

HPLC-Untersuchungen

5 HPLC-Methodenentwicklung zur Isomerentrennung

Die bei der N-Substitution des Benzimidazolgrundgerüsts entstehenden Isomere machen eine nachfolgende Trennung erforderlich. Diese erfolgte aufgrund der besseren Auftrennung der 5-(6)-OH-Benzimidazole gegenüber den analogen 5-(6)-Methoxy-Isomeren größtenteils nach der Umsetzung der Methoxy- zu ihren Hydroxyverbindungen. Herkömmliche säulenchromatographische Verfahren an polaren stationären Phasen wie Kieselgel oder Aluminiumoxid führten aufgrund der hohen Lipophilie der Verbindungen nicht zum Ziel. Erschwerend kam hinzu, dass es sich bei den Isomeren um Stellungsisomere handelt, die sich lediglich in der Position der Methoxy- bzw. Hydroxygruppe am Benzimidazol unterscheiden (5- oder 6-Position) (Abb. 40).

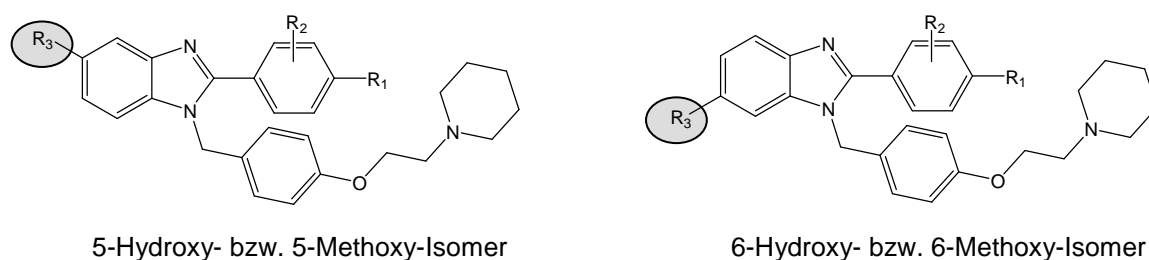


Abb. 40: Allgemeine Strukturformeln der Benzimidazol-Isomere ($R_3 = \text{OH}, \text{OCH}_3$).

Aus diesem Grund wurde die MPLC an unpolaren stationären Phasen als Trennmethode gewählt. Zunächst stand die Entwicklung einer geeigneten Methode im analytischen Maßstab im Vordergrund (HPLC), die dann auf eine präparative Säule (MPLC) übertragen werden sollte. Die Bedingungen müssen so gewählt werden, dass es zu einer guten Auftrennung der Isomeren kommt, während die Retentionszeiten möglichst kurz sein sollten.

Eine chromatographische Stofftrennung wird im Wesentlichen durch die stationäre Phase, die mobile Phase, die Fließgeschwindigkeit und durch das zu trennende Stoffgemisch bestimmt.

5.1 Umkehrphasen-Chromatographie

Im Gegensatz zur klassischen Chromatographie, die mit polaren stationären Phasen, wie Aluminiumoxid oder Kieselgel und weniger polaren Fließmitteln arbeitet, kommen bei der Umkehrphasen-Chromatographie (reversed-phase-chromatography) unpolare stationäre Phasen und polare Fließmittel zum Einsatz. Hierbei werden unpolare Substanzen stark zurückgehalten, während polare Stoffe leichter eluiert werden ^[205].

5.2 Stationäre Phase

Durch eine nachträgliche Oberflächenbehandlung des Kieselgels mit Organochlorsilanen oder Alkoxychlorsilanen kann die Polarität umgekehrt werden und man erhält stationäre Phasen mit lipophilem Charakter. Zur Auftrennung der synthetisierten Verbindungen wurde Eurospher 100 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein apolares Säulenmaterial, das sich durch hohe chemische und mechanische Stabilität auszeichnet. Die Kieselgeloberfläche ist mit Octadecylsilylgruppen (RP-18) belegt.

5.3 Mobile Phase

Die Verwendung eines Puffers war zwingend notwendig um symmetrische Peaks und eine ausreichende Auflösung zu erreichen. Eine mobile Phase aus den 3 Komponenten Acetonitril, Methanol und Acetatpuffer (pH 5.5) erwies sich als geeignet. Die prozentuale Zusammensetzung des Laufmittels wurde an die jeweilige Verbindung angepasst.

5.4 Detektion

Die Detektion der zu trennenden Verbindungen erfolgte durch UV-Messung bei 300 nm. Alle Verbindungen wiesen aufgrund des Benzimidazolrings bei dieser Wellenlänge eine ausreichende Absorption auf (Kap. 7).

5.5 Methodenentwicklung zur Isomerentrennung (MPLC)

Durch Variation der Fließmittelkomponenten und der prozentualen Zusammensetzung wurde das Laufmittel optimiert. Ohne Pufferzusatz konnte keine Trennung erreicht werden. Die Zusammensetzung der 3 Komponenten Acetatpuffer (pH 5.5), Acetonitril und Methanol im Verhältnis 60:20:20 erwies sich als optimal für das Trennungsproblem der 5- und 6-Hydroxy-Isomere. Abbildung 41 zeigt die Verbindungen, die mittels MPLC in ihre Isomere aufgetrennt werden sollten.

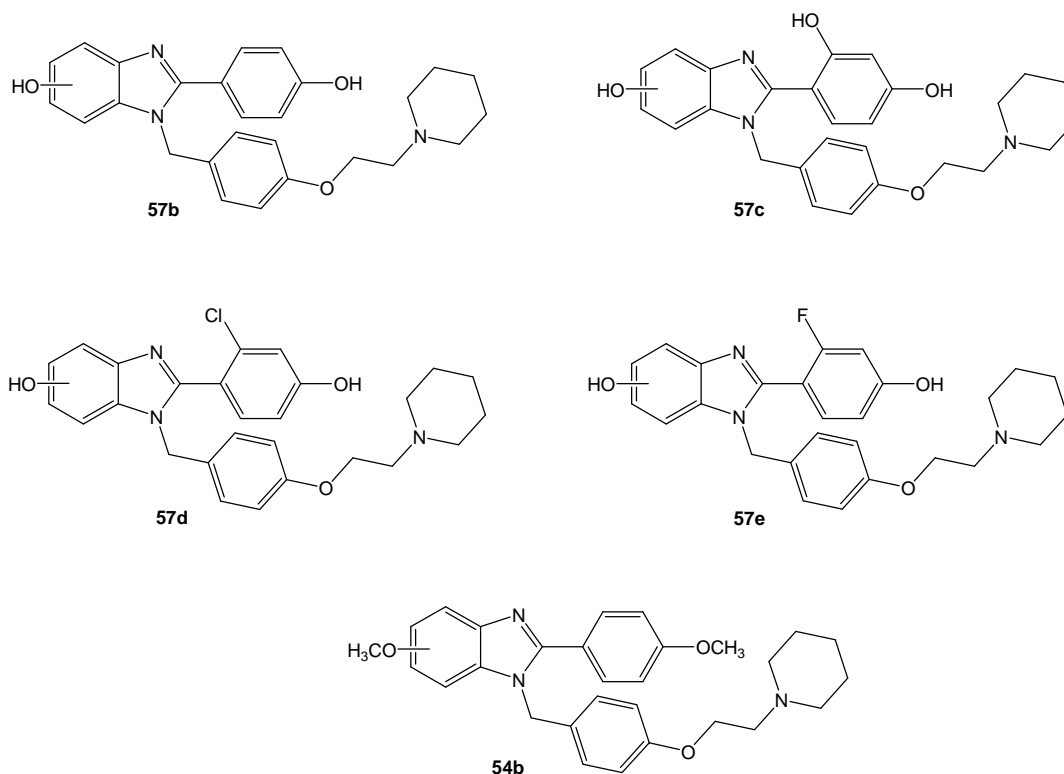


Abb. 41: Mittels MPLC zu trennende Isomerenpaare.

Abbildung 42a zeigt exemplarisch für das Benzimidazol **57b** die Auswirkung der unterschiedlichen prozentualen Zusammensetzung der mobilen Phase aus Methanol (M), Acetonitril (A) und Acetatpuffer pH 5.5 (P). Durch Erhöhung des Pufferanteils kam es bei leichter Peakverbreiterung zur Erhöhung der Retentionszeit und einer verbesserten Isomerentrennung.

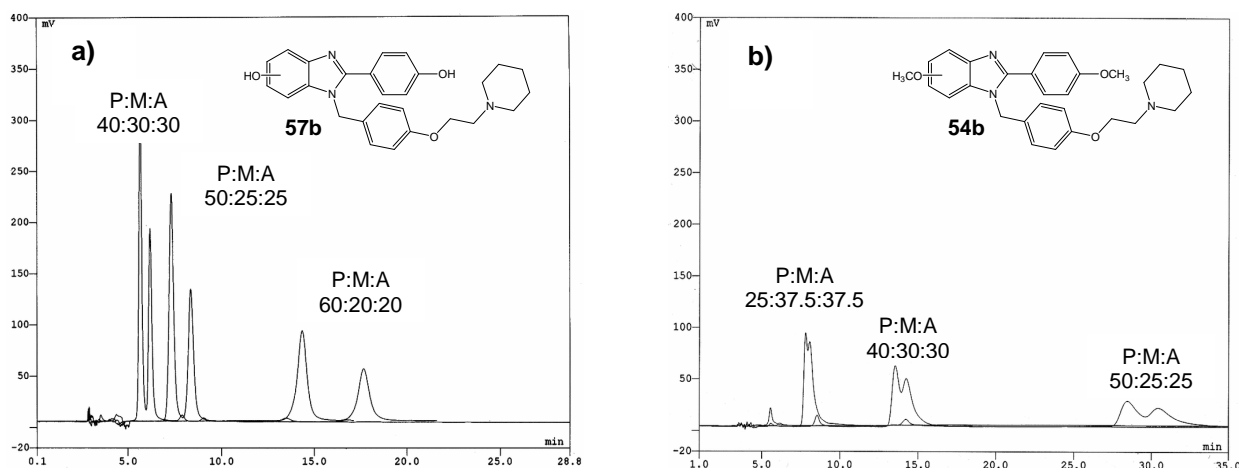


Abb. 42: Überlagerung der HPLC-Chromatogramme der Isomerenpaare bei unterschiedlicher prozentualer Fließmittelzusammensetzung.

a) **57b**

b) **54b**

Ähnliche Beobachtungen ließen sich für Verbindung **54b** machen (Abb. 42b). Der Versuch, die Isomeren der analogen Methoxyverbindung zu isolieren, erwies sich jedoch als deutlich komplizierter und wurde deshalb in der Reihe der Methoxy-Isomeren nur an Verbindung **54b** durchgeführt.

Wie bereits in Kapitel 4.8 beschrieben, erfolgte die Trennung der Stellungsisomere der übrigen Verbindungen erst nach der Etherspaltung in Form der Hydroxy-Verbindungen **57b**, **57c**, **57d** und **57e**. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich kam es mit zunehmender Lipophilie der Verbindungen zu einer Erhöhung der Retentionszeit. Die Trihydroxyverbindung **57c** konnte nicht in ihre Isomeren getrennt werden.

Verbindung	Puffer [%]	Methanol [%]	Acetonitril [%]	t _R II [min]	t _R I [min]
57b	60	20	20	14.36	17.67
57c	-	-	-	-	-
57d	60	20	20	22.20	28.31
57e	60	20	20	21.43	27.56
54b	50	25	25	28.45	30.44

Tab. 10: Fließmittelzusammensetzung und Retentionszeiten t_R für die Isomerentrennung der Verbindungen **57b**, **57c**, **57d**, **57e** und **54b**. II entspricht dem 6-Hydroxy- bzw. 6-Methoxy-Isomer, I entspricht dem 5-Hydroxy- bzw. 5-Methoxy-Isomer.

Tabelle 11 macht deutlich, dass die Bildung des Isomers mit der Hydroxygruppe in 6-Position bei der N-Substitution bevorzugt ist.

Verbindung	Isomer II [%]	Isomer I [%]
57b	60	40
57d	78	22
57e	76	24

Tab. 11: Isomerenverhältnisse der Verbindungen **57b**, **57d** und **57e**. Isomer I entspricht dem 5-Hydroxy-Isomer, Isomer II dem 6-Hydroxy-Isomer.

5.6 Präparative Isomerentrennung

Ein Laufmittelgemisch aus Acetatpuffer, Methanol und Acetonitril im Verhältnis 60:20:20 erwies sich bei der analytischen HPLC als optimal für die Trennung der Hydroxyverbindungen und wurde ebenfalls für präparative Zwecke angewendet. Bei der Trennung von Methoxyverbindung **54b** musste der Pufferanteil auf 50% herabgesetzt werden, da es sonst zu einer sehr starken Peakverbreiterung und langer Retentionszeit kommt. Aufgrund der nur geringfügigen strukturellen Unterschiede war die präparative Trennung nur in sehr kleinem Maßstab möglich. Es konnten maximal 3-4 mg Substanz aufgetragen werden, so dass für eine Verbindung bereits mehrere Durchläufe erforderlich waren.

Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und zur Freisetzung aus ihren Salzen mit einer 5%-igen NaHCO_3 -Lösung versetzt und 10 Minuten gerührt. Im Anschluss konnte das Produkt mit Dichlormethan aus der wässrigen Phase extrahiert werden. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na_2SO_4 und Abziehen des Lösungsmittels wurden die jeweiligen Isomere analysenrein erhalten.