

MAX-BUCHNER-FORSCHUNGSSTIFTUNG

Abschlussbericht

Förderprojekt : Mikroemulsionsflüssigchromatographie

1 Motivation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Einsatz von Mikroemulsionen als Eluenten bei der HPLC für die Enantiomerentrennung von Aminosäuren zu untersuchen. Da bei dieser Art der Chromatographie zwei Prozesse gleichzeitig ablaufen, nämlich Extraktion in der mobilen Phase (ein chiraler Selektor) und Adsorption an der stationären Phase (ein zweiter Selektor) ist es nötig, diese einzeln zu untersuchen. Bei der Extraktion wird ein Selektor (modifiziert mit einer Alkylkette L-Hydroxyprolin) verwendet, der in den Mikroemulsionströpfchen immobilisiert ist und nach dem Ligandenaustauschprinzip funktioniert, wo ein Komplex mit Kupfer und Enantiomer entsteht. Der zweite Selektor ist auch modifiziertes L-Hydroxyprolin, das an dem Silica Material kovalent gebunden ist (chirale Säule Astec CLC-L). Da beide Selektoren nach dem gleichen Mechanismus (Ligandenaustausch) funktionieren, ist dessen Kombination (gleiche Prozessparameter wie z.B. pH, etc.) in einem System sehr einfach.

Als erster Schritt wurde die enantioselektive Extraktion durch mizellare Ultrafiltration (MU) von zwei Aminosäuren- Phenylalanin und Tryptophan mit Mikroemulsionen untersucht [Dimitrova P., Bart H.-J., 2008]. Die Mikroemulsion wurde durch das nichtionische Tensid Nonylphenylpolyoxyethylenether (Igepal CO-630) und Cyclohexan als organische Phase erzeugt. Alle Selektoren werden in den Mikroemulsionströpfchen immobilisiert, wo auch der Selektor-Kupfer-Enantiomer Komplex gebildet wird. Die unterschiedliche Stabilität der Komplexe ist die Grundlage der Trennung, da der Komplex mit D-Enantiomeren stabiler als der Komplex mit L-Enantiomeren ist. Dabei wurden drei Selektoren verwendet: N-Heptyl-L-hydroxyprolin (C7-Hyp), N-Decyl-L-hydroxyprolin (C10-Hyp) und N-Hexadecyl-L-hydroxyprolin (C16-Hyp), die sich voneinander nur in der Kettenlänge und daher der Hydrophobizität unterscheiden [Dimitrova P., Bart H.-J. Bart, 2009a].

Als zweiter Schritt wurde die Trübungspunktextraktion mit Mikroemulsionen (ME) untersucht [Dimitrova P., H.-J. Bart, 2009b]. Leucin und Methionin waren die getesteten Aminosäuren. Ziel hier war, beide Verfahren (MU, 25°C und ME, 80°C) miteinander zu vergleichen. Es konnte festgestellt werden, dass bei der MU höhere Selektivität und Trennungseffizienz für beide Aminosäuren erreicht wurde. Bei der ME konnten in einer Stufe bis zu 40% extrahiert werden [Dimitrova P., Bart, 2009c,d].

Als dritter Schritt wurden die Adsorptionsisothermen für drei Aminosäuren (Methionin, Leucin und Tyrosin) für zwei Systeme bestimmt. Bei dem ersten wurde eine achirale C8-Säule (Zorbax-Eclipse-C8) und eine chirale mobile Phase (als Selektor N,N-Dimethyl-L-phenylalanin und Kupfer) verwendet. Es handelte sich hier wie bei der Extraktion um einen Ligandenaustauschmechanismus. Bei dem ersten System konnte man höhere Beladungen der stationären Phase als bei dem zweiten System erzielen. Bei der letzteren wurden Verdrängungseffekte beobachtet, wodurch die Plateaus zu Peaks geworden sind und keine höheren Konzentrationen gemessen werden konnten. Die Isothermen sind notwendig, um eine Modellierung der Trennung durchführen zu können.

Als nächster Schritt wurde der Einfluss von Tensiden auf die Trennung von Aminosäureenantiomeren mit chiraler mobiler Phase auf einer achiralen RP C8 Säule untersucht. Hier war es wichtig, feststellen zu können, ob die Adsorption von Tensiden auf der stationären Phase einen negativen Einfluss auf die Trennung sowie auf die Selektivität und die Effizienz hat. Sowohl im Schritt drei als auch im Schritt vier wurden van Deemter

Plots und van't Hoff Plots bestimmt, wobei die Dispersionskoeffizienten, die HETP Werte und die thermodynamischen Parameter berechnet wurden. Im letzten Schritt wurden Versuche mit Mikroemulsionen als Eluenten für die Trennung von Derivativen von Benzen und zwei Pharmazeutika durchgeführt.

2 Durchführung der Versuche

2.1 Extraktion mit Mikroemulsionen

Hier wurde die Trennung der racemischen Gemische des Phenylalanins, Tryptophans, Leucins und Methionins mittels Extraktion untersucht. Die Verteilungskoeffizienten beider Aminosäuren zwischen der Mikroemulsionsphase und der wässrigen Phase wurden mit Hilfe von Ultrafiltration bestimmt. Diese wurde in einer Filtrationszelle (Fa. Amicon, Model 8200) mit einem Volumen von 200 ml durchgeführt. Dabei wurde eine Membran mit nominaler Porengröße von 1kDa aus regenerierter Cellulose (Fa Millipore) verwendet. Die Ultrafiltration wurde im Batch-Modus bei einem Druck von 3 bar, erzeugt mit Stickstoff, durchgeführt. Für die Trübungspunktextraktionsversuche wurden 10 ml in 20 ml Bördelflaschen pipetiert und für etwa 90 Minuten auf 80°C im Wasserbad erhitzt, bis eine Phasentrennung stattgefunden hat und die Volumina der tensidhaltigen (Extrakt) und wässrigen Phasen (Raffinat) bestimmt. Für diese Versuche wurden Chemikalien mit analytischer Reinheit ohne weitere Verarbeitung und bi-distilliertes Wasser verwendet. Die Konzentrationen der Spezies (Enantiomeren und Kupfer) wurden im Permeat, bzw. Raffinat durch HPLC und Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt und mittels Massenbilanz wurden die Konzentrationen in der mizellaren Phase, bzw. im Extrakt berechnet.

2.2 Mizellare Chromatographie

Hier wurde die Trennung von racemischen Gemischen verschiedener Aminosäuren (Valin, Methionin, Leucin, Phenylalanine und Tryptophan) mittels Ligandenaustausch-Chromatographie untersucht. Dabei wurden eine chirale mobile Phase, eine achirale stationäre Phase (Eclipse XDB-C8, Fa. Agilent) und eine chirale Säule (Astec CLC-L, Fa. Sigma-Aldrich) verwendet. N,N-Dimethyl-L-phenylalanin war der chirale Selektor, der als Kupferkomplex in Wasser gelöst war. Die Versuche wurden bei konstantem Volumenstrom (1 ml/min) und Temperatur (21°C±0,5) durchgeführt. Diese beide Parameter wurden bei der Bestimmung von den van Deemter und van't Hoff Plots variiert. Es wurden fünf Tenside (Brij 35, Brij 56, Triron X-100, Tween 20 und Twenn 60) als Modifier der chiralen mobilen Phase getestet, wobei ihre Konzentrationen variiert wurden, um die Verteilungskoeffizienten mit Hilfe des Armstrong Modells bestimmen zu können. Für diese Versuche wurden Chemikalien mit analytischer Reinheit und bi-distilliertes Wasser verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Extraktion mit Mikroemulsionen

Mikroemulsionen sind optisch klare und thermodynamisch stabile disperse Systeme mit niedriger Viskosität. Sie können vom O/W (Öl in Wasser)- oder W/O (Wasser in Öl)- Typ sein, wobei in der vorliegenden Arbeit eine O/W Mikroemulsion untersucht wurde. Hier ermöglicht die Ölphase eine höhere Kapazität (mehr Selektormoleküle sind hier gelöst)

verglichen zu mizellaren Phasen und zusätzlich bieten die Nanotröpfchen große Stoffaustauschflächen, was eine schnelle Kinetik bewirkt.

Bei 25°C sind die ME einphasig und durchsichtig. Erhöht man die Temperatur, erreicht man zuerst den Trübungspunkt und danach erfolgt eine Phasentrennung (s. Foto rechts.). In der tensidreichen Phase befinden sich die gebildeten Komplexe zwischen Selektor und Enantiomeren. Aus Tabelle 1 kann man die erzielten Verteilungskoeffizienten, Effizienz und Selektivität in Abhängigkeit vom pH entnehmen. Diese Werte sind niedriger als die mit MU erzielten. Allerdings ist bei diesem Verfahren eine Aufkonzentrierung des Selektors (Faktor 6) möglich und es können bis zu 40% in nur einer Stufe extrahiert werden. Es konnte festgestellt werden, dass bei beiden Verfahren (ME und ME) mit Erhöhen des pH-Wertes die Effizienz steigt, aber die

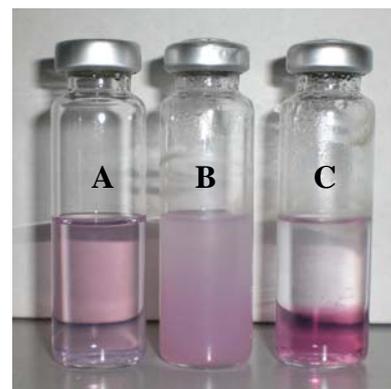


Abb. 1.: Zustand der ME bei 25°C (A); 63°C (B) und 80°C (C) (v.l.n.r.)

Tabelle 1: Verteilungskoeffizienten, Effizienz und Selektivität für D,L-Leu und D,L-Met in Abhängigkeit von pH mit C10-Hyp bei der ME bei 80°C

C ₀ mmol L ⁻¹		C10-Hyp					
		pH*	D _D	D _L	α	E ^D , %	E ^L , %
D,L-Leucin	0,45	0,5	0,03	0,03	1,01	2,70	2,67
		2	0,04	0,04	1,10	3,92	3,57
		5,20	0,06	0,05	1,17	5,36	4,63
		8,95	0,55	0,52	1,04	35,28	34,42
		11,88	0,42	0,41	1,02	29,68	29,19
D,L-Metionin	0,45	0,5	0,21	0,11	1,91	17,19	9,81
		2	0,54	0,45	1,2	34,99	30,96
		5,19	0,66	0,61	1,08	39,81	37,91
		8,91	0,45	0,40	1,14	30,98	28,33
		11,97	0,43	0,42	1,05	30,26	29,33

Selektivität abnimmt. Ein Nachteil bei der ME liegt auch in der langsamen Phasentrennung, die durch Zentrifugieren verbessert werden konnte. Außerdem ist bei der MU keine höhere Aufkonzentrierung möglich, da die Viskosität des Retentats während der Filtration ständig steigt. Man kann zusammenfassen, dass tensidhaltige Systeme (Trübungspunktextraktion, mizellare Ultrafiltration, Mikroemulsionen) einphasige Extraktion erlauben, was von Vorteil in partikelbeladenen Systemen sein kann.

3.2 Mizellare Chromatographie

Um eine chirale mobile Phase kostengünstig einzusetzen, ist eine Rückgewinnung des Selektors nötig. Dies kann mit Hilfe von Mizellen ermöglicht werden. Bei dieser Art der Chromatographie wird der Selektor in den Mizellen immobilisiert, wo auch der Komplex Selektor-Aminosäure-Kupfer gebildet wird. Dabei sind wässrige Tensidlösungen oberhalb der kritischen mizellaren Konzentration hoch effektive mobile Phasen in der HPLC, was für präparative Zwecke genutzt werden kann. Während in der Reverse Phase Flüssigchromatographie nur ein Gleichgewicht (zwischen stationärer und mobiler Phase) berücksichtigt werden muss, spielen bei der Micellar Liquid Chromatography (MLC) zwei Gleichgewichte eine wichtige Rolle (zwischen stationärer und Bulk-Phase und zwischen

mizellarer und Bulk-Phase). Dieses doppelte Gleichgewicht ist die grundlegende Eigenschaft des Systems und gibt der MLC ein Optimierungspotential für spezifische Trennungen. Mit

Hilfe des Armstrong Modells können die Verteilungskoeffizienten der Wertstoffe zwischen den Phasen bestimmt werden. Ein Beispiel ist auch in Abb. 2 dargestellt. Man kann sehen, dass bei allen Aminosäuren mit Erhöhung der Tensidkonzentration die Retentionszeiten gekürzt wurden. Dabei hat das Tensid in keiner Weise eine negative Wirkung auf die Trennung ausgeübt.

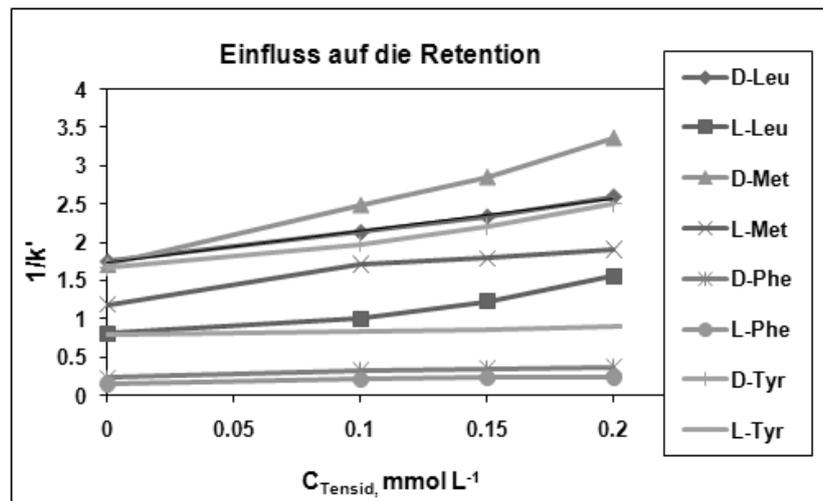


Abb. 2: Mizellare Chromatographie mit Brij 35 für Enantiomerentrennung

Setzt man Mikroemulsionen als mobile Phasen bei der HPLC an, so ist eine stärkere Verkürzung der Retentionszeiten möglich. Die Anwesenheit einer organischen Phase trägt dazu bei, dass hydrophobe Spezies im Inneren der Mizellen eingeschlossen werden können

und schneller eluieren, statt von der stationären Phase adsorbiert zu werden. Somit kann die Durchführung in Gradientenmethode vermieden werden. Ein Beispiel ist in Abb. 3 dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Mikroemulsionen als mobile Phasen verwendet werden können, und bei hydrophoben Wertstoffen konnten die Retentionszeiten um das Dreifache gekürzt werden.

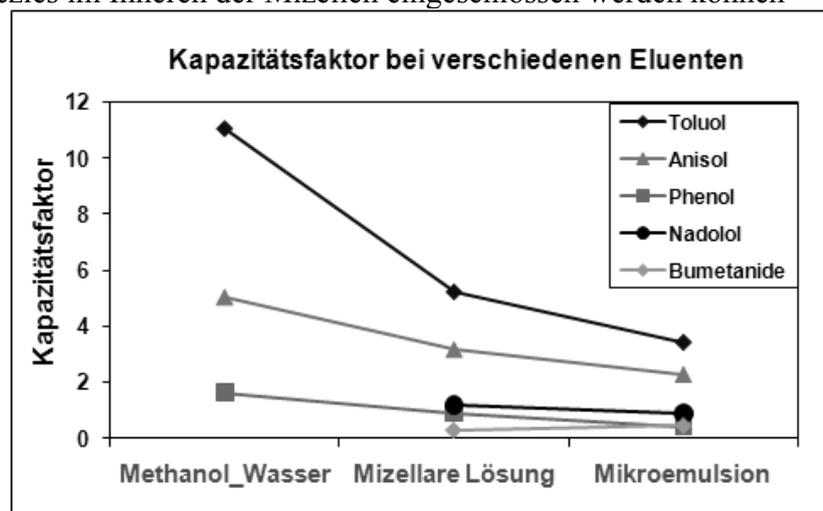


Abb. 3: Mizellare und Mikroemulsionschromatographie mit Natriumdodecylsulfat

4 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde gezeigt, dass mit Hilfe von Mikroemulsionen eine enantioselektive Trennung von Aminosäurerazematen möglich ist. Dabei wurde festgestellt, dass sich dieses Verfahren für hydrophobe Substanzen besser eignet (bessere Ergebnisse für Tryptophan als für Phenylalanin). Es wurde gezeigt, dass der pH-Wert eine große Rolle bei der Komplexbildung spielt, wobei die höchsten Verteilungskoeffizienten bei pH 7 bestimmt wurden. Es lässt sich zusammenfassen, dass Mikroemulsionen ein gutes Potential als chirale mobile Phase bei den razemischen Trennungen bei der RP Chromatographie haben. Bei der Trübungspunktextraktion, welche als eine Alternative zu der mizellaren Filtration betrachtet werden kann, waren die Selektivität und die Effizienz niedriger, dennoch ist eine Aufkonzentrierung (Faktor 6) des Selektors für seine Rückgewinnung sehr vorteilhaft.

Abschließend wurden bei der HPLC zwei Selektoren kombiniert und dabei die Gleichgewichte untersucht, bzw. Adsorptionsisothermen bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass in Anwesenheit von chiraler stationärer Phase Verdrängungseffekte stattfinden, wodurch die maximale Beladung der stationären Phase nicht bestimmt werden kann. Dabei wurden auch van Deemter und van't Hoff Plots bestimmt, um die Effizienz, die Selektivität und die thermodynamischen Parameter zu berechnen.

Des Weiteren wird eine mathematische Modellierung der chromatographischen Trennung mittels des Dispersionsgleichgewichtsmodells durchgeführt.

5 Veröffentlichungen und Vorträge

- * Dimitrova P., H.-J. Bart, „Isomerentrennung mittels Mikroemulsionschromatographie“, ProcessNet-Arbeitsausschüsse „Adsorption“ und „Extraktion“ und des Arbeitskreises „Molekulare Modellierung und Simulation für Prozess- und Produktdesign“, Asselheim, 2007
- * Dimitrova P., H.-J. Bart, „Mikroemulsionschromatographie“, 4. Doktorandenseminar: Chromatographische Trennprozesse "PURIFICATION OF BIOLOGICALS", Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg Campus Bergedorf Fakultät Life Sciences, Hamburg, 2007
- * Dimitrova P., H.-J. Bart, „Enantioselektive Trennung von Aminosäuren mittels chiraler Ligandenaustausch-Chromatographie“, ProcessNet-Fachausschüsse Adsorption und Fluidverfahrenstechnik, Bingen, 2008
- * Dimitrova P., H.-J. Bart, „Extraktion von Aminosäuren enantiomeren mit Mikroemulsionen“, ProcessNet-Fachausschusses Extraktion und des Arbeitskreises Phytoextrakte, Clausthal-Zellerfeld, 2008
- * Dimitrova P., H.-J. Bart, „Enantioselective separation of amino acids with a chiral ligand exchange chromatography“, CHISA, Prague, 2008
- * Dimitrova P., H.-J. Bart, „Trübungspunktextraktion mit enantioselektiven Mikroemulsionen“, Jahrestreffen der ProcessNet Fachausschüsse CDF, Extraktion & Mischvorgänge, Fulda, 2009
- * Dimitrova P., H.-J. Bart, „Chiral separations with microemulsions“, Achema, Frankfurt, 2009
- * H.-J. Bart, P. Dimitrova, A. Kostova, M. Schmidt, Process Intensification with Integrated Separation Principles. Proceed. PRES'07, J. Klemes (Ed.), Vol. 2, 519-524, AIDIC, 2007, Milano"
- * P. Dimitrova, H.-J. Bart. Enantioselective separation of amino acids with a chiral ligand exchange chromatography. CHISA 2008, 18th International Congress of Chemical and Process Engineering., Praha, Czech Republic, Proceed. CD, 2008
- * P. Dimitrova, H.-J. Bart. Aminosäuren enantiomerentrennung mit Ligandenaustausch-Chromatographie. (2008). *Chem. Ing. Tech.* 80 (9) 1311-1312
- * P. Dimitrova, H.-J. Bart. Adsorptionsisothermen mit chiralen mobilen Phasen. (2009). *Chem. Ing. Tech.* 81 (8) 1075
- * P. Dimitrova, H.-J. Bart, Extraction of amino acids enantiomers with microemulsions, *Chem. Eng. Technol.* 2009, 32, No.10, 1527-1534
- * P. Dimitrova, H.-J. Bart, Chirale Trennungen mittels Mikroemulsionen, *Chem. Eng. Tech.* 2009 (DOI: 10.1002/cite.200900161)
- * P. Dimitrova, H.-J. Bart, Modified ligand exchange chromatography for enantioselective amino acids separation, *Anal. Chim. Acta*, 663, 2010, 109-116

6 Literaturverzeichnis

- Armstrong D.W. and Nome F., 1981, *Anal. Chem.* (53) 1662-1666
- Bart H.-J., *Chem. Ing. Tech.*, 2005, 77, 11, 1773-1783
- Bart H.-J., *Reactive Extraction*, Springer, 2001, Berlin
- Breuer M., Ditrich K., Habicher T., Hauer B., Keßeler M., Stürmer R., Zelinski T., *Angew. Chem. Int. Ed* 2004, 43, 788-824
- Davankov V.A, *Ligand-exchange chromatography of chiral compounds*, in: D Cagniant (Ed.), *Complexation Chromatography*, M. Dekker, New York, 1992, pp 197-245.
- Hamid R. Rabie and Juan H. Vera, *Ind. Ing. Chem. Res.*, 1996, 35, 3665-3672
- Hébrant M., Burgoss P., Assfeld X., Joly J.-P., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, 998-1004
- Hinze W. L., Pramauro E., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993), 133-177
- Huie C.W., *Electrophoresis* 2006, 27, 60-75
- Kostova A., Bart H.-J., *Sep. Purif. Technol.*, 54 (2007) 340-348
- Lough M. J., *Chiral Liquid Chromatography*, Blackie & Son Ltd, 1989
- Motonari A., Makoto H., Akihisa S., Yasuo S., *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 7925-7931
- Maier N.M., Franko P., Lindner W., *J. Chromatogr., A*, 2001, 906, 3-33
- Overdevest P.E.M., de Bruin T.J.M, Südholler E.J.R., van't Riet K., Keurentjes J.T.F., van der Padt A., *Ind. Eng. Chem. Res.* 2001, 40, 5991-5997
- Overdevest P.E.M., Schutyser M.A.I., de Bruin T.J.M, van't Riet K., Keurentjes J.T.F., van der Padt A., *Ind.Eng.Chem. Res.*, 2001, 40, 5998-6003
- Pickering P. and Chaudhuri J., *Chirality* 1997, 9, 261-267
- Pickering P. J. and Chaudhuri J. B., *J. Membr. Sci.*, 1997, 127, 115-130
- Pramauro E. and Prevot A. B., *Pure Appl. Chem.*, 1995, Vol. 67, No. 4, 551-559
- Quina F. H., Hinze W. L., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38 (1999), 4150-4168
- Shinoda K. and Saito H., *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, 26, 70-74
- Steensma M., "Chiral separation of amino-alcohols and amines by fractional reactive extraction", *Dissertation*, University Twente, 2005, Febodruck, Netherlande
- Takeuchi T., Horikawa R. and Tanimura T., *Anal. Chem* 1984, 56, 1152-1155