

Teilprojekt C1 Katalyse in superkritischen Medien

H. Tiltscher †, E. Killmann, R. Schleich

Technische Universität München, Institut für Technische Chemie, Lehrstuhl II für Technische Chemie, Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching

1. Einleitung

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung einer umweltverträglichen, heterogenkatalysierten Methode für die enzymatische Racemattrennung eines pharmazeutischen Wirkstoffes in überkritischem Kohlendioxid. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die selektive enzymkatalysierte Veresterung eines racemischen Gemisches des pharmakologisch bedeutsamen Modellsubstrates Ibuprofen (2-(4'-(2''-Methylpropyl)-phenyl)-propionsäure) mit verschiedenen Alkoholen zu den jeweiligen Estern. Da die Löslichkeit von Ibuprofen in Wasser extrem gering ist, und Wasser sich ungünstig auf die Veresterung auswirkt, scheidet eine Umsetzung in wäßrigem Milieu von vornherein aus.

Das physiologisch unbedenkliche Kohlendioxid ist als Reaktionsmedium für enzymatische Umsetzungen wegen seiner besonderen stofflichen Eigenschaften gut geeignet. Gegenüber organischen Lösungsmitteln bietet Kohlendioxid den Vorteil der hohen Aufnahmekapazität für Wasser und der einfacheren Abtrennung der Reaktionskomponenten durch fraktionierte Entspannung.

Nach einem Enzymscreening wurden als Biokatalysatoren die immobilisierten Lipasen CHIRAZYME L-2, C2 (adsorptiv an den Träger gebunden) und CHIRAZYME L-2 (kovalent gebunden) aus *Candida antarctica* eingesetzt. Beide sind bezüglich dem R-Enantiomer von Ibuprofen selektiv. Die Veresterung erfolgte mit Ethanol, 1-Propanol und 2-Propanol.

2. Mechanismus und Geschwindigkeitsansatz für die Enzymreaktion

Für die lipasekatalysierte Umsetzung einer Carbonsäure zu einem Ester wird allgemein der Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus [3] zugrunde gelegt. Danach wird die Säure zuerst an das Enzym gebunden, anschließend wird Wasser abgespalten, und erst dann lagert sich das zweite Substrat (Alkohol) an das Enzym an. Der gebildete Ester wird im letzten Schritt abgegeben. Eine kinetische Auswertung des aus fünf Gleichgewichtsreaktionen bestehenden Reaktionsschemas setzt spezielle, vereinfachende Randbedingungen voraus. Sofern die Umsetzungsgrade niedrig gehalten werden, können die Konzentrationen der entstehenden Produkte vernachlässigt werden. Für diesen Fall läßt sich das komplexe Geschwindigkeitsgleichungssystem auf folgende Form reduzieren:

$$r = r_1 \frac{c_{\text{Alkohol}} c_{\text{ibu}}}{c_{\text{Alkohol}} K_{\text{ibu}} + c_{\text{ibu}} K_{\text{Alkohol}} + c_{\text{Alkohol}} c_{\text{ibu}}} \quad (1)$$

Hohe Alkoholkonzentrationen (Überschuß) führen zu einer weiteren Vereinfachung der Geschwindigkeitsgleichung:

$$r = \frac{r_1 c_{\text{ibu}}}{K_{\text{ibu}} + c_{\text{ibu}}} \quad (2)$$

r_1 ist die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit des Enzyms bei konstantem Druck und konstanter Temperatur. K_{ibu} ist ein kinetischer Parameter, der sich aus den verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten der Gleichgewichtsreaktionen zusammensetzt.

3. Verwendete Versuchsanordnungen

In Batchapparaturen wurden Löslichkeitsdaten, Enzymaktivitäten und für die Reaktion geeignete Bedingungen (T, p) ermittelt. Aufbauend auf diesen Vorversuchen wurde eine kontinuierliche Laboranlage (Abb. 1) konzipiert, mit der die reaktionstechnischen Untersuchungen unter Variation der Konzentrationen, des Druckes, der Temperatur, des Durchsatzes und des Wassergehaltes von Kohlendioxid im Langzeitbetrieb durchgeführt werden können. Die Verwendung eines kontinuierlich durchströmten, gradientenfreien Reaktors ist eine zwingende Voraussetzung, um definierte und konstante Konzentrationsverhältnisse, insbesondere in Bezug auf den Wassergehalt im Reaktionsraum, einstellen zu können.

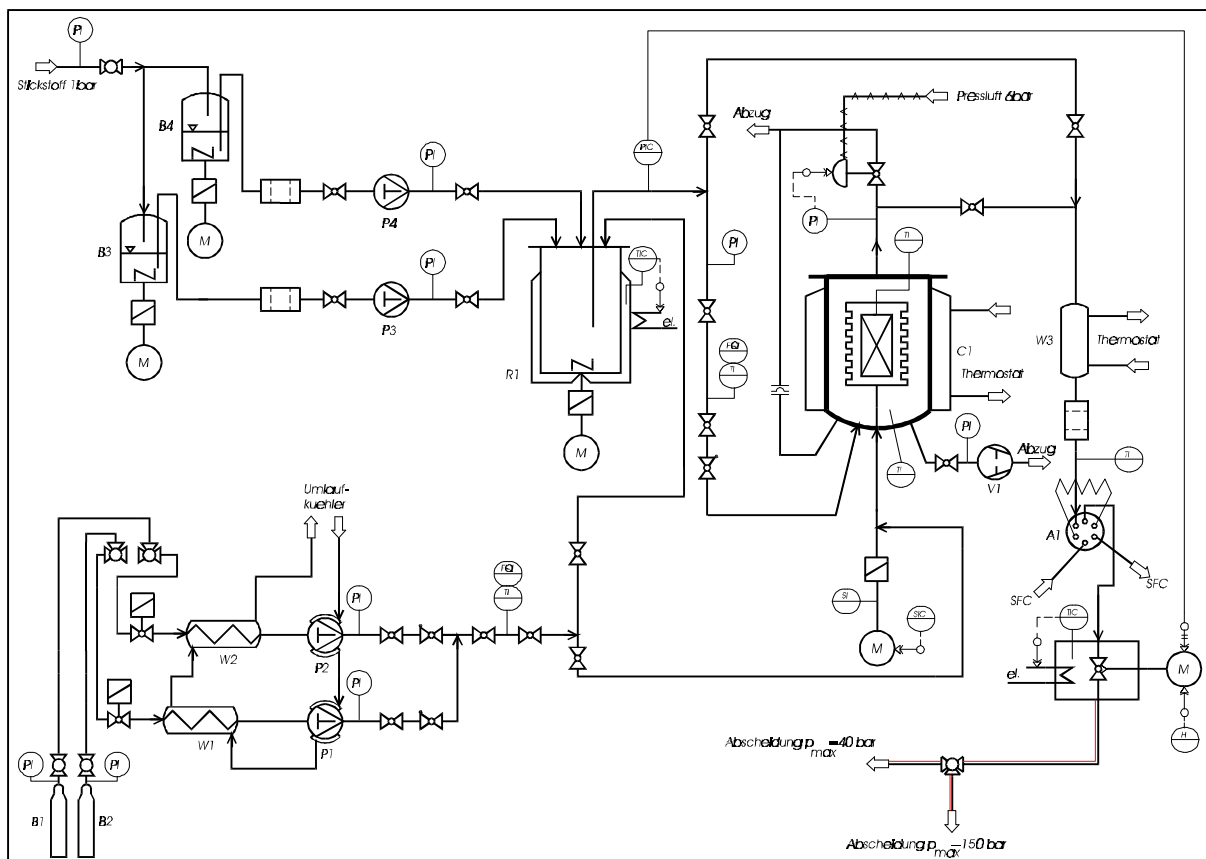


Abb. 1: Verfahrenstechnisches Fließbild der Hochdruckanlage

Die Edukte und das Lösungsmittel werden mit vier Kolbenpumpen P1 bis P4 über eine Mischkammer R1 in den Kreislaufreaktor C1 gefördert. Die an der Reaktoroberseite abgezogene Produktmischung wird an einem beheizten,

motorgesteuerten Druckregelventil M entspannt und verschiedenen Abscheidern zugeführt.

Für die kontinuierlich zu betreibende Versuchsanlage wurde eine chirale online SFC-Analytik entwickelt, die es erlaubt, kontinuierlich unter Druck Proben zu nehmen. Durch Anwendung einer speziellen Konzentrationsgradiententechnik konnten alle beteiligten chiralen Reaktanden voneinander getrennt werden.

4. Ergebnisse

Enzymauswahl

Das kovalent immobilisierte Enzym L2 zeichnet sich durch eine deutlich höhere spezifische Aktivität, eine gleichmäßigere Immobilisierung und eine engere Korngrößenverteilung ($d_K = 0,1-0,4$ mm) gegenüber dem adsorptiv an den Träger gebundenen Enzym L2C2 ($d_K = 0,3-0,9$ mm) aus. Wegen der daraus resultierenden besseren Reproduzierbarkeit der Messwerte wurde bei den kinetischen Untersuchungen das kovalent immobilisierte Enzym eingesetzt.

Selektivität der enzymatischen Reaktion

Die Selektivität der enzymatischen Reaktion, gebildet aus dem Verhältnis R-Ibuprofenester/S-Ibuprofenester, ist stark umsatzabhängig. Mit steigendem Umsatz nimmt die Selektivität ab. Die höchsten Selektivitätswerte werden mit 1-Propanol und 2-Propanol erzielt (siehe Tabelle 1). Bei 2-Propanol ergeben sich jedoch deutlich langsamere Umsetzungsgeschwindigkeiten.

| | Ethanol | 1-Propanol | 2-Propanol |
|------------------------|----------------|-------------------|-------------------|
| S_{max} | 8.1 | 13.8 | 13.4 |
| S (U=60%) | 3.4 | 8.9 | - |

Tab.1: Selektivitätsvergleich verschiedener Alkohole

Die Immobilisierungsmethode (adsorptiv/kovalent) hat bei gleichem Umsatzgrad keinen Einfluß auf die Selektivität der enzymatischen Reaktion. Alle

nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich auf die Veresterung von Ibuprofen mit 1-Propanol zu Ibuprofenpropylester .

T,p-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

Die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion nimmt im untersuchten Temperaturbereich (15-65 °C) mit zunehmender Temperatur zu. Die Langzeitstabilität der Enzymschüttung ist temperaturabhängig, aber auch bei höheren Temperaturen für eine technisch relevante Nutzung ausreichend.

| | Umsatzrückgang nach 1000 h |
|-----------------|-----------------------------------|
| T= 35 °C | 2.9 % |
| T= 50 °C | 6.6 % |

Tab.2: Langzeitstabilität bei verschiedenen Temperaturen [6]

Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmendem Druck ab. Ein kinetischer Druckeffekt oder eine Denaturierung des immobilisierten Enzyms sind infolge des niedrigen Absolutdruckes ($p_{\max}=300$ bar) unwahrscheinlich. Denaturierung würde einen bleibenden Aktivitätsverlust nachsichziehen. Dieser wurde in keinem Falle beobachtet. Eine Transportlimitierung an der Phasengrenze Fest/Fluid liegt nicht vor, da sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei Variation der Kreislauftrate nicht ändert. Porendiffusionseffekte können durch Abschätzungen auf Basis des Weisz-Prater-Kriteriums [7] ausgeschlossen werden. Die Dichte des Lösungsmittels Kohlendioxid steigt im untersuchten Druckbereich (100-300 bar) deutlich an und damit sinkt die Substratbeladung bei konstant vorgegebener molarer Konzentration ab. Die Druckabhängigkeit des Umsatzes ist in erster Linie auf die Dichteänderung des Kohlendioxides zurückzuführen. Eine Umrechnung der Umsatzwerte bei konstanten Konzentrationen (Abb.2) auf konstante Beladungen X (Abb.3) führt im Rahmen der Meßgenauigkeit zu einer befriedigenden Übereinstimmung der Meßpunkte bei verschiedenen Drücken.

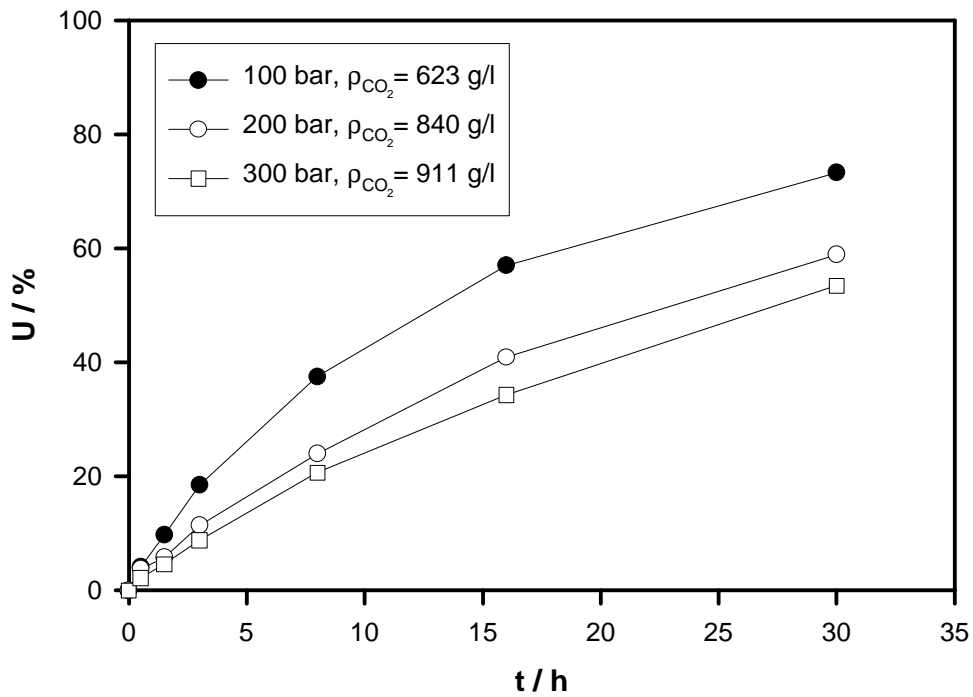


Abb.2: Druckeinfluß auf die Reaktionsgeschw. bei $T= 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $c_{\text{ibu}} = \text{const.}$

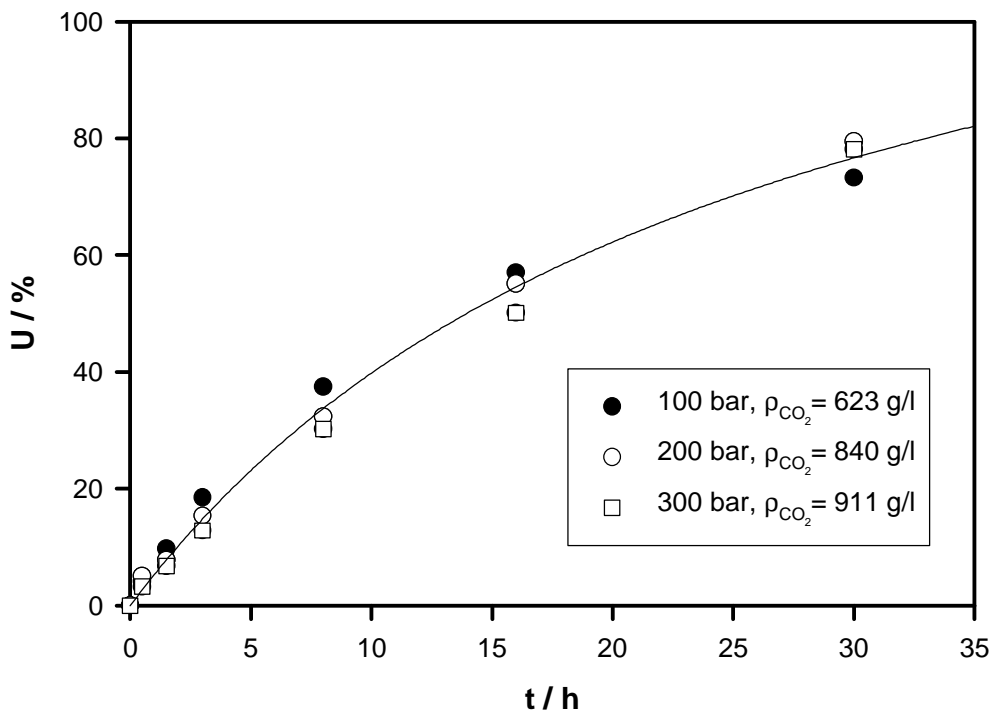


Abb.3: Dichtekorrigierte Umsatzwerte bei $T= 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $X = \text{const.}$

Wassereinfluß auf die Umsetzung

Kohlendioxid kann -abhängig von Druck und Temperatur- eine ausreichenden Wassermenge lösen, die für die Ausbildung einer katalytisch aktiven Enzymstruktur zwingend notwendig ist [1, 2]. Der optimale Wassergehalt ist von Enzym zu Enzym verschieden. Abb.4 zeigt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender Wasserbeladung des Kohlendioxids ein Maximum durchläuft.

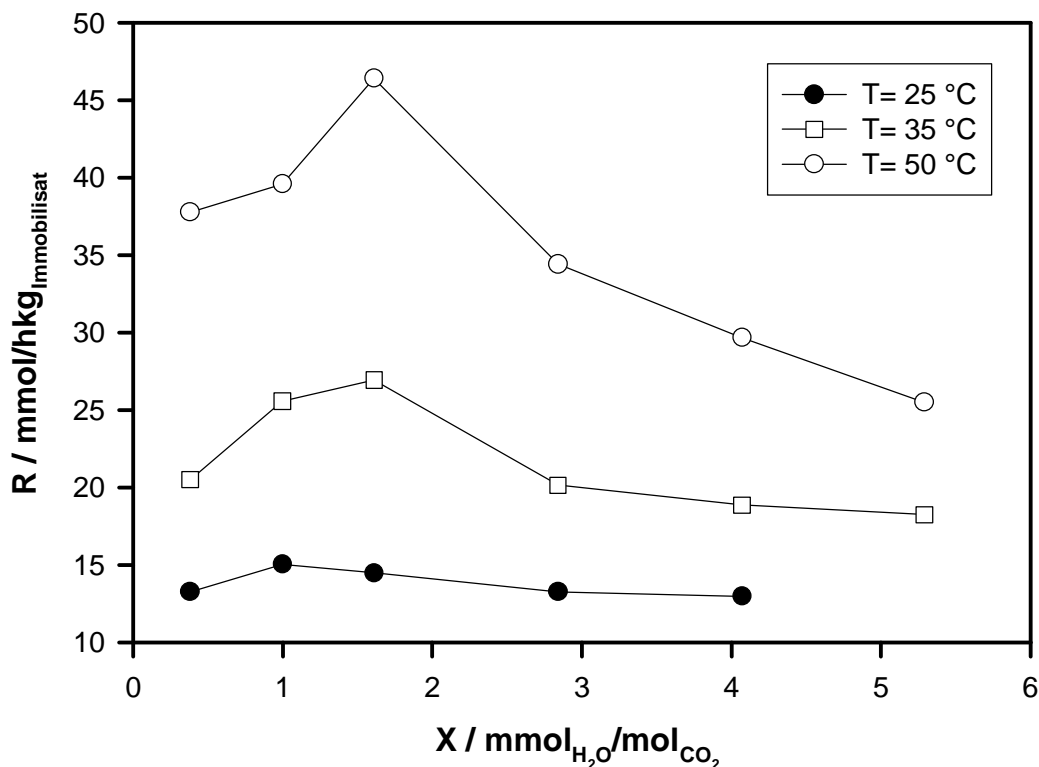


Abb.4: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Wasserbeladung des Kohlendioxids bei p= 150 bar

Der niedrigste Beladungswert ist durch den Wassergehalt des eingesetzten Kohlendioxids vorgegeben. Bei den gewählten Temperaturen liegt die höchste Reaktionsgeschwindigkeit bei Wasserbeladungen zwischen einem und zwei mmol Wasser/mol Kohlendioxid. Wird dieser Optimalwert überschritten, setzt eine Inaktivierung des Enzyms durch Strukturänderung ein. Diese ist voll reversibel und führt zu keiner bleibenden Schädigung des Enzyms, wie

die eigenen kontinuierlich durchgeführten Versuche mit wechselnder Wasserzugabe zeigen. Hinzu kommt, daß mit steigendem Wassergehalt die Rückreaktion (Esterhydrolyse) an Bedeutung gewinnt.

Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die kinetischen Parameter r_1 und K_{ibu} in Gl.2 sind ein Maß für die Leistungsfähigkeit des Enzyms und die Affinität des Substrates zum Enzym. Sie wurden aus kontinuierlichen und diskontinuierlichen Versuchen mit der Methode der Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt. Bei Batchversuchen wurden Umsatz/Zeit-Kurven aufgenommen, deren Steigung im Anfangsbereich die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wiedergibt. r_1 und K_{ibu} ergeben sich aus einer Anpassung der Meßwerte an die hyperbolische Gl.2. Die kontinuierlichen Versuche wurden durch Linearisierung von Gl.2 nach Hanes [4] ausgewertet, da die Meßwerte nur für einen begrenzten Konzentrationsbereich bezüglich Ibuprofen zur Verfügung standen. Bei diesem Verfahren wird r_1 aus der Steigung, K_{ibu} aus dem Ordinatenabschnitt der Geraden erhalten. Die weitaus höhere spezifische Aktivität der Lipase im kovalent immobilisierten Zustand (L2) kommt in den Werten der erhaltenen kinetischen Parameter zum Ausdruck. Die nach Arrhenius aus $r_1(T)$ durch lineare Regression abgeschätzte Aktivierungsenergie beträgt 59 KJ/mol.

| | CHIRAZYME L2 | | | CHIRAZYME L2, C2 | |
|---------------------------------------|--------------|-------|-------|------------------|-------|
| | 35 °C | 50 °C | 65 °C | 35 °C | 50 °C |
| K_{ibu} / mmol/l | 2.5 | 2.3 | 2.04 | 7.8 | 1.88 |
| r_1 / mmol/(h kg) | 158 | 401 | 1241 | 125 | 207 |

Tab.3: Kinetische Konstanten bei verschiedenen Temperaturen

Abscheidung der Reaktanden

Das Reaktionsgemisch wird vom Reaktionsdruck p_1 auf den Abscheidedruck p_2 entspannt, bei dem alle Komponenten weitestgehend abgeschieden werden. Um das Lösungsmittel (Kohlendioxid) nach dem einmaligen Durchlauf

durch Reaktor und Abscheider wieder den Pumpen kostengünstig zuführen zu können, sollte p_2 möglichst hoch gewählt werden.

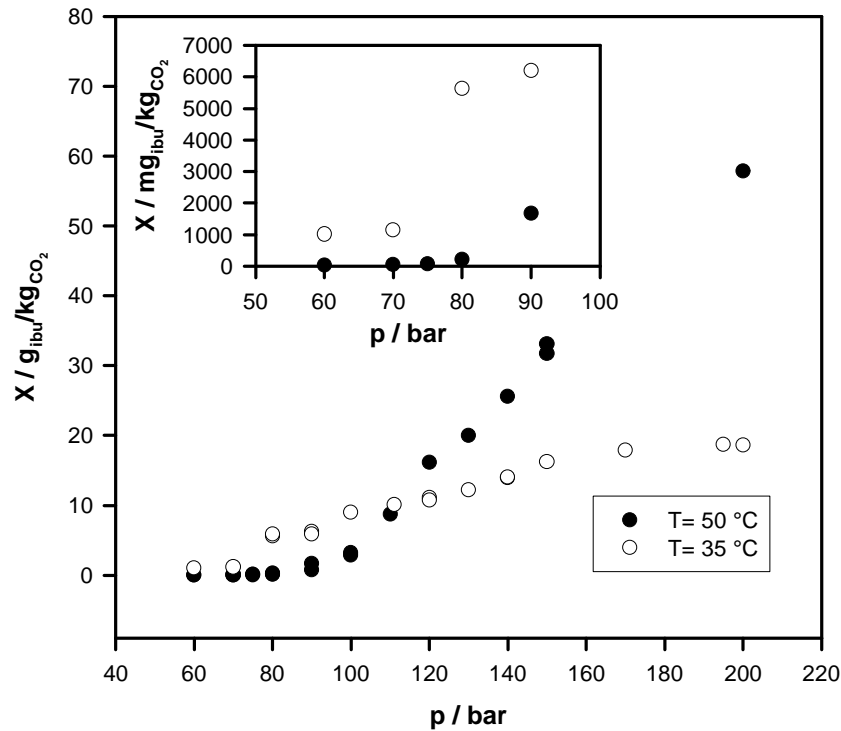


Abb.5: Löslichkeit von Ibuprofen in Kohlendioxid

Abb.5 zeigt, daß die Löslichkeit von Ibuprofen in Kohlendioxid bei $T= 50\text{ °C}$ für Drücke kleiner 70 bar sehr gering ist. Nahe der kritischen Temperatur (31 °C) und dem kritischen Druck (73.8 bar) des Kohlendioxids ist ein rapider Abfall der Löslichkeit des Ibuprofens erkennbar. Zwei gegenläufige Effekte beeinflussen die Löslichkeit. Zum einen nimmt sie bei Nichtelektrolyten für Temperaturen unterhalb der Schmelztemperatur exponentiell ab ($T_{m, \text{ibu}}= 75\text{ °C}$), zum anderen steigt die Lösefähigkeit von Kohlendioxid, ausgedrückt durch den Hildebrand-Parameter $\delta = 1.25 p_c^{1/2} \rho_{\text{red}}/\rho_{\text{red,b}}$, mit abnehmender Temperatur an [5]. $r_{\text{red,b}}$ gibt die reduzierte Dichte des Fluids am Siedepunkt an. In Übereinstimmung mit den genannten Effekten ist aus Abb.5 zu entnehmen, daß die Löslichkeit von Ibuprofen für Drücke kleiner 110 bar mit fallender Temperatur ansteigt. Es erscheint daher aussichtsreich, die

Abscheidung allein durch Entspannung bei der gewählten Reaktionstemperatur durchzuführen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Selektivität der enzymatischen Veresterung ist umsatz- und temperaturabhängig. Sie wird nicht vom Druck und von den Stoffeigenschaften der überkritischen Lösungsmittelphase beeinflusst. Erhöhter Druck ist aber Voraussetzung für hohe Substrat- und Wasserbeladungen des überkritischen Kohlendioxids. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung und ebenso die Löslichkeit von Wasser [1] und Ibuprofen (Abb.5) steigen mit zunehmender Temperatur an. Um eine ausreichende Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms (Tab.2) zu gewährleisten, empfiehlt es sich, das Verfahren bei einer maximalen Reaktionstemperatur von 50 °C und bei einem Druck von ca. 150 bar durchzuführen.

Die Abscheidung der Reaktanden aus dem Lösungsmittelstrom ist Gegenstand der Untersuchungen bis Jahresende. Dabei stehen die Ermittlung der Löslichkeit des Ibuprofenpropylesters in Kohlendioxid, sowie die kontinuierliche Abtrennung der Reaktionsteilnehmer mit gleichzeitiger Kohlendioxidrückführung im Vordergrund.

5. Literaturverzeichnis

- [1] R. Wiebe, Chem. Rev. 1941, 29, 475
- [2] J. S. Dordick, Enzyme Microb. Technol., 1989, 11, 194-211
- [3] F. X. Malcata, Enzyme Microb. Technol., 1992, 14, 426
- [4] H. Bisswanger, Enzymkinetik, Weinheim, VCH Verlag, 1994
- [5] R. Sambasiva, ind. Eng. Chem. Process Des. Dev. 1984, 23, 344-348
- [6] R. Egersdorfer, Dissertation, TU München, 1996
- [7] P. Weisz, Advanced in catalysis, 1954, 6, 143