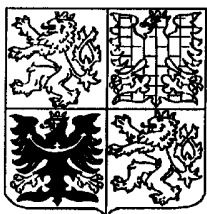


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA
VYNÁLEZU (12)

(21) 651-93

(13) A3

5(51)

C 07 C 253/16

C 07 C 253/30

(22) 13.11.92

(32) 13.11.92, 17.12.91

(31) 92US/9209945, 91/809803

(33) WO, US

(40) 13.04.94

(71) FMC CORPORATION, Philadelphia, Pennsylvania, US;

(72) Andruski Stephen Walter, Hightstown, New Jersey, US;
Goldberg Bruce, Clifton, New Jersey, US;

(54) Způsob výroby opticky aktivních kyanhydrinů

(57) Řešení spočívá ve způsobu výroby opticky aktivních S-kyanhydrinů reakcí aldehydu s kyselinou kyanovodíkovou, při níž se uvádí do styku organické rozpouštědlo, obsahující kyselinu a aldehyd s enzymem S-oxynitrilázou, zlepšení spočívá v tom, že enzym je chemicky vázán na nerozpustný komplexní materiál, tvořený porézní membránou, kterou procházejí reakční složky, porézní membrána je tvořena polymerním pryskyřičným pojivem s dispergovanými jemně rozptýlenými částicemi plniva a soustavou v podstatě propojených pórů a je propustná pro kapalinu, obsahující reakční složky.

Způsob výroby opticky aktivních kyanhydrinů

Oblast vynálezu

Vynález se týká způsobu výroby opticky aktivních kyanohydrinů při použití enzymů. Zejména jde o zlepšený způsob výroby opticky aktivních S-kyanhydrinů, které se užívají jako meziprodukty při výrobě známých pyrethroidních insekticidů, postup spočívá v reakci aldehydů s kyselinou kyanovodíkovou v přítomnosti enzymu S-oxynitrilázy.

Dosavadní stav techniky

Způsob, při němž se uvádějí do reakce aldehydy s kyselinou kyanovodíkovou v přítomnosti enzymu oxynitrilázy v diisopropyletheru jako rozpouštědla k získání opticky aktivních kyanohydrinů je znám například z US patentového spisu č. 4 859 784 (Effenberger a další). Postupuje se tak, že se reakce provádí s enzymem v ^{me}imobilizované formě, například s enzymem, vázaným na povrch skleněných kuliček, na iontoměničovou pryskyřici nebo na částice celulosy ve formě suspenze, kterou je nejprve nutno zfiltrvat před izolací výsledného produktu. I když je tento postup účinný, dochází při něm pouze k jedinému styku reakčních složek s imobilizovaným enzymem a reakce trvá 5 až 6 dnů do úplného ukončení. Podobně ve zveřejněné australské patentové přihlášce č. 38104/89 (Kula a další), se popisuje postup, při němž se užívá enzymu S-oxynitrilázy ze *Sorghum bicolor*. V jednom z provedení tohoto postupu se k imobilizaci užívá částic akrylového polymeru kulovitěho tvaru, jde o běžně dodávaný materiál Eupergit^R C (Rohm, Darmstadt), tento materiál je uveden do suspenze v reakčním prostředí nebo se plní do sloupce. Vždy se však užívá ve vodném systému, aby nedošlo k narušení materiálu různými organickými rozpouštědly.

Mimoto je při tomto postupu při použití vázaného enzymu možno dosáhnout výtěžku přibližně 85 % hmotnostních, avšak pouze až po kontinuální reakci, trvající 3 dny při použití 4-hydroxybenzaldehydu jako výchozího aldehydu. Podobné postupy jsou popsány v US patentovém spisu č. 5 008 192, (Neidermeyer), v evropském patentovém spisu č. 326 063, v US patentovém spisu č. 3 862 030 a DOS 3 823 864 A-1, které odpovídají svrchu uvedeným US a australským spisům.

V každém ze svrchu uvedených patentových spisů se uvádí "reaktor, v němž se užívá enzymu, opatřený membránou". Avšak při prostudování odpovídající technické literatury, například publikací "Engineering Aspects of Enzyme Engineering", a zejména uvedené literatury 16 a 17, to znamená Kragl a další, Ann. N. Y. Aca. Sci., 613, str. 167 až 175, 1990 a Vasic-Racki a další, Appl. Microbiol. Biotechnol., 31, str. 215 až 222, 1989 je zřejmé, že tento reaktor je v podstatě pouze řadou nádob, oddělených od sebe filtračními membránami, které brání fyzikálně průchodu enzymu. To znamená, že v tomto typu reaktoru se reakce provádí v roztoku, obsahujícím dispergovaný enzym, s nímž se reakční složky dostávají do styku pomocí difuze.

Použití reaktorů s polymerními membránami, na něž jsou vázány enzymy, je obecně známo z US patentových spisů č. 4 102 746 a 4 169 014 (oba Bruce S. Goldberg). Podobný reaktor je popsán také v publikaci "A Novel Immobilized Enzyme Reactor System", Bruce S. Goldberg, 27th Annual Spring Symposium Session on Non-Conventional Reactor Systems, AIChE, East Brunswick, N. J., 10. května 1984, kde jsou uvedeny podrobnosti, týkající se reaktorů ze svrchu uvedených US patentových spisů.

Vynález si klade za úkol navrhnout nový postup pro výrobu opticky aktivních kyanhydrinů bez nevýhod svrchu uvedených postupů.

Podstata vynálezu

Bylo zjištěno, že je možno zkrátit dobu reakce a zlepšit reakční podmínky při jinak známém způsobu výroby opticky aktivních S-kyanhydrinů reakcí aldehydů s kyselinou kyanovodíkovou v přítomnosti katalytického enzymu S-oxynitrilázy a rozpouštědla v případě, že se roztok aldehydu a kyseliny nechá procházet chemicky aktivovanou porézní membránou, na níž je enzym S-oxynitriláza chemicky vázán.

Při reakci, nekatalyzované žádným způsobem, by po reakci byly přítomny enantiomerní formy S- a R- kyanhydrinu ve stejném množství, to znamená v poměru 50 : 50. Vynález si klade za úkol zvýšit poměr S-isomeru k R-isomeru správnou volbou katalyzátoru a reakčních podmínek. Mimoto by při provádění způsobu podle vynálezu nemělo dojít pouze ke zvýšení selektivity postupu tak, aby bylo získáno co největší množství S-isomeru, nýbrž by mělo docházet také k vysoké přeměně na výsledný produkt v co nejkratší době. Dále by bylo velmi vhodné, aby tohoto cíle bylo dosaženo bez nutnosti fyzikálního oddělení enzymu z výsledného produktu.

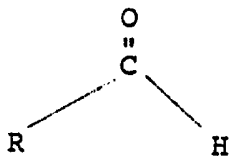
Způsob podle vynálezu pro výrobu požadovaného opticky aktivního kyanohydrinu se snadno provádí svrchu uvedeným způsobem, to znamená tak, že se roztok aldehydu a kyseliny kyanovodíkové nechá procházet přesně definovanou porézní membránou, na níž je chemicky vázán enzym, po vsázkách, nebo kontinuálně po určité časové období s následnou izolací požadovaného opticky aktivního kyanhydrinu. Při provádění tohoto postupu bylo neočekávaně zjištěno, že je možno snížit reakční dobu na jeden den, kdežto dříve známé postupy trvaly 6 nebo 7 dnů. Za dobu pouze jednoho dne je možno dosáhnout stejného a v některých případech vyššího celkového

výtěžku produktu a selektivity pro požadovaný S-isomer. Na druhé straně je s výhodou možno celkový výtěžek odpovídajícím způsobem i mnohonásobně zvýšit v případě, že se postup provádí jako u známých postupů například 6 až 7 dnů.

Je žádoucí provádět reakci v organickém systému, v němž je rozpustný ve vodě v podstatě nerozpustný aldehyd a také výsledný kyanhydrin. Je možno užít malého množství vodného pufru, až 1 % hmotnostní vody, vztaženo na celkovou hmotnost systému, avšak s výhodou se užije co nejmenšího možného množství vody, to znamená nejvýše 0,03 % hmotnostních. To znamená, že systém v podstatě obsahuje organické rozpouštědlo s případnou příměsí vodného pufru, aldehyd, kyselina a enzym, chemicky vázaný na přesně definovanou porézní membránu, tak jak bude dále podrobněji popsáno.

Reakci je možno provádět v širokém rozmezí teploty a pH. Je možno použít například teploty -6 až +30, s výhodou 6 až 25 °C. Hodnotu pH, která rovněž není kritická je možno řídit pufrem, například octanem sodným, citrátem sodným nebo fosforečnanem sodným v rozmezí 3,5 až 7,5.

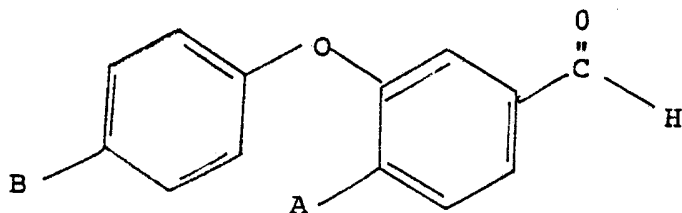
Použité aldehydy jsou aldehydy, které se k tomuto účelu běžně užívají a které byly uvedeny například v US patentovém spisu č. 4 859 784, jehož obsah byl již podrobněji uveden svrchu. Jde o aldehydy, které je možno vyjádřit obecným vzorcem



kde

R může znamenat nasycený nebo nenasycený alifatický nebo aromatický zbytek, popřípadě substituovaný různými substituenty, obsahujícími atomy halogenu, síry, dusíku nebo kyslíku.

Aldehydy by měly být ve vodě v podstatě nerozpustné a s výhodou by se měly rozpouštět v organických rozpouštědlech. K provádění reakce jsou výhodné zejména aldehydy s rozpustností ve vodě nižší než 2,0 až 0,01 mg/ml, a zvláště méně než 0,1 mg/ml až do 0,01 mg/ml. Příkladem těchto ve vodě nerozpustných aldehydů mohou být aldehydy obecného vzorce



kde

A znamená atom vodíku nebo fluoru a

B znamená atom vodíku, fluoru, chloru nebo bromu.

Z těchto sloučenin je zvláště výhodný zejména 3-fenoxybenzaldehyd.

Molární poměr aldehydu ke kyselině kyanovodíkové se může pohybovat v rozmezí 1 : 1 až 1 : 100, s výhodou 1 : 1 až 1 : 2.

Povaha použitého organického rozpouštědla má být taková, aby rozpouštědlo neovlivňovalo nepříznivě použitou membránu nebo průběh reakce. Bylo zjištěno, že výhodné je například použití di-n-butyletheru, kdežto při použití diisopropyletheru, který je užíván při postupu podle US patentového spisu č. 4 859 784 došlo neočekávaně k tomu, že postup v podstatě neprobíhal požadovaným způsobem.

Enzym S-oxynitriláza EC 4.1.2.11, který se užívá jako katalyzátor se běžně dodává (Sigma Chemical Co.) nebo je možno jej izolovat z výhonků čiroku známým způsobem, například podle publikace Bove a další, J. Biol. Chem., 226, 1, 207, 1961.

Množství enzymu, jehož se užívá vzhledem k aldehydu je obvykle 50 až 2500, s výhodou 500 až 750 jednotek enzymu na 1 g aldehydu. Enzym je s výhodou chemicky vázán na porézní membránu tak, že se na tuto membránu působí například vodným roztokem polyethyleiminu s koncentrací 5 % hmotnostních a pak například vodným roztokem glutaraldehydu s koncentrací 5 % hmotnostních a nakonec roztokem enzymu S-oxynitrilázy ve vhodném pufru.

Enzym s výhodou zůstává vázán na membránu několik dnů, takže představuje stálejší a trvalejší systém, než jakého se užívá v průběhu známých postupů, současně je vyloučena nutnost zvláštního stupně, v němž se enzym odděluje a získává zpět, tak jak tomu je v postupech podle US patentových spisů č. 4 859 784 a 5 008 192.

Použité porézní membrány jsou popsány v US patentovém spisu č. 4 102 746, kde jsou definovány materiály, které vážou enzym, povaha a postup pro jejich výrobu a vazba a izolace enzymu při použití různých materiálů. V zásadě jsou tyto membrány různé tloušťky a/nebo s různým počtem vrstev

tvořeny trojrozměrným polymerním pojivem typu pryskyřice, v němž jsou jemně rozptýleny částice plniva a soustavou vzájemně v podstatě propojených pórů, jejichž rozměr se může měnit v širokém rozmezí, s výhodou od 0,01 do 100 mikrometrů, přičemž celkový obsah pórů v materiálu je přibližně 50 až 75 % a dispergované částice plniva tvoří alespoň 25 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost membrány.

Jednou z membrán, které odpovídají těmto požadavkům, je membrána MPS^R (FMC Corporation, Philadelphia, Pa, USA). Jde o mikroporézní membrány z polyvinylchloridu a oxidu křemičitého s objemem pórů 70 až 80 %. Průměr pórů při stanovení metodou s vtlačováním rtuti je obvykle 0,2 až 2,0 mikrometru. Membrána je velmi hydrofilní, má negativní náboj, který je možno změnit na kladný a její celková plocha je 80 m²/g. Materiál není stlačitelný za běžných podmínek a jeho hustota za sucha je nízká, 0,45 g/cm³. Aktivní místa se nacházejí na oxidu křemičitém, uloženém v porézní matici, což dovoluje vazbu organických funkčních skupin jako v případě oxidu křemičitého. Tato membrána MPS má vaznou schopnost pro DNA alespoň 260 mikrogramů na cm². Mimoto bylo zjištěno, že tato membrána je stejně jako další použitelné membrány překvapivě stálá v přítomnosti organických rozpouštědel, i když byla obvykle užívána pouze ve vodném prostředí.

Polymery, které tvoří pojivo, to znamená matici membrány mohou být velmi různé. S výhodou se uijí termoplastické, běžně dodávané pryskyřice, zejména polyvinylchlorid, PVC. Je však možno užít i další materiály, jako polyethylen, plněný oxidem křemičitým nebo kopolymerem PVC s malým množstvím monoethylenových monomerů, jako jsou například vinylacetát, vinylidenchlorid, propylen a podobně. Matrice může být vyrobena ještě z dalších materiálů, například z poly-

tetrafluorethylenu PTFE, acetátu nebo triacetátu celulosy, z polyamidů, například nylonu a podobně. V případě, že se užije PTFE, je možno užít matrici, vytvořenou z fibril, například podle US patentových spisů 4 152 661 a 4 373 519, například s uloženými hydrofilními absorpčními částicemi. Obecně je tedy možno užít jakoukoliv termoplastickou pryskyřici, která je snadno změkčena rozpouštědlem nebo je sintrovatelná působením tepla nebo tlaku, nebo kterou je možno snadno zpracovat na požadovaný tvar a která je chemicky a fyzikálně stálá za podmínek, při nichž se postup provádí.

Jako plniva, s výhodou v částicové formě, je možno užít anorganické materiály, například svrchu uvedený oxid křemičitý nebo sloučeniny hliníku, například oxid nebo hydroxid hlinitý nebo organické materiály, například polysacharidy, včetně aktivovaných celulosových derivátů. Neaktivovaná celuloza byla na druhé straně v kombinaci s PVC zcela nevhodná.

Výslednou membránu je možno aktivovat některým ze známých způsobů, tak, aby došlo k prostředku, který může zajistit vazbu mezi membránou a enzymem, zvláště mezi částicemi plniva a enzymy. Může jít o vazbu chemickou adsorpcí, o kovalentní vazbu nebo o zesítní. Funkčními skupinami, které mohou být na membránu vázány jsou zejména jakékoliv volné aminoskupiny, karboxylové skupiny, isonitrilové, aldehydové nebo ketonové skupiny, které budou vázat enzym S-oxynitrilázy na plnivo membrány. Výhodnou látkou je polyethylenimin, který bude chemicky adsorbován na plnivo, například v kombinaci s glutaraldehydem, na nějž se pak bude vázat enzym.

Jak bylo uvedeno v US patentovém spisu č. 4 102 746, je možno membránu, vhodnou pro použití při provádění způsobu podle vynálezu snadno připravit tak, že se smísí vhodné

množství jemně rozptýlené polymerní pryskyřice, jemně rozptýleného organického plniva, rozpouštědla, například cyklohexanonu a látky, které reakční složky nerozpouští, například vody při nízkém stříhovém namáhání za vzniku stálého, vlhkého, jemně sypného prášku. Směs je pak možno vytlačit a kalandrovat, s výhodou na v podstatě plochou strukturu nebo na folii s požadovanými rozměry, získaný materiál je pak možno nechat projít vodnou lázní k odstranění rozpouštědla a pak pecí při vyšší teplotě za přístupu vzduchu k odstranění vody. Tímto způsobem se získá mikroporézní, rozměrově stálá, polotuhá, nerozpustná, pro kapalinu permeabilní membrána, na niž je pak možno některým ze svrchu uvedených způsobů vázat enzym.

V jednom z výhodných provedení je možno základní, chemicky ještě neaktivovanou membránu připravit následujícím způsobem: Fólie porézního materiálu se připraví tak, že se nejprve za sucha smísí 9,07 kg polyvinylchloridu Conoco^R 5385 s velikostí částic, která projde sítím s průměrem ok 180 mikrometrů a 18,14 kg Hi Sil^R 233, vysráženého hydratovaného oxidu křemičitého přibližně na 3 minuty v mísícím zařízení s nízkým stříhovým namáháním pro mísení kapalin a pevných látek (Patterson Kelley). Pak se za stálého míchání v průběhu 20 minut přidá pomocí čerpadla 24,8 kg rozpouštědla, například cyklohexanonu. Pak se k míchané směsi v průběhu následujících 20 minut přidá ještě 26,8 kg vody, čímž se získá vlhký, stálý, volně sypný prášek. Tento prášek se pak vloží do vytlačovacího zařízení, opatřeného šroubem, s teplotou přibližně 48,9 °C a vytlačený materiál se nechá projít mezi válci kalandru, čímž se získá v podstatě plochá fólie s tloušťkou 0,5 mm. Tato fólie se pak nechá projít extrakční lázní s vodou o teplotě 76,7 °C a pak se 6 minut suší v horké sušicí peci za přístupu vzduchu při teplotě 107,2 °C. Takto získaná porézní fólie má poměrně širokou distribuci průměru pórů v rozmezí 0,01 až

100 mikrometrů a střední průměr pórů v rozmezí 0,15 až 0,25 mikrometrů při stanovení vtlačováním rtuti. Celková poréznost tohoto materiálu je přibližně 65 % objemových a obsah dispergovaného plniva, například oxidu křemičitého je přibližně 56 % hmotnostních. Při provádění běžných zkoušek se voda vsákne rychle do materiálu bez použití jakéhokoliv tlaku, což znamená, že póry jsou v podstatě propojeny od jednoho povrchu ke druhému povrchu.

Takto připravenou membránu je pak možno chemicky modifikovat v případě potřeby pomocí vazného činidla, tak, aby bylo možno pevněji vázat enzym S-oxynitridlázy, následujícím způsobem: nezpracovaná membrána se inkubuje ve vodném roztoku polyethyleniminu PEI s rozvětveným řetězcem s molekulovou hmotností 50 000 s obsahem 5 g této látky na 100 ml roztoku při teplotě místnosti 1 hodinu. Pak se membrána opláchne vodou a 1M roztokem chloridu sodného k odstranění jakéhokoliv neabsorbovaného PEI. Zkoušku je možno provést pomocí kyseliny trinitrobenzensulfonové. V případě, že je přítomna alifatická aminoskupina, vznikne po nanesení této kyseliny intenzivně oranžově zbarvený trinitrofenylaminoderivát. Obsah dusíku na takto zpracované membráně je možno kvantitativně vyjádřit elementární analýzou, zpracovaná membrána obsahuje v sušině například 1,25 % dusíku ve srovnání s nezpracovanou membránou, která v sušině obsahuje 0,02 % dusíku. Chemická adsorpce PEI na membránu je v podstatě ireversibilní, to znamená, že ji není možno zrušit inkubací s roztoky s vysokou iontovou silou, například s 1M chloridem sodným nebo s 1M směsí hydrogenfosforečnanu a dihydrogenfosforečnanu draselného při pH v rozmezí 3 až 9. Pouze v případě použití silně kyselých podmínek, například při inkubaci v 1M kyselině chlorovodíkové po dobu 2 hodin, může dojít k částečné desorpci až do 50 % obsahu dusíku, jak je možno prokázat elementární analýzou. Celkový povrch zpracované membrány při sta-

novení podle normy BET je $55,4 \text{ m}^2/\text{g}$, hodnota pro kontrolní membránu je $81,1 \text{ m}^2/\text{g}$. Jinak má membrána zpracovaná působením PEI stejnou propustnost jako nezpracovaná membrána bez ohledu na použitý pufr nebo použitou iontovou sílu.

Pak se na membránu, která byla chemicky aktivována nejprve pomocí PEI svrchu popsáním způsobem a pak po navázání vazné skupiny, například glutaraldehydové skupiny, na niž se enzym může vázat, naváže enzym. Reakční složky se pak uvedou do styku s enzymem při průtoku póry membrány. Průtok reakčního prostředí se s výhodou řídí tak, že se membrána nebo několik vrstev membrány uloží do krytu nebo jiného zařízení tak, že okraje membrány jsou zachyceny za vzniku reaktorové jednotky. V případě potřeby je možno vytvořit přívod a odtok reakčního prostředí tak, aby prostředí protékalo k povrchu membrány požadovaným způsobem. Typickými reaktory tohoto typu ve formě kotoučů jsou například ACTI-DISK^R a ACTI-MOD^R (FMC Corporation, Philadelphia, PA, USA). Druhý z těchto reaktorů je tvořen několika vrstvami membrány pro vyšší účinnost. To znamená, že pojem "membrána" znamená v průběhu přihlášky jednu nebo větší počet vrstev membrány, přičemž konečná požadovaná tloušťka se snadno stanoví běžnými pokusy. V následujících příkladech obsahovala použitá matrice ACTI-DISK^R jednu až pět vrstev membrány, například jednu membránu v příkladech 2, 3, 6 a 7 a pět vrstev v příkladech 1, 4 a 5.

Požadovaný kyanhydrin je pak možno izolovat odstraněním kyseliny kyanovodíkové a rozpouštědla destilací.

Vynález bude dále osvětlen příkladovou částí. Použité rozměry sít jsou označovány podle normy ASTM Standard E11-87.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Příprava S-(kyano)-(3-fenoxyfenyl)methanolu z kyanovodíku a 3-fenoxybenzaldehydu v di-n-butyletheru při teplotě místnosti

Stupeň A Immobilizace enzymu S-oxynitrilázy na porézní matrici

Matrice ACTI-DISK^R, obsahující membránu s obsahem polyvinylchloridu a oxidu křemičitého (MPS^R folie, FMC Corp., Philadelphia, PA) byla po předběžném zpracování polyethyleniminem uložena do standardního reaktoru, opatřeného čerpadlem. reaktor byl tvořen odměrným kapalinovým čerpadlem s maximální kapacitou 10 ml za minutu, čerpadlo bylo spojeno ve výstupní části čirou, ohebnou trubicí z plastické hmoty se vstupem k matrici ACTI-DISK, jejíž výstup byl spojen se zásobníkem s objemem 100 ml, který byl propojen trubicí se vstupní částí čerpadla. Matrice ACT-DISK (Biosupport Materials, Chemical Products Group, FMC Corporation, Philadelphia, PA) je tvořena krytem z plastické hmoty s průměrem 63,5 mm a tloušťkou 6,4 mm, vstupní otvor je na jedné z plochých stran a výstupní otvor na opačné ploché straně. V krytu z plastické hmoty je uloženo pět vrstev permeabilní porézní membrány, která je tvořena hydrofobní polymerní matricí z polyvinylchloridu, jemně rozptýleného hydrofilního plniva na bazi oxidu křemičitého, dispergovaného rovnoměrně v matrici z pryskyřice a vzájemně propojenou sítí mikropórů.

Do zásobníku se uloží 25 ml vodného roztoku glutaraldehydu s obsahem 5 % hmotnostních této látky k navázání N-terminálního zakončení enzymu na ACTI-DISK, modifikovaný

PEI a roztok byl čerpán rychlostí 8 ml za minutu přes matrici ACTI-DISK celkem 60 minut. Pak byl roztok nahrazen 50 ml vody a voda byla matricí čerpána celkem 30 minut a pak byla ze zásobníku odstraněna.

28 ml vodného roztoku enzymu S-oxynitrilázy, získaného ze 7 dnů starých výhonků hybridu čiroku Sorghum/Sudan (obsah bílkovin 54 mg/ml, účinnost enzymu 10,7 jednotek/mg bílkoviny) bylo zředěno na 100 ml 0,05M pufrům s obsahem octanu sodného o pH 5,4 a roztok byl uložen do zásobníku a pak 30 minut přečerpáván matricí ACTI-DISK. Po této době byl průtok matricí obrácen, tak aby bylo možno enzym úplně a rovnoměrně navázat na membránu, Obráceným směrem byl roztok čerpán ještě 30 minut. Pak byla matrice ACTI-DISK promyta 30 minut 50 ml vody svrchu uvedeným způsobem. Po této době byl kryt s obsahem matrice s immobilizovaným enzymem S-oxynitrilázou vyjmut z reaktoru a uložen do chladicího zařízení až do použití.

Stupeň B Příprava S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu z kyanovodíku a 3-fenoxybenzaldehydu v di-n-butyletheru při teplotě místnosti

Matrice ACTI-DISK ze stupně A s obsahem immobilizovaného enzymu byla uložena do běžného reaktoru, opatřeného čerpadlem, s obíhající kapalinou. Zásobník v tomto systému měl objem alespoň 250 ml. Z matrice byl odstraněn zbytek vody kontinuálním čerpáním malého množství di-n-butyletheru přes membránu po dobu přibližně 30 minut. Při typickém provádění postupu byl do zásobníku uložen roztok, obsahující 5,1 g, 0,026 molu až 24,8 g, 0,25 molu 3-fenoxybenzaldehydu ve 100 ml di-n-butyletheru. Do tohoto roztoku bylo injekční stříkačkou přidáno 1,1 molárního ekvivalentu

kyanovodíku. Roztok byl míchán do úplného rozpuštění kyanovodíku. Pak byl roztok čerpán matricí ACTI-DISK rychlostí 1 ml až 5 ml za minutu. V určitých časových intervalech byly odebírány vzorky pro analýzu. Po ukončení reakce, obvykle po 24 hodinách byla reakční směs z reaktoru vyčerpána a matrice ACTI-DISK pak byla propláchnuta 25 ml di-n-butyletheru, který byl po určité době čerpán přes matrici. Po tomto propláchnutí je reaktor připraven ke zpracování další vsázky.

Každý vzorek reakční směsi byl dvakrát analyzován. Jedna z analýz byla provedena ke stanovení celkové přeměny 3-fenoxybenzaldehydu na (kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol, kdežto druhou analýzou byl stanoven poměr isomerů S/R v získaném produktu.

Ke stanovení přeměny na (kyano)(3-fenoxyfenyl)-methanol se uloží vzorek reakční směsi s objemem 0,1 ml do nádoby pro vzorek v plynovém chromatografu a zředí 1 ml methylenchloridu. Pak se přidá 1 ml N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu. Nádobka se uzavře a protřepe, nechá se 15 minut stát a pak se vzorek roztoku vstříkne do plynového chromatografu s příslušným programem.

Ke stanovení poměru isomeru S/R (kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol se vzorek reakční směsi s objemem 0,5 ml uloží do nádoby, přidají se tři kapky chloridu kyseliny S-(-)-alfa-methoxy-alfa-(trifluormethyl)fenyloctové a pět kapek pyridinu. Výsledná reakční směs se smísí a nechá jednu hodinu reagovat. Po této době se přidá ještě 1 ml vody a 1 ml ethylacetátu, výsledná směs se protřepe, ethylacetátová vrstva se odebere a uloží do nádoby pro vzorek v plynovém chromatografu a vzorek se vstříkne do příslušně programovaného plynového chromatografu.

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky ze sedmi vsázek, jimiž byl svrchu uvedeným způsobem připraven S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol

| vsázka | aldehyd moly | rychlost ml/min | čas (h) | přeměna (%) | poměr S/R |
|--------|-----------------|--------------------|------------|----------------|--------------|
| 1 | 0,026 | 1 | 24 | 76,3 | 91,4/8,6 |
| 2 | 0,026 | 5 | 23 | 91,8 | 91,4/8,6 |
| 3 | 0,026 | 5 | 19 | 88,4 | 92,4/7,6 |
| 4 | 0,026 | 5 | 24 | 91,2 | 93,7/6,3 |
| 5 | 0,125 | 5 | 24 | 94,0 | 91,0/9,0 |
| 6 | 0,125 | 5 | 24 | 90,7 | 85,7/14,3 |
| 7 | 0,026 | 5 | 24 | 80,7 | 75,5/24,6 |

Příklad 2

Příprava S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu z kyanovodíku a 3-fenoxybenzaldehydu v di-n-butyletheru při teplotě 6 °C

S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol v tomto příkladu byl připraven způsobem podle příkladu 1. Reaktor, opatřený čerpadlem se lišil v tom smyslu, že matrice ACTI-DISK obsahovala pouze jednu vrstvu mikroporézního materiálu, permeabilního pro kapalinu, s immobilizovaným enzymem S-oxynitrilázou. V tomto příkladu byla matrice ponořena do lázně, udržované na stálé teplotě 6 °C. Reakce byla opakována po vsázkách celkem šestnáctkrát. Pro každou vsázku bylo užito 1,0 g, 0,005 molu 3-fenoxybenzaldehydu a pře-

bytek 0,4 až 0,5 ml kyanovodíku ve 25 ml di-n-butyletheru. Roztok byl čerpán rychlostí 4 až 5 ml za minutu. Výsledky přípravy S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu pro všech 16 vsázek jsou shrnuty v následující tabulce:

| vsázka | čas (h) | přeměna (%) | poměr S/R |
|--------|------------|----------------|--------------|
| 8 | 23 | 70,0 | 95,0/5,0 |
| 9 | 26 | 65,8 | 93,2/6,8 |
| 10 | 24 | 62,8 | 94,0/6,0 |
| 11 | 24 | 65,7 | 93,0/7,0 |
| 12 | 27 | 63,9 | 93,0/7,0 |
| 13 | 24 | 65,9 | 93,4/6,6 |
| 14 | 36 | 76,9 | 93,0/7,0 |
| 15 | 24 | 75,0 | 93,5/6,5 |
| 16 | 23 | 78,2 | 95,0/5,0 |
| 17 | 24 | 77,1 | 96,0/4,0 |
| 18 | 23 | 76,4 | 95,0/5,0 |
| 19 | 24 | 72,7 | 94,5/5,5 |
| 20 | 24 | 69,2 | 93,0/7,0 |
| 21 | 24 | 70,2 | 90,0/10,0 |
| 22 | 24 | 68,2 | 87,0/13,0 |
| 23 | 24 | 56,1 | 810/19,0" |

Příklad 3

Příprava S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu z kyanovodíku a 3-fenoxybenzaldehydu v terc.butymethyletheru při teplotě místnosti

S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol byl připraven v podstatě způsobem podle příkladu 1. Reaktor, použitý v tomto příkladu se lišil tím, že matrice ACTI-DISK obsahovala pouze jednu vrstvu mikroporézního materiálu, propustného pro kapalinu s immobilizovaným enzymem S-oxynitrilázou. Byly provedeny celkem tři vsázky. Pro každou vsázku byl užit 1,0 g, 0,005 molu 3-fenoxybenzaldehydu a 0,5 ml kyanovodíku, jde o přebytek k dosažení úplné přeměny a ke kompenzaci jakýchkoliv ztrát odpařením. Rozpouštědlem pro první vsázku bylo 50 ml di-n-butyletheru, při druhých dvou vsázkách bylo vždy užito 50 ml terc.butylmethyletheru. Každá vsázka trvala 24 hodin. Roztok byl čerpán rychlostí 5 ml za minutu. Výsledky přípravy S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu ve všech třech vsázkách jsou shrnuty v následující tabulce.

| vsázka | rozpouštědlo | přeměna (%) | poměr S/R |
|--------|---------------------|-------------|-----------|
| 24 | n-Bu ₂ O | 95,0 | 93,0/7,0 |
| 25 | t-BuOMe | 74,0 | 58,0/42,0 |
| 26 | t-BuOMe | 88,5 | 53,0/47,0 |

Příklad 4

Příprava S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu z kyanovodíku a 3-fenoxybenzaldehydu v acetonitrilu při teplotě místnosti

S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol byl v tomto příkladu připraven v podstatě způsobem podle příkladu 1. Byla provedena jediná vsázka při použití 25,0 g, 0,126 molu 3-fenoxybenzaldehydu a 6 ml (přebytek) kyanovodíku ve 100 ml acetonitrilu. Reakce byla prováděna 24 hodin, reakční směs byla čerpána rychlostí 5 ml/min. Přeměna na produkt byla 88,0 % a podíl isomerů S/R ve výsledném produktu byl 52,0/48,0.

Příklad 5

Příprava S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu z kyanovodíku a 3-fenoxybenzaldehydu v tetrahydrofuranu při teplotě místnosti

S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol byl v tomto příkladu připraven v podstatě způsobem podle příkladu 1. Byla provedena jediná vsázka, při níž bylo užito 5,0 g, 0,025 molu 3-fenoxybenzaldehydu a 1,5 ml (přebytek) kyanovodíku ve 100 ml tetrahydrofuranu. Reakce byla prováděna celkem 24 hodin, reakční směs byla čerpána rychlostí 5 ml/min. V průběhu reakce bylo dosaženo přeměny na výsledný produkt 82,0 %, poměr isomerů S/R v získaném výsledném produktu byl 48,0 : 52,0.

Příklad 6

Příprava S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu z 3-fenoxybenzaldehydu při teplotě místnosti při použití kyanovodíku jako rozpouštědla

S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol byl v tomto příkladu připraven v podstatě způsobem podle příkladu 1. Reaktor se lišil v tom, že matrice ACTI-DISK obsahovala pouze jednu vrstvu mikroporézního materiálu, propustného pro kapalinu s immobilizovanou S-oxynitrilázou. Byla provedena jediná vsázka při použití 1,0 g, 0,005 molu 3-fenoxybenzaldehydu ve 20 ml kyanovodíku. Reakce byla prováděna po dobu 24 hodin, rychlost čerpání byla 5 ml za minutu. Bylo dosaženo přeměny 96,7 % na výsledný produkt, poměr isomerů S/R v produktu byl 58,1/41,9.

Příklad 7

Příprava S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu z kyanovodíku a 3-fenoxybenzaldehydu v diisopropyletheru při teplotě místnosti

Následující příklad prokazuje, že diisopropylether, který byl použit jako rozpouštědlo například v US patentovém spisu č. 4 859 784, jehož obsah byl uveden svrchu, je v případě způsobu podle vynálezu jako rozpouštědlo zcela nevhodný.

S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanol byl v tomto příkladu připraven v podstatě způsobem podle příkladu 1. Reaktor se lišil pouze tím, že matrice ACTI-DISK obsahovala pouze jednu vrstvu mikroporézního materiálu, propustného pro kapalinu s immobilizovaným enzymem S-oxynitrilázou. Byly provedeny celkem dvě vsázky. Pro každou vsázku bylo užito 2,1 g,

0,011 molu 3-fenoxybenzaldehydu a 0,6 ml (přebytek) kyanovodíku. Rozpouštědlem pro první vsázku bylo 50 ml di-n-butyletheru, ve druhé vsázce bylo užito 50 ml diisopropyletheru. Před použitím bylo 500 ml diisopropyletheru čištěno průchodem sloupcem neutrálního oxidu hlinitého s rozměrem 2,5 x 28 cm. Čištěný diisopropylether byl až do použití skladován v dusíkové atmosféře. Mezi jednotlivými vsázkami byl reaktor propláchnut 75 ml čištěného diisopropyletheru. Každá vsázka trvala 23 až 24 hodin, rychlost čerpání byla 5 ml/min. Výsledky přípravy S-(kyano)(3-fenoxyfenyl)methanolu uvedeným způsobem jsou shrnuty v následující tabulce

| vsázka | rozpouštědlo | přeměna (%) | poměr S/R |
|--------|---------------------|-------------|-----------|
| 27 | n-Bu ₂ O | 89,5 | 94,0/6,0 |
| 28 | i-Pr ₂ O | 80,0 | 66,0/34,0 |

Zastupuje:

E. Kocjane
Dr. IZENKA KOCJANOVÁ

| | | | | | | |
|-------|------|------|--------|------------|--------|--------|
| PROJ. | DATA | STAV | PRŮBĚH | POZ. ČÍSLO | PRŮBĚH | PRŮBĚH |
| | | | | | | |

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby opticky aktivních S-kyanohydrinů reakcí aldehydu s kyselinou kyanovodíkovou, při níž se uvádí do styku organické rozpouštědlo, obsahující kyselinu a aldehyd s enzymem S-oxynitrilázou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že enzym je chemicky vázán na nerozpustný komplexní materiál, tvořený porézní membránou, jíž procházejí reakční složky, porézní membrána je tvořena polymerním pryskyřičným pojivem s dispergovanými jemně rozptýlenými částicemi plniva a soustavou v podstatě propojených pórů, přičemž porézní membrána je prostupná pro kapalinu s obsahem reakčních složek.

2. Způsob podle nároku 1, pro výrobu opticky aktivních S-kyanohydrinů reakcí aldehydu s kyselinou kyanovodíkovou, při níž se uvádí do styku organické rozpouštědlo, obsahující kyselinu a aldehyd s enzymem S-oxynitrilázou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že enzym je chemicky vázán na nerozpustný komplexní materiál, tvořený porézní membránou nebo vrstvami membrán s alespoň dvěma protilehlými povrchy s předem stanovenou tloušťkou, jimiž procházejí reakční složky, porézní membrána je tvořena polymerním pryskyřičným pojivem s jemně rozptýlenými částicemi pojiva a systémem v podstatě propojených pórů, přičemž tyto póry jsou vytvořeny mezi částicemi pryskyřičného pojiva, mezi částicemi plniva a pryskyřičným pojivem a mezi sousedními částicemi pojiva, částice dispergovaného plniva jsou v porézní membráně obsaženy v množství alespoň 25 % hmotnostních, distribuce velikosti pórů se nehomogenně mění v rozmezí uvedeného povrchu v celé tloušťce materiálu v rozmezí 0,01 až 100 mikronů při stanovení vtláčováním rtuti a porézní membrána je prostupná pro kapalinu alespoň jedním ze svých povrchů.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že membrána je tvořena polyvinylchloridem jako pojivem a oxidem křemičitým jako plnivem.
4. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že membrána je svými okraji upevněna v krytu, což brání průtoku kapaliny těmito okraji.
5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kryt je opatřen vstupním otvorem, umožňujícím přístup k jednomu povrchu membrány a výstupním otvorem, umožňujícím přístup k opačnému povrchu membrány.
6. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že membrána je chemicky aktivována činidlem, schopným vázat enzym.
7. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že enzym je na vazné činidlo vázán kovalentně nebo zesítním.
8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že membrána je chemicky aktivována působením polyethyleniminu a glutaraldehydu.
9. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že rozpustnost aldehydu ve vodě je nižší než 2,0 mg/ml.
10. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že se jako aldehyd užije 3-fenoxybenzaldehyd.
11. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í - c í s e t í m , že se jako organické rozpouštědlo užije di-n-butylether.

Zastupuje:

Skovajzová

20. 11. 1968