

Bestimmung der Interkonversionsbarrieren von
Enantiomeren und Isomeren
mit dynamischen Elektromigrationsmethoden
und Computersimulation

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

GABRIELE SUSANNE TRAPP

Tag der mündlichen Prüfung:	12.12.2001
Dekan:	Professor Dr. H. Probst
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Schurig
2. Berichterstatter:	Professor Dr. G. Häfelinger

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. V. Schurig in der Zeit von November 1998 bis September 2001 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. V. Schurig für die Themenstellung, sein stetiges Interesse am Fortgang, die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die gute Zusammenarbeit und viele wertvolle Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt Dr. D. Wistuba, Dr. J. Kang und Dipl.-Chem. H. Czesla für hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Bei Dr. O. Trapp bedanke ich mich für die Unterstützung bei allen theoretischen Fragen, sowie für seine stete Bereitschaft zur Erweiterung und Verbesserung des Computerprogramms ChromWin auf die jeweiligen Bedürfnisse der Kapillar-Elektromigrationsmethoden.

Herrn Dr. Müller und Herrn Bartholomäi danke ich für die Messung von Massenspektren.

Prof. F. Vögtle und Dipl.-Chem. U. Hahn danke ich für die Kooperation auf dem Gebiet der Trögerschen Base.

Prof. Dr. I. Agranat, Dr. D.H. Hochmuth, Prof. Dr. W.A. König, Dr. S. Maier und Dr. C.J. Welch danke ich für nützliche Diskussionen und Ratschläge.

Dem Graduiertenkolleg „Chemie in Interphasen“ danke ich für die großzügige Förderung durch ein Promotionsstipendium sowie für Sachmittel und Reisestipendien.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die großzügige Unterstützung meiner akademischen Ausbildung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Problemstellung.....	6
3. Methoden zur Bestimmung von Interkonversionsbarrieren.....	9
3.1. Definitionen	9
3.1.1. Enantiomerisierung und Racemisierung.....	9
3.1.2. Isomerisierung	10
3.1.3. Kinetik und Dynamik.....	10
3.2. Vergleich der Methoden	12
3.3. Historische Entwicklung der dynamischen Chromatographie	14
3.4. Dynamische Elektromigrationsmethoden	17
3.5. Bestimmung von Aktivierungsparametern.....	19
3.6. Simulationsmodelle und Software in der dynamischen Chromatographie	21
3.6.1. Das theoretische Bodenmodell	21
3.6.2. Das stochastische Modell.....	23
3.6.3. Das stochastische Modell plus.....	25
3.6.4. Die Approximationsfunktion	27
3.6.5. ChromWin.....	28
3.6.5.1. Übersicht	28
3.6.5.2. Vergleich der Modelle	29
3.6.5.3. Computersimulation.....	30
4. Kapillarelektromigrationsmethoden.....	33
4.1. Historische Entwicklung der Elektrophorese und der elektrokinetischen Chromatographie	33
4.2. Theoretische Grundlagen.....	36
4.2.1. Allgemeines	36
4.2.2. Physikalische Grundlagen.....	37

4.2.2.1.	Elektrophorese und Elektroosmose.....	37
4.2.2.2.	Analytische Parameter zur Beschreibung elektrophoretischer und elektrochromatographischer Experimente	41
4.2.2.3.	Joulesche Wärme	44
4.3.	Elektromigrationsmethoden und ihre Anwendung für dynamische Untersuchungen	46
4.3.1.	Allgemeines	46
4.3.2.	Kapillarelektrophorese.....	47
4.3.3.	Kapillarelektrokinetische Chromatographie.....	47
4.3.4.	Anwendbarkeit des stochastischen Modells	49
4.3.5.	Anwendbarkeit des theoretischen Bodenmodells.....	51
4.4.	Instrumentation.....	53
4.4.1.	Allgemeines	53
4.4.2.	Kühlung.....	54
4.4.3.	Detektion.....	58
4.5.	Chirale Selektoren und Additive	60
4.5.1.	Allgemeines	60
4.5.2.	Tenside.....	60
4.5.3.	Cyclodextrine.....	63
4.5.4.	Sonstige.....	65
5.	Enantiomerisierung chiraler Arzneistoffe	67
5.1.	Benzodiazepine.....	67
5.1.1.	Allgemeines	67
5.1.2.	Optimierung der Puffer- und Selektorkonzentration	69
5.1.3.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Oxazepam	71
5.1.4.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Temazepam.....	74
5.1.5.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Lorazepam	77
5.1.6.	Ergebnis	80
5.2.	Chlorthalidon	84

5.2.1.	Allgemeines	84
5.2.2.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Chlorthalidon	85
5.2.3.	Ergebnis	88
5.3.	Thalidomid.....	91
5.3.1.	Allgemeines	91
5.3.2.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Thalidomid mittels DEKC.....	92
5.3.3.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Thalidomid mittels DGC.....	95
5.3.4.	Ergebnis	98
6.	Enantiomerisierung der Trögerschen Base.....	101
6.1.	Allgemeines	101
6.2.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere der Trögerschen Base	102
6.3.	Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere eines benzylierten Derivats der Trögerschen Base.....	106
6.4.	Ergebnis	110
7.	Isomerisierung von Dipeptiden	112
7.1.	Allgemeines	112
7.2.	Bestimmung der Isomerisierungsbarriere von L-Alanyl-L-Prolin.....	113
7.3.	Bestimmung der Isomerisierungsbarriere von L-Leucyl-L-Prolin.....	116
7.4.	Bestimmung der Isomerisierungsbarriere von L-Phenylalanyl-L-Prolin.....	119
7.5.	Ergebnis	122
8.	Experimenteller Teil.....	125
8.1.	Allgemeines	125
8.2.	Kapillarelektrophorese.....	126
8.2.1.	Apparative Ausstattung.....	126
8.2.2.	Kapillarsäulen	127
8.2.3.	Puffer.....	127
8.2.4.	Dynamische Elektromigrationsmethoden.....	128

8.2.4.1.	Allgemeines	128
8.2.4.2.	DMEKC Enantiomerentrennung von Benzodiazepinen	129
8.2.4.3.	DEKC Enantiomerentrennung von Chlorthalidon	129
8.2.4.4.	DEKC Enantiomerentrennung von Thalidomid	130
8.2.4.5.	DEKC Enantiomerentrennung der Trögerschen Base	131
8.2.4.6.	DCE Trennung von Dipeptiden	131
8.3.	Computer Hard- und Software	132
8.3.1.	Simulation von Elutionsprofilen	132
8.3.2.	Molecular Modelling	133
9.	Zusammenfassung	134
10.	Literaturverzeichnis	137

Abkürzungen

κ	Transmissionskoeffizient
τ	Halbwertszeit
α	Trennfaktor
σ	Standardabweichung
β	Phasenverhältnis
ΔG	freie Enthalpie
ΔG^\ddagger	freie Aktivierungsenergie, Gibbsche Energie
ΔH^\ddagger	Aktivierungsenthalpie
ΔS^\ddagger	Aktivierungsentropie
AF	Approximationsfunktion
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
Chirasil- β -Dex	Octamethylen-permethyl- β -cyclodextrin-polysiloxan
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
CM- β -CD	Carboxymethyl- β -cyclodextrin
CMPA	Chirales Mobilphasen Additiv
CPSP	chirale Pseudostationärphase
CSP	chirale Stationärphase
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DCM	Dichlormethan
<i>de</i>	Diastereomerenüberschuss
DEKC	dynamische elektrokinetische Chromatographie
DGC	dynamische Gaschromatographie
DHPLC	dynamische Hochleistungsflüssigchromatographie
DMEKC	dynamische mizellare elektrokinetische Chromatographie
DM- β -CD	statistisch methyliertes β -Cyclodextrin; Methylierungsgrad 1,6 - 1,9 pro Glucoseeinheit
DNMR	dynamische kernmagnetische Resonanz
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
EKC	elektrokinetische Chromatographie
EMM	Elektromigrationsmethoden
EOF	elektroosmotischer Fluss
<i>er</i>	Enantiomerenverhältnis

FDA	Food and Drug Administration
GC	Gaschromatographie
h	Plancksches Wirkungsquantum $6,626176 \cdot 10^{-34}$ J·s
$h_{plateau}, h_A, h_B$	relative Peakhöhen
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HP- β -CD	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
I.D.	Innendurchmesser
K	Gleichgewichtskonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
K'	Verteilungskoeffizient
k'	Retentionsfaktor, Migrationsfaktor
k_B	Boltzmannsche Konstante $1,380662 \cdot 10^{-23}$ J·K ⁻¹
LC	Flüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernresonanz
p	Druck
R'	Retentionszuwachs (Retentionsinkrement)
r	Korrelationskoeffizient
r^2	Bestimmtheitsmaß
R_S	Auflösung
SFC	überkritische Flüssigchromatographie
SM	stochastisches Modell
SM+	verbessertes stochastisches Modell
s_y	Reststandardabweichung
T	Temperatur
t	Zeit
t_0	Durchflusszeit, Migrationszeit eines ungeladenen Teilchens
t_R	Retentionszeit/Migrationszeit des Analyten
t_M	Retentionszeit der Mizelle/Pseudostationären Phase
TEAA	Triethylammoniumacetat
TPM	theoretisches Bodenmodell
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v	Geschwindigkeit/Wanderungsgeschwindigkeit
w_h	Peakbreite auf halber Höhe

1. Einleitung

Die Entwicklung der Stereochemie und ihre direkte Beziehung auf die dreidimensionale Struktur organischer Moleküle begann mit den grundlegenden Arbeiten Pasteurs (1848), der die enantiomeren Kristalle des Natriumammonium-Salzes der Traubensäure manuell trennte [1,2]. 1874 fanden van't Hoff und Le Bel unabhängig voneinander eine Erklärung für die von Pasteur beobachtete spiegelbildliche Kristallmorphologie. Sie postulierten eine tetraedrische Anordnung der vier Substituenten am Kohlenstoff (Vierbindigkeit des Kohlenstoffs: Kékulé 1858) und führen die optische Aktivität auf die molekulare Asymmetrie der vier Substituenten am Kohlenstoff zurück [3]. Die Annahme, dass diese Anordnungen sich wie inkongruentes Bild und Spiegelbild verhalten, revolutionierte die bis dahin zweidimensionale Molekülchemie. Dass die Enantiomere des Ammoniumtartrates durch den Schimmelpilz *Penicillium glaucum* unterschiedlich schnell abgebaut werden, geht ebenfalls auf eine Entdeckung Pasteurs (1858) zurück. Diese anfänglichen Beobachtungen unterschiedlicher Eigenschaften enantiomerer Verbindungen führte schließlich zu der Erkenntnis, welche außerordentlich wichtige Rolle die Stereochemie für grundlegende Lebensprozesse einnimmt.

1891 unternahm Emil Fischer erste Versuche die relative Konfiguration der Monosaccharide aufzuklären [4]. Die erste experimentelle Bestimmung einer absoluten Konfiguration gelang Bijvoet erst 1951 [5] am Beispiel des Natriumrubidiumtartrats mittels Röntgenkristallographie.

Easson und Stedman legten 1933 [6] die Grundlagen des theoretischen Verständnisses für stereochemische Unterschiede in der pharmakologischen Aktivität von Wirkstoffen. In ihrem Modell werden die unterschiedlichen pharmakologischen Aktivitäten auf die unterschiedliche Bindung von Enantiomeren an eine gemeinsame Enzym- oder Rezeptorstelle zurückgeführt – eine Erweiterung des 1894 von Emil Fischer formulierten Schlüssel-Schloss-Prinzips. Nach dem von ihnen aufgestellten „drei-Punkt“ Modell werden für die Unterscheidung zwischen zwei Enantiomeren drei unterschiedliche

Bindungsstellen des Rezeptors oder des Enzyms benötigt. Eine Diskriminierung findet dann statt, wenn ein Enantiomer gleichzeitig mit allen drei Bindungsstellen in Wechselwirkung treten kann, während das andere Enantiomere nur mit zwei Bindungsstellen wechselwirkt.

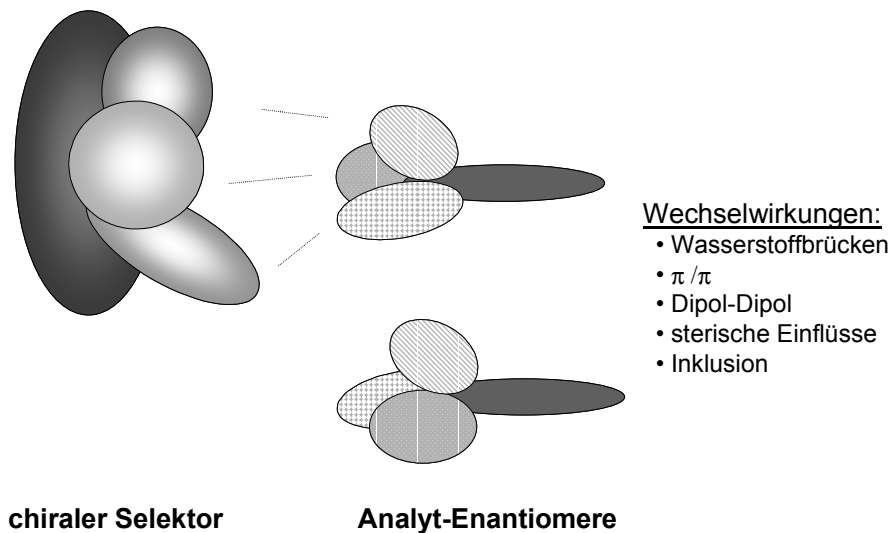


Abbildung 1: Drei-Punkt Wechselwirkungsmodell.

Chirale Moleküle können nicht durch Drehung oder Translation mit ihrem Spiegelbild zur Deckung gebracht werden. Der Einfluss der Chiralität auf lebende Systeme wird in besonderem Maße bei der Enantiomeren-diskriminierung in der Natur deutlich. Beispiele hierfür sind das nahezu ausschließliche Auftreten von D-Zuckern und L-Aminosäuren in allen lebenden Organismen sowie die rechtshändig gewundene Doppelhelix der Erbsubstanz DNA. Ausnahmen dieser Homochiralität macht sich die Natur in einigen Spezialfällen zu Nutze, so enthalten beispielsweise einige Spinnengifte D-Aminosäuren, die die Stabilität des Giftes gegenüber einem enzymatischen Abbau erhöhen. Diese „unnatürlichen Aminosäuren“ werden durch eine im Spinnengift enthaltene Isomerase aus den L-Aminosäuren synthetisiert. Auch bei der Suche nach neuen Arzneistoffen auf Peptid-Basis berücksichtigt man diese Tatsache. Durch den gezielten Einbau von D-Aminosäuren wird der Abbau durch ubiquitär vorkommende Peptidasen/Amidasen stark verlangsamt.

Die Homochiralität in der Natur hat auch zur Folge, dass Enantiomere eine unterschiedliche physiologische Wirkung aufweisen können. Beispiele hierfür reichen vom unterschiedlichen Geruch zweier enantiomerer Aromastoffe (z.B. Limonen) über den unterschiedlichen Geschmack von D- und L-Aminosäuren (z.B. Asparagin) bis zu physiologisch unterschiedlich wirkenden Arzneistoffen (z.B. DARVON und NOVRAD).

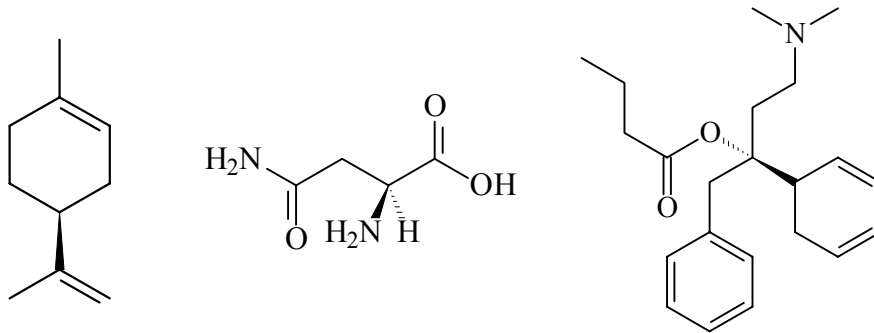


Abbildung 2: Beispiele unterschiedlicher Eigenschaften von Enantiomeren: (*S*)-Limonen (links) besitzt den Geruch von Zitronen, (*R*)-Limonen den von Orangen; (*S*)-Asparagin (Mitte) schmeckt bitter, (*R*)-Asparigin schmeckt süß; DARVON (rechts) wird als Analgetikum verwendet, sein Enantiomer NOVRAD als Antitussivum.

Etwa 60% aller in Deutschland zugelassenen Arzneistoffe sind chiral, davon sind etwa $\frac{2}{3}$ Naturstoffe oder deren Derivate und werden meist in enantiomerenreiner Form verabreicht, $\frac{1}{3}$ hingegen ist vollsynthetisch und wird zum großen Teil als Racemat angeboten [7].

Wie das Beispiel von DARVON und NOVRAD (Namensgebung als Palindrom) zeigt, ist gerade bei der Entwicklung chiraler Arzneistoffe eine effiziente Analytik von Stereoisomeren zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit, sowie eine gezielte pharmakologische Untersuchung eine unabdingbare Voraussetzung für die Zulassung durch regulative Aufsichtsbehörden wie die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) oder das deutsche Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Die Erkenntnis der Notwendigkeit einer toxikologischen Prüfung von Arzneimitteln kam relativ spät. So forderte das erste deutsche Arzneimittelgesetz von 1961 – wie damals allgemein üblich – lediglich die Registrierung eines neuen Medikaments. Erst seit 1978 wird in

Deutschland eine wissenschaftliche Prüfung von Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit aller neuen Medikamente verlangt. Andere Staaten haben ebenfalls ihre Arzneimittelpolitik geändert und verlangen nun eine Prüfung der Arzneimittelsicherheit [8-11]. Dieser radikale weltweite Wandel war die Konsequenz der Contergan Katastrophe: Das bis 1962 in Deutschland unter diesem Namen vertriebene Schlaf- und Beruhigungsmittel Thalidomid hatte schwere Missbildungen an Embryonen zur Folge und verursachte auch bei Erwachsenen bei längerer täglicher Einnahme teilweise schwere Nervenschäden. Zahlreiche synthetische und natürlich vorkommende chirale Verbindungen sind stereolabil, d.h. die Stereoisomere wandeln sich ineinander um. Je nach Konstitution der Verbindung kann dies sehr langsam oder sehr schnell erfolgen, einige Beispiele hierfür sind in Abbildung 3 gezeigt.

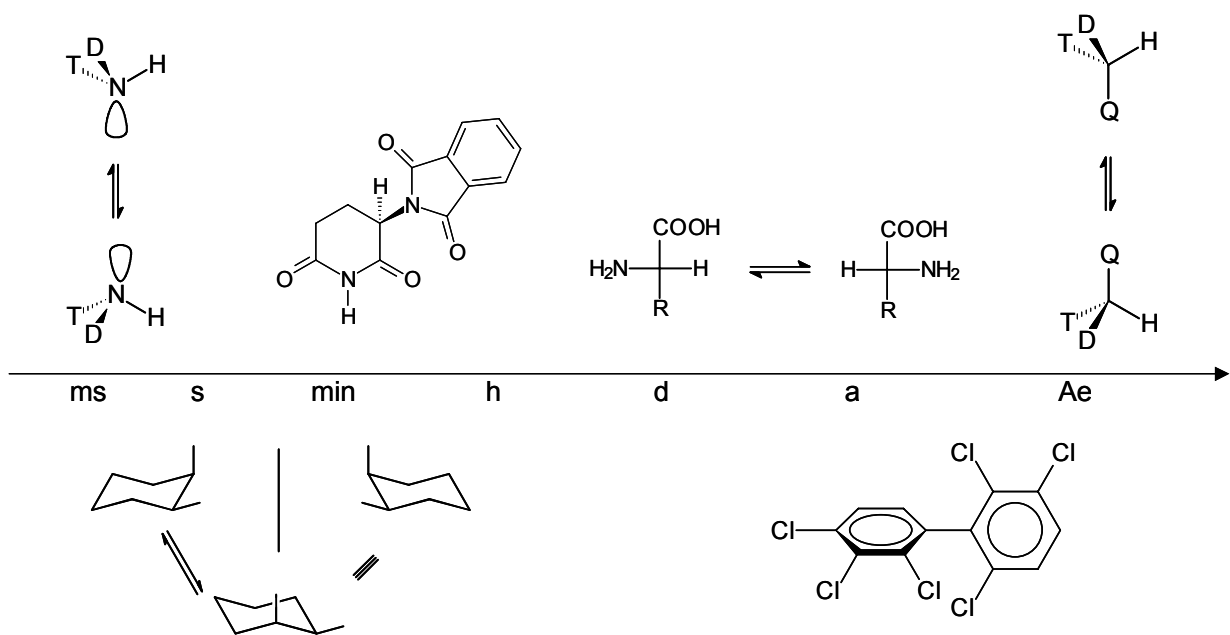


Abbildung 3: Zeitskala interkonvertierender, stereolabiler Moleküle.

Die Tatsache der Stereolabilität ist besonders hinsichtlich der Sicherheit von Arzneimitteln von Bedeutung. Verbindungen die sehr schnell interkonvertieren können von Rezeptoren oder Enzymen zwar unterschieden werden, aufgrund der schnellen Umwandlung ist jedoch eine Differenzierung der Pharmakokinetik und der Pharmakodynamik der Enantiomere nicht möglich. Moleküle mit einer

sehr großen Halbwertszeit können in enantiomerenreiner Form untersucht und je nach Eigenschaft der Enantiomere als Racemat oder einzelnes Enantiomer auf den Markt gebracht werden. Aus toxikologischer Sicht sind solche Verbindungen, die eine mittlere Lebensdauer im Bereich ihrer Verweilzeit im menschlichen Körper besitzen, problematisch. In diesen Fällen ist trotz möglicher unterschiedlicher Eigenschaften der Stereoisomere eine getrennte toxikologische Untersuchung sehr schwierig, da eine quantitative Trennung wegen der schnellen Interkonversion der Enantiomere oft kaum möglich ist. In diesen Fällen ist daher eine möglichst genaue Bestimmung der Interkonversionskinetik erforderlich, um mögliche unerwünschte Wirkungen eines Stereoisomers besser abschätzen zu können.

Für die Bestimmung der Stabilität stereolabiler Verbindungen gibt es mehrere in der Literatur beschriebene Verfahren. Neben Polarimetrie, der am häufigsten eingesetzten Methode, werden noch die dynamische NMR Spektroskopie (DNMR) sowie verschiedene chromatographische stopped-flow (sfMDGC, sfGC, sfCE) und dynamische chromatographische (DGC, DSFC, DHPLC) Methoden angewandt. Während die direkte Bestimmung der Interkonversionsbarrieren die Isolierung größerer Mengen des reinen oder zumindest angereicherten Enantiomers verlangt, zeichnen sich die chromatographischen Methoden durch einen sehr geringen Materialverbrauch sowie die Verwendung von Racematen oder auch beliebiger nicht-racemischer Mischungen der Enantiomere aus. Die Interkonversion einer racemischen Probe während einer chromatographischen Enantiomerentrennung führt zu charakteristischen Elutionsprofilen, die durch das Auftreten eines Plateaus zwischen den beiden getrennten Peaks der Enantiomere gekennzeichnet sind. Zur Auswertung solcher Chromatogramme stehen mehrere Simulationsprogramme zur Verfügung, die die Bestimmung von Interkonversionsbarrieren erlauben.

2. Problemstellung

In den letzten beiden Jahrzehnten hat sich die dynamische Chromatographie zu einer zuverlässigen Methode für die Bestimmung von Enantiomerisierungs- und Isomerisierungsbarrieren entwickelt. Höher werdende Ansprüche an die Arzneimittelsicherheit haben nicht zuletzt einen großen Beitrag zu dieser Entwicklung geleistet. Neue Simulationsprogramme wie ChromWin erlauben die schnelle Bestimmung von Interkonversionsbarrieren aus den experimentellen Chromatogrammen. Trotz großer Fortschritte in neuerer Zeit gibt es noch immer nur wenige Anwendungsbeispiele für die dynamische chromatographische Bestimmung von Interkonversionsbarrieren, wobei die DGC die am häufigsten verwendete Methode darstellt. Dies ist besonders hinsichtlich der meist zeitaufwendigen und nur begrenzt anwendbaren alternativen Methoden (Polarimetrie, DNMR, chromatographische stopped-flow Methoden) erstaunlich, die im Falle der chiroptischen Methoden die vorherige Isolierung oder Anreicherung der einzelnen Stereoisomere erfordern.

Ziel dieser Arbeit ist es, dynamische Untersuchungen stereolabiler Verbindungen auf Kapillarelektromigrationsmethoden zu erweitern, und diese als möglichst einfache, schnelle, automatisierbare und vor allem präzise und empfindliche Methoden zur Bestimmung der Interkonversionsbarriere von Enantiomeren und Isomeren zu etablieren. Diese Untersuchungsmethoden sollen, um den Verhältnissen in biologischen Medien möglichst nahe zu kommen, in wässrigen Systemen angewandt werden. Die Verwendung von organischen Modifier-freien Systemen ist notwendig, um eine möglichst realitätsnahe Untersuchung von Arzneistoffen zu gewährleisten. Elektromigrationsmethoden (CE, EKC, MEKC) haben aufgrund ihrer hohen Effizienz, des geringeren Materialverbrauchs, wegen der höheren Flexibilität und der besseren Verfügbarkeit unterschiedlichster chiraler Selektoren viele Vorteile gegenüber den konventionellen chromatographischen Verfahren (GC, HPLC, SFC).

Nachteile, an denen bisherige Versuche der Anwendung von dynamischen Elektromigrationsmethoden scheiterten, sind beispielsweise die ungenügende Effizienz vorhandener, kommerzieller Kühlsysteme, welche die durch die hohe Spannung erzeugte Joulesche Wärme rasch abführen müssen, sowie die langen Rechenzeiten bei der Computersimulation, die durch die hohen Bodenzahlen verursacht werden.

Als erstes soll daher ein Thermostatisiersystem entwickelt werden, das die entstehende Wärme auch bei hohen Ionenstärken und großen Pufferkonzentrationen in einem großen Temperaturbereich (-20 - +60°C) effizient abführt. Die Zuverlässigkeit und Robustheit dieses Systems soll untersucht werden. Außerdem sollen die Grenzen hinsichtlich der Variabilität der Kapillarlänge und die möglichen Fehler durch nicht-thermostatisierte Kapillarabschnitte ermittelt werden.

Parallel dazu sollen die für die Gaschromatographie bestehenden Modelle (SM, TPM) für die Simulation von Elutionsprofilen zur Ermittlung von Interkonversionsbarrieren auf ihre Anwendbarkeit für die unterschiedlichen Elektromigrationsmethoden (CE, EKC, MEKC) überprüft und gegebenenfalls erweitert werden.

Aufgrund des Vorhandenseins vieler Vergleichsdaten aus herkömmlichen Racemisierungsexperimenten sollen zunächst unterschiedlich substituierte Benzodiazepine unter verschiedenen Bedingungen untersucht, und die erhaltenen Werte mit Literaturdaten verglichen werden. Durch die im Vergleich zu älteren Programmen stark verbesserte Simulationsgeschwindigkeit des Computerprogramms ChromWin soll eine große Zahl von Experimenten in einem breiten Temperaturbereich zu einer hohen Präzision und Genauigkeit der erhaltenen Werte führen, welche dann im Vergleich mit den Literaturdaten validiert werden.

Mit anderen Elektromigrationsmethoden soll dann die Enantiomerisierung von Chlorthalidon und Thalidomid als weitere stereolabile Arzneistoffe untersucht werden, um das Anwendungsspektrum der dynamischen Elektromigrationsmethoden zu vergrößern. Die Trögersche Base und eines ihrer *N*-substituierten

Derivate soll als historisch interessantes Beispiel herangezogen werden, um den Einfluss von Substituent und Ladung am chirotopen pyramidalen Stickstoff zu untersuchen. Schließlich soll noch die Isomerisierung verschiedener Dipeptide, welche für die Untersuchung der Proteinfaltung eine große Rolle spielen, mittels DCE untersucht werden. In allen Fällen soll die Bestimmung der Interkonversionsbarrieren ΔG^\ddagger sowie der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger zur Aufklärung des Interkonversionsmechanismus, der in manchen Fällen in der Literatur kontrovers diskutiert wird, herangezogen werden. Durch den Vergleich der ermittelten Werte mit denen von untersuchten strukturverwandten Verbindungen soll der Einfluss von Substituenten auf die Höhe der Interkonversionsbarriere und damit auf die Stabilität der Enantiomeren/ Isomeren quantifiziert werden.

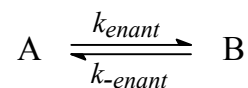
Anhand der experimentellen Elektrochromatogramme und -pherogramme der untersuchten Verbindungen sollen die unterschiedlichen Simulationsmodelle auf ihre Anwendbarkeit bei den dynamischen kapillarelektrophoretischen Messungen untersucht werden. Dazu sollen die vorhandenen dynamischen Elutionsprofile mit Hilfe des theoretischen Bodenmodells (TPM), des stochastischen Modells (SM/ SM+) sowie der erst kürzlich abgeleiteten Approximationsfunktion (AF) ausgewertet, und die erhaltenen Aktivierungsparameter verglichen werden.

3. Methoden zur Bestimmung von Interkonversionsbarrieren

3.1. Definitionen

3.1.1. Enantiomerisierung und Racemisierung

Enantiomerisierung [12,13] ist als mikroskopische Interkonversion eines Enantiomers (A) in das andere (B) definiert und kann als eine reversible Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden, die unabhängig vom Interkonversionsmechanismus ist. Allgemein kann eine Enantiomerisierung von A und B mit den Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion wie folgt formuliert werden:



Das integrierte Geschwindigkeitsgesetz ist in Gleichung (1) angegeben.

$$\ln \frac{[A]_0}{[A]_0 - 2[B]_t} = 2k_{enant}t \quad (1)$$

Racemisierung stellt im Gegensatz zur Enantiomerisierung einen irreversiblen makroskopischen Prozess dar, bei dem das Racemat aus einem nicht-racemischen Ausgangsmaterial erhalten wird [14].



Betrachtet man die Interkonversion eines einzelnen Moleküls, so wird offensichtlich, dass eine Racemisierung nicht möglich ist. Für die Racemisierung ergibt sich folgendes integrierte Geschwindigkeitsgesetz:

$$\ln \frac{[A]_0}{[A]_0 - [A,B]_t} = k_{rac}t \quad (2)$$

Vergleicht man die beiden integrierten Geschwindigkeitsgesetze aus Gleichung (1) und (2), so ergibt sich folgender Zusammenhang zwischen einer Racemisierung und einer Enantiomerisierung:

$$k_{rac} = 2k_{enant} \quad (3)$$

Als Halbwertszeit τ erhält man somit für die *Enantiomerisierung*:

$$\tau = \frac{\ln 2}{2k_{enant}} \quad (4a)$$

und für die *Racemisierung*:

$$\tau = \frac{\ln 2}{k_{rac}} \quad (4b)$$

3.1.2. Isomerisierung

Die Isomerisierung stellt eine reversible Reaktion 1. Ordnung dar, bei der die Gleichgewichtslage durch die unterschiedlichen potentiellen Energien der Isomere beeinflusst wird. Dies führt zu unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion und zu einem unterschiedlichen Isomerenverhältnis. Das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion auf das chemische Gleichgewicht K der Isomere kann wie folgt beschrieben werden:

$$K = \frac{k_{B \rightarrow A}}{k_{A \rightarrow B}} = \frac{[B]}{[A]} \quad (5)$$

Gleichung (5) impliziert, dass die Geschwindigkeitskonstante für die Rückreaktion für gegebene Werte von $k_{A \rightarrow B}$ und dem Verhältnis von $[A]$ zu $[B]$ bereits bestimmt ist.

3.1.3. Kinetik und Dynamik

Den in dieser Arbeit beschriebenen *dynamischen* chromatographischen und elektrophoretischen Methoden ist gemeinsam, dass sie die Untersuchung der Kinetik im Gleichgewicht befindlicher chemischer Systeme (bspw. Racemate) erlauben.

Im Gegensatz dazu wird bei den *kinetischen* Methoden die zeitabhängige Einstellung eines Gleichgewichts (bspw. ausgehend von einer angereicherten

Mischung der Enantiomere) beobachtet. Dabei wird zunächst durch Trennung der Stereoisomere versucht das Gleichgewicht zu stören, und anschließend die Kinetik der gleichgewichtseinstellenden Reaktion untersucht.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit einer der beiden Methoden (dynamisch oder kinetisch) ist zum einen die Unterscheidbarkeit der im Gleichgewicht stehenden Stereoisomere mit der gewählten Methode, und zum anderen muss die Umwandlungsgeschwindigkeit für die Methode angemessen sein. Es bleibt zu beachten, dass bei den *dynamischen* Methoden Erkennung und Umwandlung parallel zueinander ablaufen, während bei den *kinetischen* Methoden erst eine Trennung beider Spezies erfolgt und dann in einem weiteren Reaktionsschritt die erneute Einstellung beobachtet wird.

Die Vorteile *kinetischer* Methoden liegen in der zeitlichen und methodischen Trennbarkeit der beiden Schritte – Trennung und Interkonversion. Die vollständige Trennung stellt dabei vor allem bei Stereoisomeren mit niedriger Stereointegrität das Hauptproblem bei der Anwendung dieser Methoden dar. Die anschließende Interkonversion, die bei Enantiomeren meist über die zeitliche Änderung der optischen Aktivität verfolgt wird, ist sehr präzise und reproduzierbar.

Bei den *dynamischen* Methoden liegt methodisch eine Kopplung von Trennung und gleichzeitiger Interkonversion vor. Grundvoraussetzung für die Anwendung dynamischer Methoden ist also der Einsatz von Meßmethoden, die zum einen in der Lage sind diese Systeme voneinander zu trennen, und zum anderen ein zeitliches Auflösungsvermögen besitzen, die mit der zu untersuchenden Reaktionsgeschwindigkeit korreliert. Als Methoden für dynamische Untersuchungen haben sich sowohl DNMR als auch die breite Palette der chromatographischen Methoden (DGC, DHPLC, DSF) etabliert. Ein weiterer Vorteil dieser Methoden ist außerdem der äußerst geringe Materialverbrauch.

3.2. Vergleich der Methoden

Je nach Problemstellung und Eigenschaften der zu untersuchenden chiralen Verbindung können unterschiedliche experimentelle und theoretische Methoden eingesetzt werden.

Theoretische Verfahren zur Bestimmung von Interkonversionsbarrieren erfordern viel Erfahrung mit den jeweiligen theoretischen Modellen und sind selbst bei kleinen Molekülen sehr rechenintensiv. Um verlässliche Werte mit semiempirischen und *ab initio* Verfahren zu erhalten, wird nicht nur ein bekannter Interkonversionsmechanismus verlangt, sondern auch die Wahl des „richtigen“ Basissatzes. Einige Beispiele hierfür sind in der Literatur beschrieben [15-20].

Für Verbindungen mit niedrigen Interkonversionsbarrieren – insbesondere bei der Untersuchung von Konformationsänderungen – eignet sich die DNMR-Spektroskopie [21-27, und dort zitierte Literatur]. Allerdings sind DNMR-spektroskopische Bestimmungen, wenn anstelle der vollständigen Linienformanalyse Näherungslösungen verwendet werden, relativ ungenau (bis zu ± 5 kJ·mol⁻¹) und eine hohe Präzision bei Messungen kann nur in einem sehr engen Temperaturbereich um die Koaleszenztemperatur erreicht werden [28]. Dies wiederum hat zur Folge, dass eine Bestimmung von Aktivierungsparametern praktisch nicht durchführbar ist.

Klassische kinetische Untersuchungsmethoden gehören zu den heutzutage am meisten angewandten Methoden. Sie sind universell anwendbar, setzen allerdings die Isolierung größerer Mengen der Enantiomere voraus [28], was jedoch insbesondere bei niedrigen Interkonversionsbarrieren äußerst schwierig ist. Bei diesen Untersuchungen wird ausgehend von einem reinen Enantiomer bzw. einer Mischung mit bekanntem *ee* über chiroptische, NMR-spektroskopische oder enantioselektive chromatographische Methoden die zeitliche Änderung des Enantiomerenüberschusses *ee* verfolgt und diese nach einer Racemisierungskinetik ausgewertet.

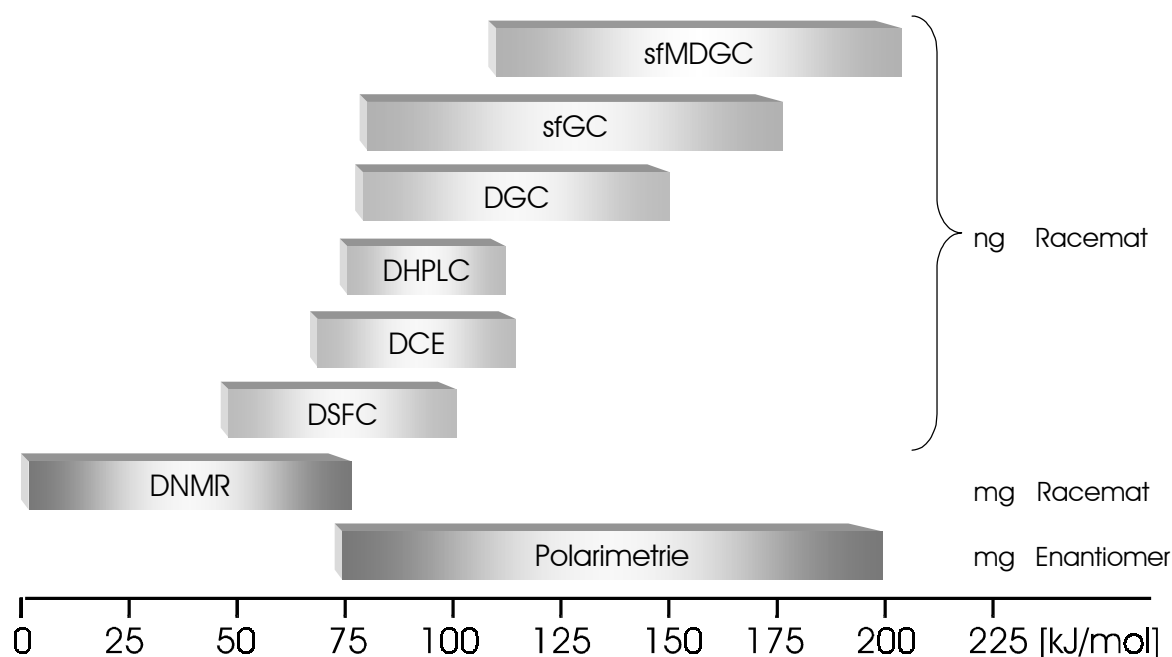


Abbildung 4. Übersicht der experimentellen Methoden zur Bestimmung von Interkonversionsbarrieren chiraler Verbindungen.

Die Bestimmung hoher Interkonversionsbarrieren (80 bis $200 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) ist für chromatographische Methoden, die sich durch einen sehr geringen Substanzbedarf (ng-Mengen des Racemats) und hohe Präzision auszeichnen, besonders geeignet. Eine Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methoden ist allerdings die analytische Trennbarkeit der Stereoisomere. Bei den Chromatographischen Methoden muss zwischen den stopped-flow und dynamischen chromatographischen Methoden unterschieden werden. Bei stopped-flow Methoden werden die Stereoisomere zunächst quantitativ getrennt und dann für eine vorgegebene Reaktionszeit bei einer erhöhten Temperatur einer Interkonversion unterworfen. Nach anschließender erneuter Trennung wird aus dem neu erhaltenen Stereoisomerenverhältnis die Interkonversionsbarriere berechnet. Bei den dynamischen Methoden hingegen wird die Höhe der Barriere durch Computersimulation der experimentellen dynamischen Elutionsprofile erhalten. Dieses weist, durch die während der chromatographischen Trennung ablaufende Interkonversion der Stereoisomere, ein charakteristisches Elutionsprofil auf, das durch eine Plateaubildung charakterisiert ist.

3.3. Historische Entwicklung der dynamischen Chromatographie

Ziel der enantioselektiven Chromatographie und auch der enantioselektiven Elektromigrationsmethoden ist die quantitative Enantiomerentrennung in Gegenwart einer chiralen Stationärphase (CSP). Eine chirale Erkennung zwischen racemischem Analyten und nicht racemischem Selektor ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Enantiomerentrennung. In der Literatur werden 6 Peakkoaleszenzphänomene beschrieben, die zu keiner oder nur einer ungenügenden Trennung führen [29]. Das Koaleszenzphänomen 3. Art beschreibt die Interkonversion des chiralen Analyten während der Enantiomerentrennung. Dieses Phänomen wird in der dynamischen Chromatographie zur Bestimmung von Interkonversionsbarrieren stereolabiler Verbindungen ausgenutzt und findet auch Anwendung bei intramolekularen Reaktionen [30] sowie Umlagerungs- und Zersetzungsreaktionen [31,32] und Isomerisierungen [33-47].

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, sind Elutionsprofile in der dynamischen Chromatographie durch das Auftreten eines Plateaus zwischen den getrennten Peaks, das durch die gegenseitige Umwandlung der getrennten Spezies zustande kommt, charakterisiert. Für die Auswertung solcher Chromatogramme mittels Computersimulation werden jedoch außer den üblichen chromatographischen Parametern – Durchflusszeit bzw. elektroosmotische Durchflusszeit t_0 , Retentions- bzw. Migrationszeiten der Stereoisomere A und B t_R^A und t_R^B , Peakbreiten auf halber Höhe w_h^A und w_h^B – noch zusätzlich die relativen Peakhöhen h_A und h_B zu den Retentionszeiten t_R^A und t_R^B , und die relative Plateauhöhe h_{Plateau} im Zeitmittel $\bar{t} = (t_R^A + t_R^B)/2$ zur Beschreibung benötigt. Mit Hilfe eines Simulationsprogramms können dann durch iterativen Vergleich dieser experimentellen Daten mit denen der simulierten Chromatogramme die Interkonversionsbarriere ΔG^\ddagger , und durch temperaturabhängige Messungen die Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger erhalten werden.

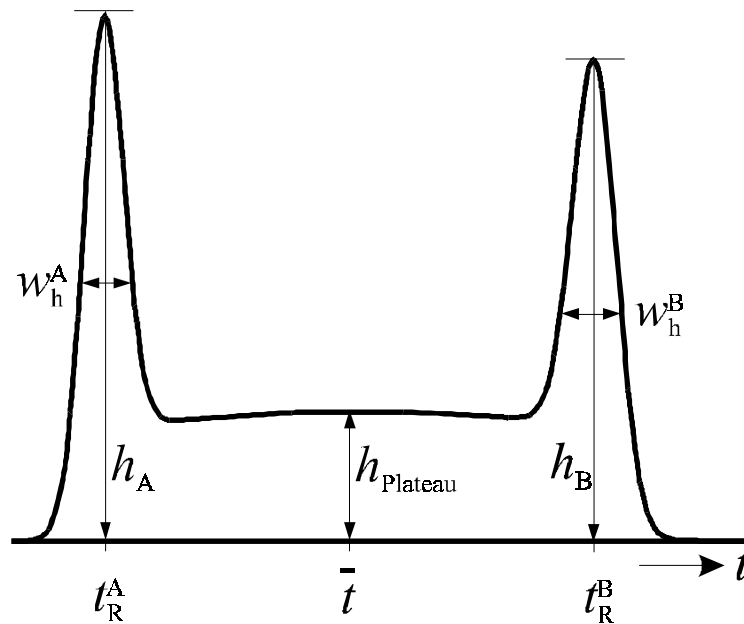


Abbildung 5. Charakteristisches Elutionsprofil mit Plateaubildung einer Enantiomerisierung in der dynamischen Chromatographie.

1960 erkannten Giddings *et al.* [48], Heilbronner *et al.* [49] und Bassett *et al.* [50] als erste, dass die Anwendung einer Peakformanalyse den Zugang zu den Geschwindigkeitskonstanten der zugrundeliegenden Reaktion ermöglicht, und entwickelten mathematische Modelle für eine iterative Auswertung. Das erste Simulationsprogramm, basierend auf dem theoretischen Bodenmodell, wurde 1984 von Bürkle *et al.* veröffentlicht [51]. Dieses Programm wurde später von Jung *et al.* auf Simulationen mit bis zu 120 000 Böden erweitert (SIMUL) [52,53]. In neuerer Zeit wurden andere, effizientere Programme (z.B. Mimesis) entwickelt [54]. Auch das stochastische Modell [55,56], das Peaks als Gaußkurven berücksichtigt und eine stochastische Wahrscheinlichkeitsverteilung verwendet, um die interkonvertierenden Spezies der Enantiomere zu beschreiben, wurde zur Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere verwendet.

Unter den dynamischen flüssig-chromatographischen Methoden fand die DHPLC, welche aufgrund der im Vergleich zu anderen Methoden niedrigeren Bodenzahlen eine schnellere und einfachere Auswertung mittels Simulation erlaubt, die größte Verbreitung [27,37-41,44,45,52,53,57-75]. Aufgrund der

höheren Anforderungen an das verwendete Simulationsprogramm sind nur wenige Beispiele für die DGC [32-36,51,53,60,76-81] und DSFC [82] bekannt. Im Gegensatz dazu wurden bislang bei den Elektromigrationsmethoden nur stopped-flow Techniken eingesetzt [42,47,83-89]. Neuere und universell einsetzbare dynamische Verfahren, welche eine breitere Anwendung der dynamischen Methoden erlauben, wurden erst kürzlich beschrieben [90]. Im folgenden wird ausschließlich auf die Entwicklung der dynamischen Elektromigrationsmethoden eingegangen, da sie Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

3.4. **Dynamische Elektromigrationsmethoden**

Temperaturabhängige dynamische Elektromigrationsmethoden stellen ein nützliches Werkzeug für die Bestimmung von Interkonversionsbarrieren im Bereich zwischen 80 und 120 kJ·mol⁻¹ dar, wo herkömmliche DNMR Experimente nicht mehr und GC Experimente wegen der ungenügenden Flüchtigkeit der Analyten bei den benötigten Temperaturen noch nicht angewandt werden können. Obwohl die Messung interkonvertierender Spezies durch dynamische Elektromigrationsmethoden ungefähr den gleichen Bereich von Interkonversionsbarrieren wie die dynamische HPLC abdecken, sind diese Methoden von besonderer Bedeutung wegen ihrer hohen Effizienz sowie der Möglichkeit des Einsatzes einer großen Zahl möglicher chiraler Additive, Detergentien oder kommerziell erhältlicher Säulen (OTLC, CEC). So konnten beispielsweise durch Kombination zweier oder mehrerer Selektoren („dual recognition“) chirale Trennprobleme gelöst werden, die mit konventionellen HPLC Methoden bisher nicht möglich waren [91-97].

In der Literatur sind bisher nur wenige Anwendungsbeispiele für die Bestimmung von Interkonversionsbarrieren mit dynamischen Elektromigrationsmethoden in Kombination mit Computersimulation beschrieben worden. Der Grund dafür sind die bei diesen Methoden auftretenden hohen Bodenzahlen, die eine aufwendige und langwierige Computersimulation nach sich ziehen. Erst kürzlich beschriebene Software Entwicklungen [98] machen eine Computersimulation von Elektropherogrammen und Elektrochromatogrammen in einem annehmbaren Zeitrahmen möglich. Ein weiterer Grund für die Vernachlässigung der Elektromigrationsmethoden ist die Schwierigkeit einer effizienten Thermostatisierung der Kapillare, die nur langsam durch die Entwicklung neuer und verbesserter Geräte reduziert wurde [99].

Die ersten Publikationen, die die Messung von Interkonversionsbarrieren in der Kapillarelektrophorese beschreiben, stammen von Weseloh *et al.* [83,84] und berichten von der Bestimmung der Rotationsbarrieren axial chiraler Biphenyle. 4,4'-Diamino-2,2'-bis(trifluormethyl)-biphenyl und 4,4'-Diamino-2,2'-diiso-

propylbiphenyl wurden unter der Verwendung von Permethyl- β -cyclodextrin als chiraler Selektor getrennt und dann in einem stopped-flow Experiment enantiomerisiert. Die Bestimmung der Rotationsbarriere mit dieser Methode verlangte weder die Verwendung der einzelnen Enantiomere, noch erforderte sie eine Computersimulation.

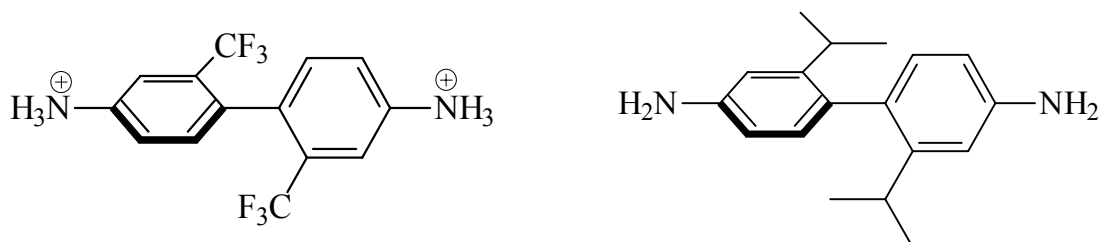


Abbildung 6: Von Weseloh *et al.* untersuchte Biphenyle.

Rathore und Horváth [47] schätzten die Geschwindigkeitskonstante isomerisierender *cis-trans* Konformere von Peptidyl-Prolin Dipeptiden in der dynamischen Kapillarelektrophorese mit Hilfe der Damköhler Zahl, die durch das Verhältnis der Verweilzeit der Migranten zur charakteristischen Reaktionszeit in der Kapillare bestimmt ist, ab. Die von ihnen zwischen 1 und 40°C erhaltenen kinetischen Daten stehen im Einklang mit den aus DNMR-Spektroskopie Experimenten erhaltenen Werten.

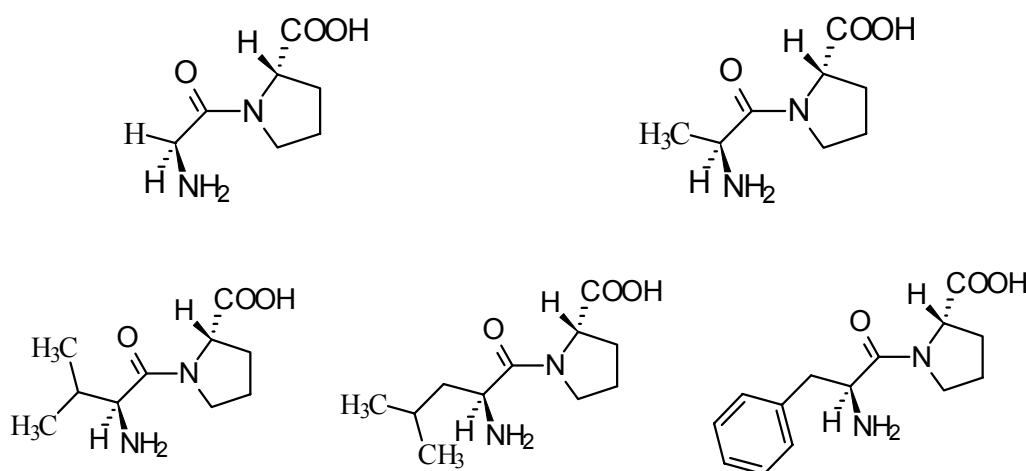


Abbildung 7: Peptidyl-Prolin Dipeptide deren Isomerisierungskinetik von Rathore und Horváth untersucht wurde.

3.5. Bestimmung von Aktivierungsparametern

Durch temperaturabhängige Messung der Geschwindigkeitskonstanten lassen sich die Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger gemäß der Gibbs-Helmholtz Gleichung $\Delta G^\ddagger(T) = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ und der Eyring-Gleichung (6) aus der Steigung und dem y-Achsen Abschnitt der Eyring-Auftragung (T^{-1} gegen $\ln(k^{app}/T)$) bestimmen [100]. Unabdingbare Voraussetzung für eine zuverlässige statistische Analyse sind hierbei viele Messpunkte in einem möglichst breiten Temperaturbereich.

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{(\Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger)}{RT}} \quad (6)$$

(6) nach $\Delta G^\ddagger(T)$ aufgelöst erhält man folgende Beziehung:

$$\Delta G(T) = -RT \ln \left(\frac{k_I^{app}}{\kappa} \cdot \frac{h}{k_B T} \right) \quad (7)$$

Dabei ist κ der Transmissionskoeffizient, k_B die Boltzmann Konstante ($k_B = 1,380662 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$), T die Enantiomerisierungstemperatur [K], h die Plancksche Konstante ($h = 6,626176 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$) und R die Gaskonstante ($R = 8,31441 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$). Der Transmissionskoeffizient κ berücksichtigt die Wahrscheinlichkeit eines Intermediates in das Edukt oder Produkt überzugehen. Bei Enantiomerisierungen ist der Transmissionskoeffizient $\kappa = 1/2$, da ein auftretendes Intermediat oder Molekül im Übergangszustand mit gleicher Wahrscheinlichkeit zum Produkt oder Edukt konvertieren kann [101].

Wichtig bei der Bestimmung von Interkonversionsbarrieren in Gegenwart einer CSP ist die Berücksichtigung der diastereomeren Wechselwirkungen. Während in achiraler Umgebung beide Enantiomere formal die gleiche freie Bildungsenthalpie besitzen, treten in chiraler Umgebung durch die Bildung von Diastereomerenkomplexen Differenzen in der Gibbsschen freien Energie - $\Delta_{B,A}\Delta G$ auf (vgl. Abbildung 8). Bei der enantioselektiven dynamischen Chromatographie von Enantiomeren erhält man daher eine Geschwindigkeitskonstante für die Hin- und eine für die Rückreaktion (k_I und k_{-I}). Für die

Berechnung von Enantiomerisierungsbarrieren wird jedoch nur die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion k_1 berücksichtigt, da k_{-1} durch den chiralen Selektor beeinflusst wird und aus der ersteren berechnet werden kann.

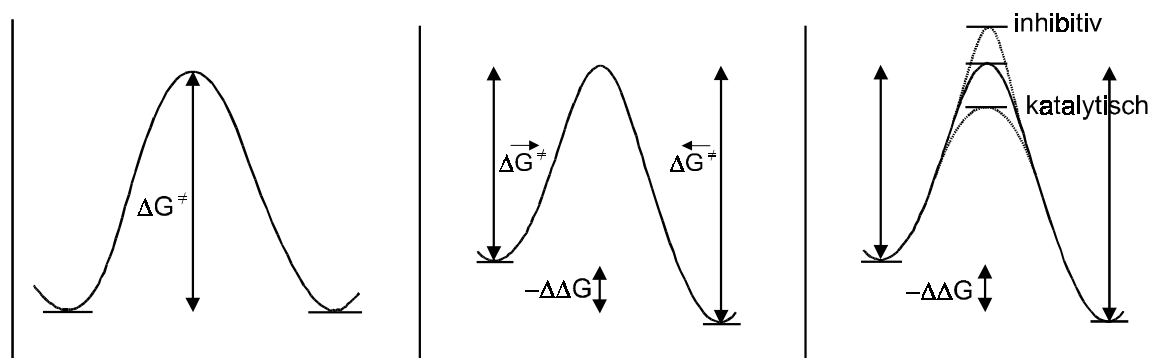


Abbildung 8. Energieprofile einer Enantiomerisierung in achiraler (links) und chiraler (mitte) Umgebung. Das rechte Energieprofil zeigt zusätzlich einen auftretenden katalytischen oder inhibierenden Effekt (gestrichelte Kurven).

Die berechnete Geschwindigkeitskonstante kann schließlich auch zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit interkonvertierender Substanzen verwendet werden. Die folgende Abbildung zeigt simulierte Chromatogramme nicht-racemischer Proben von Oxazepam, die sich während der chromatographischen Enantiomertrennung ineinander umwandeln ($k_{-1}^{app} = 3,15 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, Daten aus Beispiel 3, Tabelle 9, Oxazepam). Mit Hilfe der bekannten Geschwindigkeitskonstante lässt sich das Enantiomerenverhältnis vor der Enantiomertrennung bestimmen [85].

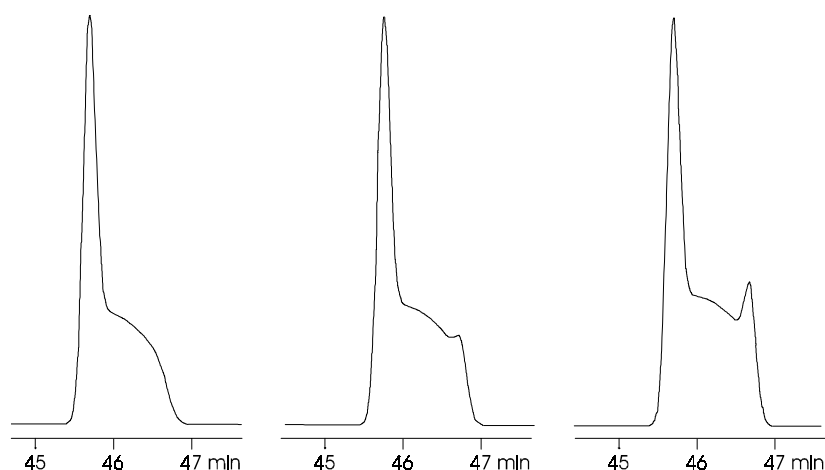


Abbildung 9: Simulierte Chromatogramme der DEKC Enantiomertrennung von Oxazepam [85]. Enantiomerenüberschuss (*ee*) des zuerst eluierten Enantiomers: 100% *ee* (links), 80% *ee* (mitte), 60% *ee* (links).

3.6. Simulationsmodelle und Software in der dynamischen Chromatographie

3.6.1. Das theoretische Bodenmodell

Das Anfang der 40er Jahre des letzten Jahrhunderts aus der Rektifikationstheorie übernommene Modell der diskontinuierlichen theoretischen Böden [102,103] beschreibt die chromatographische Trennung als einen, wie bei der Rektifizierung eines Gemisches mit einer Bodenkolonne vorhandenen, diskontinuierlichen Prozess. Die grundlegende Annahme in diesem Modell ist, dass alle Vorgänge wiederholt in getrennten, gleichartigen Sektionen einer in N theoretischen Böden unterteilten Säule ablaufen. Jeder theoretische Boden wird dabei als chemischer Reaktor für eine bestimmte Reaktion betrachtet und ist unterteilt in eine mobile Phase sowie eine stationäre (z.B. GC, HPLC, CEC) bzw. eine pseudostationäre Phase (EKC, MEKC)*.

Am Anfang werden die Stereoisomere in den ersten Boden injiziert, am Ende werden sie als Chromatogramm aufgezeichnet. In jedem der N theoretischen Böden einer chromatographischen Säule werden drei Schritte ausgeführt:

- (i) Verteilung der beiden Stereoisomere A und B zwischen der mobilen und der stationären Phase,
- (ii) Interkonversion der Stereoisomeren,
- (iii) Weitertransport der mobilen Phase in den nächsten theoretischen Boden.

Die Gleichgewichtskonstanten K'_A und K'_B der chromatographischen Verteilungsprozesse unterscheiden sich meist nur geringfügig voneinander, erst die hohe Zahl der sich nacheinander einstellenden Gleichgewichte führt zu einer Trennung der beiden Komponenten A und B.

* Die mathematischen Ableitungen des theoretischen Bodenmodells und des stochastischen Modells sind den Arbeiten von O. Trapp und M. Jung entnommen und werden hier in gekürzter Form wiedergegeben.

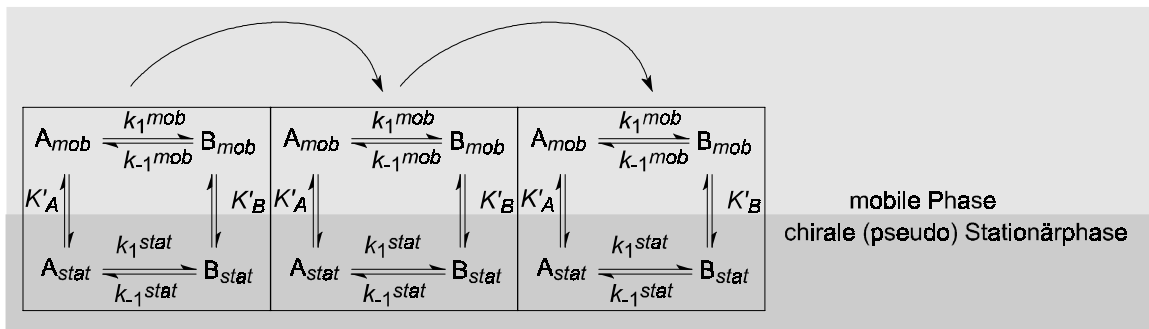


Abbildung 10: Modellvorstellung der Gleichgewichte in aufeinander folgenden chromatographischen theoretischen Böden: A ist das zuerst eluierte Enantiomer, B das später eluierte Enantiomer, k repräsentiert die Geschwindigkeitskonstante und K' ist der Verteilungskoeffizient.

Während der Verweilzeit $\Delta t = t_0 / N$ interkonvertieren die Stereoisomere A und B in den theoretischen Böden. Die *Enantiomerisierung* während der Verweilzeit Δt zwischen den Enantiomeren A und B wird durch die Geschwindigkeitskonstanten in der achiralen mobilen Phase und der CSP bestimmt ($k_1^{stat} \neq k_{-1}^{stat}$).

Für die achirale mobile Phase gilt: $k_1^{mob} = k_{-1}^{mob}$ und somit $K^{mob} = 1$.

In der CSP beziehungsweise der chiralen Pseudostationärphase CPSP ist die Gleichgewichtskonstante aufgrund der chiralen Diskriminierung der Stereoisomere von den Verteilungskoeffizienten K'_A und K'_B gemäß dem Prinzip der mikroskopischen Reversibilität [104] abhängig, und zwar verhalten sich k_1 und k_{-1} gerade reziprok zu den entsprechenden Verteilungskoeffizienten K'_A und K'_B bzw. Retentionsfaktoren k'_A und k'_B :

$$K^{stat} = \frac{K'_B}{K'_A} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{k_1^{stat}}{k_{-1}^{stat}} \quad (8)$$

Aus dieser Gleichung folgt, dass die Geschwindigkeitskonstante für die Rückreaktion k_{-1}^{stat} für gegebene Werte von k_1^{stat} , k'_A und k'_B bereits bestimmt ist. Außerdem weicht k_1^{stat} von k_{-1}^{stat} ab, wenn $K'_B > K'_A$ ist, also wenn die Enantiomere in Gegenwart einer CSP diskriminiert und daher getrennt werden - $\Delta_{B,A}\Delta G \neq 0$. Eine logische Konsequenz des Prinzips der mikroskopischen

Reversibilität ist, dass eine Enantiomerenanreicherung des später eluierten Enantiomers nicht stattfindet.

Die Stoffmenge $[A]$ nach der Enantiomerisierung erhält man aus der integrierten Geschwindigkeitsgleichung einer reversiblen Reaktion 1. Ordnung:

$$[A] = \frac{k_{-1}^{stat} ([A_0] + [B_0])}{k_1^{stat} + k_{-1}^{stat}} + \frac{k_1^{stat} [A_0] - k_{-1}^{stat} [B_0]}{k_1^{stat} + k_{-1}^{stat}} e^{-(k_1^{stat} + k_{-1}^{stat}) \Delta t} \quad (9)$$

Die Stoffmenge $[B]$ berechnet sich aus der Massenbilanz: $[A_0] + [B_0] = [A] + [B]$.

In der dynamischen Chromatographie kann *a priori* nicht zwischen den Geschwindigkeitskonstanten in der mobilen Phase und Stationärphase unterschieden werden. Es werden daher scheinbare Gesamtgeschwindigkeitskonstanten k^{app} bestimmt, die einen Mittelwert zwischen den Geschwindigkeitskonstanten der Enantiomerisierung in der mobilen Phase und CSP darstellen, der durch die Retentionsfaktoren k' gewichtet ist.

$$\begin{aligned} k_1^{app} &= \frac{1}{1 + k'_A} k_1^{mob} + \frac{k'_A}{1 + k'_A} k_1^{stat} \\ k_{-1}^{app} &= \frac{1}{1 + k'_B} k_{-1}^{mob} + \frac{k'_B}{1 + k'_B} k_{-1}^{stat} \end{aligned} \quad (10)$$

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten in der mobilen Phase kann z.B. durch stopped-flow Messungen erreicht werden. Eine Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten in Gegenwart der CSP ist dann möglich [105,106].

3.6.2. Das stochastische Modell

Das stochastische Modell (SM), das von Keller und Giddings sowie von Kramer [48,55] entwickelt wurde, beschreibt das Elutionsprofil einer chromatographischen Trennung unter Verwendung der chromatographischen Parameter (t_0 , t_R^A , t_R^B , N_A und N_B) als zeitabhängige Verteilungsfunktionen $\Phi_i(t)$. Eine Trennung der Prozesse in stationärer und mobiler Phase wird in diesem Modell nicht gemacht. Das Elutionsprofil interkonvertierender Stereoisomere ergibt sich aus der Summe der Verteilungsfunktionen $\Phi_{A'}(t)$ und

$\Phi_{B'}(t)$, der nicht-interkonvertierten Stereoisomere (Stoffmengen A' und B') und den Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen $\Psi_{A''}(t)$ und $\Psi_{B''}(t)$ der interkonvertierten Stereoisomere (Stoffmengen A'' und B'').

$$P(t) = \Phi_{A'}(t) + \Phi_{B'}(t) + \Psi_{A''}(t) + \Psi_{B''}(t) \quad (11)$$

Die Massenbilanzgleichung $A+B=A'+B'+A''+B''$ muss für den kompletten Prozess erfüllt sein.

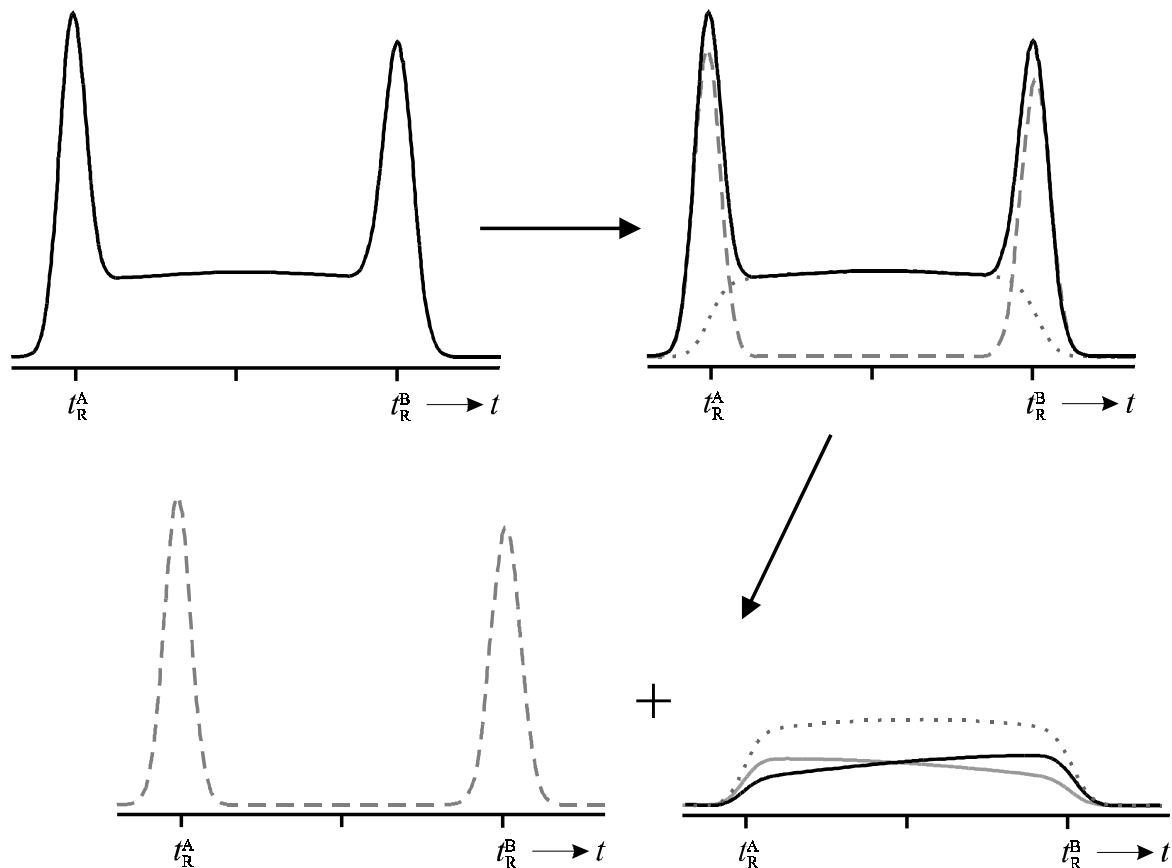


Abbildung 11: Stochastisches Modell: Gauß-Peaks der Enantiomere und Profile der interkonvertierenden Spezies, dargestellt durch eine Gauß modulierte stochastische Verteilungsfunktion.

Zieht man in Betracht, dass die Interkonversion in der mobilen Phase und in der CSP stattfindet, kann direkt Gleichung Gl. (9) für Berechnung der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten der Enantiomerisierung zur Beschreibung der Kinetik herangezogen werden.

Zur Berechnung wird das Konzentrationsprofil in eine Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion überführt, die mit der Bodentheorie und der Lösung der Massenbilanzgleichung für reine Verbindungen übereinstimmt und Phänomene wie Peakverbreiterung und -tailing berücksichtigt. Dazu wird das Konzentrationsprofil in beliebig kleine Intervalle zerlegt. Diese nahezu rechteckigen Profile werden durch Verteilungsfunktionen ersetzt. Hierzu werden die Retentionszeiten t_R^A und t_R^B und die mittlere Bodenzahl N_{AB} ($N_{AB} = (N_A + N_B) / 2$) der beiden nicht-interkonvertierten Peaks verwendet. Durch Integration über alle Verteilungsfunktionen ergibt sich die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $\Psi(t)$ die mit einem Elutionsprofil in der nicht-idealen linearen Chromatographie übereinstimmt.

In der hier vorliegenden Arbeit werden noch weitere, erst kürzlich entwickelte [98] Simulationsmodelle und Funktionen verwendet; daher soll das stochastische Modell plus (SM+) und die Approximationsfunktion (AF) im folgenden kurz vorgestellt werden.

3.6.3. Das stochastische Modell plus

Bei den Elektromigrationsmethoden treten zuweilen große Unterschiede in den Bodenzahlen N_A und N_B auf. Wenn keine Interkonversion stattfindet, lässt sich das Elutionsprofil, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, mit zwei Gauß Funktionen, die unterschiedliche Bodenzahlen berücksichtigen, berechnen. Wird aber das stochastische Modell auf ein Elutionsprofil interkonvertierender Stereoisomere angewandt, so wird bei der Simulation der Peak mit der höheren Bodenzahl (dies kann der erste oder zweite Peak sein) schmaler und der Peak mit der niedrigeren Bodenzahl wird breiter, als im Experiment beobachtet wurde. Dies wird durch die Berechnung der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion mit der mittleren Bodenzahl verursacht.

Das stochastische Modell plus (SM+) berücksichtigt nun die unterschiedlichen Bodenzahlen der beiden Peaks der Stereoisomeren unter der Annahme, dass eine lineare Veränderung der Bodenzahl vom Peak des Stereoisomers A zum Peak

von B vorliegt. Außerdem beachtet das SM+ bei der Simulation auch die zugehörigen Halbwertsbreiten. Der Unterschied zwischen den beiden Modellen (SM und SM+) wird in Abbildung 12 anhand von simulierten Elutionsprofilen gezeigt.

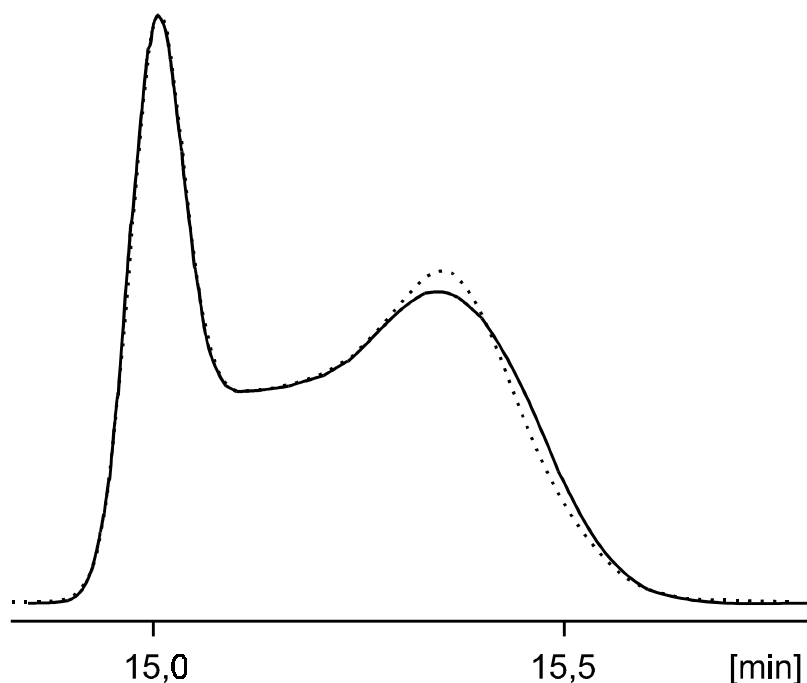


Abbildung 12. Unterschied zwischen dem stochastischen Modell (SM; durchgezogene Linie) und dem stochastischen Modell plus (SM+; gestrichelte Linie);

Eingabeparameter: $t_0 = 1,0$ min, $t_R^A = 15,0$ min, $t_R^B = 15,4$ min, $N_A = 200\ 000$, $N_B = 30\ 000$,

$$k_1^{stat} = 8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}, k_1^{mob} = 8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}.$$

Die Ausgabeparameter der beiden Simulationen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Vergleicht man beide Modelle, so fällt ein signifikanter Unterschied in der Peakbreite (bis zu 22 %) – und infolgedessen eine verringerte Auflösung R_S – auf. Mit diesem modifizierten stochastischen Modell konnte anhand der Auswertung zahlreicher experimenteller Chromatogramme [98] eine wesentlich bessere Übereinstimmung erzielt werden als mit dem nicht-modifizierten.

Tabelle 1: Berechnete Ausgabeparameter der simulierten Chromatogramme aus Abbildung 12.

	SM	SM+
w_h^A	5,54 s	5,62 s
w_h^B	8,57 s	10,49 s
h_A	100,00 %	100,00 %
h_B	48,25 %	48,68 %
$h_{plateau}$	38,77 %	38,82 %
k_{-1}^{stat}	$7,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$7,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
R_S	2,00	1,75

3.6.4. Die Approximationsfunktion

Seit der Ableitung des stochastischen Modells durch Giddings *et al.* [48] wurden viele Versuche unternommen, eine Funktion zu finden, die eine direkte Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten und Aktivierungsbarrieren aus den chromatographischen Parametern eines Elutionsprofils der dynamischen Chromatographie erlaubt, da die Quantifizierung von Barrieren mit den oben beschriebenen Modellen auch auf Großrechnern zeit- und rechenintensiv war. Der Grund für die langen Rechenzeiten liegt zum einen an der Berechnung des Profils selbst und zum anderen an der iterativen Anpassung (4-15 Schritte) der Geschwindigkeitskonstante.

Die kürzlich entwickelte Approximationsfunktion (AF), die eine Berechnung der Aktivierungsparameter direkt aus den experimentellen chromatographischen Daten erlaubt, stellt daher ein sehr nützliches Werkzeug für die Berechnung von Enantiomerisierungsbarrieren dar. Eine Herleitung dieser Funktion ist in [107] detailliert beschrieben. Dort wird gezeigt, dass die Approximationsfunktion eine Berechnung von Enantiomerisierungsbarrieren aus Elutionsprofilen der dynamischen Chromatographie ermöglicht.

Die AF berechnet die Geschwindigkeitskonstante als Funktion chromatographischer Parameter $k_1^{approx} = f(t_R^A, t_R^B, w_h^A, w_h^B, h_{plateau}, N)$:

$$k_1^{approx} = -\frac{1}{t_R^A} \left[\ln \left[\frac{(c_A^0 + c_B^0)}{(t_R^B - t_R^A)} \left(1 - \frac{h_{plateau}}{100} \left(0,5 + \frac{1}{\sqrt{2\pi N}} \right) \right) \right] \right. \\ \left. - \ln \left[\frac{(c_A^0 + c_B^0)}{(t_R^B - t_R^A)} \left(1 - \frac{h_{plateau}}{100} \left(0,5 + \frac{1}{\sqrt{2\pi N}} \right) \right) \right] \right. \\ \left. + c_A^0 \frac{0,01h_{plateau} - e^{-\frac{(t_R^B - t_R^A)^2}{8\sigma_A^2}}}{\sigma_A \sqrt{2\pi}} \right. \\ \left. + c_B^0 \frac{0,01h_{plateau} e^{-\frac{(t_R^A - t_R^B)^2}{2\sigma_B^2}} - e^{-\frac{(t_R^A - t_R^B)^2}{8\sigma_B^2}}}{\sigma_B \sqrt{2\pi}} \right] \quad (12)$$

Für die Ausgangskonzentrationen c_A^0 und c_B^0 können beliebige, aber gleiche Werte (Racemat 1:1) eingesetzt werden. Der maximale Fehler innerhalb der Standardabweichung σ der approximierten Geschwindigkeitskonstante k_1^{approx} gegenüber der simulierten wird in der Literatur [107] mit $\pm 11,7\%$ für k_1^{approx} angegeben. Die Abweichung der Gibbsschen freien Aktivierungsenergie beträgt: $\Delta G^\ddagger = -RT \ln(\pm 11,7\%) = \pm 0,11RT$. Bei einer Temperatur von $T = 298\text{K}$ ist die Abweichung für $\Delta G^\ddagger \pm 0,27 \text{ kJ mol}^{-1}$, verglichen mit dem Wert der Computersimulation.

3.6.5. ChromWin

3.6.5.1. Übersicht

Für die Simulation von Elutionsprofilen in der dynamischen Chromatographie wurde das Software-Paket ChromWin [98] verwendet das auf IBM-kompatiblen Personal Computern unter Windows lauffähig ist. Es verfügt über eine benutzerfreundliche Oberfläche, eine graphische Schnittstelle und komfortablen Funktionen zur automatisierten Simulation von Elutionsprofilen.

Das Hauptprogramm *ChromWin* stellt [98] sämtliche Modelle und Methoden für die Simulation von Elutionsprofilen in der dynamischen Chromatographie und zur graphischen Darstellung zur Verfügung. Um die CPU-Zeit optimal zu

nutzen, besteht die Möglichkeit zur Definition von Stapelverarbeitungsaufgaben und Datensätzen. Der Import experimenteller Daten und der Export simulierter Werte in und aus Tabellenkalkulationsprogrammen erfolgt über das Zusatzprogramm *ChromWin Editor*.

3.6.5.2. Vergleich der Modelle

Restriktionen bzgl. der theoretischen Bodenzahl bestehen bei dem hier verwendeten Programm ChromWin nicht mehr. Verglichen mit älteren Programmen (z.B. SIMUL [52,53]) sind die benötigten Rechenzeiten für die Simulationen drastisch verkürzt (vgl. Tabelle 2*).

Tabelle 2: Vergleich der Rechenzeiten für die Simulation (SM/SM+) bzw. Berechnung (AF) eines Elutionsprofil mit ChromWin. Methode: Enantiomerisierung. Prozessor: Intel Pentium III 600 MHz 128 MByte RAM.

Bodenzahl	5 000	50 000	250 000
Eingabeparameter			
t_0	1 min	3 min	
t_R^A	5 min	15 min	
t_R^B	6 min	16 min	
Berechnete			
Geschwindigkeitskonstante			
k_1^{app} (SM/SM+; TPM)	$5,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
k_1^{approx} (AF)	$4,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$9,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$9,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
Simulations-/Rechenzeit			
TPM	2 min	1 h	6,5 h
SM/ SM+	10 s	9 s	8 s
AF	< 1 ms	< 1 ms	< 1 ms

* Diese Tabelle wurde aus der Dissertation von O. Trapp, Universität Tübingen, 2001 übernommen

Durch die Verwendung von ChromWin wird die Auswertung großer Datenmengen möglich. Dies erlaubt eine statistische Analyse der Messdaten und dadurch eine exaktere Bestimmung der Aktivierungsparameter.

Die gute Übereinstimmung der Simulationsergebnisse des theoretischen Bodenmodells (TPM) und des stochastischen Modells (SM+) ist in Abbildung 13 gezeigt. In Abbildung A wurden beide Chromatogramme mit den mittleren Bodenzahlen berechnet, in Abbildung B wurde für die Simulation mit dem stochastischen Modell (SM+) die effektive Bodenzahl verwendet, aus diesem Grund sind die Chromatogramme nicht völlig deckungsgleich.

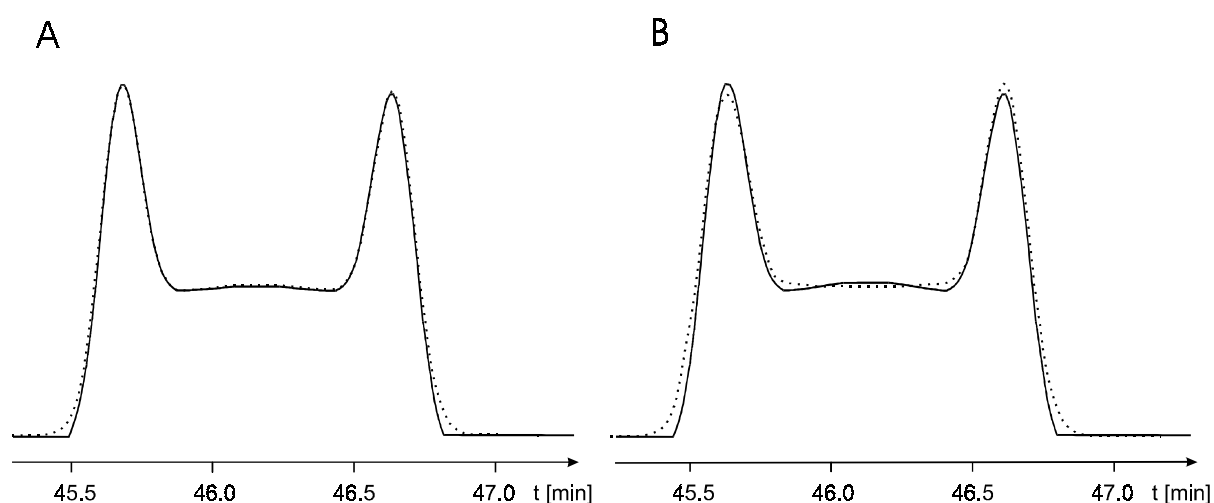


Abbildung 13: Vergleich der simulierten Chromatogramme des theoretischen Bodenmodells (TPM) mit denen des stochastischen Modells (SM+). In Abbildung A wurden die mittleren Bodenzahlen für die Simulation mit den beiden Modellen verwendet. Abbildung B zeigt die simulierten Chromatogramme, die mit der mittleren Bodenzahl für das theoretische Bodenmodell und der effektiven Bodenzahl für das stochastische Modell errechnet wurden. (Daten aus Beispiel 8, Tabelle 9, Oxazepam).

3.6.5.3. Computersimulation

Nach Auswahl des Modells (TPM, SM, SM+) oder der Funktion (AF) sowie der Methode (z.B. Enantiomerisierung, Isomerisierung ...) und der Eingabe der experimentellen Daten, manuell oder durch Import eines Datensatzes von chromatographischen Parametern aus einem Tabellenkalkulationsprogramm (z.B. EXCEL), wird die Computersimulation gestartet. Das Computerprogramm

berechnet dann die Geschwindigkeitskonstante beziehungsweise wiederholt selbstständig die Berechnung, bis das simulierte Chromatogramm zu 99,99% mit den vorgegebenen experimentellen Parametern übereinstimmt. Dazu wird ein im Programm ChromWin zur Verfügung gestellter verbesserter Newtonscher Suchalgorithmus verwendet, wobei als Anfangswert für die Geschwindigkeitskonstante $k_1^{app} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ vorgegeben wird. Ist die Geschwindigkeitskonstante des simulierten Elutionsprofils zu hoch, wird eine kleinere Geschwindigkeitskonstante eingesetzt, ansonsten eine größere. [98,108]. Nach Beendigung der Simulation wird das simulierte Elutionsprofil, die Geschwindigkeitskonstanten k_1^{app} und k_{-1}^{app} bzw. k_1^{approx} und k_{-1}^{approx} , die Peakbreiten auf halber Höhe w_h , die relativen Peakhöhen h , die Peakflächen der einzelnen Stereoisomeren und die Auflösung R_S ausgegeben. Treten aufgrund eines zu geringen Trennfaktors α nur Peaktailing und -fronting anstelle eines deutlichen Plateaus auf, so erkennt das Programm automatisch das Vorliegen einer ungenügenden Trennung oder Interkonversion. Die berechneten Ergebnisse werden schließlich als Textdatei und als Tabelle für die weitere Auswertung (Eyring-Plot) abgespeichert. Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden von ChromWin beschrieben:

- **Enantiomerization** TPM, SM, SM+, AF

Das Elutionsprofil wird bei vorgegebener Geschwindigkeitskonstante berechnet. Diese Methode ist nützlich zum Vergleich von Chromatogrammen.

Eingabeparameter: t_0 , t_R^A , t_R^B , N_A , N_B bzw. w_h^A , w_h^B , c_A^0 , c_B^0 , k_1^{stat} , k_1^{mob} .

- **Find enantiomerization barrier I** TPM, SM, SM+

Geschwindigkeitskonstanten k_1^{stat} und k_1^{mob} und das Elutionsprofil werden nach dem verbesserten Newton-Algorithmus berechnet.

Eingabeparameter: t_0 , t_R^A , t_R^B , N_A , N_B bzw. w_h^A , w_h^B , c_A^0 , c_B^0 , $h_{plateau}$.

- ***Find enantiomerization barrier II*** SM+

Wie *Find enantiomerization barrier I*, jedoch werden zusätzlich die Bodenzahlen der Enantiomere (bis auf 50 Böden) variiert, um die beste Anpassung der Peakbreiten zu finden.

- ***Isomerization*** TPM, SM, SM+

Elutionsprofile von Isomerisierungen, Epimerisierungen und Diastereomerisierungen können simuliert werden (reversible Reaktionen 1. Ordnung).

Eingabeparameter: t_0 , t_R^A , t_R^B , N_A , N_B bzw. w_h^A , w_h^B , c_A^0 , c_B^0 , $h_{plateau}$, sowie die Gleichgewichtskonstanten, die als Anpassungsfaktoren für die Geschwindigkeitskonstanten dienen.

- ***Find isomerization barrier I*** TPM, SM, SM+

Analog der Methode für Enantiomerisierungen werden die Geschwindigkeitskonstanten einer Isomerisierung berechnet.

- ***Find isomerization barrier II*** SM+

Zusätzlich zu *Find isomerization barrier I* werden noch die Bodenzahlen bei der Suche der Isomerisierungsbarriere variiert.

- ***Enhanced-flow*** TPM

Diese Methode erlaubt die Simulation von Enantiomerisierungen unter Änderung chromatographischer Parameter während des Trennprozesses. Es können sowohl Elutionszeiten (Druckveränderung, Spannungsänderung) als auch Geschwindigkeitskonstanten variiert werden.

ChromWin erlaubt die Addition und Subtraktion sowie das Übereinanderlegen von Chromatogrammen. Dies erlaubt einen direkten visuellen Vergleich unterschiedlicher Chromatogramme und Simulationsmethoden. Außer den hier beschriebenen Methoden stehen noch weitere Module zur Verfügung, auf die hier aber nicht näher eingegangen werden soll.

4. Kapillarelektromigrationsmethoden

4.1. Historische Entwicklung der Elektrophorese und der elektrokinetischen Chromatographie

Die Entwicklung der Kapillarelektrophorese begann vor 20 Jahren, dennoch hat sich die Methode in dieser relativ kurzen Zeit erstaunlich schnell weiter entwickelt. Kapillarelektrophorese wie wir sie heute kennen, wurde 1981 erstmals von Jorgenson und Lukacs beschrieben [109]. Sie verwendeten eine 75 µm Pyrex Kapillare und 30 kV Spannung zur Trennung derivatisierter Amine, Peptide und Aminosäuren.

Die Tatsache, dass geladene Teilchen in Lösung durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Ladung und Größe getrennt werden, ist schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt und wurde zur Trennung beziehungsweise Fraktionierung kolloidaler Gemische angewandt. Die theoretischen Grundlagen zur Beschreibung solcher Phänomene wurde 1897 von Kohlrausch in einer Publikation „Ueber Concentrations-Verschiebungen im Innern von Lösungen und Lösungsgemischen“ abgehandelt [110].

In den darauf folgenden Jahren wurde die Elektrophorese von Tiselius [111], Doyle [112] und Langworth [113], um nur einige zu nennen, stetig weiterentwickelt. Elektrophorese wurde in dieser Zeit jedoch weniger zur Trennung, als vielmehr zur Charakterisierung von Partikeln wie beispielsweise Kolloiden oder Proteinen verwendet, jedoch wurde das Potential bereits von Tiselius erkannt [114]. Die Verwendung als Trennmethode scheiterte zunächst an der durch die Joulesche Wärme verursachte Konvektion in der Analytlösung, die die Effizienz der Trennung drastisch verschlechterte. Aus diesem Grund wurde zuerst Papier, später Gele aus Polyacrylamid oder Agarose verwendet. Nachteil dieser klassischen* Methoden, die z.B. in der Medizin und Biochemie auch heute noch verwendet werden, sind die langen Analysenzeiten. Diese

* Der Begriff „klassisch“ wird hier verwendet, um von den Kapillarmethoden zu unterscheiden. Er soll nicht andeuten, dass diese Methoden nicht länger von Interesse sind oder nicht mehr weiterentwickelt werden.

kommen durch die niedrigen Spannungen zustande, die angewandt werden müssen, um ein Überhitzen des Gels zu verhindern. Die aufwendige Herstellung der Gele und die teilweise schwierige Quantifizierung über Densitometer machen die Methode zeit- und arbeitsintensiv.

Zonenelektrophorese in Lösung wurde schließlich 1967 von Hjertén beschrieben [115]. Er führte elektrophoretische Trennungen in mit Methylcellulose belegten Quarzkapillaren von 1-3 cm Innendurchmesser durch. Konvektion wurde durch Rotation dieser „Trennkammer“ um ihre Längsachse reduziert.

1976 wurde ein anderer Ansatz von Everaerts verfolgt [116]. Nachdem Virtanen 1974 [117] die Vorteile sehr dünner Kapillaren (0,2-0,5 mm) für die Trenneffizienz gezeigt hatte, verwendete Everaerts dünne Teflonschläuche zur Durchführung der Isotachophorese. Der Vorteil der Verwendung von PTFE Schläuchen liegt in der Unterdrückung der Elektroosmose. Nachteilig ist allerdings die schwierige Detektion, die nur über wenig sensitive Leitfähigkeitsdetektoren möglich war.

Diese Entwicklung zeigt, dass das Prinzip der Elektrophorese lange Zeit bekannt war. Zwei Hauptprobleme – die geringe Sensitivität der Detektionssysteme für Kapillaren und die Elektroosmose – verhinderten jedoch eine breite Anwendung. Jorgenson [109,118] stellte eine Lösung für diese Probleme vor. Er benutzte einen on-column Fluoreszenzdetektor zur Steigerung der Empfindlichkeit, und versuchte nicht länger die Elektroosmose zu unterdrücken, sondern nutzte stattdessen das pfropfenförmige Strömungsprofil, das in Fused-Silica-Kapillaren entsteht, um die Analyten ohne Dispersionseffekte durch die Kapillare zu bewegen. Seine Arbeiten waren zur damaligen Zeit aus vielerlei Hinsicht bedeutsam. Zum einen überraschten die schmalen Peaks, die im Vergleich zur HPLC viel größere Bodenzahlen auf gleicher Trennstrecke erlaubten und zum anderen war die Methode, im Vergleich zur klassischen Elektrophorese, viel schneller.

Diese Erkenntnisse machten Elektrophorese für viele Arbeitsgruppen zum attraktiven Forschungsgebiet, und so entstanden schnell neue Kapillarelektromigrationsmethoden. Wichtige Meilensteine dieser Entwicklung sind hier aufgelistet:

- MEKC Terabe *et al.* 1984 [119]
- CIEF Hjerten *et al.* 1985 [120]
- CE-MS Kopplung Smith *et al.* 1987 [121]
- CEC Knox, Grant, Smith, Evans [122, 123]

Die zahlreichen Elektromigrationsmethoden, die heute zur Verfügung stehen, können in kapillarelektrophoretische Methoden und elektrochromatographische Methoden differenziert werden. Trennmechanismen und Beispiele hierfür sind in Abbildung 14 gegeben.

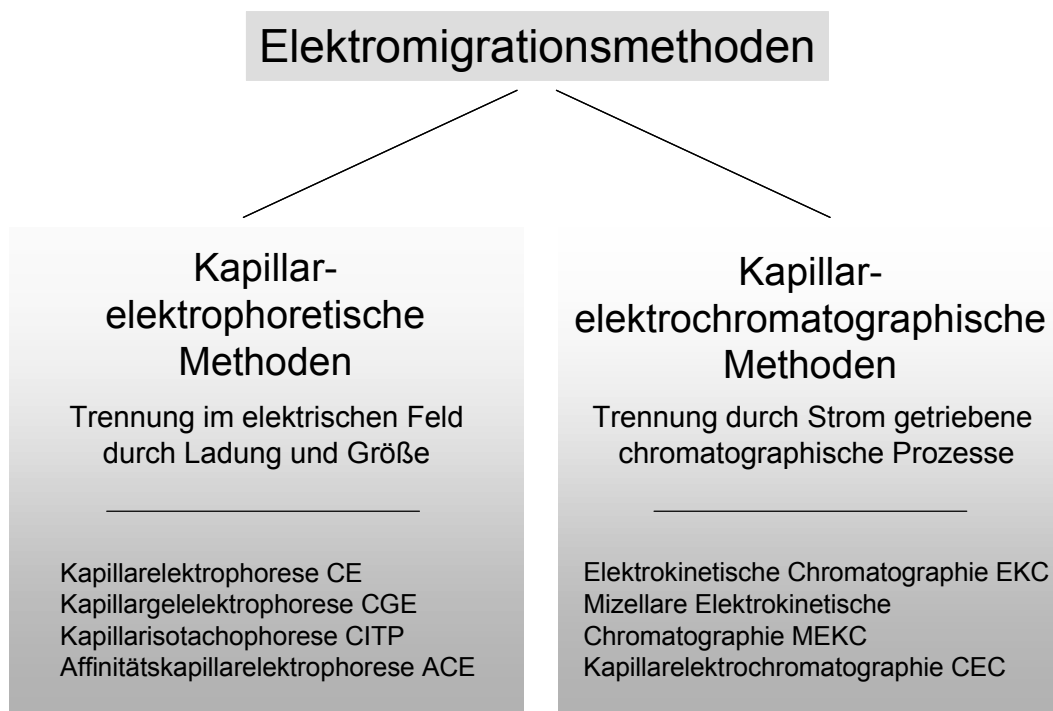


Abbildung 14: Klassifizierung der Trennverfahren [124].

4.2. Theoretische Grundlagen

4.2.1. Allgemeines

Die Trennung durch Elektrophorese erfolgt aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten von Molekülen in einem elektrischen Feld. Für einen elektrophoretischen Trennprozess werden Gleichspannung und ein Puffersystem für die elektrolytische Leitfähigkeit benötigt. In der Kapillare sind Konvektion und freier Fluss auf ein Minimum beschränkt. Typische Parameter sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Typische Parameter der CE

Länge der Kapillare	20 – 150 cm
Innendurchmesser der Kapillare	20 – 75 μm
Volumen der Kapillare	0,4 – 6,6 μl
Angelegte Spannung	0 – +/-30 kV
Stromstärke	0 – +/-200 μA
Elektrische Feldstärke	100 – 500 V/cm
Wärmeentwicklung	0,1 – 10 W
Probenvolumen	0,03 – 15 nL
Proben-Pfropfen Länge	0,06 – 3,5 mm
Probenkonzentration	~0,1 – 1,0 mg/ml
pH-Wert	2 – 12

Bei einer durchschnittlichen molaren Masse von $200 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und einem Injektionsvolumen von 1 nl mit einer Probenkonzentration von 0,1 mg/ml werden somit $5\cdot 10^{-13} \text{ mol}$ (0,5 pmol) Probe injiziert!

Die Messanordnung der Elektrophorese besteht aus einer Trennkapillare (meist Fused-Silica) deren beide Enden zusammen mit der Elektrode in den Elektrolytbehälter tauchen, einem Injektor (meist an der Anode) und einem Detektor, der nach der Signalaufbereitung die Daten an ein Datenakquisitionssystem sendet. Die Elektroden sind mit einem Hochspannungsgerät zur Erzeugung eines Potentials zwischen den beiden Säulenenden verbunden.

In den nun folgenden Abschnitten werden die Grundlagen einer elektrophoretischen Trennung am Beispiel der Kapillarelektrophorese vorgestellt. Unterschiede und Besonderheiten anderer Elektromigrationsmethoden werden in Abschnitt 4.3 erwähnt.

4.2.2. Physikalische Grundlagen

4.2.2.1. Elektrophorese und Elektroosmose

Man unterscheidet in der Elektrophorese zwischen zwei Transportphänomenen, der *Elektrophorese* und der *Elektroosmose*.

Das *elektrophoretische Trennprinzip* beruht auf der unterschiedlichen Migration von Ionen verschiedener Ladung und Größe in einem elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit v_{ep} eines Ions lässt sich nach dem Stokesschen Gesetz berechnen:

$$v_{ep} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r_I} \cdot E = \mu_{ep} \cdot E \quad (13)$$

Für die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} erhält man somit:

$$\mu_{ep} = \frac{z \cdot e}{6\pi \cdot \eta \cdot r_I} \quad (14)$$

Dabei ist z die Ladung eines Ions, e ist die Elementarladung ($1,6022 \cdot 10^{-19}$ C), η die Viskosität, r_I der Ionenradius, μ_{ep} die elektrophoretische Mobilität und E die elektrische Feldstärke.

Die elektrische Feldstärke E berechnet sich aus:

$$E = \frac{U}{L} \quad (15)$$

Hier ist U die angelegte Spannung und L die Gesamtlänge der Kapillare.

Ein Ion der Ladung $z \cdot e$ erfährt im elektrischen Feld E eine in Richtung der Elektroden gerichtete Kraft, der sich die Reibungskraft der umgebenden Lösung entgegenstellt. Ionen unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten μ wandern bei konstantem elektrischen Feld E und konstanter Viskosität η des Puffers somit mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Kleine, hochgeladene Teilchen besitzen dabei eine hohe Mobilität; große, wenig geladene Teilchen dagegen eine geringe Mobilität.

Der *elektroosmotische Fluss* (EOF) (auch elektroendoosmotischer Fluss) wird durch die Ladungen der Kapillarwand verursacht. Er ist eine Besonderheit der Kapillarelektrophorese und wird bei klassischen Elektrophoresemethoden nicht beobachtet. Seine Entstehung ist in Abbildung 15 schematisch aufgezeigt.

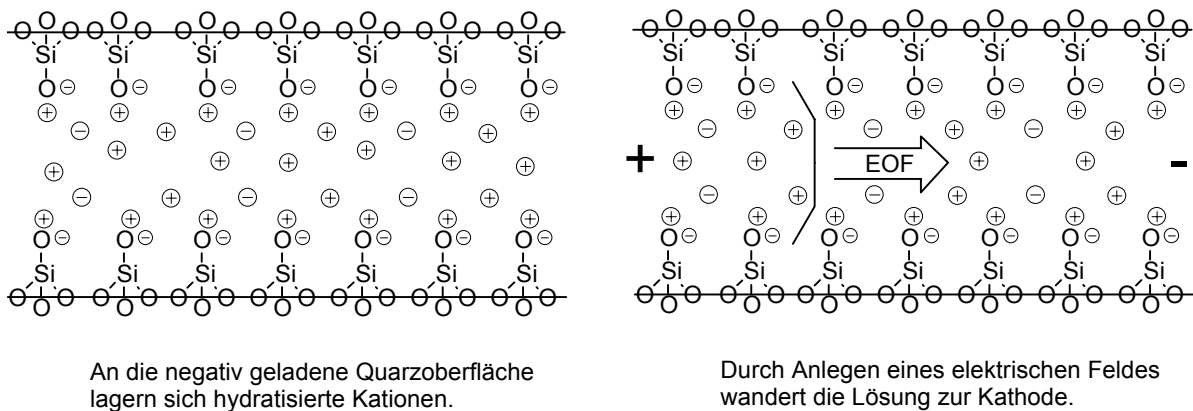


Abbildung 15: Entstehung des elektroosmotischen Flusses (EOF).

In wässriger Lösung besitzen Quarzkapillaren einen Überschuss an negativer Ladung, die durch Ionisation der Oberfläche durch ein Säure-Basen-Gleichgewicht und/oder Adsorption ionischer Teilchen an der Oberfläche resultiert. Im Falle von Fused-Silica-Kapillaren oder Kieselgelen lädt sich deren Oberfläche bei einem pH größer 2,2 durch Deprotonierung der Silanolgruppen negativ auf. Gegenionen, die sich in der Nähe der Kapillarwand aufhalten, um ein Ladungsgleichgewicht auszubilden, bilden eine Doppelschicht aus und

verursachen so eine Potentialdifferenz (Zeta Potential ζ) in der Nähe der Kapillarwand. Wird nun eine Spannung angelegt, so wandern die Kationen der diffusen Doppelschicht in Richtung Kathode. Durch ihre Solvathülle verursachen Sie einen Fluss der gesamten Elektrolyt-Lösung in diese Richtung. Im Gegensatz zu einer druckgetriebenen Strömung in einer Kapillare gilt hier das Hagen-Poiseuillesche Gesetz nicht. Es gibt kein Druckgefälle innerhalb der Kapillare, da die treibende Kraft gleichmäßig über den Querschnitt der Kapillare verteilt ist. Daher entsteht ein extrem flaches Strömungsprofil, das die Dispersion vermindert und schließlich zu einer sehr geringen Bandenverbreiterung führt.

Die Geschwindigkeit des EOF v_{eo} kann wie folgt berechnet werden:

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} E \quad (16)$$

Für die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} gilt:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (17)$$

Wobei ε die Dielektrizitätskonstante, ζ das Zeta Potential, η die Viskosität und E die elektrische Feldstärke darstellen.

Das Zeta Potential wird hauptsächlich über die Oberflächenladung auf der Kapillarinnenwand bestimmt. Da diese Ladung sehr stark pH abhängig ist, ändert sich auch die Stärke des EOFs mit dem pH-Wert. Bei hohen pH-Werten, bei denen beinahe alle Silanolgruppen deprotoniert sind, ist der EOF bedeutend stärker als bei einem sehr niedrigem pH-Wert. Das Zeta Potential ist auch von der Ionenstärke der verwendeten Elektrolytlösung abhängig, da eine höhere Ionenstärke zu einer Kompression der elektrischen Doppelschicht führt. Das Zeta Potential, und damit auch der EOF, werden durch die weniger stark ausgeprägte Doppelschicht erniedrigt.

Ein starker EOF hat zur Folge, dass außer Kationen auch neutrale Moleküle und sogar Anionen an der Kathode detektiert werden können. Dabei wandern Kationen schneller als der EOF und werden getrennt, Neutralteilchen wandern

mit der Geschwindigkeit des EOF, werden aber nicht getrennt. Anionen wandern langsamer als der EOF, da sie einerseits von der Anode angezogen, andererseits mit dem EOF Richtung Kathode transportiert werden; sie können nur dann an der Kathodenseite detektiert werden, wenn ihre elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit langsamer ist als die des EOFs. In diesem Fall können auch sie getrennt werden.

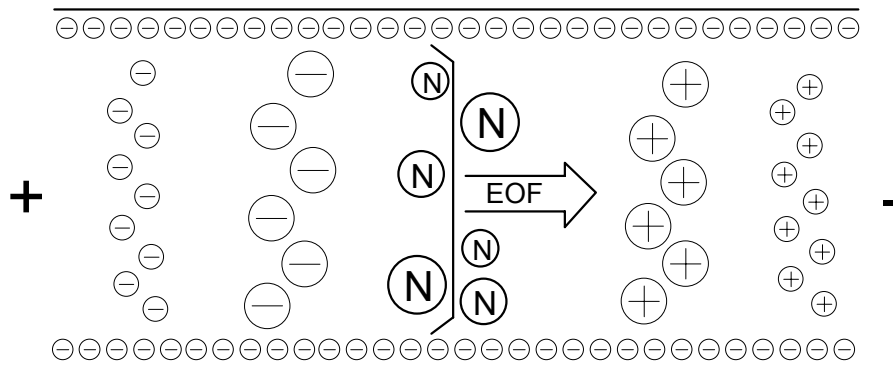


Abbildung 16: Überlagerung von elektrophoretischer und elektroosmotischer Wanderung.

Die resultierende Gesamtgeschwindigkeit eines Teilchens ergibt sich aus der Summe von elektrophoretischer Beweglichkeit und elektroosmotischem Fluss. Durch Beschichtung der Kapillarenwand mit einem geeigneten Polymer lässt sich die Elektroosmose unterdrücken oder durch Beschichtung mit einem positiv geladenen Polymer sogar umkehren.

Die Nettoladung eines Moleküls wird durch den isoelektrischen Punkt (pI) sowie den pH-Wert der verwendeten Elektrolytlösung bestimmt. Bei pH-Werten unterhalb des isoelektrischen Punktes besitzt ein Analyt eine positive Ladung und wandert schneller als der EOF in Richtung Kathode. Oberhalb des pI ist es umgekehrt; dabei ist zu beachten, dass wie bereits oben beschrieben, der EOF stark pH abhängig ist, welches eine erneute Optimierung der Trennung bei einem Wechsel des pH-Wertes erfordert.

4.2.2.2. Analytische Parameter zur Beschreibung elektrophoretischer und elektrochromatographischer Experimente

Die Zeit, die ein Analyt braucht, um zum Detektor zu wandern, wird als Migrationszeit t_R bezeichnet. Sie ergibt sich aus dem Quotienten der gewanderten Strecke und der Geschwindigkeit. Mit Hilfe der Migrationszeit kann die scheinbare Mobilität (in Anwesenheit des EOF) berechnet werden:

$$\mu_a = \frac{l}{t_R E} = \frac{lL}{t_R U} \quad (18)$$

Dabei ist l die effektive Länge der Kapillare (bis zum Detektor), L die Gesamtlänge, U die angelegte Spannung, t_R die Migrationszeit und E das angelegte elektrische Feld.

Zur Bestimmung der effektiven Mobilität μ_e (ohne den Anteil des EOF) muss die Mobilität des EOFs μ_{EOF} mit einem neutralen Marker, häufig Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid oder Aceton, bestimmt werden. Die effektive Mobilität μ_e erhält man dann nach folgender Beziehung:

$$\mu_e = \mu_a - \mu_{EOF} \quad (19)$$

Eine elektrophoretische Trennung ist abhängig von der Differenz der Mobilitäten der zu trennenden Analyte. Ob die Signale jedoch aufgelöst werden können, hängt entscheidend von der Effizienz der Trennung ab, die wiederum durch die Anzahl der theoretischen Böden N ausgedrückt wird. Experimentell kann N aus den Daten eines Elektropherogramms wie folgt ermittelt werden:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (20)$$

mit w_h als der Peakbreite auf halber Höhe.

Die theoretische Bodenzahl N ist stark vom Diffusionskoeffizienten D abhängig und kann auch wie folgt berechnet werden:

$$N = \frac{\mu_e U l}{2DL} = \frac{\mu_e E l}{2D} \quad (21)$$

Aus dieser Gleichung ist auch sofort ersichtlich, warum bei den Elektromigrationsmethoden sehr hohe Spannungen verwendet werden. Der Analyt verbringt bei höherer Spannung weniger Zeit in der Kapillare und hat damit weniger Zeit zur Diffusion. Außerdem zeigt diese Gleichung noch, dass große Moleküle wie Proteine, die meist sehr kleine Diffusionskoeffizienten besitzen weniger dispergieren und daher schmalere Peakbreiten aufweisen. Nachteil bei hohen Spannungen ist die größere Konvektion, welche durch die Joulesche Wärme verursacht wird. Abhängig von den jeweiligen Werten von D , μ und U können Bodenzahlen bis zu einer Million pro Meter in einer $50\mu\text{m}$ Kapillare erreicht werden.

Große Leitfähigkeitsunterschiede der Analytlösung und der umgebenden Pufferlösung führen zu elektrophoretischer Dispersion und damit zu Peaktailing oder Peakfronting. Besitzt beispielsweise ein kationischer Analyt eine höhere Leitfähigkeit als die ihn umgebende Pufferlösung (kathodengerichteter EOF), so wird der vordere und hintere Teil der Analytzone, der in den Puffer diffundiert, einen Spannungsanstieg erfahren (Gleichung 17), da dort eine größere elektrische Feldstärke beziehungsweise eine höherer Leitfähigkeit herrscht als in der Analytzone; Die Geschwindigkeit der Probe wird sich erhöhen. Befindet sich die Probe in der Pufferzone am hinteren Teil des Analyten, wird sie beschleunigt, bis sie sich wieder in der Analytzone befindet. Die Probe die sich in der Pufferzone unmittelbar vor der Analytzone befindet, wird ebenfalls beschleunigt und entfernt sich so von der Analytzone; der resultierende Analytpeak zeigt Fronting. Im umgekehrten Fall eines kationischen Analyten mit geringerer Leitfähigkeit als die ihn umgebende Pufferlösung entsteht entsprechend ein Peaktailing.

Die Durchflusszeit t_0 ist bei den Elektromigrationsmethoden definiert als die Zeit, die ein ungeladener Analyt braucht, um zum Detektor zu wandern. Dieser Wert ist in gewisser Hinsicht jedoch problematisch, da in einigen Fällen die Migrationszeiten t_R geladener Analyten schneller als die Durchflusszeit sein können. Mit Hilfe der Durchflusszeit und der Migrationszeit eines Analyten lässt sich der Migrations- bzw. Retentionsfaktor k' berechnen:

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o} \quad (22)$$

Beim Vorhandensein einer pseudo-stationären Phase erweitert sich (22) zu:

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o \left(1 - \frac{t_R}{t_M}\right)} \quad (23)$$

wobei t_M die Wanderungsgeschwindigkeit der Mizelle darstellt. Wie man sofort erkennt, ist Gleichung (23) für sehr große t_M identisch mit Gleichung (22).

Den Trennfaktor α lässt sich aus dem Verhältnis der Retentionsfaktoren oder auch aus dem Verhältnis der elektrophoretischen Mobilitäten berechnen:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{\mu_{ep,A}}{\mu_{ep,B}} \quad (24)$$

Die Auflösung R_S zweier Probenkomponenten wird in der Chromatographie allgemein definiert als:

$$R_S = 1,177 \frac{t_R^B - t_R^A}{w_h^A + w_h^B} \quad (25)$$

Gleichung (25) beschreibt die Effizienz eines Trennprozesses durch die Differenz der Migrationszeiten sowie der Dispersion als dazu gegenläufigen Prozess. Bei den Elektromigrationsmethoden wird die Trennung im Gegensatz zu den anderen chromatographischen Methoden hauptsächlich durch die Effizienz und weniger durch die Selektivität bestimmt. Dies wird beispielsweise dadurch deutlich, dass bei den Elektromigrationsmethoden Trennfaktoren von $\alpha = 1,01$ bei hohen Bodenzahlen häufig für eine Basislinientrennung ausreichen. Durch einsetzen von Gleichung (18) - (21) in Gleichung (25) kann man die Auflösung auch durch die Bodenzahl und die unterschiedlichen effektiven Mobilitäten beschreiben:

$$R_S = 0,5\sqrt{N} \frac{\mu_A - \mu_B}{\mu_B + \mu_A} \quad (26)$$

4.2.2.3. Joulesche Wärme

Vorteil von Kapillaren mit kleinem Innendurchmesser ist der große elektrische Widerstand. Dieser lässt selbst bei hohen Spannungen nur sehr kleine Ströme im Bereich von einigen μA zu. Die Leistung, die über die Trennkapillare abfällt, liegt damit im Bereich von wenigen Watt, und die Wärmeentwicklung (Joulesche Wärme) ist um ein Vielfaches kleiner als bei den übrigen elektro-phoretischen Trennverfahren. Dies führt zu einer Verminderung der konvektiven Rückmischung der getrennten Probezonen und zu einer Verbesserung der Trennleistung. Die Leistung P kann über die Beziehung

$$P = U \cdot I = R \cdot I^2 \quad (27)$$

berechnet werden. Wobei U die angelegte Spannung und I die Stromstärke ist.

Trotz dieser relativ geringen Wärmeentwicklung im Innern der Kapillare kann die Qualität und die Reproduzierbarkeit der Trennung durch die Joulesche Wärme in drastischer Weise beeinflusst werden. Eine effiziente Temperaturkontrolle ist daher bei den Elektromigrationsmethoden unbedingt erforderlich. Eine Verringerung der Wärmeentwicklung kann aber auch durch die Verwendung von Puffern mit geringer Ionenstärke oder Konzentration sowie durch kleine Kapillardurchmesser oder niedrige Spannung erreicht werden. Alle diese Maßnahmen vermindern die Joulesche Wärme jedoch nur unter Inkaufnahme längerer Migrationszeiten, stärkerer Peakverbreiterung, Verringerung der Sensitivität und schlechterer Auflösung.

Tabelle 4: Möglichkeiten und Effekte zur Reduktion der Jouleschen Wärme

Aktion	Wirkung
Niedrigere Spannung	<ul style="list-style-type: none"> • Längere Migrationszeiten • Höhere Peakbreiten
Kleinerer Kapillardurchmesser	<ul style="list-style-type: none"> • Geringere Sensitivität • Niedrigere Stromstärke ($I \sim r^2$)
Geringere Ionenstärke	<ul style="list-style-type: none"> • Schnellerer EOF • Verringerte Auflösung

Eine wirksamere Methode die Effekte der Jouleschen Erwärmung zu vermindern, ist daher die Verwendung eines effektiven Kühlsystems. Die Effizienz verschiedener Kühlsysteme ist in Abbildung 15 gezeigt.

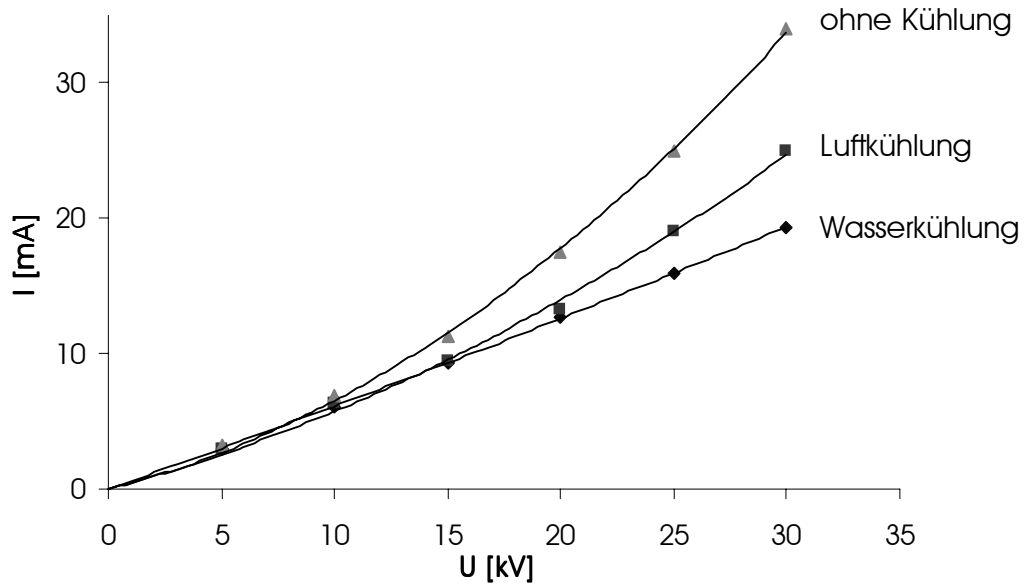


Abbildung 17: Ohm Plot für unterschiedlicher Thermostatisiermethoden.

4.3. Elektromigrationsmethoden und ihre Anwendung für dynamische Untersuchungen

4.3.1. Allgemeines

Die zur Simulation von dynamischen Elutionsprofilen verwendeten Modelle (SM, TPM) wurden bislang ausschließlich auf Systeme angewandt, bei denen die Trennung durch Verteilung der Analyten zwischen einer mobilen und einer stationären Phase erfolgt. Das theoretische Bodenmodell wurde explizit unter der Voraussetzung des Vorliegens einer verteilungschromatographischen Trennung hergeleitet wie sie z.B. bei der GC, SFC, HPLC oder CEC auftritt. Im Gegensatz dazu ist die Herleitung des stochastischen Modells weiter gefasst und berücksichtigt lediglich die Effizienz eines Trennsystems. Ein Vergleich der mit dem TPM und dem SM erhaltenen simulierten Chromatogramme, wie sie beispielsweise in Abbildung 13 gezeigt sind, zeigt die sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Computersimulationen der beiden Modelle. Ein Vergleich der in dieser Arbeit bestimmten Enantiomerisierungs- und Isomerisierungsbarrieren mit Daten aus unabhängigen Studien, wie er in den Kapiteln 5, 6 und 7 gegeben wird, demonstriert die gute Anwendbarkeit beider Simulationsmodelle auf elektrochromatographische und elektrophoretische Trennprozesse mit nur einer Phase. Eine praktische Erklärung für die Verwendbarkeit der für Zwei-Phasen-Systeme abgeleiteten Modelle ist beispielsweise die Existenz einer pseudo-stationären Phase, die als Interphase innerhalb des Ein-Phasen-Systems [125] dient und daher vergleichbar einer stationären Phase in einer „gewöhnlichen“ verteilungschromatographischen Trennung ist.

Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Methoden (CE, EKC und MEKC) vorgestellt, und anschließend die Anwendung der beiden Simulationsmodelle (TPM, SM) theoretisch begründet. Bei einer theoretischen Betrachtung muss grundsätzlich zwischen elektrophoretischer (CE) und elektrochromatographischer Trennung, in dieser Arbeit elektrokinetischer chromatographischer Trennung (EKC, MEKC) unterschieden werden.

4.3.2. Kapillarelektrophorese

Bei der kapillarelektrophoretischen Trennung in einer Elektrolytlösung ohne Zugabe eines Selektors erfolgt eine Separation der Analyten aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung und Größe. Die elektroosmotische Wanderungsgeschwindigkeit v_{eo} wird von der Art und dem pH-Wert der verwendeten Pufferlösung sowie den spezifischen Wandeigenschaften der Kapillare bestimmt, und ist somit innerhalb eines gegebenen Systems für alle Teilchen, unabhängig von ihrer Ladung oder Größe, gleich. Die Trennung der Teilchen erfolgt, wie in Abbildung 16 gezeigt, aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} .

4.3.3. Kapillarelektrokinetische Chromatographie

Bei den elektrokinetischen chromatographischen Methoden muss außer der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit einzelner Teilchen im elektrischen Feld auch noch die Wechselwirkung mit dem Selektor berücksichtigt werden.

Bei der MEKC wird ein geladenes Tensid der Pufferlösung zugemischt. Die Konzentration dieses Tensids muss über der kritischen Mizellkonzentration (CMC) liegen, damit sich eine mizellare Phase ausbildet. Neutrale oder geladene Verbindungen werden zwischen der durch den EOF bewegten wässrigen Phase (Puffer) und dem hydrophoben inneren der Mizellen (pseudo-stationäre Phase) verteilt, und wandern so mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Die pseudo-stationäre Phase bewegt sich in den meisten Fällen in die gleiche Richtung wie der EOF; aufgrund der Größe der Mizellen und ihrer meist entgegengesetzten (negativen) Ladung bewegt sich diese Phase jedoch deutlich langsamer. Die Analytmoleküle werden mit unterschiedlicher Geschwindigkeit eluiert – diese liegt zwischen der des EOFs und der der mizellaren Phase. Eine schematische Darstellung der MEKC findet sich in Abbildung 18.

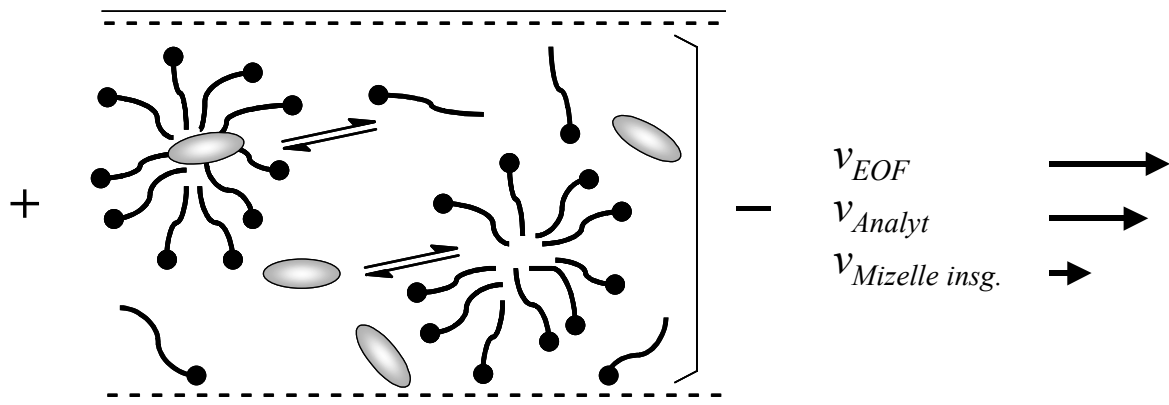


Abbildung 18: Prinzip der MEKC (links) und die Geschwindigkeitsvektoren des EOF, der pseudo-stationären Phase sowie der Analyten (rechts).

Das Prinzip der EKC (früher auch Kapillarzonenelektrophorese; CZE) ist ähnlich dem der MEKC, jedoch werden anstelle der Mizellen geladene beziehungsweise Mischungen aus geladenen und ungeladenen, meist supra-molekularen Selektoren verwendet (z.B. Cyclodextrine, Maltodextrine, Calixarene, Kronenether...). Die Verteilung der Analyten erfolgt dann zwischen den Selektormolekülen und der Pufferlösung, die sich beide mit unterschiedlicher Geschwindigkeit bewegen. In Abbildung 19 ist dieses Prinzip schematisch dargestellt.

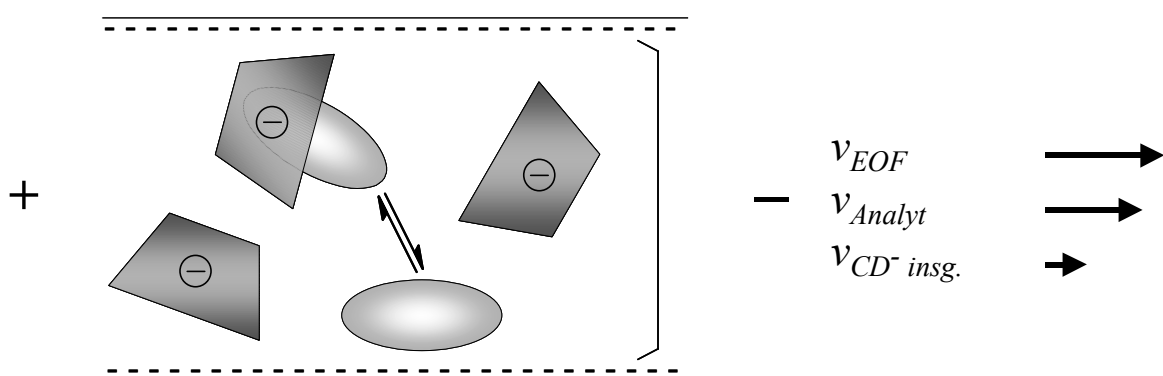


Abbildung 19: Prinzip der EKC mit negativ geladenen Cyclodextrinen als chirale Selektoren und die Geschwindigkeitsvektoren des EOF, der Selektoren sowie der Analyten.

4.3.4. Anwendbarkeit des stochastischen Modells

Das von Giddings *et al.* abgeleitete stochastische Modell beschreibt das Ergebnis eines Trennprozesses als eine statistische Konzentrationsverteilung der beiden interkonvertierenden Analyten und ist damit unabhängig von der Natur des Trennmechanismus – chromatographisch oder elektrophoretisch. Damit lässt sich das stochastische Modell auch auf Einphasensysteme anwenden. Bereits 1969 führte Giddings die Begriffe *theoretischer Boden*, *Auflösung* und *Peakkapazität* für die Elektromigrationsmethoden ein [126]. Diese Begriffe erlauben den Vergleich der Elektromigrationsmethoden wie beispielsweise Kapillarelektrophorese, Kapillargelelektrophorese oder isoelektrisches Fokussieren untereinander [127]. Auf den ersten Blick erscheint es jedoch widersprüchlich Bodenzahlen in einem stochastischen Verteilungsmodell anzuwenden, aber die hier verwendeten Bodenzahlen charakterisieren die Aneinanderreihung von Verteilungsschritten, bei denen das Verteilungsgleichgewicht, beschrieben durch die Verteilungskoeffizienten K' , aufgrund des kontinuierlichen Massentransportes durch die mobile Phase in senkrechter Richtung nicht vollständig erreicht wird [128].

Die Bestimmung der Durchflusszeit, die die wechselwirkungsfreie Reaktionszeit des Analyten beschreibt, gestaltet sich bei den Elektromigrationsmethoden wesentlich schwieriger als bei den chromatographischen Methoden wie HPLC und GC. Dies liegt zum einen an den vielfältigen Wechselwirkungsmöglichkeiten des als EOF-Marker verwendeter Substanzen mit den Selektor-Additiven, und zum anderen kann bei der Bestimmung geladener Substanzen der Fall eintreten, dass die Migrationszeit des neutralen EOF Markers deutlich langsamer ist als die Migrationszeit der Analyten. In diesem Fall würden bei der Berechnung der Nettoretentionszeiten negative Werte erhalten werden. Um dies zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit, in Fällen in denen eine Bestimmung der Durchflusszeit als wenig sinnvoll erachtet wurde, für die Computersimulation eine Durchflusszeit von 1 Minute angenommen. Eine Simulation der Variation der Durchflusszeit zeigt zwar eine deutliche Abhängigkeit von t_0 von der Bodenzahl N (Abbildung 20), jedoch hat

diese Variation praktisch keinen Einfluss auf die Höhe der ermittelten Interkonversionsbarriere. Ein Beispiel hierfür ist in Tabelle 5 gegeben.

Tabelle 5: Einfluss der Variation der Durchflusszeit auf die Geschwindigkeitskonstante.

**Simulationsmethode: SM+; Eingabeparameter: $t_{R1} = 40,7$; $t_{R2} = 42,5$;
 $w_{h1} = 29,8$; $w_{h2} = 32,2$; $h_{plateau} = 5,8\%$ (Daten aus Tabelle 14, Chlorthalidon, 30°C).**

t_0 [min]	N_1	N_2	k_I^{app} [10^{-5} s^{-1}]	ΔG^\ddagger [kJ mol $^{-1}$]
0,5	44 000	41 000	4,14	97,98
1,0	43 000	40 000	4,13	97,99
2,0	42 000	39 000	4,14	97,98
5,0	39 000	37 000	4,14	97,98
10,0	34 000	32 000	4,12	97,99
15,0	29 000	28 000	4,13	97,98
20,0	25 000	24 000	4,14	97,98
25,0	21 000	21 000	4,14	97,98
30,0	18 000	17 000	4,16	97,97
35,0	15 000	14 000	4,22	97,93
40,0	12 000	11 000	4,27	97,90

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich wird, ist die Abweichung der Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} sehr gering, und die Abweichung bei der Gibbschen freien Energie ΔG^\ddagger liegt im Bereich deutlich unterhalb des halben Fehlers, der für eine Messung angegeben wird. Die Schwankungen in der zweiten Dezimale der Werte rühren unter anderem auch von Rundungsdifferenzen bei der Simulation von Einzelwerten her.

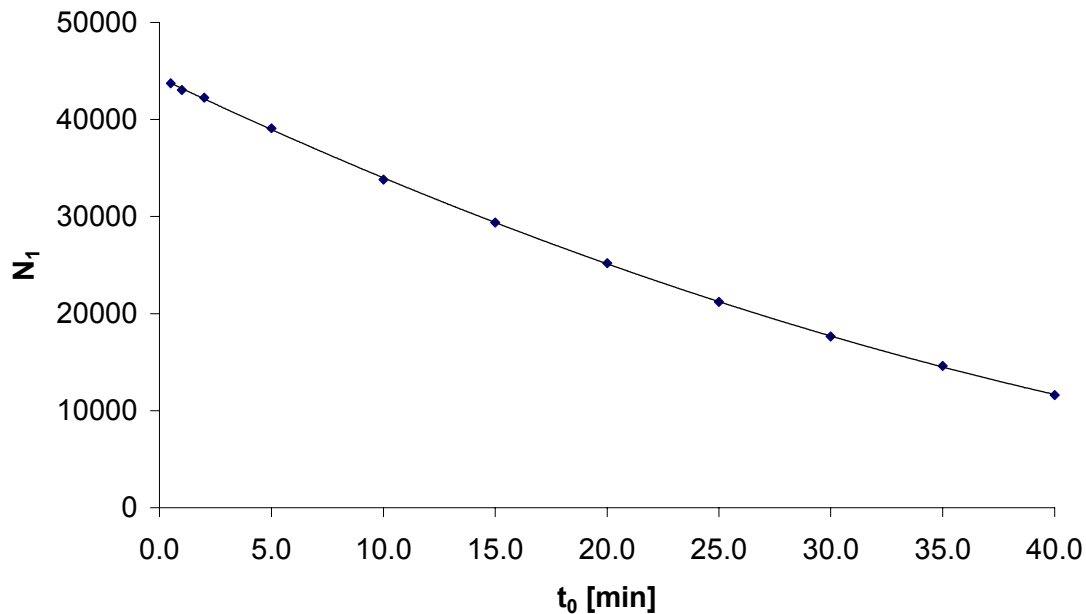


Abbildung 20: Abhängigkeit der theoretischen Bodenzahl von der Durchflusszeit (Daten aus Tabelle 5).

Dieses Ergebnis demonstriert, dass die Gesamtgeschwindigkeitskonstanten unabhängig von der Durchflusszeit sind. Als korrespondierende Größen charakterisieren die Durchflusszeit und die theoretische Bodenzahl nur die Effizienz des Trennsystems, haben aber keinen Einfluss auf die Kinetik der ablaufenden Reaktion.

4.3.5. Anwendbarkeit des theoretischen Bodenmodells

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, kann die Effizienz des Trennprozesses mit Hilfe theoretischer Bodenzahlen charakterisiert werden. Bei den dynamischen elektrokinetischen chromatographischen Methoden findet, genau wie für Zweiphasensysteme beschrieben, eine Verteilung zwischen mobiler und pseudostationärer Phase statt. Bei der dynamischen Kapillarelektrophorese ist dies aufgrund des Fehlens einer zweiten Phase nicht möglich; anstelle der Verteilung kann man jedoch folgende Schritte formulieren, die eine Anwendung dieses Modells auch auf elektrophoretische Trennprozesse begründen:

-
- (i.) Transport der Analyten A und B (Isomere) mit der jeweiligen individuellen Geschwindigkeit v_A und v_B ,
 - (ii.) Reversible Interkonversion der Isomeren A und B während der Aufenthaltsdauer Δt , die aus der Durchflusszeit t_0 und der Bodenzahl N , die über die Beziehung $\Delta t = t_0/N$ berechnet wird.

In Analogie zu chromatographischen Methoden lässt sich der elektrophoretische Transportprozess der Isomere A und B mathematisch mit Hilfe des Migrationsfaktors k' der Isomere, der Migrationsgeschwindigkeit v und der elektroosmotischen Mobilität μ beschreiben:

$$k'_i = \frac{v_0 - v_i}{v_i} = \frac{\mu_0 - \mu_i}{\mu_i} = \frac{t_R^i - t_0}{t_0} \quad (28)$$

Die Migrationsfaktoren k'_A und k'_B der Isomeren beschreiben ein Pseudogleichgewicht zwischen den Isomeren in einem theoretischen Boden und den Stereoisomeren die in den nächsten Boden wandern und so zum Trennprozess beitragen. Für hohe Bodenzahlen nähert sich diese diskontinuierliche Wanderung einem kontinuierlichen Trennprozess an. Interessanterweise ist die Peakverbreiterung, die durch diesen Transportmechanismus verursacht wird, ein integraler Bestandteil dieses hier verwendeten Modells.

4.4. Instrumentation

4.4.1. Allgemeines

Ein typisches Kapillarelektrophoresegerät besteht aus mehreren Grundbausteinen. Je nach Beschaffenheit des Gerätes und dem geplanten Anwendungsbereich kann es über alle oder auch nur über einige dieser Bausteine verfügen [129]:

- ein System zur hydrodynamischen oder elektrokinetischen Injektion,
- eine Kapillarsäule, in welcher die Trennung durchgeführt wird,
- einen Detektor,
- einen Integrator oder eine computergestützte Datenakquisition,
- eine Hochspannungsquelle,
- ein Drucksystem,
- ein System zur Temperierung der Kapillare,
- einen Autosampler.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät handelt es sich um ein Prince Unicam Crystal 300/31 Kapillarelektrophoresegerät mit einem vier-Positionen Autosampler sowie einem Luftkühlsystem über ein Peltierelement, das die Regelung der Temperatur in einem Bereich von 15-60°C erlaubt. Die Detektion erfolgt über einen on-column UV-Detektor der Firma Bischoff (Leonberg). Das Gerät erlaubt das Anlegen beliebiger Spannungen im Bereich von 0 bis +/-30 kV beziehungsweise die Vorgabe des Stromes im Bereich von 0 bis +/- 200 μ A. Zusätzlich zur Spannung kann auch ein Druck zwischen -180 und 3000 mbar auf die Injektionsseite der Kapillare gegeben werden. Üblicherweise wird die Probe an der Anode injiziert, durch Umpolung des Gleichstroms ist jedoch auch eine Injektion an der Kathode möglich.

4.4.2. Kühlung

Für die Durchführung kinetischer Untersuchungen werden temperaturabhängige Messungen benötigt. Ein normales Luftthermostatisiersystem, wie es in dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät vorhanden ist, kann die starke Hitzeentwicklung im Innern der Kapillare nicht abführen, was besonders bei hohen Pufferkonzentrationen zu Temperaturschwankungen führt. Auch kommerziell erhältliche Geräte, die mit einer Flüssigtemperierung ausgestattet sind, können diese Temperaturschwankungen nicht völlig kompensieren, da die Wärmekapazität der nicht-leitenden Thermostatisierflüssigkeiten zu niedrig, und der Wärmeaustausch aufgrund der ineffizienten Umwälzleistung zu gering ist [99]. Wasserthermostatisierte Systeme, die eine viel größere Wärmekapazität besitzen, werden im Allgemeinen vermieden, da das Risiko eines Brechens der Kapillare bei den für die Elektromigrationsmethoden verwendeten hohen Spannungen zu groß ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein sehr sicheres, effizientes und kostengünstiges Temperiersystem entwickelt, um die nötigen temperaturabhängigen Messungen durchführen zu können. Das mit Wasser betriebene System bietet zusätzlich noch den Vorteil, eines – verglichen mit dem Luftzirkulationssystem – größeren Temperaturbereichs (-60 bis +150°C). Je nach verwendetem Bereich von Messtemperaturen wurden noch Anteile 2-Propanol zur Gefrierpunktserniedrigung zugesetzt, bei Temperaturen über 70°C muss Glykol als Thermostatisierflüssigkeit verwendet werden. Die mit einem dünnen Schrumpfschlauch aus Teflon gegen Bruch isolierte Kapillare wurde in einem Polyethylenschlauch mit der Temperierflüssigkeit umspült. Diese wurde mittels einer leistungsfähigen Pumpe (12 l·min⁻¹, Haake D8-GH, Haake, Karlsruhe) ständig ausgetauscht und mit Hilfe eines Kryostaten temperiert. Die in der Kapillare generierte Joulesche Wärme konnte dadurch sofort abgeführt werden. Als sichtbares Ergebnis dieser Maßnahmen verbesserte sich bei einer gegebenen Temperatur die Auflösung der Trennungen, und die bei den Interkonversionsmessungen erhaltenen Werte waren im Vergleich zu Messungen mit dem lufttemperierten System reproduzierbar. Die Aufzeichnung

der Messwerte erfolgte mit einem Integrator des Typs Chromatopak C-R6A (Shimadzu, Kyoto, Japan).

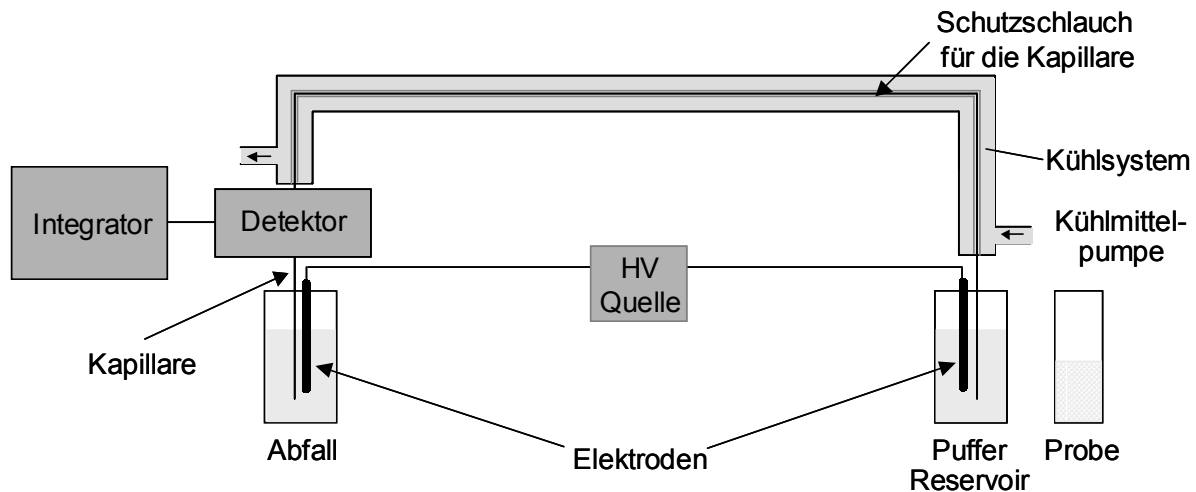


Abbildung 21: Schematischer Aufbau des verwendeten Kapillarelektrophoresegerätes mit integriertem Kühlsystem.

Die Richtigkeit und Robustheit dieses Thermostatisierungssystems wurde mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes überprüft. Da die Joulesche Erwärmung den elektrischen Widerstand erhöht, wird der Strom nicht linear mit der Spannung anwachsen, falls die entstehende Wärme nicht effizient abgeführt wird. Wie in Abbildung 22 gezeigt wird, ist der Ohm Plot für 60 mM Borat/Phosphat Puffer bei pH 8 linear (Korrelationskoeffizient $> 0,9999$) und unabhängig von der Temperatur. Bei dieser Messung wurde der Strom 5 Minuten nach Anlegen der vorgegebenen Spannung gemessen. Nach jeder Messung wurde die Kapillare für 5 Minuten mit Messpuffer gespült. Für alle Messungen betrug die Temperatur des Puffers 20°C .

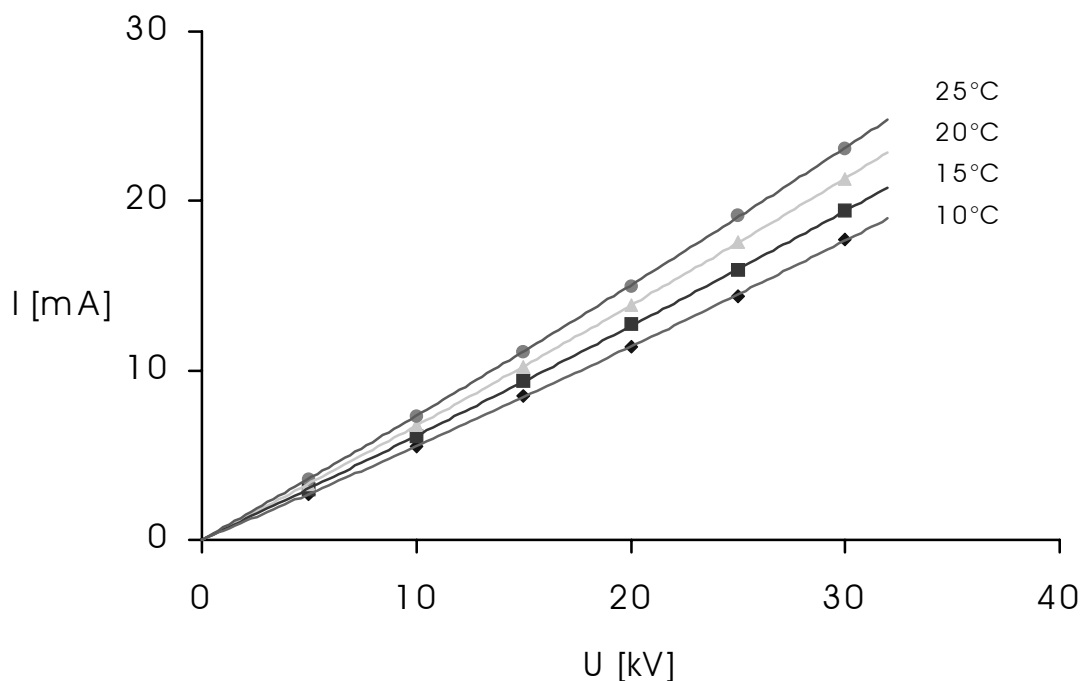


Abbildung 22: Ohm Plot. 60 mM Borat/Phosphat Puffer bei pH 8.

Aus apparativen Gründen ist eine Thermostatisierung der ersten 14 cm der Kapillare nur über das integrierte Peltierelement der Kapillarelektrophoreseinheit möglich. Eine Thermostatisierung der letzten 6 cm vor dem Detektorfenster konnte aus technischen Gründen nicht realisiert werden. Der Einfluss dieser nicht thermostatisierten Zonen wurde durch Variation der Kapillarlänge experimentell, und durch Computersimulation unterschiedlicher Szenarien theoretisch untersucht. Bei den experimentellen Untersuchungen, bei denen die Kapillarlänge im Vergleich zur sonst verwendeten Länge (Experimenteller Teil) um je 10 cm verlängert und verkürzt wurde, konnte im Rahmen der Messgenauigkeit keine Abweichung der experimentell bestimmten Geschwindigkeitskonstanten festgestellt werden. Eine größere Variation der Kapillarlänge durch stärkere Verkürzung war aus apparativen Gründen (Mindestabstand Detektor – Injektor) nicht möglich, eine weitere Verlängerung führt zu einer erheblichen Zunahme der Retentionszeiten die nur wenig Praxisnähe besitzt.

Für die theoretischen Untersuchungen wurden unterschiedlich lange Bereiche (10%, 20% und 30%) der Kapillare als nicht thermostatisiert angenommen und

mit dem *Enhanced Flow* Modul des theoretischen Bodenmodells simuliert. Abbildung 23 zeigt die gute Übereinstimmung der so simulierten Geschwindigkeitskonstanten k_{sim} mit denen aus den Enantiomerisierungsexperimenten erhaltenen k_{soll} (Daten aus Tabelle 14, Chlorthalidon).

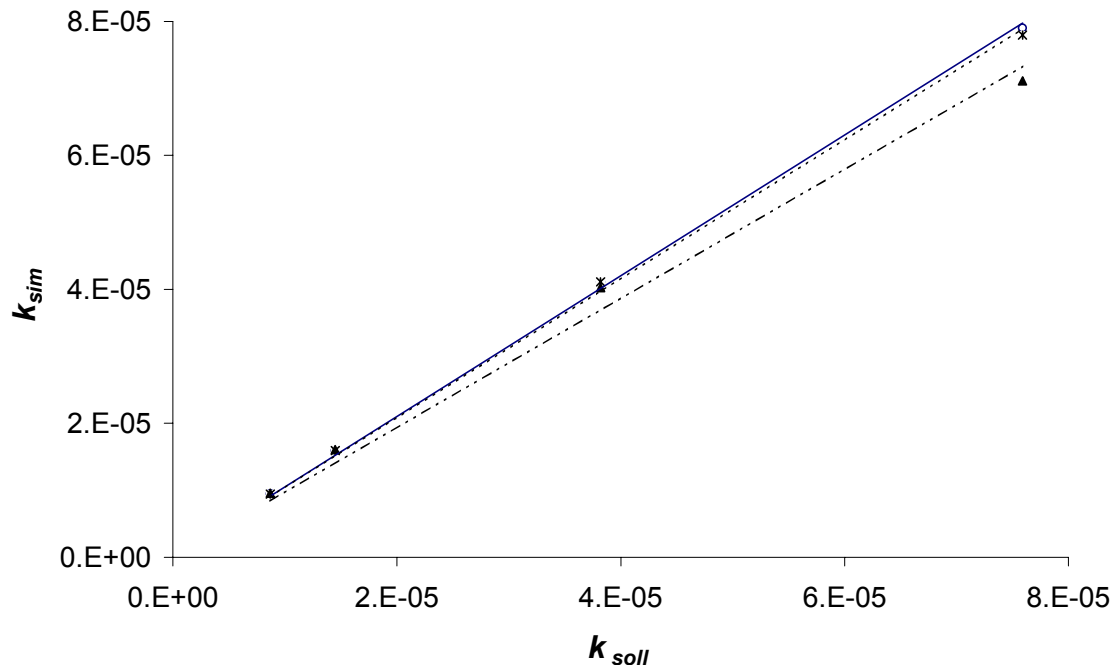


Abbildung 23: Vergleich zwischen den gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k_{soll} und den für unterschiedlich lange (10%, 20% und 30%), nicht gekühlte Bereiche simulierte Geschwindigkeitskonstanten k_{sim} . Daten aus Tabelle 14, Chlorthalidon.

Anstelle von Ursprungsgeraden mit der Steigung eins, die bei völliger Übereinstimmung der Werte zu erwarten wären, wurden folgende Steigungen a mit den Korrelationskoeffizienten r gefunden:

**Tabelle 6: Steigungen a und Korrelationskoeffizienten r der Geradengleichungen aus
Abbildung 23.**

nichtthermostatisierter Anteil	a	r
[%]		
10	0,9908	0,9996
20	1,0398	0,9993
30	1,0505	0,9954

Die Differenzen der gefundenen Geschwindigkeitskonstanten führen für die freie Aktivierungsenergie zu einer maximalen Abweichung von $\pm 0,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ im ungünstigsten Fall (30% nicht thermostatisiert, höchste Meßtemperatur).

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass der verwendete Aufbau mit einer effektiven Kapillarlänge von 95 cm und einer temperaturregulierten Zone von 76 cm im tatsächlich angewandten Temperaturbereich von -10°C bis $+60^\circ\text{C}$ eine Abweichung in der scheinbaren Geschwindigkeitskonstante selbst in Extremfällen von unter 5% ausmacht, wobei im tatsächlichen Experiment die Abweichung aufgrund der Unterstützung durch das Peltierelement bei Temperaturen oberhalb 15°C wesentlich geringer ist. Bei tiefen Temperaturen, bei denen eine Unterstützung durch das Peltierelement nicht möglich ist, hat die nicht thermostatisierte Zone keinen Einfluss auf die Geschwindigkeitskonstante, da dann bedingt durch die Koaleszenz der Analyten keine Enantiomeren-trennung auftritt. Diese durch das Fehlen des Temperiersystems verursachte Abweichung ist somit geringer als die Streuung der experimentellen simulierten Werte um den Mittelwert.

4.4.3. Detektion

In der vorliegenden Arbeit erfolgt die Detektion durch einen online-UV-Detektor. Dieser befindet sich in der Regel unmittelbar vor der Kathode. Durch Entfernen eines kleinen Teils der Polyimidschicht der Kapillare wird ein

optisches Fenster hergestellt, das für die on-column Detektion genutzt werden kann. Vorteil dieses Detektors ist, dass keine Bandenverbreiterung durch eine Detektorzelle auftritt. Der Nachteil besteht in der, im Vergleich zu anderen Detektortypen, relativen Unempfindlichkeit. Diese wird durch den geringen Kapillardurchmesser und die dadurch sehr kleine optische Weglänge verursacht. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz erhält man deshalb nur sehr geringe Lichtabsorptionen. Durch Veränderung der Geometrie der Detektorzelle (Z- oder Bubble-Zelle) kann versucht werden die Empfindlichkeit zu steigern. Andere bei den Elektromigrationsmethoden verwendete Detektortypen mit den jeweiligen Detektionsgrenzen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 7: Detektionsgrenzen einiger häufig verwendeter Detektoren [130-133].

Detektor	Detektionsgrenze	
	Konzentration* [mol/l]	Masse [mol]
Amperometrie	10^{-9} - 10^{-11}	10^{-17} - 10^{-19}
Laser-induzierte Fluoreszenz	10^{-7} - 10^{-12}	10^{-15} - 10^{-20}
Leitfähigkeit	10^{-8} - 10^{-9}	10^{-16} - 10^{-17}
Massenspektrometrie	10^{-4} - 10^{-9}	10^{-12} - 10^{-17}
Radiometrische Detektion	10^{-9} - 10^{-10}	10^{-17} - 10^{-18}
UV, direkt/Diodenarray	10^{-5} - 10^{-8}	10^{-13} - 10^{-16}
UV, indirekt	10^{-3} - 10^{-7}	10^{-11} - 10^{-15}

Es bleibt anzumerken, dass das verwendete Simulationsprogramm ChromWin den durch die on-column Detektion entstehenden Fehler in den Peakflächen durch Wichtung mit den Retentionszeiten automatisch korrigiert.

* Angenommenes Injektionsvolumen: 10 nl.

4.5. Chirale Selektoren und Additive

4.5.1. Allgemeines

Enantiomerenanalytik wird für die Arzneistoffanalyse und die Lebensmittelherstellung immer wichtiger. Die meisten Routineverfahren beruhen auf HPLC und GC, Elektromigrationsmethoden (EMM) kommen jedoch aufgrund der Vielzahl der möglichen chiralen Additive in den letzten Jahren immer häufiger zum Einsatz [134]. Im Gegensatz zu HPLC und GC müssen bei den EMM keine teuren CSPs verwendet werden, sondern es werden kleinste Mengen chiraler Selektoren direkt zu den Messpuffern hinzugegeben. Durch Mischen verschiedener Selektoren oder durch Zugabe von Additiven, wie beispielsweise organische Lösungsmittel [135], Tenside, Harnstoff, Zwitterionen oder Polymere, können die Trennbedingungen einfach und schnell optimiert werden [136-139].

4.5.2. Tenside

Tenside gehören als amphiphile Moleküle zu den am meisten verwendeten Pufferadditiven und können entweder anionisch, kationisch, neutral oder zwitterionisch sein [140-142]. Unterhalb ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) können Tenside zur Verbesserung der Löslichkeit hydrophober Substanzen oder zur dynamischen Belegung der Kapillarwand eingesetzt werden (Verringerung/Umkehrung des EOF, vgl. Abschnitt 4.2.2.1).

Die Verwendung von Tensiden als Mizellenbildner in der Kapillarelektrophorese (MEKC) wurde erstmals von Terabe beschrieben [119, 143-146]. Eine Wechselwirkung des Tensids kann entweder über eine ionische Wechselwirkung mit dem geladenen Ende des Tensids oder aber durch hydrophobe Wechselwirkung mit dem aliphatischen Alkylrest stattfinden. Anionische Tenside weisen als funktionelle Gruppen meist Carboxylat-, Sulfat- oder Sulfonatgruppen auf, während kationische Tenside beinahe ausschließlich

durch das Vorhandensein einer quartären Ammoniumgruppe gekennzeichnet sind.

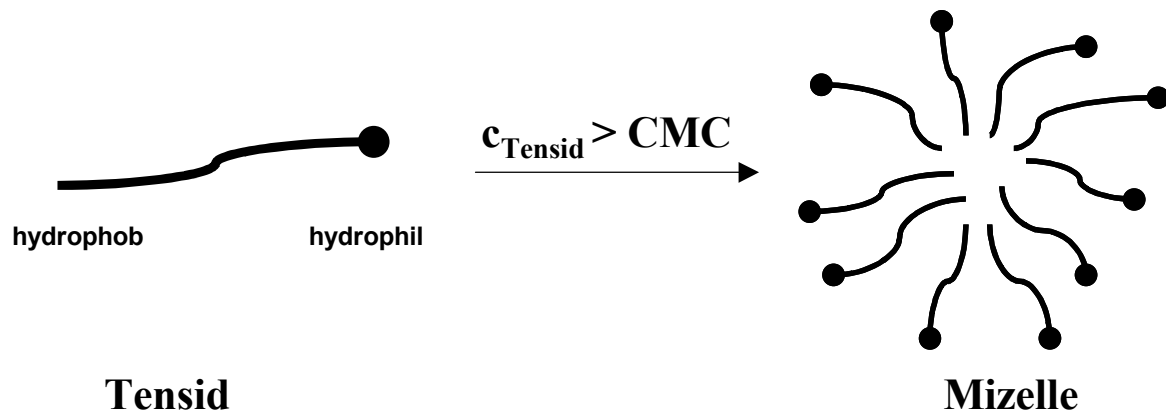
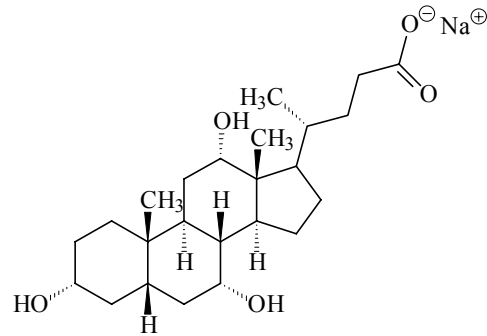
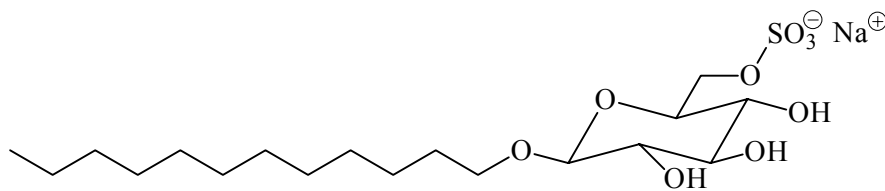
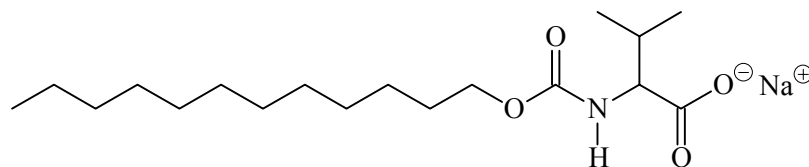


Abbildung 24: Amphophilie eines Tensids. Oberhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC) bilden sich Mizellen, dabei formen die geladenen Kopfgruppen eine sphärische „Wand“ um das Zentrum aus Kohlenwasserstoffen.

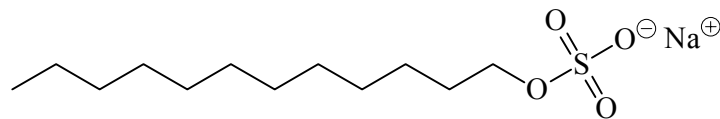
Bei den Elektromigrationsmethoden werden kationische Tenside vor allem zur dynamischen Belegung von Kapillaren verwendet, um den EOF zu unterdrücken oder umzupolen. Als Selektoren werden sie nur selten eingesetzt, da eine Anlagerung der positiv geladenen „Köpfe“ und die negativ geladene Kapillarwand die Ausbildung von Mizellen weitgehend unterdrückt. Anionische Tenside werden dagegen häufig als achirale Additive oder zur chiralen Erkennung eingesetzt [147-149]. Die erste chirale Enantiomerentrennung durch MEKC wurde von Karger *et al.* [150] beschrieben. Eine bei den elektrokinetischen chromatographischen Methoden häufig verwendete Gruppe von Mizellenbildnern sind die Steroide. Einige dieser Steroide haben physiologische Aktivität, so werden beispielsweise Gallensäuren im Darm dazu benötigt, wasserunlösliche Fette zu emulgieren, damit diese dann durch Enzyme hydrolysiert werden können. Einige Beispiele für häufig verwendete anionische und kationische Tenside sind im folgenden dargestellt:



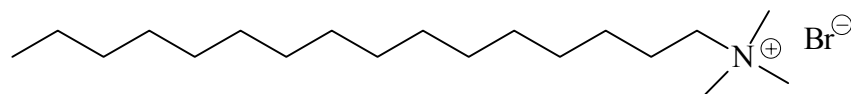
Natriumcholat

Natriumdodecyl- β -D-glucopyranosid-6-hydrogensulfat

N-Dodecylcarboxylvalin



Natriumdodecylsulfat



Hexadecyltrimethylammoniumbromid

Abbildung 25: Häufig verwendete Tenside.

Ein Beispiel für ein häufig verwendetes neutrales Tensid ist Brij 35 (Tricosäthylenglycoldodecylether). Dieses Tensid wird zur dynamischen Beschichtung von Kapillaroberflächen eingesetzt, um eine Adsorption z.B. von Proteinen an der Kapillarwand zu verhindern.

4.5.3. Cyclodextrine

Cyclodextrine (Cycloamylosen) sind ringförmige Oligosaccharide, die im großtechnischen Maßstab aus Stärke gewonnen werden können. Sie stellen die am häufigsten verwendete Gruppe chiraler Additive bei den Elektromigrationsmethoden dar [151-153]. Je nach ihrer Ringgröße bestehend aus 6, 7 oder 8 α -1,4-verknüpften Glucose Einheiten werden sie als α -, β - oder γ -Cyclodextrin bezeichnet. Cyclodextrine haben die Form eines abgeschnittenen Kegels, wobei der Durchmesser der Kavität von der Anzahl der Glucoseeinheiten bestimmt wird. Über ihre lipophile Kavität und ihre hydrophile Außenwand können Cyclodextrine mit den verschiedensten Verbindungen Inklusions- und Anlagerungskomplexe bilden und so zur chiralen Erkennung beitragen. Dabei wird entweder ein lipophiler Teil des Moleküls in das Cyclodextrin eingelagert (Wirt-Gast Komplex) oder es entstehen Wechselwirkungen mit den chiralen primären Hydroxygruppen auf der Außenseite [154].

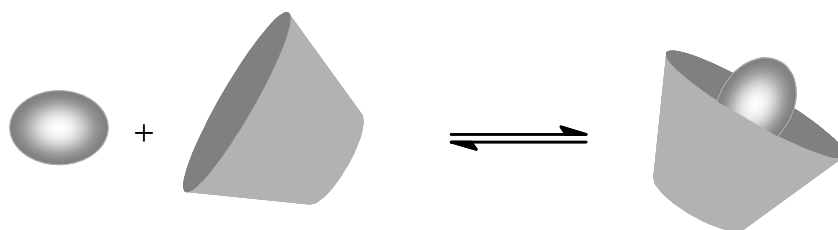


Abbildung 26: Bildung eines Cyclodextrin-Einschlusskomplexes.

Je nach ihrer Anzahl von Glucoseeinheiten besitzen die Cyclodextrine sehr unterschiedliche Eigenschaften (Tabelle 8). Besonders wichtig für die Trenneigenschaften sind dabei die Ringgröße und das Volumen der Kavität. Ebenfalls wichtig für die Anwendung ist die Löslichkeit, bei der beträchtliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Cyclodextrinen bestehen.

In der Pharma- und Lebensmittelindustrie werden Cyclodextrine auch zur Herstellung mikroverkapselter Wirk- und Aromastoffe verwendet. Sie dienen dort zur Stabilisierung empfindlicher Substanzen, sowie zur Verbesserung der Löslichkeit hydrophober Substanzen.

Tabelle 8: Eigenschaften und physikalische Daten von Cyclodextrinen [155-157]

	α -Cyclodextrin	β -Cyclodextrin	γ -Cyclodextrin
Molare Masse [g/mol]	972	1135	1297
Außendurchmesser [nm]	1,46	1,54	1,75
Innendurchmesser [nm]	0,47-0,53	0,60-0,65	0,75-0,83
Höhe [nm]	0,79	0,79	0,79
Volumen [nm³]	0,174	0,262	0,427
Wassermoleküle/Kavität	5	11	17
Schmelzpunkt [°C]	551	572	540
Löslichkeit, Wasser [g/l]	145	18,5	232
Kristallwasser [Gew. %]	10,2	13,2-14,5	8,1-17,7
pK (25°C)	12,3	12,2	12,1

Außer den – aus unsubstituierten Glucoseeinheiten bestehenden – nativen Cyclodextrinen werden bei den Elektromigrationsmethoden zunehmend auch modifizierte Cyclodextrine, wie beispielsweise Permethylcyclodextrin oder geladene Spezies wie Carboxymethyl-, Hydroxypropyl-, Sulfopropylcyclodextrin verwendet. Diese Derivate haben meist den Vorteil einer besseren Löslichkeit in wässrigen Medien, und die geladenen Spezies sind außerdem in der Lage, auch neutrale Verbindungen zu trennen, da sie eine vom EOF verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit besitzen.

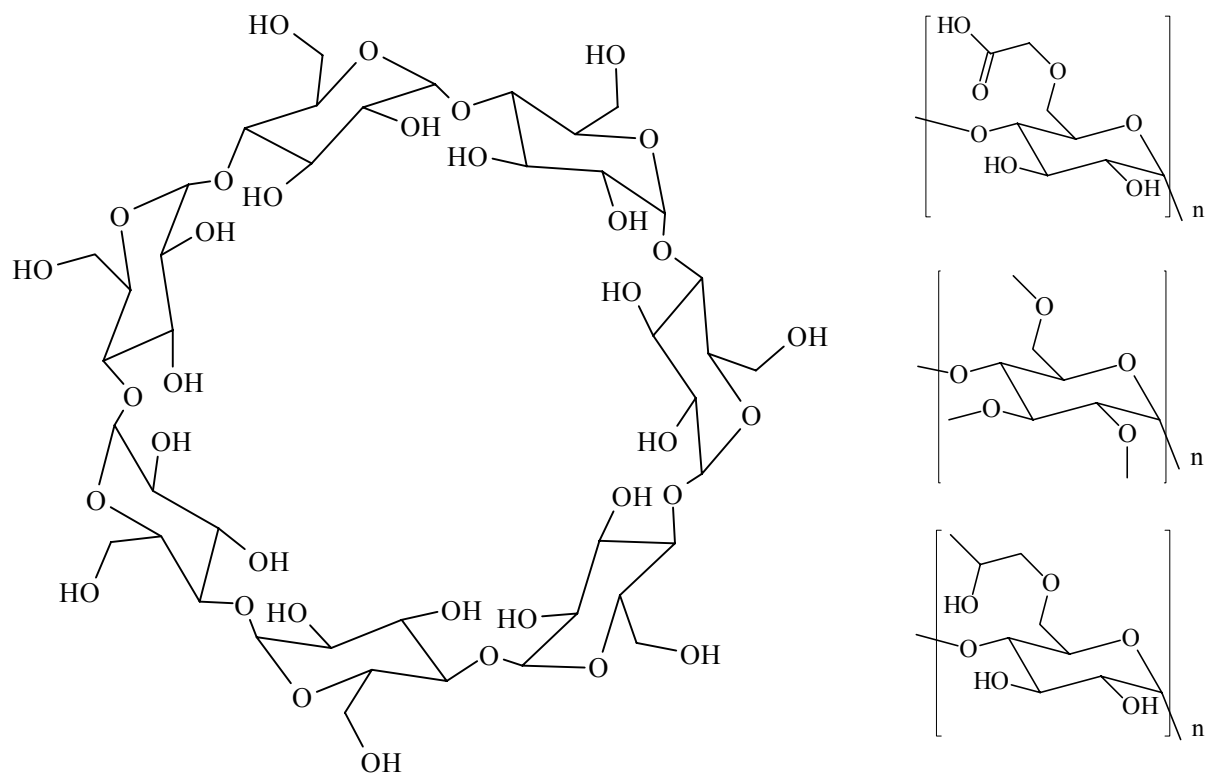


Abbildung 27: natives β -Cyclodextrin (links) und substituierte Cyclodextrine (rechts, $n=6-8$). Von oben nach unten: Carboxymethylcyclodextrin, Permethylcyclodextrin, Hydroxypropylcyclodextrin.

Je nach Hersteller besitzen die Cyclodextrinderivate unterschiedliche Substitutionsgrade. Teilweise wird statistisch modifiziert, teilweise auch hochselektiv. Besonders Vigh *et al.* berichten über den starken Einfluss des Substitutionsgrades auf die Selektivität einzelner Enantiomerentrennungen [158-173]. Dennoch werden in der Literatur, wohl auch aus Kostengründen, meist die Verwendung statistisch substituierten Cyclodextrine beschrieben [174-177].

4.5.4. Sonstige

Weitere bei den Elektromigrationsmethoden eingesetzte chirale Mobilphasenadditive sind beispielsweise Glycopeptidantibiotika (Vancomycin, Teicoplanin, Ristocetin A) [178-186] oder Proteine, wie Albumine [187,188].

Auch synthetische supramolekulare Verbindungen wie Kronenether [189-193] oder Calix[n]arene [194-199] werden als chirale Selektoren eingesetzt.

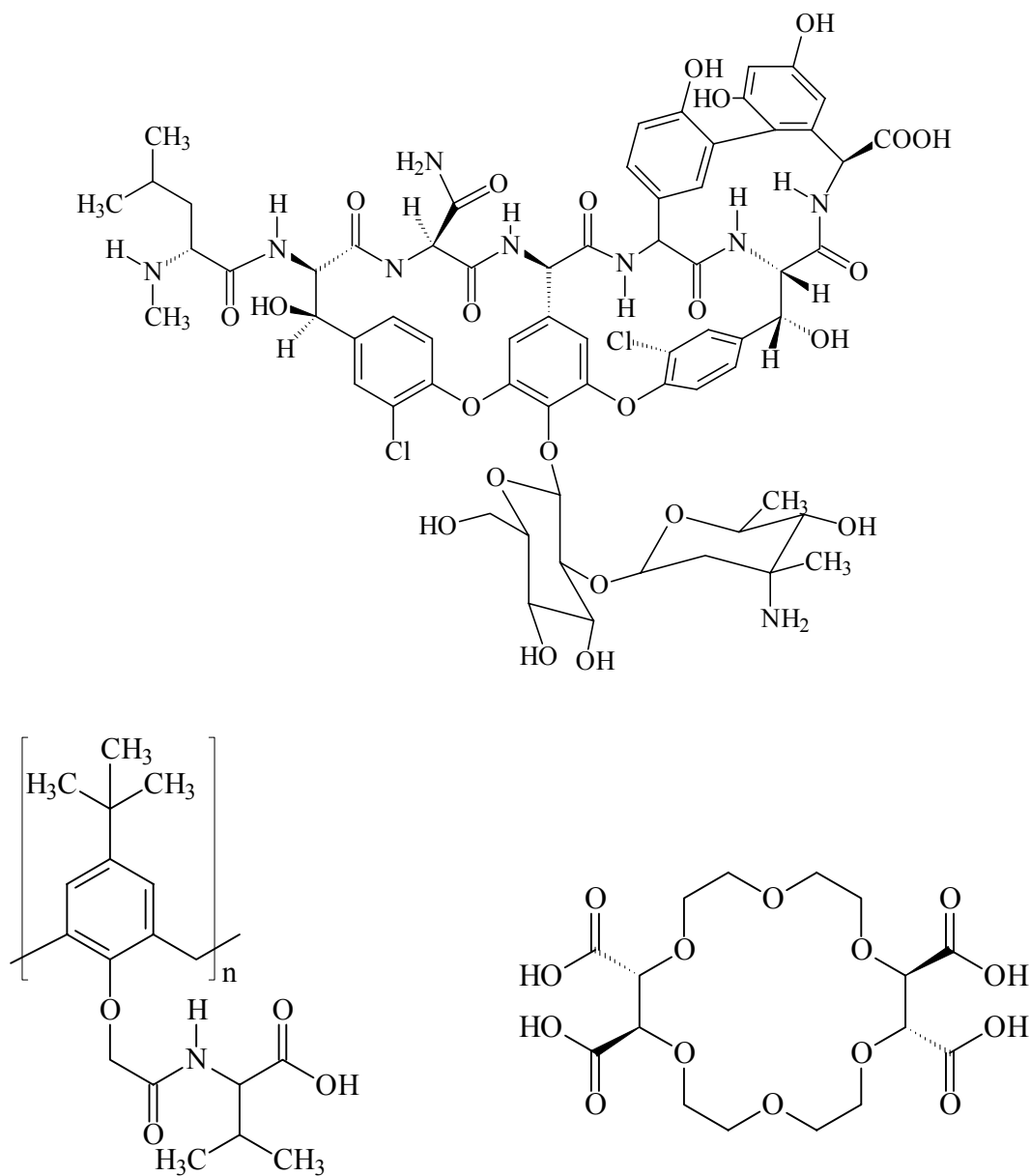


Abbildung 28: Als chirale Mobilphasenadditive verwendete Substanzen, oben: Vancomycin; unten links: (*N*-L-valinoacyl)calix[n]aren ($n= 4-8$); unten rechts: (+)-(18-krone-6)-2,3,11,12-tetracarbonsäure.

In neuerer Zeit wird auch die Verwendung von Mischungen chiraler Selektoren [200-202] oder Mischungen eines chiralen Selektors mit einem Tensid [203,204] beziehungsweise zweier Tenside [205,206] beschrieben. Solche Systeme sind teilweise in der Lage sehr komplexe Trennprobleme zu lösen.

5. Enantiomerisierung chiraler Arzneistoffe

5.1. Benzodiazepine

5.1.1. Allgemeines

In der als Anxiolytika und Sedativa weit verbreiteten Gruppe der Benzodiazepine gibt es einige konfiguratив stereolabile Vertreter. Charakteristisch für diese Verbindungen ist die Hydroxy-Gruppe an C-Atom 3 (Abbildung 29). Für diese Gruppe, zu der auch die hier untersuchten Verbindungen Oxazepam, Temazepam und Lorazepam gehören, werden unterschiedliche Enantiomerisierungsmechanismen diskutiert, auf die später noch näher eingegangen wird.

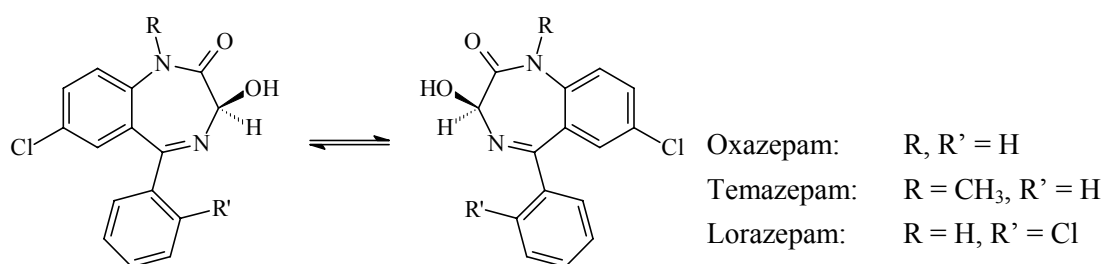


Abbildung 29: Enantiomerisierung chiraler 3-Hydroxy-1,4-benzodiazepine.

Das Auftreten von Plateaus bei der Enantiomerentrennung von Benzodiazepinen wurde zuerst von Vindevogel *et al.* [227] beobachtet. Die Autoren beschreiben, dass durch eine Temperaturerhöhung bei der Enantiomerentrennung die chirale Erkennung der Benzodiazepine unterdrückt werden kann. Andere Arbeitsgruppen haben die Interkonversionsbarriere einiger Benzodiazepine mit herkömmlichen Methoden beobachtet und teilweise auch näher untersucht [208-223]. Yang *et al.* verwendeten dazu die acylierten Verbindungen. Diese wurden zuerst präparativ mittels HPLC in die Enantiomere getrennt, die Acylgruppe der optisch reinen Verbindungen anschließend wieder abgespalten, und dann die Racemisierung der reinen Enantiomere mittels Polarimetrie untersucht. Eine Auswertung dynamischer Elutionsprofile einer enantioselektiven HPLC

Enantiomerentrennung auf einer ChiraDex-Säule wird von Cabrera *et al.* [224] beschrieben.

Die meisten Benzodiazepine sind im pH-Bereich zwischen 3 und 9 ungeladen. In der Kapillarelektrophorese kann eine Enantiomerentrennung nicht erfolgen, da die Wanderungsgeschwindigkeit der Enantiomere mit der des EOF identisch ist. In der Literatur werden für die Benzodiazepine elektrokinetische chromatographische Enantiomerentrennungen mit Rinderserumalbumin (BSA) [225], polymeren Dipeptidtsiden [148] und mit Gallensäuren [207,226,227] beschrieben. Bei diesen Enantiomerentrennungen wurden teilweise dynamische Elutionsprofile mit Plateaubildung beobachtet, jedoch konnten diese aufgrund mangelhafter Thermostatisierung kaum verlässlich ausgewertet, und wegen der auftretenden hohen Bodenzahlen nicht simuliert werden. Die qualitativ und quantitativ beste Enantiomerentrennung wird in der Gegenwart von Gallensäure durch MEKC erreicht, die deshalb auch für diese Untersuchung der konfigurativen Stabilität verwendet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde die enantioselektive DMEKC und Computersimulation der Elutionsprofile zur pH-abhängigen Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Oxazepam, Temazepam und Lorazepam angewandt [85,86]. Für alle hier beschriebenen Enantiomerentrennungen von Benzodiazepinen wurde das Gallensäuresalz Natriumcholat (SC, 3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -natriumcholat) sowie ein Borat/Phosphat Puffersystem verwendet. Die Messtemperatur lag zwischen 5 und 30°C und wurde mit dem im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Temperiersystem eingestellt. Zur Detektion wurde ein UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 230 nm verwendet. Die effektive Säulenlänge betrug für alle Versuche 95 cm bei einem Kapillarinnendurchmesser von 50 μ m. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch und die Messspannung betrug 25 kV. Die Auswertung der experimentellen Elektrochromatogramme erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin unter Verwendung des theoretischen Bodenmodells (TPM) und des stochastischen Modells (SM+). Für die Berechnung der Aktivierungsparameter

wurden Mittelwerte aus jeweils mindestens 4 Messungen gebildet und diese einer statistischen Analyse unterzogen.

5.1.2. Optimierung der Puffer- und Selektorkonzentration

Um die Trennbedingungen zu optimieren wurden verschiedene Puffer und Additivkonzentrationen untersucht. Dies wurde anhand von Oxazepam exemplarisch durchgeführt. Abbildung 30 zeigt den Einfluss der Änderung der Pufferkonzentration (Borat/Phosphat, pH 8) bei einer konstanten Tensidkonzentration (60 mM SC) sowie die Änderung der Tensidkonzentration bei konstanter Pufferkonzentration (20 mM) auf den Trennfaktor α .

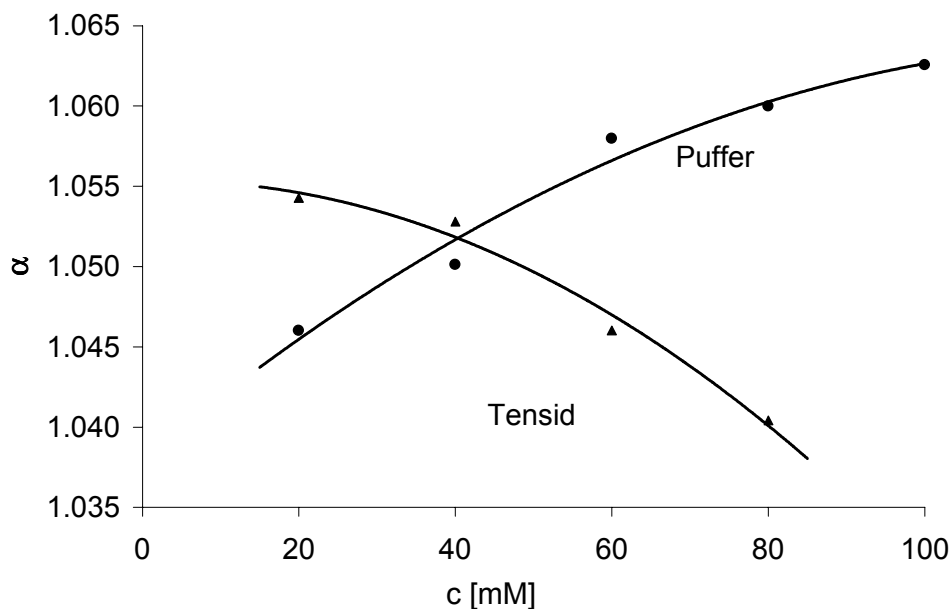


Abbildung 30: Konzentrationsabhängigkeit des Trennfaktors α der Enantiomerentrennung von Oxazepam.

Trennbedingungen: Natriumcholat (60 mM/variabel), Borat/Phosphat Puffer (variabel/20 mM), pH 8, 10°C, U=25 kV, λ =230 nm.

Eine Steigerung der Pufferkonzentration führt zu einer Erhöhung des Trennfaktors. Zudem nimmt die Retentionszeit und die theoretische Bodenzahl beträchtlich zu. Wird dagegen die Konzentration des Tensids gesteigert, so verschlechtert sich die Enantiomerentrennung. Die optimalen Trennbedingungen

werden bei einer niedrigen Tensid- und einer hohen Pufferkonzentration erreicht. In Abbildung 31 ist die Abhängigkeit der Retentionszeiten der Enantiomere von der Puffer- und Tensidkonzentration gezeigt. Steigende Konzentrationen führen zu einer Verlängerung der Retentionszeit, wobei die steigende Pufferkonzentration den größeren Effekt zeigt. Die Erklärung hierfür ist der mit steigender Konzentration sinkende EOF, der für die Bewegung der neutralen Analytmoleküle in Richtung Kathode sorgt.

Zur Enantiomerentrennung der Benzodiazepine wurde als Kompromiss zwischen langen Retentionszeiten und guter Enantiomerentrennung eine Pufferkonzentration von 20 mM und eine Tensidkonzentration von 60 mM für alle hier beschriebenen Trennungen gewählt. Die pH-Abhängigkeit der Interkonversionsbarriere wurde durch Messungen bei den pH-Werten 7, 8 und 9 untersucht.

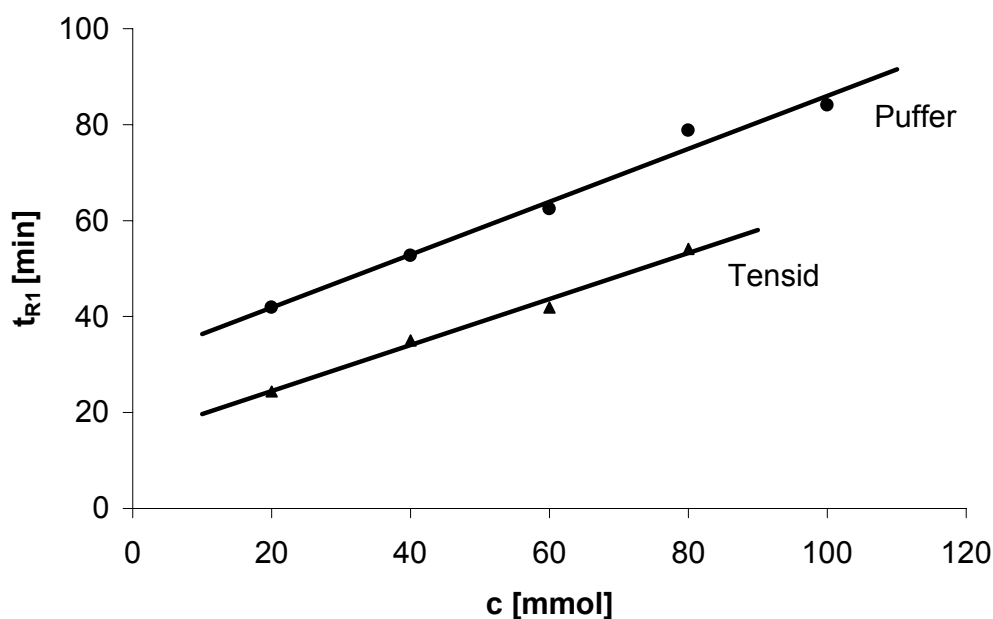


Abbildung 31: Konzentrationsabhängigkeit der Retentionszeiten der Enantiomere.
Trennbedingungen siehe Abbildung 30.

5.1.3. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Oxazepam

Wie in Abbildung 32 gezeigt, ist die Enantiomerisierung von Oxazepam durch das Auftreten charakteristischer Plateaus zwischen 5 und 20°C charakterisiert. Bei 25°C tritt Peakkoaleszenz ein, bei 0°C ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung so gering, dass eine Basislinientrennung auftritt. Chromatogramme mit Plateauhöhen über 60% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt.

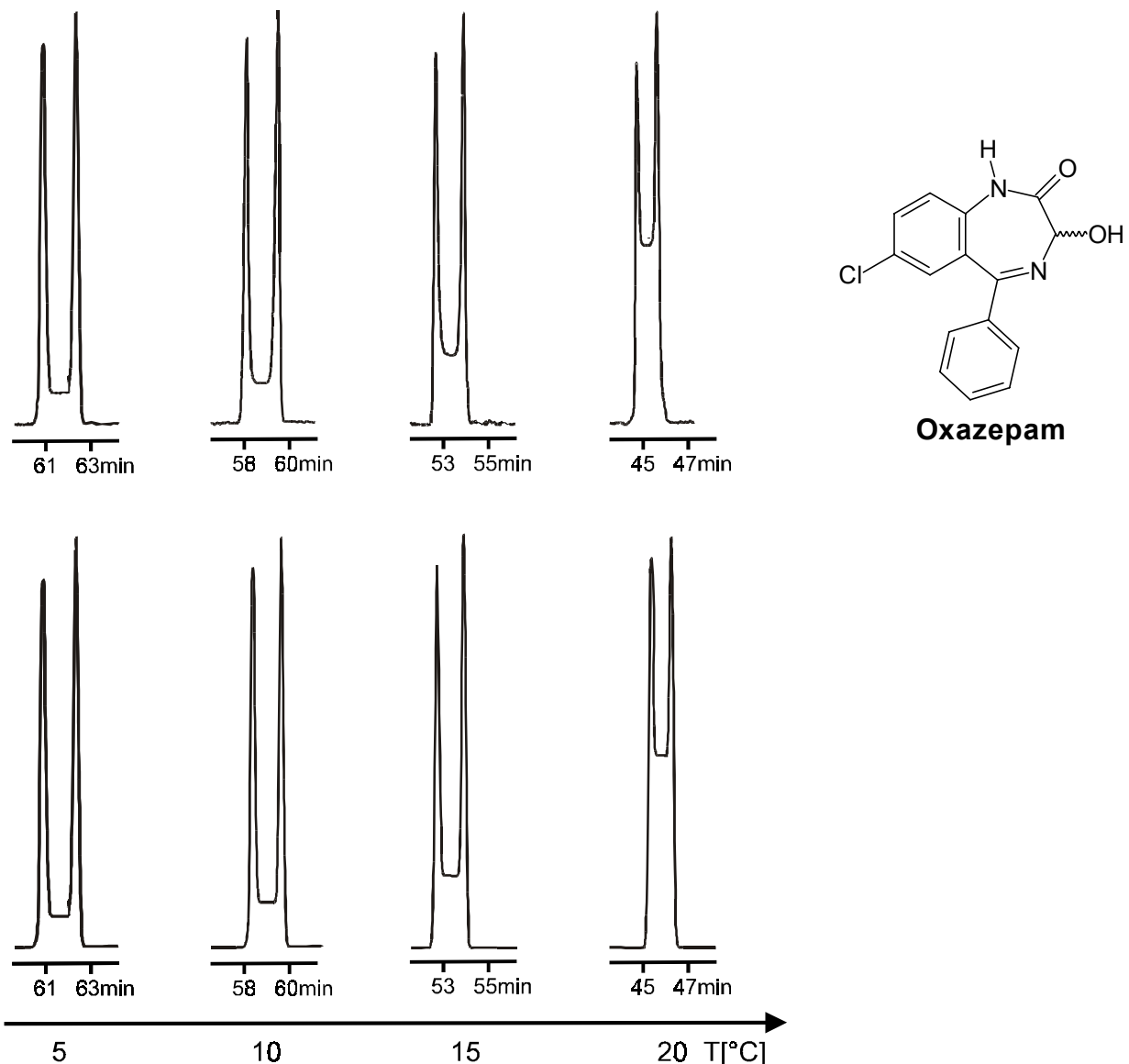


Abbildung 32: Beispiele für experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektrophorese-Chromatogramme der DMEKC Enantiomerentrennung von Oxazepam bei verschiedenen Temperaturen. Trennbedingungen: 60 mM Natriumcholat, 20 mM Borat/Phosphat Puffer, pH 8, U=25 kV, $\lambda=230$ nm.

Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde der Mittelwert aus mindestens 7 Messungen gebildet. Die Auswertung der experimentellen Elutionsprofile erfolgte sowohl mit dem theoretischen Bodenmodell (TPM) als auch mit dem modifizierten stochastischen Modell (SM+). Beispieldatensätze für die 124 ausgewerteten Elektrochromatogramme sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 9: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung von Oxazepam.

Nr.	pH	T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A\text{ eff.}}$	$N_{B\text{ eff.}}$	h_{Plateau} [%]	k_I^{app} [s ⁻¹]
1	7	5	48,6	49,7	41 000	54 000	11	$4,3 \cdot 10^{-5}$
2	7	10	42,5	43,3	60 000	67 000	18	$8,9 \cdot 10^{-4}$
3	7	15	36,4	37,1	71 000	84 000	31	$2,0 \cdot 10^{-4}$
4	7	20	33,4	34,0	115 000	85 000	53	$3,9 \cdot 10^{-4}$
5	8	5	46,0	47,0	79 000	100 000	11	$6,8 \cdot 10^{-5}$
6	8	10	39,9	40,7	100 000	132 000	15	$1,1 \cdot 10^{-4}$
7	8	15	52,9	54,3	192 000	248 000	25	$2,1 \cdot 10^{-4}$
8	8	20	45,7	46,7	190 000	221 000	44	$3,3 \cdot 10^{-4}$
9	9	5	52,8	54,0	129 000	167 000	6	$4,9 \cdot 10^{-5}$
10	9	10	45,7	46,7	94 000	132 000	11	$7,4 \cdot 10^{-5}$
11	9	15	39,2	40,0	70 000	75 000	20	$1,2 \cdot 10^{-4}$
12	9	20	33,9	34,4	138 000	139 000	48	$1,7 \cdot 10^{-4}$

Aus den scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten, die mittels Computersimulation (SM+) erhalten wurden, wurden Mittelwerte gebildet und diese zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger verwendet. Dazu wurde $\ln(k/T)$ als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen

(Abbildung 33) und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizienten: $r_{SM+/pH\ 7} = 0,9905$; $r_{SM+/pH\ 8} = 0,9964$; $r_{SM+/pH\ 9} = 0,9946$; Reststandardabweichungen: $s_{y/pH\ 7} = 0,1182$; $s_{y/pH\ 8} = 0,0620$; $s_{y/pH\ 9} = 0,0793$).

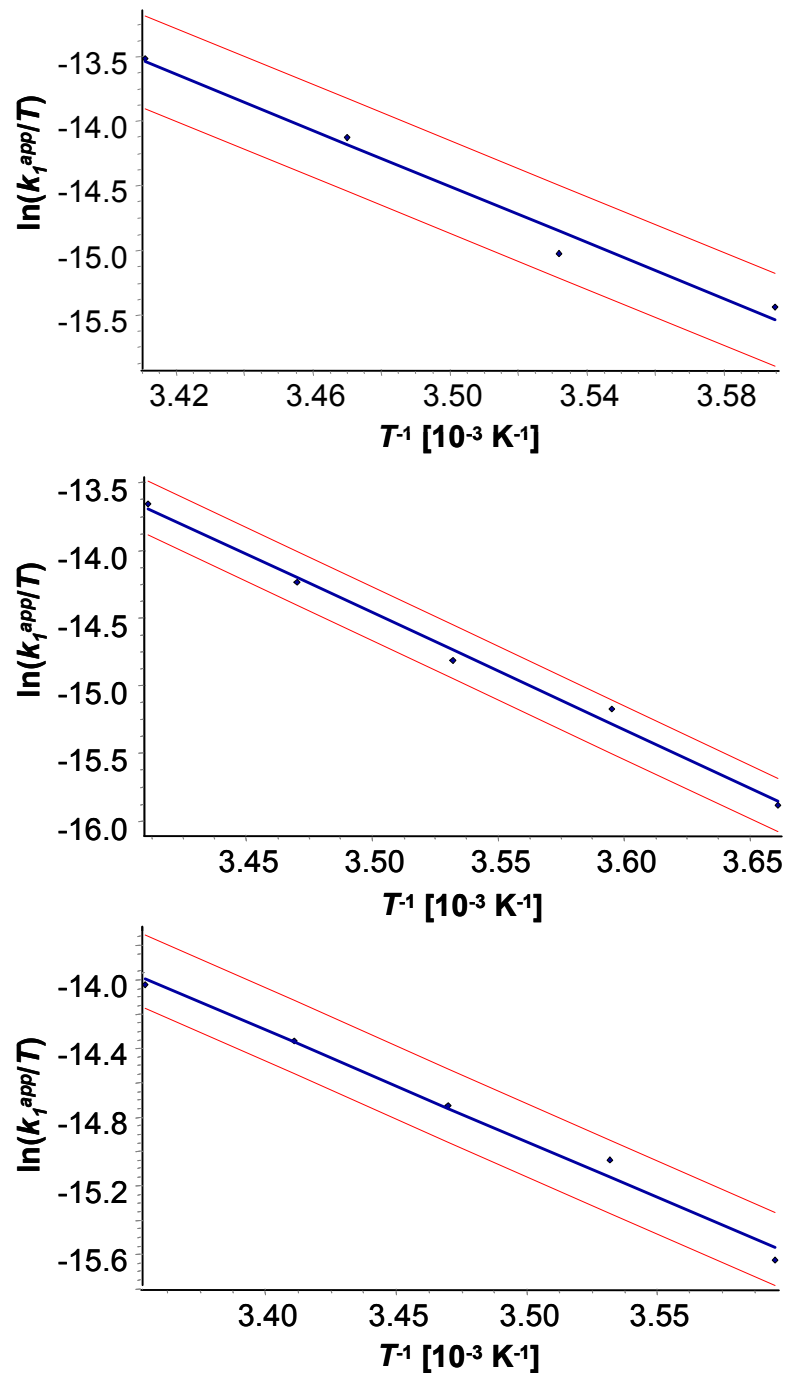


Abbildung 33: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_1^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von Oxazepam bei pH 7 (oben), pH 8 (Mitte), pH 9 (unten). Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

5.1.4. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Temazepam

Temazepam zeigt mit steigender Temperatur zwischen 5 und 30°C eine deutliche Plateaubildung (Abbildung 34) bei der Enantiomerentrennung in Gegenwart des Mizellenbildners Natriumcholat. Wie bei Oxazepam tritt auch hier bei 30°C Peakkoaleszenz ein, bei 0°C ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung so gering, dass eine Basislinientrennung auftritt.

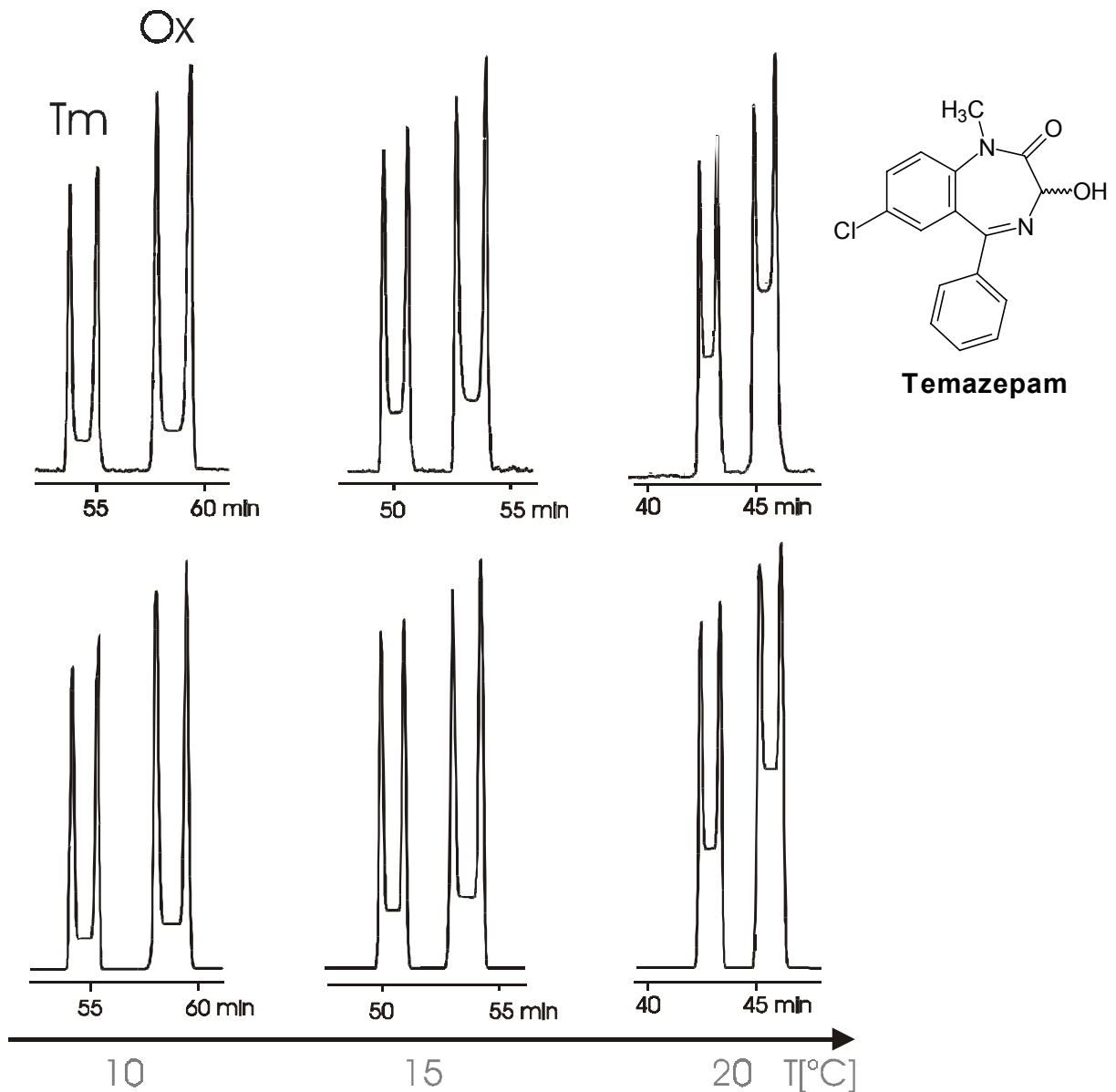


Abbildung 34: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektrochromatogramme der simultanen DMEKC Enantiomerentrennung von Temazepam (Tm) und Oxazepam (Ox). Trennbedingungen: 60 mM Natriumcholat, 20 mM Borat/Phosphat Puffer, pH 8, $U=25$ kV, $\lambda=230$ nm.

Die Auswertung der Elektchromatogramme der DMEKC Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem theoretischen Bodenmodell (TPM) und dem stochastischen Modell (SM+). Elektchromatogramme mit Plateauhöhen über 60% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt. Ausgewählte experimentelle und durch Computersimulation erhaltenen Daten sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Für die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde der Mittelwert aus mindestens 4 Messungen gebildet.

Tabelle 10: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung von Temazepam.

Nr.	pH	T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A\text{ eff.}}$	$N_{B\text{ eff.}}$	h_{Plateau} [%]	k_I^{app} [s ⁻¹]
1	7	5	51,9	53,1	135 000	119 000	7	$4,6 \cdot 10^{-5}$
2	7	10	43,3	44,1	153 000	167 000	12	$9,1 \cdot 10^{-5}$
3	7	15	40,5	41,3	126 200	89 000	21	$1,5 \cdot 10^{-4}$
4	7	20	32,8	33,2	183 000	179 000	30	$2,4 \cdot 10^{-4}$
5	8	5	56,8	57,7	338 000	203 000	5	$5,0 \cdot 10^{-5}$
6	8	10	53,2	54,5	157 000	149 000	11	$7,3 \cdot 10^{-5}$
7	8	15	49,6	50,7	225 000	240 000	18	$1,5 \cdot 10^{-4}$
8	8	20	43,2	44,1	280 000	320 000	34	$3,1 \cdot 10^{-4}$
9	9	5	51,2	52,1	356 000	193 000	6	$5,7 \cdot 10^{-5}$
10	9	10	41,1	41,9	158 000	178 000	10	$7,6 \cdot 10^{-5}$
11	9	15	36,8	37,5	151 000	196 000	18	$1,5 \cdot 10^{-4}$
12	9	20	33,6	34,1	73 000	113 000	32	$2,1 \cdot 10^{-4}$

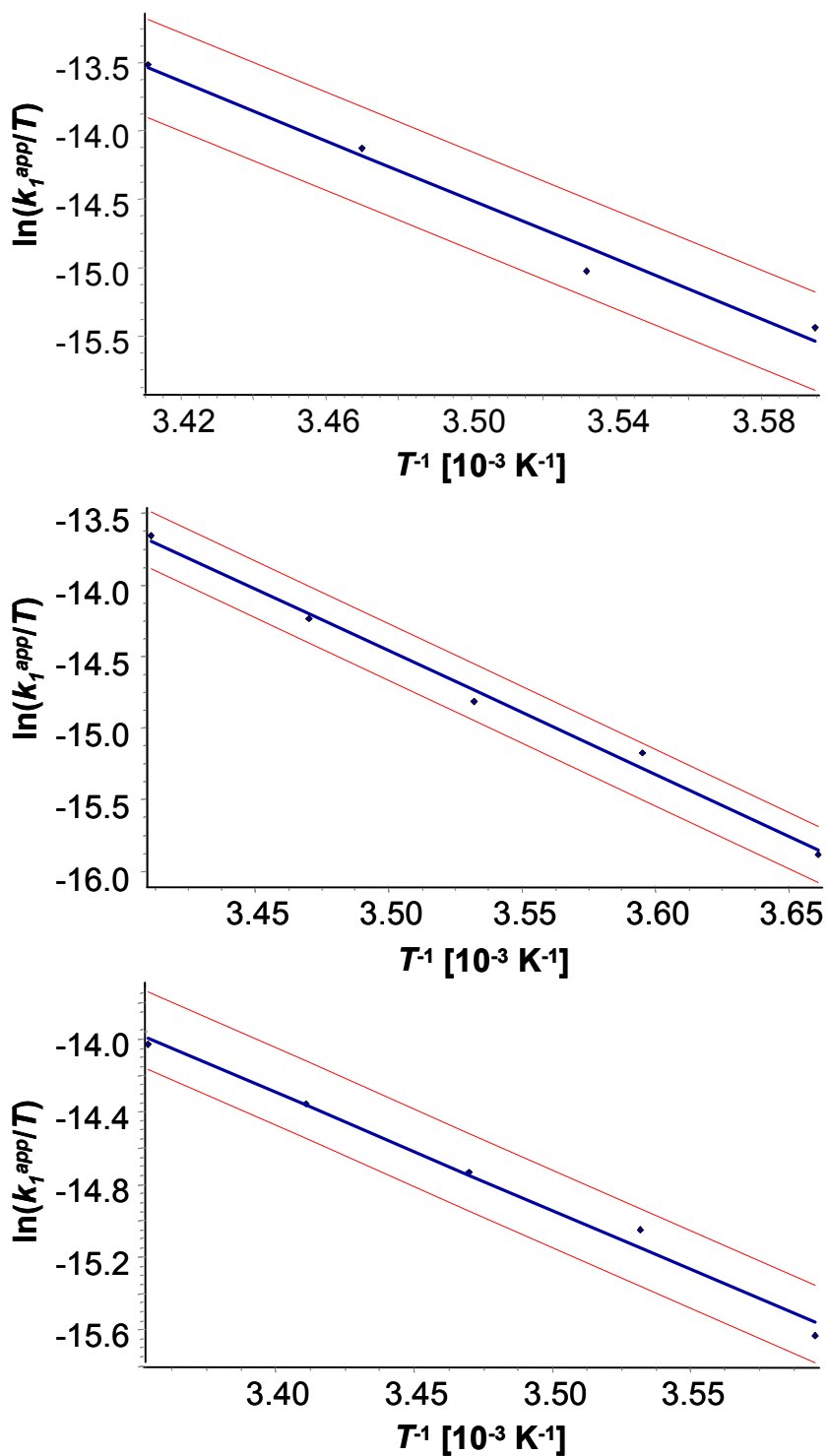
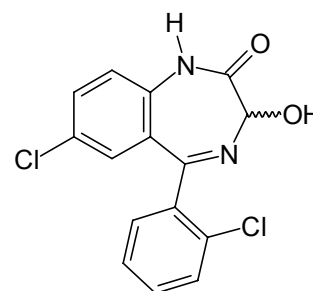


Abbildung 35: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_1^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von Temazepam bei pH 7 (oben), pH 8 (Mitte) und pH 9 (unten). Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (82 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen (Abbildung 35) und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizienten: $r_{SM+/pH\ 7} = 0,9924$; $r_{SM+/pH\ 8} = 0,9986$; $r_{SM+/pH\ 9} = 0,9922$; Reststandardabweichungen: $s_{y/pH\ 7} = 0,0882$; $s_{y/pH\ 8} = 0,0532$; $s_{y/pH\ 9} = 0,0827$).

5.1.5. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Lorazepam

Auch bei Lorazepam kann mit steigender Temperatur zwischen 5 und 25°C eine deutliche Plateaubildung (Abbildung 36) bei der Enantiomerentrennung in Gegenwart des Mizellenbildners Natriumcholat beobachtet werden. Bei Temperaturen über 25°C tritt Peakkoaleszenz ein, bei 0°C ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung so gering, dass eine Basislinientrennung der Enantiomere auftritt.



Lorazepam

Elektrochromatogramme mit Plateauhöhen über 50% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt. Für die Berechnung einer Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde jeweils der Mittelwert aus mindestens 4 Messungen gebildet.

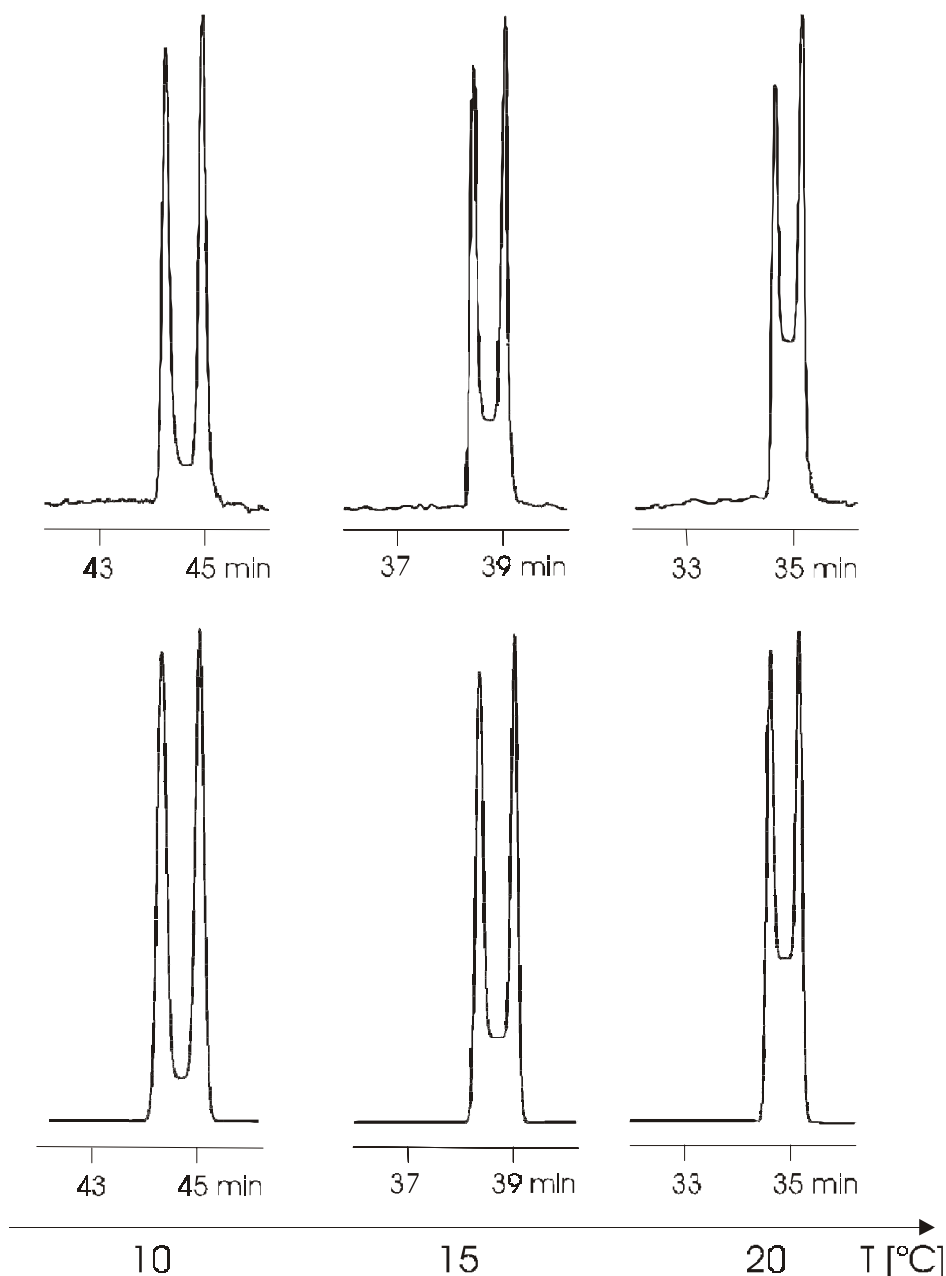


Abbildung 36: Beispiele für experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektrochromatogramme der Enantiomerentrennung von Lorazepam.
Trennbedingungen: 60 mM Natriumcholat, 20 mM Borat/Phosphat Puffer, pH 8, U=25 kV, $\lambda=230$ nm.

Die Auswertung der Elektrochromatogramme der DMEKC Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem theoretischen Bodenmodell (TPM) und dem stochastischen Modell (SM+). Ausgewählte experimentelle und durch Computersimulation erhaltenen Daten sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung von Lorazepam (pH 8).

T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A \text{ eff.}}$	$N_{B \text{ eff.}}$	h_{Plateau} [%]	k_1^{app} [s ⁻¹]
10	44,5	45,1	209 000	241 000	9	$9,6 \cdot 10^{-5}$
15	38,4	39,0	214 000	268 000	25	$1,9 \cdot 10^{-4}$
20	34,7	35,2	236 000	270 000	42	$3,1 \cdot 10^{-4}$

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (36 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen (Abbildung 37) und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} = 0,9970$; Reststandardabweichung $s_y = 0,0415$).

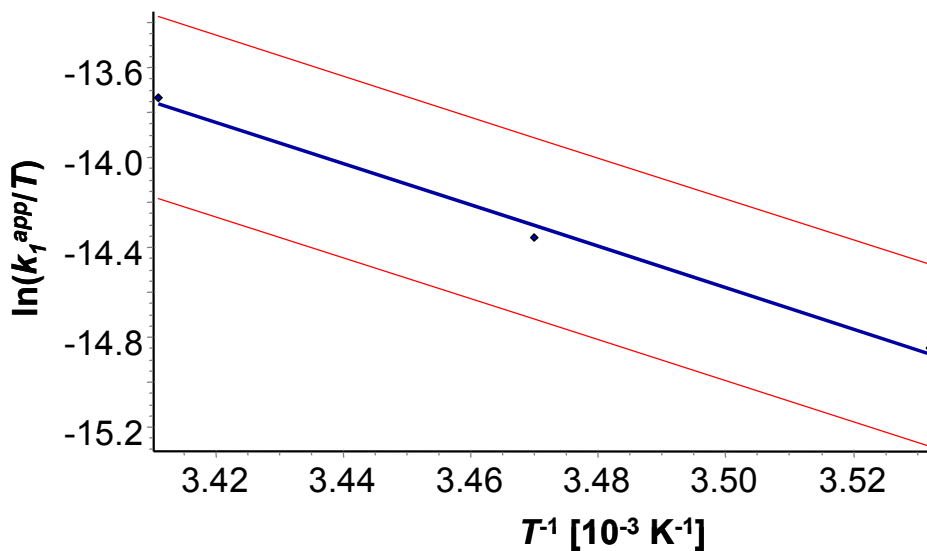


Abbildung 37: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_1^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von Lorazepam pH 8. Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

5.1.6. Ergebnis

Aus den beschriebenen Eyring-Plots lassen sich die in der nachfolgenden Tabelle zusammengefassten Aktivierungsparameter berechnen. Es ist bemerkenswert, dass die Werte für ΔG^\ddagger für die drei untersuchten Benzodiazepine vergleichbare Größe besitzen, während die Werte für die Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger sehr unterschiedlich sind.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Aktivierungsparameter der Enantiomerisierung von Oxazepam, Temazepam und Lorazepam bei 293 K.

	pH	ΔG^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J (K mol) ⁻¹]	k_I^{app} [10 ⁻⁴ s ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]
Oxazepam	7	90,9 ± 0,2	90,4 ± 0,6	-1,6 ± 12	7,3	16
	8	91,3 ± 0,1	72,0 ± 0,5	-65,8 ± 9	3,3	35
	9	93,6 ± 0,1	54,3 ± 0,6	-131,8 ± 8	2,5	46
Temazepam	7	92,3 ± 0,3	71,7 ± 0,6	-69,0 ± 7	4,3	27
	8	91,6 ± 0,2	90,5 ± 0,7	-3,9 ± 12	2,9	21
	9	92,9 ± 0,2	63,6 ± 0,6	-98,5 ± 14	3,2	36
Lorazepam	8	91,4 ± 0,1	76,5 ± 0,6	-50,9 ± 8	3,1	37

Die drei untersuchten Benzodiazepinderivate zeigen nur eine geringe Abhängigkeit der Enantiomerisierungsbarriere ΔG^\ddagger vom pH-Wert der Pufferlösung. Tendenziell ist eine leichte Erhöhung der Enantiomerisierungsbarriere ΔG^\ddagger und damit verbundenen Stabilisierung bei höheren pH-Werten beobachtbar. Im Gegensatz zu der nur geringen Änderung der Enantiomerisierungsbarriere ΔG^\ddagger in Abhängigkeit des pH-Wertes tritt für die Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger und Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger eine starke pH-Abhängigkeit auf. Auffällig sind in diesem Zusammenhang die stets negativen Werte für die Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger . Stark negative Werte für die Aktivierungsentropie weisen auf einen heterolytischen Interkonversions-

mechanismus unter Ladungstrennung im Übergangszustand hin [75,260,228-230]. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass durch die Solvatisierung eine nicht unerhebliche Stabilisierung der auftretenden Ladungen eintritt.

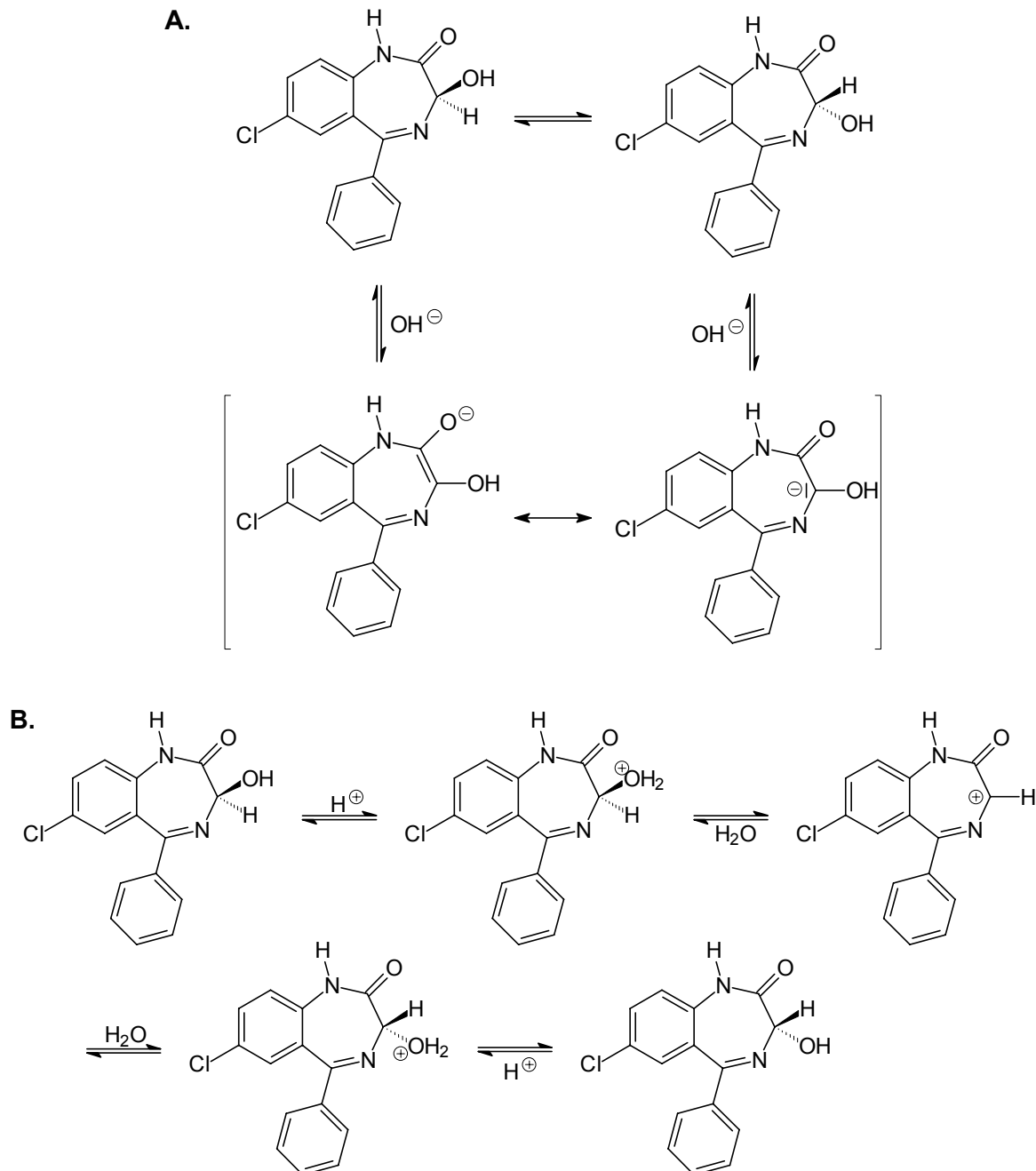


Abbildung 38: Mögliche Enantiomerisierungsmechanismen von Benzodiazepinen am Beispiel von Oxazepam. A: Basenkatalyse über eine Keto-Enol-Tautomerie; B: Säurekatalyse über einen S_N1 Mechanismus.

Die hier gefundenen Aktivierungsparameter lassen auf die in Abbildung 38 dargestellten Enantiomerisierungsmechanismen schließen. Je nach pH-Wert lässt sich ein Interkonversionsmechanismus durch Basenkatalyse über eine Keto-Enol-Tautomerie oder durch Säurekatalyse über einen S_N1 -Mechanismus formulieren. Dagegen lässt sich der von Yang diskutierte Mechanismus via Ringöffnung und Bildung einer ungeladenen achiralen Iminoaldehyd Zwischenstufe mit den hier gefundenen Daten nicht in Einklang bringen, da in diesem Fall eine pH-Abhängigkeit nicht zu erwarten wäre [222,231].

Ein Vergleich der hier bestimmten Enantiomerisierungsbarrieren mit solchen, die durch andere, unabhängige Methoden erhalten wurden, erlaubt eine Abschätzung der Genauigkeit und der Präzision der hier angewandten Methode. In Tabelle 13 sind die in der Literatur beschriebene Ergebnisse in einer Übersicht dargestellt. Es wurde eine hohe Übereinstimmung mit diesen Werten gefunden.

Tabelle 13: In der Literatur beschriebene Aktivierungsparameter für Benzodiazepine.

	Methode/ Versuchsbedingungen	<i>T</i> [K]	ΔG^\ddagger [kJ mol⁻¹]	<i>t</i>_{1/2} [min]	Lit.
Oxazepam	DHPLC/ Methanol/Phosphat Puffer/pH 2,8	298	89,0		224
Oxazepam	Ethanolysse/CD-Polarimetrie	298	92,1	12	208
Oxazepam	Racemisierung/HPLC	273	90,6*	~430	214
Oxazepam	Ethanolysse/HPLC/ 0,1 M H ₂ SO ₄	298	94,6	56	218
Temazepam	Ethanolysse/ CD-Polarimetrie	298	95,0	39	208
Temazepam	Ethanolysse/HPLC/ CD-Polarimetrie/0,5M H ₂ SO ₄	298	90,8	13	223
Lorazepam	Ethanolysse/HPLC	298		17	222

* Aus der in der Literatur angegebenen Geschwindigkeitskonstante berechnet.

Die Präzision der DMEKC Experimente wurde wie folgt bestimmt: Jedes Experiment wurde mindestens 4 mal unter den gleichen experimentellen Bedingungen wiederholt. Es zeigte sich eine gute Wiederholbarkeit der Experimente ($2,93 \sigma$ (Standardabweichung); Fehler für ΔG^\ddagger (10°C) = $0,41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Die Präzision der Experimente wurde nach 6 Monaten (nur für Oxazepam, pH 8) mit einem identischen System und einer neuen Kapillare erneut bestimmt. Innerhalb der bestimmten Fehlergrenzen konnte die gleiche Enantiomerisierungsbarriere bestimmt werden.

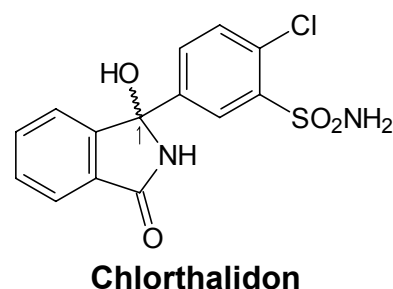
Anhand der in dieser Arbeit erstmals durchgeführten DMEKC-Experimente am Beispiel der Benzodiazepinderivate konnten außer den Enantiomerisierungsbarrieren auch die Aktivierungsparameter zuverlässig bestimmt werden. Dies wurde durch die große Anzahl an Experimenten und die rasche Auswertung der erhaltenen Daten möglich. Für die Aufklärung von Interkonversionsmechanismen ist die Ermittlung von zuverlässigen Aktivierungsparametern eine notwendige Voraussetzung.

5.2. Chlorthalidon

5.2.1. Allgemeines

Chlorthalidon (2-Chlor-5-(1-hydroxy-3-oxo-1-isoindolinyl)-benzensulfonamid) ist ein Diuretikum und Antihypertensivum aus der Gruppe der Thiazidanaloga. Bedingt durch die Hydroxy-Gruppe und die Nachbarschaft zu einer sekundären Aminofunktion sowie zweier Phenylringe, die eine positive Ladung stabilisieren können, ergibt sich in saurem Milieu ein stereolabiles Chiralitätszentrum an C-Atom 1.

Die Enantiomerisierung von Chlorthalidon wurde bereits von Severin [232] und Cabrera *et al.* [224] untersucht. Severin beschreibt die Racemisierung von Chlorthalidon in wässriger Lösung und bestimmt die Kinetik mittels konventionellen Methoden. Cabrera *et al.* verwenden dynamische HPLC in Gegenwart der CSP ChiraDex und untersuchen die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration. Jedoch konnten diese Autoren aufgrund der geringen Anzahl an durchgeführten Experimenten und der Messung bei nur einer Temperatur keine Aktivierungsparameter angeben, die den vorgeschlagenen Enantiomerisierungsmechanismus untermauern.



Die Trennung von Chlorthalidon Enantiomeren mit einem dualen Erkennungssystem bestehend aus den neutralen und anionischen Cyclodextrinderivaten Dimethyl- β -cyclodextrin und Carboxymethyl- β -cyclodextrin wird von Fillet *et al.* beschrieben [92]. Dieses hervorragend geeignete Selektorgemisch wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet, jedoch wurde die Konzentration der Cyclodextrine optimiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die enantioselektive DEKC und Computersimulation der Elutionsprofile zur Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Chlorthalidon angewandt [87]. Als Puffer wurde ein 100 mM Phosphat/Citrat-Puffer verwendet. Das Selektorgemisch wurde nur auf der Injektionsseite (Kathode) angewandt, die Selektorkonzentration betrug für jedes

der Cyclodextrine $12,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Messtemperatur lag zwischen 15 und 50°C und wurde mit dem bereits beschriebenen Temperiersystem eingestellt. Als Detektor wurde ein UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 230 nm verwendet. Die effektive Säulenlänge betrug für alle Versuche 95 cm bei einem Kapillarinne Durchmesser von $50 \text{ }\mu\text{m}$. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch und die Messspannung betrug -30 kV . Zusätzlich wurde noch ein Druck von 50 mbar an der Kathodenseite angelegt, um die Migrationszeiten zu verkürzen.

Die Auswertung der experimentellen Elektrochromatogramme erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin unter Verwendung des stochastischen Modells (SM+). Für die Berechnung der Aktivierungsparameter wurden Mittelwerte aus jeweils mindestens 9 Messungen gebildet und diese einer statistischen Analyse unterzogen. Durch die Verwendung eines niedrigen pH-Wertes in Verbindung mit einer hohen Ionenstärke des Puffers wurde eine deutliche Verringerung des EOFs, der der Migrationsrichtung des negativ geladenen Cyclodextrins entgegengesetzt ist, erreicht. Ein Beweis für die beinahe vollständige Unterdrückung des EOFs oder zumindest die schnellere Wanderungsgeschwindigkeit des negativ geladenen Cyclodextrins sind die langen Migrationszeiten. Zur Simulation wurden die totalen Migrationszeiten anstelle der reduzierten Migrationszeiten verwendet, da die Durchflusszeit des EOF Markers länger als die Migrationszeiten der Analyten war.

5.2.2. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Chlorthalidon

Chlorthalidon zeigt mit steigender Temperatur zwischen 15 und 45°C eine deutliche Plateaubildung (Abbildung 39) bei der Enantiomerentrennung in Gegenwart eines Gemisches aus den neutralen und anionischen Cyclodextrinderivaten Dimethyl- β -cyclodextrin und Carboxymethyl- β -cyclodextrin. Bei 50°C tritt Peakkoaleszenz ein, bei Temperaturen unterhalb 15°C ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung so gering, dass eine Basislinientrennung der Enantiomere auftritt. Elektrochromatogramme mit

Plateauhöhen über 50% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt.

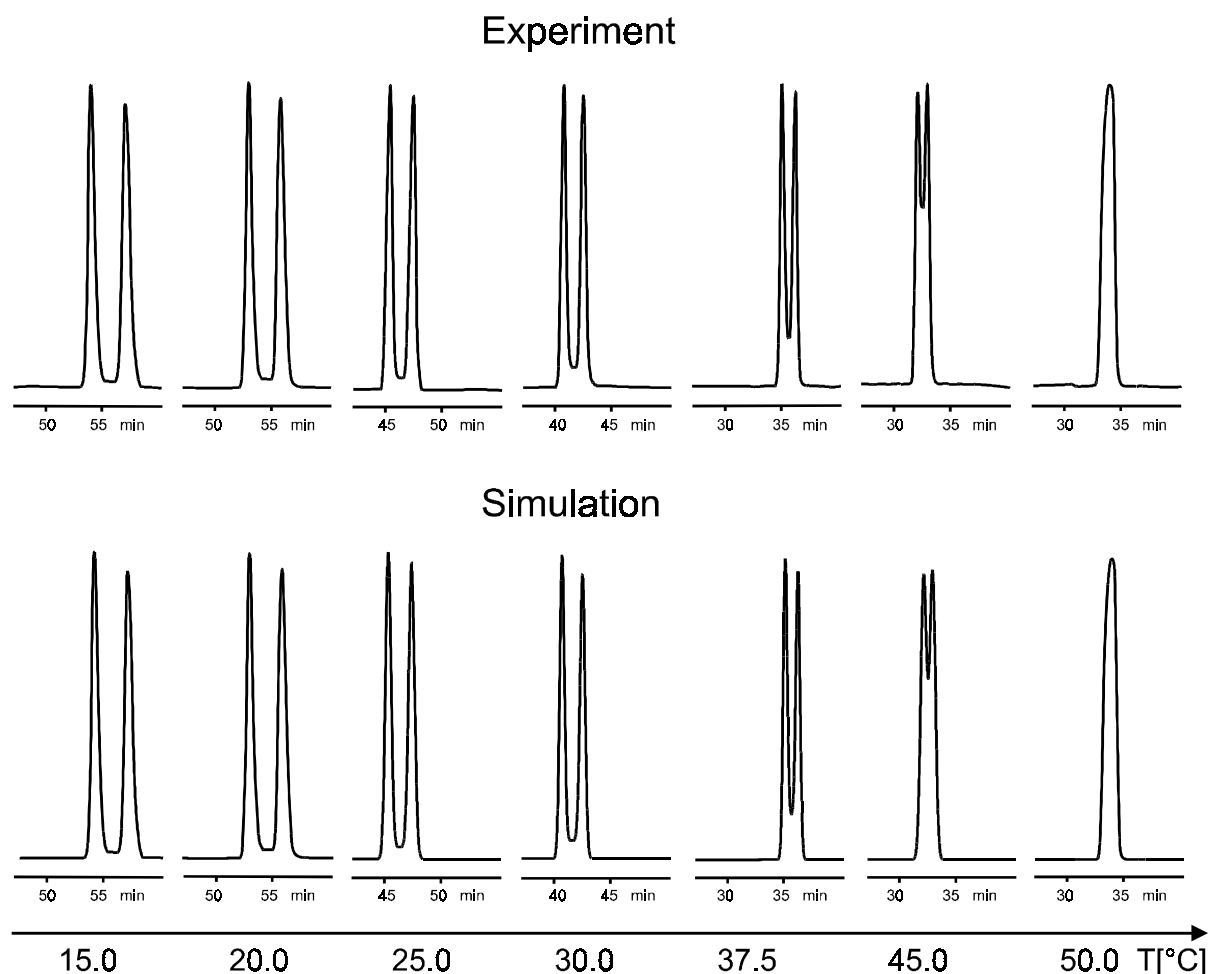


Abbildung 39: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektrochromatogramme der DEKC Enantiomerentrennung von Clorothalidon bei verschiedenen Temperaturen.

Trennbedingungen: 12,5 mg/ml Dimethyl- β -cyclodextrin und

12,5 mg/ml Carboxymethyl- β -cyclodextrin, 100 mM Citrat/Phosphat Puffer, pH 5,

$U=-30$ kV, $p = 50$ mbar, $\lambda=230$ nm

Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde der Mittelwert aus mindestens 9 Messungen gebildet.

Die Auswertung der Elektrochromatogramme der DEKC-Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem stochastischen Modell (SM+). Ausgewählte experimentelle und durch Computersimulation erhaltene Daten sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung von Chlorthalidon.

T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A\text{ eff.}}$	$N_{B\text{ eff.}}$	h_{Plateau} [%]	k_1^{app} [s ⁻¹]
15,0	54,0	57,2	32 500	30 100	1,4	$9,1 \cdot 10^{-6}$
20,0	52,6	55,4	36 300	33 400	2,7	$1,7 \cdot 10^{-5}$
25,0	45,1	47,2	34 400	32 000	3,7	$2,3 \cdot 10^{-5}$
30,0	40,7	42,5	43 100	40 400	5,8	$4,1 \cdot 10^{-5}$
37,5	34,9	36,1	37 600	36 200	15,3	$8,8 \cdot 10^{-5}$
45,0	32,2	33,0	18 300	19 500	58,2	$1,2 \cdot 10^{-4}$
50,0	33,8	-	10 000	-	100,0	$2,2 \cdot 10^{-4}$

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (78 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen (Abbildung 40) und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} = 0,9965$; Reststandardabweichung $s_y = 0,0493$).

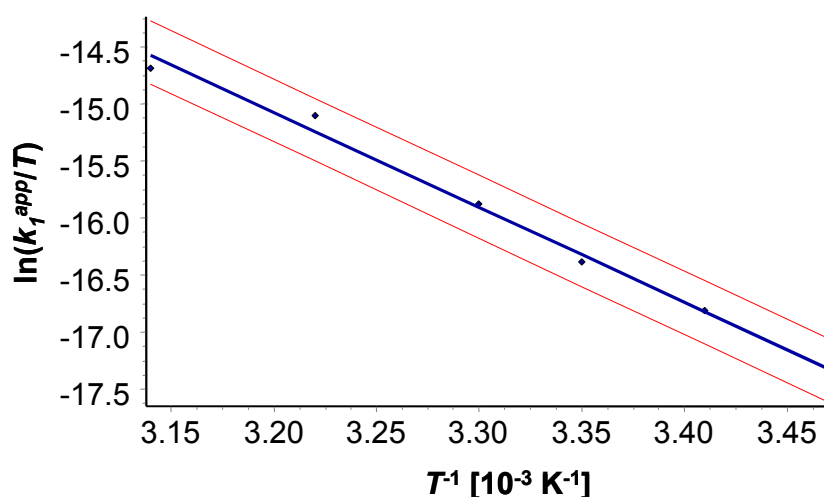


Abbildung 40: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_1^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von Chlorthalidon. Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots wurden die Aktivierungsparameter zu $\Delta H^\ddagger = 69,2 \pm 0,2 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^\ddagger = -101 \pm 6 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ berechnet. Eine Zusammenfassung der Gibbsschen Freien Energie ΔG^\ddagger , der Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} und den Halbwertszeiten τ bei unterschiedlichen Temperaturen T ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 15: Ergebnisse der DEKC-Experimente und Computersimulationen der Enantiomerisierung von Chlorthalidon.

T [°C]	ΔG^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	k_I^{app} [s ⁻¹]	$t_{1/2}$
15	98,4 ± 0,2	$8,7 \cdot 10^{-6} \pm 0,5 \cdot 10^{-6}$	22 h 9 min
20	98,9 ± 0,6	$1,5 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	13 h 18 min
25	99,4 ± 0,1	$2,4 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	8 h 7 min
30	99,9 ± 0,1	$3,8 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	5 h 2 min
37	100,6 ± 0,4	$7,6 \cdot 10^{-5} \pm 0,1 \cdot 10^{-5}$	2 h 32 min
45	101,4 ± 0,5	$1,5 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$	1 h 19 min
50	102,0 ± 0,5	$2,2 \cdot 10^{-4} \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$	52 min

5.2.3. Ergebnis

Das Auftreten einer negativen Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger , trotz Stabilisierung der auftretenden Ladung durch Solvatation, lässt auf einen Interkonversionsmechanismus unter Bindungsbruch schließen. Die Protonierung der Hydroxygruppe an C-Atom 1 unter Wasserabspaltung führt zu einem resonanzstabilisiertem Carbokation mit einem planaren sp²-hybridisierten Atom C1. Unter Eliminierung eines Protons kann mit Hilfe des freien Elektronenpaares am benachbarten Stickstoff eine Doppelbindung ausgebildet werden, die zu einer ungeladenen Zwischenstufe **2** führt.

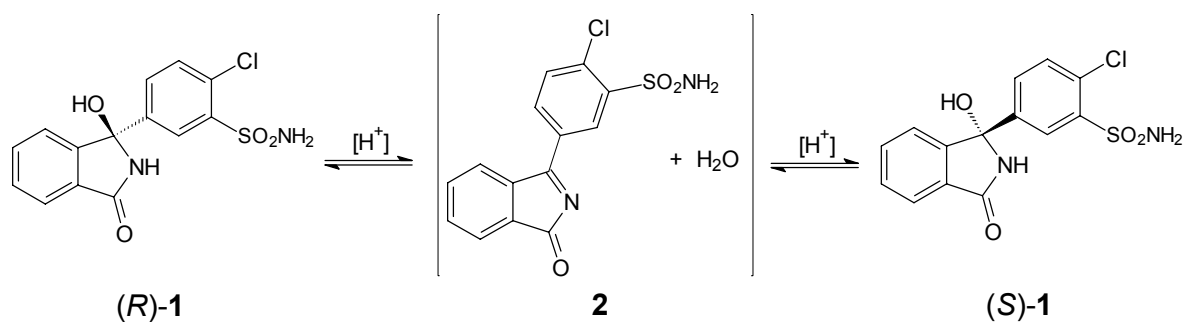


Abbildung 41: Möglicher Enantiomerisierungsmechanismus von Chlorthalidon. Säurekatalysierte Eliminierung von Wasser.

Um diesen Mechanismus zu untermauern, wurden die Strukturen **(R)-1** und **2** mit HyperChem berechnet. Zuerst wurde unter Verwendung der MM+ Kraftfeldmethode [233] eine Strukturoptimierung durchgeführt. Anschließend wurden die Strukturen mit der semiempirischen AM1 Methode [234-236] verfeinert. Der berechnete Unterschied der Bildungsenthalpie ΔH_f zwischen Struktur **(R)-1** und **2** beträgt 320 kJ mol^{-1} . Berücksichtigt man die Bildung von Wasser wird die Reaktionsenthalpie ΔH_f auf 72 kJ mol^{-1} verringert. Dieser berechnete Wert ist in guter Übereinstimmung mit der experimentell gefundenen Aktivierungsenthalpie von $\Delta H^\ddagger = 69,2 \text{ kJ mol}^{-1}$.

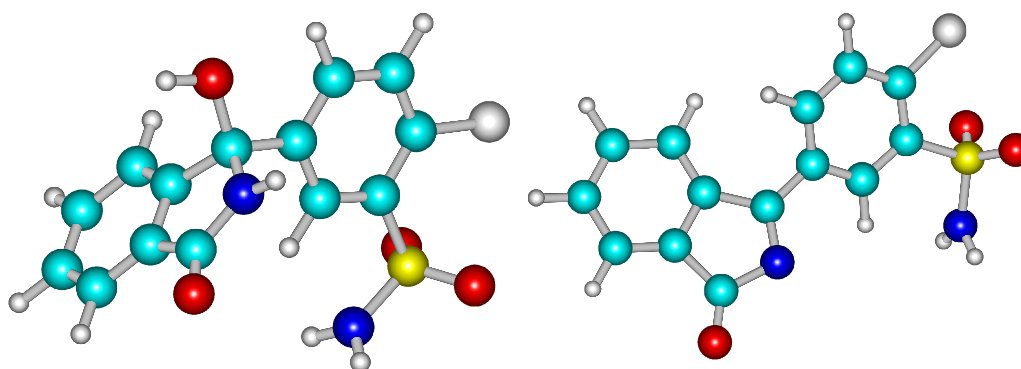


Abbildung 42: AM1 Optimierte Strukturen von (R)-1 und Zwischenstufe 2.

Ein Vergleich der hier bestimmten der Enantiomerisierungsbarrieren mit solchen, die durch andere, unabhängige Methoden erhalten wurden, erlaubt eine Bestimmung der Genauigkeit und der Präzision der hier angewandten Methode. In Tabelle 16 sind die in der Literatur beschriebene Ergebnisse in einer

Übersicht dargestellt. Es ist eine Abweichung der gefundenen Enantiomerisierungsbarriere ΔG^\ddagger von den bisher gefundenen Werten bei 15°C zu beobachten. Die in der Literatur beschriebenen Werte für 45°C stimmen jedoch gut mit den hier erhaltenen Daten überein. Ein wahrscheinlicher Grund für die Unterschiede in den beschriebenen Daten ist die ausgeprägte pH-Abhängigkeit sowie der mögliche katalytische oder inhibitive Einfluss von organischen Modifiern, den Puffersubstanzen oder den chiralen Selektoren.

Tabelle 16: In der Literatur beschriebene Aktivierungsparameter für Chlorthalidon.

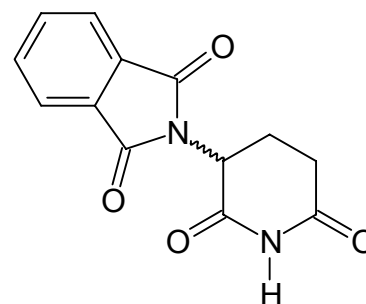
Methode/ Versuchsbedingungen	<i>T</i> [°C]	ΔG^\ddagger [kJ mol⁻¹]	k_1^{app} [s⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	Lit.
HPLC ChiraDex/ Methanol-Wasser: 1-4	15	84,5 ± 0,5	1,7 · 10 ⁻³	7	224
HPLC ChiraDex/ Methanol- TEAA pH 4,1 (2:98, v/v)	45	99,9 ± 0,5	1,5 · 10 ⁻⁴	77	224
Racemisierung/Wasser	15	88,3	3,0 · 10 ⁻⁴	38	232

Die Präzision der DMKC Experimente wurde wie folgt bestimmt: Jedes Experiment wurde mindestens 9 mal unter den gleichen experimentellen Bedingungen wiederholt. Es zeigte sich eine gute Wiederholbarkeit der Experimente (2,93 σ (Standardabweichung); Fehler für ΔG^\ddagger (25°C) = 0,10 kJ·mol⁻¹).

5.3. Thalidomid

5.3.1. Allgemeines

Thalidomid (2-(2,6-Dioxo-3-piperidiny)-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-dione) war zwischen 1956 und 1962 ein vielbenutztes Sedativum. Bedingt durch die teratogenen Nebenwirkungen wurde es nach wenigen Jahren vom Markt genommen. Heute ist es als Immunsuppressivum und Analgetikum wieder zugelassen und wird unter anderem zur Behandlung von Krebs, Lepra und Aids eingesetzt.



Thalidomid

Die Enantiomerisierung von Thalidomid kann über eine basenkatalysierte Keto-Enol-Tautomerisierung unter Beteiligung der Oxo-Gruppe am Piperidin-Ring ablaufen. Erste Untersuchungen zur konfigurativen Stabilität und den unterschiedlichen Eigenschaften der Enantiomere wurden von Blaschke *et al.* [237] durchgeführt. In der Literatur wurden anschließend viele weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zur Enantiomerisierung von Thalidomid beschrieben [238-244]. Dynamische chromatographische Untersuchungen wurden bisher nicht unternommen. Chromatographische Enantiomerentrennungen sind in der Literatur für GC [245], SFC [245], HPLC [239,243,246-250] und elektrokinetische chromatographische [251-253] Methoden beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde die enantioselektive DEKC und Computersimulation der Elutionsprofile zur Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Thalidomid angewandt [89]. Zum Vergleich wurde Thalidomid auch mittels DGC in Gegenwart der CSP Heptakis-(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-2,3-*O*-dimethyl)- β -cyclodextrin, gelöst in PS086, (10 m \times 0,25 mm I.D.; 0,25 μ m Filmdicke) in einem Temperaturbereich zwischen 180 und 220°C untersucht [254]. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Messungen stellen die erste Bestimmung der Interkonversionsbarriere und der Aktivierungsparameter von Thalidomid dar.

Für die DEKC-Experimente wurde ein 50 mM Phosphat-Puffer verwendet. 20 mg·ml⁻¹ Carboxymethyl- β -cyclodextrin wurden als chiraler Selektor auf der Injektionsseite (Anode) eingesetzt. Der Temperaturbereich der Messung lag zwischen 25 und 60°C und wurde mit dem bereits beschriebenen Temperiersystem eingestellt. Zur Detektion wurde ein UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 230 nm verwendet. Die effektive Säulenlänge betrug für alle Versuche 95 cm bei einem Kapillarinne Durchmesser von 50 μ m. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch, und die Messspannung betrug 25 kV.

Die Auswertung der experimentellen Elektrochromatogramme (DEKC) und Chromatogramme (DGC) erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin unter Verwendung des stochastischen Modells (SM+) und der Approximationsfunktion (AF). Dieses Beispiel stellt die erste Anwendung einer direkten Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere aus den Parametern eines Elektrochromatogramms mit der Approximationsfunktion dar. Für die Bestimmung der Aktivierungsparameter wurden Mittelwerte aus jeweils mindestens 3 Messungen gebildet und diese einer statistischen Analyse unterzogen.

5.3.2. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Thalidomid mittels DEKC

Thalidomid zeigt mit steigender Temperatur zwischen 25 und 55°C eine deutliche Plateaubildung (Abbildung 43) bei der Enantiomerentrennung in Gegenwart von Carboxymethyl- β -cyclodextrin. Bei 60°C tritt Peakkoaleszenz ein, bei Temperaturen unterhalb 25°C ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung so gering, dass eine Basislinientrennung der Enantiomere auftritt. Elektrochromatogramme mit Plateauhöhen über 60% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt.

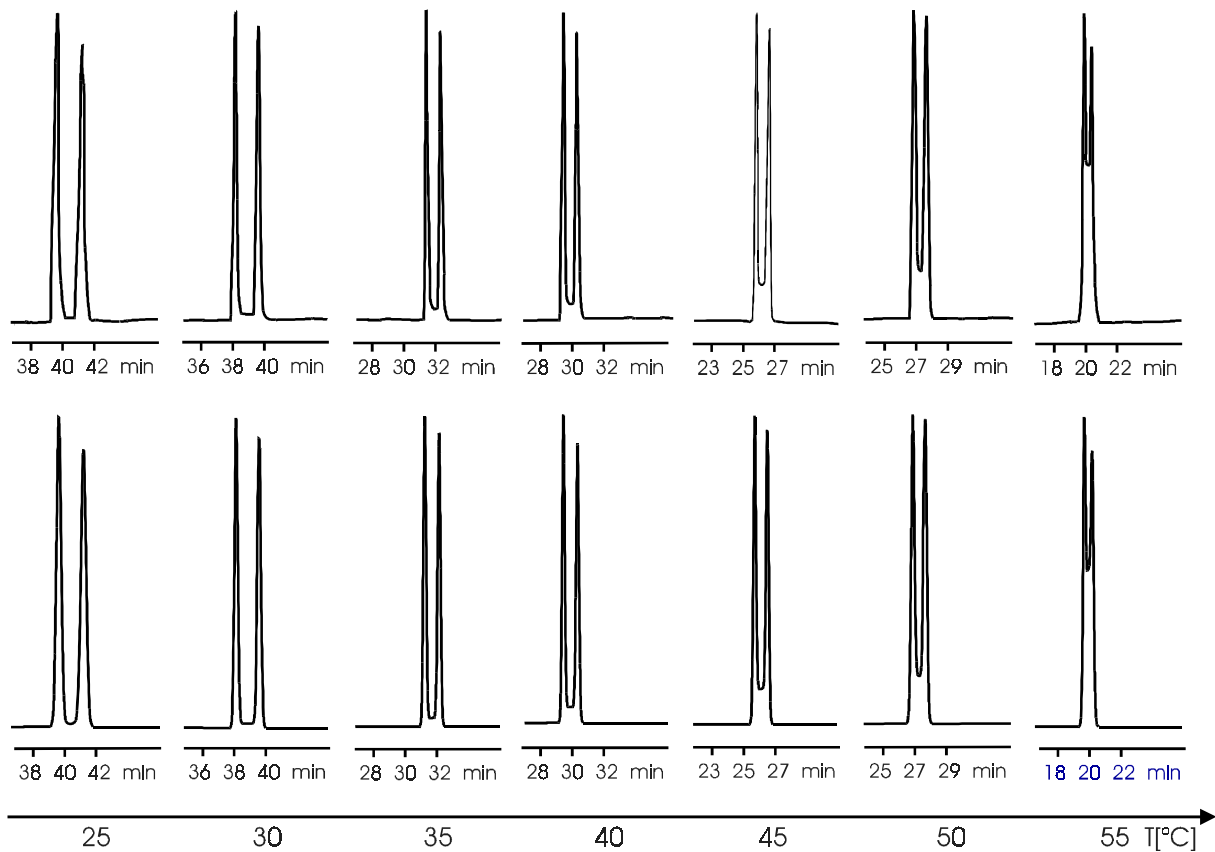


Abbildung 43: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektrochromatogramme der DEKC Enantiomerentrennung von Thalidomid bei verschiedenen Temperaturen. Trennbedingungen: 20 mg/ml Carboxymethyl- β -cyclodextrin, 50 mM Phosphat Puffer, pH 8, $U=25$ kV, $\lambda=230$ nm.

Die Auswertung der Elektrochromatogramme der DEKC-Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem stochastischen Modell (SM+) und der Approximationsfunktion (AF). Ausgewählte experimentelle und durch Computersimulation erhaltene Daten sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (28 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen (Abbildung 44) und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} = 0,9954$; Reststandardabweichung $s_y = 0,1430$).

Tabelle 17: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ und AF erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung von Thalidomid aus den DEKC-Experimenten erhalten wurden.

T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A\text{ eff.}}$	$N_{B\text{ eff.}}$	h_{Plateau} [%]	$k_I^{\text{app}}(\text{SM+})$ [s ⁻¹]	$k_I^{\text{app}}(\text{AF})$ [s ⁻¹]
25	39,4	40,9	36 200	32 300	1,1	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$
30	38,1	39,5	47 000	47 000	1,6	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$
35	31,3	32,1	55 000	53 800	2,6	$3,0 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$
40	29,0	29,8	65 000	63 000	5,1	$6,4 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-5}$
45	27,2	27,9	51 300	58 800	12,0	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$
50	25,0	25,6	65 000	63 000	16,2	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$
55	20,6	21,0	62 400	47 600	52,4	$4,8 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-4}$

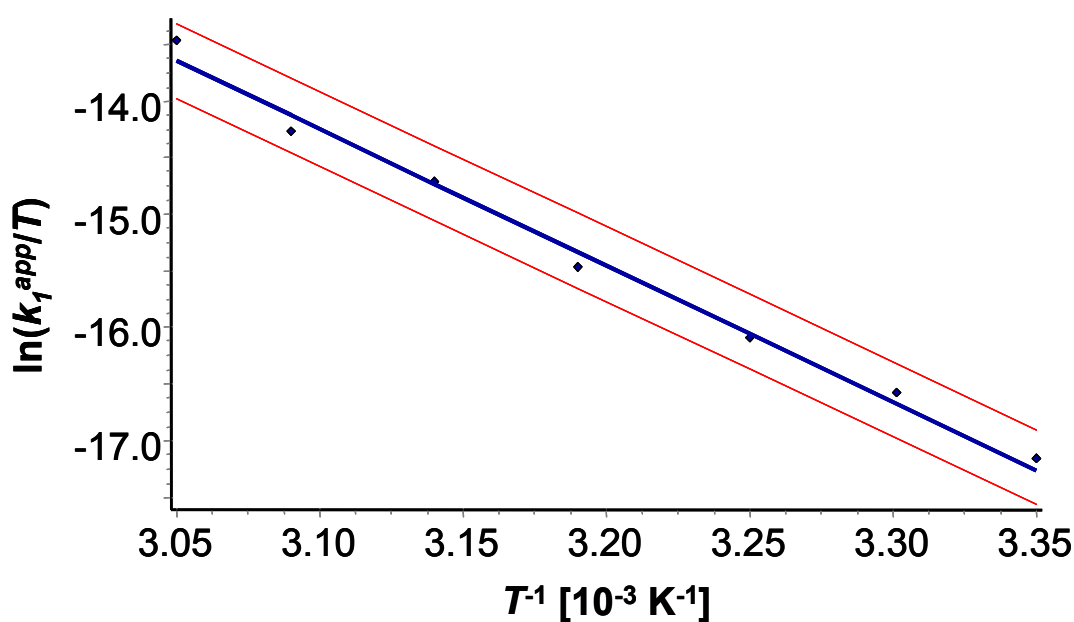


Abbildung 44: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von Thalidomid. Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots wurden die Aktivierungsparameter zu $\Delta H^\ddagger = 99 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^\ddagger = -8 \pm 3 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ berechnet. Eine Zusammenfassung der Interkonversionsbarriere ΔG^\ddagger , der Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} und den Halbwertszeiten τ bei unterschiedlichen Temperaturen T ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 18: Ergebnisse der DEKC-Experimente und Computersimulationen der Enantiomerisierung von Thalidomid.

T [°C]	ΔG^\ddagger (AF) [kJ mol ⁻¹]	ΔG^\ddagger (SM+) [kJ mol ⁻¹]	$t_{1/2}$
25	101,7 ± 0,2	101,7 ± 0,2	20h 54 min
30	101,8 ± 0,2	101,7 ± 0,2	10h 22 min
35	101,8 ± 0,2	101,8 ± 0,2	5h 23 min
50	101,8 ± 0,2	101,8 ± 0,2	2h 51min
45	101,9 ± 0,1	101,9 ± 0,1	1h 33 min
50	101,9 ± 0,1	101,9 ± 0,1	51min
55	102,0 ± 0,3	102,0 ± 0,3	29 min

5.3.3. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Thalidomid mittels DGC

Thalidomid zeigt auch in der Gaschromatographie eine Plateaubildung zwischen 180 und 220°C (Abbildung 45). Aufgrund der geringen Flüchtigkeit ist Thalidomid als Analyt für die Gaschromatographie allerdings nur sehr bedingt geeignet. Trotzdem wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche unternommen die Enantiomerisierungsbarriere von Thalidomid auch in der Gasphase zu bestimmen und mit den Ergebnissen aus dem DEKC-Experiment zu vergleichen. Das DGC-Experiment wurde mit einem Carlo-Erba Fractovap 2150 Gaschromatographen mit Split-Injektor (350°C) und Flammenionisationsdetektor (FID, 350°C) durchgeführt. Zur Enantiomerentrennung

wurde eine mit der CSP Heptakis-(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-*O*-dimethyl)- β -cyclodextrin, gelöst in PS086, belegte (0,25 μ m Filmdicke) Fused-Silica Kapillare (10 m \times 0,25 mm I.D.) eingesetzt. Als inertes Trägergas wurde Stickstoff verwendet. Alle Experimente wurden 3 mal unter identischen experimentellen Bedingungen wiederholt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Modell SM+ und der Methode „Enantiomerization FB II“ von ChromWin.

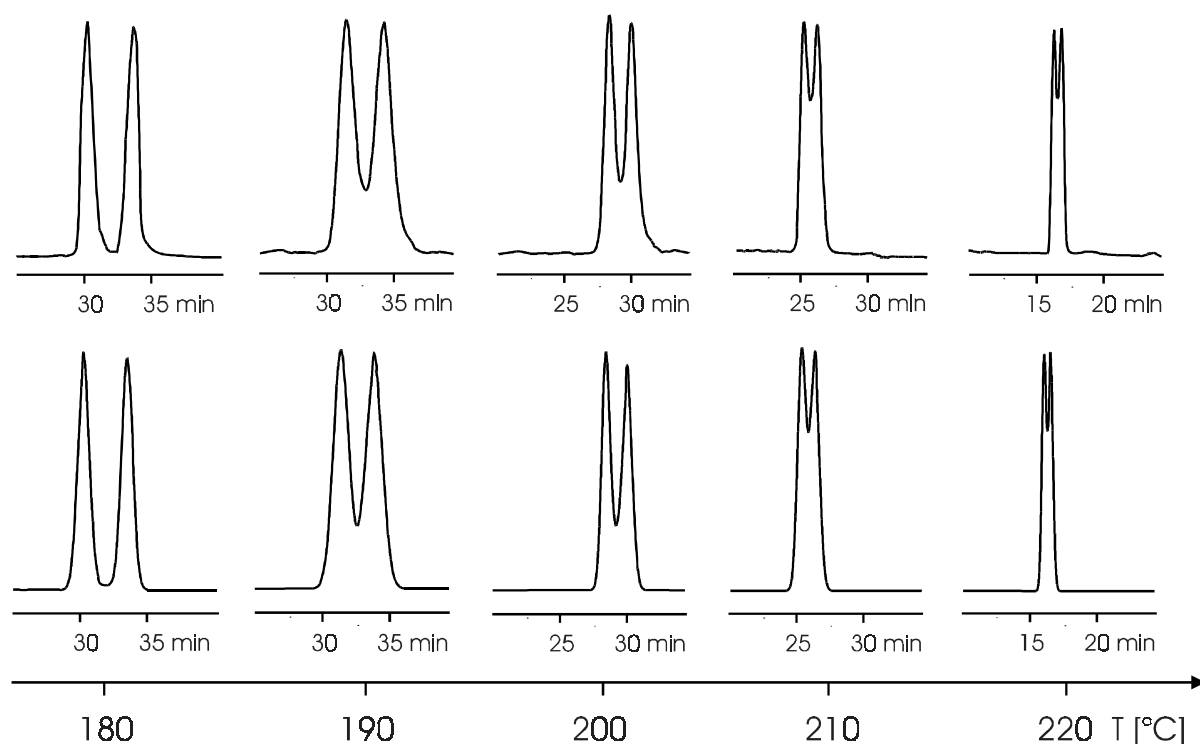


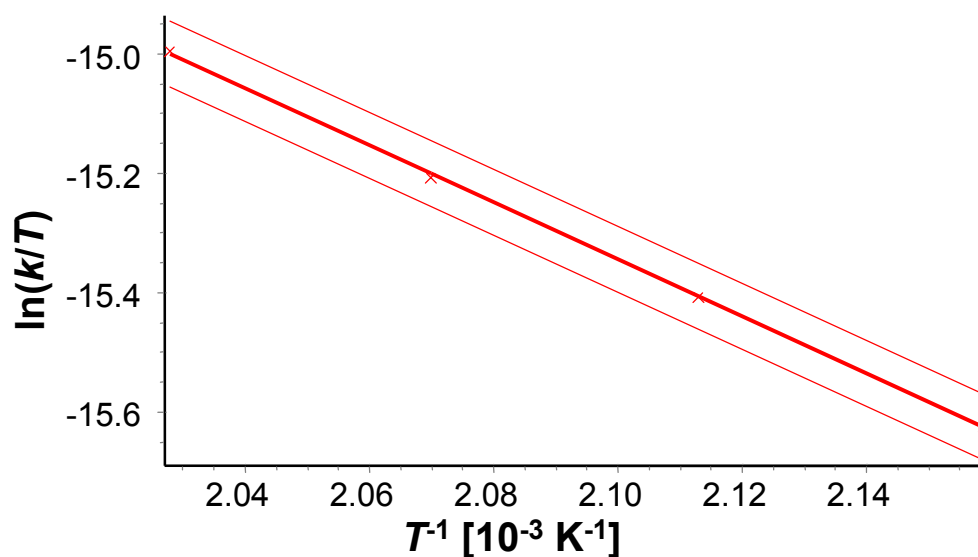
Abbildung 45: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Chromatogramme der DGC Enantiomerentrennung von Thalidomid bei verschiedenen Temperaturen. Säule: 10 m Heptakis-(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-*O*-dimethyl)- β -cyclodextrin gelöst in PS086 (0,25 mm I.D.; 0,25 μ m Filmdicke). Trägergas: N₂.

Die Auswertung der Chromatogramme der DGC Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem stochastischen Modell (SM+). Ausgewählte experimentelle und durch Computersimulation erhaltene Daten sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung von Thalidomid.

T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A\text{ eff.}}$	$N_{B\text{ eff.}}$	h_{Plateau} [%]	$k_I^{\text{app}}(\text{SM}+)$ [s ⁻¹]
180	31,5	33,5	4 600	4 200	26,7	$1,2 \cdot 10^{-4}$
190	28,7	30,3	7 700	7 600	33,7	$1,3 \cdot 10^{-4}$
200	25,4	26,4	7 900	6 900	51,8	$1,5 \cdot 10^{-4}$
210	16,6	17,2	8 300	8 900	66,1	$1,2 \cdot 10^{-4}$

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (15 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen (und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{\text{SM}+} = 0,9973$; Reststandardabweichung $s_y = 0,0283$).



Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von Thalidomid. Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots wurden die Aktivierungsparameter zu $\Delta H^\ddagger = 42 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^\ddagger = -246 \pm 16 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

berechnet. Die Enantiomerisierungsbarriere von Thalidomid wurde zusätzlich mittels stopped-flow GC (sfGC) bestimmt. Ein Vergleich der Interkonversionsbarrieren ΔG^\ddagger bei unterschiedlichen Temperaturen T , die mit den beiden Methoden bestimmt wurde, ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 20: Ergebnisse der DGC-Experimente und sfGC-Experimente der Enantiomerisierung von Thalidomid.

T [°C]	ΔG^\ddagger (DGC) [kJ·mol ⁻¹]	ΔG^\ddagger (sfGC) [kJ·mol ⁻¹]
200	154 ± 2	150 ± 3
210	157 ± 2	154 ± 2
220	159 ± 2	155 ± 3

Die Barrieren, die mit den beiden gaschromatographischen Methoden DGC und sfGC bestimmt wurden, korrelieren gut miteinander. Im Vergleich zu den erhaltenen Werten aus den DEKC-Experimenten wurden mit den gaschromatographischen Techniken deutlich höhere Werte für die Enantiomerisierungsbarriere erhalten. Dies lässt sich auf eine fehlende Stabilisierung der im Übergangszustand auftretenden Ladungen – im Falle einer Keto-Enol-Tautomerie – in Gegenwart der apolaren Polysiloxanmatrix der Stationärphase zurückführen.

5.3.4. Ergebnis

Das Auftreten einer schwach negativen Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger im wässrigen Milieu (DEKC) und einer stark negativen Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger in Gegenwart der apolaren Polysiloxanmatrix PS086 (DGC und sfGC) lässt sich mit einem Interkonversionsmechanismus unter Bindungsbruch und Ladungstrennung in Einklang bringen. Dies untermauert einen bereits von Schumacher *et al.* [255] vorgeschlagenen Mechanismus via Keto-Enol-

Tautomerisierung am Piperidinring, die zur Bildung eines planaren sp^2 -hybridisierten Übergangszustands führt (Abbildung 46). Die dabei auftretende Ladungstrennung (Wanderung eines Protons) und damit verbundene Entropieabnahme wird in Gegenwart von Wassermolekülen im Falle des DEKC-Experiments kompensiert. Die gefundene extrem negative Aktivierungsentropie aus den DGC und sfGC Experimenten stützen diesen Enantiomerisierungsmechanismus.

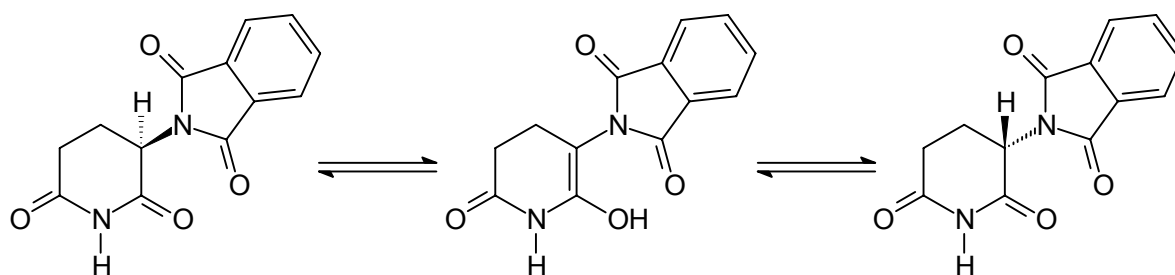


Abbildung 46: Vorgeschlagener Enantiomerisierungsmechanismus von Thalidomid in Lösung. Basenkatalysierte Keto-Enol-Tautomerisierung.

Ein Vergleich der hier bestimmten Enantiomerisierungsbarrieren mit solchen, die durch andere unabhängige Methoden erhalten wurden, ist im Falle von Thalidomid nicht möglich, da vergleichbare Daten in der Literatur fehlen.

Die Präzision der DEKC-Experimente wurde wie folgt bestimmt: Jedes Experiment wurde mindestens 3 mal unter den gleichen experimentellen Bedingungen wiederholt. Es zeigte sich eine gute Wiederholbarkeit der Experimente ($2,93 \sigma$ (Standardabweichung)); für ΔG^\ddagger (25°C) ergibt sich ein Fehler von $0,21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ im DEKC Experiment und für ΔG^\ddagger (210°C) ein Fehler von $2,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ im DGC Experiment. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten k_1^{app} für die Enantiomerisierung, die durch Computersimulation mit SM+ und durch direkte Berechnung mit der Approximationsfunktion (AF) ermittelt wurden, stimmen sehr gut überein (Tabelle 21). Bei kleineren Bodenzahlen und niedrigeren Temperaturen wurde eine bessere Übereinstimmung der Daten gefunden. Dies ist im Einklang mit den beschriebenen Eigenschaften der Approximationsfunktion [107].

Tabelle 21: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten die mit dem SM+ und der AF für die DEKC von Thalidomid berechnet wurden.

T [°C]	k_I^{app} (SM+) [s ⁻¹]	k_I^{app} (AF) [s ⁻¹]	Δk_I^{app} [s ⁻¹]
25	$9,4 \cdot 10^{-6}$	$9,4 \cdot 10^{-6}$	0
30	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	0
35	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	0
40	$6,7 \cdot 10^{-5}$	$6,7 \cdot 10^{-5}$	0
45	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	0
50	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-4}$
55	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$0,1 \cdot 10^{-4}$

6. Enantiomerisierung der Trögerschen Base

6.1. Allgemeines

Bereits 1890 übertrug Werner [256] die von van't Hoff [257] und LeBel [258] entwickelte Tetraedertheorie auf Verbindungen mit trivalentem pyramidalem Stickstoff. Meisenheimer *et al.* [259] unternahmen erste erfolglose Versuche asymmetrisch substituierte tertiäre und quartäre Amine bzw. Ammoniumsalze in ihre Enantiomere zu trennen, da eine pyramidale Inversion über einen planaren sp^2 -hybridisierten Übergangszustand bei den meisten Verbindungen mit chirotopem Stickstoff auftritt. Eine Stabilisierung des pyramidalen Stickstoffs kann durch Integration in ein gespanntes Ringssystem, wie beispielsweise bei Aziridinen oder Oxadiazolidinderivaten [105,260], oder durch Substitution mit stark elektronegativen oder sterisch anspruchsvollen Resten erreicht werden.

Die Trögersche Base (2,8-Dimethyl-6*H*,12*H*-5,11-methanodibenzo-*[b,f]*[1,5] diazozin), bei der die beiden chirotopen Stickstoffatome als Brückenkopfatome in ein starres Ringsystem eingebunden sind, kann nur durch den Bruch einer Bindung interkonvertieren [261]. 1944 gelang es Prelog und Wieland die Enantiomere der Trögerschen Base säulenchromatographisch auf Laktose zu trennen und anschließend fraktioniert zu kristallisieren [262]. Weitere Enantiomerentrennungen in der GC [78,260], HPLC [263,264] und den elektrokinetischen chromatographischen Methoden [265,264] sind in der neueren Literatur beschrieben. Greenberg *et al.* beobachteten die Interkonversion der Trögerschen Base in saurer Lösung und versuchten mittels NMR einen Beweis für das Auftreten eines Imminium Ions, welches nach dem Bindungsbruch als Zwischenstufe entstehen sollte, zu finden [266].

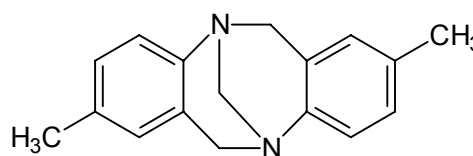
Die Trögersche Base und ihre Derivate sind in neuerer Zeit wieder verstärkt von theoretischem und praktischem Interesse, beispielsweise als chiraler Lösungsvermittler [267,268], als molekulare Rezeptoren [269,270] oder auch als chirale Auxiliare für enantioselektive Reaktionen [271,272].

In der vorliegenden Arbeit wurde die enantioselektive DEKC und Computersimulation der Elutionsprofile zur Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere der Trögerschen Base und eines *N*-benzylierten Derivates angewandt. Als Puffer wurde ein 50 mM Tris/Phosphat-Puffer pH 2,2, als Selektor 10 mg/ml Hydroxypropyl- β -cyclodextrin auf der Injektionsseite (Anode) verwendet. Die Messtemperatur lag zwischen 25 und 60°C und wurde mit dem bereits beschriebenen Temperiersystem eingestellt. Zur Detektion wurde ein UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm verwendet. Die effektive Säulenlänge betrug für alle Versuche 95 cm bei einem Kapillarinne Durchmesser von 50 μ m. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch und die Messspannung betrug 30 kV.

Die Auswertung der experimentellen Elektrochromatogramme erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin unter Verwendung des stochastischen Modells (SM+) und der Approximationsfunktion (AF). Für die Berechnung der Aktivierungsparameter wurden Mittelwerte aus jeweils mindestens 6 Messungen gebildet und diese einer statistischen Analyse unterzogen.

6.2. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere der Trögerschen Base

Die Trögersche Base zeigt mit steigender Temperatur zwischen 15 und 45°C eine deutliche Plateaubildung (Abbildung 47) bei der Enantiomerentrennung in Gegenwart des kationischen Cyclodextrinderivats Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Bei 70°C tritt Peakkoaleszenz auf, während bei Temperaturen unterhalb 25°C die



Trögersche Base

Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung dagegen so gering ist, dass eine Basislinientrennung der Enantiomere auftritt. Elektrochromatogramme mit Plateauhöhen über 60% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt.

Die Elutionsreihenfolge (S,S) < (R,R) der Trögerschen Base konnte durch Koinjektion der isolierten Enantiomere bestimmt werden. Zufälligerweise stimmt diese Reihenfolge mit der auf Chirasil- β -Dex in der GC bestimmten [106] Reihenfolge überein.

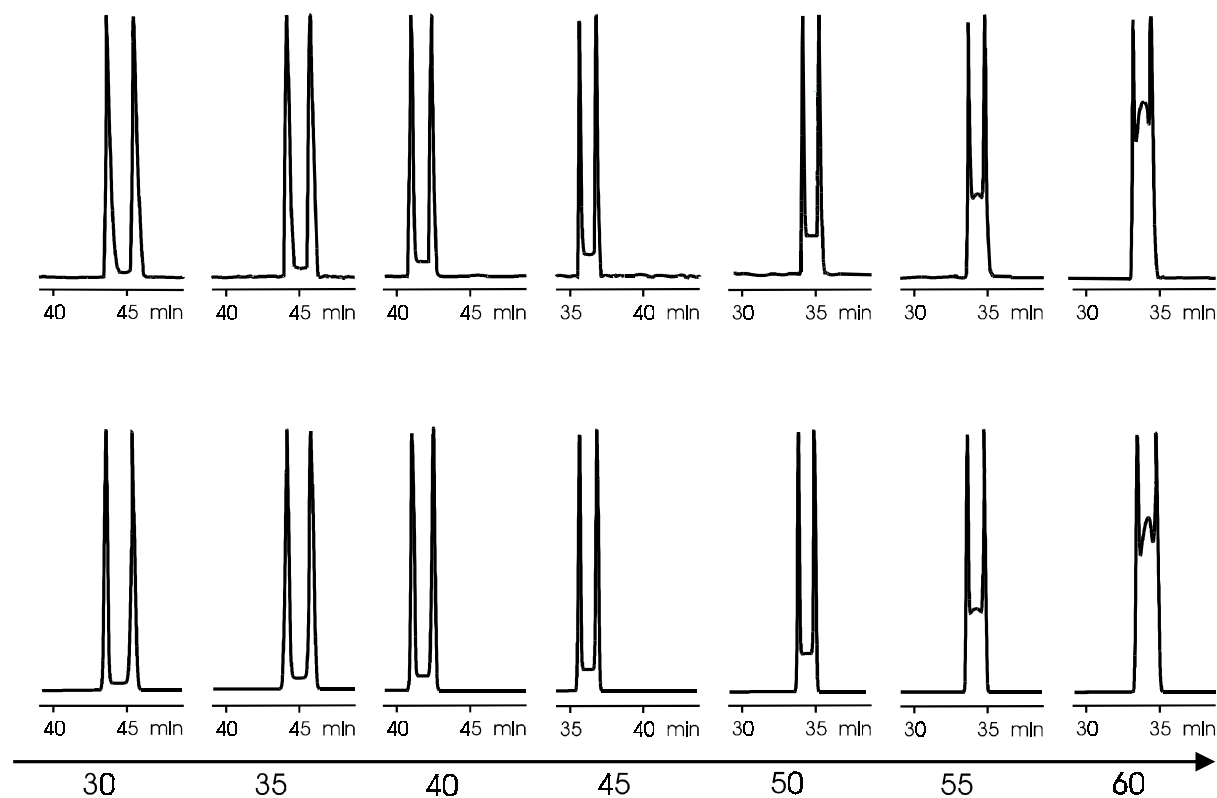


Abbildung 47: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektrochromatogramme der DEKC Enantiomerentrennung der Trögerschen Base bei verschiedenen Temperaturen. Trennbedingungen: 10 mg/ml Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 50 mM Tris/Phosphat Puffer, pH 2,2, $U=30$ kV, $\lambda=210$ nm.

Ausgewählte experimentelle und durch Computersimulation erhaltene Daten sind in Tabelle 22 dargestellt.

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (50 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} = 0,9995$; Reststandardabweichung $s_y = 0,0442$) (Abbildung 48).

Tabelle 22: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ und AF erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung der Trögerschen Base.

T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A\text{ eff.}}$	$N_{B\text{ eff.}}$	h_{Plateau} [%]	$k_1^{\text{app}}(\text{SM+})$ [s ⁻¹]	$k_1^{\text{app}}(\text{AF})$ [s ⁻¹]
30	50,5	52,5	331 000	287 000	2	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$
35	44,0	45,6	130 000	117 000	5	$4,9 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$
40	40,0	41,5	186 000	174 000	6	$6,8 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-5}$
45	35,7	36,9	286 000	263 000	9	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$
50	34,1	35,3	282 000	236 000	15	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-4}$
55	33,7	34,9	290 000	242 000	30	$3,8 \cdot 10^{-4}$	$3,7 \cdot 10^{-4}$
60	33,1	34,4	267 000	169 000	67	$7,0 \cdot 10^{-4}$	$6,7 \cdot 10^{-4}$

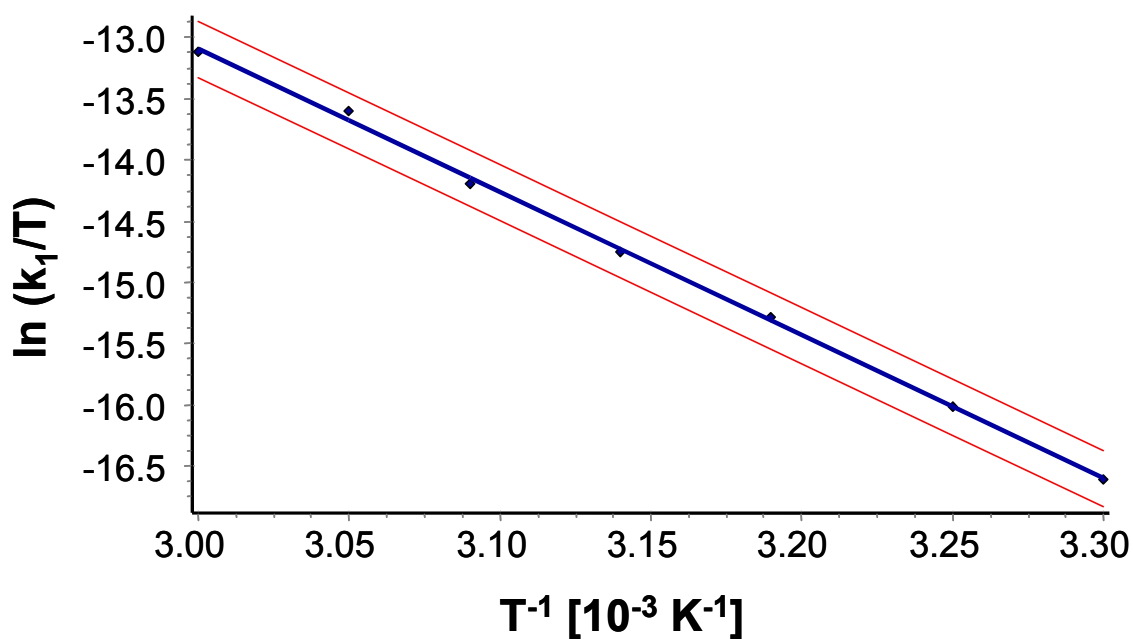


Abbildung 48: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_1^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger der Trögerschen Base. Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

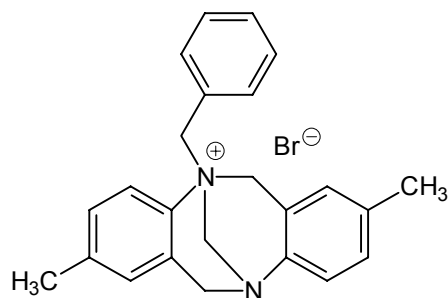
Die Aktivierungsparameter $\Delta H^\ddagger = 89,5 \pm 2,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^\ddagger = -42 \pm 10 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ wurden aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots berechnet. Eine Zusammenfassung der Gibbsschen Freien Energie ΔG^\ddagger , der Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} und den Halbwertszeiten τ bei unterschiedlichen Temperaturen T ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 23: Ergebnisse der DEKC-Experimente und Computersimulationen der Enantiomerisierung der Trögerschen Base (Werte bei 25 und 60°C sind berechnet).

T [°C]	ΔG^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	k_I^{app} (SM+) [s ⁻¹]	$t_{1/2}$
25	100,9	$1,3 \cdot 10^{-5}$	14 h 39 min
30	101,1	$2,4 \cdot 10^{-5}$	7 h 59 min
35	101,3	$4,4 \cdot 10^{-5}$	4 h 24 min
40	101,5	$7,8 \cdot 10^{-5}$	2 h 29 min
40	101,7	$1,4 \cdot 10^{-4}$	1 h 25 min
50	101,8	$2,3 \cdot 10^{-4}$	50 min
55	102	$3,9 \cdot 10^{-4}$	29 min
60	102,2	$6,5 \cdot 10^{-4}$	18 min

6.3. Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere eines benzylierten Derivats der Trögerschen Base

Das *N*-benzylierte Derivat der Trögersche Base (5-Benzyl-2,8-dimethyl-6*H*,12*H*-5,11-methanodibenzo-*[b,f]*[1,5]diazoziniumbromid) zeigt mit



Benzylierte Trögersche Base

steigender Temperatur zwischen 0 und 25°C eine deutliche Plateaubildung (Abbildung 49) bei der Enantiomerentrennung in Gegenwart des kationischen Cyclodextrinderivats Hydroxy-propyl- β -cyclodextrin. Bei 30°C tritt Peakkoaleszenz ein, bei Temperaturen unterhalb 0°C ist die Enantiomerisierung

vernachlässigbar, so dass eine Basislinientrennung der Enantiomere möglich wird. Elektrochromatogramme mit Plateauhöhen über 60% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt. Die Auswertung der Elektrochromatogramme der DEKC-Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem stochastischen Modell (SM+) und der Approximationsfunktion (AF). Für die Berechnung einer Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde der Mittelwert aus mindestens 6 Messungen gebildet.

Ausgewählte experimentelle und durch Computersimulation erhaltene Daten sind in Tabelle 24 dargestellt.

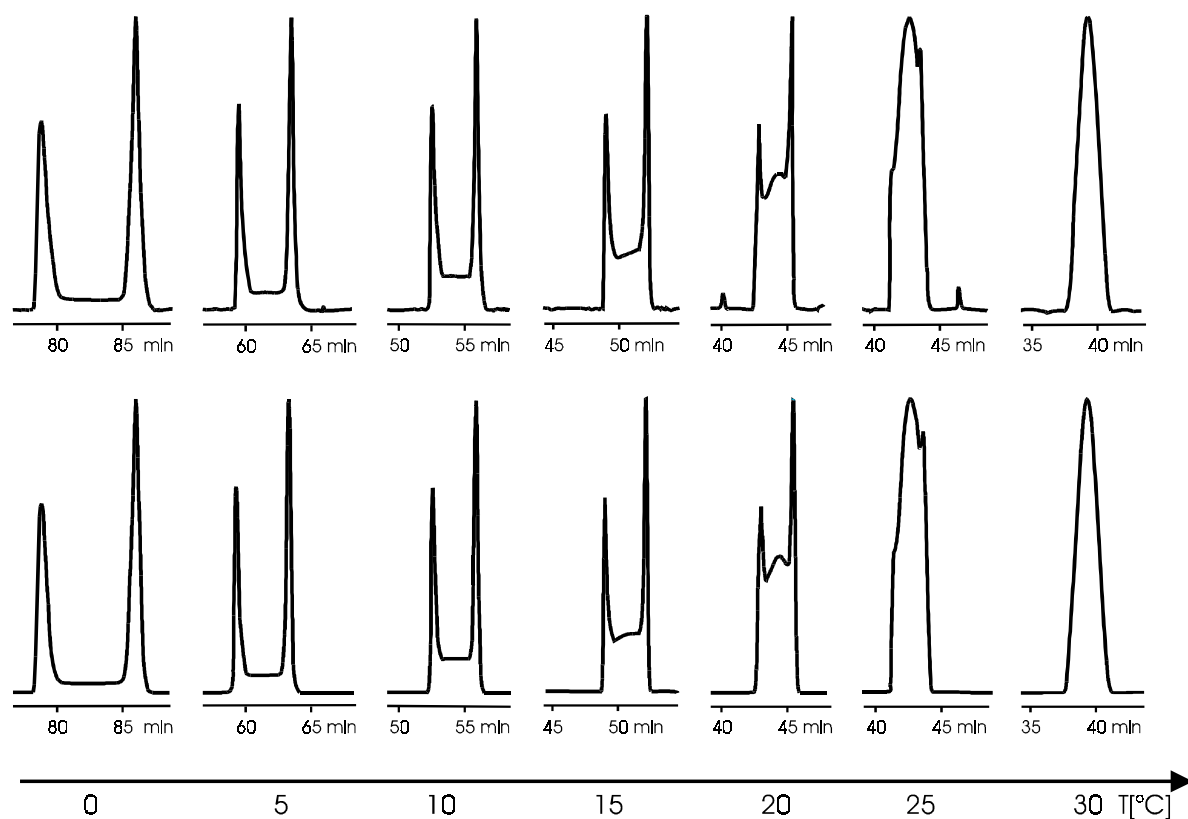


Abbildung 49: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektrochromatogramme der DEKC Enantiomerentrennung des *N*-Benzylderivats der Trögerschen Base bei verschiedenen Temperaturen. Trennbedingungen: 10 mg/ml Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 50 mM Tris/Phosphat Puffer, pH 2,2, $U=30$ kV, $\lambda=210$ nm.

Tabelle 24: Ausgewählte experimentelle Daten und die durch Simulation mit SM+ und AF erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten für die Enantiomerisierung des Benzylderivats der Trögerschen Base.

T [°C]	t_R^A [min]	t_R^B [min]	$N_{A\text{ eff.}}$	$N_{B\text{ eff.}}$	h_{plateau} [%]	$k_I^{\text{app}}(\text{SM+})$ [s ⁻¹]
0	76,2	82,5	58 000	96 000	4	$3,6 \cdot 10^{-2}$
5	59,9	63,0	80 000	131 000	6	$7,4 \cdot 10^{-2}$
10	53,3	56,8	201 000	169 000	9	$1,4 \cdot 10^{-1}$
15	50,6	53,9	415 000	375 000	17	$3,1 \cdot 10^{-1}$
20	42,5	44,9	143 000	237 000	47	$5,6 \cdot 10^{-1}$
25	41,4	43,6	-	-	-	-

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (52 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen (und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} = 0,9995$; Reststandardabweichung $s_y = 0,0321$)).

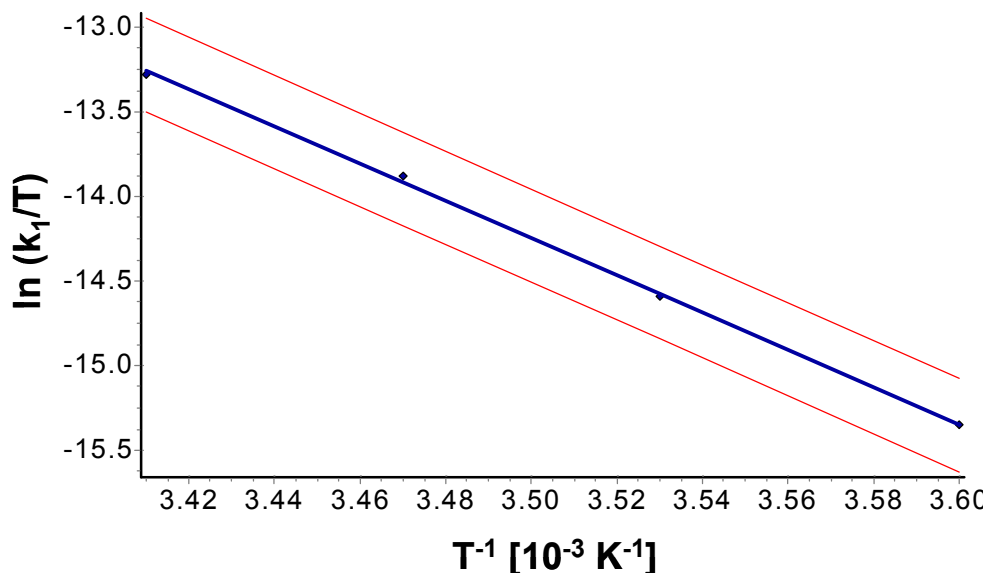


Abbildung 50: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger des Benzylderivats der Trögerschen Base. Die beiden äußeren Kurven stellen das Prognoseband der linearen Regression der Mittelwerte mit einer statistischen Sicherheit von 95% dar.

Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots wurden die Aktivierungsparameter zu $\Delta H^\ddagger = 91,4 \pm 2,0 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\Delta S^\ddagger = 9,8 \pm 10 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ berechnet. Eine Zusammenfassung der Gibbsschen Freien Energie ΔG^\ddagger , der Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} und den Halbwertszeiten τ bei unterschiedlichen Temperaturen T ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 25: Ergebnisse der DEKC-Experimente und Computersimulationen der Enantiomerisierung des Benzylderivats der Trögerschen Base (Werte über 20°C sind berechnet).

T [°C]	ΔG^\ddagger (SM+) [kJ mol ⁻¹]	k_I^{app} [s ⁻¹]	$t_{1/2}$
0	90,3	$3,0 \cdot 10^{-5}$	6 h 20 min
5	90,3	$6,4 \cdot 10^{-5}$	3 h 1 min
10	90,3	$1,3 \cdot 10^{-4}$	1 h 29 min
15	90,3	$2,6 \cdot 10^{-4}$	44 min
20	90,2	$5,1 \cdot 10^{-4}$	23 min
25	90,2	$9,7 \cdot 10^{-4}$	12 min
30	90,2	$1,8 \cdot 10^{-3}$	6 min

Während der Lagerung der Probenlösung konnte eine Zersetzung von 5-Benzyl-2,8-dimethyl-6*H*,12*H*-5,11-methanodibenzo-[*b,f*][1,5]diazoziniumbromid beobachtet werden (Abbildung 51). Im Elektrochromatogramm einer älteren Probenlösung (> 2 Wochen) sind 3 Enantiomerenpaare zu erkennen.

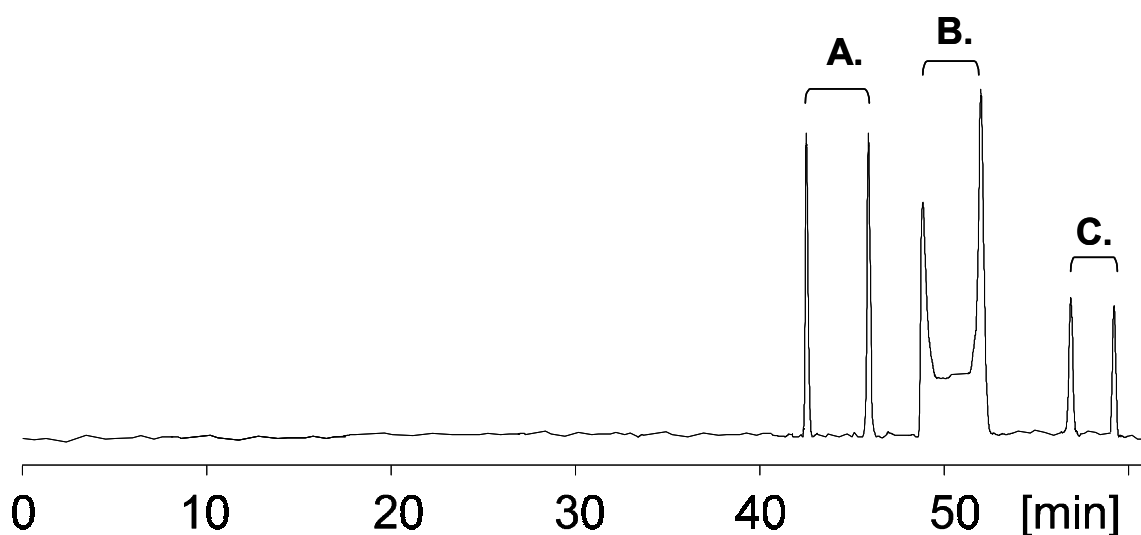


Abbildung 51: Elektrochromatogramm der Enantiomerenentrennung des Benzylderivates der Trögerschen Base. Trennbedingungen: 10 mg/ml Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, 50 mM Tris/Phosphat Puffer, pH 2,2, $T = 15^\circ\text{C}$, $U = 30 \text{ kV}$, $\lambda = 210 \text{ nm}$.

Bei den beiden mittleren Peaks (B.) handelt es sich dabei um das untersuchte Benzylderivat, die beiden zuletzt eluierten Peaks (C.) konnten durch Koinjektion (hier dargestellt) der Trögerschen Base als diese identifiziert werden. Den beiden zuerst eluierten Peaks (A.) konnte bisher keine Struktur zugeordnet werden. Ein FAB-MS der isolierten Verbindung ergab ein mit der Trögerschen Base identisches Massenspektrum. Aufgrund der schnelleren Elution muss dieses Molekül jedoch die größte Ladung aller drei Enantiomerenpaare besitzen.

6.4. Ergebnis

Das Auftreten einer negativen Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger , trotz Stabilisierung von Ladung durch Solvation, im Falle der Trögerschen Base, lässt auf einen Interkonversionsmechanismus unter Bindungsbruch und Ladungstrennung schließen. Der Grund für die positive Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger und der stark erniedrigten Enantiomerisierungsbarriere ΔG^\ddagger für das Benzylderivat der Trögerschen Base könnte in der durch die positive Ladung verursachten Instabilität liegen.

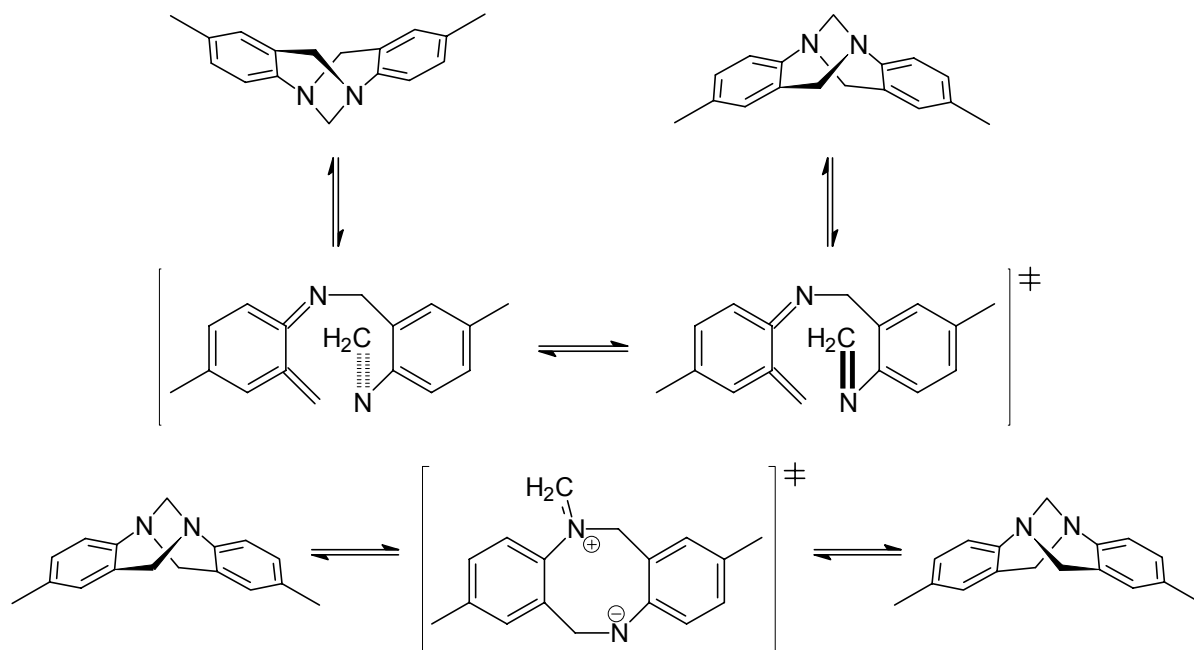


Abbildung 52: Mögliche Enantiomerisierungsmechanismen der Trögerschen Base *via* Retro-Hetero-Diels-Alder – Hetero-Diels-Alder sigmatroper Umlagerung oder *via* zwitterionischem Intermediat [106].

Aus den erhaltenen Daten lassen sich die in Abbildung 52 dargestellten Enantiomerisierungsmechanismen vorschlagen, wobei letzterer Mechanismus wahrscheinlicher ist.

In Tabelle 26 sind die in der Literatur beschriebene Ergebnisse in einer Übersicht dargestellt. Es ist eine geringe Abweichung der gefundenen Enantiomerisierungsbarriere ΔG^\ddagger von den bisher gefundenen Werten zu beobachten, die sich auf den Lösungsmiteleinfluss zurückführen lassen.

Tabelle 26: In der Literatur beschriebene Aktivierungsparameter für die Trögersche Base.

Methode/ Versuchsbedingungen	<i>T</i> [°C]	ΔG^\ddagger [kJ mol⁻¹]	k_I^{app} [s⁻¹]	Lit.
Racemisierung/Wasser	25	98,5 ± 2	8,4 · 10 ⁻⁵	262
DGC, Chirasil-β-Dex	25	117,8 ± 0,5	7,6 · 10 ^{-9*}	106
sfMDGC, Gasphase	25	112,8 ± 0,5	5,4 · 10 ^{-8*}	106

Die Präzision der DCE-Experimente wurde wie folgt bestimmt: Jedes Experiment wurde mindestens 6 mal unter den gleichen experimentellen Bedingungen wiederholt. Es zeigte sich eine gute Wiederholbarkeit der Experimente (2,93 σ (Standardabweichung)); der Fehler für ΔG^\ddagger (30°C) beträgt 0,46 kJ·mol⁻¹ für die Trögersche Base und 0,18 kJ·mol⁻¹ für das benzylierte Derivat bei 20°C.

* Aus der in der Literatur angegebenen Gibbsschen Freien Energie berechnet.

7. Isomerisierung von Dipeptiden

7.1. Allgemeines

Die biologische Aktivität verschiedener Proteine, Oligopeptide und Arzneistoffe auf Peptidbasis hängt von der Konformation der Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren ab. Die langsame Interkonversion der Prolin-haltigen Peptide stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der *cis-trans* Isomerisierung von Peptiden dar und ist daher von zentraler Bedeutung [273-275]. Prolin-haltige Dipeptide können als Modellverbindungen für größere Oligopeptide und Proteine verwendet werden [276].

Horváth *et al.* fanden als erste, dass Prolin-haltige Dipeptide während des chromatographischen Trennprozesses isomerisieren, und untersuchten dieses Phänomen mittels NMR, HPLC und CE [39-47]. Von der gleichen Gruppe stammt auch eine Abschätzung der Geschwindigkeitskonstante von Prolin-Dipeptiden mit Hilfe computerunterstützter Damköhler Analyse, einer Methode die häufig in der chemischen Verfahrenstechnik verwendet wird. Gesquiere *et al.* [277] und Krauss *et al.* [278-282] beobachteten ebenfalls die Isomerisierung der Prolin-haltigen Dipeptide auf verschiedenen Stationärphasen in der HPLC. Thomas *et al.* [283], Grathwohl *et al.* [284] und Moroder *et al.* [276] untersuchten die Isomerisierung von Peptiden mittels DNMR.

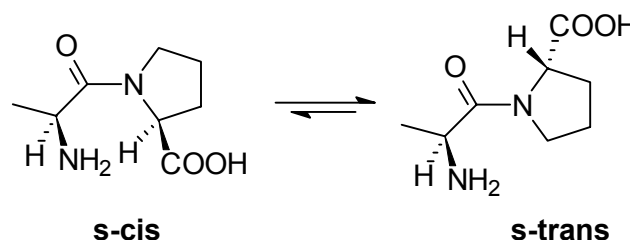
In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die DCE und Computersimulation der Elutionsprofile zur Bestimmung der Isomerisierungsbarriere der Dipeptide L-Alanyl-L-Prolin, L-Leucyl-L-Prolin und L-Phenylalanyl-L-Prolin angewandt [88]. Als Puffer wurde ein 70 mM Borat-Puffer verwendet. Da es sich bei den untersuchten Dipeptiden um Isomere handelt, ist der Zusatz eines chiralen Selektors nicht notwendig. Die Messtemperatur lag zwischen -10 und +20°C und wurde mit dem bereits beschriebenen Temperiersystem eingestellt. Als Detektor wurde ein UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 230 nm verwendet. Die effektive Säulenlänge betrug für alle Versuche 95 cm bei einem Kapillarinne Durchmesser von 50 µm. Die Injektion erfolgte hydrodynamisch und die Messspannung betrug 30 kV.

Die Simulation der experimentellen Elektropherogramme erfolgte mit dem theoretischen Bodenmodell (TPM) und dem stochastischen Modell (SM+) von ChromWin. Zusätzlich zu den üblichen Parametern wurde das Isomerenverhältnis $[cis]/[trans]$ als Eingabeparameter benötigt. Aus der Computersimulation wurden dann die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion $k_{trans \rightarrow cis}$ und $k_{cis \rightarrow trans}$ erhalten.

Die Zuordnung der Elutionsreihenfolge der Isomerenpeaks gelang durch Vergleich mit Untersuchungen von Horváth *et al.* [42,45] und Krauss *et al.* [282], die die hier untersuchten Isomere mittels HPLC trennten und die Konformation mittels NMR bestimmt haben. Aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse der *cis* und *trans* Isomeren konnten diese Ergebnisse auf die kapillarelektrophoretische Trennung übertragen werden. Für alle drei hier untersuchten Dipeptide ergab sich eine Elutionsreihenfolge von *trans* vor *cis*.

7.2. Bestimmung der Isomerisierungsbarriere von L-Alanyl-L-Prolin

L-Alanyl-L-Prolin zeigt bei der Trennung der Isomere mit steigender Temperatur zwischen -10 und 10°C eine typische Plateaubildung sowie Peak tailing des ersten Peaks und Peakfronting des zweiten Peaks (Abbildung 53). Bei 15°C tritt Peakkoaleszenz ein. Eine Basislinientrennung wird aufgrund der Erhöhung der Viskosität und einer damit einhergehenden Peakverbreiterung bei sehr niedrigen Temperaturen zu keiner Zeit beobachtet.



L-Alanyl-L-Prolin

Elektropherogramme mit Plateauhöhen über 50% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt. Für die Berechnung einer Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde der Mittelwert aus mindestens 6 Messungen gebildet.

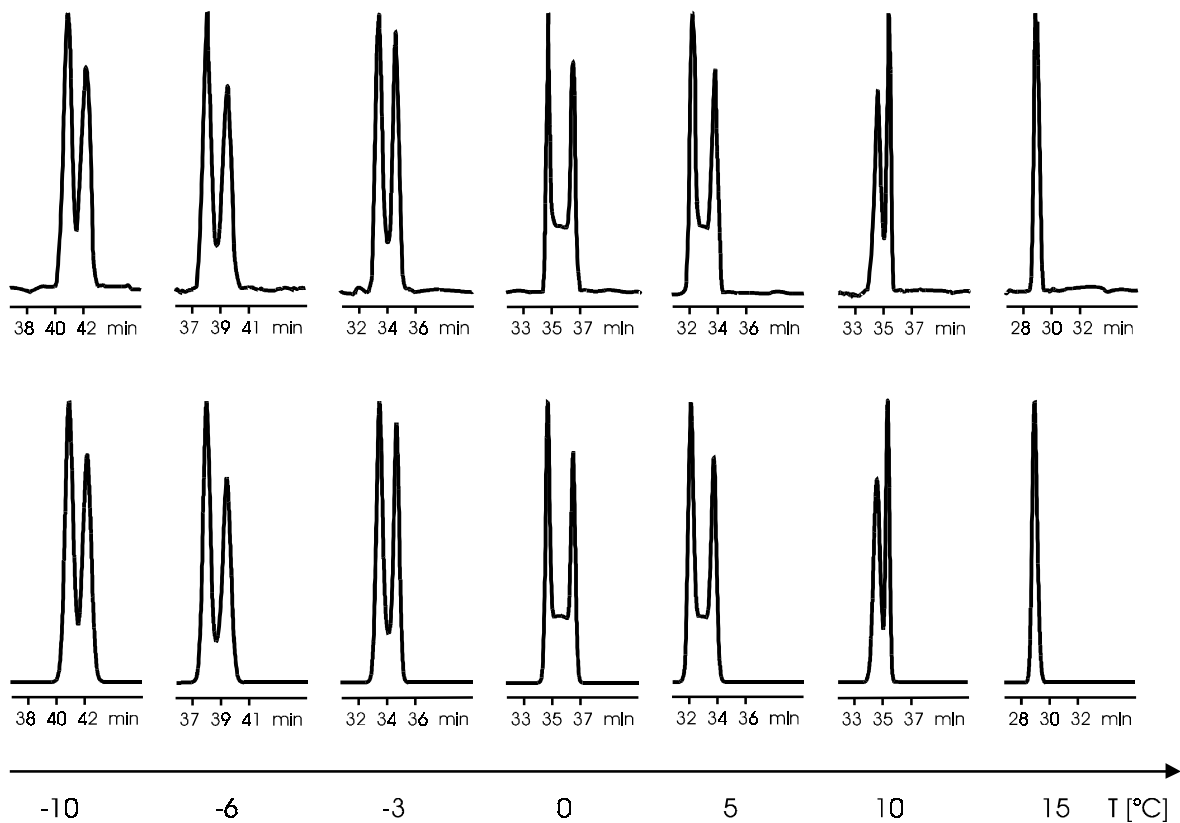


Abbildung 53: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektropherogramme der DCE Trennung von L-Alanyl-L-Prolin bei verschiedenen Temperaturen. Trennbedingungen: 70 mM Borat Puffer, pH 9,5, $U=-30$ kV, $\lambda=230$ nm.

Die Auswertung der Elektropherogramme der DCE-Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem stochastischen Modell (SM+). Ausgewählte experimentelle Peakverhältnisse und Plateauhöhen sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Experimentell bestimmte Peakverhältnisse und Plateauhöhen der Isomerisierung von L-Alanyl-L-Prolin die für die Computersimulation verwendet wurden.

T [°C]	<i>cis</i> [%]	h_{Plateau} [%]
0	44	19
10	46	25

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (48 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} > 0,9974$; Reststandardabweichung $s_y < 0,0663$).

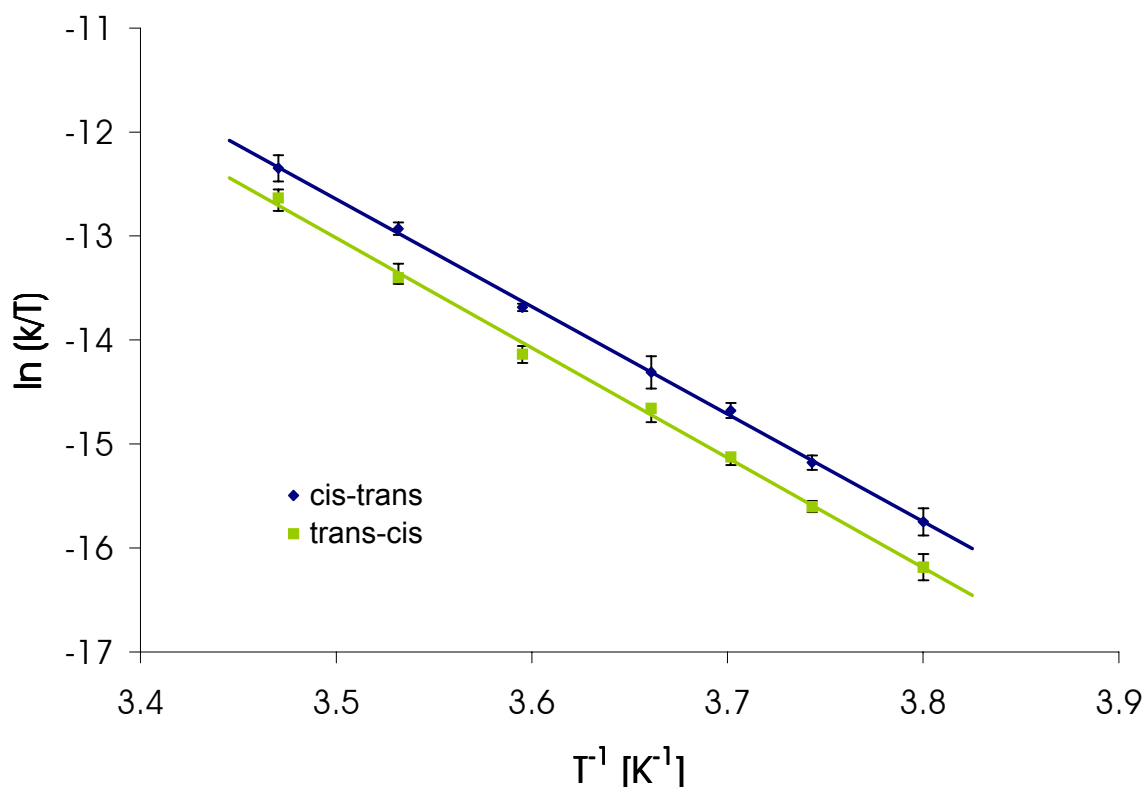


Abbildung 54: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion $k_{trans \rightarrow cis}$ und $k_{cis \rightarrow trans}$ zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von L-Alanyl-L-Prolin.

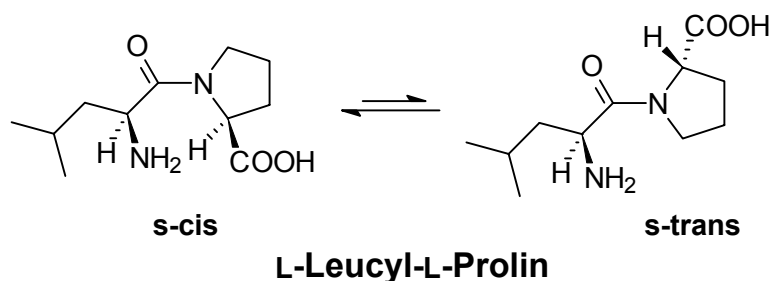
Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots wurden die Aktivierungsparameter berechnet (Tabelle 33). Eine Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten k_l^{app} und den Halbwertszeiten τ bei unterschiedlichen Temperaturen T ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 28: Ergebnisse der DCE-Experimente und Computersimulationen der Enantiomerisierung von L-Alanyl-L-Prolin.

T [°C]	$k_{trans \rightarrow cis}$ [s ⁻¹]	$k_{cis \rightarrow trans}$ [s ⁻¹]	$t_{1/2 trans \rightarrow cis}$ [min]	$t_{1/2 cis \rightarrow trans}$ [min]
0	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	64	58
10	$7,4 \cdot 10^{-4}$	$8,9 \cdot 10^{-4}$	16	13
20	$2,7 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$	4	3

7.3. Bestimmung der Isomerisierungsbarriere von L-Leucyl-L-Prolin

L-Leucyl-L-Prolin zeigt bei der Trennung der Isomere mit steigender Temperatur zwischen 0 und 15°C eine typische Plateaubildung sowie Peaktailing des ersten Peaks und Peakfronting des zeiteluierten Peaks (Abbildung 55). Bei 20°C tritt Peakkoaleszenz ein. Bei Temperaturen unterhalb 0°C ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung so gering, dass eine Basislinientrennung auftritt. Elektropherogramme mit Plateauhöhen über 50% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt.



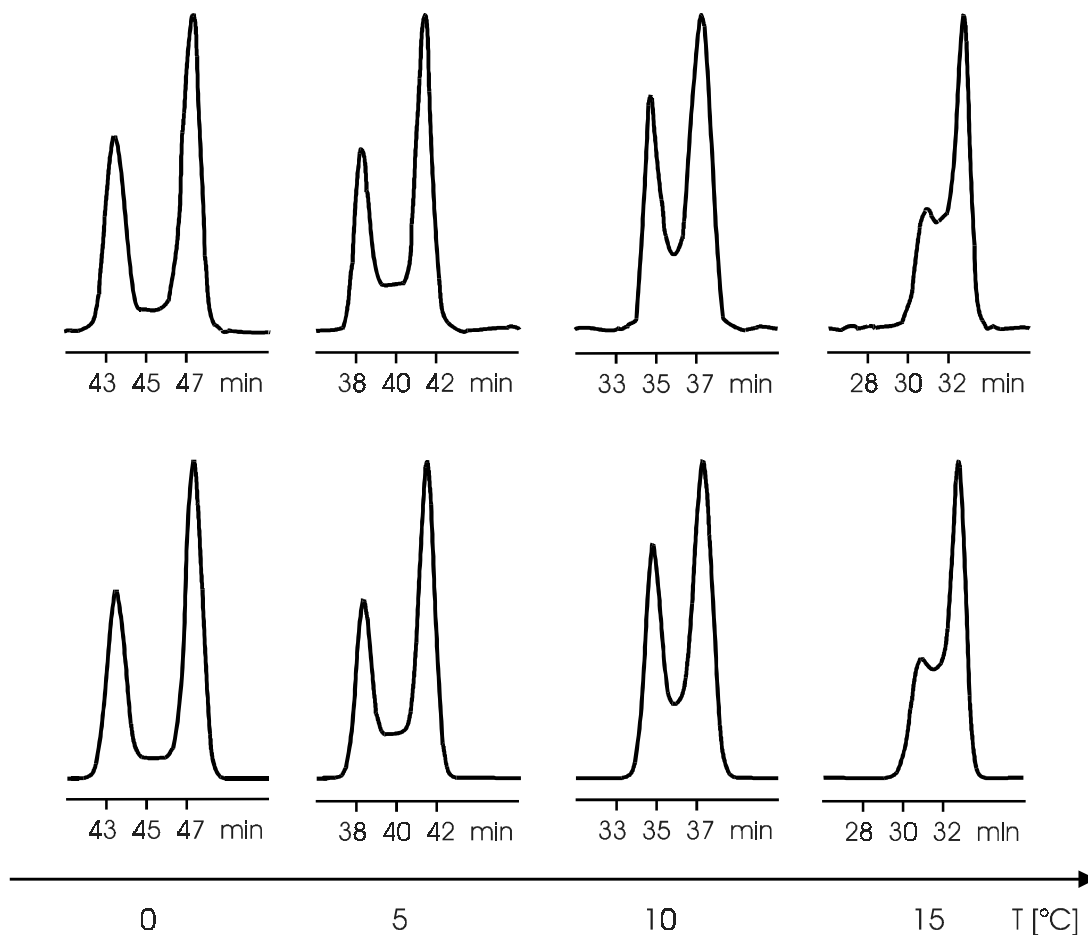


Abbildung 55: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektropherogramme der DCE Trennung von L-Leucyl-L-Prolin bei verschiedenen Temperaturen. Trennbedingungen: 70 mM Borat Puffer, pH 9,5, $U=-30$ kV, $\lambda=230$ nm.

Für die Berechnung einer Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde der Mittelwert aus mindestens 7 Messungen gebildet. Die Auswertung der Elektropherogramme der DCE-Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem stochastischen Modell (SM+). Ausgewählte experimentelle Peakverhältnisse und Plateauhöhen sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Experimentell bestimmte Peakverhältnisse und Plateauhöhen der Isomerisierung von L-Leucyl-L-Prolin die für die Computersimulation verwendet wurden.

T [°C]	cis [%]	h_{Plateau} [%]
0	57	14
10	56	22

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (39 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} > 0,996$; Reststandardabweichung $s_y < 0,0428$).

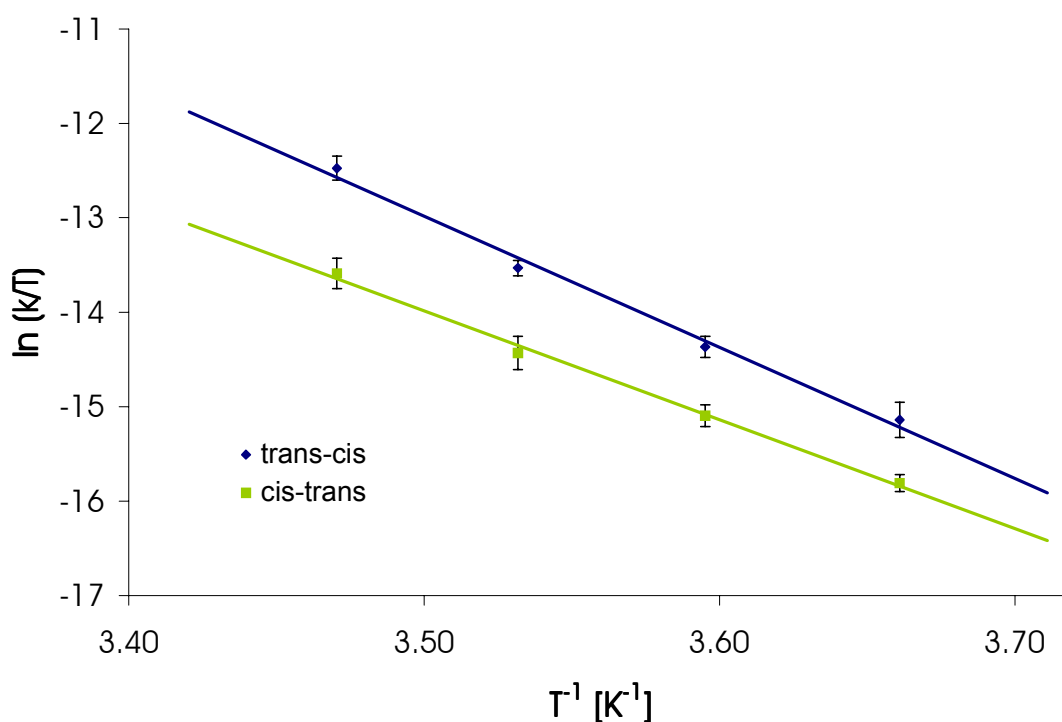


Abbildung 56: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion $k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$ und $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von L-Leucyl-L-Prolin.

Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots wurden die Aktivierungsparameter berechnet (Tabelle 33). Eine Zusammenfassung der

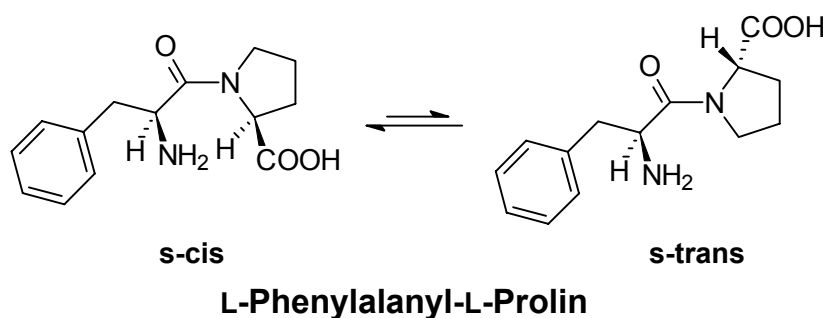
Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} und den Halbwertszeiten τ bei unterschiedlichen Temperaturen T ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 30: Ergebnisse der DCE-Experimente und Computersimulationen der Enantiomerisierung von L-Leucyl-L-Prolin.

T [°C]	$k_{trans \rightarrow cis}$ [s ⁻¹]	$k_{cis \rightarrow trans}$ [s ⁻¹]	$t_{1/2 trans \rightarrow cis}$ [min]	$t_{1/2 cis \rightarrow trans}$ [min]
0	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$	178	257
10	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-4}$	29	60
20	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$7,4 \cdot 10^{-4}$	5	16

7.4. Bestimmung der Isomerisierungsbarriere von L-Phenylalanyl-L-Prolin

L-Phenylalanyl-L-Prolin zeigt bei der Trennung der Isomere mit steigender Temperatur zwischen 0 und 25°C eine typische Plateaubildung sowie Peak-tailing des ersten Peaks und Peakfronting des später eluierten Peaks (Abbildung 57). Bei 25°C tritt Peakkoaleszenz ein, bei Temperaturen unterhalb 0°C ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Enantiomerisierung so gering, dass eine Basislinientrennung auftritt. Elektropherogramme mit Plateauhöhen über 50% wurden für die Computersimulation zur Berechnung der Enantiomerisierungsbarriere nicht berücksichtigt.



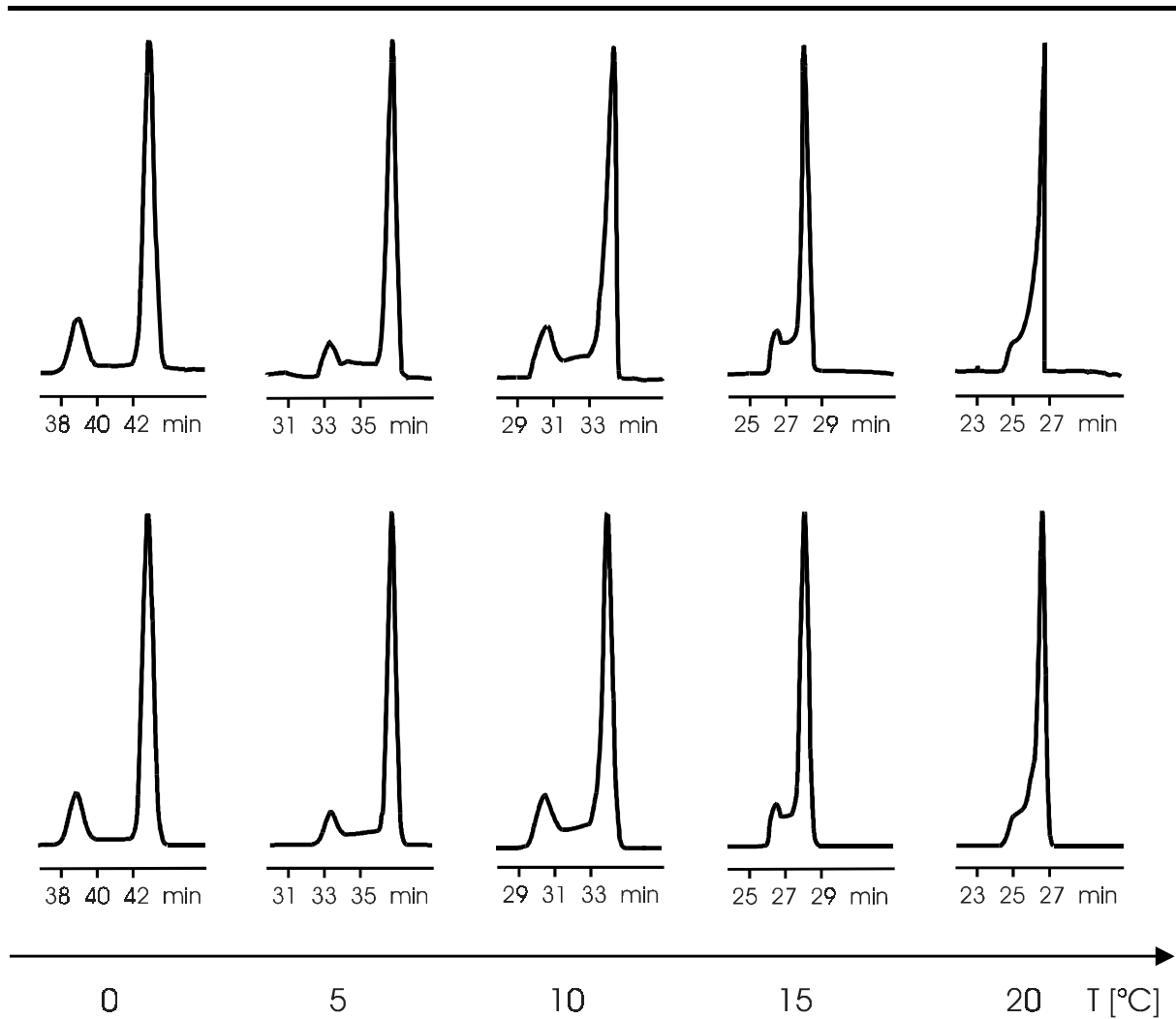


Abbildung 57: Experimentelle (oben) und simulierte (unten) Elektropherogramme der DCE Trennung von L-Phenylalanyl-L-Prolin bei verschiedenen Temperaturen.
Trennbedingungen: 70 mM Borat Puffer, pH 9,5, $U=-30$ kV, $\lambda=230$ nm.

Für die Berechnung einer Geschwindigkeitskonstanten bei einer bestimmten Temperatur wurde der Mittelwert aus mindestens 8 Messungen gebildet. Die Auswertung der Elektropherogramme der DCE-Experimente erfolgte durch Computersimulation mit ChromWin mit dem stochastischen Modell (SM+). Ausgewählte experimentelle Peakverhältnisse und Plateauhöhen sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Experimentell bestimmte Peakverhältnisse und Plateauhöhen der Isomerisierung von L-Phenylalanyl-L-Prolin die für die Computersimulation verwendet wurden.

T [°C]	cis [%]	h_{Plateau} [%]
0	82	2
10	86	7

Zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger wurden jeweils die Mittelwerte von $\ln(k/T)$ (46 Experimente) als Funktion von T^{-1} gemäß der Eyring-Gleichung aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt (Korrelationskoeffizient $r_{SM+} > 0,9978$; Reststandardabweichung $s_y < 0,0510$).

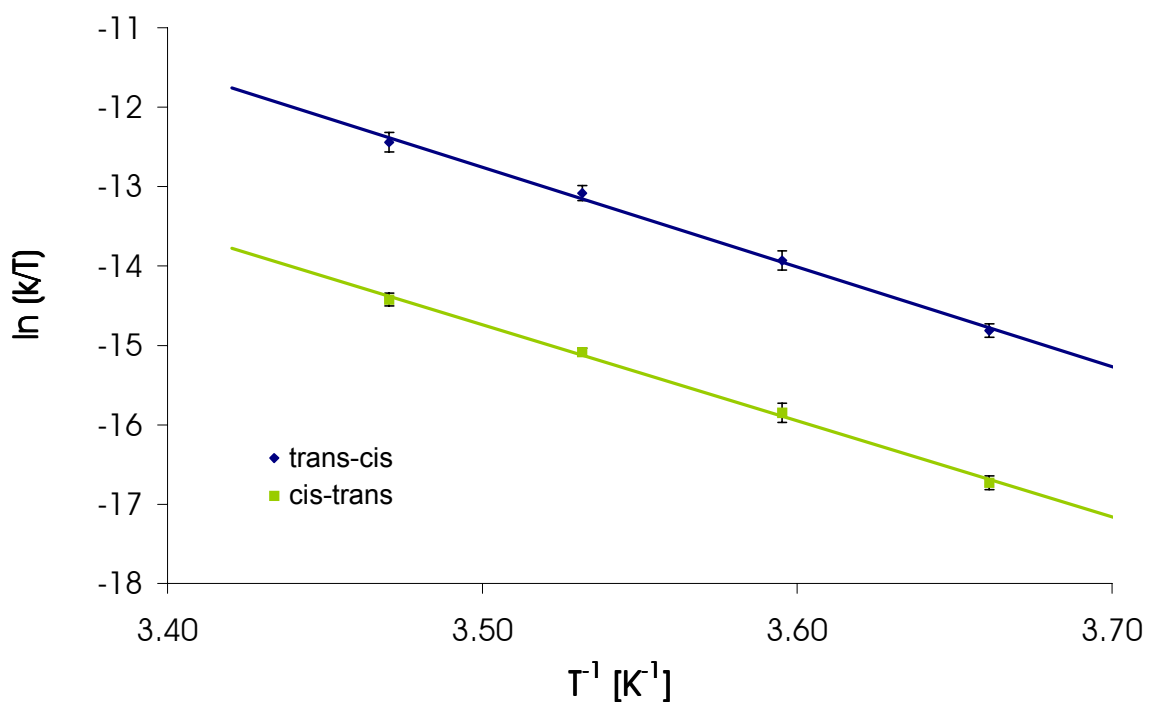


Abbildung 58: Eyring-Plot der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion $k_{\text{trans} \rightarrow \text{cis}}$ und $k_{\text{cis} \rightarrow \text{trans}}$ zur Bestimmung der Aktivierungsparameter ΔH^\ddagger und ΔS^\ddagger von L-Phenylalanyl-L-Prolin.

Aus der Steigung und dem y-Achsenabschnitt des Eyring-Plots wurden die Aktivierungsparameter berechnet (Tabelle 33). Eine Zusammenfassung der

Geschwindigkeitskonstanten k_I^{app} und den Halbwertszeiten τ bei unterschiedlichen Temperaturen T ist in folgender Tabelle gegeben:

Tabelle 32: Ergebnisse der DCE-Experimente und Computersimulationen der Enantiomerisierung von L-Phenylalanyl-L-Prolin.

T [°C]	$k_{trans \rightarrow cis}$ [s ⁻¹]	$k_{cis \rightarrow trans}$ [s ⁻¹]	$t_{1/2 trans \rightarrow cis}$ [min]	$t_{1/2 cis \rightarrow trans}$ [min]
0	$9,9 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	117	553
10	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$9,8 \cdot 10^{-5}$	21	119
20	$2,9 \cdot 10^{-3}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	4	28

7.5. Ergebnis

In der folgenden Tabelle sind die Aktivierungsparameter für die Hin- und Rückreaktion der untersuchten Dipeptide gegenübergestellt. Wie aus einem Vergleich der Daten für die Aktivierungsenergie sofort ersichtlich wird, ist für die beiden sterisch anspruchsvolleren Dipeptide L-Leucyl-L-Prolin und L-Phenylalanyl-L-Prolin im Gleichgewicht die *trans*-Konformation geringfügig stabiler. Dieses Ergebnis ist überraschend, da in dieser Konformation eine stärkere sterische Wechselwirkung der Carboxyfunktion des Prolins mit dem aliphatischen Rest der zweiten Aminosäure (Leucin, Phenylalanin) besteht. In den Elektropherogrammen macht sich diese größere Stabilität durch eine größere Peakfläche des zweiteluierten Peaks (*trans*-Isomer) bemerkbar. Im Falle des L-Alanyl-L-Prolin, bei dem durch die Methylgruppe nur eine geringe sterische Hinderung auftritt, ist die *cis*-Konformation begünstigt.

Tabelle 33: Aktivierungsparameter der Isomerisierung von Dipeptiden.

	$\Delta G^\ddagger(298\text{ K})_{\text{trans}\rightarrow\text{cis}}$	$\Delta H^\ddagger_{\text{trans}\rightarrow\text{cis}}$	$\Delta S^\ddagger_{\text{trans}\rightarrow\text{cis}}$
	$\Delta G^\ddagger(298\text{ K})_{\text{cis}\rightarrow\text{trans}}$	$\Delta H^\ddagger_{\text{cis}\rightarrow\text{trans}}$	$\Delta S^\ddagger_{\text{cis}\rightarrow\text{trans}}$
	[kJ mol ⁻¹]	[kJ mol ⁻¹]	[J(K·mol) ⁻¹]
L-Alanyl-L-Prolin	86,1 ± 0,9	88 ± 1	7 ± 12
	85,3 ± 0,9	94 ± 1	29 ± 12
L-Leucyl-L-Prolin	86,3 ± 0,8	114 ± 1	92 ± 7
	89,3 ± 0,8	91 ± 1	6 ± 7
L-Phenylalanyl-L-Prolin	85,6 ± 1,0	110 ± 2	81 ± 9
	90,7 ± 1,0	97 ± 2	20 ± 9

Die Präzision der DCE Experimente wurde wie folgt bestimmt: Jedes Experiment wurde mindestens 6 mal unter den gleichen experimentellen Bedingungen wiederholt. Es zeigte sich eine gute Wiederholbarkeit der Experimente (2,93 σ (Standardabweichung)); der maximale Fehler für ΔG^\ddagger (10°C) beträgt 0,53 kJ·mol⁻¹. Die relative Standardabweichung (RSD) der *cis-trans* Verhältnisse die für die Berechnung verwendet wurden, war für alle untersuchten Dipeptide < 2%.

Ein Vergleich der hier bestimmten Isomerisierungsbarrieren mit solchen, die durch andere, unabhängige Methoden erhalten wurden erlaubt eine Bestimmung der Genauigkeit und der Präzision der hier angewandten Methode. In Tabelle 34 sind die in der Literatur beschriebene Ergebnisse in einer Übersicht dargestellt. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Versuchsbedingungen ist eine gute Übereinstimmung der hier bestimmten Isomerisierungsbarrieren mit den in der Literatur beschriebenen Daten zu beobachten.

Tabelle 34: In der Literatur beschriebene Aktivierungsparameter für Prolin-haltige Dipeptide.

T [°C]	Methode/ Versuchsbedingungen	ΔG^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	$k_{trans \rightarrow cis}$ [s ⁻¹]	Lit.
25,0	DNMR L-Alanyl-L-Prolin pH 7,5	87,9	$2,5 \cdot 10^{-3}$	279
	DNMR L-Phenylalanyl-L-Prolin pH 7,5	89,4	$1,9 \cdot 10^{-4}$	
22,5	DHPLC L-Alanyl-L-Prolin pH 7,07	88,9	$1,2 \cdot 10^{-3}$	285
40,0	DHPLC L-Alanyl-L-Prolin pH 7,07	89,5	$7,7 \cdot 10^{-3}$	
10,0	sfCZE, pH 8,4 L-Phenylalanyl-L-Prolin	90,1	$1,42 \cdot 10^{-4}$	39
10,0	¹ H-NMR, pH 8,4 L-Phenylalanyl-L-Prolin	92,0	$6,4 \cdot 10^{-5}$	41
	CZE, pH 8,4 L-Phenylalanyl-L-Prolin	90,1	$14,4 \cdot 10^{-5}$	
1,5	DNMR, L-Phenylalanyl-L-Prolin	91,2	$2,54 \cdot 10^{-5}$	45
	Damköhler Analyse L-Phenylalanyl-L-Prolin	91,6	$2,22 \cdot 10^{-5}$	
10,0	Verdrängungschromatographie/ Computersimulation, L-Phenylalanyl-L-Prolin	90,9	$1,0 \cdot 10^{-4}$	43

8. Experimenteller Teil

8.1. Allgemeines

Massenspektrometrie: EI-Spektren (70 eV; Quelltemperatur 200°C) wurden auf dem Gerät TSQ 70 der Firma Finnigan aufgenommen.

Chemikalien: Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Chemikalienausgabe des Chemischen Instituts der Universität Tübingen bezogen.

Aldrich (Steinheim)	Trögersche Base
Cerestar	β -Cyclodextrin (C*Cavitron 82000)
Fluka (Buchs, Schweiz)	Natrium-3 α ,7 α ,12 α -trihydroxy-5 β -cholat 1M Natriumhydroxidlösung Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
Grünenthal (Aachen)	Thalidomid
ICN (Irvine, CA, USA)	L-Alanyl-L-Prolin L-Leucyl-L-Prolin L-Phenylalanyl-L-Prolin Tris
Novartis (Basel, Schweiz)	Chlorthalidon
Sigma-Aldrich (Steinheim)	Oxazepam Temazepam Lorazepam
Wacker (Burghausen)	Carboxymethyl- β -cyclodextrin (Cavamax W7 CM) Dimethyl- β -cyclodextrin (Cavasol W7 M)

Alle Cyclodextrine waren von der angegebenen Qualität und wurden vor dem Einwiegen 24 Stunden bei 80°C im Vakuum getrocknet.

Lösungsmittel: Ethanol, Methanol, und Acetonitril wurden mit max. 0,005-0,1% Wasser von Merck (Darmstadt) bezogen (UVASOL).

8.2. Kapillarelektrophorese

8.2.1. Apparative Ausstattung

Kapillarelektrophoresegerät: Es wurde ein Gerät der Firma Bischoff (Leonberg) Typ Prince Unicam Crystal 300/31 verwendet. Das Gerät verfügt über einen vier-Positionen Autosampler, ein Luftkühlsystem über ein Peltierelement (15-60°C). Das Gerät erlaubt das Anlegen beliebiger Spannungen im Bereich von 0 bis +/-30 kV beziehungsweise die Vorgabe des Stromes im Bereich von 0 bis +/- 200 µA. Zusätzlich zur Spannung kann auch ein Druck zwischen -180 und 3000 mbar auf die Injektionsseite der Kapillare gegeben werden.

Detektion: Es wurde ein on-column UV Detektor der Firma Bischoff (Leonberg) Typ Lambda 1000 verwendet.

Temperaturkontrolle: Zur Temperierung der Kapillaren wurde ein flexibles System entwickelt, welches aus einem Kryostaten (Haake D8-GH, Haake, Karlsruhe, Temperaturbereich: -25 – 150°C, Pumpleistung: 12 l/min), sowie aus Polyethylenschläuchen für den Temperierflüssigkeitstransport und Teflonschläuchen zum Schutz vor Hochspannung bei Kapillarbruch besteht.

Zur Installation des Temperiersystems wurde die Kapillarsäule in den Teflonschlauch eingeführt. Dieser wurde dann in den PE Schlauch gesteckt und über ein T-Stück mit der Pumpe verbunden. Die beiden noch offenen Enden des T-Stücks wurden mit Silikon und Heißkleber dicht verschlossen, wobei darauf geachtet wurde, dass der Teflonschlauch ca. 1 mm länger war als die verschlossenen T-Stücke.

Die Länge des temperierten Stücks $l_{\text{temperiert}}$ der Kapillare betrug stets:

$$l_{\text{temperiert}} = L - 37\text{cm}$$

(L : Gesamtlänge der Kapillare)

Die nicht-thermostatisierten Bereiche der Kapillare wurden mit Hilfe des Peltierelements im Temperaturbereich zwischen 15 und 60°C der jeweiligen Messtemperatur angepasst. Für Messungen außerhalb dieses

Temperaturbereichs wurde die jeweils tiefste beziehungsweise höchste Temperatur mit dem Peltierelement eingestellt.

Datenakquisition: Die Chromatogramme wurden mit einem Integrator CR-6A der Firma Shimadzu (Kyoto, Japan) aufgezeichnet und anschließend manuell ausgewertet.

8.2.2. Kapillarsäulen

Es wurden Fused-Silica-Kapillarsäulen der Firma MicroQuartz (München) mit einem Innendurchmesser von 50 μm verwendet.

Vor dem Einbau der Säulen in das Gerät wurde 17 cm vor dem Säulenende etwa 2-3 mm der Polyimidschicht mit einem rot-glühenden Widerstandsdraht entfernt. Diese Zone diente als optisches Fenster für die on-column UV-Detektion. Die Säulenlängen wurden so gewählt, dass die effektive Länge 95 cm (vom Injektor zum optischen Fenster) und die Gesamtlänge 112 cm betrug.

Die Konditionierung der Kapillaren erfolgte durch Spülen mit Methanol (30 min, 1 bar), 1 M Natriumhydroxid-Lösung (30 min, 1 bar), Wasser (30 min, 1 bar), und schließlich 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (30 min, 1 bar). Anschließend wurde mit dem jeweiligen Messpuffer für 30 min mit 1 bar gespült.

8.2.3. Puffer

Alle Puffer wurden mit Wasser für die HPLC (18,2 M Ω) aus einer Millipore-Q Anlage (Millipore, Marlborough, MA, USA) hergestellt und vor dem Einsatz in der CE mit einem Filter (0,45 μm Porengröße) (Macherey Nagel, Düren) filtriert. Alle Pufferlösungen wurden im Kühlschrank für maximal eine Woche aufbewahrt, Phosphatpuffer um den Neutralpunkt wurden alle zwei Tage frisch hergestellt. Der pH-Wert der jeweiligen Pufferlösung wurde vor Zugabe des chiralen Selektor eingestellt und anschließend nicht mehr verändert.

Borat Puffer: Zur Herstellung des Puffers wurde eine Lösung aus $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ in der jeweils verwendeten Konzentration hergestellt und auf den entsprechenden pH-Wert durch Zugabe von 1 M Natriumhydroxidlösung oder 1 M Salzsäurelösung eingestellt.

Borat/Phosphat Puffer: Zur Herstellung des Puffers wurden jeweils Lösungen aus $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ in der jeweils verwendeten Konzentration hergestellt und auf den entsprechenden pH-Wert durch Mischen der Lösungen gleicher Konzentration eingestellt.

Phosphat/Citrat Puffer: Zur Herstellung des Puffers wurden jeweils Lösungen aus $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und Zitronensäure ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$) in der jeweils verwendeten Konzentration hergestellt und auf den entsprechenden pH-Wert durch Mischen der Lösungen gleicher Konzentration eingestellt.

Tris/Phosphat Puffer: Zur Herstellung des Puffers wurde eine Lösung aus Tris ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) in der jeweils verwendeten Konzentration hergestellt und mit einer entsprechenden Menge H_3PO_4 auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

8.2.4. Dynamische Elektromigrationsmethoden

8.2.4.1. Allgemeines

Sämtliche Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Durchflusszeit wurde, wo möglich, mit Dimethylformamid als Marker bestimmt. Die zur Simulation der Elutionsprofilen benötigten chromatographischen Parameter wurden durch Integration der Elutionsprofile erhalten. Bei der Verwendung von Shimadzu-Integratoren wurde die ausgegebene Peakbreite mit einem Faktor von 0,9394 korrigiert, um die Peakbreite auf halber Höhe zu erhalten. Ein Modul für diese Korrektur ist im Simulationsprogramm enthalten.

Das verwendete Simulationsprogramm ChromWin korrigiert den durch die on-column Detektion entstehenden Fehler in den Peakflächen durch Wichtung mit

den Retentionszeiten automatisch. Eine Umrechnung der experimentellen Werte ist somit nicht notwendig.

8.2.4.2. DMEKC Enantiomerentrennung von Benzodiazepinen

Alle Benzodiazepin-Proben wurden in Methanol gelöst, die Konzentration betrug 0,1 mg/ml. Probenlösungen wurden auf Vorrat hergestellt und im Kühlschrank (+4°C) bis zu 3 Monaten gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Probenlösungen mit einem Filter (0,45 µm Porengröße) (Macherey-Nagel, Düren) filtriert. Die Injektion erfolgte durch Anlegen von 20 mbar Druck für 2 Sekunden. Die Messspannung betrug, soweit nicht anders beschrieben, 25 kV. Die Messtemperatur lag stets zwischen 0 und 30°C, die Wellenlänge des UV-Detektors betrug 230 nm.

Soweit nicht anders beschrieben, wurde 60 mM Natriumcholat als chiraler Selektor, gelöst in 20 mM Borat/Phosphat Puffer, verwendet. Die Messungen für Temazepam und Oxazepam wurden bei den pH-Werten 7, 8 und 9 durchgeführt, Lorazepam wurde ausschließlich bei pH 8 vermessen. Als EOF-Marker wurde für alle Messungen Dimethylformamid verwendet.

Die Konditionierung der Kapillare zwischen den Messungen erfolgte durch Spülen mit Pufferlösung für 5 min bei 1 bar. Vor jeder Änderung der Pufferkonzentration, des pH-Wertes oder des Analyten wurde die Kapillare zuerst mit 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (10 min, 1 bar), anschließend mit der neuen Puffer-Lösung gespült (30 min, 1 bar).

8.2.4.3. DEKC Enantiomerentrennung von Chlorthalidon

Chlorthalidon wurde als methanolische Lösung der Konzentration 0,1 mg·ml⁻¹ verwendet. Probenlösungen wurden auf Vorrat hergestellt und im Kühlschrank (+4°C) bis zu 2 Monate gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Probenlösungen mit einem Filter (0,45 µm Porengröße) (Macherey Nagel, Düren) filtriert. Die Injektion erfolgte durch Anlegen von 50 mbar Druck für 3 Sekunden. Die Messspannung betrug -30 kV. Um die Enantiomerentrennung zu beschleunigen wurde zusätzlich zur Spannung ein Druck von 50 mbar angelegt.

Die Messtemperatur lag stets zwischen 15 und 50°C, die Wellenlänge des UV-Detektors betrug 230 nm.

Als chirale Selektoren wurde ein 1:1 Gemisch von Dimethyl- β -cyclodextrin und Carboxymethyl- β -cyclodextrin (jeweils 12,5 mg/ml), gelöst in 100 mM Citrat/Phosphat Puffer pH 5 verwendet. Das Selektorgemisch wurde nur auf der Kathodenseite zugegeben.

Die Konditionierung der Kapillare zwischen den Messungen erfolgte durch Spülen mit Pufferlösung für 20 min bei 1 bar. Nach jedem Messtag wurde die Kapillare zuerst mit 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (10 min, 1 bar), anschließend mit frischer Puffer-Lösung gespült (30 min, 1 bar).

8.2.4.4. DEKC Enantiomerentrennung von Thalidomid

Thalidomid wurde in Acetonitril gelöst, die Konzentration betrug 1 mg/ml. Probenlösungen wurden wöchentlich frisch hergestellt und im Kühlschrank (+4°C) gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Probenlösungen mit einem Filter (0,45 μ m Porengröße) (Macherey Nagel, Düren) filtriert. Die Injektion erfolgte durch Anlegen von 20 mbar Druck für 2 Sekunden. Die Messspannung betrug 25 kV. Die Messtemperatur lag zwischen 25 und 60°C, die Wellenlänge des UV-Detektors betrug 230 nm.

20 mg/ml Carboxymethyl- β -cyclodextrin, gelöst in 50 mM Phosphat Puffer wurde als chiraler Selektor verwendet. Der pH-Wert der Pufferlösung betrug 8. Als EOF-Marker wurde für sämtliche Messungen Dimethylformamid verwendet.

Die Konditionierung der Kapillare zwischen den Messungen erfolgte durch Spülen mit 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (2 min, 1 bar) gefolgt Wasser (5 min, 1 bar) und schließlich Pufferlösung für 20 min bei 1 bar. Die Puffergefäße wurden nach jeder 4. Messung ausgetauscht.

8.2.4.5. DEKC Enantiomerentrennung der Trögerschen Base

Alle Proben der Trögerschen Base und des benzylierten Derivats* wurden in Methanol gelöst, die Konzentration betrug $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Probenlösungen wurden 14-tägig frisch hergestellt und im Kühlschrank ($+4^\circ\text{C}$) gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Probenlösungen mit einem Filter ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße) (Macherey Nagel, Düren) filtriert. Die Injektion erfolgte durch Anlegen von 70 mbar Druck für 2 Sekunden. Die Messspannung betrug 30 kV. Die Messtemperatur lag stets zwischen 5 und 60°C , die Wellenlänge des UV-Detektors betrug 210 nm.

14 mg/ml Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (10 mM), gelöst in 50 mM Tris/Phosphat Puffer wurde als chiraler Selektor verwendet. Der pH-Wert der Pufferlösung betrug 2,2.

Die Konditionierung der Kapillare zwischen den Messungen erfolgte durch Spülen mit 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (5 min, 1 bar) gefolgt von Pufferlösung für 10 min bei 1 bar.

8.2.4.6. DCE Trennung von Dipeptiden

Alle Proben der Dipeptide L-Alanyl-L-Prolin, L-Leucyl-L-Prolin und L-Phenylalanyl-L-Prolin wurden in Methanol gelöst, die Konzentration betrug 0,5 mg/ml. Probenlösungen wurden wöchentlich frisch hergestellt und im Kühlschrank ($+4^\circ\text{C}$) gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Probenlösungen mit einem Filter ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$ Porengröße) (Macherey Nagel, Düren) filtriert. Die Injektion erfolgte durch Anlegen von 250 mbar Druck für 3 Sekunden. Die Messspannung betrug 30 kV. Die Messtemperatur lag stets zwischen -10 und 25°C , die Wellenlänge des UV-Detektors betrug 230 nm. 70 mM Borat Puffer mit einem pH-Wert von 9,5 wurde als Messpuffer verwendet. Als EOF-Marker wurde für alle Messungen Dimethylformamid verwendet.

* Das benzylierte Derivat der Trögerschen Base wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Vögtle, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

Die Konditionierung der Kapillare zwischen den Messungen erfolgte durch Spülen mit 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (2 min, 1 bar), gefolgt von Wasser (2 min, 1 bar) und schließlich Pufferlösung für 20 min bei 1 bar.

8.3. Computer Hard- und Software

8.3.1. Simulation von Elutionsprofilen

Zur Simulation von Elutionsprofilen wurde ChromWin 2000 Version 4.0 von O. Trapp [98] eingesetzt. Das Programmpaket benötigt etwa 3,5 MByte Festplattenspeicher und besteht aus den Anwendungen ChromWin, ChromWin Editor, ChromWin 2D und ChromWin SCR, sowie sechs Excel-Tabellenvorlagen zur Auswertung und Archivierung experimenteller Daten. Über den ChromWin Editor können Daten aus jedem beliebigen Tabellenkalkulationsprogramm in ChromWin übernommen werden. Als Simulationsmodelle wurden das theoretische Bodenmodell (TPM), stochastische Model (SM) und stochastische Modell plus (SM+) verwendet. Die Importschnittstelle verarbeitet die Daten in der folgenden Reihenfolge: #1 Name, #2 Überschrift, #3 t_0 , #4 t_R^1 , #5 t_R^2 , #6 w_h^1 , #7 w_h^2 , #8 $h_{plateau}$, #9 c_1 , #10 c_2 , #11 Tailing-Faktor, #12 Korrekturfaktor für die mobile Phase, #13 Korrekturfaktor für die stationäre Phase, #14 h_1 , #15 h_2 , #16 k_1^{mob} , #17 k_1^{stat} , #18 N_1 , #19 Modulationszeit, #20 N_2 , #21 k'_3 , #22 k'_4 , #23 t_R^3 , #24 t_R^4 , #25 t_R^5 , #26 k_2^{mob} , #27 k_2^{stat} .

Als zusätzliche Methode für die direkte Berechnung von Enantiomerisierungen wurde auch die Approximationsfunktion (AF) [107] verwendet. Die jeweils benutzten Methoden und Eingabeparameter wurden an den entsprechenden Stellen aufgeführt.

Die Berechnungen wurde auf folgenden IBM-kompatiblen Personal Computern durchgeführt: Intel Pentium MMX 200 MHz 96 MByte RAM, Intel Pentium II 233 MHz 256 MByte RAM, Intel Pentium II 266 MHz 320 MByte RAM, Intel Pentium II 333 MHz 128 MByte RAM, Intel Celeron 600 MHz 128 MByte

RAM, Intel Pentium II 800 MHz 256 MByte RAM, Intel Pentium III 1 GHz 512 MByte RAM. Als Betriebssysteme wurden Microsoft Windows 98 und 2000 Professional verwendet.

8.3.2. Molecular Modelling

Berechnungen mit der Kraftfeldmethode MM+ [233] und der semiempirischen Methode AM1 [234] wurden mit dem Software-Paket HyperChem (Release 4.0) und der Erweiterung ChemPlus (Release 1.5) von Hypercube Inc. (1115 NW 4th Street, Gainesville, FL 32601-4256, USA) durchgeführt. Sämtliche Strukturoptimierungen wurden mit der Gradientenmethode Polak-Ribierere durchgeführt, bis der RMS-Gradient einen Wert $\leq 0,01 \text{ kcal}\cdot(\text{\AA}\cdot\text{mol})^{-1}$ erreicht hatte. Bei der systematischen Variationen von Torsionswinkeln wurde eine Energiebarriere von $10\ 000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (constraint = 10 000) für die entsprechende Torsion vorgegeben, um den Winkel beizubehalten. Danach wurde nach der oben beschriebenen Vorgehensweise die Struktur optimiert.

9. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Theorie und Anwendung dynamischer Elektromigrationsmethoden zur Bestimmung Enantiomerisierungs- und Isomerisierungsbarrieren stereolabiler Verbindungen beschrieben.

Für die Durchführung temperaturabhängiger Messungen wurde zunächst ein effizientes Temperiersystem für die Trennkapillaren entwickelt, das die Durchführung dynamischer Experimente in einem Temperaturbereich von -25 bis 150°C erlaubt. Ein solches Temperiersystem ist notwendig, um die bei der Messung entstehende Joulesche Wärme, die durch die zur Trennung benötigte hohe Spannung verursacht wird, schnell abführen zu können. Anhand von linearen Ohmplots über einen breiten Spannungs- und Temperaturbereich konnte die Wirksamkeit des Wasserthermostatisiersystems nachgewiesen werden. Der Einfluss des nicht temperierten Injektor- und Detektorbereichs wurde experimentell und mittels Computersimulation mit dem *Enhanced Flow* Modul des Simulationsprogramms ChromWin untersucht. Der durch diese Zonen entstehende Einfluss auf die Höhe der Interkonversionsbarrieren konnte so quantifiziert werden.

Die zur Auswertung dynamischer Elektropherogramme und -chromatogramme verwendeten theoretischen Modelle wurden auf ihre Anwendbarkeit untersucht und ihre Gültigkeit sowohl durch Simulationen als auch durch den Vergleich experimenteller Daten nachgewiesen.

Unterschiedliche elektrokinetische chromatographische und elektrophoretische Trennmethoden wurden erstmals für dynamische Untersuchungen angewandt, und die erhaltenen Messwerte einer statistischen Fehler Analyse unterzogen und durch Vergleich mit Daten aus unabhängigen Messungen validiert.

Anhand der DMEKC konnten die Enantiomerisierungsbarrieren von Oxazepam, Temazepam und Lorazepam, dreier weit verbreiteter Sedativa, untersucht werden. Durch temperaturabhängige Messungen konnten die Aktivierungsparameter bestimmt werden und über pH-abhängige Messungen waren Aussagen zum Interkonversionsmechanismus dieser Benzodiazepine

möglich. Anhand der Benzodiazepine konnte auch die Anwendung der dynamischen Elektromigrationsmethoden zur Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen interkonvertierender Moleküle gezeigt werden.

Die Bestimmung der Enantiomerisierungsbarriere von Chlorthalidon, einem Diuretikum, mittels DEKC unter Verwendung eines Gemisches aus neutralen und negativ geladenen Cyclodextrinen stellt das erste Beispiel für die Bestimmung einer Interkonversionsbarriere mit einer dynamischen Elektromigrationsmethode unter Verwendung der erst kürzlich beschriebenen Approximationsfunktion dar. Durch Vergleich der berechneten Daten mit den simulierten Werten konnte die Gültigkeit dieser Funktion auch bei hohen Bodenzahlen experimentell nachgewiesen werden.

Die Enantiomerisierungsbarriere sowie die Aktivierungsparameter von Thalidomid, einem Sedativum, welches in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts unter dem Namen Contergan traurige Berühmtheit erlangte, wurde ebenfalls mittels DEKC bestimmt. Da keiner dieser Werte bisher in der Literatur beschrieben wurde, stellen diese Messungen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der stereochemischen Labilität dieser Verbindung dar. Durch vergleichende Messungen mit DGC und sfGC konnten Aussagen zum Interkonversionsmechanismus getroffen werden.

Auch die Trögersche Base sowie eines ihrer *N*-benzylierten Derivate wurden mittels DEKC untersucht. Die Interkonversionsbarrieren und die Aktivierungsparameter beider Verbindungen konnten bestimmt werden. Aufgrund der permanenten positiven Ladung der *N*-benzylierten Verbindung wurde eine drastische Verringerung der Enantiomerisierungsbarriere beobachtet.

Mit Hilfe der dynamischen Kapillarelektrophorese wurde die Isomerisierung der Dipeptide L-Alanyl-L-Prolin, L-Leucyl-L-Prolin und L-Phenylalanyl-L-Prolin untersucht. Diese Verbindungen spielen sowohl für die Arzneimittelindustrie, als Vorläufersubstanzen für ACE-Hemmer wie Enalapril, als auch als Modellsubstanzen für größere Oligopeptide und Proteine eine große Rolle. Mit Hilfe der Peakverhältnisse konnten die Geschwindigkeitskonstanten für die Hin-

und Rückreaktion der cis/trans-Isomerisierung berechnet und die zugehörigen Aktivierungsparameter bestimmt werden.

Die hier vorgestellten Methoden sind für die Arzneimittelforschung von besonderem Interesse, da auf vergleichsweise einfache und kostengünstige Art und Weise die Interkonversionsbarrieren chiraler oder isomerer Verbindungen in biogenen Medien untersucht werden können. Die erhaltenen Aktivierungsparameter erlauben Rückschlüsse auf die jeweiligen Interkonversionsmechanismen, und erlauben so Aussagen hinsichtlich der Stabilität strukturverwandter Verbindungen. Diese Daten sind insbesondere für die Leitstrukturoptimierung von großem Interesse.

10. Literaturverzeichnis

- [1] L. Pasteur. *Ann. Chim. Phys.* **24**, 442 (1848).
- [2] L. Pasteur. *Ann. Chim. Phys.* **28**, 56 (1850).
- [3] E.W. Meijer. *Angew. Chem.* **113**, 3899-3905 (2001).
- [4] E. Fischer. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **24**, 2683 (1891).
- [5] J.M. Bijvoet, A.F. Peerdeman, A.J. van Bommel. *Nature*, **168**, 271 (1951).
- [6] E.H. Easson, E. Stedman. *Biochem. J.* **27**, 1257 (1933).
- [7] H.J. Roth, C.E. Müller, G. Folkers. *Stereochemie und Arzneistoffe*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft., Stuttgart, 5 (1998).
- [8] W.H. De Camp. *Chirality* **1**, 2-6 (1989).
- [9] B. Testa, W.F. Trager. *Chirality* **2**, 129-133 (1990).
- [10] Anonymous. *Chirality* **4**, 338-340 (1992).
- [11] S.C. Stinson. *Chem. & Eng. News* 101-122 (1999).
- [12] M. Reist, B. Testa, P.-A. Carrupt, M. Jung, V. Schurig. *Chirality* **7**, 396-400 (1995).
- [13] E.L. Eliel, S.H. Wilen, *Stereochemistry of Organic Compounds*, 1st Ed., Wiley-Interscience, New York (1994).
- [14] M. Reist, B. Testa, P.A. Carrupt. *Enantiomer* **2**, 147-155 (1997).
- [15] J.B. Lambert. *Topics in Stereochemistry* **6**, 19-105 (1971).
- [16] G. Häfelinger, C. Regelman. *J. Comput. Chem.* **6**, 368-376 (1985).
- [17] G. Häfelinger, C. Regelman. *J. Comput. Chem.* **8**, 1057-1065 (1987).
- [18] J. Krupcik, M. Majekova, P. Majek, J. Hrouzek, E. Benicka, F. Onuska, P. Sandra, J. de Zeeuw. *Fresenius J. Anal. Chem.* **352**, 696-698 (1995).
- [19] T.H. Tang, M. Nowakowska, J.E. Guillet, I.G. Csizmadia. *J. Mol. Struct.* **232**, 133 (1991).
- [20] P.U. Biedermann, V. Schurig, I. Agranat. *Chirality* **9**, 350-353 (1997).
- [21] H. Kessler. *Angew. Chem.* **80**, 971-972 (1968).
- [22] H. Kessler. *Angew. Chem.* **82**, 236-253 (1970).
- [23] H.-O. Kalinowski, H. Kessler. *Topics in Stereochemistry* **7**, 295-383 (1973).
- [24] G. Binsch, H. Kessler. *Angew. Chem.* **92**, 445-463 (1980).
- [25] C. Roussel, A. Djafri. *New J. Chem.* **10**, 399 (1986).

-
- [26] H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, M. Kottenhahn, J.W. Bats. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4805-4818 (1992).
- [27] F. Gasparri, L. Lunazzi, D. Misiti, C. Villani. *Acc. Chem. Res.* **28**, 163-170 (1995).
- [28] J. Sandström. *Dynamic NMR Spectroscopy*, 1st Ed., Academic Press, London (1982).
- [29] V. Schurig. *Chirality* **10**, 140-146 (1998).
- [30] D.W. Bassett, H.W. Habgood. *J. Phys. Chem.* **64**, 769-773 (1960).
- [31] J. Kallen, E. Heilbronner. *Helv. Chim. Acta* **43**, 489-500 (1960).
- [32] H.K. Lee, S.F.Y. Li, P.J. Marriott. *Bull. Sing. N. I. Chem.* **18**, 109-114 (1990).
- [33] P.J. Marriott, Y.-H. Lai. *J. Chromatogr.* **447**, 29-41 (1988).
- [34] P.J. Marriott, Y.-H. Lai. *Chemistry in Australia* 386-389 (1994).
- [35] Y.-H. Lai, P.J. Marriott, B.-C. Tan. *Aust. J. Chem.* **38**, 307-314 (1985).
- [36] P.J. Marriott, Y.-H. Lai. *Inorg. Chem.* **25**, 3680-3683 (1986).
- [37] M. Moriyasu, Y. Hashimoto, M. Endo. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **56**, 1972-1977 (1983).
- [38] M. Moriyasu, K. Kawanishi, A. Kato, Y. Hashimoto, M. Sugiura, T. Sai. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **58**, 3351-3355 (1985).
- [39] W.R. Melander, J. Jacobson, C. Horváth. *J. Chromatogr.* **234**, 269-276 (1982).
- [40] W.R. Melander, H.-J. Lin, J. Jacobson, C. Horváth. *J. Phys. Chem.* **88**, 4527-4536 (1984).
- [41] J. Jacobson, W. Melander, G. Vaisnys, C. Horváth. *J. Phys. Chem.* **88**, 4536-4542 (1984).
- [42] S. Ma, F. Kálmán, A. Kálmán, F. Thunecke, C. Horváth. *J. Chromatogr. A* **716**, 167-182 (1995).
- [43] F. Thunecke, A. Kálmán, F. Kálmán, S. Ma, A.S. Rathore, C. Horváth. *J. Chromatogr. A* **744**, 259-272 (1996).
- [44] D.E. Henderson, C. Horváth. *J. Chromatogr. A* **368**, 203-213 (1996).
- [45] A. Kálmán, F. Thunecke, R. Schmidt, P.W. Schiller, C. Horváth. *J. Chromatogr. A* **729**, 155-171 (1996).
- [46] A.S. Rathore, C. Horváth. *J. Chromatogr. A* **787**, 1-12 (1997).
- [47] A.S. Rathore, C. Horváth. *Electrophoresis* **18**, 2935-2943 (1997).
- [48] R.A. Keller, J.C. Giddings. *J. Chromatogr.* **3**, 205-220 (1960).

-
- [49] J. Kallen, E. Heilbronner. *Helv. Chim. Acta* **43**, 489-500 (1960).
- [50] D.W. Bassett, H.W. Habgood. *J. Phys. Chem.* **64**, 769-773 (1960).
- [51] W. Bürkle, H. Karfunkel, V. Schurig. *J. Chromatogr.* **288**, 1-14 (1984).
- [52] M. Jung, V. Schurig. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 529-534 (1992).
- [53] M. Jung, Program Simul, No. 620, Quantum Chemistry Program Exchange, *QCPE Bull.* **3**, 12 (1992).
- [54] D.H. Hochmuth, W.A. König. *Liebigs Ann.* 947-951 (1996).
- [55] R. Kramer. *J. Chromatogr.* **107**, 241-252 (1975).
- [56] E. Cremer, R. Kramer. *J. Chromatogr.* **107**, 253-263 (1975).
- [57] V. Schurig, M. Jung, M. Schleimer, F.-G. Klärner. *Chem. Ber.* **125**, 1301-1303 (1992).
- [58] M. Jung, M. Fluck, V. Schurig. *Chirality* **6**, 510-512 (1994).
- [59] K. Cabrera, M. Jung, M. Fluck, V. Schurig. *J. Chromatogr. A* **731**, 315-321 (1996).
- [60] V. Schurig, F. Keller, S. Reich, M. Fluck. *Tetrahedron: Asymmetry* **8**, 3475-3480 (1997).
- [61] A. Mannschreck, H. Zinner, N. Pustet. *Chimia* **43**, 165-166 (1989).
- [62] A. Mannschreck, L. Kießl. *Chromatographia* **28**, 263-266 (1989).
- [63] B. Stephan, H. Zinner, F. Kastner, A. Mannschreck. *Chimia* **10**, 336-338 (1990).
- [64] J. Veciana, M.I. Crespo. *Angew. Chem.* **103**, 85-88 (1991).
- [65] W.H. Pirkle, C.J. Welch, A.J. Zych. *J. Chromatogr. A* **648**, 101-109 (1993).
- [66] F. Gasparrini, L. Lunazzi, S. Alcaro, C. Villani. *J. Org. Chem.* **60**, 5515-5519 (1995).
- [67] R.J. Friary, M. Spangler, R. Osterman, L. Schulman, J.H. Schwerdt. *Chirality* **8**, 364-371 (1996).
- [68] F. Gasparrini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani. *Tetrahedron: Asymmetry* **8**, 2069-2073 (1997).
- [69] K. Lorenz, E. Yashima, Y. Okamoto. *Angew. Chem.* **110**, 2025-2028 (1998).
- [70] J. Oxelbark, S. Allenmark. *J. Org. Chem.* **64**, 1483-1486 (1999).
- [71] J. Oxelbark, S. Allenmark. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1587-1589 (1999).
- [72] J. Oxelbark, S. Claeson, S. Allenmark. *Enantiomer* **5**, 413-419 (2000).

-
- [73] F. Gasparrini, L. Lunazzi, A. Mazzanti, M. Pierini, K.M. Pietrusiowicz, C. Villani. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4776-4780 (2000).
- [74] G. Cannazza, D. Braghiroli, A. Tait, M. Baraldi, C. Parenti, W. Lindner. *Chirality* **13**, 94-101 (2001).
- [75] O. Trapp, S. Caccamese, C. Schmidt, V. Böhmer, V. Schurig. *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 1395-1398 (2001).
- [76] V. Schurig, W. Bürkle, A. Zlatkis, C.F. Poole. *Naturwissenschaften* **66**, 423-424 (1979).
- [77] V. Schurig, W. Bürkle. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7573-7580 (1982).
- [78] V. Schurig, D. Schmalzing, M. Schleimer. *Angew. Chem.* **103**, 994-996 (1991).
- [79] W.R. Roth, M. Winzer, M. Korell, H. Wildt. *Liebigs Ann.* 897-919 (1995).
- [80] C. Wolf, W.A. König, C. Roussel. *Liebigs Ann.* 781-786 (1995).
- [81] C. Wolf, D.H. Hochmuth, W.A. König, C. Roussel. *Liebigs Ann.* 357-363 (1996).
- [82] C. Wolf, W.H. Pirkle, C.J. Welch, D.H. Hochmuth, W.A. König, G.-L. Chee, J.L. Charlton. *J. Org. Chem.* **62**, 5208-5210 (1997).
- [83] G. Weseloh, C. Wolf, W.A. König. *Angew. Chem.* **107**, 1771-1772 (1995).
- [84] G. Weseloh, C. Wolf, W.A. König. *Chirality* **8**, 441-445 (1996).
- [85] G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig. *Anal. Chem.* **72**, 2758-2764 (2000).
- [86] G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig. *Enantiomer* **5**, 391-396 (2000).
- [87] G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig. *J. Cap. Elec.* 169-175 (1999).
- [88] G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig. *Electrophoresis* **22**, 2409-2415 (2001).
- [89] G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig. *Electrophoresis* **22**, 3185-3190 (2001).
- [90] O. Trapp, G. Schoetz, V. Schurig. *Chirality* **13**, 403-414 (2001).
- [91] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen. *Electrophoresis* **19**, 2834-2840 (1998).
- [92] M. Fillet, L. Fotsing, J. Crommen. *J. Chromatogr. A* **817**, 113-119 (1998).
- [93] H. Jakubetz, M. Juza, V. Schurig. *Electrophoresis* **19**, 738-744 (1998).
- [94] M. Fillet, B. Chankvetadze, J. Crommen, G. Blaschke. *Electrophoresis* **20**, 2691-2697 (1999).
- [95] S.-I. Izumoto, H. Nishi. *Electrophoresis* **20**, 189-197 (1999).
- [96] M. Fillet, Ph. Hubert, J. Crommen. *J. Chromatogr. A* **875**, 123-134 (2000)

-
- [97] C. Garcya-Ruiz, Y. Martyn-Biosca, A.L. Crego, M.L. Marina. *J. Chromatogr. A* **910**, 157-164 (2001).
- [98] O. Trapp, V. Schurig. *Comput. Chem.* **25**, 187-195 (2001).
- [99] R.H. Palmieri. *Beckmann, Technical Information T-1823A* (1996).
- [100] H. Eyring. *Chem. Rev.* **17**, 65 (1935).
- [101] K.J. Laidler. *Chemical Kinetics*, 3rd Ed., Harper & Row, New York (1987).
- [102] A.J.P. Martin, R.L.M. Synge. *Biochem. J.* **35**, 1358 (1941).
- [103] L.C. Craig. *J. Biol. Chem.* **155**, 519-534 (1944).
- [104] R.C. Tolman. *Principles of Statistical Mechanics*, Oxford University Press, Oxford (1938).
- [105] S. Reich, O. Trapp, V. Schurig. *J. Chromatogr. A* **892**, 487-498 (2000).
- [106] O. Trapp, V. Schurig. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1424-1430 (2000).
- [107] O. Trapp, V. Schurig. *J. Chromatogr. A* **911**, 167-175 (2001).
- [108] K. Ebert, H. Ederer. *Computeranwendungen in der Chemie*, 2. Aufl., VCH, Weinheim (1985).
- [109] J.W. Jorgenson, K. DeArman-Lukacs. *Anal. Chem.* **53**, 1298-1302 (1981).
- [110] F.W.G. Kohlrausch. *Ann. Phys. Chem.* **62**, 14 (1897).
- [111] A. Tiselius. *Trans Faraday Soc.* **33**, 524 (1937).
- [112] V.P. Dole. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1119-1126 (1945).
- [113] L.G. Longworth. *J. Phys. Chem.* **51**, 171-183 (1947).
- [114] A. Tiselius. *Electrophoresis. Theory, Methods and Applications*, Academic Press, New York, 17 (1959).
- [115] S. Hjertén. *Chromatogr. Rev.* **9**, 122-239 (1967).
- [116] F.M. Everaerts, J.L. Beckers, T.P.E.M. Verheggen. *Isotachophoresis – Theory, Instrumentation and Applications*. *J. Chromatogr. Library*, Elsevier, Amsterdam (1976).
- [117] R. Virtanen. *Acta Polytech. Scand.* **123**, 1-67 (1974).
- [118] J.W. Jorgenson. *J. Chromatogr.* **218**, 208 (1981).
- [119] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchia, T. Ando. *Anal. Chem.* **56**, 111-113 (1984).
- [120] S. Hjertén. *J. Chromatogr. A* **347**, 191-198 (1985).
- [121] J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith. *Anal. Chem.* **59**, 1230-1232 (1987).

-
- [122] J.H. Knox, I.H. Grant. *Chromatographia* **24**, 135-143 (1987).
- [123] N.W. Smith, M.B. Evans. *Chromatographia* **38**, 649-657 (1994).
- [124] M.-L. Riekkola, A.Å. Jönsson, *Preliminary IUPAC Recommendation "Terminology for Analytical Electromigration Techniques"* (2001).
- [125] C.F. Poole, S.K. Poole. *J. Chromatogr. A* **792**, 89-104 (1997).
- [126] J.C. Giddings. *Sep. Sci.* **4**, 181-189 (1969).
- [127] J.C. Giddings. *J. Chromatogr.* **480**, 21-33 (1989).
- [128] G. Schomburg. *Gas Chromatography – A Practical Course*, 1st Ed., VCH, Weinheim, **22** (1990).
- [129] W. Kok. *Chromatographia* **S51**, S3-S89 (2000).
- [130] K. Swinney, D.J. Bornhop. *Electrophoresis* **21**, 1239-1250 (2000).
- [131] S.C. Beale. *Anal. Chem.* **70**, 279R-300R (1998).
- [132] R.P. Baldwin. *Electrophoresis* **21**, 4017-4028 (2000).
- [133] S. McWhorter, S.A. Soper. *Electrophoresis* **21**, 1267-1280 (2000).
- [134] R. Kuhn, S. Hofstetter-Kuhn. *Chromatographia* **34**, 505-512 (1992).
- [135] K. Sarmini, E. Kandler. *J. Chromatogr. A* **792**, 3-11 (1997).
- [136] M.-L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I.E. Valko, H. Siren. *J. Chromatogr. A* **792**, 13-35 (1997).
- [137] K. Verleysen, P. Sandra. *Electrophoresis* **19**, 2798-2833 (1998).
- [138] D. Wistuba, V. Schurig. *J. Chromatogr. A* **875**, 255-276 (2000).
- [139] R. Vespalec, P. Bocek. *Chem. Rev.* **100**, 3715-3753 (2000).
- [140] S.A. Shamsi, I.M. Warner. *Electrophoresis* **18**, 853-872 (1997).
- [141] P. Camilleri. *Electrophoresis* **18**, 2322-2330 (1997).
- [142] M.G. Khaledi. *J. Chromatogr. A* **780**, 3-40 (1997).
- [143] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando. *Anal. Chem.* **57**, 834-841 (1985).
- [144] S. Terabe, M. Shibata, Y. Miyashita. *J. Chromatogr.* **480**, 403-411 (1989).
- [145] K. Otsuka, S. Terabe. *J. Chromatogr. A* **515**, 221-226 (1990).
- [146] P.G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe. *J. Chromatogr. A* **780**, 41-61 (1997).
- [147] C.C. Williams, S.A. Shamsi, I.M. Warner. *Adv. Chromatogr.* **37**, 364-423 (1997).
- [148] F. Haddadian, S.A. Shamsi, I.M. Warner. *Electrophoresis* **20**, 3011-3026 (1999).

-
- [149] Z. El Rassi. *J. Chromatogr. A* **875**, 207-233 (2000).
- [150] A.S. Cohen, A. Paulus, B.L. Karger. *Chromatographia* **24**, 15-24 (1987).
- [151] B. Koppenhoefer, X. Zhu, A. Jakob, S. Wuerthner, B. Lin. *J. Chromatogr. A* **875**, 135-161 (2000).
- [152] S. Fanali. *J. Chromatogr. A* **875**, 89-122 (2000).
- [153] T. de Boer, R.A. de Zeeuw, G.J. de Jong, K. Ensing. *Electrophoresis* **21**, 3220-3239 (2000).
- [154] B. Chankvetadze, G. Blaschke. *Electrophoresis* **20**, 2592-2604 (1999).
- [155] W. Saenger. *Angew. Chem.* **92**, 343-361 (1980).
- [156] J.H.T. Luong, A.L. Nguyen. *J. Chromatogr. A* **792**, 431-444 (1997).
- [157] J. Szejtli. *Chem. Rev.* **98**, 1743-1753 (1998).
- [158] J.B. Vincent, D.M. Kirby, T.H. Nguyen, G. Vigh. *Anal. Chem.* **69**, 4419-4428 (1997).
- [159] J.B. Vincent, A.D. Sokolowski, T.V. Nguyen, G. Vigh. *Anal. Chem.* **69**, 4226-4233 (1997).
- [160] J.B. Vincent, G. Vigh. *J. Chromatogr. A* **816**, 233-241 (1998).
- [161] J.B. Vincent, G. Vigh. *J. Chromatogr. A* **817**, 105-111 (1998).
- [162] H. Cai, G. Vigh. *J. Chromatogr. A* **827**, 121-132 (1998).
- [163] H. Cai, T.V. Nguyen, G. Vigh. *Anal. Chem.* **70**, 580-589 (1998).
- [164] H. Cai, G. Vigh. *J. Microcol. Sep* **10**, 293-299 (1998).
- [165] R. Kuhn. *Electrophoresis* **20**, 2605-2613 (1999).
- [166] W. Zhu, W.-S. Li, F.M. Raushel, G. Vigh. *Electrophoresis* **21**, 3249-3256 (2000).
- [167] J.P. Quirinio, S. Terabe, K. Otsuka, J.B. Vincent, G. Vigh. *J. Chromatogr. A* **838**, 3-10 (1999).
- [168] M. Tacker, P. Glukhovskiy, H. Cai, G. Vigh. *Electrophoresis* **20**, 2794-2798 (1999).
- [169] W. Zhu, G. Vigh. *Anal. Chem.* **72**, 310-317 (2000).
- [170] W. Zhu, G. Vigh. *J. Chromatogr. A* **892**, 499-507 (2000).
- [171] W. Zhu, G. Vigh. *Electrophoresis* **21**, 2016-2024 (2000).
- [172] P. Glukhovskiy, G. Vigh. *Electrophoresis* **21**, 2010-2015 (2000).
- [173] T. Christians, U. Holzgrabe. *J. Chromatogr. A* **911**, 249-257 (2001).
- [174] G. Gübitz, M.G. Schmid. *J. Chromatogr. A* **792**, 179-225 (1997).
- [175] B. Chankvetadze. *J. Chromatogr. A* **792**, 269-295 (1997).

-
- [176] M. Fillet, P. Hubert, J. Crommen. *Electrophoresis* **19**, 2834-2840 (1998).
- [177] V. Schurig, D. Wistuba. *Electrophoresis* **20**, 2313-2328 (1999).
- [178] D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, J.-R. Chen. *Chirality* **6**, 496-509 (1994).
- [179] K.L. Rundlett, D.W. Armstrong. *Anal. Chem.* **67**, 2088-2095 (1995).
- [180] D.W. Armstrong, M.P. Gasper, K.L. Rundlett. *J. Chromatogr. A* **689**, 285-304 (1995).
- [181] T.J. Ward, T.M. Oswald. *J. Chromatogr. A* **792**, 309-325 (1997).
- [182] J.-W. Kang, Y.-T. Yang, J.-M. You, Q.-Y. Ou. *J. Chromatogr. A* **825**, 81-87 (1998).
- [183] T. Oswald, T.J. Ward. *Chirality* **11**, 663-668 (1999)
- [184] K.H. Ekborg-Ott, G.A. Zientara, J.M. Schneiderheinze, K. Gahm, D.W. Armstrong. *Electrophoresis* **20**, 2438-2457 (1999).
- [185] T.J. Ward, A.B. Farris III, K. Woodling. *J. Biochem. Biophys. Methods* **48**, 163-174 (2001).
- [186] T.J. Ward, A.B. Farris III. *J. Chromatogr. A* **906**, 73-89 (2001).
- [187] R. Vespalec, V. Sustacek, P. Bocek. *J. Chromatogr. A* **638**, 255-261 (1993).
- [188] X. Zhu, Y. Ding, B. Lin, A. Jakob, B. Koppenhoefer. *Electrophoresis* **20**, 1869-1877 (1999).
- [189] R. Kuhn, F. Erni, T. Bereuter, J. Häusler. *Anal. Chem.* **64**, 2815-2820 (1982)
- [190] K. Verleysen, T. Van den Bosch, P. Sandra. *Electrophoresis* **20**, 2650-2655 (1999).
- [191] R. Kuhn. *Electrophoresis* **20**, 2605-2613 (1999).
- [192] Y. Tanaka, K. Otsuka, S. Terabe. *J. Chromatogr. A* **875**, 323-330 (2000).
- [193] T. Koide, K. Ueno. *J. Chromatogr. A* **909**, 305-315 (2001).
- [194] M. Sánchez-Pena, Y. Zhang, S. Thibodeaux, L. McLaughlin, A. Munoz de la Pena, I. Warner. *Tetrahedron Lett.* **37**, 5841-5844 (1996).
- [195] D. Shohat, E. Grushka. *Anal. Chem.* **66**, 747-750 (1994).
- [196] M.S. Pena, Y. Zhang, I.M. Warner. *Anal. Chem.* **69**, 3239-3242 (1997).
- [197] S. Sun, M.J. Sepaniak, J.-S. Wang, C.D. Gutsche. *Anal. Chem.* **69**, 344-348 (1997).
- [198] A. Bazzanella, H. Mörbel, K. Bächmann, R. Milbrandt, V. Böhmer, W. Vogt. *J. Chromatogr. A* **792**, 143-149 (1997).
- [199] H. Ogoshi, T. Mizutani. *Acc. Chem. Res.* **31**, 81-89 (1998)

-
- [200] M. Fillet, L. Fotsing, J. Crommen. *J. Chromatogr. A* **817**, 113-119 (1998).
- [201] S.-I. Izumoto, H. Nishi. *Electrophoresis* **20**, 189-197 (1999).
- [202] M.A. Nussbaum. *Electrophoresis* **20**, 2664-2669 (1999).
- [203] S. Terabe, Y. Miyashita, O. Shibata, E.R. Barnhart, L.R. Alexander, D.G. Patterson, B. Karger, N. Tanaka. *J. Chromatogr. A* **516**, 23-31 (1990).
- [204] S. Terabe, Y. Miashita, Y. Ishihama, O. Shibata. *J. Chromatogr. A* **636**, 47-55 (1993).
- [205] K.L. Rundlett, D.W. Armstrong. *Anal. Chem.* **67**, 2088-2095 (1995).
- [206] J.G. Clothier, L.M. Daley, S.A. Tomellini. *J. Chromatogr. B* **603**, 121-131 (1996).
- [207] S. Boonkerd, M.R. Detaevernier, Y. Michotte, J. Vindevogel. *J. Chromatogr. A* **704**, 238-241 (1995).
- [208] J. Barret, W. Franklyn Smyth, I.E. Davidson. *J. Pharm. Pharmac.* **25**, 387-393 (1972).
- [209] V. Sunjic, R. Dejanovic, A. Palcovic, L. Klasinc, F. Kaifez. *Tetrahedron Lett.* **49**, 4493-4496 (1976).
- [210] V. Sunjic, M. Oklobdzija, A. Lisini, A. Segal, F. Kajfez, D. Srzic, L. Klasinc. *Tetrahedron* **35**, 2531-2537 (1979).
- [211] X.-L. Lu, S.K. Yang. *J. Chromatogr. A* **535**, 229-238 (1990).
- [212] S.K. Yang, X.-L. Lu. *J. Pharmazeutical Sci.* **78**, 789-795 (1989).
- [213] Y. Aso, S. Yoshioka, T. Shibasaki, M. Uchiyama. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1834-1840 (1988).
- [214] S.K. Yang, X.-L. Lu. *Chirality* **4**, 443-446 (1992).
- [215] T. Jira, C. Vogt, G. Blaschke, T. Beyrich. *Pharmazie* **48**, 196-198 (1993).
- [216] K. Cabrera, D. Lubda. *J. Chromatogr. A* **666**, 433-438 (1994).
- [217] S.K. Yang. *J. Pharmazeutical Sci.* **83**, 898-902 (1994).
- [218] T.J. Yang, S.K. Yang. *J. Food and Drug Anal.* **3**, 173-183 (1995).
- [219] S.K. Yang, Z. Bao, M. Shou. *Chirality* **8**, 214-223 (1996).
- [220] S.K. Yang, R. Tang, Q.-L. Pu. *J. Lab. Comp.* **38**, 753-759 (1996).
- [221] T. Nishikawa, Y. Hayashi, S. Suzuki, H. Kubo, H. Ohtani. *J. Chromatogr. A* **767**, 93-100 (1997).
- [222] S.K. Yang. *Enantiomer* **3**, 485-490 (1998).
- [223] S.K. Yang. *Chirality* **11**, 179-186 (1999).
- [224] K. Cabrera, M. Jung, M. Fluck, V. Schurig. *J. Chromatogr. A* **731**, 315-321 (1996).

-
- [225] H. Hofstetter, O. Hofstetter, V. Schurig. *J. Microcol. Sep* **10**, 287-291 (1998).
- [226] H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo. *J. Chromatogr. A* **515**, 233-243 (1990).
- [227] S. Boonkerd, M.R. Detavernier, J. Vindevogel, Y. Michotte. *J. Chromatogr. A* **756**, 279-286 (1996).
- [228] O. Trapp, V. Schurig. *Chem. Eur. J.* **7**, 1495-1502 (2001).
- [229] R. Huisgen. *Angew. Chem.* **89**, 689-602 (1977).
- [230] R. Huisgen, W. Scheer, H. Mäder. *Angew. Chem.* **81**, 619-621 (1969).
- [231] S.K. Yang. *J. Chin. Chem. Soc.* **45**, 277-284 (1998).
- [232] G. Severin. *Chirality* **4**, 222-226 (1992).
- [233] Allinger, N.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127.
- [234] M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- [235] M.J.S. Dewar, K.M. Dieter. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8075.
- [236] J.J.P. Stewart *J. Comp. Aided Mol. Design* **1990**, *4*, 1.
- [237] G. Blaschke, H.P. Kraft, K. Fickentscher, F. Köhler. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **29**, 1640-1642 (1979).
- [238] B. Testa, P.A. Carrupt, J. Gal. *Chirality* **5**, 105-111 (1993).
- [239] B. Knoche, G. Blaschke. *J. Chromatogr. A* **666**, 235-240 (1994).
- [240] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, A. Fyg, P. Höglund. *Chirality* **7**, 44-52 (1995).
- [241] M. Reist, L.H. Christiansen, P. Christoffersen, P.-A. Carrupt, B. Testa. *Chirality* **8**, 469-473 (1995).
- [242] C. Weinz, G. Blaschke. *J. Chromatogr. B* **647**, 287-292 (1995).
- [243] T. Eriksson, S. Björkman, B. Roth, A. Fyge, P. Höglund. *Chirality* **10**, 223-228 (1998).
- [244] M. Reist, P.-A. Carrupt, E. Francotte, B. Testa. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 1521-1528 (1998).
- [245] J. Dönneke, C. Paul, W.A. König, L.A. Svensson, O. Gyllenhaal, J. Vessman. *J. Microcol. Sep* **8**, 495-505 (1996).
- [246] B. Knoche, G. Blaschke. *Chirality* **6**, 221-224 (1994).
- [247] J.C. Reepmeyer. *Chirality* **8**, 11-17 (1996).
- [248] H.Y. Aboul-Enein, S. Bakr. *Chirality* **9**, 10-12 (1997).

-
- [249] M. Meyering, D. Strickmann, B. Chankvetadze, G. Blaschke, C. Desiderio, S. Fanali. *J. Chromatogr. B* **723**, 225-264 (1999).
- [250] M. Mayering, B. Chankvetadze, G. Blaschke. *J. Chromatogr. A* **876**, 157-167 (2000).
- [251] A. Aumatell, R.J. Wells, D.K.Y. Wong. *J. Chromatogr. A* **686**, 293-307 (1994).
- [252] M. Meyring, B. Chankvetadze, G. Blaschke. *Electrophoresis* **20**, 2425-2431 (1999).
- [253] M. Meyring, C. Mühlenbrock, G. Blaschke. *Electrophoresis* **21**, 3270-3279 (2000).
- [254] O. Trapp, G. Schoetz, V. Schurig. *J. Pharm. Biomed. Anal.* in press (2001).
- [255] H. Schumacher, R.L. Smith, R.T. Williams. *Br. J. Pharmacol.* **25**, 324-327 (1965).
- [256] A. Werner. *Über die räumliche Anordnung der Atome in stickstoffhaltigen Molekülen*, Dissertation, Polytechnikum Zürich (1890).
- [257] J.H. van't Hoff. *La Chimie dans l'Espace*, Bazendijk, Rotterdam (1875).
- [258] J.A. LeBel. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **22**, 337 (1874).
- [259] J. Meisenheimer, L. Angermann, O. Finn, E. Vieweg. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **57**, 1747 (1924).
- [260] R.G. Kostyanovsky, G.K. Kadorkina, V.R. Kostyanovsky, V. Schurig, O. Trapp. *Angew. Chem.* **112**, 3066-3069 (2000).
- [261] J. Tröger. *J. Prakt. Chem.* **36**, 225-245 (1887).
- [262] V. Prelog, P. Wieland. *Helv. Chim. Acta* **27**, 1127-1134 (1944).
- [263] E. Huthmann, M. Juza. *J. Chromatogr. A* **908**, 185-200 (2001).
- [264] K. Krause, B. Chankvetadze, Y. Okamoto, G. Blaschke. *Electrophoresis* **20**, 2772-2778 (1999).
- [265] S. Mayer, *Dissertation Universität Tübingen*. S. 49 (1993).
- [266] A. Greenberg, N. Molinaro, M. Lang. *J. Org. Chem.* **49**, 1127-1130 (1984).
- [267] S.H. Wilen, J.Z. Qi, P.G. Willard. *J. Org. Chem.* **56**, 485-487 (1991).
- [268] A. Aamouche, F.J. Devlin, P.J. Stephens. *Chem. Commun.* 361-362 (1999).
- [269] M.D. Cowart, I. Sucholeiki, R.R. Bukownik, C.S. Wilcox. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6204-6206 (1998).

-
- [270] S. Goswami, K. Ghosh, S. Dasgupta. *J. Org. Chem.* **65**, 1907-1914 (2000).
- [271] C.S. Wilcox. *Tetrahedron Lett.* **26**, 5749-5752 (1985).
- [272] B. Minder, M. Schürch, T. Mallat, A. Baiker. *Catal. Lett.* **31**, 143-149 (1995).
- [273] J.F. Brandts, H.R. Halvorson, M. Brennan. *Biochemistry* **14**, 4953-4963 (1975).
- [274] P.A. Evans, C.M. Dobson, R.A. Kautz, G. Hatful, R.O. Fox. *Nature* **329**, 266-268 (1987).
- [275] P.A. Evans, R.A. Kautz, R.O. Fox, C.M. Dobson. *Biochemistry* **28**, 362-270 (1989).
- [276] C. Renner, S. Alefelder, J.H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder. *Angew. Chem.* **113**, 949-951 (2001).
- [277] J.C. Gesquiere, E. Diesis, M.T. Cung, A. Tartar. *J. Chromatogr.* **478**, 121-129 (1989).
- [278] S. Friebe, G.J. Krauss. *J. Chromatogr. A* **598**, 139-142 (1992).
- [279] S. Friebe, B. Hartrodt, K. Neubert, G.-J. Krauss. *J. Chromatogr. A* **661**, 7-12 (1994).
- [280] A. Wutte, G. Gübitz, S. Friebe, G.-J. Krauss. *J. Chromatogr. A* **677**, 186-191 (1994).
- [281] G.-J. Krauss, S. Friebe, S. Gebauer. *J. Prot. Chem.* **17**, 515-516 (1998).
- [282] S. Gebauer, S. Friebe, G. Scherer, G. Gübitz, G.-J. Krauss. *J. Chromatogr. Sci.* **36**, 388-394 (1998).
- [283] W.A. Thomas, M.K. Williams. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 994 (1972).
- [284] C. Grathwohl, K. Wüthrich. *Biopolymers* **20**, 2623-2633 (1981).
- [285] P.C. Uden, Y. Zeng. *Chromatographia* **34**, 269 (1992).

Meine akademischen Lehrer waren:

U. Abram, K. Albert, H.P.T. Ammon, E. Bayer, H. Bertagnolli, D. Christen, G. Döring, G. Drews, H. Eckstein, G. Gauglitz, K.E. Geckeler, F. Gönnerwein, W. Göpel, G. Häfelinger, M. Hanack, L. Heide, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, B. Koppenhoefer, K.-A. Kovar, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M.E. Maier, H.A. Mayer, H.-J. Meyer, K. Müller, U. Nagel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, E. Plies, H. Pommer, O. Rössler, H.J. Roth, P.C. Schmidt, D. Schrenk, V. Schurig, E. Schweda, F.F. Seelig, H.-U. Siehl, B. Speiser, G. Staudt, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, M. Wahl, A. Wächtler, A. Wankmüller, W. Winter, K.-P. Zeller, C. Ziegler.

CURRICULUM VITAE

Gabriele Susanne Trapp, geb. Schoetz

- 27.10.1972 geboren in Göppingen.
Eltern: Roland Schoetz,
Renate Schoetz, geb. Silcher.
- 1979 – 1983 Grundschule Hohenstaufen.
- 1983 – 1992 Mörike-Gymnasium Göppingen.
- Mai 1992 Allgemeine Hochschulreife.
- August 1992 Santa Barbara City College, Santa Barbara, CA, USA,
- September 1993 Associate of Arts in Liberal Studies.
- 1993 - 1998 Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen.
- August 1995 Diplomvorprüfung in Chemie.
- 1995 - 1999 Studium Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen.
- Februar 1998 Diplomhauptprüfung in Chemie.
- März 1998 Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. K.-A. Kovar
- September 1998 mit dem Thema: „Potentielle Designerdrogen: Synthese und
Struktur einiger neuer Tryptaminderivate“.
- November 1998 Experimenteller Teil der Dissertation unter der Leitung von
- August 2001 Prof. Dr. V. Schurig mit dem Thema: „Bestimmung der
Interkonversionsbarrieren von Enantiomeren und Isomeren
mit dynamischen Elektromigrationsmethoden und
Computersimulation“.
- Januar 1999 Kollegiatin des Graduiertenkollegs „Chemie in
- Dezember 2001 Interphasen“.
- März 1999 Erstes Staatsexamen Pharmazie.
- Oktober 2000 Doktoranden-Stipendium des Graduiertenkollegs „Chemie
- Dezember 2001 in Interphasen“.
- September 2001 Hochzeit mit Oliver Trapp.