

Environmental Health Science Laboratory¹, Sumitomo Chemical Co., Ltd. und Research Laboratory, Sumitomo Pharmaceutical Co.², Ltd. Osaka, Japan

Zur Trennung racemischer Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-dimyristate durch HPLC an chiralen stationären Phasen

M. OKAMOTO¹, K.-I. TAKAHASHI¹, Y. TAKIMOTO¹ und H. KISHIMOTO²

In der vorliegenden Arbeit wird die chirale HPLC-Trennung einiger racemischer Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-dimyristate an chiralen stationären Phasen (CSP) beschrieben. Als CSP kamen verschiedene Pirkle-Phasen (Sumichiral[®] OA-2500, 3100, 3200, 3300, 4000, 4100) zum Einsatz. Die besten Ergebnisse wurden mit Sumichiral[®] OA-2500 erzielt. Einflüsse der Hydrophobie der Analyten wurden ebenso untersucht wie die Einflüsse der Variation der mobilen Phase und der Temperatur auf das chromatographische Trennergebnis.

HPLC-separation of racemic cyclohexane-1,2-diamine platinum(II) dimyristates on chiral stationary phases

In this paper, the stereochemical resolution of racemic cyclohexane-1,2-diamine platinum(II) dimyristates on chiral stationary phases (CSP) is described. These CSP are Pirkle phases chiral column (Sumichiral[®] OA-2500, 3100, 3200, 3300, 4000, 4100). Among them, the Sumichiral[®] OA-2500 column gave the best results. The effects of the temperature and mobile phase composition as well as the hydrophobicity of the analytes on the chromatographic separation are described.

1. Einleitung

Die meisten Arzneistoffe kommen heute noch als Racemate zur Anwendung, da die Synthese nur eines optischen Isomers oft sehr kompliziert, aufwendig und mit hohen Kosten verbunden ist [1]. Die Tendenz, bei chiralen Arzneistoffen zunehmend die reinen Enantiomere anstelle der Racemate einzuführen und damit einen „isomeren Ballast“ einzuschränken, erfordert den Einsatz von analytischen Methoden zur getrennten Erfassung der Enantiomere und ihrer Biotransformationsprodukte in biologischen Materialien sowie eine Kontrolle der Enantiomerenreinheit [1]. Neben der Entwicklung enantioselektiver Syntheseverfahren gewinnt und Auswahl analytischer und präparativer chromatographischer Trennmethode für Racemate eine besondere Bedeutung [2]. Verschiedene HPLC-Methoden, d. h. direkte und indirekte Verfahren, werden für diesen Zweck eingesetzt [3].

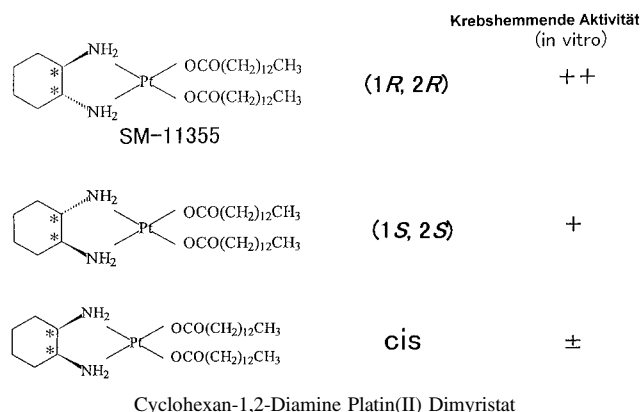
Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-Dimyristat, zu dessen Gruppe auch Cisplatin gehört, zeigt eine krebshemmende Aktivität. Bei diesen Verbindungen besitzen die Enantiomere unterschiedliche Wirkungsstärken, wobei das (1*R*,2*R*)-Enantiomer (SM-11355) immer stärker wirksam ist als die (1*S*,2*S*)- und *cis*-Form. Das (1*R*,2*R*)-Enantiomer (SM-11355) wird derzeit als zytostatisches Arzneimittel entwickelt [4, 5]. Untersuchungen zur chiralen HPLC-Trennung der Analyten sind die Grundlage für eine pharma-

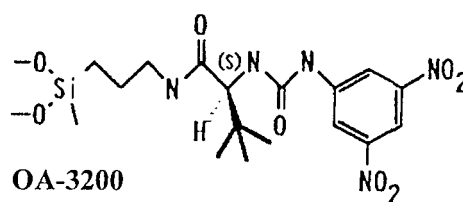
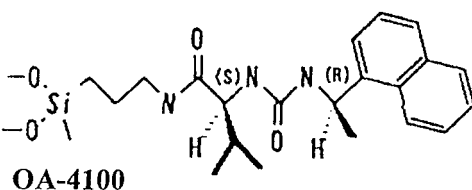
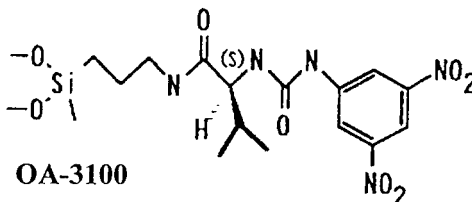
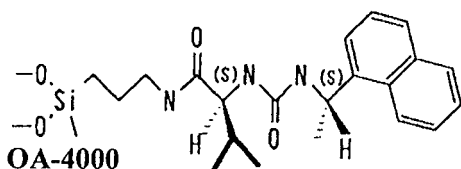
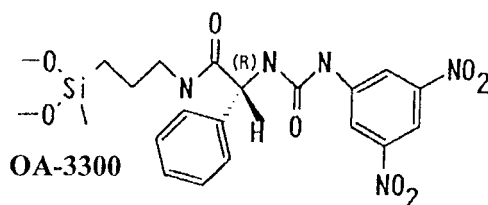
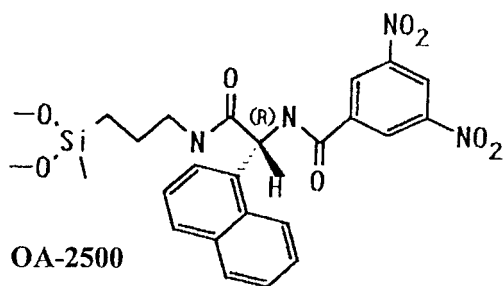
kologische Testung und den Nachweis einer potenziell unterschiedlichen biologischen Aktivität der Enantiomere. Auf dem Gebiet der Enantiomerentrennung von Metallkomplexverbindungen gibt es nur wenige Veröffentlichungen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Erkenntnisse zum chiralen HPLC-Verhaltensverhalten der Analyten an verschiedenen CSP zu erhalten und zu interpretieren. Als chirale stationäre Phasen (CSP) wurde Sumichiral[®] OA-2500 eingesetzt. Unseres Wissens wurde über Trennungen von Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-Dimyristat-Derivaten mit drei verschiedenen Symmetrieelementen in einem Molekül noch nicht berichtet.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Die einfachste Möglichkeit der Enantiomerentrennung ist die direkte Chromatographie an CSP, wobei reversible Diastereomerenkomplexe zwischen Analyten und CSP gebildet werden. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir unterschiedliche, kommerziell erhältliche Typen von CSP: gebundene synthetische chirale Selektoren (Selektoren mit Charge-Transfer-Komplexbildung, Pirkle-Phasen, Sumichiral[®] OA-2500 [6, 7], 3100 [8], 3200 [6, 9, 10, 11], 3300 [6, 9, 10, 11], 4000 [6, 9, 10, 11], 4100 [9, 10 bis 12]).

Aus diesen Säulen wurden die besten Ergebnisse – erkennbar an größeren Trennfaktoren und Auflösungen – mittels der Sumichiral[®] OA-2500-Säule erhalten (Tabelle 1). Als besonders günstige Kombination scheint das *n*-Hexan/Ethanol-Gemisch (95/5 oder 9/1, v/v) die geeignete Laufmittelzusammensetzung (Retentionszeiten bis 20 min) für ein erstes Abschirmungslaufmittel zu sein. Die Analyten können sich aufgrund ihrer höheren Lipophilie (log *P* > 6) relativ stark an die CSP binden, dafür werden sie mit mobilen Phasen wie *n*-Hexan/2-Propanol nicht rasch genug eluiert. Folglich verwendeten wir *n*-Hexan/Ethanol für die Trennung von Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-dimyristat an diesen CSP. Die Analyten werden relativ stark an drei Sumichiral[®] OA-3100, -3200, und -4100-Säulen zurückgehalten, jedoch wiederum ohne Trennung (Tabelle 1). Mit Eluenten in unterschiedlichen





Strukturen der untersuchten chiralen stationären Phasen (Sumichiral® OA)

Tabelle 1: Chromatographische Ergebnisse der SM-11355 und ihrer (1S,2S)-Enantiomere an verschiedenen CSP

Säule	Mobile Phase	k ₁ '	k ₂ '	α	R _s
OA-2500	<i>n</i> -Hexan/Ethanol (95:5)	4,21	4,94	1,17	2,85
OA-3100	<i>n</i> -Hexan/Ethanol (95:10)	4,14	—	1,00	—
OA-3200	<i>n</i> -Hexan/Ethanol (95:10)	3,65	—	1,00	—
OA-3300	<i>n</i> -Hexan/Ethanol (95:10)	4,70	5,58	1,19	1,52
OA-4000	<i>n</i> -Hexan/Ethanol (95:5)	4,22	4,59	1,09	0,96
OA-4100	<i>n</i> -Hexan/Ethanol (95:5)	4,15	—	1,00	—

Mischungsverhältnissen von *n*-Hexan, 2-Propanol und Ethanol war eine Trennung der Substanz mit diesen CSP ebenfalls nicht möglich. Es zeigt sich an diesen Ergebnissen, dass es zum heutigen Zeitpunkt noch nicht möglich ist, einen strukturabgeleiteten Trennmechanismus für die Analyten zu postulieren. Dennoch konnten nach Optimierung der mobilen Phase (*n*-Hexan/2-Propanol/Ethanol (97/1/3, v,v,v)) für Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-dimyristat Trennungen mit α -Werten von 1,13 erreicht werden. Die Analyten ließen sich in ihre drei Enantiomere trennen. Abb. 1 zeigt ein repräsentatives Standardchromatogramm und die Elutionsreihenfolge der drei optischen Isomere an der Sumichiral® OA-2500-Trennphase. Diese chromatographischen Bedingungen können sehr wahrscheinlich auch für präparative Trennungen verwendet werden.

Der Einfluss der Lipophilie auf die Trennung der Analyten wurden anhand sechs verschiedener Derivate untersucht (Tabelle 2). Das Retentionsverhalten der Analyten entspricht ihrer Lipophilie. Die Länge der Alkylkette bleibt ohne Einfluss auf den Trennfaktor (die α -Werte liegen zwischen 1,13 und 1,14 für die Analyten), sie be-

wirkt nur, wie im Retentionsverhalten zu erwarten, eine Erhöhung der Kapazitätsfaktoren mit zunehmender Kettenlänge. Daraus lässt sich schließen, dass die Lipophilie der Analyten keine große Rolle für die Trennung spielt. Die

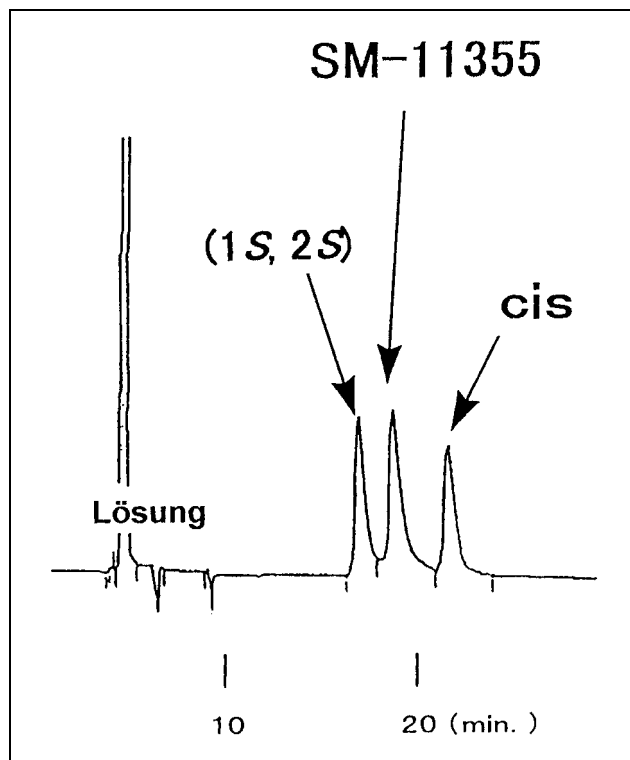
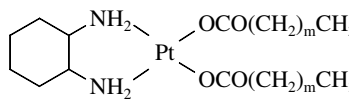


Abb. 1: Chromatogramm der chiralen Trennung von Cyclohexan-1,2-Diamine Platin(II) Dimyristat an Sumichiral® OA-2500.
Mobile Phase: *n*-Hexan/2-Propanol/Ethanol (97/1/3, v,v,v)
Flussrate: 1,0 ml/min
Konzentration: 0,25 mg/ml CHCl₃
Injektionsvolumen: 1 µl
Detektionswellenlänge: 216 nm
Temperatur: 25 °C

Tabelle 2: Chromatographische Ergebnisse der verschiedenen Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-Dicarboxylate

				
Carboxylgruppe	m	k' ₁	k' ₂	α
Laurinsäure	10	3,98	4,52	1,14
Tridecansäure	11	3,56	4,06	1,14
Myristinsäure	12	4,30	4,87	1,13
Pentadecansäure	13	3,81	4,33	1,14
Palmitinsäure	14	4,55	5,15	1,13
Heptadecansäure	15	4,93	5,55	1,13

CSP der Sumichiral® OA-2500-Säule wird als eine Art „Pirkle-Phase“ bezeichnet. Damit eine Enantiomerentrennung erfolgen kann, müssen gleichzeitig d-π-Wechselwirkungen, Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und/oder sterische Wechselwirkungen auftreten [13]. Für diese Racemattrennung scheinen ausschließlich die d-π-Wechselwirkungen zwischen Pt (II) in den Analyten und aromatischen Systemen in der CSP verantwortlich zu sein. Die Auswirkungen einer Temperaturerhöhung auf die Retention wurden für die vorliegende Verbindungsklasse untersucht. Mit Zunahme der Säulentemperatur von 5 °C auf 45 °C bleiben die Trennfaktoren unbeeinflusst; die α-Werte liegen zwischen 1,11 und 1,12 für die Analyten. Der van't Hoff-Plot (ln k'/1/T) zeigt Linearität (Abb. 2), d. h. der Retentionsmechanismus dieses Analyten an dieser CSP ändert sich innerhalb des untersuchten Temperaturbereiches nicht. Es stellt sich heraus, dass die hydrophoben Analyten ganz stark an der CSP zurückgehalten werden, wobei die Analyten mit Säulentemperaturerhöhung folglich nicht so einfach eluiert werden. Ein solches Retentionsverhalten der Analyten ist nicht zu beobachten.

Bei einer Trennung unter optimierten Bedingungen wurde das (1*S*,2*S*)-Enantiomer erst nach SM-11355 eluiert, so dass eine Überlappung mit der *cis*-Form vermieden und eine quantitative Auswertung ermöglicht wurde. Die Enantiomerenbestimmungs- und die Enantiomerennachweisgrenze des analytischen Verfahrens wurde jeweils auf 0,5 und 0,25% festgelegt. Die Linearität ist im Bereich von 0,5–50% für (1*S*, 2*S*)-Enantiomere bei SM-11355 gege-

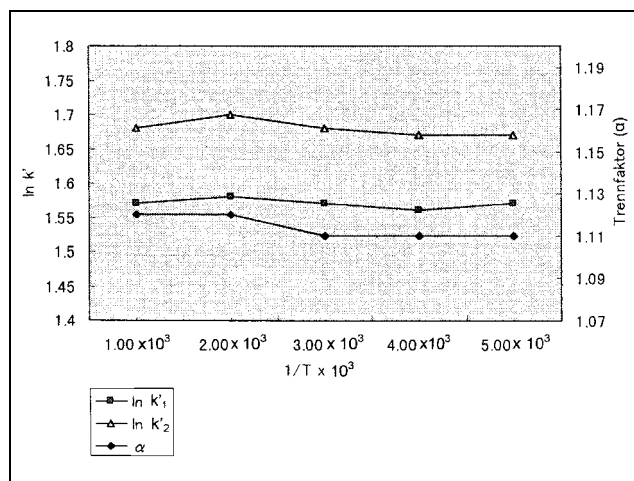


Abb. 2: Temperaturabhängigkeit der Trennung von Cyclohexan-1,2-diamin-Platin(II)-dimyristat an Sumichiral® OA-2500 (Vers.-Bed. s. Abb. 1).
t₀ (Chloroform) = 2,925 min

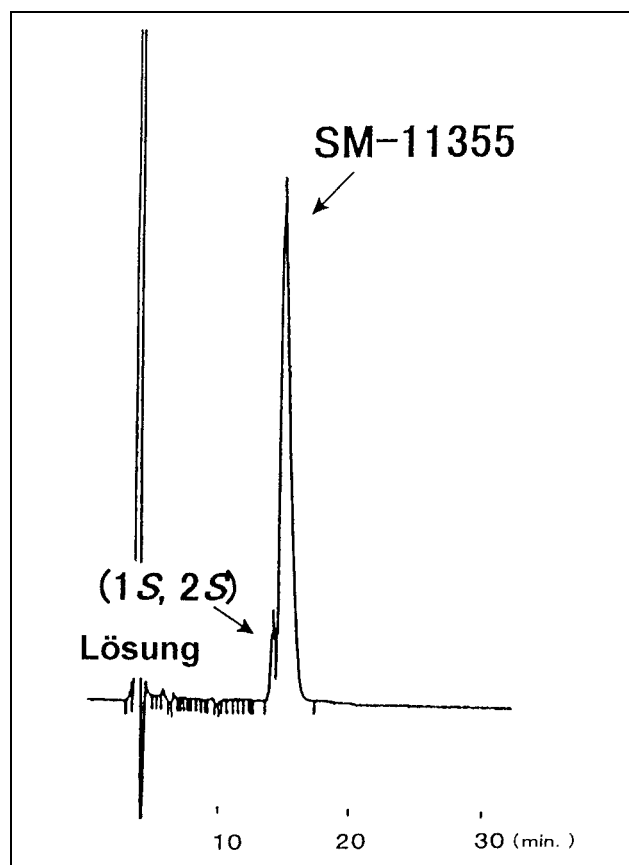


Abb. 3: Chromatographische Racemattrennung von SM-11355 und ihrer Enantiomere an Sumichiral® OA-2500.
Konzentration: 7,5 mg/ml CHCl₃
Andere Vers.-Bed. s. Abb. 1

ben. Innerhalb dieser Grenzen ist daher eine sichere Bestimmung der (1*S*, 2*S*)-Enantiomere möglich. Die Richtigkeit wurde durch Zusatz von der (1*S*,2*S*)-Enantiomere zu SM-11355 überprüft. Die Wiederfindungsrate betrug 103% des theoretischen Werts. Damit ist die Richtigkeit bewiesen (Abb. 3).

Die beschriebene Methode ermöglicht somit eine selektive Quantifizierung der (1*S*,2*S*)-Enantiomere in SM-11355.

3. Experimenteller Teil

3.1. Gerät

Für die hplc Untersuchungen wurde eine Hitachi L-6200 Pumpe mit Hitachi L-4000 UV-Vis-Detektor, sowie einem Senshu Scientific SSC-2110 Column-Thermostat, und Shimadzu C-R7A Chromato-Integrator eingesetzt. Die Injektion der Proben erfolgte über ein Rheodyne 7125-Injektions-Ventil mit 20 µl Probenschleife.

3.2. Chromatographische Bedingungen (chiral)

Die untersuchten chiralen Säulen (Edelstahlsäule 250 × 4,6 mm I.D., 5 µm), Sumichiral® OA, sind von Sumika Chemical Analysis Service Co., (Osaka, Japan) bezogen worden. Detektionswellenlänge war in diesen Experimenten 216 nm. Die Substanzen wurden in CHCl₃ gelöst (0,25–7,5 mg/ml). Von dieser Konzentration kamen 1–2 µl zur Injektion.

3.3. Chemikalien

Die Darstellung der untersuchten Substanzen erfolgte nach der bereits beschriebenen allgemeinen Vorschrift [4]. Zur Herstellung von Lösungen und mobiler Phasen wurde Aqua bidest., *n*-C₆H₁₄, C₂H₅OH, CHCl₃, *i*-C₃H₇OH (Kanto Chemical, Tokio, Japan) verwendet. Die mobilen Phasen wurden in den angegebenen Volumina gemischt und im Ultraschallbad (Bransonic B-2200, Yamato, Tokio, Japan) entgast.

Danksagung: Für die Unterstützung der Arbeiten durch Frau Yoko Okada und Herrn Takao Nakagawa bei unserem Laboratorium (Sumitomo Chemical Co.), bedanken wir uns herzlich.

Literatur

- 1 Ariens, E. J.; in Krustulovic, A. M. (Ed.): Chiral Separations by HPLC. S. 31, Ellis Horwood Limited, Chichester 1989
- 2 De Camp, W. H.: in Lough, W. J. (Ed.): Chiral Liquid Chromatography. S. 14, Blackie and Son Ltd, London 1989
- 3 Freibush, B.; Grinberg, N.: in Zief, M.; Crane, L. J. (Eds.): Chromatographic Chiral Separations. S. 1, Marcel Dekker, Inc., New York 1988
- 4 Kishimoto, S.; Fukui, M.; Fukushima, S.; Nakano, M.: Reg Cancer Treat. **1-2**, 25 (1992)
- 5 Maeda, M.; Sasaki, T.: Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 5-76954[93-76954]
- 6 Oi, N.; Kitahara, H.; Kira, R.: J. Chromatogr. **515**, 441 (1990)
- 7 Oi, N.; Kitahara, H.; Matsumoto, Y.; Nakajima, H.; Horikawa, Y.: J. Chromatogr. **462**, 382 (1990)
- 8 Oi, N.; Kitahara, H.; Aoki, F.; Kisu, F.: J. Chromatogr. A **689**, 195 (1995)
- 9 Oi, N.: Bunseki Kagaku **33**, E401 (1984)
- 10 Oi, N.; Kitahara, H.: J. Liq. Chromatogr. **9**, 511 (1986)
- 11 Oi, N.; Kitahara, H.; Kira, R.: J. Chromatogr. **535**, 213 (1990)
- 12 Oi, N.; Kitahara, H.; Aoki, F.: J. Chromatogr. A **694**, 129 (1995)
- 13 Jira, Th.; Vogt, C.; Beyrich, Th.: Pharmazie **43**, 385 (1988)

Eingegangen am 1. November 1999

Angenommen am 25. Februar 2000

Dr. Masahiko Okamoto
Senior Research Associate
Environmental Health
Science Laboratory
Sumitomo Chemical Co.
3-1-98 Kasugade-naka
Konohana-ku
Osaka 554-0022
Japan