

Untersuchung chromatographischer Racemattrennungen, II¹⁾

Enantiomerenspezifische ³H/¹⁴C-Doppelmarkierung von Racematen, Basis einer neuen Methode zur Bestimmung der Trennleistung optisch aktiver Adsorbentien

Gottfried Blaschke

Pharmazeutisches Institut der Universität Kiel, D-2300 Kiel, Gutenbergstraße 76–78

Eingegangen am 24. April 1973

Die Synthese enantiomerenspezifisch ³H/¹⁴C-doppelmarkierter d,l-Mandelsäure, d,l-Mandelsäure-methylester und d,l-Mandelsäureamid wird mitgeteilt. Solche doppelmarkierten Racemate ermöglichen die rasche und genaue Prüfung chromatographischer Racemattrennungen, wobei die Berechnung des Trenneffekts aus scintillations-spektroskopisch ermittelten ³H- und ¹⁴C-Zählraten erfolgt.

Investigation of Chromatographic Resolutions of Racemates, II¹⁾

Enantiomerically Specific ³H/¹⁴C-Double Labeled Racemates, the Basis of a New Method for the Determination of Chromatographic Resolution on Optically Active Adsorbents

The synthesis of enantiomerically specific labelled d,l-mandelic acid, d,l-methyl mandelate, and d,l-mandelamide is reported. These double labelled racemates enable the rapid and very sensitive determination of chromatographic resolution. The resolution is determined by liquid scintillation counting of ³H and ¹⁴C.

Als Adsorbentien zur chromatographischen Auftrennung von Racematen sind bisher vor allem die leicht zugänglichen Naturstoffe Cellulose und Stärke sowie deren Derivate wie Cellulose-2¹/₂-acetat untersucht worden. An diesen Naturstoffen erreicht man jedoch in den meisten Fällen nur geringfügige Anreicherungen von Antipoden²⁾. Bessere Trennleistungen sollten von synthetischen Adsorbentien, deren funktionelle Gruppen dem aufzutrennenden Racemat angepaßt werden könnten, zu erwarten sein. Für die systematische Untersuchung der Leistungsfähigkeit solcher Adsorbentien fehlte es aber bislang an einer Bestimmungsmethode, die Genauigkeit mit geringem stofflichen Aufwand an Adsorbens verbindet. Die übliche Methode zur Bestimmung der Trennleistung durch Messung der optischen Drehung bedarf zumeist größerer Substanzmengen sowie langer Säulen, also auch größerer Mengen des jeweiligen Adsorbens. Außerdem werden etwaige optisch aktive Verunreinigungen wie Abbauprodukte der optisch aktiven Adsorbentien bei der Drehwertmessung mitbestimmt, so das Ergebnis oft verfälschend, zumindest aber besondere Blindmessung erfordernd.

Diese Nachteile sind durch Verwendung doppelmarkierter Racemate vermeidbar. Jeweils ein Antipode des Racemats wird mit ³H, der andere mit ¹⁴C markiert. Verändert sich das Antipodenverhältnis bei der Chromatographie am optisch aktiven

¹⁾ I. Mitteil.: G. Blaschke, *Angew. Chem.* **83**, 547 (1971); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **10**, 520 (1971).

²⁾ Literatur dazu siehe: G. Blaschke, *Chem. Ber.* **107**, 237 (1973), nachstehend.

Adsorbens, so verschiebt sich damit das ursprüngliche $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis, wobei die ^3H - und ^{14}C -Zählraten der einzelnen Fraktionen scintillations-spektroskopisch auf einfache Weise bestimmt werden können.

Enantiomerenspezifisch doppelmarkierte Mandelsäure und deren Derivate

Racemische [*Carboxy*- ^{14}C]Mandelsäure stellte man aus Benzaldehyd und [^{14}C]-Kaliumcyanid, racemische [^3H]Mandelsäure durch Platin-katalysierten Austausch zwischen racemischer Mandelsäure und $^3\text{H}_2\text{O}$ her. Beide Racemate kristallisierte man nach säulenchromatographischer Reinigung als Methylester bis zur konstanten spezifischen Aktivität um, trennte durch fraktionierte Kristallisation der Ephedrisalze in die Antipoden auf und vermischte gleiche Mengen der Antipoden, deren radiochemische und optische Reinheit durch Isotopenverdünnungsanalysen bestimmt worden war, zu den Racematen (*R*)-[^3H]/(*S*)-[*Carboxy*- ^{14}C]Mandelsäure und (*R*)-[*Carboxy*- ^{14}C]/(*S*)-[^3H]Mandelsäure. Aus diesen doppelmarkierten Racemformen können leicht Derivate hergestellt werden. So erhielt man mit Diazomethan enantiomerenspezifisch doppelmarkierten Mandelsäure-methylester, daraus mit Ammoniak doppelmarkiertes Mandelsäureamid. Ähnlich könnte man nach bekannten Verfahren die Hydroxygruppe der Mandelsäure und ihrer Derivate alkylieren und acylieren.

Auswertung der Radioaktivitätsmessungen

Die zum Chromatographieversuch verwendete Racemform sei (*R*)-[^3H]/(*S*)-[^{14}C]-markiert. Sie besitzt eine ^3H -Zählrate von a_R cpm/mg und eine ^{14}C -Zählrate von a_S cpm/mg. In einer Fraktion des Eluats werde die ^3H -Zählrate z_R (cpm) und die ^{14}C -Zählrate z_S (cpm) gemessen. Diese Fraktion ist aus x_R Prozent des *R*-Antipoden und x_S Prozent des *S*-Antipoden zusammengesetzt. Das in dieser Fraktion vorliegende Antipodenverhältnis wird nach Gl. (1), der Prozentgehalt an *R*- bzw. *S*-Antipoden nach Gl. (2) und (3) und die Gewichtsmenge an *R*- bzw. *S*-Antipoden nach Gl. (4) und (5) berechnet.

$$\frac{x_R}{x_S} = \frac{a_S \cdot z_R}{a_R \cdot z_S} \quad (1)$$

$$x_R = \frac{100}{\frac{a_R \cdot z_S}{a_S \cdot z_R} + 1} \quad (2)$$

$$x_S = 100 - x_R \quad (3)$$

$$\text{Gewichtsmenge } R\text{-Antipode (mg)} = \frac{z_R}{2 a_R} \quad (4)$$

$$\text{Gewichtsmenge } S\text{-Antipode (mg)} = \frac{z_S}{2 a_S} \quad (5)$$

Diese für (*R*)-[^3H]/(*S*)-[^{14}C]-markierte Racemformen geltenden Gleichungen werden für (*R*)-[^{14}C]/(*S*)-[^3H]-markierte Racemformen entsprechend abgeleitet.

Herrn Prof. Dr. O.-E. Schultz danke ich für die Förderung dieser Arbeit, der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für Sach- und Personalmittel.

Experimenteller Teil

Radioaktivitätsmessungen: Die zu untersuchende Fraktion des Eluats wurde i. Vak. eingedampft, der Rückstand in 5.0 ml Dioxan-Scintillatorlösung (7.0 g/Liter PPO, 0.3 g/Liter Dimethyl-POPOP und 100.0 g/Liter Naphthalin in 1 Liter reinstem Dioxan) gelöst und im Scintillationsspektrometer Mod. 3375 der Fa. Packard gemessen. Für die Messung von ^3H wurde eine Verstärkung von 50% und eine Kanalbreite von 50–1000, für die Messung von ^{14}C die Verstärkung 7% und Kanalbreite 230–1000 gewählt. Durch diese Einstellung werden im ^{14}C -Meßkanal ausschließlich ^{14}C -Impulse gezählt, wobei der niederenergetische Anteil der ^{14}C -Strahlung auch im ^3H -Meßkanal mit gemessen wird. Dieser Anteil, durch Eichmessungen bestimmt, betrug 60% der ^{14}C -Zählrate und wurde bei der Auswertung von der gemessenen ^3H -Impulsrate subtrahiert. Da man sämtliche Radioaktivitätsmessungen unter gleichen Bedingungen durchführte, konnten für die Isotopenaktivitäten die Impulsraten abzüglich der Nullrate eingesetzt werden. Die Konstanz der Meßbedingungen wurde durch das Zählratenverhältnis des externen Standards sowie durch Eichmessungen mit ^3H - bzw. ^{14}C -Hexadecan als internem Standard regelmäßig kontrolliert. Quencheffekte von Meßproben waren wegen der sehr geringen Menge zu messender Substanz nicht festzustellen. Die Standardabweichung der Messungen lag bei höchstens $\pm 2\%$.

(R,S)-[Carboxy- ^{14}C]Mandelsäure: Die Suspension des aus 2.12 g (20.0 mmol) reinstem Benzaldehyd hergestellten Hydrogensulfid-Additionsprodukts³⁾ in 1.0 ml Wasser wurde bei 0°C mit 2 mCi [^{14}C]Kaliumcyanid (ca. 2 mg, spez. Aktivität 30–50 mCi/mmol, Radiochemical Centre, Amersham) vermischt. Anschließend fügte man eine gesättigte wäßrige Lösung von 1.50 g (23.0 mmol) nicht radioaktiven Kaliumcyanids zu, wobei die Kristalle in Lösung gingen und das Benzaldehyd-cyanhydrin ausfiel, das durch 5maliges Ausschütteln mit je 2 ml Benzol extrahiert wurde. Den vereinigten Benzolphasen fügte man 20 ml konz. Salzsäure zu, dampfte nach 12 h i. Vak. zur Trockne ein, löste den hellbraunen kristallinen Rückstand in 10 ml Wasser, kochte mit 0.1 g Aktivkohle auf und fällte die Mandelsäure als Cadmiumsalz⁴⁾, das abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und mit konz. Salzsäure zerlegt wurde⁴⁾. Die farblose, kristalline Mandelsäure verrieb man mit Seesand und extrahierte erschöpfend im Soxhlet mit Benzol. Aus der klaren Benzollösung kristallisierten beim Erkalten 1.02 g farblose Nadeln vom Schmp. und Misch-Schmp. 119°C mit der spez. Aktivität 1.41 mCi/g aus. Die spez. Aktivität blieb auch nach mehrfacher Umkristallisation einer Probe aus Benzol konstant. Das IR-Spektrum in KBr stimmte mit dem Spektrum racem. Mandelsäure überein.

(R,S)-[u - ^3H]Mandelsäure: Die Mischung von 2 Ci Tritiumwasser (0.4 ml, spez. Aktivität 5 Ci/ml, Radiochemical Centre, Amersham) und 0.5 ml wasserfreiem Dioxan wurde in einer Hochvakuumapparatur durch zweimalige Destillation über jeweils 0.1 g Aktivkohle in ein mit Trockeneis/Aceton gekühltes Auffanggefäß von Katalysatorgiften gereinigt. In dieser Lösung suspendierte man die Mischung von 60 mg vorhydriertem Platindioxid und 152 mg (1.00 mmol) racem. Mandelsäure, erhitze unter Rühren in einer abgeschmolzenen, evakuierten Glasampulle 24 h auf 100°C und destillierte das Lösungsmittel i. Vak. in eine Kühlfalle ab. Den Rückstand extrahierte man portionsweise mit insgesamt 50 ml Methanol, dampfte das Methanol i. Vak. ab und reinigte den farblosen, kristallinen Rückstand wie im vorstehend beschriebenen Versuch über das Cadmiumsalz. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Benzol erhielt man 137 mg farblose Nadeln vom Schmp. und Misch-Schmp. 119°C. Das IR-Spektrum in KBr stimmte mit dem Spektrum racem. Mandelsäure überein.

³⁾ C. J. Collins, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 5517 (1955).

⁴⁾ O. K. Neville, J. Amer. Chem. Soc. **70**, 3499 (1948).

Die spezif. Aktivität von 82 mCi/g blieb auch nach mehrfacher Umkristallisation einer Probe konstant. Das handelsübliche Tritiumwasser hatte Verunreinigungen enthalten, welche zunächst den Pt-katalysierten Tritiumaustausch stark verzögerten. — Versuche zum basisch katalysierten Tritiumaustausch des Methin-Protons von Mandelsäure mit Tritiumwasser/Triäthylamin ergaben Produkte mit wesentlich geringerer spez. Aktivität.

Reinigung markierter Mandelsäuren: Radioaktive Verunreinigungen in den markierten Präparaten, die durch Fällung als Cadmiumsalz und Umkristallisation nicht entfernt worden waren, trennte man durch Chromatographie der Methylester ab. Mandelsäure selbst war zur chromatographischen Reinigung nicht geeignet, da sie vom Kieselgel zu stark adsorbiert wurde.

Zum Beispiel wurde die äther. Lösung von 200 mg (*R,S*)-[Carboxy-¹⁴C]Mandelsäure mit überschüss. Diazomethan verestert und an einer 40 cm langen Chromatographiesäule von 80 g Kieselgel H mit Benzol chromatographiert. Man fing Fraktionen von je 10 ml auf und bestimmte scintillations-spektroskopisch die Radioaktivität:

Frakt. Nr.:	20	25	30	35	40	45	50	55	60
ml Gesamteluat:	200	250	300	350	400	450	500	550	600
Aktivität (Mikrocurie)	0.0	0.1	0.4	0.2	0.1	0.1	5.3	11.7	10.0
Frakt. Nr.:	65	70	75	80	85				
ml Gesamteluat:	650	700	750	800	850				
Aktivität:	10.1	6.9	5.2	0.9	0.2				

Die Fraktionen 50–75 wurden vereinigt und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Den farblosen, kristallinen Rückstand des Mandelsäure-methylesters verseifte man durch 5stdg. Erhitzen in der Mischung von 20 ml Dioxan und 5 ml 3 N NaOH, engte die Lösung i. Vak. ein, säuerte mit konz. Salzsäure an und extrahierte die Mandelsäure erschöpfend mit Äther. Man erhielt nach Umkristallisation aus Benzol 167 mg farblose Kristalle der spez. Aktivität von 1.44 mCi/g. Entsprechend reinigte man die ³H-markierte Mandelsäure und erhielt ein Präparat mit der spez. Aktivität von 86.9 mCi/g. Vor der Verseifung hatte man die chemische Reinheit beider Ester geprüft: Die spez. Aktivitäten blieben sowohl nach erneuter Chromatographie als auch nach Umkristallisation jeweils konstant.

(R)-[³H]Mandelsäure und (R)-[Carboxy-¹⁴C]Mandelsäure: Aus der heiß gesättigten Lösung von 100 mg (8.69 mCi) (*R,S*)-[³H]Mandelsäure, 165 mg nicht radioaktiver (*R*)-Mandelsäure und 250 mg (*1R,2S*)-Ephedrin in Äthanol kristallisierten beim Erkalten weiße Nadeln des (*1R,2S*)-Ephedrin-(*R*)-mandelats⁵⁾ aus, die 4 mal bis zur optischen Reinheit aus Äthanol umkristallisiert wurden. Das Salz (268 mg) löste man in einer Mischung von 10 ml Äthanol und 90 ml Wasser, filtrierte über eine Ionenaustauschersäule (Polystyrolsulfonat, H⁺-Form), wusch mit Wasser nach und erhielt als Abdampfrückstand 105 mg farblose, kristallisierte (*R*)-Mandelsäure der spez. ³H-Aktivität von 20.2 mCi/g.

Entsprechend wurden aus der Mischung von 150 mg (0.22 mCi) (*R,S*)-[Carboxy-¹⁴C]-Mandelsäure, 32 mg nicht radioaktiver (*R*)-Mandelsäure und 200 mg (*1R,2S*)-Ephedrin 43 mg optisch reine (*R*)-Mandelsäure der spez. ¹⁴C-Aktivität von 1.0 mCi/g erhalten.

(S)-[³H]Mandelsäure und (S)-[Carboxy-¹⁴C]Mandelsäure: Die nach Kristallisation der radioaktiven (*1R,2S*)-Ephedrin-(*R*)-mandelate erhaltenen Mutterlaugen wurden in der Hitze mit jeweils ca. 150 mg nicht radioaktivem (*1R,2S*)-Ephedrin-(*R*)-mandelat gesättigt,

⁵⁾ R. F. Manske und T. B. Johnson, J. Amer. Chem. Soc. 51, 1906 (1929).

das beim Erkalten auskristallisierte und damit noch vorhandene radioaktive (*R*)-Mandelsäure aus den Lösungen abreicherte. Die Filtrate verdünnte man mit Wasser, filtrierte über Polystyrolsulfonat und dampfte die vorwiegend markierte (*S*)-Mandelsäure enthaltenden Eluate i. Vak. zur Trockne ein. Die ^3H -markierte Verbindung vermischte man mit 165 mg nicht radioaktiver (*S*)-Mandelsäure und 250 mg (1*S*,2*R*)-Ephedrin, die ^{14}C -markierte Verbindung mit 32 mg nicht radioaktiver (*S*)-Mandelsäure und 200 mg (1*S*,2*R*)-Ephedrin, kristallisierte die erhaltenen Ephedrinsalze jeweils 4mal aus Äthanol um und erhielt nach Filtration über Polystyrolsulfonat 91 mg (18.2 mCi/g) ^3H - bzw. 30 mg (1.0 mCi/g) ^{14}C -markierte, optisch reine (*S*)-Mandelsäure.

Prüfung der markierten (R)- bzw. (S)-Mandelsäuren auf optische Reinheit: Eine Probe (*R*)-[$u\text{-}^3\text{H}$]Mandelsäure (ca. 0.1 mg) vermischte man mit 206 mg nicht radioaktivem (1*S*,2*R*)-Ephedrin-(*S*)-mandelat, kristallisierte mehrmals aus Äthanol um und bestimmte die spez. Aktivität an einer Probe des jeweiligen Kristallisats:

Ausgangsaktivität:	142000 cpm/mg
Kristalle nach 1. Umkristallisation:	25000 cpm/mg
Kristalle nach 2. Umkristallisation:	4900 cpm/mg
Kristalle nach 3. Umkristallisation:	2450 cpm/mg

Der nach der umgekehrten Isotopenverdünnungsanalyse⁶⁾ bestimmte Anteil an ursprünglich enthaltener (*S*)-[$u\text{-}^3\text{H}$]Mandelsäure liegt somit unter 1.7%. Entsprechende Werte für den Antipodengehalt wurden auch bei (*R*)-[*Carboxy*- ^{14}C]Mandelsäure sowie bei den auf *R*-Antipoden untersuchten (*S*)-Mandelsäureproben ermittelt, wobei die markierten (*S*)-Mandelsäuren mit nicht radioaktivem (1*R*,2*S*)-Ephedrin-(*R*)-mandelat umkristallisiert wurden.

*Racem. (R)-[$u\text{-}^3\text{H}$]/(S)-[*Carboxy*- ^{14}C]Mandelsäure:* Die Lösung von 53.1 mg (*R*)-[$u\text{-}^3\text{H}$]Mandelsäure, 30.0 mg (*S*)-[*Carboxy*- ^{14}C]Mandelsäure und 23.1 mg nicht radioaktiver (*S*)-Mandelsäure in Methanol wurde zur Trockne eingedampft. Scintillationsspektroskopisch wurden im ^3H -Meßkanal $6.95 \cdot 10^6$, im ^{14}C -Meßkanal $0.339 \cdot 10^6$ cpm/mg registriert.

Entsprechend wurde auch das zweite Racemat mit ^3H -markiertem *S*- und ^{14}C -markiertem *R*-Antipoden erhalten.

*Racem. (R)-[$u\text{-}^3\text{H}$]/(S)-[*Carbonyl*- ^{14}C]Mandelsäure-methylester:* Aus 20.2 mg (*R*)-[$u\text{-}^3\text{H}$]/(*S*)-[*Carboxy*- ^{14}C]Mandelsäure erhielt man nach Veresterung mit Diazomethan, säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel H mit Benzol als Fließmittel und Sublimation i. Hochvak. 15.8 mg (73%) des doppelmarkierten Racemats vom Schmp. und Misch-Schmp. 58°C.

*Racem. (R)-[$u\text{-}^3\text{H}$]/(S)-[*Carbonyl*- ^{14}C]Mandelsäureamid:* Die Lösung von 15.0 mg des vorstehend beschriebenen Mandelsäure-methylesters in 0.2 ml Methanol wurde mit 2 ml flüss. Ammoniak vermischt und 24 h bei -40°C aufbewahrt. Der farblose, kristalline Abdampfrückstand wurde durch Chromatographie an Kieselgel H mit dem Fließmittel Benzol/Äthanol (95:5) gereinigt und aus Benzol/Petroläther umkristallisiert. Man erhielt 11.3 mg (83%) des doppelmarkierten Amids vom Schmp. und Misch-Schmp. 133–134°C.

⁶⁾ *H.-R. Schütte*, Radioaktive Isotope in der Organischen Chemie und Biochemie, S. 142 ff., Verlag Chemie Weinheim 1966.