

Johannes Sebastian Hägele

**Enantiomerentrennung mittels
Kapillarelektrophorese und
Kapillarelektrochromatographie**

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Magisters

an der naturwissenschaftlichen Fakultät der
Karl-Franzens-Universität Graz

Begutachter: Ao. Univ. Prof. Dr. Martin G. Schmid
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften

2010

Danksagung

Die folgende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Wissenschaften der Karl-Franzens-Universität im Fachbereich Pharmazeutische Chemie unter der Leitung von Ao. Univ. Prof. Dr. Martin G. Schmid durchgeführt.

Hierbei gilt mein ganz besonderer Dank diesem, da er mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit anzufertigen und mir dabei zu jedem möglichen Zeitpunkt mit fachlichem Rat, Diskussions- und Hilfsbereitschaft und Interesse am Geschehen zur Seite gestanden ist.

Mein weiterer Dank gilt der kompletten Arbeitsgruppe, insbesondere Mag. Stefan Mohr und Ing. Kurt Plöschberger für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre.

Und natürlich danke ich meiner ganzen Familie, meiner Freundin Verena und all meinen Freunden - ohne euch hätt's sowieso nie geklappt!

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis.....	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Chiralität.....	12
1.1 Grundlagen der Stereochemie und chiraler Verbindungen	12
1.1.1 Geschichtliches	12
1.1.2 Stereochemische Grundlagen.....	13
1.2 Natürlich auftretende Chiralität.....	18
1.3 Chiralität in der Pharmazie	20
1.4 Zugang zu optisch reinen Verbindungen – Verfahren der Enantiomerentrennung.....	27
2 Getestete chirale Substanzklassen	30
2.1 α -Aminosäuren, Dansyl- α -Aminosäuren und N-2,4-Dinitrophenyl- α - Aminosäuren	30
2.2 α -Hydroxysäuren.....	34
3 Kapillarelektrophorese.....	36
3.1 Geschichtliches	36
3.2 Grundlagen der Kapillarelektrophorese.....	38
3.2.1 Physikalische Grundlagen.....	38
3.2.2 Der Elektroosmotische Fluss (EOF).....	41
3.3 Apparativer Aufbau	46
3.3.1 Kapillaren.....	46
3.3.2 Injektion	47
3.3.3 Detektion.....	48
3.3.4 Durchführungsarten der Kapillarelektrophorese.....	48
4 Das Prinzip des chiralen Ligandenaustausches in der Kapillarelektrophorese.....	51
5 Analytischer, experimenteller Teil.....	53
5.1 Chemikalien und Lösungen	53

5.2	Geräte und Apparaturen.....	53
5.3	Methode	53
5.4	Verwendete Parameter zur Beschreibung der Trennleistung in der LECE	55
5.5	Ergebnisse und Diskussion	57
5.5.1	L-Phenylalaninamid und L-Paraaminophenylalanin.....	57
5.5.2	L-Threonin	83
5.5.3	L-Ornithin	103
5.5.4	L-Lysin	111
6	Kapillarelektrochromatographie	121
6.1	Allgemeines	121
6.2	Präparativer und analytischer Teil.....	124
6.2.1	Chemikalien und Lösungen	124
6.2.2	Geräte und Apparaturen.....	124
6.2.3	Methode	124
6.2.4	Herstellung des monolithischen L-Phenylalaninamid-CBs.....	125
6.2.5	Ergebnisse und Diskussion	130
7	Zusammenfassung	133
	Anhang A: Strukturformeln der getesteten Racemate	136
A.1	Aminosäuren	136
A.2	Dansylierte Aminosäuren.....	136
A.3	N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren	137
A.4	α -Hydroxysäuren	137
	Anhang B: Geräte, Materialien, Substanzen, Reagenzien	139
B.1	Geräte und Materialien.....	139
B.2	Substanzen und Reagenzien	139
	Anhang C: Poster der Summer School 2010, Zagreb	141
	Literaturverzeichnis.....	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung isomerer Strukturen	13
Abbildung 2: Grundstruktur eines Enantiomerenpaares	15
Abbildung 3: DL-Milchsäure in der Fischerprojektion.....	16
Abbildung 4: (RS)-Milchsäure nach CIP	17
Abbildung 5: widersinnig gewundene Schnecken	18
Abbildung 6: Knöterich und Alpenveilchen.....	18
Abbildung 7: (RS)-Limonen	19
Abbildung 8: (RS)-Thalidomid	21
Abbildung 9: Structure-Activity-Relationship (SAR) der Adrenalinantimere am adrenergen Rezeptormodell.....	22
Abbildung 10: (RS)-Citalopram.....	23
Abbildung 11: (RS)-Ketamin.....	23
Abbildung 12: (RS)-Ofloxacin	24
Abbildung 13: (RS)-Bupivacain	25
Abbildung 14: (RS)-Omeprazol.....	26
Abbildung 15: Allgemeine Struktur einer α -Aminosäure, einer dansylierten α -Aminosäure und einer N-2,4-Dinitrophenyl- α -Aminosäure.....	30
Abbildung 16: Allgemeine Struktur einer α -Hydroxysäure	34
Abbildung 17: <i>Arne Tiselius</i> und der Aufbau seines ersten Versuchs	36
Abbildung 18: Einfluss der Reibungs- und der Beschleunigungskraft auf ein Ion unter dem Einwirken eines elektrischen Feldes	38
Abbildung 19: Entstehen des EOF in einer Quarzkapillare.....	41
Abbildung 20: Schematischer Aufbau der elektrischen Doppelschicht und der Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand der Kationen zur negativen Kapillaroberfläche	42
Abbildung 21: Darstellung eines durch den EOF und eines durch Druck entstehenden Flussprofils	43
Abbildung 22: Migrationsreihenfolge für Kationen, ungeladene Moleküle und den Anionen unter einem kathodischen EOF.	45
Abbildung 23: schematischer Aufbau einer CE-Apparatur.....	46
Abbildung 24: Hypothetische Kupferkomplexstrukturen zwischen L-Threonin und dem D- und L-Enantiomer einer α -Hydroxysäure.....	52
Abbildung 25: Entstehung diastereomer Metallmischkomplexe in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten.....	52
Abbildung 26: L-Phenylalaninamid und L-Paraaminophenylalanin	57
Abbildung 27: Chirale Trennung von Methionin mittels L-Paraaminophenylalanin- Kupfer-Komplexen	58
Abbildung 28: Chirale Trennung von Dns-Methionin mittels L-Phenylalaninamid- Zink-Komplexen.....	60

Abbildung 29: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen.....	62
Abbildung 30: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexes für die Modellsubstanzen Dns-Tryptophan und Dns-Methionin.....	63
Abbildung 31: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Methionin	64
Abbildung 32: Chirale Trennung von Dns-Methionin mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen.....	66
Abbildung 33: Chirale Trennung von gespiktem Dns-Methionin mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen	67
Abbildung 34: Chirale Trennung von Dns-Methionin, Dns-Phenylalanin und Dns-Tryptophan mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen	68
Abbildung 35: Chirale Trennung von Dns-Asparaginsäure mittels L-Phenylalaninamid-Cadmium-Komplexen	70
Abbildung 36: Unterschiede in der Auflösung R_s und der Affinität unterschiedlicher Zentralionen zu dansylierten Aminosäuren.....	71
Abbildung 37: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexes für die Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure	75
Abbildung 38: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexes für die Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure.....	76
Abbildung 39: Chirale Trennung von 3-Hydroxy-3-methoxymandelsäure mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen	79
Abbildung 40: Chirale Trennung von 3-(3-indolyl)-Milchsäure und 3-Hydroxy-3-methoxymandelsäure mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen	80
Abbildung 41: Chirale Trennungen von 3-(3-indolyl)-Milchsäure unter Verwendung verschiedener Zentralionen für den L-Phenylalaninamidkomplex	82
Abbildung 42: L-Threonin.....	83
Abbildung 43: Abhängigkeit der Auflösung R_s und des Trennfaktors α_{eff} von unterschiedlichen pH-Werten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure	84
Abbildung 44: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure.....	85
Abbildung 45: Chirale Trennung von p-Hydroxyphenylmilchsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen	87
Abbildung 46: Chirale Trennung von p-Hydroxyphenylmilchsäure, 3-Hydroxymandelsäure und 4-Bromomandelsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen	88
Abbildung 47: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen	90

Abbildung 48: Chirale Trennung von Dns-Glutaminsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen	91
Abbildung 49: Chirale Trennung von gespiktem Dns-Tryptophan mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen	92
Abbildung 50: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan.....	93
Abbildung 51: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan.....	94
Abbildung 52: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen	97
Abbildung 53: Chirale Trennung fünf dansylierter Aminosäuren in einem Lauf mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen.....	98
Abbildung 54: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan und p-Hydroxyphenylmilchsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen.....	100
Abbildung 55: Chirale „Doppeltrennung“ von Dns-Tryptophan mittels eines dualen Selektorsystems	102
Abbildung 56: L-Ornithin.....	103
Abbildung 57: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan und Dns-Phenylalanin mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen.....	105
Abbildung 58: Chirale Trennung von Phenylalanin mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen	107
Abbildung 59: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten und Gesamtmolaritäten des L-Ornithin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanzen 3-(3-indolyl)-Milchsäure und p-Hydroxyphenylmilchsäure	108
Abbildung 60: Chirale Trennung von 3-(3-indolyl)-Milchsäure mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen	110
Abbildung 61: L-Lysin.....	111
Abbildung 62: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Lysin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan	112
Abbildung 63: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Lysin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan.....	113
Abbildung 64: Chirale Trennung von gespiktem Dns-Methionin mittels D- und L-Lysin-Kupfer-Komplexen.....	116
Abbildung 65: Reinheitsprüfung von Dns-L-Tryptophan mittels D-Lysin-Kupfer-Komplexen	117
Abbildung 66: Chirale Trennung fünf dansylierter Aminosäuren in einem Lauf mittels L-Lysin-Kupfer-Komplexen	118
Abbildung 67: Chirale Trennung 3-(3-indolyl)-Milchsäure mittels L-Lysin-Kupfer-Komplexen	120
Abbildung 68: Schematischer Aufbau einer druckunterstützten CEC-Apparatur	122
Abbildung 69: Allylierung von Phenylalaninamid	125

Abbildung 70: Silanisierung der Kapillarenwand.....	127
Abbildung 71: Monomere und Polymerisationsstarterreagenzien des CBs	128
Abbildung 72: Reaktionsendprodukt im inneren der Kapillare.....	129
Abbildung 73: Chirale Trennung von 3-Hydroxymandelsäure mittels des L-Phenylalaninamid-CBs	131
Abbildung 74: Chirale Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure mittels des L-Phenylalaninamid-CBs.....	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Getestete α -Aminosäuren, dansylierten α -Aminosäuren und N-2,4-Dinitrophenyl- α -Aminosäuren	33
Tabelle 2: Getestete α -Hydroxysäuren	35
Tabelle 3: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Zink-Komplexen innerhalb einer Sequenz	59
Tabelle 4: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz	61
Tabelle 5: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen innerhalb einer Sequenz	65
Tabelle 6: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Cadmium-Komplexen innerhalb einer Sequenz	69
Tabelle 7: Trennergebnisse für N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen innerhalb einer Sequenz	73
Tabelle 8: Grober pH-Scan für α -Hydroxysäuren anhand der Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen.....	74
Tabelle 9: Trennergebnisse für α -Hydroxysäuren mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz	77
Tabelle 10: Trennergebnisse für α -Hydroxysäuren unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II) und Kobalt (II) mittels L-Phenylalaninamidkomplexen...	81
Tabelle 11: Grober pH-Scan für α -Hydroxysäuren anhand der Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen.....	84
Tabelle 12: Trennergebnisse für α -Hydroxysäuren mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz	86
Tabelle 13: Trennergebnisse für p-Hydroxyphenylmilchsäure unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) mittels L-Threoninkomplexen	89
Tabelle 14: Besterzielte Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen	96
Tabelle 15: Trennergebnisse für Dns-Tryptophan unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) mittels L-Threoninkomplexen	99
Tabelle 16: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz	104
Tabelle 17: Trennergebnisse für α -Aminosäuren mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz	106
Tabelle 18: Messwerte zur Stabilitätsprüfung der Elektrolytlösung des L-Lysin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan	114
Tabelle 19: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Lysin-Kupfer-Komplexen	115
Tabelle 20: Trennergebnisse für Dns-Tryptophan und Dns-Phenylalanin unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) mittels L-Lysin-Komplexen.....	119
Tabelle 21: Vorkonditionierung der 100 μ m ID Kapillare.....	126

Tabelle 22: Trennergebnisse der getesteten α -Hydroxysäuren mittels des L-Phenylalaninamid-CBs	130
--	-----

Abkürzungsverzeichnis

AA	amino acid
AHA	alpha hydroxy acid
AUC	area under the curve
CCB	chiral continuous bed
CE	capillary electrophoresis
CEC	capillary electrochromatography
CIP	Cahn, Ingold, Prelog
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CSP	Chiral Stationary Phase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Dns	dansyl
EMO	enantiomeric migration order
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ID	inner diameter
INN	International Nonproprietary Name
LE	ligand-exchange
LECE	ligand-exchange capillary electrophoresis
pI	isoelektrischer Punkt
SAR	structure-activity-relationship
SDS	Natriumdodecylsulfat

1 Chiralität

1.1 Grundlagen der Stereochemie und chiraler Verbindungen

Die Stereochemie ist heute zu einem der wichtigsten Teilgebiete der Chemie herangewachsen. Doch nicht nur in der Chemie, sondern auch in der Pharmazie, der Medizin, der Biologie und anderen Wissenschaften spielt diese aufgrund der von Natur aus auftretenden Chiralität der Grundbausteine jeglichen Lebens, eine bedeutende Rolle [1].

1.1.1 Geschichtliches [1-7]

Schon lange Zeit bevor Forscher Kenntnis über Molekülstrukturen hatten, beschäftigten sie sich mit diversen Phänomenen der Stereochemie. 1801 beobachtete *René-Just Haüy*, ein französischer Mineraloge, dass es spiegelsymmetrische Quarzkristalle gibt. Einige Jahre darauf fand *Jean-Baptiste Biot*, französischer Physiker und Mathematiker, heraus, dass manche Quarzkristalle die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht in verschiedene Richtungen drehen. Dieser war es auch der 1815 die optische Aktivität von Campher, Saccharose und Weinsäure feststellte. 1848 führte *Louis Pasteur*, französischer Chemiker und Bakteriologe, die erste Enantiomerentrennung am Racemat von Ammoniumnatriumtartrat durch. Dies geschah durch mühsame Handauslese der in ihrer Struktur entgegengesetzten Weinsäurekristalle unter dem Mikroskop. Er beobachtete zudem, dass die optische Aktivität dieser Salze in Lösung erhalten blieb. 1860 schloss er aufgrund seiner Beobachtungen daraus, dass die optische Aktivität dieser Kristalle eine molekulare Eigenschaft sein müsse, welche auf einer Spiegelbildlichkeit der Moleküle beruht. 1874 publizierten *Jacobus Henricus van't Hoff*, ein niederländischer Chemiker, und *Joseph Le Bel*, ein französischer Chemiker, unabhängig voneinander ihre Vorstellungen vom tetraedrischen Bau von Kohlenstoffverbindungen am Beispiel von Methan, welche die Vermutungen von *Pasteur* bestätigten. Dieser postulierte tetraedrische Bau erklärte zum ersten Mal das Vorkommen von Stoffen, deren Moleküle zwar dieselbe Konstitution, aber unterschiedliche Konfigurationen aufwiesen. Im Jahre 1884 führte *Sir William Thomson, Lord Kelvin of Largs*, erstmals den Begriff Chiralität für Moleküle, deren Konfigurationen spiegelbildlich zueinander

sind, ein. Er nannte eine geometrische Figur oder Gruppe von Punkten chiral, wenn ihr ideelles Spiegelbild nicht zur Deckung mit sich selbst gebracht werden konnte.

1.1.2 Stereochemische Grundlagen [1, 8-11]

Die Stereochemie befasst sich mit den Konsequenzen der dreidimensionalen Struktur von Verbindungen wie deren Reaktivität und Verhalten in chemischen Reaktionen. In der nachfolgenden Abbildung wird die Klassifizierung isomerer Strukturen dargestellt.

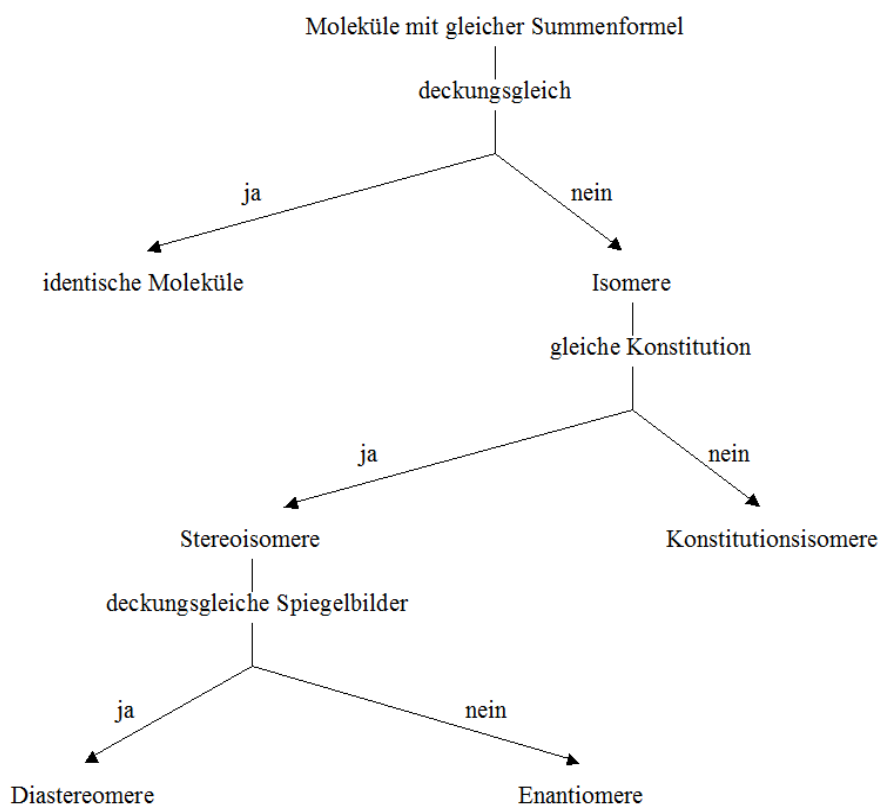


Abbildung 1: Klassifizierung isomerer Strukturen

Moleküle, welche die gleiche stöchiometrische Summenformel besitzen, also in der Art ihrer Atome und deren Anzahl identisch sind, aber unterschiedliche molekulare Strukturen besitzen, werden Isomere genannt. Aufgrund dieser unterschiedlichen Strukturen besitzen sie meist unterschiedliche physikalische und/oder chemische Eigenschaften. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Konstitution, Konfiguration oder ihrer Konformation. Besitzen diese nicht dieselbe Konstitution, also nicht dieselbe Aneinanderreihung der Atome und Arten von Verknüpfungen, werden sie als Konstitutionsisomere bezeichnet. Ist dies jedoch der Fall, so spricht man von Stereoisomeren. Diese besitzen eine gleiche Konstitution, sie unterscheiden sich jedoch

in ihrer Konfiguration oder ihrer Konformation, also in der dreidimensionalen Anordnung ihrer Atome im Raum. Die Gruppe der Stereoisomere lässt sich wiederum in zwei Untergruppen unterteilen. Lassen sich die Verbindungen zur Deckung bringen, so spricht man von Diastereomeren. Ist dies nicht der Fall, so spricht man von Enantiomeren.

Der Begriff Chiralität (griech. $\chi\epsilon\acute{\iota}\rho$ (*cheir*): Hand) bedeutet soviel wie „Händigkeit“ oder Spiegelbildlichkeit. In Anbetracht der Tatsache, dass sich unsere Hände ebenfalls wie Bild und Spiegelbild verhalten, wurde dieser Ausdruck 1884 von *Lord Kelvin* sehr passend gewählt. Dabei können verschiedene Arten von Chiralität unterschieden werden:

- Zentrale Chiralität: hier besitzen die Verbindungen Atome mit einem Satz von Substituenten, welche die räumliche Anordnung haben, dass sie mit ihrer spiegelbildlichen Anordnung nicht zur Deckung gebracht werden können. Die Form der zentralen Chiralität mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom tritt in chemischen Verbindungen am häufigsten auf. Aber auch andere vierbindige und tetraedisch koordinierte Atome wie zum Beispiel Stickstoff- oder Phosphoratome können ein Chiralitätszentrum sein.
- Axiale Chiralität und helicale Chiralität: dabei weisen die Verbindungen als stereogene Einheit eine Chiralitätsachse auf.
- Planare Chiralität: hier weisen die Verbindungen eine Chiralitätsebene auf.

Chiralität ist sowohl die Ursache als auch die notwendige und hinreichende Bedingung für das Auftreten von Enantiomeren. Bei Enantiomeren (griech. $\epsilon\nu\alpha\nu\acute{\iota}\omicron\varsigma$ (*enantios*): entgegengesetzt und $\mu\epsilon\rho\omicron\varsigma$ (*meros*): Teil) handelt es sich wie schon erwähnt um Verbindungen, welche sich wie Bild und Spiegelbild verhalten, nicht zur Deckung gebracht werden können und in achiraler Umgebung die gleichen physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften besitzen. Die Grundstruktur eines Enantiomerenpaares ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

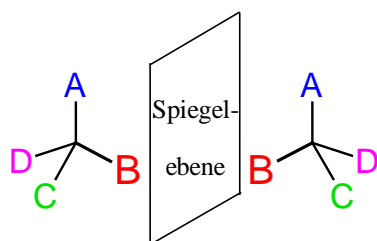


Abbildung 2: Grundstruktur eines Enantiomerenpaares

Das einzige physikalische Unterscheidungsmerkmal von Enantiomeren ist ihre optische Aktivität, also die Fähigkeit, die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht um einen bestimmten Winkel zu drehen. Dabei unterscheiden sie sich aber auch nur im Vorzeichen dieses Drehwertes, nicht in dessen Betrag. Ein äquimolares Gemisch zweier Enantiomere wird als Racemat bezeichnet. Racemat leitet sich vom lateinischen Namen der Traubensäure, *acidum racemicum* (lat. *racemus*: die Traube) ab, dem Racemat der Weinsäure, welches als erstes in seine Enantiomere getrennt wurde. Racemate sind stets optisch inaktiv, da sich die Drehwerte der Enantiomere zu Null addieren. Verbindungen mit einem chiralen Zentrum besitzen immer ein Paar an Enantiomeren. Falls eine Verbindung jedoch mehr als ein chirales Zentrum besitzt, so können 2^n Stereoisomere auftreten, wobei „n“ für die Anzahl von stereogenen Zentren steht. Dabei sind die Hälfte der dabei auftretenden Paare Enantiomere, die andere Hälfte sind Diastereomere, welche keine spiegelbildlichen Verbindungen darstellen. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser gleichen sich normalerweise nicht.

Für die Klassifizierung von Stereoisomeren gibt es dabei in der Stereochemie drei unterschiedliche Systeme.

Das erste Nomenklatorsystem für stereoisomere Verbindungen stellt das d/l oder (+)/(-)-System dar, durch welches die Richtung angegeben wird, in die die Verbindung linear polarisiertes Licht dreht. Enantiomere die das Licht nach links drehen werden linksrotatorisch genannt und erhalten den Deskriptor l oder (-). Drehen sie das Licht nach rechts, erhalten sie den Deskriptor r oder (+) und werden rechtsrotatorisch genannt. Entsprechend werden Racemate mit d/l oder (+)/(-) gekennzeichnet. Dieses System wird in der Chemie schon lange verwendet. Da aber die Drehung von linear polarisiertem Licht von vielen Faktoren, wie zum Beispiel vom verwendeten Lösungsmittel, abhängt, kann mit diesem System keine absolute Konfiguration einer Verbindung beschrieben werden.

Eine zweite Möglichkeit bietet das sogenannte D/L-System. Die Verbindung wird hier in der sogenannten Fischer-Projektion dargestellt. In dieser wird die Kohlenstoff-Hauptkette (längste Kohlenstoffkette) vertikal angeordnet. Das Kohlenstoffatom mit der höchsten Oxidationsstufe wird nach oben geschrieben und erhält die niedrigste Stellungsnummer. In der Fischer-Projektion zeigen die vertikalen Bindungen übereinkunftsgemäß in die Papierebene hinein, die horizontalen aus der Papierebene heraus. Es werden die Stereodeskriptoren D und L verwendet, wobei D hier für *dexter*, rechts und L für *laevus*, links steht. Racemate werden mit DL gekennzeichnet. Um diese jedoch zuzuordnen zu können, muss die Strukturformel der Verbindung in dieser speziellen Schreibweise dargestellt sein. Die betreffende Gruppe ist dann zum Beispiel L-konfiguriert, wenn sie in der Fischer-Projektion auf der linken Seite steht. Dieses Nomenklatorsystem wird heutzutage meist nur noch für Aminosäuren und Zucker verwendet.

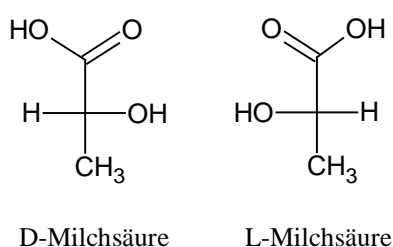


Abbildung 3: DL-Milchsäure in der Fischerprojektion

Die dritte Möglichkeit bietet das sogenannte CIP-Nomenklatorsystem (benannt nach den Begründern Cahn, Ingold und Prelog). Dieses ist das gängigste formale Verfahren zur Beschreibung der absoluten Konfiguration einer Verbindung, allein aus der Anordnung der Atome um eine stereogene Einheit. Es ist somit auch das einzige, mit welchem die absolute Konfiguration von Verbindungen mit mehreren Stereozentren dargestellt werden kann. Dabei werden die Substituenten am Chiralitätszentrum nach festgelegten Sequenzregeln geordnet und ihnen mittels einer Prioritätsreihenfolge ein Buchstabe (a-d) oder eine Zahl (1-4) verliehen. Die Priorität des Substituenten sinkt dabei mit abnehmender Ordnungszahl. Wenn sich am Chiralitätszentrum zwei Atome mit gleicher Ordnungszahl befinden, so müssen die nächsten Bindungssphären betrachtet werden, bis eine Entscheidung über die Priorität fällt. Besonderheiten in dieser Art der Nomenklatur zeigen sich darin, dass mehrfachgebundene Atome nach ihrer

Bindung vervielfacht werden, Isotope aufgrund ihrer Massenzahl unterschieden werden können und freie Elektronenpaare die fiktive Ordnungszahl null, also die niedrigste Priorität, erhalten. Nachdem die Prioritätsreihenfolge festgestellt werden konnte, wird das Chiralitätszentrum so betrachtet, dass das Atom mit der niedrigsten Priorität vom Betrachter weg orientiert ist. Nun stellt man die Reihenfolge der Substituenten von a über b bis c (1 über 2 bis 3) fest. Sind diese im Uhrzeigersinn angeordnet, so handelt es sich um ein (R)-konfiguriertes Stereozentrum. Sind sie gegen Uhrzeigersinn angeordnet, so ist das Stereozentrum (S)-konfiguriert. (R) steht hierbei für *rectus*, rechts und (S) für *sinister*, links. Dieses Verfahren ist am nachfolgenden Beispiel der (RS)-Milchsäure dargestellt.

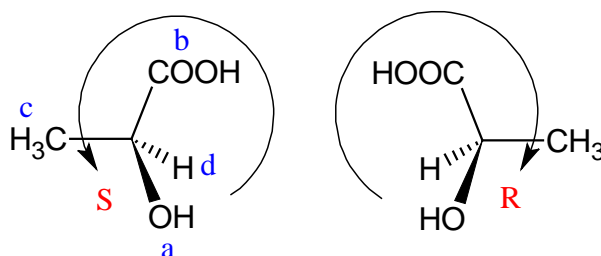


Abbildung 4: (RS)-Milchsäure nach CIP

1.2 Natürlich auftretende Chiralität [1, 12-15]

In der Natur existieren zahlreiche Objekte und molekulare Strukturen als Spiegelbilder. Nicht nur Hände oder die Füße des Menschen, sondern auch zum Beispiel Schneckenhäuser kommen als Spiegelbilder vor. Diese sind extrem häufig in der rechtsgängigen Form vorzufinden, während linksgängige nur sehr selten vorkommen. Dieses Phänomen wird als Homochiralität bezeichnet, was soviel bedeutet wie die „Bevorzugung einer chiralen Form“.



Abbildung 5: widersinnig gewundene Schnecken [12]

Auch viele Pflanzen weisen beim Wachstum eine helicale Chiralität auf. So zeigt die nächste Abbildung (Abb. 6, links) einen Knöterich, der an einem Bambusstab in einer linksgängigen Spirale hinaufwächst, dabei aber gleichzeitig um seine eigene Achse eine Rechtsdrehung ausführt.



Abbildung 6: Knöterich [13] und Alpenveilchen [13]

Weitere Beispiele für solch „chirale“ Pflanzen sind der Hopfen, welcher sich ausschließlich in einer Linksspirale windet oder das Alpenveilchen (Abb. 6, rechts), bei welchem die Blütenblätter vor deren Öffnung stets rechtshändig aufgerollt sind.

Ebenso vermitteln unsere Geruchs- und Geschmacksrezeptoren unter dem Einfluss verschiedener Enantiomere unterschiedliche Eindrücke. Von der Aminosäure Asparagin schmeckt das L-Enantiomer süß, wohingegen die D-Form keinen oder allenfalls einen schwach mehligem Geschmack besitzt. Im Falle von Phenylalanin schmeckt die D-Form süß, während L-Phenylalanin einen bitteren Geschmack aufweist. (R)-Carvon ist ein Geruchsstoff der Krauseminze, während (S)-Carvon in den ätherischen Ölen des Kümmels zu finden ist und diesem seinen typischen Geruch verleiht. Das Monoterpen (R)-Limonen besitzt einen typischen Geruch nach Orangen. Dessen S-Enantiomer dagegen riecht unangenehm minzig bis terpentinartig, in hohen Konzentrationen kann dabei unter dem intensiven Terpentingeruch auch ein schwaches Zitronenaroma empfunden werden.

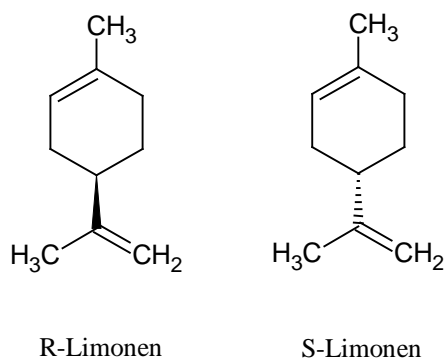


Abbildung 7: (RS)-Limonen

Zudem sind auch viele, für den lebenden Organismus wichtige, Stoffe chiral und lebenswichtige Makromoleküle werden aus chiralen Bausteinen aufgebaut. Die Gesamtheit all dieser Bausteine wird nach CIP als „pool of chiral building blocks“ bezeichnet. Beispiele für die von der Natur verwendeten Bausteine sind L-Aminosäuren welche zur Biosynthese von Peptiden und Proteinen benötigt werden, D-konfigurierte Monosaccharide, welche zur Synthese von Oligo- und Polysacchariden verwendet werden oder die DNA, welche als chirale Struktur eine Doppelhelix besitzt.

1.3 Chiralität in der Pharmazie [1, 10, 14, 17-21]

Vor allem in der Pharmazie spielt die räumliche Struktur von Molekülen eine enorm große Rolle. Da, wie in Kapitel 1.2 schon erwähnt, der menschliche Körper eine „chirale Umgebung“ darstellt, können auch pharmakologisch aktive Enantiomere in dieser unterschiedlich wirken. Sie treten verschiedenen chiralen Makromolekülen (so genannten „Targets“) wie Rezeptoren im Körper in Wechselwirkung und bilden mit diesen „diastereomere“ Addukte aus, welche energetisch unterschiedlich sind. Ob und wie stark diese Wechselwirkungen zwischen einem Arzneistoff und einem Target ablaufen spielt sowohl für die Pharmakodynamik als auch für die Pharmakokinetik eine entscheidende Rolle. Der aus der Pharmakologie stammende Begriff Eutomer bezeichnet dabei das stärker oder besser wirksame Enantiomer. Das andere Enantiomer wird Distomer genannt. Es ist bezogen auf den gewünschten Effekt weniger wirksam oder unwirksam. Dabei wird aber noch nichts über eventuell andere auftretende Wirkungen wie zum Beispiel einen Antagonismus oder zusätzlichen Agonismus zum Eutomer, Nebenwirkungen oder Toxizität ausgesagt. Über das eudismische Verhältnis, welches aus dem Quotienten der Wirkstärke des Eutomers zu der Wirkstärke des Distomers gebildet wird, kann eine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern stärker das Eutomer wirkt.

Racemische Arzneistoffe können somit als Kombinationspräparate angesehen werden, die zu 50 % eine „Verunreinigung“ enthalten. Selbst wenn das Distomer keinen nachteiligen Effekt hinsichtlich der Wirkung beinhaltet, muss es der Körper trotzdem metabolisieren und eliminieren, was für diesen eine zusätzliche Belastung darstellt. In den letzten Jahren wurden aufgrund dessen vermehrt reine Arzneistoffenantiomere auf den Markt gebracht, da dies in der Regel mit einer Qualitätsverbesserung der Therapie einhergeht.

Im restlichen Teil des Kapitels wird eine Auswahl an Arzneistoffenantiomeren anhand ihrer unterschiedlichen Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik, mit Ausnahme von Thalidomid, behandelt.

Das wohl bekannteste Beispiel für die unterschiedliche Wirkung von Enantiomeren ist das des Arzneistoffs Thalidomid, einem chiralen Phthalimidoglutarimid, welches in den frühen sechziger Jahren von der Firma Grünenthal unter dem Handelsnamen Contergan[®] entwickelt und vertrieben wurde. Der Vertrieb des Medikaments in

Deutschland entwickelte sich zur wohl größten Arzneimittelkatastrophe überhaupt. Das damals äußerst beliebte Sedativum und Schlafmittel, welches auch zur Bekämpfung der morgendlichen Übelkeit bei Schwangeren eingesetzt wurde, war die Ursache mehrerer tausend an Wirbelsäule und Gliedmaßen missgebildeter Neugeborener in den Jahren 1958 bis 1962.

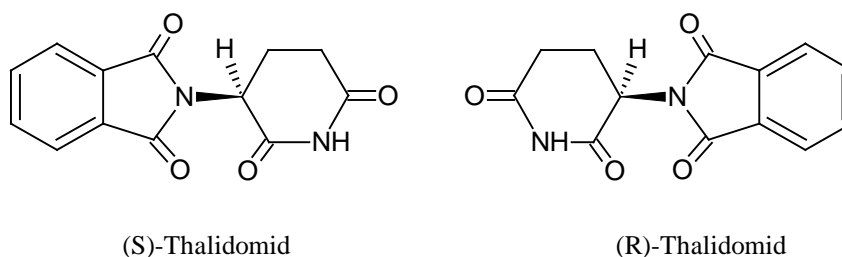


Abbildung 8: (RS)-Thalidomid

Der Grund dafür bestand darin, dass nur das (R)-Enantiomer für die positiven Eigenschaften der Substanz verantwortlich, das (S)-Enantiomer jedoch extrem teratogen ist. Doch selbst wenn diese Tatsache zum damaligen Zeitpunkt schon bekannt gewesen wäre, hätte die Verabreichung der enantiomerenreinen Form und nicht die des Racemats eine Trennung der therapeutischen von den unerwünschten Effekten verhindern können, da, aufgrund der sich in α -Position zum Chiralitätszentrum befindlichen Carbonylgruppe, die Racemisierungshalbwertszeit unter physiologischen Bedingungen bei nur ca. zwei Stunden liegt. Dies bestätigte sich auch bei der Wiedereinführung von Thalidomid zur Behandlung der Lepra in Brasilien 1993, wo wieder etliche Fälle von missgebildeten Kinder bekannt geworden sind.

1. Affinität von Enantiomeren an Rezeptoren: Ein Beispiel hierfür bietet Adrenalin (INN: Epinephrin), ein Hormon des Nebennierenmarks, welches über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stark blutdruck- und herzfrequenzsteigernd, bronchodilatierend, lipolytisch und glucoseliberierend wirkt. Die folgende Abbildung zeigt dafür Adrenalin am adrenergen Rezeptormodell.

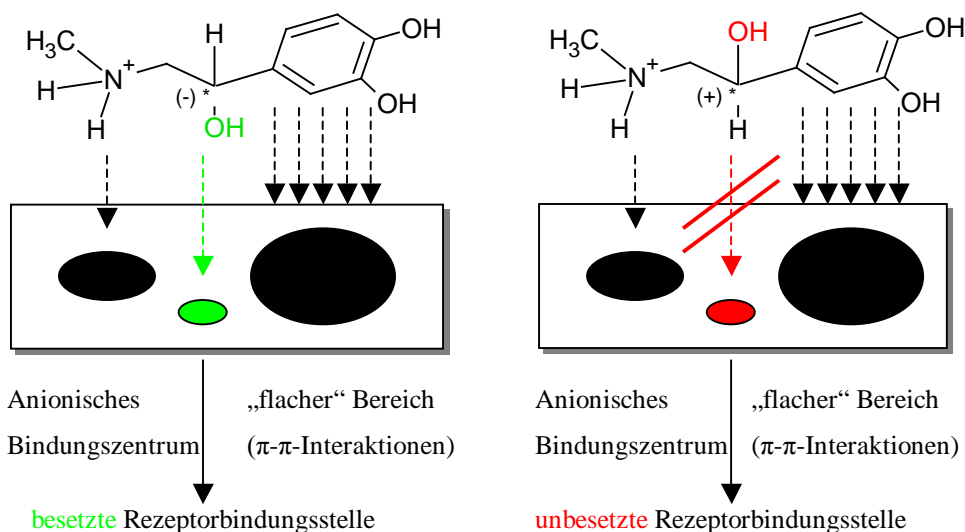


Abbildung 9: Structure-Activity-Relationship (SAR) der Adrenalinantimere am adrenergen Rezeptormodell

Daraus wird ersichtlich, dass das (R)-(-)-Enantiomer mit dem Rezeptor über drei Punkte interagieren kann, im Falle des (S)-(+)-Enantiomers sind nur zwei Interaktionen möglich. Die natürlichen, physiologischen Transmitter von Adrenalin weisen die (R)-(-)-Form auf. Die entsprechenden (S)-(+)-Enantiomere sind dabei 20- bis 50 mal weniger biologisch aktiv bzw. wirksam. Als weitere Beispiele für die unterschiedliche Wirkung von Enantiomeren an Rezeptoren können unter anderem das H₁-Antihistaminikum Cetirizin, bei dem die (R)-Form circa 33 mal stärker an peripheren H₁-Rezeptoren bindet oder Zopiclon, bei dem das (S)-Enantiomer circa 50 mal stärker an die Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptors bindet, genannt werden.

2. Unterschiedliche Interaktionen von Enantiomeren mit Transportsystemen: Das Antidepressivum Citalopram gehört im engeren Sinne zur Wirkstoffklasse der selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI).

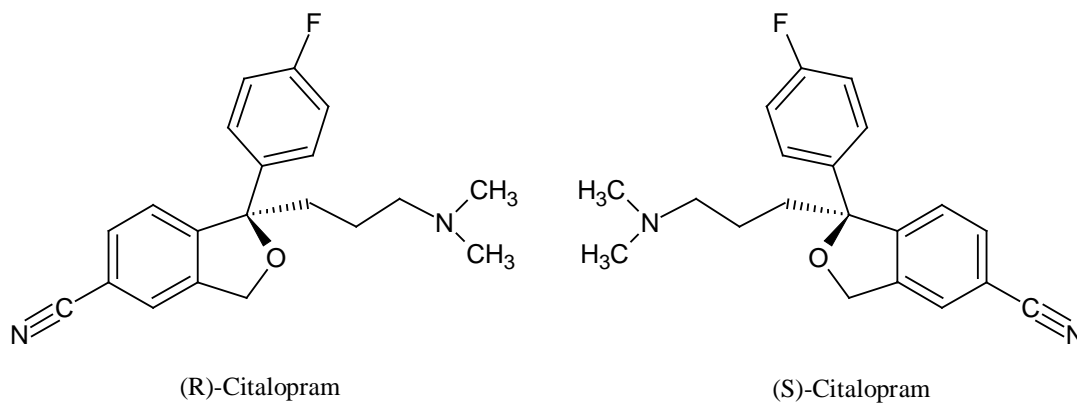


Abbildung 10: (RS)-Citalopram

Es entfaltet seine antidepressiven Effekte durch die selektive Hemmung der Wiederaufnahme von Serotonin in das präsynaptische Neuron wodurch dessen Konzentration im synaptischen Spalt steigt und damit seine Wirkung erhöht. Die Blockade der Serotonin-Wiederaufnahme wird durch Wechselwirkungen von Citalopram mit dem Serotonin-Transportprotein erreicht. Diese erfolgt stereoselektiv, wobei Escitalopram ((S)-Citalopram) circa 40 mal stärker an das Transportprotein bindet und auch 40 mal stärker wirkt als sein (R)-Enantiomer. Aus diesem Grund ist (R)-Citalopram auch nicht antidepressiv wirksam. Durch alleinige Applikation des S-Enantiomers kann sich in diesem Fall die Dosis halbieren lassen.

3. Unterschiedliche Rezepteselektivität von Enantiomeren: Das Narkosemittel Ketamin wird auf Grund seiner analgetischen Wirkkomponente bevorzugt für kurze, schmerzhaft Eingriffe sowie in der Notfallmedizin verwendet..

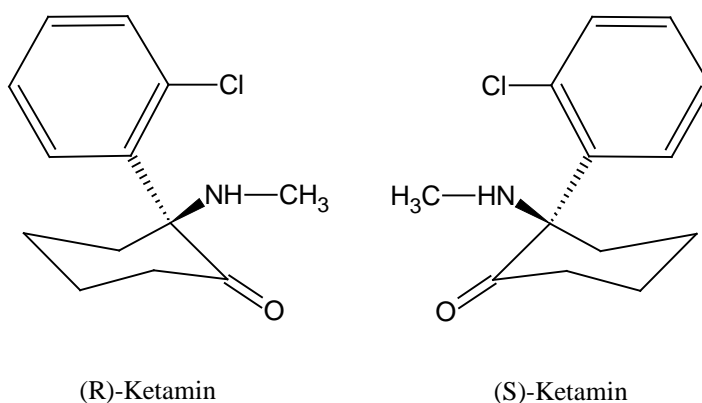


Abbildung 11: (RS)-Ketamin

Die anästhetischen und analgetischen Wirkungen beruhen vornehmlich auf der Blockade von NMDA-Rezeptoren, welche zur Gruppe der ligandgesteuerten Ionenkanäle gehören. Diese besitzen mehrere Bindungsstellen, wobei Ketamin im Inneren der Ionenkanalpore an der Phencyclidin-Bindungsstelle angreift. Die (S)-Form des Ketamins bindet hier circa 3 mal stärker als das (R)-Enantiomer. Dieser relativ geringe Affinitätsunterschied würde die Anwendung des reinen Eutomers nicht rechtfertigen. Zusätzlich besitzt das (S)-Enantiomer aber auch noch eine etwa dreifach höhere Affinität zu μ - und κ -Opioid-Rezeptoren, weshalb der analgetische Effekt etwas stärker ausfällt. Das schwächer wirksame (R)-Enantiomer zeigt dagegen eine höhere Affinität zu σ - Opioid-Rezeptoren. Mit der Aktivierung dieser werden unangenehme Träume, Halluzinationen während der Narkose, die Verwirrungs-zustände und das zunächst fehlende Erinnerungsvermögen während der Aufwachphase in Zusammenhang gebracht. Diese zusätzlichen, durch die unterschiedliche Affinität der Enantiomere zu den Opioid-Rezeptoren, hervorgerufenen Effekte erklären den Einsatz von reinen (S)-Ketamin als eigenständigen Arzneistoff.

4. Unterschiedliche Affinität von Enantiomeren zu Enzymen: Das Fluorochinolonantibiotikum Ofloxacin hemmt bakterielle Gyrasen (Typ-II-Topoisomerasen), welche die Superspiralisierung (supercoiling) der DNA nach der Zellteilung katalysieren.

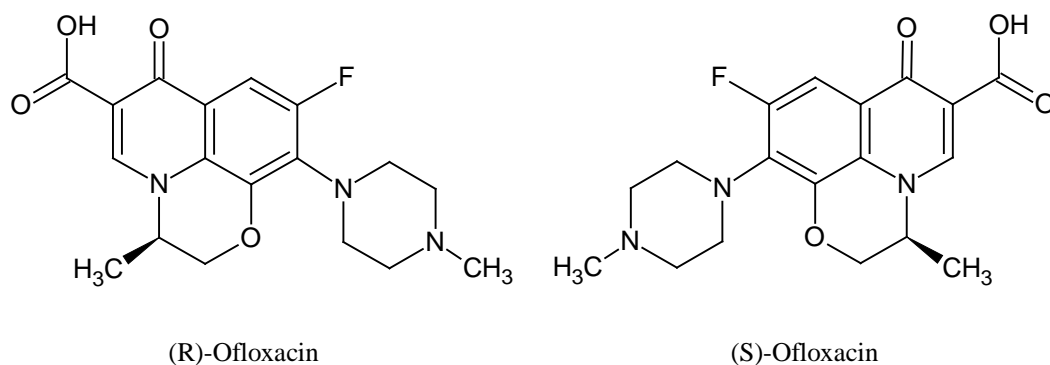


Abbildung 12: (RS)-Ofloxacin

Dabei spalten Gyrasen zuerst beide DNA-Einzelstränge, schieben dann ein anderes DNA-Doppelhelix-Segment durch die „Öffnung“ und verschließen die dabei entstandenen Bruchstellen wieder. Wird die Gyrase gehemmt, führt dies zum Absterben der Bakterien, da die DNA ihre normale biologische Funktion nur in einem adäquaten topologischen Zustand ausüben kann. Ofloxacin stellt in der Gruppe der Gyraseinhibitoren, in welcher die meisten nicht chiral sind, aufgrund

dessen eine Ausnahme dar. Das (S)-Enantiomer Levofloxacin, welches als eigenständiger Arzneistoff zugelassen ist, stellt das Eutomer dar, das die bakterielle Gyrase stärker inhibiert und weniger toxisch ist als sein (R)-Enantiomer. Es werden in der klinischen Praxis zwar vergleichbare Dosierungen von (S)-Ofloxacin und dem Racemat eingesetzt, Levofloxacin wirkt jedoch, je nach Keimart, in vitro 8- bis 128-mal stärker antimikrobiell als sein Diastomer.

5. Unterschiedliche Toxizitäten von Enantiomeren: Das Lokalanästhetikum Bupivacain, welches zur Anästhesie bei kleineren und größeren chirurgischen Eingriffen eingesetzt wird, unterbricht die Reizleitung in sensorischen und motorischen Nervenfasern indem es spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle (in höheren Konzentrationen auch K^+ - und Ca^{2+} -Kanäle) blockiert.

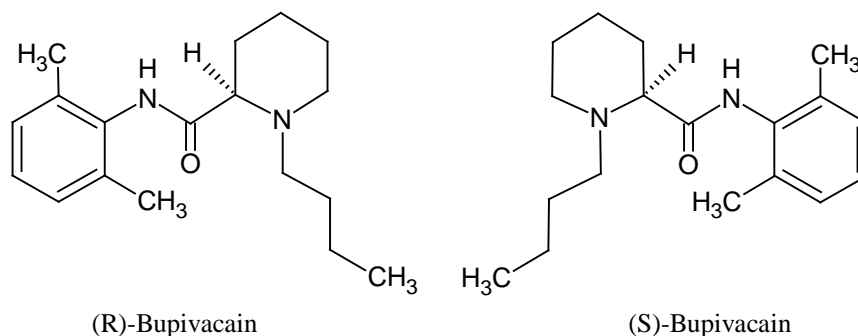


Abbildung 13: (RS)-Bupivacain

Gerät das Lokalanästhetikum jedoch auf irgend eine Art und Weise in den systemischen Kreislauf, so kann es zu folgenschweren (Neben-) Wirkungen kommen. Durch Blockade kardialer Na^+ -Kanäle, welche negativ inotrope und negativ chronotrope Wirkung mit sich bringen, kann ernsthafte Bradykardie und Blutdruckabfall bis hin zum Herzstillstand hervorgerufen werden. Mit der Einführung des enantiomerenreinen Arzneistoffs Levobupivacain wurde in diesem Fall nicht die Wirkung, sondern die Sicherheit verbessert. In diesem Beispiel entspricht das (S)-Enantiomer Levobupivacain in Stärke und Dauer des lokal-anästhetischen Effekts dem (R)-Enantiomer, mit dem Vorteil, weniger kardiale Nebenwirkungen aufgrund kürzer und schwächer Interaktion mit den Ionenkanälen hervorzurufen. Ein weiteres Beispiel für unterschiedliche Toxizitäten von Enantiomeren stellt Penicillamin dar. Während D-Penicillamin als Antirheumatikum und Antidot bei Schwermetallvergiftungen eingesetzt werden kann, ist L-

Penicillamin ausgesprochen toxisch, da es vom Körper nicht von proteinogenen Aminosäuren unterschieden werden kann.

6. Unterschiedliche Pharmakokinetik von Enantiomeren: Der Protonenpumpenhemmer Omeprazol, welcher zur Behandlung von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren (Ulcus ventriculi und duodeni) sowie zur Behandlung der Refluxösophagitis eingesetzt wird, blockiert nach vorangegangener, nicht enzymatischer, Bioaktivierung das Enzym H^+/K^+ -ATPase, welches in den Belegzellen des Magens für die Sezernierung der Salzsäure in das Magenlumen verantwortlich ist, irreversibel.

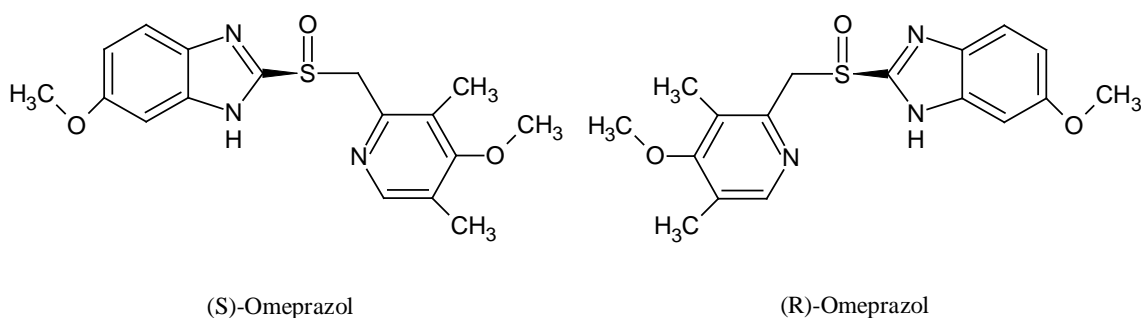


Abbildung 14: (RS)-Omeprazol

Im Omeprazol ist der Schwefel des Sulfoxids das Chiralitätszentrum. Bei der Bioaktivierung durch die Salzsäure der Belegzellen wird dieses zerstört und aus dem chiralen Sulfoxiden entsteht das gleiche, achirale Produkt (Sulfenamid). Der Unterschied der Enantiomere liegt hier in der stereoselektiven Biotransformation. Aus (S)- und (R)-Omeprazol entstehen drei unterschiedliche Hauptmetabolite, wobei die Gesamtmenge dieser bei (R)-Omeprazol etwa dreimal so hoch ist. Vergleicht man dabei eine Gabe gleicher Dosen von Omeprazol-Racemat und reinem (S)-Omeprazol, so erreicht letzteres eine größere AUC (area under the plasma concentration time curve), welche mit der Hemmung der Magensäuresekretion korreliert. (S)-Omeprazol wird langsamer inaktiviert und ausgeschieden und soll deshalb den pH-Wert des Magens über einen längeren Zeitraum als das Racemat erhöhen. Klinisch besitzt dies jedoch keine Relevanz, da Omeprazol-Racemat und Esomeprazol in gleicher Dosis verabreicht werden. Ein weiteres Beispiel hierfür wäre der als Racemat vertriebene Lipidsenker Ciprofibrat, bei welchem sich die Unterschiede der Pharmakokinetik ebenfalls in den Eliminationshalbwertszeiten widerspiegeln. Sie betragen für das (S)-Enantiomer ungefähr 24 h, für das (R)-Enantiomer dagegen ungefähr 100 h.

1.4 Zugang zu optisch reinen Verbindungen – Verfahren der Enantiomerentrennung [1, 22-25]

Wie aus Kapitel 1.3 ersichtlich wird, sind Verfahren, die zu enantiomerenreinen Produkten in der Pharmazie führen von größter Bedeutung und unumgänglich. Den idealen Weg um zu solchen zu gelangen, würde die sogenannte enantioselektive Synthese darstellen, bei welcher chirale oder prochirale Substanzen oder Reagenzien verwendet werden (asymmetrische Synthese, Synthese ausgehend von Substanzen des „pool of chiral building blocks“ oder Synthese ausgehend von synthetisch hergestellten chiralen Baustein). Diese ist jedoch nicht immer leicht durchführbar und teuer. Deshalb besitzen unterschiedliche Separationsverfahren für Enantiomere einen extrem hohen Stellenwert. Dabei können folgende Verfahren zum Einsatz kommen:

1. Spontane Kristallisation: Eine Möglichkeit stellt Auslese enantiomorpher, also in ihrer Struktur spiegelbildlicher, Kristalle dar, wie sie schon von *Pasteur* 1848 durchgeführt wurde. Da aber Racemformen meist auch als Racemat auskristallisieren kann diese Methode nur in Ausnahmefällen und selbst dann nur in bestimmten Temperaturbereichen angewandt werden. Sie ist sehr mühsam und nur möglich, wenn die Trennung der Enantiomere spontan während der Kristallisation eintritt und somit Konglomerate der Enantiomere entstehen.
2. Impfmethode: In diesem Separationsverfahren wird eine Lösung eines racemischen Stoffes mit Kristallen eines reinen Enantiomers angeimpft. Dabei entstehen nur Kristalle eines Enantiomers. Diese können aus der Mutterlauge abgetrennt werden, aus welcher dann das andere Enantiomer gewonnen werden kann. Diese Methode kann jedoch nur angewendet werden, wenn sich dabei keine Mischkristalle bilden.
3. Trennung über diastereomere Derivate: Dabei werden Racemate mit einer enantiomerenreinen Verbindung in diastereomere Derivate wie Salze oder Ester überführt. Aufgrund ihrer unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften können diese dann, zum Beispiel auf Grund unterschiedlicher Löslichkeiten, getrennt werden. Im Anschluss daran wird das Hilfsreagenz wieder freigesetzt und eine enantiomerenreine Verbindung erhalten.
4. Kinetische Racemattrennung: diese Möglichkeit beruht auf unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Enantiomere mit einem enantiomerenreinen Reagenz. Dabei werden häufig Enzyme verwendet. Im Idealfall ist die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enantiomers gleich Null, so dass die Reaktion nach 50 %

Umsatz aufhört. Das eine Enantiomer wird somit komplett zum Produkt umgesetzt, das andere Enantiomer bleibt unverändert zurück. In der Praxis jedoch muss man sich mit einem Kompromiss aus Umsatz und erzieltm Enantiomerenüberschuss zufrieden geben.

5. Biochemische Spaltung: In dieser Methode werden verschiedene Schimmelpilzarten und Bakterien verwendet. Diese verzehren beim Wachstum auf Nährböden nur eine optisch aktive Form. Bei dieser Form der Enantiomerentrennung muss jedoch berücksichtigt werden, dass eines der beiden Enantiomere verloren geht.
6. Instrumentelle Methoden: In den letzten drei Jahrzehnten haben sich zusätzlich zu den klassischen Methoden chromatographische und Elektromigrationstrenntechniken behaupten können. Für chromatographische Methoden wie Gaschromatographie (GC), Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), Überkritische-Fluidchromatographie (SFC) und Dünnschichtchromatographie (TLC) wurden verschiedene chirale Trenntechniken entwickelt. Als noch jüngere, aber sehr gute und alternative Methoden sind die Kapillarelektrophorese (CE) und die Kapillarelektrochromatographie (CEC) anzusehen. Einige chirale chromatographische Trenntechniken wurden erfolgreich auf diese übertragen. Das Hauptanwendungsgebiet der instrumentellen Trenntechniken liegt in Analytik. Sie werden zum Beispiel für Reinheitskontrollen in der Synthese von enantiomerenreinen Arzneistoffen, Überprüfung von Racemisierungsprozessen, pharmazeutischen Qualitätskontrollen oder pharmakokinetischen Studien verwendet.

Dabei können innerhalb der instrumentellen Methoden zwei Arten der Enantiomerentrennung unterschieden werden:

- zum einen die direkte Trennung, bei welcher ein chiraler Selektor direkt in die mobile Phase gegeben wird oder mittels Adsorption oder kovalenter Bindungen des Selektors an der stationären Phase sogenannte chirale stationäre Phasen (CSP) erzeugt werden.
- zum anderen die indirekte Trennung, bei welcher die Enantiomere mit einem chiralen Derivatisierungsreagenz (zum Beispiel einem fluoreszierenden zur Erhöhung der Sensibilität der Detektion) umgesetzt und aufgrund der sich bildenden Diastereomerenpaare trennen lassen.

Nachteile der indirekten Trennung sind der zusätzliche Derivatisierungsschritt, dass das Derivatisierungsreagenz optisch rein vorliegen muss und dass Racemisierungs-

prozesse während der Reaktion nicht stattfinden dürfen. Es muss dabei jedoch berücksichtigt werden, dass viele Probleme mittels indirekter Trennung gelöst werden können, zu welchen direkte Trennmethode nicht in der Lage sind.

Der Grund, warum mittels dieser Methoden eine chirale Trennung geschieht, wird am besten über das Drei-Punkt-Kontaktmodell von C. E. Dalglish [24] beschrieben. Es beinhaltet, dass zwischen Selektor und Analyt drei Interaktionen vorhanden sein müssen, wobei mindestens eine davon stereoselektiv sein muss. Dieses kann auf die meisten chiralen Trennprinzipien angewendet werden. Mögliche Wechselwirkungen zwischen dem Selektor und dem Analyten können dabei multiple Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol Wechselwirkungen, π -Donor- π -Akzeptor Wechselwirkungen (z.B. Pirkle-Type Phasen), ionische Wechselwirkungen (z.B. Kationen- oder Anionentauscher), chirale Metallkomplexe mit Ligandenaustausch, chirale Inklusionskomplexe (z.B. Cyclodextrine) oder Affinitäts-Wechselwirkungen (z.B. Proteine) sein.

2 Getestete chirale Substanzklassen

2.1 α -Aminosäuren, Dansyl- α -Aminosäuren und N-2,4-Dinitrophenyl- α -Aminosäuren [15, 19, 26-32]

Aminosäuren sind für den menschlichen Organismus von enormer Bedeutung, da sie als Proteinbausteine, Lieferanten biologisch aktiver Verbindungen sowie als Stoffwechselzwischenprodukte dienen. Ein Beispiel hierfür sind die durch Decarboxylierung von Aminosäuren entstehenden Amine, von denen einige als Signalstoffe wirken (biogene Amine). Aus Phenylalanin bzw. Tyrosin entstehen Catecholamine wie Adrenalin und Dopamin, Schilddrüsenhormone wie Thyroxin und Trijodthyronin und das Hautpigment Melanin.

Die allgemeine Struktur von α -Aminosäuren ist in nachfolgender Abbildung (1) dargestellt:

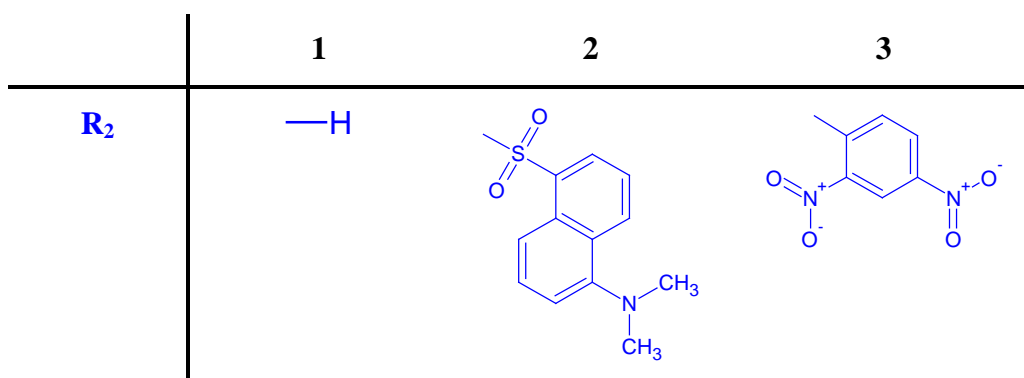
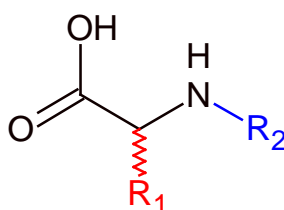


Abbildung 15: Allgemeine Struktur einer α -Aminosäure (1), einer dansylierten α -Aminosäure (2) und einer N-2,4-Dinitrophenyl- α -Aminosäure (3)

Alle α -Aminosäuren besitzen am α -C-Atom eine Aminogruppe, die unter physiologischen Bedingungen protoniert ist, und eine Carboxylgruppe, die deprotoniert vorliegt. Sie sind somit Ampholyte und besitzen als Zwitterionen einen isoelektrischen Punkt (pI), an welchem ihre Nettoladung gleich null ist. Der Rest R_1 steht für die spezifischen Seitenketten, die für die jeweiligen Eigenschaften der unterschiedlichen Aminosäuren und für das Entstehen der chiralen Zentren verantwortlich sind. 19 der 20 proteinogenen sowie die meisten nichtproteinogenen Aminosäuren gehören dabei der L-Reihe an. Lediglich Glycin, welches als Seitenkette ein H-Atom besitzt, ist nicht chiral. In Abbildung 15/(2) ist die allgemeine Struktur einer dansylierten α -Aminosäure dargestellt. Dabei wurde eine α -Aminosäure mit dem Fluoreszenzmarker Dansylchlorid (5-Dimethylaminonaphtalinsulfonylchlorid), welches mit primären Aminogruppen zu ihrem 1-Naphtylsulfonamid reagiert, umgesetzt. Die Methode ist zur Sequenzbestimmung von Peptiden und Proteinen geeignet. Dabei wird das Peptid bzw. das Protein nach der Umsetzung mit Dansylchlorid einer Säurehydrolyse unterzogen. Da die Sulfonamidbindung säurestabil und die Peptidbindung säurelabil ist, kann die Dansylrest tragende Aminosäure als die N-terminale identifiziert werden. Zudem können diese, aufgrund des eingebrachten Fluorophors, in extrem niedrigen Mengen (bis in den Nanogrammbereich) nachgewiesen werden. Abbildung 15/(3) zeigt die allgemeine Struktur einer N-2,4-Dinitrophenyl- α -Aminosäure. Dabei wurde eine α -Aminosäure mit dem so genannten Sanger's Reagenz DNFB (2,4-Dinitro-1-fluorbenzol) an der primären Aminogruppe umgesetzt. Dieses wird ebenfalls zur Sequenzbestimmung und der Identifizierung von Peptiden und Proteinen und zu einer Verbesserung der Detektion verwendet.

Die Aminosäuren lassen sich dabei aufgrund folgender Kriterien einteilen:

- nach ihren chemischen Eigenschaften: Diese gehen von ihrer Seitenkette aus, da die funktionellen Gruppen am α -C-Atom identisch sind. Man unterscheidet dabei Aminosäuren mit apolaren, aliphatischen (z.B. Leucin) oder aromatischen (z.B. Phenylalanin) Seitenketten, mit polaren, ungeladenen Seitenketten (z.B. Threonin) oder mit polaren, geladenen Seitenketten (z.B. Lysin). Dabei entspricht der Aufbau ihrer Seitenketten in etwa auch ihrer Löslichkeit. Apolare, aliphatische und aromatische Aminosäuren sind hydrophob, solche mit geladenen Seitenketten dagegen eher hydrophil und solche mit polaren, ungeladenen Seitenketten nehmen eine Zwischenstellung ein. Zudem können sie

anhand ihrer Seitenkette auch in saure, basische und neutrale Aminosäuren eingeteilt werden.

- nach ihrer Verwendung zur Proteinbiosynthese: Hier wird in proteinogene und nichtproteinogene Aminosäuren unterschieden. In der Natur kommen 20 proteinogene Aminosäuren vor, welche die Bausteine der von verschiedensten Lebewesen synthetisierten Proteine darstellen. Außer diesen sind noch mehrere hundert nichtproteinogene Aminosäuren beschrieben worden, die verschiedenste Stoffwechselfunktionen ausüben.
- nach der Fähigkeit des Körpers zu ihrer Biosynthese: Dabei werden die Aminosäuren in essentielle und nichtessentielle eingeteilt. Zu den essentiellen zählen Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Lysin, Methionin und Threonin. Diese können vom menschlichen oder tierischen Organismus nicht selbst synthetisiert werden und müssen infolgedessen mit der Nahrung aufgenommen werden.
- nach ihrer Funktion als Substrate der Gluconeogenese: Das Kohlenstoffskelett vieler Aminosäuren kann zur Gluconeogenese verwendet werden. Diese werden als sogenannte glucogene Aminosäuren bezeichnet. Ihnen kommt vor allem bei der Nahrungskarenz eine besondere Bedeutung zu. Nichtglucogene, auch als ketogene Aminosäuren bezeichnet, werden dagegen nach ihrer Zufuhr in größeren Mengen in Ketonkörper umgewandelt.

Anwendung finden Aminosäuren als:

- Grundbausteine der Peptidsynthese. Oligo- und Polypeptidhormone mit bis zu 40 Aminosäuren werden dabei durch diese aufgebaut und können in ihrer Struktur abgewandelt werden. Zahlreiche Peptidhormone sind industriell für die Anwendung in der Human- oder Tiermedizin synthetisch oder biotechnologisch zugänglich.
- enantiomerenreine Edukte in der Arzneistoffsynthese (Substanzen des „pool of chiral building blocks“)
- eigenständige Arzneistoffe (z.B. L-DOPA in Verbindung mit einem peripheren DOPA-Decarboxylaseinhibitor bei Morbus Parkinson oder D-Penicillamin bei Morbus Wilson)

- Bestandteile von Elektrolytlösungen zur parenteralen Ernährung oder zur Infusion

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von Aminosäuren stellt die sogenannte „Aminosäure-Uhr“ dar. Diese wird zur Altersbestimmung von Fossilien, die nicht älter sind als 100.000 Jahre eingesetzt. Sie beruht darauf, dass nach dem Tod eines Organismus die L-Aminosäuren beginnen zu racemisieren. Über den Prozentsatz an D-Aminosäuren können Rückschlüsse auf das Alter des Fundes gezogen werden.

In nachfolgender Tabelle sind die getesteten α -Aminosäuren, dansylierten α -Aminosäuren und N-2,4-Dinitrophenyl- α -Aminosäuren aufgeführt. Die chemischen Strukturen der einzelnen Substanzen sind in Anhang A, A.1-3 zu finden.

Tabelle 1: Getestete α -Aminosäuren, dansylierten α -Aminosäuren und N-2,4-Dinitrophenyl- α -Aminosäuren

<u>α-Aminosäuren</u>	<u>Dansyl-α-Aminosäuren</u>	<u>N-2,4-Dinitrophenyl-α-Aminosäuren</u>
DL-Tryptophan (Trp)	DL-Dns-Tryptophan (Dns-Trp)	DL-DNP-Phenylalanin (DNP-Phe)
DL-Methionin (Met)	DL-Dns-Leucin (Dns-Leu)	DL-DNP-Methionin (DNP-Met)
DL-Phenylalanin (Phe)	DL-Dns-Valin (Dns-Val)	DL-DNP-Citrullin (DNP-Citr)
DL-DOPA	DL-Dns-Glutaminsäure (Dns-Glut)	DL-DNP- α -Aminocaprylsäure (DNP-ACA)
	DL-Dns-Norvalin (Dns-NVal)	DL-DNP-Norleucin (DNP-NLeu)
	DL-Dns- α -Aminobuttersäure (Dns- α -ABA)	DL-DNP-Norvalin (DNP-NVal)
	DL-Dns-Methionin (Dns-Met)	DL-DNP-Glutaminsäure (DNP-Glut)
	DL-Dns-Asparaginsäure (Dns-Asp)	DL-DNP-Ethionin (DNP-Eth)
	DL-Dns-Norleucin (Dns-NLeu)	DL-DNP-Methioninsulfoxid (DNP-MetSO)
	DL-Dns-Phenylalanin (Dns-Phe)	
	DL-Dns-Threonin (Dns-Thre)	

2.2 α -Hydroxysäuren [15, 33-37]

α -Hydroxysäuren (AHA: alpha-hydroxy-acids) sind Carbonsäuren, die am α -C-Atom eine Hydroxylgruppe tragen. Sie besitzen chemisch betrachtet die Eigenschaften von organischen Säuren und Alkoholen.

Die allgemeine Struktur von α -Hydroxysäure ist in nachfolgender Abbildung dargestellt:

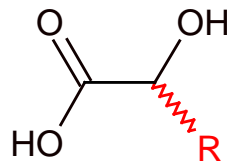


Abbildung 16: Allgemeine Struktur einer α -Hydroxysäure

Der Rest R steht für die spezifischen Seitenketten, die für das Entstehen der chiralen Zentren der α -Hydroxysäuren verantwortlich ist. Sie können in großen Mengen direkt aus tierischen und vor allem pflanzlichen Produkten (z.B. Fruchtsäuren) gewonnen werden. Zu den bedeutendsten α -Hydroxysäuren gehören die Milchsäure, an der die asymmetrische Synthese grundlegend erforscht wurde und die Weinsäure, deren Enantiomere von *Pasteur* bereits 1848 getrennt werden konnten.

Anwendung finden α -Hydroxysäuren als:

- enantiomerenreine Edukte in der Arzneistoffsynthese (Substanzen des „pool of chiral building blocks“)
- unter anderem als Permeationenhancer, Moisturizer oder zur Behandlung von Akne in der Dermatologie, Dermakosmetik und der Pflegekosmetik
- Antioxidationsmittel und Säuerungsmittel (z.B. Milchsäure)
- Herstellung von Säuglingsnahrung und „gut verträglichem“ Joghurt (spez. rechtsdrehende Milchsäure, da diese vom Körper besser verarbeitet werden kann)
- Antiseptika aufgrund bakterizider Wirkung im sauren Medium (z.B. Mandelsäure)

In nachfolgender Tabelle sind alle getesteten α -Hydroxysäuren aufgeführt. Die Strukturen der einzelnen Substanzen sind in Anhang A, A.4 zu finden

Tabelle 2: Getestete α -Hydroxysäuren

<u>α-Hydroxysäuren</u>	
DL-Mandelsäure	DL- α -Hydroxyglutarsäure
DL-3,4-Dihydroxymandelsäure	DL- α -Hydroxyisocaproensäure
DL-4-Methoxymandelsäure	DL-2-(p-methoxyphenoxy)-Propionsäure
DL-4-Chloromandelsäure	DL-Tropasäure
DL-4-Bromomandelsäure	DL-p-Hydroxyphenylmilchsäure
DL-4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	DL- β -Phenylmilchsäure
DL-4-Hydroxymandelsäure	DL-3-(3-indolyl)-Milchsäure
DL-3-Hydroxymandelsäure	DL-Atromilchsäure
DL- α -Hydroxyisovaleriansäure	DL-3-Phenylmilchsäure
DL- α -Hydroxyvaleriansäure	

3 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist ein instrumentell-analytisches Trennverfahren das die klassische Elektrophorese auf Platten mit den instrumentellen Methoden der Chromatographie hinsichtlich direkter Detektion der getrennten Proben in der Kapillare und damit einfach durchzuführender Identifizierung und Quantifizierung der Analyten vereint. Sie hat sich dabei in den letzten Jahrzehnten als gute Alternative zur HPLC erwiesen [38].

3.1 Geschichtliches [38-41]

Bereits vor über 100 Jahren wurde das 1. Gesetz von Kohlrausch formuliert, welches besagt, dass geladene Teilchen in Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern. Frühzeitig wurde für dieses Phänomen der Begriff "Elektrophorese" eingeführt. Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit im angelegten elektrischen Feld beruhen dabei entweder auf verschiedenen Ladungszahlen der Moleküle und/oder auf unterschiedlichen Reibungswiderständen aufgrund ihrer Größe bei gleicher effektiver Ladung.

Die Elektrophorese als Trennmethode wurde von den Schweden *Arne Tiselius* im Jahre 1937 eingeführt. Dieser entdeckte, dass ein Gemisch aus Proteinen in einem mit Pufferlösung gefüllten Rohr beim Anlegen einer Spannung in eine Richtung (Prinzip der wandernden Grenzzonen, „moving boundary“) wandert und sich in bestimmte Komponenten (Albumin, α -, β -, γ -Globulin) auftrennte.

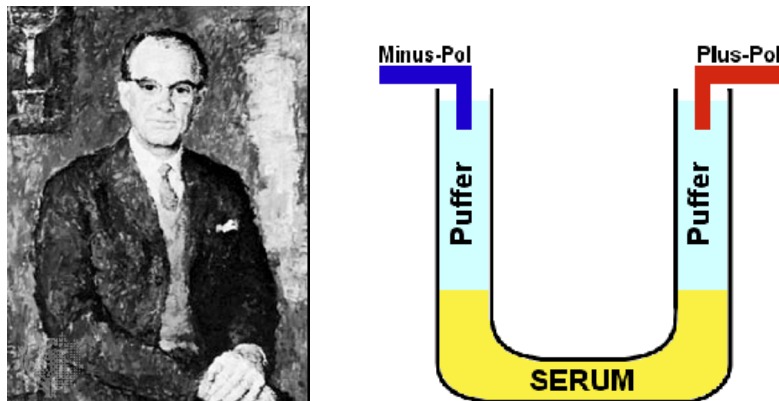


Abbildung 17: *Arne Tiselius* [41] und der Aufbau seines ersten Versuchs [40]

Für seine Arbeiten über Analysen mittels Elektrophorese und Adsorption, insbesondere für die Entdeckung der komplexen Natur von Serumproteinen, erhielt er dafür im Jahre 1948 den Nobelpreis für Chemie. Die Trennleistung der verwendeten Methode in freier Lösung war dabei jedoch durch thermische Diffusion und Konvektion begrenzt. Deshalb wurde die Elektrophorese daraufhin auf antikonvektive Medien, wie zum Beispiel auf Agarosegele, übertragen. Ein zusätzlicher Vorteil bei der Verwendung dieser war, dass durch die unterschiedlich starken Interaktionen der Moleküle mit den Gelfasern ein zweites Trennprinzip hinzugekommen war. Dadurch wurden sowohl Störungen durch Konvektion vermindert als auch für Makromoleküle mit geringen Differenzen in der Ladungsdichte die Wechselwirkung und damit die Trennleistung erhöht. Die klassische Gelelektrophorese besitzt jedoch auch einige entscheidende Nachteile:

- Die reproduzierbare Herstellung und Handhabung der Gele.
- Die quantitative Bestimmungen von Analysen von zum Beispiel Proteinen können nur mittels ihrer Anfärbung, welche stark fehlerbehaftet ist, geschehen.
- Es dürfen keine zu großen Spannungen am Gel angelegt werden um sein Austrocknen zu verhindern, da die Wärmeentwicklung bei angelegtem elektrischen Feld („Joulesche Wärme“) quadratisch mit der Spannung zunimmt. Niedrigere Spannungen führen dabei jedoch zu extrem langen Analysenzeiten.

Um die Detektions- und Kühlprobleme der Gelelektrophorese zu beheben wurde nun versucht, die elektrophoretische Trennung auf dünne Röhren zu übertragen. Diese besitzen, bezogen auf das Puffervolumen, eine extrem große Oberfläche. Sie erlaubt einen schnellen und effektiven Abtransport der Jouleschen Wärme, was mit dem Anlegen relativ hoher Spannungen und somit kürzeren Analysenzeiten einhergeht. Zudem war bei geeigneten Kapillarmaterial nun eine direkte (on-line) Detektion möglich. Die erste Trennung mithilfe einer offenen Glasröhre wurde von *Hjertén* im Jahre 1967 beschrieben. Die eigentliche Entwicklung der Kapillarelektrophorese begann jedoch erst mit den Pionierarbeiten von *Mikkers* und *Everaerts* Ende der siebziger Jahre und mit denen von *Jorgenson* und *Lukas* Anfang der achtziger Jahre. Dabei wurden zwei entscheidende Verbesserungen erzielt, nämlich die deutliche Verkleinerung des Innendurchmessers der Kapillaren und der Austausch der anfänglich noch verwendeten Leitfähigkeitsdetektion durch eine on-line UV-Detektion. Voraussetzungen für diese entscheidenden Weiterentwicklungen waren dabei die Verfügbarkeit von Quarz-

kapillaren in dem Bereichen von 50-100 μm ID, welche im unteren UV-Bereich hohe Transparenz besitzen und aufgrund des relativ großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen die thermisch induzierte Konvektion stark verminderten. Die Einfachheit der Apparatur und die hocheffiziente Trennleistung führten dabei ab der zweiten Hälfte der achtziger Jahre zu einem stark gesteigerten Interesse an der Kapillarelektrophorese.

3.2 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

3.2.1 Physikalische Grundlagen [38, 42, 43]

Die Trennung von Ionen in elektrophoretischen Systemen beruht auf deren unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, welche dabei von ihrer Geometrie und Ladung, der Temperatur, dem pH-Wert, der Viskosität des Trennmediums und der elektrischen Feldstärke abhängen. Wie nachfolgende Abbildung zeigt, sind Substanzen, welche in einer Elektrolytlösung als Ionen vorliegen, im elektrischen Feld verschiedenen Kräften ausgesetzt.

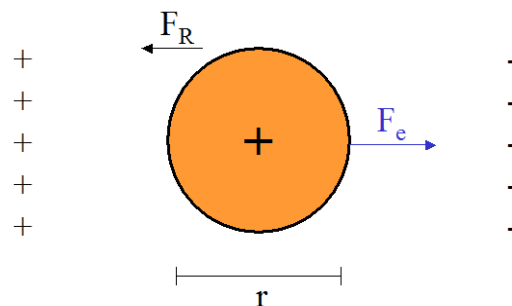


Abbildung 18: Einfluss der Reibungs- und der Beschleunigungskraft auf ein Ion unter dem Einwirken eines elektrischen Feldes

Auf ein geladenes Teilchen in einer Lösung wirkt in einem elektrischen Feld der Feldstärke E [V/cm] die Beschleunigungskraft F_e .

Gleichung 1:

$$F_e = q \cdot E = z \cdot e \cdot E$$

z beschreibt hierbei die Anzahl der effektiven Ladungen des Stoffes und e [C] stellt die Elementarladung dar.

Die auf die bewegten Teilchen von einem Radius r [cm] ausgeübte Reibungskraft F_R kann dabei unter der Annahme von kugelförmigen Ionen in einem laminaren Fluss in einem Medium der Viskosität η [Pa*s] bei einer Geschwindigkeit v [m/s] näherungsweise durch das Stokesche Gesetz beschrieben werden.

Gleichung 2:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

Im stationären Zustand ist die Summe aller dabei auftretenden Kräfte gleich null. Wird das Ion nun solange beschleunigt bis es zu einem Kräftegleichgewicht zwischen der Beschleunigungskraft F_e und der Reibungskraft F_R kommt, so ergibt sich:

Gleichung 3:

$$F_e = F_R$$

Und damit nach Umformung von Gleichung 3 für die elektrophoretische Geschwindigkeit:

Gleichung 4:

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Im Kräftegleichgewicht bewegen sich alle Ionen mit einer konstanten Geschwindigkeit v , die dabei direkt proportional zum angelegten elektrischen Feld ist. Daraus ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität μ_e :

Gleichung 5:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Die elektrophoretische Mobilität μ_e [m^2/Vs] stellt für eine ionische Spezies eine Konstante dar und repräsentiert dabei die Wanderungsgeschwindigkeit bei einer angelegten Feldstärke von 1 V/m. Kationen erhalten für ihre Mobilitäten ein positives, Anionen ein negatives Vorzeichen.

Umgeformt ergibt sich für die Geschwindigkeit v unter Abhängigkeit der Weglänge L_{ges} und der anliegenden Spannung U :

Gleichung 6:

$$v = \mu_e \cdot E = \frac{\mu_e \cdot U}{L_{\text{ges}}}$$

Ersetzt man nun die Geschwindigkeit v als Länge L_{eff} pro Zeit t und formt nach μ_e um, so erhält man:

Gleichung 7:

$$\mu_e = \frac{L_{\text{eff}}}{t \cdot E} = \frac{L_{\text{eff}} \cdot L_{\text{ges}}}{t \cdot U}$$

Die zuvor aufgeführten Überlegungen gelten jedoch nur für idealisierte Teilchen in einem trägerfreien, unendlich verdünnten und praktisch salzfreien Medium. In einem realen System muss zusätzlich der Einfluss der Hydrathülle des wandernden Ions und seine Atmosphäre berücksichtigt werden (Debye-Hückel-Theorie). Dabei baut sich um ein Ion in einer Elektrolytlösung endlicher Ionenkonzentration eine Wolke aus Gegenionen auf, welche seine effektive Ladung verringert. Es migriert deshalb langsamer als es seiner Ladung entspricht. Dieses Phänomen wird als elektrophoretischer Effekt bezeichnet. Eine weitere Konsequenz ist der sogenannte Relaxationseffekt. Dieser resultiert aus einem stetigen Auf- und Abbau einer Gegenionenwolke im elektrischen Feld. Die Ionenwolke deformiert sich dabei, so dass die Zentren der positiven und negativen Ladungen nicht mehr zusammenfallen. Dadurch wird die Bewegung des zentralen Ions ebenfalls gebremst.

3.2.2 Der Elektroosmotische Fluss (EOF) [38, 39, 42-44]

In der Kapillarelektrophorese spielt jedoch nicht nur die Trennung aufgrund eigener unterschiedlicher Mobilitäten der geladenen Teilchen eine Rolle. Ein weiterer wichtiger, elektrokinetischer Effekt ist die Elektroosmose. Man versteht darunter einen Fluss der Elektrolytlösung im elektrischen Feld, der durch Ladungen an der inneren Kapillarwand verursacht wird. Das Prinzip der Elektroosmose basiert dabei auf eine von *Stern* beschriebenen Theorie. Sie besagt, dass sich aufgrund einer Ladungsverteilung zwischen einer festen, stationären Phase, welche in diesem Fall die Quarzkapillare darstellt, und einer flüssigen, beweglichen Phase, hier dem Elektrolyten, bei Anlegen eines elektrischen Feldes eine elektrische Doppelschicht aufbaut.

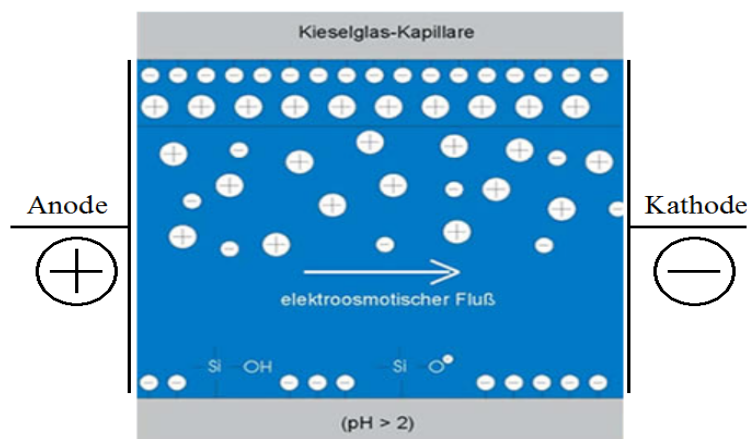


Abbildung 19: Entstehen des EOF in einer Quarzkapillare [mod. nach 44]

Die Quarzkapillare trägt an ihrer Oberfläche endständig Silanolgruppen (SiOH), die ab einem pH-Wert von größer 2 teilweise bis vollständig dissoziiert in der anionischen Form (SiO⁻) vorliegen. An diesen werden Kationen adsorbiert und Anionen abgestoßen. Ein Teil der adsorbierten Kationen wird dabei durch elektrostatische Anziehungskräfte an der Kapillarwand fixiert. Diese starre, fixierte Schicht wird als „Sternschicht“ bezeichnet. Um die verbleibenden negativen Ladungen der Kapillaroberfläche auszugleichen werden weitere Gegenionen angelagert. Jedoch können diese, aufgrund ihrer Hydrathülle, nicht mehr an der Oberfläche fixiert werden. Es entsteht eine diffuse Grenzschicht, in welcher die Konzentration der Kationen exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche der Kapillare abnimmt. Sie wird als „Gouy-Chapman-Schicht“ be-

zeichnet (Abbildung 20, links). Mit größer werdender Entfernung zwischen der negativen Kapillarwand und den Kationen der diffusen Grenzschicht verringern sich auch die Coulombschen Wechselwirkungen. Dadurch wird ein Wandern der diffusen Kationen zum negativ geladenen Pol ermöglicht. Es bildet sich zwischen der an der Kapillarwand fixierten und der diffusen Schicht eine Scherebene aus. In der starren Sternschicht nimmt das Potential mit zunehmender Entfernung zur Kapillarwand linear ab. Sie steht dabei im Gleichgewicht mit der diffusen Grenzschicht, in der das Potential exponentiell auf null zurückgeht. Das Potential, welches sich an dieser Scherebene ausbildet, wird Zetapotential (ζ) genannt (Abbildung 20, rechts). Es ist eine dabei experimentell indirekt zugängliche Größe von welcher die Elektroosmose abhängig ist.

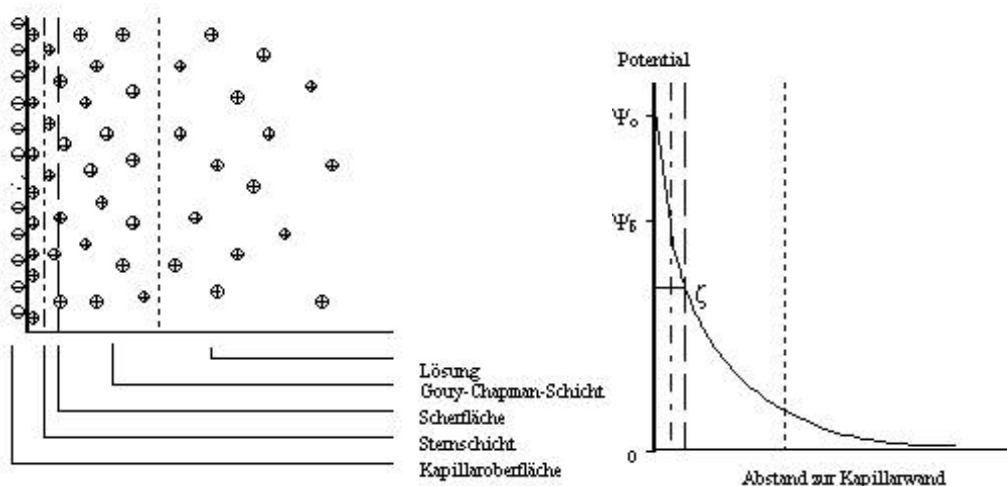


Abbildung 20: Schematischer Aufbau der elektrischen Doppelschicht (links) und der Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Abstand der Kationen zur negativen Kapillaroberfläche (rechts) [42]

Wird nun eine Spannung an die mit Elektrolyt gefüllte Kapillare angelegt, wandern die Kationen der diffusen Schicht in Richtung Katode. Aufgrund ihrer Solvatisierung wird die umgebende Lösung mit den Richtung Katode bewegt.

Der EOF verläuft dabei aber nicht wie in der Chromatographie nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz einer druckgetriebenen und damit parabolischen Strömung (Abbildung 21, unten). Er unterscheidet sich durch sein extrem flaches, stempel-förmiges Strömungsprofil, da die Triebkraft entlang der Kapillaren einheitlich ist und kein Druckgefälle existiert (Abbildung 21, unten). Unter typischen experimentellen Bedingungen konnten Berechnungen zeigen, dass sich die Flüssigkeit mit einem

Abstand von 10 nm zur Quarzoberfläche bereits gleichförmig bewegt. Dies führt zu einer sehr geringen Dispersion der Probenzonen und daher zu schmalen Peaks und hohen Effizienzen. Im idealisierten Fall sollte bei der Kapillarelektrophorese nur die Axialdiffusion zu einer Bandenverbreiterung beitragen.

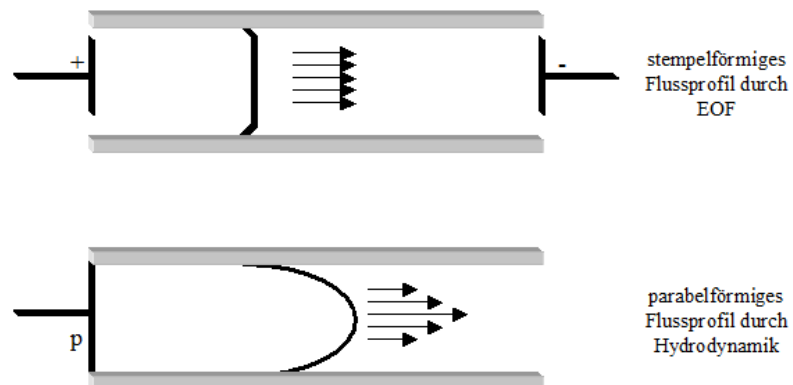


Abbildung 21: Darstellung eines durch den EOF (oben) und eines durch Druck (unten) entstehenden Flussprofils

Die Geschwindigkeit v_{EOF} des EOFs lässt sich dabei vereinfacht über die sogenannte Helmholtzgleichung beschreiben.

Gleichung 8:

$$v_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta}$$

mit ε : Dielektrizitätskonstante, E : Feldstärke, ζ : Zetapotential, η : Viskosität des Elektrolyten

Für seine elektrophoretische Mobilität μ_{EOF} gilt:

Gleichung 9:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta}$$

Der EOF sinkt dabei in Quarzkapillaren mit zunehmender Elektrolytkonzentration, da sich das ζ -Potential und damit auch der EOF umgekehrt proportional zur Ionenstärke verhält. Umgekehrt dagegen steigt die Geschwindigkeit des EOFs mit zunehmender Basizität des Elektrolyten. Grund dafür ist die direkte Proportionalität des ζ -Potenzials zur Ladungsdichte an der Kapillarwand. Zudem können Zusätze wie organische Lösungsmittel, kovalente Beschichtungen oder Tenside den EOF beeinflussen.

Die effektive Mobilität und somit die Gesamtwanderungsgeschwindigkeit eines Ions unter einem kathodischen elektroosmotischen Fluss setzt sich aus der vektoriellen Summe seiner elektrophoretischen Mobilität und der elektroosmotischen Mobilität zusammen:

Gleichung 10:

$$\mu_{eff} = \mu_{EOF} + \mu_e$$

mit μ_{eff} : effektive Mobilität; μ_{eof} : elektroosmotische Mobilität;
 μ_e : elektrophoretische Mobilität

Durch die Ausnutzung des EOF ist es somit möglich, Kationen, Anionen und ungeladene Moleküle gemeinsam zur Kathode zu bewegen. Dabei muss μ_e des Anions kleiner als μ_{EOF} sein, so dass der elektroosmotische Fluss die entgegengerichtete elektrophoretische Migration der Anionen überlagert. In nachfolgender Abbildung ist dafür die Migrationsreihenfolge von Teilchen unterschiedlicher Ladung dargestellt.

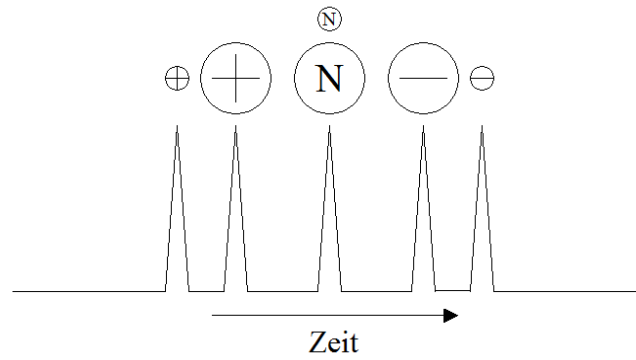


Abbildung 22: Migrationsreihenfolge für Kationen (+), ungeladene Moleküle (N) und den Anionen (-) unter einem kathodischen EOF.

3.3 Apparativer Aufbau [38, 43]

Die wichtigsten Bestandteile eines Kapillarelektrophoresesystems stellen eine Hochspannungsquelle, die Kapillare, ein Injektor und ein Detektor dar. Die Hochspannungsquelle liefert dabei Gleichspannung im Bereich von -30 kV bis + 30 kV. Zudem besitzen kommerziell erhältliche Geräte eine Thermostatierung zur Abführung der Jouleschen Wärme. Temperaturen können in einem Bereich von 15 °C bis 60 °C variiert werden.

Der schematische Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Systems ist in nachfolgender Abbildung dargestellt:

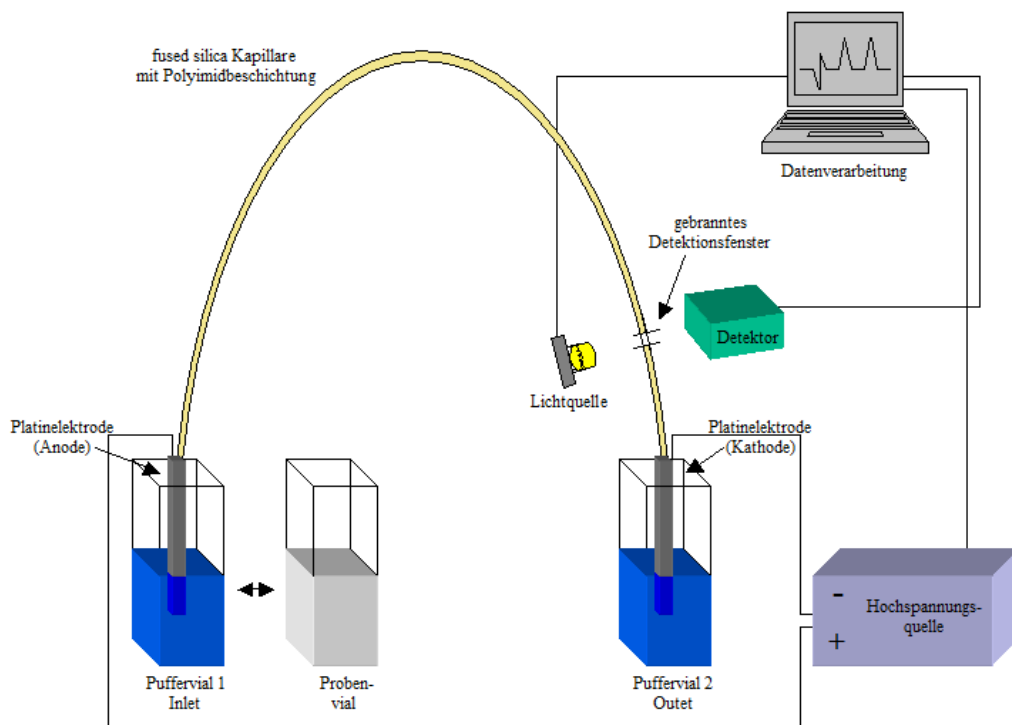


Abbildung 23: schematischer Aufbau einer CE-Apparatur

3.3.1 Kapillaren [38, 43]

In der Kapillarelektrophorese werden polyimidbeschichtete Quarzkapillaren, welche aus geschmolzenem SiO_2 (fused silica) gezogen werden, verwendet. Gängige Innendurchmesser sind dabei 25 bis 100 μm und typische Längen 10 bis 100 cm. Die Polyimidbeschichtung muss vor der Verwendung an der Stelle der Detektion chemisch,

mechanisch oder durch abbrennen entfernt werden, da sie eine UV-Durchlässigkeit der Kapillare verhindert. Bei den meisten Anwendungen werden dabei unmodifizierte Kapillaren eingesetzt. Eine Kapillare von 100 cm Länge und einem Durchmesser von 75 μm besitzt ein Volumen von etwa 4,4 μl . Injektionsvolumina bewegen sich dabei im Bereich von 1/100 des Kapillarevolumens.

3.3.2 Injektion [38, 43]

In der Kapillarelektrophorese werden sehr kleine Probenvolumina im Bereich von 2 nl bis 20 nl injiziert. Dabei gibt es drei wichtige Injektionsarten, welche in kommerziell erhältlichen Geräten Anwendung finden.

1. Druck-Injektion: Bei dieser Methode erfolgt die Probenaufgabe durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß und Kapillarende. Dabei kann entweder der Druck auf das Probengefäß erhöht oder am Kapillarende der Druck verringert werden. Die aufgegebene Probenmenge ist hier nur von der Druckdifferenz und Injektionszeit abhängig. Dieses Injektionsverfahren ist in kommerziell erhältlichen Geräten das verbreitetste, da durch dieses auch ein einfaches Spülen der Kapillare möglich ist und es hinsichtlich der Reproduzierbarkeit gute Werte bietet. Zudem findet keine Trennung der Probenkomponenten statt.
2. Elektrokinetische Injektion: Bei diesem Injektionsverfahren wird das Probengefäß, in welchem ein Ende der Kapillare eingetaucht ist, mit der Hochspannungsquelle verbunden. Durch kurzzeitiges Anlegen einer definierten Spannung wandern die Probenbestandteile in die Kapillare. Bei diesem Injektionsverfahren ist die aufgegebene Probenmenge abhängig von der Höhe der Spannung, der Zeit und der Mobilität der Probenkomponenten. Die Reproduzierbarkeit dieser Methode ist relativ hoch, jedoch findet eine Trennung der Probenkomponenten aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten statt. In extremen Fällen können manche dieser nicht injiziert werden.
3. Hydrostatische Injektion: Hier wird eine Höhendifferenz zwischen dem Puffergefäß und dem Probengefäß zum injizieren kleiner Probenvolumina ausgenutzt. Durch einen Siphoneffekt wird die Probenlösung in die Kapillare gesaugt. Abhängig ist die aufgegebene Probenmenge dabei von der Höhendifferenz und der Zeit. Bei dieser Methode erfolgt keine Trennung der

Probenkomponenten. Die Reproduzierbarkeit ist ungefähr vergleichbar mit der Methode der Druckinjektion.

3.3.3 Detektion [38, 43]

Sie erfolgt in der Kapillarelektrophorese in den meisten Fällen direkt in der Trennkapillare (on-column). In seltenen Fällen, wie zum Beispiel bei der Kopplung mit einem Massenspektrometer oder mit einem Leitfähigkeitsdetektor erfolgt die Detektion außerhalb der Kapillare. Die am häufigsten verwendete Detektionsart ist in der CE ist die der optischen, also der UV- oder der Fluoreszenz-Detektion. Aufgrund der geringen Schichtdicke (mittlerer Kapillarinne Durchmesser) werden hohe Anforderungen bezüglich Empfindlichkeit, Rauschen, etc. an die Detektoren gestellt. Bei gut absorbierenden Verbindungen liegen die Nachweisgrenzen mittels UV-Detektion bei circa 10^{-6} mol/l. Wesentlich empfindlicher sind dagegen die Fluoreszenzdetektoren, mit welchen sich mittels laserinduzierter Fluoreszenz Aminosäuren bis in den attomolaren Bereich nachweisen lassen. Alternativ zur direkten Detektion lässt sich auch indirekt detektieren. Dabei liefert der Puffer ein Grundsignal (mittels z.B. fluoreszierender Verbindungen darin), welches vom Analyten bei Durchschreiten des Detektorfensters gestört wird. Weitere Detektionsmöglichkeiten in der Kapillarelektrophorese bieten elektrochemische Detektoren (z.B. Leitfähigkeitsdetektoren oder amperometrische Detektoren), Massenspektrometrie, on-line Radioaktivitätsmessungen, Raman-Spektroskopie oder Circular dichroismus- und Brechungsindexbestimmungen.

3.3.4 Durchführungsarten der Kapillarelektrophorese [38, 43, 45]

Unter dem Begriff Kapillarelektrophorese werden verschiedene elektrophoretische Trenntechniken zusammengefasst:

- Kapillarenzonenelektrophorese (CZE): Die CZE ist die Umsetzung der Originalmethode von *Tiselius* in der Kapillarelektrophorese mit dem Unterschied, dass die Probenaufgabe in diesem Verfahren als möglichst schmales Band erfolgt. Sie wird ausschließlich in elektrolytgefüllten Kapillaren durchgeführt und stellt die zurzeit am häufigsten verwendete Methode dar. Trennungen beruhen in der CZE auf den Mobilitätsdifferenzen der Proben. Das Verfahren ähnelt dabei der Elutionschromatographie. Die Zonen wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Trennsystem und sind im Optimalfall voneinander durch Elektrolyt getrennt. Die CZE ist eine Methode, welche den EOF ausnutzt. Somit ist es möglich, wie in

Kapitel 3.2.2. schon beschrieben, kationische, anionische und neutrale Probenbestandteile zu untersuchen.

- Micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC): Die MEKC stellt einen Hybrid zwischen der CE und der HPLC dar. Sie wurde von Terabe et al. [45] das erste Mal 1984 erwähnt. Dabei werden dem Puffer oberflächenaktive Substanzen zugesetzt, so dass auch Neutralteilchen nicht nur von Anionen und Kationen, sondern auch untereinander getrennt werden können. Die neutralen Moleküle verteilen sich dabei zwischen dem Puffer und den Micellen, je nach ihrer Hydrophobie. Trennungen beruhen auf der Mobilität der meist negativ geladenen Micellen (z.B. Natriumdodecylsulfat, SDS) und dem Transport der Proben außerhalb dieser mittels des EOF. In diesem Falle handelt es sich um einen Verteilungsprozess zwischen der pseudostationären Phase der Micellen und der mobilen Phase der Pufferlösung. Es stellt somit ein echtes chromatographisches Verfahren dar. Auch hier sind die Proben im Idealfall durch den Elektrolyten voneinander getrennt. Der Trennbereich liegt in der MEKC zwischen der Wanderung der Verbindungen, die sich außerhalb der Micellen aufhalten und somit mit dem EOF wandern, und denen, die permanent in den Micellen eingeschlossen sind.
- Isotachophorese (ITP): Sie stellt die älteste Kapillarentrenntechnik dar und wird in der CZE auch zur Probenaufkonzentrierung verwendet. Mit ihr lassen sich in einer Analyse nur entweder Anionen oder Kationen bestimmen, welche während der Analyse nach ihrer elektrophoretischen Mobilität geordnet werden. In der ITP wandern die sich ausbildenden Zonen mit gleicher Geschwindigkeit aufgrund eines sich ausbildenden Potenzialgradienten zwischen zwei Elektrolyten (terminating und leading electrolyte) unter Anlegen eines elektrischen Feldes. In diesem Durchführungsmodus der CE sind die Probenbestandteile nicht durch Elektrolyt voneinander getrennt. Das Verfahren der ITP ist der Verdrängungschromatographie analog.
- Isoelektrische Fokussierung (IEF): Hier erfolgt die Trennung amphoterer Probenbestandteile aufgrund eines pH-Gradienten, welcher sich durch Zusatz von Ampholyten zum Puffer im elektrischen Feld ausbildet. Auch diese Methode besitzt fokussierende Eigenschaften. Nachdem die Probe aufgegeben und das elektrische Feld angelegt wurde, beginnen die Probenbestandteile in dem System so lange zu

wandern, bis sie in eine Zone gelangen in der ihre Nettoladung gleich Null ist. Ihre Wanderung ist am isoelektrischen Punkt (pI) abgeschlossen. Nach Abschalten des elektrischen Feldes wird der Kapillarinhalt mittels Druck zum Detektorfenster befördert, welches die Komponenten der Probe, geordnet nach ihren pI-Werten, passieren. In diesem Modus der CE sollte der EOF unterdrückt werden.

- Kapillargelelektrophorese (CGE): In diesem Fall ist die Kapillare mit einer Polymerlösung oder einem Gel gefüllt, welches die elektrophoretische Migration von Makromolekülen behindert. Der Transport der Probe durch die Kapillare beruht dabei auf der Ladung dieser, getrennt werden sie jedoch abhängig von ihrer Molekülgröße.
- Kapillarelektrochromatographie (CEC): Das Verfahren der CEC wird in Kapitel 6 genauer erläutert.

4 Das Prinzip des chiralen Ligandenaustausches in der Kapillarelektrophorese [46-54]

Das Prinzip des chiralen Ligandenaustausches (LE) in der Chromatographie wurde von *Davankov* und *Rogozhin* erstmals im Jahre 1971 beschrieben [46]. Sie verwendeten dabei Phasen, in denen L-Prolin-Reste an chlormethyliertes Polystyren gebunden wurden. Mit Cu (II) und anderen zweiwertigen Metallionen als Komplexbildner wurden die Enantiomere von Aminosäuren getrennt. Durch *Gübitz et al.* wurde dieses Grundprinzip auf die HPLC übertragen, indem chirale LEC-Phasen basierend auf modifiziertem Silicagel entworfen und erfolgreich getestet wurden [47]. 1985 konnte das Prinzip des chiralen Ligandenaustausches durch *Zare et al.* auf die Kapillarelektrophorese übertragen werden. Dies geschah, indem sie zum Elektrolyten einen chiralen Selektor-Metall-Komplex (L-Histidin- und L-Aspartam-Cu(II)-Komplexe) zugaben und für die Trennung von dansylierten Aminosäuren verwendeten [48, 49]. *Desiderio et al.* berichteten von den ersten chiralen kapillarelektrophoretischen Trennungen von α -Hydroxysäuren mittels L-Prolin-, L-Hydroxyprolin- und L-Aspartam-Cu(II)-Komplexen im Jahre 1994 [50]. Im Jahre 1996 wurden dann zum ersten Mal auch underivatisierte Aminosäuren kapillarelektrophoretisch mittels L-Prolin- und L-Hydroxyprolin-Cu(II)-Komplexen durch *Schmid* und *Gübitz* getrennt [51].

Der Mechanismus des LE basiert dabei auf der Bildung von ternären Metallmischkomplexen zwischen den chiralen Selektorliganden und einem Analytliganden. Die Enantiomere, welche diesen Komplex ausgeformt haben, verhalten sich nun wie Diastereomere zueinander. Um diese meist zweizähligen Chelatkomplexe bilden zu können, müssen der Selektor und die Analytmoleküle gewisse strukturelle Voraussetzungen, also komplexbildende Strukturen wie Hydroxy-, Carboxy- oder Aminogruppen, mit sich bringen. Das Zentrum des Komplexes wird dabei von einem zweiwertigen Metallion, wie zum Beispiel Cu (II) gebildet. In nachfolgender Abbildung ist die hypothetische Struktur eines solchen Komplexes zwischen der Aminosäure L-Threonin und den Enantiomeren einer α -Hydroxysäure dargestellt.

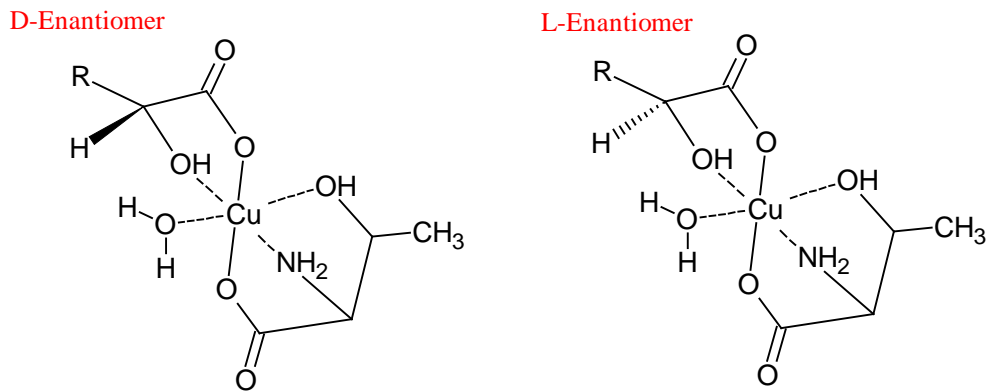


Abbildung 24: Hypothetische Kupferkomplexstrukturen zwischen L-Threonin und dem D- und L-Enantiomer einer α -Hydroxysäure

Die chirale Trennung in der Kapillarelektrophorese beruht nun darauf, dass ein Selektormolekül eines Selektor-Metall-Selektor-Komplexes von einem Analytmolekül verdrängt wird. Aufgrund unterschiedlicher Komplexbildungskonstanten zwischen den Selektormolekülen und den Analytenantiomeren kommt es zu einer chiralen Auftrennung dieser. In der Kapillarelektrophorese wird dabei das Enantiomer, welches stärker komplexiert, schneller transportiert und somit früher detektiert. Für diesen Prozess kann durch folgendes Gleichgewicht beschrieben werden [52-54]:

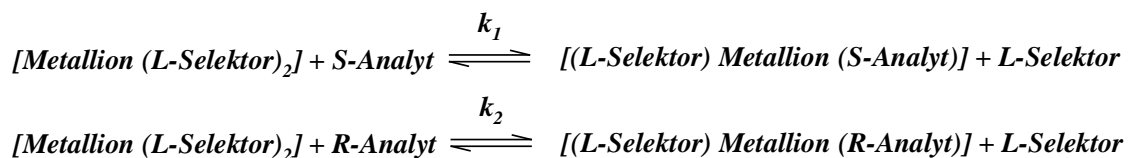


Abbildung 25: Entstehung diastereomer Metallmischkomplexe in Abhängigkeit ihrer unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten

5 Analytischer, experimenteller Teil

5.1 Chemikalien und Lösungen

Alle Chemikalien und Lösungen waren von analytischer Reinheit. Sie sind, einschließlich Hersteller oder Vertreiber, in Anhang B, B.2 gelistet.

5.2 Geräte und Apparaturen

Für die Experimente wurde ein voll automatisiertes ^{3D}CE-System (Agilent Technologies, Kalifornien, USA), welches mit einem Diodenarray-Detektor ausgestattet war, verwendet. Detektiert wurde mittels on-column UV-Absorptionsmessung unter den Wellenlängen 208, 218 and 254 nm. Die kapillarelektrophoretischen Messungen wurden in 50 µm ID fused silica Kapillaren (58.5 cm/ 50 cm effektive Länge) von Microquartz (München, Deutschland) durchgeführt. Vor und nach jeder Messung wurde die Kapillare, um gleichbleibende Analysenbedingungen zu gewährleisten, jeweils 2 Minuten mit Wasser, 2 Minuten mit 0,2 M NaOH, wieder 2 Minuten mit Wasser und insgesamt 7 Minuten mit Elektrolytlösung (3 Minuten Inlet to waste, 4 Minuten Inlet to Outlet) gespült.

5.3 Methode

In den Messungen wurden die Enantiomerentrennungen mittels Ligandenaustausch-CZE und -MEKC durchgeführt. Als chirale Selektoren wurden dafür verschiedene L- α -Aminosäuren und Derivate dieser unter der Verwendung verschiedener Zentralionen benutzt. Die Elektrolytlösungen wurden hergestellt, indem die festen Bestandteile nach deren Massenberechnung zuerst eingewogen wurden. Danach wurden diese in Aqua bidest. durch Ultraschall gelöst, mit einer 1 M Lösung des jeweiligen Zentralions zum jeweils verwendeten Volumen aufgefüllt und der pH-Wert mittels einer Ag/AgCl-Elektrode eingestellt. Im Anschluss wurden sie durch einen 0,45 µm Teflonfilter (Schleicher/Schuell, Dassel, Deutschland) in CE-Vials filtriert und für 2 Minuten im Ultraschallbad entgast. Die Proben wurden im Falle der getesteten Aminosäuren und der α -Hydroxysäuren in Wasser, im Falle der dansylierten Aminosäuren, aufgrund ihrer

darin besseren Löslichkeit, in Wasser/Methanol 50:50 in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und mittels Druckinjektion aufgegeben. Der EOF, falls vorhanden, konnte aufgrund der negativen Absorption des jeweiligen Lösungsmittels sichtbar gemacht werden.

Die Messungen wurden, falls nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Die Migrationsreihenfolgen der Enantiomere wurden durch Spikes der Proben mit reinen Enantiomeren, die mehrerer Substanzen in einer Probe durch Spikes mit dem jeweiligen Racemat identifiziert. Verwendete Versuchsparameter wie die jeweils angelegte Spannung, Puffersubstanzen, Selektoren, Zentralionen, genaue Probenaufgabe und eingestellter pH-Wert sind den Bedingungen unter den jeweiligen Tabellen und Elektropherogrammen zu entnehmen.

5.4 Verwendete Parameter zur Beschreibung der Trennleistung in der LECE [27, 38, 39]

Die in der Chromatographie verwendeten Grundgrößen können zum größten Teil auf die Kapillarelektrophorese übertragen werden, mit dem Unterschied, dass für den Begriff Retentionszeit der Begriff Migrationszeiten verwendet wird.

- t_m entspricht dabei der Migrationszeit, also der Zeit, welche eine Substanz von der Probenaufgabe bis zum Detektor benötigt. Dabei setzt sich die Geschwindigkeit v_{eff} aus der Geschwindigkeit des EOF \pm der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Substanz zusammen.

$$t_m = \frac{L_{eff}}{v_{eff}}$$

- t_0 entspricht der Zeit, die eine ungeladene Substanz, welche also mit dem EOF wandert, von der Probenaufgabe bis zum Detektor benötigt.
- In der Chromatographie wird als Maß für die Selektivität der Trennfaktor α_{eff} verwendet, welcher als Quotient der Kapazitätsfaktoren k der zu trennenden Substanzen definiert ist. Dieser errechnet sich über die jeweiligen Retentionszeiten t_R und die Totzeit t_0 . Da jedoch t_0 in der Kapillarelektrophorese aufgrund von zum Beispiel angewendeter negativer Spannung oder einer extrem langen Migrationsdauer des EOF dieser nicht immer detektiert werden kann, wird zur Berechnung des Trennfaktors auch der Quotient der Migrationszeiten herangezogen (α_{app}). Dabei wird von einer Trennung gesprochen, wenn der Wert von α größer als 1,0 ist.

$$\alpha_{eff} = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{mit} \quad k_1 = \frac{t_1 - t_0}{t_0} \quad \text{und} \quad k_2 = \frac{t_2 - t_0}{t_0}$$

$$\alpha_{app} = \frac{t_2}{t_1}$$

- Die quantitative Auflösung R_s zweier Peaks im Elektropherogramm kann wie folgt berechnet werden, wobei ω für die jeweiligen Peakbasisbreiten steht.

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_2 - t_1)}{\omega_1 + \omega_2}$$

Eine vollständigen Auftrennung ist dabei ab einem Wert von größer 1,5 erreicht.

- Zudem können für die einzelnen Substanzen und für den EOF, falls dieser beobachtet wurde, die elektrophoretischen Mobilitäten über nachfolgende Gleichung berechnet werden.

$$\mu_e = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{t_m \cdot U}$$

5.5 Ergebnisse und Diskussion

In folgendem werden die Trennergebnisse nach den verwendeten chiralen Selektoren mit den Analyten als jeweilige Untergruppen geordnet.

5.5.1 L-Phenylalaninamid und L-Paraaminophenylalanin

Die ersten chirale Selektoren, welche in dieser Arbeit getestet wurden, sind L-Phenylalaninamid und L-Paraaminophenylalanin. Ihre jeweiligen Strukturen sind in nachfolgender Abbildung dargestellt:

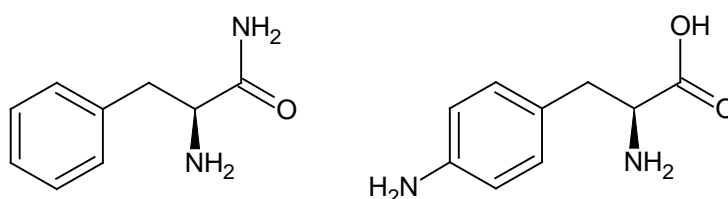


Abbildung 26: L-Phenylalaninamid (links) und L-Paraaminophenylalanin (rechts)

Die Messungen im Falle von L-Paraaminophenylalanin wurden jedoch nach kurzer Zeit wieder eingestellt, da sich die Elektrolytlösungen, welche diesen Selektor beinhalteten, extrem ins bräunliche verfärbten und sich Niederschläge bildeten. Reproduzier- und wiederholbare Messungen wären dadurch nicht möglich gewesen. Grund für die Niederschläge und Verfärbungen ist, dass L-Paraaminophenylalanin ein Derivat des Anilins darstellt, welches sich durch Selbstoxidation an der Luft ebenfalls ins bräunliche verfärbt. Es konnte jedoch am Beispiel von Methionin (siehe Abb. 27) gezeigt werden, dass auch L-Paraaminophenylalanin die Eigenschaften eines chiralen Selektors für α -Aminosäuren besitzt.

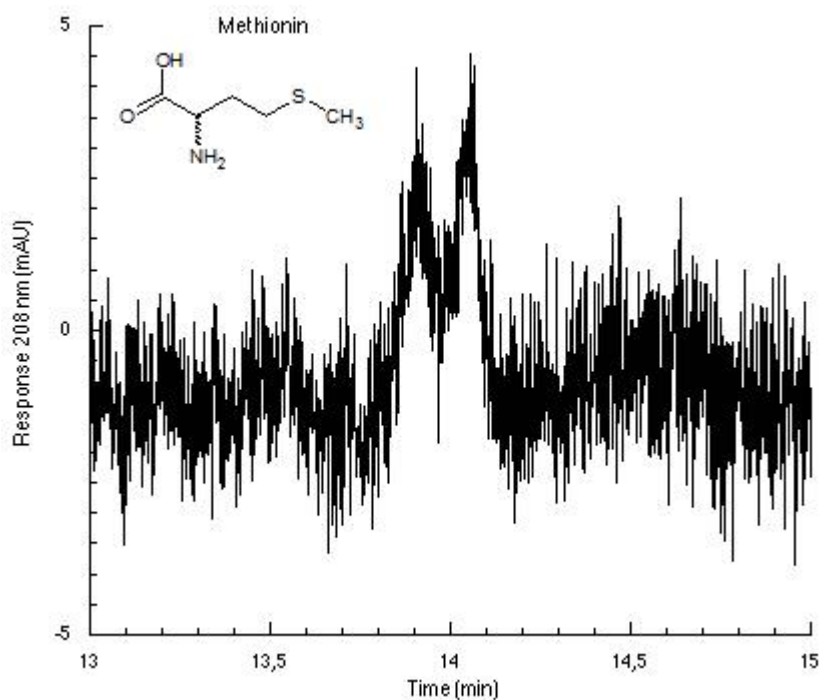


Abbildung 27: Chirale Trennung von Methionin mittels
L-Paraaminophenylalanin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Paraaminophenylalanin 30 mM, Kupferacetat 15 mM, pH 4,0 eingestellt mit Essigsäure verd., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, ~ 38 μ A, Probenaufgabe: 5 mbar, 5s

Der Rest des Kapitels 5.5.1 beinhaltet somit nur noch Trennergebnisse für L-Phenylalaninamid.

5.5.1.1 Dansylierte Aminosäuren

Im Falle der dansylierten Aminosäuren als Analyten wurden für L-Phenylalaninamid verschiedene Metallionen als Komplexzentrum getestet. Mit Zink (II) wurden bereits erfolgreiche Messungen von *Qi* und *Yang* [55] und mit Kupfer (II) und von *Hobo et al.* [56] durchgeführt. Der von *Qi* und *Yang* verwendete Puffer bestehend aus 5 mM Natriumacetat, 100 mM Borsäure und einem pH-Wert von 8,2, welcher mit 1 M Trislösung eingestellt worden ist, wurde für die eigenen Messungen übernommen. Für die Wiederholung der von *Qi* und *Yang* bereits getesteten Analyten (Dansyl-Asp, -Trp, -Phe, -Thr, -Met) und für die neu verwendeten (Dansyl-Leu, -Val, -Glut, -Nval, -Nleu, -

α ABA) wurde eine Selektorkonzentration von 10 mM und als Zentralionenkonzentration 5 mM gewählt.

In der folgenden Tabelle sind die Trennergebnisse für das Zentralion Zink (II) und die oben beschriebene Elektrolytlösung aufgeführt.

Tabelle 3: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Zink-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	ω_1	ω_2	α_{app}	R_s
Dns-Trp	18,184	18,277	0,1159	0,1227	1,005	0,8
Dns-Leu	16,169	16,285	0,1001	0,0757	1,007	1,3
Dns-Val	15,335	-	0,0941	-	1,000	-
Dns-Glut	9,985	-	0,2267	-	1,000	-
Dns-NVal	17,529	17,685	0,1063	0,0891	1,009	1,6
Dns-αABA	17,258	17,321	0,1403	0,0831	1,004	0,6
Dns-Met	20,422	20,775	0,1021	0,1114	1,017	3,3
Dns-Asp	15,129	-	0,1210	-	1,000	-
Dns-NLeu	19,609	19,895	0,1027	0,0946	1,015	2,9
Dns-Phe	19,609	19,949	0,1112	0,1051	1,017	3,1
Dns-Thr	19,759	-	0,1718	-	1,000	-

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Zinksulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, $\sim -14 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Dabei konnte in dieser Selektor-Metallionen-Konzentration für die wiederholten Proben Dns-Met und Dns-Phe eine Auflösung R_s von über 1,5 und für Dns-Trp eine von 0,8 erreicht werden. Dns-Asp und Dns-Thr zeigten keine chirale Trennung. Im Falle der neu verwendeten Analyten wurde Dns-NLeu und Dns-Nval mit einer Auflösung von über 1,5, Dns-Leu und Dns- α ABA wurden mit einer Auflösung unter diesem Wert getrennt. Dns-Glut und Dns-Val konnten nicht getrennt werden. Die nachfolgende Abbildung zeigt den Erstversuch zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode

anhand der Modellsubstanz Dns-Methionin unter einer Probenaufgabe von 50 mbar für 6 s.

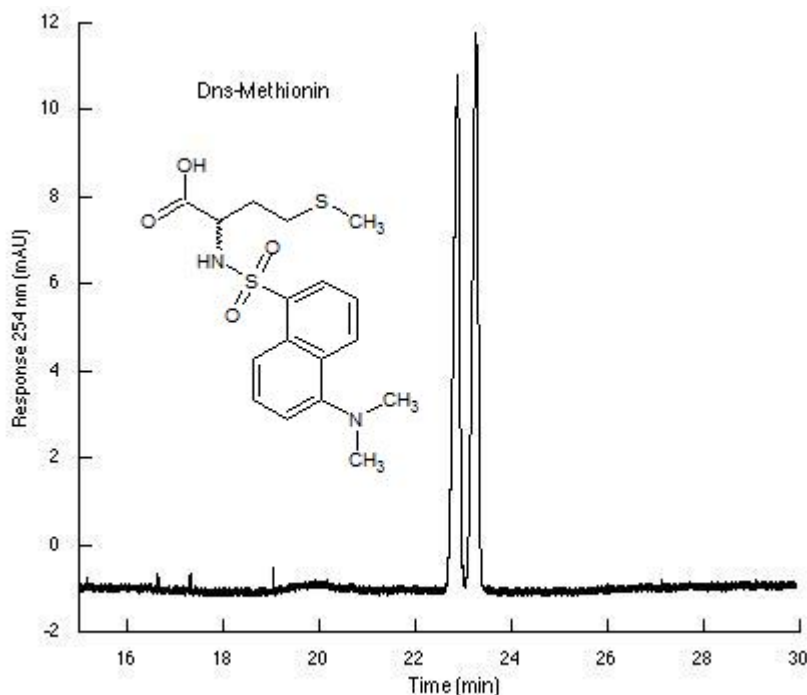


Abbildung 28: Chirale Trennung von Dns-Methionin mittels L-Phenylalaninamid-Zink-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Zinksulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, circa pH 8 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, ~ -14 μ A, Probenaufgabe: 50 mbar, 6 s

Im Anschluss an die Messungen mit Zink (II) wurde L-Phenylalaninamid mit Kupfer (II) als Zentralion getestet. Nach *Hobo et al.* [56] lägen die idealen Trennbedingungen bei einem pH-Wert von 5,0 und einer L-Phenylalaninamid:Kupfer-Konzentration von 20:10 mM. Es wurde jedoch durch *Qi und Yang* [55] am Beispiel von drei dansylierten Aminosäuren gezeigt, dass auch unter einem pH-Wert von 8,0 mit einer niedrigeren Selektor-Zentralionen-Konzentration eine chirale Trennung stattfinden kann. Deshalb wurden die Analyten unter denselben Bedingungen (pH-Wert 8,2; L-Phenylalaninamid:Kupfer(II) 10:5 mM) unter Verwendung einer positiven Spannung von 17 kV getestet, um später einen Vergleich der verschiedenen Zentralionen anstellen zu können.

In der folgenden Tabelle sind dafür die Trennergebnisse für das Zentralion Kupfer (II) aufgeführt.

Tabelle 4: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s
Dns-Trp	28,217	29,310	12,417	0,1905	0,2034	1,069	5,5
Dns-Leu	26,624	-	11,204	0,3468	-	1,000	-
Dns-Val	26,877	-	10,917	0,2620	-	1,000	-
Dns-Glut	-	-	10,978	-	-	-	-
Dns-NVal	25,137	25,371	10,950	0,1677	0,3505	1,016	0,9
Dns-αABA	20,497	20,667	9,830	0,1380	0,3014	1,016	0,8
Dns-Met	19,864	20,104	9,924	0,1282	0,1755	1,024	1,6
Dns-Asp	-	-	10,424	-	-	-	-
Dns-NLeu	18,324	-	9,510	0,2597	-	1,000	-
Dns-Phe	17,737	17,957	9,444	0,1046	0,1654	1,027	1,6
Dns-Thr	20,030	20,145	9,970	0,1398	0,2327	1,011	0,6

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Kupferacetat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 17 kV zur Kathode, $\sim 9,5 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Für das Zentralion Kupfer (II) konnte in dieser Selektor-Metallion-Konzentration und diesem pH-Wert für drei dansylierte Aminosäuren (Dns-Trp, Dns-Met und Dns-Phe) eine Auflösung von über 1,5 erreicht werden. Jeweils drei weitere (Dns-NVal, Dns- α ABA und Dns-Thr) konnten mit einer Auflösung darunter getrennt beziehungsweise nicht getrennt werden (Dns-Val, Dns-Leu und Dns-NLeu). Dns-Glut und Dns-Asp konnten dabei über 70 Minuten nicht detektiert werden. Neu eingeführte Analyten waren hierbei Dns-Val, Dns-Leu und Dns-Thr. Die nächste Abbildung zeigt die chirale Trennung von Dns-Tryptophan aus dieser Sequenz.

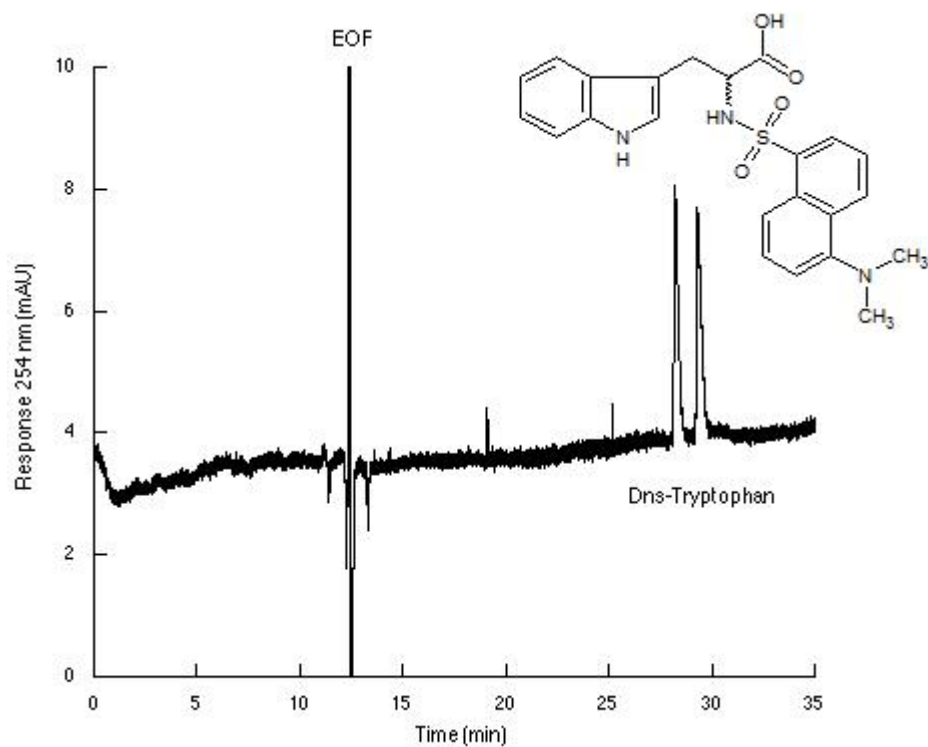


Abbildung 29: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan mittels
L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Kupferacetat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 17 kV zur Kathode, $\sim 9,5 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Da für L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexe noch keine chiralen Trennungen für dansylierte Aminosäuren bekannt waren, wurden diese bezüglich ihrer Abhängigkeit der Auflösung R_s auf pH-Wert und Gesamtmolarität des Komplexes getestet. Für das Selektor-Metallionen-Verhältnis wurde L-Phenylalaninamid zu Nickel als zwei zu eins gewählt. Folgendes Diagramm zeigt die Abhängigkeit der Auflösung R_s für verschiedene pH-Werte anhand der Modellsubstanzen Dns-Tryptophan und Dns-Methionin.

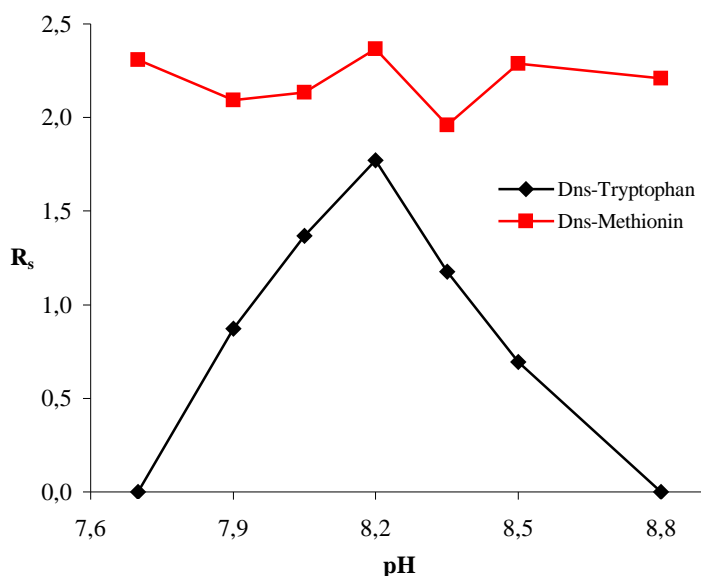


Abbildung 30: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexes für die Modellsubstanzen Dns-Tryptophan und Dns-Methionin

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Nickelsulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH jeweils eingestellt mit 1M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Dabei wurde zuerst die Modellsubstanz Dns-Methionin über einen pH-Wert von 7,65 bis 8,80 betrachtet. Die beste Auflösung wurde bei einem pH-Wert von 8,2 erreicht, jedoch zeigten die erhaltenen Werte für Dns-Methionin über den betrachteten Bereich keine Linearität. Deshalb wurde eine zweite Modellsubstanz, Dns-Tryptophan, ausgewählt und die Messungen über denselben pH-Bereich wiederholt. In diesem Fall wurde das Auflösungsmaximum ebenfalls bei pH 8,2 erreicht, jedoch zeigte sich die

Abhängigkeit des pH-Wert dabei deutlich. Alle folgenden Messungen für Nickel (II) als Zentralion wurden somit bei pH 8,2 durchgeführt.

Darauf folgend wurde die Abhängigkeit der Auflösung R_s für unterschiedliche Gesamtmolaritäten des L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexes getestet. Diese ist in nachfolgendem Diagramm dargestellt.

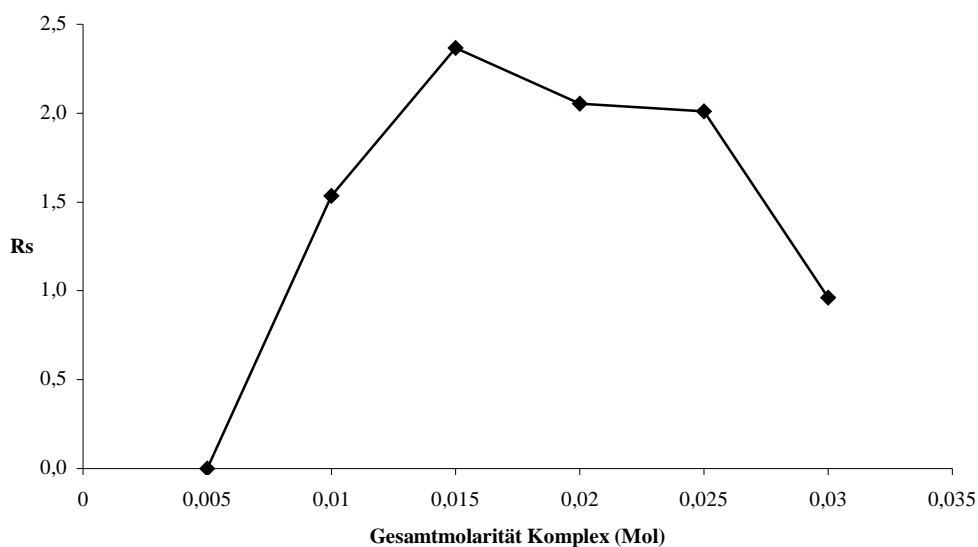


Abbildung 31: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexes anhand der Modells substanz Dns-Methionin

Bedingungen: Verhältnis L-Phenylalaninamid zu Nickelsulfat 2:1, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Diese wurde dabei über den Bereich von 5 bis 30 mM der Gesamtmolarität des Komplexes nur anhand der Modells substanz Dns-Methionin getestet. Es zeichnete sich dabei eine gewisse Linearität in den Messungen ab und ein Maximum konnte bestimmt werden. Dieses befand sich bei einer Gesamtmolarität von 15 mM (L-Phenylalaninamid:Nickel 10:5 mM).

Nach der Optimierung der Analysenbedingungen für den L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplex wurden alle 11 bisher verwendeten dansylierten Aminosäuren ebenfalls in einer Sequenz getestet. Die Trennergebnisse sind in nachfolgender Tabelle gelistet.

Tabelle 5: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	ω_1	ω_2	α_{app}	R_s
Dns-Trp	24,942	25,249	0,2097	0,1368	1,012	1,8
Dns-Leu	20,762	20,907	0,2659	0,1262	1,007	0,7
Dns-Val	18,892	-	0,1761	-	1,000	-
Dns-Glut	9,509	9,582	0,0440	0,1411	1,008	0,8
Dns-NVal	18,516	18,649	0,2192	0,0934	1,007	0,9
Dns-αABA	17,531	17,644	0,1929	0,1175	1,006	0,7
Dns-Met	22,901	23,847	0,3772	0,4221	1,041	2,4
Dns-Asp	-	-	-	-	-	-
Dns-NLeu	18,592	18,759	0,2179	0,0896	1,009	1,1
Dns-Phe	18,599	18,832	0,1264	0,1020	1,013	2,0
Dns-Thr	19,702	-	0,2591	-	1,000	-

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Nickelsulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, $\sim -14 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Dabei konnte für drei der 11 Analyten (Dns-Trp, Dns-Met und Dns-Phe) eine Auflösung von über 1,5 erreicht werden. Für weitere fünf (Dns-Leu, Dns-Glut, Dns-NVal, Dns- α ABA und Dns-NLeu) konnte eine Trennung unter diesem Wert erfolgen. Somit zeigten für das Zentralion Nickel (II) nur drei der getesteten dansylierten Aminosäuren (Dns-Val, Dns-Asp und Dns-Thr) keine chirale Trennung, wobei die Substanz Dns-Asp über 50 Minuten nicht beobachtet werden konnte. Nachfolgende Abbildung zeigt die chirale Trennung von Dns-Methionin aus dieser Sequenz.

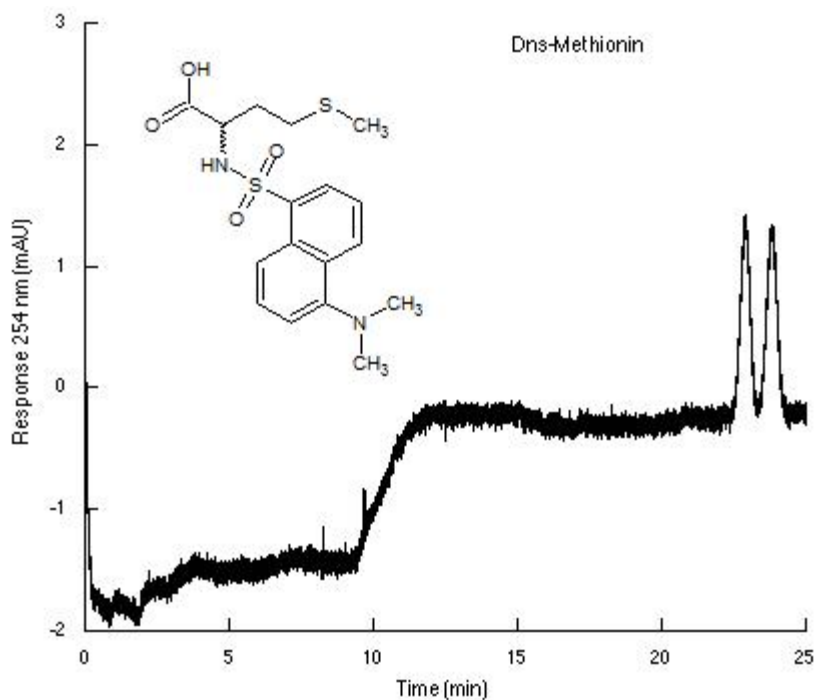


Abbildung 32: Chirale Trennung von Dns-Methionin mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Nickelsulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, $\sim -14 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Zudem wurden für den L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplex weitere Versuche durchgeführt. Durch spiken der Probe Dns-Methionin mit dem reinen L-Enantiomer konnte die Migrationsreihenfolge der Enantiomere als D vor L bestimmt werden. Diese ist in nachfolgendem Elektropherogramm dargestellt.

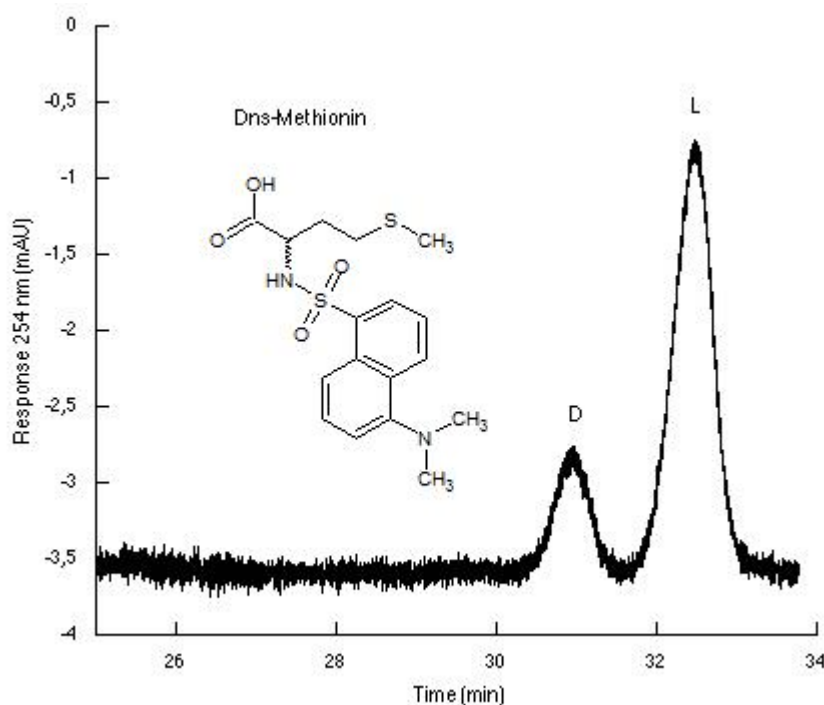


Abbildung 33: Chirale Trennung von gespicktem Dns-Methionin mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Nickelsulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, $\sim -14 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Phenylalaninamid-Nickel-Komplexe sind demnach auch zur Reinheitsprüfung von dansylierten Aminosäuren geeignet, da das D-Enantiomer schneller migriert als seine L-Form. Es wird somit früher detektiert und fällt damit auch nicht einen Bereich eines eventuellen tailings dieser. Die Migrationszeiten der oben gezeigten Messung gleichen denen der Sequenz für Dns-Methionin nicht. Es wurde aufgrund dessen im Anschluss erneut eine ungespickte Probe vermessen, bei welcher die Migrationszeiten wieder mit denen der Sequenz übereinstimmten. Es konnte somit kein Grund für die Migrationszeitenerhöhung der gespickten Probe gefunden werden.

Desweiteren konnten die drei Analyten Dns-Methionin, Dns-Phenylalanin und Dns-Tryptophan zusammen in einer Probe unter den optimierten Analysenbedingungen getrennt werden. Hierbei zeigte sich, dass Migrationszeiten der einzelnen Substanzen änderte. Dieses ist der nachfolgendem Elektropherogramm abgebildet.

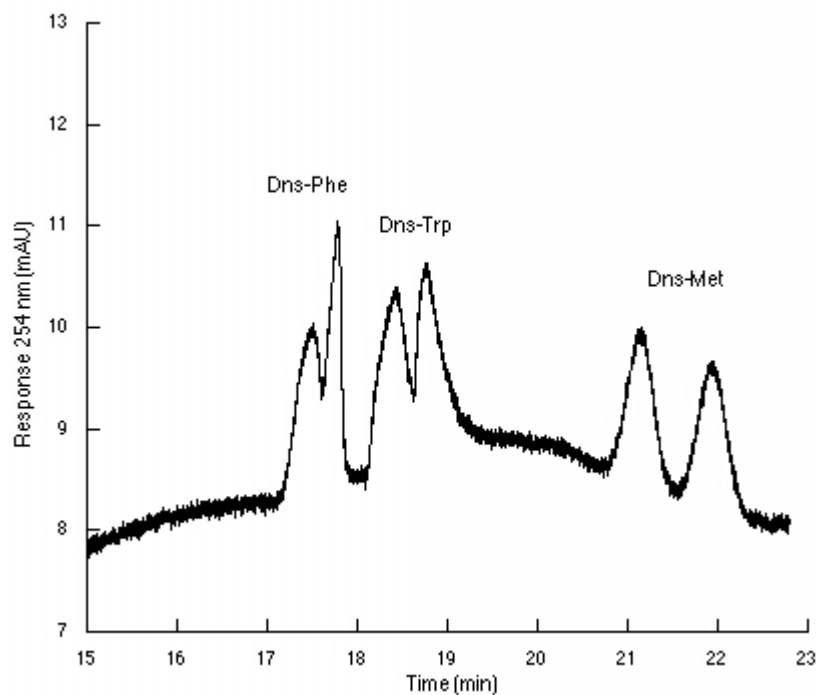


Abbildung 34: Chirale Trennung von Dns-Methionin, Dns-Phenylalanin und Dns-Tryptophan mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Nickelsulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, $\sim -14 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 5 mbar, 6 s

Nach den erhaltenen Migrationszeiten der Sequenz müsste die Reihenfolge zu detektierenden Analyten Dns-Phe, im Anschluss Dns-Met und zuletzt Dns-Trp lauten.

Analog zu den Messungen mit Zink (II), Kupfer (II) und Nickel (II) wurden zuletzt die Zentralionen Kobalt (II) und Cadmium (II) getestet. Für diese wurden keine erneuten Messungen zur Optimierung des pH-Werts und der Gesamtmolarität des Komplexes vorgenommen und somit die selbe Puffer-, pH- und Selektorkonzentrationen verwendet. Folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Trennergebnisse für Cadmium (II) als Zentralatom.

Tabelle 6: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Cadmium-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	ω_1	ω_2	α_{app}	R_s
Dns-Trp	36,130	-	0,8021	-	1,000	-
Dns-Leu	31,854	-	0,5280	-	1,000	-
Dns-Val	34,548	-	0,4046	-	1,000	-
Dns-Glut	-	-	-	-	-	-
Dns-NVal	50,115	50,336	1,3628	0,2891	1,004	0,3
Dns-αABA	37,986	-	0,4648	-	1,000	-
Dns-Met	-	-	-	-	-	-
Dns-Asp	33,082	33,416	0,2467	0,2261	1,010	1,4
Dns-NLeu	53,405	53,967	1,0218	0,4282	1,011	0,8
Dns-Phe	58,901	-	1,4181	-	1,000	-
Dns-Thr	-	-	-	-	-	-

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Cadmiumchlorid 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, $\sim -14 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Im Falle von Cadmium (II) als Zentralatom konnten nur drei der getesteten 11 Analyten getrennt werden. Dns-NVal, Dns-Asp und Dns-NLeu zeigten dabei Auflösungen von unter 1,5. Dns-Thr, Dns-Met und Dns-Glut erschienen dabei über 60 Minuten nicht. Für die restlichen fünf der getesteten 11 dansylierten Aminosäuren erfolgte keine chirale Trennung. In nachfolgendem Elektropherogramm ist die chirale Trennung von Dns-Methionin aus dieser Sequenz dargestellt.

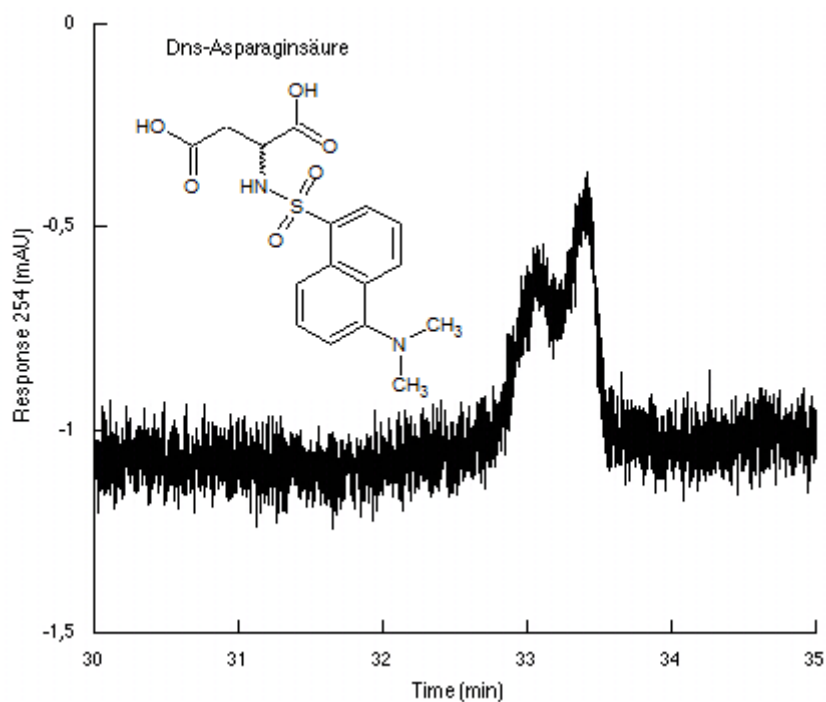


Abbildung 35: Chirale Trennung von Dns-Asparaginsäure mittels L-Phenylalaninamid-Cadmium-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Cadmiumchlorid 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, $\sim -14 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Für Kobalt (II) wird an dieser Stelle keine Tabelle aufgeführt, da unter Verwendung dieses Zentralatoms keine Trennungen erfolgten. Die Messungen wurden dabei für alle 11 dansylierten Aminosäuren sowohl unter positiver Spannung (analog zu Cu (II): 17 kV zur Kathode) als auch unter negativer (analog zu Zn (II), Ni (II) und Cd (II): 23 kV zur Anode) durchgeführt.

5.5.1.1.1 Zusammenfassung der Trennergebnisse von L-Phenylalaninamid als chiraalem Selektor für die Substanzklasse der Dansyl-Aminosäuren

In der nachfolgenden Abbildung sind noch einmal alle bisher aufgeführten Auflösungen R_s hinsichtlich des L-Phenylalaninamidkomplexes mit den Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II), Kupfer (II), und Cadmium (II) für die 11 untersuchten dansylierten Aminosäuren zusammenfassend in einem Diagramm dargestellt.

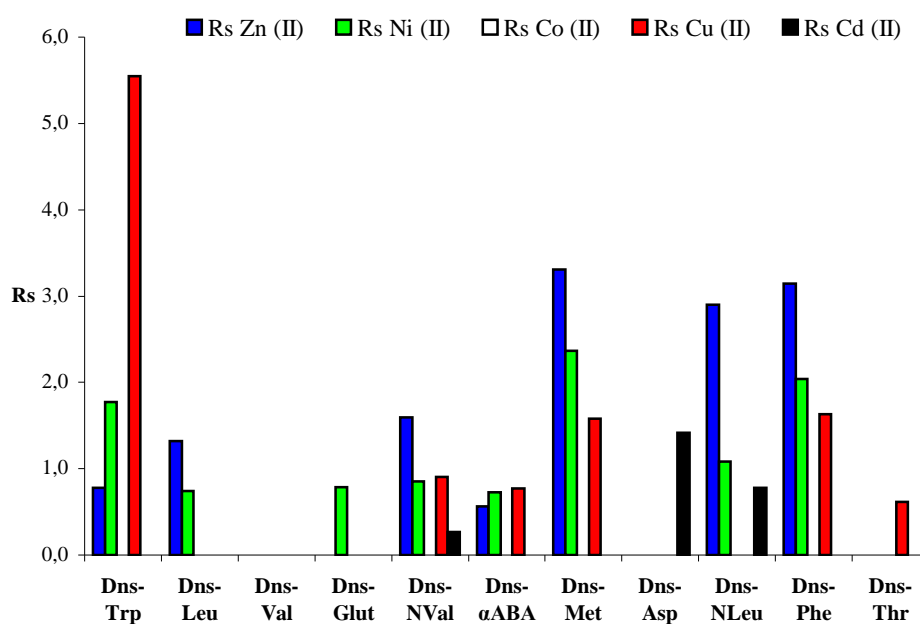


Abbildung 36: Unterschiede in der Auflösung R_s und der Affinität unterschiedlicher Zentralionen zu dansylierten Aminosäuren

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Zentralion 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung für Zn (II), Co (II), Ni (II) und Cd (II): 23 kV zur Anode, angelegte Spannung für Cu (II) und Co (II): 17 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Aus diesem wird ersichtlich, dass unter ansonsten identischen Analysenbedingungen bezüglich pH-Wert, Pufferkonzentration, Selektor-Zentralionen-Konzentration und -Verhältnis, Probenaufgabe und angelegter Spannung (außer der positiv gewählten Spannung für Kupfer (II)), die Wahl des Zentralatoms entscheidenden Einfluss auf die Trennung der Analyten hat. Dies spiegelte sich in der Auflösung R_s und der Affinität als

Komplex zu den verwendeten Analyten wider. Somit zeigte zum Beispiel nur Nickel (II) als Komplexzentrum für L-Phenylalaninamid die Eigenschaft Dns-Glut zu trennen und nur mit Kupfer (II) konnte Dns-Thr getrennt werden. Sogar Cadmium (II), welches insgesamt nur drei der getesteten 11 dansylierten Aminosäuren trennen konnte, zeigte als einziges Zentralatom die Eigenschaft Dns-Asp zu trennen.

5.5.1.2 N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren

Als nächste Substanzklasse wurden N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren untersucht. Analog zu den dansylierten Aminosäuren wurden auch diese mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen vermessen. Für diese wurden aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit keine erneuten Optimierungsversuche durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Trennergebnisse der 9 getesteten Analyten aufgeführt.

Tabelle 7: Trennergebnisse für N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren mittels L-Phenylalaninamid-Nickel-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	ω_1	ω_2	α_{app}	R_s
DNP-Phe	15,364	-	1,0015	-	1,00	-
DNP-Met	15,028	-	0,6617	-	1,00	-
DNP-Citr	16,791	-	0,1439	-	1,00	-
DNP-ACA	-	-	-	-	-	-
DNP-NLeu	-	-	-	-	-	-
DNP-NVal	15,587	-	0,8164	-	1,00	-
DNP-Glut	7,557	-	0,1235	-	1,00	-
DNP-Eth	17,573	-	0,2081	-	1,00	-
DNP-MetSO	17,478	-	0,5884	-	1,00	-

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Nickelsulfat 5 mM, Natriumacetat 5 mM, Borsäure 100 mM, pH 8,2 eingestellt mit 1 M Trislösung, angelegte Spannung: 23 kV zur Anode, ~ -14 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 6 s

Dabei kam es bei keiner der verwendeten N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren zu einer chiralen Auftrennung. Die Sequenzmessung wurde daraufhin mit einer höheren Gesamtmolarität von insgesamt 40 mM (L-Phenylalaninamid:Nickel 26,66:13,33 mM) wiederholt. Unter diesen Bedingungen konnte ebenfalls keine chirale Trennung sondern nur eine Erhöhung der Migrationszeiten erreicht werden.

5.5.1.3 α -Hydroxysäuren

Für weitere Untersuchungen von L-Phenylalaninamid als chiralem Selektor wurden als weitere Analytklasse α -Hydroxysäuren in Erwägung gezogen. Dafür wurde, wie bei den bisher verwendeten Analyten, für den Puffer eine Selektorkonzentration von 10 mM und Kupfer (II) als Zentralion in einer Konzentration von 5 mM verwendet. Diese wurden in einer 25 mM Ammoniumacetatlösung für einen groben pH-Scan mit konzentriertem Ammoniak oder verdünnter Essigsäure auf die jeweiligen Werte eingestellt. Das Verhältnis von Selektor zu Zentralion wurde in allen Messungen als zwei zu eins beibehalten. Folgende Tabelle beinhaltet die erhaltenen Trennergebnisse für die Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure.

Tabelle 8: Grober pH-Scan für α -Hydroxysäuren anhand der Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	pH
3-(3-indolyl)-Milchsäure	8,670	-	7,251	0,1025	-	1,000	-	4
	13,100	-	9,243	0,2877	-	1,000	-	5
	27,761	28,072	13,416	0,9113	0,2543	1,022	0,5	6
	30,084	32,432	9,601	0,9189	0,9224	1,115	2,6	7
	10,538	10,764	5,303	0,2093	0,1484	1,043	1,3	8

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH eingestellt mit Ammoniak conc. oder Essigsäure verd., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 20 mbar, 5 s

Da sich durch diese Messungen bestätigte, dass L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexe ebenfalls die Eigenschaft besitzen α -Hydroxysäuren chiral zu trennen, wurden weitere Messungen zur Optimierung der Analysenbedingungen durchgeführt.

Diese begannen mit einer weiteren Optimierung des pH-Wertes. Es wurde dafür ein pH-Bereich zwischen 5,5 und 8,6 näher betrachtet. Die Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure wurde dafür beibehalten und die Probenaufgabe 20 mbar für 5 s auf 10 mbar für 5 s aufgrund der guten Detektion dieser gesenkt. Folgendes Diagramm zeigt die Abhängigkeit der Auflösung R_s für die unterschiedlich verwendeten pH-Werte.

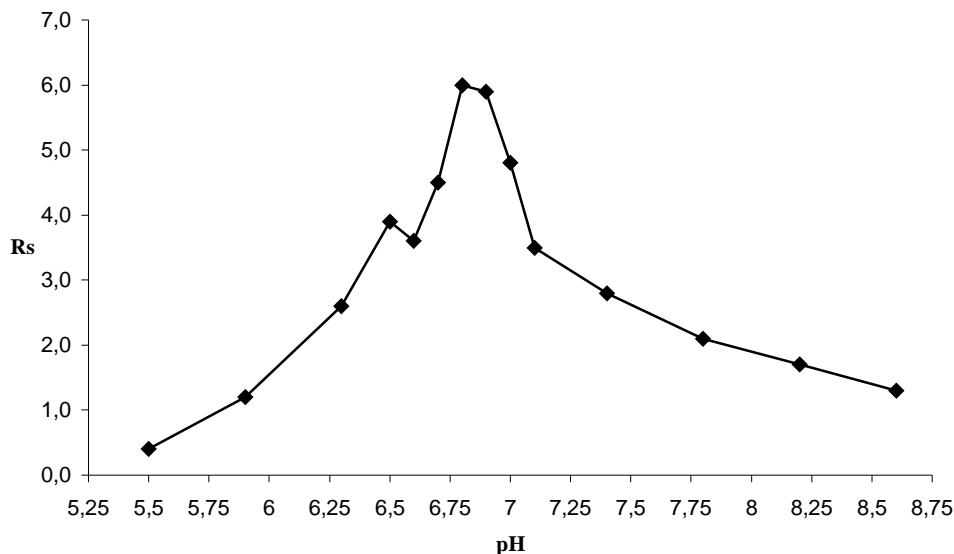


Abbildung 37: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexes für die Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH eingestellt mit Ammoniak conc. oder Essigsäure verd., angelegte Spannung: 28 kV zur Katode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Dabei stellte sich heraus, dass das Maximum für die Auflösung R_s der Modellsubstanz bei einem pH-Wert 6,85 liegt. Dieser Wert wurde somit in allen weiteren Messungen verwendet.

Für die weitere Optimierung wurde die Gesamtmolarität des L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexes über einen Bereich von 7,5 mM bis 30 mM betrachtet. Die erhaltenen dafür Werte sind im nachfolgendem Diagramm dargestellt.

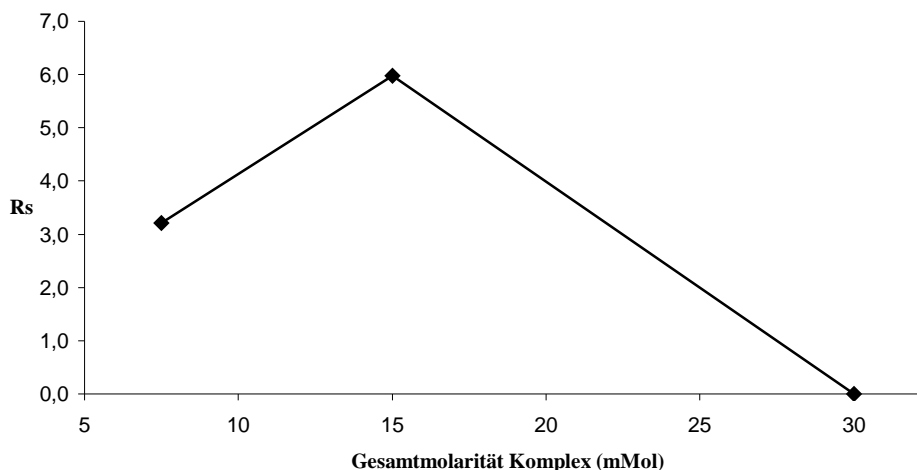


Abbildung 38: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexes für die Modells substanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure

Bedingungen: Verhältnis L-Phenylalaninamid zu Kupfersulfat 2:1, Ammoniumacetat 25 mM, pH 6,85 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 30 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5s

Es zeigte sich, dass sich mit einer Erhöhung der Selektor-Metallionen-Konzentration sich auch die Auflösung R_s verbesserte. Jedoch stiegen mit der Auflösungsverbesserung auch die Migrationszeiten an, so dass bei einer Gesamtmolarität des Komplexes von 30 mM (L-Phenylalaninamid:Kupfer 20:10 mM) über 60 Minuten keine Substanz mehr detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Gesamtmolarität von 15 mM (L-Phenylalaninamid:Kupfer 10:5 mM) als Kompromiss zwischen der Auflösung R_s und der Migrationszeit beibehalten.

Unter den optimierten Analysenbedingungen wurden nun, unter einer Ammoniumacetatkonzentration von 40 mM und einer Probenaufgabe von 25 mbar für 5 s, 19 α -Hydroxysäuren vermessen. Folgende Tabelle beinhaltet dafür die Trennergebnisse.

Tabelle 9: Trennergebnisse für α -Hydroxysäuren mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s
Mandelsäure	-	-	6,918	-	-	1,000	-
3,4-Dihydroxymandelsäure	-	-	6,918	-	-	1,000	-
4-Methoxymandelsäure	-	-	6,918	-	-	1,000	-
4-Chloromandelsäure	-	-	6,976	-	-	1,000	-
4-Bromomandelsäure	-	-	6,944	-	-	1,000	-
4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	29,149	31,232	6,921	0,6722	0,6276	1,094	3,2
4-Hydroxymandelsäure	38,510	42,780	6,887	1,0370	1,0780	1,135	4,0
3-Hydroxymandelsäure	36,044	39,192	6,491	1,2127	1,4170	1,107	2,4
α-Hydroxyisovaleriansäure	-	-	6,995	-	-	1,000	-
α-Hydroxyvaleriansäure	-	-	6,795	-	-	1,000	-
α-Hydroxyglutarsäure	-	-	6,964	-	-	1,000	-
α-Hydroxyisocapronsäure	-	-	7,079	-	-	1,000	-
2-(p-methoxyphenoxy)-Propionsäure	-	-	6,421	-	-	1,000	-
Tropasäure	-	-	6,359	-	-	1,000	-
β-Phenylmilchsäure	15,606	16,194	6,252	0,4723	0,3427	1,063	1,4
3-(3-indolyl)-Milchsäure	19,357	20,549	6,330	0,2865	0,3377	1,092	3,8
Atromilchsäure	19,637	-	6,156	0,5351	-	1,000	-
3-Phenylmilchsäure	43,853	47,564	6,314	1,0400	0,9236	1,099	3,8
p-Hydroxyphenylmilchsäure	25,818	26,270	6,140	0,7648	0,3090	1,023	0,8

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 40 mM, pH 6,85 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 28 kV zur Kathode, $\sim 43 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 25 mbar, 5 s

Dabei konnten in den Messungen für fünf der 19 α -Hydroxysäuren eine Auflösung von über 1,5 erreicht werden. Zwei weitere konnten mit einer Auflösung unter diesem Wert detektiert werden. Nur eine der detektierten α -Hydroxysäuren trennte sich nicht. 11 der

vermessenen Analyten konnten über einen Zeitraum von 50 Minuten nicht detektiert werden.

Im Anschluss an die Sequenz wurden zusätzlich noch Messungen mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), welches in einer Konzentration von 2 mM (CMC 1,2 mM) zum Elektrolyten beigegeben wurde, durchgeführt. Dieses Detergens lagert sich mit seinen positiv geladenen Ende an die negativ geladenen Silanolgruppen der Quarzkapillare und erzeugt unter Ausbildung eines Bilayers einen anodischen EOF. Die Messungen sollten aufgrund dieses Zusatzes beschleunigt werden, da die α -Hydroxysäuren unter dem verwendeten pH-Wert negativ geladen sind. Jedoch konnte den Elektropherogrammen nach der Zugabe von CTAB aufgrund einer extrem unruhigen und wandernden Basislinie nichts mehr entnommen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre gewesen, von der angelegten positiven Spannung vom ins Negative zu wechseln. Diese Möglichkeit wurde jedoch nicht ausgetestet und sollte, bei einem weiteren Versuch die verbleibenden 11 α -Hydroxysäuren zu detektieren und zu trennen, nicht außer Acht gelassen werden.

Folgendes Elektropherogramm zeigt eine chirale Trennung von 3-Hydroxy-3-methoxy-mandelsäure. Diese Messung stammt nicht aus der Sequenz und wurde unter einer Probenaufgabe von 10 mbar für 5 s bei 30 kV (Ammoniumacetat 25 mM) durchgeführt.

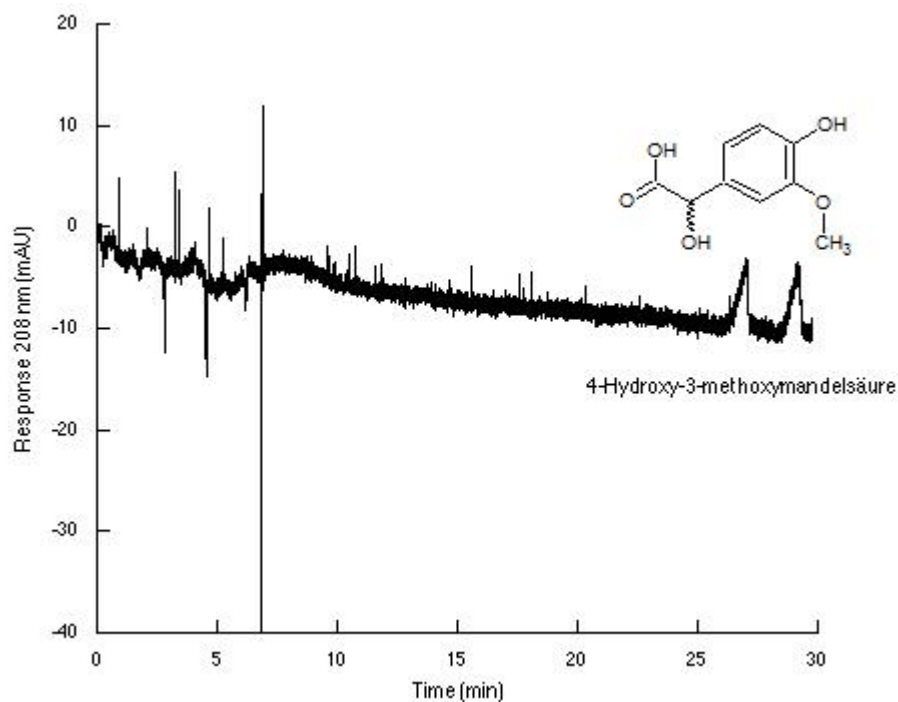


Abbildung 39: Chirale Trennung von 3-Hydroxy-3-methoxymandelsäure mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 6,85 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 30 kV zur Kathode, ~ 36,5 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Zudem konnte für die α -Hydroxysäuren, welche mittels des L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexes getrennt wurden, die Migrationsreihenfolge der Enantiomere als D vor L bestimmt werden und es konnten ein Milchsäure- und ein Mandelsäurederivat in einem Lauf basisliniengetrennt werden. Dieses ist der nachfolgender Abbildung dargestellt.

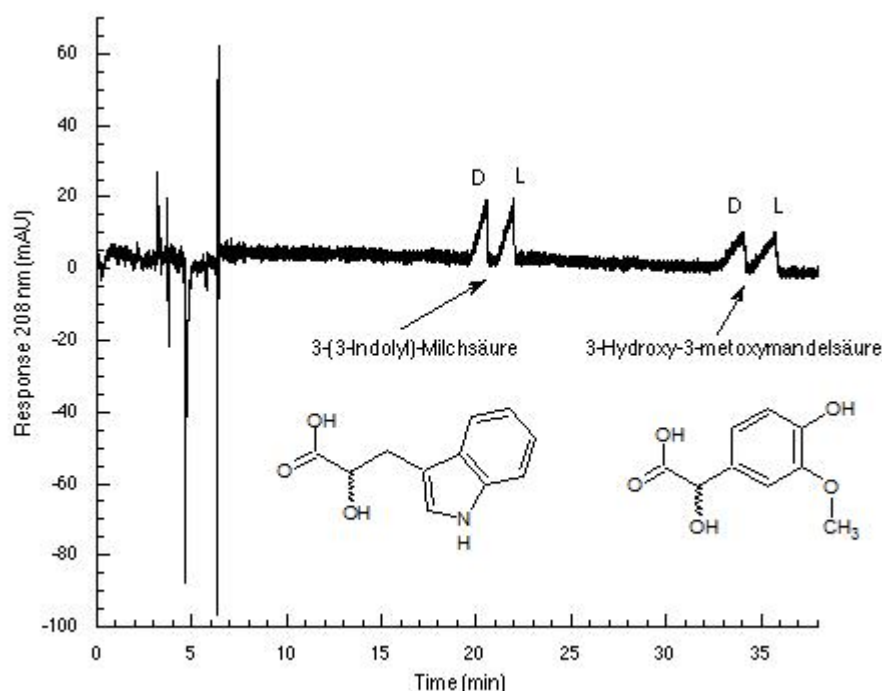


Abbildung 40: Chirale Trennung von 3-(3-indolyl)-Milchsäure und 3-Hydroxy-3-methoxymandelsäure mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 40 mM, pH 6,85 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 28 kV zur Kathode, $\sim 43 \mu\text{A}$, Probenaufgabe 25 mbar, 5s

Desweiteren wurden die schon bei den dansylierten Aminosäuren verwendeten Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) als Komplexzentrum getestet. Für die ersten drei von ihnen wurden vier α -Hydroxysäuren ausgewählt und in einer Sequenz über 60 Minuten vermessen. Dies geschah unter denselben Bedingungen wie für Kupfer (II) ohne eine weitere Optimierung hinsichtlich des pH-Wertes oder der Gesamtmolarität des verwendeten Komplexes. Im Falle von Cadmium (II) als Zentralion wurde eine eigene Sequenz, welche alle 19 bisher verwendeten α -Hydroxysäuren beinhaltet, vermessen. In dieser konnte nur der Analyt 3-(3-indolyl)-Milchsäure mit einem Trennfaktor α_{eff} von 1,02 und Auflösung R_s von 1,1 angetrennt werden. Die Trennergebnisse für die Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) sind nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 10: Trennergebnisse für α -Hydroxysäuren unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II) und Kobalt (II) mittels L-Phenylalaninamidkomplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	Zentralion
3,4-Dihydroxymandelsäure	-	-	9,802	-	-	-	-	Zn (II)
4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	47,222	-	8,981	1,0125	-	1,000	-	
3-(3-indolyl)-Milchsäure	25,213	26,903	8,155	0,4773	0,4859	1,099	3,5	
p-Hydroxyphenylmilchsäure	26,579	26,905	7,779	0,5943	0,2433	1,017	0,8	
3,4-Dihydroxymandelsäure	48,842	-	9,101	1,3166	-	1,000	-	Ni (II)
4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	41,649	42,856	9,047	0,8755	0,6268	1,037	1,6	
3-(3-indolyl)-Milchsäure	18,655	23,164	8,329	0,4200	0,5218	1,437	9,6	
p-Hydroxyphenylmilchsäure	30,411	32,710	8,335	0,9497	0,8669	1,104	2,5	
3,4-Dihydroxymandelsäure	34,838	-	7,443	0,5998	-	1,000	-	Co (II)
4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	38,325	-	7,693	0,7469	-	1,000	-	
3-(3-indolyl)-Milchsäure	40,428	42,021	7,964	0,6580	0,6064	1,049	2,5	
p-Hydroxyphenylmilchsäure	48,837	-	7,753	0,6339	-	1,000	-	

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Zentralion 5 mM, Ammoniumacetat 40 mM, pH 6,85 eingestellt mit Essigsäure verd., angelegte Spannung: 24 kV zur Kathode, Probenaufgabe 25 mbar, 5s

Bei diesen Messungen zeigte sich, dass L-Phenylalaninamid unter Einsatz verschiedener Metallionen nicht nur die Fähigkeit besitzt die Enantiomere von dansylierten Aminosäuren zu trennen, sondern auch die Enantiomere von α -Hydroxysäuren unter ansonsten identischen Analysenbedingungen trennen kann. Wieder ergaben sich hinsichtlich der Auflösung R_s und der Affinität als Komplex zu den einzelnen Substanzen deutliche Unterschiede. In der nachfolgenden Abbildung ist dies anhand der Elektropherogramme der Substanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure für die verschiedenen Zentralionen dargestellt.

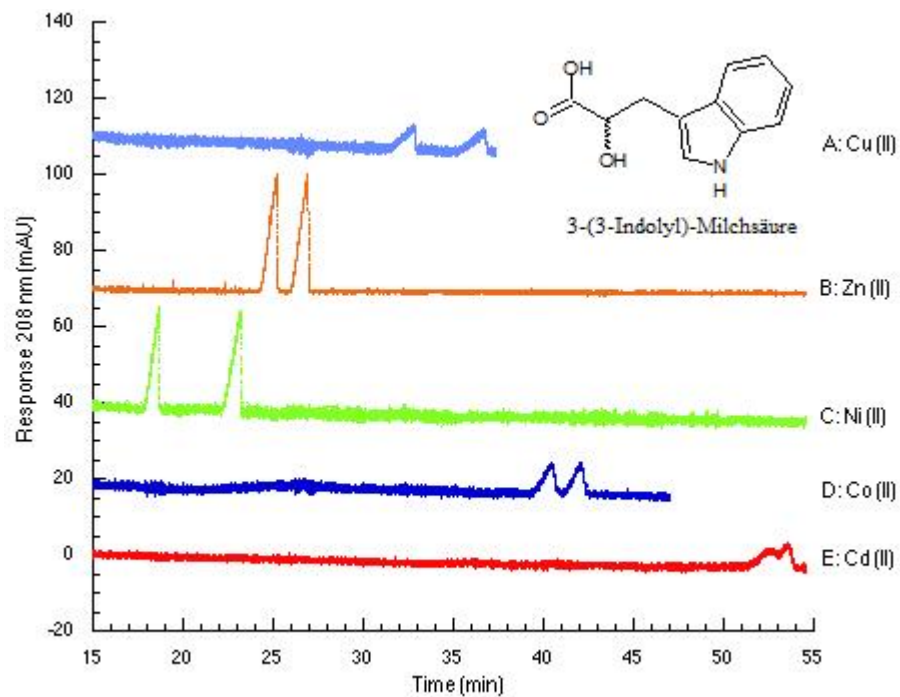


Abbildung 41: Chirale Trennungen von 3-(3-indolyl)-Milchsäure unter Verwendung verschiedener Zentralionen für den L-Phenylalaninamidkomplex

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, Zentralion 5 mM, für A: Ammoniumacetat 25 mM, für B bis E: Ammoniumacetat 40 mM, pH 6,85 eingestellt mit Ammoniak conc. oder Essigsäure verd., angelegte Spannung für A: 28 kV zur Kathode, angelegte Spannung für B bis E: 24 kV zur Kathode, Probenaufgabe für A: 10 mbar, 5 s, Probenaufgabe für B bis E: 25 mbar, 5 s

5.5.2 L-Threonin

Der dritte chirale Selektor, welcher in dieser Arbeit getestet wurde, war L-Threonin. Dieser wurde schon von *Schmid et al.* [57] erfolgreich zur Trennung der Enantiomere von β -Blockern und Sympathomimetika eingesetzt. In dieser Arbeit wurde mit diesem versucht, die Enantiomere von dansylierten Aminosäuren und α -Hydroxysäuren trennen. Die Struktur von L-Threonin ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

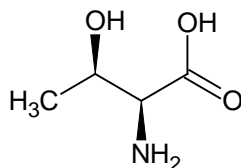


Abbildung 42: L-Threonin

5.5.2.1 α -Hydroxysäuren

Zuerst wurde für L-Threonin mit Kupfer (II) als Zentralion die Substanzklasse der α -Hydroxysäuren betrachtet. Mit einer willkürlich verwendeten Selektor-Zentralionenkonzentration von 60 mM zu 30 mM wurden die pH-Werte 4, 5 und 6 durch konzentrierten Ammoniak eingestellt und die Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure getestet. Aufgrund der hohen verwendeten Selektor-Metallion-Konzentration geschah dies ohne einen Salzzusatz wie Ammoniumacetat im Falle von L-Phenylalaninamid. Als Verhältnis von Selektor zu Zentralion wurde über die kompletten Messungen wieder zwei zu eins gewählt. Nachfolgende Tabelle beinhaltet die erhaltenen Trennergebnisse für die oben genannten pH-Werte.

Tabelle 11: Grober pH-Scan für α -Hydroxysäuren anhand der Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	pH
p-Hydroxyphenylmilchsäure	10,184	10,346	7,324	0,1471	0,1062	1,06	1,3	4
	13,764	14,164	7,650	0,2596	0,1953	1,07	1,8	5
	14,130	14,429	6,230	0,3337	0,1585	1,04	1,2	6

Bedingungen: L-Threonin 60 mM, Kupfersulfat 30 mM, pH jeweils eingestellt Ammoniak conc., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Da sich für diese drei pH-Werte das Maximum der Auflösung R_s bei pH 5 zwischen den beiden anderen vermessenen Werten befand, wurde erneut in derselben Selektor-Metallionenkonzentration ein pH-Bereich von 4,4 bis 5,2 in Schritten zu 0,2 näher betrachtet. Die Abhängigkeit der Auflösung R_s und des Trennfaktors α_{eff} für die unterschiedlichen pH-Werte ist nach folgender Abbildung dargestellt.

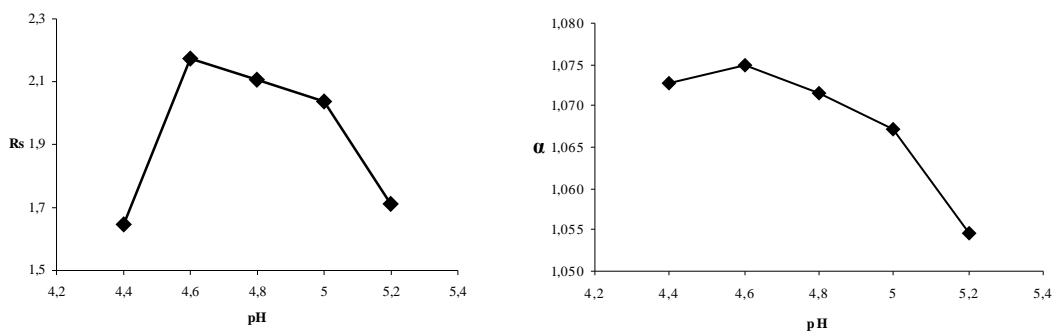


Abbildung 43: Abhängigkeit der Auflösung R_s und des Trennfaktors α_{eff} von unterschiedlichen pH-Werten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure

Bedingungen: L-Threonin 60 mM, Kupfersulfat 30 mM, pH jeweils eingestellt Ammoniak conc., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Durch diese Messungen konnte somit ein Auflösungs- und Trennfaktormaximum bei einem pH-Wert von 4,6 festgestellt werden. Dieser wurde in allen weiteren Messungen verwendet.

Im Anschluss daran wurden für die weitere Optimierung die Gesamtmolarität des L-Threonin-Kupfer-Komplexes über einen Bereich von 7,5 mM bis 135 mM betrachtet. Die erhaltenen dafür Werte sind im nachfolgendem Diagramm dargestellt.

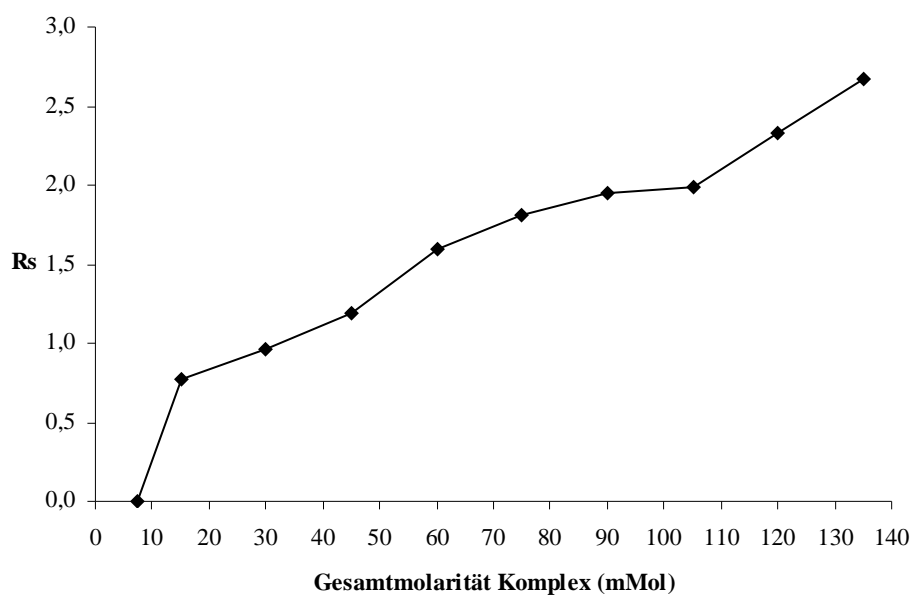


Abbildung 44: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure

Bedingungen: Verhältnis L-Threonin zu Kupfersulfat 2:1, pH 4,6 eingestellt Ammoniak conc., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Dabei zeigte sich, dass mit höher werdender Konzentration des L-Threonin-Kupfer-Komplexes auch die Auflösung R_s konstant anstieg. Die Messungen wurden jedoch bei einer Gesamtmolarität von 135 mM (L-Threonin:Kupfer 90:45 mM) gestoppt um Detektionsprobleme zu vermeiden. Dieser Wert wurde somit auch in allen weiteren Messungen verwendet.

Unter den optimierten Analysenbedingungen wurden nun alle 19 α -Hydroxysäuren, welche auch schon mittels L-Phenylalaninamidkomplexen getestet wurden, in einer Sequenz über 40 Minuten pro Messung betrachtet. Folgende Tabelle beinhaltet deren Trennergebnisse.

Tabelle 12: Trennergebnisse für α -Hydroxysäuren mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s
Mandelsäure	15,752	16,103	6,799	0,2593	0,2017	1,039	1,5
3,4-Dihydroxymandelsäure	12,137	12,222	6,781	0,1984	0,0474	1,016	0,7
4-Methoxymandelsäure	13,035	13,247	6,728	0,2607	0,1699	1,034	1,0
4-Chloromandelsäure	15,028	15,291	6,773	0,2149	0,1584	1,032	1,4
4-Bromomandelsäure	14,634	14,906	6,824	0,1854	0,1435	1,035	1,7
4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	11,698	11,867	6,884	0,1570	0,1032	1,035	1,3
4-Hydroxymandelsäure	12,324	12,547	6,952	0,1840	0,1408	1,042	1,4
3-Hydroxymandelsäure	13,536	13,801	7,023	0,1993	0,1414	1,041	1,6
α-Hydroxyisovaleriansäure	-	-	7,111	-	-	-	-
α-Hydroxyvaleriansäure	-	-	7,183	-	-	-	-
α-Hydroxyglutarsäure	-	-	7,280	-	-	-	-
α-Hydroxyisocapronsäure	-	-	7,379	-	-	-	-
2-(p-methoxyphenoxy)-Propionsäure	19,054	-	7,491	0,2602	-	1,000	0,0
Tropasäure	12,479	-	7,606	0,1936	-	1,000	0,0
β-Phenylmilchsäure	10,922	-	7,726	0,1417	-	1,000	0,0
3-(3-indolyl)-Milchsäure	8,883	-	7,576	0,0907	-	1,000	0,0
Atromilchsäure	13,079	13,274	8,003	0,1899	0,1136	1,038	1,3
3-Phenylmilchsäure	11,251	-	8,143	0,1387	-	1,000	0,0
p-Hydroxyphenylmilchsäure	13,430	13,852	8,251	0,1661	0,1499	1,081	2,7

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 4,6 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, ~ 60 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Es konnten in der Sequenz alle verwendeten Substanzen, mit Ausnahme der vier getesteten aliphatischen α -Hydroxysäuren, welche über die Analysenzeit von 40 Minuten nicht erschienen, innerhalb von maximal 19 Minuten detektiert werden. Dabei konnte bei allen acht verwendeten Mandelsäurederivate in einer Zeit von weniger als 16 Minuten eine chirale Trennung beobachtet werden. Zudem war dies für zwei Milchsäurederivate, nämlich Atromilchsäure mit einer Auflösung von 1,3 und p-Hydroxyphenylmilchsäure mit einer Auflösung von 2,7, der Fall. Die restlichen fünf α -Hydroxysäuren zeigten unter Einfluss der L-Threonin-Kupfer-Komplexe keine chirale Trennung.

Folgende Abbildung zeigt das Elektropherogramm von p-Hydroxyphenylmilchsäure aus der vermessenen Sequenz.

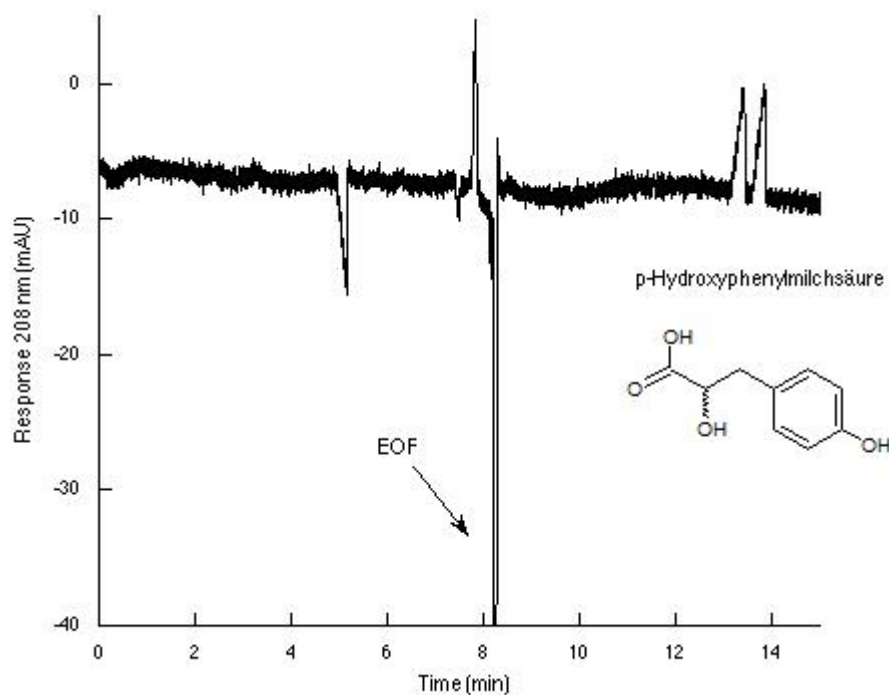


Abbildung 45: Chirale Trennung von p-Hydroxyphenylmilchsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 4,6 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, ~ 60 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Zudem konnte für die α -Hydroxysäuren, welche mittels der L-Threonin-Kupfer-Komplexe getrennt wurden, die Migrationsreihenfolge der Enantiomere durch spiken der Modellsubstanz Mandelsäure als L vor D bestimmt werden. Nach dem Feststellen

dieser wurde mittels eines Zusatzes von 15 mM SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Elektrolyten versucht, die Migrationsreihenfolge umzukehren, so dass das unerwünschte D-Enantiomer vor seiner L-Form detektiert werden kann. Durch den Zusatz des Detergens konnte in diesem Fall die EMO (enantiomeric migration order) umgekehrt werden.

Im Anschluss an die bisher durchgeführten Messungen konnten zudem noch drei α -Hydroxysäuren (ein Milchsäurederivat und zwei Mandelsäurederivate) in einer Probe vermessen und chiral getrennt werden. Dieses ist in folgendem Elektropherogramm dargestellt.

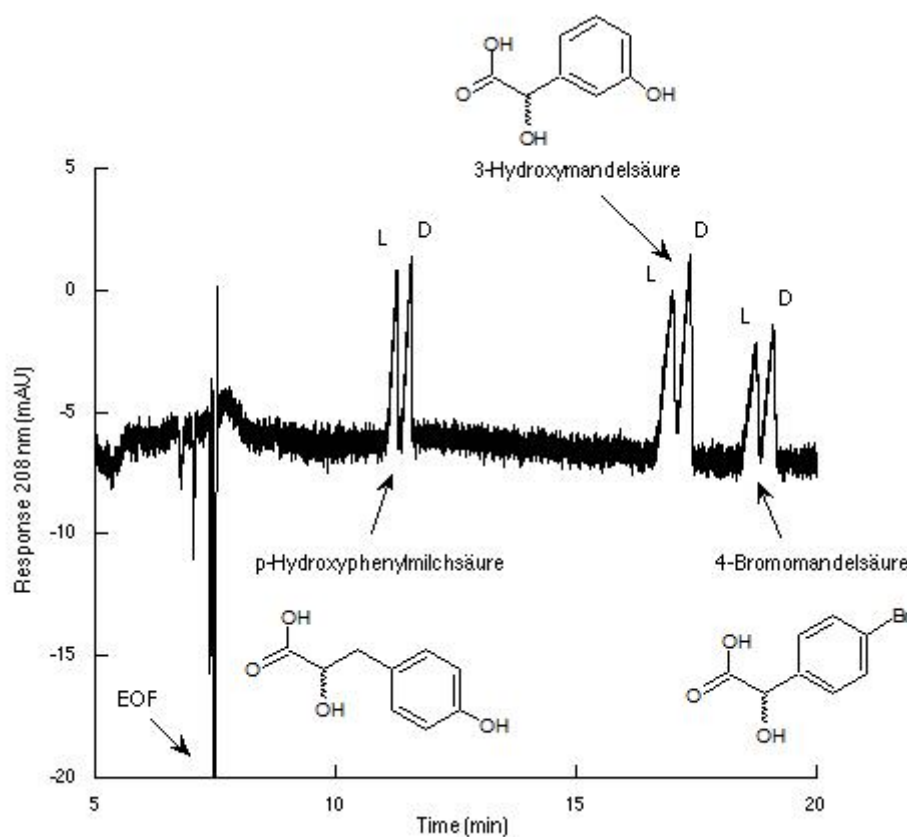


Abbildung 46: Chirale Trennung von p-Hydroxyphenylmilchsäure, 3-Hydroxymandelsäure und 4-Bromomandelsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 4,6 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, ~ 60 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Als letztes wurde auch in dieser Substanzklasse mittels L-Threoninkomplexen, unter Austausch des Zentralatoms Kupfer (II) durch die bisher schon verwendeten Metallionen, versucht eine chirale Trennung zu erlangen. Dies geschah anhand der Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure ohne eine weitere Optimierung der Analysenbedingungen für das jeweilige Zentralatom. Die erhaltenen Trennergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 13: Trennergebnisse für p-Hydroxyphenylmilchsäure unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) mittels L-Threoninkomplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	Zentralion
p-Hydroxyphenylmilchsäure	24,346	-	16,697	0,3945	-	1,000	-	Zn (II)
	25,240	25,367	17,365	0,3514	0,1576	1,016	0,5	Ni (II)
	35,215	-	11,592	0,7955	-	1,000	-	Cd (II)
	22,260	-	11,920	0,3465	-	1,000	-	Co (II)

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Zentralion 45 mM, pH 4,6 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 20 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

In diesen Messungen wurde nur unter der Verwendung von L-Threonin-Nickel-Komplexen eine leichte Antrennung der Modellsubstanz beobachtet. Unter der Verwendung der anderen drei Zentralionen konnte keine chirale Trennung für p-Hydroxyphenylmilchsäure erreicht werden. Doch, wie schon am Beispiel des Selektors L-Phenylalaninamid gezeigt wurde, können die unterschiedlichen Zentralionen natürlich zu anderen α -Hydroxysäuren eine höhere Affinität besitzen und diese chiral trennen. Diese Messungen waren somit nur exemplarisch für diese Substanzgruppe.

5.5.2.2 Dansylierte Aminosäuren

Als zweite Analytgruppe für den L-Threonin-Kupfer-Komplex wurden dansylierte Aminosäuren getestet. Dabei ist zuerst eine Sequenz aller 11 Analyten bei einem pH-Wert von 8,2, welcher analog zu den Messungen mit L-Phenylalaninamid war, und mit einer Gesamtmolarität von 135 mM (L-Threonin:Kupfer 90:45 mM), analog zu den vorigen Messungen mit L-Threonin, getestet. Das Verhältnis von Selektor zu Zentralion wurde in allen Messungen stets bei zwei zu eins gehalten.

In dieser Sequenz konnten Dns-Trp (R_s 3,6), Dns-Glut (R_s 2,9), Dns-Met und Dns-Asp (je R_s 1,2) und Dns-Phe (R_s 2,9) getrennt werden. Zudem konnte die Migrationsreihenfolge der Enantiomere als L vor D bestimmt werden. Die folgenden drei Elektropherogramme stammen aus dieser Sequenz.

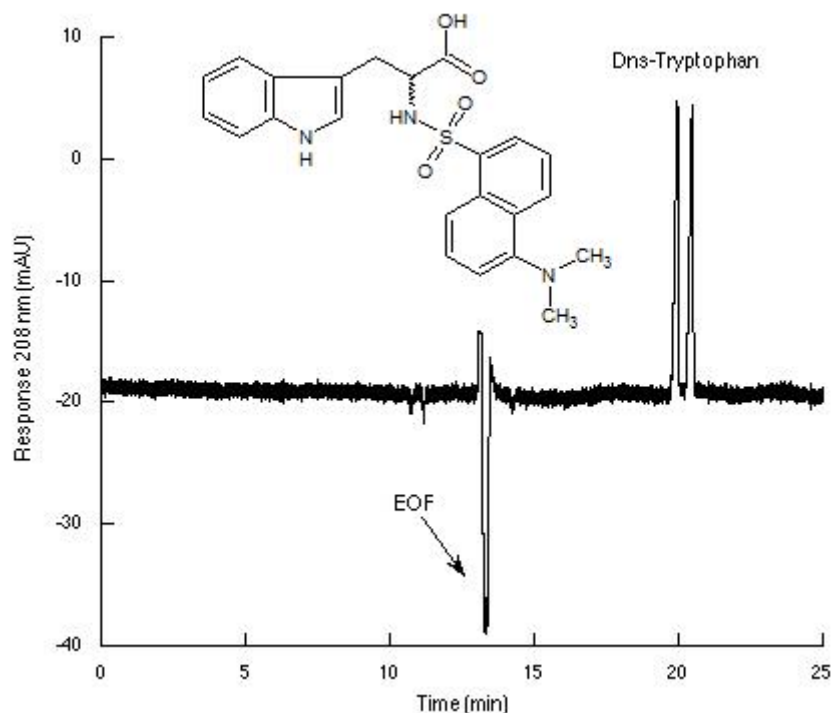


Abbildung 47: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 8,2 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 10 kV zur Kathode, ~ 30,5 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

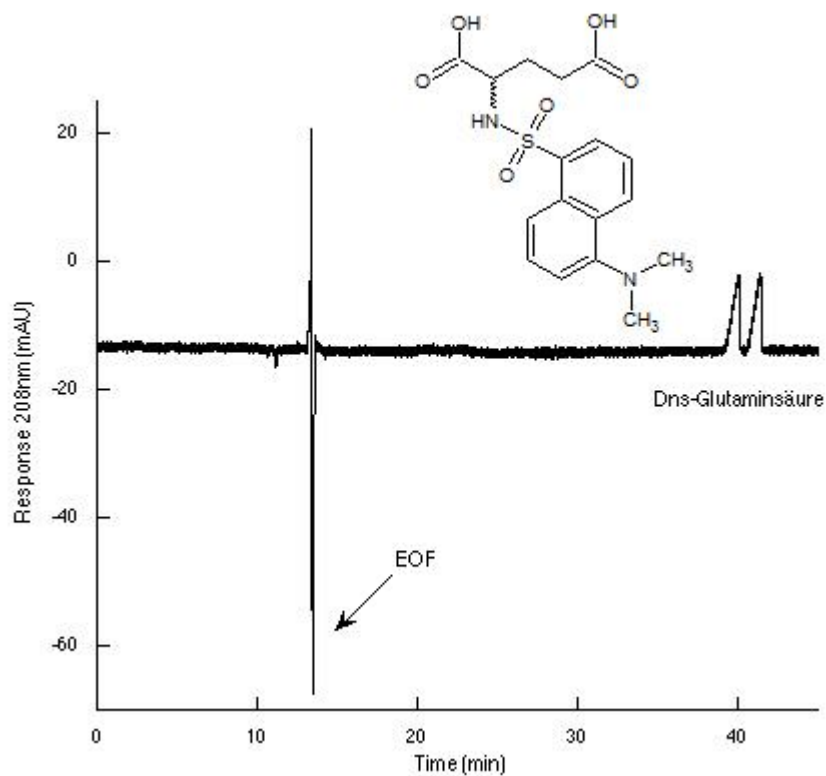


Abbildung 48: Chirale Trennung von Dns-Glutaminsäure mittels
L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 8,2 eingestellt mit Ammoniak conc.,
angelegte Spannung: 10 kV zur Kathode, ~ 30,5 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

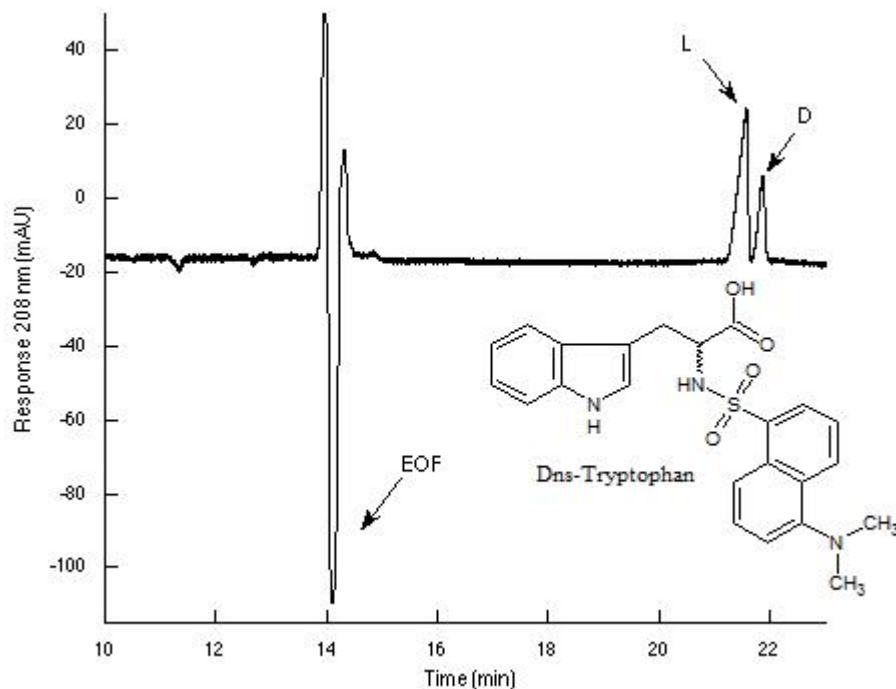


Abbildung 49: Chirale Trennung von gespicktem Dns-Tryptophan mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 8,2 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 10 kV zur Kathode, ~ 30,5 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Daraufhin wurde, wie auch schon für alle anderen Selektor- und Analytgruppen, versucht den pH-Wert und die Gesamtmolarität des Komplexes zu optimieren. Dies sollte anhand der Modells substanz Dns-Tryptophan geschehen. In den folgenden zwei Abbildungen werden die Abhängigkeit der Auflösung R_s für unterschiedliche pH-Werte und Gesamtmolaritäten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes dargestellt.

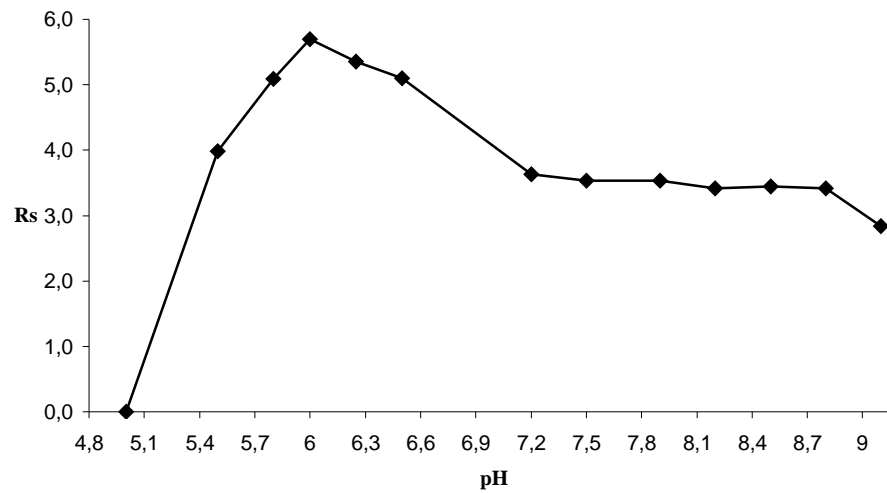


Abbildung 50: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modells substanz Dns-Tryptophan

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH jeweils eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 15 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

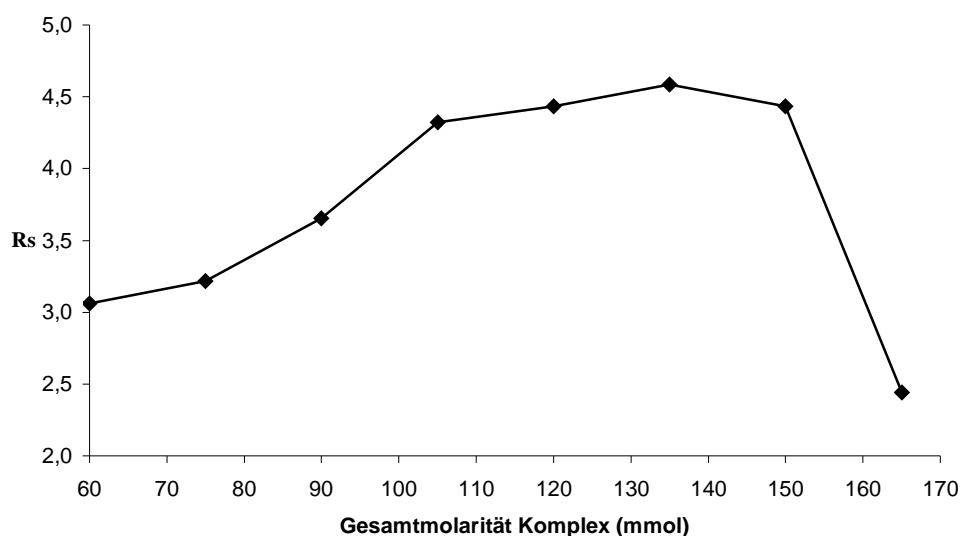


Abbildung 51: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Threonin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan

Bedingungen: L-Threonin zu Kupfersulfat 2:1, pH 6,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 15 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

An den Diagrammen wird ersichtlich, dass sowohl für den pH-Wert ein Maximum bei 6,0 als auch für die Gesamtmolarität des Komplexes bei 135 mM (L-Threonin:Kupfer 90:45 mM) für die Modellsubstanz existiert. Jedoch wurde schon bei den Messungen zur Gesamtmolarität ein Verlust an Auflösung R_s deutlich. So verringerte sich die Auflösung R_s bei der von vorher schon gewählten Gesamtmolarität von 135 mM von 5,7 in den pH-Messungen auf 4,6 in den Messungen zur Gesamtmolarität des Komplexes. Darauf folgend wurde die Modellsubstanz Dns-Trp und die Substanz Dns-Glut, welche sich in der ersten Sequenz trennten, noch einmal unter den optimierten Bedingungen vermessen. Für Dns-Trp konnte dabei nur noch eine Auflösung R_s von 4,0 erreicht werden, Dns-Glut zeigte unter diesen Bedingungen plötzlich keine chirale Trennung mehr. Daraufhin wurde eine erneute Sequenz aller 11 dansylierten Aminosäuren vermessen. In dieser konnte nur eine chirale Trennung für Dns-Asp (R_s 2,7) und für Dns-Phe (R_s 1,5) beobachtet werden. Zudem trennte sich die gespikete Probe von Dns-Trp während ungespiktes Dns-Trp keine chirale Trennung zeigte. Desweiteren wurde

noch eine weitere Sequenz mit frisch hergestellten Analytlösungen vermessen. In dieser trennte sich nur Dns-Trp mit einer Auflösung R_s von 2,5. Zusätzlich zu den frischen Analyten wurden Messungen in neuen Kapillaren durchgeführt. Diese haben jedoch auch nicht zu einer Verbesserung der Analysensituation beigetragen. Die folgende Tabelle enthält somit nur die besten Trennergebnisse, welche über den kompletten Verlauf der Messungen erhalten werden konnten.

Tabelle 14: Besterzielte Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	
Dns-Trp	26,656	28,104	12,626	0,2455	0,2626	1,103	5,7	***
Dns-Leu	21,884	-	13,609	0,2624	-	1,000	-	*
Dns-Val	22,142	-	13,552	0,2038	-	1,000	-	*
Dns-Glut	40,050	41,430	13,493	0,4971	0,4697	1,052	2,9	**
Dns-NVal	24,599	-	14,433	0,3206	-	1,000	-	*
Dns-αABA	23,996	-	14,722	0,2052	-	1,000	-	*
Dns-Met	20,965	21,105	13,541	0,1311	0,1063	1,019	1,2	**
Dns-Asp	36,975	38,017	15,045	0,3778	0,3842	1,048	2,7	*
Dns-NLeu	25,533	-	15,209	0,2778	-	1,000	-	*
Dns-Phe	21,390	21,684	13,802	0,1385	0,1334	1,039	2,2	**
Dns-Thr	25,719	-	15,529	0,3183	-	1,000	-	*

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH eingestellt mit Ammoniak conc. (*: pH 6,0; **: pH 8,2, ***: Bedingungen Abb. 49), angelegte Spannung: 10 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Somit konnten über den kompletten Verlauf der Messungen fünf der 11 vermessenen dansylierten Aminosäuren getrennt werden. Drei von ihnen (Dns-Phe, Dns-Met und Dns-Glut) zeigten die beste Auflösung R_s bei einem pH-Wert von 8,2 während zwei weitere von ihnen (Dns-Trp und Dns-Asp) ihr Auflösungsmaximum bei dem eigentlich optimierten pH-Wert von 6,0 aufwiesen. Die restlichen sechs dansylierten Aminosäuren konnten alle detektiert werden, jedoch zeigte keine von ihnen sowohl bei pH 6,0 als auch pH 8,2 eine chirale Auftrennung.

Folgendes Elektropherogramm zeigt die erste chirale Trennung von Dns-Trp unter den optimierten Analysenbedingungen (R_s 4,0).

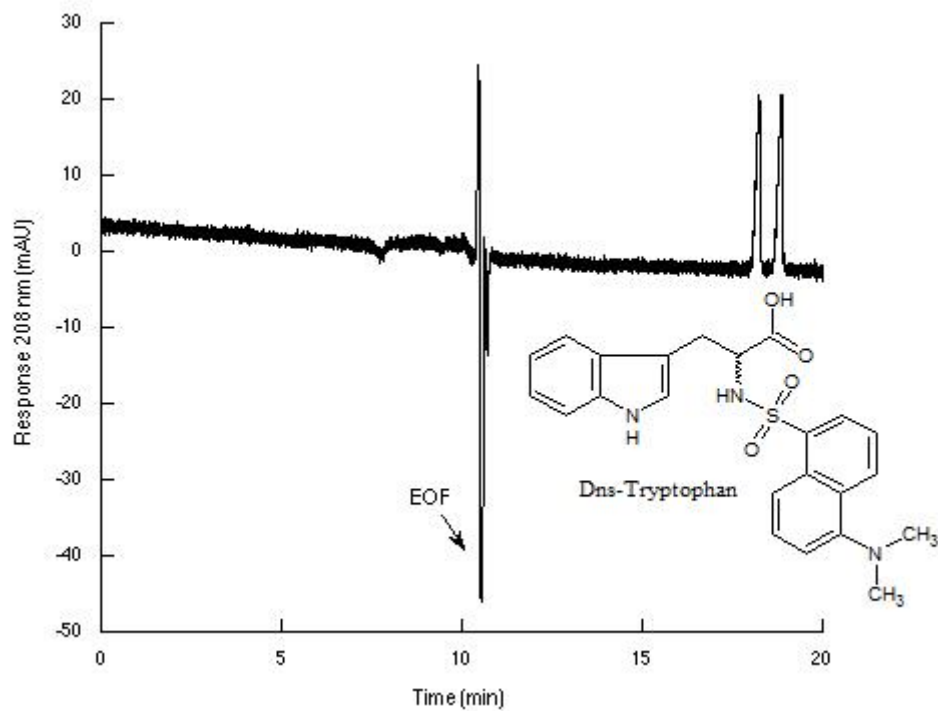


Abbildung 52: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan mittels
L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 6,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 15 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Desweiteren wurden Versuche mit SDS zur Umkehr der Migrationsreihenfolge der Enantiomere und mit CTAB zur Erzeugung eines anionischen EOF durchgeführt. Jedoch konnten aufgrund eines hohen Rauschens und starker Basisliniendriffs keine Substanzen erfolgreich detektiert werden. Zudem wurde wieder versucht mehrere Analyten innerhalb einer Probe zu trennen. Dieses ist in nachfolgendem Elektropherogramm dargestellt.

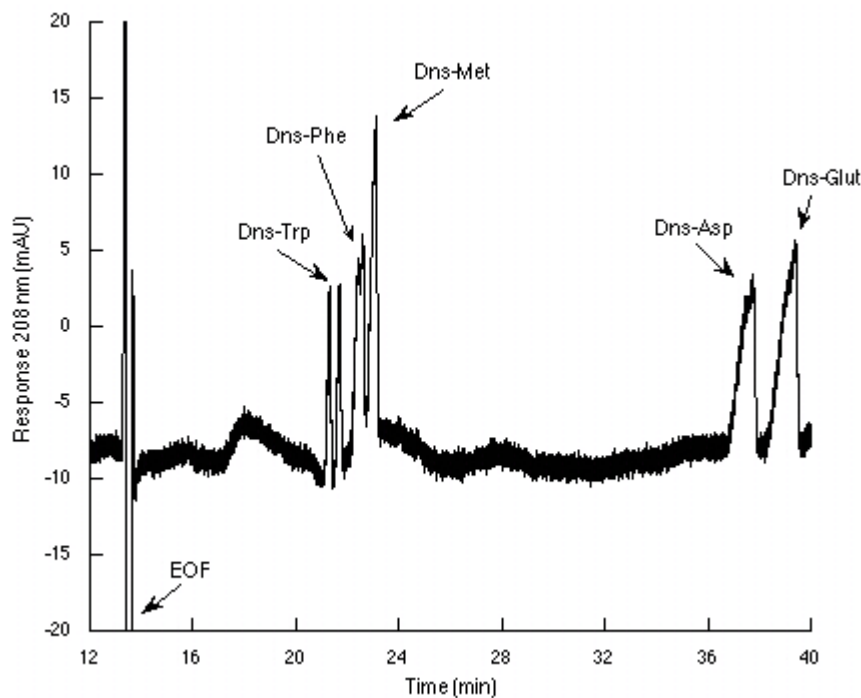


Abbildung 53: Chirale Trennung fünf dansylierter Aminosäuren in einem Lauf mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 6,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 10 kV zur Kathode, ~ 32 μ A, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich wird, ließen sich die Substanzen, welche im Laufe der bis dahin durchgeführten Messungen getrennt werden konnten, unter den optimierten Bedingungen innerhalb einer Probe nur noch schlecht chiral trennen. Dabei zeigte nur Dns-Trp eine Basislinientrennung, Dns-Phe, Dns-Asp und Dns-Glut ließen sich leicht antrennen und Dns-Met zeigte keine chirale Trennung mehr.

Trotz der schlechten Wiederholbarkeit wurde auch in dieser Substanzklasse mittels L-Threoninkomplexen unter Austausch des Zentralatoms Kupfer (II) versucht eine chirale Trennung zu erlangen. Dies geschah anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan ohne weitere Optimierungen der Analysenbedingungen für die jeweiligen Zentralatome. Die erhaltenen Trennergebnisse beinhaltet nachfolgende Tabelle.

Tabelle 15: Trennergebnisse für Dns-Tryptophan unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) mittels L-Threoninkomplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	Zentralion
Dns-Trp	63,777	-	18,029	0,8485	-	1,000	-	Zn (II)
	44,653	-	16,074	0,5211	-	1,000	-	Ni (II)
	63,424	-	17,591	0,7796	-	1,000	-	Co (II)
	57,579	-	19,338	0,8253	-	1,000	-	Cd (II)

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Zentralion 45 mM, pH 6,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 15 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Dabei fand unter der jeweiligen Verwendung der vier Zentralionen trotz deren Detektion keine chirale Trennung statt. Auch hier sind die Messungen nur exemplarisch für eine Substanz durchgeführt worden.

5.5.2.2.1 Weitere Versuche

Da mit dem chiralen Selektor L-Threonin unter der Verwendung des Zentralatoms Kupfer (II) sowohl dansylierte Aminosäuren als auch α -Hydroxysäuren getrennt werden konnten, wurde versucht, diese in einer Probe zu trennen. Dafür wurden die Substanzen Dns-Tryptophan und p-Hydroxyphenylmilchsäure ausgewählt, da sie unter den jeweiligen optimierten Bedingungen die beste Auflösung zeigten. Zudem lag die beste Auflösung beider Substanzklassen bei einer Gesamtmolarität des Komplexes von 135 mM. Für den Versuch wurde somit eine Elektrolytlösung mit einem Kompromiss der pH-Werte 4,6 (pH Optimum der α -Hydroxysäuren) und 6,0 (pH Optimum der dansylierten Aminosäuren) hergestellt. Das Ergebnis, welches für diesen pH-Kompromiss erzielt werden konnte, ist in nachfolgendem Elektropherogramm dargestellt.

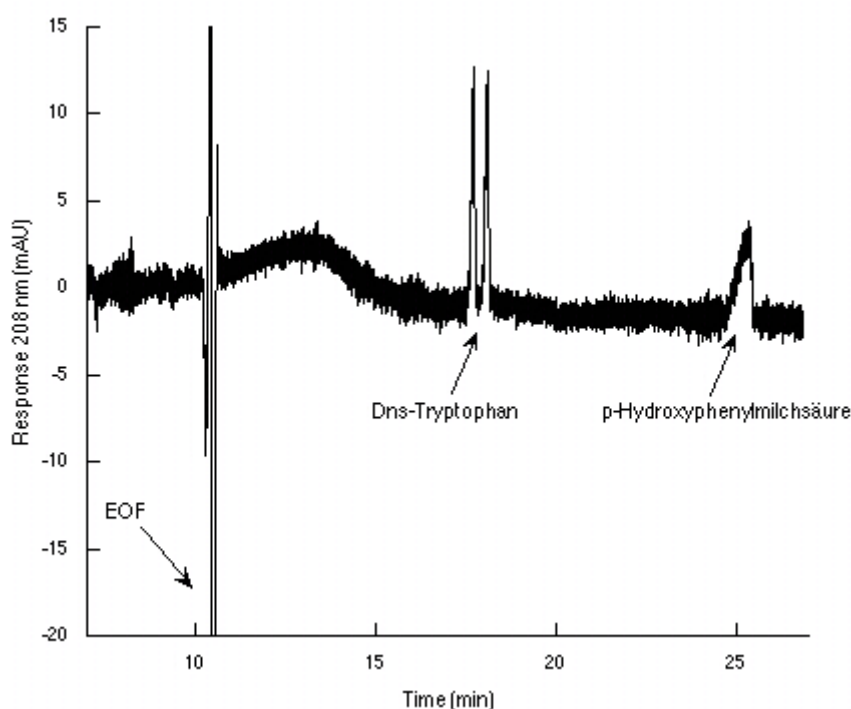


Abbildung 54: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan und p-Hydroxyphenylmilchsäure mittels L-Threonin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Threonin 90 mM, Kupfersulfat 45 mM, pH 5,5 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 15 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Dabei konnte für Dns-Trp unter einem pH-Wert von 5,5 noch eine Basislinientrennung erreicht werden, während die p-Hydroxyphenylmilchsäure nur eine leichte Antrennung zeigte. Wurde der pH-Wert zum Beispiel auf 5,0 erniedrigt, so zeigte Dns-Trp keine chirale Trennung mehr, die Auflösung der p-Hydroxyphenylmilchsäure jedoch stieg an. In diesen Versuchen zeigt sich, dass der chirale Selektor L-Threonin in Verbindung mit Kupfer (II) als Zentralion nicht das ultimative „Werkzeug“ für die Trennung dieser zwei Substanzklassen innerhalb einer Probe darstellt.

Desweiteren wurde versucht die beiden Substanzen mittels eines dualen Selektorsystems bestehend aus L-Phenylalaninamid 10 mM, L-Threonin 40 mM und Kupfer (II) 25 mM zu trennen. Es wurde dafür ein pH-Wert von 5,9 für den Elektrolyten gewählt, da die α -Hydroxysäuren für beide Selektoren unter diesem pH-Wert eine chirale Auflösung besaßen und das pH-Optimum der dansylierten Aminosäuren für L-Threonin bei 6,0 lag. Doch auch für dieses Selektorsystem konnte keine befriedigende chirale Auftrennung beider Substanzen erreicht werden.

Es konnte durch diese Messungen jedoch noch einmal gezeigt werden, dass beide bisher verwendeten chiralen Selektoren eine eigene Affinität zu den jeweiligen Substanzgruppen besitzen. Dieses in nachfolgendem Elektropherogramm dargestellt.

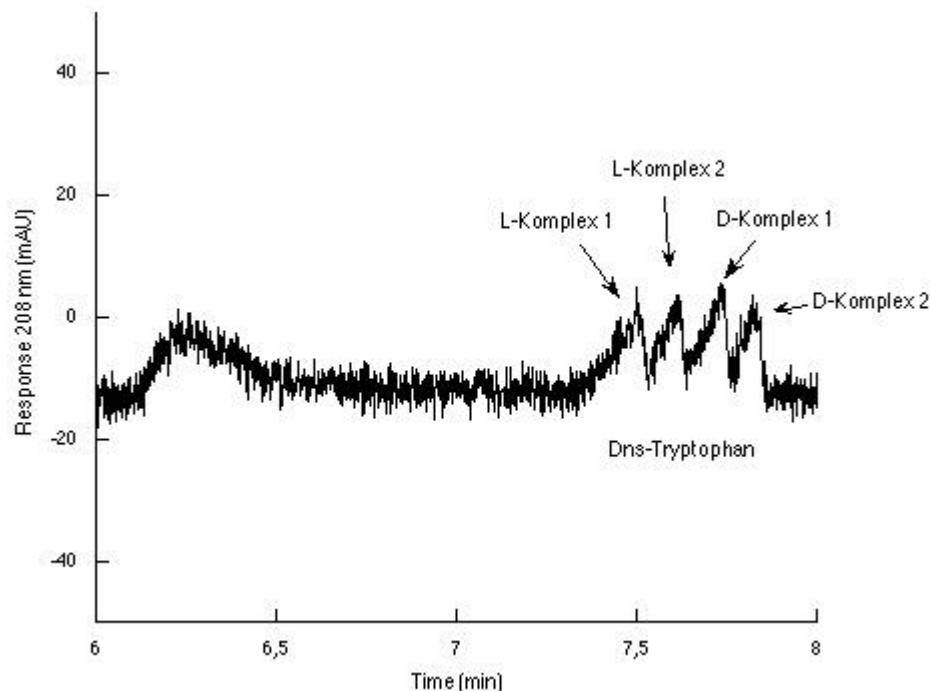


Abbildung 55: Chirale „Doppeltrennung“ von Dns-Tryptophan mittels eines dualen Selektorsystems

Bedingungen: L-Phenylalaninamid 10 mM, L-Threonin 40 mM, Kupfersulfat 25 mM, pH 5,9 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 22 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 20 mbar, 5 s

In dieser Analyse konnten für die Substanz Dns-Tryptophan vier Peaks registriert werden. Dies bedeutet, dass die Enantiomere dieser mit jeweils einem chiralen Selektor in Verbindung getreten sind und, aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten, aufgetrennt werden konnten. Nachgewiesen werden konnte dies durch spiken der Probe mit reinem L-Dns-Trp, bei welcher für die ersten beiden Peaks im Elektropherogramm ein Anstieg der Fläche beobachtet werden konnte. Welcher Komplex zu welchem chiralen Selektor gehörte, konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Grund für die chirale „Doppeltrennung“ könnte sein, dass das pH-Optimum für L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexe nach [56] bei einem pH-Wert von 5,0 liegen und der gewählte Wert von 5,9 in der Nähe beider Maxima für die jeweiligen chiralen Selektoren liegt.

5.5.3 L-Ornithin

Den vierten, dieser Arbeit verwendeten chiralen Selektor stellt L-Ornithin dar. Er wurde bereits von *Zheng, Wei* und *Lin* [58] erfolgreich zur Trennung der Enantiomere von dansylierten Aminosäuren eingesetzt. Für den Einsatz von L-Ornithin wurde zuerst versucht, die Methode für dansylierten Aminosäuren zu reproduzieren und im Anschluss auf α -Aminosäuren und α -Hydroxysäuren zu übertragen. Die Struktur von L-Ornithin ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

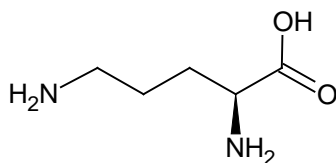


Abbildung 56: L-Ornithin

5.5.3.1 Dansylierte Aminosäuren und underivatisierte Aminosäuren

Für die Reproduktion der Ergebnisse von *Zheng, Wei* und *Lin* wurde ein Elektrolytlösung von L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM und Ammoniumacetat 25 mM verwendet. Das Verhältnis von Selektor zu Zentralion wurde stets bei zwei zu eins gehalten. Der von ihnen bereits optimierte pH-Wert von 8,0 wurde mit konzentriertem Ammoniak eingestellt. Folgende Tabelle beinhaltet dafür die Trennergebnisse aller 11 bisher schon verwendeten dansylierten Aminosäuren. Sie wurden in einer Sequenz mit einer Analysenzeit von 55 Minuten pro Lauf vermessen.

Tabelle 16: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s
Dns-Trp	13,003	14,783	8,969	0,1480	0,1814	1,441	10,8
Dns-Leu	25,517	27,995	8,979	0,2296	0,2491	1,150	10,4
Dns-Val	27,026	27,548	8,846	0,4369	0,3013	1,029	1,4
Dns-Glut	-	-	8,853	-	-	-	-
Dns-NVal	24,444	26,336	8,885	0,2759	0,3024	1,122	6,5
Dns-αABA	25,785	27,277	8,857	0,3299	0,3329	1,088	4,5
Dns-Met	17,796	19,858	8,248	0,2316	0,2563	1,216	8,5
Dns-Asp	27,581	27,913	8,711	0,4690	0,2363	1,018	0,9
Dns-NLeu	24,276	25,131	8,614	0,2092	0,2103	1,055	4,1
Dns-Phe	20,386	21,687	8,504	0,2311	0,2430	1,109	5,5
Dns-Thr	20,629	20,708	8,373	0,3418	0,0753	1,006	0,4

Bedingungen: L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 8,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 25 kV zur Katode, Probenaufgabe: 25 mbar, 5 s

Es stellte sich heraus, wie schon durch *Zheng, Wei* und *Lin* beschrieben wurde, dass L-Ornithin einen potenten chiralen Selektor für dansylierte Aminosäuren darstellt. In der Sequenz konnten unter dem gewählten Selektor-Zentralionenverhältnis 10 der 11 verwendeten Analyten getrennt werden. Dabei blieben nur drei von ihnen (Dns-Thr, Dns-Asp und Dns-Val) unter einer Auflösung R_s von 1,5. Dns-Glut konnte unter dem gewählten Bedingungen über die Analysenzeit von 55 Minuten nicht detektiert werden. Als neu eingeführte und getrennte Substanz kann an dieser Stelle Dns- α ABA genannt werden, welche eine Auflösung R_s von 4,5 zeigte.

Die nachfolgende Abbildung zeigt dafür eine chirale Trennung von Dns-Tryptophan und Dns-Phenylalanin innerhalb einer Probe. Die Migrationsreihenfolge, welche durch zusätzliches vermessen einer gespikten Probe innerhalb der Sequenz als L vor D bestätigt werden konnte, ist in diesem Elektropherogramm ebenfalls kenntlich gemacht.

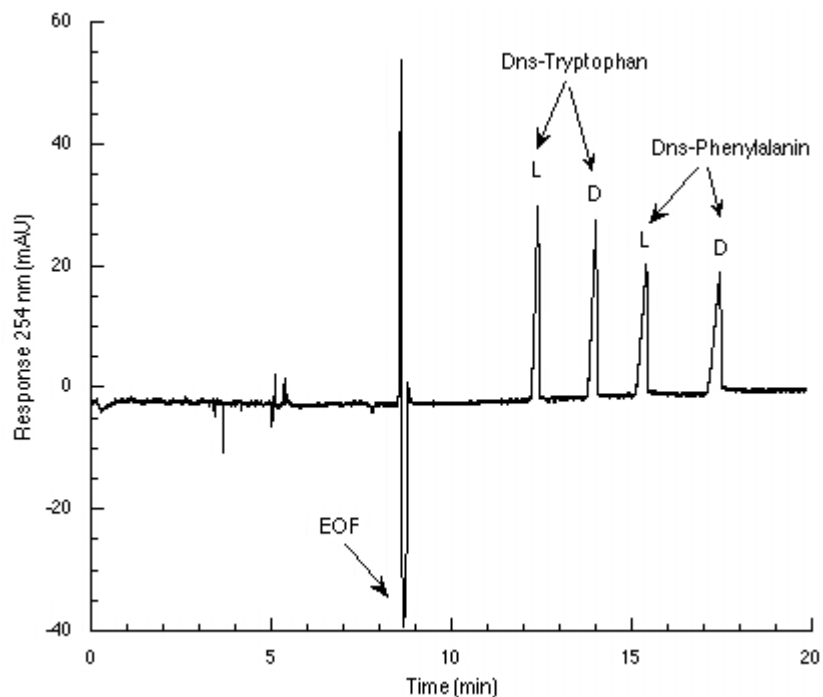


Abbildung 57: Chirale Trennung von Dns-Tryptophan und Dns-Phenylalanin mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 8,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 25 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 25 mbar, 5 s

Desweiteren wurden unter den selben Analysenbedingungen drei weitere α -Aminosäuren auf den Einfluss des pH-Wertes der Elektrolytlösung getestet. Tryptophan und Phenylalanin zeigten bereits bei einem pH von 8,0 in den Untersuchungen von *Zheng*, *Wei* und *Lin* eine chirale Trennung. In der folgenden Tabelle ist ein grober pH-Scan für die beiden oben genannten Substanzen und für 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) dargestellt.

Tabelle 17: Trennergebnisse für α -Aminosäuren mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen innerhalb einer Sequenz

	t_1 (min)	t_2 (min)	ω_1	ω_2	α_{app}	R_s	pH
Tryptophan	6,496	-	0,0842	-	1,000	-	4
	6,376	6,439	0,1055	0,0395	1,010	0,9	5
	6,273	6,344	0,1824	0,0572	1,011	0,6	6
	5,861	5,924	0,2750	0,0429	1,011	0,4	7
	6,186	6,258	0,3434	0,0738	1,012	0,3	8
Phenylalanin	6,584	-	0,0675	-	1,000	-	4
	6,618	6,705	0,0774	0,0501	1,013	1,4	5
	6,121	6,207	0,1433	0,0621	1,014	0,8	6
	5,856	5,935	0,1713	0,0608	1,013	0,7	7
	5,849	5,935	0,2266	0,0667	1,015	0,6	8
DOPA	6,383	-	0,0511	-	1,000	-	6
	6,870	-	0,1092	-	1,000	-	7
	6,250	6,358	0,1949	0,0952	1,017	0,7	8

Bedingungen: L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH jeweils eingestellt mit Ammoniak conc. Oder Essigsäure verd., angelegte Spannung: 25 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Dabei zeigten die Substanzen Tryptophan und Phenylalanin bei einem pH-Wert von 5 ihr Optimum. DOPA wurde unter den pH-Werten von 4 und 5 nicht mehr vermessen, da es nur eine chirale Auftrennung bei einem pH von 8, welcher zuerst vermessen wurde, zeigte. Die chirale Trennung von Phenylalanin einen pH-Wert von 5 ist in folgender Abbildung dargestellt.

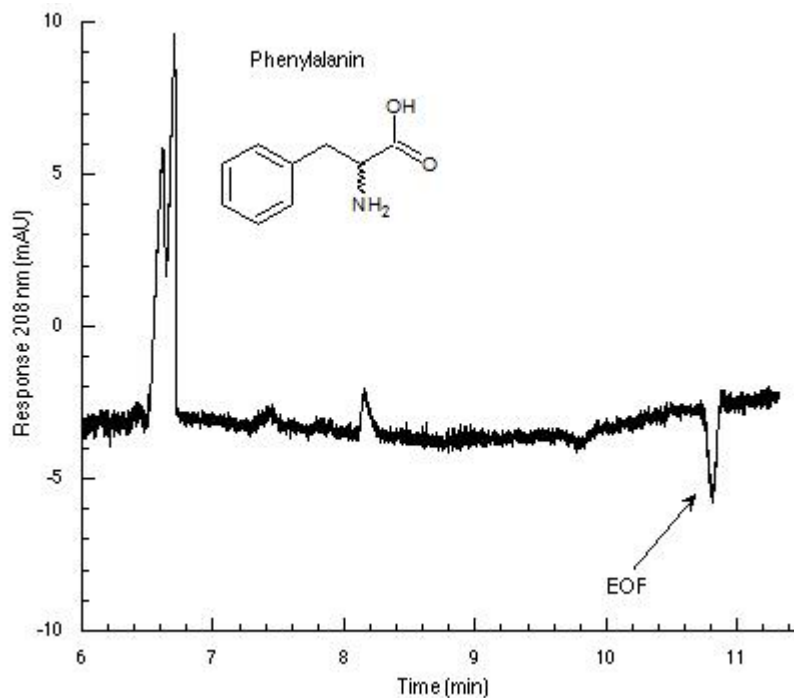


Abbildung 58: Chirale Trennung von Phenylalanin mittels
L-Ornithin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 5,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 25 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

Weitere α -Aminosäuren wurden in dieser Arbeit mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen nicht vermessen. Es wurde jedoch gezeigt, dass dieser chirale Selektor in der Lage ist auch diese bei einem groben pH-Optimum von circa 5 zu trennen. L-Ornithin bietet somit die Möglichkeit für weitere, erfolgreiche Untersuchungen an α -Aminosäuren.

5.5.3.2 α -Hydroxysäuren

Für die weiteren Untersuchungen von L-Ornithin als chiraalem Selektor wurden als nächste Substanzklasse, analog zu den bisher verwendeten Selektoren, α -Hydroxysäuren vermessen. Dafür wurde für die Elektrolytlösung erneut die selbe Zusammensetzung verwendet und zunächst ein pH-Bereich von 4,5 bis 5,5 betrachtet. Die nächste Abbildung beinhaltet die erhaltenen Trennergebnisse für die Modellsubstanzen 3-(3-indolyl)-Milchsäure (schwarz) und p-Hydroxyphenylmilchsäure (rot).

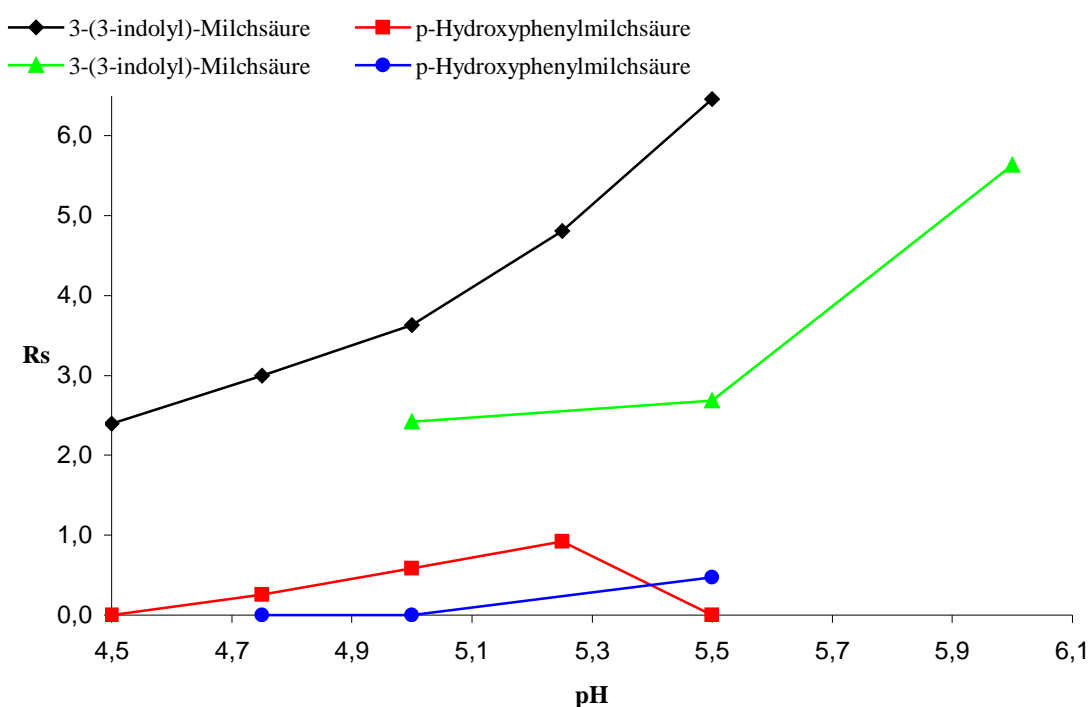


Abbildung 59: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten und Gesamtmolaritäten des L-Ornithin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanzen 3-(3-indolyl)-Milchsäure und p-Hydroxyphenylmilchsäure

Bedingungen: L-Ornithin zu Kupfersulfat 2:1, Ammoniumacetat 25 mM, pH jeweils eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: s.u., Probenaufgabe: 25 mbar, 5 s

3-(3-indolyl)-Milchsäure: L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, 25 kV zur Kathode

3-(3-indolyl)-Milchsäure: L-Ornithin 5 mM, Kupfersulfat 2,5 mM, 25 kV zur Kathode

p-Hydroxyphenylmilchsäure: L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, 28 kV zur Kathode

p-Hydroxyphenylmilchsäure: L-Ornithin 5 mM, Kupfersulfat 2,5 mM, 28 kV zur Kathode

Es stellte sich heraus, dass mit einem zunehmenden pH-Wert die chirale Trennkraft des L-Ornithin-Kupfer-Komplexes für beide Modellsubstanzen deutlich anstieg. Jedoch stiegen mit der Auflösung R_s auch Migrationszeiten extrem an, so dass bei einem pH-Wert und 5,5 die Substanz p-Hydroxyphenylmilchsäure über 75 min nicht mehr detektiert werden konnte.

Im Zuge dessen wurde die Gesamtmolarität des Komplexes von 15 mM auf 7,5 mM verringert um auch die Migrationszeiten zu reduzieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass unter der nun geringeren Gesamtmolarität bei steigenden pH-Werten sich die Auflösung R_s immer noch verbesserte. Bei einem pH-Wert von 6,0 konnte für die Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure ein annähernd so hoher Wert erlangt werden wie unter der vorherigen Gesamtmolarität bei einem pH von 5,5. 3-(3-indolyl)-Milchsäure zeigte sogar bei einem pH-Wert von 6,65 in einer Selektor- zu Zentralionenkonzentration von 2 mM zu 1 mM noch eine Auflösung R_s von 1,8 (angelegte Spannung: 30 kV). Im folgendem Elektropherogramm ist die chirale Trennung von 3-(3-indolyl)-Milchsäure bei einem pH-Wert von 5,5 und einer Gesamtmolarität von 15 mM dargestellt.

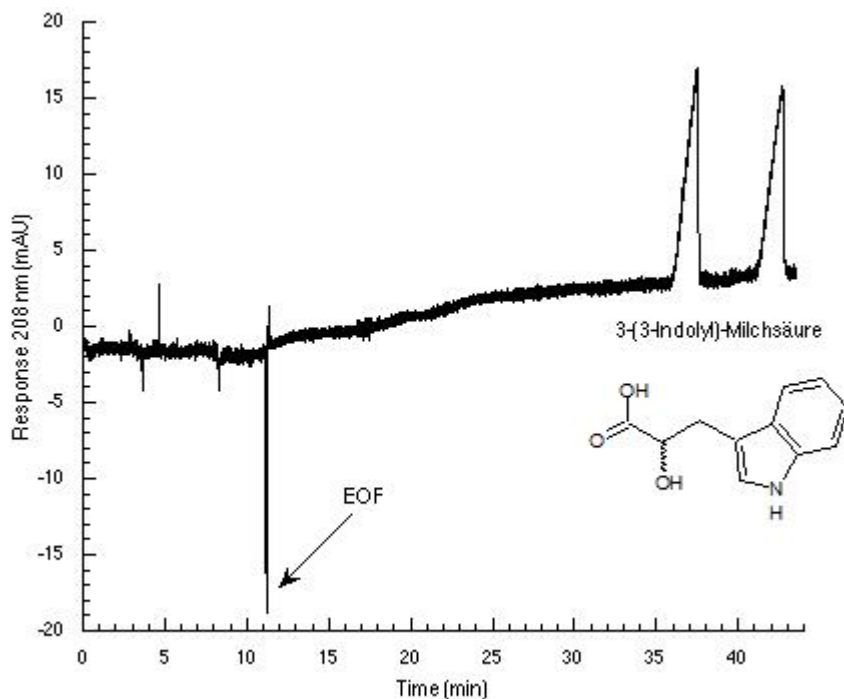


Abbildung 60: Chirale Trennung von 3-(3-indolyl)-Milchsäure mittels L-Ornithin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Ornithin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 5,5 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 25 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 25 mbar, 5 s

Jedoch wurden auch für diese Substanzklasse die Arbeiten mittels den L-Ornithin-Kupfer-Komplexen eingestellt, da, parallel zu diesen, Messungen mit L-Lysin (siehe Kapitel 5.5.4) durchgeführt wurden. Die bisherigen Messungen zeigten wiederum jedoch, dass L-Ornithin in Verbindung mit Kupfer (II) eine gute und mit Sicherheit erfolgreiche Möglichkeit bietet die Enantiomere von α -Hydroxysäuren zu trennen. Für weiteren Untersuchungen sollte zu einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes und der Gesamtmolarität des Komplexes die Möglichkeit des Anlegens einer negativen Spannung oder die Verwendung von CTAB zur Generierung eines anodischen EOFs aufgrund der bei diesem pH negativ geladenen Analytspezies in Betracht gezogen werden.

5.5.4 L-Lysin

Als letzter, in dieser Arbeit kapillarelektrophoretisch verwendeter, chiraler Selektor wurde L-Lysin verwendet. Dies geschah in Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeit zu L-Ornithin und dessen guter Eigenschaft als Kupferkomplex die Enantiomere von dansylierten Aminosäuren zu trennen. Eine Literaturrecherche ergab dabei, dass L-Lysin bisweilen nur als Kupfer- [59] oder Zinkkomplex [60] zur Trennung underivatisierter Aminosäuren in der Kapillarelektrophorese verwendet wurde. Somit wurde dessen Eigenschaft als chiraler Selektor für dansylierte Aminosäuren überprüft. Nachfolgende Abbildung zeigt die Struktur des L-Lysins.

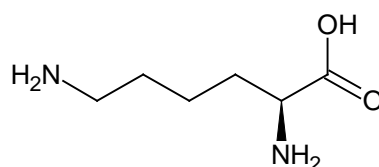


Abbildung 61: L-Lysin

L- und D-Lysin wurden dabei immer in ihrer Form als Hydrochlorid verwendet.

5.5.4.1 Dansylierte Aminosäuren

Zunächst wurde ein L-Lysin-Kupfer-Komplex hinsichtlich seines Auflösungsvermögens R_s für unterschiedliche pH-Werte, welche mit konzentrierten Ammoniak eingestellt wurden, getestet. Für dessen Gesamtmolarität wurde vorerst, analog zum L-Ornithin-Kupfer-Komplex, 15 mM in einer 25 mM Ammoniumacetatlösung gewählt. Das Verhältnis von Selektor zu Zentralion wurde, wie in allen bisherigen Messungen, stets bei zwei zu eins gehalten. Nachfolgende Abbildung zeigt die dabei erhaltenen Werte über einen pH-Bereich von 5,1 (uneingestellter Ausgangs-pH-Wert) bis 9,0. Als Modellsubstanz wurde Dns-Tryptophan gewählt.

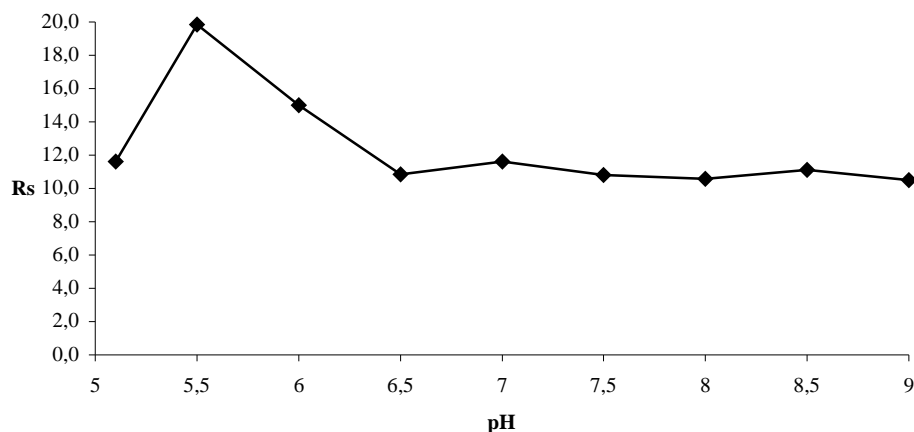


Abbildung 62: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen pH-Werten des L-Lysin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellschubstanz Dns-Tryptophan

Bedingungen: L-Lysin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH jeweils eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 27 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 15 mbar, 5 s

Dabei stellte sich heraus, dass L-Lysin unter der Verwendung von Kupfer (II) über den kompletten betrachteten pH-Bereich und in dieser Gesamtmolarität einen extrem potenten, chiralen Selektor für die verwendete Modellschubstanz darstellt. Die erhaltenen Auflösungen R_s waren in jeder Messung und somit bei jedem verwendeten pH-Wert über 10 angesiedelt. Das Maximum wurde bei einem pH-Wert von 5,5 mit der Auflösung R_s 19,9 erreicht.

Darauf folgend wurde versucht, eine weitere Optimierung der Analysenbedingungen anhand der Betrachtung der Gesamtmolarität des Elektrolyten über einen Bereich von 7,5 mM bis 30 mM durchzuführen. Die dafür erhaltenen dafür Werte sind in nachfolgendem Diagramm dargestellt.

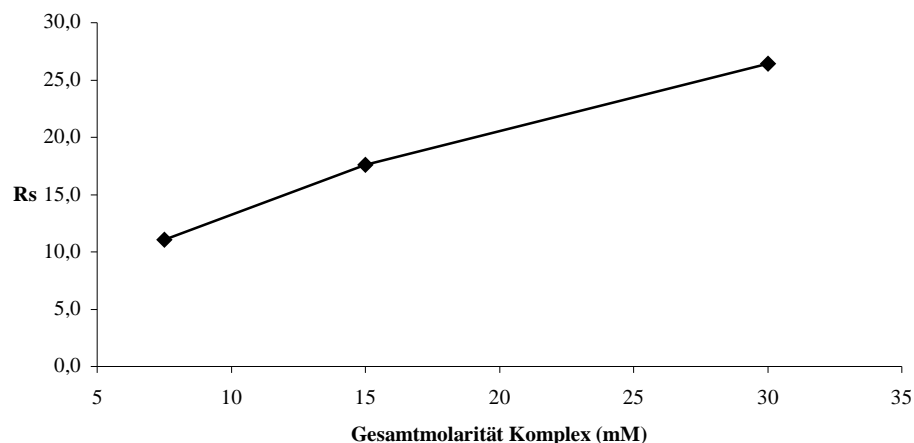


Abbildung 63: Abhängigkeit der Auflösung R_s von unterschiedlichen Gesamtmolaritäten des L-Lysin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan

Bedingungen: Verhältnis L-Lysin zu Kupfersulfat 2:1, Ammoniumacetat 25 mM, pH 5,5 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 27 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 15 mbar, 5 s

In den Messungen stiegen mit zunehmender Gesamtmolarität des L-Lysin-Kupfer-Komplexes sowohl die Migrationszeiten als auch die jeweiligen Auflösungen R_s an. Dabei konnte bei einer Gesamtmolarität von 30 mM (L-Lysin:Kupfer 20:10 mM) eine Auflösung R_s von 26,4 erreicht werden. In allen folgenden Messungen wurde jedoch weiterhin, aufgrund der guten Auflösungswerte unter kürzeren Migrationszeiten, für den Selektor L-Lysin 10 mM und für das Zentralion Kupfer (II) 5 mM beibehalten.

Im Anschluss an die Optimierung des Elektrolyten wurden für die Modellsubstanz Messungen durchgeführt, um Informationen darüber zu erhalten, inwieweit der Puffer innerhalb einer Sequenz stabil bleiben würde und konstante Werte für die Auflösung R_s liefert. Dns-Trp wurde dafür insgesamt fünf mal hintereinander über 60 Minuten in einer Sequenz mit dem gleichen Puffer vermessen. Die dafür erhaltenen Werte sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 18: Messwerte zur Stabilitätsprüfung der Elektrolytlösung des L-Lysin-Kupfer-Komplexes anhand der Modellsubstanz Dns-Tryptophan

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	Messung
Dns-Trp	23,609	29,185	10,714	0,2823	0,3507	1,432	17,6	1
	25,127	30,860	10,789	0,2820	0,3539	1,400	18,0	2
	25,781	31,214	10,754	0,2913	0,3598	1,362	16,7	3
	22,848	26,536	10,057	0,2687	0,3043	1,288	12,9	4
	25,556	29,836	10,521	0,2783	0,3110	1,285	14,5	5

Bedingungen: L-Lysin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 5,5 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 27 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 15 mbar, 5 s

Dabei konnte beobachtet werden, dass die Werte für die Auflösung R_s innerhalb der ersten drei Messungen von jeweils einer Stunde mit einem Mittelwert von 17,4 und einer relativen Standardabweichung RSD von 3,95% relativ konstant blieben und ein Abfall der Auflösung erst mit Beginn der vierten Messung stattfand. Der Mittelwert aller fünf Messungen betrug 15,9 mit einer relativen Standardabweichung RSD von 13,72%.

Daraufhin wurde, aufgrund der erhaltenen Validierungswerte, bei der Vermessung der dansylierten Aminosäuren nach jeder dritten Analyse eine neue Elektrolytlösung verwendet. Zudem ist, in Anbetracht der kürzeren Migrationszeiten bei einer trotzdem akzeptablen Auflösung R_s , für den verwendeten Puffer ein pH-Wert von 8,0 gewählt worden. Die erhaltenen Trennergebnisse für die 11 dansylierten Aminosäuren beinhaltet folgende Tabelle.

Tabelle 19: Trennergebnisse für dansylierte Aminosäuren mittels L-Lysin-Kupfer-Komplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s
Dns-Trp	11,092	12,224	8,594	0,0950	0,1142	1,453	10,8
Dns-Leu	23,275	27,522	8,568	0,2465	0,3206	1,289	15,0
Dns-Val	33,257	35,763	9,054	0,4121	0,4389	1,104	5,9
Dns-Glut	-	-	8,249	-	-	-	-
Dns-NVal	13,307	14,814	7,328	0,2203	0,2501	1,252	6,4
Dns-αABA	16,294	18,547	8,495	0,1898	0,2139	1,289	11,2
Dns-Met	13,499	16,086	8,814	0,1311	0,1730	1,552	17,0
Dns-Asp	28,090	29,421	8,821	0,3807	0,3536	1,069	3,6
Dns-NLeu	16,739	18,302	8,469	0,2120	0,2292	1,189	7,1
Dns-Phe	14,849	17,141	9,007	0,1986	0,2346	1,392	10,6
Dns-Thr	16,234	17,523	9,333	0,2070	0,2178	1,187	6,1

Bedingungen: L-Lysin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 8,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 27 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 15 mbar, 5 s

Auch unter den gewählten, nicht optimalen Bedingungen von pH-Wert und Gesamtmolarität des Komplexes konnten 10 der 11 verwendeten Analyten basisliniengetrennt werden. Dabei war, wie auch schon unter der Verwendung des chiralen Selektors L-Ornithin, die einzige Substanz, welche weder getrennt noch detektiert werden konnte, Dns-Glutaminsäure. Für sie wurden zusätzliche Messungen mit neu hergestellten Proben und extrem langen Analysenlaufzeiten von bis zu 100 Minuten bei einem pH-Wert von 8,0 durchgeführt. Dies führte jedoch auch nicht zu einer Detektion dieser.

Zudem konnte für die dansylierten Aminosäuren unter Einfluss des L-Lysin-Kupfer-Komplexes die Migrationsreihenfolge der Enantiomere anhand der Modellsubstanz Dns-Methionin als L vor D bestimmt werden. Durch einen Ersatz des chiralen Selektors L-Lysin durch sein D-Enantiomer ließ sich diese auch umgekehren. Diese Messungen sind in folgendem Elektropherogramm dargestellt.

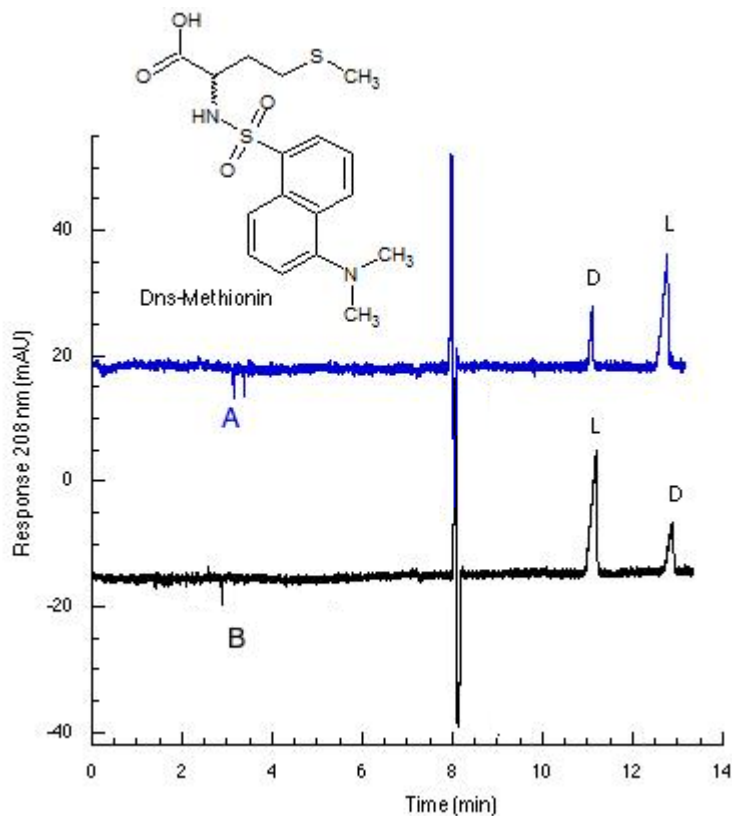


Abbildung 64: Chirale Trennung von gespiktem Dns-Methionin mittels D- und L-Lysin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: A: D-Lysin 10 mM, B: L-Lysin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 8,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 27 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 15 mbar, 5 s

Die Umkehr der Migrationsreihenfolge der Enantiomere durch den Ersatz des L-Lysins durch seine D-Form prädestinierte den Kupferkomplex aufgrund seines guten Auflösungsvermögens über einen breiten pH-Bereich für fast alle dansylierten Aminosäuren für deren Reinheitsprüfungen. Eine solche wird in der nächsten Abbildung an der Modellsubstanz Dns-L-Tryptophan gezeigt. Um die Analysenzeit zu verringern und dabei gleichzeitig die Peakschärfe zu erhöhen wurde für die Messung eine Erhöhung Temperatur von 25 °C auf 50 °C gewählt.

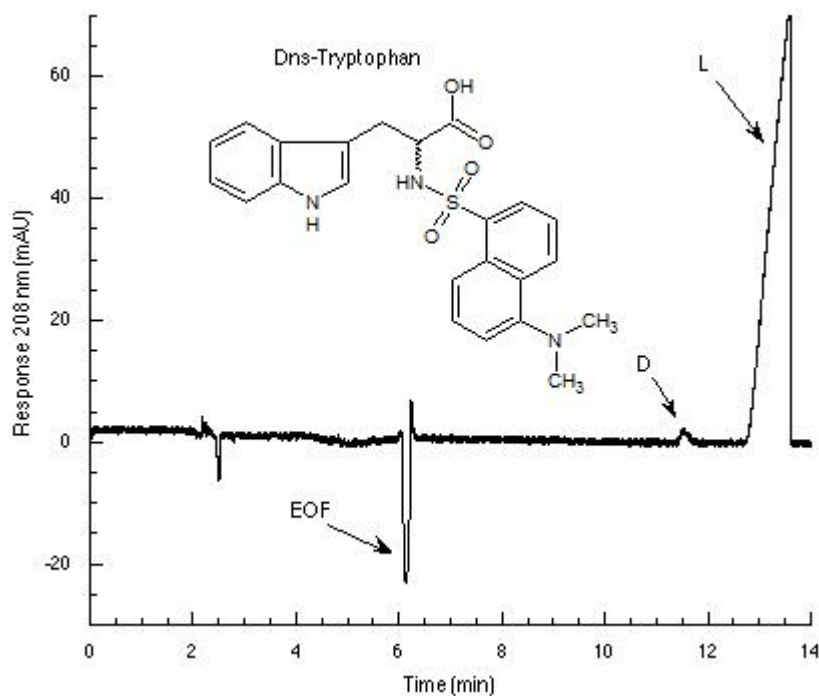


Abbildung 65: Reinheitsprüfung von Dns-L-Tryptophan mittels
D-Lysin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: D-Lysin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 5,5 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 28 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 50 mbar, 5 s, Temperatur 50°C

In dieser konnte festgestellt werden, dass die verwendete Probe circa 3,5 % des unerwünschten D-Enantiomers enthält. Um die Peakschärfe noch weiter zu erhöhen könnte aufgrund des guten Auflösungsvermögens des Komplexes eine geringere Gesamtmolarität des Komplexes, ein höherer pH-Wert, eine noch höhere Temperatur oder eine Kombination dieser Parameter in Betracht gezogen werden.

Im Anschluss an die Reinheitsprüfung wurde auch mit diesem Selektor wieder versucht, mehrere Analyten innerhalb einer Probe zu vermessen und zu trennen. Die Messung ist im folgenden Elektropherogramm dargestellt.

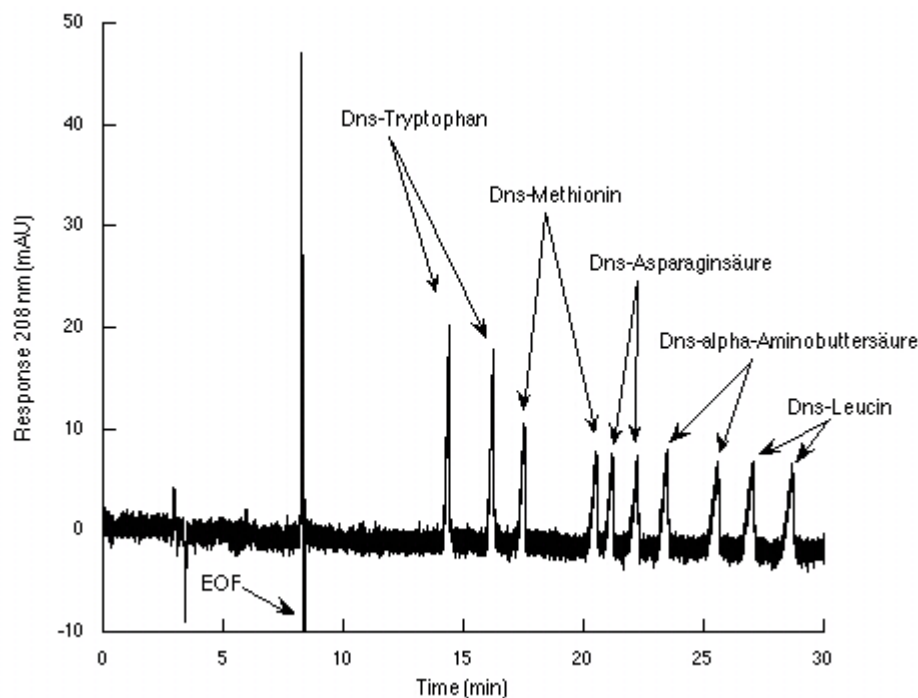


Abbildung 66: Chirale Trennung fünf dansylierter Aminosäuren in einem Lauf mittels L-Lysin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Lysin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 5,5 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 27 kV zur Kathode, $\sim 42 \mu\text{A}$, Probenaufgabe: 10 mbar, 5 s

In dieser Messung konnten alle 10 Enantiomere der fünf verwendeten dansylierten Aminosäuren basisliniengetrennt werden. Auch hier entsprachen, wie zum Beispiel auch schon in den vorangegangenen Messungen mit L-Phenylalaninamid und dansylierten Aminosäuren, die Migrationsreihenfolge und somit auch nicht die Migrationszeiten denen der einzelnen vermessenen Substanzen. Zudem konnte beobachtet werden, dass unter der Verwendung mehrerer Substanzen in einer Probe der EOF ebenfalls schneller detektiert werden konnte als in Einzelmessungen unter identischen pH-Bedingungen.

Zu guter letzt wurde für die Substanzklasse der dansylierten Aminosäuren getestet, ob das Zentralion Kupfer (II) unter ansonsten gleichbleibenden Analysenbedingungen durch ein anderes ersetzt und eine chirale Trennung der Substanzen erreicht werden kann. Als Modellsubstanzen wurden Dns-Tryptophan und Dns-Phenylalanin gewählt. Dafür erhaltene Trennergebnisse sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 20: Trennergebnisse für Dns-Tryptophan und Dns-Phenylalanin unter den Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) mittels L-Lysinkomplexen

	t_1 (min)	t_2 (min)	t_0 (min)	ω_1	ω_2	α_{eff}	R_s	Zentralion
Dns-Trp	52,804	-	8,559	0,1689	-	1,000	-	Zn (II)
	-	-	9,405	-	-	-	-	Ni (II)
	39,462	-	7,744	0,8525	-	1,000	-	Co (II)
	-	-	9,113	-	-	-	-	Cd (II)
Dns-Phe	-	-	8,455	-	-	-	-	Zn (II)
	-	-	9,624	-	-	-	-	Ni (II)
	-	-	11,420	-	-	-	-	Co (II)
	-	-	8,597	-	-	-	-	Cd (II)

Bedingungen: L-Lysin 10 mM, Zentralion 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 5,5 eingestellt mit Ammoniak conc. oder Essigsäure verd., angelegte Spannung: 30 kV zur Kathode, Probenaufgabe: 15 mbar, 5 s

Wie aus der obigen Tabelle ersichtlich wird, konnte dabei für keine der beiden Modellsubstanzen unter dem Einfluss der jeweiligen Zentralatome eine chirale Trennung beobachtet werden. Im Falle von Dns-Phe wurde in keiner Messung, welche jeweils 60 Minuten andauerten, eine Substanz detektiert. Für Zink (II) und Kobalt (II) als Zentralatom konnte Dns-Trp wenigstens, wenn auch spät in der Messung, detektiert werden.

5.5.4.1.1 α -Hydroxysäuren

Im Laufe der Untersuchungen von dansylierten Aminosäuren mittels L-Lysin-Kupferkomplexen wurde auch, repräsentativ für die Substanzklasse der α -Hydroxysäuren, die Substanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure vermessen. Es konnte dabei beobachtet werden, dass auch dieser Selektor-Metallionenkomplex eine Möglichkeit darstellt, um die Enantiomere von α -Hydroxysäuren zu trennen. Dies ist in nachfolgendem Elektropherogramm dargestellt.

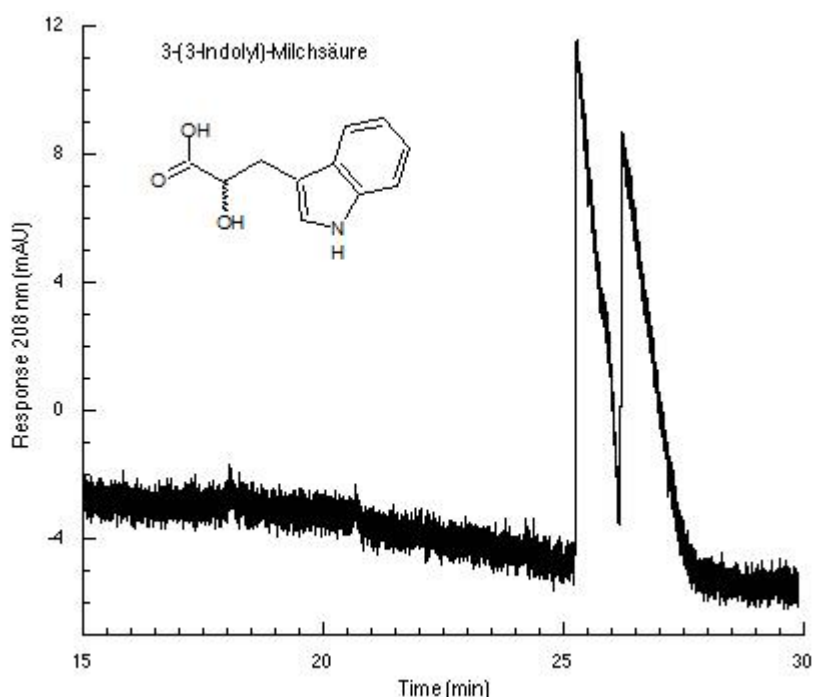


Abbildung 67: Chirale Trennung 3-(3-indolyl)-Milchsäure mittels L-Lysin-Kupfer-Komplexen

Bedingungen: L-Lysin 10 mM, Kupfersulfat 5 mM, Ammoniumacetat 25 mM, pH 6,0 eingestellt mit Ammoniak conc., angelegte Spannung: 27 kV zur Anode, Probenaufgabe: 15 mbar, 5 s

In diesem konnte 3-(3-indolyl)-Milchsäure unter dem Anlegen einer negativen Spannung von 27 kV zur Anode bei einem pH-Wert von 6,0 angetrennt werden. Bei einer weiteren Messung unter dem pH-Wert 5,5 konnte die Substanz mit einer Auflösung R_s von 4,2 bereits basisliniengetreunt werden. In dieser wurden die Enantiomere nach 49,077 und 57,002 Minuten detektiert. Weitere Versuche zur Optimierung des Elektrolyten und mit anderen Analyten dieser Substanzklasse wurden bisher noch nicht durchgeführt.

6 Kapillarelektrochromatographie

6.1 Allgemeines [23, 53, 61-64]

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde versucht, die durch LE-Kapillarelektrophorese erhaltenen Trennungen von α -Hydroxysäuren mittels L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen auf die Trennmethode der LE-Kapillarelektrochromatographie (CEC, capillary electrochromatography) zu übertragen. Die Methode der CEC stellt dabei eine Hybridtechnik aus der HPLC und der CE dar, welche die hohen Effizienzen der CE aufgrund des EOFs und den damit verbundenen flachen Strömungsprofilen mit den hohen Selektivitäten der stationären Phasen der HPLC vereint. Die Trennung wird dabei, analog zur HPLC, durch die Verteilung der Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase erreicht. In der LE-CEC wird dabei das Enantiomer, welches stärker mit den chiralen Selektor interagiert, im System langsamer transportiert somit später detektiert. Der Aufbau einer CEC-Apparatur unterscheidet sich, bis auf eine externe Druckgaszufuhr welche zur Probenaufgabe, zum spülen der Kapillaren oder für diverse CEC-Modi verwendet werden kann, von herkömmlichen CE-Apparaturen nicht. Der schematische Aufbau einer solchen ist in nachfolgender Abbildung dargestellt.

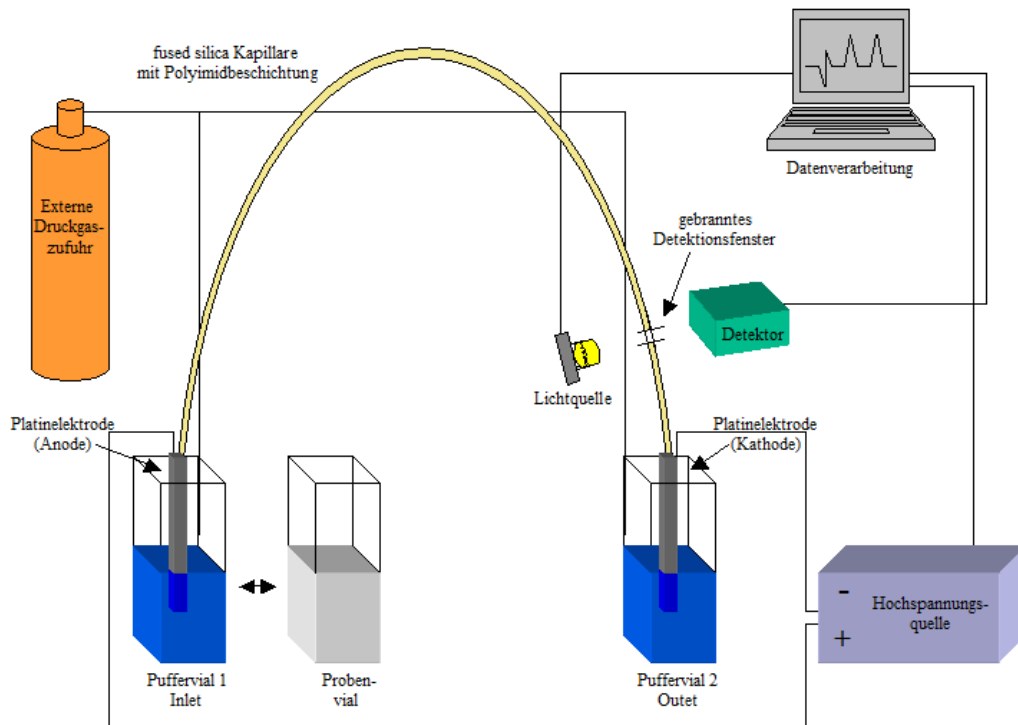


Abbildung 68: Schematischer Aufbau einer druckunterstützten CEC-Apparatur

Durch den Unterschied der externen Druckgaszufuhr können mittels CEC-Apparaturen mehrere chromatographische Modi, nämlich echte CEC (Bewegung der Analyten nur mittels des EOFs und ihren eigenen elektrophoretischen Mobilitäten), Nano-HPLC (Bewegung der Analyten nur mittels Druck) und druckunterstützte CEC (einer Kombination der beiden erstgenannten Methoden), durchgeführt werden.

Zudem kann die CEC dabei mittels mehrerer verschiedener Methoden hinsichtlich der Modifikation der Kapillaren durchgeführt werden.

- Open-tubular-Kapillaren (o-CEC): In dieser Methode wird der chirale Selektor kovalent oder durch Adsorption an die innere Oberfläche der fused-silica Kapillare gebunden. Vorteil dabei stellen eine einfache Herstellung und eine kurze Konditionierungszeit dar.
- Gepackte Kapillaren (p-CEC): Hierbei ist die Kapillare mit typischen HPLC-Packmaterialien wie Silikagel, welches durch gesinterte Fritten in der Kapillare gehalten wird, gefüllt. Die chirale Trennung kann aufgrund einer achiralen stationären Phase unter Verwendung chiralen mobilen Phase oder einer chiralen stationären Phase unter Verwendung achiralen mobilen Phase geschehen. Neben einigen Vorteilen gegenüber der o-CEC beinhaltet diese Methode jedoch den

Nachteil des Benötigens von Fritten. Diese sind nicht leicht herzustellen, brechen leicht, können verstopfen und sind der Hauptgrund für die Bildung von Luftblasen in der Kapillare, welche zu einem Stromzusammenbruch im System führen können.

- Monolithische Phasen (m-CEC): Diese Methode beinhaltet die Herstellung einer monolithischen „Packung“ mittels eines in-situ Polymerisationsverfahrens direkt innerhalb der Kapillare. Sie stellt eine sehr gute Alternative zu den gepackten Kapillaren dar, da, aufgrund der Fixierung des Monolithen keine Fritten benötigt werden. Prinzipiell kann man dabei die Monolithen den zwei Hauptkategorien einteilen. Eine Kategorie stellen Monolithen auf Silikabasis dar. Sie werden mittels eines Sol-Gel-Verfahrens, welches auf einer in-situ Polykondensation von Alkyloxysilanen beruht, hergestellt. Der chirale Selektor kann dabei über physikalische Adsorption, Einkapselung oder on-column Derivatisierung fixiert werden. Die andere Kategorie stellen Monolithe auf organischer Polymerbasis (continuous beds, CBs) dar. Diese werden durch eine in-situ Polymerisation von Monomeren, welche den chiralen Selektor bereits beinhalten, hergestellt. Vorteile dieser Methode sind die einfache Herstellung, die Stabilität und die einheitliche Struktur der monolithische Phasen. Zudem müssen, wie schon erwähnt, in dieser Methode keine Fritten, welche die größten Nachteile der p-CEC darstellen, gesintert werden.

Diese Technik der in-situ Polymerisation von monolithischen Phasen wurde dabei als erstes von *Hjertén et al.* im Jahre 1989 beschrieben [62]. *Schmid et al.* synthetisierte dabei hier im Haus die erste monolithische Ligandenaustausch-CB (chiral stationary phase) durch in-situ Copolymerisation von Metacrylamid und N-(2-hydroxy-3-allyloxypropyl)-L-4-hydroxyprolin in Anwesenheit von Piperazindiacrylamid als Quervernetzter und Vinylsulfonsäure als Ladungsträger. Sie wurde für die chirale Trennung von underivatisierten Aminosäuren und α -Hydroxysäuren, unter der Verwendung eines kupfersulfathaltigen Phosphatpuffers als mobile Phase, verwendet [63, 64].

Dieses von *Schmid et al.* entwickelte Prinzip eines chiralen Ligandenaustausch-CBs wurde aufgegriffen und in dieser Arbeit mit den chiralen Selektor L-Phenylalaninamid zur Trennung von α -Hydroxysäuren verwendet.

6.2 Präparativer und analytischer Teil

6.2.1 Chemikalien und Lösungen

Alle Chemikalien und Lösungen waren von analytischer Reinheit. Sie sind, einschließlich Hersteller oder Vertreiber, in Anhang B, B.2 gelistet.

6.2.2 Geräte und Apparaturen

Für die Experimente wurde ein voll automatisiertes ^{3D}CE-System (Agilent Technologies, Kalifornien, USA), welches mit einer externen 12 bar Druckunterstützung und einem Diodenarray-Detektor ausgestattet war, verwendet. Detektiert wurde mittels on-column UV-Absorptionsmessung unter der Wellenlänge 208 nm. Die Kapillarelektrochromatographischen Messungen wurden in einer 100 µm ID fused silica Kapillare (33,5 cm / 8.5 cm effektive Länge des CBs) von Microquartz (München, Deutschland) durchgeführt. Zur Präkonditionierung und zum externen Spülen der CEC-Kapillare wurde eine Merk-Hitachi HPLC 6200 intelligent pump (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

6.2.3 Methode

In den Messungen wurden die Enantiomerentrennungen mittels Ligandenaustausch-Kapillarelektrochromatographie durch eine monolithische L-Phenylalaninamid-Kapillare durchgeführt. Die für den Messungen verwendete mobile Phase wurde aus 50 mM Ammoniumacetat und 0,1 mM Kupfersulfat mit einem pH-Wert von 6,85, welcher das pH-Optimum für α -Hydroxysäuren in der CE mittels des L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexes darstellte, hergestellt. Diese wurde vor ihrer Verwendung durch einen 0,45 µm Teflonfilter (Schleicher/Schuell, Dassel, Deutschland) filtriert und für 5 Minuten im Ultraschallbad entgast. Die Proben der verwendeten α -Hydroxysäuren wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser gelöst und mittels elektrokinetischer Injektion aufgegeben. Alle Messungen wurden unter einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Verwendete Versuchsparameter wie die jeweils angelegte Spannung, die Druckunterstützung und die genaue Probenaufgabe sind den Bedingungen unter der Trenntabelle und den jeweiligen Elektropherogrammen zu entnehmen. Die Parameter zur Beschreibung der Trennleistung in der CEC gleichen denen der CE und sind in Kapitel 5.4 näher erläutert. Für die Vermessung der α -Hydroxysäuren mittels des „short end“-

CCBs wurden Kapillareinlass und –auslass vertauscht, da sich die monolithische Füllung hinter dem Detektorfenster befand. Aufgrund der negativen Ladung der α -Hydroxysäuren wurde die Spannung jedoch nicht geändert. Zwischen jeder Messung wurde die Kapillare extern für 15 min mit der mobilen Phase gespült.

6.2.4 Herstellung des monolithischen L-Phenylalaninamid-CBs

6.2.4.1 Allylierung des Selektors

Um den chiralen Selektor kovalent in das CB einzubinden, muss dieser erst chemisch unter einführen einer Doppelbindung als funktionelle Gruppe, modifiziert werden. Dies geschah durch die Allylierung von L-Phenylalaninamid unter Verwendung von Allyl-2,3-epoxypropylether (Allylglycidylether). Dazu wurden 100 mg des Selektors in 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mittels 2 M Natronlauge auf einem pH-Wert von 8,5 eingestellt. Im Anschluss wurde eine äquimolare Menge des Allylierreagenzes tropfenweise, unter rühren hinzugefügt. Um eine vollständige Allylierung von L-Phenylalaninamid zu gewährleisten, wurde die Lösung für drei Tage unter Raumtemperatur weitergerührt. Folgende Abbildung zeigt die Reaktionsgleichung für den Allyliervorgang.

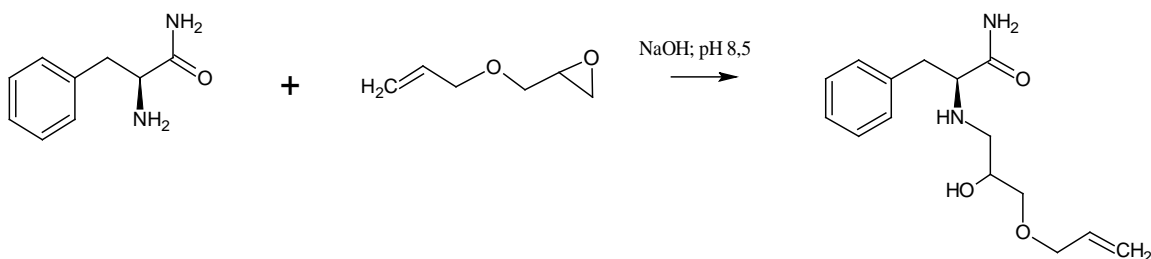


Abbildung 69: Allylierung von Phenylalaninamid

6.2.4.2 Vorkonditionierung der Kapillareninnenwand

Um eine kovalente Fixierung des continuous beds zu erlangen, musste die Kapillare einer speziellen Vorbehandlung unterzogen werden. Der Ablauf und der Sinn dieser ist für die verwendete 100 μ m ID Kapillare in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 21: Vorkonditionierung der 100 µm ID Kapillare

Schritt	Reagenz	Zeit	Zweck
1	Aceton	5 min	Entfernung lipophiler Verunreinigungen
2	Aqua bidest.	2 min	Reinigung
3	0,1M HCl	3 min	Entfernung metallischer Verunreinigungen
4	Aqua bidest.	2 min	Reinigung
5	NaOH	5 min	Konditionierung der Kapillarinne wand
6	Aqua bidest.	2 min	Reinigung
7	Luft	2 min	Trocknung
8	25 µL Aceton + 25 µL Bindsilan (γ-Methacryloxypropyltrimethoxysilan)	0,6 min	Silanisierung der Kapillarinne wand

Dabei wurden alle verwendeten Reagenzien mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch die Kapillare gesaugt. Durch die Schritte eins bis sieben wurde die Kapillare gereinigt und während des achten wurde die Kapillarinne wand silanisiert. Dies geschah mithilfe des Bindsilans μ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan. Durch die Reaktion seiner Methoxygruppen mit den Silanolgruppen der Kapillareninne wand wurde das Reagenz kovalent an diese gebunden. Zugleich bringt seine Struktur eine Doppelbindung in Form ihres Methacrylrestes mit sich, mit welcher die Monomere, die zur Bereitung des continuous beds benötigt werden, ebenfalls unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren können. Diese Reaktion der Silanisierung ist in der nächsten Abbildung dargestellt.

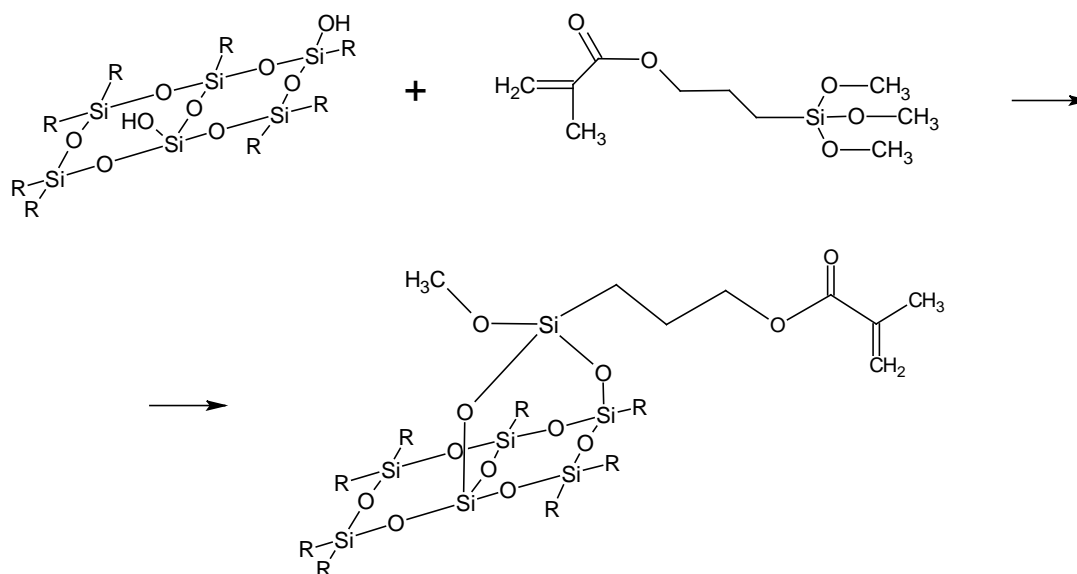


Abbildung 70: Silanisierung der Kapillarinnenwand

Nach dem Einsaugen des Bindsilans wurden beide Enden der Kapillare mit Schliff fett verschlossen und, zur Gewährleistung einer vollständigen Reaktion, eine Nacht im Abzug aufbewahrt. Am Tag darauf wurden die verschlossenen Enden von der Kapillare abgeschnitten und die verbliebenen Reste des μ -Methacryloxypropyltrimetoxysilans durch spülen der Kapillare mit Aceton und mit Wasser entfernt.

6.2.4.3 Herstellung des Continuous Beds

Für die Herstellung des CBs nach der Vorschrift von *Hjertén et al.* [65] aus dem Jahre 1999 36 mg Methacrylamid (MA) mit 44 mg des Quervernetzers Piperazindiacrylamid (PDA) und 20 mg Ammoniumsulfat (AS), welches als Porogen fungiert, in 400 μ L der Lösung des allylierten Selektors gelöst. Als Comonomer und negativen Ladungsträger zur Generierung eines EOFs wurden 6 μ L einer 30 prozentigen Vinylsulfonsäure (VSA) hinzugefügt. Die Mischung wurde im Anschluss mittels Ultraschall für 3 Minuten entgast. Im Anschluss wurden eine 10 prozentige Diammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS) und 5 prozentige N,N,N',N'-Tetramethyldiamin-Lösung (TEMED) als Starterreagenzien vorbereitet. Die erhaltene, leicht koaleszente Monomerlösung wurde im Anschluss zu jeweils 80 μ L aufgeteilt um die optimale Menge an Starterlösungen mittels Vorversuchen zu bestimmen. Diese lag unter den verwendeten Bedingungen für 80 μ L bei jeweils 2 μ L APS und TEMED. In der nachfolgenden Abbildung sind die

Strukturen aller verwendeten Bestandteile des CB mit Ausnahme des allylierten chirale Selektors dargestellt.

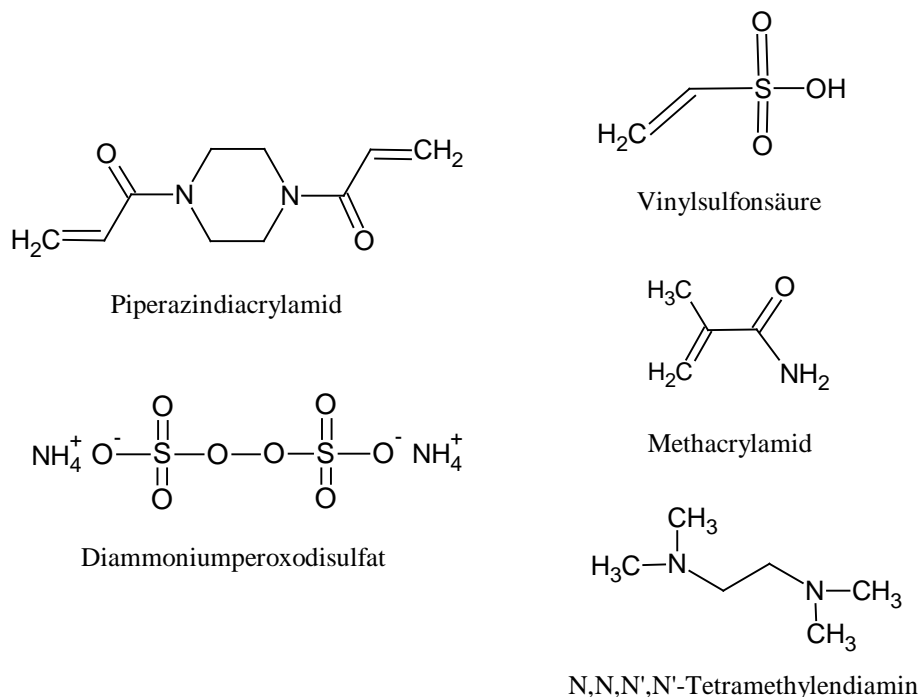


Abbildung 71: Monomere und Polymerisationsstarterreagenzien des CCBs

Nach der Zugabe der Startreagenzien wurde die Lösung mittels Evaporation vermengt und im Anschluss daran, mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, in das kurze Ende der Kapillare bis zum Detektorfenster gesaugt. Danach wurden die Enden der Kapillare wieder mit Schliff fett verschlossen. Die Polymerisation begann dabei circa 15 Minuten nach dem Einsaugen der Monomerlösung. Die Kapillare wurde in verschlossenem Zustand über Nacht im Abzug gelagert, um eine vollständige Auspolymerisation der Monomere zu gewährleisten. Am darauf folgenden Tag wurden die mit Schliff fett versehenen Enden entfernt, das kurze Ende der Kapillare auf 8,5 cm und das lange Ende auf 25,0 cm geschnitten. Vor dem ersten Einsatz wurde die Kapillare zuerst mit Wasser und mit 50 mM Kupfersulfatlösung gespült und anschließend mit der mobilen Phase konditioniert. In folgender Abbildung ist das in der Kapillare entstandene CCB in seiner chemischen Struktur dargestellt.

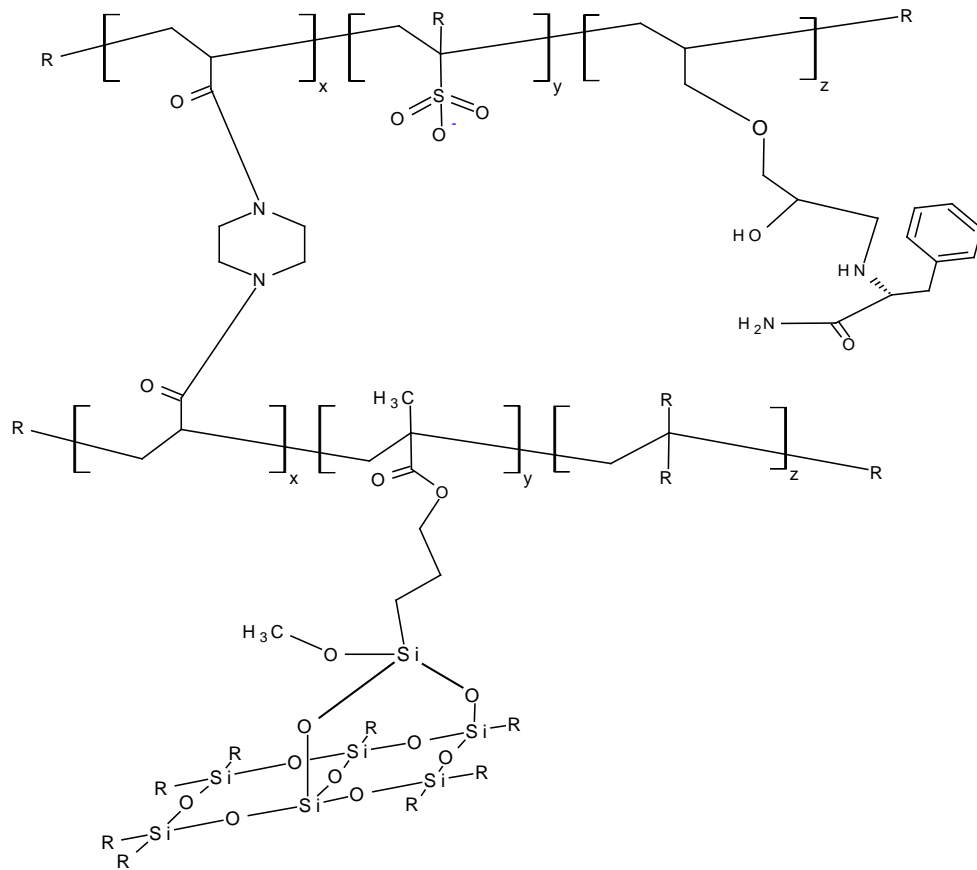


Abbildung 72: Reaktionsendprodukt im inneren der Kapillare

6.2.5 Ergebnisse und Diskussion

Mittels des hergestellten L-Phenylalaninamid-CBs wurde nun versucht, die selben α -Hydroxysäuren, welche schon kapillarelektrophoretisch getrennt wurden, zu trennen. In der folgenden Tabelle sind die dafür erhaltenen Trennergebnisse der getesteten Analyten aufgelistet.

Tabelle 22: Trennergebnisse der getesteten α -Hydroxysäuren mittels des L-Phenylalaninamid-CBs

	t_1 (min)	t_2 (min)	ω_1	ω_2	α_{app}	R_s	U	ps.
3-Hydroxymandelsäure	15,986	18,433	1,2112	1,8668	1,153	1,6	4 kV	-
	6,492	7,529	0,5251	0,8311	1,160	1,5	4 kV	7 bar
4-Hydroxymandelsäure	8,254	9,727	0,7396	0,7803	1,178	1,9	4 kV	5 bar
4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	6,859	7,947	0,4976	0,7383	1,159	1,8	5 kV	5 bar
Betaphenylmilchsäure	7,800	-	0,4989	-	1,000	-	3 kV	6 bar
p-Hydroxyphenylmilchsäure	30,976	-	2,7560	-	1,000	-	4 kV	-
3-(3-indolyl)-Milchsäure	11,823	-	1,6553	-	1,000	-	4 kV	7 bar

Bedingungen: 8,5 cm x 100 μ m ID L-Phenylalaninamid-CB, Mobile Phase: Ammoniumacetat 50 mM, Kupfersulfat 0,1 mM, pH 6,85 eingestellt mit Essigsäure verd., Probenaufgabe: 1 kV, 2 s

Dabei konnten in der für das CB verwendeten Selektorkonzentration drei der sechs getesteten Analyten getrennt werden. Diese drei Mandelsäurederivate zeigten jedoch auch in der Kapillarelektrophorese schon die höchsten Auflösungen. Die anderen getesteten Analyten, welche in der Kapillarelektrophorese ebenfalls eine chirale Trennung zeigten, konnten unter diesen Bedingungen nicht getrennt werden. Das Grund dafür könnte eine zu niedrige Selektorkonzentration von L-Phenylalaninamid im CB sein. Diese ließ sich aber kaum erhöhen, da L-Phenylalaninamid keine gute Löslichkeit in Wasser besitzt. In einem weiteren Versuch wurden von L-Phenylalaninamid 250 mg in 5,0 ml Wasser gelöst, jedoch fiel es während des dreitägigen Rührens zur Allylierung innerhalb von zwei Tagen wieder aus. Weitere Versuche wurden mittels des LE-CBs nicht durchgeführt. In den nachfolgenden zwei Abbildungen werden die kapillarelektro-

chromatographisch erhaltenen chiralen Trennungen von 3-Hydroxymandelsäure und 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure dargestellt.

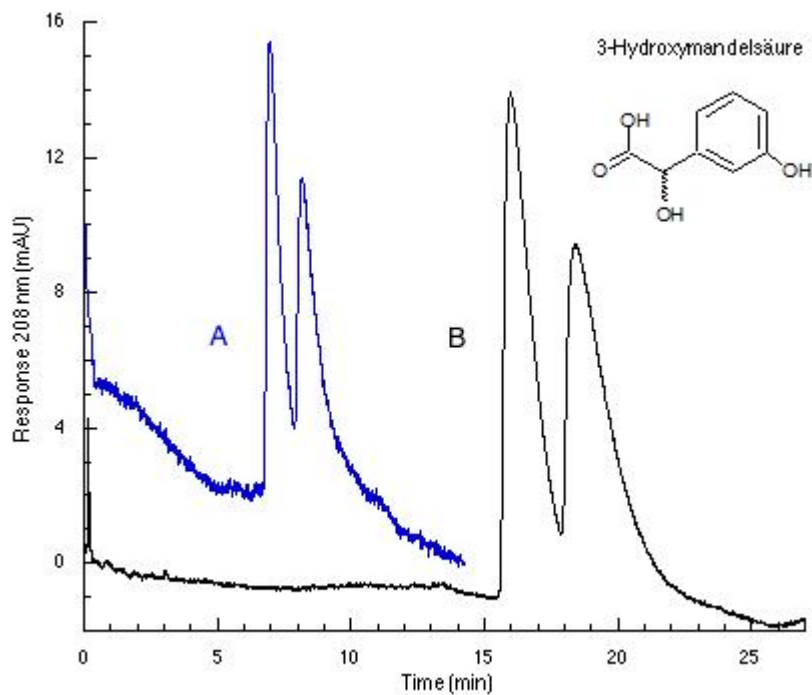


Abbildung 73: Chirale Trennung von 3-Hydroxymandelsäure mittels des L-Phenylalaninamid-CBs

Bedingungen: 8,5 cm x 100 μ m ID L-Phenylalaninamid-CB, Mobile Phase: Ammoniumacetat 50 mM, Kupfersulfat 0,1 mM, pH 6,85 eingestellt mit Essigsäure verd., Probenauflage: 1 kV, 2 s

A: Druckunterstützte CEC: 4 kV zur Anode, 7 bar

B: CEC: 4 kV zur Anode, 2 bar auf inlet und outlet

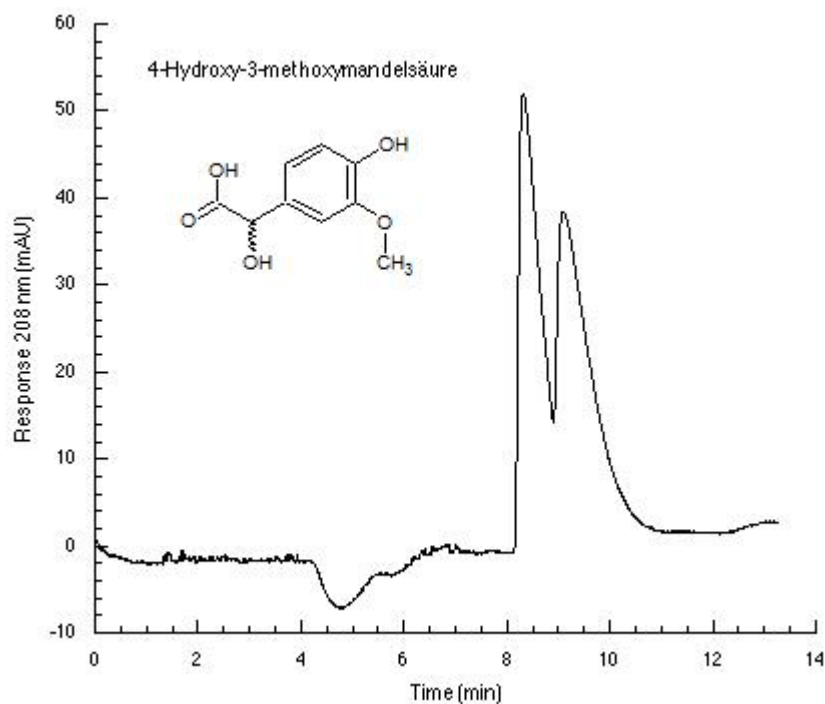


Abbildung 74: Chirale Trennung von 4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure mittels des L-Phenylalaninamid-CBs

Bedingungen: 8,5 cm x 100 μ m ID L-Phenylalaninamid-CB, Mobile Phase: Ammoniumacetat 50 mM, Kupfersulfat 0,1 mM, pH 6,85 eingestellt mit Essigsäure verd., druckunterstützte CEC: 5 kV zur Anode, 5 bar, Probenaufnahme: 2 kV, 2 s

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Enantiomerentrennung von Aminosäuren, dansylierten Aminosäuren, N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren und α -Hydroxysäuren mittels Ligandenaustausch-Kapillarelektrophorese (LE-CE) und Ligandenaustausch-Kapillarelektrochromatographie (LE-CEC). Da der menschliche Körper eine „chirale Umgebung“ darstellt, können auch pharmakologisch aktive Enantiomere in dieser unterschiedlich wirken. Ob und wie stark diese Wechselwirkungen ablaufen spielt sowohl für die Pharmakodynamik als auch für die Pharmakokinetik eine entscheidende Rolle. Auf Grund dessen ist die Trennung chiraler Substanzen vor allem in der Pharmazie von besonderem Interesse.

In den durchgeführten Messungen wurden im Falle der LE-CE L-Paraaminophenylalanin, L-Phenylalaninamid, L-Threonin, L-Ornithin und L-Lysin als chirale Selektoren verwendet. Die Messungen mit L-Paraaminophenylalanin wurden dabei jedoch aufgrund einer sich verfärbenden, Niederschläge bildenden Elektrolytlösung und der damit verbundenen schlechten Wiederholbarkeit der Analysen rasch eingestellt. Es zeigte sich jedoch am Beispiel einer chiralen Trennung von Methionin, dass auch diese Substanz als chiraler Selektor verwendet werden könnte. Für L-Phenylalaninamid wurden jeweils 11 dansylierte Aminosäuren unter der Verwendung der Zentralionen Kupfer (II), Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) bei ansonsten gleichbleibenden Analysenbedingungen von einem pH-Wert von 8,2 und einer Gesamtmolarität des Komplexes von 15 mM (Selektor:Zentralion 2:1) getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Wahl des Zentralatoms entscheidenden Einfluss auf die Trennung der Analyten hinsichtlich der Auflösung R_s und der Affinität als Komplex zu ihnen hat. Zudem wurden mit L-Phenylalaninamid-Kupfer-Komplexen neun N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren und 19 α -Hydroxysäuren getestet. Erstgenannte zeigten für diesen Selektor keine chirale Trennung während sieben der 19 α -Hydroxysäuren unter den optimierten Bedingungen von pH 6,85 und einer Gesamtmolarität des Komplexes von 15 mM chiral getrennt werden konnten. Zudem konnte für sie die Migrationsreihenfolge der Enantiomere als D vor L bestimmt werden und anhand der Modellsubstanz 3-(3-indolyl)-Milchsäure gezeigt werden, dass mit allen fünf zuvor schon erwähnten Zentralionen eine chirale Auftrennung für diese Analytklasse erfolgen kann. Für den chiralen Selektor L-Threonin als Kupferkomplex wurde in der

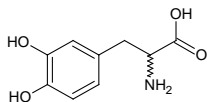
Substanzklasse der α -Hydroxysäuren ein pH-Wert von 4,6 und eine Gesamtmolarität des Komplexes von 135 mM als Optimum bestimmt. Unter diesen Analysenbedingungen konnten 10 der 19 verwendeten Analyten, unter welchen sich alle acht verwendeten Mandelsäurederivate befanden, chiral getrennt werden. Die Migrationsreihenfolge der Enantiomere, welche sich durch den Zusatz von SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Elektrolyten umkehren lassen konnte, konnte für sie als L vor D bestimmt werden. Zudem konnte unter der Verwendung von Nickel (II) als weiteres Zentralatom eine leichte Antrennung für die Modellsubstanz p-Hydroxyphenylmilchsäure erreicht werden, während mit Zink (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) keine Trennung beobachtet werden konnte. Für die Substanzklasse der dansylierten Aminosäuren ließen sich unter L-Threonin-Kupfer-Komplexen fünf der verwendeten 11 Analyten trennen. Die Analysenbedingungen wurden für diesen Selektor auf pH 6,0 und eine Gesamtmolarität des Komplexes von 135 mM optimiert. Unter der Verwendung der anderen bisher schon verwendeten vier Zentralionen konnte unter diesen keine chirale Trennung erreicht werden. Den vierten chiralen Selektor stellte L-Ornithin unter der Verwendung von Kupfer (II) als Zentralion dar. Für diesen wurden bereits durchgeführte Messungen von dansylierten Aminosäuren unter einem pH-Wert von 8,0 und einer Gesamtmolarität des Komplexes von 15 mM erfolgreich reproduziert und versucht, diese auf underivatisierte Aminosäuren und α -Hydroxysäuren zu übertragen. Dabei konnte für die underivatisierten Aminosäuren ein grobes pH-Optimum von 5,0 ausgemacht werden. Für die Substanzklasse der α -Hydroxysäuren wurden als Modellsubstanzen 3-(3-indolyl)-Milchsäure und p-Hydroxyphenylmilchsäure verwendet. Für beide konnten gute chirale Trennungen erfolgen, jedoch wurde noch kein eindeutiges pH- und Gesamtmolaritätsmaximum festgestellt. Den letzten kapillarelektrophoretisch verwendeten chiralen Selektor stellte L-Lysin dar. Dieser wurde aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu L-Ornithin und dessen guten Auflösungsvermögens für dansylierte Aminosäuren getestet. In der Verwendung als Kupferkomplex konnte für ihn ein pH-Optimum von 5,5 unter einer Gesamtmolarität des Komplexes von 15 mM festgestellt werden. L-Lysin zeigte unter den optimierten Bedingungen so gute Auflösungen, dass 10 der bisher schon verwendeten 11 dansylierten Aminosäuren bei einem pH von 8,0 basisliniengetrennt werden konnten. Die Migrationsreihenfolge der Analyten konnte als L vor D bestimmt werden und mittels der Verwendung des D-Enantiomers von Lysin als chiralem Selektor umgekehrt und für eine Reinheitsprüfung von Dns-L-Tryptophan verwendet werden. Zudem wurden unter denselben Analysen-

bedingungen wieder die Zentralionen Zink (II), Nickel (II), Kobalt (II) und Cadmium (II) getestet. Unter diesen konnte jedoch keine chirale Trennung für die Modellsubstanzen Dns-Tryptophan und Dns-Phenylalanin erreicht werden.

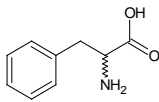
Für die Messungen in der LE-CEC wurde eine monolithische Phase auf der Basis von Metacrylamid als Monomer, Piperazindiacrylamid als Quervernetzer, Ammoniumsulfat als Porogen, Vinylsulfonsäure als Ladungsträger und mit dem durch Allyl-2,3-epoxypropylether allylierten Selektor L-Phenylalaninamid hergestellt. Als mobile Phase wurde Ammoniumacetat 50 mM und Kupfersulfat 0,1 mM verwendet. Diese wurde zum Testen von sechs α -Hydroxysäuren eingesetzt, wovon drei von ihnen chiral getrennt werden konnten.

Anhang A: Strukturformeln der getesteten Racemate

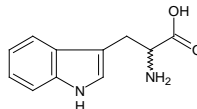
A.1 Aminosäuren



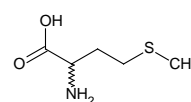
DOPA



Phenylalanin

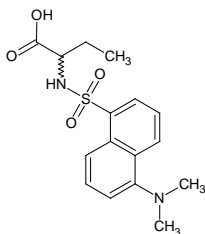
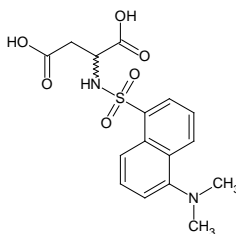


Tryptophan

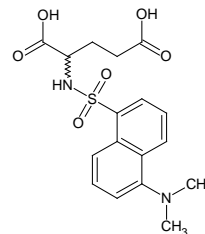


Methionin

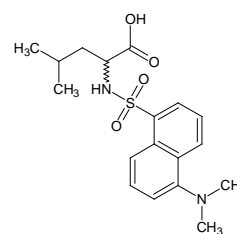
A.2 Dansylierte Aminosäuren

Dns- α -Aminobuttersäure

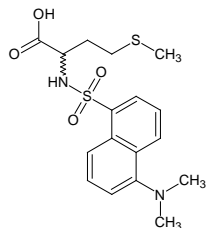
Dns-Asparaginsäure



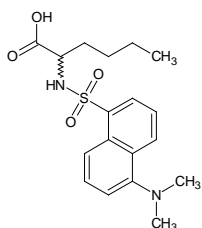
Dns-Glutaminsäure



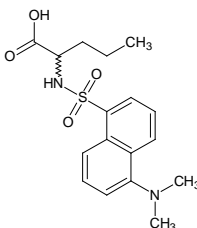
Dns-Leucin



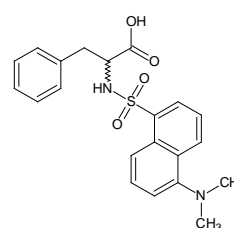
Dns-Methionin



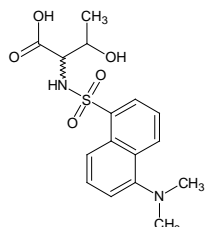
Dns-Norleucin



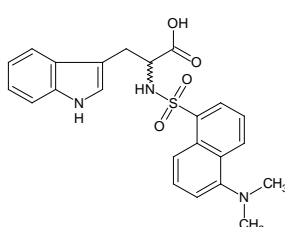
Dns-Norvalin



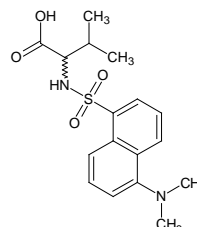
Dns-Phenylalanin



Dns-Threonin

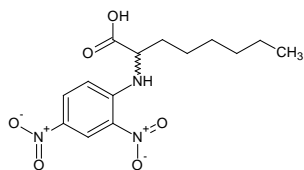
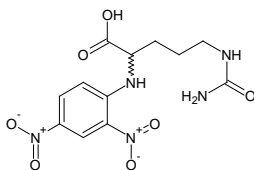


Dns-Tryptophan

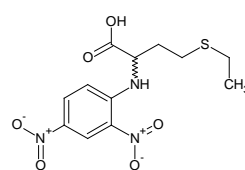


Dns-Valin

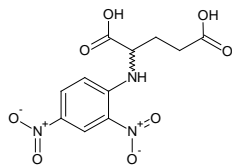
A.3 N-2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren

N-2,4-DNP- α -Aminocaprylsäure

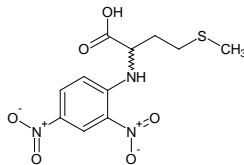
N-2,4-DNP-Citrullin



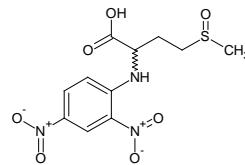
N-2,4-DNP-Ethionin



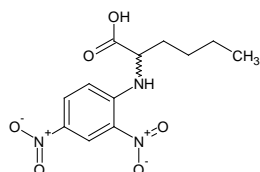
N-2,4-DNP-Glutaminsäure



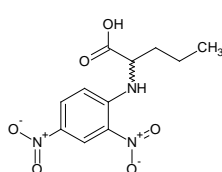
N-2,4-DNP-Methionin



N-2,4-DNP-Methioninsulfoxid

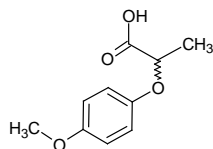


N-2,4-DNP-Norleucin

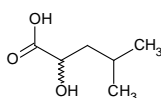


N-2,4-DNP-Norvalin

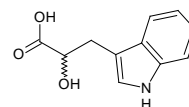
A.4 α -Hydroxysäuren



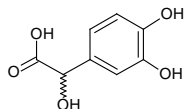
2-(p-Methoxyphenoxy)-Propionsäure



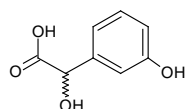
2-Hydroxyisocaprinsäure



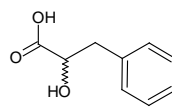
3-(3-indolyl)-Milchsäure



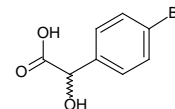
3,4-Dihydroxymandelsäure



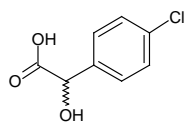
3-Hydroxymandelsäure



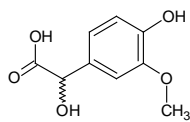
3-Phenylmilchsäure



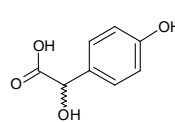
4-Bromomandelsäure



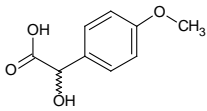
4-Chloromandelsäure



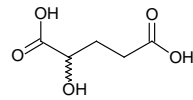
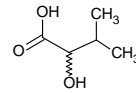
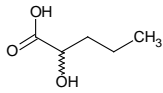
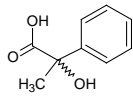
4-Hydroxy-3-metoxymandelsäure



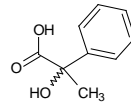
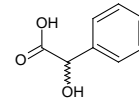
4-Hydroxymandelsäure



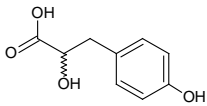
4-Methoxymandelic acid

 α -Hydroxyglutaric acid α -Hydroxyisovaleric acid α -Hydroxyvaleric acid

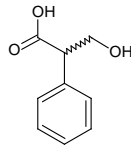
Atromilic acid

 β -Phenylmilchic acid

Mandelic acid



p-Hydroxyphenylmilchic acid



Tropolic acid

Anhang B: Geräte, Materialien, Substanzen, Reagenzien

B.1 Geräte und Materialien

- Agilent Technologies ^{3D}CE-System (Palo Alto, CA, USA)
- Agilent Technologies ^{3D}CE-System mit 12 bar externer Druckunterstützung (Palo Alto, CA, USA)
- Merk-Hitachi HPLC 6200 intelligent pump (Darmstadt, Deutschland)
- 50 µm Mikroquartz fused silica Kapillaren (München, Deutschland)
- 0,45 µm Schleicher/Schuell Filter (Dassel, Deutschland)

B.2 Substanzen und Reagenzien

Aqua bidest.	1	DL-Dns- α -Aminobuttersäure	2
Methanol	3	DL-Dns-Methionin	2
Harnstoff	2	DL-Dns-Asparaginsäure	2
Cetyltrimethylammoniumbromid	3	DL-Dns-Norleucin	2
Sodiumdodecylsulfat	4	DL-Dns-Phenylalanin	2
Borsäure	1	DL-Dns-Threonin	2
Tris	5	DL-Mandelsäure	2
Natriumacetat	1	DL-3,4-Dihydroxymandelsäure	2
Ammoniumacetat	3	DL-4-Methoxymandelsäure	2
Ammoniak (konz.)	1	DL-4-Chloromandelsäure	4
Essigsäure (verd.)	1	DL-4-Bromomandelsäure	4
Kupfersulfat (1M Lsg.)	1	DL-4-Hydroxy-3-methoxymandelsäure	2
Zinksulfat (1M Lsg.)	1	DL-4-Hydroxymandelsäure	4
Nickelsulfat (1M Lsg.)	1	DL-3-Hydroxymandelsäure	1
Cobaltsulfat (1M Lsg.)	1	DL- α -Hydroxyisovaleriansäure	2
Cadmiumchlorid (1M Lsg.)	1	DL- α -Hydroxyvaleriansäure	2

Natriumhydroxid (2M)	1	DL- α -Hydroxyglutarsäure	2
Aceton	1	DL- α -Hydroxyisocaprinsäure	2
Salzsäure	1	DL-2-(p-methoxyphenoxy)-propionsäure	2
γ -Metacryloxypropyltrimethoxysilan	2	DL-Tropasäure	2
Methacrylamid	4	DL-p-Hydroxyphenylmilchsäure	2
Piperazindiacrylamid	2	DL- β -Phenylmilchsäure	2
Vinylsulfonsäure	4	DL-3-(3-indolyl)milchsäure	2
Ammoniumsulfat	2	DL-Atromilchsäure	2
Natriumdihydrogenphosphat	3	DL-3-Phenylmilchsäure	4
Dinatriumhydrogenphosphat	3	DL-DNP-Phenylalanin	2
L-Phenylalaninamid	2	DL-DNP-Methionin	2
L-Paraaminophenylalanin	4	DL-DNP-Citrullin	2
L-Threonin	1	DL-DNP-ACA	2
D-Lysin	4	DL-DNP-Norleucin	2
L-Lysin	2	DL-DNP-Norvalin	2
L-Ornithin	2	DL-DNP-Glutaminsäure	2
DL-Dns-Tryptophan	2	DL-DNP-Ethionin	2
DL-Dns-Leucin	2	DL-DNP-Methioninsulfoxid	2
DL-Dns-Valin	2	DL-Tryptophan	2
DL-Dns-Glutaminsäure	2	DL-Phenylalanin	2
DL-Dns-Norvalin	2	DL-DOPA	2
		DL-Methionin	2

1: Bestand KFU-Graz

2: Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO, USA)

3: Merk (Darmstadt, Deutschland)


4: Fluka (Buchs, Schweiz)


5: Boeringer (Mannheim, Deutschland)

Anhang C: Poster der Summer School 2010, Zagreb

Chiral separation of dansylated amino acids and α -hydroxy acids by ligand-exchange capillary electrophoresis

Johannes Hägele, Stefan Mohr, Martin G. Schmid
 Institute of Pharmaceutical Sciences, Dept. of Pharmaceutical Chemistry,
 Karl-Franzens-University, Universitätsplatz 1, A-8010 Graz, Austria
 Summer School 2010, Zagreb





INTRODUCTION

This work deals with the application of L-threonine and L-phenylalaninamide as chiral selectors for enantiomeric separation of dansylated amino acids and α -hydroxy acids by LCEC. The principle of ligand-exchange chromatography was introduced by Danusso and Righetti in the early 1970s and transferred by Zaro's group in the year 1985 to CE. Chiral recognition in this way of separating enantiomers is based on the formation of ternary mixed metal complexes between the chiral selector ligand and an analyte ligand. The different complex stability constants of the mixed complex with D- and L- enantiomers are responsible for the enantiomeric separation.

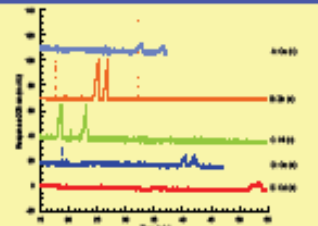


Figure 1: Chiral separation of DL-DL-tryptophan using different central ions. Conditions: 10 mM L-phenylalaninamide, 2 mM central ion in 40 mM ammonium acetate solution, pH 6.2 adjusted with ammonia or acetic acid, applied voltage 24 kV, injection 10 nbar / 10 injection 10-20 nbar / 10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water.

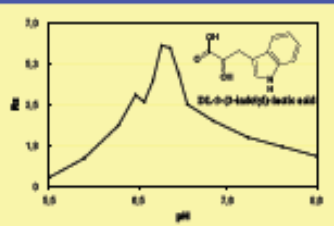
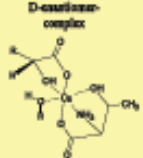


Figure 3: Influence of the pH on the separation of DL-DL-tryptophan. Conditions: 10 mM L-phenylalaninamide, 2 mM copper(II) in 20 mM ammonium acetate solution, pH was adjusted with ammonia or acetic acid, applied voltage 20 kV, injection 10 nbar/10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water.

D-enantiomer-complex



L-enantiomer-complex

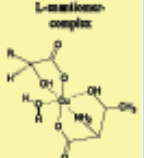


Figure 1: Possible structure of a mixed copper complex between L-threonine and the D- and L-enantiomers of an α -hydroxy acid.

Table 1: Best separation data for dansylated amino acids in a mixture using 10 mM L-threonine, 40 mM copper sulfate in aqueous solution, pH was adjusted with ammonia

	t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)	R _S	R _L
Dansyltyrosine	19,907	20,479	13,294	1,073	5.6
Dansylleucine	21,884	-	13,639	1,000	6.0
Dansylvaline	22,142	-	13,710	1,000	6.0
Dansylisoleucine	46,053	41,453	13,691	1,070	2.9
Dansylalanine	24,579	-	14,470	1,000	6.0
Dansylmethionine	23,974	-	14,770	1,000	6.0
Dansylphenylalanine	26,940	21,109	13,340	1,019	5.2
Dansylserine	24,973	20,077	13,040	1,000	2.7
Dansylproline	23,111	-	13,219	1,000	6.0
Dansylhistidine	21,179	21,684	13,820	1,019	2.3
Dansylasparagine	23,719	-	13,529	1,000	6.0

Table 2: Separation data for α -hydroxy acids in a mixture using 10 mM L-phenylalaninamide, 2 mM copper sulfate in 40 mM ammonium acetate solution, pH 6.2 adjusted with ammonia, applied voltage 22 kV, -43 nA, injection 22 nbar/10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water

	t _R (min)	t _R (min)	R _S	R _L
Malic acid *	-	-	4,938	-
2,4-Dihydroxybutanoic acid *	-	-	4,938	-
4-Hydroxypentanoic acid *	-	-	4,938	-
4-Chloropentanoic acid *	-	-	4,938	-
4-Bromopentanoic acid *	-	-	4,944	-
4-Hydroxy-3-oxopentanoic acid	20,149	21,371	4,921	1,000
4-Hydroxybutanoic acid	20,153	42,740	4,917	1,170
2-Hydroxybutanoic acid	24,094	29,191	4,911	1,187
2-(p-methoxyphenyl)propionic acid *	-	-	4,921	-
Threonic acid *	-	-	4,939	-
β -Phenylactic acid	15,498	14,198	4,253	1,000
2-O-allyl-L-threonic acid	19,337	20,349	4,250	1,000
Alcoholic acid	19,007	-	4,254	1,000
2-Phenylacetic acid	43,003	47,348	4,254	1,000
p-Hydroxyphenylacetic acid	23,658	24,770	4,240	1,000

Instrumentation

CE was performed in 50 μ m ID fused silica capillaries (28.5 cm/ 50 cm effective length) from Microquartz (Munich, Germany). For the experiments a fully automated CE system (Agilent Technologies, CA, USA) equipped with a diode array detector was used. Detection was performed via on-column measurement of the UV absorptions at 206, 218 and 254 nm. Before and after each run capillaries were washed with water, 0.2 M NaOH, water and background electrolyte, respectively.




Table 3: Separation data for α -hydroxy acids in a mixture using 10 mM L-threonine, 40 mM copper sulfate in aqueous solution, pH 6.0 adjusted with ammonia, applied voltage 22 kV, -40 nA, injection 22 nbar/10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water

	t _R (min)	t _R (min)	t _R (min)	R _S	R _L
Malic acid	13,772	14,133	4,791	1,019	3.3
2,4-Dihydroxybutanoic acid	13,137	13,223	4,791	1,014	6.7
4-Hydroxypentanoic acid	13,093	13,247	4,728	1,004	3.0
4-Chloropentanoic acid	13,028	13,281	4,779	1,022	3.4
4-Bromopentanoic acid	14,404	14,596	4,824	1,019	3.7
4-Hydroxy-3-oxopentanoic acid	11,499	11,847	4,884	1,019	3.3
4-Hydroxybutanoic acid	13,724	13,247	4,970	1,042	3.4
2-Hydroxybutanoic acid	13,704	13,281	5,000	1,040	3.6
2-(p-methoxyphenyl)propionic acid	16,094	-	5,490	1,038	6.0
Threonic acid	13,479	-	5,698	1,038	6.0
β -Phenylacetic acid	10,932	-	7,728	1,038	6.0
2-O-allyl-L-threonic acid	8,480	-	7,374	1,038	6.0
Alcoholic acid	13,019	13,274	8,000	1,038	3.3
2-Phenylacetic acid	11,320	-	8,340	1,038	6.0
p-Hydroxyphenylacetic acid	13,439	13,282	8,230	1,040	2.7

Table 4: Differences in resolution and separated substances for dansylated amino acids using different central ions

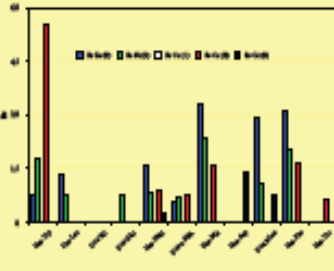


Figure 4: Differences in resolution and separated substances for dansylated amino acids using different central ions. Conditions: 10 mM L-phenylalaninamide, 2 mM central ion, total volume system, 100 mM buffer acid, pH 6.2 adjusted with 1 M NaOH solution, applied voltage in case of Cu(II), Cu(II), 10 (20) and Cu(II) -13 (14), applied voltage in case of Zn(II) and Cd(II): 17 kV, injection 10 nbar / 10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water/0.01 M D.

RESULTS

According to the results obtained the best conditions for chiral separation in case of L-threonine turned out to be 90 mM selector with 45 mM copper sulfate for both types of analytes, the dansylated amino acids at pH 6.0 or 6.2 and the α -hydroxy acids at pH 4.6. Furthermore, the enantiomer migration order (EMO) was found to be L before D for both types of analytes. The EMO could be reversed adding 15 mM SDS in the electrolyte for the α -hydroxy acids, whereas for the dansylated amino acids no reversal could be observed. Table 1 shows the best results of the dansylated amino acids using L-threonine. The chiral selector L-phenylalaninamide showed its best chiral separation power again for both types of analytes in a ratio of 10 mM selector and 5 mM of metal ion. In case of the dansylated amino acids using pH 6.2 different central ions were tested. It was shown that different central ions can generate different resolutions for the same analyte and even exhibit differences in separating substances using the same conditions such as mobility ratio of central ion to selector and pH. For the α -hydroxy acids using L-phenylalaninamide with copper sulfate, a pH 6.25 turned out to be optimal for chiral recognition. In case of this selector the EMO was found out to be D before L, which can be used for purity checks. Additionally, with the same conditions, separations could be achieved with other central ions such as Ni (II), Zn (II), Co (II) and Cd (II) shown in Fig. 1.

Table 5: Chiral separation of dansylated amino acids using 10 mM L-threonine, 40 mM copper sulfate in aqueous solution, pH 6.0 adjusted with ammonia, applied voltage 22 kV, -40 nA, injection 10 nbar / 10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water

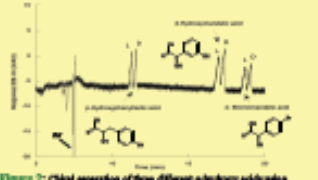


Figure 2: Chiral separation of dansylated amino acids using 10 mM L-threonine, 40 mM copper sulfate in aqueous solution, pH 6.0 adjusted with ammonia, applied voltage 22 kV, -40 nA, injection 10 nbar / 10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water.

Table 6: Chiral separation of dansylated amino acids using 10 mM L-phenylalaninamide, 2 mM central ion, total volume system, 100 mM buffer acid, pH 6.2 adjusted with 1 M NaOH solution, applied voltage 22 kV, -13 (14), injection 10 nbar / 10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water/0.01 M D

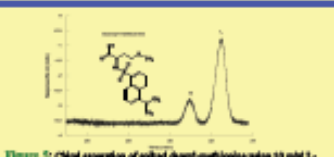


Figure 3: Chiral separation of dansylated amino acids using 10 mM L-phenylalaninamide, 2 mM central ion, total volume system, 100 mM buffer acid, pH 6.2 adjusted with 1 M NaOH solution, applied voltage 22 kV, -13 (14), injection 10 nbar / 10, temperature 23 °C, sample: 1 ng/mL in water/0.01 M D.

Literaturverzeichnis

- [1] **K.-H. Hellwich** (2007): "Stereochemie Grundbegriffe, 2. Auflage", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- [2] <http://www.wissen.de/wde/generator/wissen/ressorts/natur/index.page=1119104>
(Datum des Zugriffs: 16. Juli 2010, 9:50 Uhr)
- [3] <http://www-history.mcs.st-andrews.ac.uk/Biographies/Biot.html>
(Datum des Zugriffs: 11. Juni 2010, 18:50 Uhr)
- [4] <http://www.wissen.de/wde/generator/wissen/ressorts/natur/naturwissenschaften/indexoffline.page=1209124> (Datum des Zugriffs: 16. Juli 2010, 9:55 Uhr)
- [5] <http://www.wissen.de/wde/generator/wissen/ressorts/natur/naturwissenschaften/indexoffline.page=1123520> (Datum des Zugriffs: 16. Juli 2010, 10:00 Uhr)
- [6] <http://www.wissen.de/wde/generator/wissen/ressorts/natur/naturwissenschaften/indexoffline.page=1176570> (Datum des Zugriffs: 16. Juli 2010, 9:55 Uhr)
- [7] **Albert Gossauer** (2006): "Struktur und Reaktivität der Biomoleküle - Eine Einführung in die organische Chemie", Helvetica Chimica Acta-Verlag, Zürich
- [8] <http://online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/stereo/kapitel1.html>
(Datum des Zugriffs: 16. Juni 2010, 16:48 Uhr)
- [9] <http://online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/stereo/kapitel2.html>
(Datum des Zugriffs: 16. Juni 2010, 16:48 Uhr)
- [10] **J. Patocka, A. Dvorak** (2004): "Biomedical aspects of chiral molecules", Journal of Applied Biomedicine, 2: 95-100, ISSN 1214-0287
- [11] **Wolfgang Glöckner** (1995): "Abiturwissen-Chemie", 4. Auflage, Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt am Main
- [12] <http://www.uni-tuebingen.de/AKSCHURIG/download/bunsen.pdf>
(Datum des Zugriffs: 16. Juni 2010, 17:48 Uhr)
- [13] http://www.chemie.uni-regensburg.de/Anorganische_Chemie/Brunner/gal.htm
(Datum des Zugriffs: 16. Juni 2010, 18:36 Uhr)

- [14] **A. Wollrab** (2009): "Organische Chemie – eine Einführung für Lehramts- und Nebenfachstudenten, 3. Auflage", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- [15] http://de.wikipedia.org/wiki/Chiral_pool, (Datum des Zugriffs: 17. Juli 2010, 13:00 Uhr)
- [16] http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=titel_30_2005, (Datum des Zugriffs: 11. Juni 2010, 18:30 Uhr)
- [17] http://www.k-faktor.com/contergan/#kap_01, (Datum des Zugriffs: 19. Juni 2010, 18:00 Uhr)
- [18] <http://tigger.uic.edu/~kbruzik/text/chapter4.htm> (Datum des Zugriffs: 19. Juni 2010, 18:03 Uhr)
- [19] **Aktories, Förstermann, Hoffmann, Starke** (2005): "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, Urban und Fischer-Verlag, München
- [20] **Aktories, Förstermann, Hoffmann, Starke** (2006): "Repetitorium-Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie“, 1. Auflage, Urban und Fischer-Verlag, München
- [21] http://www.pharmazeutische-zeitung.de/fileadmin/nrf/pdf/1-epinephrin_nase.pdf , (Datum des Zugriffs: 17. Juli 2010, 16:00 Uhr)
- [22] **G. Gübitz, M. G. Schmid** (2004): "Chiral Separations- Methods and Protocols", Chapter 1, **G. Gübitz, M. G. Schmid**: "Chiral Separation Principles: An Introduction", Humana Press-Verlag, Totowa, New Jersey
- [23] **G. Gübitz, M. G. Schmid** (2001): "Chiral Separation by Chromatographic and Electromigration Techniques", Biopharm. Drug Dispos. 22, 291-336
- [24] **C. E. Dalgliesh** (1952): "The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms", J. Chem. Soc., 137, 3940-3942
- [25] <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/racemate/racemate.htm>, (Datum des Zugriffs: 18. Juli 2010, 17:40 Uhr)
- [26] **G. Löffler** (2005): "Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie“, 6. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- [27] **E. Ehlers** (2002): "Analytik II - Quantitative und instrumentelle pharmazeutische Analytik“, 10. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart

- [28] **E. Breitmaier, G. Jung** (2005): "Organische Chemie", 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [29] **M. H. Gey** (1998): "Instrumentelle Bioanalytik", 1. Auflage, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden
- [30] **Werner Buselmaier** (1995): "Abiturwissen-Biologie", 1. Auflage, Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt am Main
- [31] **Austria Codex CD-ROM**, (Erscheinungsdatum 01.01.2010)
- [32] **P. Högger, E. Strehl** (2007): "Repetitorium Klinische Pharmazie", 1. Auflage, Govi-Verlag, Eschborn
- [33] **S. Ellsäßer** (2008): "Körperpflegekunde und Kosmetik", 2. Auflage, Springer Medizin-Verlag, Eschborn
- [34] **A. Willmes** (2007): "Taschenbuch chemische Substanzen", 3. Auflage, Harri Deutsch-Verlag, Frankfurt am Main
- [35] <http://www.lebensmittellexikon.de/m0000530.php>, (Datum des Zugriffs: 21. Juli 2010, 17:00 Uhr)
- [36] <http://www.andechser-molkerei.de/?id=134>, (Datum des Zugriffs: 21. Juli 2010, 17:30 Uhr)
- [37] http://www.akoci.uni-hannover.de/AK_Kalesse/OCF-vortraege04WS/10.01.05_Chiral%20Pool%20II.pdf, (Datum des Zugriffs: 21. Juli 2010, 17:30 Uhr)
- [38] **H. Engelhardt, W. Beck und T. Schmitt** (1994): "Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten", 1. Auflage, Vieweg-Verlag, Braunschweig/Wiesbaden
- [39] **J. Böcker** (1997): "Chromatographie-Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese", 1. Auflage, Vogel-Verlag, Würzburg
- [40] http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/elektrophorese/lbef_elektrophorese.htm (Datum des Zugriffs: 22. Juli 2010, 17:00 Uhr)
- [41] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/596960/Arne-Tiselius>, (Datum des Zugriffs: 22. Juli 2010, 17:05 Uhr)
- [42] <http://www.kapillarelektrophorese.de/Capillary%20Electrophoresis.htm>, (Datum des Zugriffs: 23. Juli 2010, 12:40 Uhr)

- [43] http://www.uni-ulm.de/uni/fak/natwis/AG_1.3/anachem/Lehrveranstaltungen/analyt_chem_hauptstud/F-P-Analytische%20Chemie/Elektrophorese-Skript%202004.pdf, (Datum des Zugriffs: 23. Juli 2010, 14:20 Uhr)
- [44] http://www.pharmchem.tu-bs.de/images/waetzig_kpep_eof-entstehung.jpg, (Datum des Zugriffs: 27. Juli 2010, 15:10 Uhr)
- [45] **S. Terabe, K. Ando Ichikawa, K. Otsuka, A. Tsuchiya** (1984): "Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries", *Anal. Chem.*, 56: 111-113
- [46] **V. A. Davankov, S. V. Rogozhin** (1971): "Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper(II) complexes", *J. Chromatogr.*, 60: 280-283
- [47] **G. Gübitz, W. Jellenz, G. Löffler, W. Santi** (1979): "Chemically bounded chiral stationary phases for the separation of racemates by HPLC", *J. High. Resolut. Chrom. Chrom. Comm.*, 2: 145-146
- [48] **E. Gassmann, J. E. Kuo, R. N. Zare** (1985): "Electrokinetic separation of chiral compounds", *Science*, 230: 813-814
- [49] **P. Gozel, E. Gassmann, H. Michelsen, R. N. Zare** (1987): "Electrokinetic resolution of amino acid enantiomers with copper(II)-aspartame support electrolyte", *Anal. Chem.*, 59: 44-49
- [50] **C. Desiderio, Z. Aturki, S. Fanali** (1994): "Separation of α -hydroxy acid enantiomers by high performance capillary electrophoresis using copper(II)-L-amino acid and copper(II)-aspartam complexes as chiral selectors in the background electrolyte", *Electrophoresis*, 15: 864-869
- [51] **M. G. Schmid, G. Gübitz** (1996): "Direct resolution of underivatized amino acids by capillary zone electrophoresis based on ligand exchange", *Enantiomer*, 1: 23-27
- [52] **G. Gübitz, M. G. Schmid** (2004): "Chiral Separations- Methods and Protocols", Chapter 22, **M. G. Schmid, G. Gübitz**: "Chiral Ligand-Exchange Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography", Humana Press-Verlag, Totowa, New Jersey

- [53] **M. G. Schmid, N. Grobuschek, O. Lecnik, G. Gübitz** (2001): "Chiral ligand-exchange capillary electrophoresis", *J. Biochem. Biophys. Methods*, 48: 143-154
- [54] **M. G. Schmid** (2010): "Methoden der Enantiomerentrennung", Wahlfachskriptum
- [55] **L. Qi, G. Yang** (2009): "Enantioseparation of dansyl amino acids by ligand exchange capillary electrophoresis with zinc(II)-L-phenylalaninamide complex", *J. Sep. Sci.*, 32: 3209-3214
- [56] **Z. Chen, M. Niitsuma, T. Nakagama, K. Uchijama, T. Hobo** (2002): "Enantio-separations of dansyl amino acids by capillary electrophoresis using Cu(II) complexes with L-amino acylamides as chiral selectors in electrolytes", *J. Sep. Sci.*, 25: 1197-1201
- [57] **H. Hödl, A. Krainer, K. Holzmüller, M. G. Schmid, G. Gübitz** (2007): "Chiral separation of sympathomimetics and β -blockers by ligand-exchange CE using Cu(II) complexes of L-tartaric acid and L-Threonine as chiral selectors", *Electrophoresis*, 28: 2675-2682
- [58] **Z-X. Zheng, Y. Wei, J-M. Lin** (2004): "Chiral separation based on ligand-exchange capillary electrophoresis using a copper(II)-L-ornithine ternary complex as selector", *Electrophoresis*, 25: 1007-1012
- [59] **X. Lu, Y. Chen, L. Guo, Y. Yang** (2002): "Chiral separation of underivatized amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis using a copper(II)-L-lysine complex as selector", *Journal of Chromatography A*, 945: 249-255
- [60] **L. Qi, Y. Han, M. Zuo, Y. Chen** (2007): "Chiral CE of aromatic amino acids by ligand-exchange with zinc(II)-L-lysine complex", *Electrophoresis*, 28: 2629-2634
- [61] **G. Gübitz, M. G. Schmid** (2004): "Recent advances in chiral separations principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography", *Electrophoresis*, 23: 3981-3996
- [62] **S. Hjertén, J. L. Liao, R. Zhang** (1989): "High-performance liquidchromatography on continuous polymer beds", *J. Chromatography*, 473: 273-275
- [63] **M. G. Schmid, N. Grobuschek, C. Tuscher, et al.** (2000): "Chiral separation of amino acids by ligand-exchange capillary electrochromatography using continuous beds", *Electrophoresis*, 21: 3141-3144

- [64] **M. G. Schmid, N. Grobuschek, O. Lecnik, G. Gübitz, Á. Végvári, S. Hjertén** (2001): “Enantioseparation of hydroxy acids on easy-to-prepare continuous beds for capillary electrochromatography”, *Electrophoresis*, 22: 2616-1619
- [65] **A. Maruška, C. Ericson, A. Végvári, S. Hjertén** (1999): “(Normal-phase) capillary chromatography using acrylic polymer-based continuous beds”, *J. Chromatography A*, 837: 25-33