő illesztést. Az illesztés megbízhatóságának ellenőrzését irodalmi mintapéldák alapján (naftalin, ibuprofen, etanol, metanol, stb.) majd a saját mérési eredményeink felhasználásával végeztük. Ezek a szoftverek azonban nem tettek lehetővé elegendő flexibilitást a számolások során, ezért MatLab fejlesztői környezetben, A. Martin és mtsi (Teaching advanced equations of state in applied thermodynamics courses using open source programs, Educ. for Chem. Eng., 6(4), 114-121, 2011) szoftvercsomagjából kiindulva alakítottuk ki a biner elegyek kölcsönhatási paramétereinek illesztéséhez szolgáló algoritmusokat. A modellezés során többek között arra kérdésre kerestük a választ, hogy hogyan kellene a mérésszám megtartása mellett módosítani a kialakított mérési protokollt, hogy a modellezés számára megfelelőbb, és ezért a valóságot jobban leíró modellt kapjunk. Az eredmények alapján a mérési hőmérsékletek számát csökkenteni lehet, azonban egy-egy hőmérsékleten minimum 5 koncentrációnál meg kell határozni az opálósodási nyomást a statikus módszernél (a dinamikus módszernél pedig minimum 5 nyomásnál meghatározni az oldhatóság értékét) ahhoz, hogy megfelelő bemenő adatot szolgáltatassunk az állapotegyenletek segítségével történő matematikai leíráshoz.

3. Diasztereomerek kristályosítása antiszolvens technikákkal

A kutatási munka első évében komoly erőfeszítést és időráfordítást igényelt az egyes új mérési területekhez kapcsolódó készülékigény (3.1 alpont). Az antiszolvens kristályosításhoz nem rendelkezünk korábban jól működő kristályosítóval. Szakaszos mérésekhez (gas antisolvent precipitation= GAS) az 1. munkatervi pont megvalósításához kialakított mérőrendszert fejlesztettük tovább, mert antiszolvens kristályosítás esetén a hatékony, de eldugulásra nem hajlamos szűrés megoldása kulcsfontosságú. Ha nem elég hatékony a szűrés, mosáskor a kisméretű (mikrométeres tartomány) kristályokat kihordja a készülékből az áramló közeg, ha

pedig eltömődik a szűrő, akkor nyomásmentesítéskor a visszamaradó, szerves oldószer visszaoldja a kristályos mintát, ezért a kristályosítás nem működhet. A GAS készülék kialakítása után sikerült csak úgy átalakítanunk a félfolyamatos (supercritical antisolvent = SAS) készüléket, amellyel a kristályképződés valóban konstans nyomáson és hőmérsékleten történhet, hogy preparatív méretű kristályosítást tudjunk végrehajtani. Itt a szerves oldószerben feloldott komponenseket a nyomás alatti térbe egy fúvókán keresztül injektáljuk, miközben a szén-dioxid áramlás is folyamatos. A szűrés megoldása mellett ennél a készüléknél számos további fejlesztést kellett megoldani, mint –a teljesség igénye nélkül- a fúvóka megfelelő kialakítása, a szén-dioxid beoldódásának megakadályozása az injektálás megkezdése előtt a mintát tartalmazó szerves oldószerbe, mert ez a csővezetékek azonnali eltömődését okozza, vagy a belépő áramok megfelelő keveredése a nyomás alatti kristályosítóban, a nyomás szabályozása két független betáplálási áram mellett, ahol az áramok aránya is meghatározó a termékképzésre. A feladat komoly szakmai kihívást jelentett, hiszen a megoldáshoz számos sikertelen kísérlet részletes elemzésén, hipotézis és ellenhipotézis felállításán majd igazolásán/elvetésén keresztül jutottunk el.

GAS mérésekkel (3.2 alpont) vizsgált resolválási rendszerek közül a CPS–BAB, a CHD-BS és a CKS-BAB rendszerek esetén nem tapasztaltunk királis megkülönböztetést. A CPS–FEA és IBU-FEA rendszerek esetében kevés diasztereomer képződött, azonban a képződő diasztereomer só enantiomer felesleg tisztaság értékei a paraméterektől függően elérték a 80–90%-ot. A kidolgozott mérési módszer alkalmas az antizolvens kristályosítás gyors tesztelésére és a meghatározó paraméterek megfelelő beállítása esetén szelektív diasztereomer só kristályosításra.

A CPS-FEA rendszer esetén (3.3 alpont)részletesen vizsgáltuk a nyomás hatását 200 bar és 100 bar között 45 °C-on. Az eredmények alapján a nyomásnak igen jelentős hatása van az enantiomer tisztaságra és a termelésre is. Az enantiomer tisztaság 96%-tól egészen 0%-ig változik, 120 bar és 130 bar valamint 170 bar és 180 bar között igen éles, ugrásszerű változás figyelhető meg. 130- 170 bar között kis átmérőjű (<500 nm) szálás termék keletkezik. Az IBU-FEA rendszer esetén 200-150-100 bar nyomáson mérve kisebb mértékű eltérés figyelhető meg, a diasztereomer só enantiomer tisztasága 80-90% volt. A vizsgált tartományban a hőmérséklet hatása kisebb, mint a nyomásé, de nem elhanyagolható.

A SAS módszer (3.4 és 3.5 alpontok) elvi működését igazoltuk a gyakorlatban is és egy lépésben értünk el félfolyamatos rendszerben mikronizálást és resolválást. A SEM felvételek alapján az eljárás során képződő kristályok hosszú szálás szerkezetűek. A szálak átmérője egy mintán belül szűk eloszlást mutat, azonban a különböző minták (különböző körülmények) között jelentős eltérés lehet (250–400 nm mérettartománytól egészen a 3–4 μm-ig), míg adott beállításnál a képződő kristályok homogének, és jól reprodukálható mind az enantiomer tisztaság mind a kristályméret (pontos méreteloszlás vizsgálatot nem állt módunkban végezni). CPS-FEA rendszer esetében, metanol oldószerből végezve a kristályosítást a kristályok termelése ugyan alacsony (5–26%), optikai tisztaságuk azonban meghaladja a 85%-ot, néhány kísérletben pedig a

95%-ot is eléri. Az enantiomer tisztaság adatok kissé jobbak, mint az azonos körülmények között végzett GAS kísérletekben, a termelés értékek közel azonosak.

A kristályok képződésére a nyomás, hőmérséklet, a fázisarányok és az oldott anyag injektált szerves oldószerben való koncentrációja közül mindegyik jelentős hatással van. Vizsgált tartományban az injektálás térfogatára (az oldószer / CO₂ arány állandóan tartása mellett) nem volt kimutatható hatással a keletkező kristályokra, de már a minimális térfogatot is úgy választottuk meg, hogy a fúvóka porlassza az oldószert. A porlasztást a látóüveges cellában figyeltük meg, hogy levegőben a képződő jet teljesen eltérő karakterű, mint ha szuperkritikus szén-dioxidba történik az injektálás. Az legjobb beállítások mellett képződő kristályok rendkívül laza szerkezetű, kis halmazsűrűségű fázist alkotnak, a halmazsűrűség kb. huszada a vákuumbepárlással előállított azonos mintakénak. A halmazsűrűség mechanikai behatásra (rázás, keverés) könnyen növelhető anélkül, hogy a kis szemcseméret (nagy fajlagos felület) változna.

Összevetve az eredményeinket a szakirodalomban leírt összesen kettő diasztereomer kristályosítással, úgy véljük, hogy jelentős előrelépést értünk el. Az elképzelést először 1999-ben vetették fel Kordikowski és mtsi, akik efedrint rezolváltak (teljes diasztereomer só képzéssel) *R*-mandulasav rezolválószerezrel. A felhasznált racém mennyisége kísérletenként kicsi volt ~260 mg, ami körülbelül megegyezik a GAS kísérletekben általunk használt anyag mennyiségével. Az elválasztás hatékony volt (ee 85-90% egy lépésben) keletkező kristályok >200 µm jellemző méretűek voltak. Martin és Cocero 2007-ben a mandulasav rezolválását mutatta be FEA-val grammos méretben. A maximális elért enantiomer tisztaság 63% volt, kristályméret > 20 µm. A saját eredményeinket eddig csak konferencián mutattuk be, illetve TDK dolgozat és BSc szakdolgozat alapjául szolgáltatták, nemzetközi folyóiratban történő publikációját a közeljövőben tervezzük.

4. Enzimkatalizált kinetikus rezolválás – termék elválasztás szuperkritikus extrakcióval

Az enzimkatalizált kinetikus rezolválás témakörön belül az egyes alpontokban eltérő sikerességgel haladt a kutatómunka. Az 1. munkapontban leírt készülékfejlesztés lehetővé tette, hogy szuperkritikus szén-dioxidban végzett enzimkatalizált rezolválások időbeli lejátszódását nyomonkövessük, míg adszorpciós termék- szubsztrát elválasztások nehézségekbe ütköztek (lásd alább), ezért jelentősebb előrehaladást az előbbi témakörben értünk el.

A terc-butil-3-fenil-4-hidroxipirrolidin-1-karboxilát kiválasztása során figyelembe vettük, hogy az utóbbi néhány évben több szabadalom szerzői alapanyagként használják a vegyületet különböző biológiailag aktív származékok szintéziséhez. A vegyületet az irodalom szerint racém formában (*S,R* és *R,S* enantiomerek keverékeként) állítják elő, az enantiomereket királis preparatív HPLC-s módszerekkel választják szét. A tiszta enantiomerek drágán, kis mennyiségben kaphatóak.

Célunk volt egy olcsó, környezetbarát módszer kifejlesztése az enantiomerek szétválasztásához. Ahol nem csak az enantioszelektív reakció, de a termék szubsztrát elválasztás is hatékony.

A 4.1 alpontnak megfelelően előkísérleteinkhez a racém észtert (acetátot és butirátot) az alkohol kémiai acilezésével (savanhidriddel vagy savkloriddal piridinben) állítottuk elő. Az alkohol-észter keverékek szilárd hordozó/hexán megoszlási tulajdonságait vizsgáltuk a racém alkohol, illetve az acilcsoport minőségének függvényében. A megoszlási hányados vizsgálatok az tapasztaltuk, hogy már a legapolárisabb oldószer (hexán) is a hordozóra (szilikagél, celit, florisil) felvitt észter és a polárisabb alkohol nagy részét (~80%) leoldotta, így nem volt értelme a további atmoszférikus adszorpciós vizsgálatoknak (4.5 alpont).

4.2- 4.4 alpontok: Acilezőszernek vinil-acetátot használtunk. A kísérletsorozatban az alkoholt tetrahidrofuránban feloldottuk, vinil-acetátot és enzimet adtunk hozzá. Az alkohol és az enzim tömegaránya 2:1 volt. A reakciókat 30 °C-on végeztük, a komponensek keveredését rázatással biztosítottuk. A következő enzimekkel végeztünk kísérleteket: *Burkholderia cepacia* Amano lipáz PS, *Aspergillus niger* Amano lipáz A, *Mucor javanicus* Amano lipáz M, *Rhizopus oryzae* Amano lipáz F-AP15, *Pseudomonas fluorescens* Amano lipáz AK, *Candida cylindracea* lipáz, Sertéshasnyálmirigy lipáz, *Candida antarctica* lipáz A, *Candida antarctica* immobilizált lipáz B (Novozym 435, CALB), *Thermomyces lanuginosus* immobilizált lipáz (Liposym TL IM), Papaya Latex papain, *Carica papaya* papain, *Mucor miehei* immobilizált lipáz, termofil fonalas gombákból előállított enzimek készítmény (BUTE-3). Csak a BUTE-3 és a Novozym 435 CALB enzimek készítményeknél sikerült kimutatható konverziót elérni.

Az enzimek katalitikus tulajdonságai erősen függenek az alkalmazott oldószertől. Mind a reakciósebességet, mind a szelektivitást befolyásolják, ezért nagyon fontos feladat a legalkalmasabb oldószer megtalálása. A reakciókat VRK-val követtük, és azokból a mintákból, amelyekben a termék jól kimutatható volt, királis kolonnán gázkromatográfiás mérést is végeztünk a termék enantiomer összetételének a meghatározására. (Vizsgált oldószerek: EtOAc, MTBE, toluol, diizopropil-éter, hexán, aceton, THF) A reakciókat 30 °C-on végeztük, a komponensek keveredését rázatással biztosítottuk. A BUTE-3 enzimmel végzett reakciók eredményeként azt kaptuk, hogy a legmagasabb E-értéket (13,8) diizopropil-éterben sikerült elérni, a reakciósebesség is itt volt a legnagyobb (72 óra alatt 70%-os konverzió). 10-nél magasabb E-értéket értünk meg el az MTBE-ben és toluolban végzett kísérletekkor is. A CALB-vel végzett reakciók esetén értük el a legmagasabb E-értéket (15,0), ezt MTBE oldószertben mértük. Mivel Novozym 435-tel jobb szelektivitást tudtunk elérni, mint a BUTE-3-mal, ezért a későbbiekben ezzel az enzimmel dolgoztunk tovább mind atmoszférikus mind szuperkritikus méréseknél.

Az acilezőszer kiválasztásánál azt tapasztaltuk, hogy bár közel azonos az enantiomer szelektivitás, lényegesen gyorsabban játszódik le a reakció a rövidebb szénláncú észter (acetát) képződésekor, mint a hosszabb (butirát) előállítása során, így az acetátot választottuk ki.

MTBE-ben a reakció optimális hőmérséklete 40-50 °C között van. Ezekben az esetekben ≈55%-os konverziónál a korábbiakhoz képest jóval magasabb, 27 körüli enantiomer szelektivitást tapasztaltunk. A hőmérséklet emelésével a reakció sebessége kismértékben nő. (Az

atmoszférikus rezolválás eredményeiből a kézirat elkészült). Szuperkritikus szén-dioxidban 3^2 típusú faktoros kísérlettervet készítettünk a nyomás és a hőmérséklet reakciósebességre és enantioszelektivitásra gyakorolt hatásainak értékeléshez. Az idő, a nyomás és a hőmérséklet együttesen befolyásolják mind az enantiomer szelektivitást (1 és 50 közötti tartományban) mind az enzimaktivitást. Az enzim aktivitása hőmérséklet növelésével egyértelműen növekszik, míg az enantiomer szelektivitásnak a hőmérséklet és a nyomás függvényében maximuma van. 150 bar-on és 50 °C-on 50-es E-érték mellett 24 óra alatt 40 % hozammal enantiomertiszta ($ee > 99,9\%$) alkohol keletkezett.

Megvizsgáltuk továbbá a reakció utáni adszorpciós termékeltávolítás lehetőségeit, a hordozó, a nyomás, hőmérséklet és áramlási sebesség függvényében. A folyamatosan kevert tartályreaktor kivezető szelepét csővezeték segítségével összekötöttük egy kromatográfiás oszloppal, amibe a szilikagél, florisil illetve celit hordozót töltöttük és ezen keresztül végeztük el a reakcióelegy nyomás alatti eltávolítását a reaktorból. Az immáron alkoholt és acetátot is tartalmazó szén-dioxid végighalad az oszlopon, ahol megtörtént az elválás. A kiáramló szén-dioxidot csapdáztuk. A mintavétőt adott időközönként cseréltük. A celit erősebben köti az alkoholt és átengedi az észtert, míg a körülményektől függetlenül a florisil és a szilikagél hordozón mind az alkohol, mint az észter erősen kötődik. A celit alkalmas a reakcióelegyből tiszta észter előállítására (legjobb elválasztás, amikor leggyengébb az adszorpció, alacsony nyomáson és magas hőmérsékleten), azonban az észter – alkohol kvantitatív elválasztását nem tudtuk megoldani.

Szakaszos reaktorban részletes, kísérlettervvel alátámasztott vizsgálatokat végeztünk a Szegedi Tudományegyetemen Dr. Fülöp Ferenc csoportjával együttműködve egy racém β -laktám (4-benzil-2-azetidion) lipáz (CALB = *Candida antarctica* lipáz B) katalizált kinetikus rezolválására. A folyamat során a laktám gyűrű nyitásával enantiomertiszta β -aminosavat állítottunk elő. A reakció szuperkritikus szén-dioxid oldószerben teljes mértékben lejátszódik. A hőmérséklet és a nyomás reakcióra gyakorolt hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy az optimális nyomás 160 bar, míg az optimális hőmérséklet megközelítőleg 70 °C, amely kissé alacsonyabb, mint az enzim atmoszférikus hőmérséklet optimuma (kb. 80 °C). A laktám oldódik szén-dioxidban, az aminosav oldhatósága elhanyagolható, ezért extrakciós termék – szubsztrát elválasztást is megvalósítottunk a reakció lejátszódása után (a LAK $ee > 99\%$, aminosav $ee > 98\%$). (J. Supercrit. Fluids 55:(3), 1019-1022, 2011)

A *transz*-1,2-ciklohexán-diol enantiomerjei királis centrum beépítésére alkalmasak nagyobb molekulákba. A CHD enzimkatalizált enantioszelektív acilezését vizsgáltuk szuperkritikus szén-dioxidban és hexánban CALB enzimmel és vinil-acetát acilezőszerrel. Az acilezőszer/CHD aránnyal befolyásolható a reakció konverziója és a keletkező termékek aránya. A vinil-acetát mennyiségének növelésével a második acilezési reakció felé tolható el a rendszer. Szén-dioxidban az első acilezési lépés során keletkezett *R,R*-monoacetát rögtön tovább acileződik *R,R*-diacetáttá, és így termékként tiszta *R,R*-diacetát és nagy enantiomer tisztaságú ($ee > 98\%$) *S,S*-monoacetát marad. Hexánban az *S,S*-monoacetát enantiomer tisztasága nem haladta meg a 96%-ot, és a reakció lassabb is, mint azonos hőmérsékletű szén-dioxidban. A reakció kinetikai leírását

mind szén-dioxidban mind hexánban elvégeztük és meghatároztuk a reakciósebességi együtthatókat, irreverzibilis konszekutív reakciót feltételezve. (Az elkészített cikket 2012. decemberben 2. "revision" után javítva visszaküldtük a Process Biochemistry folyóiratnak.)

A CHD konszekutív enantioszelektív észterezése nagy enantioszelektivitású és gyors reakció szuperkritikus szén-dioxidban. A szakaszos kísérletek eredményei alapján megterveztünk és kialakítottunk egy folyamatos immobilizált enzimmel töltött csőreaktoron alapuló mérőrendszert, és vizsgáltuk az átlagos tartózkodási idő hatását a produktivitásra és enantiomer tisztaságra. Állandó nyomás és hőmérséklet mellett optimális a tartózkodási időnél közel 10-szeresére nőtt a produktivitás az enantioszelektivitás csökkenése nélkül. A mérési eredmények alátámasztották, hogy a reaktor tervezése során alkalmazott számítások helytállóak, és az enzim >28 óra alatt sem veszít aktivitásából. (J. Supercrit. Fluids, DOI: 10.1016/j.supflu.2012.11.016)

A *transz*-2-hidroxiciklohexánkarbonitril (CCH) szintén szintézis során használható királis alapanyag lehet. CALB katalizált enantioszelektív acilezése szuperkritikus szén-dioxidban a CHD-hoz hasonlóan nagy enantioszelektivitással megvalósítható (Tetrahedron Letters 52:(30), 3916-3918, 2011), bár a reakció típusa és kinetikája eltér. A CCH és acetátja egyaránt jól oldódik szén-dioxidban. A reakció vizsgálata során részletesen foglalkoztunk a víztartalom, nyomás és hőmérséklet hatásainak komplex, együttes értékelésével. Víztartalom szempontjából nagyon csekély, kb. az egyszer desztillált élelmiszeripari szén-dioxid víztartalmának megfelelő hozzáadott víz az optimális, ekkor az enzimaktivitás lényegesen nagyobb, mint hozzáadott víz vagy akár vízmentes oldószer (CO₂) használatakor.

5. Királis kromatográfiai módszerek kutatása

Az analitikai munkánkban a rezolválások követése és minősítése terén végeztünk fejlesztő munkát. Az enantiomer tisztaságok meghatározása minden esetben királis kromatográfiával történt. Minden vegyületre elvégeztük az analitikai módszer kifejlesztését. A módszerek a megfelelő publikációkban megjelentek/megjelennek. A kapilláris elektroforézis nyújtotta előnyök kihasználásán dolgoztunk, a rezolválási minták királis analíziséhez szükséges mindennap alkalmazandó módszerek kidolgozása mellett. (Magyar Kémiai Folyóirat, 11, 151-159, 2010) A rezolválás során keletkező diasztereomer só két komponensét határoztuk meg mennyiségileg az anionok és a kationok szelektív detektálásával a kapilláris katódos oldalán a királis összetétel meghatározása mellett. A mi esetünkben a CPS-FEA és CPS- BAB rezolválás analitikai fejlesztésével foglalkoztunk részletesen, a konverzió pontos meghatározásának érdekében.

Kidolgoztuk az előző pontokban részletezett vizsgált vegyületek királis gázkromatográfiai analízisét. A savak esetében származékképzést alkalmaztunk. Kapilláris elektroforézis felhasználásával megoldottuk, hogy a só képzésben résztvevő rezolválószer és az elválasztott anyag enantiomer szelektíven meghatározható legyen és így ne csak az enantiomer tisztaság, hanem a konverzió is egyszerre meghatározható legyen egy analitikai vizsgálattal. Tudomásunk szerint a szakirodalomban nem található ilyen analízis. A módszer már jól kidolgozott 1-fenilettil

amin rezolváló ágensre és cisz-permetrinsav elválasztandó anyagra, illetve 1-fenil-etil-amin és ibuprofen kombinációra (Acta Politechnica Hungarica, elfogadva). A kutatások során több új ciklodextrin származékot próbáltunk ki. Az elválasztásainkhoz a monoamino-dimetilezett- β -ciklodextrin bizonyult legmegfelelőbbnek.

Eredmények

A BME-n a csoport által korábban kifejlesztett igen hatékony szuperkritikus extrakciós rezolválás tapasztalataiból kiindulva további enantiomer előállítási módszereket dolgoztunk ki és vizsgáltunk meg. A világon elsőként valósítottunk meg in situ diasztereomer só képzést tiszta szuperkritikus szén-dioxidban és kimutattuk, hogy a nyomás és a hőmérséklet befolyásolja a sóképzési reakció sebességét és a diasztereomer sók egyensúlyi arányát is. A szuperkritikus szén-dioxidot antiszolvensként alkalmazva nagy enantiomer tisztaságú és mikroméretű diasztereomer só kristályosítására alkalmas eljárást dolgoztunk ki. A legfontosabb eredménye az antiszolvens kristályosításon alapuló rezolválásnak a “know how”, ami akár az enantiomer tisztaság maximalizálását akár a szemcseméret eloszlás szabályozását lehetővé teszi. A harmadik enantiomer előállítási módszer, aminek alkalmazhatóságát bemutattuk az a szuperkritikus szén-dioxid oldószerben végrehajtott enzimkatalizált kinetikus rezolválás, amit kedvező oldhatósági viszonyok esetén termékeltválasztással lehet összekapcsolni, és így két enantiomertiszta végterméket előállítani. Újdonságként dolgoztunk ki konzekutív észterképzésen (szakaszos és folytonos reaktor kialakítással) alapuló reakciót, ami mind a monoacetát, mind a diacetát terméket >98% enantiomertisztaságban szolgáltatja, továbbá laktámgyűrű nyitáson alapuló rezolválást szén-dioxidban. Ez utóbbi reakció esetén hatékony kapcsolt termék elválasztást is megvalósítottunk, végeredményképpen mindkét terméket >98% enantiomer tisztaságban állítottuk elő. Mind a három módszer esetén állítottunk elő 90% feletti enantiomer tisztaságú termékeket, azonban ebben az esetben eddig csak az enzimkatalizált rezolválás esetében közelítette meg a termelés az 50-50%-ot.

A kutatás eredményeit folyamatosan publikáltuk, illetve a publikálás még folyamatban van. Mivel az OTKA rendszerbe csak az adott eredmény legmagasabb szintű publikációját kéri feltüntetni (amit nem minden esetben tudunk megtenni, mert a korábban felvitt publikációkat a leírással ellentétben törölni nem tudtuk, csak módosítani), az egyes típusok összesítését itt adjuk meg.

ismeretterjesztő előadás: 1

hazai konferencia előadás/poszter: 23

nemzetközi konferencia előadás/poszter: 17

magyar nyelvű (lektorált) folyóirat cikk: 7 (+ 5 várható)

angol nyelvű (lektorált) folyóirat cikk: 11 (+5 várható)

TDK dolgozat: 8 (+ 1 várható)

szakdolgozat: 8

diplomamunka: 3

PhD értekezés: 2 (1 fokozatot szerzett, 1 nyilvános védés előtt)

Jelölések

BME Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

DSC differential scanning calorimetry

DTA differential thermal analysis

E enantioszelektivitás

ee enantiomer tisztaság

FTIR Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia

GAS gas antisolvent precipitation

SAS supercritical antisolvent precipitation

scCO₂ szuperkritikus szén-dioxid

SFE szuperkritikus fluidum extrakció

TG termogravimetria

VRK vékonyréteg kromatográfia

XRD porröntgen diffrakció