

DERACEMIZACE MLETÍM: VIEDMOVO ZRÁNÍ

JAN HOLAŇ^a, FRANTIŠEK ŠTĚPÁNEK^a
a LUDEK RIDVAN^b

^a Ústav chemického inženýrství, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6,
^b Zentiva k.s., U kabelovny 130/22, 102 00 Praha 10 – Dolní Měcholupy
holanj@vscht.cz

Došlo 8.4.13, přijato 10.6.13.

Klíčová slova: deracemizace, racemát, enantiomer, Viedmovo zrání, Ostwaldovo zrání

Obsah

1. Úvod
2. Druhy krystalických racemických směsí
3. Metody dělení racemátů
 - 3.1. Krystalizační metody
 - 3.2. Chromatografické metody
 - 3.3. Viedmovo zrání
 - 3.4. Průmyslové využití
4. Závěr

1. Úvod

Důležitost separace enantiomerů z racemické směsi v posledních letech výrazně narůstá v souvislosti s rozvojem nových a účinnějších léčiv. Je známo, že enantiomery téže biologicky aktivní látky (Active Pharmaceutical Ingredient – API), mohou mít v chirálním prostředí zcela jiný farmakologický a toxikologický efekt. Asi nejznámějším případem, poukazujícím na závažnost tohoto

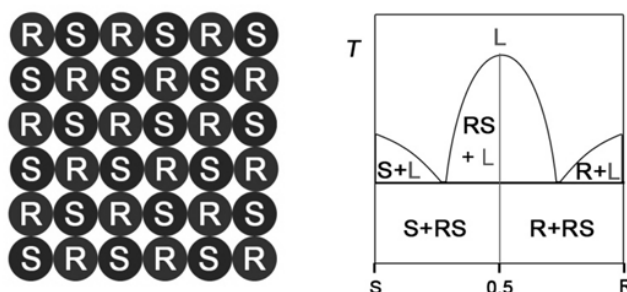
problému, byl účinek léčiva thalidomidu¹. Ten se v 50. letech 20. stol. užíval ke zmírnění ranních nevolností těhotných žen. Pozdějším pozorováním bylo zjištěno, že (*R*)-enantiomer thalidomidu má sedativní účinky a (*S*)-enantiomer účinky teratogenní. Tehdejší neznalost rozdílného působení enantiomerů si celosvětově vyžádala daň v podobě 12 000 postižených novorozenců. Od té doby se problematice přípravy opticky čistých látek věnuje velká pozornost, nikoli jen ze strany farmaceutických firem, ale také ze strany registračních institucí.

Připravit opticky čistou látku lze několika způsoby. Jedním z nich je užití chirální syntézy. Využívají se např. různé chirální katalyzátory obsahující kovové ligandy² či moderně přicházejí na řadu biokatalyzátory³. Nevýhodou chirální syntézy je většinou její náročnost a to jak provedením, tak finančně. Produkt bývá zřídka opticky zcela čistý a musí se dočišťovat krystalizací, či méně často užitím chromatografických metod⁴.

Jelikož je snaha většinu léčiv vyrábět v krystalické formě, jedním z posledních kroků výroby API je krystalizace. Je to proces, kterým se látka nejen přečistí, ale také získá požadované fyzikální vlastnosti, jako např. velikost nebo tvar částic (za předpokladu, že během filtrace, při promývání filtračního koláče a sušení již nedojde k lámání, otěru, aglomeraci či jiným změnám v morfologii částic)⁵. Krystalizačními technikami lze také účinně rozdělit směs enantiomerů nebo docílit převedení jednoho enantiomeru na druhý a dostat tak téměř 100% výtěžek. Tento příspěvek se zabývá právě jednou z možností získávání opticky čistých krystalů.

2. Druhy krystalických racemických směsí

Racemické látky se mohou při krystalizaci chovat třemi různými způsoby^{6,7}. První a nejčastější případ krysta-



Obr. 1. Pravidelné uspořádání enantiomerů v krystalu a binární fázový diagram látky tvořící racemickou sloučeninu. *R*, *S*, *RS*, a *L* reprezentují pevnou fázi (*R*)-enantiomeru, (*S*)-enantiomeru, racemickou sloučeninu (*RS*), nebo pevný roztok (*RS*) a kapalnou fázi *L*. Směs je nejstabilnější v molárním poměru obou enantiomerů 1:1, kdy je teplota tání směsi nejvyšší



Obr. 2. **Nepřavidelné uspořádání enantiomerů v krystalu a binární fázový diagram látky tvořící pevný roztok neboli pseudoracemát.** Teplota tání je konstantní a nezáleží na poměru jednotlivých enantiomerů

lizace racemátu je tvorba tzv. racemické sloučeniny (racemic compound). Tento případ nastane tehdy, pokud molekuly jednoho enantiomeru mají vyšší afinitu k opačnému enantiomeru. Výsledkem je pak pravidelné uspořádání obou enantiomerů v poměru 1:1 v elementární buňce (obr. 1). Krystalizace v podobě racemické sloučeniny nastává přibližně u 85–90 % všech racemátů.

Další případ nastane, pokud není velký rozdíl v afinitě ke stejnému nebo opačnému enantiomeru, v krystalové struktuře jsou oba enantiomery opět přítomny v poměru 1:1, ale neuspořádaně (obr. 2). Tomuto typu chování se říká pevný roztok neboli pseudoracemát. Nastává u necelých 5 % všech racemických směsí. Z takového systému není možné získat krystalizací opticky čistou látku^{6,7}.

Poslední typ krystalického chování racemátů je tvorba tzv. racemického konglomerátu. Nastává tehdy, když molekuly jednoho enantiomeru mají vyšší afinitu ke stejnému enantiomeru a výsledkem je elementární buňka pouze s jednou opticky čistou látkou (obr. 3). Ze samotného chování vyplývá, že pokud racemát krystalizuje jako konglomerát, lze od sebe tyto enantiomery poměrně snadno oddělit nebo je převést na jeden žádaný enantiomer. Nevýhodou je pouze malé procento látek, které vykazují tento typ chování. Celkově jich je okolo 5–10 % (cit.^{6,7}).

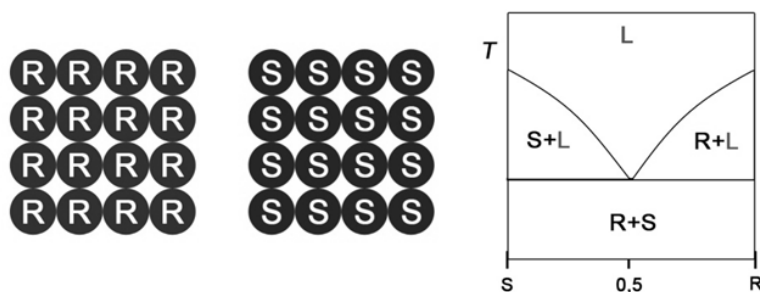
Aby bylo možné určit, jakým způsobem daná racemická směs krystalizuje, je třeba sestavit binární fázový diagram. Většinou se pro sestavení těchto diagramů užívá diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)⁸.

3. Metody dělení racemátů

3.1. Krystalizační metody

Mezi krystalizační techniky, kterými lze od sebe jednotlivé enantiomery oddělit, patří např. převedení enantiomerů na diastereomerní soli. Ty mají odlišné fyzikální a chemické vlastnosti, jsou to tedy dvě rozdílné sloučeniny, které lze od sebe oddělit krystalizací či jinou separační metodou⁹.

Další metodou, jak rozdělit směs enantiomerů, je preferenční krystalizace¹⁰. Princip preferenční krystalizace spočívá v krystalizaci nejdříve jednoho enantiomeru naočkováním racemické směsi námi požadovaným enantiomerem. Po vykrystalizování a odfiltrování krystalů daného enantiomeru dochází ke krystalizaci druhého enantiomeru. V praxi se jedná o dva krystalizační aparáty zapojené sériově. Při použití této metody je třeba dbát na řízení procesu



Obr. 3. **Struktura krystalu pouze s jedním enantiomerem a fázový diagram látky tvořící konglomerát.** Horní křivka indikuje teplotu tání pro enantiomer s definovaným složením. Spodní úsečka pak indikuje eutektický bod. Z diagramu je také zřejmé, že poklesem enantiomerní čistoty dochází k poklesu teploty tání

krystalizace. Je nezbytné se pohybovat pouze v metastabilní oblasti a zastavit krystalizaci včas, aby nedocházelo k nukleaci a krystalizaci druhého enantiomeru. Preferenční krystalizací lze účinně dělit pouze konglomeráty.

Použití chirálních aditiv či rezoluce na základě tvorby kokrystalu jsou další krystalizační metody, vedoucí k získání opticky čisté látky. Je nutno říci, že výtěžky u těchto metod, pokud se jedná o racemát, jsou pouze do 50 % (cit.¹¹).

3.2. Chromatografické metody

Získat opticky čistou látku lze také pomocí chromatografických technik. U chromatografie v kapalně i plynné fázi se používají nejčastěji kolony naplněné stacionární fází na bázi polysacharidů a proteinů¹². Chirální rozlišení v těchto typech kolon probíhá na základě hydrofobních interakcí a vodíkových vazeb. Nevýhodou chirální separace používané pro velké objemy výrobních šarží je obvykle její vysoká cena.

3.3. Viedmovo zrání

Nedávno byla popsána metoda, s jejíž pomocí je možno racemickou směs účinně převést pouze na jeden žádaný enantiomer¹³. Před popisem principu této techniky je třeba se podívat zpět do historie.

V roce 1896 německý vědec, nositel Nobelovy ceny Wilhelm Ostwald, popsal jako první jev, později nazvaný jeho jménem, Ostwaldovo zrání (Ostwald ripening)¹⁴.

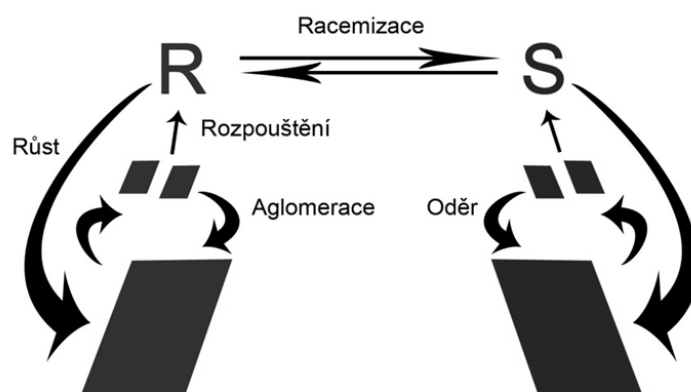
Ostwald pozoroval, že malé částice mají vyšší rozpustnost, než částice větší. To je způsobeno menší energetickou stabilitou molekul na povrchu částic než uvnitř. Z toho důvodu méně stabilní molekuly přecházejí do roztoku snáze a tím dochází ke zmenšování samotných částic a zvyšování počtu volných molekul v roztoku. Poté, kdy se roztok stane nasycený těmito volnými molekulami, dojde k opětovnému uspořádání do větších celků. Tento jev,

zvaný jako Ostwaldovo zrání, má za následek postupný nárůst střední velikosti částic.

Ostwald prováděl experimenty s chlorečnanem sodným. Chlorečnan sodný není chirální molekula, v roztoku je vlivem disociace achirální, ale krystaly této látky stáčí rovinu polarizovaného světla. Chlorečnan sodný je látka krystalizující jako konglomerát. Ostwald zjistil, že pokud nechá nasycený roztok chlorečnanu sodného krystalovat po dobu téměř dvou měsíců, vzniknou velké krystaly pouze jednoho enantiomeru. Z toho usoudil, že opticky čisté krystaly jsou termodynamicky preferovány. Aby se urychlil proces deracemizace, provedl Ostwald další experimenty s přesyceným roztokem chlorečnanu sodného. Přidal do něj malé olovené kuličky používané v té době k vážení na rovnoramenných vahách (něm. Tariiergranate). Tuto směs míchal několik dní, načež zjistil, že se ve směsi vyskytují krystaly pouze jednoho enantiomeru^{11,15}.

Cristobal Viedma studoval Ostwaldovy experimenty a následně je zkusil aplikovat na organické chirální molekuly¹¹. Aby docílil kýženého výsledku, bylo potřeba přimět organické molekuly v roztoku racemizovat. K racemizaci může docházet přidávkem silné báze nebo kyseliny, záleží na povaze molekuly. Viedma společně s Blackmondovou testovali tuto myšlenku na derivátu aminokyseliny (*R,S*)-*N*-(2-methylbenzyliden)-fenyglycin amidu, krystalizujícího jako konglomerát¹¹. Pro racemizaci směsi použili organickou bázi DBU (1,8-diazabicyklo (5,4,0)undec-7-en). Směs míchali spolu se skleněnými kuličkami, kterými nahradili Ostwaldem použité olovené tárovací kuličky, po dobu 30 dní. Na konci experimentu získali krystaly obsahující pouze (*R*)-enantiomer. Aby potvrdili správnost výsledku, byl tentýž pokus prováděn ve čtyřech rozdílných laboratořích. Ve všech se podařilo docílit stejného výsledku.

Mechanismus deracemizace (obr. 4) spočívá v rozpouštění nejmenších krystalů v nasyceném roztoku. Menší částice, vzniklé oděrem krystalů se skleněnými kuličkami, se rozpustí na základě Ostwaldova zrání a vlivem



Obr. 4. Mechanismus metody Viedmova zrání. Rozpuštěné částice podléhají racemizaci a náhodně se začleňují do opticky čistých krystalů. Na konci procesu je přítomný pouze jeden enantiomer

silné kyseliny nebo báze racemizují. V roztoku se vyskytují (*R*) a (*S*) enantiomery, které mají tendenci krystalovat resp. se napojovat na hrany nerozpuštěných opticky čistých krystalů. Tato inkorporace do enantiomerně čistých krystalů je zcela náhodná a závisí pouze na poměru obou enantiomerů. Pokud se vychází z poměru obou enantiomerů 1:1, přeměna do opticky čistého krystalu je zprvu velmi pomalá v řádu několika dní. S přibývajícím množstvím krystalů jednoho enantiomeru rychlost přeměny exponenciálně roste¹⁵. Pro urychlení procesu je možné vycházet z mírného přebytku žádaného enantiomeru (1–10%)¹¹. Vlivem mletí je získána na konci procesu úzká distribuce velikostí částic.

Uvedená metoda, později nazvaná Viedmovo zrání, byla doposud využita při deracemizaci asparagové kyseliny¹¹, naproxenu¹⁶ a klopidogrelu¹⁷, vždy se 100% výtěžkem. V některých případech není potřeba používat k oděru skleněné kuličky, dostačující je míchání magnetickým míchadlem.

3.4. Průmyslové využití

Ve větším množství lze racemáty tvořící konglomerát deracemizovat pomocí průmyslového kulového mlýnu¹⁷. Lze tak podstatně zkrátit proces deracemizace. Kritickým parametrem deracemizace v průmyslovém kulovém mlýnu je rychlost mletí. Pokud se otáčky míchadla nastaví příliš vysoko, sníží se rychlost deracemizace vlivem majoritního množství malých krystalů a také může docházet k amorfizaci materiálů.

4. Závěr

Příprava opticky čistých látek je dnes nezbytnou součástí chemického a farmaceutického průmyslu. Jednotlivé enantiomery lze od sebe separovat pomocí různých krystalizačních nebo chromatografických technik nebo je možné racemickou směs převést na jeden čistý enantiomer. K tomu slouží metoda zvaná Viedmovo zrání. Její výhody spočívají v jednoduchosti procesu, je ekonomicky nenáročná a poskytuje 100% výtěžek se stejnou distribucí velikosti částic. Viedmovo zrání má také svá úskalí skrývající se v nutnosti racemizace dané molekuly, která se navíc musí při krystalizaci chovat jako konglomerát. I když nároky na vlastnosti molekul jsou poměrně vysoké, tak jednoduchost a efektivita tohoto procesu jsou jistě zajímavým motivem k aplikaci.

LITERATURA

1. Ando Y., Fuse E., Figg W. D.: *Clin. Cancer Res.* 8, 6 (2002).
2. Akutagawa S.: *Appl. Catal., A* 128, 2 (1995).
3. Xuereb D., Dzierzak J., Raja R.: *Catal. Today* 198, 1 (2012).
4. Al-Majed A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 1 (2009).
5. Saleemi A., Steele G., Pedge N.: *Int. J. Pharm.* 430, 1 (2012).
6. Srisanga S., Horst J.: *Cryst. Growth* 10, 1808 (2010).
7. Moss G.: *Pure Appl. Chem.* 68, 2193 (1996).
8. Giron D.: *Thermochim. Acta.* 1995, 248.
9. Yokota M., Takahashi Y., Sato A.: *Chem. Eng. Sci.* 53, 8 (1997).
10. Angelov I., Raisch J.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 45, 759 (2006).
11. Noorduyn W., Vlieg E.: *Angew. Chem.* 48, 9600 (2009).
12. Younes A., Ates H., Mangelings D.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013, 75.
13. Ostwald W.: *Z. Phys. Chem.* 1896, 22.
14. Dilip K., Kondepudi, Rebecca J.: *Science* 250, 975 (2009).
15. Iggländ M., Mazzotti M.: *Cryst. Growth* 11, 4611 (2011).
16. Noorduyn W., Kaptein B.: *Angew. Chem.* 48, 4581 (2009).
17. Noorduyn W., Asdonk P.: *Org. Process Res. Dev.* 14, 908 (2010).

J. Holan^a, F. Štěpánek^a, and L. Ridvan^b
^aDepartment of Chemical Engineering, Institute of Chemical Technology Prague, ^bZentiva Co., Prague): **Deracemization by Grinding: Viedma Ripening**

The preparation of optically pure compounds plays an important role in pharmaceutical and chemical industry. The separation of two enantiomers in a racemic mixture of chiral compounds by crystallization is one of the commonly used methods of achieving optical purity. Viedma discovered a new method of deracemization of racemic crystals by grinding them in saturated solutions. The process is based on the finding that smaller crystals are more soluble than the larger ones. Due to the presence of a racemization agent, racemization occurs in solution. The molecules then create clusters that are randomly formed into (*R*) or (*S*) crystals. The process (Ostwald ripening) would eventually lead to a single enantiomer. The method always provides 100% yield and the same crystal size distribution. The deracemization by grinding is a very simple and economically attractive process for obtaining optically pure crystals.