

Chromatographische Racemattrennungen, X¹⁾

Racemattrennung des Thalidomids und anderer Glutarimid-Derivate

Gottfried Blaschke*, Horst-Peter Kraft und Hildegunde Markgraf

Pharmazeutisches Institut der Universität Bonn,
An der Immenburg 4, D-5300 Bonn 1

Eingegangen am 10. Dezember 1979

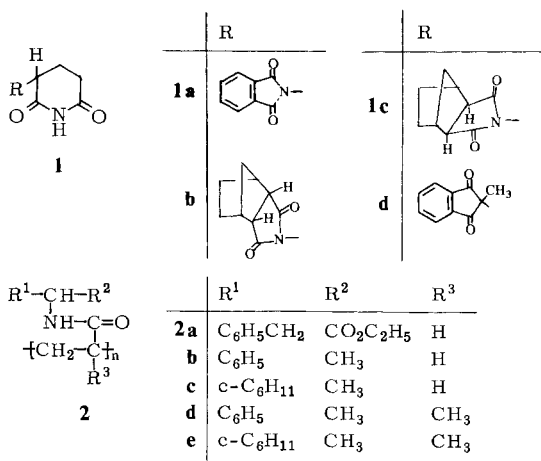
Chromatographic Resolutions of Racemates, X¹⁾

Optical Resolution of Thalidomide and Other Glutarimide Derivatives

Racem. thalidomide (**1a**) is resolved completely by chromatography on the chiral polyamide **2e** in an analytical as well as preparative scale. The glutarimides **1b–d** are partially resolved. Both enantiomers of **1b** and one enantiomer of **1d** were isolated by recycling chromatography.

Die chromatographische Racemattrennung an optisch aktiven Polyamiden ist besonders für Verbindungen geeignet, die mit konventionellen Methoden nicht oder nur schwierig in optisch aktiver Form zu erhalten sind^{1–3)}. Ein Chromatographieversuch an Polyamiden ist dann besonders erfolgversprechend, wenn das Racemat in der Nähe des Chiralitätszentrums Amid- oder Imidgruppen besitzt. Diese bilden vermutlich mit den Amidgruppen des optisch aktiven Adsorbens Wasserstoffbrücken aus, wodurch die Enantiomeren in asymmetrische Hohlräume des Adsorbens hineingezogen werden. Die unterschiedliche Einpassung in diese Hohlräume führt dann zur Trennung.

Nachfolgend berichten wir über die chromatographische Racemattrennung der α -substituierten Glutarimide **1a–d**, welche das oben genannte Kriterium besitzen.



Thalidomid (1a): Die Enantiomeren des früher als Schlafmittel (Contergan®) verwendeten Thalidomids (**1a**) sind bekannt⁴⁾. Ihre Darstellung aus optisch aktivem Isoglutamin durch stereoselektive Synthese ist jedoch kostspielig und kompliziert. Dagegen erhält man die Enantiomeren einfach durch Chromatographie am optisch aktiven Polyamid **2e** (Abb.). Der Trennfaktor α beträgt 2.0, die wegen unsymmetrischer Elutionsbande des stärker adsorbierten Enantiomeren nicht genau zu definierende Auflösung R_S etwa 1.6. Erwärmt man die Säule nach Elution von (+)-Thalidomid, so wird auch die (-)-Form als nahezu symmetrische Elutionsbande eluiert (gestrichelte Linie in der Abb.).

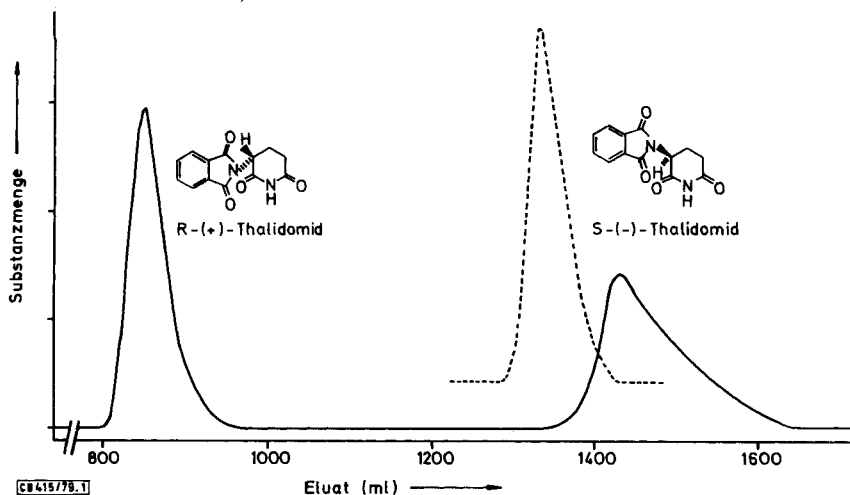


Abb.: Chromatographie von 51.5 mg *racem.* Thalidomid (**1a**) an 65 g **2e**. Schichthöhe 80 cm, Fließmittel Benzol/Dioxan (4:1). --- Elutionskurve des (-)-Enantiomeren nach Chromatographie von 52.9 mg Racemat und Temperaturerhöhung nach 1260 ml Eluat auf 50°C

Das Adsorbens **2e** ist ungewöhnlich hoch belastbar. Selbst 500 mg Racemat **1a** werden an 65 g des Polyamids (Gewichtsverhältnis 1:130) bei einem thalidomidfreien Zwischenvolumen von 120 ml vollständig getrennt. Noch höhere Belastung führt zu weiterer Verbreiterung der Elutionskurven und damit zu Mischfraktionen. Wie bei anderen Chromatographieversuchen an optisch aktiven Polyamiden wird die aufgetragene Substanz vollständig zurückerhalten. Die gleiche Säulenfüllung ist ohne Änderung ihrer Trennleistung beliebig oft verwendbar. So konnten durch Wiederholung des Chromatographieversuchs beide Enantiomere des Thalidomids im Grammmaßstab isoliert werden. Diese sind tierexperimentell auf ihre teratogene Wirkung untersucht worden⁵⁾: Während (-)-Thalidomid im Vergleich zum Racemat stärker teratogen wirkt, ist die (+)-Form selbst bei höchster Dosierung nicht teratogen.

Durch Chromatographie war auch die optische Reinheit optisch aktiver Thalidomidproben, die früher durch asymmetrische Synthese hergestellt worden waren, mit kleinen Substanzmengen genau zu bestimmen.

Die Fließmittelkomponente Benzol ist bei diesen Versuchen ohne Auswirkung auf das Trennergebnis durch Toluol zu ersetzen. Außerdem ist die Fließgeschwindigkeit durch Erhöhung des Drucks auf 2.5 bar zu steigern, um die Trennzeit abzukürzen. Weitere Erhöhung des Drucks verlangsamt die Fließgeschwindigkeit, da die Säule reversibel komprimiert wird.

Am Polyacrylamid **2a**, welches chirale Arzneistoffe wie Chlortalidon und Oxazepam vollständig trennt¹⁾, wird Thalidomid ebenso wie an den Polyacrylamiden **2b**–**c** praktisch nicht, am Polymethacrylamid **2d** unvollständig zerlegt.

Von *Biglumid* (**1b**)⁶, ein von *Koch* und *Kotlan*⁷ entwickeltes Mittel mit sedativ-hypnotischen Eigenschaften, das zur Therapie der Lepra verwendet wird, sind die reinen Enantiomeren bisher nicht bekannt. Bei der Chromatographie des Racemats an **2e** beobachtet man keine vollständige Trennung. Gleiche Beträge der spezifischen Drehung in Anfangs- und Endfraktionen sind aber ein Hinweis auf reine Enantiomere in diesen Fraktionen.

Zur präparativen Isolierung chromatographierte man nacheinander jeweils das Racemat an **2e**, faßte die rechtsdrehenden Anfangs- und die linksdrehenden Endfraktionen zusammen und trennte diese an der gleichen Säule weiter auf. Man pumpte dazu das Eluat unter Kontrolle des Trennerfolgs durch kontinuierliche Messung des Drehwerts und der Konzentration wieder im Kreislauf über die Säule. Nach drei Durchläufen zeigte eine Basislinientrennung der Polarimeter- und Refraktometersignale die vollständige Abtrennung des zuvor angereicherten Enantiomeren von der Restmenge des anderen Enantiomeren an. Die jeweilige Hauptfraktion wurde gesammelt und war nach Umkristallisieren analysenrein. Der spezifische Drehwert stimmte dann mit den Absolutwerten aus Anfangs- und Endfraktionen der Einfachtrennung überein. Die optische Reinheit dieser Proben wurde zusätzlich durch erneute Chromatographie an der gleichen Säule bewiesen, wobei man jeweils nur ein symmetrisches Elutionsdiagramm beim Retentionsvolumen des betreffenden Enantiomeren erhielt.

Optisch aktives *Biglumid* racemisiert bereits in schwach alkalischer Lösung. Bei pH 7.4 beträgt die Halbwertszeit der Racemisierung etwa 15 Minuten.

*Glutarimidderivat 1c*⁷): Das Elutionsdiagramm dieser *exo*-Form stimmt mit dem unter gleichen Bedingungen erhaltenen Diagramm der *endo*-Form **1b** fast überein. Die räumliche Anordnung des Bicyclus (*endo/exo*) beeinflusst damit nicht die Trennung. Auch bei diesem Versuch weisen gleiche Beträge der spezifischen Drehung in Anfangs- und Endfraktionen auf deren optische Reinheit hin. Auf eine präparative Isolierung der Enantiomeren wurde verzichtet, da *racem. 1c* schwer zugänglich ist und eine Anwendung als Arzneistoff nicht beabsichtigt wird.

Das *Glutarimidderivat 1d* ist ein Kohlenstoffanalog des *Thalidomids*⁸). Ein zumindest stark angereichertes Enantiomer dieses bisher nicht getrennten Racemats wurde für Bindungsmessungen an DNA benötigt⁹). Für die Trennung stand nur eine kleine Substanzmenge zur Verfügung.

Im Vergleich zu den Versuchen mit den Racematen **1a** – **c** wurde **1d** bei unvollständiger Trennung an **2e** rasch eluiert. Während einer Recycling-Chromatographie hätten die linksdrehenden Anfangsfraktionen die stärker gebundene (+)-Form überholt und sich mit dieser wieder vermischt. Man führte daher die vereinigten linksdrehenden Anfangsfraktionen einer Einfachtrennung im Kreislauf über die Chromatographiesäule. Dann entnahm man bei jedem Durchlauf die ersten Anteile des schnellaufenden (–)-Enantiomeren, vereinigte diese Anteile und kristallisierte die erhaltene Substanz um. Ihr spezifischer Drehwert stimmte mit den Absolutwerten von Anfangs- und Endfraktionen der Einfachtrennung überein. Wegen der geringen Substanzmenge wurde die optische Reinheit aber nicht weiter geprüft.

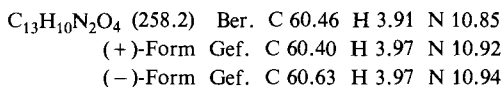
Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Ministerium für Jugend, Familie und Gesundheit danken wir für Sachmittel.

Experimenteller Teil

Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid (1a): Die Suspension von 65.0 g Poly[(*S*)-*N*-(1-cyclohexylethyl)methacrylamid], vernetzt mit 1,2-Ethandiol-dimethacrylat (**2e**)^{10,11}) in Benzol/Dioxan (4: 1) ergab in einer thermostatisierten Glassäule des inneren Durchmessers 2.3 cm eine Schichthöhe von 80 cm. Man trug die Lösung von 51.5 mg *racem. 1a* in 15 ml Benzol/Dioxan (4: 1) auf und eluierte bei Raumtemp. unter Normaldruck mit dem gleichen Fließmittel und 18 ml/h. Das Eluat wurde durch die 10-cm-Küvette eines Polarimeters (Perkin-Elmer

Typ 241 mit Gebereinheit für Kompensationsschreiber) geleitet und fraktioniert aufgefangen. Die in der Abb. durchgehend gezeichnete Elutionskurve wurde aus den kontinuierlich registrierten Drehwerten konstruiert. Bei der Wiederholung des Versuchs an der gleichen Säule mit 52.9 mg **1a** in 3 ml Dioxan erhöhte man die Säulentemperatur nach Elution von (+)-**1a** auf 50°C, wobei die gestrichelt gezeichnete Elutionskurve von (-)-Thalidomid in der Abb. erhalten wurde.

Zur präparativen Trennung füllte man 65 g Adsorbens in eine Säule des inneren Durchmessers 2.5 cm (Schichthöhe 62 cm, Fließgeschwindigkeit bei Normaldruck 24 ml/h), trug die Lösung von 504.6 mg *racem.* **1a** in 10 ml warmen Dioxan auf und eluierte bei Raumtemp. mit Benzol/Dioxan (4:1), wobei nach einem Vorlauf von 560 ml (+)-**1a** (220 ml Eluat) und nach einem substanzfreien Elutionsvolumen von 120 ml (-)-**1a** (520 ml Eluat) erhalten wurde. Die nach Abdampfen der beiden Fraktionen als Dioxan-Solvat praktisch vollständig zurückgewonnenen Enantiomeren (99.8% nach spektralphotometrischer Gehaltsbestimmung bei 292.5 nm) wurden aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt, wobei man 210.3 mg (83%) (+)-**1a** sowie 202.0 mg (80%) (-)-**1a**, Schmp. jeweils 271°C, $[\alpha]_{589}^{22} = 63.3/ -63.0$ (2proz. in Dimethylformamid) (Lit.⁴) 64.0/ -64.6° erhielt.



Zur Prüfung der optischen Reinheit synthetisch erhaltener Proben (Fa. Grünenthal) chromatographierte man 150.3 bzw. 157.0 mg der rechtsdrehenden (Probe E 511) bzw. linksdrehenden (Probe E 411) Substanz unter gleichen Bedingungen und bestimmte den Gehalt beider Enantiomeren spektralphotometrisch. Aus den Extinktionswerten berechnete man die optische Reinheit von 95.2% (E 511) bzw. 84.0% (E 411).

Bei der Chromatographie von jeweils ca. 300 mg *racem.* **1a** an den vernetzten Adsorbentien Poly[(S)-N-acryloylphenylalanin-ethylester] (**2a**)², Poly[(S)-N-(1-phenylethyl)acrylamid] (**2b**)², Poly[(S)-N-(1-cyclohexylethyl)acrylamid] (**2c**)^{10,11} und Poly[(S)-N-(1-phenylethyl)methacrylamid] (**2d**)² erzielte man optische Ausbeuten von 3.8, 7.2, 1.5 bzw. 42%, wobei jeweils (-)-**1a** stärker gebunden wurde.

Bei einer Wiederholung der Chromatographie von 65 mg *racem.* **1a** an 65 g **2e** in einer beiderseits mit Teflonfritten versehenen Säule ($\emptyset \times$ Höhe 2.4 \times 62 cm) mit dem Fließmittel Toluol/Dioxan (4:1) bei einem Fließmitteldruck von 2.5 bar (Membranpumpe Duromat) resultierte eine Fließgeschwindigkeit von 40 ml/h. Nach Umfällen der vollständig getrennten Enantiomeren aus Dimethylformamid/Wasser erhielt man 23 mg (81%) (+)-**1a** sowie 21 mg (74%) (-)-**1a** mit Schmp. 271°C, $[\alpha]_{589}^{21} = 63.1/ -63.6$ ° (Dimethylformamid).

(+)- und (-)-3-(3,5-Dioxo-4-aza-endo-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-4-yl)-2,6-piperidindion (*Biglumid*) (**1b**): Chromatographie von 302.8 sowie in einem darauffolgenden Versuch von 313.1 mg *racem.* **1b**^{7,12} an 65 g **2e** (Säule 2.4 \times 62 cm) bei 2.0 bar mit Toluol/Dioxan (1:1) lieferte jeweils eine Anfangs- bzw. Endfraktion mit $[\alpha]_{365}$ von ca. 116 und -116° (Dimethylformamid). Aus beiden Versuchen vereinigte man die Anfangsfraktionen mit $[\alpha]_{365}$ über 85° sowie die Endfraktionen mit $[\alpha]_{365}$ unter -85° (140 sowie 200 mg) und chromatographierte diese an der gleichen Säule, wobei das Eluat jeweils im Kreislauf durch die Säule gepumpt wurde (Recycling-Chromatographie). Nach dem dritten Kreislauf war jeweils die Hauptbande von dem kleineren Peak der optisch aktiven Verunreinigung vollständig abgetrennt (Kontrolle durch Polarimeter- und Differentialrefraktometer-Signal des Eluats). Man fing das Eluat der Hauptbande auf und kristallisierte den Abdampfdruckstand jeweils zweimal aus Ethanol um, wonach 86.3 mg (+)- sowie 179.5 mg (-)-**1b** mit $[\alpha]_{365}^{25}$ -Werten von 115.4/ -116.6° und $[\alpha]_{589}^{25}$ -Werten von 30.0/ -29.6°

(0.5proz. in Dimethylformamid), Schmp. 242°C (Zers.), erhielt. Erneute Chromatographie dieser beiden Proben ergab jeweils eine symmetrische Elutionsbande.

$C_{14}H_{16}N_2O_4$ (276.3) Ber. C 60.86 H 5.84 N 10.14

(-)-**1b**: Gef. C 60.83 H 5.89 N 10.16

Racemisierung von (-)-1b: Die $[\alpha]_{436}^{25}$ -Werte einer Lösung von 5.0 mg (-)-**1b** in der Mischung aus 1.0 ml Dioxan und 1.0 ml Phosphatpuffer pH 7.4 wurde über einen Zeitraum von 30 min in Abständen von jeweils 1 min gemessen. Aus der halblogarithmischen Auftragung der Drehwerte gegen die Zeit resultierte eine Gerade, aus deren Steigung die Halbwertszeit der Racemisierung von 15.1 min ermittelt wurde.

Chromatographie von racem. 3-(3,5-Dioxo-4-aza-exo-tricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-4-yl)-2,6-piperidindion („exo-Biglumid“) (**1c**): Nach bekanntem Verfahren wurde *racem. 1c* vom Schmp. 262°C (Lit.⁷⁾ 259–261°C) hergestellt. Das Racemat wurde wie die *endo*-Form **1b** an **2e** chromatographiert, wobei die ersten beiden Fraktionen mit $[\alpha]_{589}$ -Werten von 31.7° (2.4 mg) und 30.2° (18.0 mg) sowie die letzten beiden Fraktionen mit $[\alpha]_{589}$ -Werten von -30.3° (10.5 mg) und -30.0° (2.0 mg) (Drehwerte jeweils in Dimethylformamid) erhalten wurden.

Chromatographie von 3-(2-Methyl-1,3-dioxo-2-indanyl)-2,6-piperidindion (1d): Wie bei den vorstehenden Versuchen chromatographierte man an **2e** 315 mg *racem. 1d*, vereinigte die linksdrehenden Anfangsfraktionen (140 mg) und chromatographierte diese siebenmal im Kreislauf an der gleichen Säule. Bei jedem Durchlauf entnahm man dem Eluat jeweils ca. 10 mg enthaltende Anfangsfraktion („peak-shaving“). Diese wurden vereinigt (66 mg) und zweimal aus Ethanol umkristallisiert, wobei man 40.0 mg (-)-**1d** mit $[\alpha]_{589} = -127^\circ$ (0.25proz. in Dioxan) erhielt. Dieser Wert stimmt dem Betrag nach mit den Werten aus der Anfangsfraktion (-129°) und der Endfraktion (128°) einer Einfachtrennung von 100.0 mg *racem. 1d* annähernd überein.

Literatur

- 1) IX. Mitteil.: G. Blaschke und H. Markgraf, Chem. Ber. **113**, 2031 (1980).
- 2) A.-D. Schwanghart, W. Backmann und G. Blaschke, Chem. Ber. **110**, 778 (1977).
- 3) G. Blaschke, H.-P. Kraft und A.-D. Schwanghart, Chem. Ber. **111**, 2732 (1978).
- 4) Y. F. Shealy, C. E. Opliger und J. A. Montgomery, J. Pharm. Sci. **57**, 757 (1968).
- 5) G. Blaschke, H.-P. Kraft, K. Fickentscher und F. Köhler, Arzneim.-Forsch. **29** (II), 1640 (1979).
- 6) **1b** wird auch als Taglutimid (INN) bezeichnet.
- 7) H. Koch und J. Kotlan, Monatsh. Chem. **97**, 1648 (1966).
- 8) K. Fickentscher, U. Halfmann und F. Köhler, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.), im Druck.
- 9) K. Fickentscher und H.-O. Markgraf, unveröffentlicht.
- 10) G. Blaschke und H.-P. Kraft, Makromol. Chem., Rapid Commun. **1**, 85 (1980).
- 11) G. Blaschke und F. Donow, Chem. Ber. **108**, 2792 (1975).
- 12) Herrn Doz. Dr. Koch, Pharmaz. Inst. Wien, danken wir für eine Probe von *racem. 1b*.

[415/79]