

**Calixaren-Kieselgele: Unterschiedlich große
Makrocyclen als chromatographische Selektoren in
der HPLC**



Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Frau Sabine Gebauer
geb. 20. März 1970 in Wolfen**

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. G.-J. Krauß**
- 2. Prof. Dr. W. Engewald**
- 3. Prof. Dr. G. Gübitz**

Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von November 1993 bis April 1998 im Institut für Biochemie in der Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie sowie in der Arbeitsgruppe Molecular Modelling - Theoretische Wirkstoffbiochemie der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß bin ich für die interessante Themenstellung, das fördernde Interesse am Fortgang meiner Arbeit, die stets gewährte Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen zu besonderem Dank verpflichtet.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Gübitz für seine hilfreiche Unterstützung und die inspirierenden Diskussionen während meines Aufenthaltes am Institut für Pharmazeutische Chemie der Karl-Franzens-Universität Graz, Österreich, und bei der Anfertigung der Dissertation.

Bei Frau Dr. S. Menge möchte ich mich für die Diskussionen analytischer Problemstellungen und kritischen Hinweise bedanken.

Frau Dr. I. Thondorf danke ich für die geduldige und uneingeschränkte Unterstützung, die kritischen und wertvollen Hinweise bei der Diskussion meiner Arbeit, die mir eine große Hilfe waren.

Frau Dr. A. Schierhorn und Herrn Dr. J. Schmidt danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Prof. Dr. H. Schneider und Frau I. Nowak vom Fachbereich Physik der MLU Halle-Wittenberg gilt mein Dank für die Anfertigung der Festkörper-NMR-Spektren.

Herrn Prof. Lasch und seinen Mitarbeitern vom Institut für Physiologische Chemie der MLU Halle-Wittenberg danke ich für die Durchführung der HPLC-Untersuchungen zur Trennung von Lipiden.

Bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Molecular Modelling und der Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie, die mir mit Rat und Tat bei der Durchführung der Arbeiten und ein angenehmes Arbeitsklima geholfen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Calixarene - Eigenschaften und Anwendungen in der Analytik	3
2.1	Überblick	3
2.2	Konformative Eigenschaften der Calix[n]arene	3
2.2.1	Calix[4]aren	5
2.2.2	Calix[5]aren	7
2.2.3	Calix[6]aren	9
2.2.4	Calix[8]aren	11
2.3	Anwendungen der Calixarene in der analytischen Chemie	13
3	Retentionsmechanismen in der Reversed Phase-HPLC	15
3.1	Überblick	15
3.2	Modell der solvophoben Adsorption in der Reversed Phase-HPLC	15
3.3	Stationärphasen mit Reversed Phase-Eigenschaften	16
3.3.1	RP 18-Phasen	16
3.3.2	Cyclodextrin-Phasen	17
3.3.3	Calixaren-Phasen	19
4	Synthesen der Calix[n]aren-Stationärphasen	23
4.1	Überblick	23
4.2	Materialien und Methoden	23
4.2.1	Materialien	23
4.2.2	Methoden	23
4.3	Synthesen der <i>p</i> -tert-Butylcalixaren-Derivate	25
4.3.1	Synthese der <i>p</i> -tert-Butylcalix[n]arene (n = 4, 8), [n] _I	25
4.3.2	Synthese der <i>p</i> -tert-Butylcalix[n]arenacetate (n = 4, 5, 6, 8), [n] _{II}	27
4.3.3	Synthese der <i>p</i> -tert-Butylcalix[n]arenessigsäuren (n = 4, 5, 6, 8), [n] _{III}	28
4.3.4	Synthese von <i>p</i> -tert-Butylphenoxyessigsäureethylester, [1] _{II}	29
4.3.5	Synthese der <i>p</i> -tert-Butylphenoxyessigsäure, [1] _{III}	30
4.4	Immobilisierung der Calixarene an Kieselgel	30
5	Charakterisierung der Calixaren-Stationärphasen	32
5.1	Überblick	32
5.2	Adsorptionsmessungen	32
5.3	Elementaranalyse	35
5.4	Festkörper-NMR-Spektroskopie	37
5.4.1	²⁹ Si CP/MAS NMR-Spektroskopie	37
5.4.2	¹³ C CP/MAS NMR-Spektroskopie	40
5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der Calixaren-Stationärphasen	42

6	Anwendungen der Calix[n]aren-Stationärphasen in der HPLC	43
6.1	Überblick.....	43
6.2	Definitionen chromatographischer Kenngrößen.....	43
6.3	HPLC von Stereoisomeren.....	45
6.3.1	<i>cis/trans</i> -Isomere prolinhaltiger Dipeptide	45
6.3.1.1	L-Ala-L-Pro.....	48
6.3.1.2	L-Phe-L-Pro	50
6.3.1.3	L-Ile-L-Pro	53
6.3.1.4	Nachweis der Retentionsreihenfolge der <i>cis/trans</i> -Isomere von L-Phe-L-Pro mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	54
6.3.1.5	Einfluß verschiedener Parameter auf die HPLC der <i>cis/trans</i> -Isomere ..	56
6.3.2.	<i>cis/trans</i> -Isomere prolinhaltiger Tetra- und Pentapeptide.....	59
6.3.3	17 α - und 17 β -Östradiol	60
6.4	HPLC von Positionsisomeren	62
6.4.1	Nitroaniline	63
6.4.2	Dihydroxybenzene.....	64
6.4.3	Kresole und andere disubstituierte Aromaten	66
6.4.4	Uracil und methylierte Uracil-Derivate	66
6.5	HPLC von Lipiden.....	69
6.6	HPLC von Buckminsterfullerenen	73
6.6.1	C ₆₀ /C ₇₀ -Trennungen an [n]Aren Si 100.....	74
6.6.2	C ₆₀ /C ₇₀ -Trennungen an [n]Aren Si 300.....	75
6.7	Zusammenfassung der HPLC-Ergebnisse.....	77
7	Moleküldynamik-Simulationen von Calix[n]arenen mit Dipeptiden des Typs L-Xaa-L-Pro (Xaa = Ala, Ile, Pro).....	79
7.1	Überblick.....	79
7.2	Grundlagen der Moleküldynamik-Simulationen	79
7.3	Komplexierung mit <i>cis/trans</i> -Isomeren prolinhaltiger Dipeptide	81
7.3.1	<i>p-tert</i> -Butylcalix[4]arentetraessigsäuremethylester	83
7.3.2	<i>p-tert</i> -Butylcalix[5]arenpentaessigsäuremethylester	88
7.3.3	<i>p-tert</i> -Butylcalix[6]arenhexaessigsäuremethylester	92
7.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Moleküldynamik -Simulationen	97
8	Zusammenfassung und Ausblick	99
9	Literaturverzeichnis	102
10	Anhang.....	117

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

α	relative Trennfaktor
α_{exp}	Oberflächenkonzentration der Stationärphasen
Å	Angström-Einheit ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Ala	Alanin
Ar	Argon
BET	BRUNAUER, EMMETT, TELLER
BJH	BRUNAUER, JOYNER, HALENDA
$\text{BrCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	Bromessigsäureethylester
C4	<i>p</i> -tert-Butylcalix[4]arentetraessigsäuremethylester
C5	<i>p</i> -tert-Butylcalix[5]arenpentaessigsäuremethylester
C6	<i>p</i> -tert-Butylcalix[6]arenhexaessigsäuremethylester
CD	Cyclodextrin
CDCl_3	deutertes Chloroform
CD_3CN	deutertes Acetonitril
CD_3OD	deutertes Methanol
CHCl_3	Chloroform
CH_2Cl_2	Methylenchlorid
$\text{ClCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	Chloressigsäureethylester
CP	Cross Polarization
CSD	Cambridge Struktur-Datenbank
Cs^+	Cesium-Ion
Cs_2CO_3	Cesiumcarbonat
CT	Charge-Transfer
\bar{d}_p	mittlerer Porendurchmesser
$\text{d}v_p/\text{d}d_p$	Porengrößenverteilung
D_2O	deutertes Wasser
Da	Damköhler-Zahl
DSC	Differential scanning calorimetry
EIS	electrolyte insulator semiconductor
ESI	Elektronenstoßionisation
EtOH	Ethanol
Fp.	Schmelzpunkt
FTIR	Fouriertransformations-Infrarotspektroskopie
h	Stunden

H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HMB	Hexamethylbenzen
¹ H-NMR	Protonen-Kernmagnetische Resonanz
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
Ile	Isoleucin
ISFET	ionenselektive Feldeffekttransistoren
<i>k</i>	Retentionsfaktor (Kapazitätsfaktor)
K ⁺	Kalium-Ion
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
KBr	Kaliumbromid
KI	Kaliumjodid
KOH	Kaliumhydroxid
MAS	Magnetic Angle Spinning
MD	Moleküldynamik
MeOH	Methanol
MLU	Martin-Luther-Universität
MO	Molekülorbital
MS	Massenspektrometrie
N	Bodenzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
PE	Petrolether
Phe	Phenylalanin
Rb ⁺	Rubidium-Ion
RMS	Root Mean Square
RP	Reversed Phase
R _s	Peak-Auflösung
RT	Raumtemperatur
s	spezifische Oberfläche
SAW	Surface-acoustic-wave
t	Schichtdicke
THF	Tetrahydrofuran
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
TMS	Tetramethylsilan
WW	Wechselwirkungen

w	Basisbreite eines Peaks in Minuten
v_p	spezifisches Porenvolumen
vdW	van-der-Waals
ZrO ₂	Zirkoniumoxid
ΔG^\ddagger	Energiebarriere der Ringinversion
$\Delta H_{\text{Komplex}}$	Komplexbildungsenergie
ω	Torsionswinkel

1 Einleitung und Problemstellung

Synthetische Rezeptoren von großer struktureller Vielfalt haben in den letzten Jahren das chemische Wissen bereichert. Unter ihnen haben sich Calixarene (GUTSCHE, 1989, 1995; VICENS and BÖHMER, 1990; BÖHMER, 1995; POCHINI and UNGARO, 1996; CASNATI, 1997) als wichtige Substanzklasse in der Wirt-Gast-Chemie einen festen Platz erobert. Ihr Name resultiert aus der kelchförmigen Gestalt (*griechisch.*: calix = Tasse, Vase oder Kelch) des einfachsten Vertreters, dem Calix[4]aren **1** (Abb. 1).

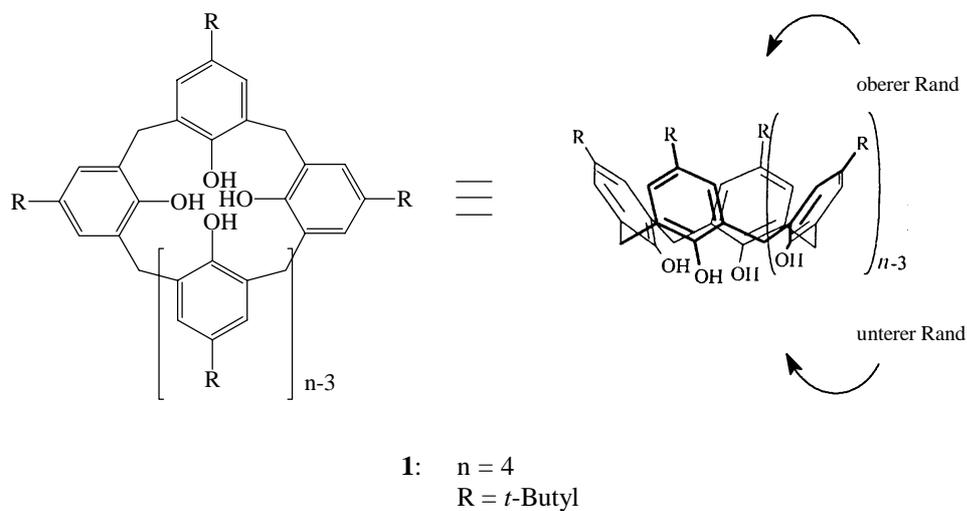


Abb. 1: Calix[n]arene (n = 4-8) in zwei- und dreidimensionaler Darstellung

Calixarene sind $[1_n]$ -Metacyclophane, die durch Cyclokondensation von Phenolen und Formaldehyd einfach zugänglich sind. Sie zeichnen sich durch eine nahezu „unbegrenzte“ Funktionalisierbarkeit aus (BÖHMER, 1995). Von besonderer Bedeutung sind ihre Fähigkeiten, neutrale organische Moleküle und Ionen komplexieren zu können. Daraus resultiert ihr Einsatz als selektive Liganden in der analytischen Chemie, in der Sensortechnik, in der medizinischen Diagnostik, in der Aufarbeitung nuklearer Abfälle und als Mimetika für Enzyme (CASNATI, 1997). Weniger verbreitet ist die Verwendung als selektive Trennmedien in der Chromatographie, jedoch nimmt das Interesse daran seit Mitte der 90er Jahre ständig zu. Die maßgeschneiderte Anfertigung der Makrocyclen und ihre variable Funktionalisierung ermöglichen die zielgerichtete Anpassung von Stationärphasen an stereospezifische Trennprobleme, deren Retentionsmechanismen auf Wirt-Gast-Wechselwirkungen beruhen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die systematische Untersuchung des Einflusses der Ringgröße der Calixarene, gebunden an Kieselgel, auf HPLC-Trennungen von ausgewählten Modellmolekülen.

Die Kenntnis der Stereochemie der Calixarene, die in Kapitel 2 behandelt wird, ist grundlegend für das Verständnis der chromatographischen Trenneigenschaften der Calixaren-Stationärphasen. So ist bekannt, daß Ester der Calixarene ionophore Eigenschaften besitzen, d.h. selektiv Ionen, insbesondere Alkali- und Erdalkalimetall-Ionen, binden können. Damit verbunden ist häufig eine Erhöhung der Symmetrie der makrocyclischen Ringstruktur, wodurch der Hohlraum der Calixarene für Wechselwirkungen mit Gastmolekülen zugänglicher wird. Deshalb stellte sich die Frage, ob es auch in der Chromatographie einen „Ionen-Effekt“ gibt. In Kapitel 2 wird zudem ein kurzer Überblick über Anwendungen von Calixarenen in der analytischen Chemie gegeben.

Aufbauend auf bereits bekannte Retentionsmechanismen in der Reversed Phase-HPLC (RP 18- und Cyclodextrin-Phasen (CD)) und aus Struktureigenschaften der Calixarene werden in Kapitel 3 Retentionsmechanismen für die Calixaren-Phasen abgeleitet.

Der experimentelle Teil dieser Arbeit, die Herstellung und Charakterisierung der Calixaren-Phasen sowie die Erarbeitung von HPLC-Applikationen unter bioanalytischen Gesichtspunkten, wird in den Kapiteln 4, 5 und 6 beschrieben. Besonderes Gewicht wurde dabei auf die Beantwortung folgender Frage gelegt: Ist die Retention der zu trennenden Moleküle von der Ringgröße der Calixarene abhängig, und ist es möglich, daß selektive Trenneigenschaften dieser Stationärphasen auf Einschlußkomplexbildung beruhen, ähnlich wie es für CD-Phasen festgestellt wurde? Anhand ausgewählter Moleküle aus unterschiedlichen Substanzklassen, bei denen es sich vor allem um Stereo- und Positionsisomere handelt, sollten sich Hinweise zur Klärung dieses Sachverhaltes ergeben. Aus dem Vergleich der Chromatogramme und den dazugehörigen chromatographischen Parametern läßt sich schlußfolgern, ob der chromatographische Prozeß von der Ringgröße der Calixarene abhängig ist. Ein eindeutiger Beweis für die Bildung von Einschlußkomplexen anhand der Elutionsprofile ist jedoch nicht möglich. Deshalb wurden Moleküldynamik-Simulationen (MD) zur Untersuchung von ausgewählten Wirt-Gast-Komplexen durchgeführt. Die Ergebnisse der MD-Simulationen werden in Kapitel 7 diskutiert und mit den Resultaten der HPLC-Trennungen verglichen.

Eine allgemeine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung von Calixarenen als selektive Trennmedien in der HPLC wird im Kapitel 8 gegeben.

Im Anhang befinden sich Graphiken, Tabellen und Publikationen. Die Graphiken und Tabellen sind mit ‚Axx‘ gekennzeichnet.

2 Calixarene - Eigenschaften und Anwendungen in der Analytik

2.1 Überblick

Die Kenntnis der Stereochemie ist wesentlich für das Verständnis des chromatographischen Trennverhaltens Kieselgel-gebundener Calixarene. Aus diesem Grund wird im folgenden ein Überblick über die konformativen Eigenschaften der Calix[n]arene ($n = 4, 5, 6, 8$) gegeben (Abschnitt 2.2).

Der analytische Einsatz von Calixarenen ist erst in den letzten 10 Jahren in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt. Aufgrund ihrer vielfältigen Möglichkeiten der Funktionalisierung und ihrer außerordentlich selektiven Eigenschaften, Ionen und neutrale Moleküle zu binden, finden sie als Wirtmolekül wachsende Bedeutung. Ein Literaturüberblick über die wichtigsten analytischen Anwendungen wird in Abschnitt 2.3 gegeben.

2.2 Konformative Eigenschaften der Calix[n]arene

Der Grundkörper der Calixarene ist aus Phenol-Bausteinen aufgebaut, die jeweils in ortho-Position über Methylengruppen verbrückt sind. In Abb. 2 sind Röntgenkristallstrukturen von *p-tert*-Butylcalix[n]arenen ($n = 4, 5, 6, 8$) dargestellt. Zur Veranschaulichung der Verteilung der Polarität im Calixarenmolekül wurde die Darstellung der Connolly-Oberflächen gewählt. Die braunen bis grünen Bereiche stellen hydrophobe Oberflächen dar, die aus den aromatischen Bausteinen und *tert*-Butylgruppen gebildet werden. Der untere, stark hydrophile Rand (phenolische OH-Gruppen) ist dagegen blau gekennzeichnet. Je nach der Anzahl der aromatischen Einheiten, markiert durch „[n]“ zwischen „Calix“ und „aren“, unterscheidet man ähnlich wie bei Cyclodextrinen (α , β und γ) verschieden große Makrocyclen, wobei Calixarene bedeutend flexiblere Makrocyclen sind als Cyclodextrine.

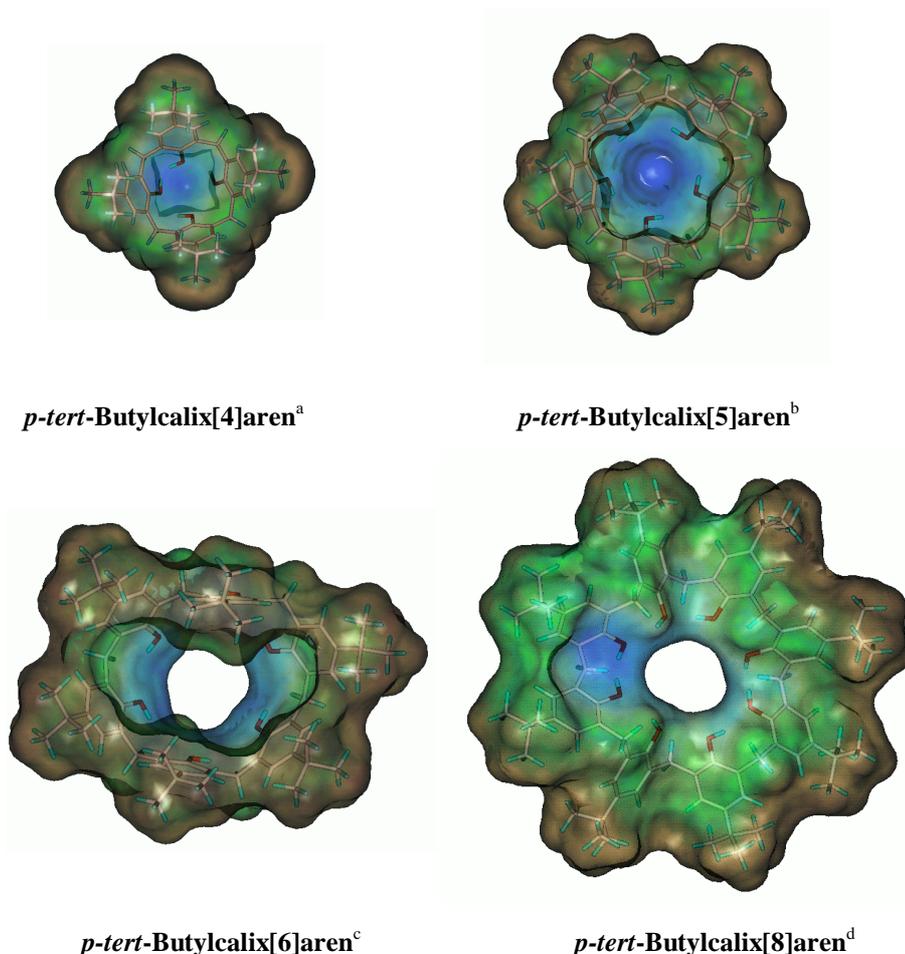


Abb. 2: Röntgenkristallstrukturen von *p-tert-Butylcalix[n]aren* ($n = 4, 5, 6, 8$) mit lipophilen Connolly-Oberflächen (Ansicht von oben)

Die Moleküle sind kodiert entsprechend ihrer Namen in der CSD: ^a BHPMYC (ANDREETTI et al., 1979), ^b BIMXIE (CORUZZI et al., 1982), ^c KENBUA (ANDREETTI et al., 1989), ^d LAYKUR (CZUGLER et al., 1991)

Die konformative Mobilität der Calixarene kann unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert werden:

- a) nach der Anzahl vorhandener Konformationen,
- b) anhand des möglichen Durchschwingens der Aryl-Einheiten durch den Ring und
- c) nach ΔG^\ddagger , der Energiebarriere für die Ringinversion, die aus temperaturabhängigen NMR-Untersuchungen ermittelt werden kann.

Die kleineren Vertreter ($n = 4, 5$) zeichnen sich durch eine geringere Flexibilität und höhere Symmetrie aus. Mit wachsender Anzahl der Phenolbausteine erhöht sich die Flexibilität des Ringsystems beträchtlich und damit die Zahl der Konformationen. Durch verschiedenartige Funktionalisierungen der Calixarene ist es gelungen, die Flexibilität des makrocyclischen Grundgerüsts einzuschränken oder sogar einzufrieren (GUTSCHE, 1989; VICENS and BÖHMER, 1991). Folgende Veränderungen des Grundgerüsts bieten sich dafür an:

- a) die Einführung von genügend großen Substituenten am unteren Rand für $n = 4, 5$ und/oder am oberen Rand ab $n > 5$, wodurch ein Durchschwingen der Aryl-Einheiten verhindert wird. Dabei können durch partielle oder vollständige Derivatisierung sehr gezielt Konformationen mit selektiven Eigenschaften hergestellt werden.
- b) die Verbrückung des oberen oder unteren Randes durch geeignete Spacer, die sich durch eine besonders starre, *cone*-förmige Molekülgestalt auszeichnen.

Beide Varianten bieten die Möglichkeit, heteroditope Rezeptoren zu erzeugen. Das bedeutet, gleichzeitig ionische und neutrale Gastmoleküle zu binden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode a), die vollständige O-Alkylierung der phenolischen OH-Gruppen mit $\text{ClCH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, genutzt. Sie bietet den Vorteil, daß vor allem die kleineren Calixarene bevorzugt in einer *cone*- oder *cone*-ähnlichen Konformation vorliegen. Die Immobilisierung an Kieselgel kann über die Carboxylgruppen am unteren Rand erfolgen, so daß der obere Rand für den Einschluß von Gastmolekülen geöffnet ist. Die Synthesen wurden in der Literatur ausführlich beschrieben. Die Herstellung im großen Maßstab ist problemlos möglich. Wie erwähnt, zeichnen sich diese Calixaren-Derivate durch heteroditope Rezeptoreigenschaften aus, die sich im Verlauf der HPLC-Untersuchungen als vorteilhaft erwiesen.

Die folgenden Ausführungen zu konformativen Eigenschaften der verschiedenen Calixarene beschränken sich aufgrund der vielfältigen Funktionalisierbarkeit hauptsächlich auf ihre Grundstrukturen und Ester-Derivate der *p-tert*-Butylcalixare.

2.2.1 Calix[4]aren

Das *p-tert*-Butylcalix[4]aren existiert sowohl im festen Zustand als auch in Lösung in der *cone*-Konformation, die durch einen intramolekularen Ring von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Ferner unterliegt die *cone*-Konformation in Lösung auf der NMR-Zeitskala einer Ringinversion, bei der die phenolischen OH-Gruppen durch das Innere des Makrocyclus schwingen. Durch Funktionalisierung der phenolischen Sauerstoffatome mit Alkyl- oder Acylgruppen kann diese eingefroren werden. Es kommt zum Auftreten weiterer stabiler Konformationen, der sogenannten *partial cone*, *1,3-alternate* und *1,2-alternate* Konformationen (Abb. 3).

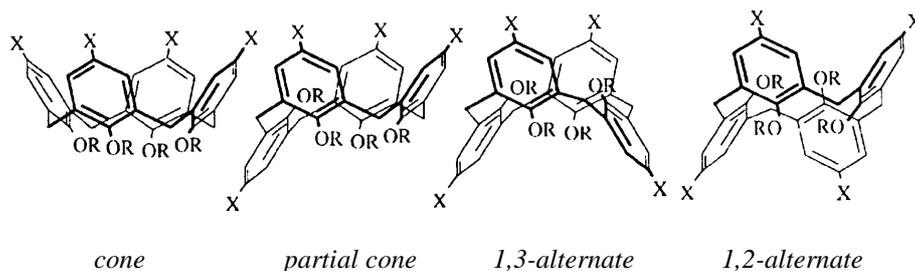


Abb. 3: Konformationen des Calix[4]arens

Im allgemeinen führt schon die Einführung von Resten mit $R > \text{Ethyl}$ zu einer Fixierung der Konformationen. Die Wahl der entsprechenden Reaktionsbedingungen liefert sehr gezielt das gewünschte Konformer. Bei der Umsetzung mit Bromessigsäureethylester in Gegenwart von Na_2CO_3 entsteht z.B. ausschließlich das *cone*-Isomer. Dagegen wird bei Verwendung von Cs_2CO_3 das *partial cone*-Isomer zu 100 % erhalten. Damit zeigt sich, daß durch bestimmte Metallkationen ein Templateffekt ausgelöst wird, der die Bildung der Konformere steuert (ARNAUD-NEU et al., 1989).

Ferner haben tetra-O-alkylierte Derivate, wie z.B. Ester, Amide und Ketone vor allem als Ionophore Bedeutung erlangt, wobei die Ionen-Selektivität von der Ringgröße und der Konformation abhängig ist. Das *cone*-Isomer des Tetraesters komplexiert beispielsweise selektiv Na^+ , welches sandwichartig zwischen den Ebenen der Phenol- und Carbonylsauerstoffatome eingebettet wird (Abb. 4). Die anderen Konformere bevorzugen das K^+ -Ion (BÖHMER, 1995).

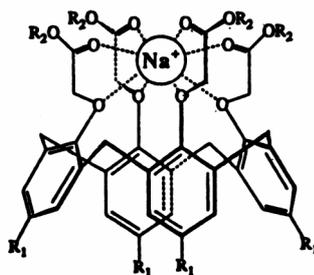


Abb. 4: Na^+ -Komplex eines Tetraester-Derivates

NMR-Spektren des Na^+ -Komplexes des Tetraesters zeigen, daß Strukturen mit einer vierzähligen Symmetrieachse erzeugt werden (ARDUINI et al., 1986). Ursprünglich liegt die *cone*-Konformation der freien Liganden in einer zweizähligen Symmetrie vor, bei der zwei gegenüberliegende Phenolbausteine nahezu parallel und die anderen beiden nach außen gerichtet sind. Die Estergruppen sind divergierend angeordnet, d.h. die Carbonylsauerstoffatome zeigen nach außen.

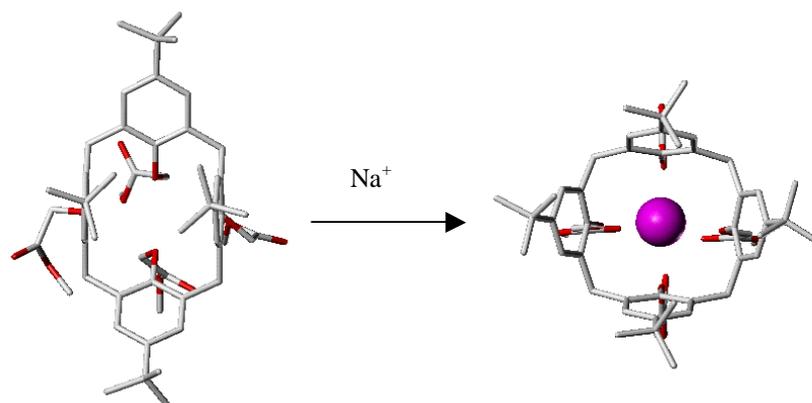


Abb. 5: Strukturänderung eines *p*-*tert*-Butylcalix[4]arentetraester-Derivates von einer zweizähligen zu einer vierzähligen Symmetrieachse durch Komplexbildung von Na⁺ (Ansicht von oben)

In Abb. 5 ist die Strukturänderung durch Komplexbildung eines Na⁺-Ions dargestellt, die zur Bildung eines Hohlraumes führt, der für Wechselwirkungen mit kleinen organischen Gastmolekülen geeignet ist.

Die strukturelle Besonderheit der Calix[4]arenester, sowohl in Lösung als auch im festen Zustand selektiv Ionen zu binden, weist darauf hin, daß möglicherweise auch Kieselgel-gebundene Calixarenester Na⁺-Ionen komplexieren und eine Konformationsänderung bewirken. Deshalb war zu untersuchen, ob Verbesserungen der Trennleistungen der Calix[4]aren-Phase beispielsweise durch Na⁺-haltige mobile Phasen erreicht werden können.

2.2.2 Calix[5]aren

Mit der Verknüpfung fünf aromatischer Phenolbausteine und der damit verbundenen Zunahme der Ringgröße erhöht sich die Flexibilität dieses Ringsystems. Es ergeben sich zusätzliche Anordnungsmöglichkeiten, die zu anderen, komplexeren Konformationstypen führen. Die Einführung einer neuen Nomenklatur für Calix[5]arene wird gegenwärtig in der Literatur diskutiert (STEWART et al., 1995; THONDORF and BRENN, 1997; HARADA and SHINKAI, 1995).

p-*tert*-Butylcalix[5]aren liegt ähnlich wie das homologe Tetramer im Kristall in einer *cone*-Konformation vor, die wie beim Calix[4]aren durch einen Ring intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den phenolischen OH-Gruppen stabilisiert wird. Größere O...O-Abstände weisen darauf hin, daß die Wasserstoffbrückenbindungen etwas

schwächer als im Calix[4]aren sind, demzufolge ist auch die Energiebarriere der $cone \rightleftharpoons cone$ Inversion niedriger als beim Calix[4]aren. Für Calix[5]aren sind neben dem $cone$ -Konformer ebenfalls $partial\ cone$ -, $1,2$ - $alternate$ - und $1,3$ - $alternate$ -Konformere bekannt (STEWART et al., 1995; ASFARI and VICENS, 1995). Molekülmechanische Berechnungen zeigen, daß sowohl für p - $tert$ -Butylcalix[5]aren als auch für Penta-hydroxycalix[5]aren die $cone$ -Konformation am stabilsten ist (THONDORF and BRENN, 1997; STEWART et al., 1995). Die Energieunterschiede zwischen den Grundkonformationen sind jedoch eher gering, wodurch unter experimentellen Bedingungen die Koexistenz aller Konformere in Lösung sehr wahrscheinlich ist. Im kristallinen Zustand wurde ausschließlich die $cone$ -Konformation gefunden (CORUZZI et al., 1982; JUNEJA et al., 1992; PERRIN and LECOCQ, 1991).

Die erschöpfende O-Alkylierung der phenolischen OH-Gruppen mit Ester- und Ether-Reagenzien führt ähnlich wie bei den Ester-Derivaten des Tetramers zu einer Einschränkung der Flexibilität der Ringstruktur (STEWART et al., 1995). Eine gewisse Mobilität bleibt jedoch auch bei einem Rest $R = n$ -Butyl erhalten. Mit der Einführung von Benzylethergruppen wird eine Immobilisierung der Ringstruktur erreicht. Ebenso weisen Pentabenzooat- und Pentatosylatester auf der NMR-Zeitskala eine konformative Fixierung der $cone$ -Konformation auf ($\Delta G^\ddagger \gg 20$ kcal/mol). Auch für p - $tert$ -Butylcalix[5]arenpentaessigsäureester wurde in Lösung eine $cone$ -ähnliche Konformation nachgewiesen (BARRETT et al., 1993). Die Röntgenkristallstruktur dieser Verbindung, die im Vergleich zur dynamischen Durchschnittsstruktur auf der NMR-Zeitskala eine statische Struktur widerspiegelt, weist eine gestörte $cone$ -Konformation auf (BARRETT et al., 1993), die nach der GUTSCHE-Nomenklatur auch als „ $cone$ -in“ bezeichnet wird. Dieses Molekül besitzt keine kristallographische Symmetrie bzw. entspricht keiner anderen bekannten geometrischen Anordnung (Abb. 6).

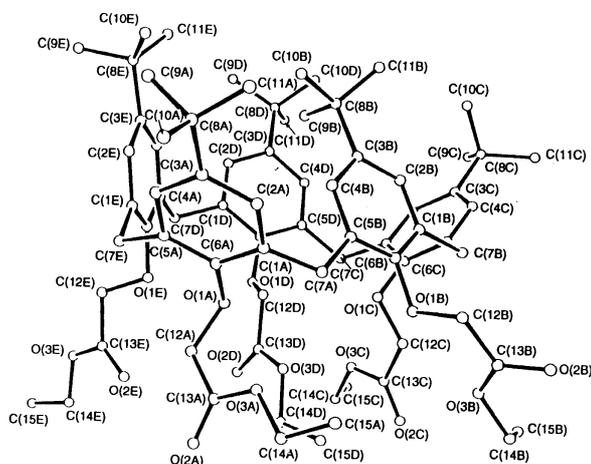


Abb. 6: Röntgenkristallstruktur des p - $tert$ -Butylcalix[5]arenpentaessigsäureethylesters (BARRETT et al., 1993)

Diese Konformation läßt sich am besten durch die Winkel, die aus den aromatischen Einheiten und der Ebene der Methylengruppen gebildet werden, beschreiben. Dabei ist ein Phenolbaustein nach innen geklappt und die dazugehörige *tert*-Butylgruppe auf die gegenüberliegenden Phenolbausteine gerichtet. Der Hohlraum wird dadurch geschlossen und ist theoretisch nur schwer für Gastmoleküle zugänglich. Es ist anzunehmen, daß dieser Zustand in Lösung sehr stark von der Polarität des Lösungsmittels abhängig ist. Während in organischen Lösungsmitteln eine *cone*-ähnliche Konformation stabil sein wird, ist es denkbar, daß in wäßrigen Medien aufgrund von hydrophoben Effekten eine gestörte *cone*-Konformation zu Grunde liegt.

PAPPALARDO and PARISI (1996) konnten für Kronenether-Derivate des *p-tert*-Butylcalix[5]arens NMR-spektroskopisch die Bildung stabiler *endo*-Komplexe in CDCl₃-CD₃OD nachweisen. Daher sollte es möglich sein, daß der Essigsäureethylester des *p-tert*-Butylcalix[5]arens in Abhängigkeit vom Lösungsmittel als Rezeptor für kleine organische Moleküle geeignet ist.

Weiterhin zeigen Pentaester Ionenbindungseigenschaften für Alkalimetallionen (BARRETT et al., 1993). Aus den Extraktionsstudien geht hervor, daß bevorzugt größere Kationen wie K⁺, Rb⁺ und Cs⁺ komplexiert werden, deren Komplexbildungskonstanten sich jedoch nur schwach unterscheiden. Ursache dafür sind zum einen die Anzahl der Donorplätze im Calix[5]aren und das Zusammenspiel zwischen Kationengröße und Größe der Cavität am unteren Rand. Für eine Na⁺-Komplexierung ist der untere Rand des Pentamers beispielsweise zu groß.

2.2.3 Calix[6]aren

Das Calix[6]aren zeichnet sich im Vergleich zu Calix[4]- und Calix [5]aren durch einen größeren Hohlraum und eine höhere Flexibilität aus, wodurch sich die Anzahl stabiler Konformationen erhöht. HARADA and SHINKAI (1995) fanden beispielsweise bei molekülmechanischen Untersuchungen bis zu 90 Energieminima für das Calix[6]aren.

Für das Hexamer werden im kristallinen Zustand drei stabile Konformationen diskutiert, die *pinched-cone*- (ANDREETTI et al., 1989; HALIT et al., 1988), die *winged-cone*- (ANDREETTI et al., 1987) und die *1,2,3-alternate*-Konformation (ATWOOD et al., 1992; CASNATI, 1997), wobei sich die Konformationen in der Position der Methylenkohlenstoffatome bezüglich des Hohlraums, der durch die aromatischen Ringe gebildet wird, unterscheiden. In der *winged*-Konformation sind alle sechs verbrückten Methylengruppen nach außen gerichtet (Abb. 7a). Während zwei Aryl-

Einheiten nach außen neigen, befinden sich die verbleibenden vier in einer aufrechten Anordnung. Im Gegensatz dazu sind in der *pinched*-Konformation zwei gegenüberliegende Methylengruppen nach innen gerichtet, wodurch der Hohlraum zusammengedrückt wird (Abb. 7b).

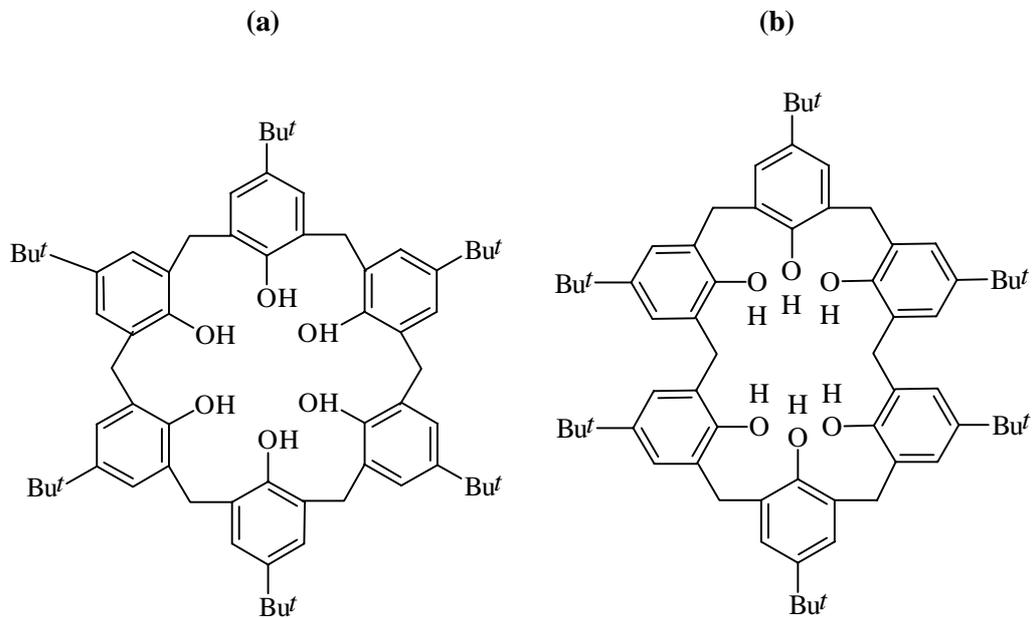


Abb. 7: *winged*- (a) und *pinched*-Konformation (b) von *p*-*tert*-Butylcalix[6]aren (LÜNING et al., 1998)

Abb. 8 zeigt die Röntgenkristallstruktur einer *1,2,3-alternate*-Konformation, bei der sich jeweils drei benachbarte Aryl-Einheiten auf verschiedenen Molekülseiten befinden (ATWOOD et al., 1992).

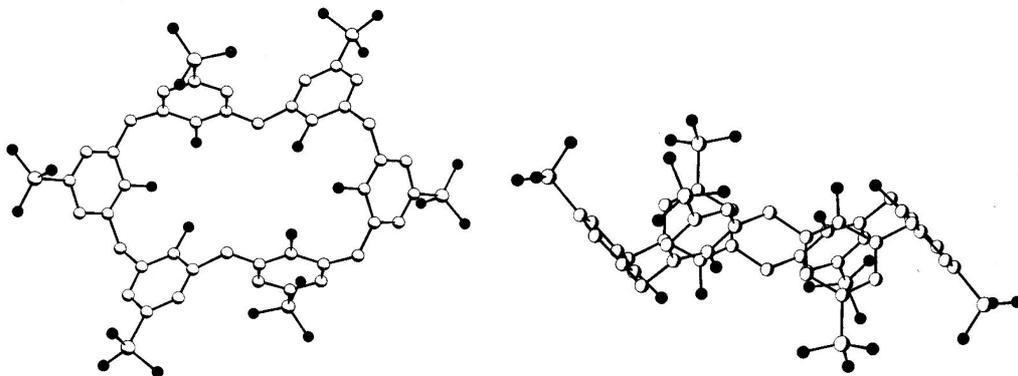


Abb. 8: Röntgenkristallstruktur einer *1,2,3-alternate*-Konformation des Natriumsalzes von Calix[6]aren-*p*-sulfonsäure (ATWOOD et al., 1992). Links: Ansicht von oben; rechts: Seitenansicht

In Lösung wird von *pinched*- und *winged*-Konformation berichtet. Basierend auf NMR- und Moleküldynamik-Untersuchungen beschreiben MOLINS et al. (1992) die *winged*-Konformation eines Calix[6]arens mit alternierenden *tert*-Butyl- und Chlor-Substituenten am oberen Rand als stabilste Anordnung, wobei diese Konformation durch drei unterschiedliche dynamische Prozesse gekennzeichnet ist: die Ringinversion des Makrocyclus, die Pseudorotation der Aryl-Einheiten und die Umkehr der Ausrichtung der Wasserstoffbrücken. REINHOUDT und Mitarbeiter diskutieren dagegen das Vorhandensein einer *pinched*-Konformation als stabilste Konformation (JANSSEN et al., 1996; van HOORN et al., 1996). Infolge schneller Pseudorotation und Ringinversion erscheint die *pinched*-Konformation auf der NMR-Zeitskala als eine C_n -symmetrische Durchschnittsstruktur, die bei tiefen Temperaturen eine statische asymmetrische Struktur annimmt (JANSSEN et al., 1996; MAGRANS et al., 1998).

Im Gegensatz zu Calix[4]- und Calix[5]aren führt eine vollständige Substitution der phenolischen OH-Gruppen mit voluminösen Gruppen nicht zu einer Immobilisierung des Calix[6]arens, da eine Ringinversion des makrocyclischen Systems auch am oberen Rand erfolgen kann. In der Arbeitsgruppe UNGARO (Parma, Italien) konnte jedoch gezeigt werden, daß 1,3,5-Trimethoxy-2,4,6-trialkoxy-Derivate in ihrer Beweglichkeit deutlich eingeschränkter sind als z.B. das entsprechende Hexaalkoxy-Derivat (CASNATI, 1997).

Möglichkeiten, die Konformation des Calix[6]arens dennoch einzufrieren, sind durch Einführung sterisch anspruchsvoller Substituenten gegeben (CASNATI et al., 1991; KANAMATHAREDDY and GUTSCHE, 1993). Die in Abschnitt 2.2 erwähnte Variante b) - die Verbrückung der Hohlräume - eignet sich besonders für eine vollständige Fixierung der *cone*-ähnlichen Konformation des Calix[6]arens (LÜNING et al., 1998; SAIKI et al., 1996).

Trotz noch vorhandener konformativer Flexibilität des Hexaester-Derivates wurde in der vorliegenden Arbeit die Variante a) - die vollständige Alkylierung des Calix[6]arens - vorgezogen, da aufgrund ionen-selektiver Eigenschaften und der Kopplung an Kieselgel eine Immobilisierung der *cone*-ähnlichen Ringstruktur möglich sein sollte. Zudem erlaubt eine moderate Beweglichkeit des Rezeptors eine bessere Anpassung an das Gastmolekül.

Aus der Bestimmung von Komplexbildungskonstanten und Extraktionsuntersuchungen geht hervor, daß Hexaester bevorzugt Cs^+ - gegenüber Na^+ -Ionen komplexieren (ARNAUD-NEU et al., 1989). Desweiteren weisen sie eine hohe Selektivität für Ammonium- (CHANG et al., 1991; CASNATI, 1997) und Guanidinium-Ionen (ARAKI et al., 1994) auf. Ferner ist bekannt, daß das Hexaamid einen 1:2-Komplex mit Na^+ bildet und vermutlich in einer *cone*-ähnlichen Konformation vorliegt (CASNATI et al., 1992). Dabei übt das zuerst komplexierte Natrium-Ion einen positiven allosterischen Effekt aus, was zu einer Präorganisation des Liganden in der *cone*-Konfor-

mation führt und die Koordination des zweiten Kations begünstigt. Die Komplexbildungskonstante für den 1:1-Komplex ist jedoch so schwach, daß dieser nicht nachgewiesen werden konnte. Erst im Verhältnis 1:2 ist eine Komplexbildung zu beobachten. Aufgrund dessen sollte es für die HPLC-Untersuchungen an Calix[6]aren-Phasen von Interesse sein, den Einfluß der Ionen aus der mobilen Phase zu testen. Vermutlich läßt sich durch die Wahl des richtigen Puffer-Kations der Hohlraum des immobilisierten Calix[6]arens präorganisieren und somit die chromatographischen Trenneigenschaften verbessern.

2.2.4 Calix[8]aren

Die Verknüpfung von acht Phenolbausteinen führt zu Makrocyclen mit einer sehr hohen Flexibilität. Eine einfache und anschauliche Charakterisierung der Strukturen ist kaum noch möglich.

Für das *p-tert*-Butylcalix[8]aren wurde eine „*pleated-loop*“-Konformation als stabilste kristalline Struktur ermittelt (GUTSCHE et al., 1985, Abb. 9(a)). In Lösung wurde eine stabile *pinched*-Konformation gefunden (GUTSCHE, 1983, Abb. 9(b)).

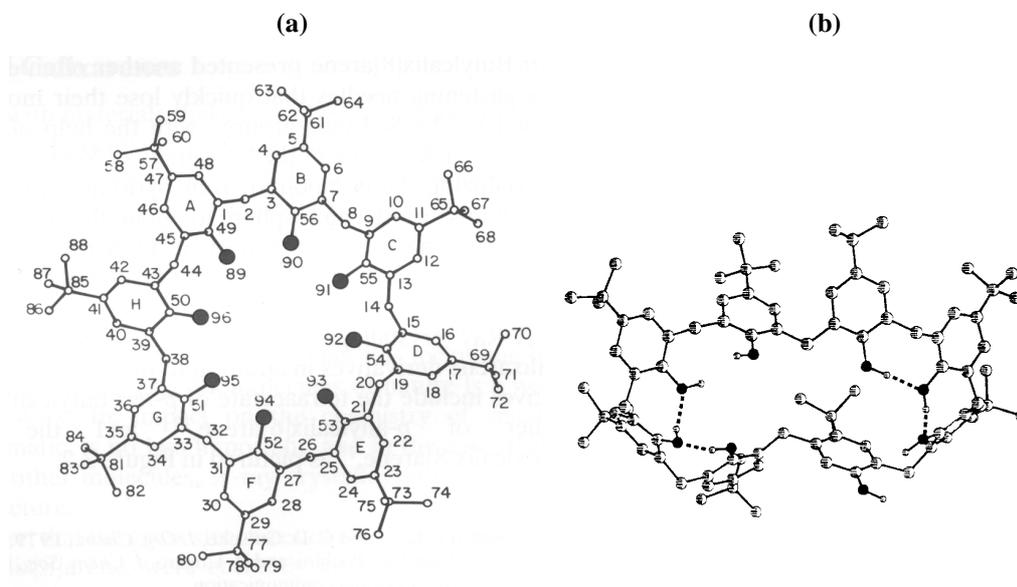


Abb. 9: *pleated-loop*- (a) und *pinched*-Konformation (b) des *p-tert*-Butylcalix[8]arens

Das Verhalten in Lösung zeigt Ähnlichkeiten zu dem von *p-tert*-Butylcalix[4]aren. Die Energiebarriere der Ringinversion des Octamers entspricht sehr genau der des Tetramers ($\Delta G^\ddagger = 15,7$ kcal/mol). Die Resonanz der Methylenprotonen im Calix[8]aren

ergibt wie beim Calix[4]aren nur ein Paar von Dubletts (GUTSCHE and BAUER, 1981b). Ursache dieses Phänomens sind intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, die die Konformation mit einem regelmäßigem „auf-und-ab“ der phenolischen Einheiten stabilisieren. Dadurch werden alle Methylengruppen äquivalent, so daß sich für die Protonen eine ähnliche Umgebung wie im Calix[4]aren ergibt. Das Octamer verhält sich dabei so, als wäre es ein Dimer des Calix[4]arens. Es resultiert die oben erwähnte *pinched*-Konformation (Abb. 9(b)).

Eine vollständige Umsetzung der phenolischen OH-Gruppen zum Octaester, beschrieben von ARNAUD-NEU et al. (1989), führt leider nicht zur Fixierung einer Konformation, da die *p*-Substituenten durch den Ring schwingen können (IWAMOTO et al., 1993; GUTSCHE, 1989).

Bei der Kopplung des Octaesters an Kieselgel ist jedoch eine Einschränkung der konformativen Vielfalt wahrscheinlich, da die Ester-Ketten fixiert werden und somit die *p*-Substituenten nicht mehr durch den Ring treten können. Welche Konformationen vorliegen, kann nicht vorhergesagt werden.

Aus Extraktions-Untersuchungen von Calix[8]aren-Derivaten geht hervor, daß ihre Kationen-Bindungsfähigkeiten gegenüber Na^+ , K^+ und Cs^+ sehr schwach sind und geringe Selektivitäten zeigen (ARNAUD-NEU et al., 1989).

Über die Bildung von Wirt-Gast-Komplexen mit Calix[8]arenen wurde bereits mehrfach berichtet. Selektive Bindungseigenschaften wurden beispielsweise für große aromatische Moleküle wie C_{60} (ATWOOD et al., 1994; NAKASHIMA et al., 1995) oder kleine organische Moleküle (SHINKAI et al., 1988; WILLIAMS and VERHOEVEN, 1992; SHINKAI et al., 1990) beobachtet. Es wurde festgestellt, daß - insbesondere bei der Bindung kleiner Gastmoleküle - 1:2-Komplexe gebildet werden. Die Komplexbildung läuft dabei über einen „induced-fit“ ab, der die Bildung zweier Cavitäten beinhaltet. Es erfolgt eine Anpassung des Calix[8]aren-„Hohlraums“ an den zu komplexierenden Gast, was einen interessanten Aspekt bezüglich der chromatographischen Untersuchungen darstellt.

2.3 Anwendungen der Calixarene in der analytischen Chemie

Das Anwendungspotential der Calixarene in der analytischen Chemie ist aufgrund ihrer Rezeptoreigenschaften für Ionen und organische neutrale Moleküle sehr vielfältig. Das Spektrum reicht vom Einsatz als Wirtmolekül in verschiedenartigen Sensoren bis hin zur Verwendung als stationäre Phasen in der Chromatographie (Gas- und Flüssig-

chromatographie). In jüngster Zeit finden Calixarene auch als pseudostationäre Phasen in der Kapillarelektrophorese verstärkt Verwendung. Tab. 1 gibt einen Überblick über Anwendungsmöglichkeiten der Calixarene in der analytischen Chemie.

Tab. 1: Literaturübersicht über Calixarene in der analytischen Chemie

analytische Anwendungen	Verwendungszweck	Literatur
Sensoren	Übersichtsartikel	DIAMOND und McKERVEY, 1996
	als chemische Sensoren zur Detektion organischer Verbindungen	SCHIERBAUM et al., 1993; ARDUINI et al., 1997; RÖSLER et al., 1998; DALCANALE et al., 1998
	als ionenselektive Elektroden	CADOGAN et al., 1992; DENG et al., 1993; BOCCHI et al., 1995; O'CONNOR et al., 1997; VICOSO et al., 1997; LEE et al., 1997; NEMILOWA et al., 1997; KANG et al., 1998; LAN et al., 1998; KATSU, 1998
	als elektrochemische Sensoren für Ionen	KUMAGAI et al., 1996; GALE et al., 1998
	zur Detektion von Biomolekülen	WANG et al., 1994; KEMIN et al., 1995
	als konduktometrische Biosensoren zur Analyse von Peroxidase	SERGEYEVA et al., 1998
	SAW (Surface-acoustic-wave transducer)	SWANSON et al., 1996
	als ISFET und EIS zur Detektion von Erdalkali- und Schwermetallionen sowie Anionen	MLIKA et al., 1997a; MLIKA et al., 1997b; MLIKA et al., 1998; KAWAURA et al., 1998
Flüssigchromatographie	als Stationärphasen	IWATA et al., 1993; GLENNON et al., 1993; IWATA et al., 1994; GLENNON et al., 1994; FRIEBE et al., 1995; GLENNON et al., 1996; PATHAK et al., 1996; MENYES et al., 1996; ARENA et al., 1996; OHTO et al., 1997; LEE et al., 1997; GLENNON et al., 1997; GEBAUER et al., 1998a; GEBAUER et al., 1998b; XU et al., 1998; HEALY et al., 1998
	als Additive zur mobilen Phase	PARK et al., 1993; MILLERSHIP et al., 1998
Superkritische Fluids		GLENNON et al., 1997
Gaschromatographie	als Stationärphasen	MANGIA et al., 1983; MNUK et al., 1995; ZHONG et al., 1995; MNUK et al., 1996; ZHANG et al., 1997; XIAO et al., 1997; ZHANG et al., 1997; ZHANG et al., 1998; LIN et al., 1998a; LIN et al., 1998b; ZENG et al., 1998; LIM et al., 1998; IKI et al., 1998
Kapillarelektrophorese	achirale Calixarene	SHOHAT et al., 1994; ZHANG et al., 1994; BÄCHMANN et al., 1995; SUN et al., 1997; ZHAO et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 1998; BAZZANELLA et al., 1998; ARCE et al., 1998; TANAKA et al., 1998
	chirale Calixarene	PENA et al., 1996; PENA et al., 1997;

3 Retentionsmechanismen in der Reversed Phase-HPLC

3.1 Überblick

Da die Reversed Phase-HPLC (RP-HPLC) sowohl der Adsorptions- als auch der Verteilungschromatographie zugeordnet werden kann, gibt es eine Vielzahl von Modellen, die versuchen, den Retentionsmechanismus in der RP-Chromatographie zu beschreiben (HORVÁTH et al., 1976; MARTIRE and BOEHM, 1983; ZHU, 1986). Die Ausführungen in diesem Kapitel (Abschnitt 3.2) beschränken sich auf das Modell der solvophoben Adsorption von HORVÁTH et al. (1976).

Weiterhin schafft dieses Kapitel mit der Beschreibung von Retentionsmechanismen der in der RP-HPLC häufig verwendeten RP 18- und CD-Stationärphasen (Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2) Voraussetzungen für die Beschreibung von Retentionsmechanismen immobilisierter Calixarene (Abschnitt 3.3.3). Da bisher nur wenig über Retentionsmechanismen von Calixaren-Phasen bekannt ist, wird versucht, mögliche Wechselwirkungen zu klassifizieren. Durch Vergleiche der Retentionseigenschaften von RP 18- und CD-Phasen sowie der Analyse möglicher Wechselwirkungen im Calixaren-Stationärphasen-System ist es möglich, Retentionsmechanismen für Calixaren-Phasen vorzuschlagen.

3.2 Modell der solvophoben Adsorption in der Reversed Phase-HPLC

In der Flüssigchromatographie wird die Retention eines Analyten durch die Energiebilanz der Wechselwirkungen von Analyt/Stationärphase, mobile Phase/Stationärphase sowie Analyt/mobile Phase bestimmt. Meist liegt ein Flüssig-Flüssig-Verteilungssystem vor, da die mobile Phase in der RP-Chromatographie polarer als die stationäre Phase ist, und die Probemoleküle oftmals polaren Charakter besitzen.

HORVÁTH et al. (1976) beschreiben die Retention als ein ausschließlich von der Solvation einer Probe abhängigen Prozeß, die von der Verteilung bzw. Löslichkeit des Analyten in der mobilen Phase und von der Assoziation des Analyten mit der unpolaren Stationärphase abhängt. Da meist Gemische von Wasser/Acetonitril oder Wasser/Methanol bzw. wäßrige Pufferlösungen als mobile Phasen verwendet werden, hängt der solvophobe Effekt auch von der Polarität der Probemoleküle ab. Je unpolarer die Oberfläche der Probemoleküle ist, um so schwächer sind ihre Wechselwirkung mit polaren Lösungsmitteln wie z.B. Wasser. Durch Zusatz organischer Lösungsmittel,

insbesondere Acetonitril oder Methanol, können selektive Effekte hervorgerufen werden. Da Acetonitril eine stark verringerte Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen besitzt, wird es die relativ stark geordnete Struktur des Wassers viel stärker beeinflussen als Methanol. Methanol, das am meisten „wasserähnliche“ Lösungsmittel, verändert die Struktur des Wassers in einem viel geringeren Ausmaß. Es bildet mit den Wassermolekülen über Wasserstoffbrückenbindungen Hydrate. Zum anderen verringert sich aufgrund der CH_3 -Gruppe des Methanols die Polarität der mobilen Phase.

Der Retentionsmechanismus hängt in starkem Maße auch von der stationären Phase ab. Für die RP-Chromatographie wurden eine Vielzahl von Säulenmaterialien entwickelt. Die am häufigsten verwendeten Stationärphasen sind derivatisierte Kieselgelphasen mit Alkylketten, z.B. C_8 - oder C_{18} -Ketten (MEYER, 1990). Kieselgel erweist sich aufgrund seiner mechanischen Stabilität, relativ geringer chemischer Reaktivität gegenüber organischen Lösungsmitteln, großer spezifischer Oberfläche, definierter Porenverteilung und Porenstruktur sowie Silanol-Gruppen an der Oberfläche für die Modifizierung als vorteilhaft. Durch Derivatisierung der Kieselgeloberfläche lassen sich Stationärphasen mit unterschiedlich polaren oder unpolaren Eigenschaften entwickeln, die die Retention und Selektivität beeinflussen. Im folgenden werden RP 18- und CD-Phasen vorgestellt, die als Referenz-Phasen in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

3.3 Stationärphasen mit Reversed Phase-Eigenschaften

3.3.1 RP 18-Phasen

RP 18-Phasen zeichnen sich vor allem durch ihren stark hydrophoben Charakter aus. Neben den Alkylketten können ferner auch Silanol-Gruppen mit den Analyten in Wechselwirkung treten, da aus sterischen Gründen nicht alle Hydroxylgruppen der Kieselgeloberfläche mit Alkylketten zur Reaktion gebracht werden können (UNGER, 1989).

Die Struktur der RP 18-Phasen ist noch nicht vollständig geklärt. Je nach Silanisierungsverfahren (Verwendung von mono- oder multifunktionellen Alkylsilanen) erhält man Phasen mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften (UNGER et al., 1976). Bei Einsatz monofunktionaler Silane sind dies Phasen mit monomerer Bedeckung, die sogenannten „Brush“-Phasen. Bei di- oder trifunktionellen Silanen (z.B. Di- oder Trialkoxysilane) ist die Möglichkeit der Vernetzung untereinander gegeben, so daß polymere Phasen entstehen. Der unerwünschte Wechselwirkungsbeitrag durch Silanol-Gruppen kann somit erheblich eingeschränkt werden.

Die Ausrichtung der Alkylketten auf der Oberfläche des Kieselgels ist sehr unterschiedlich. Mitunter ist die Verteilung der C₁₈-Ketten auf der Kieselgeloberfläche nicht homogen. Weiterhin können sich die Ketten falten, wobei ihre Konformation stark von der Zusammensetzung des Eluenten abhängig ist. UNGER (1989) beschreibt das Verhalten immobilisierter Alkylketten als einen dynamischen Zustand. Sie verhalten sich wie „...Seegrass auf dem Meeresboden...“ oder können sich zu „...Knäueln verformen...“. In wäßrigen Eluenten bildet sich eine relativ starre Oberflächenschicht aus, wodurch die zur Verfügung stehende hydrophobe Oberfläche verkleinert und somit für Probemoleküle schwerer zugänglich wird.

3.3.2 Cyclodextrin-Phasen

Cyclodextrine sind cyclische Oligoglykoside und bestehen aus 6 bis 12 Glukoseeinheiten, die in 1,4-Position verknüpft sind. α -CD ist aus 6, β -CD aus 7 und γ -CD aus 8 Glukoseeinheiten aufgebaut. Sie haben eine toroidale Gestalt, die sich durch einen hydrophoben Innenraum auszeichnet. An der einen Seite der Öffnung des Torus befinden sich die sekundären, im Uhrzeigersinn angeordneten Hydroxylgruppen, auf der anderen Seite die primären, dem Uhrzeigersinn entgegengesetzt angeordneten Hydroxylgruppen. Damit ist das CD-Molekül in der Lage, intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Das Innere des Hohlraums bietet für eine Vielzahl unterschiedlich stark wasserlöslicher Verbindungen Platz, wobei Einschlußkomplexe (Wirt-Gast-Komplexe) gebildet werden können. Diese Eigenschaft wird vielfältig als Trennfunktion für den chromatographischen Einsatz genutzt, wobei die Retention der Moleküle durch verschiedene physikalisch-chemische Einflüsse, wie Form und Größe der zu trennenden Moleküle, van-der-Waals- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Oberflächen, geprägt wird. Bei Verwendung wäßrig-organischer, mobiler Phasen wird die Retention hauptsächlich durch Einschlußkomplexbildung beeinflusst. Die Moleküle der mobilen Phase konkurrieren dabei mit den zu trennenden Molekülen um den Raum im hydrophoben Inneren der Cavität. Deshalb nimmt mit zunehmenden organischen Modifier-Anteil die Retention der zu trennenden Substanzen ab. Auch Polaritätsunterschiede verschiedener Lösungsmittel können bei gleichbleibenden Anteilen zu einem Abfall der Retention führen. So werden beispielsweise Acetonitril oder Ethanol viel stärker von Cyclodextrin gebunden als Methanol. Dadurch wird verständlich, daß Probemoleküle mit einer mobilen Phase aus

Wasser/Methanol (50:50, v/v) viel stärker retardiert werden als mit Wasser/Acetonitril (50:50, v/v).

Sehr starkes Interesse finden CD-Phasen vor allem wegen ihrer Fähigkeit, Enantiomere zu trennen. Zum einen besitzen Cyclodextrine eine Vielzahl attraktiver Bindungsstellen, die für eine chirale Erkennung notwendig sind, wie beispielsweise die chiralen C-Atome der Glukoseeinheit (5 Kohlenstoffe pro Einheit) und die sekundären und primären Hydroxylgruppen jeweils an den Öffnungen des Hohlraums. Zum anderen ist die Wechselwirkung mit den Analyten aufgrund des Einschlusses im Hohlraum intensiv. Daher eignen sich CD-Stationärphasen auch zur Trennung von Positions- und Strukturisomeren. In Abhängigkeit von der Ringgröße lassen sich sowohl große Moleküle, wie substituierte Benzopyrene, als auch kleine Ionen analysieren. Durch Einschlußkomplexbildungen resultieren ungewöhnlich hohe Selektivitäten, die sich von denen der Normalphasen- und gewöhnlichen RP-Chromatographie deutlich unterscheiden. Die molekulare Erkennung von Verbindungen, die nur in ihrer Geometrie oder Konformation differieren, ist bemerkenswert.

Bezüglich der Ringgröße der Cyclodextrine lassen sich unterschiedliche Selektivitäten feststellen. Betrachtet man das Retentionsverhalten disubstituierter Aromaten, so folgt für β -CD-Phasen im allgemeinen die Retentionsreihenfolge *para* > *ortho* > *meta* sowie für α -CD-Phasen *para* > *meta* > *ortho*. Im Gegensatz dazu sind γ -CD-Phasen weniger zur Trennung disubstituierter Aromaten, sondern zur Trennung größerer Moleküle geeignet.

Nitroaniline stellen z.B. ein geeignetes Testgemisch zur Beschreibung der Retentionseigenschaften an β -CD-Phasen dar (ARMSTRONG and DeMOND, 1984). Interessant ist, daß die absolute Retention der drei Isomere, insbesondere der Unterschied der Retention des *para*- und *ortho*-Isomers, direkt mit dem Bedeckungsgrad der CD-Phasen korreliert. *p*-Nitroanilin wird auf einer β -CD Säule mit geringer Beladung zuerst eluiert. Mit zunehmender Bedeckung wird *p*-Nitroanilin als letztes der drei Isomere eluiert, seine Verweildauer erhöht sich im stärkeren Maße als die der *ortho*- und *meta*-Isomere. Das kann als Indikator für eine größere „Bindungskonstante“ des *p*-Nitroanilins angesehen werden, die aus der linearen Geometrie dieses Moleküls resultiert (ARMSTRONG and DeMOND, 1984) und zu einer optimaler Penetration in das β -CD-Molekül führt.

CD-Phasen zeichnen sich durch ein hohes Maß an Selektivität aus, die durch die Bildung von Einschlußkomplexen vor allem bei Verwendung von wäßrig-organischen, mobilen Phasen verursacht wird. Sie lassen sich effektiv sowohl im RP- als auch im Normalphasen-Modus anwenden, wobei im letzteren Fall von einem anderen Mechanismus ausgegangen werden kann, der nicht auf die Bildung von Einschluß-

komplexen, sondern auf Adsorptions- und Dipol-Wechselwirkungen zurückzuführen ist (ARMSTRONG and DeMOND, 1984).

3.3.3 Calixaren-Phasen

Schon der einfache Aufbau des Grundgerüsts des Calix[4]arens läßt seine Fähigkeit erkennen, kleine organische Moleküle und Ionen einzuschließen. Größere Calixarene wie das Hexamer und das Octamer sind aufgrund ihres größeren Hohlraums in der Lage, größere Moleküle zu komplexieren bzw. 1:2-Komplexe mit kleineren Molekülen zu bilden (SHINKAI, 1988). Bei einer Immobilisierung von Calixarenen an chromatographische Adsorbentien sollten diese Eigenschaften erhalten bleiben und für die Einschlußkomplexbildungs-Chromatographie ähnlich wie Cyclodextrin-Phasen geeignet sein. Bisher ist der Einsatz von Calixaren-Stationärphasen in der Flüssigchromatographie nur auf einige wenige Arbeiten beschränkt (s. Tab. 1).

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten für die Immobilisierung von Calixarenen an chromatographische Adsorbentien:

- 1) die Kopplung über den oberen Rand und
- 2) die Kopplung über den unteren Rand der Makrocyclen (s. Abb. 1).

Die Synthese von Calixaren-Phasen nach Methode 1) liefert Stationärphasen mit ionenchromatographischen, zum Teil auch mit RP-Eigenschaften (GLENNON et al., 1994, 1996, 1997; ARENA et al., 1996). Nach Methode 2) werden Stationärphasen mit RP Eigenschaften, die besonders zur Chromatographie von neutralen organischen Molekülen geeignet sind, erhalten (IWATA et al., 1993, 1994; GEBAUER, 1993; FRIEBE et al., 1995; MENYES et al., 1996; LEE et al., 1997; XU et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Stationärphasen nach Methode 2) synthetisiert.

Da bisher nur wenig über Retentionsmechanismen von Calixaren-Phasen bekannt ist, wird in diesem Abschnitt versucht, mögliche Wechselwirkungen, insbesondere Wirt-Gast-Wechselwirkungen, zu beschreiben, um im Zusammenhang mit den erzielten HPLC-Ergebnissen Trennmechanismen ableiten zu können (s. Kapitel 6).

Die Komplexierung von Gastmolekülen im Hohlraum der Calixarene kann auf das Zusammenspiel mehrerer intermolekularer Wechselwirkungen beruhen. Dazu gehören:

- solvophobe und hydrophobe Effekte,
- van-der-Waals-Wechselwirkungen (induzierte Dipole, Dispersionskräfte und/oder Charge-Transfer (CT)-Wechselwirkungen),
- elektrostatische Wechselwirkungen (Coulomb-Wechselwirkungen) sowie

- sterische Anpassungen, insbesondere bei den größeren Calixarenen, durch „induced-fit“.

Die Bildung von Wasserstoffbrücken innerhalb der hydrophoben Cavität ist unwahrscheinlich, da die verwendeten Calixaren-Derivate nicht über die notwendigen Voraussetzungen für entsprechende Bindungsstellen verfügen.

In wäßrigen Lösungen wird vor allem die Attraktion zwischen lipophilen Teilen von Wirt- und Gastmolekülen dominieren. Der „klassische“ hydrophobe Effekt resultiert aus dem Entropiegewinn ΔS° bei der Freisetzung von Wassermolekülen, wobei der Gast beim Eintritt in den Hohlraum seine Hydrathülle abstreift (SCHNEIDER, 1991). Für solvophobe Effekte können statt, oder zusätzlich zu den erwähnten Entropie-, auch Enthalpiargumente (ΔH°) ins Feld geführt werden. Die erzielte Erniedrigung der Enthalpie ist dabei Ausdruck einer erhöhten Stabilität von Wirt-Gast-Komplexen. Neben dieser häufig beobachteten Enthalpieabnahme für die Assoziatbildung ist auch eine Abnahme der Wärmekapazität ΔC_p charakteristisch, da durch das Freisetzen von Solvatwasser die Anzahl der wärmeaufnehmenden Bindungen sinkt. Als Konsequenz dessen sind die $\Delta H^\circ/\Delta S^\circ$ -Werte für Wirt-Gast-Komplexe deutlich temperaturabhängig. Demzufolge ist der Einfluß der Temperatur während der HPLC an den Calixaren-Phasen von Interesse.

Ein auf dem ΔH° -Gewinn beruhendes Modell beschreibt den solvophoben Effekt durch kohäsive Kräfte - meist Wasserstoffbrückenbindungen - zwischen den Solventmolekülen, für welche die Oberflächenspannung ein experimentelles Maß liefert (PULLMAN, 1981). Beim Zusammentreffen zweier Teilchen an einer zuvor z.B. durch Wasser solvatisierten Oberfläche A führt die Bildung von einer statt zuvor zwei Cavitäten in Wasser zu einer Freisetzung von Solventmolekülen mit einem Gewinn an kohäsiver Energie.

Ganz entscheidenden Einfluß auf den solvophoben Effekt haben auch die Struktur des Gastmoleküls und die Gestalt der Cavität, da die Kontaktfläche A im direkten Zusammenhang mit $\Delta H_{\text{Komplex}}$, der Komplexbildungsenergie, steht (SCHNEIDER et al., 1990a). Dabei zeigt sich bei strukturell gleichartigen Rezeptoren alternativ mit und ohne Hohlraum ein Zugewinn von $\Delta H_{\text{Komplex}}$ durch das Vorhandensein einer Cavität. Aus diesem Grund wurden die HPLC-Untersuchungen durch Verwendung einer neu entwickelten *p-tert*-Butylphenol-Phase ergänzt. Bei der Interpretation der chromatographischen Ergebnisse ist deshalb ein spezieller Cavitätseffekt zu berücksichtigen. Sollten demzufolge eine regelmäßige Zunahme der Retentionsfaktoren zwischen den Calix[n]aren-Phasen und der *p-tert*-Butylphenol-Phase ergeben, kann das auf die unterschiedlichen Kontaktflächen zurückgeführt werden. Bei einem allseitigen Einschluß würden somit die größten Retentionsfaktoren zu erwarten sein. Andererseits ist

es möglich, daß bei Wechselwirkungen zwischen Analyten mit planarer, hydrophober Gestalt und dem planaren *p-tert*-Butylphenol-Derivat die Kontakte intensiver sind als in einem zu kleinen oder zu großen Hohlraum. Die Retentionsfaktoren sind dann für den linearen Liganden größer als für die Cavitäten.

Ferner können auch solche Teile der Gastmolekülen erheblich zur Bindung in Calixarenen beitragen, die aus dem Hohlraum herausragen und damit dem Kontakt zwischen Wirt und Gast entzogen sind. Dieser sogenannte Extracavitätsseffekt ist vor allem beim Calix[4]aren zu erwarten, da der Hohlraum sehr klein ist. SCHNEIDER et al. (1990b) konnten zeigen, daß solche Molekülteile, die nicht im Kontakt mit dem Wirtmolekül stehen, die Komplexbildung um einen beträchtlichen Faktor erhöhen können.

Während der solvophobe Effekt die Stabilität supramolekularer Komplexe erhöht, werden andere selektive Wechselwirkungen zwischen Wirt- und Gastmolekül herabgesetzt. So entfaltet Wasser als mobile Phase neben den auf Desolvation der isolierten Moleküle beruhenden entropischen und/oder kohäsiven hydrophoben Effekte, auch die Assoziatbildung, die durch seine extrem geringe Polarisierbarkeit auch die Assoziatbildung induziert wird. Andererseits werden Coulomb-Wechselwirkungen durch Wasser und andere polare Lösungsmittel aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen abgeschwächt und durch unpolare Lösungsmittel verstärkt (SCHNEIDER, 1991).

Auch den van-der-Waals-Wechselwirkungen kommen bei der HPLC an Calixaren-Stationärphasen eine wichtige Bedeutung zu. Es ist zwischen Wechselwirkungen mit induzierten Dipolen, dispersiven und Charge Transfer (CT)-Beiträgen zu unterscheiden. Eine Komplexstabilisierung durch Induktion von Dipolen geht im wesentlichen auf das Vorhandensein leicht polarisierbarer Elektronenwolken zurück. Dispersive (London-) Wechselwirkungen treten zwischen allen Molekülen auf. Sie resultieren aus der Anziehung zwischen momentan auftretenden, fluktuierenden Dipolen in Atomen und dipollosen Molekülen als Folge der inneren Elektronenbewegung. Dabei treten mit zunehmender Annäherung der Moleküle verstärkt Abstoßungskräfte auf. In wäßrigen Medien spielen solche Wechselwirkungen aufgrund der geringen Polarisierbarkeit des Wassers eine wesentliche Rolle. Gleichzeitig sind sie dadurch nur schwer von solvophoben Effekten zu unterscheiden. CT-Komplexe werden durch Transfer von Elektronen aus höher liegenden besetzten Molekülorbitalen (MO) in niedrig liegende unbesetzte MOs stabilisiert. Diese Wechselwirkungen sind jedoch in polaren Lösungsmitteln gering. Nach SCHNEIDER (1991) ist bei den stärksten CT-Komplexen eine Zunahme der Komplexbildungskonstanten durch abwechselnd elektronenziehende und elektronenschiebende Substituenten auf elektrostatische und induzierte Beiträge zu zurückzuführen. Ferner sind π - π -Komplexe in Calixaren-Gast-Systemen möglich. Diese

Wechselwirkungen können durch elektrostatische, Dipol-induzierte und dispersive Beiträge stabilisiert werden.

Elektrostatische Wechselwirkungen in organischen Wirt-Gast-Komplexen leisten aufgrund ihrer Richtungsabhängigkeit einen hohen Beitrag zur Selektivität der molekularen Erkennung. Die Ionenpaar-Bildung ist besonders in Wasser durch eine Entropiezunahme, unter Umständen sogar durch ΔH° -Werte charakterisiert. Ähnlich wie bei der Diskussion des solvophoben Effektes wird durch Freisetzung der in der Solvathülle der getrennten Ionen hoch geordneten Lösungsmittelmoleküle die Assoziation begünstigt. Die für die Ionenpaar-Bildung verantwortlichen Kräfte umfassen neben den klassischen Coulomb-Wechselwirkungen auch induzierte Dipole, besonders bei leicht polarisierbaren Elektronenwolken (SCHNEIDER, 1991). Bei den hier verwendeten Calixaren-Phasen können elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Carboxylgruppen am unteren Rand der Calixarene und eingeschlossenem Kation auftreten. Da Ester der Calixarene Alkali- und Erdalkalimetallionen selektiv binden und die Gestalt des Makrocyclus präorganisieren können (BÖHMER, 1995), sollte ein Einfluß auf die HPLC zu beobachten sein. Zusätzlich können Gastmoleküle mit negativer Ladung durch eingeschlossene Kationen angezogen werden. Das Calixaren kann dabei als „Kokon“ des Komplexes betrachtet werden. Dem Schlüssel-Schloß-Prinzip von FISCHER (1894) folgend, sollten sich daher durch Aufnahme komplementärer Gastmoleküle besondere Selektivitäten ergeben können.

4 Synthesen der Calix[n]aren-Stationärphasen

4.1 Überblick

Dieses Kapitel enthält Methoden und Materialien sowie alle Synthesevorschriften zur Darstellung der Calixaren-Phasen.

4.2 Materialien und Methoden

4.2.1 Materialien

p-*tert*-Butylcalix[5]aren wurde von der Mainzer Arbeitsgruppe (Dr. V. BÖHMER) zur Verfügung gestellt. *p*-*tert*-Butylcalix[6]aren wurde käuflich von der Firma AGROS (Gelnhausen, Germany) erworben. Alle verwendeten und im experimentellen Teil nicht beschriebenen Substanzen waren kommerziell erhältlich (AGROS, Merck, Fluka, Bachem).

4.2.2 Methoden

Die Reinheit aller Verbindungen wurde mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie, der Massenspektrometrie, der Elementaranalyse, sowie durch Schmelzpunktbestimmungen überprüft.

NMR-Spektroskopie

Alle ¹H-NMR-Messungen (500,13 MHz) wurden an einem Bruker ARX 500 NMR-Spektrometer aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm (δ -Skala) angegeben.

Massenspektrometrie

Die Anfertigung der Elektrospray-Massenspektren erfolgte an einem VG BIO Q Tripel-Quadrupol Massenspektrometer mit Elektrospray Interface. In einem konstanten Fluß (4 μ L/min) von ACN/Wasser (50:50, v/v) bzw. CH₂Cl₂ (Pumpe HP 1050) wurden

10 μL der Probelösung über ein Schleifendosierventil (Rheodyne 5717, 10 μL) direkt in die Quelle injiziert.

Die Aufnahme der MALDI-Massenspektren erfolgte mit einem Reflex-Flugzeit-Massenspektrometer der Firma Bruker-Franzen Analytik GmbH Bremen. Die Ionenbeschleunigung betrug 28,5 kV. Als Matrix wurde α -Cyano-4-hydroxymethylsäure verwendet. Die Anregung der Matrix erfolgte mit Hilfe eines Stickstofflasers (337 nm, 4 ns Pulsweite).

Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden an einem Analysenautomat des Typs Leco CHNS 932 durchgeführt. Es erfolgten doppelte Analysen für Kohlenstoff und Wasserstoff.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einer Nagema-Heiztisch-Apparatur bestimmt.

Adsorptionsmessungen

Die spezifischen Parameter wurden an einem Gerät vom Typ Sorptomatic 1900 Turbo der Firma Carlo Erba Instruments entsprechend der BET-Theorie ermittelt (BRUNAUER et al., 1938). Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils 24 Stunden bei 120°C in einem Hochvakuum von 10^{-5} mbar getrocknet. Die Porenverteilung wurde aus dem Desorptionsast der N_2 -Isotherme nach der BJH-Methode (BARRETT et al., 1951) errechnet.

Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Aufnahmen der Festkörper-NMR-Spektren erfolgten an dem NMR-Spektrometer UNITY 400 der Firma Bruker. Die ZrO_2 -Rotoren wurden mit etwa 200-300 mg gepackt. Der MAS (Magic Angle Spinning) wurde bei einer Meßfrequenz von 2,9 - 6,0 kHz und einer Pulslänge von 3 - 7 μs aufgenommen. Die Kontaktzeit betrug 3 - 4 ms, die Pulswiederholungszeit 2 bzw. 5 s. Die chemische Verschiebung wurde auf Hexamethylbenzen (HMB) bezogen.

HPLC

Die HPLC-Untersuchungen wurden an einer HPLC-Apparatur der Firma Merck (Darmstadt) durchgeführt, die aus einer L-6200 Pumpe (intelligent pump), einem variablen UV-Detektor des Typs 655 und einem Computersystem Modell D-6000 (HPLC-Manager Version 2) besteht. Die Temperaturvariationen wurden mit Hilfe eines

externen Kryostaten des Typs Julabo VC der Firma Seelbach bzw. eines Säulenthmostaten des Typs Jetstream 2 von Hewlett Packard geregelt.

Als Referenzphasen wurden α -CD-Si 100, β -CD-Si 100 (beide 5 μm , 250 x 4 mm), γ -CD-Si 100 (10 μm , 2 mal 125 x 4 mm) und Octadecyl-Si 100 (5 μm , 250 x 4 mm) der Firma Serva (Heidelberg) sowie eine LiChrospher Si 60 (5 μm , 250 x 4 mm) der Firma Merck verwendet.

Molecular Modelling

Die Moleküldynamik-Simulationen (MD) wurden an Unix-Workstations INDIGO 2 der Firma Silicon Graphics mit R10000 Prozessoren durchgeführt. Zum Docken der Gastmoleküle wurde das Programm FLEXIDOCK verwendet, welches im SYBYL-Programmpaket¹ implementiert ist. Die Auswertung der MD-Simulationen erfolgte mit Hilfe der Programme Carnal und Mdanal, die im Programm AMBER 4.1 enthalten sind. Das Programm VMD wurde zur Visualisierung der MDs genutzt (NELSON et al., 1995).

4.3 Synthesen der *p*-tert-Butylcalixaren-Derivate

Zur Vereinfachung der Schreibweise werden die *p*-tert-Butylcalixarene im folgenden nur als Calixarene bezeichnet. Die Synthesestufen der Calixaren-Derivate sind mit $[\mathbf{n}]_x$ abgekürzt. Der Buchstabe n in den eckigen Klammern kennzeichnet das jeweilige Calix[n]aren (n = 4, 5, 6, 8). Der tiefgestellte Buchstabe x markiert die Synthesestufe (x = I für das Calixaren-Grundgerüst; x = II für die Ether-Derivate und x = III für die Säure-Derivate). Die Synthese der *p*-tert-Butylcalix[4]arentetraessigsäure und ihre Immobilisierung an Kieselgel wurden bereits beschrieben (GEBAUER, 1993). Um einen vollständigen Überblick der Synthesen zu geben, werden sie nochmals angeführt.

4.3.1 Synthese der *p*-tert-Butylcalix[n]arene (n = 4, 8), $[\mathbf{n}]_I$

p-tert-Butylcalix[4]aren, $[\mathbf{4}]_I$ (nach GÖRMAR et al., 1990): Vorkondensat: 100 g (0,67 mol) *p*-tert-Butylphenol, 250 mL Formaldehyd (37%ig) und 1,2 g (0,03 mol) NaOH, gelöst in 5 mL Wasser, wurden erwärmt, die Temperatur auf 130 bis 140°C ge-

¹ SYBYL Version 6.3, Tripos Associates, Inc., St Louis, MO 63144

steigert und das Wasser abdestilliert. Der viskose Rückstand wurde auf eine Aluminiumfolie gegossen und erstarrte zu einer hellgelben, harzartigen Masse.

Umsetzung in Parex: In einem Sulfierkolben mit Innenthermometer, Wasserabscheider, Rührer und Inertgaseinleitung wurde das Vorkondensat in 800 mL Parex (Benzinfraktion, Kp.: 250 bis 260°C) suspendiert und langsam erwärmt. Zwischen 60 und 100°C schmolz das Vorkondensat zu einer viskosen Masse, wobei ein Rühren nicht möglich war. Die viskose Masse löste sich mit steigender Temperatur auf. Zwischen 140 und 180°C fiel ein weißer Niederschlag aus, der als *p-tert*-Butylcalix[8]aren identifiziert wurde. Die Temperatur wurde bis auf 250°C gesteigert. Das ausgefallene Octamer reagierte weiter zum Tetra-, Penta-, Hexa- und Heptamer. Das *p-tert*-Butylcalix[4]aren bildete dabei das Hauptprodukt. Die Reaktionslösung wurde 6 h bei 250°C gerührt, bis die Lösung homogen war. Nach dem Abkühlen kristallisierte *p-tert*-Butylcalix[4]aren in hellen Blättchen aus. Das Rohprodukt wurde mit Toluol im Soxhlet extrahiert, um ausgefallenes *p-tert*-Butylcalix[6]aren und *p-tert*-Butylcalix[8]aren zu entfernen. Anschließend wurde das Produkt getrocknet. Ausbeute: 50 - 60 %.

Fp.: 342-344°C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,21 (s, 36 H, C(CH₃)₃), 3,25 (d, 4 H, CH₂), 4,48 (d, 4 H, CH₂), 7,05 (s, 8 H, ArH), 10,33 (s, 4 H, ArOH).

***p-tert*-Butylcalix[8]aren, [8]_I:** Die Synthese von [8]_I erfolgte nach der Vorschrift von GUTSCHE et al. (1981): Es wurden 54,1 g (0,36 mol) *p-tert*-Butylphenol, 16,7 mL (0,06 mol) Formaldehyd (37%ig) und 0,8 mL (8 mmol) 10 N KOH mit 300 mL Xylol in einem Sulfierkolben, der mit einem Thermometer, Rührer und Wasserabscheider ausgestattet war, gemischt und 8 h unter Inertgasatmosphäre (Ar) gekocht. Nach Abkühlung des Reaktionsansatzes wurde der Rückstand abfiltriert, portionsweise mit Toluol, Ether, Aceton und Wasser gewaschen und über Nacht bei 80°C getrocknet. Das weiße Pulver wurde in Chloroform umkristallisiert und nochmals getrocknet. Ausbeute: 13,8 g (24 %). GUTSCHE et al. (1981) gaben eine Ausbeute von 64 % an.

Fp.: 411-412°C. MS (CI): *m/z* = 1297 [M+H]⁺. Elementaranalyse: C₈₈H₁₁₂O₈ berechnet: C: 81,4 %, H: 8,7 %; gefunden: C: 81,9 %, H: 9,1 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,24 (s, 72 H, C(CH₃)₃), 3,5 (d, 8 H, CH₂), 4,3 (d, 8 H, CH₂), 7,14 (s, 16 H, ArH), 9,6 (s, 8 H, ArOH).

4.3.2 Synthese der *p*-tert-Butylcalix[n]arenacetate (n = 4, 5, 6, 8), [n]_{II}

Allgemeine Darstellung der *p*-tert-Butylcalix[n]arenacetate (n = 4, 6, 8): Die Darstellung erfolgte nach einer Vorschrift von GÖRMAR (persönliche Mitteilung): Zu einer Suspension von Calixaren in Chloressigsäureethylester wurden K₂CO₃, KBr sowie eine Spatelspitze KI zugegeben und solange unter Rühren gekocht, bis kein Ausgangsprodukt nachweisbar war (in der Regel 3-5 Tage). Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes wurde der Feststoff abgesaugt und mit Chloressigsäureethylester gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Rotationsverdampfer abgezogen und zu einem Öl eingengt. Verbleibende Chloressigsäureethylester-Spuren wurden im Hochvakuum abdestilliert. Der Destillationsrückstand wurde mit EtOH aufgenommen und 24 h bei -24°C stehen gelassen. Das kristalline Produkt wurde abfiltriert, mit kaltem EtOH gewaschen. Anschließend wurde der Feststoff durch Umkristallisation gereinigt.

Die Darstellung von *p*-tert-Butylcalix[5]arenpentaacetat erfolgte nach der Synthesevorschrift von BARRETT et al. (1993) und die Aufarbeitung entsprechend der allgemeinen Darstellung für *p*-tert-Butylcalix[n]arenacetate.

***p*-tert-Butylcalix[4]arentetraacetat [4]_{II}:** Entsprechen der obigen Vorschrift wurden 80 g (0,12 mol) [4]_I in 600 mL ClCH₂COOEt gelöst und 54 g (0,39 mol) K₂CO₃ und eine Spatelspitze NaI zugegeben. Nach Aufarbeitung wurde eine Ausbeute von 90 % erzielt.

Fp.: 124 - 126°C. ¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,07 (s, 36 H, C(CH₃)₃), 1,29 (t, 12 H, CH₃-CH₂), 3,9 (d 4 H, ArCH₂Ar), 4,23 (q, 8 H, CH₃-CH₂), 4,82 (s, 8 H, OCH₂COO), 4,85 (d, 4 H, ArCH₂Ar), 6,77 (s, 8 H, ArH).

***p*-tert-Butylcalix[5]arenpentaacetat [5]_{II}:** 3g (37,0 mmol) [5]_I wurden mit 3,4 g (28,0 mmol) K₂CO₃ und 4,1 mL (0,037 mol) ClCH₂COOEt in 100 mL trockenem Aceton bei ca. 120°C umgesetzt und nach vollständigem Umsatz aufgearbeitet.

Ausbeute: 2,9 g (64 %). Von BARRETT et al. (1993) werden Ausbeuten von 79 % angegeben.

Fp.: 146-148°C. MS (CI): *m/z* = 1241 [M+H]⁺. Elementaranalyse: C₇₅H₁₀₀O₁₅ berechnet: C: 72,5 %, H: 8,1 %; gefunden: C: 70,8 %, H: 7,9 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,00 (s, 45 H, C(CH₃)₃), 1,30 (t, 15 H, CH₃-CH₂), 3,32 (d, 5 H, ArCH₂Ar), 4,23 (q, 10 H, CH₃-CH₂), 4,62 (s, 10 H, OCH₂COO), 4,80 (d, 5 H, ArCH₂Ar), 6,85 (s, 10 H, ArH).

***p*-tert-Butylcalix[6]arenhexaacetat [6]_{II}**: Gemäß obiger Vorschrift wurden 7,5 g (7,1 mmol) [6]_I mit 8,8 g (63,9 mmol) K₂CO₃, 5,5 g (43,0 mmol) KBr und eine Spatelspitze KI in 67,5 mL ClCH₂COOC₂H₅ umgesetzt. Nach der Aufarbeitung verblieben 6,5 g (62 %) [6]_{II} in Form farbloser Kristalle. CHANG et al. (1986) erhielten [6]_{II} mit einer Ausbeute von 65 % und ARNAUD-NEU et al. (1989) von 88 %.

Fp.: 252-255°C. MS (CI): $m/z = 1489$ [M+H]⁺. Elementaranalyse: C₉₀H₁₂₀O₁₈ · H₂O
berechnet: C: 71,3 %, H: 8,4 %; gefunden: C: 71,8 %, H: 8,1 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 0,97 (s, 54 H, C(CH₃)₃), 1,25 (t, 18 H, CH₃-CH₂), 3,2-5,1 (m, 36 H, ArCH₂Ar, CH₃-CH₂ sowie OCH₂COO), 6,98 (s, 12 H, ArH).

***p*-tert-Butylcalix[8]arenoctaacetat [8]_{II}**: Ausgehend von 7,6 g (6,0 mmol) [8]_I, 6,4 g (46,0 mmol) K₂CO₃, 8,4 g (70,0 mmol) KBr, einer Spatelspitze KI und 150 mL ClCH₂COOC₂H₅ wurden nach der Aufarbeitung 4,0 g (34 %) [8]_{II} als blaßgelbe Kristalle erhalten. CHANG et al. (1986) erzielten eine Ausbeute von 75 % bzw. ARNAUD-NEU et al. (1989) von 89 %.

Fp.: 200-205°C. MS (CI): $m/z = 993$ [M+H]⁺. Elementaranalyse: C₁₂₀H₁₆₀O₂₄ · H₂O
berechnet: C: 72,6 %, H: 8,1 %; gefunden: C: 72,1 %, H: 8,1 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,1 (br. s, 96 H, C(CH₃)₃), 3,8-4,2 (m, 48 H, ArCH₂Ar, CH₃-CH₂ sowie OCH₂COO), 6,9 (br. s, 16 H, ArH).

4.3.3 Synthese der *p*-tert-Butylcalix[n]arenessigsäuren (n = 4, 5, 6, 8), [n]_{III}

***p*-tert-Butylcalix[4]arentetraessigsäure [4]_{III}**: 0,25 g (25 mmol) des Tetraester des Calix[4]arens [4]_{II} wurden mit 30 g (0,53 mol) KOH in Ethanol und 200 mL Wasser gelöst und bis zum Sieden erhitzt. Beim Abkühlen kristallisierte das Kaliumsalz aus. Anschließend wurde der Feststoff durch scharfes Absaugen von der Mutterlauge getrennt, in 1 L Wasser aufgeschlämmt, 100 mL konzentrierte Salzsäure zugegeben, gut durchmischt und über Nacht stehen gelassen. Der Feststoff wurde abgesaugt, säurefrei gewaschen und anschließend in siedendem Eisessig gelöst. Beim Abkühlen kristallisierte [4]_{III} mit einer Ausbeute von 95 % aus. Es wurde für 48 h bei 80°C getrocknet.

Fp.: 260 - 265°C (Zersetzung). ¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,07 (s, 36 H, C(CH₃)₃), 3,25 (d, 4 H ArCH₂Ar) 4,60 (d, 4 H ArCH₂Ar) 4,65 (s, 8 H, CH₂COO), 6,9 (s, 8 H, ArH).

Allgemeine Darstellung der *p*-tert-Butylcalix[n]arenessigsäuren (n = 5, 6, 8): Die Darstellung erfolgte nach der Vorschrift von CHANG and CHO (1986): Zu einer Lösung

von *p-tert*-Butylcalixarenessigsäureethylester und trockenem THF wurde eine 10% wäßrige Lösung aus Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) gegeben. Die resultierende Mischung wurde unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Gemisch mit konzentrierter HCl angesäuert und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallenen Feststoff wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

***p-tert*-Butylcalix[5]arenpentaessigsäure [5]_{III}**: Es wurden 2,94 g (2,37 mmol) [5]_{II} mit 50 mL TMAH in 50 mL THF umgesetzt. Nach der Aufarbeitung verblieben 2,52 g (97 %) [5]_{III}. BARRETT et al. (1993) berichteten von einer Ausbeute von 82 %.

Fp.: 220-222°C. MS (CI): $m/z = 1101$ [M+H]⁺. Elementaranalyse: C₆₅H₈₀O₁₅ berechnet: C: 67,6 %, H: 8,2 %; gefunden: C: 67,7 %, H: 7,2 %

***p-tert*-Butylcalix[6]arenhexaessigsäure [6]_{III}**: Ausgehend von 3,24 g (2,18 mmol) [6]_{II}, 70 mL TMAH und 70 mL trockenem THF wurden nach 24 h Erhitzen unter Rückfluß und nachfolgender Aufarbeitung 2,8 g (97 %) [6]_{III} als weißer, kristalliner Feststoff erhalten.

Fp.: 276-279°C. MS (CI): $m/z = 1319$ [M+H]⁺. Elementaranalyse: C₇₈H₉₆O₁₈ berechnet: C: 70,9 %, H: 7,7 %; gefunden: C: 67,9 %, H: 7,4 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,2 (br. s, 54 H, C(CH₃)₃), 3,6-4,8 (m, 24 H ArCH₂Ar und CH₂COO), 6,8-7,4 (br. s, 12 H, ArH, COOH).

***p-tert*-Butylcalix[8]arenoctaessigsäure [8]_{III}**: Entsprechend der oben beschriebenen Arbeitsvorschrift wurden 1,45 g (0,73 mmol), 50 mL TMAH und 50 mL THF umgesetzt. Nach der Reinigung wurden 1,27 g (99 %) [8]_{III} als blaßgelber, kristalliner Feststoff isoliert.

Fp.: 272-275°C. MS (CI): $m/z = 1761$ [M-H]⁻. Elementaranalyse: C₁₀₄H₁₂₈O₂₄ berechnet: C: 70,9 %, H: 7,3 %; gefunden: C: 67,1 %, H: 7,3 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ (500 MHz) 1,1 (br. s, 72 H, C(CH₃)₃), 3,0-4,3 (m, 32 H, ArCH₂Ar und CH₂COO), 6,9 (br. s, 16 H, ArH).

4.3.4 Synthese von *p-tert*-Butylphenoxyessigsäureethylester, [1]_{II}

Die Darstellung erfolgte nach einer modifizierten Literaturvorschrift von ARNAUD-NEU et al. (1989): Zu einer Lösung von 3 g (20 mmol) *p-tert*-Butylphenol und 76 mL

Aceton wurden 5,52 g (40 mmol) K_2CO_3 und 4,42 mL (40 mmol) $ClCH_2COOC_2H_5$ gegeben. Nach vollständigem Umsatz der Reaktion (52 h) wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer abgezogen. Nach Zugabe von 15 mL Wasser wurde die resultierende Mischung mit 3 x 10 mL Petrolether (PE) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit einer wäßrigen NaOH-Lösung und Wasser gewaschen sowie mit NaCl getrocknet. Nach Verdampfen des Lösungsmittels verblieb das Produkt [**1**]_{II} als blaßgelbes Öl. Ausbeute: 5 g (63 %). MS (CI): $m/z = 237 [M+H]^+$. Dieses Produkt wurde aufgrund des bestätigten Molpeaks nicht weiter charakterisiert und gleich zur Säure umgesetzt.

4.3.5 Synthese der *p*-tert-Butylphenoxyessigsäure, [**1**]_{III}

Die Darstellung erfolgte nach einer modifizierten Synthesevorschrift von GÖRMAR (persönliche Mitteilung): Zu 80 mL Wasser wurden 4,1 g (73,2 mmol) KOH dazugegeben und anschließend 5 g (21,2 mmol) [**1**]_{II} sowie 135 mL EtOH. Der Ansatz wurde 4 h unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel eingengt und 10 mL konzentrierte HCl dazugegeben. Der ausgefallene Feststoff wurde abgesaugt und mit Wasser neutral gewaschen. Nach dem Trocknen im Exsikkator verblieben 4,18 g (95 %) [**1**]_{III}.

Fp.: 83-85°C. MS (EI): $m/z = 208 [M]^+$. Elementaranalyse: $C_{12}H_{16}O_3$ berechnet: C: 69,2 %, H: 7,6 %; gefunden: C: 68,2 %, H: 7,6 %.

1H -NMR ($CDCl_3$): δ (500 MHz) 1,3 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 4,65 (s, 2 H, CH_2COO), 7,85 (d, 2 H, ArH), 7,35 (d, 2 H, ArH), 10,3 (br. s, 1 H, COOH).

4.4 Immobilisierung der Calixarene an Kieselgel

Für die Immobilisierung der Calixarene wurden Kieselgele der Firma Serva (Heidelberg) mit zwei verschiedenen Porenweiten (100 Å und 300 Å) verwendet. Die Calixaren-Phasen wurden als [n]Aren Si 100 (Kurzform: [n]Aren) und [n]Aren Si 300 (n = 4, 5, 6, 8) sowie die *p*-tert-Butylphenol-Phase als [1]Aren bezeichnet.

Die erarbeiteten Vorschriften werden an dieser Stelle nicht veröffentlicht und sind im Institut für Biochemie der MLU, Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie (Leiter Prof. G.-J. KRAUSS) einsehbar.

Packen der Säulen: Das Packen der Säulen erfolgte mittels der L-6200 Pumpe (Merck). Dazu wurden 2 g derivatisiertes Kieselgel in 40 mL MeOH aufgeschlämmt und 10 min im Ultraschallbad homogenisiert. Die zu packende Säule wurde mit MeOH, das Vorratsgefäß mit der Kieselgelsuspension gefüllt und durch Pumpendruck in die Säule gepreßt. Es wurden insgesamt 1 L MeOH (je 500 mL in eine und je 500 mL in die andere Laufrichtung) mit maximal möglichem Druck durch die Säule gepumpt (die [n]Aren Si 100 Phasen mit 390 bar und die [n]Aren Si 300 Phasen mit 200 bar). Danach wurde das System über Nacht entspannt und die Säulen mit Fittings versehen.

5 Charakterisierung der Calixaren-Stationärphasen

5.1 Überblick

Zur Charakterisierung der Stationärphasen wurden folgende analytische Untersuchungen durchgeführt: Adsorptionsmessungen, Elementaranalyse und Festkörper-NMR-Spektroskopie. In den Abschnitten 5.2 und 5.3 werden die Ergebnisse der Adsorptionsmessungen und der Elementaranalyse dargestellt. Die Ergebnisse der Festkörper-NMR-Untersuchungen werden im Abschnitt 5.4 diskutiert. Im Abschnitt 5.5 wird eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der Calixaren-Kieselgele gegeben, die eine Bewertung hinsichtlich chromatographischer Eigenschaften ermöglicht.

5.2 Adsorptionsmessungen

Die große innere Oberfläche poröser Kieselgele ist die Ursache für das hervorragende Adsorptionsvermögen von gelösten Stoffen und Gasen. Die Hohlraumstruktur der Poren, an denen die Adsorptions- und Desorptionsvorgänge stattfinden, spielt dabei eine entscheidende Rolle. So bestimmt die Öffnung der Poren die Geschwindigkeit des Stofftransportes an die aktiven Zentren der Oberfläche. Die Hohlraumstruktur wird - unabhängig von der chemischen Zusammensetzung - durch folgende Parameter charakterisiert (UNGER, 1990):

- geometrische Ausdehnung der Porenwandflächen pro Gramm Adsorbens (z.B. Kieselgel) = *spezifische Oberfläche* s (m^2/g),
- Gesamtvolumen der Poren pro Gramm Adsorbens = *spezifisches Porenvolumen* v_p (ml (flüssiges Adsorptiv)/g),
- *mittlerer Porendurchmesser* \bar{d}_p (\AA),
- Verteilungsfunktion $dv_p/dd_p = f(\bar{d}_p) = \textit{Porengrößenverteilung}$.

Werte für diese Parameter erhält man aus Adsorptionsmessungen. Die spezifische Oberfläche s , das spezifische Porenvolumen v_p , der mittlere Porendurchmesser \bar{d}_p (bis 400 \AA) und die Porengrößenverteilung dv_p/dd_p lassen sich aus Gasadsorptionsmessungen bestimmen. Bei Gasadsorptionsmessungen werden als Adsorptiv hauptsächlich Stickstoff, daneben seltener Argon und andere Edelgase sowie Kohlenwasserstoffe verwendet. Das Ergebnis ist eine Adsorptionsisotherme, die den adsorbierten Betrag des

jeweiligen Gases x_a (mol pro Gramm Adsorbens) als Funktion des Druckverhältnisses p/p_0 im Bereich von $0 < p/p_0 \leq 1$ wiedergibt (p = Dampfdruck des Adsorptivs bei der Adsorption, p_0 = Sättigungsdampfdruck des reinen flüssigen Adsorptivs).

Durch Oberflächenreaktionen an Kieselgelen können die Parameter der Hohlraumstruktur beeinflusst werden. Folgende Veränderungen sind möglich (UNGER, 1972):

- eine spezifische Gewichtszunahme gegenüber dem Ausgangsmaterial, wodurch die spezifische Oberfläche und das spezifische Porenvolumen um einen entsprechenden Betrag korrigiert werden müssen,
- eine Änderung der Polarität der Oberfläche,
- eine Abnahme des mittleren Porendurchmessers um $\Delta \bar{d}_p = 2t$, da durch Oberflächenreaktionen eine Schicht der Dicke t auf die ursprüngliche Oberfläche gebracht wird, was gleichzeitig zu einer Abnahme der spezifischen Oberfläche s und des spezifischen Porenvolumens v_p führen kann.

Entsprechend einer Einteilung in makro- (Porenweite $> 500 \text{ \AA}$), meso- (Porenweite von $20 - 500 \text{ \AA}$) und mikroporöse Kieselgele (Porenweite $< 20 \text{ \AA}$) werden ihre Parameter durch Oberflächenreaktionen unterschiedlich beeinflusst (GREGG and SING, 1991). Während die Eigenschaften makroporöser Kieselgele relativ unbeeinflusst bleiben, nehmen die spezifische Oberfläche, das spezifische Porenvolumen und der mittlere Porendurchmesser mesoporöse Kieselgele um einen spezifischen Betrag ab (UNGER, 1972). Bei mikroporösen Kieselgelen führen Oberflächenreaktionen zu einem völligen Verstopfen der Poren, da die Größe der reagierenden Moleküle in der Größenordnung des Porendurchmessers liegt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kieselgele haben eine Porenweite von 100 bzw. 300 \AA und lassen sich den mesoporösen Adsorbentien zuordnen. In Tab. 2 sind die Parameter der Hohlraumstrukturen für die nativen und Calixaren-Kieselgele zusammengefaßt (s_{BET} ist die spezifische Oberfläche nach der BET-Methode (BRUNAUER et al., 1938)).

Tab. 2: Strukturparameter der nativen und Calixaren-Kieselgele

Kieselgel	s_{BET} (m ² /g)	v_p (ml/g)	\bar{d}_p (Å)
Si 100	321	1,5	140
[1]Aren Si 100	302	1,2	120
[4]Aren Si 100	369	1,2	110
[5]Aren Si 100	383	1,1	120
[6]Aren Si 100	406	1,0	100
[8]Aren Si 100	407	1,1	100

Kieselgel	s_{BET} (m ² /g)	v_p (ml/g)	\bar{d}_p (Å)
Si 300	179	0,7	380
[4]Aren Si 300	290	1,0	200
[5]Aren Si 300	229	0,7	330
[6]Aren Si 300	225	0,5	300
[8]Aren Si 300	195	0,7	320

Wie die Ergebnisse der Adsorptionsmessungen zeigen, liegen die Werte der spezifischen Oberflächen in dem für mesoporöse Kieselgele zu erwartenden Bereich von 10 bis 500 m²/g (UNGER, 1972), wobei die 100 Å Materialien eine größere spezifische Oberfläche (302 bis 407 m²/g) als die 300 Å Materialien (195 bis 290 m²/g) aufweisen. Im Gegensatz zu der eingangs getroffenen Aussage, daß die spezifische Oberfläche durch Oberflächenreaktion abnimmt, wurde - mit Ausnahme von [1]Aren Si 100 - eine Zunahme festgestellt. Eine ungleichmäßige Belegung der Kieselgeloberfläche mit den voluminösen Calixarenen und eine dadurch bedingte Vergrößerung der Oberfläche erklären diese Beobachtung. Durch die kovalente Bindung der Calixarene werden zusätzliche Oberflächen (ähnlich wie Noppen) gebildet, die eine Vergrößerung der spezifischen Oberfläche zur Folge haben. Die Abnahme der spezifischen Oberfläche für [1]Aren Si 100 läßt sich dagegen auf eine dichte (homogene) Belegung mit dem *p-tert*-Butylphenol-Derivat zurückführen. Dies wird durch eine hohe Oberflächenkonzentration α_{exp} von 1,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bestätigt (s. Tab. 3). Eine weitere Besonderheit weist das [4]Aren Si 300 Kieselgel auf. Es zeichnet sich im Vergleich zu den anderen [n]Aren Si 300 Kieselgelen durch eine bedeutend höhere spezifische Oberfläche, ein größeres Porenvolumen und einen geringeren mittleren Porendurchmesser aus. Zudem ist dieses Material durch eine relativ hohe Oberflächenkonzentration von 0,9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (s. Tab. 3) gekennzeichnet, die möglicherweise die Ursache für die stark abweichenden Parameter ist. Der Verlauf der Adsorptionsisotherme von [4]Aren Si 300 weist andererseits keine Besonderheiten auf, die auf eine Zerstörung der Kieselgelstruktur deuten könnte.

Die Werte der spezifischen Porenvolumina und der mittleren Porendurchmesser der Calixaren-Kieselgele nehmen im Vergleich zu den nativen Kieselgelen (Si 100 und Si 300) erwartungsgemäß ab.

Die Porengrößenverteilungen sind in den Abb. 10 und 11 dargestellt. Dabei sind die Porengrößenverteilungen der [n]Aren Si 100 Kieselgele (Abb. 10) annähernd gleich, wobei die Maxima aufgrund der Derivatisierung der Kieselgele zu kleineren Porengrößen verschoben sind.

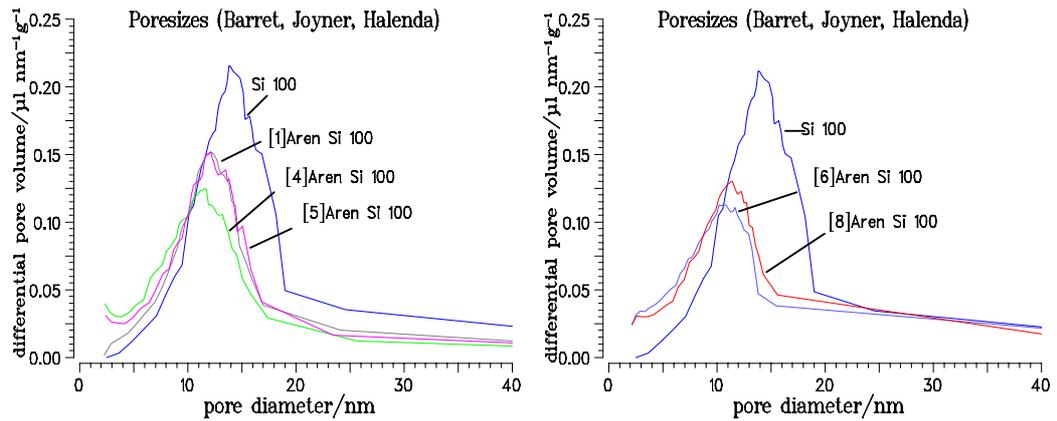


Abb. 10: Differentielle Porengrößenverteilung für [n]Aren Si 100 und natives Si 100 Kieselgel

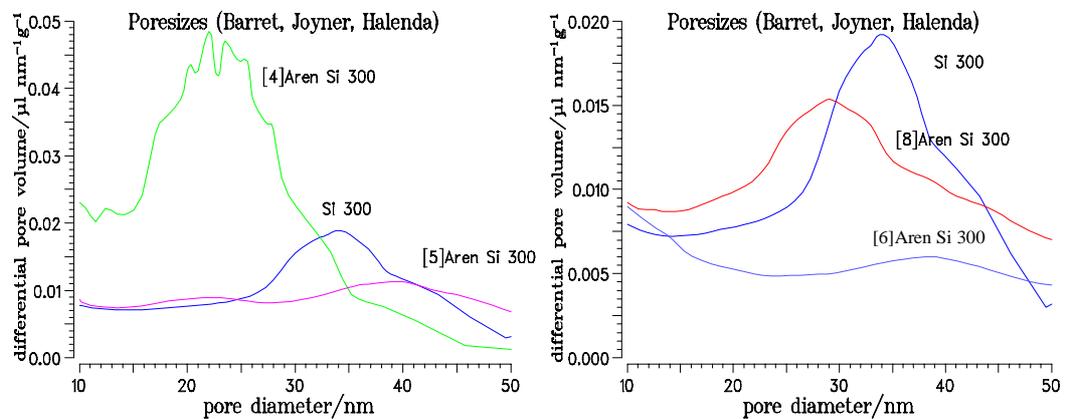


Abb. 11: Differentielle Porengrößenverteilung für [n]Aren Si 300 und natives Si 300 Kieselgel

Die Porengrößenverteilung der [n]Aren Si 300 Kieselgele sind bis auf [4]Aren Si 300, dessen durchschnittlicher Porendurchmesser etwa zwischen 200 und 250 nm liegt, ebenfalls annähernd gleich. Im Vergleich zu den [n]Aren Si 100 Kieselgelen ist jedoch eine breitere Verteilung der Porengrößen zu erkennen.

5.3 Elementaranalyse

In Tab. 3 sind die Elementgehalte (C- und H-Gehalt) sowie die Oberflächenkonzentrationen α_{exp} der Calixaren-Kieselgele zusammengefasst.

Tab. 3: C- und H-Gehalte sowie Oberflächenkonzentrationen der Calixaren-Kieselgele

Calixaren-Kieselgele	Elementgehalte [%]		α_{exp} [$\mu\text{mol}/\text{m}^2$]
	C	H	
[1]Aren Si 100	8,7	1,6	1,30
[4]Aren Si 100	11,0	1,9	0,39
[5]Aren Si 100	9,4	1,1	0,27
[6]Aren Si 100	15,6	2,7	0,37
[8]Aren Si 100	13,2	2,3	0,23
[4]Aren Si 300	14,2	2,1	0,90
[5]Aren Si 300	10,6	1,8	0,54
[6]Aren Si 300	13,4	2,1	0,58
[8]Aren Si 300	9,1	1,6	0,39

Die Kohlenstoffgehalte der Calixaren-Phasen weichen nur geringfügig voneinander ab. Sie liegen zwischen 9 und 15 %. Eine heterogene Kieselgeloberfläche, d.h. eine unterschiedliche Reaktivität der Silanol-Gruppen des Ausgangskieselgels, sowie die unterschiedliche Reaktivität der verschiedenen Calix[n]arenester-Derivate führen zu einer geringfügigen Abweichungen der C-Gehalte. Die Werte liegen jedoch in einem für derivatisierte Kieselgele üblichen Bereich (GILPIN et al., 1975; UNGER, 1979). Zudem ist die chemische Modifizierung poröser Adsorbentien stark von der „Reinheit“ der Oberfläche abhängig. Oft sind Spuren von adsorbiertem Wasser oder Sauerstoff vorhanden, da die Proben nur im Hochvakuum und nicht im Ultrahochvakuum bei höheren Temperaturen ausgeheizt werden. Es liegen folglich vor der Reaktion keine - im physikalisch-chemischen Sinn - reinen Oberflächen vor (UNGER, 1972).

Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung derivatisierter Kieselgele stellt die *Oberflächenkonzentration* α_{exp} dar. Sie gibt an, wieviel mol einer gebundenen Substanz sich pro m^2 Adsorbens befinden und läßt sich aus der Masse m der funktionellen Gruppe (Gramm pro Gramm Kieselgel), der molaren Masse der funktionellen Gruppe M (g/mol) und der spezifischen Oberfläche des Ausgangsmaterials s_{BET} (m^2/g) bestimmen (UNGER et al., 1976):

$$\alpha_{\text{exp}} = \frac{m}{M \times s_{\text{BET}}} \quad [\mu\text{mol}/\text{m}^2]. \quad \text{Gl. 1}$$

Die Oberflächenkonzentrationen der [n]Aren-Kieselgele sind in Tab. 3 aufgeführt. Vor allem [1]Aren Si 100 (die *p-tert*-Butylphenol-Phase) weist im Vergleich zu den anderen Calixaren-Kieselgelen einen hohen Derivatisierungsgrad von $1,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ auf, was durch die planare Gestalt des *p-tert*-Butylphenols verursacht wird, dessen Platzbedarf auf gleicher Kieselgeloberfläche kleiner ist als der eines Calixarens.

UNGER und Mitarbeiter (1976) konnten bei Untersuchungen von Phenyl- und Alkyl-Phasen ähnliche Befunde feststellen. Während die Oberflächenkonzentrationen innerhalb der Gruppe der Alkyl-Phasen ($R = C_4$ bis C_{18}) und der Phenyl-Phasen (mono-, bi- und tri-Phenyl) nur geringfügig verschieden waren, traten hingegen zwischen Alkyl- und Phenyl-Phasen deutliche Unterschiede auf. Die Oberflächenkonzentrationen der Phenyl-Phasen sind dabei wesentlich kleiner als die der Alkyl-Phasen, was ebenfalls auf einen größeren Platzbedarf der Phenylmoleküle zurückgeführt wurde.

5.4 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie hat sich zu einer leistungsfähigen Methode bei der Charakterisierung physikochemischer Eigenschaften von Kieselgeloberflächen entwickelt (VÖLKEL, 1988). Es lassen sich organische Verbindungen auf Kieselgeloberflächen identifizieren oder funktionelle Aspekte wie z.B. die Verknüpfung von Siliciumatomen untersuchen. Die notwendige spektrale Auflösung von Feststoffen wird durch die Rotation der Probe um den „magischen“ Winkel von $54,7^\circ$ (MAS: Magic Angle Spinning) erreicht. Eine wesentliche Verbesserung der Empfindlichkeit wurde durch Kreuzpolarisation (CP: Cross Polarization) möglich, wodurch sich die Festkörper-NMR-Spektroskopie zu einer selektiven Methode bei der Charakterisierung von Oberflächen entwickelte (ELLINGSEN and RESING, 1980). Während mit Hilfe der ^{29}Si CP/MAS NMR Informationen über die Beschaffenheit der Kieselgeloberfläche erhältlich sind, lassen sich anhand der ^{13}C CP/MAS NMR-Spektroskopie Strukturen der an Kieselgeloberflächen gebundenen polyfunktionellen Silane untersuchen.

5.4.1 ^{29}Si CP/MAS NMR-Spektroskopie

Die ^{29}Si CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 100 und [n]Aren Si 300 Kieselgele sind in den Abb. 12 und 13 dargestellt. Die Spektren weisen zwei Gruppen von Peaks auf, wobei sich die eine Gruppe im Bereich von -90 bis -110 ppm und die andere im Bereich von -47 bis -65 ppm befindet. Im Bereich von -90 bis -110 ppm liegen die Resonanzen der Siliciumatome, die sich an der Kieselgeloberfläche befinden (Abb. A1). Man unterscheidet zwischen Silandiolen [-90 ppm, $\text{Si}(\text{OH})_2$, Q^2], Silanolen [-100 ppm, SiOH , Q^3] und Siloxan-Gruppen [-110 ppm, Si-O-Si , Q^4] (MACIEL and SINDORF, 1980). Da

durch Kreuzpolarisation jedoch nur Kerne detektiert werden können, denen Protonen benachbart sind (bis etwa 4 Bindungslängen entfernt) (SINDORF and MACIEL, 1983a, b), läßt sich der Nachweis der Siloxan-Gruppen (Q^4), die keine Protonen tragen, nur indirekt über die Protonen der Silandiol- (Q^2) und Silanol-Gruppen (Q^3) führen (FYFE, 1983).

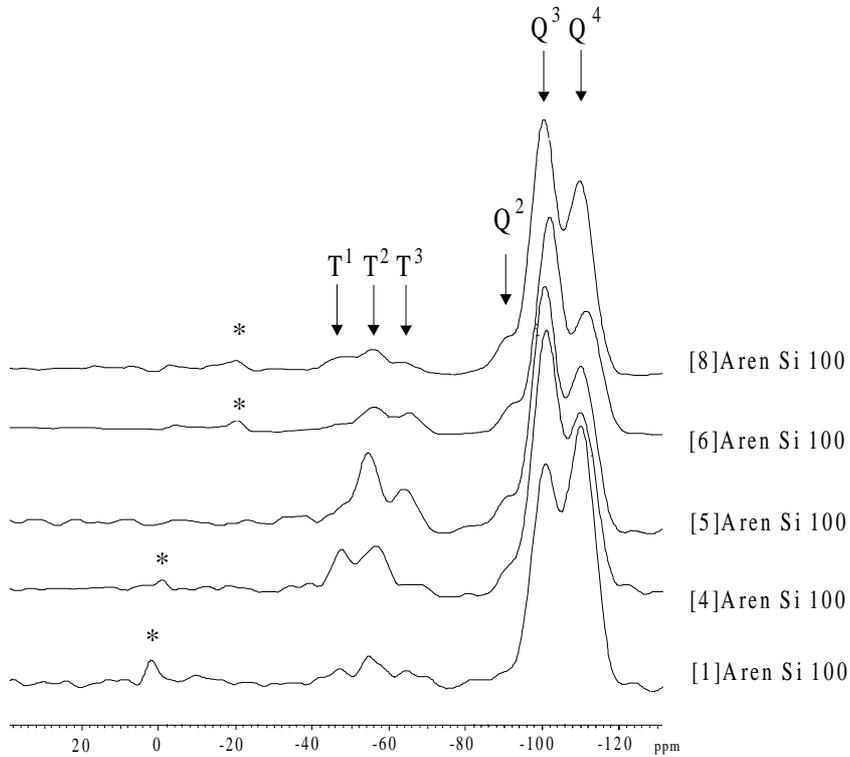


Abb. 12: ^{29}Si CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 100 Kieselgele

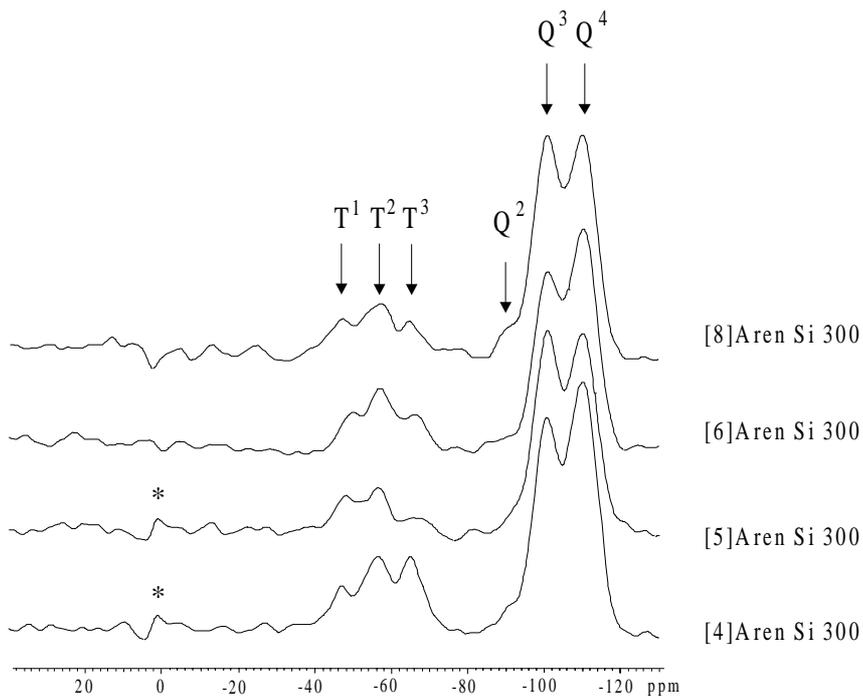


Abb. 13: ^{29}Si CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 300 Kieselgele

Die Derivatisierung der Kieselgele durch *p*-*tert*-Butylcalixarene bzw. *p*-*tert*-Butylphenol über Silanspacer führt zu einer verstärkten Annäherung von Protonen an die Q⁴-Einheiten der Trägeroberfläche, wodurch die Siloxan-Gruppen in zunehmendem Maße kreuzpolarisiert werden. Eine verstärkte Signalintensität von Q⁴ ergibt sich daher für Kieselgele mit hohen Oberflächenkonzentrationen wie z.B. [1]Aren Si 100, [4]Aren Si 300 und [6]Aren Si 300 (s. Abb. 12 und 13, Tab. 3).

Die schwachen Q²-Signale zeigen dagegen, daß nur wenig Silandiol-Gruppen vorhanden sind. Die Existenz von Silanol-Gruppen (Q³) läßt sich nicht vermeiden, da aus sterischen Gründen von 4,6 Silanol-Gruppen pro nm² Oberfläche nur maximal 2,3 Silanol-Gruppen zur Reaktion gebracht werden können (KRAUSS und KRAUSS, 1986). Durch Endcapping der Silanol-Gruppen (UNGER, 1989), d.h. Nachbehandlung der Calixaren-Kieselgele mit kurzkettigen n-Alkylsilanen (Hexamethyldisilazan), konnte die Anzahl freier Silanol-Gruppen auf der Kieselgeloberfläche reduziert werden. Aufgrund der starken Vernetzung der Silanspacer, deren Signale im Bereich von -47 bis -65 ppm zu sehen sind, sollten die Silanol-Gruppen abgeschirmt sein und einen geringen Einfluß auf die Trenneigenschaften der Calixaren-Kieselgele haben. Zur kovalenten Bindung der Calixarene wurde ein Propyltriethoxysilan als Spacer verwendet. Die chemische Verschiebung der Signale ist vom Grad der Vernetzung abhängig. So erscheint bei -47 ppm das Signal der einfach-gebundenen (T¹), bei -56 ppm das der zweifach-gebundenen (T²) und bei -65 ppm das der vollständig vernetzten (T³) Silane (Abb. 12 und 13). Die Intensitäten der Peaks der T-Gruppe sind im Vergleich zu den Signalen der Q-Gruppe bedeutend geringer. Daraus folgt, daß nur kleine Mengen an Silan an die Kieselgeloberflächen gebunden wurden. Festkörper-NMR-Untersuchungen Kieselgelgebundener Calixarene von GLENNON und Mitarbeiter zeigen ähnliche Befunde (BRINDLE, 1996).

Die Verhältnisse der Peaks der Silanbindungstypen T¹:T²:T³ sind von Calixaren-Kieselgel zu Calixaren-Kieselgel unterschiedlich. In den meisten Fällen überwiegt eine zweifache Vernetzung (T²). Das [4]Aren Si 300 Kieselgel weist im Vergleich zu den anderen Kieselgelen einen besonders hohen Vernetzungsgrad auf (Abb. 13), was ein weiteres Indiz für die Besonderheit dieses Kieselgels darstellt (s. Abschnitt 5.2).

Aus Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen an RP 18-Kieselgelen ist bekannt, daß im Bereich von 10 bis 20 ppm das Signal der Octadecylsilan-Gruppe erscheint (VERHULST et al., 1994; SCHOLTEN et al., 1994). In den Spektren der Calixaren-Kieselgele sind im Bereich von 2 bis -20 ppm Peaks zu erkennen, die die Signale der Calixaren-Silane bzw. des *p*-*tert*-Butylphenol-Silans repräsentieren. Sie sind mit einem „*“ gekennzeichnet. Aufgrund der planaren Gestalt des *p*-*tert*-Butylphenols erscheint dieses Signal bei [1]Aren Si 100 besonders deutlich, während die stets

vorhandene konformative Flexibilität der Calixarene zu bedeutend schwächeren Signalen führt.

5.4.2 ^{13}C CP/MAS NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 100 und [n]Aren Si 300 Kieselgele in Abb. 14 und 15 bestätigen, daß Calixarene erfolgreich an Kieselgel gebunden wurden. Ein Vergleich aller Spektren zeigt die strukturelle Ähnlichkeit der [n]Aren-Kieselgele, was aufgrund der gleichen Untereinheiten zu erwarten ist. Die Auflösung der Peaks ist nicht nur ausreichend, um zwischen den Kohlenstoffatomen der Calixarene und der Silanspacer zu unterscheiden, sondern auch, um alle theoretisch zu erwartenden Kohlenstoffatome identifizieren zu können. Die mit einem Stern gekennzeichneten Peaks bei 50, 65, zwischen 80 und 120 ppm sowie bei 165 ppm konnten nicht zugeordnet werden.

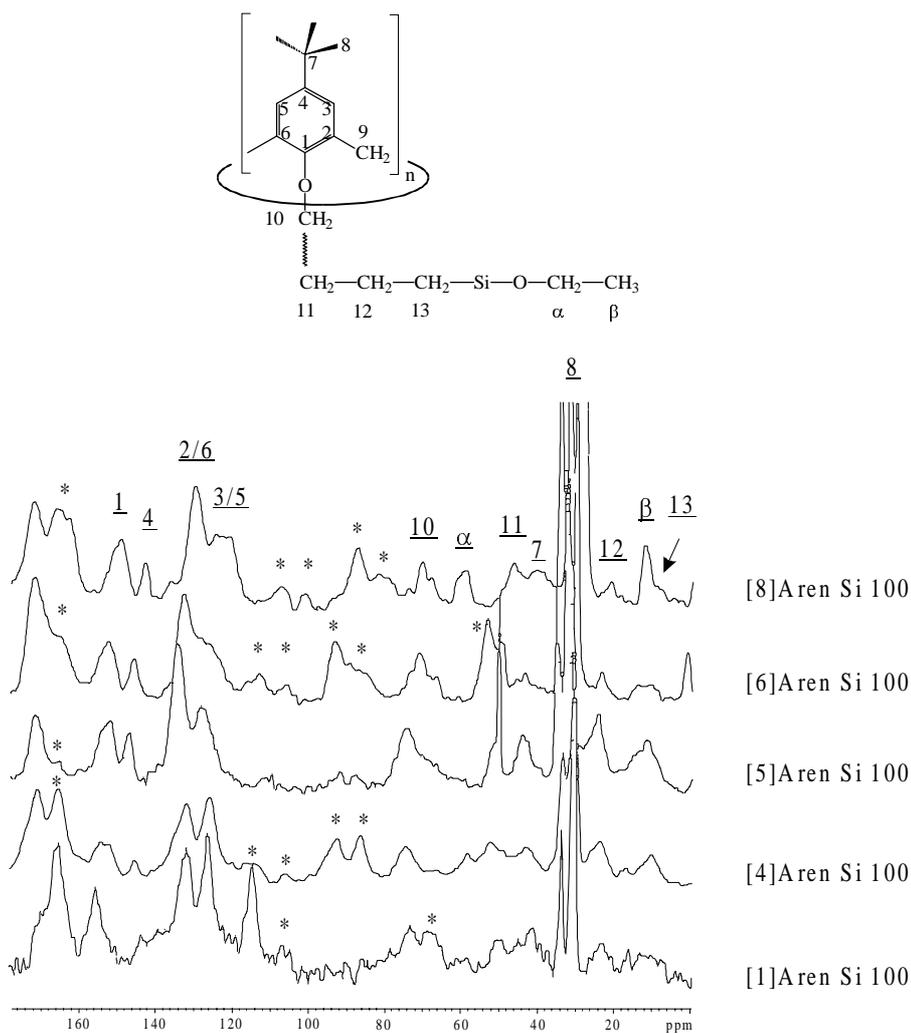


Abb. 14: ^{13}C CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 100 Kieselgele

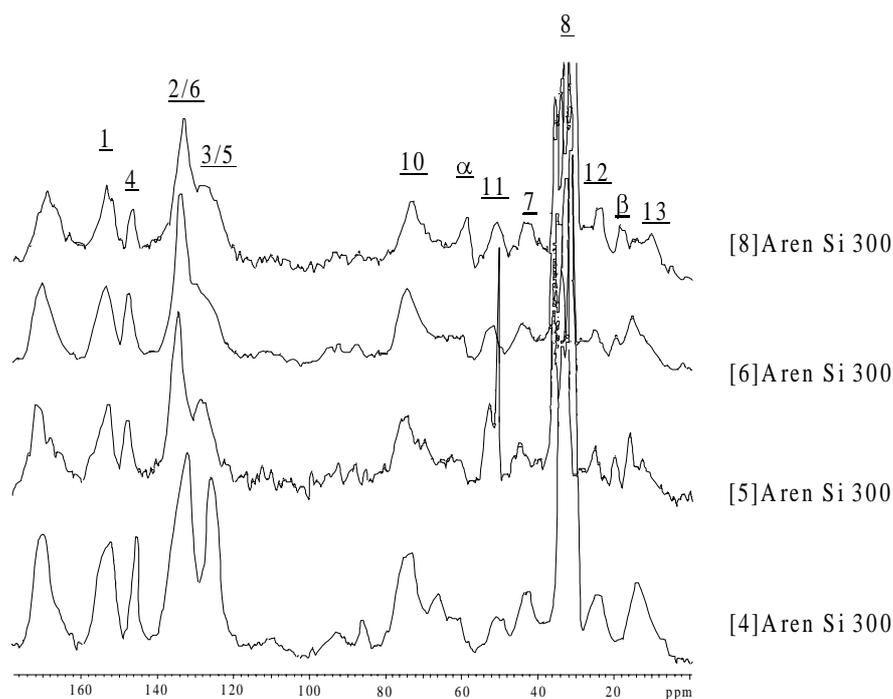


Abb. 15: ^{13}C CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 300 Kieselgele

In den Spektren der Abb. 14 und 15 sind die *tert*-Butylgruppen als scharfes Signal zwischen 30 und 33 ppm zu erkennen. Dies spricht für ihre hohe Mobilität. Die Signale der aromatischen Kohlenstoffatome sind Bereich zwischen 120 und 140 ppm zu sehen, wobei die Atome C2/C6 gut von den Atomen C3/C5 zu unterscheiden sind. Auffallend ist die Abnahme der Intensitäten der C3/C5-Signale mit größer werdendem Calixaren, deren Ursache die zunehmende konformative Flexibilität des makrocyclischen Ringsystems ist. Das bedeutet, daß auch durch die kovalente Bindung größerer Calixarene ein gewisses Maß an Mobilität erhalten bleibt und Wirt-Gast-Wechselwirkungen durch induced-fit möglich sind.

Die Peaks des Propyl-Spacers (C11, C12 und C13) in der Region von 50 bis 10 ppm sind ebenfalls gut aufgelöst. Die verbleibenden Ethoxygruppen vom Triethoxyalkylsilan (C α und C β) zeigen zum Teil schwache Signale bei 58 und 16 ppm. In Übereinstimmung mit den ^{29}Si CP/MAS NMR-Untersuchungen sind diese Peaks besonders klein, da der Anteil an vollständig vernetzten (T^3) und zweifach-gebundenen (T^2) Silan-Gruppen hoch ist und kaum noch Ethoxygruppen vorhanden sind. Dies ist vor allem bei [6]Aren Si 100 zuerkennen. Dagegen sind die Signale für C α und C β gut zu erkennen, wenn der Anteil an einfach-gebundenem Silan (T^1) im Verhältnis zu vollständig vernetzten (T^3) überwiegt, wie beispielsweise bei [8]Aren Si 100 oder [8]Aren Si 300 zu sehen ist.

5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der Calixaren-Stationärphasen

Die für das Verständnis der funktionellen Aspekte der neu entwickelten Calixaren-Stationärphasen wichtigen Aussagen aus den physikochemischen Untersuchungen sind:

1. *p-tert*-Butylcalix[n]arene ($n = 4, 5, 6, 8$) und *p-tert*-Butylphenol wurden erfolgreich kovalent an Kieselgel gebunden, was durch Adsorptionsmessungen, Elementaranalyse und Festkörper-NMR-Spektroskopie bestätigt wird.
2. Aufgrund der Derivatisierung der Kieselgeloberfläche erfolgte im Vergleich zum nativen Kieselgel eine Abnahme der spezifischen Porenvolumina v_p und der mittleren Porendurchmesser \bar{d}_p .
3. Es wurde eine Zunahme der spezifischen Oberfläche s_{BET} der Calixaren-Kieselgele festgestellt, die aus der chemischen Bindung der Calixarene an die Kieselgeloberfläche resultiert und zu einer Vergrößerung (Auflockerung) der Oberfläche führt.
4. Die spezifische Oberfläche des [1]Aren Si 100 Kieselgels nimmt im Vergleich zum unbehandelten Kieselgel ab, was auf eine dichte Anordnung der *p-tert*-Butylphenol-Bausteine auf der Kieselgeloberfläche bzw. homogene Bedeckung hinweist, die im Einklang mit der hohen Oberflächenkonzentration von $1,3 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ steht.
5. Die physikochemischen Eigenschaften des [4]Aren Si 300 Kieselgels weichen im Vergleich zu den anderen [n]Aren Si 300 Kieselgelen ab, was auf die hohe Belegung mit Calix[4]aren zurückgeführt werden kann.
6. Der Derivatisierungsgrad der Calixaren-Kieselgele, der aus der Elementaranalyse und ^{29}Si CP/MAS NMR-Spektroskopie ermittelt wurde, ist im Vergleich zu herkömmlich derivatisierten Kieselgelen gering.
7. Die Silanspacer sind stark vernetzt und schirmen die noch vorhandenen, freien Silanol-Gruppen ab, wodurch ihr Einfluß während der HPLC gering sein sollte.
8. Die Untersuchungen zur Charakterisierung der [n]Aren Si 100 und [n]Aren Si 300 Kieselgele (mit Ausnahme von [4]Aren Si 300) zeigen, daß die physikochemischen Eigenschaften ähnlich sind. Chromatographische Besonderheiten während der HPLC an den Calixaren-Phasen können daher auf das makrocyclische Ringsystem zurückgeführt werden (s. Kapitel 6).

6 Anwendungen der Calix[n]aren-Stationärphasen in der HPLC

6.1 Überblick

Um das chromatographische Verhalten der Calixarene in Abhängigkeit ihrer Ringgröße zu untersuchen, wurden Strukturisomere verschiedener Moleküle aus unterschiedlichen Substanzklassen ausgewählt, die aufgrund ihrer chemischen Natur potentiell geeignet sein sollten, mit Calixarenen Wirt-Gast-Komplexe zu bilden. Zudem wurden HPLC-Applikationen erarbeitet, die die Eignung der Calixaren-Phasen im bio- und umweltanalytischen Bereich zeigen.

6.2 Definitionen chromatographischer Kenngrößen

Folgende chromatographische Kenngrößen wurden zur Charakterisierung der Stationärphasen verwendet: der Retentionsfaktor k , der Trennfaktor α , die Peak-Auflösung R_s , und die Bodenzahl N . Die entsprechenden Definitionen wurden der IUPAC-Empfehlung „Nomenclature for Chromatography“ (ENGELHARDT and ROHR-SCHNEIDER, 1993) entnommen.

Der *Retentionsfaktor k (Kapazitätsfaktor)* ist als Quotient der reduzierten Retentionszeit t_R' und der Retentionszeit t_M bzw. den entsprechenden Volumina definiert:

$$k = \frac{t_R'}{t_M} = \frac{t_R' - t_M}{t_M} = \frac{V_R'}{V_M}, \quad \text{Gl. 2}$$

dabei entspricht t_R' der Zeit, die zwischen der Aufgabe der Probe und der Elution des Peakmaximums vergeht. t_M ist die Zeit, die benötigt wird, um eine nicht zurückgehaltene Substanz zu eluieren (Totzeit der Trennsäule).

Der Retentionsfaktor ist ein Maß für die Zeit, die sich die Probe an/in der stationären Phase aufhält, bezogen auf die Aufenthaltszeit in der mobilen Phase. Er gibt an, um wieviel länger eine Probe an der stationären als in der mobilen Phase verweilt.

Der **Trennfaktor** α berechnet sich aus dem Quotienten der Retentionsfaktoren k_2 und k_1 zweier benachbarter Peaks (Peak 1 und Peak 2) bzw. der reduzierten Retentionszeiten t'_{R2} und t'_{R1} oder den Verteilungskonstanten K_2 und K_1 :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{K_2}{K_1}. \quad \text{Gl. 3}$$

Er ist ein Maß für die Eigenschaft eines chromatographischen Systems, zwei Komponenten trennen zu können. Um eine Trennung zu erreichen, muß $\alpha > 1$ sein.

Der Trennfaktor wird mitunter auch als **Selektivität** bezeichnet. Die Verwendung dieses Begriffes ist jedoch nur dann sinnvoll, wenn spezifische Trenneigenschaften stationärer Phasen für definierte Analytenpaare charakterisiert werden sollen.

Die **Peak-Auflösung** R_S berechnet sich für symmetrische Peaks aus dem Abstand der Peakmaxima und dem Mittelwert der Peakbreiten zwischen den Tangenten an der Basislinie w_b :

$$R_S = 1,177 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \quad \text{Gl. 4}$$

$$(t_{R2} > t_{R1}),$$

wobei w_{h1} und w_{h2} die Peakbreiten in halber Peakhöhe darstellen. Die Peak-Auflösung steht mit dem Trennfaktor α , der Bodenzahl N und dem Retentionsfaktor k in folgendem Zusammenhang:

$$R_S = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \sqrt{N_2} \frac{k_2}{k_2 + 1}. \quad \text{Gl. 5}$$

Die **Bodenzahl** N beschreibt das Trennvermögen einer Säule. Es kann nach folgender Beziehung aus dem Chromatogramm berechnet werden:

$$N = 5,54(t_R / w_h)^2. \quad \text{Gl. 6}$$

Diese Gleichung liefert jedoch nur dann korrekte Ergebnisse, wenn der Peak die Form einer Gauß-Kurve besitzt. Bei asymmetrischen Peaks gilt annähernd die Gleichung:

$$N = 41,7 \frac{(t_R/w_0)^2}{T + 1,25} \quad \text{Gl. 7}$$

w_0 entspricht der Peakbreite in 10 % der Höhe des Peaks. T ist die Peakasymmetrie, die sich aus: $T = \frac{b_0}{a_0}$ bestimmen läßt, wobei a_0 der Abstand von der Peakfront bis zum Maximum und b_0 der Abstand vom Maximum bis zum Peakende jeweils in einer Höhe von 10 % der gesamten Peakhöhe ist.

Da die Bodenzahl eines Peaks vom Retentionsfaktor k abhängig ist, sollte stets der entsprechende k -Wert angegeben werden.

6.3 HPLC von Stereoisomeren

6.3.1 *cis/trans*-Isomere prolinhaltiger Dipeptide

Untersuchungen zur *cis/trans*-Isomerisierung prolinhaltiger Peptide spielen vor allem bei Regulationsmechanismen biologischer Systeme wie z.B. Proteinfaltung und -refaltung (FISCHER, 1994) sowie Immunantwort (ROSEN et al., 1990) eine wichtige Rolle. Die Isomerisierung der Xaa-Prolylbindung stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Es wird vermutet, daß die *cis/trans*-Isomerisierung einen essentiellen Schritt im Enzymkatalysemechanismus in Prolin spezifischen Proteasen, insbesondere für Dipeptidylpeptidase IV, darstellt (BRANDT et al., 1996).

Peptide, die in C-terminaler Position Prolin enthalten, existieren infolge der Rotationsbarriere der Peptidylprolinbindung in der *cis*- und *trans*-Konformation (Abb. 16).

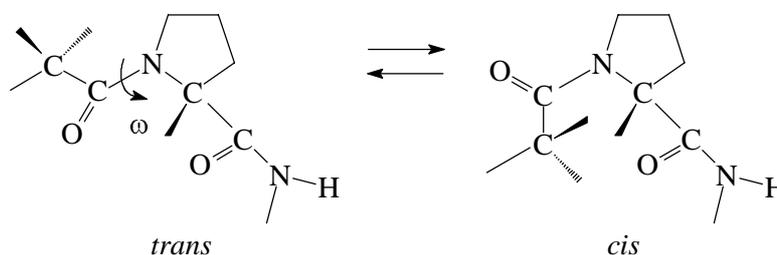


Abb. 16: *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidylprolinbindung (FISCHER, 1994)

Prolin und N-substituierte Aminosäuren unterscheiden sich von anderen proteino-genen Aminosäuren vor allem durch ihre Seitenkette, die mit dem Stickstoffatom eine kovalente Bindung eingehen. Aufgrund der Bildung des Pyrrolidinringes und dem damit verbundenen Verlust eines Amidwasserstoffatoms wird die freie Rotation um die

Peptidbindung gehindert (BRANDTS et al., 1984). Durch Mesomerie-Effekte erhält die C-N-Bindung partiellen Doppelbindungscharakter, deren Energiebarriere etwa 85 kJ/mol (20 kcal/mol) beträgt (FISCHER, 1992). Es existieren zwei thermodynamisch begünstigte Konformationen *cis* und *trans* mit Torsionswinkeln von $\omega_{cis} = 0^\circ$ und $\omega_{trans} = 180^\circ$. Der Torsionswinkel bestimmt maßgeblich die Ausrichtung der Polypeptidkette (FISCHER, 1994). Beide Konformationen können in vergleichbaren Konzentrationen vorkommen, wobei die *trans*-Form energetisch bevorzugt ist. Peptide mit n Xaa-Pro-Bindungen besitzen bis zu 2^n relativ stabile *cis/trans*-Konformere. Die Isomerisierungsgeschwindigkeit hängt hauptsächlich von der N-terminalen Aminosäure der Xaa-Pro-Bindung, der Anzahl der Xaa-Pro-Bindungen, der Reihenfolge der Aminosäurereste und dem Lösungsmittel ab. Der partielle Doppelbindungscharakter und die resultierenden Rotationsbarrieren führen zu einer Verzögerung der *cis/trans*-Isomerisierung, die mit analytischen Methoden, deren Zeitskala an die Zeitskala der Konformerenumwandlung (im Bereich von 10 bis 1000 s, gemessen an Modellpeptiden) angepaßt sind, untersucht werden können. Mit Hilfe spektroskopischer und kinetischer Methoden läßt sich die Konformerenumwandlung quantitativ beschreiben (HÜBNER et al., 1991; MEYER et al., 1994; MA et al., 1995; KÁLMÁN et al., 1996; KRAMER and FISCHER, 1997). Zur Isolierung und Identifizierung authentischer Konformere sind chromatographische und elektroforetische Methoden von wachsendem Interesse.

Während eines chromatographischen Laufes wird die Konformerenumwandlung durch einen weiteren dynamischen Prozeß - der Verteilung der Konformere zwischen der mobilen und stationären Phase - beeinflusst (Abb. 17).

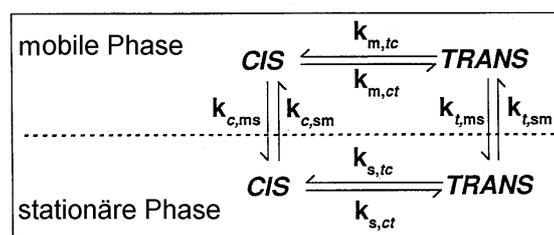


Abb. 17: Verteilung der Konformere zwischen mobiler und stationärer Phase (KÁLMÁN et al., 1996)

Das Zusammenspiel von simultan ablaufender *cis/trans*-Isomerisierung und chromatographischer Trennung kann durch die **Danköhler-Zahl** Da charakterisiert werden. Sie stellt das Verhältnis der charakteristischen Trennzeit t_R zur charakteristischen Reaktionszeit τ dar (KÁLMÁN et al., 1996):

$$Da = \frac{t_R}{\tau}$$

GL. 8

Ist die Damköhler-Zahl klein ($Da < 0,1$), so wird die Isomerisierung nicht wesentlich vom chromatographischen Prozeß beeinflusst. Die Konformere können getrennt werden. Bei einer Damköhler-Zahl größer 10 ist die Isomerisierungsgeschwindigkeit zu hoch. Es erfolgt keine Trennung der Konformere. Sie werden gemeinsam in einer Zeit, die der mittleren Retentionszeit beider Konformere entspricht, eluiert.

Konformerentrennungen mittels HPLC lassen sich durch kurze Trennsäulen, hohe Fließgeschwindigkeiten der mobilen Phase, steile Gradienten, tiefe Arbeitstemperaturen und pH-Wert beeinflussen.

Dipeptide des Typs $H^+L\text{-Xaa-L-Pro-O}^-$ (im weiteren Xaa-Pro) stellen geeignete Modellsubstanzen zur Untersuchung spezieller Trennmechanismen, wie z.B. der Einschlußkomplexbildungs-HPLC, dar. Durch Verwendung von β -CD-Phasen konnten Trennungen von *cis/trans*-Konformeren durch die Bildung von Einschlußkomplexen entscheidend verbessert werden (FRIEBE et al., 1992). MELANDER et al. (1982) und KÁLMÁN et al. (1996) untersuchten das Verhalten prolinhaltiger Peptide an RP 18-Phasen, deren Retentionsverhalten vor allem auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Damit sollten beide Stationärphasen (CD- und RP 18-Phasen) sowie ein zusätzlich mit *p-tert*-Butylphenol derivatisiertes Kieselgel ([1]Aren) für vergleichende Untersuchungen an Calixaren-Kieselgelen ([n]Aren, $n = 4, 5, 6, 8$) geeignet sein, um Trennfunktionen der neuartigen Calixaren-Phasen beschreiben zu können.

Da das Isomerengleichgewicht und die Geschwindigkeit der Isomerisierung prolinhaltiger Peptide sehr stark vom pH-Wert, der Temperatur und dem Lösungsmittel abhängen (EVANS and RABENSTEIN, 1974; HENDERSON and HORVÁTH, 1986; THUNECKE et al., 1996), wurde der pH-Wert der mobilen Phase auf 6,2 (zwitterionischer Zustand) und eine Säulentemperatur von 4°C eingestellt. Tiefe Arbeitstemperaturen verzögern die Relaxation der Isomere und führen zu geringeren Umwandlungsgeschwindigkeiten. Der Acetonitril-Anteil wurde zwischen 0 bis 7 % (v/v) variiert. Bei einem sauren pH-Wert und zu hohem organischen Modifier-Anteil würde die Isomerisierung zum einen beschleunigt und zum anderen das *cis/trans*-Verhältnis zu stark verändert werden (THUNECKE et al., 1996).

Durch Re-Chromatographie und 1H -NMR-Spektroskopie des Dipeptides Phe-Pro konnte die Existenz der Isomere und die Retentionsreihenfolge bestätigt werden (s. Abschnitt 6.3.1.4).

Zur Überprüfung, inwieweit gebundene Calixarene über ionenselektive Eigenschaften verfügen und ob diese zu einer Verbesserung der Trenneigenschaften führen, wurde der Einfluß verschiedener Kationen (Na^+ und NH_4^+) phosphathaltiger Pufferlösungen untersucht (s. Abschnitt 6.3.1.5).

6.3.1.1 L-Ala-L-Pro

Die Verwendung reiner Phosphat-Pufferlösungen erwies sich für die HPLC der *cis/trans*- Isomere von Ala-Pro an den Calixaren-Stationärphasen am geeignetsten. Abb. 18 zeigt die Trennprofile der getesteten Stationärphasen (RP 18, β -CD, [1]-, [4]-, [5]-, [6]- und [8]Aren). Nahezu vollständige Auflösungen werden an RP 18, β -CD und [6]Aren erreicht. Eine Aufspaltung der Peaks (Peaksplitting) wird an der [5]Aren-Phase beobachtet. An den [4]Aren- und [8]Aren-Phasen werden die Isomere zusammen eluiert, jedoch deuten die stark deformierten Peaks (auch Tailing genannt) auf das Vorhandensein eines Isomerengleichgewichts hin. An der [1]Aren-Phase werden die Isomere dagegen als ein symmetrischer Peak eluiert, was aus einem ungünstigen Verhältnis von Isomerisierungsgeschwindigkeit und chromatographischer Trennzeit (Damköhler-Zahl, s. Gl. 8) resultiert.

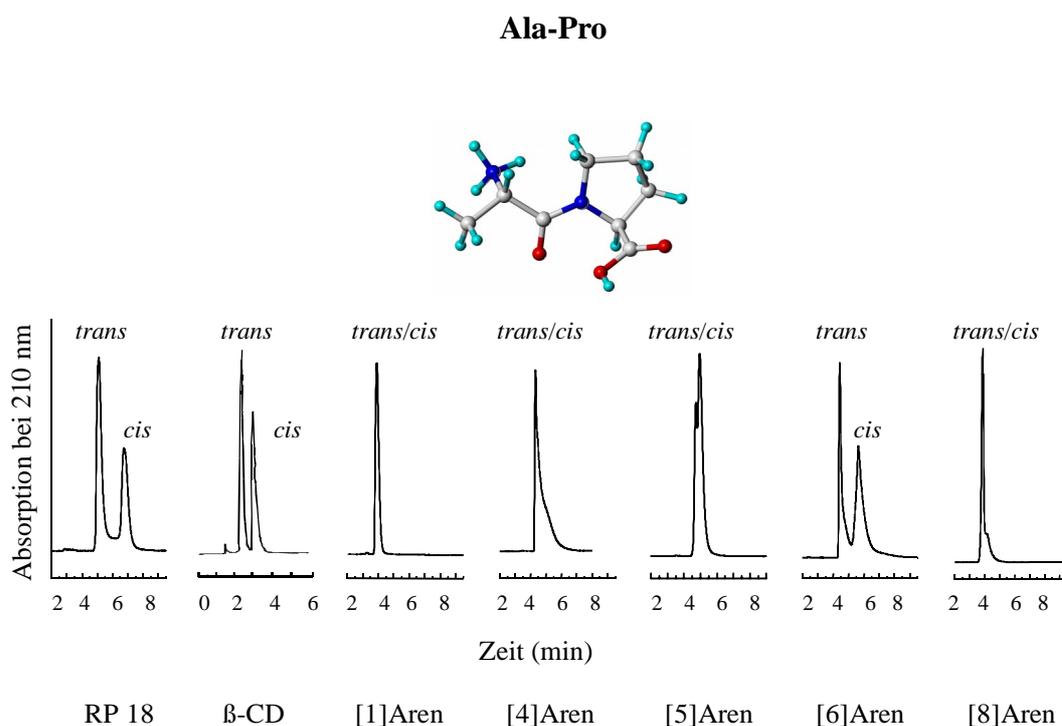


Abb. 18: HPLC von Ala-Pro bei 4°C an verschiedenen Stationärphasen; mobile Phase: 0,02 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 6,2); Fluß: 1 mL/min

Aus $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen fraktionierter Isomere des Dipeptids Phe-Pro konnte für Ala-Pro die Retentionsreihenfolge *trans* vor *cis* abgeleitet werden (GEBAUER et al., 1998, Abschnitt 6.3.1.4), die identisch mit der für RP-Phasen ist und von MELANDER et al. (1982) mit einem Raummodell von Ala-Pro postuliert und später von KÁLMÁN et al. (1996) an einer RP 18-Phase auch bestätigt werden konnte.

Anhand der Retentionsfaktoren in Tab. 4 ist erkennbar, daß die Retention der Isomere im allgemeinen gering ist ($k < 1$), was im Einklang mit der hydrophilen Natur von Ala-Pro steht.

Tab. 4: Chromatographische Parameter für *cis/trans*-Isomere von Ala-Pro nach HPLC an verschiedenen Stationärphasen bei 4°C; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2); Fluß: 1 mL/min

Parameter	RP 18	β-CD	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren
k_{trans}	0,89	0,60	0,24	0,29	0,35	0,85	0,32
k_{cis}	1,50	1,00	0,24	0,29	0,41	1,36	0,32
α	1,70	1,70	1,00	1,00	1,20	1,60	1,00
R_s	1,70	1,10	0,00	0,00	0,30	1,20	0,00
N_{trans}	396	735	940	1367	1106	201	1614
N_{cis}	764	465	940	1367	738	463	1614

Interessant ist, daß neben den sehr ähnlichen Elutionsprofilen der [6]Aren- und β-CD-Phasen sowohl der Trennfaktor α als auch die Auflösung R_s nur geringfügig verschieden sind. Da an beiden Stationärphasen makrocyclische Selektoren gebunden sind, deren innere Durchmesser vergleichbar groß sind (Calix[6]aren (ellipsoidal): ca. 9 x 11 Å und β-CD: ca. 11 Å¹), kann man auf eine einheitliche Retentionsfunktion schließen. Als Ursache für die Selektivität wird die Bildung von Einschlußkomplexen postuliert. Bekräftigt wird diese Annahme durch einen Vergleich der Elutionsprofile der [n]Aren-Phasen. Während das Peaksplitting an der [5]Aren-Phase auf einen etwas zu kleinen Hohlraum des Calix[5]arens hindeutet, erscheinen die des Tetramers und Octamers dagegen zu klein bzw. zu groß, was durch das Tailing im Trennprofil für [4]Aren und [8]Aren sichtbar wird. Diese Aussagen zudem werden durch Molecular Modelling Untersuchungen bekräftigt (Kapitel 7). Der symmetrische Peak im Elutionsprofil der [1]Aren-Phase steht im Einklang mit dem Fehlen einer Cavität.

An der RP 18-Phase werden die Peaks getrennt, jedoch erreicht die Basislinie nicht die Grundlinie. Dieses typische Plateau zwischen den Isomerenpeaks wird durch die in Relaxation befindlichen Peptidmoleküle verursacht (MELANDER et al., 1982), da die *cis/trans*-Isomerisierung durch ein sekundäres Gleichgewicht, der Verteilung der Isomere zwischen mobiler und stationärer Phase, überlagert wird (Abb. 17). Infolge zu starker hydrophober Wechselwirkungen und eines erschwerten Massetransfers zwischen mobiler und stationärer Phase, insbesondere bei tiefen Temperaturen, werden die Isomere zu lange retardiert, so daß die *cis/trans*-Isomerisierung während des chromatographischen

¹ Die Angaben beziehen sich auf die Abstände der Schwerpunkte der aromatischen Einheiten im Calix[6]aren bzw. der Glukopyranose-Einheiten im β-CD und nicht auf van-der-Waals Radien. Die Abstände wurden mit Hilfe des Molecular Modelling Programms Sybyl 6.3 gemessen.

Laufes fortschreitet. KÁLMÁN et al. (1996) konnten durch Verwendung von unporösen, pellicularem RP 18-Kieselgel eine beachtliche Verbesserung der Auflösung erreichen. Eine Diffusion der Isomere in die Poren ist nicht möglich, wodurch Wechselwirkungen nur noch an der hydrophoben Oberfläche der Kieselgelpartikel stattfinden können. Daraus resultieren kürzere Retentionszeiten und kleinere k -Werte. Eine Interferenz der Isomerisierungsgeschwindigkeit mit dem chromatographischen Prozeß wird somit verringert.

Bei HPLC-Untersuchungen an α -, β - und γ -CD-Phasen wurden ähnliche Ergebnisse wie an den Calixaren-Phasen festgestellt². Die Auflösungen der Peaks sind sowohl an α -CD- als auch an γ -CD-Phasen schlechter als an der β -CD-Phase. An der α -CD-Phase konnte nur ein Peaksplitting beobachtet werden. Vermutlich ist auch in diesem Fall der Hohlraum des α -Cyclodextrins zu klein zur Einschlußkomplexbildung, ähnlich wie es bei Calix[5]aren beobachtet wurde. Infolge des größeren inneren Durchmessers des γ -Cyclodextrins sind die intermolekularen Abstände zwischen Wirt- und Gastmolekülen zu groß und führen ebenfalls zu einer Verschlechterung der Auflösung.

6.3.1.2 L-Phe-L-Pro

Das Dipeptid Phe-Pro zeichnet sich aufgrund der aromatischen Seitenkette des Phenylalanins durch seine größere Hydrophobizität im Vergleich zu Ala-Pro aus. Durch die voluminöse, aromatische Seitenkette des Phenylalanins ist die Rotationsbarriere der Peptidylprolinbindung erhöht und die Isomerisierungsgeschwindigkeit verringert, so daß sich *cis*- und *trans*-Konformere prinzipiell leichter trennen lassen. Der organische Modifier-Anteil der mobilen Phase wurde im Bereich von 0 bis 7 % variiert. Während die Verwendung reiner Phosphatpufferlösungen zu einer drastischen Verschlechterung der Auflösung führte, wurden die Isomere bei einem Anteil von 7 % Acetonitril gut aufgelöst (Abb. 19). In relativ kurzer Zeit werden an den [n]Aren-Phasen ausreichende Basislinientrennungen erreicht, wobei mit wachsender Ringgröße der Calixarene die Auflösung zunimmt.

² MENGE, unveröffentlichte Ergebnisse und persönliche Mitteilungen

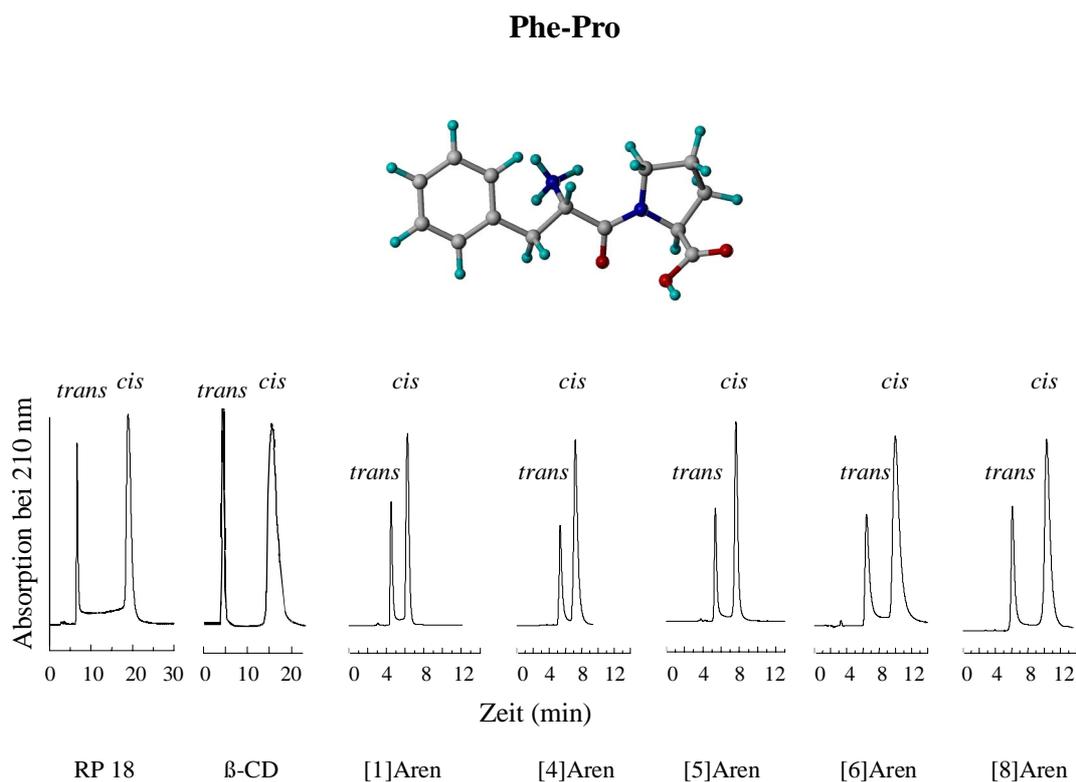


Abb. 19: HPLC von Phe-Pro bei 4°C an verschiedenen Stationärphasen; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2)/ACN (93:7, v/v); Fluß: 1 mL/min

Auffällig ist weiterhin die Ähnlichkeit der *trans/cis*-Peakflächenverhältnisse von 25:75 (±3) Flächenprozent, die mit dem Konformerenverhältnis in Lösung korrelieren (EVANS and RABENSTEIN, 1974).

Infolge starker, hydrophober Wechselwirkungen an der RP 18-Phase resultieren lange Retentionszeiten. Typisch für die Trennung ist das bereits erwähnte Plateau, das auf eine ungenügende Diskriminierung der Isomere zurückgeführt wird (MELANDER et al., 1982). Die Trennprofile der Calixaren-Phasen weisen ebenfalls Plateaus auf, die aufgrund kürzerer Trennzeiten bedeutend schwächer sind. Im Chromatogramm der β-CD-Phase ist kein Plateau zu erkennen, was als Folge der sterischen Diskriminierung der Isomere durch Einschlußkomplexenbildung diskutiert wird (FRIEBE et al., 1992). Eine Rotation um die Peptidylprolinbindung wird somit verhindert. Im Gegensatz zu den Calixaren-Phasen sind die Retentionszeiten bedeutend länger.

Ein Vergleich der Retentionsfaktoren k_{trans} und k_{cis} der [n]Aren-Phasen verdeutlicht, daß mit größer werdendem Calixaren die Retentionsfaktoren zunehmen und die Retention von der Ringgröße der Calixarene abhängig zu sein scheint. Eine Korrelation zur Oberflächenkonzentration der Calixaren-Phasen ist nicht festzustellen (s. Tab. 5 und 3). Während die [8]Aren-Phase die größten Retentionsfaktoren und die geringste Ober-

flächenkonzentration aufweist, zeigt die [1]Aren-Phase die kleinsten Retentionsfaktoren und die größte Oberflächenkonzentration.

Tab. 5: Chromatographische Parameter für *cis/trans*-Isomere von Phe-Pro nach HPLC an verschiedenen Stationärphasen bei 4°C; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2)/ACN (93:7, v/v); Fluß: 1 mL/min

Parameter	RP 18	β-CD	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren
k_{trans}	1,36	1,00	0,44	0,44	0,42	0,98	1,19
k_{cis}	5,75	6,49	0,93	0,94	1,02	2,07	2,71
α	4,20	6,50	2,10	2,10	2,40	2,10	2,30
R_s	4,60	3,50	2,20	1,60	3,20	2,50	2,60
N_{trans}	744	1063	738	542	1355	253	476
N_{cis}	794	742	1215	611	1922	288	592

Die deutliche Zunahme der Retentionsfaktoren an [6]Aren und [8]Aren läßt auf einen stereoselektiven Effekt schließen, deren Ursache die Bildung von Einschlußkomplexen sein kann. Aufgrund der Ringgröße dieser Calixarene spielt möglicherweise auch die Anpassung der Cavitäten an die Form der Isomere eine Rolle. Die Peaks in den Chromatogrammen von [6]Aren und [8]Aren sind relativ breit, wodurch sich geringe Peak-Auflösungen und kleine Bodenzahlen ergeben. Im Gegensatz dazu zeigt die [5]Aren-Phase eine hohe Peak-Auflösung, die durch schmale Peakformen verursacht werden, da neben der Bodenzahl die Peakbreite und die Peaksymmetrie in die Gleichung der Peak-Auflösung eingehen (Gl. 5 und 7). Zudem zeigen Molecular Modelling Untersuchungen in Kapitel 7, daß Calix[5]- und Calix[4]arene aufgrund der kleineren makrocyclischen Ringsysteme keine Einschlußkomplexe bilden können. Interessant ist andererseits, daß die [1]Aren-Phase im Vergleich zur [4]Aren-Phase eine verbesserte Peak-Auflösung zeigt, was offensichtlich auf die planare, aromatische Struktur des *p*-*tert*-Butylphenols zurückgeführt werden kann, die zu attraktiven π - π Wechselwirkungen fähig ist.

Nicht zu vernachlässigen sind neben solvophoben Effekten auch van-der-Waals-Wechselwirkungen, die aufgrund des hydrophoben Charakters der Calixarene maßgeblich am Trenngeschehen beteiligt sein sollten. Ferner zeigen Molecular Modelling Untersuchungen, daß auch elektrostatische Wechselwirkungen im Calixaren-Dipeptid-Komplex eine Rolle spielen. Dabei kann es vor allem zwischen Kationen aus der mobilen Phase, die zwischen den Carboxylgruppen der Calixarene eingeschlossen werden, und der negativ geladenen Carboxylgruppe des Dipeptides zu attraktiven Wechselwirkungen kommen.

6.3.1.3 L-Ile-L-Pro

Weiterhin wurde das chromatographische Verhalten des Dipeptids Ile-Pro untersucht. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wurde im Bereich von 0 bis 7 % Acetonitril variiert, wobei die Retention mit wachsendem Modifier-Anteil abnahm. Die besten Auflösungen wurden jedoch mit 5 % Acetonitril erreicht (Abb. 20, Tab. 6).

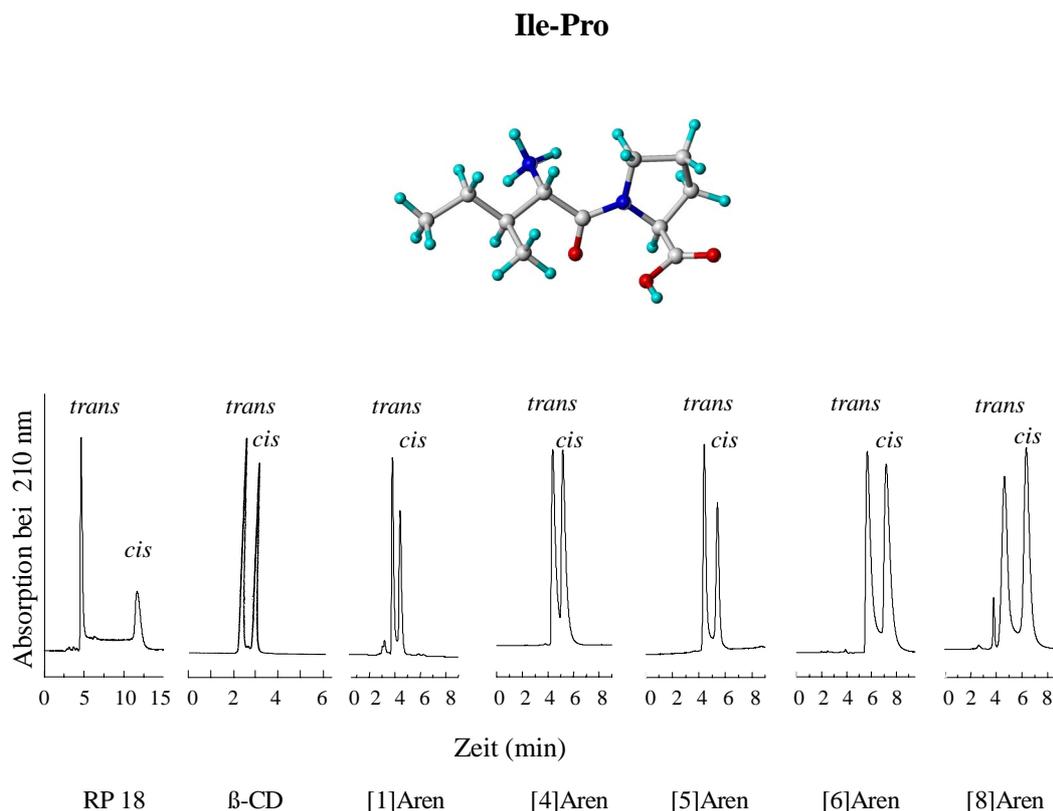


Abb. 20: HPLC von Ile-Pro bei 4°C an verschiedenen Stationärphasen; mobile Phase: 0,02 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 6,2)/ACN (95:5, v/v); Fluß: 1 mL/min

Die Peaks sind ausreichend aufgelöst, jedoch ohne Basislinientrennung. Sie zeichnen sich durch sehr scharfe und symmetrische Peakformen aus. Interessant ist, daß das *cis/trans*-Verhältnis nicht in allen Fällen identisch ist, was Ausdruck der unterschiedlichen Verteilung der Isomere zwischen stationärer und mobiler Phase ist.

Die HPLC an der RP 18-Phase zeigt wiederum das typische Plateau zwischen den Isomerenpeaks, wie es für die Trennungen von Ala-Pro und Phe-Pro beobachtet wurde. An der β -CD-Phase wird eine Basislinientrennung der Isomere unter 4 min erreicht, die mit Calixaren-Phasen nicht möglich ist.

Tab. 6: Chromatographische Parameter für *cis/trans*-Isomere von Ile-Pro nach HPLC an verschiedenen Stationärphasen bei 4°C; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2)/ACN (95:5, v/v); Fluß: 1 mL/min

Parameter	RP 18	β-CD	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren
k_{trans}	0,49	0,16	0,23	0,15	0,19	1,32	0,77
k_{cis}	2,86	0,36	0,45	0,36	0,46	1,94	1,44
α	5,80	2,20	2,00	2,40	2,40	1,50	1,90
R_S	4,60	1,60	1,40	1,20	2,00	1,40	2,00
N_{trans}	990	1847	863	666	1729	582	288
N_{cis}	908	2272	1338	928	1978	681	805

Wie Tab. 6 zeigt, nehmen die Retentionsfaktoren innerhalb der [n]Aren-Phasen bis [6]Aren zu und fallen bei [8]Aren wieder. Bei der Annahme, daß die Retention durch Einschlußkomplexbildung beeinflusst wird, sind daher die Wechselwirkungen mit Ile-Pro an der [6]Aren-Phase am stärksten. Eine bessere Auflösung wird jedoch an der [8]Aren-Phase erreicht. Die Retention der Isomere ist ähnlich wie die HPLC von Phe-Pro nicht von der Oberflächenkonzentration, sondern von der Ringgröße der Calixarene abhängig.

6.3.1.4 Nachweis der Retentionsreihenfolge der *cis/trans*-Isomere von L-Phe-L-Pro mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

Um die Retentionsreihenfolge der *cis/trans*-Isomere zu bestimmen, wurde ¹H-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Am Beispiel des Dipeptids Phe-Pro, dessen *cis/trans*-Isomerie in der Kälte relativ langsam verläuft, konnte die Existenz der *cis*- und *trans*-Isomere in der HPLC nachgewiesen werden. Die Fraktionierung der Isomere erfolgte an einer analytischen β-CD-Phase, da sich in Vorversuchen bei Verwendung von Wasser/Acetonitril-Gemischen eine schlechtere Auflösung an den [n]Aren-Phasen zeigte. Für die semi-präparative Trennung an der β-CD-Phase wurden deuterierte Lösungsmittel (D₂O und CD₃CN) verwendet. Zur Isolierung des ersten Peaks wurde die β-CD-Phase mit 1 mg Phe-Pro und zur Isolierung des zweiten Peaks mit 0,1 mg Phe-Pro, jeweils gelöst in 100 µL mobiler Phase, überladen. Nach der HPLC wurden die isolierten Fraktionen umgehend mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bei 4°C gemessen. Die erhaltene Spektren sind in Abb. 21 a) und b) dargestellt.

In Übereinstimmung zu den Untersuchungen von KÁLMÁN et al. (1996) können die NMR-Signale des ersten Peaks eindeutig dem *trans*-Konformer und die des zweiten Peaks dem *cis*-Konformer zugeordnet werden, wodurch die Annahme bestätigt wird, daß die Retention des *cis*-Konformers an der β-CD-Phase stärker ist als die des *trans*-

Konformers (FRIEBE et al., 1992). Durch unmittelbare Re-Chromatographie der fraktionierten Peaks an der [8]Aren-Phase und anhand des Vergleiches der Retentionszeiten konnte die gleiche Elutionsreihenfolge wie an der β -CD-Phase bestimmt werden.

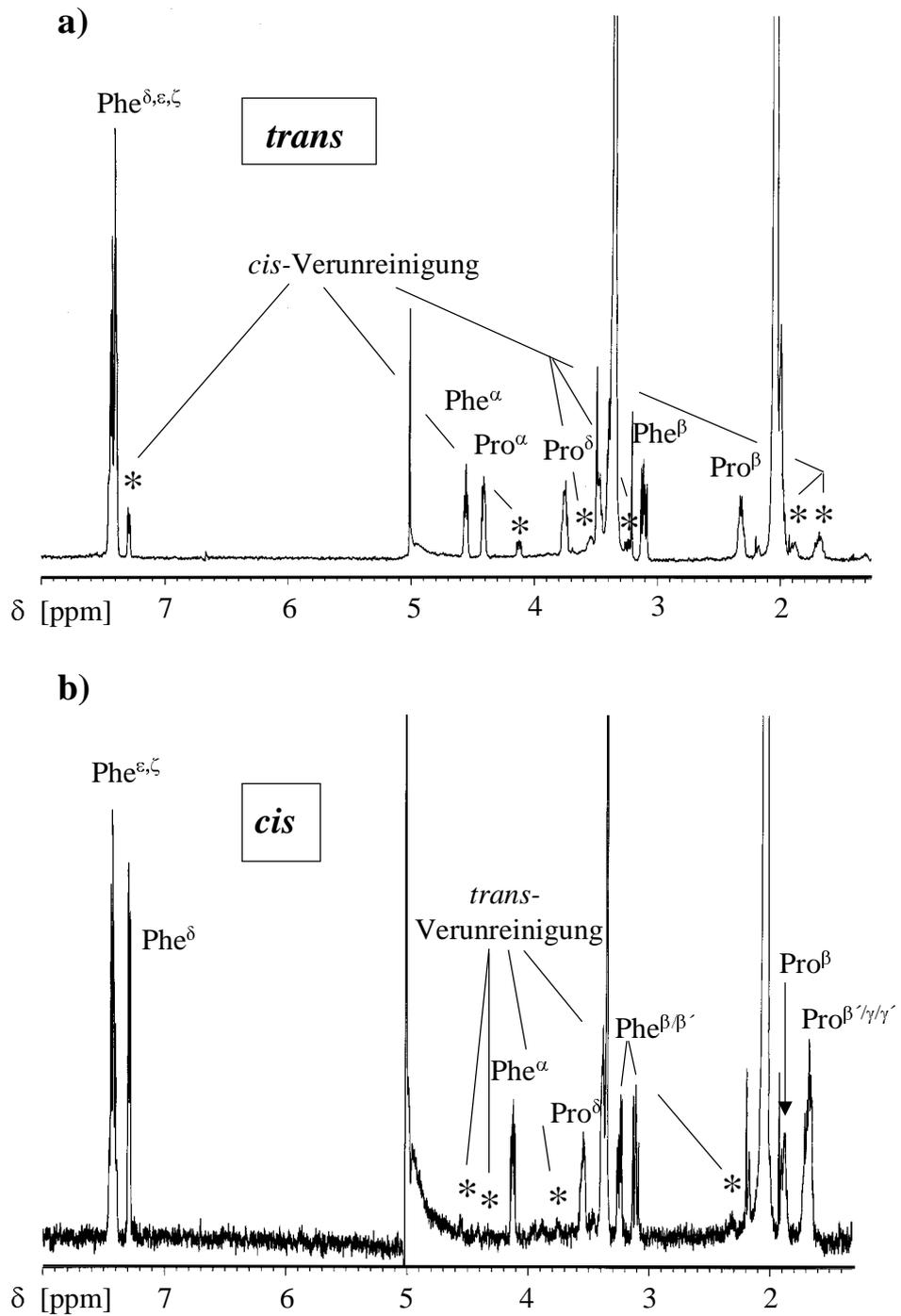


Abb. 21: $^1\text{H-NMR}$ Spektren der fraktionierten Isomere von Phe-Pro bei 4°C in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (95:5, v/v): a) *trans*-Konformer und b) *cis*-Konformer

6.3.1.5 Einfluß verschiedener Parameter auf die HPLC der *cis/trans*-Isomere

In diesem Abschnitt wird der Einfluß verschiedener Kationen aus der mobilen Phase auf die relative Retention der *cis/trans*-Isomere der Dipeptide Xaa-Pro (Xaa = Ala, Phe, Ile) untersucht.

Es ist bekannt, daß Ester der Calixarene in Lösung selektive Komplexierungseigenschaften gegenüber Alkali- und Erdalkalimetallionen zeigen. Deshalb sollte getestet werden, ob immobilisierte Calixarene ein ähnliches Verhalten aufweisen, und wenn ja, ob sich diese Effekte vorteilhaft auf die HPLC-Trennungen auswirken. Beispielsweise werden Na^+ -Ionen sehr selektiv von Estern der Calix[4]arene komplexiert. Ester der Calix[5]- und Calix[6]arene komplexieren hingegen Cs^+ -Ionen mit einer hohen Affinität. Im Gegensatz dazu wurden für Ester der Calix[8]arene bisher keine Besonderheiten beobachtet (ARNAUD-NEU et al., 1989; BÖHMER, 1995).

Für die chromatographischen Untersuchungen wurden 0,02 M NaH_2PO_4 und 0,02 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -Lösungen (pH 6,2) sowie unterschiedliche Acetonitril-Anteile (0, 2, 5 und 7 %) verwendet. In den Abb. 22 bis 24 sind die Trennfaktoren α der *cis/trans*-Bindungs-isomere von Ala-Pro, Phe-Pro und Ile-Pro in Abhängigkeit des Acetonitril-Anteils aufgetragen. Die Trennfaktoren wurden nach Gl. 3 berechnet.

Für die Trennungen der *cis/trans*-Isomere von Ala-Pro ergibt sich eine einfache graphische Darstellung (Abb. 22).

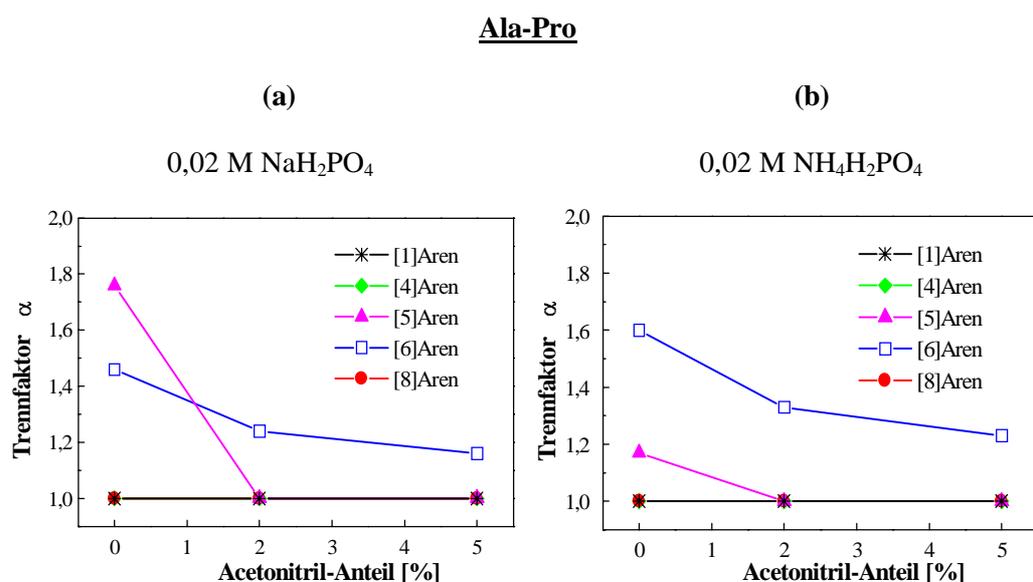


Abb. 22: Einfluß von Na^+ - (a) und NH_4^+ - (b) Ionen auf den Trennfaktor α während der HPLC von Ala-Pro in Abhängigkeit vom Acetonitril-Gehalt

Die HPLC ohne Acetonitril liefert die größten Trennfaktoren. Mit zunehmenden Acetonitril-Gehalt nimmt α ab. An [6]Aren sind Trennungen sowohl mit Na^+ - (a) als auch mit NH_4^+ -haltigen (b) mobilen Phasen möglich ($\alpha > 1$). Im Vergleich zur [5]Aren-Phase lassen sich die Isomere nur bei Verwendung von reinen Pufferlösungen trennen. Ab 2 % Acetonitril sinkt α auf 1. Während für [6]Aren höhere α -Werte mit NH_4^+ -haltigen Lösungen (b) erreicht werden, weist [5]Aren mit Na^+ -haltigen Lösungen selektivere Trenneigenschaften auf. Die verbleibenden [n]Aren-Phasen ($n = 1, 4$ und 8) sind dagegen nicht in der Lage, die Isomere zu trennen ($\alpha \approx 1$).

Der Einfluß der Kationen auf die HPLC von Phe-Pro ist in Abb. 23 dargestellt. Die Trennfaktoren der [n]Aren-Phasen sind mit Ausnahme von [6]Aren in (c) und [4]Aren in (d) größer als 2 und spiegeln den hydrophoben Charakter dieses Dipeptides wider.

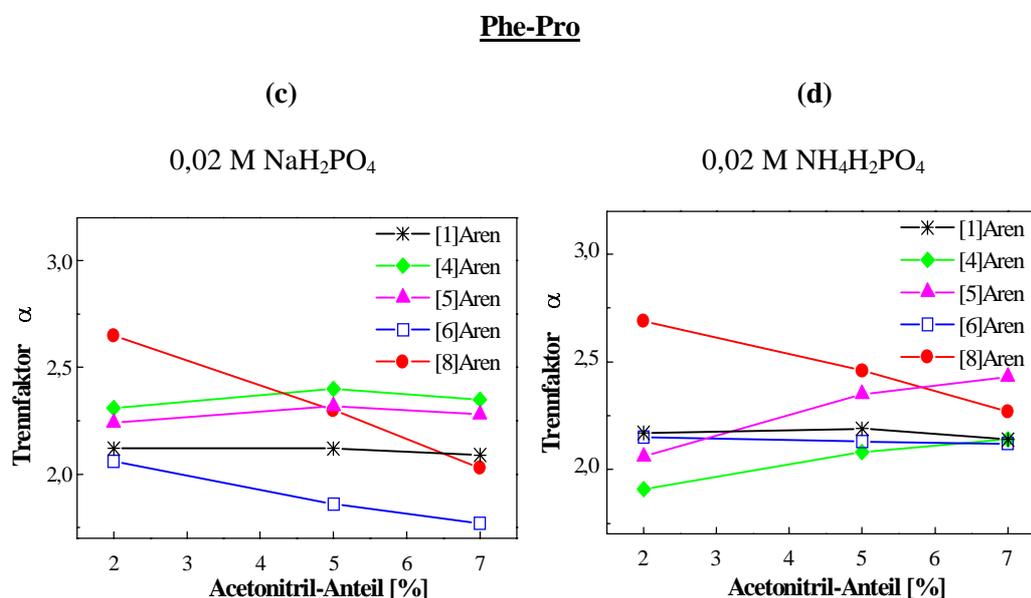


Abb. 23: Einfluß von Na^+ - (c) und NH_4^+ - (d) Ionen auf den Trennfaktor α während der HPLC von Phe-Pro in Abhängigkeit vom Acetonitril-Gehalt

Aus den Diagrammen in Abb. 23 sind folgende Abhängigkeiten zu erkennen:

- Die α -Werte von [4]Aren und [5]Aren steigen mit zunehmendem Acetonitril-Gehalt an,
- Die α -Werte von [6]Aren und [8]Aren sinken mit zunehmendem Acetonitril-Gehalt,
- Der Kurvenverlauf der [1]Aren-Phase bleibt im Bereich von 2 bis 7 % fast unverändert.

Während die [4]Aren-Phase generell höhere α -Werte bei Verwendung von 0,02 M NaH_2PO_4 (c) liefert, zeigen [6]Aren und [8]Aren ab 5 % Acetonitril eine Selektivität für 0,02 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Der Unterschied ist im Gegensatz zu [4]Aren jedoch geringer.

[5]Aren weist bei 2 % Acetonitril eine höhere Selektivität gegenüber Na^+ -Ionen und bei 7 % Acetonitril gegenüber NH_4^+ -Ionen auf. Einen signifikanter Effekt auf die Trennfaktoren der Monomer-Phase ist nicht festzustellen.

In Abb. 24 ist der Einfluß der Kationen auf die HPLC von Ile-Pro im Bereich von 2 bis 7 % Acetonitril dargestellt.

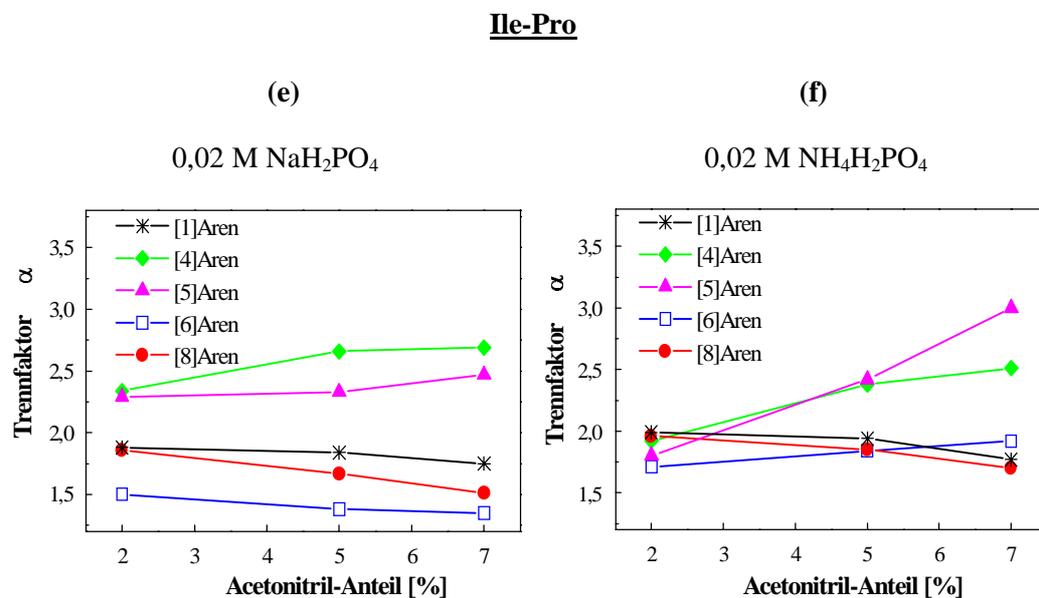


Abb. 24: Einfluß von Na^+ - (e) und NH_4^+ - (f) Ionen auf den Trennfaktor α während der HPLC von Ile-Pro in Abhängigkeit vom Acetonitril-Gehalt

Ähnlich wie für die HPLC von Phe-Pro steigt die Trenneffizienz an [4]Aren und [5]Aren mit zunehmenden Acetonitril-Gehalt und sinkt mit zunehmenden Acetonitril-Gehalt bei [6]-, [8]- und [1]Aren (mit Ausnahme von [6]Aren in (f)). Die Trennfaktoren an der [4]Aren-Phase sind bei Verwendung von Na^+ -haltigen mobilen Phasen größer (e). Die [5]Aren-Phase zeigt wiederum ein bereits erwähntes bivalentes Verhalten, wobei bei 2 % Acetonitril eine höhere Effizienz für Na^+ -Ionen (e) und bei 7 % Acetonitril für NH_4^+ -Ionen (f) festzustellen ist. Zudem läßt sich eine Selektivität für NH_4^+ -Ionen an [6]Aren feststellen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die HPLC der Dipeptide an den Calixaren-Phasen von der Art des Kations der mobilen Phase beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu konnten bei der Monomer-Phase keine Abhängigkeiten festgestellt werden. Damit wird deutlich, daß ein Zusammenhang zwischen der Größe des Kations und der Größe des inneren Hohlraum der Calixarene besteht. Obwohl im Fall von Calix[4]aren und Calix[5]aren, theoretisch belegt durch Molecular Modelling, keine Einschlußkomplexe mit den Dipeptiden gebildet werden können (Kapitel 7), scheint das Kation dennoch unterschiedlich große hydrophobe Oberflächen zu induzieren, die offensichtlich einen Einfluß auf die

HPLC der Dipeptide haben. Für die chromatographische Nutzung der Calixaren-Phasen lassen sich daher einige Anwendungshinweise ableiten:

1. Da durch den Einsatz von Natrium-Ionen in der mobilen Phase die Trenneffizienz der Calix[4]aren-Phase erhöht werden kann, ist es vorteilhaft, Na⁺-haltige Pufferlösungen zu verwenden.
2. Für die [n]Aren-Phasen mit größeren Ringdimensionen, wie n = 5, 6, 8, ist es empfehlenswert, Pufferlösungen mit größeren Kationen, wie NH₄⁺, K⁺- oder speziell im Fall von [6]Aren Cs⁺-Ionen einzusetzen.

6.3.2 *cis/trans*-Isomere prolinhaltiger Tetra- und Pentapeptide

Ausgehend von den HPLC-Studien zur *cis/trans*-Isomerisierung der Peptide des Casomorphin-Typs an β -CD-Phasen (FRIEBE et al., 1994) wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. K. NEUBERT (Institut für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg) Tetra- und Pentapeptide mit ein und zwei Xaa-Pro-Bindungen sowie unterschiedlicher D- und L-Konfiguration an den Calixaren-Phasen untersucht (s. Tab. A2). Die HPLC dieser Peptide erwies sich jedoch auch bei tiefen Arbeitstemperaturen (4°C) als wenig erfolgreich und erbrachte nicht die gewünschten Auflösungen der Isomere. Bei den Peptiden mit zwei Xaa-Pro-Bindungen konnten statt des zu erwartenden Isomerenmuster von 4 Peaks ($2^2 = 4$) nur 2 Peaks detektiert werden. Die Leistungsfähigkeit der Calixaren-Phasen ist nicht ausreichend, um zwischen den *cis-cis*-, *trans-trans*-, *cis-trans*- und *trans-cis*-Konformeren unterschieden zu können. Offensichtlich sind diese Peptide bzw. wesentliche Teile solcher Peptide zu groß, um in das Innere der Calix[n]arene zu penetrieren.

Eine Verbesserung der HPLC von Tetra- und Pentapeptiden an Calixaren-Phasen sollte jedoch durch eine gezielte Derivatisierung der Makrocyclen z.B. durch den Einbau chiraler und/oder wasserstoffbrückenbindender Funktionen möglich sein.

6.3.3 17 α - und 17 β -Östradiol

Die Trennung von Östrogenen mittels klassischer Flüssigchromatographie stellt ein schwieriges Trennproblem dar und führt oftmals zu unzureichenden Ergebnissen (ZARZYCKI et al., 1997). 17 α - und 17 β -Östradiol wurden als Modellverbindungen eingesetzt, um das chromatographische Verhalten der Calixaren-Phasen zu testen, da häufig eine Trennung beider Epimere nicht möglich ist (BATRA and SAUMANDE, 1984). Abb. 25 zeigt die Strukturen der untersuchten Steroide.

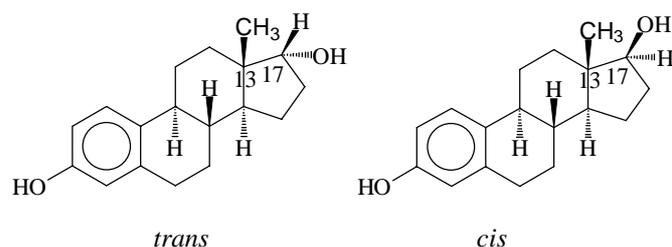


Abb. 25: Strukturformeln von 17 α - (*trans*) und 17 β -Östradiol (*cis*)

Sie werden in die Gruppe der weiblichen Sexualhormone eingeordnet und in der Humanmedizin eingesetzt.

17 α -Östradiol ist der Hauptmetabolit des biologisch aktiven 17 β -Östradiols. Obwohl es keine biologische Aktivität besitzt, ist das 17 α -Östradiol von klinischem Interesse, da Konzentrationsänderungen in biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Blutplasma, Urin oder Milch, in enger Beziehung zum Follikelsprung und während der Schwangerschaft stehen (BATRA and SAUMANDE, 1984).

Da sich 17 α - und 17 β -Östradiol nur in der Position der OH-Gruppe am C-Atom 17 unterscheiden, war die chromatographische Leistungsfähigkeit der Calixaren-Phasen von Interesse. Abb. 26 zeigt die Chromatogramme der 17 α - und 17 β -Östradiol-Trennungen an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase. Die Epimere werden an den [n]Aren-Phasen selektiv voneinander getrennt und könnten daher für die klinische Praxis von Nutzen sein, um beispielsweise die Biochemie des Metaboliten innerhalb einer Therapie zu studieren. Im Gegensatz dazu ist die Trennung an der RP 18-Phase nur unvollständig. Die Elutionsreihenfolge ist der an den [n]Aren-Phasen jedoch identisch. Untersuchungen an der β -CD-Phase führten unter gleichen chromatographischen Bedingungen zu keiner Trennung der Epimere. ZARZYCKI et al. (1997) konnten jedoch durch Zusatz von β -CD zur mobilen Phase (Acetonitril/Wasser, 30:70 (v/v)) eine Basislinientrennung von 17 α - und 17 β -Östradiol an einer RP 18-Phase (Bakerbond) erreichen.

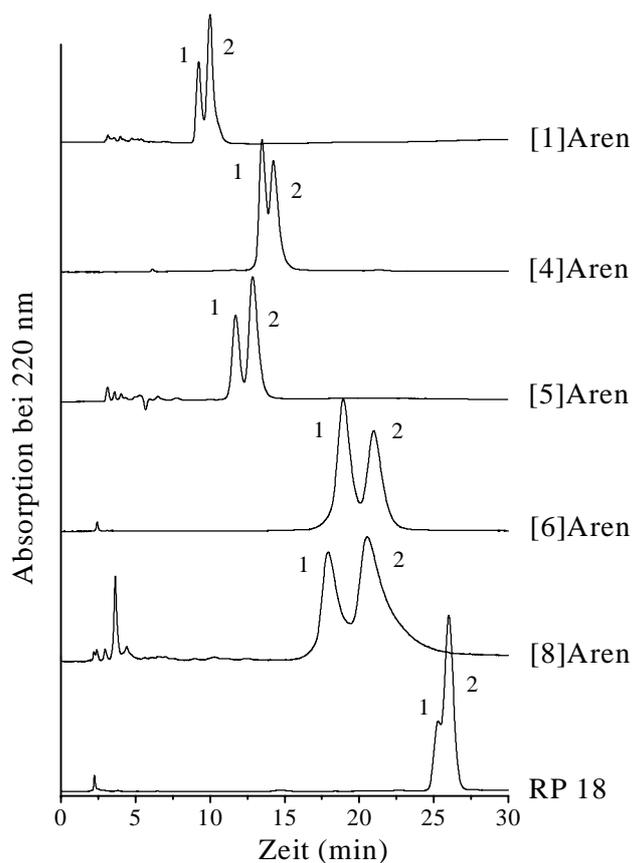


Abb. 26: HPLC von 17 α - (1) und 17 β -Östradiol (2) an [n]Aren und RP 18; mobile Phase: 0,02 M NaH₂PO₄/Methanol (40:60, v/v); Fluß: 1 mL/min

Wie Tab. 7 zeigt, nehmen mit größer werdendem Hohlraum der Calixarene die Retentionsfaktoren zu. Interessant ist die hohe Auflösung an der [6]Aren-Phase.

Tab. 7: Chromatographische Parameter für 17 α - und 17 β -Östradiol nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase; mobile Phase: s. Abb. 26

Parameter	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren	RP 18
k_{trans}	1,95	3,20	2,75	6,85	7,15	10,35
k_{cis}	2,20	3,45	3,15	7,70	8,35	10,65
$\alpha\alpha$	1,13	1,08	1,14	1,12	1,17	1,03
R_S	1,00	0,70	1,05	1,10	1,05	0,50
N_{trans}	3337	3532	2153	1910	1710	6709
N_{cis}	2600	2513	1973	1794	651	7060

Aus DSC- und FTIR-Untersuchungen von *p*-tert-Butylcalix[n]arenen (n = 4, 6, 8) und 4-en-3-keto-Steroiden ist bekannt, daß selektive Wechselwirkungen auf die Bildung von Wirt-Gast-Komplexen vor allem bei Calix[6]- und Calix[8]aren zurückgeführt werden können (PARINI et al., 1994). Daher wird die Annahme gestützt, daß der Trennmechanismus für die Östradiol-Epimere ähnlich wie bei der HPLC der prolinhaltigen Dipeptide von Einschlußkomplexbildungen geprägt wird. Dennoch scheint

die Retention komplex zu sein und setzt sich zudem aus den typischen Trennfunktionen der RP-Chromatographie, wie solvophobe und hydrophobe Wechselwirkungen, zusammen.

6.4 HPLC von Positionsisomeren

Für chromatographische Untersuchungen zum Wirt-Gast-Wechselwirkungsverhalten von immobilisierten oder freien, in der mobilen Phase vorliegenden, Makrocyclen stellen vor allem Positionsisomere geeignete Modellverbindungen dar. ARMSTRONG und DeMOND (1984) konnten auf diese Weise das stereoselektive Retentionsverhalten von CD-Phasen unter Beweis stellen.

Seit der Einführung der Calixarene in die Chromatographie wurden Positionsisomere oft genutzt, um ihr chromatographisches Verhalten zu beschreiben. So stellten z.B. UNGARO und Mitarbeiter (1983) bei gaschromatographischen Trennungen aromatischer Verbindungen an *p-tert*-Butylcalix[8]aren, adsorbiert an Chromosorb, eine vom Siedepunkt unabhängige Retention für Dichlorbenzen fest und führten dies auf einen stereospezifischen Effekt zurück. MNUK et al. (1996) untersuchten ebenfalls für gaschromatographische Zwecke die Komplexbildungseigenschaften von *p-tert*-Butylcalix[n]arenen ($n = 4, 5, 6, 8$). Die Ergebnisse zeigten, daß ein direkter Zusammenhang zwischen der Struktur der zu trennenden Moleküle und ihrem Retentionsverhalten besteht, der vor allem vom Einschluß in den Hohlraum der Calixarene bestimmt wird.

Trennungen von Positionsisomeren an immobilisierter und freier Calix[6]aren-*p*-sulfonsäure (CAPS) wurden von PARK und Mitarbeitern beschrieben (PARK et al., 1993; LEE et al., 1997), wobei nach Zusatz von CAPS zur mobilen Phase deutlich kürzere Retentionszeiten gemessen wurden als ohne CAPS. Die HPLC von Phenolen mit polaren Substituenten ($-\text{NH}_2$, $-\text{NO}_2$, $-\text{OCH}_3$) zeigte im Vergleich zu Phenolen mit unpolaren Substituenten ($-\text{Cl}$, $-\text{CH}_3$) bessere Auflösungen an der CAPS-Phase, was die Autoren auf die Bildung von Einschlußkomplexen zurückführen. XU et al. (1998) immobilisierten *p-tert*-Butylcalix[6]aren an Kieselgel und untersuchten das selektive Retentionsverhalten dieser Phase anhand von Positionsisomeren, insbesondere von Aminophenol- und Nitroanilin-Isomeren. Als Trennfunktion wird die Bildung von Einschlußkomplexen diskutiert, die möglicherweise durch Charge-transfer-Komplexe hervorgerufen wird, da z.B. Nitroanilin als π -Akzeptor und die Calixaren-Cavity als π -Donor wirken kann (FRIEBE et al., 1995).

6.4.1 Nitroaniline

Abb. 27 zeigt die Chromatogramme der Nitroanilin-Trennungen an den [n]Aren- und RP 18-Phasen.

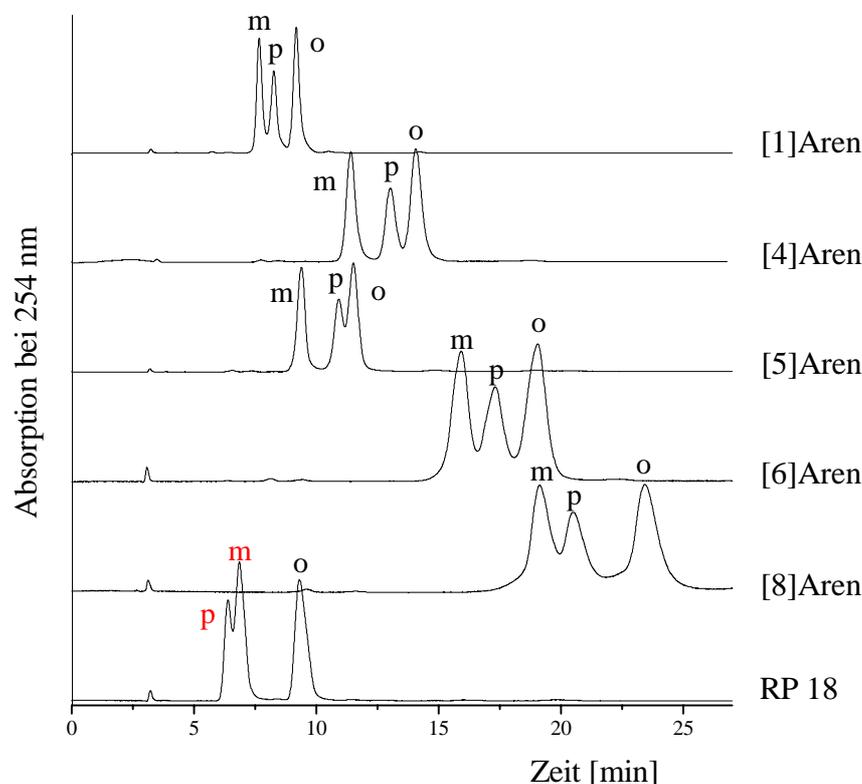


Abb. 27: HPLC von Nitroanilinen an [n]Aren und RP 18; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 /Methanol (60:40, v/v); Fluß: 1 mL/min

Die Isomere werden an allen [n]Aren-Phasen getrennt, wobei die besten Auflösungen an [4]Aren und [6]Aren erreicht werden (s. Tab 8). Unabhängig vom Bedeckungsgrad der [n]Aren-Phasen resultiert die Retentionsreihenfolge: $m < p < o$. Interessanterweise weist die [8]Aren-Phase mit der kleinsten Oberflächenbedeckung die größten Retentionsfaktoren auf. XU et al. (1998) berichten unabhängig von diesen Ergebnissen über die gleiche Reihenfolge. Im Gegensatz dazu resultieren für RP 18- und β -CD-Phasen (s. Anhang: FRIEBE et al. 1995) unterschiedliche Reihenfolgen (RP 18: $p < m < o$; β -CD: $p < m < o$).

Die veränderte Retentionsreihenfolge an den [n]Aren-Phasen deutet auf einen Trennmechanismus hin, der möglicherweise auf π -Donor- π -Akzeptor-Wechselwirkungen aufgrund des (+)I-Effekts der *tert*-Butylgruppen der Calixarene und des (-)I-Effekts der Nitrogruppe des Nitroanilins beruht und zur Bildung von Einschlußkomplexen, insbesondere Charge-transfer-Komplexen, führt (FRIEBE et al., 1995). Ein weiterer Zusammenhang scheint zwischen den pK_a -Werten der Nitroaniline zu bestehen, da die

Acidität der Isomere (m (2,45) > p (0,98) > o (-0,28)) mit der Elutionsreihenfolge übereinstimmt. Das bedeutet, daß o -Nitroanilin mit der geringsten Säurekonstante die stärksten Wechselwirkungen mit den Calixarenen eingeht und nach m - und p -Nitroanilin eluiert wird.

Tab. 8: Chromatographische Parameter für o -, m -, p -Nitroanilin nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase; mobile Phase: s. Abb. 27

Parameter	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren	RP 18
k_m	1,29	2,28	1,99	4,28	4,14	1,15
k_p	1,46	2,58	2,46	4,76	4,50	1,00
k_o	1,74	3,06	2,65	5,33	5,28	1,93
$\alpha_{p/m}$	1,13	1,13	1,24	1,11	1,09	1,15 ^a
$\alpha_{o/p}$	1,19	1,19	1,08	1,12	1,17	1,68 ^b
$R_S m/p$	1,25	1,40	2,10	1,00	0,80	0,60 ^c
$R_S p/o$	1,60	1,90	0,60	1,10	1,64	2,80 ^d
$R_S m/o$	3,30	3,35	2,75	2,15	2,55	3,80 ^e
N_m	5114	4659	3191	2271	2426	936
N_p	4447	3462	3153	1981	2125	1447
N_o	5520	4001	2820	2393	2773	1745

^a $\alpha_{p/m}$ entspricht bei RP 18 $\alpha_{m/p}$; ^b $\alpha_{o/p}$ entspricht bei RP 18 $\alpha_{o/m}$; ^c $R_S m/p$ entspricht $R_S p/m$; ^d $R_S p/o$ entspricht $R_S m/o$; ^e $R_S m/o$ entspricht $R_S p/o$

Tab. 8 zeigt, daß die Retentionsfaktoren mit größer werdendem Hohlraum der Calixarene zunehmen. Für [6]Aren und [8]Aren ergeben sich die längsten Retentionen. Die [5]Aren-Phase weist ein abweichendes Trennverhalten auf, welches offenbar mit der *cone-in*-Konformation des Calix[5]arens im Zusammenhang stehen kann (STEWART et al., 1995; BARRETT et al., 1993). Die Kontaktfläche des hydrophoben Hohlrums geht dabei verloren, wodurch keine Wechselwirkung zwischen der Cavität und den zu trennenden Molekülen möglich ist (s. Abschnitt 2.2.2). Die hohe Selektivität der [4]Aren-Phase scheint mit der geeigneten Größe des Makrocyclus im Zusammenhang zu stehen, was aus Röntgen-Untersuchungen von Calix[4]arenen mit aromatischen Gastmolekülen folgt (GUTSCHE, 1989).

Die HPLC an der [1]Aren-Phase zeigt gegenüber Nitroanilinen ein selektives Trennverhalten, deren Ursache ebenfalls Charge-transfer-Komplexe sein können.

6.4.2 Dihydroxybenzene

Die Abb. 28 zeigt die Trennprofile der Dihydroxybenzen-Isomere an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase. Die chromatographischen Parameter der Trennungen sind in Tab. 9 dargestellt.

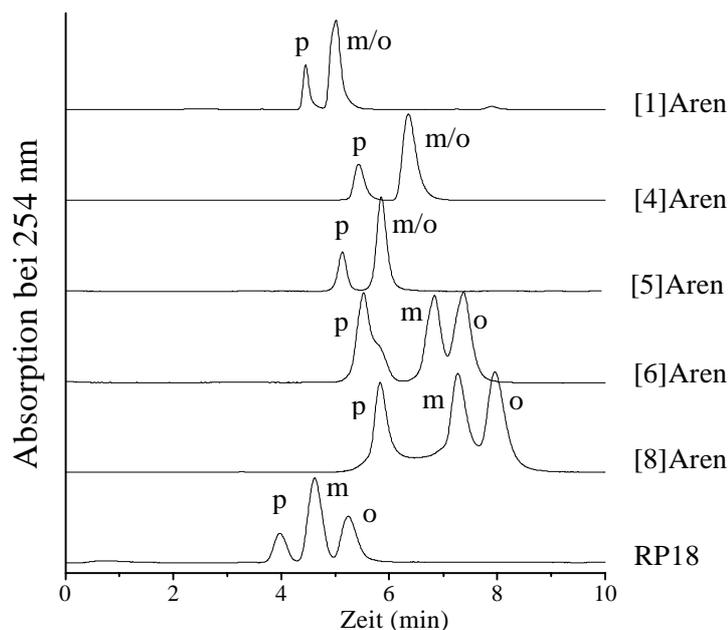


Abb. 28: HPLC von Dihydroxybenzenen an [n]Aren und RP 18; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 /Methanol (70:30, v/v); Fluß: 1 mL/min

Tab. 9: Chromatographische Parameter für *o*-, *m*-, *p*-Dihydroxybenzenen nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase; mobile Phase: s. Abb. 28

Parameter	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren	RP 18
k_p	0,80	0,53	0,49	0,72	0,81	0,21
k_m	1,03	0,79	0,70	1,14	1,25	0,41
k_o	1,03	0,79	0,70	1,30	1,46	0,60
$\alpha_{m/p}$	1,29	1,49	1,43	1,58	1,54	1,95
$\alpha_{o/m}$	1,00	1,00	1,00	1,14	1,17	1,46
$R_S\ p/m$	2,00	2,20	2,20	2,60	2,70	1,35
$R_S\ m/o$	0,00	0,00	0,00	0,95	1,10	1,20
$R_S\ p/o$	2,00	2,20	2,20	3,20	3,65	2,45
N_p	7421	3431	4310	1469	2230	1225
N_m	2930	3118	5027	2606	2543	1388
N_o	2930	3118	5027	2612	2328	1318

Die Elutionsreihenfolge ist an allen untersuchten Stationärphasen gleich ($p < m < o$). Mit wachsender Ringgröße der Calixarene nehmen die Retentionsfaktoren zu. Interessant ist, daß vollständige Auflösungen nur an [6]Aren und [8]Aren möglich sind. Durch Solvataion der OH-Gruppen wird die Oberfläche der Dihydroxybenzene vergrößert, so daß nur [6]Aren und [8]Aren aufgrund von Einschlußkomplexbildung zur selektiven Trennung fähig sind.

In Analogie zur polaren Natur der Dihydroxybenzene ist die Retention gering, was offensichtlich auf solvophobe Effekte zurückgeführt werden kann.

6.4.3 Kresole und andere disubstituierte Aromaten

Die HPLC disubstituierter aromatischer Verbindungen, wie Kresol, Xylen, Toluidin, Chlor- und Nitrophenol sowie α - und β -Naphthol, zeigen, daß Trennungen der m - und p -Isomere nicht möglich sind (Tab. 10). Interessant ist, daß die Elutionsreihenfolge der untersuchten Substanzen (mit Ausnahme der Kresole) an den [n]Aren-Phasen gleich ist, was auf einen einheitliche Trennmechanismus zurückgeführt werden kann. Im Gegensatz dazu werden unterschiedliche Retentionsreihenfolgen an der RP 18-Phase festgestellt.

Tab. 10: Retentionsreihenfolgen ausgewählter, disubstituierter aromatischer Verbindungen nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase

Analyt	Elutionsreihenfolge		mobile Phase
	[n]Aren	RP 18	
Kresol	$m = p < o^a$	$m = p = o$	0,02 M NaH ₂ PO ₄ (pH 3,5)/Methanol (70:30, v/v)
Xylen	$o < m = p$	n. b.	0,02 M NaH ₂ PO ₄ (pH 5,0)/Methanol (50:50, v/v)
Toluidin	$o < m = p$	$p < m = o$	s. Xylen
Chlorphenol	$o < m = p$	$o < p \approx m$	s. Xylen
Nitrophenol	$o < m = p$	$m = p < o$	s. Xylen
Naphthol	$\beta < \alpha$	$\beta < \alpha$	s. Xylen

^a nur für [6]- und [8]Aren gültig, für n = 4: $m = p = o$; n. b.: nicht bestimmbar, da die Retentionszeiten zu lang waren

Die Basislinientrennungen von α - und β -Naphthol sind sowohl an [n]Aren als auch RP 18 möglich. Bei gleicher Retentionsreihenfolge ($\beta < \alpha$) sind die Retentionsfaktoren an [6]Aren und [8]Aren jedoch bedeutend größer als an der RP 18-Phase, was möglicherweise durch Einschlußkomplexe mit starken π - π -Wechselwirkungen verursacht wird.

6.4.4 Uracil und methylierte Uracil-Derivate

Die HPLC von Nukleinsäurekomponenten nimmt aufgrund ihrer fundamentalen biologischen Bedeutung einen zentralen Platz bei der Isolierung und Quantifizierung aus biologischen Flüssigkeiten (wie z.B. Harn, Blutserum und Blutplasma), Zellen und Geweben ein (SIMPSON and BROWN, 1986).

Zudem stellen Nukleobasen, Nukleoside und Nukleotide geeignete Modellverbindungen dar, deren Strukturen Zugang für verschiedene Trennfunktionen, wie z.B.

Reversed-Phase, Adsorption, Ionenaustausch oder Einschlußkomplexbildung, erlauben (KRAUSS, 1987). Die Mehrzahl der HPLC-Trennungen von Nukleinsäurekomponenten wird an RP-Materialien, insbesondere RP 18-Phasen, vorgenommen (BROWN, 1984). Zudem finden auch Ligandenaustausch-, Anionenaustausch- und Boronat-Affinitäts-HPLC ihren Einsatz. Untersuchungen an β -CD-Phasen zeigten, daß Trennung von Nucleobasen und Nucleosiden möglich sind (KRAUSS, 1987). Erste Untersuchungen an Calix[4]aren-Phasen lieferten erfolgreiche Trennungen von Nucleobasen und Nucleosiden (GEBAUER, 1993; FRIEBE et al., 1995). XU et al. (1998) berichten über erfolgreiche Trennungen der Nucleoside Uridin, Thymidin und Adenosin an ihrer Calix[6]aren-Phase.

Ziel der HPLC-Untersuchungen an den Calix[n]aren-Phasen war es, ausgewählte, strukturell sehr ähnliche Pyrimidin-Abkömmlinge (Abb. 29) selektiv zu trennen, wobei 3-Methyluracil und 6-Methyluracil keine natürlichen Nucleobasen darstellen.

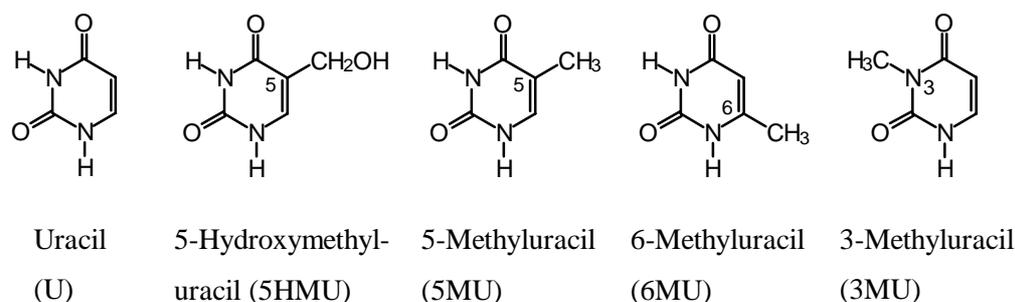


Abb. 29: Strukturen ausgewählter Uracil-Derivate

Als Referenzphasen wurden RP 18- und CD-Phasen (α , β , γ) verwendet. Abb. 30 und 31 zeigen die Trennprofile an den [n]Aren-Phasen ($n = 1, 4, 5, 6, 8$), den CD-Phasen (α , β , γ) und der RP 18-Phase. Die Analyse der Retentionsreihenfolge an den [n]Aren-Phasen zeigt, daß die Retention durch die Hydrophobie der Pyrimidin-Derivate bestimmt wird. Interessant ist das Trennverhalten von 5-Methyluracil (5MU) und 6-Methyluracil (6MU), die nur einen strukturellen Unterschied in der Position der Methylgruppe aufweisen. Im Gegensatz zu den CD-Phasen und der RP 18-Phase werden die methylierten Uracil-Derivate nur an den [n]Aren-Phasen getrennt (Abb. 30).

Während die Elutionsreihenfolgen an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase identisch sind ($5HMU < U < 5MU < 6MU < 3MU$), weisen die CD-Phasen eine andere Reihenfolge auf ($5HMU < U < 3MU < 5MU \approx 6MU$), da offensichtlich andere Trennfunktionen zugrunde liegen.

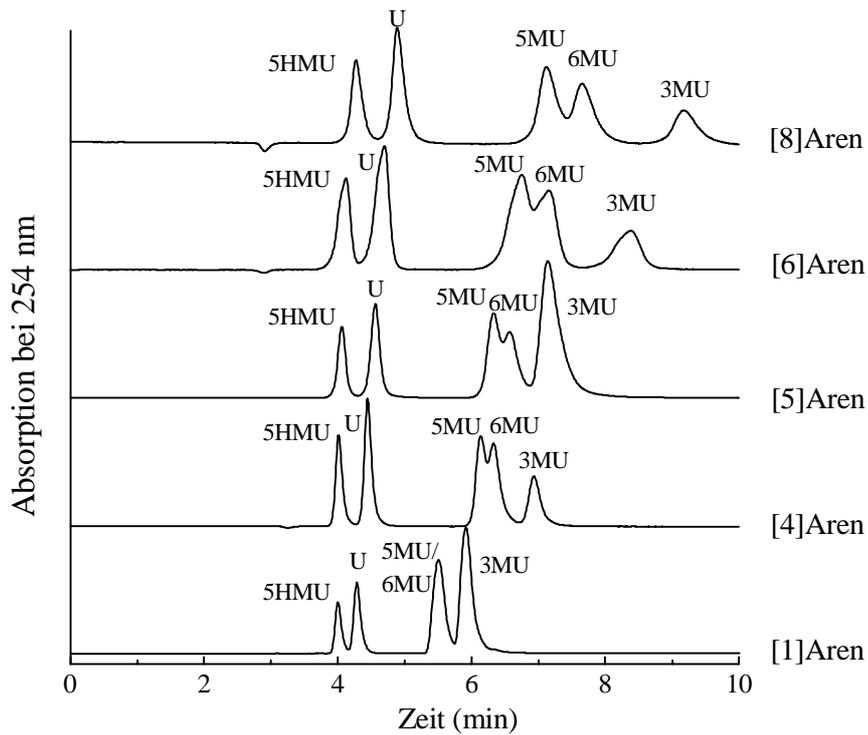


Abb. 30: HPLC von Uracil und methylierten Uracil-Derivaten an [n]Aren; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 (pH 3,0); Fluß: 1 mL/min

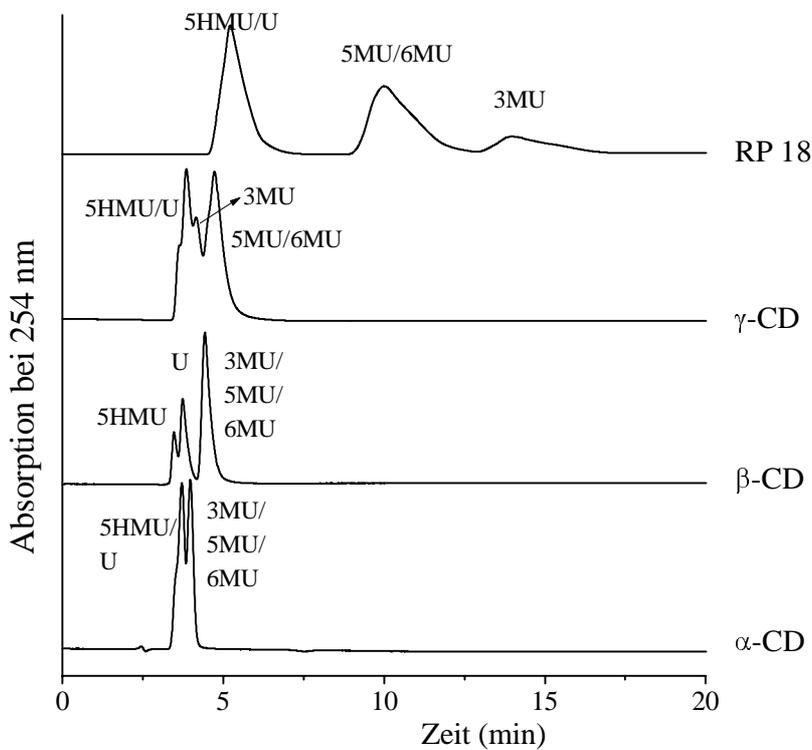


Abb. 31: HPLC von Uracil und methylierten Uracil-Derivaten an RP 18- und α -, β -, γ -CD-Phasen; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 (pH 3,0); Fluß: 1 mL/min

Wie Tab. 11 zeigt, wird mit zunehmender Ringgröße der Calixarene sowohl eine Zunahme der Retentionsfaktoren als auch eine erhöhte Auflösung erreicht. Dabei besitzt vor allem die [8]Aren-Phase eine hohe Selektivität für die Trennung des Isomerenpaares 5MU und 6MU und ist somit besonders geeignet für die HPLC von Uracil-Verbindungen. Im Gegensatz dazu konnten bei Untersuchungen an Ligandenaustausch-Materialien, insbesondere 8-Hydroxychinolin-Kieselgel, 5MU von 6MU nicht getrennt werden (KRAUSS, 1987), was die Leistungsfähigkeit der [8]Aren-Phase unterstreicht.

Tab. 11: Chromatographische Parameter für 5MU und 6MU nach HPLC an den [n]Aren-Phasen; mobile Phase: s. Abb. 30

Parameter	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren
k_{5MU}	0,78	0,89	1,07	1,32	1,45
k_{6MU}	0,78	0,95	1,15	1,46	1,64
$\alpha\alpha$	1,00	1,07	1,07	1,11	1,13
R_S	0	0,45	0,60	0,55	1,00

Der Trennmechanismus der Uracilverbindungen an den Aren-Phasen hängt sowohl von der Hydrophobie der zu trennenden Moleküle als auch von der Ringgröße der Calixarene ab.

6.5 HPLC von Lipiden

Die Applikationen zur HPLC von Lipiden sind in Zusammenarbeit mit Prof. J. LASCH (Institut für Physiologische Chemie, MLU Halle-Wittenberg) entstanden und waren eingebettet in die Untersuchungen zur Isolierung von Ceramiden aus Extrakten der menschlichen Hornhaut der Fußsohle mittels Säulenchromatographie und präparativer HPLC (GILDENAST und LASCH, 1997). Es sollte überprüft werden, ob Calixaren-Kieselgele selektive Packungsmaterialien für präparative Trennungen von Ceramiden sein könnten, da herkömmliche präparative HPLC-Materialien in ihrer Leistungsfähigkeit zum einen aufgrund ihrer grobkörnigen Beschaffenheit im Vergleich zu analytischen Materialien und zum anderen infolge der chemischen Natur dieser Kieselgele limitiert sind. Ferner sollte durch Verwendung kleinerer Partikel und regelmäßiger Packung eine Verbesserung der Auflösung erreicht werden. Anhand der analytischen Calixaren-Phasen war zu zeigen, ob eine Anwendung im präparativen Bereich möglich ist.

Ceramide (N-Acyl-sphingoide) sind Derivate des langkettigen Aminoalkohols Sphinganin (D-erythro- oder (2S,3R)-2-Amino-octadecan-1,3-diol), die aufgrund unterschiedlich langer Kohlenwasserstoffketten sehr komplexe Lipide darstellen. Diese

sogenannten Sphingolipide enthalten Sphingoin als Grundkörper. Aufgrund der Erkenntnis, daß sie als Lipidvermittler bei Zellteilung, Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle spielen, sind sie in den letzten Jahren verstärkt in das Licht biochemischen und medizinischen Interesses gerückt. Sie sind extrem polare, membranbildende Lipide und wirken als Signalmoleküle.

Über das Vorhandensein von Ceramiden in der menschlichen Epidermis wurde erstmals von GRAY und YARDLEY (1975a, b) berichtet. DOWING et al. (1987) analysierten diese Lipide in zahlreichen tierischen Spezies und untersuchten ihre Funktion in der Haut. Ferner wurde die Zusammensetzung isolierter Ceramide in der menschlichen Hornhaut bestimmt (WERTZ et al., 1985; LONG et al., 1985). Man fand heraus, daß sie einen Anteil von bis zu 35 % der Lipide ausmachen können (LAMPE et al., 1983). Neben ihrer Funktion als Hautschutz sind sie aber auch für die wasserbindende Kapazität der Hornhaut verantwortlich (LONG et al., 1985). Aufgrund dessen finden Ceramide auch in Kosmetika Anwendung.

Für die folgenden HPLC-Untersuchungen an den Calixaren-Phasen wurde eine Mischung aus authentischen Referenzsubstanzen (Abb. 32) verwendet, die gewöhnlich in Extrakten der menschlichen Hornhaut der Fußsohle zu finden sind (2 % (w/w) Cholesterolsulfat, 20 % (w/w) freie Fettsäuren, 20 % (w/w) Ceramide, 43 % (w/w) unveresterte Sterole, 4 % (w/w) Triacylglycerol und 9 % (w/w) Sterolester (ZELLMER und LASCH, 1997)).

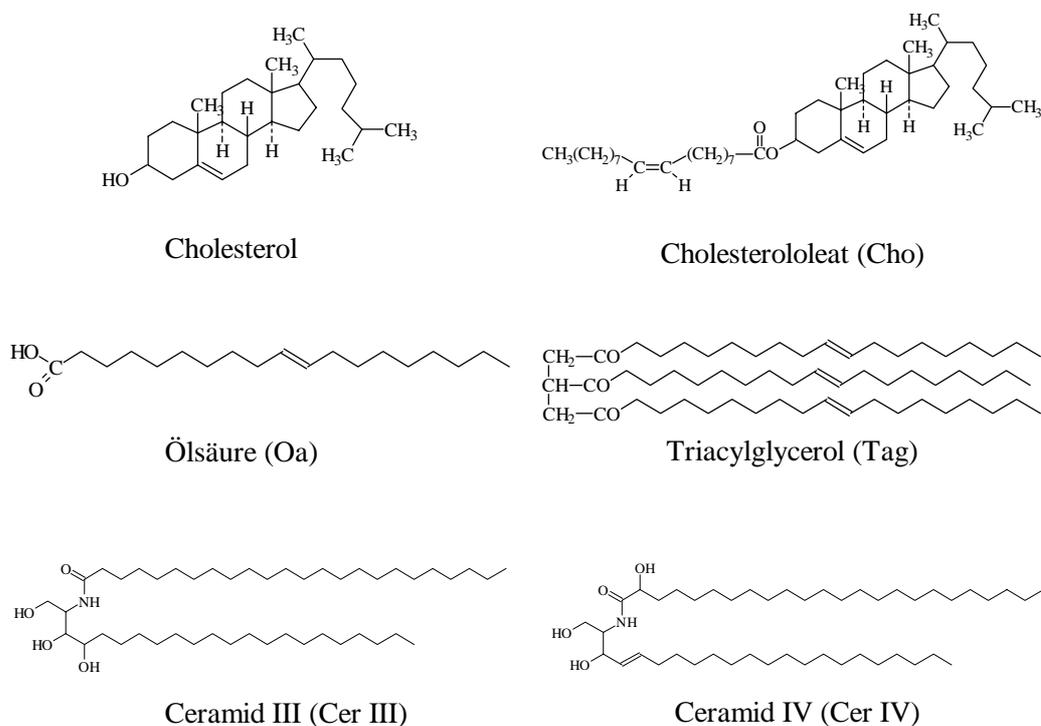


Abb. 32: Strukturen der untersuchten Lipide

Zur Detektion der Lipide wurde ein UV-Detektor, der die Absorption bei 215 nm überwachte, und ein Laser-Lichtstreuverdampfungsdetektor (ELSD) eingesetzt. Dabei wurden 15 % des Eluates dem ELSD zugeführt. Der ELSD hat sich bei der Trennung von Lipiden zur Detektionsmethode der Wahl entwickelt, da er als einziger Detektor eine stabile Basislinie und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Ein weiterer Vorteil ist die Eliminierung der Lösungsmittelfront, in der coeluiierende Peaks enthalten sein können.

Abb. 33 zeigt die Trennprofile der Referenzsubstanzen an den [n]Aren-Phasen und einer LiChrospher Si 60 Phase. Die Elutionsreihenfolge richtet sich in erster Linie nach den hydrophoben Eigenschaften der Lipide. Eine Trennung der Ceramide ist (mit von Ausnahme der [4]Aren) an den [n]Aren-Phasen möglich. Mit zunehmender Ringgröße der Calixarene nehmen die Kapazitätsfaktoren zu und die Auflösung wird verbessert (Tab. 12). Interessant ist, daß an der [6]Aren-Phase neben der größten Auflösung der Ceramide eine nahezu vollständige Trennung aller Substanzen erreicht wird. Im Vergleich dazu werden an Si 60-Phase Cholesterololeat (Cho) und Triacylglycerin (Tag) nicht getrennt, dagegen zeigt diese Phase die größte Auflösung der Ceramide. Die Elutionsreihenfolge ist an beiden Phasensystemen identisch.

Abb. 34 zeigt das Chromatogramm einer Realprobe an [6]Aren, da dieses Säulenmaterial die besten HPLC-Resultate liefert und für präparative Zwecke am geeignetsten zu sein scheint.

Die Lipid-Untersuchungen an Calixaren-Phasen zeigen, daß Trennungen der Ceramide von Lipiden der menschlichen Hornhaut unter analytischen Bedingungen möglich sind. Eine Übertragung auf präparative bzw. semipräparative Calixaren-HPLC-Stationärphasen sollte deshalb möglich sein und zu einer Optimierung des bisherigen Verfahrens zur Isolierung von Ceramide führen (GILDENAST und LASCH, 1997). Von Vorteil gegenüber herkömmlichen präparativen HPLC-Säulen ist weiterhin die Verwendung kleinerer Partikel und eine regelmäßige Packung des Säulenmaterials, die zu einer Erhöhung der Auflösung führen sollten. Damit eröffnen sich für Calixaren-Kieselgele erstmals praktische Anwendungen zur präparativen HPLC.

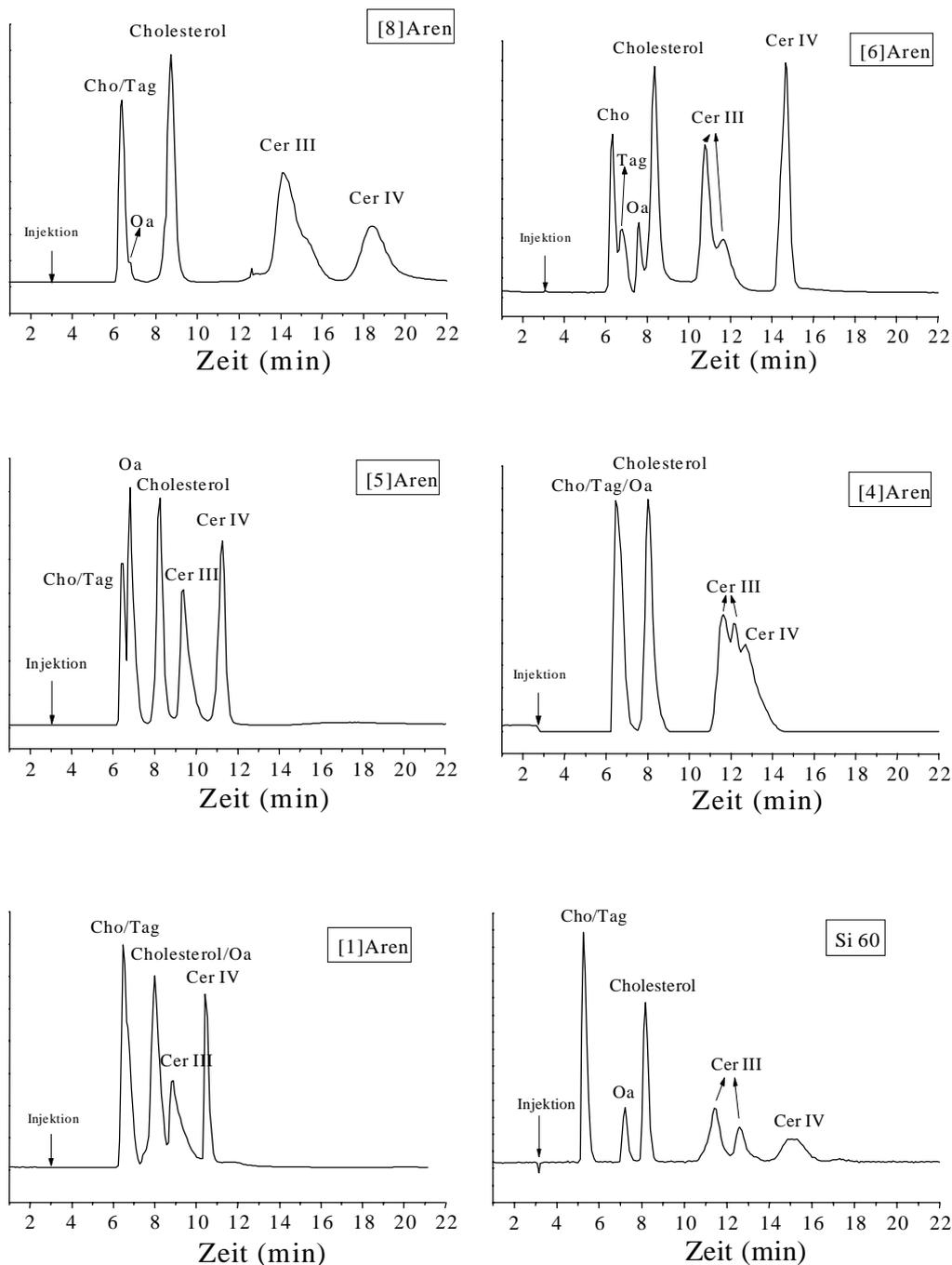


Abb. 33: HPLC von ausgewählten Lipiden an [n]Aren und Si 60; mobile Phase: n-Hexan/Ethanol (29:1); Fluß: 1 mL/min

Tab. 12: Chromatographische Parameter für Ceramide III und IV nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der Si 60 Phase; mobile Phase: s. Abb. 33

Parameter	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren	Si 60
k_{CerIII}	0,38	0,79 ^a /0,87 ^b	0,45	0,72 ^a /0,86 ^b	1,22	2,86 ^a /3,40 ^b
k_{CerIV}	0,63	0,95	0,74	1,34	1,89	4,57
$\alpha\alpha$	1,65	1,20 ^a /1,09 ^b	1,66	1,86 ^a /1,56 ^b	1,55	1,60 ^a /1,34 ^b
$R_{\text{SCerIV/CerIII}}$	2,30	-	2,60	4,80 ^a	2,00	2,40 ^a /1,70 ^b

^a bezieht sich auf den ersten Peak von Cer III, ^b bezieht sich auf den zweiten Peak von Cer III

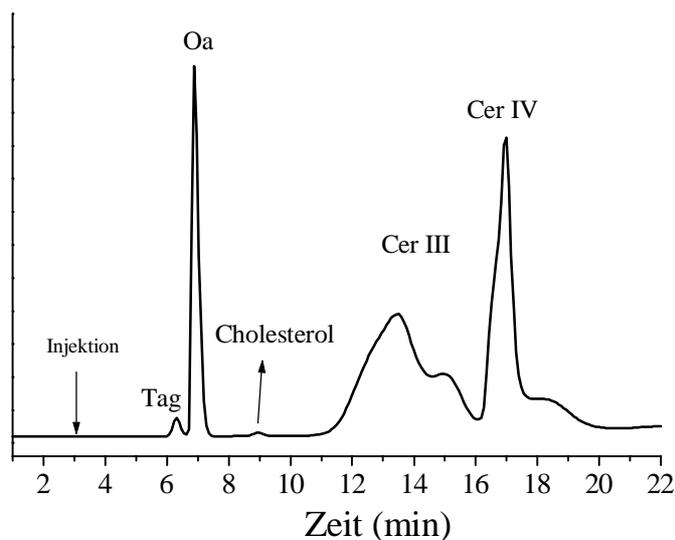


Abb. 34: HPLC eines Extrakts der menschlichen Hornhaut an [6]Aren; mobile Phase: n-Hexan/ Ethanol (29:1); Fluß: 1 mL/min

6.6 HPLC von Buckminsterfullerenen

Buckminsterfullerene, wie z.B. C_{60} und C_{70} , sind Käfigverbindungen aus durchkonjugierten Fünf- und Sechsringen. Sie können beispielsweise an der Oberfläche mit Nucleophilen reagieren oder aber im Hohlraum Metall-Ionen oder Edelgase aufnehmen (HIRSCH, 1994). Bislang ist die Herstellung hochreiner Fullerene im großen Maßstab sehr kostenaufwendig, wodurch sie sehr teuer sind. Wachsendes Interesse finden Fullerene vor allem auf dem Gebiet der Materialwissenschaften, der Supraleitfähigkeit und anderen verwandten Technologien. Deshalb ist die Entwicklung einer einfachen und weniger kostenintensiven Methode zur Isolierung und Reinigung von großer analytischer Bedeutung. Über verschiedene flüssigchromatographische Methoden zur Trennung von C_{60} und C_{70} wurde berichtet, wobei sich Pirkle- (WELCH und PIRKLE, 1992), Phenyl- (JINNO et al., 1992), Methoxyphenylpropyl- (JINNO et al., 1993a) und Octadecyl-Phasen (JINNO et al., 1993a) als geeignete Stationärphasen erwiesen haben. Jedoch erreichten die C_{60}/C_{70} -Trennungen nicht das Niveau, um Fullerene im großen Maßstab trennen zu können (JINNO et al., 1993b; SUZUKI et al., 1994).

Einen Durchbruch für eine weniger kostenintensive Reinigung und Isolierung der Buckminsterfullerene scheint der Einsatz makrocyclischer Wirtmoleküle zu sein (ATWOOD et al., 1998). Bei der Reinigung in organischen Lösungsmitteln erwiesen sich vor allem Calixarene als besonders geeignet (ATWOOD et al., 1994; SUZUKI et al.,

1994). Eine Vielzahl von Studien belegen das selektive Wirt-Gast-Verhalten von Calixarenen und Buckminsterfullerenen, wobei vor allem Calix[5]-, Calix[6]- und Calix[8]arene in der Lage sind, Einschlußkomplexe zu bilden (IKEDA et al., 1997; HAINO et al., 1997; ISAACS et al., 1997; LARA-OCHOA et al., 1996; SUZUKI et al., 1995, 1994).

Ziel der HPLC-Untersuchungen von Buckminsterfullerenen an Calixaren-Phasen ist die Entwicklung eines selektiven Trennverfahrens für C₆₀- und C₇₀-Fullerene, das möglicherweise eine einfache und schnelle Reinigung im großen Maßstab und im Hinblick auf ökonomische Aspekte erlaubt. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Calixaren-Kieselgele, [n]Aren Si 100 und [n]Aren Si 300, eingesetzt, um die Trennungen in Abhängigkeit von der Ringgröße der Calixarene und der Porenweite des Kieselgels zu optimieren.

Es wurde ein Fulleregemisch aus 72 wt% C₆₀, 13 wt% C₇₀ und 15 wt% anderen Fullerenen verwendet.

6.6.1 C₆₀/C₇₀-Trennungen an [n]Aren Si 100

Abb. 35 zeigt die Trennprofile der C₆₀/C₇₀-Trennungen an den [n]Aren Si 100 Phasen. Basislinientrennungen sind nur an [6]Aren und [8]Aren möglich, wobei C₆₀ vor C₇₀ eluiert wird. Aufgrund der Retentionsreihenfolge wird deutlich, daß die Trennungen primär von hydrophoben Wechselwirkungen abhängig sind. Die zunehmenden Retentionsfaktoren und die verbesserte Auflösung mit wachsender Ringgröße der Calixarene lassen jedoch vermuten (Tab. 13), daß, insbesondere bei den Trennungen an den [6]Aren und [8]Aren-Phasen, die Bildung von Einschlußkomplexen als selektive Trennfunktion an der HPLC der Fullerene beteiligt ist. In Übereinstimmung zu Komplexbildungsstudien von Fullerenen und Calixarenen in Lösung (IKEDA et al., 1997) scheinen π - π -Wechselwirkungen (einschließlich Charge-transfer-Wechselwirkungen) und/oder solvophobe Effekte die treibenden Kräfte zu sein.

Bemerkenswert sind die symmetrischen Peakformen und die hohe Auflösung im Elutionsprofil der [8]Aren-Phase, wodurch sich diese Phase besonders zur Trennung von C₆₀/C₇₀-Fullerenen eignet. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit des Calix[8]aren-Kieselgels kann daher ein Einsatz zur präparativen Reinigung von C₆₀/C₇₀-Fullerenen empfohlen werden.

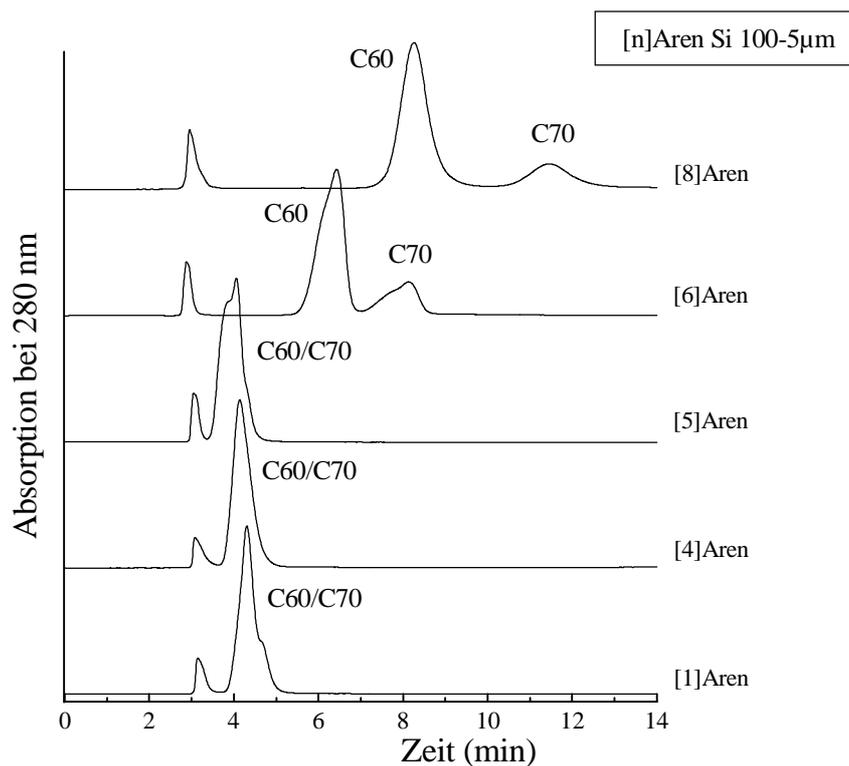


Abb. 35: HPLC von C₆₀ und C₇₀ Buckminsterfullerenen an [n]Aren Si 100; mobile Phase: Methanol/Toluol (60:40, v/v); Fluß: 1mL/min

Tab. 13: Chromatographische Parameter für C₆₀ und C₇₀ Buckminsterfullerene nach HPLC an den [n]Aren Si 100 Phasen; mobile Phase: s. Abb. 35

Parameter	[1]Aren	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren
$k_{C_{60}}$	0,35	0,33	0,33	1,22	1,84
$k_{C_{70}}$	0,35	0,33	0,33	1,86	2,92
$\alpha\alpha$	0	0	0	1,52	1,57
R_s	0	0	0	1,60	2,10

6.6.2 C₆₀/C₇₀-Trennungen an [n]Aren Si 300

Die Chromatogramme der Fullerenentrennungen an den [n]Aren Si 300 Kieselgelen sind in Abb. 36 dargestellt³. Es wurde die gleiche Retentionsreihenfolge wie bei den Trennungen an [n]Aren Si 100 festgestellt. Eine selektive Trennung von C₆₀ und C₇₀ erfolgt nur an der [8]Aren-Phase, wobei im Vergleich zur [8]Aren Si 100 Phase die Auflösung geringer wird (s. Tab. 13 und 14). Breite Peakformen sind für die anderen [n]Aren Si 300 Phasen charakteristisch.

³ Eine [1]Aren Si 300 Phase wurde nicht hergestellt.

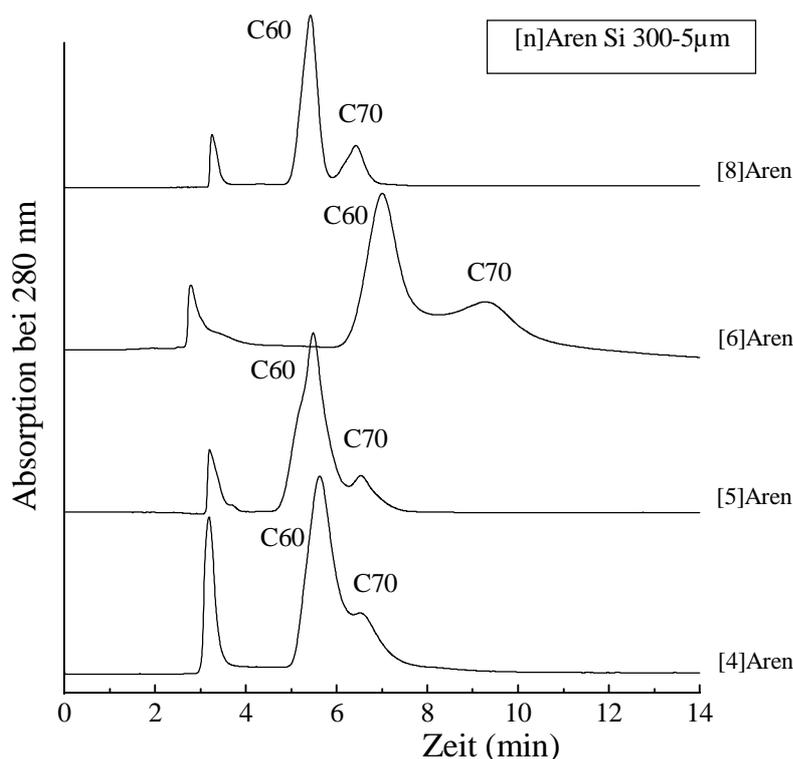


Abb. 36: HPLC von C₆₀ und C₇₀ Buckminsterfullerenen an [n]Aren Si 300; mobile Phase: Methanol/Toluol (60:40, v/v); Fluß: 1mL/min

Tab. 14: Chromatographische Parameter für C₆₀ und C₇₀ Buckminsterfullerene nach HPLC an den [n]Aren Si 300 Phasen; mobile Phase: s. Abb. 36

Parameter	[4]Aren	[5]Aren	[6]Aren	[8]Aren
$k_{C_{60}}$	0,78	0,73	1,50	0,68
$k_{C_{70}}$	1,06	1,06	2,30	1,00
$\alpha\alpha$	1,36	1,45	1,53	1,47
R_s	0,65	0,90	0,95	1,35

Die [n]Aren Si 300 Kieselgele zeigen einen hydrophoberen Charakter als die [n]Aren Si 100 Kieselgele, der mit der größeren Oberflächenkonzentration korreliert (s. Tab. 3). Aus den Trennprofilen wird deutlich, daß die Retention der Fullerene auch von der Porenweite der Kieselgele abhängig ist, da die Peak-Auflösungen an [4]Aren und [5]Aren verbessert werden konnte. Anhand der Peakformen ist jedoch zu erkennen, daß die Wechselwirkungen wenig spezifisch sind und nicht das Niveau der Trennung an der [8]Aren Si 100 Phase erreichen (Abb. 35).

Der chromatographische Einsatz der [n]Aren Si 300 Kieselgele zur Reinigung von Buckminsterfullerenen kann daher nicht empfohlen werden.

6.7 Zusammenfassung der HPLC-Ergebnisse

1. Die Applikationen der Calixaren-Phasen liefern Beiträge zur HPLC von Strukturisomeren aus unterschiedlichen Substanzklassen und zeigen die Einsatzbreite bei Trennproblemen aus verschiedenen Gebieten der Analytik. Es wurde das Elutionsverhalten von folgenden Verbindungen untersucht:
 - *cis/trans*-Isomere prolinhaltiger Dipeptide des Typs L-Xaa-L-Pro (Xaa = Ala, Ile, Phe),
 - 17 α - und 17 β -Östradiol,
 - disubstituierte aromatische Verbindungen (wie Nitroanilin, Dihydroxybenzen, Kresol, Naphthol und andere),
 - methylierte Uracilverbindungen,
 - Lipide und
 - Buckminsterfullerene.
2. Die Nutzung vielfältiger Strukturisomere liefert ein stereoselektives Verhalten der Calixaren-Phasen in Abhängigkeit von der Größe der makrocyclischen Ringstruktur. Beispielsweise weist die [4]Aren-Phase die größte Selektivität gegenüber *o*-, *m*-, *p*-Nitroanilinen auf. [6]Aren eignet sich vor allem für die HPLC des Dipeptides Ala-Pro, der Östradiol-Epimere, der *o*-, *m*-, *p*-Dihydroxybenzene sowie von Cholesterol und Ceramiden. Die [8]Aren-Phase zeigt selektive Trenneigenschaften für die Separation von Ile-Pro, Phe-Pro, den *o*-, *m*-, *p*-Dihydroxybenzenen, 5-Methyl- und 6-Methyluracil sowie Buckminsterfullerenen (C₆₀ und C₇₀). Die [5]Aren-Phase zeigt dagegen eine begrenzte Anwendbarkeit, was offensichtlich auf konformative Eigenschaften des Calix[5]arens, d.h. die Abwesenheit einer schüsselförmigen *cone*-Konformation des *p-tert*-Butylcalix[5]aren-Derivates, zurückzuführen ist (s. Abschnitt 2.2.2).
3. Anhand der Vergleiche der Elutionsprofile, der Retentionsfaktoren und der Peak-Auflösungen an den Calixaren- und den Referenzphasen ([1]Aren, RP 18 und CD) wird deutlich, daß der Trennmechanismus der Calixaren-Phasen primär von hydrophoben Wechselwirkungen bestimmt wird. Sekundär scheinen selektive Trenneigenschaften von der Ringgröße der Calixarene abhängig zu sein, wodurch die Bildung von Einschlußkomplexen als Trennfunktion diskutiert wird. Folgende treibende Kräfte, die die Einschlußkomplexbildung forcieren, lassen sich aus den chromatographischen Untersuchungen ableiten:
 - hydrophobe und π - π -Wechselwirkungen (einschließlich Charge-transfer-Komplexe),
 - solvophobe Effekte,

- elektrostatische Wechselwirkungen (durch MD-Simulationen bekräftigt,)
- induced fits der Cavitäten der Calix[6]- und Calix[8]arene an die Form der zu untersuchten Moleküle.

Im allgemeinen wird eine von der Oberflächenkonzentration der Calixaren-Kieselgele unabhängige Retention beobachtet (mit Ausnahme der [n]Aren Si 300 Kieselgele).

4. Durch den Einsatz verschiedener kationenhaltiger Phosphat-Lösungen kann die Selektivität der Trennungen an den Calixaren-Phasen optimiert werden, da offenbar auch unter chromatographischen Bedingungen eine Präorganisation der makrocyclischen Ringstruktur durch eine geeignete Kationenkomplexierung der ionischen Bindungsstelle am unteren Rand erfolgen kann. Während sich für die [4]Aren-Phase die Verwendung von Na^+ -haltigen Lösungen empfiehlt, eignen sich für die HPLC an den [5]-, [6]- und [8]Aren-Phasen NH_4^+ -haltige Lösungen. Für [6]Aren wird insbesondere der Einsatz Cs^+ -haltiger Lösungen vorgeschlagen, der zur Erhöhung der Trenneffizienz führen sollte.
5. Durch Re-Chromatographie und ^1H -NMR-Spektroskopie des Dipeptides Phe-Pro konnte die Existenz sowie die Retentionsreihenfolge der Isomere prolinhaltiger Dipeptide bestätigt werden: *trans* < *cis*.
6. Eine Übertragung der HPLC von Cholesterol und Ceramiden sollte im präparativen und semipräparativen Maßstab an einer Calix[6]aren-Phase möglich sein und zu einer Verbesserung der bisher verwendeten Methode führen. Zudem wird der Einsatz einer präparativen Calix[8]aren-Phase zur Reinigung von $\text{C}_{60}/\text{C}_{70}$ empfohlen.
7. Die hier vorgestellten Applikationen zeigen, daß Calixaren-Stationärphasen sowohl im RP- als auch im Normalphasenmodus (HPLC von Lipiden) eingesetzt werden können und damit für ein breites Spektrum trennanalytischer Probleme genutzt werden können.

7 Moleküldynamik-Simulationen von Calix[n]arenen (n = 4, 5, 6) mit Dipeptiden des Typs L-Xaa-L-Pro (Xaa = Ala, Ile, Pro)

7.1 Überblick

Die Moleküldynamik-Simulationen (MD) sollen zum Verständnis und zur Interpretation der experimentellen Befunde in der HPLC hinsichtlich möglicher Wirt-Gast-Wechselwirkungen von Calixarenen mit *cis/trans*-Isomeren prolinhaltiger Dipeptide (L-Xaa-L-Pro, Xaa = Ala, Ile und Phe) beitragen. Einführend werden im Abschnitt 7.2 Grundlagen der MD-Simulationen und das Amber-Kraftfeld kurz vorgestellt. Abschnitt 7.3 beinhaltet die Vorgehensweise beim Aufbau der Komplexe von *p-tert*-Butylcalix[n]aren (n = 4, 5, 6) und den L-Xaa-L-Pro-Dipeptiden sowie die Ergebnisse der MD-Simulationen. Eine Zusammenfassung wird in Abschnitt 7.4 gegeben.

7.2 Grundlagen der Moleküldynamik-Simulationen

Im Gegensatz zu zeitunabhängigen molekülmechanischen Berechnungen ist es mit MD-Simulationen möglich, nicht nur die potentielle, sondern auch die kinetische Energie der Moleküle und des umgebenden Mediums zeitabhängig zu untersuchen. Die Zeitdauer einer Simulation wird durch die Rechenzeit begrenzt, die von der Rechnerleistung, der Komplexität des Systems und dem verwendeten Medium (Simulation in der Gasphase oder in einem Lösungsmittel) abhängt, und liegt üblicherweise im Bereich von Femtosekunden (10^{-15} s) bis einigen Nanosekunden (10^{-9} s). Ausgehend von den Gesetzen der klassischen Mechanik werden die Trajektorien (Konfigurationen des Molekülensembles als Funktion der Zeit) aus den numerischen Lösungen der Newtonschen Bewegungsgleichungen für das Molekülensemble bestimmt. Aus den Trajektorien lassen sich makroskopische Eigenschaften berechnen und ableiten. Die Wahl des Kraftfeld-Modells, in dem sich das Molekülensemble befindet, wird durch den zu modellierenden experimentellen Vorgang - hier mögliche Einschlußkomplexbildungen von *p-tert*-Butylcalix[n]arenen (n = 4, 5 und 6) mit prolinhaltigen Dipeptiden - bestimmt. Zu weiteren Einzelheiten über MD-Simulationen sei auf einen Übersichtsartikel von van GUNSTEREN and BERENDSEN (1990) verwiesen.

Kraftfeldprogramme beschreiben Moleküle und Atome als Massepunkte, die durch Federn zusammen gehalten werden. Man geht von „natürlichen“ Bindungslängen, Bindungswinkeln und Torsionswinkeln (empirische Parameter) aus. Die Struktur der Moleküle wird so deformiert, daß die Summe all dieser Spannungsenergien minimal und in möglichst vielen kleinen Komponenten auf das Molekül verteilt ist. Für die Berechnung dieser sogenannten Straffunktion wird das Kraftfeld eines Moleküls in eine Summe von Molekülkräften zerlegt, wobei die Molekülkräfte über die klassische Mechanik beschrieben werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten MD-Simulationen wurde das Kraftfeld AMBER 4.1 verwendet (PEARLMAN et al., 1995). Dieses Kraftfeld wurde vor allem für Biomoleküle wie Proteine und Nukleinsäuren entwickelt (WEINER and KOLLMAN, 1981) und konnte inzwischen auch erfolgreich zur Beschreibung der Rezeptoreigenschaften synthetischer Wirtmoleküle wie Calixarene (MIYAMOTO and KOLLMAN, 1992; MUZET et al., 1996; BOTTA et al., 1997; THONDORF et al., 1994; THUÉRY et al., 1997), Cyclodextrine (LIPKOWITZ et al., 1997) und andere Rezeptoren (COSTANTE-CRASSOUS et al., 1997; PIETERS et al., 1997) angewandt.

Die Potentialenergiefunktion des Amber-Kraftfeldes setzt sich aus der Summe von Spannungsenergien und nichtbindender Wechselwirkungen zusammen (WEINER et al., 1984):

$$E_{\text{total}} = \sum_{\text{Bindungslängen}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{Bindungswinkel}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{Torsionswinkel}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Gl. 9

Die ersten drei Terme stellen den Energieunterschied zwischen einer Geometrie, bei der die Bindungslängen, die Bindungs- und Torsionswinkel ideale Werte annehmen, und einer aktuellen Geometrie dar. Der vierte Term steht für nichtbindende van-der-Waals (vdW) und elektrostatische Wechselwirkungen. Während die bindenden Parameter (Bindungslängen, Bindungs- und Torsionswinkel) relativ einfach aus spektroskopischen Strukturdaten bzw. einem linearen Interpolationsmodell ermittelt wurden und gut zu beschreiben sind, ist die Wahl der nichtbindenden Parameter ein kritischer Punkt bei der Optimierung von Kraftfeldern (WEINER et al., 1984). Die Verwendung von

Gitterenergien und Kristallstrukturdaten allein ist nicht ausreichend und führt zu signifikanten Unterschieden der van-der-Waals-Radien R und der Potentialtiefe der van-der-Waals-Energie ϵ . Erst durch den Einsatz eines empirischen Skalierungsfaktors konnten vertretbare Ergebnisse erhalten werden. Aus einem numerischen Fit quantenmechanisch berechneter elektrostatischer Potentiale wurden die Atomladungen bestimmt.

Die Optimierung der nichtbindenden Parameter im Amber-Kraftfeld führte zu einem leistungsfähigen Kraftfeld, das den realen Verhältnissen sehr nahekommt und Simulationen von Wirt-Gast-Komplexen erlaubt.

7.3 Komplexierung mit *cis/trans*-Isomeren prolinhaltiger Dipeptide

In diesem Abschnitt werden die Wechselwirkungen von *p-tert*-Butylcalix[n]arenen ($n = 4, 5, 6$) mit *cis/trans*-Isomeren prolinhaltiger Dipeptide des Typs L-Xaa-L-Pro (Xaa = Ala, Ile und Phe) während einer MD-Simulation in einer Wasserbox beschrieben. Zur Vereinfachung der Schreibweise wird im folgenden die Bezeichnung der L-Konfiguration der Peptide weggelassen, da es sich bei den Dipeptiden ausschließlich um die L-Isomere handelt.

Zum Aufbau der Startstrukturen wurden Röntgenkristallstrukturen der *p-tert*-Butylcalix[n]arene ($n = 4, 5, 6$) aus der Cambridge Struktur-Datenbank (ALLEN et al., 1991) verwendet. Aufgrund der hohen Flexibilität des *p-tert*-Butylcalix[8]arens konnten die Berechnungen dieser Komplexe nicht durchgeführt werden, da die Vielfalt der konformativen Anordnungsmöglichkeiten der aromatischen Einheiten des Calix[8]arens zur Zeit keine realistischen Simulationen mit Standardverfahren zuläßt.

Für die Modellberechnungen wurden folgende Vereinfachungen und Voraussetzungen festgelegt:

- als Rezeptoren wurden die Methoxycarbonylmethyl-Derivate der *p-tert*-Butylcalix[n]arene verwendet,
- als Startstrukturen der Calix[n]arene wurden die *cone*- (bei $n = 4, 5$) bzw. eine *winged*-Konformation (bei $n = 6$) gewählt,
- die Estergruppen der Calix[n]arene komplexieren ein Natrium-Ion und sind konvergierend angeordnet, d.h. alle Carbonylsauerstoffatome sind zum Kation gerichtet; woraus für $n = 4$ eine C_{4v} - und für $n = 5$ eine C_{5v} -symmetrische Struktur resultiert,

- die Dipeptide liegen in ihrer zwitterionischen Struktur ($\text{H}^+\text{-Xaa-Pro-O}^-$) vor, entsprechend den Verhältnissen in der HPLC,
- als Ausgangspunkt der MD-Simulationen wurde immer ein Einschlußkomplex, d.h. ein *endo*-Komplex, gewählt.

Die MD-Simulationen wurden jeweils von energetisch optimierten Strukturen gestartet, wobei die Energien aller Moleküle zunächst einzeln und anschließend im Komplex minimiert wurden, bis der Energiegradient einen RMS- (Root Mean Square) Wert von kleiner als $10^{-4} \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ aufwies.

Beim Aufbau der Komplexe wurden zunächst zwei Anordnungsmöglichkeiten für die Isomere im Calix[4]- und Calix[5]aren berücksichtigt, da nicht bekannt war, welcher Teil der Isomere mit den Calixarenen bevorzugt in Wechselwirkung tritt. Dazu wurden die Peptide zum einen mit den N-terminalen Aminosäuren (Ala, Ile und Phe) und zum anderen mit dem C-terminalen Prolin ausgehend vom oberen Rand in das Innere der Calix[n]arene gedockt.

Die Simulationen erfolgten in einer Wasserbox unter Verwendung einer Dielektrizitätskonstante von $\epsilon = 1$. Die Gasteiger-Hückel-Methode wurde für die Berechnung der Partialladungen der Moleküle verwendet (GASTEIGER und MARSILI, 1980). Der „cutoff“-Wert für nichtbindende Wechselwirkungen wurde auf 12 \AA gesetzt. Vor der Simulation wurde eine Belly-Dynamik über eine Zeitdauer von 10 ps durchgeführt, bei der sich nur die Wasserhülle bewegt, um den gesamten Komplex besser mit Wassermolekülen auszufüllen. Das System wurde dabei langsam von 0 auf 277 K erwärmt und bei dieser Temperatur konstant gehalten (Wärmebadkopplung). Zu erwähnen ist weiterhin, daß die eingestellte Endtemperatur von 277 K in der MD-Simulation nicht der realen Temperatur von 277 K (4°C) entspricht, sondern einer bestimmten kinetischen Energie des Systems. Die in den MD-Berechnungen verwendete Temperatur von 277 K sollte jedoch annähernd den Temperaturverhältnissen von 277 K in der HPLC entsprechen.

Um eine Schrittweite von 2 fs verwenden zu können, wurde die „Shake“-Option eingesetzt, die X-H-Bindungen auf die Gleichgewichts-Bindungslängen fixiert (RYCKAERT et al., 1977). Die Simulation der Komplexe sowie die der Einzelmoleküle erfolgte in einem isotherm-isobaren Ensemble (NPT) in einer kubischen Wasserbox von etwa $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$ mit 1577 bis 2004 Wassermolekülen. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, d.h. um die Stabilität der Einschlußkomplexe beurteilen zu können, wurde eine Zeitspanne von 470 ps gewählt.

In Abb. 37 ist der Simulationsraum (die Wasserbox) für *p-tert*-Butylcalix[4]aren mit dem *cis*-Konformer von Ala-Pro dargestellt.

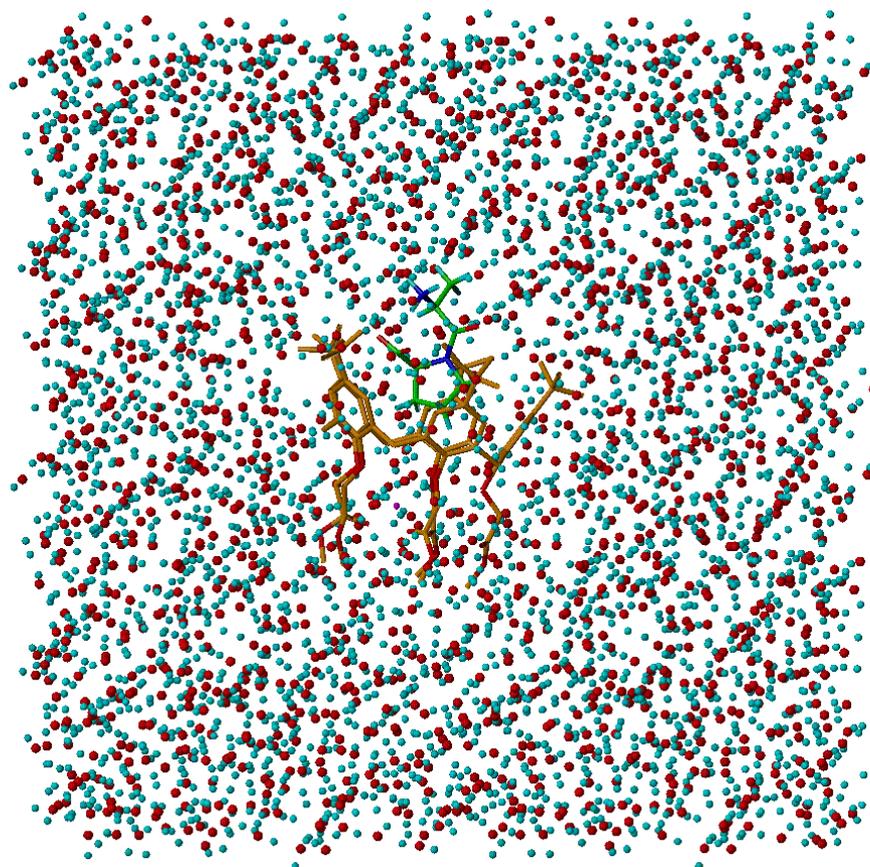


Abb. 37: *p*-*tert*-Butylcalix[4]aren/*cis*-Ala-Pro-Komplex in einer Wasserbox

7.3.1 *p*-*tert*-Butylcalix[4]arentetraessigsäuremethylester

Die Startstruktur des *p*-*tert*-Butylcalix[4]arentetraessigsäuremethylesters (von nun an als Calix[4]aren bezeichnet) war in allen Fällen eine C_{4v} -symmetrische *cone*-Konformation. Die Konformere der Xaa-Pro-Peptide wurden ausgehend vom oberen Rand des Calix[4]arens zum einen mit den N-terminalen Aminosäuren (als „Variante **1**“ bezeichnet) und zum anderen mit Prolin (als „Variante **2**“ bezeichnet) in den Hohlraum gedockt. Im Ausgangszustand sind die Gastmoleküle etwa 6 bis 7,5 Å von der Ebene der Methylenkohlenstoffatome des Calix[4]arens entfernt, so daß die Abstoßungskräfte durch überlappende van-der-Waals-Radien weitgehend minimal sind. Da der innere mittlere Durchmesser des Calix[4]arens (gemessen an den Schwerpunkten der Phenylringe) 6,4 Å beträgt und das kleinste Dipeptid Ala-Pro nur etwa 5 x 7 Å groß ist, können die Gastmoleküle nicht tief genug in den Käfig, sondern nur zwischen die *tert*-Butylgruppen, eingebaut werden.

Die visuellen Auswertungen der MD-Simulationen zeigen, daß bei beiden Varianten (**1** und **2**) keine stabilen Wirt-Gast-Komplexe gebildet werden. Da die MD-Simulationen nahezu identische Ergebnisse liefern, beschränkt sich die Diskussion der MD-Simulationen nur auf die Ergebnisse der Variante **2**, d.h. mit Prolin im Inneren.

Abb. 38 zeigt die Start- (**a**) und Endstruktur (**b**) des Calix[4]arens (C4)-Komplexes mit Ala-Pro in der *trans*-Konformation. Zum besseren Überblick wurden die Wassermoleküle der Simulationsbox und die Wasserstoffatome des Calix[4]arens weggelassen. Die anderen Komplexe weisen ähnliche Anordnungen auf.

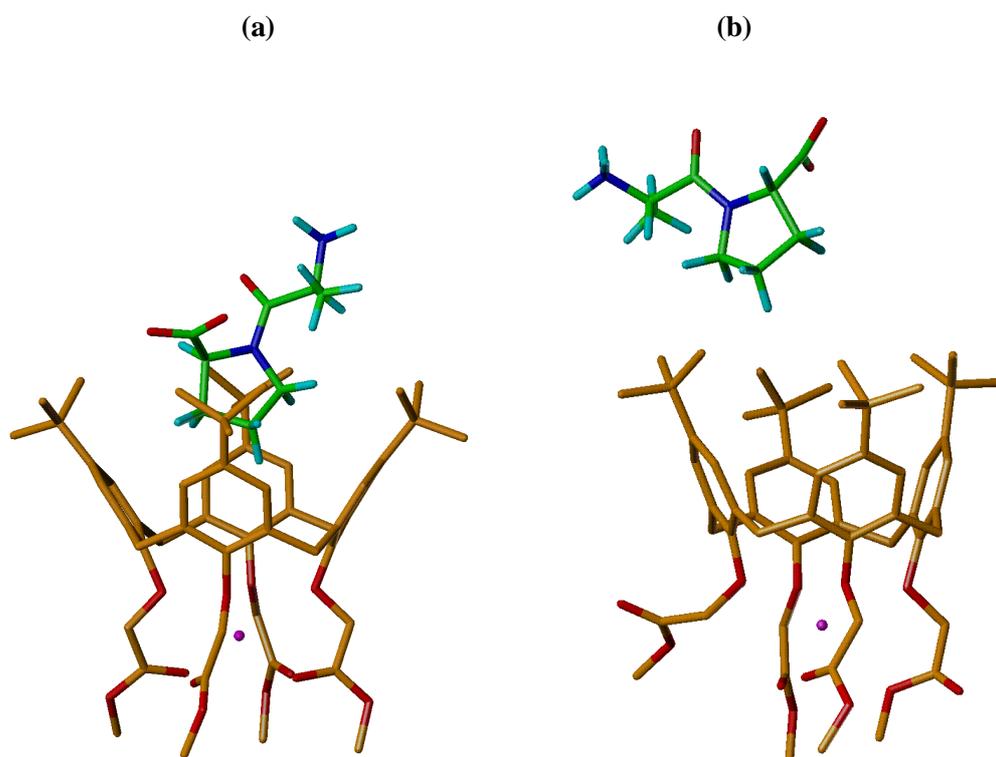


Abb. 38: Start- (a) und Endstruktur (b) der MD-Simulation von C4/*trans*-Ala-Pro (Seitenansicht) ‡

Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Änderungen der Abstände von Calix[4]aren und den Konformeren der Dipeptide (ausgehend von der Ebene der Methylkohlenstoffatome des Calix[4]arens zum Schwerpunkt der Dipeptide) zeigt, daß sich alle Konformere innerhalb von etwa 20 ps vom Calix[4]aren entfernen (Abb. A2) und sich außerhalb des Hohlraums, d.h. über den *tert*-Butylgruppen, befinden. Dort verbleiben sie im allgemeinen bis zum Ende der MD-Simulation (Abb. 38 (b)). Die numerischen

‡ Die grün gefärbten Atome kennzeichnen die Kohlenstoffatome des Dipeptids, die orange gefärbten die des Calixarens. Rot gefärbte Atome stellen Sauerstoff, dunkelblau Stickstoff und hellblau Wasserstoff dar. Das magenta gefärbte Ion ist das Natrium-Ion.

Auswertungen zeigen, daß die nichtkovalenten Wechselwirkungsenergien zwischen Calix[4]aren und den Konformeren der Dipeptide vor allem auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den *tert*-Butylgruppen des Calix[4]arens und dem Prolinring der Peptide zurückzuführen sind. Die resultierenden durchschnittlichen Energiewerte liegen zwischen -6,6 bis -7,2 kcal/mol und nehmen für alle untersuchten Strukturen vergleichbare Werte an (Tab. 15).

Tab. 15: Durchschnittliche Wechselwirkungsenergien [kcal/mol] zwischen Calix[4]aren und Dipeptiden in Wasser

Wirt-Gast-System	$\langle E_{\text{vdw}} \rangle$
C4/ <i>cis</i> -Ala-Pro	-6,6
C4/ <i>trans</i> -Ala-Pro	-7,1
C4/ <i>cis</i> -Ile-Pro	-7,2
C4/ <i>trans</i> -Ile-Pro	-7,2
C4/ <i>cis</i> -Phe-Pro	-7,1
C4/ <i>trans</i> -Phe-Pro	-6,6

Damit wird deutlich, daß im Fall der HPLC-Untersuchungen an der Calix[4]aren-Stationärphase keine Einschlußkomplexe gebildet werden, da der innere Hohlraum des *p-tert*-Butylcalix[4]arens für die Wechselwirkung mit den Konformeren der Xaa-Pro Dipeptide zu klein ist. Bezüglich der Interpretation eines Retentionsmechanismus an Calix[4]aren-Stationärphasen läßt sich ferner schlußfolgern, daß die erfolgreichen Trennungen der Konformere von Phe-Pro und Ile-Pro (Abb. 19 und Abb. 20) auf eine im Vergleich zu Ala-Pro „langsamere“ *cis/trans*-Isomerisierung zurückzuführen sind.

Neben der Wirt-Gast-Wechselwirkung zwischen Calix[4]aren und den Konformeren der Dipeptide ist ferner die Wechselwirkung zwischen Calix[4]aren und dem am unteren Rand komplexierten Natrium-Ion von Interesse, da Kationen die Form der Cavität der Calixarene beeinflussen können. Das bedeutet, daß bei geeigneter Wahl eines entsprechend großen Kations die Cavität des Wirtmoleküls für den Einschluß bzw. partiellen Einschluß von Gastmolekülen maßgeblich präorganisiert werden kann. So führt z.B. die Komplexierung von einem Na⁺-Ion in einem Calix[4]arenester zu einer Cavität mit einer annähernd C_{4v}-symmetrischen *cone*-Konformation (BÖHMER, 1995).

Die graphischen als auch die numerischen Auswertungen der MD-Simulationen zeigen, daß die C_{4v}-Symmetrie (bezogen auf das [1₄]-Metacyclophan-Grundgerüst des Calix[4]arens) während der gesamten Simulationszeit erhalten bleibt (Abb. 39, Tab. 16). Diese Aussagen korrelieren sehr gut mit experimentellen Befunden von BÖHMER (1995),

McKERVEY et al. (1985), ARNAUD-NEU et al. (1989) und ARDUINI et al. (1986).

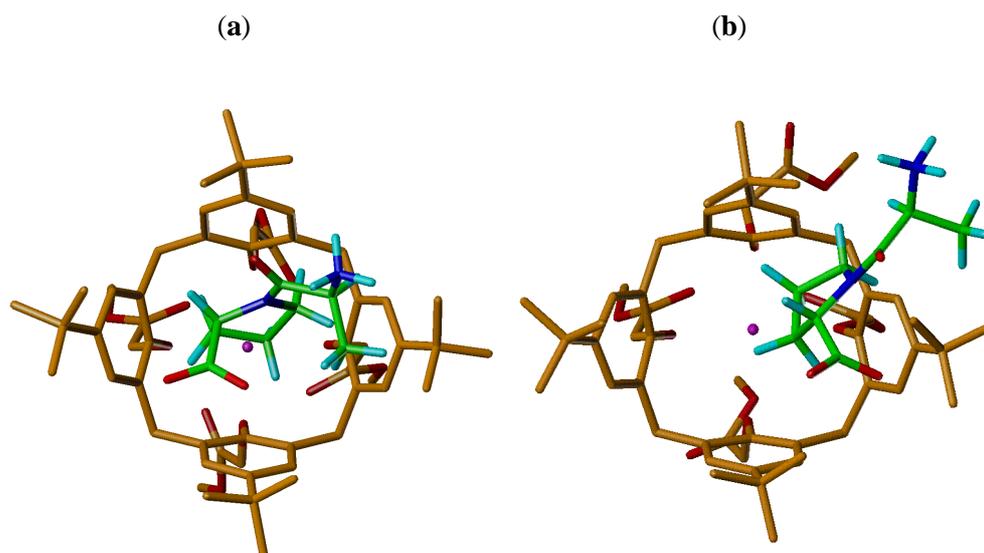


Abb. 39: C_{4v} -symmetrische *cone*-Konformation[§] im $C4/trans$ -Ala-Pro-Komplex (a) vor der MD und (b) nach der MD (Ansicht von oben)

Bei einer Nichtkomplexierung mit Kationen resultiert dagegen eine C_{2v} -symmetrische Konformation, die keinen Hohlraum aufweist und somit keine Gastmoleküle einschließen kann.

Einige geometrische Parameter sind in Tab. 16 aufgeführt. Sie zeigen, daß die Geometrie des Calix[4]arens in allen Calixaren-Dipeptid-Systemen ähnlich ist. Vor allem die Abstände der gegenüberliegenden Phenylringe unterscheiden sich nur sehr gering und bestätigen das Vorhandensein einer durchschnittlich C_{4v} -symmetrischen Konformation. Weiterhin ist der Abstand der phenolischen Sauerstoffe zum Natrium-Ion $\langle d_{Na^+ \dots O_{Ether}} \rangle$ in allen Wirt-Gast-Systemen annähernd gleichbleibend. Die stärker differierenden Abstände der Carbonylsauerstoffatome ($\langle d_{Na^+ \dots O=C} \rangle$) weisen darauf hin, daß mindestens eine Estergruppe zeitweise in eine divergierende Anordnung übergeht (Abb. A4). Bei einer solchen divergierenden Anordnung können Wassermoleküle in den Bereich der Estergruppen gelangen und das Natrium-Ion solvatisieren, was sich in den niedrigen Werten der Solvationsenergien (E_{Na^+/H_2O}^{**}) < -12 kcal/mol widerspiegelt.

Zudem korrelieren die durchschnittlichen Wechselwirkungsenergien zwischen Calix[4]aren und Na^+ (E_{C4/Na^+}) mit der achtfachen Koordination des Na^+ -Ions. Die

[§] bezüglich des [1₄]-Metacyclophangerüsts

** Typische Solvationsenergien für Na^+ liegen im Bereich von -19 kcal/mol.

Energien sind sehr stark negativ und liegen im Bereich von -130 bis -144 kcal/mol. Diese extrem niedrigen Werte beruhen vor allem auf elektrostatischen Wechselwirkungen und stimmen mit experimentellen Befunden überein, daß das Natrium-Ion sehr gut von Calix[4]arenester-Derivaten komplexiert wird (McKERVEY et al., 1985; ARNAUD-NEU et al., 1989; ARDUINI et al., 1986).

Tab. 16: Durchschnittliche Abstände der Schwerpunkte der gegenüberliegenden Phenylringe, der phenolischen und Carbonylsauerstoffatome zum Na⁺ in [Å]; durchschnittliche Wechselwirkungsenergien von Calix[4]aren mit Na⁺ sowie durchschnittliche Solvatationsenergien für Na⁺ in [kcal/mol]

Wirt-Gast-System	$\langle d_{\text{Aromat} \cdots \text{Aromat}} \rangle$	$\langle d_{\text{Na}^+ \cdots \text{OEtHe}} \rangle^a$	$\langle d_{\text{Na}^+ \cdots \text{O=C}} \rangle$	$\langle E_{\text{C4/Na}^+} \rangle$	$\langle E_{\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}} \rangle^b$
C4 (isoliertes Wirtmolekül)	6,22 ± 0,18 6,46 ± 0,18	2,50 ± 0,12	4,68 ± 0,99 2,44 ± 0,15 3,04 ± 0,87 2,45 ± 0,14	-130,0	-19,0
C4/ <i>cis</i> -Ala-Pro	6,50 ± 0,18 6,40 ± 0,18	2,51 ± 0,12	4,72 ± 0,79 2,44 ± 0,15 2,46 ± 0,16 2,45 ± 0,17	-133,0	-14,4
C4/ <i>trans</i> -Ala-Pro	6,43 ± 0,18 6,45 ± 0,18	2,52 ± 0,13	2,47 ± 0,22 2,56 ± 0,41 2,49 ± 0,19 4,80 ± 1,11	-133,0	-13,6
C4/ <i>cis</i> -Ile-Pro	6,48 ± 0,18 6,43 ± 0,18	2,53 ± 0,14	2,50 ± 0,23 2,75 ± 0,62 3,19 ± 1,02 2,58 ± 0,32	-140,1	-10,4
C4/ <i>trans</i> -Ile-Pro	6,39 ± 0,20 6,49 ± 0,20	2,55 ± 0,13	2,69 ± 0,37 2,61 ± 0,47 2,64 ± 0,30 2,52 ± 0,23	-144,9	-8,1
C4/ <i>cis</i> -Phe-Pro	6,49 ± 0,22 6,43 ± 0,20	2,56 ± 0,13	2,67 ± 0,26 2,53 ± 0,23 2,58 ± 0,30 2,50 ± 0,17	-144,9	-7,0
C4/ <i>trans</i> -Phe-Pro	6,37 ± 0,24 6,52 ± 0,19	2,52 ± 0,14	2,49 ± 0,14 2,43 ± 0,12 5,20 ± 0,29 2,51 ± 0,20	-134,2	-13,0

^a Durchschnittswerte der vier Ethersauerstoffatome; ^b normalisiert auf 1600 H₂O-Moleküle

7.3.2 *p*-tert-Butylcalix[5]arenpentaessigsäuremethylester

Die MD-Simulationen des *p*-tert-Butylcalix[5]arenpentamethylesters (Calix[5]aren) in einer C_{5v} -symmetrischen *cone*-Konformation mit den *cis/trans*-Isomeren prolinhaltiger Dipeptide wurden nach den in Abschnitt 7.3.1 erwähnten Varianten **1** (N-Terminus des Dipeptids im Inneren des Makrocyclus) und **2** (C-Terminus des Dipeptids im Inneren des Makrocyclus) durchgeführt. Während alle nach Variante **1** konstruierten Wirt-Gast-Komplexe zeitlich instabil waren, konnte dagegen nach Variante **2** ein auf der MD-Zeitskala stabiler Calix[5]aren-Komplex beobachtet werden. Die Diskussion der Ergebnisse der MD-Simulationen beschränkt sich daher nur auf Variante **2**.

In Vergleich zum Calix[4]aren war es aufgrund des größeren Hohlraums des Calix[5]arens möglich, die Gastmoleküle tiefer, d.h. in einem Abstand von 5 bis ca. 6 Å (ausgehend von der mittleren Ebene der fünf Methylenkohlenstoffatome) in das Innere der Cavität einzubauen (Abb. A5). Wie in Abb. 40 (a) zusehen ist, befindet sich der Prolinring der Dipeptide im allgemeinen zwischen den aromatischen Ringen und den *tert*-Butylgruppen des Calix[5]arens und die N-terminale Aminosäure außerhalb des pentameren Makrocyclus. Nach dem Start der MD-Simulationen wurde im allgemeinen ein Auseinanderdriften beider Moleküle auf ca. 10 - 15 Å (gemessen von der mittleren Ebene der fünf Methylenkohlenstoffe zum Schwerpunkt der Dipeptide) beobachtet (Abb. 40 (b)).

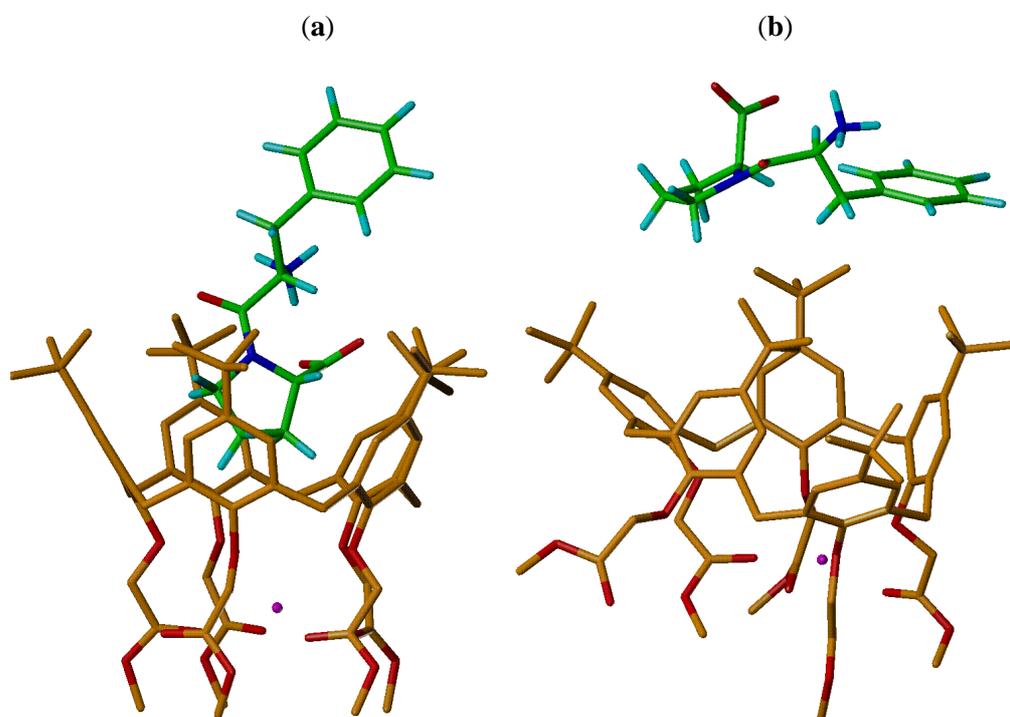


Abb. 40: Start- (a) und Endstruktur (b) der MD-Simulation von C5/*cis*-Phe-Pro (Seitenansicht)

Nur das *trans*-Isomer von Ala-Pro verblieb im Inneren der Cavität (Abb. 41) und bildete aufgrund der Wechselwirkung zwischen dem Natrium-Ion, das von den Carboxylgruppen des Calix[5]arens komplexiert wird, und der Carboxylgruppe des Peptids einen auf der MD-Zeitskala stabilen Wirt-Gast-Komplex.

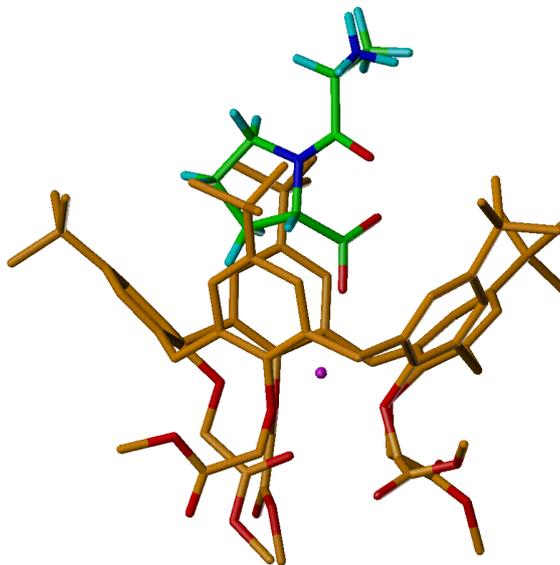


Abb. 41: Endstruktur der MD-Simulation des C5/*trans* Ala-Pro-Komplexes

Die Bildung des Einschlußkomplexes wird vor allem durch die Form und Größe des *trans*-Konformers von Ala-Pro begünstigt. Abstoßende Wechselwirkungskräfte werden durch anziehende Kräfte zwischen der negativ geladenen Carboxylgruppe des Prolins, die wie eine Pfeilspitze in das Innere des Calix[5]arens ragt, und dem positiv geladenen Natrium-Ion kompensiert. Dies äußert sich in einer stark negativen durchschnittlichen elektrostatischen Wechselwirkungsenergie von -85,3 kcal/mol und einer positiven durchschnittlichen van-der-Waals-Energie von 2,7 kcal/mol. Für den C5/*trans*-Ala-Pro-Komplex wurde eine Komplexierungsenergie^{††} von -54 kcal/mol ermittelt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zum experimentellen Befund in der HPLC (Abb. 18), daß die Aufspaltung der Peaks an der Calix[5]aren-Phase offensichtlich auf die Einschlußkomplexbildung von *trans*-Ala-Pro zurückgeführt werden kann.

Interessant ist weiterhin, daß für alle Calix[5]aren-Dipeptid-Systeme, die keine Einschlußkomplexe bilden, eine Selbstkomplexierung beobachtet wird. Die C_{5v}-symmetrische *cone*-Konformation wechselt in eine stark gestörte *cone*-Konformation, die

^{††} Die Komplexierungsenergie ist die Energie, die bei der Bildung eines Komplexes aus den stabilen Formen seiner Einzelemente (Wirt und Gast) frei wird. Sie ist definiert als: $\langle E_{\text{Komplex}} \rangle = \langle E_{\text{totWG}} \rangle - [\langle E_{\text{totG}} \rangle + \langle E_{\text{totW}} \rangle]$, wobei E_{tot} die durchschnittlichen Totalenergien für Gast (G), Wirt (W) und Wirt/Gast (WG) darstellen.

sogenannte *cone-in*-Konformation (STEWART et al., 1995) (Abb. 40 (b) und A6). Dabei bilden vier *tert*-Butylphenol-Einheiten einen Hohlraum, in dem die verbleibende *tert*-Butylphenol-Einheit eingeschlossen wird. Dadurch geht die hydrophobe Kontaktfläche für die Wechselwirkung mit den Dipeptiden verloren, was zu einem Auseinanderdriften von Wirt- und Gastmolekülen und zu einem Energieverlust führt. Somit wird auch verständlich, warum sich keine durchschnittlichen Wechselwirkungsenergien für diese C5-Systeme bestimmen lassen. Die Visualisierung der Trajektorien zeigt dennoch, daß die *tert*-Butylgruppen des Calix[5]arens in einem sehr geringen Ausmaß mit den hydrophoben Teilen der Dipeptide in Wechselwirkung treten können, ähnlich wie es für die Calix[4]aren-Systeme beobachtet wurde (Abschnitt 7.3.1).

Zudem zeigt ein Vergleich der Retentionsfaktoren der Calixaren-Phasen (s. Kapitel 6), daß die *cone-in*-Konformation offensichtlich auch im immobilisierten Calix[5]aren existiert, da die Retentionsfaktoren dieser Phase im Gegensatz zur Calix[6]aren-Phase deutlich kleiner sind (s. Tab. 4, 5 und 6). Dagegen sind die Unterschiede zwischen der Calix[5]aren- und Calix[4]aren-Phase nur gering, da in beiden Fällen die Hohlräume zu klein sind, um die Dipeptide einzuschließen. Ein Öffnen der *cone-in*-Konformation des Calix[5]arens im immobilisierten Zustand ist jedoch wahrscheinlich, da Konformationsänderungen in Lösung schnelle, dynamische Prozesse sind und die Bildung von Einschlußkomplexen für *trans*-Ala-Pro an der Calix[5]aren-Phase erklären.

Die Annahme, daß die *cone-in*-Konformation eine stabile Konformation ist, wird durch die Röntgenkristallstruktur des Calix[5]arenesters bestätigt (BARRETT et al., 1993). In Lösung wird zwar eine C_{5v} -symmetrische *cone*-Konformation gefunden, die jedoch aufgrund schneller Konformationsänderungen eine Durchschnittsstruktur darstellt (STEWART et al. 1995). BELL et al. (1998) fanden ähnliches für Ketone des Calix[5]arens sowohl in Lösung als auch im kristallinen Zustand. Auch Molekülmechanische Untersuchungen korrelieren mit diesen Befunden.

Die Analyse der Na^+ -Komplexierung in den Calix[5]aren-Systemen ergab folgende interessante Befunde: Das Natrium-Kation wurde bei allen untersuchten Wirt-Gast-Systemen auf der MD-Zeitskala komplexiert. Entsprechend dem Ionenradius von Na^+ ($0,95 \text{ \AA}$)^{††} ist maximal nur eine oktaedrale Wechselwirkung mit den phenolischen und den Carbonylsauerstoffatomen möglich. Deshalb können nicht alle fünf phenolischen und fünf Carbonylsauerstoffatome des Calix[5]arens gleichzeitig an der Komplexierung

^{††} Brockhaus ABC Chemie, 1987

beteiligt sein, wodurch das Natrium-Ion im *exo*-Käfig nicht zentriert ist. Daher ergeben sich generell größere Abstände zu den Phenolsauerstoffatomen als im Vergleich zu Calix[4]aren. Anhand der in Tab. 17 aufgeführten geometrischen Parameter lassen sich für das Calix[5]aren divergierende Anordnungen der Estergruppierungen (s. Abb. A7 und A8), ihre Korrelation mit der Solvatationsenergie und der durchschnittlichen Wechselwirkungsenergie Calix[5]aren-Na⁺ nachvollziehen.

Tab. 17: Durchschnittliche Abstände der phenolischen und Carbonylsauerstoffatome zum Na⁺ in [Å]; durchschnittliche Wechselwirkungsenergien von Calix[5]aren mit Na⁺ sowie durchschnittliche Solvatationsenergien für Na⁺ in [kcal/mol]

Wirt-Gast-System	$\langle d_{\text{Na}^+ \dots \text{O}^{\text{Ether}}} \rangle$	$\langle d_{\text{Na}^+ \dots \text{O}=\text{C}} \rangle$	$\langle E_{\text{C5}/\text{Na}^+} \rangle$	$\langle E_{\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}} \rangle^c$
C5 (isoliertes Wirtmolekül)	2,5 ± 0,2	4,8 ± 0,8	-72,3	-17,8
	3,1 ± 0,6	2,4 ± 0,1		
	5,5 ± 0,6	8,0 ± 1,1		
	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,1		
	2,6 ± 0,3	2,5 ± 0,2		
C5/ <i>cis</i> -Ala-Pro	3,6 ± 0,4	2,3 ± 0,1	-77,0	-15,8
	4,8 ± 1,2	7,2 ± 1,3		
	3,0 ± 0,3	2,4 ± 0,1		
	2,6 ± 0,3	3,1 ± 0,9		
	2,7 ± 0,3	4,7 ± 0,8		
C5/ <i>trans</i> -Ala-Pro	2,6 ± 0,2	5,5 ± 0,5	-79,3	-2,7
	3,4 ± 0,4	5,8 ± 0,5		
	2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1		
	3,3 ± 0,4	5,5 ± 0,6		
	2,5 ± 0,1	5,5 ± 0,3		
C5/ <i>cis</i> -Ile-Pro	2,6 ± 0,2	3,0 ± 1,0	-75,1	-15,9
	3,8 ± 0,3	2,4 ± 0,5		
	5,3 ± 0,6	7,4 ± 1,5		
	2,8 ± 0,3	2,4 ± 0,1		
	2,5 ± 0,2	5,2 ± 0,5		
C5/ <i>trans</i> -Ile-Pro	3,0 ± 0,3	2,4 ± 0,2	-73,9	-16,0
	2,6 ± 0,4	3,4 ± 1,1		
	2,7 ± 0,3	3,9 ± 0,9		
	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,1		
	5,3 ± 1,0	7,6 ± 1,2		
C5/ <i>cis</i> -Phe-Pro	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,1	-75,2	-10,7
	5,1 ± 0,8	7,4 ± 1,6		
	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,1		
	2,7 ± 0,3	2,5 ± 0,2		
	2,5 ± 0,2	4,0 ± 1,2		
C5/ <i>trans</i> -Phe-Pro	3,8 ± 0,4	2,3 ± 0,1	-74,1	-16,5
	5,4 ± 0,7	7,9 ± 1,3		
	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,1		
	2,5 ± 0,3	5,1 ± 0,6		
	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,1		

^c normalisiert auf 1700 H₂O-Moleküle

Ein Vergleich der Abstände zeigt, daß durchschnittlich jeweils nur drei phenolische und drei Carbonylsauerstoffatome mit dem Na^+ -Ion in Wechselwirkung treten (nahezu gleiche Abstände). Die verbleibenden Abstände zum Kation sind zu groß und führen zu schwächeren Wechselwirkungen zum Na^+ -Ion, wodurch im Vergleich zu Calix[4]aren bedeutend geringere Wechselwirkungsenergien für $\langle E_{\text{C5/Na}^+} \rangle$ resultieren. Damit wird deutlich, daß das Natrium-Ion für die Bindungsstelle des Calix[5]aren zu klein ist und deshalb offensichtlich keine Fixierung der *cone*-Konformation möglich ist.

In dem Komplex C5/*trans*-Ala-Pro sind alle phenolischen Sauerstoffatome an der Komplexierung des Natrium-Ions beteiligt, da dieses aufgrund der Wechselwirkung mit dem *trans*-Isomer von Ala-Pro stärker in das Innere der Cavität gezogen wird (Abb. 41 und A7). Eine Solvatation des Natrium-Ions wird dadurch verhindert ($E_{\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}} = -2,7$ kcal/mol). Die anderen Calix[5]aren- Na^+ -Komplexe sind durch für Na^+ typische Solvatationsenergien von ca. -11 bis -18 kcal/mol gekennzeichnet. Die Simulationen zeigten, daß das Na^+ -Ion nicht in der Lage ist, die Ausbildung eines für die Komplexierung der Peptid-Isomeren notwendigen Hohlraums (in einer annähernd C_{5v} -symmetrischen *cone*-Konformation) zu induzieren. Daraus folgt, daß die Verwendung größerer Kationen, wie K^+ oder NH_4^+ , für eine Präorganisation der *cone*-Konformation geeigneter wären. Die Beteiligung aller Ether- und Carbonylsauerstoffatome des Calix[5]arens an der Kation-Komplexierung könnte zu einer Verringerung der Flexibilität der Phenyleinheiten des Calix[5]arens führen und eine schüsselförmige *cone*-Konformation stabilisieren. Untersuchungen zur Komplexbildung von Alkalimetallionen mit Ketonen des Calix[5]arens zeigten jedoch, daß auch bei der Komplexierung mit größeren Kationen, wie z.B. Rb^+ , welches den Hohlraum zwischen den Ether- und den Carbonylgruppen besser ausfüllt, keine C_{5v} -symmetrische *cone*-Konformation resultiert (BELL et al., 1998). Dennoch ist es für die HPLC an Calix[5]aren-Stationärphasen empfehlenswert, Pufferlösungen mit größeren Kationen, wie K^+ oder NH_4^+ , zu verwenden (Abschnitt 6.3.1.5).

7.3.3 *p*-tert-Butylcalix[6]arenhexaessigsäuremethylester

Da das Calix[6]aren im Gegensatz zu Calix[4]aren und Calix[5]aren einen bedeutend größeren Hohlraum besitzt, sollten die Dipeptide fast vollständig eingeschlossen werden können, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Bildung

von Einschlußkomplexen bei der HPLC der Dipeptide an der Calix[6]aren-Phase eine Rolle spielen könnte.

Da in der Literatur zwei stabile *cone*-Konformationen diskutiert werden, die kugelförmige *winged*- und die offene *pinched*-Konformation (MOLINS et al., 1992; JANSSEN et al., 1996; van HOORN et al., 1996), war es interessant zu erfahren, ob sich die Konformationen den Erfordernissen der Gastmoleküle anpassen können.

Gestartet wurde von einer *winged*-Konformation, in der Annahme, daß Konformationsumwandlungen nur einen geringen energetischen Aufwand erfordern. Abb. 42 zeigt die typische Startstruktur der Calix[6]aren-Komplexe. N- und C-Terminus der Dipeptide (NH_3^+ und COO^-) sind nach innen gerichtet.

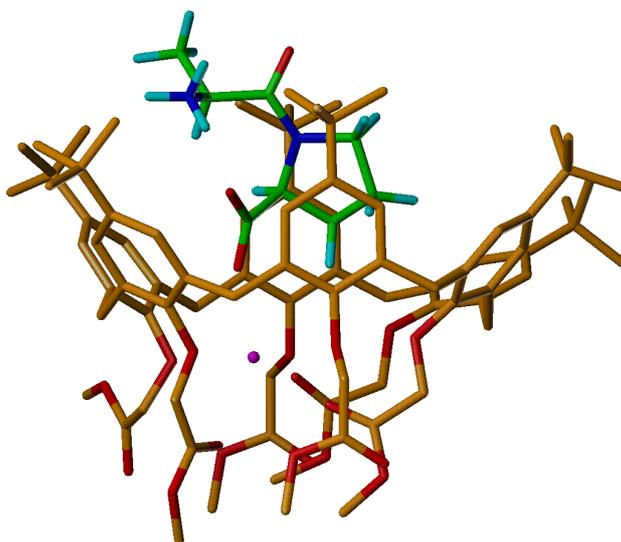


Abb. 42: Startstruktur der MD-Simulation des C6/*cis*-Ala-Pro-Komplexes

Der Schwerpunkt der Gastmoleküle ist im allgemeinen 5 Å vom Mittelpunkt der Ebene der sechs Methylenkohlenstoffe des Calix[6]arens entfernt (Abb. A9).

Alle untersuchten Komplexe waren auf der MD-Zeitskala stabil. Somit konnten die Komplexe im Gegensatz zu Calix[4]aren und Calix[5]aren erstmals hinsichtlich energetischer und geometrischen Aspekte untersucht werden.

Die Analyse der MD-Simulationen zeigt, daß schon nach der Minimierung der Komplexe eine Anpassung der *winged*-Konformationen an die Dipeptide erfolgte, da im Startzustand der MDs für alle Komplexe unterschiedliche Abstände der Phenolbausteine gemessen wurden (Abb. A10). Zudem ist eine weitere Anpassung während der MDs festzustellen, da sich die mittleren Abstände der Phenolbausteine zueinander ändern, deren Ursache eine Pseudorotation der *winged*-Konformation ist. In Abb. 43 ist am Beispiel des C6/*trans*-Ala-Pro-Komplexes zu sehen, daß die *winged*-Konformation

während der MD erhalten bleibt und keine Konformationsänderungen in die *pinched*-Konformation erfolgt.

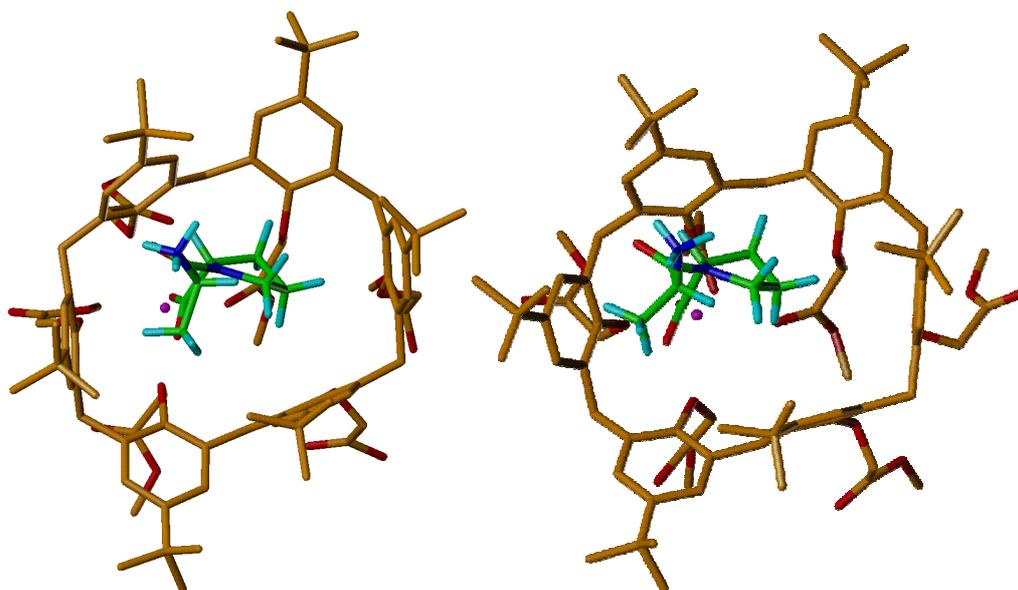


Abb. 43: *winged*-Konformation im C6/*trans*-Ala-Pro-Komplex (a) vor der MD und (b) nach der MD (Ansicht von oben)

Ein entscheidendes Kriterium für die Komplexstabilität ist die Komplexierungsenergie ($\langle E_{\text{Komplex}} \rangle$, s. Tab. 18). Die dazugehörigen Einzelenergien sind Tab. A1 zu entnehmen. Die *cis*-Isomere werden aufgrund ihrer kompakten Gestalt besser komplexiert als die langgestreckten *trans*-Isomere. Daraus resultieren kleine aber entscheidende Unterschiede in den van-der-Waals-Wechselwirkungen, wodurch sich auch die große Energiedifferenz bei Ile-Pro erklären läßt.

Tab. 18: Durchschnittliche Wechselwirkungsenergien [kcal/mol] der C6-Komplexe in Wasser sowie Energiedifferenzen in Bezug auf die geringste Komplexierungsenergie

Wirt-Gast-System	$\langle E_{\text{Komplex}} \rangle$	$\langle E_{\text{vdW}} \rangle$	$\langle E_{\text{Dipeptid}/t\text{-Bu}} \rangle$ (vdW)	$\langle E_{\text{Dipeptid}/\text{Aromat}} \rangle$ (vdW)	$\langle E_{\text{elektrostat. WW}} \rangle$
C6/ <i>cis</i> -Ala-Pro	-61,4 (0,0)	-4,4	-6,9	-1,3	-58,4
C6/ <i>trans</i> -Ala-Pro	-59,6 (1,8)	0,1	-5,8	1,3	-74,8
C6/ <i>cis</i> -Ile-Pro	-74,8 (0,0)	-29,3	-8,0	-23,2	-51,9
C6/ <i>trans</i> -Ile-Pro	-62,8 (12,0)	-9,2	-7,8	-1,8	-70,9
C6/ <i>cis</i> -Phe-Pro	-60,1 (0,0)	-11,4	-9,0	-3,0	-59,9
C6/ <i>trans</i> -Phe-Pro	-55,8 (4,3)	1,8	-5,8	5,8	-90,6

Die elektrostatischen Wechselwirkungsenergien sind dagegen in den Komplexen der *trans*-Isomere energetisch günstiger als in den Komplexen der *cis*-Isomere. Ursache ist die fehlende Salzbrücke zwischen N- und C-Terminus in den *trans*-Isomeren, wodurch sich ihre Carboxylgruppe besser in den Hohlraum einfügt. Die van-der-Waals-Wechselwirkungsenergien scheinen aber wesentlicher für das Komplexierungsverhalten zu sein als die elektrostatischen. Dabei leisten vor allem die *tert*-Butylgruppen einen entscheidenden Beitrag zur Komplexstabilität als das aromatische Ringsystem (Tab. 18, mit Ausnahme von C6/*cis*-Ile-Pro).

Die Ergebnisse der Komplexierungsuntersuchungen korrelieren mit dem experimentell beobachteten Trend in der HPLC. Sie bestätigen die Elutionsreihenfolge prolinhaltiger Dipeptide des Typs L-Xaa-L-Pro an Calixaren-Stationärphasen: $k_{trans} < k_{cis}$ und erlauben die Schlußfolgerung, daß in wäßrigen mobilen Phasen die Bildung von Wirt-Gast-Komplexen zu einer erfolgreichen Trennung an Calix[6]aren-Phasen führen kann.

Die Untersuchungen zur Komplexierung des Na^+ -Ions im Calix[6]aren zeigen, daß das Natrium-Ion von vier phenolischen (Abstände kleiner 4,9 Å) und drei Carbonylsauerstoffatomen (in der Regel Abstände kleiner 5,5 Å) komplexiert wird (Tab. 19, Abb. A11 und A12). Die achte Koordinationsstelle des Natrium-Ions tritt mit der Carboxylgruppe der Dipeptide in Wechselwirkung.

Ein Vergleich der durchschnittlichen Wechselwirkungsenergien $\langle E_{\text{C6}/\text{Na}^+} \rangle$ und $\langle E_{\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}} \rangle$ gibt Aufschluß über den Grad der Abschirmung des Natrium-Ions. Die in Tab. 19 aufgeführten Werte verdeutlichen, daß das Natrium-Ion sehr stark vom Calix[6]aren komplexiert wird und mit dem Lösungsmittel nur wenig in Kontakt gelangt. Die vergleichsweise starke Wechselwirkung des Natrium-Ions im isolierten Wirtmolekül mit dem Lösungsmittel (-38 kcal/mol) läßt sich auf das Fehlen eines realen Gastmoleküls zurückführen, da der Hohlraum des Wirtmoleküls mit Wassermolekülen gefüllt ist und eine Solvation auch vom oberen Rand erfolgen kann. Ferner sind die Wechselwirkungen $\langle E_{\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}} \rangle$ in den Komplexen C6/*cis*-Ile-Pro und C6/*cis*-Phe-Pro etwas stärker als im Vergleich zu den anderen Komplexen, was auf divergierende Estergruppen zurückgeführt werden kann (durchschnittliche Abstände $\langle d_{\text{Na}^+ \dots \text{O}=\text{C}} \rangle$ größer 7 Å deuten auf eine divergierende Anordnung hin, während Werte von etwa 5 Å auf einen zeitlichen Wechsel von konvergierenden und divergierenden Strukturen hindeuten).

Trotz der großen Fluktuationen der Abstände einiger Carbonylsauerstoffatome zum Na^+ -Ion bleiben diese Komplexe während der Simulationsdauer stabil. Ein Herauslösen des Kations wird nicht beobachtet. Durch Komplexierung eines größeren Kations sollte sich jedoch die Konformation des Calix[6]arens besser präorganisieren lassen, da aus Extraktionsuntersuchungen bekannt ist, daß Ester der Calix[6]arene eine hohe Bindungs-

affinität für Cs^+ - und NH_4^+ -Ionen aufweisen (ARNAUD-NEU et al., 1989; CASNATI, 1997). Daher ist, wie bereits erwähnt, für die HPLC an Calix[6]aren-Phasen die Verwendung von NH_4^+ - und/oder Cs^+ -haltigen mobilen Phasen empfehlenswert.

Tab. 19: Durchschnittliche Abstände der phenolischen und Carbonylsauerstoffatome zum Na^+ in [Å]; durchschnittliche Wechselwirkungsenergien von Calix[6]aren mit Na^+ sowie durchschnittliche Solvatationsenergien für Na^+ in [kcal/mol]

Wirt-Gast-System	$\langle d_{\text{Na}^+ \dots \text{O}^{\text{Ether}}} \rangle$	$\langle d_{\text{Na}^+ \dots \text{O}=\text{C}} \rangle$	$\langle E_{\text{C6}/\text{Na}^+} \rangle$	$\langle E_{\text{Na}^+/\text{H}_2\text{O}} \rangle^{\text{d}}$
C6 (isoliertes Wirtmolekül)	$3,8 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$	-121,2	-38,4
	$7,3 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,6$		
	$6,7 \pm 0,4$	$7,5 \pm 0,9$		
	$4,4 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$		
	$2,5 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$		
	$2,6 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,3$		
C6/cis-Ala-Pro	$2,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	-106,8	-1,9
	$2,5 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$		
	$2,8 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,6$		
	$4,3 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$		
	$6,7 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,8$		
	$5,6 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,8$		
C6/trans-Ala-Pro	$2,5 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,3$	-96,9	4,1
	$2,4 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,5$		
	$4,3 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$		
	$6,8 \pm 0,3$	$8,5 \pm 1,0$		
	$5,8 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,7$		
	$2,4 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,7$		
C6/cis-Ile-Pro	$4,9 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,4$	-102,4	-13,9
	$6,4 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,7$		
	$4,5 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,1$		
	$2,6 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,8$		
	$2,6 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,7$		
	$2,4 \pm 0,1$	$5,2 \pm 0,7$		
C6/trans-Ile-Pro	$2,5 \pm 0,2$	$4,2 \pm 1,1$	-91,3	-1,9
	$2,7 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,8$		
	$4,1 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1$		
	$6,8 \pm 0,3$	$8,8 \pm 0,8$		
	$5,4 \pm 0,3$	$7,8 \pm 0,8$		
	$2,5 \pm 0,2$	$7,8 \pm 0,8$		
C6/cis-Phe-Pro	$2,5 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,4$	-88,0	-10,7
	$2,7 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,7$		
	$4,1 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,1$		
	$6,8 \pm 0,5$	$9,3 \pm 0,8$		
	$5,4 \pm 0,6$	$7,0 \pm 1,1$		
	$2,8 \pm 0,6$	$7,0 \pm 1,1$		
C6/trans-Phe-Pro	$2,6 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,4$	-85,6	4,1
	$2,4 \pm 0,1$	$3,7 \pm 1,0$		
	$4,3 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$		
	$6,8 \pm 0,3$	$8,9 \pm 0,7$		
	$5,5 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,7$		
	$2,4 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,7$		

^d normalisiert auf 1900 H_2O -Moleküle

7.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Moleküldynamik-Simulationen

Aus den MD-Untersuchungen zum Komplexierungsverhalten von *p-tert*-Butylcalix[n]arenmethylester ($n = 4, 5, 6$) mit den *cis/trans*-Konformeren prolinhaltiger Dipeptide (L-Xaa-L-Pro, Xaa = Ala, Ile, Phe) ergeben sich für die Interpretation der HPLC-Ergebnisse hinsichtlich eines Retentionsmechanismus folgende Rückschlüsse:

1. Konformere der Xaa-Pro-Dipeptide können nicht von *p-tert*-Butylcalix[4]aren und *p-tert*-Butylcalix[5]aren komplexiert werden, da die Cavitäten beider Makrocyclen zu klein sind. Lediglich das *trans*-Konformer von Ala-Pro bildet mit *p-tert*-Butylcalix[5]aren einen zeitlich stabilen Wirt-Gast-Komplex, da dieses Gastmolekül im Vergleich zu den anderen Peptiden kleiner ist. Das zeigt, daß die Bildung von Einschlußkomplexen stark von der Form und Größe des Rezeptors abhängig ist. Es erklärt auch das Peaksplitting von Ala-Pro im Chromatogramm der Calix[5]aren-Phase (Abb. 18).
2. *p-tert*-Butylcalix[6]aren ist in der Lage, mit allen Konformeren der Dipeptide stabile Wirt-Gast-Komplexe zu bilden. Daraus folgt, daß die Bildung von Einschlußkomplexen am Trenngeschehen in der HPLC beteiligt sein kann. Dieser Sachverhalt erklärt vor allem die erfolgreiche Trennung der Konformere von Ala-Pro an der Calix[6]aren-Phase (s. Abb. 18).
3. Die MD-Simulationen zeigen, daß die Bildung der Einschlußkomplexe unter anderem auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Carboxylgruppe der Dipeptide und dem am unteren Rand des Calix[6]arens eingeschlossenen Kation beruht. Jedoch lassen sich entscheidende Unterschiede in der Komplexstabilität zwischen den *cis*- und *trans*-Isomeren auf van-der-Waals-Wechselwirkungen zurückzuführen, die von der Größe und Form der Peptide abhängig sind. Die kompakten *cis*-Konformere werden dabei besser von der *winged*-Konformation des Calix[6]arens komplexiert als die langgestreckten *trans*-Konformere. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu den HPLC-Untersuchungen an der Calix[6]aren-Phase.
4. Die MD-Simulationen von Calix[5]aren zeigen, daß es aufgrund einer Selbstkomplexierung zu einer Konformationsänderung kommt. Die *cone*-Konformation geht in eine *cone-in*-Konformation über, wodurch hydrophobe Kontaktflächen für die Wechselwirkung mit den Dipeptiden verloren gehen.

Offensichtlich existiert die *cone-in*-Konformation des Calix[5]arens auch unter HPLC-Bedingungen, da die deutlich kleineren Retentionsfaktoren im Vergleich zur

Calix[6]aren-Phase darauf hindeuten (s. Tab. 4, 5 und 6). Dagegen sind die Unterschiede zur Calix[4]aren-Phase nur gering. Bei beiden Phasen sind die Hohlräume der Selektoren zu klein, um die Peptide (mit Ausnahme von *trans*-Ala-Pro) einzuschließen. Ein Öffnen der *cone-in*-Konformation des immobilisierten Calix[5]arens ist wahrscheinlich, da Konformationsänderungen schnelle, dynamische Prozesse sind und somit die Bildung des Einschlußkomplexes für *trans*-Ala-Pro erklären.

5. Aus den Untersuchungen zum Einfluß von Natrium-Ionen auf die Präorganisation der Cavitäten geht hervor, daß die Komplexierung von Na^+ im Calix[4]aren zu einer Stabilisierung der C_{4v} -symmetrischen *cone*-Konformation (bezogen auf das [1_d]-Metacyclophangerüst) führt. Daher bietet sich die Verwendung Na^+ -haltiger Pufferlösungen für die HPLC an Calix[4]aren-Stationärphasen an. Andererseits sollten zur HPLC an Calix[5]aren- und Calix[6]aren-Stationärphasen Pufferlösungen mit größeren Kationen verwendet werden, da das Natrium-Ion zu klein ist, um von allen Ether- und Carbonylsauerstoffatomen komplexiert zu werden und einen für die Aufnahme des Peptids geeigneten Hohlraum zu induzieren. Es wird empfohlen, beispielsweise K^+ -haltige Pufferlösungen für Calix[5]aren-Phasen sowie NH_4^+ - und/oder Cs^+ -haltige Pufferlösungen für Calix[6]aren-Phasen zu verwenden.

8 Zusammenfassung und Ausblick

1. *p-tert*-Butylcalix[n]arene ($n = 4, 5, 6, 8$) konnten erfolgreich als chromatographische Selektoren an irreguläres Kieselgel mit einer Porenweite von 100 und 300 Å gebunden werden. Weiterhin wurde eine Monomer-Phase mit *p-tert*-Butylphenol an Kieselgel mit einer Porenweite von 100 Å gekoppelt. Die derivatisierten Kieselgele wurden als [n]Aren Si 100 (kurz [n]Aren) und [n]Aren Si 300 ($n = 1, 4, 5, 6, 8$) bezeichnet. Sie weisen Kohlenstoff-Gehalte von 9 bis 15 % auf. Für die [n]Aren Si 100 Kieselgele konnten Oberflächenkonzentrationen von 0,23 bis 0,39 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ und für die [n]Aren Si 300 Kieselgele von 0,39 bis 0,90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ bestimmt werden. Im Vergleich dazu wurde für [1]Aren Si 100 eine bedeutend höhere Oberflächenkonzentration (1,3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$) berechnet, was auf die planare Gestalt des *p-tert*-Butylphenols zurückzuführen ist, dessen Platzbedarf auf gleicher Fläche kleiner ist als der eines Calixarens.
2. Die strukturelle Analyse der derivatisierten Kieselgele mittels Adsorptionsmessungen und Festkörper-NMR-Spektroskopie bestätigt die Belegung mit Calixarenen. Die Adsorptionsmessungen zeigen, daß eine Verengung der Kieselgelporen erfolgte, die durch die Derivatisierung der Oberfläche verursacht wurde. Die Porengrößenverteilung kann für die Calixaren-Phasen (mit Ausnahme von [4]Aren Si 300) als annähernd gleich angesehen werden. Die Signale in den ^{13}C Festkörper-NMR-Spektren sind ausreichend aufgelöst, um die Kohlenstoffatome der Calixarene und der Silanspacer auf den Kieseloberflächen zu erkennen. ^{29}Si Festkörper-NMR-Messungen zeigen, daß noch freie Silanol-Gruppen vorhanden sind, die aufgrund der starken Vernetzung der Silanspacer abgeschirmt sein sollten.
3. Die neuartigen Calixaren-Phasen eignen sich als selektive Trennmedien in der HPLC. Sie zeichnen sich durch Langzeitstabilität aus, sind im üblichen pH-Bereich zwischen 2 und 7 einsetzbar und zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit. Die Säulenmaterialien sind sowohl im RP-Modus als auch im Normal-Phasen-Modus anwendbar. Die Stationärphasen wurden erfolgreich zur HPLC von:
 - *cis/trans*-Isomeren prolinhaltiger Dipeptide (des Typs L-Xaa-L-Pro, Xaa = Ala, Ile und Phe),
 - Östradiol-Epimeren,
 - disubstituierten Aromaten (wie Nitroanilin und Hydroxybenzen),
 - methylierten Uracil-Derivaten,
 - Lipiden und

- Buckminsterfullerenen (C_{60}/C_{70})

eingesetzt. Aus dem Vergleich der Elutionsprofile und Retentionsfaktoren mit Cyclodextrin-, RP 18- und der neu entwickelten *p-tert*-Butylphenol-Phase als Referenzphasen lassen sich Rückschlüsse auf die Trennfunktionen der Calixaren-Stationärphasen ziehen. Im Vergleich zur HPLC an Cyclodextrin- und RP 18-Phasen wird deutlich, daß Trennfunktionen der Calixaren-Phasen auf solvophobe/ hydrophobe Effekte und Einschlußkomplexbildung zurückgeführt werden können, die durch „induced fit“, Charge-transfer, π - π - und elektrostatische Wechselwirkungen beeinflusst werden können. In Abhängigkeit von der Ringgröße der Calixarene ergeben sich Selektivitäten bezüglich der Größe und der Stereochemie der zu trennenden Moleküle. Die Calix[4]aren-Phase besitzt selektive Trenneigenschaften bei der HPLC der Nitroaniline. Die Calix[6]aren-Phase ist in der Lage, die Isomere des Dipeptides L-Ala-L-Pro, 17α - und 17β -Östradiol, die Positionsisomere des Dihydroxybenzens sowie unterschiedliche Ceramide und Cholesterol aufzulösen. Eine Übertragung der HPLC von Cholesterol und Ceramiden sollte im präparativen und semipräparativen Maßstab an einer Calix[6]aren-Phase möglich sein und zu einer Verbesserung der bisher verwendeten Methode führen. Die Calix[8]aren-Phase bietet sich für Trennungen der Isomere von L-Ile-L-Pro und L-Phe-L-Pro an. Zudem zeigt sie gegenüber den Isomeren des Dihydroxybenzens, 5-Methyl- und 6-Methyluracil sowie den Buckminsterfullerenen C_{60} und C_{70} eine hohe Trennleistung. Der Einsatz einer präparativen Calix[8]aren-Phase zur Reinigung von C_{60}/C_{70} kann empfohlen werden. Dagegen zeigt die Calix[5]aren-Phase keine besonderen chromatographischen Eigenschaften, was möglicherweise auf eine *cone-in*-Konformation des Pentamers vor allem in wäßrigen Lösungsmitteln zurückzuführen ist.

4. Zum Verständnis und zur Interpretation des Elutionsverhaltens der *cis/trans*-Konformere prolinhaltiger Dipeptide wurden Moleküldynamik-Simulationen mit Hilfe des Amber-Kraftfeldes durchgeführt. Das Komplexierungsverhalten der Calixaren-Stationärphasen wurde modellhaft anhand der Methoxycarbonylmethyl-Derivate der *p-tert*-Butylcalix[n]arene ($n = 4, 5, 6$) untersucht. Von besonderem Interesse sind die MD-Simulationen des cyclischen Hexamers. Es bildet auf der MD-Zeitskala mit allen getesteten Dipeptiden stabile Einschlußkomplexe, wodurch ein auf Einschlußkomplexbildung beruhender Retentionsmechanismus unterstützt wird. Dagegen waren alle Komplexe des Tetramers auf der MD-Zeitskala instabil, da der innere Hohlraum des Calix[4]arens für eine Einschlußkomplexbildung zu klein ist. Gleiches gilt auch für das Pentamer, wobei lediglich für das *trans*-Konformer von

Ala-Pro ein zeitlich stabiler Wirt-Gast-Komplex beobachtet werden konnte, der das Peaksplitting im Elutionsprofil der Calix[5]aren-Phase erklärt. MD-Simulationen für Calix[8]aren wurden nicht durchgeführt, da die Vielfalt der konformativen Anordnungen der Phenolbausteine des *p*-tert-Butylcalix[8]arens mit den derzeitigen Methoden des Molecular Modelling keine realistischen Simulationen erlaubt.

5. Die MD-Simulationen zeigen, daß durch die Komplexierung von geeigneten Kationen am unteren Rand eine Präorganisation der Calixarenrezeptoren möglich ist. HPLC-Untersuchungen mit verschiedenen kationenhaltigen mobilen Phasen bestätigen diese Ergebnisse. Daher ergeben sich für die HPLC an den Calixaren-Stationärphasen folgende Empfehlungen:
 - Na⁺-haltige Pufferlösungen für die HPLC an Calix[4]aren-Phasen,
 - K⁺-haltige Pufferlösungen für die HPLC an Calix[5]aren-Phasen und
 - NH₄⁺ oder Cs⁺-haltige Pufferlösungen für die HPLC an Calix[6]aren-Phasen.
6. Die Fraktionierung der *cis/trans*-Konformere des Dipeptids L-Phe-L-Pro an einer β -Cyclodextrin-Phase, nachfolgende ¹H-NMR-Spektroskopie sowie Re-Chromatographie an der Calix[8]aren-Phase bestätigen die Elutionsreihenfolge *trans* < *cis* an Cyclodextrin- und Calixaren-Phasen.
7. Die neuartigen Calixaren-Stationärphasen stellen selektive Trennmedien dar und können auch zur Lösung anderer, ähnlich gelagerter Aufgabenstellungen genutzt werden. Verbesserungen der Trenneigenschaften der Calixaren-Stationärphasen können durch Teilchenform und Teilchengröße des Kieselgels erreicht werden. Sphärische und kleinere Kieselgelpartikel führen zu dichteren Packungen der Säulenmaterialien und zu einer Erhöhung der Bodenzahlen, wodurch die Peakauflösung verbessert werden kann.
8. Aufgrund der Achiralität der Calixarene sind diese Stationärphasen nicht zur Trennung von Enantiomeren biologisch bzw. pharmazeutisch relevanter Verbindungen geeignet, die in der analytischen Chemie jedoch von wachsendem Interesse sind. Daraus ergibt sich für weiterführende Arbeiten die Entwicklung chiraler Calixaren-Phasen zur Trennung von Enantiomeren. Es eröffnet sich somit ein neues Feld für den analytischen Einsatz chiraler Calixarene sowohl in der Chromatographie als auch in der Kapillarelektrophorese.

9 Literaturverzeichnis

- F. H. ALLEN, J. E. DAVIES, J. J. GALLOY, O. JOHNSON, O. KENNARD, C. F. MACRAE, E. M. MITCHELL, G. F. MITCHELL, J. M. SMITH, D. G. WATSON. The development of version 3 and 4 of the Cambridge Structural Database System. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **31**, 187-204 (1991)
- G. D. ANDRETTI, F. UGOZZOLI, A. CASNATI, E. GHIDINI, A. POCHINI, R. UNGARO. Molecular inclusion in functional macromolecules. XVII. Crystal and molecular structure of p-tert-butylcalix[6]arene 1:1 tetrachloroethylene clathrate. *Gazz. Chim. Ital*, **119**, 47-50 (1989)
- G. D. ANDRETTI, G. CALESTANI, F. UGOZZOLI, A. ARDUINI, E. GHIDINI, A. POCHINI, R. UNGARO. Solid state studies on p-tert-butylcalix[6]arene derivatives *J. Inclusion Phenom.*, **5**, 123-26 (1987)
- G. D. ANDRETTI, R. UNGARO, A. POCHINI. Crystal and molecular structure of cyclo{quater[(5-t-butyl-2-hydroxy-1,3-phenylene)methylene]} toluene (1:1) clathrate. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1005-07 (1979)
- K. ARAKI, K. AKAO, H. OTSUKA, K. NAKASHIMA, F. INOKUCHI, S. SHINKAI. Immobilization of the ring inversion motion in calix[6]arene by a cap with C₃-symmetry. *Chem. Lett.*, 1251-54 (1994)
- L. ARCE, A. S. CARRETERO, A. RÍOS, C. CRUCES, A. FERNÁNDEZ, M. VALCÁRCEL. Use of calixarene compounds as selectivity modifiers in capillary electrophoresis separations. *J. Chromatogr. A*, **816**, 243-49 (1998)
- A. ARDUINI, A. POCHINI, S. REVERBERI, R. UNGARO, G. D. ANDRETTI, F. UGOZZOLI. The preparation of a new lipophilic sodium selective ether ester ligand derived from p-t-butylcalix[4]arene. *Tetrahedron*, **42**, 2098-2100 (1986)
- A. ARDUINI, D. BOLDRINI, A. POCHINI, A. SECCHI, R. UNGARO. Selective calix[4]arene-based sensors for neutral organic analytes. *Conf. Proc.-Ital. Phys. Soc.*, **54**, 131-37 (1997)
- G. ARENA, A. CASNATI, A. CONTINO, L. MIRONE, D. SCIOTTO, R. UNGARO. Synthesis of new calixcrowns and their anchoring to silica gel for selective separation of Cs⁺ and K⁺. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 2277-78 (1996)
- D. W. ARMSTRONG and W. DeMOND. Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers. *J. Chromatogr. Sci.*, **22**, 411-15 (1984)
- D. W. ARMSTRONG, W. DeMOND, A. ALAK, W. L. HINZE, T. E. RIEHL, K. H. BUI. Liquid Chromatographic separation of diastereomers and structural isomers on Cyclodextrin-Bonded Phases. *Anal. Chem.*, **57**, 234-37 (1985)
- F. ARNAUD-NEU, E. M. COLLINS, M. DEASY, G. FERGUSON, S. J. HARRIS, B. KAITNER, A. J. LOUGH, M. A. McKERVEY, E. MARQUES, B. L. RUHL, M. J. SCHWING-WEILL, E. M. SEWARD. Synthesis, X-ray crystal structures, and cation-binding properties of alkyl calixaryl esters and ketones, a new family of macrocyclic molecular receptors. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8681-91 (1989)
- S. ASFARI and J. VICENS. The chemistry of calix[5]arenes. *Acros Org. Acta*, **1**, 18-21

(1995)

J. L. ATWOOD, D. L. CLARK, R. K. JUNEJA, G. W. ORR, K. D. ROBINSON, R. L. VINCENT. Double partial cone conformation for $\text{Na}_8\{\text{calix}[6]\text{arene sulfonate}\} \times 20,5 \text{ H}_2\text{O}$ and its parent acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7558-59 (1992)

J. L. ATWOOD, G. A. KOUTSANTONIS, C. L. RASTON, I. B. N. SUDRIA.. C_{60} - und C_{70} -Verbände in den zangenartigen Hohlräumen von Calix[6]aren. *Angew. Chemie*, **110**, 1029-31 (1998)

J. L. ATWOOD, G. A. KOUTSANTONIS, C. L. RASTON. Purification of C_{60} and C_{70} by selective complexation with Calixarenes. *Nature*, **368**, 229-31 (1994)

K. BÄCHMANN, A. BAZZANELLA, I. HAAG, K.-Y. HAN, R. ARNECKE, V. BÖHMER, W. VOGT. Resorcarenes as pseudostationary phases with selectivity for electrokinetic chromatography. *Anal.Lett.*, **67**, 1722-26 (1995)

E. P. BARRETT, L. G. JOYNER, P. P. HALENDA. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 373-80 (1951)

G. BARRETT, M. A. MCKERVEY, J. F. MALONE, A. WALKER, F. ARNAUD-NEU, M.-J. SCHWING-WEILL, C. D. GUTSCHE, D. R. STEWART. Cation complexation by chemically modified calixarenes. Part 6. Alkali and silver(I) cation complexation by *p*-*tert*-butylcalix[5]arene derivatives and X-ray structure determination of a pentaester. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1475-78 (1993)

S. K. BATRA and J. SAUMANDE. High performance liquid chromatographic separation of estradiol- 17α and - 17β in biological fluids; application to plasma, milk and urine of cows. *J. Liq. Chromatogr.*, **7**(12), 2431-46 (1984)

A. BAZZANELLA, H. MÖRBEL, K. BÄCHMANN, R. MILBRADT, V. BÖHMER, W. VOGT. Highly efficient separation of amines by electrokinetic chromatography using resorcarene-octa-carboxylic acids as pseudostationary phases. *Biomed. Chromatogr.*, **12**, 111-12 (1998)

S. E. J. BELL, J. K. BROWNE, V. MCKEE, M. A. MCKERVEY, J. F. MALONE, M. O'LEARY, A. WALKER. Cation complexation by chemically modified calixarenes. 11. Complexation and extraction of alkali cations by calix[5]- and -[6]arene ketones. Crystal and molecular structures of calix[5]arene ketones and Na^+ and Rb^+ complexes. *J. Org. Chem.*, **63**, 489-501 (1998)

C. BOCCHI, M. CARERI, A. CASNATI, G. MORI. Selectivity of calix[4]arene-crown-6 for cesium ion in ISE: Effect of the conformation. *Anal. Chem.*, **67**, 4234-38 (1995)

V. BÖHMER. Calixarene - Makromoleküle mit (fast) unbegrenzten Möglichkeiten. *Angew. Chem.*, **107**, 785-818 (1995)

B. BOTTA, G. D. MONACHE, M. C. De ROSA, C. SERI, E. BENEDETTI, R. IACOVINO, M. BOTTA, F. CORELLI, V. MASIGNANI, A. TAFI, E. GACS-BAITZ, A. SANTINI, D. MISITI. Synthesis of C-alkylcalix[4]arenes. 5. Design, synthesis, computational studies, and homodimerization of polymethylene-bridged resorc[4]arenes. *J. Org. Chem.*, **62**, 1788-94 (1997)

B. BOTTA, G. D. MONACHE, P. SALVATORE, F. GASPARRINI, C. VILLANI, M. BOTTA, F. CORELLI, A. TAFI, E. GACS-BAITZ, A. SANTINI, C. F. CARVALHO, D. MISITI. Synthesis of C-alkylcalix[4]arenes. 4. Design, synthesis, computational

- studies of novel chiral amido[4]resorcinarenes. *J. Org. Chem.*, **62**, 932-38 (1997)
- W. BRANDT, O. LUDWIG, I. THONDORF, A. BARTH. A new mechanism in serine proteases catalysis exhibited by dipeptidyl peptidase IV (DPIV). Results of PM3 semiempirical thermodynamic studies supported by experimental results. *Europ. J. Biochem.*, **236**, 109-14 (1996)
- J. F. BRANDTS, H. R. HALVORSON, M. BRENNAN. Consideration of the possibility that slow step in protein denaturation is due to *cis-trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry*, **14**, 4953-63 (1975)
- R. BRINDLE, K. ALBERT, S. J. HARRIS, C. TRÖLTZSCH, E. HORNE, J. D. GLENNON. Silica-bonded calixarenes in chromatography I. Synthesis and characterization by solid-state NMR spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, **731**, 41-46 (1996)
- S. BRUNAUER, P. H. EMMETT, E. TELLER. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309-19 (1938)
- A. CADOGAN, Z. GAO, A. LEWENSTAM, A. IVASKA, D. DIAMOND. All-solid-state sodium-selective electrode based on calixarene ionophore in a poly(vinyl chloride) membrane with a polypyrrole solid contact. *Anal. Chem.*, **64**, 2496-501 (1992)
- A. CASNATI, P. MINARI, A. POCHINI, R. UNGARO, W. F. NIJENHUIS, F. de JONG, D. N. REINHOUDT. Selective complexation and membrane transport of guanidinium salts by calix[6]arene amides. *J. Isr. Chem. Soc.*, **32**, 79-87 (1992)
- A. CASNATI, P. MINARI, A. POCHINI, R. UNGARO. Conformational freezing of *p*-*tert*-butylcalix[6]arene in the cone structure by selective functionalization at the lower rim: Synthesis of new preorganized ligands. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1413-14 (1991)
- A. CASNATI. Calixarenes: From chemical curiosity to a rich source for molecular receptors. *Gazz. Chim. Ital.*, **127**, 637-49 (1997)
- S.-K. CHANG, H.-S. HWANG, H. SON, J. YOUK, Y. S. KANG. Selective transport of amino acid esters through a chloroform liquid membrane by a calix[6]arene-based ester carrier. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 217-18 (1991)
- S.-K. CHANG, I. CHO. New metal cation-selective ionophores derived from calixarenes: their syntheses and ion-binding properties. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 211-14 (1986)
- M. CORUZZI, G. D. ANDRETTI, V. BOCCHI, A. POCHINI, R. UNGARO. Molecular inclusion in functionalized macrocycles. Part 5: The crystal and molecular structure of 25,26,27,28,29-pentahydroxycalix[5]arene-acetone (1:2) clathrate. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1133-38 (1982)
- J. COSTANTE-CRASSOUS, T. J. MARRONE, J. M. BRIGGS, J. A. McCAMMON, A. COLLET. Absolute configuration of bromochlorofluoromethane from molecular dynamics simulation of its enantioselective complexation by cryptophane-C. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3818-23 (1997)
- M. CZUGLER, S. TISZA, G. SPEIER. Versatility in inclusion hosts: unusual conformation in the crystal structure of the *p*-*tert*-butylcalix[8]arene:pyridine (1:8) clathrate. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **11**, 323-31 (1991)

- E. DALCANALE, S. LEVI, S. RÖSLER, J. AUGÉ, J. HARTMANN, B. HENNING. Macromolecules for new chemical sensor applications. *GIT Lab. J.*, **2**, 118-21 (1998)
- G. DENG, T. SAKAKI, Y. KAWAHARA, S. SHINKAI. Tunable chemical sensors: light-switched ion selective electrodes on the basis of a photoresponsive calix[4]arene. *Supramolecular Chemistry*, **2**, 71-76 (1993)
- D. DIAMOND and M. A. McKERVEY. Calixarene-based sensing agents. *Chem. Soc. Rev.*, 15-24 (1996)
- H. ENGELHARDT and L. ROHRSCHEIDER. Nomenclature for Chromatography. *Pure und Appl. Chem.*, **65**, 819-72 (1993)
- C. A. EVANS, D. L. RABENSTEIN. Nuclear magnetic resonance studies of the acid-base chemistry of amino acids and peptides. II. Dependence of the acidity of the C-terminal carboxyl group on the conformation of the C-terminal peptide bond. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7312-16 (1974)
- E. FISCHER. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **27**, 2984-93 (1894)
- G. FISCHER. Faltung der Proteine: Der Weg vom Baustein zur Funktion. in Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, 117. Versammlung, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Aachen, 1992, 245-60
- G. FISCHER. Über Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen und ihre Effektoren. *Angew. Chem.*, **106**, 1479-1501 (1994)
- S. FRIEBE, B. HARTRODT, K. NEUBERT, G.-J. KRAUSS. HPLC separation of *cis-trans* isomers of proline-containing peptides. II. Fractionation of oligopeptides in different cyclodextrin systems. *J. Chromatogr.* **661**, 7-12 (1994)
- S. FRIEBE, G.-J. KRAUSS, H. NITSCHKE. HPLC separation of *cis-trans* isomers of proline-containing peptides. I. Separation on cyclodextrin bonded silica. *J. Chromatogr.* **598**, 139-42 (1992)
- S. FRIEBE, S. GEBAUER, G.-J. KRAUSS, G. GÖRMAR, J. KRÜGER. HPLC on calixarene bonded silica gels. I. Characterization and applications of *p-tert*-butylcalix[4]arene bonded materials. *J. Chromatogr. Sci.*, **33**, 281-84 (1995)
- C. A. FYFE. Solid state NMR for chemists. CFC-Press, Guelph (1983)
- P. A. GALE, Z. CHEN, M. G. B. DREW, J. A. HEATH, P. D. BEER. Lower-rim ferrocenyl substituted calixarenes: new electrochemical sensors for anions. *Polyhedron*, **17**, 405-12 (1998)
- J. GASTEIGER and M. MARSILI. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to charges. *Tetrahedron*, **36**, 3219- 28 (1980)
- S. GEBAUER, Diplomarbeit: Synthese von Calix[4]aren-Derivaten zum Einsatz als selektive Trennmedien, MLU Halle-Wittenberg, 1993
- S. GEBAUER, S. FRIEBE, G. GÜBITZ, G.-J. KRAUSS. HPLC on calixarene bonded silica gels. II. Separation of regio- and stereoisomers on *p-tert*-butylcalix[n]arene phases. *J. Chromatogr. Sci.*, **36**, 383-87 (1998a)

- S. GEBAUER, S. FRIEBE, G. SCHERER, G. GÜBITZ, G.-J. KRAUSS. HPLC on calixarene bonded silica gels. III. Separation of *cis/trans* isomers of proline containing peptides. *J. Chromatogr. Sci.*, **36**, 388-94 (1998b)
- T. GILDENAST and J. LASCH. Isolation of ceramide fraction from human stratum corneum lipid extracts by high-performance liquid chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1346**, 69-74 (1997)
- R. K. GILPIN, J. A. KORPL, C. A. JANICKI. In-situ chemically bonded stationary phases for high pressure liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **47**, 1498-1502 (1975)
- J. D. GLENNON, B. LYNCH, K. HALL, S. J. HARRIS, P. O'SULLIVAN. Water-eluent based ion chromatography on silica bonded molecular baskets. *Spec. Publ. - R. Soc. Chem.*, 196(Progress in Ion Exchange), 153-59 (1997)
- J. D. GLENNON, E. HORNE, D. COCKER, A. KUHN, S. J. HARRIS, M. A. McKERVEY. Silica-bonded calixarenes in chromatography II. Chromatographic retention of metal ions and amino acid ester hydrochlorides. *J. Chromatogr. A*, **731**, 47-55 (1996)
- J. D. GLENNON, E. HORNE, K. O'CONNOR, G. KEARNEY, S. J. HARRIS, M. A. McKERVEY. Chromatographic selectivity for amino acid esters and alkali metal ions on a silica bonded calix[4]arene tetraester stationary phase. *Anal. Proc. Includ. Analy. Commun.*, **31**, 33-35 (1994)
- J. D. GLENNON, K. O'CONNOR, S. SRIJARANAI, K. MANLEY, S. J. HARRIS, M. A. McKERVEY. Enhanced chromatographic selectivity for Na⁺ ions on a calixarene-bonded silica phase. *Anal. Lett.*, **26**, 153-62 (1993)
- J. D. GLENNON, S. HUTCHINSON, S. J. HARRIS, A. WALKER, M. A. McKERVEY, C. C. McSWEENEY. Molecular baskets in supercritical CO₂. *Anal. Chem.*, **69**, 2207-12 (1997)
- G. GÖRMAR, K. SEIFFARTH, M. SCHULZ. Verfahren zur Herstellung von p-Alkylcalix[4]aren. Pat.-Nr.: DD-292904 vom 22.03.1990
- G. GRATHWOHL and K. WÜTHRICH. The X-Pro peptide bond as an NMR probe for conformational studies of flexible linear peptides. *Biopolymers*, **15**, 2025-41 (1976)
- S. J. GREGG and K. S. W. SING. Adsorption, surface area and porosity. (Second edition), Academic Press Inc., London, 1991
- C. D. GUTSCHE and L. J. BAUER. Calixarenes. 5. Dynamic and NMR characteristics of *p-tert*-butylcalix[4]arenes and *p-tert*-butylcalix[8]arenes. *Tetrahedron Lett.*, **22**, 4763-66 (1981b)
- C. D. GUTSCHE, A. E. GUTSCHE, A. I. KARAULOV. Calixarenes. 11. Crystal and molecular structure of *p-tert*-butylcalix[8]arene. *J. Inclusion Phenom.*, **3**, 447-51 (1985)
- C. D. GUTSCHE, B. DHAWAN, K. H. NO, and R. MUTHUKRISHNAN. Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from *p-tert*-butylphenol. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3782-92 (1981a)
- C. D. GUTSCHE. *Calixarenes - Revisited*, Publisher: Royal Soc. Chem., Letchworth, UK, 1998

- C. D. GUTSCHE. Calixarenes. *Acc. Chem. Res.*, **16**, 161-70 (1983)
- C. D. GUTSCHE. *Calixarenes; Monographs in Supramolecular Chemistry*, ed. J. F. STODDARD, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989
- C. D. GUTSCHE: Calixarenes. *Aldrichimica Acta*, **28**, 3-9 (1995)
- T. HAINO, M. YANASE, Y. FUKAZAWA. Crystalline complexes of C₆₀ with calix[5]arenes. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 3739-42 (1997)
- M. HALIT, D. OEHLER, M. PERRIN, A. THOZET, R. PERRIN, J. VIECENS, M. BOURAKHOUDAR. Crystal and molecular structure of two calix[6]arenes; *p*-isopropyl-calix[6]arene and *p*-*tert*-butylcalix[6]arene-benzene (1:3) complex. *J. Inclusion Phenom.*, **6**, 613-23 (1988)
- T. HARADA and S. SHINKAI. Combined NMR spectroscopy and molecular mechanics studies on the stable structure of calix[n]arenes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2231-42 (1995)
- L. O. HEALY, M. M. McENERY, D. G. McCARTHY, S. J. HARRIS, J. D. GLENNON. Silica-bonded calixarenes in chromatography: enantioseparations on molecular basket phases for rapid chiral LC. *Anal. Lett.*, **31** (9), 1543-51 (1998)
- D. E. HENDERSON and C. HORVÁTH. Low temperature high-performance liquid chromatography of *cis-trans* proline dipeptides. *J. Chromatogr.*, **368**, 203-13 (1986)
- A. HIRSCH. Die Chemie der Fullerene. *Chemie in unserer Zeit*, **2**, 79-87 (1994)
- C. HORVÁTH, W. MELANDER, I. MOLNÁR. Solvophobic interaction in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J. Chromatogr.*, **125**, 129-156 (1976)
- D. HÜBNER, T. DRAKENBERG, S. FORSEN, G. FISCHER. Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activity as studied by dynamic proton NMR spectroscopy. *FEBS Lett.*, **284**, 79-81 (1991)
- A. IKEDA, M. YOSHIMURA, S. SHINKAI. Solution complexes formed by C₆₀ and calixarenes. On the Importance of the preorganized structure for cooperative interaction. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 2107-10 (1997)
- N. IKI, F. NARUMI, T. SUZUKI, A. SUGAWARA, S. MIYANO. A new chiral stationary phase for gas chromatography by use of a chiral thiacalix[4]arene derivative. *Chem. Lett.*, 1065-66 (1998)
- N. S. ISAACS, P. J. NICHOLS, C. L. RASTON, C. A. SANDOVA, D. J. YOUNG. Solution volume studies of a deep cavity inclusion complex of C₆₀:[*p*-benzylcalix[5]arene ⊂ C₆₀]. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1839-40 (1997)
- K. IWAMOTO, H. SHIMIZU, K. ARAKI, S. SHINKAI. Syntheses and optical resolution of calix[4]arenes with molecular asymmetry. Systematic classification of all possible chiral isomers derivable from calix[4]arene. *J. Am. Chem. Soc.*, 3997-4006 (1993)
- K. IWATA, H. KIMIZUKA, H. SUZUKI. Adsorptionsträger für Chromatographie. *Japan Patent Hei 6-58920* (1994)
- K. IWATA, S. MORIGUCHI. Adsorptionsträger für Chromatographie. *Japan Patent*

Hei 5-264531 (1993)

R. G. JANSSEN, J. P. M. van DUYNHOVEN, W. VERBOOM, G. J. van HUMMEL, S. HARKEMA, D. N. REINHOUDT. Studies on the dynamics of phosphorylated *p*-tert-butylcalix[6]arenes by using 2D NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3666-75 (1996)

K. JINNO, K. YAMAMOTO, T. UEDA, H. NAGASHIMA, K. ITOH, J. C. FETZER, W. R. BIGGS. Liquid chromatographic separation of all-carbon molecules C₆₀ and C₇₀ with multi-legged phenyl group bonded silica phases. *J. Chromatogr.*, **594**, 105-09 (1992)

K. JINNO, T. UEMURA, H. OHTA, H. NAGASHIMA, K. ITOH. Separation and identification of higher molecular weight fullerenes by high-performance liquid chromatography with monomeric and polymeric octadecylsilica bonded phases. *Anal. Chem.*, **65**, 2650-54 (1993 b)

K. JINNO, Y. SAITO, Y.-L. CHEN, G. LUEHR, J. ARCHER, J. C. FETZER, W. R. BIGGS. Separation of C₆₀ and C₇₀ fullerenes on methoxyphenylpropyl bonded stationary phases in microcolumn liquid chromatography. *J. Microcolumn Sep.*, **5**, 135-40 (1993 a)

R. K. JUNEJA, K. D. ROBINSON, G. W. ORR, R. H. DUBOIS, K. A. BELMORE, J. L. ATWOOD, J. A. RIPMEESTER, C. I. RATCLIFFE. Inclusion of multi-ring compounds by *p*-tert-butylcalix[5]arene. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **13**, 93-96 (1992)

A. KÁLMÁN, F. THUNECKE, R. SCHMIDT, P. W. SCHILLER, and C. HORVÁTH. Isolation and identification of peptide conformers by RP-HPLC and NMR at low temperature. *J. Chromatogr. A*, **729**, 155-71 (1996)

S. KANAMATHAREDDY and C. D. GUTSCHE. Synthesis and conformational properties of calix[6]arenes bridged on the lower rim: self-anchored rotaxanes. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6572-79 (1993)

Y. R. KANG, H. J. OH, K. M. LEE, G. S. CHA, H. NAM, K. PAEK, H. IHM. Potentiometric characteristics of ion-selective electrodes based on upper-rim calix[4]crown neutral carrier. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **19**, 207-11 (1998)

T. KATSU. Determination of the pH difference across a cell membrane using a methylammonium-selective membrane electrode. *Analyst*, **123**, 1369-72 (1998)

H. KAWAURA, T. SAKAMOTO, T. BABA, Y. OCHIAI, J. FUJITA, S. MATSUI, J. SONE. Transistor operation of 30-nm gate-length EJ-MOSFETs. *IEEE Electron Device Lett.*, **19**, 74-76 (1998)

W. KEMIN, H. XIQIN, C. W. HOUNG, L. A. W. MING. Development of a dopamine-selective optrode membrane based on a lipophilic hexaester of calix[6]arene. *J. of Hunan University*, **22**, 55-60 (1995)

M. KRAMER and G. FISCHER. FKBP-like catalysis of peptidyl-prolyl bond isomerization by micelles and membranes. *Biopolymers*, **42**, 49-60 (1997)

G.-J. KRAUSS und G. KRAUSS. SERVA Praxishefte. Band 2 Hochleistungsflüssigchromatographie, Heidelberg, New York, 1986

- G.-J. KRAUSS. Dissertation für die Promotion B: Beiträge zur hochleistungs-chromatographischen Analytik von Nukleobasen, Nukleosiden und Nukleotiden in biologischen Systemen, MLU Halle-Wittenberg, 1987
- H. KUMAGAI, S. MIYANARI, S. MIYANO. Preparation of sulfonylcalixarene and sulfanylcalixarene derivatives as ion sensors. *PCT Int. Appl.*, 24 pp. (1996)
- M. A. LAMPE, A. L. BURLINGAME, J. WHITNEY, M. L. WILLIAMS, B. E. BROWN, E. ROITMAN, P. M. ELIAS. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. Lipid Res.*, **24**, 120-30 (1983)
- B. T. T. LAN, K. TOTH. Characterization of chromogenic calix[4]arene derivative based ion-selective optical sensors. *Anal. Sci.*, **14**, 191-97 (1998)
- F. LARA-OCHOA, J. A. COGORDAN, I. SILAGHI-DUMITRESCU. Interaction between calix[8]arenes and fullerenes. Molecular dynamics and molecular mechanics simulation of the 1:1 and 1:2 complexes. *Fullerene Science and Technology*, **4**(5), 887-96 (1996)
- H. J. LEE, H. J. OH, G. CUI, G. S. CHA, H. NAM. All-solid-state sodium-selective electrodes based on room temperature vulcanizing-type silicone rubber matrix . *Anal. Sci.*, **13**, 289-94 (1997)
- Y. L. LEE, Y. K. RYU, J. W. RYU, B. E. KIM, J. H. PARK. Reversed-phase liquid chromatography of some positional isomers on calix[6]arene-*p*-sulfonate-bonded silica. *Chromatographia*, **46**(9/10), 507-10 (1997)
- H. J. LIM, H. S. LEE, I. W. KIM, S. H. CHANG, S. C. MOON, B. E. KIM, J. H. PARK. Separation of positional isomers on polymeric calix[4]arene-siloxane stationary phases in capillary GC. *Chromatographia*, **48**(5/6), 422-26 (1998)
- L. LIN, C. Y. WU, Z. Q. YAN, X. Q. YAN, X. L. SU, H. M. HAN. Calix[4]arene derivative as stationary phases for capillary gas chromatography. *Chromatographia*, **47** (11/12), 689-94 (1998a)
- L. LIN, Z. YAN, X. SU, C. WU. Gas chromatographic study on the inclusion properties of calix[4]arene derivatives. *Sepu*, **16**(3), 208-10 (1998b)
- K. B. LIPKOWITZ, G. PEARL, B. CONER, M. A. PETERSON. Explanation of where and how enantioselective binding takes place on permethylated β -cyclodextrin, a chiral stationary phase used in gas chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 600-10 (1997)
- K. B. LIPKOWITZ, R. CONER, M. A. PETERSON. Locating of maximum chiral discrimination: A computational study of enantioselection on a popular chiral stationary phase used in chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11269-76 (1997)
- S. A. LONG, P.W. WERTZ, J. S. STRAUSS, D. T. DOWNING. Human stratum corneum polar lipids and desquamation. *Arch. Derm. Res.*, **277**, 284-87 (1985)
- U. LÜNING, H. ROSS, I. THONDORF. Concave reagents. Part 27. Steric requirements of intraannular substituents in A,D-bridged calix[6]arenes. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1313-17 (1998)
- S. MA, F. KÁLMÁN, A. KÁLMÁN, F. THUNECKE, C. HORVÁTH. Capillary zone electrophoresis at subzero temperatures I. Separation of the *cis* and *trans* conformers of small peptides. *J. Chromatogr. A*, **716**, 167-82 (1995)

- G. E. MACIEL and D. W. SINDORF. Silicon-29 nuclear magnetic resonance study of the surface of silica gel by cross polarization and magic-angle spinning. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7606-7 (1980)
- J. O. MAGRANS, A. M. RINCÓN, F. CUEVAS, J. LÓPEZ-PRADOS, P. M. NIETO, M. PONS, P. PRADOS, J. de MENDOZA. Interplay for steric hindrance and hydrogen bonding to restrict mono-*O*-substituted *p*-*tert*-butylcalix[6]arenes in cone conformation. *J. Org. Chem.*, **63**, 1079-85 (1998)
- A. MANGIA, A. POCHINI, R. UNGARO, G. D. ANDREETTI. 4-*tert*-butylcalix[8]-arene as a stationary phase in gas-solid chromatography. *Anal. Chem.*, **16**, 1027-36 (1983)
- D. E. MARTIRE and R. BOEHM. Unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. 2. Reversed-phase liquid chromatography with chemically bonded phases. *J. Phys. Chem.*, **87**, 1045-62 (1983)
- M. A. MCKERVEY, E. M. SEWARD, G. FERGUSON, B. L. RUHL, S. J. HARRIS. Synthesis. X-ray crystal structures, and cation transfer properties of alkyl calixaryl acetates, a new series of molecular receptors. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 388-90 (1985)
- W. R. MELANDER, J. JACOBSON, C. HORVÁTH. Effect of molecular structure and conformational change of proline-containing dipeptides in reversed-phase chromatography. *J. Chromatogr.*, **234**, 269-76 (1982)
- U. MENYES, U. ROTH, C. TRÖLTZSCH. Process for modifying supports containing silanol groups with calixarene for chromatography. *Eur. Pat. Appl.*, 1996
- S. MEYER, A. JABS, M. SCHUTKOWSKY, G. FISCHER. Separation of *cis/trans* isomers of a prolyl peptide bond by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, **15**, 1151-57 (1994)
- V. MEYER, *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie, Reihe: Laborbücher Chemie*, Salle und Sauerländer, Frankfurt a. M., Aarau, 1990
- J. S. MILLERSHIP, M. A. MCKERVEY, J. A. RUSSELL. Complexation and chromatographic studies involving water-soluble calixarenes and nitrophenols. *Chromatographia*, **48**(5/6), 402-06 (1998)
- S. MIYAMOTO and P. A. KOLLMAN. Molecular dynamics studies of calixspherand complexes with alkali metal cations: Calculation of the absolute and relative free energies of binding of cations to a calixspherand. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3668-74 (1992)
- R. MLIKA, H. B. OUADA, N. JAFFREZIC-RENAULT, I. DUMAZET, R. LAMARTINE, M. GAMOUDI, G. GUILLAND. Study of ion-selective evaporated calixarene film used as sensitive layer on ISFET. *Sens. Actuators, B*, **B47**, 43-47 (1998)
- R. MLIKA, H. B. OUADA, R. BEN CHAABANE, M. GAMOUDI, G. GUILLAUD, N. JAFFREZIC-RENAULT, R. LAMARTINE. Calixarene membranes on semiconductor substrates for EIS chemical sensors. *Electrochim. Acta*, **43**, 842-47 (1997b)

- R. MLIKA, I. DUMAZET, M. GAMOUDI, R. LAMARTINE, H. BEN OUADA, N. JAFFREZIC-RENAULT, G. GUILLAUD. Membranes containing new large size calixarenes on semiconductor substrates for chemical microsensors. *Anal. Chim. Acta*, **354**, 283-89 (1997a)
- P. MNUK and L. FELTL. Gas chromatographic study of the inclusion properties of calixarenes I. *p*-*tert*-butylcalix[4]arene in a micropacked column. *J. Chromatogr. A*, **696**, 101-12 (1995)
- P. MNUK, L. FELTL, V. SCHURIG. Gas chromatographic study of the inclusion properties of calixarenes. II. Selective properties of cyclic tetra to octamers derived from phenol, and some problems associates with the use of calixarenes in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **732**, 63-74 (1996)
- M. A. MOLINS, P. M. NIETO, C. SÁNCHEZ, P. PRADOS, J. de MENDOZA, M. PONS. Solution structure and conformational equilibria of a symmetrical calix[6]arene. Complete sequential and cyclostereospecific assignment of the low-temperature NMR spectra of a cyclosymmetric molecule. *J. Org. Chem.*, **57**, 6924-31 (1992)
- N. MUZET, G. WIPFF, A. CASNATI, L. DOMIANO, R. UNGARO, F. UGOZZOLI. Alkaline earth and uranyl cation complexes of a calix[4]arene-tetraamide: MD and FEP simulations in aqueous and acetonitrile solutions and X-ray structure of its Sr(Picrate)₂ complex. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1065-75 (1996)
- M. NELSON, W. HUMPHREY, A. GURSOY, A. DALKE, L. KALE, R. SKEEL, K. SCHULTEN, R. KUFRIN. MDSCOPE – a visual computing environment for structural biology. *Comp. Phys. Comm.*, **91**, 111-33 (1995)
- M. NEMILOVA, N. V. SHVEDENE, O. V. KOCHULINA, I. A. PRONINA, I. V. PLETNEY. PVC-plasticized ion-selective electrodes based on neutral carriers for determining novocaine. *Vestn. Mosk. Univ., Ser. 2: Khim.*, **38**, 99-103 (1998)
- P. NERI, E. BATTOCOLO, F. CUNSOLO, C. GERACI, M. PIATTELLI. Study of *p*-*tert*-butylcalix[8]arene. Partially *O*-alkylated calix[8]arenes. *J. Org. Chem.*, **59**, 3880-89 (1994)
- K. M. O'CONNOR, W. HENDERSON, E. O'NEILL, W. M. D. ARRIGAN, S. J. HARRIS, M. A. McKERVEY, G. SVEHLA. Calix[4]arenes in the partial cone conformation as ionophores in silver ion-selective electrodes. *Electroanalysis*, **9**, 311-15 (1997)
- K. OHTO, Y. TANAKA, K. INOUE. Adsorption of lead and zinc ions by novel type of calix[4]arene carboxylate resin immobilized with polyallylamine. *Chem. Lett.*, 647-48 (1997)
- S. PAPPALARDO and M. F. PARISI. Selective *endo*-calix complexation of linear alkylammonium cations by functionalized (1,3)-*p*-*tert*-butylcalix[5]crown ethers. *J. Org. Chem.*, **61**, 8724-25 (1996)
- C. PARINI, S. COLOMBO, A. CASNATI. Solid state interaction of steroids with calixarenes. I. A preliminary FTIR and DSC study on 4-en-3-keto-steroids. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **18**, 341-51 (1994)
- J. H. PARK, Y. K. LEE, N. Y. CHEONG, M. D. JANG. Reversed phase liquid chromatographic separation of some mono-substituted phenols with calix[6]arene-*p*-sulfonate-modified eluents. *Chromatographia*, **37**, 221- 23 (1993)

- R. PATHAK and G. N. RAO. Synthesis and metal sorption studies of p-tert-butylcalix[8]arene chemically bound to polymeric support. *Anal. Chim. Acta*, **335**, 283-90 (1996)
- D. A. PEARLMAN, D. A. CASE, J. W. CALDWELL, W. S. ROSS, T. E. CHEATHAM III, D. M. FERGUSON, G. L. SEIBEL, U. C. SINGH, P. K. WEINER and P. A. KOLLMAN, AMBER 4.1, University of California, San Francisco, (1995)
- M. S. PENA, Y. ZHANG, I. M. WARNER. Enantiomeric separation by use of calixarene electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.*, **69**, 3239-42 (1997)
- M. S. PENA, Y. ZHANG, S. THIBODEAUX, M. L. McLAUGHLIN, A. M. PENA, I. M. WARNER. Synthesis of a water-soluble chiral *N*-acylcalix[4]arene amino acid derivative. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5841-44 (1996)
- M. PERRIN and S. LECOCQ. Crystal and molecular structure of p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)calix[5]arene and its 1:1 complex with toluene. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **11**, 171-83 (1991)
- R. J. PIETERS, J. CUNTZE, M. BONNET, F. DIEDERICH. Enantioselective recognition with C₃-symmetric cage-like receptors in solution and on a stationary phase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1891-1900 (1997)
- A. PINES, M. G. GIBBY, J. S. WAUGH. Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids. *J. Phys. Chem.*, **59**, 569-90 (1973)
- A. POCHINI and R. UNGARO. Calixarenes and related hosts. In: *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, eds. J. L. ATWOOD, J. E. D. DAVIES, M. ACNICOL, F. VÖGTLE, Elsevier Science Ltd., Oxford, Vol. **2**, 143ff (1996)
- B. PULLMAN (Hrsg.), *Intermolecular Forces*, Reidel, Dordrecht, 1991
- I. RODRIGUEZ, H. K. LEE, S. F. Y. LI. Capillary electrophoresis separation of *p*-sulfonated calix[*n*]arenes, *n*=4,6,8. *TALANTA*, **45**, 683-691 (1998)
- M. K. ROSEN, R. F. STANDAERT, A. GALAT, M. NAKATSUKA, S. L. SCHREIBER. Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate. *Science*, **248**, 863- 66 (1990)
- S. RÖSLER, R. LUCKLUM, R. BORNGRABER, J. HARTMANN, P. HAUPTMANN. Sensor system for the detection of organic pollutants in water by thickness shear mode resonators. *Sens. Actuators, B*, **B48**, 415-24 (1998)
- J. P. RYCKAERT, G. CICCOTTI, H. J. C. BERENDSEN. Numerical integration of the Cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of *n*-alkanes. *J. Comput. Phys.*, **23**(3), 327-41, (1977)
- T. SAIKI, K. GOTO, N. TOKITOH, M. GOTO, R. OKAZAKI. Structure of bridged calix[6]arenes bearing a bromide functionality in the cavity. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 4039-42 (1996)
- K. D. SCHIERBAUM and W. GÖPEL. Functional polymers and supramolecular compounds for chemical sensors. *Synthetic Metals*, **61**, 37-45 (1993)
- H.-J. SCHNEIDER, R. KRAMER, I. THEIS, M.-Q. ZHOU. Large extra-cavity contributions to hydrophobic binding of lipophilic substrates in synthetic receptor

models. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 276-78 (1990b)

H.-J. SCHNEIDER, T. BLATTER, P. ZIMMERMANN. Wirt-Gast-Komplexe mit geschlossenen, halboffenen und gestreckten Rezeptoren: hydrophobe Effekte und induzierte Pol-Dipol-Wechselwirkungen. *Angew. Chemie*, **102**, 1194-95 (1990a)

H.-J. SCHNEIDER. Mechanismen in der molekularen Erkennung- Untersuchungen an organischen Wirt-Gast-Komplexen. *Angew. Chemie*, **103**, 1419-548 (1991)

A. B. SCHOLTEN, J. W. de HAAN, H. A. CLAESSENS, L. J. M. van de VEN, C. A. CRAMERS. 29-Silicon NMR evidence for the improved chromatographic siloxane bond stability of bulky alkylsilane ligands on a silica gel surface. *J. Chromatogr. A*, **688**, 25-29 (1994)

M.-J. SCHWING-WEILL and F. ARNAUD-NEU. Calixarenes for radioactive waste management. *Gazz. Chim. Ital.*, **127**, 687-92 (1998)

T. A. SERGEYEVA, N. V. LAVRIK, A. E. RACHKOV, Z. I. KAZANTSEVA, A. V. ELSKYA. An approach to conductometric immunosensor based on phthalocyanine thin film. *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 359-69 (1998)

S. SHINKAI, H. KAWABATA, T. MATSUDA, H. KAWAGUCHI, O. MANABE. Synthesis and inclusion properties of „neutral“ water-soluble calixarenes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1272-74 (1990)

S. SHINKAI, K. ARAKI, O. MANABE. NMR determination of association constants for calixarenes. Evidence for the formation of 1:2 complex with calix[8]arene. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7214-15 (1988)

D. SHOHAT and E. GRUSHKA. Use of calixarenes to modify selectivities in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **66**, 747-50 (1994)

R. C. SIMPSON, P. R. BROWN. High performance liquid chromatographic profiling of nucleic acid components in physiological samples. *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **379**, 269-311 (1986)

D. W. SINDORF and G. E. MACIEL. ¹³C CP/MAS NMR study of molecular motion in *n*-alkylsilanes bonded to the silica surface. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 1848-51 (1983a)

D. W. SINDORF and MACIEL G. E. Solid-state NMR studies of the reactions of silica surfaces with polyfunctional chlorosilanes and ethoxymethylsilanes. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 3767-76 (1983b)

D. SLOTFELDT-ELLINGSEN and H. A. RESING. Motions of phenyl groups chemically bond to silica gel. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. *J. Phys. Chem.*, **84**, 2204-09 (1980)

D. R. STEWART, M. KRAWIEC, R. P. KASHYAP, W. H. WATSON, C. D. GUTSCHE. Conformational characteristics of ethers and esters of *p*-tert-butylcalix[5]arene. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 586-601 (1995)

S. SUN, M. J. SEPANIAK, J.-S. WANG, C. D. GUTSCHE. Capillary electrokinetic chromatography employing *p*-(carboxyethyl) calix[*n*]arenes as running buffer additives. *Anal. Chem.*, **69**, 344-48 (1997)

T. SUZUKI, K. NAKASHIMA, S. SHINKAI. Influence of *para*-substituents and solvents on selective precipitation of fullerenes by inclusion in calix[8]arenes.

Tetrahedron Lett., **36**, 249-52 (1995)

T. SUZUKI, K. NAKASHIMA, S. SHINKAI. Very Convenient and efficient purification method for fullerene (C₆₀) with 5,11,17,23,35,41,47-octa-tert-butylcalix-[8]arene-49,50,51,52,53,54,55,56-octol. *Chem. Lett.*, 699-702 (1994)

B. I. SWANSON, D. LI, J.-X. SHI, S. JOHNSON, X. YANG. Smart-film sensors hydrocarbons for halogenated VOCs. *Proc. Int. Conf. Incineration Therm. Treat. Technol.*, 393-97 (1996)

Y. TANAKA, Y. KISHIMOTO, K. OTSUKA, S. TERABE. Strategy for separation solutions in capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **817**, 49-57 (1998)

I. THONDORF and J. BRENN. Conformations of calix[5]arenes - a molecular mechanics study. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2293-99 (1997)

I. THONDORF, G. HILLIG, W. BRANDT, J. BRENN, A. BARTH, V. BÖHMER. Molecular modelling study of a dissymmetric calix[4]arene and its methyl ethers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2259-67 (1994)

P. THUÉRY, M. NIERLICH, J. C. BRYAN, V. LAMARE, J.-F. DOZOL, Z. ASFARI, J. VICENS. Crown ether conformations in 1,3-calix[4]arene bis(crown ethers): crystal structures of a caesium complex and solvent adducts and molecular dynamics simulations. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 4191-4202 (1997)

F. THUNECKE, A. KÁLMÁN, F. KÁLMÁN, S. MA, A. S. RATHORE, C. HORVÁTH. Kinetic study on the *cis-trans* isomerization of peptidyl-proline dipeptides. *J. Chromatogr. A*, **744**, 259-72 (1996)

Y. S. TSANTRIZOS, W. CHEW, L. D. COLEBROOK, F. SAURIOL. Synthesis of a novel 1,4-bridged calix[8]arene „host“ cavity. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 5411-14 (1997)

K. K. UNGER (Editor). Packings and stationary phases in chromatographic techniques. in: *Chromatographic Science Series*, Vol. 47, Marcel Dekker, New York und Basel, 1990

K. K. UNGER, N. BECKER, P. ROUMELIOTIS. Recent developments in the evaluation of chemically bonded silica packings for liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **125**, 115-27 (1976)

K. K. UNGER. *Handbuch der HPLC, Teil 1 - Leitfaden für Anfänger und Praktiker*. GIT Verlag, Darmstadt, 1989

K. K. UNGER. Hohlraumstruktur poröser Adsorbentien. *Angew. Chem.*, **8**, 331-43 (1972)

K. UNGER. Porous silica. Its properties and use as support in column liquid chromatography. *Journal of Chromatography Library*, Vol. 16, Elsevier Amsterdam (1975)

W. F. van GUNSTEREN und H. J. C. BERENDSEN. Moleküldynamik-Computer-simulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. *Angew. Chem.*, **102**, 1020-55 (1990)

W. P. van HOORN, F. C. J. M. van VEGGEL, D. N. REINHOUDT. Conformation of

hexahydroxycalix[6]arene. *J. Org. Chem.*, **61**, 7180-84 (1996)

H. A. M. VERHULST, L. J. M. van de VEN, J. W. de HAAN, H. A. CLAESSENS, F. EISENBEISS, C. A. CRAMERS. Patching in reversed-phase high-performance liquid chromatographic materials studied by solid-state NMR spectroscopy. *J. Chromatogr. A*, **687**, 213-21 (1994)

J. VICENS and V. BÖHMER. Calixarenes: A Versatile Class of Macrocyclic Compounds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991

C. VICOSO, M. J. F. REBELO, M. F. CAMOES. Studies with a sodium ion selective electrode using a calixarene as ionophore. *Port. Electrochim. Acta*, **15**, 297-301 (1997)

A. VINAS, S. GOMEZ, J. BERTRAN, F. TEIXIDOR, J.-F. DOZOL, H. ROUQUETTE. Cobalt bis(dicarbollide) derivatives as extractants for europium from nuclear wastes. *Chem. Commun. (Cambridge)*, **2**, 191-92 (1998)

R. VÖLKEL. High-resolution solid-state ¹³C-NMR spectroscopy of polymers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1655-72 (1988)

J. WANG and J. LIU. Calixarene-coated amperometric detectors. *Anal. Chim. Acta*, **294**, 201-06 (1994)

P. K. WEINER and P. A. KOLLMAN. AMBER: Assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions. *J. Comput. Chem.*, **2**(3), 287-303 (1981)

P. K. WEINER, P. A. KOLLMAN, D. A. CASE, U. C. SINGH, C. GHIO, G. ALAGONA, S. PROFETA, P. WEINER. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 765-84 (1984)

C. J. WELCH, W. H. PIRKLE. Progress in the design of selectors for buckminsterfullerene. *J. Chromatogr.*, **609**, 89-101 (1992)

R. M. WILLIAMS and J. W. VERHOEVEN. Supramolecular encapsulation of fullerene c60 in a water-soluble calixarene: a core-shell charge-transfer complex. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **111**, 531-32 (1992)

A. WUTTE, G. GÜBITZ, S. FRIEBE, G.-J. KRAUSS. HPLC separation of *cis-trans* isomers of proline-containing peptides. III. comparative studies with different stationary phases. *J. Chromatogr.* **677**, 186-91 (1994)

D.-Q. XIAO, Y. LING, Y.-X. WEN, R.-N. FU, J.-L. GU, R.-J. DAI, A.-Q. LUO. Synergistic effect of resorcarene and cyclodextrin mixed stationary phase in gas chromatography. *Chromatographia*, **46**, 177-82 (1997)

W. XU, J.-S. LI, Y.-Q. FENG, S.-L. DA, Y.-Y. CHEN, X.-Z. XIAO. Preparation and characterization of *p-tert*-butyl-calix[6]arene-bonded silica gel stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, **48** (3/4), 245-50 (1998)

P. K. ZARZYCKI, M. WIERZBOWSKA, H. LAMPARCZYK. The influence of temperature on the multiple separation of estrogenic steroids using mobile phases modified with β -cyclodextrin in high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **15**, 1281-87 (1997)

S. ZELLMER and J. LASCH. Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determination by automated multiple development of high-performance thin-

- layer chromatography plates. *J. Chromatogr. B*, **691**, 321-29 (1997)
- Z. ZENG, J. WANG, X. TANG, S. TANG, X. LU. Two kinds of calix[4]arene derivatives as capillary gas chromatography stationary phases. *Fenxi Huaxue*, **26** (9), 1060-64 (1998)
- H. ZHANG, Y. LING, R. DAI, Y. WEN, R. FU, J. GU. Two alkyl resorcarenes as stationary phases for isomer separation by GC. *Chem. Lett.*, 225-26 (1997)
- S. ZHANG, W. ZHANG, C. WU, Z. ZHENLIN. Gas chromatography of calix[4]arene derivatives. *Fenxi Kexue Xuebao*, **14**, 14-18 (1998)
- Y. ZHANG and I. M. WARNER. Separation of water-soluble *p*-sulfonated calixarenes 4, 6 and 8 and 4-hydroxybenzene sulfonate by use of capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, **688**, 293-300 (1994)
- W. ZHANG, C. WU, J. WANG, S. ZHANG. A new calixcrown polysiloxane stationary phase for capillary gas chromatography. *Chinese J. Chromatogr.*, **15**, 204-5, (1997)
- T. ZHAO, X. HU, J. CHENG, X. LU. Use of calix[4]arene to separate positional isomers in capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta*, **358**, 263-68 (1998)
- Z.-L. ZHONG, C.-P. TANG, C.-Y. WU, Y.-Y. CHEN. Synthesis and properties of calixcrown telomers. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1737-38 (1995)
- P. L. ZHU. On the chromatography mechanism of reversed-phase liquid chromatography. *Chromatographia*, **21**(4), 229-33 (1986)

10 Anhang (einschließlich Publikationen)

Abb. A1: Bezeichnungen der verschiedenen der Siliciumatome, die zur Beschriftung der CP/ MAS NMR-Spektren verwendet wurden

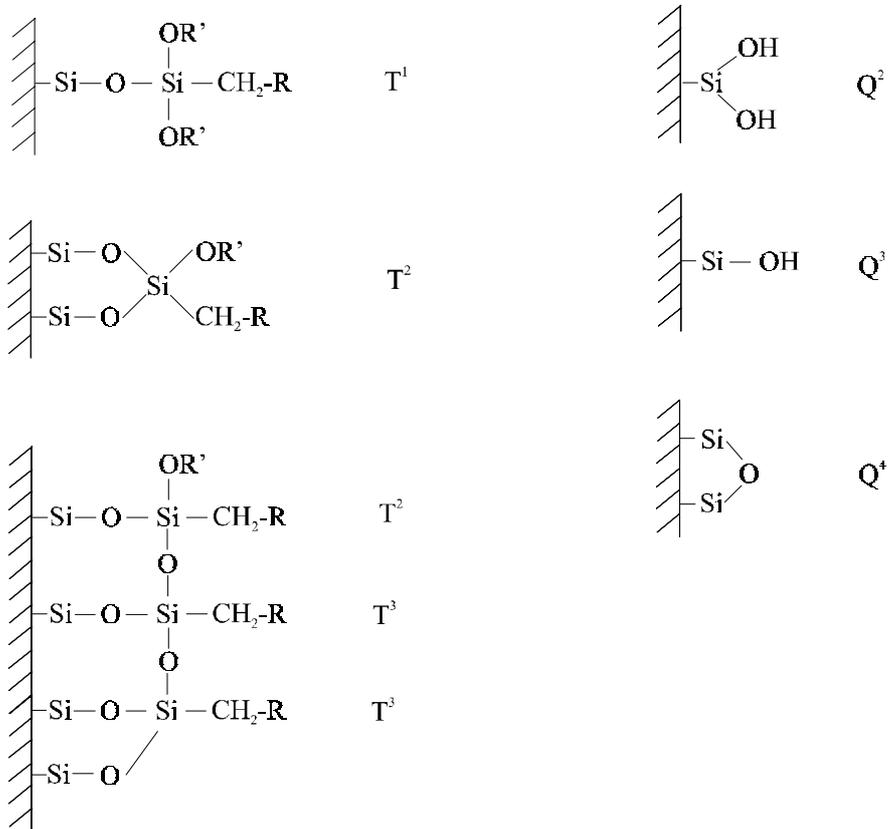


Abb. A2: Zeitlicher Verlauf der Änderungen der Abstände der Schwerpunkte der *cis/trans*-Konformere der Dipeptide (Xaa-Pro) von der Ebene der Methylenkohlenstoffatome des Calix[4]arens; a) für *cis*- und b) für *trans*-Konformere

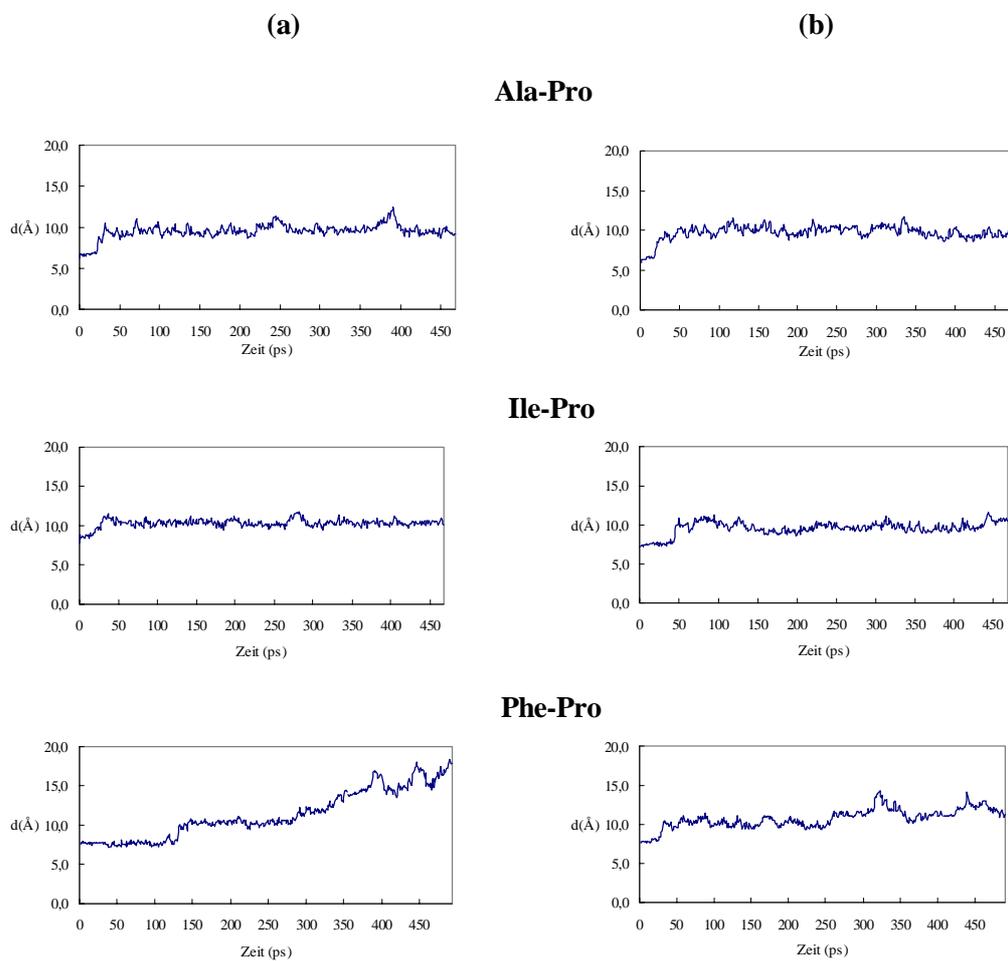


Abb. A3: Abstände der Ethersauerstoffatome vom Na⁺-Ion in Abhängigkeit der Simulationsdauer für die einzelnen Calix[4]aren-Systeme; a) *cis*-, b) *trans*-Konformere

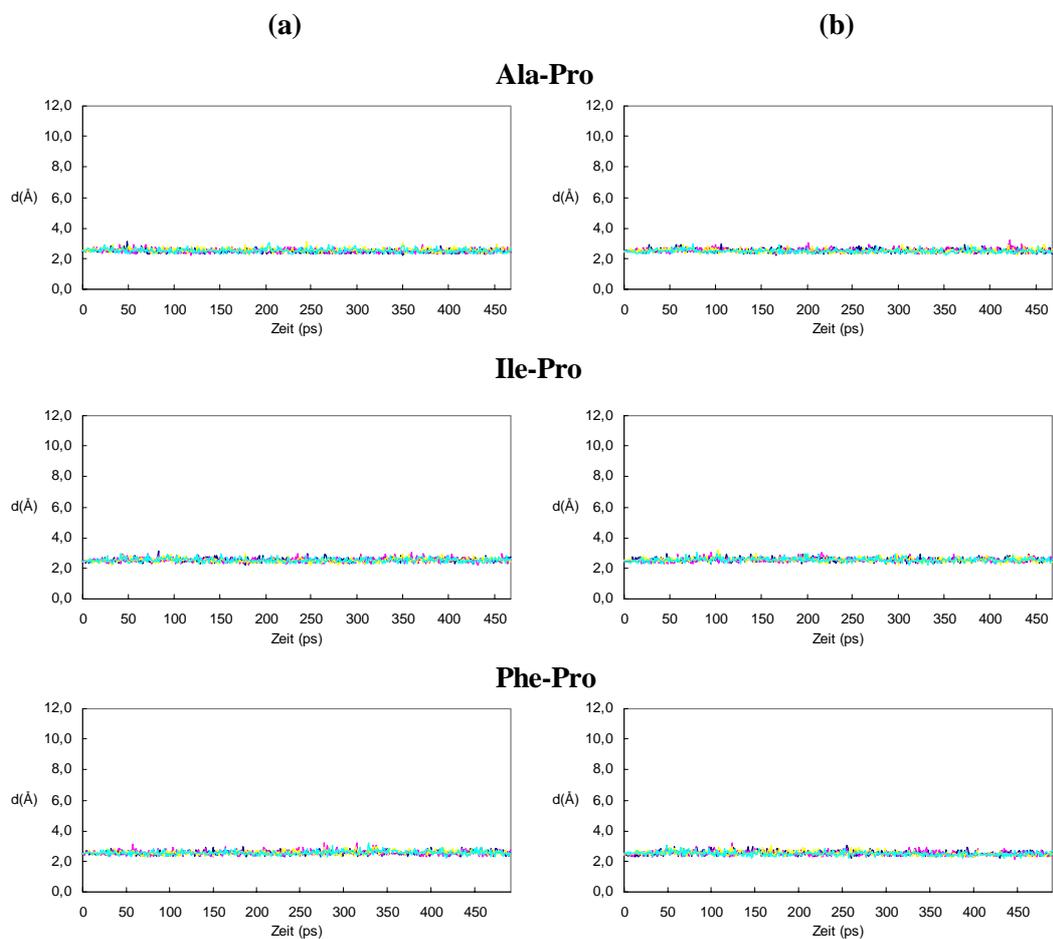


Abb. A4: Abstände der Carbonylsauerstoffatome vom Na^+ -Ion in Abhängigkeit der Simulationsdauer für die einzelnen Calix[4]aren-Systeme; a) *cis*-, b) *trans*-Konformere

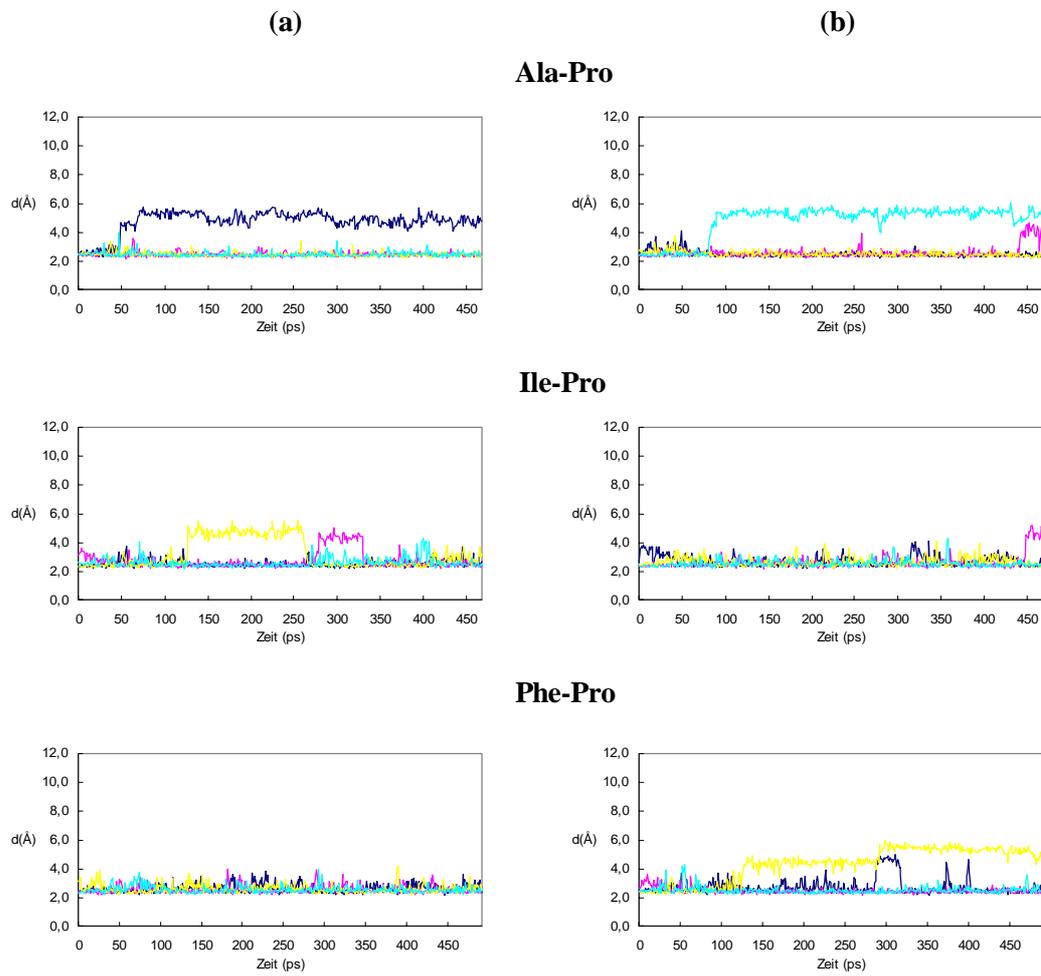


Abb. A5: Zeitlicher Verlauf der Änderungen der Abstände der Schwerpunkte der *cis/trans*-Konformere der Dipeptide (Xaa-Pro) von der Ebene der Methylenkohlenstoffatome des Calix[5]arens; a) für *cis*- und b) für *trans*-Konformere

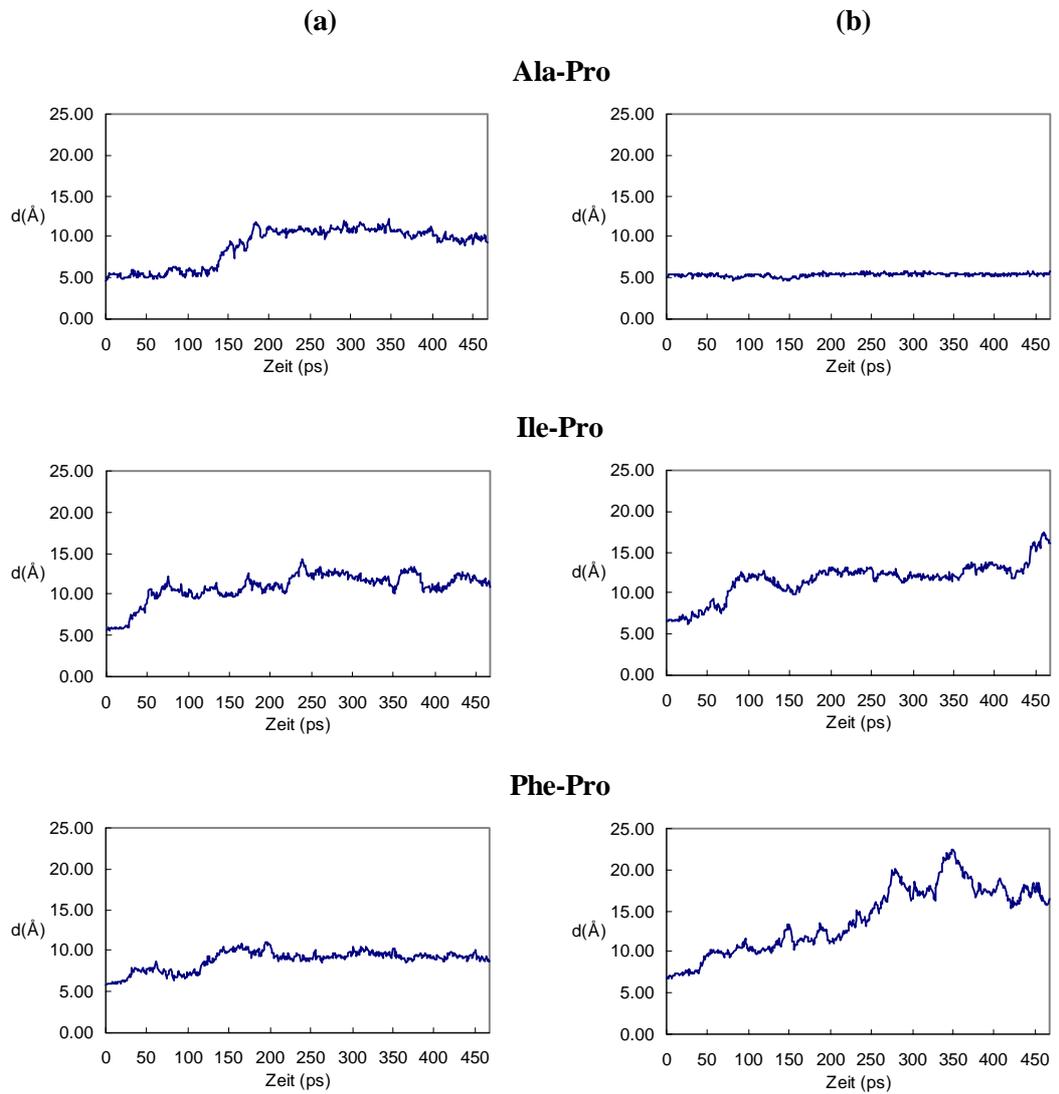


Abb. A6: Zeitlicher Verlauf der Änderungen der Abstände der aromatischen Ringe des Calix[5]arens zum Mittelpunkt in den Wirt-Gast-Systemen; a) für *cis*- und b) für *trans*-Konformere

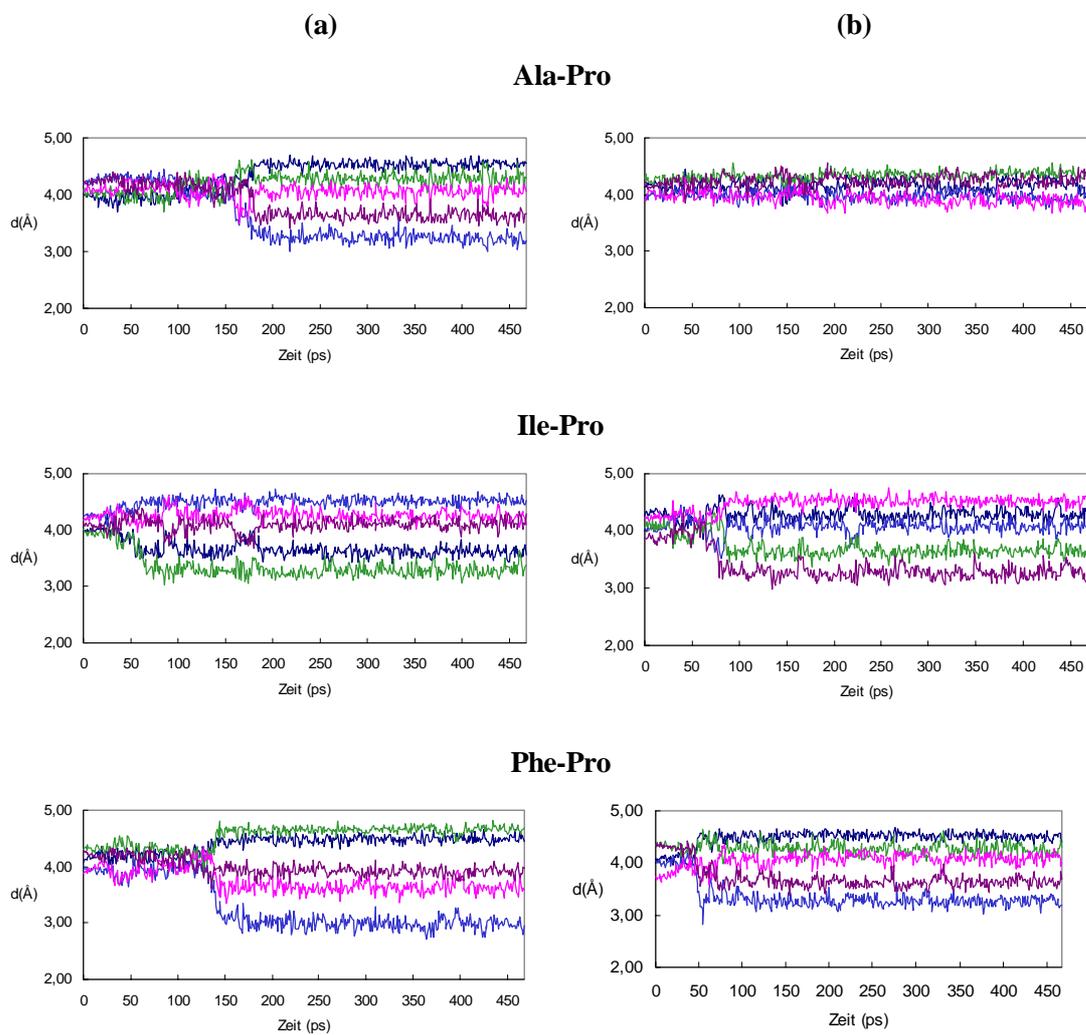


Abb. A7: Abstände der Ethersauerstoffatome vom Na⁺-Ion in Abhängigkeit der Simulationsdauer für die einzelnen Calix[5]aren-Systeme; a) *cis*-, b) *trans*-Konformere

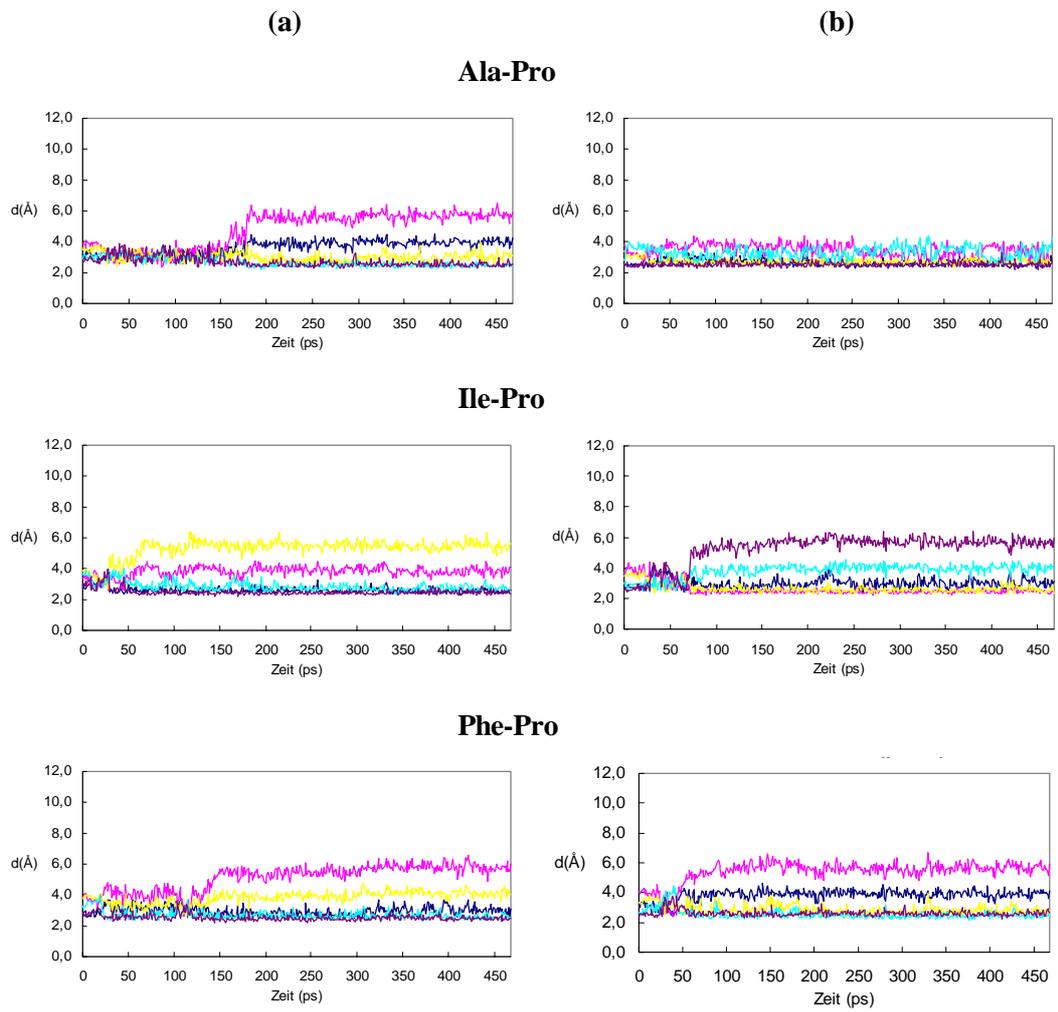


Abb. A8: Abstände der Carbonylsauerstoffatome vom Na⁺-Ion in Abhängigkeit der Simulationsdauer für die einzelnen Calix[5]aren-Systeme; a) *cis*-, b) *trans*-Konformere

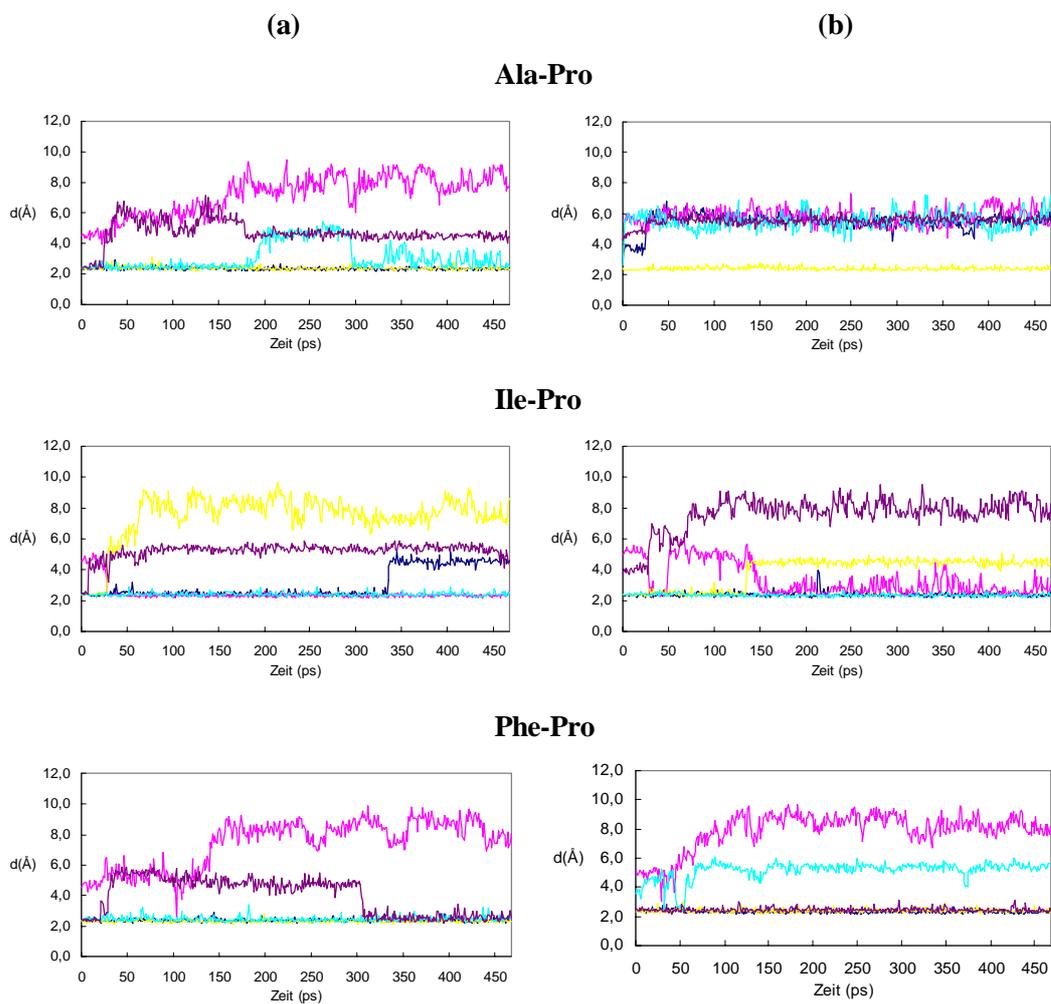


Abb. A9: Zeitlicher Verlauf der Änderungen der Abstände der Schwerpunkte der *cis/trans*-Konformere der Dipeptide (Xaa-Pro) vom Mittelpunkt der Ebene der Methylenkohlenstoffatome des Calix[6]arens; a) für *cis*- und b) für *trans*-Konformere

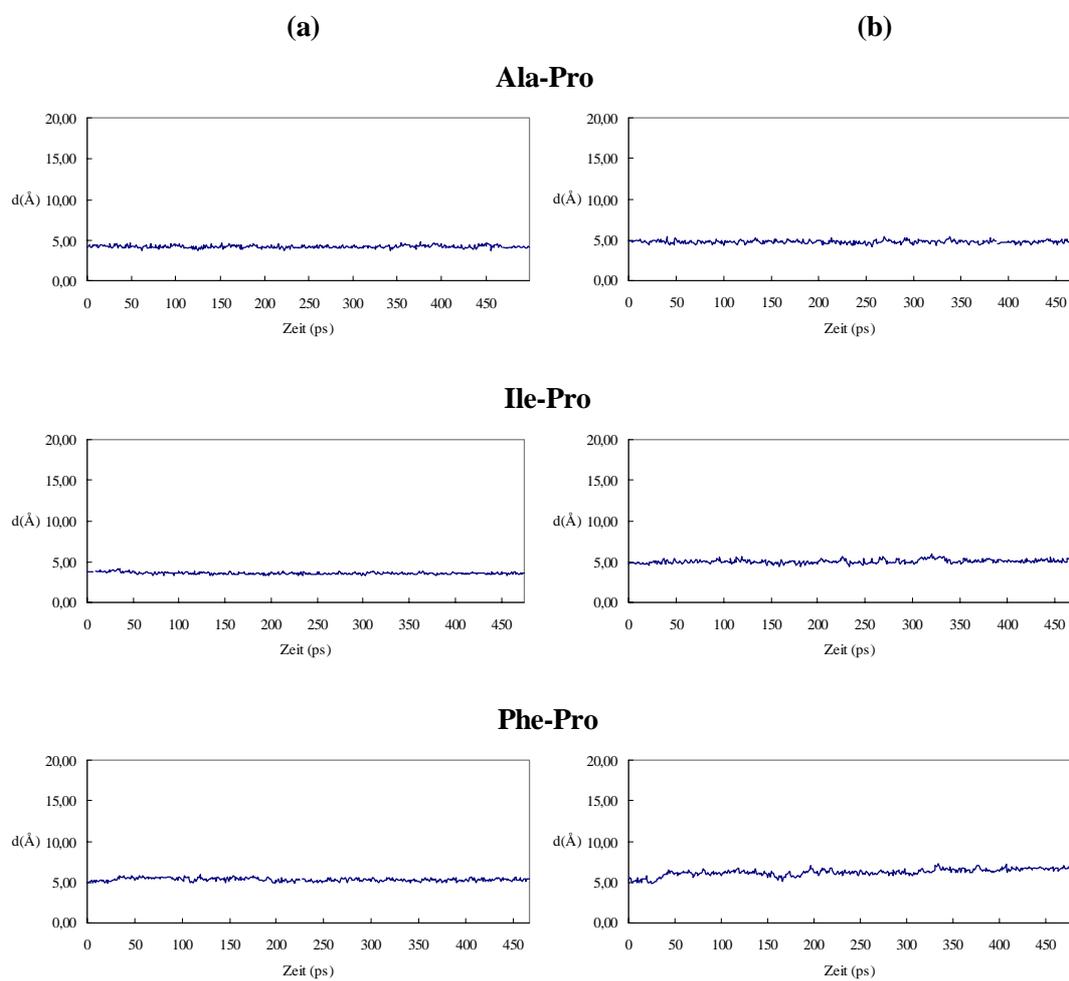


Abb. A10: Zeitlicher Verlauf der Änderungen der Abstände der aromatischen Ringe des Calix[6]arens zum Mittelpunkt in den Wirt-Gast-Systemen; a) für *cis*- und b) für *trans*-Konformere

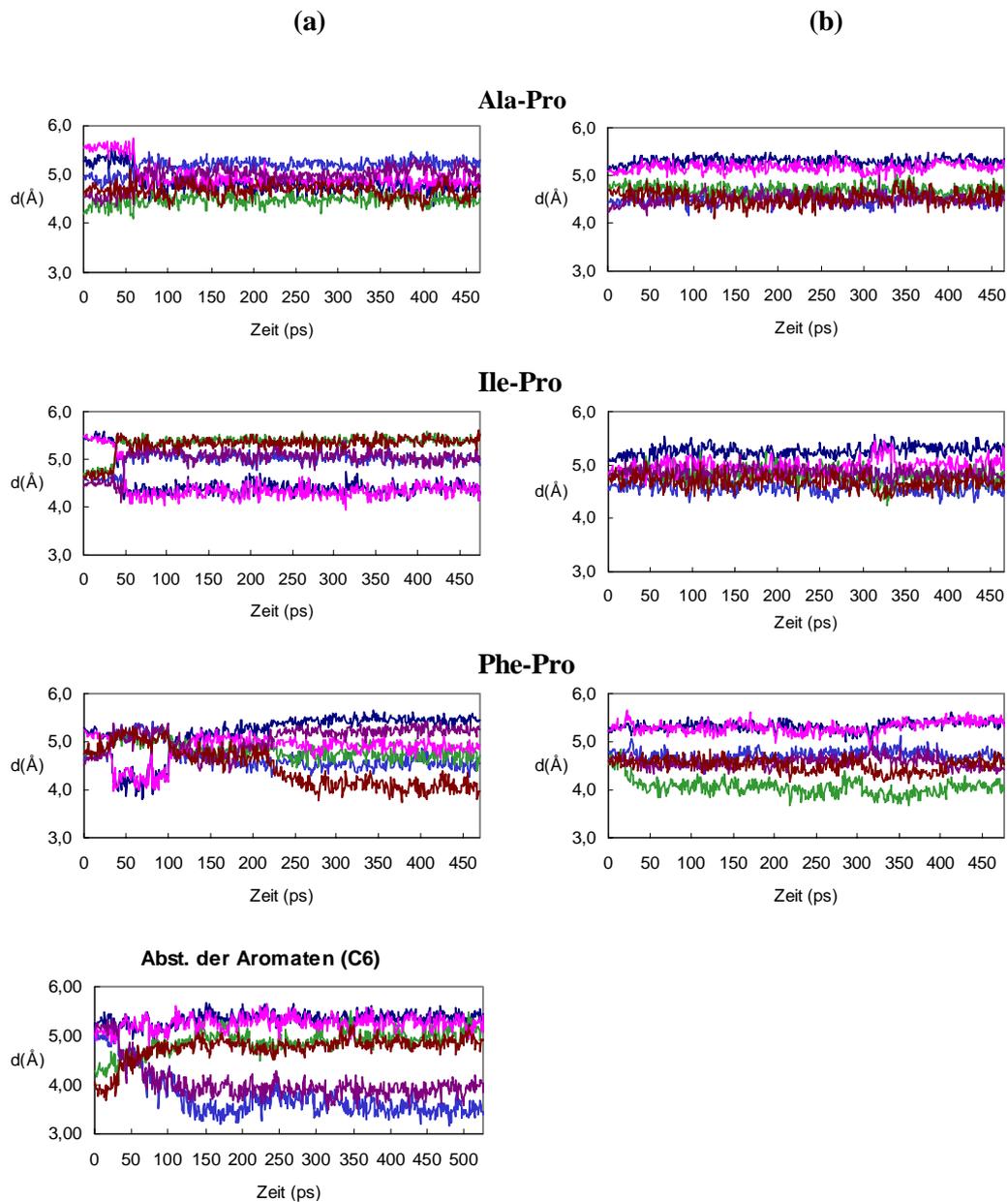


Abb. A11: Abstände der Ethersauerstoffatome vom Na⁺-Ion in Abhängigkeit der Simulationsdauer für die einzelnen Calix[6]aren-Systeme; a) *cis*-, b) *trans*-Konformere

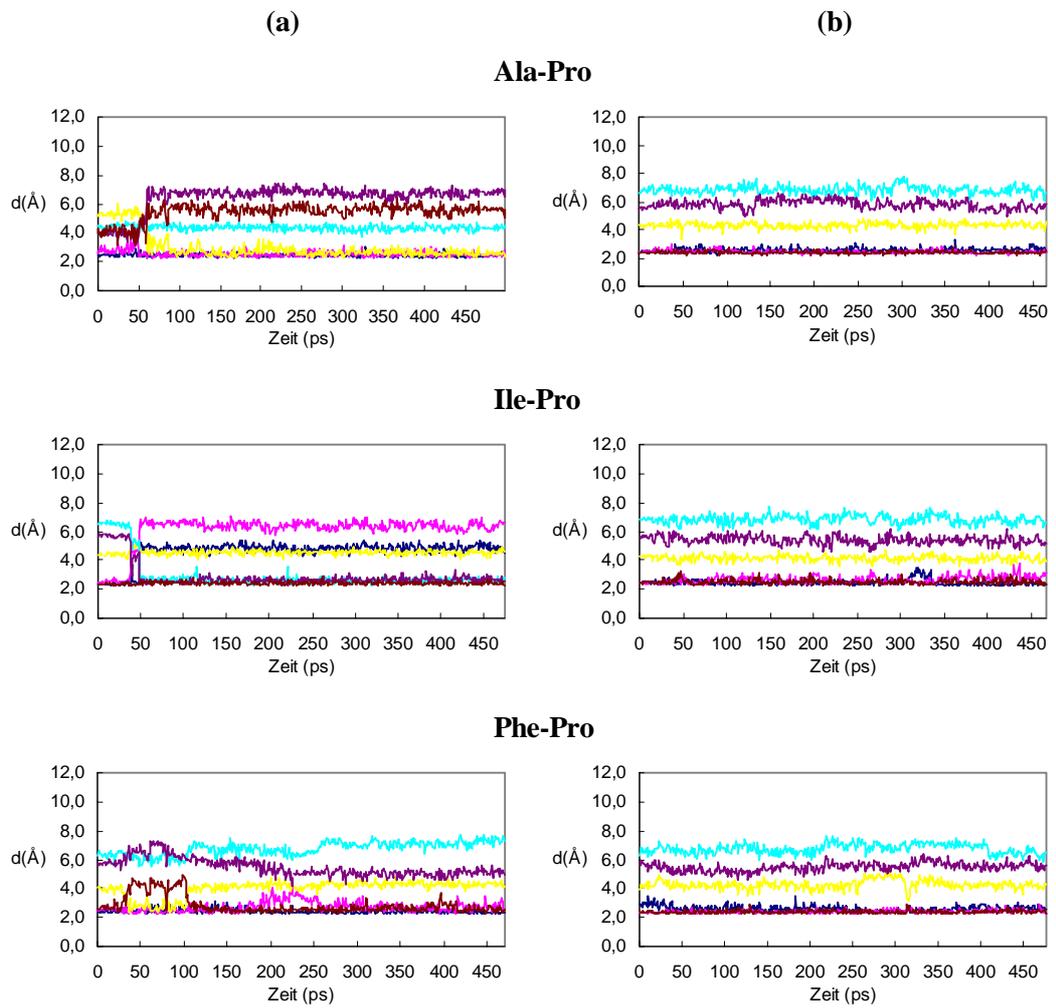
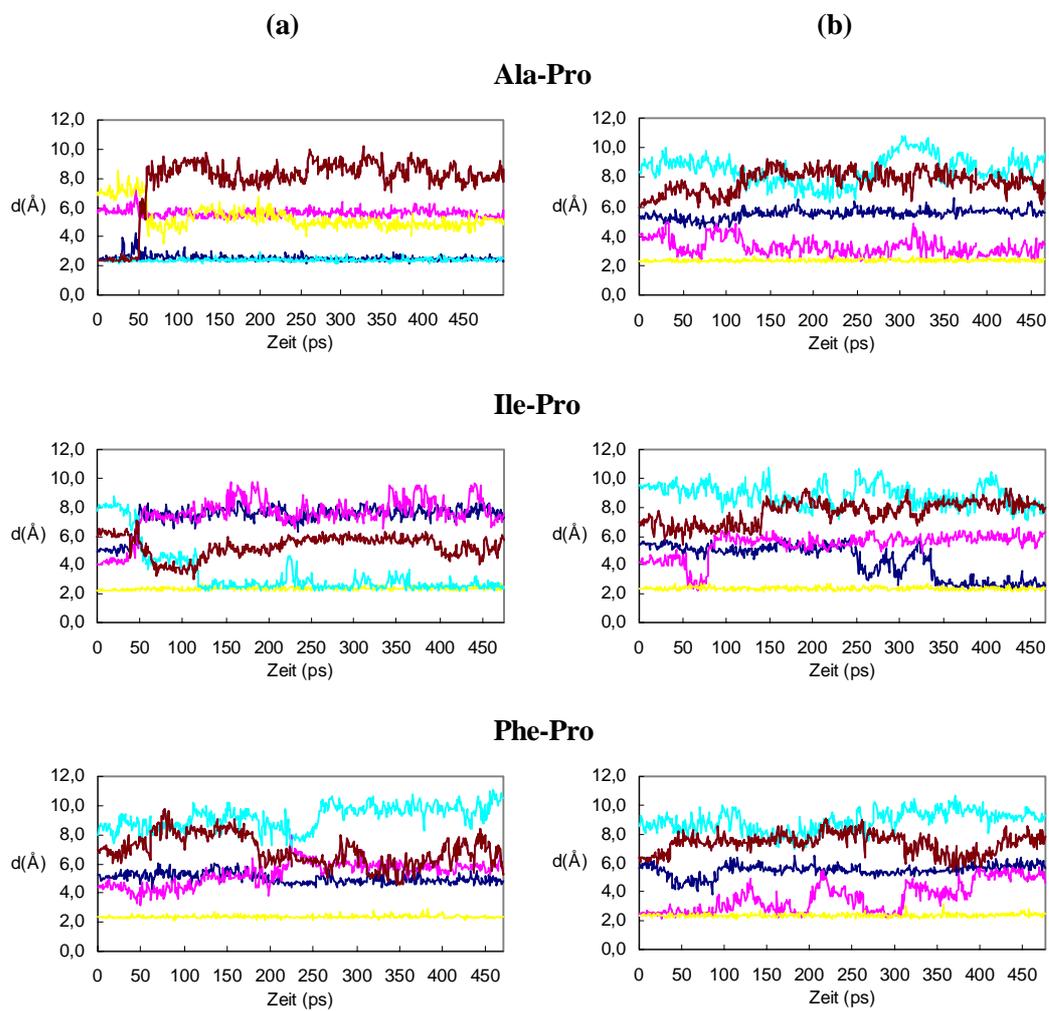


Abb. A12: Abstände der Carbonylsauerstoffatome vom Na⁺-Ion in Abhängigkeit der Simulationsdauer für die einzelnen Calix[6]aren-Systeme; a) *cis*-, b) *trans*-Konformere



Tab. A1: Durchschnittliche Totalenergien zur Berechnung der Komplexbildungsenergien ($\langle E_{\text{Komplex}} \rangle = \langle E_{\text{totWG}} \rangle - [\langle E_{\text{totG}} \rangle + \langle E_{\text{totW}} \rangle]$) in den Calix[6]-aren-Komplexen

Wirt- und Gastmoleküle	$\langle E_{\text{totG}} \rangle$	$\langle E_{\text{totW}} \rangle$	$\langle E_{\text{totWG}} \rangle$
C6		110,7	
C6/ <i>cis</i> -Ala-Pro	-54,4		-5,1
C6/ <i>trans</i> -Ala-Pro	-17,3		33,8
C6/ <i>cis</i> -Ile-Pro	-52,6		-16,7
C6/ <i>trans</i> -Ile-Pro	-8,8		38,7
C6/ <i>cis</i> -Phe-Pro	-56,2		-5,6
C6/ <i>trans</i> -Phe-Pro	-19,1		35,8

Tab. A2: Prolinhaltige Tetra- und Pentapeptide

Peptid		Abkürzungen
1	LLL	H-Pro-Phe-Pro-Gly-OH x HCl
2	LDL	H-Pro-D-Phe-Pro-Gly-OH
3	DDD	H-D-Pro-D-Phe-D-Pro-Gly-OH x HCl
4	DLL	H-D-Pro-Phe-Pro-Gly-OH x HCl
5	DDL	H-D-Pro-D-Phe-Pro-Gly-OH x HCl
6	DLD	H-D-Pro-Phe-D-Pro-Gly-OH x HCl
7	LLD	H-Pro-Phe-D-Pro-Gly-OH
8	LDD	H-Pro-D-Phe-D-Pro-Gly-OH x HCl
9	LLLD	H-Tyr-Pro-Phe-D-Pro-NH ₂ x HCl
10	LLLD	H-Tyr-Pro-Phe-D-Pro-Gly-OH x HCl
11	LLLL	H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-OH x HCl
12	LDLL	H-Tyr-D-Pro-Phe-Pro-NH ₂ x HCl
14	LLLL	H-Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂ x HCl
16	LLLD	H-Phe-Pro-Phe-D-Pro-Gly-OH x HCl
17	LLDL	H-Phe-Pro-D-Phe-Pro-Gly-OH x HCl
18	LLLL	H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂ x HCl
19	LLLL	H-Tyr-Phe-Phe-Pro-Gly-OH x HCl
13	LDLD	H-Tyr-D-Ala-Phe-D-Pro-NH ₂
15	LDLL	H-Tyr-D-Ala-Phe-Pro-NH ₂

Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1: Literaturübersicht über Calixarene in der analytischen Chemie
- Tab. 2: Strukturparameter der nativen und Calixaren-Kieselgele
- Tab. 3: C- und H-Gehalte sowie Oberflächenkonzentrationen der derivatisierten Kieselgele
- Tab. 4: Chromatographische Parameter für *cis/trans*-Isomere von Ala-Pro nach HPLC an verschiedenen Stationärphasen bei 4°C; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2); Fluß: 1 mL/min
- Tab. 5: Chromatographische Parameter für *cis/trans*-Isomere von Phe-Pro nach HPLC an verschiedenen Stationärphasen bei 4°C; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2)/ACN (93:7, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Tab. 6: Chromatographische Parameter für *cis/trans*-Isomere von Ile-Pro nach HPLC an verschiedenen Stationärphasen bei 4°C; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2)/ACN (95:5, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Tab. 7: Chromatographische Parameter für 17 α - und 17 β -Östradiol nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase; mobile Phase: s. Abb. 26
- Tab. 8: Chromatographische Parameter für *o*-, *m*-, *p*-Nitroanilin nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase; mobile Phase: s. Abb. 27
- Tab. 9: Chromatographische Parameter für *o*-, *m*-, *p*-Dihydroxybenzen nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase; mobile Phase: s. Abb. 28
- Tab. 10: Retentionsreihenfolgen ausgewählter, disubstituierter aromatischer Verbindungen nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der RP 18-Phase
- Tab. 11: Chromatographische Parameter für 5MU und 6MU nach HPLC an den [n]Aren-Phasen; mobile Phase: s. Abb. 30
- Tab. 12: Chromatographische Parameter für Ceramide III und IV nach HPLC an den [n]Aren-Phasen und der Si 60 Phase; mobile Phase: s. Abb. 33
- Tab. 13: Chromatographische Parameter für C₆₀ und C₇₀ Buckminsterfullerene nach HPLC an den [n]Aren Si 100 Phasen; mobile Phase: s. Abb. 35
- Tab. 14: Chromatographische Parameter für C₆₀ und C₇₀ Buckminsterfullerene nach HPLC an den [n]Aren Si 300 Phasen; mobile Phase: s. Abb. 36

-
- Tab. 15: Durchschnittliche Wechselwirkungsenergien [kcal/mol] zwischen Calix[4]-aren (C4) und Dipeptiden in Wasser
- Tab. 16: Durchschnittliche Abstände der Schwerpunkte der gegenüberliegenden Phenylringe, der phenolischen und Carbonylsauerstoffatome zum Na^+ in [Å]; durchschnittliche Wechselwirkungsenergien von Calix[4]aren mit Na^+ sowie durchschnittliche Solvatationsenergien für Na^+ in [kcal/mol]
- Tab. 17: Durchschnittliche Abstände der phenolischen und Carbonylsauerstoffatome zum Na^+ in [Å]; durchschnittliche Wechselwirkungsenergien von Calix[5]-aren mit Na^+ sowie durchschnittliche Solvatationsenergien für Na^+ in [kcal/mol]
- Tab. 18: Durchschnittliche Wechselwirkungsenergien [kcal/mol] der C6-Komplexe in Wasser sowie Energiedifferenzen in Bezug auf die geringste Komplexierungsenergie
- Tab. 19: Durchschnittliche Abstände der phenolischen und Carbonylsauerstoffatome zum Na^+ in [Å]; durchschnittliche Wechselwirkungsenergien von Calix[6]-aren mit Na^+ sowie durchschnittliche Solvatationsenergien für Na^+ in [kcal/mol]

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: Calix[n]arene (n = 4-8) in zwei- und dreidimensionaler Darstellung
- Abb. 2: Röntgenkristallstrukturen von *p-tert*-Butylcalix[n]aren (n = 4, 5, 6, 8) mit lipophilen Connolly-Oberflächen (Ansicht von oben)
- Abb. 3: Konformationen des Calix[4]arens
- Abb. 4: Na⁺-Komplex eines Tetraester-Derivates
- Abb. 5: Strukturänderung eines *p-tert*-Butylcalix[4]arentetraester-Derivates von einer zweizähligen zu einer vierzähligen Symmetrieachse durch Komplexierung von Na⁺ (Ansicht von oben)
- Abb. 6: Röntgenkristallstruktur des *p-tert*-Butylcalix[5]arenpentaessigsäureethyl-esters (BARRETT et al., 1993)
- Abb. 7: *winged*- (a) und *pinched*-Konformation (b) von *p-tert*-Butylcalix[6]aren (LÜNING et al., 1998)
- Abb. 8: Röntgenkristallstruktur einer *1,2,3-alternate*-Konformation des Natriumsalzes von Calix[6]aren-*p*-sulfonsäure (ATWOOD et al., 1992). Links: Ansicht von oben; rechts: Seitenansicht
- Abb. 9: *pleated-loop*- (a) und *pinched*- (b) Konformationen des *p-tert*-Butylcalix[8]arens
- Abb. 10: Differentielle Porengrößenverteilung für [n]Aren Si 100 und natives Si 100 Kieselgel
- Abb. 11: Differentielle Porengrößenverteilung für [n]Aren Si 300 und natives Si 300 Kieselgel
- Abb. 12: ²⁹Si CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 100 Kieselgele
- Abb. 13: ²⁹Si CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 300 Kieselgele
- Abb. 14: ¹³C CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 100 Kieselgele
- Abb. 15: ¹³C CP/MAS NMR-Spektren der [n]Aren Si 300 Kieselgele
- Abb. 16: *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidylprolinbindung (FISCHER, 1994)
- Abb. 17: Verteilung der Konformere zwischen mobiler und stationärer Phase (KÁLMÁN et al., 1996)
- Abb. 18: HPLC von Ala-Pro bei 4°C an verschiedenen Stationärphasen; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 19: HPLC von Phe-Pro bei 4°C an verschiedenen Stationärphasen; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2)/ACN (93:7, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 20: HPLC von Ile-Pro bei 4°C an verschiedenen Stationärphasen; mobile Phase: 0,02 M NH₄H₂PO₄ (pH 6,2)/ACN (95:5, v/v); Fluß: 1 mL/min

- Abb. 21: $^1\text{H-NMR}$ Spektren der fraktionierten Isomere von Phe-Pro bei 4°C in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (95:5, v/v): a) *trans*-Konformer und b) *cis*-Konformer
- Abb. 22: Einfluß von Na^+ - (a) und NH_4^+ - (b) Ionen auf den Trennfaktor α während der HPLC von Ala-Pro in Abhängigkeit vom Acetonitril-Gehalt
- Abb. 23: Einfluß von Na^+ - (c) und NH_4^+ - (d) Ionen auf den Trennfaktor α während der HPLC von Phe-Pro in Abhängigkeit vom Acetonitril-Gehalt
- Abb. 24: Einfluß von Na^+ - (e) und NH_4^+ - (f) Ionen auf den Trennfaktor α während der HPLC von Ile-Pro in Abhängigkeit vom Acetonitril-Gehalt
- Abb. 25: Strukturformeln von 17α - (*trans*) und 17β -Östradiol (*cis*)
- Abb. 26: HPLC von 17α - (1) und 17β -Östradiol (2) an [n]Aren und RP 18; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 /Methanol (40:60, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 27: HPLC von Nitroanilinen an [n]Aren und RP 18; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 /Methanol (60:40, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 28: HPLC von Dihydroxybenzenen an [n]Aren und RP 18; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 /Methanol (70:30, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 29: Strukturen ausgewählter Uracil-Derivate
- Abb. 30: HPLC von Uracil und methylierten Uracil-Derivaten an [n]Aren; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 (pH 3,0); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 31: HPLC von Uracil und methylierten Uracil-Derivaten an RP 18- und α -, β -, γ -CD-Phasen; mobile Phase: 0,02 M NaH_2PO_4 (pH 3,0); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 32: Strukturen der untersuchten Lipide
- Abb. 33: HPLC von ausgewählten Lipiden an [n]Aren und Si 60; mobile Phase: n-Hexan/Ethanol (29:1); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 34: HPLC eines Extrakts der menschlichen Hornhaut an [6]Aren; mobile Phase: n-Hexan/ Ethanol (29:1); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 35: HPLC von C_{60} und C_{70} Buckminsterfullerenen an [n]Aren Si 100; mobile Phase: Methanol/Toluol (60:40, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 36: HPLC von C_{60} und C_{70} Buckminsterfullerenen an [n]Aren Si 300; mobile Phase: Methanol/Toluol (60:40, v/v); Fluß: 1 mL/min
- Abb. 37: *p-tert*-Butylcalix[4]aren/*cis*-Ala-Pro-Komplex in einer Wasserbox
- Abb. 38: Start- (a) und Endstruktur (b) der MD-Simulationen von $\text{C4}/\text{trans}$ -Ala-Pro (Seitenansicht)

Abb. 39: C_{4v} -symmetrische *cone*-Konformation im $C4/trans$ -Ala-Pro-Komplex (a) vor der MD und (b) nach der MD (Ansicht von oben)

Abb. 40: Start- (a) und Endstruktur (b) der MD-Simulationen von $C5/cis$ -Phe-Pro (Seitenansicht)

Abb. 41: Endstruktur der MD-Simulation des $C5/trans$ -Ala-Pro-Komplexes

Abb. 42: Startstruktur der MD-Simulation des $C6/cis$ -Ala-Pro-Komplexes

Abb. 43: *winged*-Konformation im $C6/trans$ -Ala-Pro-Komplex (a) vor der MD und (b) nach der MD (Ansicht von oben)

Publikationsverzeichnis

1. S. FRIEBE, S. GEBAUER, G.-J. KRAUSS, G. GÖRMAR, J. KRÜGER. *J Chromatogr Sci*, **1995**, 33, 281-284, "HPLC on calixarene bonded silica gels. I. Characterization and applications of the *p-tert*-butylcalix[4]arene bonded materials"
2. R. ARNECKE, V. BÖHMER, S. FRIEBE, S. GEBAUER, G.-J. KRAUSS, I. THONDORF, W. Vogt. *Tetrahedron Lett*, **1995**, 36, 6221-6224, "Regio- and diastereoselective condensation of resorcarenes with primary amines and formaldehyde"
3. S. GEBAUER, S. FRIEBE, G. GÜBITZ, and G.-J. KRAUSS. *J Chromatogr Sci*, **1998**, 36, 383-387, "HPLC on calixarene bonded silica gels. II. Separations of regio- and stereoisomers on *p-tert*-butylcalix[n]arenes"
4. S. GEBAUER, S. FRIEBE, G. SCHERER, G. GÜBITZ, and G.-J. KRAUSS. *J Chromatogr Sci*, **1998**, 36, 388-394, "HPLC on calixarene bonded silica gels. III. Separations of *cis/trans* isomers of proline containing peptides"
5. G.-J. KRAUSS, S. FRIEBE, and S. GEBAUER. *J. Protein Chemistry*, **1998**, 17, 515-516, "Cavity supported HPLC of *cis/trans* isomers of proline containing peptides using cyclodextrins and calixarenes"

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Universität oder Hochschule eingereicht.

Halle/Saale, Juli 1999

Sabine Gebauer

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Gebauer
Vorname:	Sabine
Geburtsdatum:	20.03.1970
Geburtsort:	Wolfen, Sachsen-Anhalt

Ausbildung

September 1976 - Juli 1986	Polytechnische Oberschule, Raguhn
September 1986 - Juli 1988	Abitur an der Erweiterten Oberschule „Ernst-Thälmann“, Bitterfeld
September 1988 - September 1992	Studiengang Chemie (Diplom) am Fachbereich Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Oktober 1992 - Juli 1993	Diplomarbeit am Institut für Biochemie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
November 1993 - Dezember 1996	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie <i>in dieser Zeit Forschungsaufenthalte:</i>
Mai 1995 - Juli 1995	am Institut für Pharmazeutische Chemie an der Karl-Franzens-Universität Graz (Österreich)
November 1995 - Dezember 1995	am Institut für Org. Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Januar 1997 - April 1998

wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe Molecular Modelling - Theoretische Wirkstoffbiochemie

Mai 1998 - Dezember 1998

wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physikalische Chemie des Fachbereiches Chemie

seit Januar 1999

wissenschaftliche Mitarbeiterin am University College, Cork (Irland)

Halle/S., Juli 1999