

Fortschritte in der Enantiomerentrennung durch den Einsatz von Membranen

Carlos A. M. Afonso* und João G. Crespo*

Stichwörter:

Chromatographie · Enantiomerentrennung · Enzyme · Membranen

Der Bedarf der pharmazeutischen Industrie an enantiomerenreinen Verbindungen ist eine wichtige Triebkraft für die Entwicklung neuer Strategien zur präparativen Trennung racemischer Gemische.^[1] Chromatographische Verfahren, insbesondere Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (GLC) und Feststoff-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), sind seit langer Zeit die besten Methoden zur analytischen Enantiomerentrennung.^[2] Die Enantiomerentrennung durch Flüssigkeits-Chromatographie hat sich außerdem für viele Substrate auch als eine sehr effiziente präparative Methode erwiesen. Chromatographische Methoden zeichnen sich durch hohe Effizienz und breite Anwendbarkeit aus, haben jedoch den Nachteil, dass sie typischerweise diskontinuierlich sind. Diese Beschränkung wird bei der Simulierten Gegenstrom-Chromatographie (simulated moving bed chromatography, SMB chromatography) umgangen. Diese Methode ermöglicht einen kontinuierlichen Prozess im präparativen Maßstab und kann auch auf die Chromatographie mit überkritischen Flüssigkeiten

(supercritical fluid chromatography, SFC) angewendet werden.^[3] Die SMB-Chromatographie ist sehr nützlich für Trennungen (einschließlich Enantiomerentrennungen) im großen Maßstab, jedoch ist für jedes Substrat eine Optimierung der Trennung notwendig, die komplexe experimentelle und theoretische Untersuchungen verlangt. Eine breite Anwendung dieser Technik wird vor allem durch die hohen Kosten der stationären Phasen beschränkt. Die SMB-Methode wird deshalb hauptsächlich dann zum Abschluss der Herstellung eines reinen Enantiomers eingesetzt, wenn eine einfache Trennung durch Kristallisation nicht praktikabel ist.

Mit der Kapillarelektrophorese,^[4] einschließlich der schnellen Enantiomerentrennung durch Mikrochip-Elektrophorese,^[5] wurde vor einiger Zeit eine sehr leistungsstarke Analysemethode entwickelt. Es wird angenommen, dass die Enantiomerentrennung hierbei auf ähnlichen Wechselwirkungen beruht, wie sie in der Chromatographie zwischen Enantiomer und chiralem Selektor auftreten. Daher sind chirale Selektoren wie Cyclodextrine und Derivate von Aminosäuren in beiden Techniken gleichermaßen effektiv. Der chirale Selektor befindet sich in der Lösung, in der die differentielle Migration der Enantiomere stattfindet. Deshalb können auch andere Selektortypen (Kronenether, lineare Polysaccharide, makrocyclische Antibiotika, Übergangsmetallkomplexe, chirale Tenside und Proteine) zum Einsatz kommen. Die Kapillarelektrophorese wird für die Trennung ionischer racemischer Substrate sicher große Bedeutung erlangen, wenn ihre bemerkenswerte Leistungsfähigkeit für

Enantiomerentrennungen im präparativen Maßstab genutzt werden kann.

Die sehr einfache Enantiomerentrennung durch enantioselektive Extraktion ist vor dreißig Jahren durch Cram und Mitarbeiter beschrieben worden.^[6] Sie setzten chirale Kronenether (in Chloroform) als effiziente Selektoren für die Extraktion racemischer Ammoniumsalze aus wässrigen Lösungen ein. Seitdem sind weitere leistungsfähige chirale Selektoren beschrieben worden, z.B. Organometallkomplexe,^[7] Desoxyguanosin-Derivate,^[8] Borat-Komplexe von 1,2-Diolen,^[9] und steroidale Guanidinium- und Harnstoff-Rezeptoren.^[10] In allen beschriebenen Beispielen ist der chirale Selektor in der organischen Phase gelöst, während sich das racemische Gemisch in der wässrigen Phase befindet. Dies trifft auch auf die von Cram und Mitarbeitern beschriebene „Catalytic Resolving Machine“ (W-tube device)^[11] und die „Multiple Dual-flow Countercurrent Batch Extraction Procedure“^[12] zu. In einer Lösungsmittelumgebung, die weniger polar ist als die wässrige Substratlösung, ist die Bindung des chiralen Selektors zu einem der Enantiomere in Übereinstimmung mit der Dreipunktregel (three-point rule)^[13] deutlicher bevorzugt.

Auf Phasenverteilung beruhende Extraktionen sind aber mit großen Hindernissen für den präparativen und kontinuierlichen Betrieb verbunden, z.B. einer geringen Grenzfläche oder Problemen, die mit der Phasenverteilung und Phasenkoaleszenz zusammenhängen. Diese Hindernisse können durch den Einsatz von Hohlfasermembran-Kontaktoren verringert werden.^[14] Ein Membrankontaktor ist eine Baueinheit mit einer typischen Porengröße zwi-

[*] Prof. C. A. M. Afonso

CQFM
Departamento de Engenharia Química
Instituto Superior Técnico
1049-001 Lissabon (Portugal)
Fax: (+351) 21-841-7122
E-mail: carlosafonso@ist.utl.pt

Prof. J. G. Crespo
REQUIMTE/CQFB
Departamento de Química
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa
Campus da Caparica, 2829-516 Caparica
(Portugal)
Fax: (+351) 21-294-8550
E-mail: jgc@dq.fct.unl.pt

schens 0.2 und 0.05 μm . Mit dem Durchfluss eines Fluids durch die mikroporöse Membran ist ein Gas-Flüssigkeits- oder Flüssigkeits-Flüssigkeits-Massentransport verbunden, ohne dass dabei eine Phase in der anderen Phase dispergiert wird. Mit der Auswahl eines geeigneten Membranmaterials (sowohl hydrophile als auch hydrophobe Membrankontaktoren sind kommerziell erhältlich) und sorgfältiger Kontrolle der Druckdifferenz zwischen den Fluiden wird eines der Fluide in den Poren der Membran festgehalten. Am Ausgang einer jeden Pore befindet sich dadurch eine Fluid-Fluid-Grenzfläche. Gegenüber konventionellen Disperse-Phase-Kontaktoren bietet dieser Ansatz einige bedeutende Vorteile, wie die Vermeidung von Emulsionen und eine überraschend große Grenzfläche. Die spezifische Oberfläche in Membrankontaktoren ist typischerweise 30-mal größer als in Gasabsorbern und 500-mal größer als in Flüssig-flüssig-Extraktionskolonnen.^[14] Eine Überflutung bei hohen oder ein Rückfluss bei niedrigen Flussraten sind nicht möglich, und es besteht keine Notwendigkeit für eine Dichtedifferenz zwischen den Fluiden oder eine Phasentrennung nach ihrem Kontakt.

Für den Einsatz von Flüssigmembransystemen zur Enantiomerentrennung sind verschiedene Ansätze bekannt.^[10,15] Bei einem der gebräuchlichsten Verfahren wird eine Lösung des chiralen Selektors in einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel durch das Innere der Fasern gepumpt. Gleichzeitig zirkuliert die wässrige Lösung, die das racemische Substrat enthält, an der Außenseite des Hohlfasermoduls. Die große Oberfläche der Hohlfasern ermöglicht einen effizienten Massentransport zwischen beiden Phasen. Dieses System kann seriell um einen zweiten Hohlfaserkontaktor erweitert werden, durch dessen Fasern das andere Enantiomer des chiralen Selektors zirkuliert. Weitere Modifikation dieser Methode sind vorgeschlagen worden, so die Verwendung eines Hohlfaserkontaktors. Dieser besteht aus zwei Gruppen von Fasern, in denen unabhängig voneinander zwei Lösungsmittelphasen mit jeweils einem Enantiomer des Selektors zirkulieren (Abbildung 1). Nach der Extraktion kann jedes Enantiomer des Produkts aus der jeweiligen Zielphase

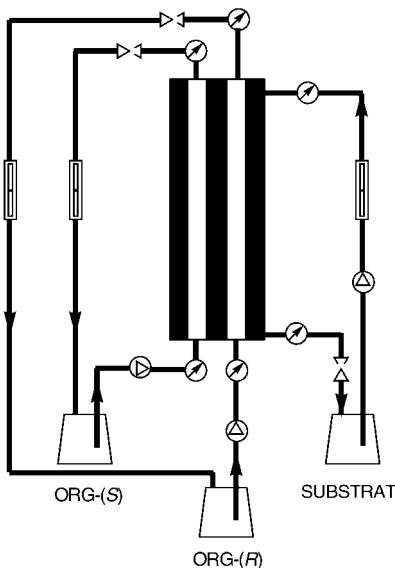


Abbildung 1. Ein System für die Trennung wässriger Mischungen durch simultane Membranextraktion, wobei zwei organische Phasen (ORG) verwendet werden, die den jeweiligen chiralen Selektor (R- bzw. S-Form) enthalten.

durch Reextraktion und/oder Abdestillieren des Lösungsmittels erhalten werden. Die enantiomeren Selektoren werden ebenfalls zurückgewonnen und wieder verwendet; sie werden deshalb nur in katalytischen Mengen benötigt.

Da beide Enantiomere aus der Substratphase abtransportiert werden, wird die verbleibende Mischung im Wesentlichen racemisch bleiben. Für jedes der Enantiomere ist eine gewisse Enantioselektivität gewährleistet, solange eine adäquate thermodynamische Triebkraft für den Transport vorhanden ist. Falls eine bestimmte Selektor-Substrat-Kombination eine zu geringe Enantioselektivität aufweist, können weitere Membraneinheiten hinzugefügt werden (Stacking). Cussler und Mitarbeiter haben ein Hydroxyprolin-Derivat (gebräuchlich in der chiralen Ligandenaustausch-Chromatographie) als chiralen Selektor in einem Hohlfasermodul verwendet.^[16] Da die Selektivitäten geringer als 2.5 waren, wurden beiden Phasen im Gegenstrom geführt, sodass jede einzelne Faser nun als eine Chromatographiesäule geringer Effizienz arbeitete. Durch dieses Vorgehen wurde die Trennleistung gesteigert und eine vollständige Trennung der Enantiomere erzielt.

Obgleich der Transport durch die Flüssigmembranphase hindurch mittels

Diffusion erfolgt, ist wegen der extrem großen spezifischen Oberfläche der Hohlfasern ein ausreichender Massentransport möglich. Die Entwicklung neuer Lösungsmittel (z.B. ionischer Flüssigkeiten) und das Design von Lösungsmittelphasen hat zu Flüssigkontaktoren mit höherer Stabilität und Langzeitleistung geführt. Hohlfasermembranen sind sicherlich für kontinuierliche Trennungen in größerem Maßstab geeignet. Da analog zu chromatographischen Methoden auch hier eine große Zahl aufeinander folgender Phasengleichgewichte erforderlich ist, ist es immer noch problematisch, hoch enantiomerenreine Produkte zu erhalten. Als Lösung sind Verfahren vorgeschlagen worden, die die Flüssigmembran-technologie mit einer Gegenstromfraktionierung kombinieren.^[17]

Es ist erfahrungsgemäß extrem schwierig, enantiospezifische chirale Selektoren zu erhalten, und diese sind, wie erwartet, sehr spezifisch. Kürzlich ist ein interessantes Verfahren vorgeschlagen worden, das dieses Problem umgeht. Dabei kombiniert man eine enantiospezifische enzymatische Veresterung mit einer hochfluorierten Gruppe, bei der ein Enantiomer in einen fluorierten Ester überführt wird, mit einer fluororganischen Extraktion.^[18] Eine ähnliche Methode haben Goto und Mitarbeiter unlängst bei der Enantiomerentrennung von Ibuprofen angewendet.^[19] An der Grenzfläche der Substratlösung mit einer trägergestützten Flüssigmembran (supported liquid membrane, SLM), die eine ionische Flüssigkeit enthält, wird hierbei selektiv (S)-Ibuprofen durch eine enantioselektive Lipase aus *Candida Rugosa* (CRL) in (S)-Ibuprofenmethylester umgewandelt.^[20] Die ionische Flüssigkeit transportiert den hydrophoberen Ibuprofenmethylester selektiv von der wässrigen Substratlösung zur Zielphase. An der Grenzfläche der Zielphase wird das (S)-Ibuprofenmethylester durch Schweinepankreaslipase (PPL) zu (S)-Ibuprofen hydrolysiert. Da (S)-Ibuprofen hydrophiler ist, wird es nicht durch die ionische Flüssigkeit zurücktransportiert (Abbildung 2). Dieses System hat große Bedeutung für den kontinuierlichen Betrieb. Goto und Mitarbeiter legten Batch-Untersuchungen für einen Betrieb über 2.5 Tage vor, die zeigten, dass die verwendete SLM

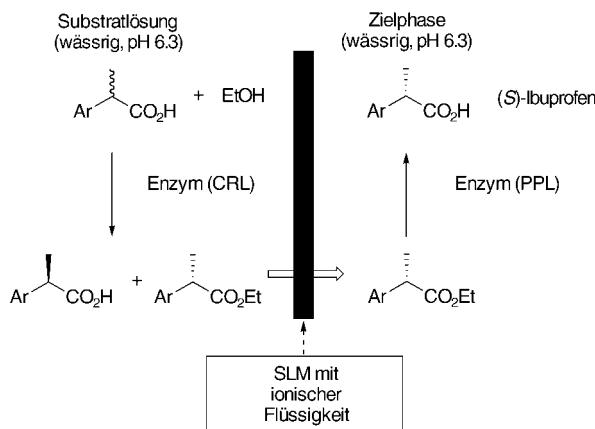


Abbildung 2. Ein System für die Enantiomerentrennung von Ibuprofen nach Goto und Mitarbeitern.^[19] Nacheinander erfolgen eine enantioselektive enzymatische Veresterung (Enzym CRL, links), der selektive Transport durch die trägergestützte Flüssigmembran (SLM) sowie eine enzymatische Hydrolyse (Enzym PPL, rechts).

unter den gewählten Bedingungen stabil ist.

Dass aus Polypeptiden hergestellte, chirale Polyelektrolyt-Multischichten (PEMUs) als Membranen für die analytische Enantiomerentrennung in der Kapillarelektrophorese geeignet sind, wurde kürzlich von Rmaile und Schleöffel gezeigt.^[21] Dabei wurden racemische Ascorbinsäure und DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin) als Modellsubstrate verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit waren sehr interessant: Erstens wurde bestätigt, dass optisch aktive Multischichten Enantiomerentrennungen bewirken. Zweitens wurde die Selektivität für eines der Enantiomere (D-Ascorbinsäure) erhöht, wenn eine Multischicht zum Einsatz kam, die nicht aus einem, sondern aus zwei chiralen Polyelektrolyten bestand. Außerdem wurde beobachtet, dass eine Umkehr der Konfiguration der Polyelektrolyte in der Multischicht zur Inversion der Selektivität (L- statt D-Isomere) führte. Schließlich wiesen PEMU-Membranen einen höheren Fluss als andere untersuchte chirale Membranen auf, was vielversprechend für künftige Anwendungen in präparativen Enantiomerentrennungen ist.

Auf der Membrantechnologie aufbauende Prozesse werden für kontinuierliche Verfahren sicherlich große Bedeutung erlangen, obwohl ihre Stereo-selektivität zumeist noch gering ist. Dieses Problem kann mithilfe von technischen Lösungen gemeistert werden, die

für eine große Zahl von Gleichgewichtszuständen in einer kompakten Anlage sorgen. Wir erwarten, dass andere effiziente Lösungen auf den bemerkenswerten Entwicklungen im Bereich der analytischen Anwendungen aufbauen werden. Entscheidend für eine kontinuierliche Enantiomerentrennung sind erstens die Eigenschaft des chiralen Selektors, mit jedem der Enantiomere sehr unterschiedlich zu wechselwirken, und zweitens die Verbesserung dieses Effekts für

den präparativen und kontinuierlichen Betrieb. Beide Aspekte sind für neue Entwicklungen offen. Die Entdeckung von effizienteren chiralen Selektoren, wie den breit anwendbaren Apoenzymen,^[22] und die Ausarbeitung direkterer Zugänge zu diesen Verbindungen werden das Gebiet gewiss voranbringen.

Online veröffentlicht am 21. September 2004

- [1] a) *Chiral Separation Techniques* (Hrsg.: G. Subramanian), Wiley-VCH, 2001; b) A. M. Rouhi, *Chem. Eng. News* **2003**, 81(18), 45–55.
- [2] T. J. Ward, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4521–4528; T. J. Ward, *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2863–2872.
- [3] a) E. Francotte, T. Leutert, L. La Vecchia, F. Ossola, P. Richert, A. Schmidt, *Chirality* **2002**, 14, 313–317; b) H. A. Zinnen, M. J. Gattuso, US-A 6410794, 2002; c) V. G. Mata, A. E. Rodrigues, *J. Chromatogr. A* **2001**, 939, 23–40; d) M. Schulte, J. Strube, *J. Chromatogr. A* **2001**, 906, 399–416; e) J. Strube, S. Haumreisser, H. Schmidt-Traub, M. Schulte, R. Ditz, *Org. Process Res. Dev.* **1998**, 2, 305–319.
- [4] R. Vespalet, P. Bocek, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 3715–3753.
- [5] a) I. Rodriguez, L. J. Jin, S. F. Y. Li, *Electrophoresis* **2000**, 21, 211–219; b) S. R. Wallenborg, I. S. Lurie, D. W. Arnold, C. G. Bailey, *Electrophoresis* **2000**, 21, 3257–3263.
- [6] E. B. Kyba, K. Koga, L. R. Sousa, M. G. Siegel, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 2692–2693.
- [7] J. Lacour, C. Goujon-Ginglinger, S. Torche-Haldimann, J. J. Jodry, *Angew.*
- [8] V. Andrisano, G. Gottarelli, S. Masiero, E. H. Heijne, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2543–2544; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2386–2388.
- [9] J. A. Riggs, R. K. Litchfield, B. D. Smith, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 1148–1150.
- [10] a) B. Baragaña, A. G. Blackburn, P. Breccia, A. P. Davis, J. de Mendoza, J. M. Padrón-Carrillo, P. Prados, J. Riedner, J. G. de Vries, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 2931–2936; b) L. Siracusa, F. M. Hurley, S. Dresen, L. J. Lawless, M. N. Pérez-Payán, A. P. Davis, *Org. Lett.* **2002**, 4, 4639–4642.
- [11] M. Newcomb, J. L. Toner, R. C. Helgeson, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4941–4947.
- [12] Y. Abe, T. Shoji, S. Fukui, M. Sasamoto, H. Nishizawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, 44, 1521–1524.
- [13] W. H. Pirkle, T. C. Pochapsky, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 347–362.
- [14] a) „Membrane Contactors: Membrane Separations“: J. G. Crespo, I. M. Coelhoso, R. M. C. Viegas in *Encyclopedia of Separation Processes*, Academic Press, **2000**, S. 3303–3311; b) A. Gabelman, S.-T. Hwang, *J. Membr. Sci.* **1999**, 159, 61–106.
- [15] a) T. Oshima, K. Inoue, S. Furusaki, M. Goto, *J. Membr. Sci.* **2003**, 217, 87–97; b) H. M. Krieg, J. Lotter, K. Keizer, J. C. Breytenbach, *J. Membr. Sci.* **2000**, 167, 33–45; c) D. K. Mandal, A. K. Guha, K. K. Sirkar, *J. Membr. Sci.* **1998**, 144, 13–24; d) W. H. Pirkle, W. E. Bowen, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 773–776.
- [16] H. B. Ding, P. W. Carr, E. L. Cussler, *AIChE J.* **1992**, 38, 1493–1498.
- [17] a) J. T. F. Keurentjes, EP 0 663 897 B1, 1997; b) J. T. F. Keurentjes, L. J. W. M. Nabuurs, E. A. Vegter, *J. Membr. Sci.* **1996**, 113, 351–360.
- [18] a) P. Beier, D. O'Hagan, *Chem. Commun.* **2002**, 1680–1681; b) B. Hungerhoff, H. Sonnenschein, F. Theil, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2550–2552; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2492–2494.
- [19] E. Miyako, T. Maruyama, N. Kamiya, M. Goto, *Chem. Commun.* **2003**, 2926.
- [20] L. C. Branco, J. G. Crespo, C. A. M. Afonso, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2895–2897; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2771–2773.
- [21] H. H. Rmaile, J. B. Schleöffel, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6602–6603.
- [22] B. B. Lakshmi, C. R. Martin, *Nature* **1997**, 388, 758–760.