



Whitepaper

# **METHODENENTWICKLUNG IN DER CHIRALEN LC & SFC**

Dr. Ute Schlund, Dr. Daniel Eßer, Dr. Anja Bräutigam  
[schlund@ymc.de](mailto:schlund@ymc.de), [esser@ymc.de](mailto:esser@ymc.de), [braeutigam@ymc.de](mailto:braeutigam@ymc.de)

## Inhalt

Einleitung.....	3
Gecoatete Polysaccharide.....	3
Immobilisierte Polysaccharide .....	4
Chirale Methodenentwicklungsstrategie für Normalphase .....	5
First-Choice-Eluenten .....	5
Second-Choice-Eluenten .....	5
Additive .....	6
NP Beispiel.....	7
Strategie zur chiralen Methodenentwicklung für Reversed Phase.....	10
Einfluss des pH-Wertes .....	11
RP Beispiel.....	12
Strategie zur chiralen Methodenentwicklung für die SFC.....	15
CHIRAL ART Säulen im SFC-Modus .....	15
First- and Second-Choice Eluenten.....	16
SFC Beispiel .....	16
Aufskalierung zum präparativen Prozess.....	17
Effektivität von SFC-Trennungen .....	18
Vorteile der SFC-Trennung.....	18
Beispiel einer chiralen Methodenentwicklung für LC-MS .....	19
Chirales RP Screening .....	20
Trennung in weniger als 20 Minuten .....	20
Transfer von LC-UV zu LC-MS/MS.....	21
Beispiel-Chromatogram mit Enantiomer A1 beim LOQ in Weintrauben-Matrix-Extrakt..	22
Chromatographische Performance-Parameter.....	23
Zusammenfassung .....	24
Literatur .....	24
Kontakt.....	24

## Einleitung

Analytische Methoden zur Bewertung der Enantiomeren-Reinheit von Medikamenten und anderen Substanzen sind von zentraler Bedeutung in der pharmazeutischen und chemischen Industrie. Die chromatographische Isolierung von reinen Enantiomeren im analytischen und präparativen Maßstab ist heutzutage Routine.

Polysaccharide, wie Cellulose und Amylose, sind natürlich vorkommende Polymere, welche in ihrer Struktur vielschichtige chirale Informationen beinhalten. In den frühen Achtzigern begann eine Gruppe japanischer Wissenschaftlicher damit, diese zu derivatisieren, um ihre chirale Erkennungsfähigkeit zu verbessern und um sie auf ein Silica-Gel aufbringen (coaten) zu können [1, 2]. Dieser bahnbrechende Schritt mündete in den Polysaccharid-Derivaten (Abbildung 1), die als bevorzugter und vielfältigster Selektor für analytische und präparative Trennungen von Enantiomeren mittels Flüssigkeits- und superkritischer Fluidchromatographie (LC und SFC) eingesetzt werden.

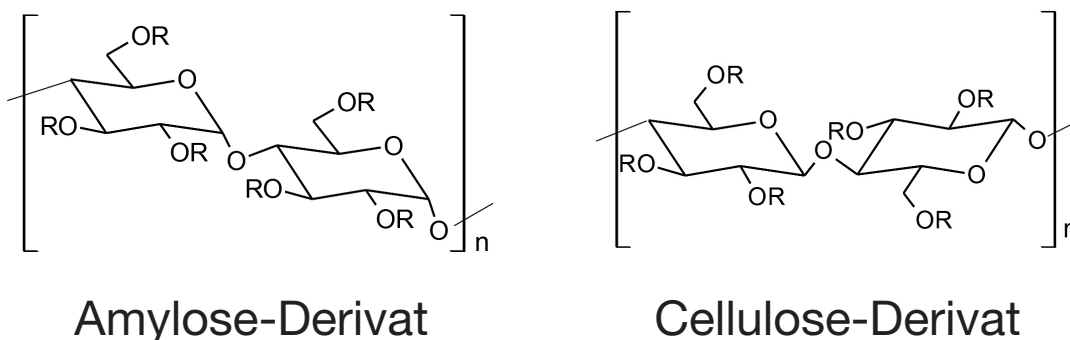


Abbildung 1: Chirale Selektoren: Amylose- und Cellulose-Derivative.

### Gecoatete Polysaccharide

YMC hat erfolgreich eine neue Familie chiraler Produkte für die chirale LC/SFC entwickelt: CHIRAL ART Amylose-C und CHIRAL ART Cellulose-C. Das Silica-Packmaterial ist mit den Polysaccharid-Derivaten beschichtet (gecoatet). Mit diesen beiden verschiedenen Selektoren wird ein breiter Applikationsbereich abgedeckt. Sie zeigen hohe Stabilität und sind deshalb auch für die SFC und Simulated-Moving-Bed (SMB) Trennungen geeignet. Diese Phasen sind von 3 µm bis 20 µm voll skalierbar und finden im analytischen und präparativen Bereich Anwendung.

Tabelle 1: Eigenschaften der gecoateten chiralen Polysaccharid-Phasen

Spezifikationen	CHIRAL ART Amylose-C	CHIRAL ART Cellulose-C
Partikelgröße	3, 5, 10, 20 µm	
Chiraler Selektor	Amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbammat)	Cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbammat)
USP	L51	L40
Typ	Gecoated	
Trennmodus	NP/SFC	
Temp.-Bereich	0-40 °C	
Drucklimit	300 bar / 30 MPa / 4350 psi	

Da das Silica-Packmaterial mit den Polysaccharid-Derivaten gecoated ist, können Lösungsmittel wie THF, Aceton, Ethylacetat, Chloroform, Dichlormethan, DMSO und DMF ggf. den chiralen Selektor selbst ablösen. Diese Lösungsmittel sollten in der mobilen Phase und im Proben-Lösungsmittel vermieden werden.

### Immobilisierte Polysaccharide

Aufgrund der Notwendigkeit von Phasen zur Analyse von polaren Verbindungen und Trennungen im RP-Modus, wurde eine neue Serie von immobilisierten Polysaccharid-basierten chiralen Phasen (Chiral Stationary Phases, CSPs) entwickelt.

YMC wendet dazu eine innovative Technologie zur Immobilisierung von Polysaccharid-Derivaten an, um die immobilisierten Polysaccharid-Phasen CHIRAL ART Amylose-SA, CHIRAL ART Cellulose-SB und CHIRAL ART Cellulose-SC herzustellen. Diese stellen eine Serie von chiralen Trennsäulen mit hoher Stereo-Selektivität dar. Sie sind geeignet für Trennungen eines breiten Spektrums an chiralen Substanzen, cis-trans-Isomeren und geometrischen Isomeren. Die verfügbaren Partikelgrößen und Säulendimensionen ermöglichen eine einzigartige Wirtschaftlichkeit für analytische und präparative Trennungen.

Tabelle 2: Eigenschaften der immobilisierten Polysaccharid-Chiralphasen

Spezifikationen	CHIRAL ART Amylose-SA	CHIRAL ART Cellulose-SB	CHIRAL ART Cellulose-SC
Partikelgröße	3, 5, 10, 20 µm		
Chiraler Selektor	Amylose tris (3,5-dimethylphenyl- carbamat)	Cellulose tris (3,5-dimethylphenyl- carbamat)	Cellulose tris (3,5-dichlorophenyl- carbamat)
Typ	Immobilisiert		
Trennmodus	NP/ RP/ SFC		
Temp.-Bereich	0-40 °C		
pH-Bereich	2,0 – 9,0		
Drucklimit	300 bar / 30 MPa / 4350 psi		
Anwendbare organische Lösungsmittel	<i>n</i> -Hexan, <i>n</i> -Heptan, Chloroform, Dichlormethan, <i>tert</i> -Butylmethylether, Ethylacetat, THF, Alkohole, Acetonitril etc.		

CHIRAL ART Säulen sind aktuell mit drei verschiedenen Typen der immobilisierten Polysaccharid CSPs, welche auf hoch stabilen super-wide-pore Silikapartikeln mit 3, 5, 10 und 20 µm Durchmesser basieren, verfügbar. Für die jeweiligen chiralen Selektoren werden übereinstimmende Retentions- und Selektivitäts-Parameter über den gesamten Partikelgrößenbereich erzielt.

All diese innovativen Eigenschaften beruhen auf dem proprietären Immobilisierungs-Prozess, welcher den Vorteil der erweiterten Lösungsmittel-Kompatibilität, der breiten chiralen Erkennungsfähigkeit, der hohen chromatographischen Effizienz und der exzellenten Reproduzierbarkeit ermöglicht.

Aufgrund ihrer Immobilisierung können diese CSPs mit vielfältigen Lösungsmitteln eingesetzt werden: Es können mobile Phasen verschiedener Zusammensetzung genutzt werden, beginnend mit Alkohol-Alkan-Mischung bis zu mobilen Phasen welche *tert*-Butylmethylether (MTBE), Tetrahydrofuran (THF), chlorierte Lösungsmittel, Ethylacetat und weitere Lösungsmittel enthalten.

## Chirale Methodenentwicklungsstrategie für Normalphase

Jede Methodenentwicklung beginnt mit der Festlegung der initialen Bedingungen wie der Säule selbst und der mobilen Phase. Das ist besonders bei chiralen Trennungen herausfordernd, da theoretische Vorhersagen in Bezug auf den geeigneten chiralen Selektor für das Zielmolekül nicht getroffen werden können. Der erste Schritt beim Methoden-Screening ist es also, verschiedene CHIRAL ART Säulen zu testen und anschließend die weitere Methodenentwicklung mit der Säule durchzuführen, die die besten Ergebnisse zeigte. Im Folgenden werden Beispiele für das NP-, RP- und SFC-Methoden-Screening aufgezeigt.

Gecoatete und auch immobilisierte CHIRAL ART Säulen können für das Normalphasen-Screening eingesetzt werden. Jedoch können, obwohl die First-Choice Eluenten mit gecoateten und immobilisierten Eluenten verwendet werden können, die Second-Choice Eluenten nur mit den immobilisierten Säulen angewendet werden.

### First-Choice Eluenten

First-Choice Eluenten sind Mischungen aus Alkanen wie z. B. *n*-Hexan mit 2-Propanol oder Ethanol. Basierend auf vorrangegangenen experimentellen Daten, können die Zusammensetzungen aus Tabelle 3 als Ausgangspunkt genommen werden und entsprechend der zu trennenden Verbindung angepasst werden. Das Retentionsverhalten der Verbindung wird die Zusammensetzung der mobilen Phase bestimmen. Mit diesen so genannten First-Choice Daten kann man entscheiden, was die besten Lösungsmittel oder Lösungsmittelzusammensetzungen sind um die Tests durchzuführen.

### Second-Choice Eluenten

Wenn mit dem First-Choice Screening der mobilen Phase kein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht wird, können weitere Lösungsmittel, wie THF, Dichlormethan oder MTBE, einbezogen werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mobile Phasen für das initiale Screening

Eluent A/B	First Choice		Second Choice*		
	<i>n</i> -Hexan/ 2-Propanol	<i>n</i> -Hexan/ Ethanol	<i>n</i> -Hexan/ THF	<i>n</i> -Hexan/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<i>n</i> -Hexan/ MTBE
Gradient B	10-50%	10-50%	10-50%	30-50%	30-50%
Gradientenzeit	0-20 min	0-20 min	0-20 min	0-20 min	0-20 min

\* Nur anwendbar bei immobilisierten Phasen

Wenn Dichlormethan für die immobilisierten Säulen verwendet wird, ist für schwach retardierende Substanzen eine Mischung aus Dichlormethan und Alkan geeignet. Für Proben mit stärkerer Interaktion mit der stationären Phase, ist aber wiederum der Zusatz eines Alkohols zum Dichlormethan notwendig. EtOH hat sich aufgrund seiner universalen Mischbarkeit als Option bewährt, aber auch Methanol ist aufgrund seiner geringeren Viskosität und stärkeren Elutionskraft einsetzbar. Alkane sollten nicht mit Dichlormethan, welches MeOH enthält, kombiniert werden, um mögliche Inkompatibilitäten aufgrund fehlender Mischbarkeit zu vermeiden.

### Additive

Für basische und saure Analyten ist es oft notwendig ein Additiv zur mobilen Phase zuzugeben, um starke achirale Wechselwirkungen zu minimierend oder zu verhindern. Diese Art der Interaktion dient nicht der enantioselektiven Erkennung, könnte aber eine breite Peakform, Peak tailing und eine übermäßige Retention verursachen. Aus diesem Grund können basische Substanzen basische Additive (wie Diethylamine (DEA), Butylamin, Ethanolamin oder Ethylendiamin) und saure Substanzen den Zusatz von sauren Additiven (z.B. Trifluoressigsäure (TFA), Essigsäure oder Ameisensäure (FA)) erfordern. Der typische Anteil beträgt 0,1%.

TFA kann für einige gecoatete Amylose-Phasen bezüglich der Retentionszeit-Stabilität und Säulenlebensdauer herausfordernd sein. CHIRAL ART Amylose-C zeigt hingegen eine verbesserte Stabilität wenn mobile Phasen mit TFA eingesetzt werden. Das Retentionsverhalten und die Säuleneffizienz bleiben vollständig unbeeinflusst (Abbildung 2). Deshalb gibt es keine Limitierung bei der Verwendung als Additiv für gecoatete CHIRAL ART Phasen.

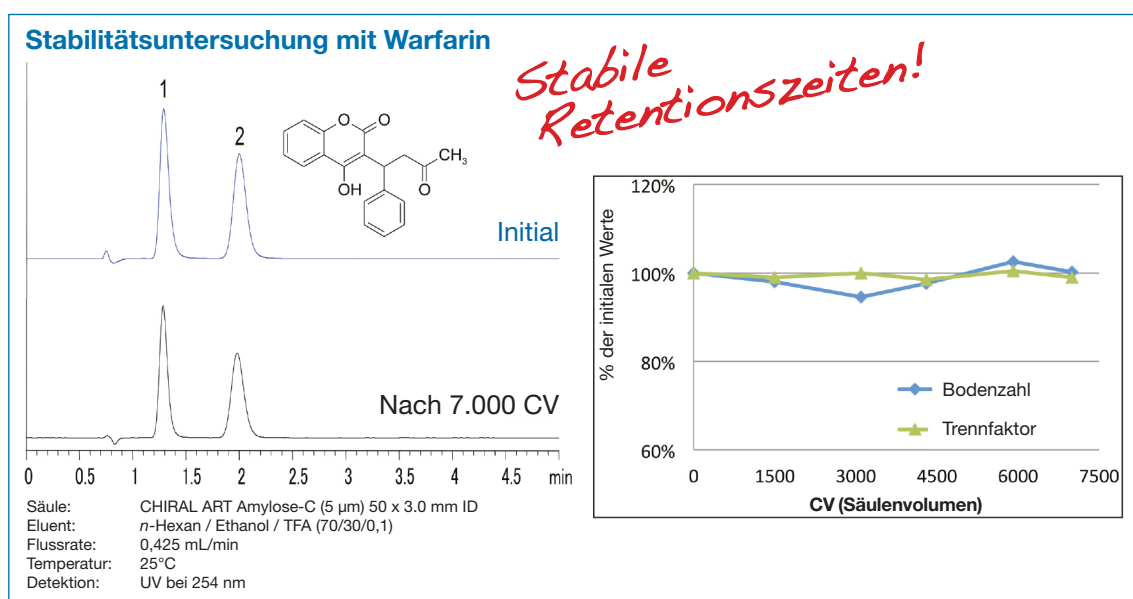


Abbildung 2: Stabilitätsuntersuchung mit Warfarin.

**NP Beispiel**

Als Screening-Beispiel im NP-Modus wurde Astaxanthin verwendet, mit dem Ziel alle drei Enantiomere **1**, **2** und **3** mit hoher Auflösung und kurzen Retentionszeiten zu trennen. Die zwei gecoateten Phasen CHIRAL ART Amylose-C und Cellulose-C wurden eingesetzt. Zusätzlich war CHIRAL ART Cellulose-SB, als immobilisierte Phase mit dem gleichen chiralen Selektor wie Cellulose-C, Teil der Phasenauswahl.

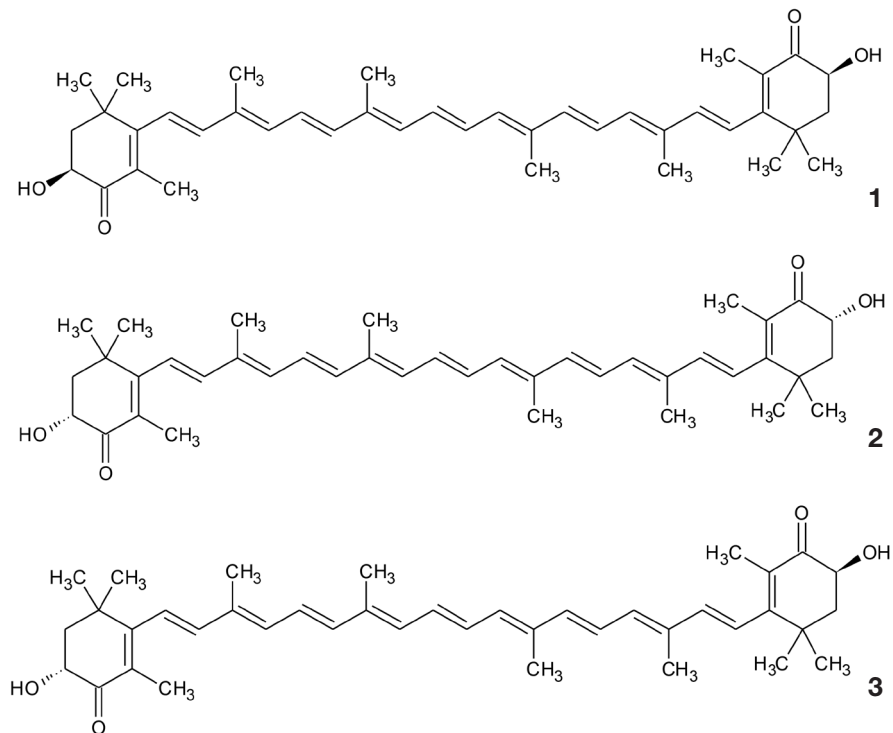


Abbildung 3: (1S,1'S)-all-trans-Astaxanthin (1), (1R,1'R)-all-trans-Astaxanthin (2), (1R,1'S)-all-trans-Astaxanthin (3).

Bei diesem Screening wurde mit den First-Choice Eluenten keine Trennung erreicht. Deshalb wurden andere Lösungsmittel wie THF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oder MTBE als Second-Choice Eluenten einbezogen. Diese Lösungsmittel können nicht bei den gecoateten Phasen eingesetzt werden, da diese nicht stabil sind. Das beste Ergebnis für die Astaxanthin-Enantiomere wurde mit CHIRAL ART Cellulose-SB in Kombination mit *n*-Hexan und THF erzielt.

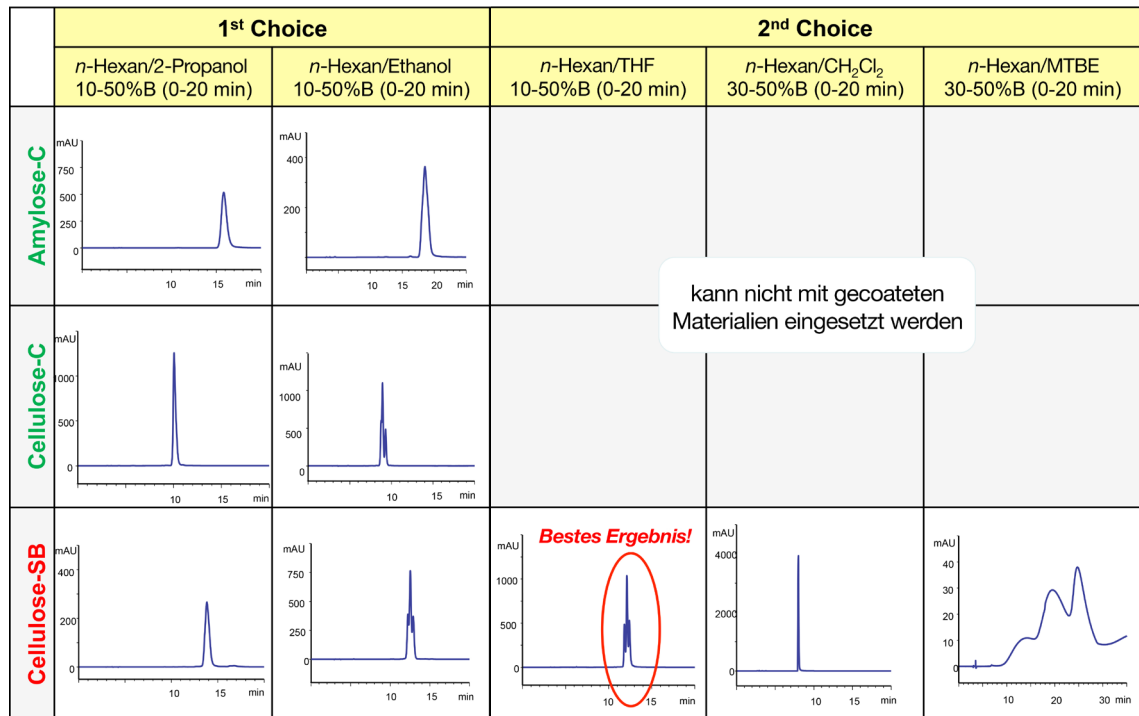


Abbildung 4: Primär-Screening von Astaxanthin auf CHIRAL ART Amylose-C, Cellulose-C und Cellulose-SB.

Dieses Primär-Screening der Lösemittel ist ein idealer Ausgangspunkt für die weitere Optimierung. Dabei müssen die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

- Säulendimension
- Gradient => isokratisch
- Flussrate
- Temperatur
- Injektionsvolumen
- Additive:    basisch: z.B. DEA, Ethanolamin  
                  sauer:  z.B. TFA, Ameisensäure

Abbildung 5 zeigt beispielhaft die zielgerichtete Optimierung basierend auf dem Primär-Screening.

- 1.) Für das Primär-Screening wurde ein Gradient von 10-50% B verwendet.
- 2.) Diese Methode wurde auf isokratische Bedingungen transferiert, indem eine 15-20% niedrigere Zusammensetzung, als die bei der die Substanz unter Gradientbedingungen eluiert, gewählt wurde.

→ Bestes Ergebnis war *n*-Hexan/THF 85/15.

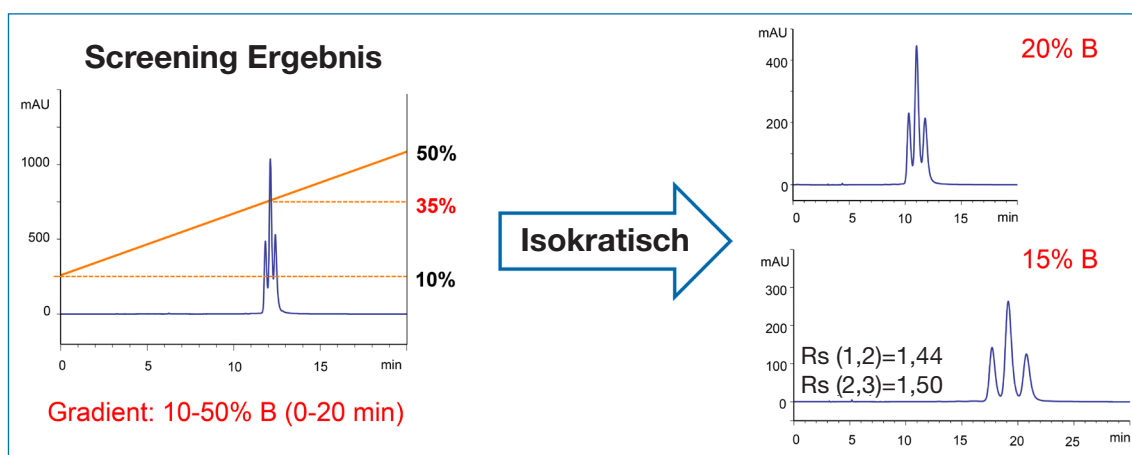


Abbildung 5: Methodenoptimierung unter Verwendung von isokratischen Bedingungen.

Zusätzliche Optimierung kann erreicht werden, indem man die Flussrate anpasst. Eine Änderung der Flussrate von 1,0 mL/min zu 0,5 mL/min führte zu einer erhöhten Auflösung. Wie in Abbildung 6 gezeigt, wurde die Auflösung zwischen Peak 1, 2 und 3 verbessert.

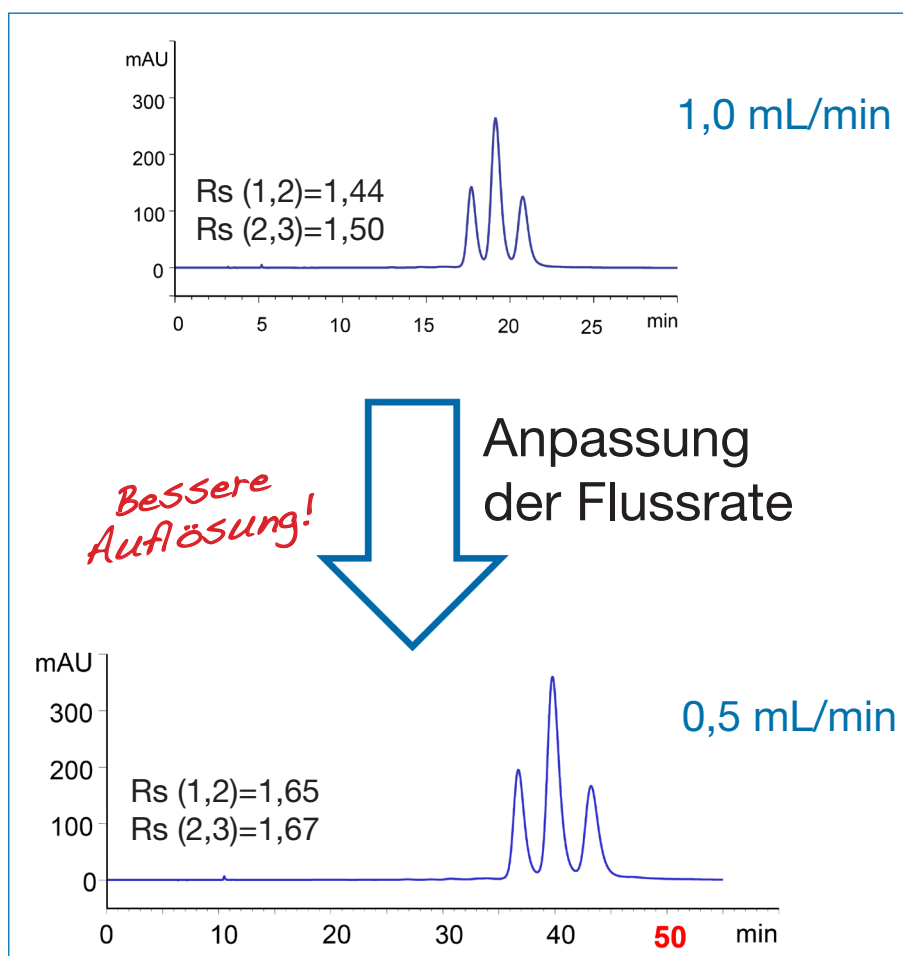


Abbildung 6: Methodenoptimierung durch Anpassung der Flussrate.

## Strategie zur Methodenentwicklung für Reversed Phase

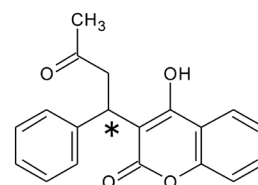
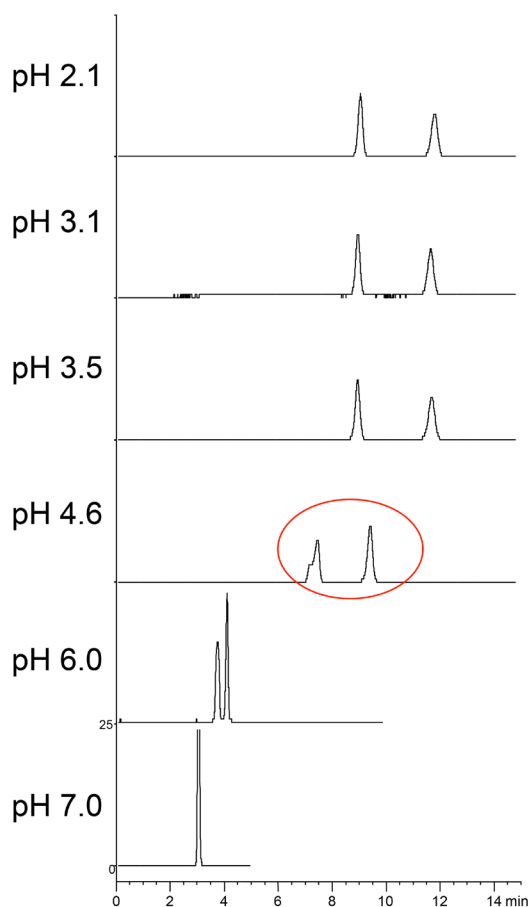
Analyten für den RP-Modus sind hydrophile Verbindungen, welche nur schwerlöslich in NP-Eluenten sind. Dies schließt auch salzbildende Verbindungen ein. Hier können gecoatete Phasen nicht mehr eingesetzt werden. Immobilisierte Phasen wie CHIRAL ART Amylose-SA, Cellulose-SB und Cellulose-SC sind hier die erste Wahl. Die immobilisierten Phasen sind universell einsetzbar für RP, NP und SFC. Typische RP-Eluenten, welche Kombinationen aus Acetonitril, Methanol, 2-Propanol, und THF mit einem wässrigen Lösungsmittel einschließen, können mit einem Gradienten von 5% – 80% organischen Anteil gefahren werden.

Tabelle 4: Mögliche mobile Phasen im RP-Modus

Organische mobile Phase	pH-Wert (aq.)
Acetonitril	Sauer (pH 2,9) 0,1% HCOOH
Methanol	Neutral (pH 6,9) 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
2-Propanol	Alkalisch (pH 9,0) 20 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
THF	pH 9 mit DEA einstellen

### Einfluss des pH-Wertes

Für saure und basische Analyten spielt der pH-Wert der mobilen Phase eine sehr wichtige Rolle. Untersuchungen von sauren Substanzen wie Warfarin (pKa 5,56) zeigen eine Verschlechterung der Trennung im Bereich ihres pKa-Wertes (Abbildung 7).



Warfarin (pKa 5,56)

Die Peakform kann sich im Bereich des pKa-Wertes des Analyten verschlechtern.

Abbildung 7: Studien bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase.

Vergleichsstudien des Retentionsfaktors  $k'$  für Warfarin zeigen, dass unter sauren Bedingungen mit einem pH-Wert unter 3,5 eine gute Trennung erzielt werden kann (Abbildung 8).

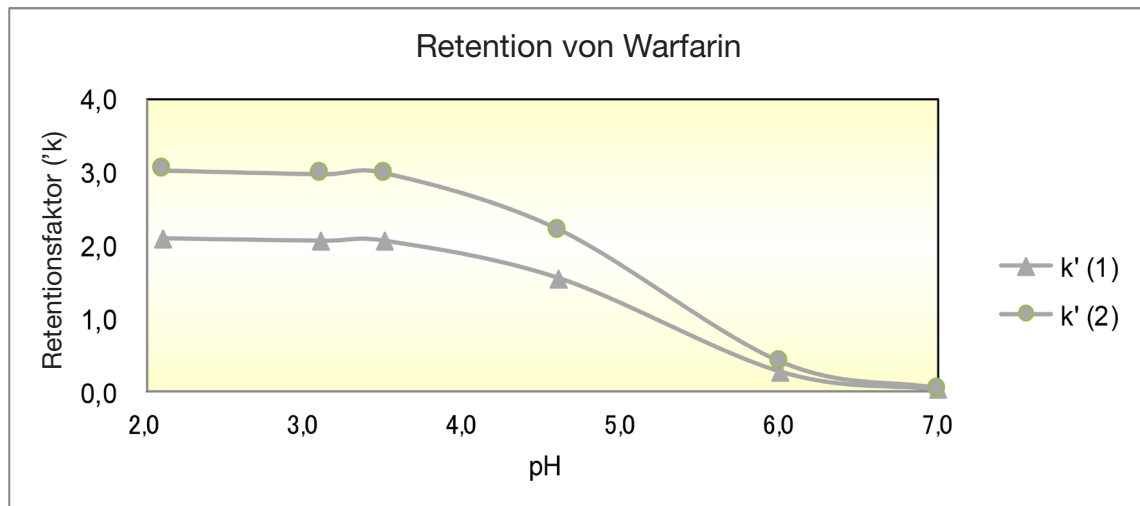


Abbildung 8: Untersuchungen zum Retentionsfaktor ( $k'$ ) bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase.

### RP Beispiel

Im folgenden Beispiel wird das Screening einer sauren Substanz (vertrauliche Kundenprobe) gezeigt. CHIRAL ART Amylose-SA und CHIRAL Cellulose-SB wurden als stationäre Phase verwendet. Der pH-Wert der mobilen Phase wurde, wie in Abbildung 9 gezeigt, angepasst. Das beste Ergebnis konnte mit CHIRAL ART Cellulose-SB und Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure erreicht werden. Wie bereits zuvor gezeigt, ist das beste Ergebnis für diese saure Verbindung bei sauren Bedingungen zu finden.

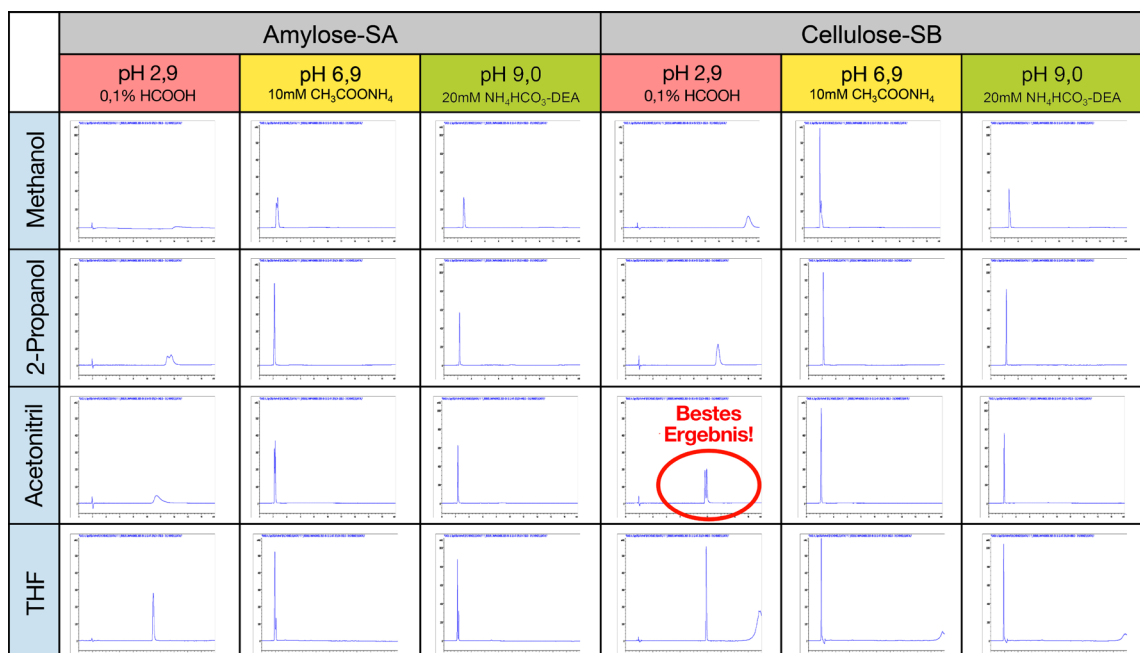


Abbildung 9: Methodenentwicklung für eine saure Substanz (vertrauliche Kundenprobe).

Dieses initiale Lösemittel-Screening stellt einen hervorragenden Ausgangspunkt für die weitere Optimierung dar. Wie im Falle der NP-Methodenoptimierung, sollten die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

- Säulendimension
- Gradient => isokratisch
- Flussrate
- Temperatur
- Injektionsvolumen
- Additive:    basisch: z.B. DEA, Ethanolamin  
              sauer:    z.B. TFA, Ameisensäure

Die in Abbildung 10 aufgezeigte Methodenoptimierung wurde bei 40% organischem Lösemittelanteil in der wässrigen sauren Phase (HCOOH) durchgeführt.

- 1.) Der initiale Gradient von 5-80% wurde verwendet.
  - 2.) Diese Methode wurde auf isokratische Bedingungen transferiert, indem eine 15-20% niedrigere Zusammensetzung, als die bei der die Substanz unter Gradientbedingungen eluiert, gewählt wurde.
- Das beste Ergebnis wurde mit 0,1% HCOOH/Acetonitril 60/40 erzielt.

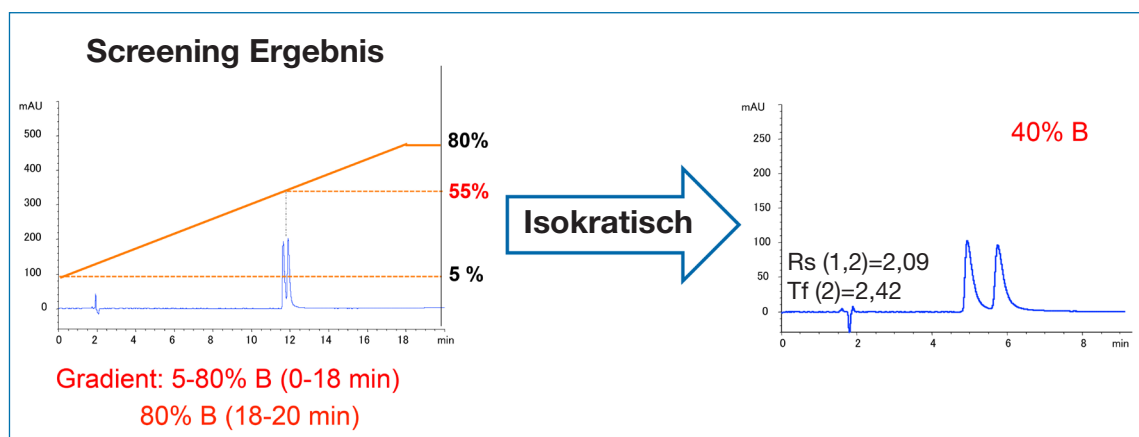


Abbildung 10: Methodenoptimierung im RP-Modus.

Eine weitere Verbesserung gelang durch Austausch des Additivs Ameisensäure durch TFA. (Abbildung 11).

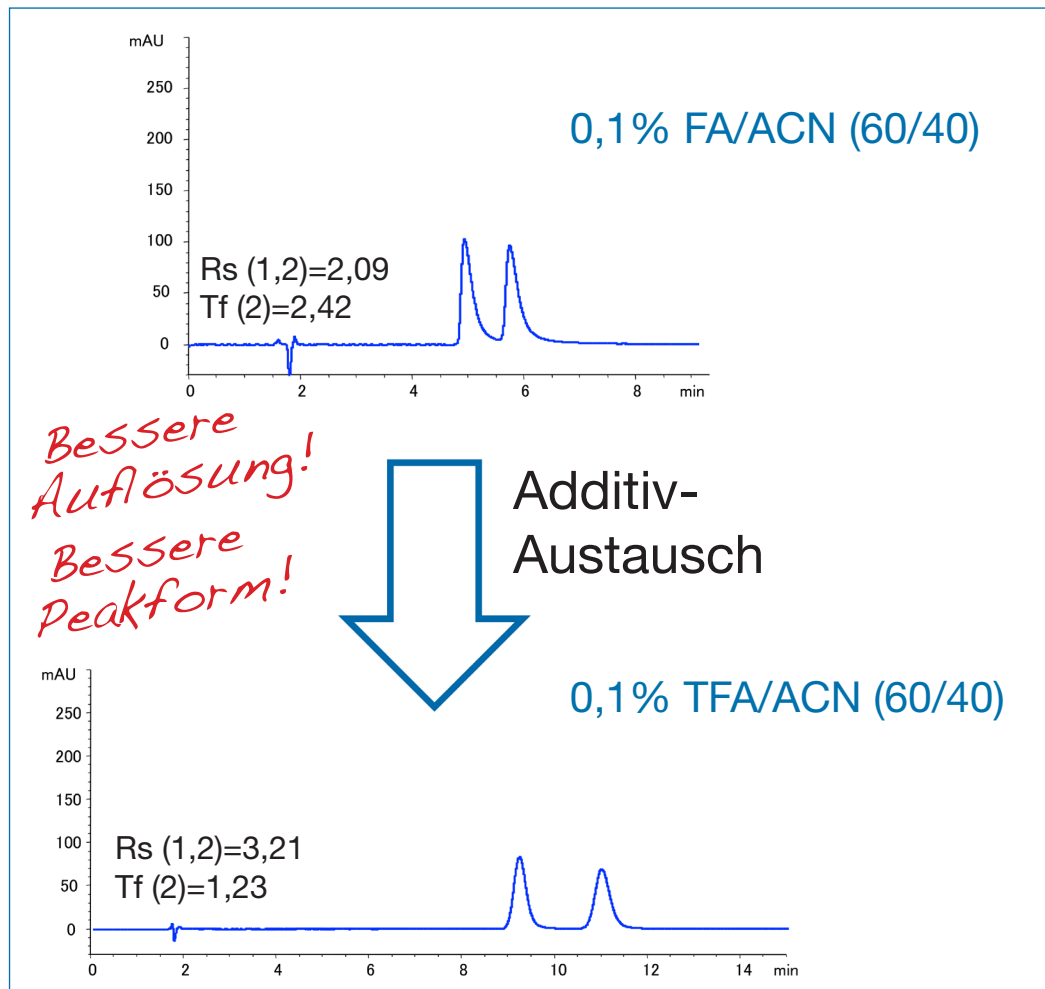


Abbildung 11: Methodenoptimierung durch Tausch der Additive.

Die Methodenentwicklung wurde für den NP- und RP-Modus mit Analyten unterschiedlicher Eigenschaften vorgestellt. Die auf Know-How und Erfahrung basierende Strategie beinhaltet zwei Schritte. Der erste Schritt ist die Wahl der initialen Bedingungen bezüglich des Säulentyps und der mobilen Phase. Innerhalb des zweiten Schritts kommt es zur Methodenentwicklung durch Evaluierung des Einflusses von Flussrate, pH-Wert, isokratischen Konditionen und verschiedener Additive.

## Strategie zur chiralen Methodenentwicklung für die SFC

Eine reine Substanz kann abhängig von Druck und Temperatur flüssig, fest oder gasförmig sein. Innerhalb eines Phasendiagramms gibt es einen kritischen Punkt, über dem es eine Phase gibt, die weder flüssig noch gasförmig ist – dieser Zustand wird als superkritische Flüssigkeit bezeichnet (supercritical fluid, Tabelle 5). Superkritische Flüssigkeiten verfügen über geringere Viskositäten und hohe Diffusionskoeffizienten. Folglich sind superkritische Flüssigkeiten ideal für Hochdurchsatz-Anwendungen.

Für mit Lösemittelabfällen und zeitaufwändiger Lösemittelaufbereitung überlastete Laboratorien, ist SFC eine vorteilhafte Alternative für die Aufreinigung und analytische Applikationen.

Die Prinzipien der SFC sind vergleichbar mit denen der Flüssig-Chromatographie, obwohl die SFC typischerweise Kohlenstoffdioxid als Haupt-Eluenten verwendet. Die SFC ist im Grunde eine Normalphasen-Chromatographie-Technik mit inhärent hoher Geschwindigkeit und Effizienz aufgrund ihrer mobilen Phase. Als Hochdruck-Flüssigkeit oder superkritische Flüssigkeit ist CO<sub>2</sub> aufgrund seiner geringen Viskosität und seinem hohen Diffusionsvermögen ein hervorragendes Lösungsmittel, welches in modernen anspruchsvollen Aufreinigungslaboren benötigt wird. Weiterhin stellt es ein nachhaltiges Lösungsmittel dar, da es nach Gewinnung aus anderen industriellen Prozessen wiederverwendet werden kann.

SFC überzeugt bei der Trennung und Aufreinigung von chiralen Substanzen und Naturprodukten weil sie schneller ist, weniger Lösemittel verbraucht und im Allgemeinen eine preiswertere und „grünere“ Methode für chirale Trennungen ist als Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatografie (HPLC).

Tabelle 5: Eigenschaften der superkritischen Flüssigkeit im Vergleich zu Gasen und Flüssigkeiten

	Diffusionskoeffizient [cm <sup>2</sup> /s]	Viskosität [g/cm·s]
Gas	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-4</sup>
Superkritische Flüssigkeit	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup>
Flüssigkeit	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>

### CHIRAL ART Säulen im SFC-Modus

Alle CHIRAL ART Säulen können unter SCF-Bedingungen genutzt werden. Es besteht sogar die Auswahl zwischen Standard-LC-Säulen, die SFC kompatibel sind, und speziell für die SFC ausgelegte Säulen.

### First- und Second-Choice Eluenten

Basierend auf einer signifikanten Datenmenge, können die in Tabelle 6 aufgelisteten Verhältnisse als Ausgangspunkt genommen werden und entsprechend der zu trennenden Substanz angepasst werden. Das Retentionsverhalten der Substanz bestimmt die Einstellung der Zusammensetzung der mobilen Phase. Mit diesen so genannten First-Choice Daten kann die Entscheidung über die besten Lösungsmittel oder Lösungsmittel-Zusammensetzungen getroffen werden.

Alkohole (Methanol, Ethanol, 2-Propanol) werden typischerweise als First-Choice Eluenten in Kombination mit CO<sub>2</sub> eingesetzt. Alle CHIRAL ART Säulen, sowohl gecoated (CHIRAL ART Amylose-C, Cellulose-C) als auch immobilisiert (CHIRAL ART Amylose-SA, Cellulose-SB, Cellulose-SC), sind hierfür geeignet.

Second-Choice Lösungsmittel wie Acetonitril, THF und MTBE können auch genutzt werden (Tabelle 6), hier aber wieder mit der Limitierung auf immobilisierte Säulen wie CHIRAL ART Amylose-SA, Cellulose-SB oder Cellulose-SC. Proben, die in Alkohol löslich sind, sind dabei ideal für die SFC.

Tabelle 6: Mobile Phasen für das initiale Screening im SFC-Modus

	First-Choice			Second-Choice*		
Eluent A	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
Eluent B	MeOH	EtOH	2-Propanol	MeOH/ACN (50/50)	MeOH/THF (50/50)	MeOH/MTBE (50/50)
Gradienten elution	10-50% Modifier					

\*nur für immobilisierte Phasen

### SFC Beispiel

Abbildung 13 zeigt beispielhaft das First-Choice-Screening von Flavon (Abbildung 12), eines enantiomeren Flavonoids. Hier wurde das beste Resultat mit einer gecoateten CHIRAL ART Amylose-C Säule mit CO<sub>2</sub>/Ethanol 80/20 erzielt.

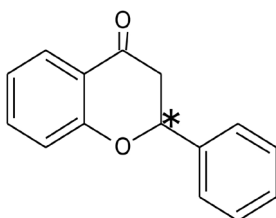


Abbildung 12: Flavon

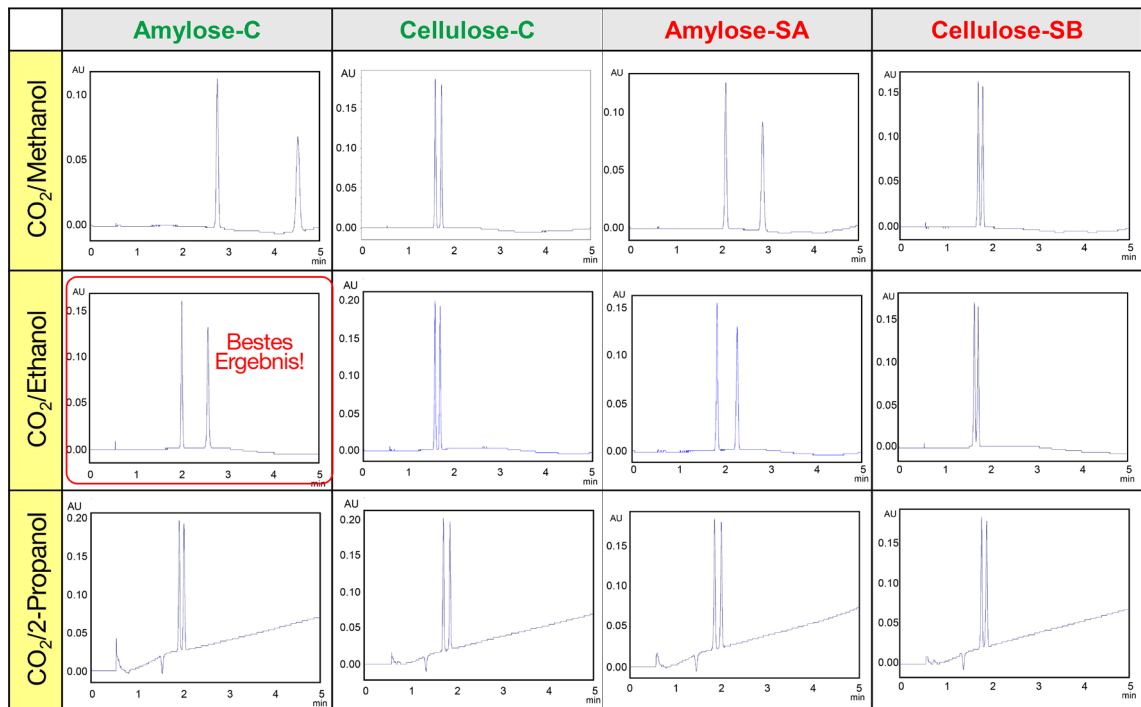


Abbildung 13: First-Choice-Screening auf CHIRAL ART Amylose-C, Cellulose-C, Amylose-SA und Cellulose-SB.

Das First-Choice-Screening zeigt den idealen Ausgangspunkt für die weitere Optimierung. Die folgenden Aspekte können für die Methodenentwicklung im SFC-Modus berücksichtigt werden:

- Säulendimension
- Gradient => isokratisch
- Flussrate
- Temperatur
- Injektionsvolumen
- Rückdruck
- Additive: basisch: z.B. DEA, Ethanolamin;  
sauer: z.B. TFA, Ameisensäure

### Aufskalierung zum präparativen Prozess

SFC spielt auch bei der Aufskalierung zum präparativen Prozess eine wichtige Rolle. Für Flavon wurde eine CHIRAL ART Amylose-C Säule (5 µm, 250 x 20 mm ID) für die HPLC verwendet. Im Vergleich dazu wurde eine spezielle SFC-Säule CHIRAL ART Amylose-C (5 µm, 250 x 20 mm ID) für die präparative SFC eingesetzt. Abbildung 14 zeigt, dass für beide Methoden hohe Werte von 100% Enantiomeren-Reinheit für Fraktion 1 und nahezu 100% für Fraktion 2 erzielt werden. Auch die Wiederfindungsraten sind vergleichbar hoch.

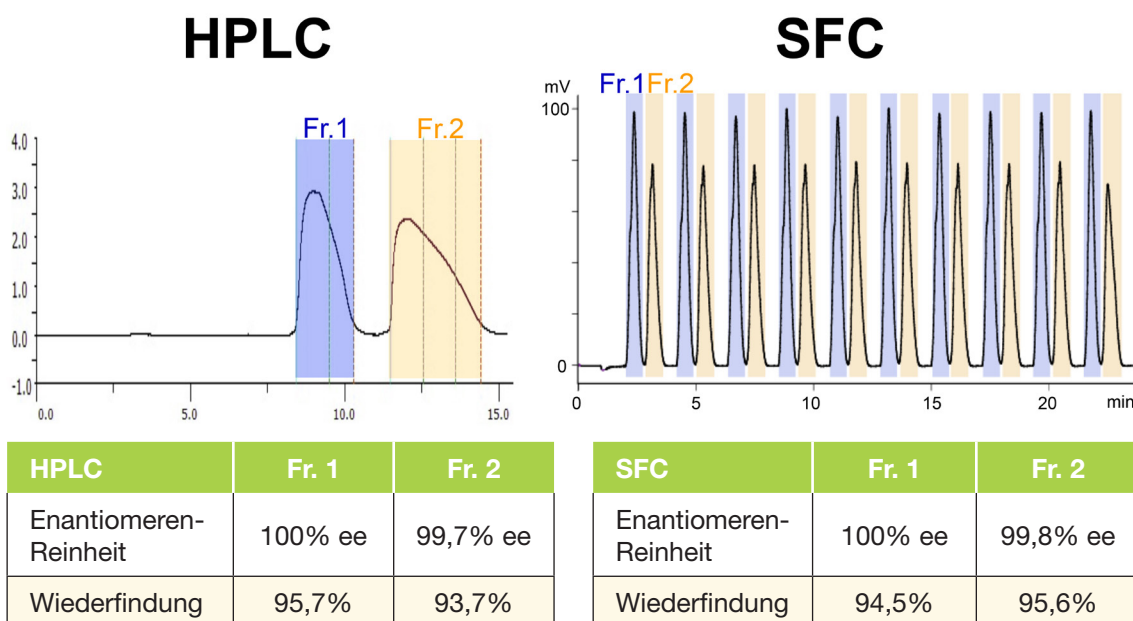


Abbildung 14: Methodentransfer von HPLC zu SFC (stacked injections).

#### Effektivität von SFC-Trennungen

Der Vorteil der SFC-Trennung im Vergleich zur HPLC wird beim Betrachten der Produktivität deutlich. Diese ist für Fraktion 1 mit 340 mg Produkt/h um 100% höher als bei der HPLC (Tabelle 7). Das gleiche trifft auf Fraktion 2 zu. Gepaart mit dem geringen Lösungsmittelverbrauch macht dies die SFC für die präparative Chromatographie äußerst effektiv.

Tabelle 7: Vergleich von HPLC und SFC für die Aufreinigung von Flavon

HPLC				SFC	
Säule: 250 x 20 mm ID		Fr. 1	Fr. 2	Fr. 1	Fr. 2
Enantiomeren-Reinheit	[%ee]	> 99,9	99,7	> 99,9	99,8
Wiederfindung	[%]	95,7	93,7	94,5	95,6
Produktivität	[mg Product / h]	172	169	340	344
Fraktionsvolumen	[L Lösungsmittel / g Produkt]	1,15	2,88	0,39	0,57
Lösungsmittelverbrauch	[L Lösungsmittel / g Produkt]	7,0		2,0	

+100%

-75%

-70%

#### Vorteile der SFC-Trennung

- Produktivität pro Zeiteinheit nahezu verdoppelt im Vergleich zu HPLC
- Verdampfen von Lösungsmittel der Fraktionen einfacher
- Fraktionsvolumen entspricht ca. 25% des Volumens von HPLC-Trennungen
- Verringerung des Lösungsmittelverbrauchs von ca. 70% möglich

## Beispiel einer chiralen Methodenentwicklung für LC-MS

Es wurde eine State-of-the-Art LC-basierte chirale Methode für Spiroxamin, welche an MS/MS gekoppelt werden kann, entwickelt. Ziel war es Spiroxamin-Rückstände im Spurenbereich zu detektieren. Daher bestand die Präferenz RP-Bedingungen zu untersuchen. Weiterhin was das Ziel die vier Isomere in weniger als 30 Minuten zu trennen. Die Trennung wurde zunächst mit LC-UV entwickelt und anschließend auf LC-MS/MS transferiert.

Spiroxamin ist ein systemisches Fungizid, welches von Bayer CropScience auf den Markt gebracht wurde. Die Substanz ist eine Mischung aus Diastereomere A und B, welche wiederum aus zwei Enantiomeren bestehen, was insgesamt zu den vier Enantiomeren A1, A2, B1 und B2 führt (Abbildung 15).

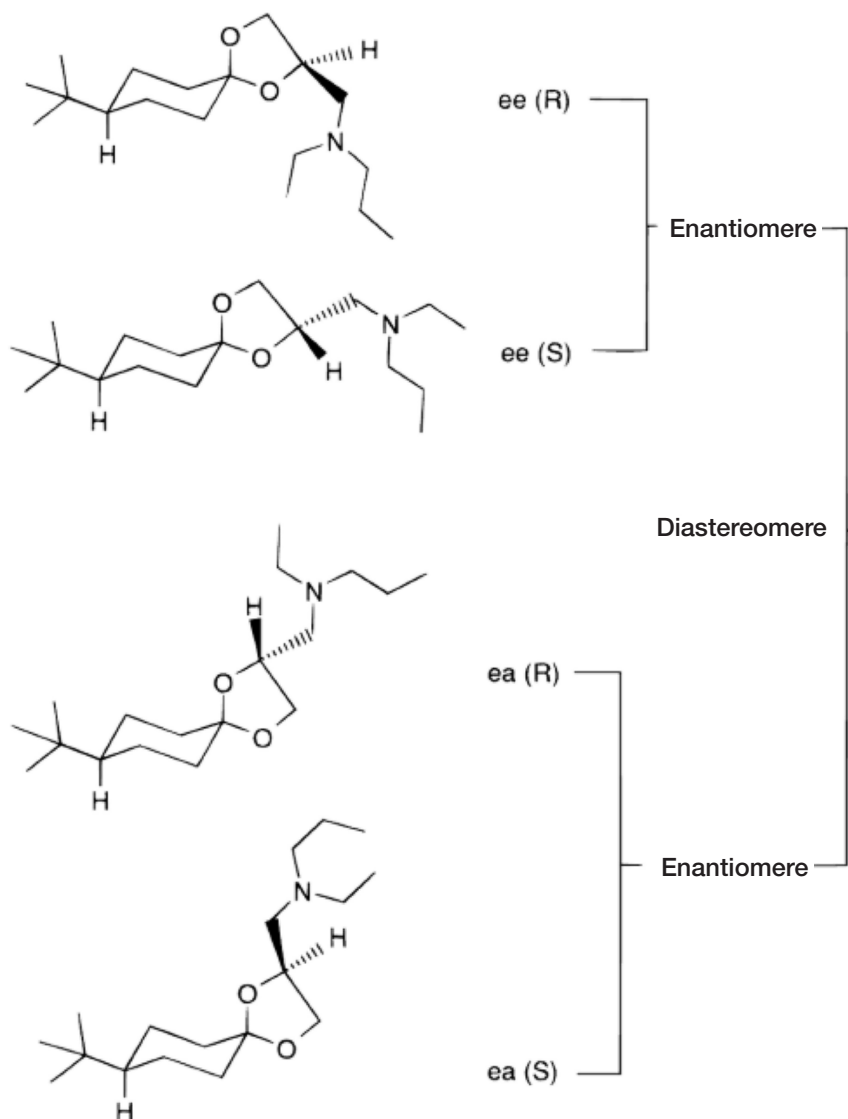


Abbildung 15: Isomere von Spiroxamine [3], Diastereomer A:  $\log Pow = 2,79$  (bei 20 °C), Diastereomer B:  $\log Pow = 2,92$  (bei 20 °C),  $pKa$ -Wert= 6,9.

### Chirales RP-Screening

Um das Ziel der Trennung unter RP-Konditionen zu erfüllen, wurden alle immobilisierten YMC Chiralphasen, CHIRAL ART Amylose-SA, Cellulose-SB und Cellulose-SC, mit RP-Eluenten getestet. Eine ausreichende Auflösung konnte nur mit CHIRAL ART Amylose-SA erzielt werden (Abbildung 16). Eine Partikelgröße von 5 µm und eine Dimension von 250 x 4,6 mm wurden für jede Säule verwendet.

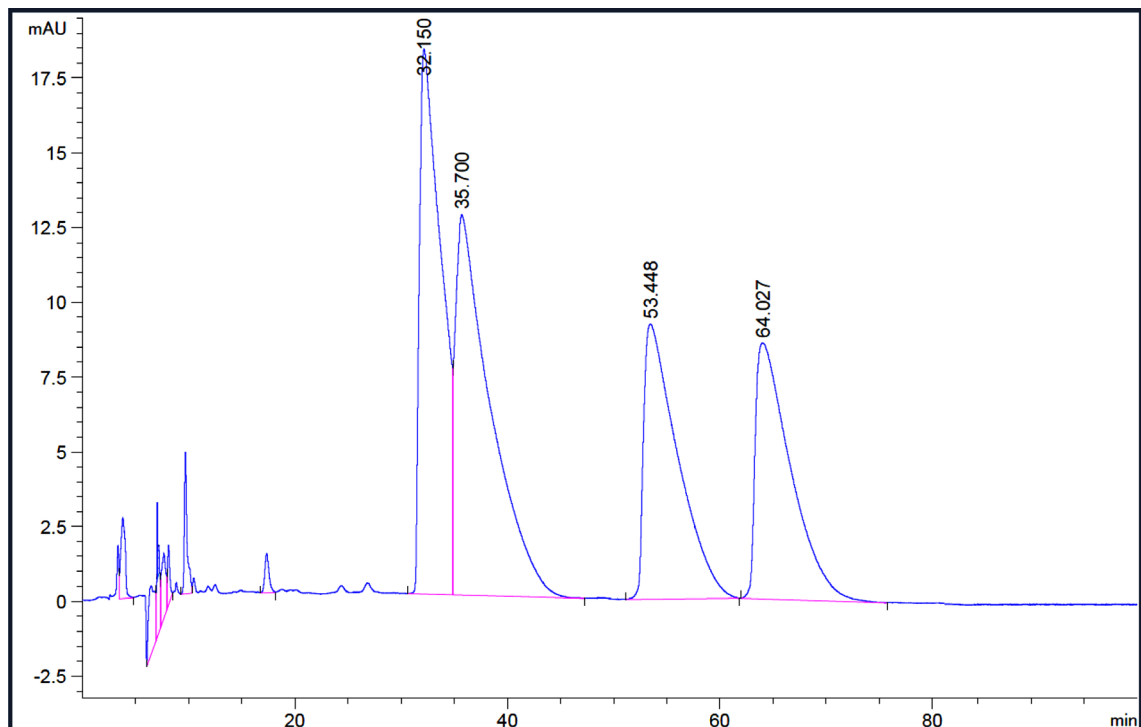


Abbildung 16: Ergebnis des chiralen Screenings von Spiroxamin mit CHIRAL ART Amylose-SA, 5 µm.

### Trennung in weniger als 20 Minuten

Um das Ziel einer Trennung in weniger als 30 Minuten zu erreichen, wurde die Säulenlänge und der ID reduziert. Darüber hinaus wurden 3 µm anstelle von 5 µm Partikeln eingesetzt, um die Auflösung zu erhöhen.

Die Ionisation bei der MS-Detektion kann durch Zugabe eines Additivs verbessert werden, aber der Zusatz von Essigsäure oder auch Ameisensäure war nicht hilfreich, da keine Retention beobachtet werden konnte. Aber die Verwendung von Diethylamin resultierte in einer erheblich besseren Peakform.

Es war nicht nur möglich alle vier Isomere voneinander zu trennen, sondern auch die Analysenzeit konnte auch nur 20 Minuten verkürzt werden. Es konnten also alle Vorgaben erfüllt werden.

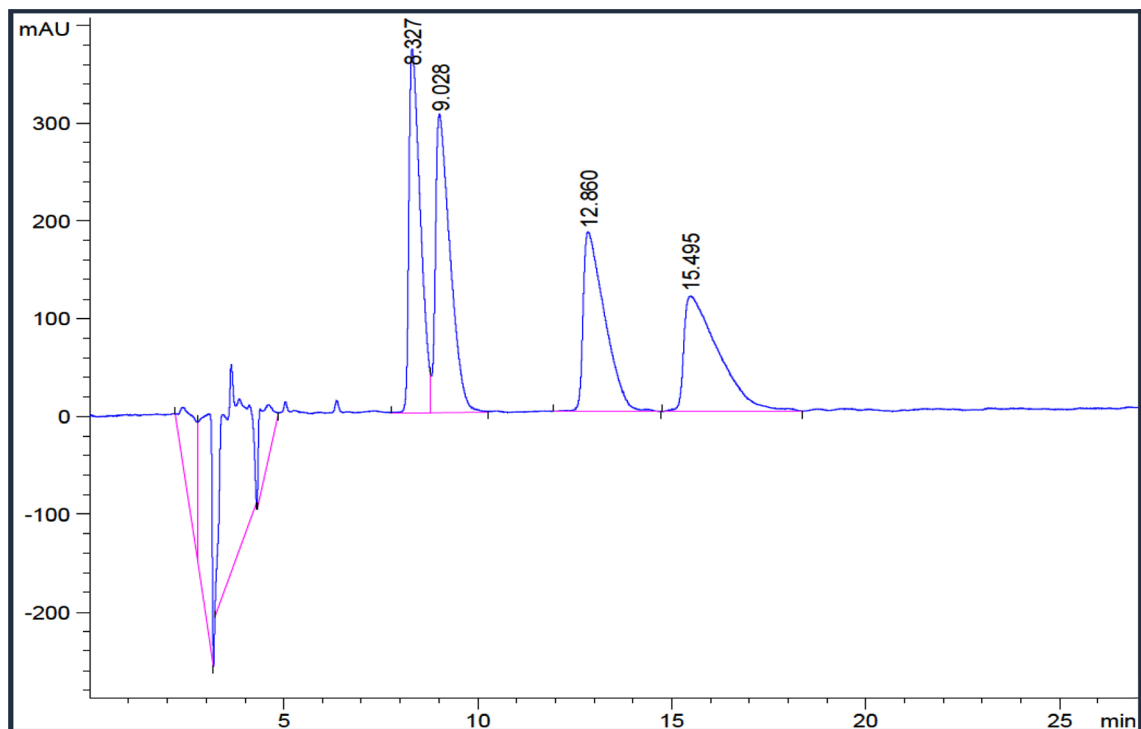


Abbildung 17: Optimierte Methode für Spiroxamin mit CHIRAL ART Amylose-SA, 3 µm.

Säule:	CHIRAL ART Amylose-SA 3 µm (150 x 3,0 mm ID)
Bestell-Nr.:	KSA99S03-1503WT
Eluent:	Wasser/Ethanol/DEA (27,5/72,5/0,1)
Flussrate:	0,25 ml/min
Temperatur:	30 °C
Detektion:	UV at 210 nm
Injektion:	10 µL (10 mg/mL)

### Transfer von LC-UV zu LC-MS/MS

Anschließend wurde die Applikation auf ein LC-MS/MS Gerät bestehend aus einem Agilent 1290 UPLC-System (binäre und isokratische Pumpe), einem CTC-Autoinjektor und einem Sciex API6500 high-end triple-quadrupole Massenspektrometer übertragen.

Diethylamin, welches in der UV-Applikation genutzt wurde, musste durch eine 10 mM Ammoniumcarbonat-Lösung (pH 9,5) ersetzt werden. Das Diethylamin beeinflusste den Ionisations-Prozess stark und unterdrückte somit das MS-Signal um 99%. Um die Ionisation zu verbessern, wurde nach der chiralen Säule 1% Ameisensäure gelöst in Methanol/Wasser 50/50 in den Eluentenstrom geleitet („Änderung“ des pH-Werts vom schwach alkalischen zum schwach sauren ermöglicht Protonierung von Spiroxamin; pka 6,9).

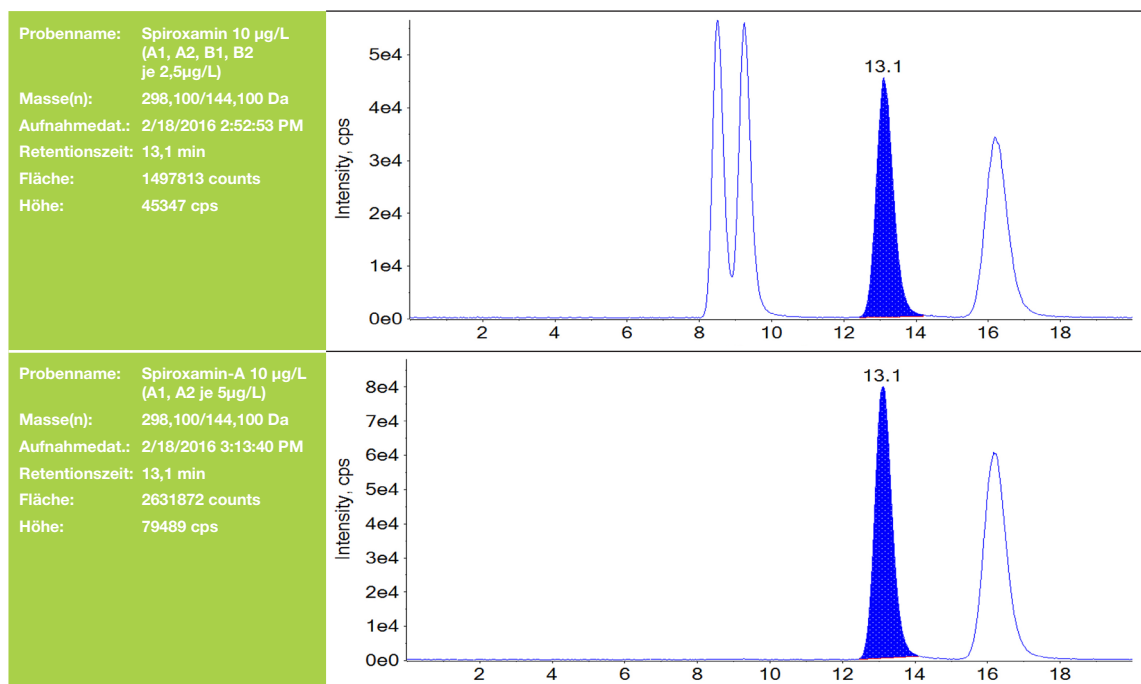
## Finales Set-up

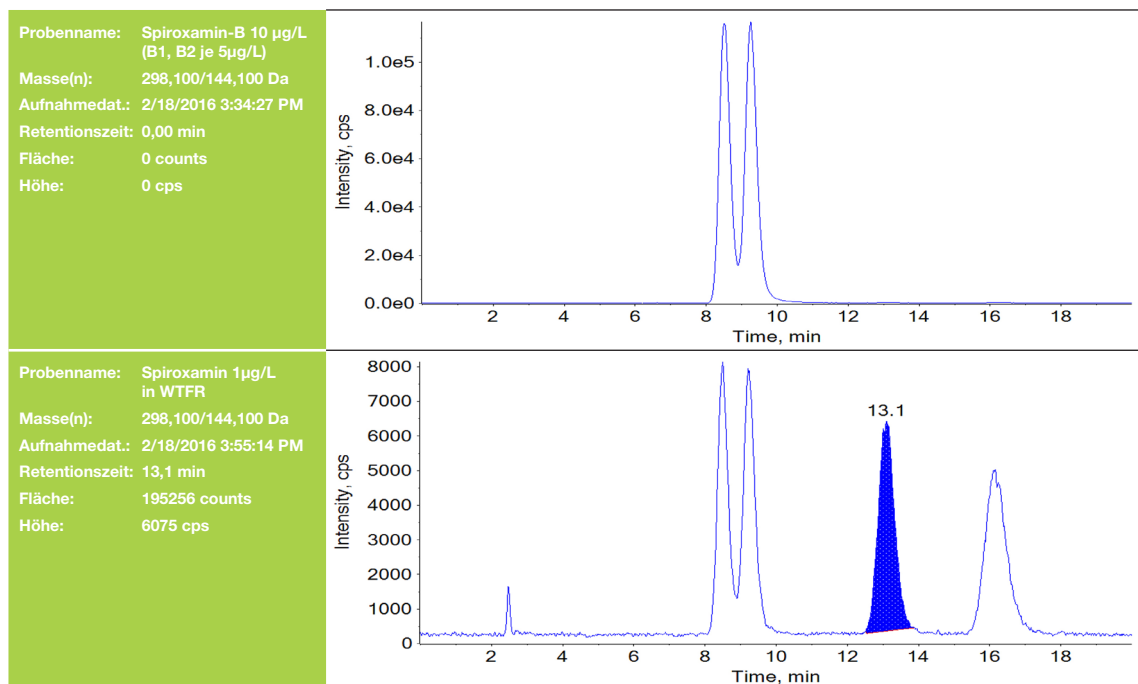
Finale Konz. beim LOQ: 1 µg/L Spiroxamin = 0.54 µg/L A-Isomer; 0.46 µg/L B-Isomer  
 = 0.27 µg/L A1 Enantiomer  
 = 0.27 µg/L A2 Enantiomer  
 = 0.23 µg/L B1 Enantiomer  
 = 0.23 µg/L B2 Enantiomer

<b>HPLC Säule:</b>	CHIRAL ART Amylose-SA, 3 µm (150 x 3 mm ID)
<b>Eluent:</b>	A/B (25/75) A: Wasser/Ethanol 9/1 + 10 mM Ammoniumcarbonate (pH ~9,5) B: Wasser/Ethanol 1/9 + 10 mM Ammoniumcarbonate
<b>Flussrate:</b>	0,3 mL/min
<b>Injektion:</b>	1 µL
<b>Iso-Pumpe:</b>	Post-Column Make-up via T-Stück mit 0,3 mL/min 1% Ameisensäure in Methanol/ Wasser 50/50.
<b>MS-MS Bedingungen:</b>	Multiple-reaction-monitoring (MRM) mode mit ESI positiv, MRM 298-144 für Quantifizierung und MRM 298-100 zur Bestätigung

### Beispiel-Chromatogramm mit Enantiomer A1 beim LOQ in Weintrauben-Matrix-Extrakt

Tabelle 8: Bestimmung von Enantiomer A in Weintrauben-Matrix-extrakt, jeweils die 4. Wiederholung jedes Chromatogramms [4]





### Chromatographische Performance-Parameter

<b>HPLC Säule:</b>	CHIRAL ART Amylose-SA
<b>Probe:</b>	10 µg/L Spiroxamin (Mischung aus 4 Enantiomeren)
<b>Säulenlänge:</b>	150 mm
<b>Säulen-ID:</b>	3 mm
<b>Partikelgröße d<sub>p</sub>:</b>	3 µm
<b>V<sub>d</sub> Säule:</b>	742,1 µl
<b>V<sub>Schleife</sub>:</b>	1 µl
<b>V<sub>Kapillaren</sub>:</b>	5,7 µl
<b>V<sub>gesamt</sub>:</b>	748,7 µl
<b>Flussrate:</b>	300 µL/min
<b>t<sub>d cal.</sub>:</b>	2,496 min

theor. Plates N: 
$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2$$

Peak capacity n: 
$$n = 1 + \frac{\sqrt{N_{\max}}}{4} \ln(1 + k_{\max})$$

Capacity Factor: should be >3 best: 4-10  
 Separation Factor: k'<sub>2</sub>/k'<sub>1</sub> always >1  
 Peak Resolution: 0.0 = co-eluting  
 0.6 = 12% peak overlapping  
 1.0 = 2% peak overlapping  
 1.5 = baseline separated

Analyt = Elutionsreihenfolge	t <sub>R</sub> [min]	k'-Wert	W <sub>H</sub> [min]	W <sub>H</sub> [s]	St.Abw.o [s]	Boden-zahl N	Boden-höhe H [µm]	Böden/m N/m	Trenn-faktor a <sub>n,n+1</sub>	Peak Auflösung RS <sub>n,n+1</sub>	k' <sub>max</sub> u. N <sub>max</sub>	Peak-Kapazität n
Spiroxamin Enantiomer B1	8,50	2,41	0,3385	20,31	8,628	<b>3494</b>	42,9297	23294			k' <sub>max</sub> 5,49	<b>29</b>
Spiroxamin Enantiomer B2	9,24	2,70	0,3570	21,42	9,099	<b>3712</b>	40,4083	24747	1,12	1,22		
Spiroxamin Enantiomer A1	13,10	4,25	0,5080	30,48	12,948	<b>3685</b>	40,7064	24566	1,57	4,47	N <sub>max</sub> 3712	
Spiroxamin Enantiomer A2	16,19	5,49	0,6708	40,25	17,098	<b>3228</b>	46,4698	21519	1,29	2,71		

Chromatographische Charakteristika: Peak-Kapazität n 29, Bodenzahl/m 24747

## Zusammenfassung

In diesem Whitepaper wurde die chirale Methodenentwicklung im NP-, RP- und SFC-Modus mit Analyten verschiedener Eigenschaften gezeigt. Die Strategie beinhaltet zwei Stufen. Der erste Schritt ist die Wahl der initialen Konditionen, wie die Auswahl des Säulentyps und der mobilen Phase. Hierfür wurden mögliche First-Choice und Second-Choice Eluenten mit entsprechenden Gradienten vorgestellt. Diese Ergebnisse stellen eine ideale Basis für die weitere Methodenentwicklung dar. Der nächste Schritt ist die Methodenentwicklung durch Optimierung der Flussrate, des pH-Werts, Umstellung auf isokratische Bedingungen und durch Zugabe verschiedener Additive. Jeder Trennmodus, ob NP, RP oder SFC, setzt einen anderen Screening-Ansatz voraus – sei es die Auswahl von gecoateten und immobilisierten Phasen oder die Wahl von ausschließlich immobilisierten Phasen. Für jeden Modus wurde ein Screening-Beispiel für eine spezifische Substanz präsentiert, um die praktische Vorgehensweise aufzuzeigen, z.B. für Astaxanthin im NP-Modus oder Flavon im SFC-Modus.

Für saure und basische Analyten ist der Einsatz eines Additivs von zentraler Bedeutung. Experimente mit sauren Substanzen wie Warfarin (pka 5,56) zeigen eine schlechtere Peakform im Bereich ihres pka-Wertes. Deshalb spielt der pH-Wert der mobilen Phase eine wichtige Rolle bei der Methodenentwicklung und muss entsprechend angepasst werden.

Die Vorteile von gecoateten und immobilisierten chiralen CSPs werden auch im SFC-Modus deutlich. Die extrem hohe Produktivität in Verbindung mit dem geringen Lösemittelverbrauch machen SFC sehr lukrativ. Der Vorteil von SFC-Trennungen im Vergleich zur HPLC wird besonders deutlich, wenn auch die Produktivität im präparativen Maßstab mit einbezogen wird

## Literatur

- [1] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada, Chem. Lett. (1984) 739.
- [2] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada, J. Am. Chem. Soc. 106 (1984) 5357.
- [3] WA. Etzel, W. Gau, W. Krämer, U. Stelzer, J. Weissmüller, Magn. Reson. in Chem. 36, (1998) 64-68.
- [4] alle Chromatogramme wurden freundlicherweise von S. Stuke/Bayer CropScience zur Verfügung gestellt

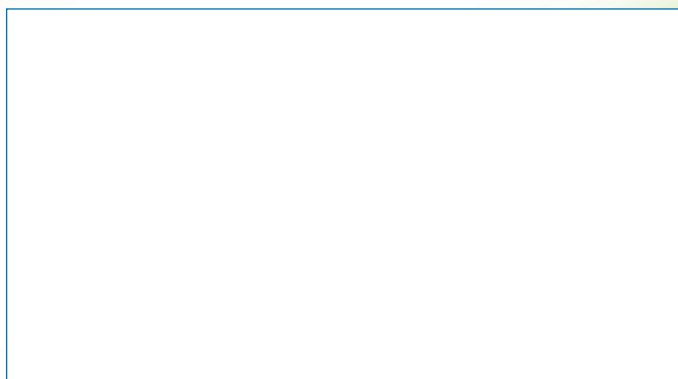
## Kontakt

Dr. Daniel Eßer  
Product Specialist  
Tel.: +49 (0)2064 427-271  
E-Mail: [esser@ymc.de](mailto:esser@ymc.de)

Dr. Ute Schlund  
Product Specialist  
Tel.: +49 (0)2064 427-260  
E-Mail: [schlund@ymc.de](mailto:schlund@ymc.de)

Dr. Anja Bräutigam  
Head of Laboratories  
Tel.: +49 (0)2064 427-283  
E-Mail: [braeutigam@ymc.de](mailto:braeutigam@ymc.de)

Your local distributor:



**YMC Co., Ltd.**

YMC Karasuma-Gojo Bld. 284 Daigo-cho,  
Karasuma Nisiiru Gojo-dori Shimogyo-ku,  
Kyoto 600-8106 Japan  
TEL. +81(0)75-342-4515, FAX +81(0)75-342-4550  
[www.ymc.co.jp](http://www.ymc.co.jp)

**YMC Europe GmbH**

Schöttmannshof 19  
D-46539 Dinslaken  
Germany  
TEL. +49(0)2064/427-0, FAX +49(0)2064/427-222  
[www.ymc.de](http://www.ymc.de)

**YMC America, Inc.**

941 Marcon Boulevard Suite 201  
Allentown, PA18109 USA  
TEL. +1-610-266-8650, FAX +1-610-266-8652  
[www.ymcamerica.com](http://www.ymcamerica.com)

**YMC Taiwan Co., Ltd.**

3F, No. 1353, Zhongzheng Rd.,  
Taoyuan City, Taoyuan Country 330,  
Taiwan (R.O.C.)  
TEL. +886-3-2150-630, FAX +886-3-2150-286  
[www.ymctaiwan.com](http://www.ymctaiwan.com)

**YMC Korea Co., Ltd.**

#208, Owners Tower, 16-5, Sunae-dong,  
Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do,  
463-825 Korea  
TEL. +82-31-716-1631, FAX +82-31-716-1630  
[www.ymckorea.com](http://www.ymckorea.com)

**YMC India Pvt. Ltd.**

A-154, Eros Boulevard Hilton Hotel Complex Plot No.13-  
B, District Centre Mayur Vihar Phase-I  
New Delhi-110091 India  
TEL. +91-11-45041601;45041701, FAX +91-11-45041901  
[www.ymcindia.com](http://www.ymcindia.com)

**YMC Co., Ltd. Shanghai Rep. Office**

Far East International Plaza A2404  
No. 319 Xianxia Road, Shanghai 200051  
P.R. China  
TEL. +86-21-6235-1388, FAX +86-21-6235-1398  
[www.ymcchina.com](http://www.ymcchina.com)

**YMC Singapore Tradelinks Pte. Ltd.**

6 Indus Road, #13-09 Emerald Park, Tower 1,  
Singapore 169588  
TEL.+65-9023-7617  
[www.ymc.sg](http://www.ymc.sg)