

PRÄPARATIVE TRENNUNG VON STEREOISOMEREN - GEZIELTE ENANTIOMERENTRENNUNG ÜBER DIASTEREOMERE AMIDE

Günter Helmchen

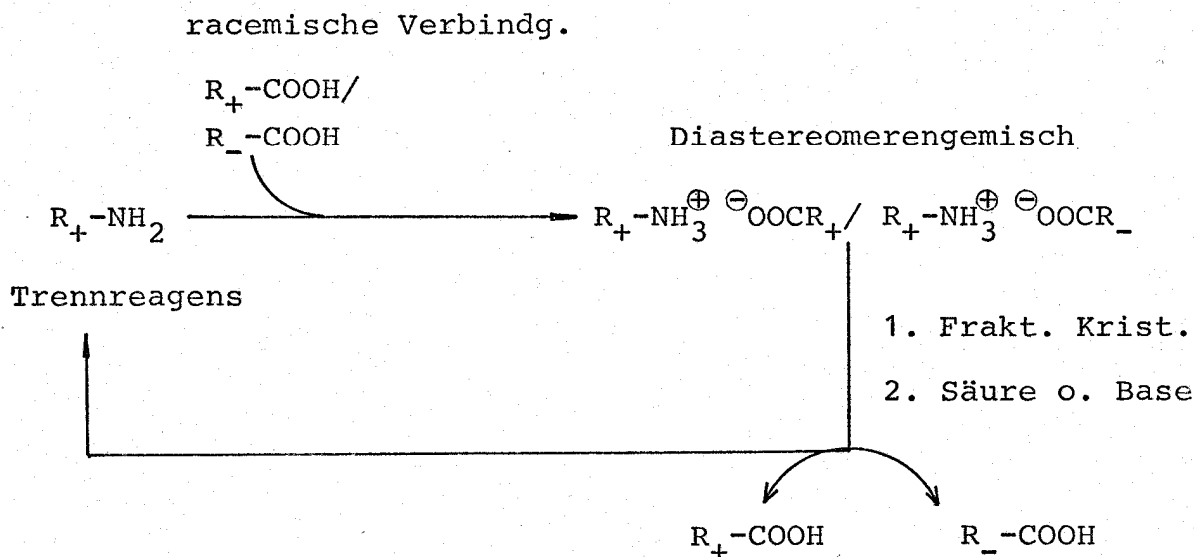
Institut für Organische Chemie, Biochemie und Isotopenforschung
der Universität, Pfaffenwaldring 55, 7000 Stuttgart 80

Zusammenfassung. - Als Hintergrund-Information zum Vortrag des Autors werden vergleichend die für Enantiomerentrennungen relevanten Ergebnisse der Gas- (GC) und flüssigkeitschromatographischen (LC) Trennung von diastereomeren Verbindungen an achiralen Phasen geschildert. Eine Methode zur gezielten LC-Enantiomerentrennung von Carbonsäuren und Aminen über diastereomere Amide sowie ein einfaches System zur präparativen Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (P-HPLC) wird in den Grundzügen beschrieben und seine Effizienz an Beispielen demonstriert.

Das "klassische" Verfahren zur Enantiomerentrennung; ein neues Konzept: "Gezielte Enantiomerentrennung". - Die Trennung von Enantiomeren gehört zu den mühsamsten Aufgaben im Bereich der organischen, speziell der Naturstoff- und der pharmazeutischen Chemie. Im wesentlichen bedient man sich auch heute noch einer von Pasteur vor mehr als 100 Jahren eingeführten Methodik: Herstellung von diastereomeren Derivaten durch Umsetzung mit chiralen Reagentien, Trennung der Diastereomeren durch fraktionierte Kristallisation und Rückspaltung in die Ausgangskomponenten. Als typisches Beispiel sei die Trennung einer racemischen Carbonsäure via Salzbildung mit einem chiralen Amin angeführt (s. S. 2).

Wie alle auf der Kristallisation beruhenden Trennverfahren leidet auch dieses an drei Defekten:

1. Es ist ein Trial-and-error-Verfahren, d. h. der Erfolg kann im Einzelfall nicht vorherbeurteilt werden. Üblicherweise müssen mehrere Hilfsreagentien erprobt werden und man erhält nur eines der beiden Enantiomeren in hoher enantiomerer Reinheit [1].
2. Falls man zu optisch aktiven Verbindungen gelangt, ist ihre enantiomere Reinheit nicht bekannt. Sie muß durch andere Verfahren separat ermittelt werden.
3. Ebenfalls unbekannt ist zunächst die absolute Konfiguration der Enantiomeren. Auch zu ihrer Bestimmung müssen weitere, u. U. recht aufwendige Verfahren herangezogen werden.



Offensichtlich beruhen diese Unvollkommenheiten auf der Tatsache, daß die fraktionierte Kristallisation ein Trennverfahren ist, welches keine quantitative Detektion erlaubt und bei dem der Zusammenhang zwischen Struktureigenschaften (Molekelstruktur, insbesondere räumlicher Aufbau) und Trenneigenschaften (Löslichkeit, Mischkristallbildung u. a.) der Separanden unbekannt ist.

Wir haben schon vor längerer Zeit ein Verfahren zur Enantiomerentrennung, welches die obigen Defekte nicht besitzt, als "gezielte Enantiomerentrennung" bezeichnet. In positiver Formulierung: Eine gezielte Enantiomerentrennung gestattet die Trennung von Enantiomeren mit im voraus abschätzbarem Erfolg unter simultaner Bestimmung der enantiomeren Reinheit und absoluten Konfiguration.

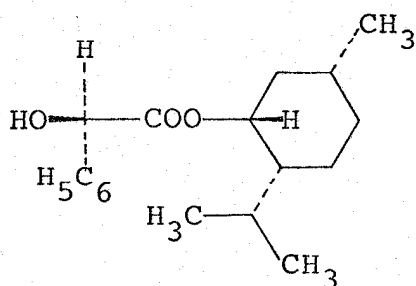
GC- und LC-Untersuchungen zur Trennung von Enantiomeren. - Auf der Suche nach besser geeigneten Verfahren als das "klassische" wurden alle bekannten Trennverfahren herangezogen. Gründliche

Bearbeitung erfuhren jedoch nur die chromatographischen Methoden. Zwei Klassen werden im allgemeinen unterschieden:

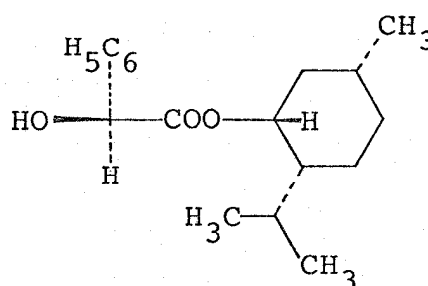
- Trennung chiraler Stoffe an chiralen stationären Phasen über diastereomere Assoziate.
- Trennung von vorgebildeten Diastereomeren an achiralen stationären Phasen [2].

Wir haben uns nur mit der zweiten Klasse befaßt und wollen die Diskussion darauf beschränken.

Gemäß eigenen eingehenden Literaturrecherchen wurden Trennungen von kovalenten Diastereomeren, Amide und Ester, durch Flüssigadsorptionschromatographie bereits 1938 [5] (Kieselgel) und 1942 [6] (Aluminiumoxid) beschrieben. Bis 1970 wurden ca. 10 weitere präparative Trennungen durchgeführt [7]. Als Beispiel [6] seien die diastereomeren Mandelsäurementhylester 1a,1b angeführt.



1a



1b

1959 begann ein intensives Studium der GC-Trennung von kovalenten Diastereomeren, wiederum überwiegend Ester und Amide. Diese Untersuchungen sind in einem ausgezeichneten Übersichtsartikel von Gil-Av und Nurok [8] 1974 nahezu lückenlos zusammengefaßt worden. Die für unser Anliegen relevanten Ergebnisse sind folgende:

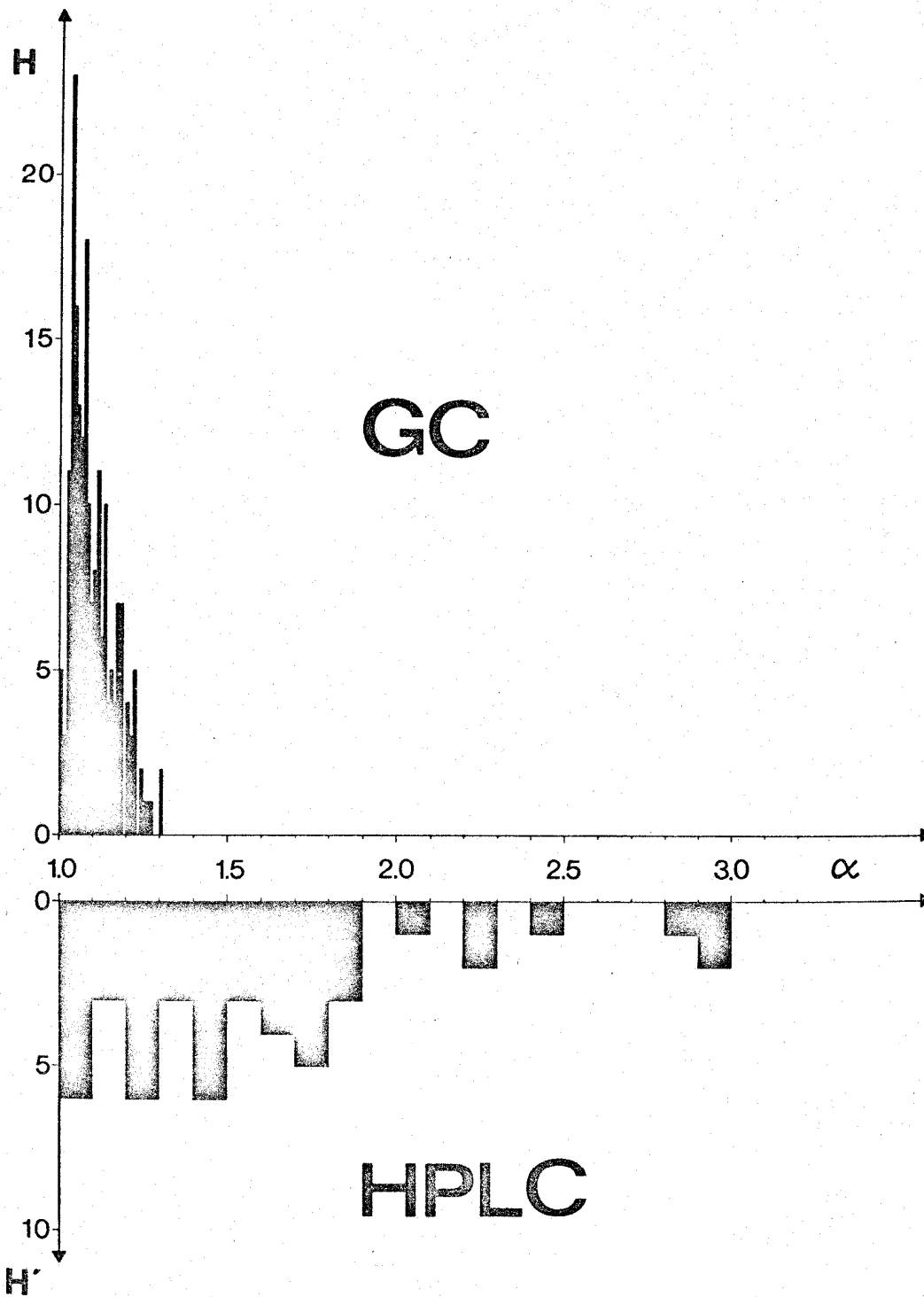


Abb. 1. Häufigkeit des Vorkommens von Diastereomerentrennungen in verschiedenen Bereichen des Trennfaktors α ;

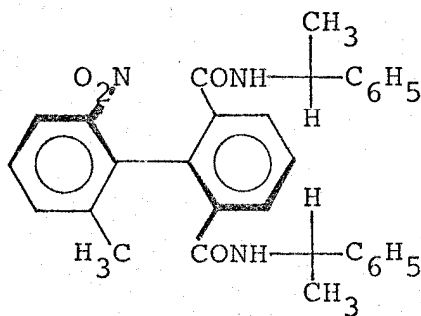
H = Zahl der in [8] angeführten GC-Trennungen nichtcyclischer Diastereomeren im Intervall $\Delta\alpha = 0.01$,

H' = Zahl der von uns untersuchten LC-Trennungen nichtcyclischer Diastereomeren im Intervall $\Delta\alpha = 0.1$.

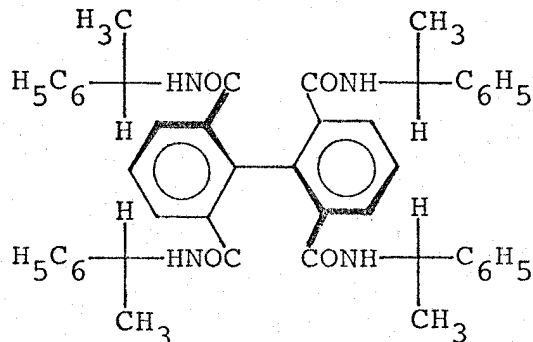
- Diastereomere Ester und Amide lassen sich nahezu immer durch GC trennen. In Abb. 1 (oben) ist die Häufigkeitsverteilung der erzielten Trennfaktoren α [9] sämtlicher Verbindungen (ca. 200) aus der Arbeit von Gil-Av und Nurok dargestellt. Die Trennfaktoren sind klein, typisch ist der Bereich 1.03-1.1, aber ausreichend, um quantitative Trennungen durch Kapillar-GC zu gewährleisten.
- Trennungen von Substanzen mit $\alpha < 1.1$ durch präparative GC sind im Routinebetrieb für Nichtspezialisten kaum oder allenfalls nur in sehr kleinem Substanzmaßstab durchführbar. Hinzu kommt die Schwerflüchtigkeit und Zeretzlichkeit vieler Diastereomerenpaare (Molmasse i. d. Regel > 250).
- Die gaschromatographischen Trennungen stellen in vielen Fällen gezielte Enantiomerentrennungen dar: sie lassen sich, zumindest in Mikromengen, nahezu immer durchführen (Kriterium 1); sie lassen sich natürlich immer quantitativ beurteilen (Kriterium 2); es wurden empirische Modellvorstellungen entwickelt, vor allem durch Karger u. Mitarb. [8], welche in gewissen Verbindungsreihen eine Deduktion der Konfiguration aus der Elutionsabfolge gestatten (Kriterium 3).

Obwohl GC-Amateur, sei dem Autor aus der Sicht des organischen Chemikers die Beurteilung gestattet: Die GC-Trennung von diastereomeren Verbindungen ist eine hervorragende analytische Methode, sie besitzt aber außer in speziellen Fällen kaum eine Zukunft für die präparative Trennung von Enantiomeren.

Eigene Arbeiten zur gezielten Enantiomerentrennung durch LC von diastereomeren Amid. - Unsere Arbeiten zur LC-Trennung von Diastereomeren wurden durch eine zufällige Beobachtung ausgelöst: Ein für $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen benötigtes Gemisch von drei diastereomeren Diamiden der Struktur 2 (pseudoasymmetrische Verbindungen) ließ sich sowohl dünn-schichtchromatographisch (DC)



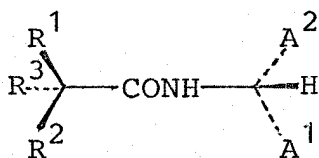
2a,b,c



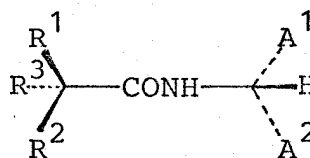
3a,b,c,d

als auch durch konventionelle Säulenchromatographie (SLC) an Kieselgel trennen [10]. Im noch komplizierteren Fall 3 sind sogar vier Diastereomere möglich [11]. Erstaunlicherweise konnten selbst diese durch präparative Dünnschichtchromatographie (PDC) getrennt werden. Diese Ergebnisse, zusammen mit den in der Literatur beschriebenen, schienen anzudeuten, daß diastereomere Amide sich ungewöhnlich gut durch LC trennen lassen. Bedachte man die geringe Leistungsfähigkeit der DC, PDC und SLC (ca. 400 th. Böden), so mußten die Trennfaktoren wesentlich größer als die der analogen GC-Trennungen (routinemäßig 3000-100000 th. Böden) sein.

Eine eingehende Untersuchung dieses Trennphänomens schien lohnenswert. Hierfür sind so komplizierte Verbindungen wie 2 und 3 nicht gut geeignet, da ihre Synthese recht aufwendig ist. Als durchsichtige Modelle bearbeiteten wir zunächst eine relativ große Zahl (inzwischen ca. 100) von Diastereomerenpaaren des folgenden, zu 1a,b analogen Typs ($R^i, A^i = \text{Alkyl, Aryl, OR, NR}_2, \text{Halogen, H u. a.}$):



4a



4b

Die Trenneffekte wurden anfänglich durch DC, ab 1971/72 durch analytische HPLC (A-HPLC) bestimmt. Parallel wurden sämtliche Verbindungen einzeln durch $^1\text{H-NMR}$ - und IR-Spektroskopie untersucht, um Aussagen über ihre Konformation zu gewinnen. Diese Aussagen wurden durch Röntgenstrukturanalyse und quantenchemische Berechnungen gefestigt. Die Konfiguration der Verbindungen wurde in jedem Fall unabhängig durch Synthese oder eine von uns entwickelte Kernresonanzmethode [12] ermittelt.

Die Resultate dieser Untersuchungen sind grob skizziert folgende:

1. Die Trennfaktoren α eines Teils unserer Untersuchungsobjekte sind in Abb.1 denen der GC-Untersuchungen gegenübergestellt. Ein Kommentar erübrigt sich. Neuerdings wurden Amine und Carbonsäuren gefunden, die routinemäßig $\alpha = 2-3$ ergeben, der Maximalwert beträgt 5. Um vergleichen zu können, wurden als Eluentien lediglich Hexan-Äthylacetat 8:2 und 1:1 verwendet. Die angeführten Werte sind also nicht optimiert.
2. Mit Hilfe eines UV- oder Refraktometer-Detektors kann die Zusammensetzung von Gemischen leicht gemessen werden [13]. Eine Eichung ist im allgemeinen nicht notwendig, da Diastereomere sich in ihren optischen Eigenschaften nur wenig unterscheiden. Bei Trennfaktoren $\alpha > 1.5$ ist überdies selbst mit primitiven LC-Systemen (SLC, PDC) eine vollständige Trennung erreichbar, so daß Gemische nicht anfallen.
3. Zwischen der Konfiguration der Diastereomeren und ihrer Elutionsreihenfolge ließen sich eindeutige Beziehungen für Klassen von Amiden ableiten, deren Konformation in Lösung unabhängig von der Natur spezieller Substituenten angegeben werden kann [14]. Folgende allgemeine Regeln wurden in allen Fällen bestätigt gefunden:
 - Sekundäre Amide $RCONHR'$ besitzen in polaren Lösungen und im adsorbierten Zustand auf Kieselgel [15] im wesentlichen dieselbe Konformation.
 - Im adsorbierten Zustand ist eine parallele Anordnung der planaren Amidgruppe und der in Mikrobereichen ebenen Oberfläche des Kieselgels bevorzugt. Als Ursache stellen wir uns eine doppelte Wasserstoffbrückenbindung entsprechend Abb. 2a vor.
 - Apolare Gruppen (Alkyl, Aryl) stören die optimale Anordnung umso mehr, je weiter sie aus der Amidebene herausragen. Eine repulsive Wechselwirkung mit dem Adsorbens geht oft, aber nicht immer(!), dem üblichen sterischen Effekt parallel. Der LC-sterische Effekt muß empirisch ermittelt werden. Wir sprechen von LC-sterisch kleinen (S) und LC-sterisch großen (L) Gruppen.
 - Dasjenige Diastereomere eines Paares ist das früher eluierte, in dem beide Seitenflächen der Amidgruppe besser LC-sterisch abgeschirmt sind als die am schwächsten abgeschirmte Seitenfläche des anderen Diastereomeren.
 - Zwischen kleinen polaren Gruppen (OH) und dem Kieselgel besteht eine attraktive Wechselwirkung, besonders dann, wenn diese Gruppen keine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zur Amidgruppe ausbilden [16]. Formal betrachten wir solche Gruppen als "sehr kleine Gruppen (VS)".

Für den einfachen, aber praktisch sehr wichtigen Fall 4:R³=H sind

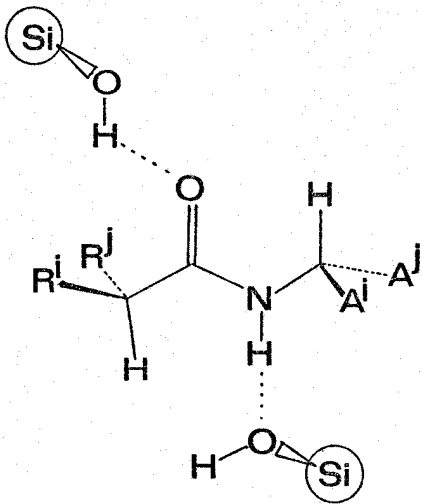
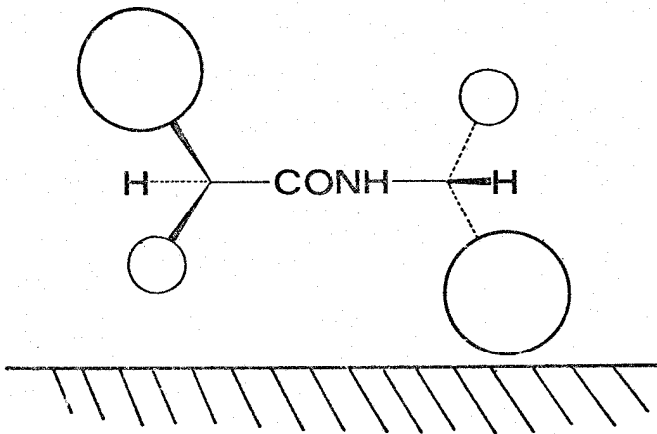


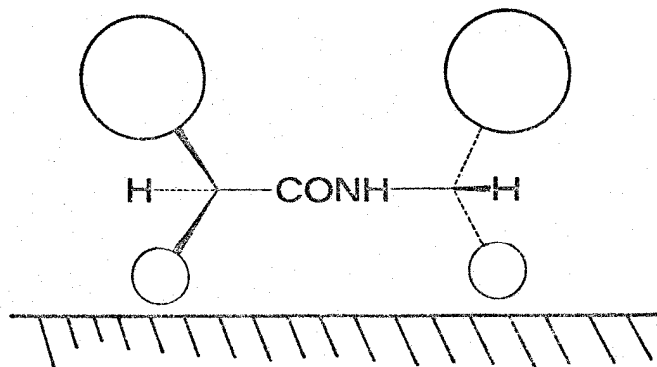
Abb. 2. Modell zur Bindung von diastereomeren sekundären Amiden an Kieselgel

a. Blick auf die Oberfläche des Kieselgels; Bindung der planaren Amidgruppe durch doppelte Wasserstoffbrücken.

b,c. Blickrichtung parallel zur Oberfläche; der große bzw. kleine Kreis bezeichnet eine LC-sterisch große bzw. kleine (apolare) Gruppe.



b. Früher eluierte Verbindung (infolge beidseitiger Abschirmung der Amidgruppe).



c. Später eluierte Verbindung (infolge nur einseitiger Abschirmung der Amidgruppe).

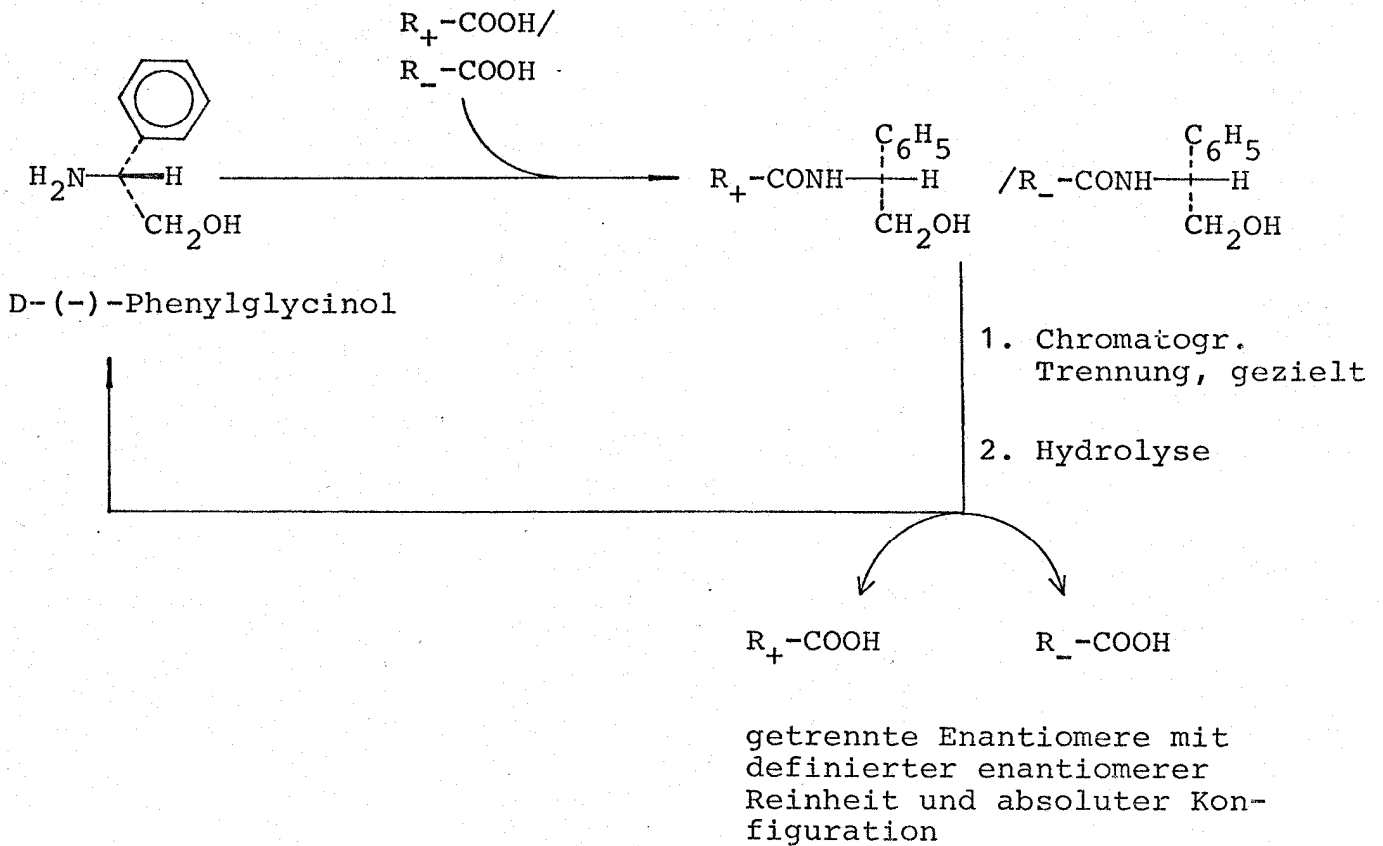
diese Regeln explicit in Abb. 2 dargestellt. Hier gilt die zusätzliche Regel, daß die stabilste Konformation solcher Verbindungen durch eine im Mittel antiperiplanare Anordnung der C-H-Bindung des Acylteils relativ zur Carbonyl-Gruppe gekennzeichnet ist.

Präparative Enantiomerentrennungen über diastereomere Amide. - Der praktischen Anwendung der obigen Erkenntnisse standen anfänglich zwei Hindernisse entgegen:

- Amide lassen sich sehr leicht in praktisch quantitativer Ausbeute herstellen (Peptidsynthese), aber in der Regel nur schwer wieder in Carbonsäure und Amin zerlegen.
- Die präparative HPLC (P-HPLC) wurde für lange Zeit in rudimentärem und unbefriedigendem Zustand belassen. Die Entwicklung eines eigenen Hochleistungssystems für den Gramm- und Multi-grammbereich kostete uns - organische Chemiker - viel Zeit und Mühe.

Wenden wir uns zunächst dem ersten Problem zu. Es wurde erst kürzlich weitgehend befriedigend gelöst [17]. Wir fanden Carbonsäuren und Amine, die bei geeigneter Anordnung von polaren Gruppen (OH) sowohl zu sehr hohen Trenneffekten als auch zu leichter Hydrolysierbarkeit (Nachbargruppeneffekte) ihrer Amide führen. Ein besonders günstiges Reagens zur Trennung enantiomerer Carbonsäuren ist das bei allen Feinchemikalienfirmen erhältliche D-(-)-Phenylglycinol. In der Regel besitzen die abgeleiteten diastereomeren Amide Trennfaktoren $\alpha=1.5-3$. Die eingangs dargestellte Trennung einer racemischen Carbonsäure wird nunmehr nach dem auf Seite 10 formelmäßig beschriebenen Prinzip gezielt durchgeführt.

Entwicklung einer präparativen Hochleistungstrennsäule. - Ausgangspunkt unserer Bemühungen um ein brauchbares P-HPLC-System waren die bekannten Merck-Lobar-Fertigsäulen. Infolge einer Knappheit an Verbrauchsmitteln trachteten wir danach, qualitativ äquivalente oder sogar bessere Säulen aus billigem Kieselgel der Korngröße 60-70 μ (~ 40DM/kg) selbst herzustellen. Da auch der apparative Aufwand niedrig gehalten werden sollte, beschränkten wir uns auf den Niederdruckbereich, d. h. ca. 2-20 bar.



Unter Anwendung modifizierter Standard-Trockenpacktechniken war es nicht schwer, Säulen mit Durchmesser >2 cm weitgehend optimal herzustellen (65 g, 270 g und 1 kg Kieselgel). Die HETP-Werte betragen im Minimum der van Dempster-Kurve (Testbedingungen $>10^{-4}$ g Naphthalin und Nitrobenzol, Eluens: Petroläther (tiefs.)-Äthylacetat 95:5) 2-3 Korndurchmesser, sind also ausgezeichnet. Die Trennsäule mit dem Inhalt 1 kg Kieselgel der Dimension 65x6 cm besitzt 3000 theoretische Böden (Naphthalin, $25 \text{ cm}^3/\text{min}$) und kann mit Durchflußgeschwindigkeiten von $200 \text{ cm}^3/\text{min}$ unterhalb 10 bar betrieben werden.

Eigentlicher Gegenstand des Referats des Autors wird eine Neuentwicklung sein. Ab Anfang dieses Jahres kam Kieselgel der Korngröße 15-25 μ zum Preis von 175DM/kg auf den Markt. Wir begannen sofort, dieses zu erproben. Trockenpackverfahren schieden aus. Wie bei analogen Versuchen mit A-HPLC-Säulen fanden wir ein

"antidogmatisches" Packverfahren, d. h. ein Verfahren das etablierten Regeln widerspricht, hervorragend geeignet. Ein Sedimentationsverfahren in Säulen der Dimensionen 28x2,4 cm (50 g Kieselgel) bzw. 40x4 cm (200 g Kieselgel) ergab reproduzierbar Bodenzahlen von 7000 bzw. 9500 (Naphthalin, s. oben). In Abb.3 ist die van Dempster-Kurve sowie ein mit hoher Schreibergeschwindigkeit aufgenommener Peak dargestellt. Dem Fachmann braucht nicht gesagt zu werden, daß es sich hier um eine Trennsäule höchster Qualität handelt.

Ein Beispiel. - Für die Synthese eines Pheromons benötigen wir enantiomer reine 2-Methyl-valeriansäure. Ihre Herstellung nach einem klassischen Kristallisationsverfahren ist beschrieben worden. Daher konnten wir unser Verfahren vergleichend beurteilen. Der Arbeitsablauf war folgender:

1. Herstellung diastereomerer Amide (30 g) durch Umsetzung des (\pm)-Säurechlorids mit D-Phenylglycinol; (Zeitbedarf 6 Std., Ausbeute quantitativ).
2. Trennung der Diastereomeren:
 - a. DC-Tests zur Ermittlung des Eluens (Zeitbedarf 1 Std.)
 - b. Testruns auf der kleinen Säule (28x2,4 cm) mit 250 mg und 800 mg Substanz (Überladungstest); vgl. Abb.4 (Zeitbedarf ca. 3 Std.)
 - c. Haupttrennung auf der großen Säule (40x4 cm) mit fünfmaliger Injektion von je 6 g (Zeitbedarf einschließlich Rückgewinnung von 80 % des Lösungsmittels ca. 10 Std.).
3. Hydrolyse der reinen diastereomeren Amide (Ausb. >95%) und Rückgewinnung des D-Phenylglycinols (Zeitbedarf ca. 5 Std.).

Dieses Beispiel zeigt, daß es nunmehr möglich ist, in ca. 3 Tagen ein Racemat quantitativ im 10 g-Maßstab in beide enantiomer reine Komponenten unter Rückgewinnung des Trennreagens zu zerlegen. Dabei konnte der Erfolg der Trennung ohne Ausprobieren vorhergesehen werden und aus dem Trennvorgang enantiomere Reinheit und absolute Konfiguration bestimmt werden.

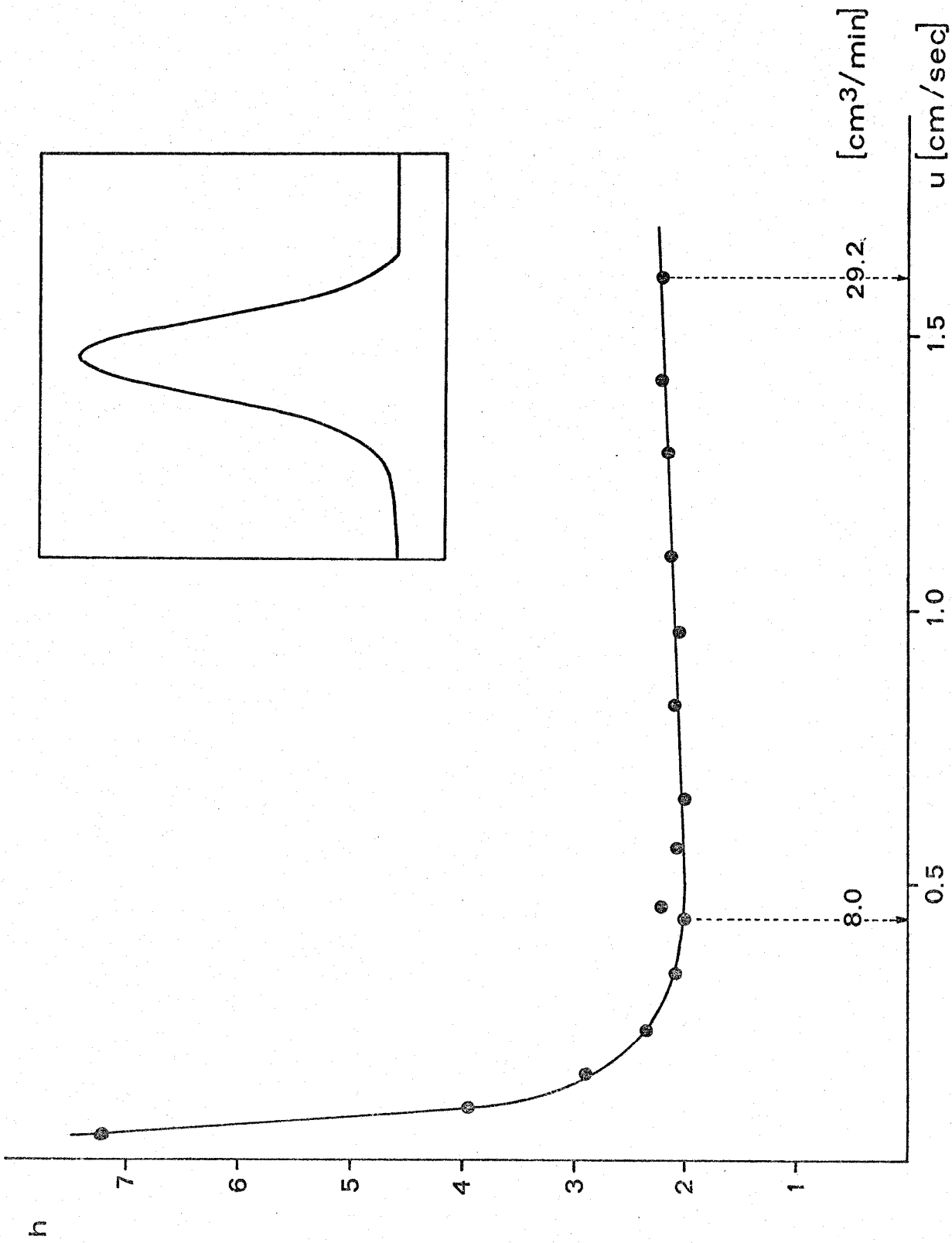


Abb. 3. Van-Dempster-Kurve einer präparativen Kieselgelsäule (Naphthalin, Eluens Petroläther tiefs.-Äthylacetat 95:5, Korndurchmesser 15-25 μ , Säulenlänge 28 cm, -durchmesser 2,4 cm) oben rechts: mit hoher Schreibergeschw. registrierter Peak.

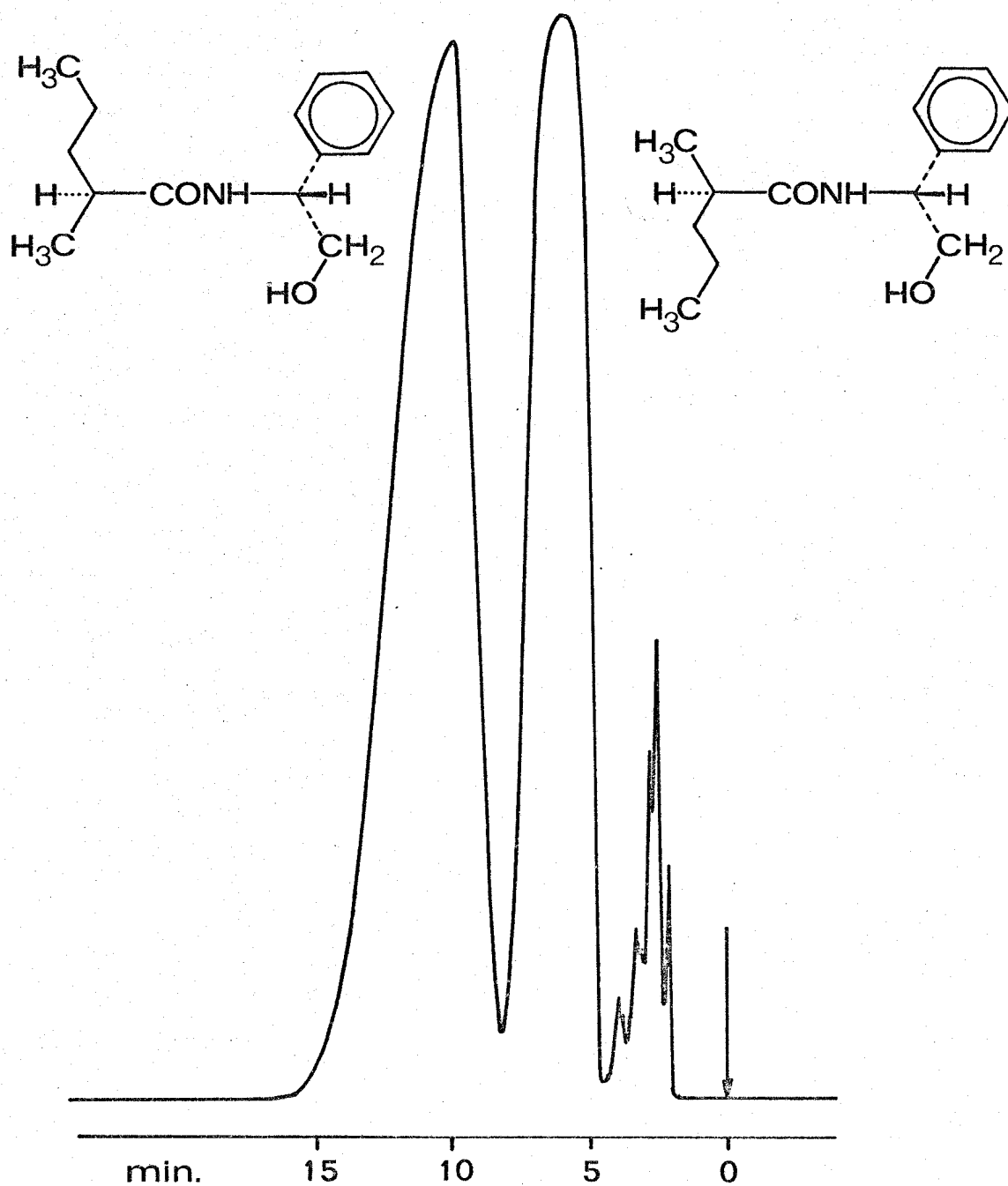


Abb. 4. Präparative Trennung diastereomerer Amide
(Trennsäule wie Abb. 3, Inhalt 50 g Kieselgel,
Substanzmenge 0.8 g, entsprechend ca. 30-facher
Überladung); vgl. S. 11.

Die Entwicklung der P-HPLC-Säulen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. B. Glatz durchgeführt. Für seine wichtigen Beiträge bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Für Hilfe bei der Abfassung des Manuskripts danke ich Frau G. Kraschewski und Frl. Diplom-Chemiker H. Völter.

FUSSNOTEN UND REFERENZEN

- [1] Als "enantiomere Reinheit" bezeichnet man den prozentualen Überschuss der überwiegenden Komponente eines Enantiomerengemisches:

$$\text{e.p.} = 100 \frac{[A_+] - [A_-]}{[A_+] + [A_-]}$$

- [2] Weitere Fallunterscheidungen lassen sich durchführen, z. B. Trennung chiraler Verbindungen in chiralen mobilen Phasen an achiralen stationären Phasen (vgl. z. B. [3]) oder die Trennung vorgebildeter Diastereomere an chiralen Phasen (vgl. z. B. [4]). Diese Verfahren besitzen bisher keine praktische Bedeutung und werden deshalb im allgemeinen nicht explizit behandelt.

- [3] W.H. Pirkle und D.L. Sikkilaga, *J. Chromatography* 123, 400 (1976)

- [4] W.A. Koenig et al., *Chromatographia* 10, 444 (1977)

- [5] A. Stoll und A. Hofmann, *Z. Physiol. Chem.* 251, 155 (1938)

- [6] M.M. Jamison und E.E. Turner, *J. Chem. Soc.*, 1942, 611

- [7] Über die Geschichte der flüssigkeitschromatographischen Trennung von diastereomeren Verbindungen sind besonders in der chromatographischen Literatur z. T. recht absurde Angaben zu finden. So werden z. B. in einem verbreiteten Lehrbuch "erste Ergebnisse" auf das Jahr 1973 (!) datiert. Zu dieser Zeit waren allein in unserer Arbeitsgruppe mehr als 30 Diastereomerenpaare, sogar -tripel und -quadrupel durch analytische HPLC und präparativ getrennt worden.

- [8] E. Gil-Av und D. Nurok, *Advances in Chromatography* 10, 99 (1974)

- [9] Der Trennfaktor α ist bei gegebenem Adsorbens und Eluens eine Stoffpaarkonstante:

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad t_{R2} \text{ bzw. } t_{R1} = \text{Retentionszeit des hinteren bzw. vorderen Peaks}$$

t_0 = Totzeit = Retentionszeit einer nicht adsorbierten Substanz

Der Trennfaktor darf nicht mit der Auflösung R_s (Resolution) verwechselt werden; diese ist eine Funktion der Trennbedingungen (Trennfaktor, Bodenzahl, Kapazitätsfaktor).

- [10] G.Helmchen und V.Prelog, *Helv.Chim.Acta* 55, 2599 (1972)
- [11] G.Helmchen, G.Haas und V.Prelog, *Helv.Chim.Acta* 56, 2255 (1973)
- [12] G.Helmchen, *Tetrahedron Lett.* 1974, 1527
- [13] G.Helmchen und W.Strubert, *Chromatographia* 7, 713 (1974)
- [14] G.Helmchen, R.Ott und K.Sauber, *Tetrahedron Lett.* 1972, 3873; G.Helmchen, H.Völter und W.Schühle, *Tetrahedron Lett.* 1977, 1417
- [15] Diese und die folgenden Aussagen beziehen sich auf Kieselgel als Adsorbens. Sie sind wahrscheinlich für analoge Adsorbentien, wie Aluminiumoxid, gültig, für andere, wie Reversed-Phase-Adsorbentien, nicht richtig.
- [16] Intramolekulare Wasserstoffbrücken lassen sich leicht durch IR-Spektroskopie nachweisen.
- [17] G.Helmchen, G.Nill und D.Flockerzi, unveröffentlichte Resultate.