

MAX-BUCHNER-FORSCHUNGSSTIFTUNG

Abschlussbericht MBFSt-Kennziffer 2447 Förderprojekt : Mizellare Chromatographie

1. Zielsetzung

Objekte, bei denen Bild und Spiegelbild nicht zur Deckung zu bringen sind, bezeichnet man als chiral. Auch Moleküle können diese Eigenschaft besitzen und werden Stereoisomere bzw. Enantiomere genannt und sind Substanzen mit der gleichen Strukturformel und Atomabfolge, aber mit unterschiedlicher räumlicher Anordnung von vier unterschiedlichen Gruppen um ein stereogenes Zentrum (Chiralitätszentrum). Die chemischen Eigenschaften zweier Enantiomere sind identisch, solange der Reaktionspartner achiral ist. Sind diese dagegen auch chiral, so unterscheiden sich die beiden Enantiomere in ihrem chemischen Verhalten. Aminosäuren (ebenfalls chirale Moleküle), die im Körper mit chiralen Molekülen in Wechselwirkung treten, werden von diesen erkannt und verhalten sich unterschiedlich. Über ein Drittel der weltweit synthetisch hergestellten Arzneimittel (Winkler, H. 1995) und mehr als die Hälfte der Arzneimittel der European Pharmacopeia (1997) sind chiral. Auch hier können die Enantiomere unterschiedliche Wirkung haben. Während das eine Enantiomer die erwünschte Wirkung besitzt, kann das andere gravierende Nebenwirkungen verursachen. Die Erkenntnis der unterschiedlichen pharmakologischen Wirksamkeit von Enantiomeren erfordert die Verabreichung und folglich das Synthetisieren von isolierten Enantiomeren. Die Darstellung dieser Verbindungen erfolgt dabei zum einen durch chirale Synthese, wobei dies häufig sehr schwierig für eine vollständige Prozessgestaltung realisierbar ist. Zum anderen bietet sich an, mit chiralen Trennmethode ein Racemat aufzuarbeiten, wobei dies bei rund 65 % aller synthetischen Arzneimittel passiert.

Da die Enantiomerentrennungen einen schlechten Trennfaktor haben, ist das Ziel dieser Arbeit, die Selektivität einer Methode zur Enantiomerentrennung zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Trennung eines racemischen Gemisches von unterschiedlichen Aminosäuren (Phenylalanin, Phenylglycin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin) mittels mizellarer chiraler Chromatographie untersucht. Ein wichtiger Punkt zur Auswahl der Methoden ist die Anwendung von geeigneten Tensiden alternativ zu organischen Lösungsmitteln, mit dem Vorteil, im wässrigen Milieu arbeiten zu können. Hierfür wird das nichtionische Tensid Nonyl-phenyl-(9)-polyoxyethylen verwendet. Vorversuche zur mizellaren Phenolabtrennung wurden schon durchgeführt und in der Fachwelt vorgestellt (Garcia Diez, L. und Bart, H. J. 2001, Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. 2002, Garcia Diez, L., Bart, H.-J., et al. 2002, Garcia Diez, L., Bart, H.-J., et al. 2003, Garcia Diez, L., Bart, H.-J., et al. 2004). Bei der chiralen mizellaren Chromatographie müssen passende chirale stationäre Phasen gesucht werden und hinsichtlich der Selektivität und der Verträglichkeit mit tensidhaltigen mobilen Phasen erprobt werden. Ein Modell zur Beschreibung der Retention und ihre Abhängigkeit vom pH-Wert und von der Tensidkonzentration wurde entwickelt und eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen erzielt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der experimentellen Arbeiten dargestellt (Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. 2003, Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. 2003, Garcia Diez, L., Bart, H.-J., et al. 2003, Garcia Diez, L., Bart, H. J., et al. 2003, Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. 2004, Garcia Diez, L. und Bart, H. J. 2005, Garcia Diez, L., Bielska, M., et al. 2005).

2. Experimenteller Aufbau

Unter Verwendung zweier chiraler Säulen und eines nicht-ionischen Tensids (Igepal CO-630) in der Mizellaren Phase wurde die Mizellare Chromatographie (MLC) für die Trennung von unterschiedlichen Aminosäuren untersucht. Die Anwendbarkeit der MLC in der chiralen Chromatographie wird studiert. Es werden die Parameter Retentionsfaktor der freien Wertkomponente, Trennfaktor, Auflösung, die Effizienz der Trennung und der Zusammenhang mit der Tensidkonzentration bestimmt.

2.1 Geräte

Das HPLC-System für die chromatographischen Versuche besteht aus folgenden Komponenten: zwei Pumpen, Entgaser, Autoinjektor mit 20 µl Schleife (alles Fa. Gilson), UV-Detektor (Hitachi Merck) mit einem Wellenlängenbereich zwischen 200 und 258 nm und einer Software für die Erfassung und Behandlung der Messwerte (Fa. Gilson). Die Säulen (150 mm lang x 4.6 mm Innendurchmesser) sind mit 5 µm-Partikeln ChiroSil SCA(-) (Fa. RS-tech, Korea) bzw. Sumichiral OA-5000(L) (Fa. Sumika Chemical Analysis, Japan) gepackt. Zusätzlich werden Vorsäulen mit dem jeweiligen Säulenmaterial benutzt, um die chirale Säule vor Beschädigungen zu schützen.

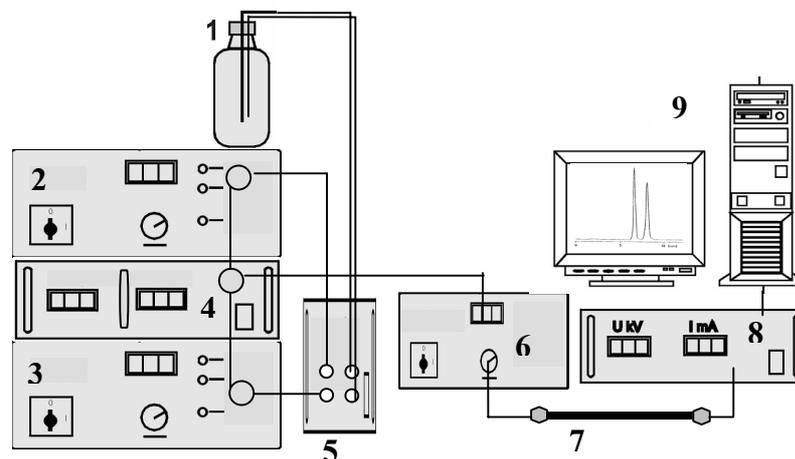


Abbildung 1: Anlagenschema: 1 Vorratsbehälter (mobile Phase), 2 Pumpe, 3 Pumpe, 4 Mischkammer, 5 Entgaser, 6 Autoinjektor, 7 Säule, 8 Detektor und 9 Rechner.

2.2 Reagenzien

Es wurde entionisiertes und einfach destilliertes Wasser verwendet. Das Tensid bzw. die Aminosäuren (Merck und Sigma-Aldrich), Perchlorsäure, Essigsäure, Methanol, Isopropanol und Kupfersulfat (alle Merck) sind analytisch rein.

2.3 Prozedur

Die mobilen Phasen werden nach Herstellung mit einer 0,45/0,2 µm Zellulose-Filterkartusche Sartopore 2-150 (Sartorius AG) vorbehandelt, wodurch Partikel, die die Säule beschädigen können, entfernt werden.

Für die Säule *Sumichiral OA-5000* werden unterschiedliche Mobilphasen verwendet. Eine unerlässliche Bedingung für die Funktionalität der Säule ist, dass die mobile Phase Kupferionen in einer Konzentration zwischen 10^{-5} und 10^{-3} mol/l enthalten muss, da das Prinzip dieser Säule auf der Bildung eines tertiären Komplexes der Aminosäuren mit Kupfer und einem Austauschliganden (N,S-Dioctyl-d-penicillamin) beruht. Mobile Phasen ohne Tenside enthalten 5-10% Isopropanol und 2 mmol/l Kupfersulfat als Zusatz. Für die

Untersuchung der MLC werden die mobilen Phasen mit unterschiedlichen Tensidkonzentrationen (0,01 mmol/l-0,5 mmol/l) versetzt. Die Aminosäurekonzentration betrug 0,8 mmol/l und wird mit einem Volumenstrom der mobilen Phase von 1,0 ml/min behandelt.

Die Säule *Chirosil SCA(-)* wird auch mit unterschiedlichen mobilen Phasen untersucht. Da der Selektor auf der Säule ein Kronenether ((-)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetracarbonsäure) ist und die Trennung auf dem Einschluss-Prinzip beruht, muss die mobile Phase im sauren pH-Bereich liegen, da nur dort die Aminogruppen der Aminosäuren protoniert sind. Die mobilen Phasen enthalten Perchlorsäure oder Essigsäure, und der Zusatz ist bis zu 84 % Methanol. Die Tensidkonzentration der mobilen Phase für die MLC-Untersuchungen variierte von 0,01 mmol/l bis 0,5 mmol/l. Die Aminosäurekonzentration betrug 0,4 mmol/l und wurde abhängig von Aminosäure und Zusammensetzung der mobilen Phase mit einem Volumenstrom zwischen 0,6 ml/min und 1,5 ml/min chromatographiert. Um reproduzierbare Ergebnisse sicherzustellen, mussten die Säulen bei jeder Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase jeweils neu equilibriert werden. Die Retentionszeit der unterschiedlichen Aminosäuren wurde bei einer Temperatur von 25 °C für verschiedene Zusammensetzungen und Tensidkonzentrationen der mobilen Phase bestimmt. Jede Probe wurde mindestens vier Mal gemessen, wobei die Retentionszeiten immer konstant über die vier Experimente gewesen waren. Kapazitätskoeffizienten, Auflösung, Selektivität und Effizienz wurden für jedes Experiment berechnet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Sumichiral OA-5000 (L)

Es handelt sich um eine RP-Säule, eine Silikat-Säule, die Octadecylgruppen an der Oberfläche gebunden hat. Dadurch erhält sie ihre hydrophobe Eigenschaft und kann mit dem chiralen Selektor N,S-Dioctyl-D-penicillamin oder N,S-Dioctyl-L-penicillamin beschichtet werden. Der Selektor ist zwischen den Alkylketten des RP-Materials integriert und ändert dadurch die Oberfläche der Säule. Der hydrophile Teil von Penicillamin ist in Richtung der polaren mobilen Phase angeordnet und ist dadurch zugänglich für die Kupfer-Ionen. Diese binden sich reversibel an das Penicillamin und ermöglichen die Komplexbildung mit Komponenten, die Atome bzw. Doppelbindungen besitzen, die wiederum Elektronen bzw. π -Elektronen abgeben können. Dabei nehmen diese Komponenten eine Position an der Koordinationssphäre des Metall-Ions an.

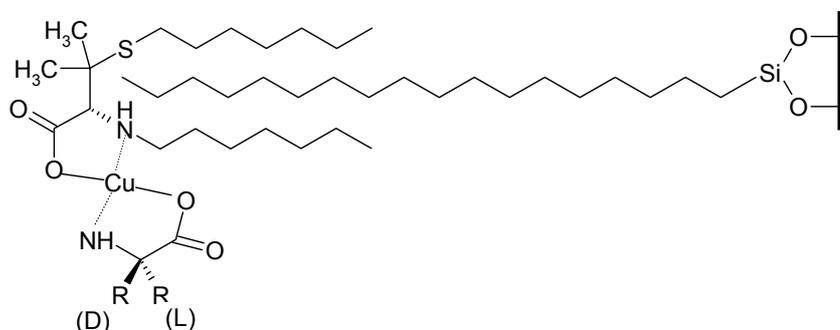


Abbildung 2: Komplexbildung in der Sumichiral OA-5000 chiralen Säule

Wenn eine stationäre Phase, die einen mit Kupfer komplexierten chiralen Liganden enthält, mit einem Enantiomer aus der mobilen Phase interagiert, findet eine Enantiomertrennung durch die Bildung eines Komplexes zwischen den Enantiomeren und der an die Säule gebundenen Kupfer-Ligand-Einheit statt. Grund dafür ist der Unterschied der

thermodynamischen Stabilität der beiden chiralen Komplexe. Die unterschiedliche Stabilität der Komplexe und die Fähigkeit einer schnellen Lösung und Bindung ist eine unerlässliche Bedingung für den rapiden Ligand-Austausch, der in der chromatographischen Säule stattfindet. Typische Metallionen, die diesen Anforderungen entsprechen, sind bivalente Kationen, wie z.B. Cu (II), Fe(II), Ni(II), Co(II), Zn(II) oder Cd(II). Diese Metallionen können das ungepaarte Elektronenpaar eines elektronegativen Atoms (z.B. O-, N- oder S-Atoms) des Liganden in ihre Koordinationssphäre binden (Davankov, V. A. 1980). Die übrigen freien Koordinationsstellen der Metallionen sind verantwortlich für die Bildung eines temporären Komplexes mit den Enantiomeren in der mobilen Phase (Davankov, V. A. 1982).

Die Untersuchungen mit unterschiedlichen Tensidkonzentrationen (0,01 mol/l, 0,1 mmol/l und 0,5 mmol/l) ergeben, dass für alle Aminosäuren sich mit Erhöhung der Tensidkonzentration der Logarithmus des Kapazitätskoeffizienten linear mit einem Regressionskoeffizienten von 0,996 bis 0,998, abnimmt. Somit ergibt eine Erhöhung der Tensidkonzentration bzw. der Mizellenzahl eine Abnahme der Retention und das zeigt, dass sich das Verhalten von mizellaren Lösungen und von konventionellen mobilen Phasen gleicht. Durch die kürzeren Retentionszeiten wird eine Reduktion des chromatographischen Zeitaufwands erzielt, was Kosten und Mengenbedarf an mobiler Phase reduziert. Die Elutionsreihenfolge der Komponenten, von stark zu wenig retenierten, stimmt mit der Reihenfolge im Vergleich zu reinem Isopropanol überein: Phenylalanin, Tyrosin, Phenylglycin und Histidin. Demzufolge weisen alle Aminosäuren eine Wechselwirkung mit der Mizelle auf.

Die Selektivität für alle Aminosäuren bleibt fast konstant oder weist eine geringe Erhöhung auf, was auf die konkurrierenden Gleichgewichte zurückzuführen ist. Das Tensid konkurriert mit den Aminosäuren nicht um die Bindungsstellen, da sonst die Selektivität mit der Zugabe von Tensid abnehmen würde. Während für Phenylglycin und Tyrosin hohe Werte bei der Selektivität (2,0 bzw. 1,8) mit mizellaren mobilen Phasen erreicht werden, zeigt der Trennfaktor beim Phenylalanin im Vergleich nur 1,35. Für Histidin zeigen sich noch niedrigere Selektivitätswerte (1,2). Die Werte der Auflösung für alle Aminosäuren verringern sich mit der Zugabe von Tensid. Trotzdem erfolgt noch eine vollständige Trennung aller Aminosäuren. Der höchste Wert wird von Phenylglycin (12-7) erreicht, gefolgt von Tyrosin (10-7), Phenylalanin (7-5) und zuletzt Histidin (1,5).

Um die Effizienz der Trennung zu beurteilen, wurde die Anzahl der theoretischen Böden berechnet. Es ist zu erwarten, dass die Anzahl der Böden (N) von der Tensidkonzentration abhängt. Phenylalanin zeigt einen deutlich höheren Wert als die anderen Aminosäuren. Während Tyrosin und Phenylglycin vergleichbare Werte der Böden erreichen, liegen die Böden für Histidin in einem niedrigeren Bereich, da diese Säule keine gute Trennung für DL-Histidin gewährleisten kann. Die Werte für die L-Aminosäuren sind leicht höher als für die D-Aminosäuren. Die erste Erhöhung der Tensidkonzentration bringt eine leichte Abnahme der Bodenzahl bzw. bei Phenylalanin eine leichte Zunahme, was auf die Wechselwirkung mit den Mizellen zurückzuführen ist. Eine weitere Erhöhung der Tensidkonzentration, was auch eine Erhöhung der Mizellenkonzentration bedeutet, verursacht eine deutliche Abnahme der Bodenzahl und deswegen eine Reduzierung der Trennleistung. Der Grund dafür ist wahrscheinlich der langsame Stoffübergang von der Mizelle in die stationäre Phase, da bekannt ist, dass das Innere der Mizelle eine höhere Viskosität besitzt als die Bulk-Phase. Ein Vergleich mit der Zugabe von Isopropanol ergibt, dass die Bodenzahl-Werte für alle Konzentrationen einer mizellaren mobilen Phase deutlich höher liegen als bei der Zugabe von Isopropanol, was eine Erhöhung der Trennleistung bedeutet. Die Werte für Phenylalanin betragen von 8000 bis 4000 bei der Anwendung von Tensidlösungen, während mit Isopropanol als konventionellem organischen Eluenten nur Werte von 2500 bis 1500 erreicht wurden. Bei Tyrosin und Phenylglycin sehen die Werteunterschiede ähnlich aus (4500-2000 gegenüber 1500-1000). Die Kapazitätskoeffizienten k'_1 können mit angepassten

Gleichgewichtskonstanten K_4 und K_3 entsprechend der Gleichung 1 vorausberechnet werden. In Abbildung 3 sind die experimentellen und simulierten Werte des Kapazitätskoeffizienten über der Mizellenkonzentration dargestellt. Da der pH-Wert konstant ist, ergibt sich ein parabelförmiges Verhalten, was das Modell vorhergesagt hatte. Anhand dieses Diagramms lässt sich eine gute Übereinstimmung feststellen.

$$k_1' = \frac{\phi[L_s]K_3}{1 + K_4[M_m]} \quad (\text{Gl.1})$$

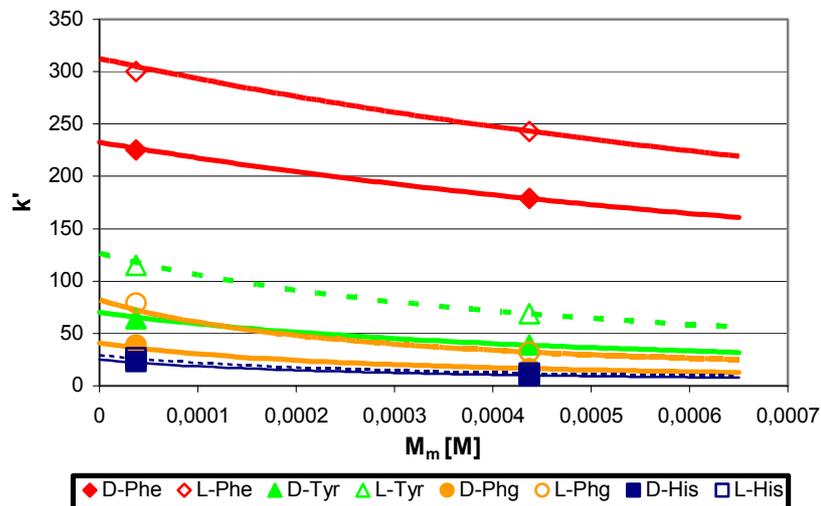


Abbildung 3: Experimentelle und simulierte (durchgezogene oder punktierte) Werte der Kapazitätskoeffizient der D-Aminosäuren bzw. L-Aminosäure in Abhängigkeit der Mizellenkonzentration.

3.2 ChiroSil SCA(-)

Die stationären Phasen ChiroSil SCA(-) und ChiroSil RCA(+) sind von RStech Corporation in Daejeon (Korea) entwickelt worden. Der chirale Selektor (+) bzw. (-)-(18-Crown-6)-tetracarbonsäure (s. Abbildung 4) ist durch drei Bindungsstellen an das Säulenmaterial kovalent gebunden. Hier handelt es sich um sphärisch trifunktionelle Aminopropyl-Silikate mit $5\mu\text{m}$ Partikel und 100\AA Porengröße (s. Abbildung 5). Diese Säule ist geeignet für die Trennung von Aminosäuren und Komponenten mit primären Aminogruppen. Vorteile dieser Säule ist die Verträglichkeit mit gängigen organischen Lösungsmitteln, die lange Haltbarkeit und gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf Grund der kovalent gebundenen Gruppe. Außerdem besitzt diese Säule die Möglichkeit der Umkehrung der Elutionsreihenfolge, da beide chirale Säulen für R- und S-Enantiomere lieferbar sind. Der maximale Druck, mit dem die Säule belastet werden kann, liegt bei 5000 psi bzw. 344 bar. Die Temperatur kann von 5 bis $50\text{ }^\circ\text{C}$ variiert werden, wobei die empfohlene Temperatur $20\text{ }^\circ\text{C}$ beträgt. Der pH-Wert der mobilen Phase sollte nach Angaben des Herstellers zwischen pH 2 und pH 7,5 liegen. Die Prinzipien der Chiralität-Erkennung und wie sie sich äußern, helfen bei der Erklärung des Mechanismus der chiralen Trennung mittels „Host-Guest-Komplexen“. Dabei ermöglicht der Einschluss der Moleküle in der Kavität eine chirale Trennung mit nur zwei Interaktionspunkten (Topiol, S. und Sabio, M. 1996). Die protonierte Aminogruppe der „Guest“-Moleküle bilden drei Wasserstoffbrücken und zeigen hohe Enantioselektivität. Der Grund dafür ist eine Wechselwirkung über Wasserstoffbrückenbildung (Webb, T. H. und Wilcox, C. S. 1993). So bilden die protonierten Aminosäuren mit den Sauerstoffatomen der Kronenether drei Wasserstoffbrücken und nur die zusätzliche Interaktion der Phenylgruppe der Aminosäure mit dem Kronenether reicht, um die Chiralitätserkennung zu ermöglichen. Dies ist im Einklang mit der Drei-Punkt-Interaktion-Regel (Davankov, V. A. 1989).



Abbildung 4: (a) (-)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetracarbonsäure und (b) (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetracarbonsäure

Ein alternatives Produkt ist die Säule Crownpak CR (Fa. Daicel Chemical Industries Ltd.). Dabei ist die Säule mit einem Binaphtyl-Kronenether als Selektor beschichtet. Diese Säule liefert eine gute Trennleistung für Aminosäuren, wobei ein paar Beschränkungen bezüglich Lösungsmitteln in der mobilen Phase berücksichtigt werden müssen. Der Methanol-Gehalt in der mobilen Phase sollte 15 % nicht übersteigen und die Anwendung anderer Lösungsmittel ist nicht empfohlen, da dann die Säule ausgelaugt wird und der Selektor aus der Säule läuft (Shinbo, T., Yamaguchi, T., et al. 1987, Lee, D. W. und Hong, C. Y. 2000). Lee, W., Baek, C.-S., et al. 2002 berichteten über eine neue Säule Chirosil SCA(-) und RCA(+), wo der Selektor (+)- oder (-)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylsäure an Aminopropyl-Silikagel kovalent gebunden ist. Diese Säule erzielte noch bessere Ergebnisse, also kürzere Retentionszeiten, höhere Trennfaktoren und eine höhere Stabilität der Säule. Es ist zu erwarten, dass diese Säule zur Trennung vieler Aminosäuren und verwandter Komponenten im analytischen und präparativen Maßstab dienen kann.

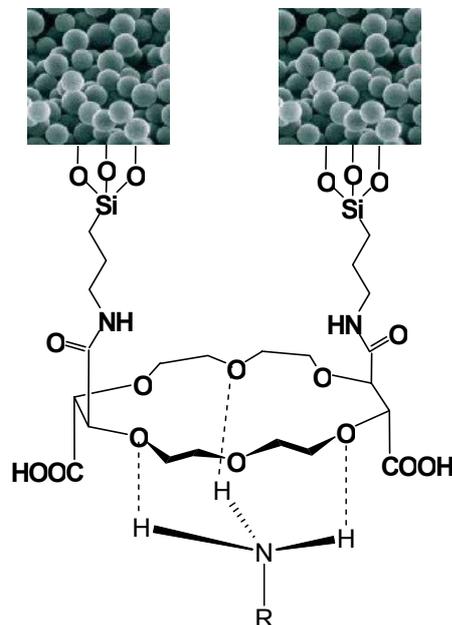


Abbildung 5: Schema der trifunktionellen Bindung des Ammoniumions in der Kavität des Kronenethers (Gebunden an Aminopropylsilikat als Trägermaterial)

Das wichtigste Merkmal des Mechanismus der chiralen Trennung ist die Komplexbildung zwischen der Ammoniumgruppe der D- bzw. L-Aminosäure mit Sauerstoff (O4, O10 und O16) der Ethergruppe des Kronenethers. Drei Wasserstoffbrücken werden im Käfig des Kronenethers als dreifüßiges System gebildet (s. Abbildung 5). Bei einer von beiden Aminosäuren zeigen Abstände und Winkel der Wasserstoffbindung dieses Netzes optimale Werte, was die Struktur stabiler macht. Des Weiteren tragen zwei zusätzliche Interaktionen

zur chiralen Trennung bei. Die zusätzliche hydrophobe Wechselwirkung des Polyether-Ringes und der Phenylgruppe der Aminosäure sind bewiesen worden, wobei die räumliche Ausrichtung der Restgruppe der beiden Aminosäuren hinsichtlich des Kronenethers unterschiedlich ist. Interessanterweise wurde eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbildung nur zwischen dem Wasserstoff der Carbonsäure des Kronenethers und dem Carbonyl-Sauerstoff der L-Aminosäure (bei der Chirosil SCA(-)) beobachtet, während diese bei der D-Aminosäure auf Grund des großen Abstands nicht gebildet werden kann (Hyun, M. H., Jin, J. S., et al. 1998, Bang, E., Jung, J.-W., et al. 2001).

Die Tensidkonzentration wurde bei einer Säurenkonzentration von 1mmol/l (pH=2,2) von 0,01 mmol/l bis 0,8 mmol/l variiert. Die Elutionsreihenfolge der Komponenten, von stark zu wenig retenierten, stimmt mit der Reihenfolge der konventionellen Methanoleluation überein: Tryptophan, Phenylglycin, Phenylalanin und Tyrosin. Die Kapazitätskoeffizienten aller Aminosäuren zeigen keine Veränderung mit der Erhöhung der Tensidkonzentration in der mobilen Phase. Dies bedeutet nicht, dass die Aminosäuren keine Wechselwirkung mit der Mizelle aufweisen. Die chirale Erkennung hängt wegen des unterschiedlichen Dissoziationsgrads der Aminosäure sehr stark vom pH-Wert der mobilen Phase ab. Um als dreizähliger Ligand zu arbeiten und mit dem Kronenether der Säule einen Komplex zu bilden, müssen die Aminosäuren als Kation bzw. als Zwitterion vorhanden sein, da die Aminogruppen protoniert sein müssen. Bei dem untersuchten pH-Wert (2,2) liegen alle Aminosäuren in der Kation- und Zwitterion-Form in einem Verhältnis von ca. 1:1 vor. Das heißt, dass so viele Kationen wie Zwitterionen im Gleichgewicht vorliegen und wir befinden uns in einem „isoeluting point“, wo der Kapazitätsfaktor unabhängig von der Tensidkonzentration ist. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Modell der mizellaren Chromatographie überein, in dem die Trennung und die Retention durch die Bilanz der Wechselwirkungen der Wertkomponente mit den Mizellen und mit der Säule gesteuert ist und auf der Änderung der Ladungsform der Wertkomponente basiert. Eine Erhöhung oder Reduzierung des pH-Wertes würde eine Veränderung des Kapazitätskoeffizienten mit der Tensidkonzentration verursachen, da dann die Ladungsverteilung der Wertkomponente sich in einem anderen Verhältnis befindet und die Wechselwirkungen der Wertkomponenten mit Mizellen und Säule nicht ausgeglichen ist.

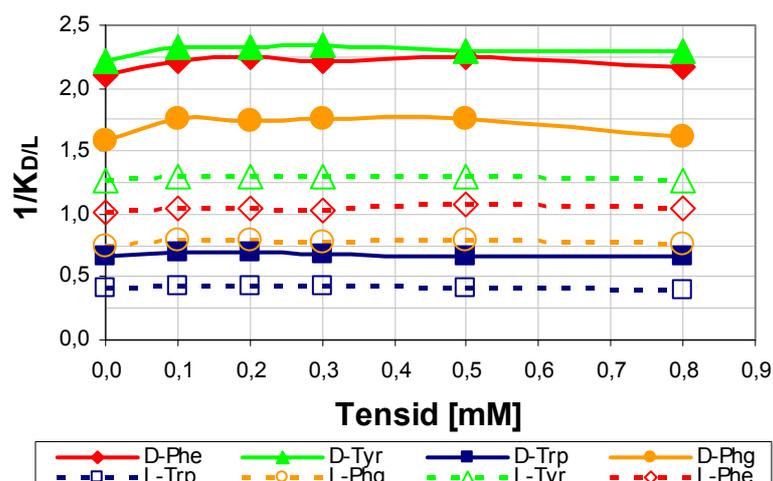


Abbildung 6: Experimentell ermittelte Kehrwerte der Kapazitätskoeffizienten von D- bzw. L-Aminosäuren in Abhängigkeit der Tensidkonzentration.

Die Selektivität für alle Aminosäuren bleibt konstant. Das Tensid konkurriert wiederum nicht mit den Aminosäuren um die Bindungsstellen, da die Selektivität mit der Zugabe von Tensid sonst abnehmen würde. Während Phenylglycin und Phenylalanin hohe Werte für die Selektivität (2,2 bzw. 2,1) mit den mizellaren mobilen Phasen zeigen, beträgt der Trennfaktor im Vergleich beim Tyrosin 1,8 und beim Tryptophan 1,6. Die Veränderung der Auflösung für alle Aminosäuren mit der Zugabe von Tensid ist nicht nennenswert und eine vollständige Trennung erfolgt für alle Aminosäuren. Der höchste Wert wird für Phenylglycin (2,7) erreicht, gefolgt von Tryptophan (2,5), Phenylalanin (2,3) und zuletzt Tyrosin (1,7).

Die Effizienz der Trennung wurde mit der Gleichung von Foley und Dorsey (Foley, J. P. und Dorsey, J. G. 1983, Foley, J. P. und May, W. E. 1987, Foley, J. P. 1990) für die Berechnung der Bodenzahl bestimmt, welche die Asymmetrie des Peaks korrigiert, da die Peaks bei diesen Experimenten Asymmetrie-Verhältnisse von 2,00 bis 2,6 zeigten. Alle Aminosäuren zeigen ähnliche Werte für die Bodenzahl, wobei Tyrosin bei etwa 700 liegt, während die anderen etwa 600 erreichen. Geringe Erhöhungen der Tensidkonzentration bringen eine konstante oder leicht zunehmende Bodenzahl. Die Erhöhung der Tensidkonzentration von 0,5 auf 0,8 mmol/l verursacht eine leichte Abnahme der Bodenzahl für Phenylalanin und Tyrosin und deswegen eine Reduzierung der Trennleistung. Die Bodenzahl-Werte für alle Konzentrationen der mizellaren mobilen Phase liegen höher als im Vergleich zu Methanol, was eine höhere Trennleistung bedeutet.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Mizellare Chromatographie für die Enantiomerentrennung untersucht. Als Enantiomerenbeispiele wurden verschiedene Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin und Phenylglycin) ausgewählt, deren Trennung unter der Anwendung eines nichtionischen Tensides (Nonyl-phenyl-(9)-polyoxyethylen kommerziell erhältlich als Igepal CO-630) und zwei unterschiedlichen chiralen Säulen untersucht wurden. Die Selektivität, Auflösung, Effizienz und Verträglichkeit mit tensidhaltigen mizellaren mobilen Phasen wurde erprobt. Ein Modell zur Beschreibung der Retention und ihre Abhängigkeit vom pH-Wert und der Tensidkonzentration wurde entwickelt und eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen erzielt.

5. Veröffentlichungen und Vorträge

Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. (2002). "Mizellare Chromatographie." *DECHEMA/GVC Fachauschusstagung Adsorption*, Bingen

Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. (2003). "Micellar Chromatography for Enantiomer Separations." *4th European Congress of Chemical Engineering ECCE4*, Granada, Spanien

Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. (2003). "Mizellare Chromatographie für Enantiomerentrennung." *Fachauschusstagung Adsorption DECHEMA/GVC* Würzburg

Garcia Diez, L. und Bart, H.-J. (2004). "Chirale Trennung von Phenylalanin durch selektive Komplexbildung bei der mizellaren Chromatographie." *Chem. Ing. Techn* 76 (9): 1413

Garcia Diez, L., Bart, H.-J. und Szymanowski, J. (2002). "Micellar Chromatography for Phenol Separation." *International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques (SPICA)*, Heildeberg

Garcia Diez, L., Bart, H.-J. und Szymanowski, J. (2003). "Micellar Chromatography for Enantiomer Separations." *Achema 2003*, Frankfurt am Main

Garcia Diez, L., Bart, H.-J. und Szymanowski, J. (2003). "Mizellare Chromatographie." *Chemie Ingenieur Technik* 75 (4): 383-386

- Garcia Diez, L., Bart, H.-J. und Szymanowski, J.** (2004). "Micellar Chromatography." *Chem. Eng. Technol.* 27 (1): 38-42
- Garcia Diez, L. und Bart, H. J.** (2001). "Mizellare Chromatographie." *Doktoranden Seminar "Chromatographische Trennprozesse"*, Rothenbuch
- Garcia Diez, L. und Bart, H. J.** (2004). "Amino acids separation using micellar chromatography and selective complex formation " *International Symposium on Preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques (SPICA)*, Aachen
- Garcia Diez, L. und Bart, H. J.** (2004). "Chirale Trennung von Phenylalanin durch selektive Komplexbildung bei der mizellaren Chromatographie." *GVC Jahrestagung*, Karlsruhe
- Garcia Diez, L. und Bart, H. J.** (2004). "Trennung von Alpha-Aminosäuren mittels mizellarer Chromatographie und selektiver Komplexbildung." *Fachausschusssitzung Adsorption (GVC/DECHEMA)*, Leipzig
- Garcia Diez, L. und Bart, H. J.** (2005). "Mizellare Chromatographie für die Selektive Trennung von Aminosäure Racemate." *Fachausschusssitzung Adsorption (GVC/DECHEMA)*, Lübeck
- Garcia Diez, L., Bart, H. J., Szymanowski, J., Materna, K., Bielska, M. und Tatara, E.** (2003). "Verfahren, Stoffübergang und Grenzflächenphänomene bei der Reaktivextraktion." *4th General Assembly INCREASE 2003*, Oberhausen
- Garcia Diez, L., Bielska, M., Materna, K., Bart, H. J. und Szymanowski, J.** (2005). "Ultrafiltration of colloidal solutions containing DL-Phenylalanine, trans-4-hydroxy-L-proline and their copper complexes." *Desalination* 172: 19-26

6. Literaturverzeichnis

- Ahuja, S.** (1996). "Chiral Separation Methods." *Chiral Separations: Applications and Technology*: 139-155, Washington
- Ahuja, S.** (1996). "Chiral Separations and Technology: An Overview." *Chiral Separations: Applications and Technology*: 1-9, Washington
- Armstrong, D. W.** (1981). "Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography." *Analytical Chemistry* 53: 1662-1666
- Armstrong, D. W. und Fendler, J. H.** (1977). "Differential partitioning of tRNAs between micellar and aqueous phases: a convenient gel filtration method for separation of tRNAs." *Biochimica et Biophysica Acta* 478: 75-80
- Armstrong, D. W. und Henry, S. J.** (1980). "Use of an aqueous micellar mobile phase for separation of phenols and polynuclear aromatic hydrocarbons via HPLC." *Journal of liquid Chromatography* 3(5): 657-662
- Arunyanart, M.** (1984). "Model for micellar effects on liquid chromatography capacity factors and for determination of micelle-solute equilibrium constants." *Analytical Chemistry* 56: 1557-1561
- Arunyanart, M.** (1986). "Micellar liquid chromatography: partitioning mechanism and application to the determination of drugs in body fluids." *Dissertation Abstracts International* 47(7): 2869B-2870B
- Arunyanart, M. und Cline Love, L. J.** (1985). "Influence of Micelles on Partitioning Equilibria of Ionizable Species in Liquid Chromatography: pH and Ionic Strength Effects." *Anal. Chem* 57: 2837-2843
- Bang, E., Jung, J.-W., Lee, W., Lee, D. W. und Lee, W.** (2001). "Chiral recognition of (18-crown-6)-tetracarboxylic acid as a chiral selector determined by NMR spectroscopy." *J. Chem.Soc., Perkin Trans. 2*: 1685-1692
- Blaser, H.-U. und Sluder, M.** (1999). *Chirality* 11: 459-464

- Branch, S. K.** (2001). "International Regulation of Chiral Drugs." *Chiral Separation Techniques*: 319-343, Weinheim
- Creagh, A. L., Hasenack, B. B. E. und Van der Padt, A.** (1994). "Separation of amino-acid enantiomers using Micellar-Enhanced Ultrafiltration." *Biotechnology and Bioengineering* 44: 690-698
- Davankov, V. A.** (1980). "Resolution of racemates by ligand-exchange chromatography." *Advances in Chromatography* 18: 139-195
- Davankov, V. A.** (1982). "Chiral chelating resins in chromatography of optical isomers." *Pure & Appl. Chem.* 54(11): 2159-2168
- Davankov, V. A.** (1989). "Separation of Enantiomeric Compounds Using Chiral HPLC Systems. A Brief Review of General Principles, Advances, and Development Trends." *Chromatographia* 27(9/10): 475-482
- de Haan, A. B., Kuipers, N. J. M. und Steensma, M.** (2002). "Opportunities for extraction technology in chiral separations." *ISEC* 2: 589-596
- de Haan, A. B. und Simandi, B.** (2002). "Extraction Technology for the separation of optical isomers." *Ion Exchange and Solvent Extraction - A Series of Advances* 15: 255 - 294, New-York, Basel
- Foley, J. P.** (1990). "Critical compilation of solute-micelle binding constants and related parameters from micellar liquid chromatographic measurements." *Analytica Chimica Acta* 231: 237
- Foley, J. P. und Dorsey, J. G.** (1983). "Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks." *Analytical Chemistry* 55: 730-737
- Foley, J. P. und May, W. E.** (1987). "Optimization of secondary chemical equilibria in liquid chromatography: theory and verification." *Anal. Chem* 59: 102-109
- Franco, P. und Minguillon, C.** (2001). "Techniques in preparative chiral separations." *Chiral Separation Techniques*: 1-23, Weinheim
- Haupt, D., Pettersson, C. und Westerlund, D.** (1992). "Separation of (R) - and (S) - naproxen using micellar chromatography and an α_1 -acid-glycoprotein column: application for chiral monitoring in human liver microsomes by coupled-column chromatography." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 25: 273-284
- Haupt, D., Pettersson, C. und Westerlund, D.** (1993). "Enantiomeric separations of remoxipride, propranolol and trimiparmin on chiral-agg using micellar chromatography and anionic additives." *Chirality* 5: 224-228
- Heusch, R.** (1972). "Physikalische Methoden als Hilfe für die Herstellung und Entwicklung von Tensiden: Oberflächenspannungsmessungen." *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, Jahrgang (Nr 11)
- Heusch, R.** (1996). "Tensidstrukturen und ihre technische Anwendung." *Lauda Tensiometer anleitung*
- Hyun, M. H., Jin, J. S. und Lee, W.** (1998). "A New Chiral Stationary Phase for the Direct Resolution of Racemic Quinolone Antibacterials Containing a Primary Amino Group." *Bull. Korean Chem. Soc.* 19(8): 819-821
- Lee, D. W. und Hong, C. Y.** (2000). "Direct liquid chromatographic enantiomer separation of new fluoroquinolones including gemifloxacin." *Journal of chromatography A* 879: 113-120
- Lee, W., Baek, C.-S. und Lee, K.** (2002). "Chromatographic Enantiomer Separation of Diphenylalanine on Chiral Stationary Phases Derived from Chiral Crown Ethers." *Bull. Korean Chem. Soc.* 23: 1677-1679
- Lough, W. J.** (1989). "Chiral liquid Chromatography." 276, Glasgow
- Lough, W. L.** (1996). "High performance liquid chromatography - Fundamental principles and practice." London

- Pickering, P., Chaudhuri, J.** (1997). "Enantioselective extraction of (D)-phenylalanine from racemic (D/L)-phenylalanine using chiral emulsion liquid membranes." *Journal of Membrane Science* 127: 115-130
- Pickering, P., Chaudhuri, J.** (1997). "Equilibrium and kinetic studies of the enantioselective complexation of (D/L)-phenylalanine with copper (II) N-decyl-(L)-hydroxyproline." *Chemical Engineering Science* 53(3): 377-386
- Pickering, P., Chaudhuri, J.** (1999). "Chiral phase partitioning by enantioselective complexation: Characterisation by the semi-empirical application of regular solution theory." *Chirality* 11: 241-248
- Scamehorn, J. F. und Harwell, J. H.** (1988). "Surfactant-based treatment of aqueous process streams." *Surfactants in Chemical Process Engineering* 28: 77-125
- Scamehorn, J. F. und Harwell, J. H.** (1989). "Surfactant-based separation processes." M. Dekker, New York
- Shinbo, T., Yamaguchi, T., Nishimura, K. und Sugiura, M.** (1987). "Chromatographic separations of racemic amino acids by use of chiral crown ether coated reversed-phase packings." *Journal of Chromatography* 405: 145-153
- Strube, J., Schmidt-Traub, H. und Schulte, M.** (1998). "Auslegung, Betrieb und ökonomische Betrachtung Chromatographischer Trennprozesse." *Chemie Ingenieur Technik* 70 (10): 1271 - 1279
- Subramanian, G.** (2001). "Chiral Separations." 350, Weinheim
- Topiol, S. und Sabio, M.** (1996). "Elucidation of Chiral Recognition Principles." *Enantiomer* 1: 251-265
- Webb, T. H. und Wilcox, C. S.** (1993). "Enantioselective and Diastereoselective Molecular Recognition of Neutral Molecules." *Chemical Society Reviews* 22: 383-395
- Winkler, H.** (1995). "Chirale Pharmaka z.B. S(+) Ibuprofen." *Pharmainformation Jahrgang* 10 (1)
- Wood, V. M. L., Collins, A. W., Sheldrake, J. und Crosby, J.** (1997). *Chirality and Industry* Chapter 7, Weinheim
- Yarmchuk, P.** (1982). "Selectivity in liquid chromatography with micellar mobile phases." *Analytical Chemistry* 54: 2233-2238
- Yarmchuk, P., Weinberger, R., Hirsch, R. F. und Cline Love, L. J.** (1984). "Effects of restricted mass transfer on the efficiency of micellar chromatography." *Journal of Chromatographic Science* 283: 47-60