

Racematspaltung: Sagten Sie „klassisch“?

André Collet*

Die 1853 von Pasteur entdeckte „klassische Racematspaltung“ beruht auf der Vereinigung eines Racemats mit einem Enantiomer einer chiralen Substanz als Trennreagens, um ein 1:1-Gemisch aus (p,n)-Diastereomeren Salzen zu erhalten, die dann durch Kristallisation voneinander getrennt werden (p steht dabei für das am wenigsten lösliche Diastereomer). Ein Großteil der optisch aktiven Grundstoffe, die in enantiomerreiner Form für die Herstellung von Pharmaka oder Agrochemikalien benötigt werden, wird gegenwärtig noch immer über die klassische Racematspaltung hergestellt – und dies ungestrichen ihres in mancher Hinsicht zweideutigen und nicht mehr zu rechtfertigenden Rufs, eher eine Kunst als eine Wissenschaft zu sein. Dazu einige Beispiele: Mehrere tausend Jahrestonnen (S)-Naproxen,^[1] D-Phenylglycin und D-4-Hydroxyphenylglycin^[2] werden durch Trennung diastereomerer Salze produziert und nicht auf durchaus vorhandenen alternativen Wegen wie der asymmetrischen Synthese oder der biochemischen Racematspaltung. Hierfür gibt es gute Gründe: Bei Enantiomerentrennungen im großen Maßstab sind Kristallisationstechniken meist unkomplizierter und wirtschaftlicher als jede andere Methode. Dies ist eine Folge der großen Anstrengungen der akademischen und industriellen Forschung der letzten Jahrzehnte, die physikalisch-chemischen Konzepte besser zu verstehen, auf denen die Trennung von Diastereomeren durch Kristallisation beruht.^[3, 4]

Bezieht man Phasendiagramme ein, so beschleunigt dies gewöhnlich die Auswahl eines guten Trennreagens und der besten Kristallisationsbedingungen. In weniger als sechs Monaten ausgearbeitete industrielle Anwendungen sind keine Ausnahme. Es gibt drei Grundtypen von Phasendiagrammen, die Fest-flüssig-Gleichgewichte von diastereomeren Gemischen beschreiben. Das einfache Eutektikum ohne feste Lösungen im Randbereich ist für Trennungszwecke am interessantesten (Abb. 1a). Hierbei wird das am wenigsten lösliche Diastereomer p in reiner Form nach einer einzigen Kristallisation aus dem 1:1-Gemisch (p:n) der Zusammensetzung O erhalten. Die erwartete Ausbeute ist $Y = 100 \times (OE/Ep)/C_O$, wobei C_O die Konzentration des Gemisches O ist. Diese Ausbeute nähert sich dem Maximalwert von 0.5 (oder

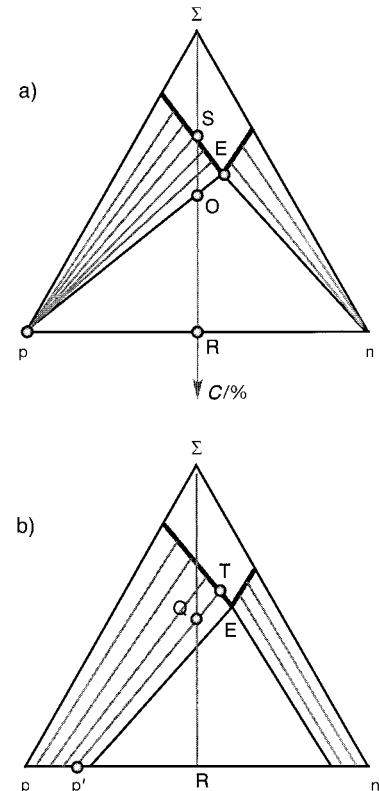


Abb. 1. a) Ideale Löslichkeitsisothermen für zwei p- und n-Diastereomere, die im Lösungsmittel Σ ein Eutektikum bilden. Die weniger lösliche Komponente p kann in reiner Form aus Lösungen der Zusammensetzung zwischen O und S erhalten werden. Die maximale Ausbeute Y für p erhält man aus der Lösung bei O (siehe Text). In dem gezeigten Fall liegt Y bei 25 %, ein Bild, wie es recht häufig auftritt; b) eutektisches Phasendiagramm mit fester Lösung sowohl auf der p- als auch der n-Seite. Bei Kristallisation wird ein System der Zusammensetzung Q einen unreinen Feststoff (p') in einer Flüssigkeit der Zusammensetzung T ergeben.

50 %), wenn das Eutektikum E nahe an den Rändern des Phasendiagramms liegt. Solche „guten Systeme“ stellen wahrscheinlich nicht mehr als 20 % der Fälle. Sie eignen sich für äußerst wirtschaftliche kommerzielle Anwendungen (z.B. Naproxen). Häufig sind eutektische Phasendiagramme durch feste Lösungen erschwert, die an den Rändern auftreten (Abb. 1b). Dann können mehrere Kristallisationsschritte nötig sein, um die Enantiomerenreinheit auf ein akzeptables Maß anzuheben, und die Gesamtausbeute liegt unterhalb der in der oben beschriebenen Gleichung. Feste Lösungen an den

[*] Prof. Dr. A. Collet
École normale supérieure de Lyon
Stéréochimie et Interactions Moléculaires (UMR CNRS 117)
F-69364 Lyon Cedex 07 (Frankreich)
Fax: (+33) 472-72-84-83
E-mail: andre.collet@ens-lyon.fr

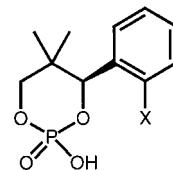
Rändern von Diastereomeren-Phasendiagrammen sind häufig ein Hauptproblem bei industriellen Anwendungen.

Relativ häufig gibt es auch Fälle, bei denen die beiden Diastereomere unter Bildung einer kontinuierlichen Reihe von festen Lösungen zusammen kristallisieren. Derartige Systeme sind generell zur Racematspaltung ungeeignet, zumindest bei kommerziellen Anwendungen.^[5] Im Fall der ebenfalls recht häufig anzutreffenden 1:1-Additionsverbindungen (Doppelsalze) ist eine Trennung der Diastereomeren durch Kristallisation ihrer 1:1-Gemische nicht möglich.

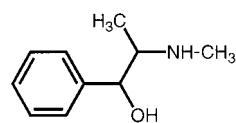
Von großer Wichtigkeit ist daher die Auswahl eines guten Trennreagens, das zu einem extrem dissymmetrischen, eutektischen Phasendiagramm führt, wenn möglich ohne feste Lösungen im Randbereich. Gewöhnlich wird dieser entscheidende Schritt am besten durch „Trial-and-error“-Verfahren angegangen. Auch wenn diese Versuche sehr systematisch und effizient durchgeführt werden können,^[6] lässt sich der Erfolg nicht vorhersagen. Es gibt keine feststehenden Richtlinien, um für ein gegebenes Substrat das ideale Trennreagens vorherzusagen. Ausnahme sind vielleicht Analogien, die innerhalb einer Reihe eng verwandter Substrate gelten können; z.B. können einfach substituierte Mandelsäurederivate allgemein mit Ephedrin in die Enantiomere gespalten werden. Obwohl unlösbare Fälle die Ausnahme sind (zumindest nach Erfahrung des Autors), liegt in den meisten Fällen, für die klassische Racematspaltungsverfahren entwickelt werden konnten, die Ausbeute nicht immer nahe am theoretischen Wert von 50 %. Dies kann für kommerzielle Anwendungen problematisch sein. Vor allem aus Zeitmangel können meistens nicht genügend Trennreagentien überprüft werden. Ferner ist die Zahl käuflicher Reagentien zur Racematspaltung begrenzt.

Vries et al. vermitteln einen neuen Lösungsansatz für dieses lange bekannte Problem.^[7] Die Grundidee ist einfach und offensichtlich zugleich: „Wir hofften daher, daß durch Zugabe mehrerer Reagentien zur Racematspaltung die langwierige Suche nach einem geeigneten Reagens verkürzt würde.“ Ist diese Idee wirklich so vernünftig, wie sie erscheint? Auf den ersten Blick hat eine kombinatorische Variante der üblichen Vorgehensweise geringe Erfolgsaussichten. Es ist sehr unwahrscheinlich, aus einem solchen Mehrkomponentengemisch kristalline Materialien zu erhalten, da ja die Konzentration eines gegebenen diastereomeren Salzes um den Faktor drei verringert wird, wenn ein Gemisch von drei Trennreagentien anstelle eines einzigen eingesetzt wird. Folglich können mit dieser Methode nur sehr schwerlösliche Salze ausgewählt werden. Die Autoren mußten auch schnell erfahren, daß der Einsatz zufälliger Kombinationen von Trennreagentien keine guten Ergebnisse liefert.

Die Resultate verbesserten sich aber schlagartig, als die Autoren begannen, Mischungen aus mehreren (gewöhnlich drei) Trennreagentien der gleichen „Familie“ einzusetzen. So bildet z.B. das 1:1:1-Gemisch von drei unterschiedlich substituierten Phosphorsäuren mit der gleichen, gezeigten Konfiguration eine derartige „Familie“, im folgenden „P-Mix“ genannt. Zehn solcher ternäre Mischungen werden in der erwähnten Veröffentlichung aufgeführt.^[7] Einige sind saure, andere basische Trennreagentien. In diesem Zusammenhang ist der Begriff „Familie“ stark einschränkend: Die Kompo-



„P-Mix“
X = H, Cl, OCH₃



(±)-1
Ephedrin (1R,2S)

nenten des Gemisches sind nicht nur strukturell und chemisch verwandt, sondern sie sind auch annähernd Isostere.^[8] So ist z.B. Weinsäure kein Mitglied der Dibenzoylweinsäure-„Familie“.

Wird ein derartiger Mix zu einer Lösung eines racemischen Substrats gegeben, dann fällt gewöhnlich schnell ein kristallines Salz aus. Meist hat das im Niederschlag enthaltene Substrat einen ee-Wert von 90–98 %. Die wichtigste Feststellung ist, daß das Salz immer mehrere Trennreagentien enthält, die in einem nichtstöchiometrischen Verhältnis zueinander vorliegen. So ergibt (±)-Ephedrin **1** mit dem oben beschriebenen „P-Mix“ kombiniert in 2-Propanol ein Salz, das (+)-**1** mit 98 % ee und die drei Phosphorsäuren des „P-Mix“ im Verhältnis 1:1.2:1.1 enthält. Meist sind die Salze auch nach wiederholter Kristallisation nichtstöchiometrisch zusammengesetzt. Im erwähnten Beispiel verschob sich die anfängliche Zusammensetzung nach 20 Kristallisationsschritten auf 1:14:55. Die gemischten Salze sind also nicht nur Gemische aus reinen diastereomeren Salzen, sondern sie bestehen eher aus einer einzigen kristallinen Einheit, bei der die drei Trennreagentien eine feste Lösung bilden. Die strukturelle Ähnlichkeit der Komponenten des Mix ist im Einklang mit dieser Hypothese. Sie wird auch durch die Aufklärung der Struktur im Kristall eines binären Salzes von (+)-Ephedrin mit nahezu äquimolaren Mengen von zwei der Phosphorsäure-Komponenten des „P-Mix“ gestützt.

Ungeachtet dessen, daß keine relevanten Phasendiagramme oder Löslichkeitsdaten verfügbar sind, scheint die Hypothese der festen Lösungen der Schlüssel für eine logische Erklärung des Phänomens zu sein. Feste Lösungen bilden sich häufig zwischen eng verwandten chiralen Strukturen gleicher Konfiguration.^[8] Dies ist eine der Aussagen, auf denen unter anderem die bekannte Methode von Fredga beruht.^[9] Mit ihr lassen sich die relativen Konfigurationen strukturell verwandter Verbindungen aus ihren Schmelzpunkt-Phasendiagrammen bestimmen. So bilden z.B. *o*-Chlor- und *o*-Brommandelsäure gleicher Konfiguration eine derartige feste Lösung. Vom thermodynamischen Standpunkt aus könnte eine feste Lösung eine geringere Löslichkeit haben und eine höhere Dichte als die reinen Komponenten. Das läßt sich leicht verstehen: In einem Kristall mit nur einer Komponente ist die Packungsdichte durch die Anforderungen der Gittersymmetrie auf ein gewisses Maß begrenzt, während in einer festen Lösung die lokale Symmetrie durch die Gegenwart unterschiedlicher Spezies verringert ist, obwohl die durchschnittliche Kristallsymmetrie erhalten bleibt. Diese Situation ermöglicht eine dichtere Packung und damit eine höhere Dichte. Im Gegenzug sollte eine dichtere Packung zu einer

besseren Selektivität für die Konfiguration des Substrats führen. Anders gesagt würde sich eine feste Flüssigkeit zwischen p- und n-Salzen am Randbereich nicht so leicht bilden, wenn anstelle des Mix nur ein einzelnes Trennreagens eingesetzt würde (Abb. 1b). Das ist vielleicht der Grund für die hohen *ee*-Werte, die für die zuerst ausgefallenen gemischten Salze gemessen werden.

Weitere Informationen über die physikalischen Eigenarten der Komponenten dieser komplexen Systeme und ihrer Gemische wären jetzt nötig. Dank dieser Entdeckung hat sich ein neues Forschungsfeld eröffnet, das Aspekte wie Phasengleichgewichte, Kristallisationskinetik und die Struktur und Dynamik fester und flüssiger Phasen einbeziehen sollte.

Das größte praktische Interesse dieses „Familien-Ansatzes“ liegt – ungeachtet der physikalisch-chemischen Erklärung – möglicherweise nicht darin, den Prozess zum Auffinden des besten Trennreagens zu beschleunigen, sondern eher im Potential, die Qualität der diastereomeren Salze zu verbessern. Dabei wird eine Selbstoptimierung der Kristallpackung ermöglicht, die aus der Gegenwart von mehreren leicht unterschiedlichen Bausteinen anstelle eines einzigen den Vorteil zieht. Bei DSM Andeno wurde die Methode bereits angewendet, um Racemate im 100-kg-Maßstab zu spalten.^[10] Es besteht kein Zweifel, daß die „klassische Racematspaltung“ immer noch eine große Zukunft hat,

sowohl in der Grundlagen- als auch in der anwendungsorientierten Forschung.

Stichwörter: Chiralität • Diastereomere • Enantiomeren-trennung • Kristallisation

- [1] P. J. Harrington, E. Lodewijk, *Org. Process Res. Dev.* **1997**, *1*, 72.
- [2] J. Kamphuis, W. H. J. Boesten, B. Kaptein, H. F. M. Hermes, T. Sonke, Q. B. Broxterman, W. J. J. van den Tweel, H. E. Schoemaker in *Chirality in Industry* (Hrsg.: A. N. Collins, G. N. Sheldrake, J. Crosby), Wiley, New York, **1994**, S. 189.
- [3] J. Jacques, A. Collet, S. H. Wilen, *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, Wiley, New York, **1981**; J. Jacques, A. Collet, *Reissue with corrections*, Krieger, Malabar, FL, USA, **1994**.
- [4] E. L. Eliel, S. H. Wilen, N. Mander, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley, New York, **1994**.
- [5] J. Costante, N. Ehlinger, M. Perrin, A. Collet, *Enantiomer* **1996**, *1*, 377.
- [6] A. Collet in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 10 (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, D. N. Reinhardt), Pergamon, Oxford, **1996**, S. 113–149.
- [7] T. Vries, H. Wynberg, E. van Echten, J. Koek, W. ten Hoeve, R. M. Kellogg, Q. B. Broxterman, A. Minnaard, B. Kaptein, S. van der Sluis, L. Hulshof, J. Kooistra, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2391; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2349.
- [8] Für eine Diskussion siehe: A. Collet, L. Ziminski, C. Garcia, F. Vigné-Maeder in *Supramolecular Stereochemistry* (Hrsg.: J. S. Siegel), Kluwer, Dordrecht, **1995**, S. 91–110 (NATO ASI Series).
- [9] A. Fredga, *Tetrahedron* **1960**, *8*, 126.
- [10] L. A. Hulshof, Q. B. Broxterman, T. R. Vries, H. Wijnberg, E. van Echten (DSM N.V.), EP-B 0 838 448 A1, **1997** [*Chem. Abstr.* **1998**, *129*, 4278].

In-vitro-Evolution und Selektion von Proteinen: durch Ribosomen-Display zu größeren Bibliotheken**

Ulrich Hoffmüller und Jens Schneider-Mergener*

Ein sich seit Beginn der 90er Jahre stürmisch entwickelndes Forschungsgebiet ist die Herstellung und Nutzung von molekularen Bibliotheken (Übersicht siehe Lit. [1]). Das Schlagwort dabei ist: „kombinatorisch“, gepaart mit Chemie, Biochemie oder Biologie. Obwohl die angewendeten Methoden bisher kaum in Lehrbüchern zu finden sind, kennt doch beinahe jeder in der Chemie oder in den Biowissenschaften tätige Forscher inzwischen Begriffe wie Phagen-Display, Peptid- und Nucleinsäure-Bibliotheken oder kombinatorische Chemie. Die gemeinsame Strategie sowie das Ziel aller

chemischen und biologischen Ansätze ist immer 1) Generierung eines möglichst großen und vollständigen Pools von unterschiedlichen Molekülen (der „Bibliothek“) und 2) Durchmustern der Bibliothek nach Einzelsubstanzen mit gewünschten Eigenschaften, z. B. einem Ausgangsstoff (Leitstruktur) für ein Arzneimittel oder nach einem Antikörper für diagnostische Zwecke. Bibliotheken werden zunehmend zur Identifizierung von Interaktionspartnern bei der Signaltransduktion, der Zell-Zell-Erkennung und bei immunologischen Regulationsprozessen eingesetzt. Diese Herangehensweise beschleunigt nicht nur die Bearbeitung vieler Probleme, sondern ermöglicht in vielen Fällen erst deren Lösung. Daher haben eine Vielzahl von Chemikern und Biologen in Industrie- und Universitätslaboratorien begonnen, neuartige Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, Bibliotheken zu erzeugen und zu durchmustern. Der bekannteste Ansatz ist die Phagen-Display-Methode,^[2,3] bei der Peptid- oder Protein-Bibliotheken auf Phagenoberflächen präsentiert werden. Die Selektion der gewünschten Phagen erfolgt *in vitro*, während die

[*] Priv.-Doz. Dr. J. Schneider-Mergener, Dr. U. Hoffmüller
Institut für Medizinische Immunologie
Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität
Schumannstraße 20/21, D-10098 Berlin
Fax: (+49) 30-2802-6460
E-mail: jsm@charite.de

[**] Wir danken A. Warsinke und M. Paschke für die kritische Durchsicht des Manuskripts. U.H. dankt der DFG für ein Stipendium (INK 16A1-1).