

**Entwicklung von robusten  
kapillarelektrophoretischen Methoden  
für die Enantiomerentrennung  
mittels sulfatierter Cyclodextrine**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

**Fabian I. Stapf**

aus Breitenbach SO

Basel 2007

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag von

Prof. Dr. Michael Oehme und Prof. Dr. Carla Vogt

Basel, den 26. Juni 2007

Prof. Dr. Hans-Peter Hauri

Dekan

Meinem  
verstorbenen  
Vater  
Hans Stapf

Die vorliegende Arbeit ist entstanden in den Laboratorien der Abteilung Proteinanalytik der Solvias AG in Basel unter der Oberaufsicht von Herrn Prof. Dr. Michael Oehme und der Betreuung von Frau Dr. Franka Kálmán.

#### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herr Prof. Dr. Michael Oehme für die Möglichkeit, diese Arbeit ausserhalb seines Instituts in der Firma Solvias AG in Basel anzufertigen, seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie die vielen Anregungen und kritischen Diskussionen.

Für die Betreuung in der Abteilung Proteinanalytik der Solvias AG in Basel möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Franka Kálmán bedanken. Ihre Unterstützung und grosse Hilfsbereitschaft bei der praktischen Durchführung und der unermüdliche Einsatz, mir die tiefen Geheimnisse der Kapillarelektrophorese beizubringen, hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei den Kollegen des Arbeitskreises an der Universität Basel - Dorrit Griesshaber, Sven Heekmann, Jana Hüttig, Saverio Iozza, Alexander Kotz, Ingrid Langlois, Margot Reth, Fernando Romero und Zdenek Zencak - möchte ich mich für die freundschaftliche Aufnahme und manch wertvolle Diskussion und Information bedanken.

Mein besonderer Dank gilt speziell den Mitarbeitern im Team AK2 der Proteinanalytik der Solvias AG in Basel, die mich immer tatkräftig in meiner Arbeit unterstützt haben. Insbesondere Dr. Steffen Kiessig, der mir immer zu Rat gestanden hat und oft noch spät abends mit mir die Theorie des Signalteilungseffekts diskutiert hat. Dóra Bolyan und Marie-Eve Bury, die mich fortwährend motiviert und für die immer so angenehme Arbeitsatmosphäre beigetragen haben. Yvette Cornelis, Dr. Daniela Hoegger, Dr. Boriana Popkirova, Dr. Kristina

Račaitytė, Dr. Anna Rozhkova und Dr. Erika Schmidt danke ich für ihre Unterstützung, grosse Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge. Für die vielen diskussionsbehafteten Mittagessen mit Marcel Jegge bedanke ich mich wie auch für die vielen Gespräche mit allen Personen im Aufenthaltsraum vom zweiten Stock. Ein spezieller Dank gilt auch Herrn Dr. Michael Wössner, Hassan Bouzater und Frau Yuliya Schmidt, die mich herzlich in ihrem Team nach meiner Dissertation aufgenommen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Daniel Richner für die Viskositätsmessungen. Ein grosser Dank geht auch an Dr. Anita Schnyder, Dr. Felix Spindler und Dr. Martin Studer aus der Katalyse und an Dr. Hansueli Blaser für die wertvolle Hilfe bei Vorträgen und Publikationen. Weiterhin möchte ich mich bei Marketing und Sales für das immer offene Ohr bedanken, besonders bei Dr. Guido Sonsmann für die gütige Mitnutzung seines Hotelzimmers an der MSB 2006 in Amsterdam. Ohne ihn und sein Coaching wäre die Präsentation nicht so ein grosser Erfolg gewesen.

Ausdrücklich möchte ich mich auch bei der DAC (DIVISION of ANALYTICAL CHEMISTRY of the Swiss Chemical Society) für die finanzielle Unterstützung an den Konferenzen MSB 2006 und HPLC 2006 bedanken.

Ein Dank geht an Dr. Cheff Chapman der Firma Beckman Coulter und Prof. Dr. Gyula Vigh der Firma Antek für die Bereitstellung vieler HSCDs.

Mein persönlichster Dank gilt meiner Verlobten Céline, die mir durch alle Hochs und Tiefs dieser Arbeit half und viel Verständnis für diese Arbeit in den letzten Jahren aufbrachte. Auch Célines Eltern danke ich.

Ebenso meiner Mutter, wie auch meinen beiden früheren Arbeitskolleginnen Eva Henn und Dr. Uta Scherer, aber auch allen früheren Arbeitskollegen der Fachhochschule beider Basel (FHBB) gilt ein ganz grosser Dank. Ein weiterer Dank geht an meine ehemaligen Studienkollegen Patrick Furrer und Martin Umiker.

Nicht vergessen möchte ich, auch meinen beiden Joggingkollegen Markus Häner und Michel Kottmann zu danken. Das morgendliche Training mit Markus war oft der Anstoss für viele gute Ideen.

Abschliessend danke ich der Firma Solvias, besonders Dr. Peter Hirter, Dr. Martin Looser und Urs Weber, denn ohne die finanzielle Unterstützung der Firma Solvias AG wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

# Inhalt

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABKÜRZUNGEN .....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>TYPISCHE VON FIRMEN VERWENDETE ABKÜRZUNGEN .....</b>                      | <b>10</b> |
| <b>MESSEINHEITEN .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG .....</b>                               | <b>15</b> |
| <b>1.1. CHIRALE MOLEKÜLE .....</b>   | <b>15</b> |
| 1.1.1 Übersicht .....  | 15        |
| 1.1.2 Anwendung .....  | 16        |
| 1.1.3 Trennung von Enantiomeren .....  | 17        |
| <b>1.2. AUFGABENSTELLUNG .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>1.3. CHIRALE TRENNSYSTEME .....</b>                                       | <b>21</b> |
| 1.3.1 Gaschromatographie (GC) .....  | 21        |
| 1.3.2 Überkritische Flüssigkeitschromatographie (SFC) .....                  | 21        |
| 1.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....                  | 22        |
| 1.3.4 Vergleich Kapillarelektrophorese und HPLC .....                        | 23        |
| <b>1.4. GRUNDLAGEN DER KAPILLARELEKTROPHORESE – THEORETISCHER TEIL .....</b> | <b>24</b> |
| 1.4.1 Apparativer Aufbau .....   | 24        |
| 1.4.2 Theoretische Grundlagen .....  | 28        |
| <b>1.5. CHIRALE SELEKTOREN .....</b>   | <b>31</b> |
| 1.5.1 Cyclodextrine (CDs) .....  | 33        |
| 1.5.2 Struktur und Eigenschaft .....   | 33        |
| 1.5.3 Synthese .....   | 36        |
| 1.5.4 Cyclodextrinderivate .....   | 37        |
| 1.5.5 CE-Trennprinzip mit sulfatierten Cyclodextrinen .....                  | 39        |
| 1.5.5.1 Komplexierungskonstantenmodell .....                                 | 39        |
| 1.5.5.2 Migrationszeitenmodell .....   | 40        |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>42</b> |
| <b>2.1. MATERIAL UND REAGENZIEN .....</b>                                    | <b>42</b> |
| 2.1.1 Hochsulfatierte Cyclodextrine .....                                    | 42        |
| 2.1.2 Reagenzien, Kapillaren .....   | 43        |
| <b>2.2. ARBEITSGERÄTE UND HILFSMITTEL .....</b>                              | <b>47</b> |
| 2.2.1 CE-Geräte .....  | 47        |
| 2.2.2 Geräteeinstellungen, Kapillaren .....                                  | 47        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>2.3. METHODEN / ELEKTROLYTE / PROBENVORBEREITUNGEN .....</b>                                  | <b>49</b>  |
| 2.3.1 Elektrolytherstellung .....  | 49         |
| 2.3.2 Herstellung der Probenlösungen .....   | 49         |
| <b>3 RESULTATE UND DISKUSSION .....</b>  | <b>50</b>  |
| <b>3.1. EINLEITUNG.....</b>  | <b>50</b>  |
| <b>3.2. CHIRALE TRENNUNG WASSERLÖSLICHER MODELLSUBSTANZEN.....</b>                               | <b>53</b>  |
| <b>3.3. CHIRALE TRENNUNG NICHT WASSERLÖSLICHER MODELLSUBSTANZEN.....</b>                         | <b>58</b>  |
| 3.3.1 Auftreten unerwarteter Signale .....   | 58         |
| 3.3.2 Einfluss der Injektionspfropfenlänge auf die Signalteilung .....                           | 62         |
| 3.3.3 Einfluss der Methanolkonzentration der Probe auf den Signalteilungseffekt .....            | 66         |
| 3.3.4 Einfluss des Lösungsmittels auf den Signalteilungseffekt .....                             | 68         |
| 3.3.5 Signalflächenverhältnisse.....   | 70         |
| 3.3.6 Relative Mobilitätsdifferenz $\delta_m$ .....  | 72         |
| 3.3.6.1 Einfluss der Methanolkonzentration der Probe auf die Selektivität $\delta_m$ .....       | 72         |
| 3.3.6.2 Einfluss der Injektionszeit auf die Selektivität $\delta_m$ .....                        | 74         |
| 3.3.7 Einfluss der Kapillaroberflächeneigenschaften auf die Signalteilung .....                  | 76         |
| 3.3.8 Einfluss der Kapillartemperatur auf die Signalaufteilung .....                             | 79         |
| 3.3.9 Geräteunabhängigkeit der Signalaufteilung .....  | 81         |
| 3.3.10 Einfluss der Basizität und Löslichkeit der Modells-substanzen auf die Signalteilung.....  | 81         |
| 3.3.11 Einfluss des pH-Wertes der Probelösung auf die Signalteilung .....                        | 83         |
| <b>3.4. HYPOTHESE DER ARTEFAKT-BILDUNG.....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>3.5. DISKUSSION DER ARTEFAKT-BILDUNG ANHAND DES<br/>KOMPLEXIERUNGSKONSTANTENMODELLS .....</b> | <b>90</b>  |
| 3.5.1 Einfluss der Pfropfenlänge .....   | 90         |
| 3.5.2 Einfluss des organischen Lösungsmittels.....   | 91         |
| 3.5.3 Einfluss der Konzentration des organischen Lösungsmittels .....                            | 94         |
| 3.5.4 Einfluss der Kapillartemperatur .....  | 94         |
| 3.5.5 Einfluss der Löslichkeit und Basizität der Modells-substanz.....                           | 96         |
| <b>3.6. STANDARD CE-SYSTEM.....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>3.7. HOCHDURCHSATZMETHODEN (HIGH THROUGHPUT).....</b>   | <b>103</b> |
| 3.7.1 Short End Technik.....   | 103        |
| 3.7.2 Multirun .....   | 105        |
| <b>3.8. VERGLEICH HSCDS VON BECKMAN COULTER MIT ALDRICH ANHAND DER<br/>MULTIRUNTECHNIK.....</b>  | <b>107</b> |
| <b>3.9. ERMITTELN DER KOMPLEXIERUNGSKONSTANTEN .....</b>   | <b>109</b> |
| <b>4 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>121</b> |

## Abkürzungen

|              |  |
|--------------|--|
| ABI          | Kapillarelektrophoresegerät ABI-270HT, <i>Applied Biosystems</i>   |
| ACN          | Acetonitril  |
| A.D.         | Aussendurchmesser  |
| AFS          | Artefaktsignal   |
| CD           | Cyclodextrin   |
| CE           | Kapillarelektrophorese, <i>capillary electrophoresis</i>   |
| CCE          | Chirale Kapillarelektrophorese, <i>chiral capillary electrophoresis</i>  |
| Chirale-HPLC | Chirale Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>chiral high performance liquid chromatography</i>                         |
| CZE          | Kapillarzonenelektrophorese  |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid   |
| DAD          | Dioden-Feld-Detektor, <i>diode-array detector</i>  |
| ee           | Enantiomerenüberschuss, <i>enantiomeric excess</i>   |
| EOF          | elektroosmotischer Fluss   |
| FDA          | Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten,<br><i>Food and Drug Administration</i>                                  |
| GC           | Gaschromatographie   |
| HGE          | Hintergrundelektrolyt  |
| EN           | Enantiomer   |
| EP           | Enantiomerenpaar   |
| EtOH         | Ethanol  |
| HPLC         | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>  |
| HSCD         | Hochsulfatierte Cyclodextrine  |
| HS-CD        | Hochsulfatierte Cyclodextrine von Beckman Coulter ( <i>highly sulfated cyclodextrins</i> )                                     |
| I.D.         | Innendurchmesser   |
| IUPAC        | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>   |
| LOD          | Kleinste, mit einer bestimmten Unsicherheit behaftete Konzentration an Analyt, die noch messbar ist, <i>Limit of Detection</i> |
| n.a.         | nicht analysiert   |
| MeOH         | Methanol   |

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| NMR                | Kernresonanzspektroskopie, <i>nuclear magnetic resonance</i> |
| SFC                | <i>supercritical fluid chromatography</i>                    |
| TEA                | Triethylamin   |
| UV                 | Ultraviolett   |
| VIS                | sichtbar, <i>visible</i>                                     |
| v/v                | Mischungsverhältnis Volumen-zu-Volumen                       |
| w/v                | Mischungsverhältnis Masse-zu-Volumen                         |
| $\mu_{\text{eof}}$ | elektroosmotische Mobilität                                  |

## Typische von Firmen verwendete Abkürzungen

|       |  |
|-------|--|
| HSCD  | Hochsulfatierte Cyclodextrine (wird nicht differenziert angewendet)  |
| HS-CD | Hochsulfatierte Cyclodextrine von Beckman Coulter ( <i>highly sulfated cyclodextrins</i> )   |
| SsCD  | Einfach sulfatierte Cyclodextrine an Position 6 von z.B. Antek, Registech, ElphoTech ( <i>single-isomer sulfated cyclodextrins</i> ) |
| sCDs  | Hochsulfatierte Cyclodextrine z.B. von Aldrich, Carbomer ( <i>sulfated cyclodextrins</i> )   |

## Messeinheiten

|               |   |
|---------------|---|
| cm            | Zentimeter  |
| mol/l (M)     | mol pro Liter   |
| $\mu\text{A}$ | Mikroampère   |
| mAU           | Milliabsorptionseinheiten ( <i>milli-absorption units</i> ) |

## Gleichungen

- Enantiomerenüberschuss ee(%)

Gleichung 1

$$ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \cdot 100 \text{ mit } [R] > [S]$$

R: Peakfläche des überschüssigen Enantiomers

S: Peakfläche des zu geringem Anteil vorhandenen Enantiomers [Schmitt, 2002].

- Auflösung

Gleichung 2

$$R_s = 2 \cdot (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$$

$t_2$  und  $t_1$  sind die Migrationszeiten des langsamer respektive des schneller migrierenden Peaks, gemessen am Peakmaximum,  $w_2$  und  $w_1$  sind die korrespondierenden Basisbreiten [Engelhardt *et al.*, 1994].

- Korrigierte Peakfläche

Gleichung 3

$$A_c = \text{Area} / t_m$$

Infolge unterschiedlicher Migrationszeiten und deshalb „falscher“ Integrationssignale werden die Peakflächen mit der Division aus den Integrationsflächen und entsprechenden Migrationszeiten relativiert [Altria, 1993].

## Zusammenfassung

Die Analytik chiraler Verbindungen in der pharmazeutischen Chemie hat in den letzten Jahren gross an Bedeutung gewonnen. Die Anwendung der Kapillarelektrophorese (CE) als Hochleistungstrenntechnik hat sich in diesem Zusammenhang stark etabliert und als effektives und schnelles Werkzeug zur Ermittlung von Enantiomerenverhältnissen bei minimalem Materialverbrauch gezeigt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung der CE zur Enantiomerenbestimmung von 26 optisch aktiven Zwischenprodukten in der Entwicklung von homogenen Ligand-Katalysatoren zur asymmetrischen Hydrierung. Diese optisch aktiven Zwischenprodukte werden als Modellsubstanzen für die Bestimmung von Umsatz und Enantiomerenreinheit eingesetzt und wurden bislang mit Gaschromatographie und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie analysiert. Dabei waren aufwändige Probenvorbereitungen und Derivatisierungen notwendig respektive konnte teilweise bislang gar keine Trennung in die Enantiomere erreicht werden. Mit dem Einsatz der CE und der selektiven Anwendung von hochsulfatierten Cyclodextrinen (HSCDs) konnten die wasserlöslichen Modellsubstanzen in die beiden Enantiomere des Racemates und dem dazugehörigen Edukt aufgetrennt werden.

Schwierigkeiten traten bei grösseren Mengen an organischen Lösungsmitteln, welche zur Löslichkeitsverbesserung in den Substanzproben zugegeben wurden, auf. Dabei splitteten sich die beiden Enantiomerensignale auf und bildeten je ein ursprüngliches Signal und ein Artefakt-signal aus.

---

Dieser Aufteilungseffekt wurde in der Arbeit anhand folgender elektrophoretischer Faktoren detailliert untersucht und anschliessend auf Plausibilität geprüft.

- Injektionsmenge
- Lösungsmittelgehalt der Probelösung
- Art des Lösungsmittels
- pH-Wert der Probelösung
- Kapillaroberflächen
- Kapillartemperatur
- Art der HSCDs (Aldrich, Antek, Beckman Coulter)
- Basizität und Löslichkeit der Modellsubstanzen

Die Injektionsmenge wie auch die Konzentration an organischem Lösungsmittels in der Probelösung wirken sich dabei sehr stark auf die Signalteilung aus. Die Basizität wie auch die Löslichkeit der zu trennenden Verbindungen zeigen ebenfalls einen Einfluss auf die beobachtete Signalteilung. Hingegen bewirkt eine Änderung der Art der HSCDs, der Kapillaroberfläche und der Kapillartemperatur keine messbare Verstärkung oder Abschwächung der Signalteilung. Ebenso eine starke Veränderung des pH-Werts der Probelösung zeigt wenig Einfluss.

Mit den Ergebnissen konnte der Aufteilungseffekt anhand des Komplexierungskonstantenmodells modelliert werden. Mit dem Modell wurden daraus folgende geeignete Massnahmen zur Unterdrückung der Signalteilung ermittelt.

- Konzentrierte Probelösungen mit minimalem organischem Lösungsmittelgehalt
- Minimale Injektionsmenge
- Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel

Dadurch wurde es möglich, ein Standard CE-System zu entwickeln, welches auch die sehr schlecht in Wasser löslichen Modellsubstanzen mit DMSO zu lösen und ohne Signalteilung zu trennen. Dieses Standard CE-System gestattet es, die geforderten 26 Modellsubstanzen ohne Probenvorbereitung in ihre Enantiomere zu trennen und auch eine Abtrennung des Eduktes zu erzielen. Dies ermöglicht neben der Enantimerenüberschuss-Bestimmung (ee) auch eine Umsatzbestimmung der Hydrierung des Ligand-Katalysators.

Das Standard CE-System wurde für die beiden Hochdurchsatzmethoden „*Short End*“ und „*Multirun*“-Technik erweitert und erfolgreich angewendet. Zugleich konnte gezeigt werden, dass mit HSCDs von Beckman Coulter im Vergleich zu denen von Aldrich und Antek Trennungen mit oft höheren Auflösungen und weniger Basislinienrauschen möglich sind.

Mit dem Wissen des Aufteilungseffektes wurden Messungen zur Bestimmung der Komplexbildungskonstanten bei hohen organischen Lösungsmittelkonzentrationen und ohne Zusatz vorgenommen. Für das Enantiomerenpaar (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin konnten ohne Lösungsmittel Werte von  $E_1=13337 \text{ M}^{-1}$  und  $E_2= 315 \text{ M}^{-1}$ , und mit 60% (v/v) Methanolgehalt Werte von  $E_1 =119 \text{ M}^{-1}$  und  $E_2=33 \text{ M}^{-1}$  ermittelt werden.

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

## 1.1. Chirale Moleküle

### 1.1.1 Übersicht

Die Chiralität ("Cheir" = griechisch: die Hand/Händigkeit) beruht in der Chemie auf der Eigenschaft von Molekülen, dass ihr Spiegelbild durch Drehung nicht mit dem Original zur Deckung gebracht werden kann. Die häufigste Ursache dafür ist die Anwesenheit eines „asymmetrischen“ Kohlenstoffatoms, das ein stereogenes Zentrum im Molekül darstellt [Schmitt, 1995]. Andere Atome wie Phosphor oder Stickstoff können ebenso stereogene Zentren ausbilden, wobei aber entscheidend ist, dass die Substituenten am stereogenen Zentrum ihre relative Lage zueinander nicht ändern können. Solche Moleküle, werden chiral, die anderen achiral genannt.

Chirale Moleküle, welche sich wie Bild und Spiegelbild zueinander verhalten, werden als Enantiomere bezeichnet. Eine Mischung mit gleichen Anteilen beider Enantiomere (1:1) wird Racemat oder racemisches Gemisch genannt (siehe Abbildung 1.1.1).

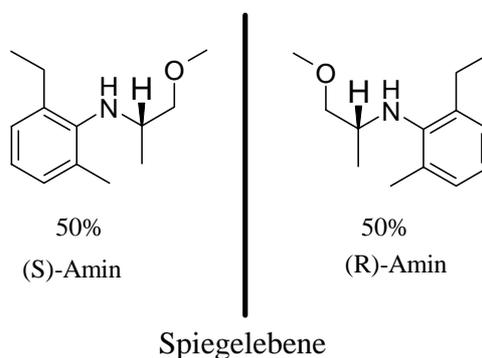


Abbildung 1.1.1: Enantiomerengemisch (1:1) Racemat von S- und R-Amin.

---

Zur Unterscheidung wird die räumliche Anordnung der Substituenten an einem Stereozentrum nach den durch R. S. Cahn, C. K. Ingold und V. Prelog festgesetzten Regeln (CIP-Regeln nach IUPAC) mit R- oder S- (R für rectus, lateinisch "rechts" und S für sinister, lateinisch "links") bezeichnet [Cahn *et al.*, 1966]. Andere Nomenklaturen mit D/L, +/- oder  $\alpha/\beta$  sind zwar noch häufig anzutreffen, sollten jedoch wegen der Gefahr von Missverständnissen vermieden werden. Liegen mehrere Stereozentren in einem Molekül vor, so werden sie jeweils einzeln nach den CIP-Regeln mit R- oder S- bezeichnet. Unterscheiden sich zwei Verbindungen in einem oder mehreren, nicht aber in allen Stereozentren, so spricht man von Diastereomeren.

### 1.1.2 Anwendung

Chiralität ist eine wichtige Eigenschaft von vielen synthetischen Stoffen wie Pharmazeutika und biologischen Verbindungen und gilt dabei oft als wesentliche Eigenschaft der „Lebensbausteine“ [Maier *et al.*, 2001]. Ungefähr 40% aller Pharmawirkstoffe, die zurzeit (Stand 2000) im Handel sind, sind chiral [Gübitz und Schmid, 2000].

Oft ist dabei nur ein Enantiomer verantwortlich für die spezifische Eigenschaft der Verbindung. In manchen Fällen haben beide Enantiomere eine biologische Aktivität, wobei für spezielle Anforderungen ein exaktes Verhältnis der beiden Enantiomere zueinander vorhanden sein muss, um die optimale Wirkung zu erhalten [Verleysen und Sandra, 1998a]. Die pharmakologische Aktivität des zweiten Enantiomers kann aber auch inaktiv sein, ungewünschte Nebeneffekte beinhalten oder im schlimmsten Fall sogar Toxizität aufweisen. Dies geschah im Falle der „Contergan-Katastrophe“, wobei das „unerwünschte“ Enantiomer eine teratogene Wirkung zeigte [Botting, 2002].

---

Die Analytik des pharmakologisch aktiven Enantiomers, aber auch des anderen Enantiomers, ist deshalb äusserst wichtig und seit der Einführung neuer Vorschriften der FDA 1992 über die Enantiomerenreinheit von Arzneimitteln unumgänglich [Verleysen und Sandra, 1998a; Chankvetadze, 2001]. Dadurch ist die Entwicklung von Methoden zur Kontrolle der Enantiomerenreinheit bei der Synthese von optisch aktiven Substanzen für pharmakologische Studien sehr wichtig.

Gerade bei der Herstellung von neuen pharmazeutischen Komponenten, aber auch bereits bei deren synthetischen Zwischenprodukten, ist das Ermitteln der chiralen Reinheit, der Sicherheit und Effizienz einer Substanz ein kritischer Faktor. Eine Überwachung der beiden Enantiomere ist zwingend, besonders wenn beide eine unterschiedliche biologische Aktivität oder ein unterschiedliches toxikologisches Profil haben. Das unerwünschte Enantiomer wird dann als Verunreinigung betrachtet und muss im Herstellungsprozess minimiert und dadurch im niedrigen Konzentrationsbereich kontrolliert werden [Schmitt *et al.*, 2002]. Diese Aufgabenstellung ist eine grosse Herausforderung an die Analytik und benötigt eine sehr selektive und höchst effiziente (auf die gewünschten Edukte, Enantiomer und Verunreinigungen empfindliche und sehr schnelle) Trennmethode.

### 1.1.3 Trennung von Enantiomeren

Ein Enantiomerenpaar verhält sich wie „Bild und Spiegelbild“ zueinander und unterscheidet sich deswegen nicht in ihren physikalischen (mit der Ausnahme von polarisiertem Licht) und chemischen Eigenschaften. Die Trennung von Enantiomeren ist somit auf klassischem Weg, zum Beispiel durch Destillation oder Umkristallisieren, nicht möglich. Zur Unterscheidung der Enantiomere gibt es verschiedene Verfahren.

---

Die NMR (Kernresonanzspektroskopie, *nuclear magnetic resonance*) ist zum Beispiel mit Hilfe chiraler Verschiebungsreagenzien in der Lage, Enantiomere zu identifizieren und zu quantifizieren. Allerdings können die Enantiomere damit nur detektiert, nicht aber voneinander getrennt werden.

Zur Trennung müssen analytische Verfahren wie Gaschromatographie (GC), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), überkritische Flüssigkeitschromatographie (SFC) und Kapillarelektrophorese (CE) modifiziert werden. Im einfachsten Fall kann die Umsetzung (Derivatisierung) der zu untersuchenden chiralen Substanz mit einer anderen enantiomerenreinen, chiralen Verbindung erfolgen. Durch die Einbringung eines zweiten, asymmetrischen Kohlenstoffatoms liegen dann Diastereomere vor. Da sich diese nun in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften unterscheiden, kann die Trennung mit Hilfe einer der oben genannten Trennverfahren erfolgen. Eine solche Vorgehensweise ist oft kompliziert und wegen der Herstellung eines enantiomerenreinen Reagenzes in äquimolaren Mengen sehr teuer.

Eine andere Variante ist die Schaffung eines chiralen Umfeldes durch Trennverfahren [Engelhardt *et al.*, 1994]. Für eine chirale Erkennung, das heißt die Bildung diastereomerer Komplexe, ist eine „Dreipunktwechselwirkung“ zwischen Analyt und Selektor notwendig. Das heißt, es muss eine Fixierung des Analyten am Selektor in der Nähe des chiralen Zentrums über drei Punkte möglich sein, die ihrer Stabilität nach stereospezifisch für die Analytenantiomere ist. Diese Wechselwirkungen können durch die Bildung von Wasserstoffbrücken oder Ionenpaaren,  $\pi$ - $\pi$ -, Dipol-Dipol-, hydrophobe, elektrostatische oder sterische Wechselwirkungen realisiert werden [Dalgliesh, 1952].

## 1.2. Aufgabenstellung

Chirale Zwischenprodukte finden mehr und mehr Anwendung in der chemischen und pharmazeutischen Industrie zur kostengünstigen Produktion von optisch reinen Chemikalien und Arzneimitteln. Diese chiralen Zwischen- aber auch Endprodukte werden oft mittels asymmetrischer, homogener Hydrierung synthetisiert [Blaser *et al.*, 2001].

Ein Beispiel einer asymmetrischen, homogenen Hydrierung ist in Abbildung 1.2.1 dargestellt, in welcher ein achirales Edukt, das MEA Imin ((2-Ethyl-6-methyl-phenyl)-(2-methoxy-1-methyl-ethyliden)-amin) zu (S)-NAA ((2-Ethyl-6-methyl-phenyl)-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-amin) hydriert wird. S-(NAA) ist ein Zwischenprodukt zur Herstellung des weltweit im Einsatz befindlichen Herbizids (S)-Metolachlor, welches mittels eines hochspezifischen Ligandkatalysator, einem Iridiumkomplex mit einem chiralen Josiphosliganden, hydriert wird. Im gesamten enantioselektiven, katalytischen Produktionsprozess wird (S)-Metolachlor mit einem ee von 80% erhalten [Blaser *et al.*, 1999].

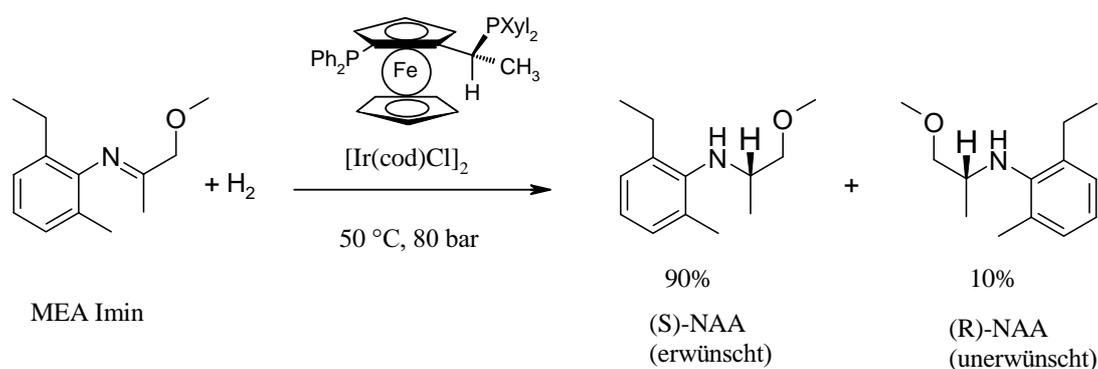


Abbildung 1.2.1: Asymmetrische homogene Hydrierung des achiralen Edukts MEA Imin ((2-Ethyl-6-methyl-phenyl)-(2-methoxy-1-methyl-ethyliden)-amin) zu (S)-NAA ((2-Ethyl-6-methyl-phenyl)-(2-methoxy-1-methyl-ethyl)-amin)

Zur Synthese chiraler Synthesebausteinen werden verschiedene, spezifische und hochaktive Ligand-Katalysatoren verwendet [Hsiao *et al.*, 2004; Thommen, 2005]. Diese elektronisch

und sterisch optimierten Ligand-Katalysatoren werden zur asymmetrisch homogenen Hydrierung von definierten funktionellen Gruppen verwendet [Hsiao *et al.*, 2004]. Die Effizienz eines solchen Hydrierprozesses, wie auch die Leistung des Ligand-Katalysators wird durch die Bestimmung der chiralen Reinheit der chiralen Modellsubstanzen ermittelt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von robusten, analytischen „Standard-Systemen“ zur quantitativen Bestimmung des Enantiomerüberschusses (ee) und der chemischen Reinheit von 26 chiralen Modellsubstanzen (siehe Tabelle 4) der Synthese-Katalyse-Abteilung von Solvias AG.

Die zu untersuchenden Modellsubstanzen zeigen eine sehr grosse Variabilität an chemischen Strukturen und funktionellen Gruppen. Des weitern sind die Moleküle neutral, sauer und basisch. Da eine effiziente Prozess- und Katalysatorentwicklung und die dazu notwendige Untersuchung auf chirale Reinheit von so vielen Modellsubstanzen wie möglich sehr essentiell ist, sind schnelle und einfache analytische Methoden nötig.

Eine direkte Analyse der Reaktionsmischung, welche stark in der Probenkonzentration und Matrixzusammensetzung variiert, ist ebenfalls von Bedeutung. Eine zeitaufwändige Probenreinigung oder Konzentrationsanpassung darf daher nicht notwendig sein. Ein universelles Analysensystem, anwendbar für alle Modellsubstanzen, wäre von Vorteil, da ein Wechsel zwischen unterschiedlichen Analysensystemen apparativ aufwändig und zeitintensiv ist. Da die Analysen nicht von analytischem Personal durchgeführt werden, sollte(n) das(die) chirale(n) Testsystem(e) einfach zu bedienen, robust und sehr reproduzierbar sein.

---

## 1.3. Chirale Trennsysteme

### 1.3.1 Gaschromatographie (GC)

Die chirale Gaschromatographie (GC) ist eine sehr kosteneffiziente und universell angewendete Trennmethode mit hoher Selektivität und hoher Präzision [Buser und Francotte, 1997].

Die chromatographische Auftrennung des Enantiomerengemisches basiert auf der Wechselwirkung der beiden Enantiomere mit der auf der Kapillaroberfläche aufgetragenen chiralen stationären Phase. Spezielle Derivate von Cyclodextrinen (CD siehe Kapitel 1.5.4) oder auch chirale Polysiloxane werden dabei angewendet.

Die Trennung wird normalerweise durch einfache Säulentemperaturänderung optimiert. Grösstenteils muss aber infolge zu niedrigen Dampfdruckes der zu untersuchenden Verbindungen, vorhergehend eine Derivatisierung des Enantiomerenpaares zu einer niederflüchtigen Verbindung vorgenommen werden. Des Weiteren sind Säulen/Oberflächen für chirale Trennungen eingeschränkt und nur zeitaufwändig auswechselbar. Deshalb wurde die GC nicht weiter in Betracht gezogen.

### 1.3.2 Überkritische Flüssigkeitschromatographie (SFC)

Die SFC ist eine relativ neue Trennmethode. Sie ist der HPLC sehr ähnlich, jedoch wird eine überkritische mobile Phase benutzt (oft Kohlenstoffdioxid, CO<sub>2</sub>). Mit SFC kann in bedeutend kürzerer Zeit als in der HPLC eine Trennung erzielt werden. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass mit viel höheren Durchflussmengen gearbeitet wird. Der Diffusionskoeffizient ist bei einem überkritischen Lösungsmittel ähnlich gross wie der eines Gases und die Equilibrierung der Säulen wird ebenfalls viel schneller als bei der HPLC erreicht [Schleimer und Schurig, 1992; Maftouh *et al.* 2005].

Chirale Trennungen sind mit den gleichen wie in der HPLC gebräuchlichen Säulen möglich und auch die Trennmechanismen können als gleich angeschaut werden. Zur Trennung werden geeignete Zusätze wie Methanol oder Aceton zur Polaritätserhöhung und damit zum Lösen der zu trennenden Enantiomere dem überkritischen Elutionsmittel zugeführt. Die für SFC extra erforderten und oft komplexen Spezialanlagen sowie das benötigte Fachwissen sind wahrscheinlich die Gründe, weshalb die SFC sich in den Syntheselaboratorien noch nicht etabliert hat. Infolge Fehlens einer solchen Anlage und den oben genannten Gründen wird darauf auch nicht weiter eingegangen.

### 1.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC ist wie die vorhin erwähnte GC eine heute sehr stark verbreitete und sehr universell angewendete Trennmethode. Die chromatographische Auftrennung des Enantiomerengemisches erfolgt wie in der GC aufgrund der gezielten Wechselwirkung der beiden Enantiomere mit der chiralen stationären Phase. Dabei wird das Enantiomerengemisch durch die verschieden starken Wechselwirkungen mit der chiralen stationären Phase, welche eine sehr grosse Bandbreite von gebundenen chiralen Selektoren ähnlich derer in der CE (siehe Kapitel 1.5 chirale Selektoren) aufweist, aufgetrennt [Stalcup und Gahm, 1996].

Da nur durch empirische Versuche die geeignete Phase für das Trennproblem gefunden werden kann, ist eine Vorhersage des optimalen chiralen Selektors oft nicht möglich. Die Trennung auf der geeigneten stationären Phase wird danach durch die Änderung der Polarität der mobilen Phase optimiert. Ein Wechsel der Säule bei Änderung der Trennproblematik, ein Wechsel der mobilen Phase wie auch die Equilibrierung des Systems sind zeitaufwändig. Zudem sind chirale Säulen oft sehr teuer.

### 1.3.4 Vergleich Kapillarelektrophorese und HPLC

Eine detaillierte Betrachtung der Kapillarelektrophorese wird im Kapitel 1.4 vorgenommen. Die HPLC und CE sind beide hocheffiziente Analysetechniken, die zur Trennung chiraler Gemische verwendet werden [Chankvetadze, 2001]. Der Vorteil beider Techniken ist das in den Laboratorien oftmals schon vorhandene Equipment, weshalb die Beschaffung zusätzlicher teurer Trennsysteme wegfällt. Vergleicht man die HPLC mit der CE, zeigen beide eine sehr hohe Trenneffizienz.

Der grosse Vorteil der CE ist der nur sehr geringe Verbrauch an Reagenzien. Des weiteren werden keine kostenintensiven Trennsäulen benötigt und der Wechsel von Trennmedien ist enorm einfach und schnell [Altria, 1999; Lipka *et al.*, 2004]. CE ist ausserdem bekannt für die oftmals extrem kurzen Analysenzeiten.

Nachteile jedoch sind die geringere Nachweisgrenze durch die bei der UV-Detektion kleinere optische Weglänge durch die Kapillare [Andersson und Hägglund, 2002b], das oftmals fehlende Fachwissen und die aber inzwischen grösstenteils behobene schlechte Injektionsreproduzierbarkeit [Altria, 1999]. Durch das Fehlen einer stationären Phase sind CE-Systeme im Vergleich zu HPLC-Systemen jedoch sehr robust betreffend Matrixwechsel und variablen Probenmolekülen. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Trenneffizienz durch die Peakschärfe, welche infolge Fehlens der Eddy-Diffusion, und des deshalb abwesendem Massentransfers, erzielt wird (A- und C-Terme der Van Deemter Gleichung fehlen). Durch die oft sehr hohe Selektivität in der CE, der grossen Trennstufenzahl von bis zu 1'000'000 pro Meter und der Basislinientrennung kann eine Trennung bei bedeutend geringeren Konzentrationen an chiralen Selektoren im Vergleich zu HPLC/GC erreicht werden [de Boer *et al.*, 2000; Chankvetad-

ze, 2001]. Da sich für die Aufgabenstellung CE als bevorzugte Trennmethode herausgestellt hat, wird für die folgenden Betrachtungen nur noch darauf eingegangen.

## **1.4. Grundlagen der Kapillarelektrophorese – Theoretischer Teil**

Die Kapillarelektrophorese CE ist eine Hochleistungstrenntechnik (high performance capillary electrophoresis, HPCE), die durch Jorgenson und Lukacs zu Beginn der 1980er Jahre entwickelt wurde [Jorgenson und Lukacs, 1981; Jorgenson und Lukacs 1983]. Sie weist im Vergleich zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) besondere Vorteile für die Untersuchung geladener Analyten auf. Für die Enantiomerentrennung stellt die CE eine wertvolle Ergänzung zur HPLC dar, die sich durch hohe Trenneffizienz, gute Automatisierbarkeit und eine breite Adaptierbarkeit der Trennbedingungen auszeichnet. Daher hat sich die CE in den letzten Jahren auch fest in der chiralen Analytik etabliert [Altira, 1993; Verleysen und Sandra, 1998a; de Boer *et al.*, 2000].

### **1.4.1 Apparativer Aufbau**

Der schematische Aufbau eines CE-Gerätes ist in Abbildung 1.4.1 dargestellt. Eine mit Puffer gefüllte Quarzkapillare, die mit ihren Enden in Puffergefäße eintaucht, bildet den Hauptbestandteil des Gerätes.

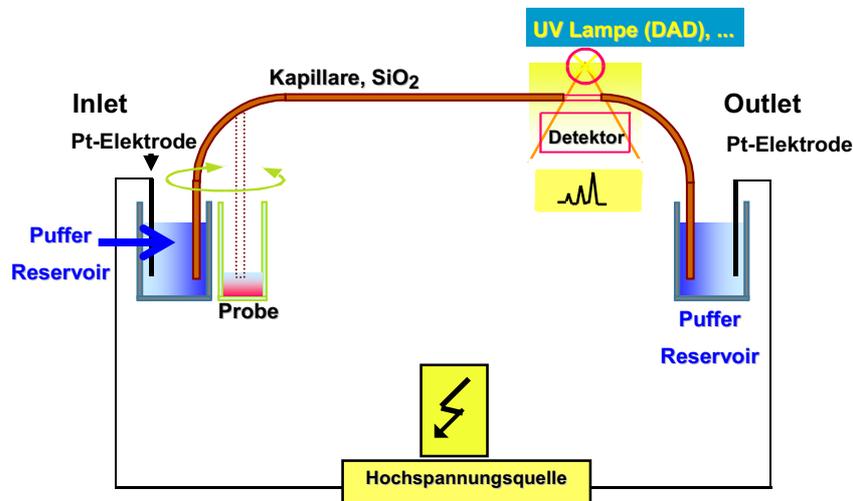


Abbildung 1.4.1: Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes

Häufige Verwendung finden Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 25 bis 100  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 15 bis 150 cm (gerätespezifisch). Diese überbrückt die beiden Puffergefäße, zwischen denen eine Spannung von bis zu 30'000 Volt angelegt wird. Das Material, aus welchem die Kapillaren gezogen werden, besteht aus Quarz (*fused silica*). Zu deren besseren Handhabbarkeit (Bruchgefahr) werden sie aussen mit einer Polyimid-Beschichtung versehen. Die Detektion erfolgt *online* am Detektionsfenster, das heisst unter Verwendung eines Abschnitts der Kapillare, von dem die äussere, UV/VIS-undurchlässige Polyimid-Beschichtung entfernt wurde.

Gebräuchlichster Detektor ist ein UV/VIS-DAD-Detektor. Neben den UV-Detektoren können Fluoreszenzdetektoren, induktive Leitfähigkeitsdetektoren, elektrochemische oder radioaktive Detektoren eingesetzt werden. Eine Kombination der CE mit Massenspektrometrie (MS) ist wie in der HPLC ebenfalls möglich, aber wenig verbreitet.

Um die Probe in der Kapillare zu platzieren, wird das Puffergefäß an einem Ende gegen ein entsprechendes Probengefäß ausgetauscht (Inlet beziehungsweise gegenüberliegende Kapillarseite Outlet). Die Injektion kann folgendermassen erfolgen:

- hydrodynamisch (durch Anlegen von Druck oder Vakuum),
- elektrokinetisch (durch Anlegen einer Spannung),
- hydrostatisch (mittels Schwerkraft durch Höhenunterschied der Kapillarenden).

In kommerziellen Geräten finden nur noch die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion Anwendung. Die Trennung der Probe erfolgt im Trennpuffer innerhalb der Kapillare durch Anlegen einer Spannung über die beiden Puffergefässelektroden. Das sich in der Kapillare ausbildende elektrische Feld bewirkt eine Migration der Probezone und eine Auftrennung aller Ionen bezogen auf ihr Masse-/Ladungsverhältnis.

Das Gebiet der Kapillarelektrophorese umfasst verschiedenste Techniken, die auf unterschiedlichen Trennprinzipien beruhen. Eine kleine Übersicht gebräuchlicher Arten ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht diverser Arten der Kapillarelektrophorese

| Art   | Abkürzung | Trennprinzip   | <sup>1</sup> EOF                   | Praktische Anwendung   |
|---|-----------|--|------------------------------------|--|
| Kapillarzonen-<br>elektrophorese                            | CZE       | Elektrophoretische Mobilität, Verhältnis<br>Masse zu Ladung und Einfluss des EOFs                            | kontrolliert/<br>unkontrolliert    | Kleine und grosse geladene Teil-<br>chen, oder Moleküle, die an gelade-<br>ne Teilchen gebunden sind   |
| Mizellarelektro-<br>kinetische Kapillare-<br>elektrophorese | MEKC      | Elektrophoretische Mobilität und Vertei-<br>lung der Probe zwischen Mizellen und<br>Puffer Einfluss des EOFs | vorhanden                          | breiter Anwendungsbereich bei klei-<br>nen, neutralen und geladenen Mole-<br>külen                     |
| Kapillargelelektro-<br>phorese                              | CGE       | Elektrophoretische Mobilität mit Siebef-<br>fekt, kein Einfluss des EOFs                                     | unterdrückt                        | Trennung nach Molekülgrösse bei<br>DNA-Molekülen und mit <sup>2</sup> SDS de-<br>naturierten Proteinen |
| Kapillarisoelektrische<br>Fokussierung                      | CIEF      | In einem pH-Gradient gemäss dem iso-<br>elektrischen Punkte der Probe  | unterdrückt, ge-<br>ring vorhanden | Trennung von zwitterionischen Pro-<br>ben gemäss ihrer pI-Werte  |
| Kapillarisotachophorese                                     | CITP      | Elektrophoretische Mobilität, Einfluss<br>des EOFs   | vorhanden                          | Beschränkt, Aufkonzentrierung von<br>verdünnten Lösungen der CE  |
| Kapillarelektrochromato-<br>graphie                         | CEC       | Wechselwirkung mit der stationären Pha-<br>se, EOF dient als Pumpe   | vorhanden                          | Beschränkt, da sehr ähnlich wie<br>HPLC  |

<sup>1</sup>EOF (elektroosmotischer Fluss); <sup>2</sup>SDS (*sodium dodecyl sulfate*)

Weitere Informationen können in folgenden Übersichtsartikeln oder Lehrbüchern gefunden werden [Wagner und Blasius, 1989; Engelhardt *et al.*, 1994; Schmitt, 1995; Gübitz und Schmid, 1997; Vespašec und Boček, 1999; Gübitz und Schmid, 2000; Amini 2001].

### 1.4.2 Theoretische Grundlagen

In einem elektrischen Feld mit der Feldstärke  $E$  bewegen sich Ionen mit einer konstanten Geschwindigkeit  $u$  (m/s). Diese Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  erhöht sich durch Zunahme der angelegten Spannung  $U$  (V). Die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  ( $\text{m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ ) der Ionen (die elektrische Beweglichkeit) hängt von der Feldstärke  $E$  wie in Gleichung 4 beschrieben ab.

Gleichung 4

$$u = \mu_{ep} \cdot E = \frac{L_{eff}}{t_m}$$

Die Geschwindigkeit  $u$  des Ions wird dabei durch das Verhältnis aus zurückgelegter Weglänge  $L_{eff}$  (effektive Kapillarlänge, vom Injektionspunkt bis zum Detektor) und Migrationszeit  $t_m$  (s) bestimmt.

Die Beschleunigungskraft  $K_B$  ist dabei die auf das Ion einwirkende Kraft. Sie lässt sich wie in Gleichung 5 beschrieben aus der effektiven, formalen Ladung  $z$  des Ions, der Faradaykonstante  $F$  (96500Cb/Mol), der Avogadrozahl  $N_A$  (1/Mol) und des Elektrischen Feldes  $E$  (V/m) berechnen.

Gleichung 5

$$K_B = \frac{z \cdot F \cdot E}{N_A}$$

Die entgegen der Bewegungsrichtung des Ions gerichtete Kraft ist die Reibungskraft  $K_R$ . Sie ist gleich gross wie die Beschleunigungskraft  $K_B$ , nachdem das Ion seine Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  erreicht hat und nicht weiter beschleunigt oder verzögert wird.  $K_R$  wird angenähert durch das Stokesche Gesetz beschrieben, welches in Gleichung 6 dargestellt ist. Hierbei ist  $\eta$  die dynamische Viskosität [ $\text{Pa}\cdot\text{s}$  oder  $\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ] und  $r$  der Stokesche Radius des Ions (m), der auch die Solvatationshülle beinhaltet.

Gleichung 6

$$K_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u$$

Eine direkte Berechnung der Wanderungsgeschwindigkeit aufgrund der molekül- und puffer-spezifischen Grössen ist jedoch nicht möglich, da der Stokesche Radius meist nicht bekannt ist und mit dem messbaren Ionenradius in Kristallgittern nicht korreliert. Die Zahl 6 gilt nur unter Annahme sphärischer Teilchen.

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  ist demnach gegeben durch:

Gleichung 7

$$u = \frac{z \cdot F \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N_A} = \mu_{ep} \cdot E$$

Daraus wird deutlich, dass neben der elektrischen Feldstärke  $E$  auch die effektive Ladung  $z$ , der Radius  $r$  des hydratisierten Moleküls (Masse-Ladungs-Verhältnis) sowie die Viskosität des verwendeten Puffers einen Einfluss haben. Die Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  der Analyten in der Kapillare hängt zusätzlich zur elektrophoretischen Mobilität  $\mu_{ep}$  auch vom elektroosmotischen Fluss (EOF) ab, der durch Oberflächeneigenschaften des Kapillarmaterials verursacht wird. Der EOF sinkt bei Quarzkapillaren mit zunehmender Konzentration des Elektrolyten sowie beim Zusatz von organischen Komponenten. Er wächst aber mit dem Dissoziati-

---

onsgrad der Oberflächensilanolgruppen, das heisst, er steigt mit dem pH-Wert an. Messen kann man die Grösse des elektroosmotischen Flusses durch die Aufgabe einer ungeladenen Substanz (Migrationszeitindikator) [Schmitt, 1995].

Obwohl der EOF selbst nicht zur Trennung beiträgt, wird sein Einfluss dennoch oft gezielt zur Verbesserung der Trenneffizienz ausgenutzt. Wenn er jedoch störend wirkt, so kann er durch verschiedene Änderungen des elektrophoretischen Systems wie durch Reduzierung des pH-Wertes, dynamisches [Cavallaro *et al.*, 1995] oder statisches Belegen der Kapillaroberfläche so stark reduziert werden, dass er vernachlässigt werden kann.

Neben dem EOF werden zur Optimierung der Trennleistung in der CE eine grosse Anzahl von Parametern variiert:

- pH-Wert,
- Ionenstärke,
- Temperatur,
- Kapillaroberflächenmodifizierung durch Belegen der Kapillaroberfläche mit Diaminobutan, 1,3-Diaminopropan, PVA, geladene Polymere [Cavallaro *et al.*, 1995; Wang und Khaledi, 1999; Phinney und Sander, 2005]
- Pufferzusätze (Detergenzien, UV-absorbierende Puffer [Steiner *et al.*, 1996], organische Lösungsmittel, chirale Selektoren).

Die chiralen Selektoren für die Enantiomerentrennung werden im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

---

## 1.5. Chirale Selektoren

In der Kapillarelektrophorese wird die optisch aktive Umgebung durch Zusatz einer optisch aktiven Substanz zum Trennpuffer erzeugt. Diese einfache Verfahrensweise stellt einen grossen Vorteil der Kapillarelektrophorese dar, da langwierige und arbeitsintensive Immobilisierungsschritte des chiralen Selektors auf diversen Trägermaterialien entfallen. Die Suche nach einem chiralen Selektor erfolgt aber ebenfalls nach der in der HPLC üblichen „trial and error“ Methode.

Die in der Kapillarelektrophorese verwendeten chiralen Selektoren sind wasserlöslich, lassen sich daher einfach dem Puffer zusetzen und ermöglichen so ein wesentlich vereinfachtes Suchen nach dem Selektor zur Trennaufgabe. Die bisher verwendeten chiralen Selektoren in der CE sind in Tabelle 2 in verschiedene Klassen unterteilt und zusammengefasst. Sie finden teilweise schon lange in der HPLC und GC Anwendung [Kuhn und Erni, 1992; Fanali, 1996; Fanali, 1997; Gübitz und Schmid, 1997; Juvancz *et al.*, 1997; Sutton *et al.*, 1997; Vigh und Sokolowski, 1997; Vincent *et al.*, 1997; Verleysen und Sandra, 1998a; Vespalec und Boček, 1999; Amini, 2001; Yanes *et al.*, 2001; Raab *et al.*, 2003].

Tabelle 2: Überblick über die chiralen Selektorklassen in der Kapillarelektrophorese [Schmitt, 1995]

| Selektorklasse                                | chiraler Selektor  |
|---|--|
| Cyclodextrine                                 | $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Cyclodextrine:<br>Methylierte, hydroxypropylierte, carboxymethylierte, carboxethylerte, carboxymethylethylerte, succinylierte, sulfobutylether, aminierte, diaminierte, sulfierte und phosphatierte Cyclodextrine |
| Chirale Micellenbildner                       | <sup>1</sup> SDS-Digitonin, <sup>2</sup> SDVal, <sup>3</sup> SDAla   |
| Chirale Metallkomplexe                        | Kupfer-L-Histidin Komplexe<br>Kupfer-Aspartam Komplexe   |
| Chirale Kronenether                           | 18-Krone-6,<br>Tetracarboxylsäure  |
| Reine Enantiomere                             | L-Weinsäure  |
| Proteine und Glycoproteine                    | Rinderserumalbumin, Humanalbumin, Orosomucoid, Ovomuroid und Fugal Cellulose, Cellulase  |
| Kapillarwandbelegung mit einer chiralen Phase | Kapillarbelegung mit einer „Chirasil-Dex-Phase“  |

<sup>1</sup>SDS (*sodium dodecyl sulfate*); <sup>2</sup>SDVal (*sodium N-dodecyl-L-valinate*); <sup>3</sup>SDAla (*sodium N-dodecyl-L-alaninate*)

Unter den verwendeten Selektoren bieten die Cyclodextrine und ihre Derivate das breiteste und vielversprechendste Anwendungsspektrum in der Kapillarelektrophorese. Der Grund dafür liegt in der Molekülstruktur vieler pharmazeutischer Präparate, die mit Cyclodextrinen Einschlusskomplexe ausbilden können. Der Aufbau, die verschiedenen Derivate der Cyclodextrine und die Möglichkeit zur Bildung von Einschlusskomplexen wird daher im Folgenden ausführlich besprochen [Surapaneni *et al.*, 1997; de Boer *et al.*, 2000; Gübitz und Schmid, 2000].

## 1.5.1 Cyclodextrine (CDs)

### 1.5.2 Struktur und Eigenschaft

Cyclodextrine (CDs) sind eine Klasse von cyclischen Verbindungen, die aus einfachen Monosaccharidzuckern, den  $\alpha$ -D(+)-Glucopyranosidbausteinen, aufgebaut sind. Sie stellen somit ringförmige Abbauprodukte von Amylose (Bestandteil von zum Beispiel Maisstärke) dar, welche untereinander  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpft sind. CDs sind aus fünf oder mehr Glucosemolekülen aufgebaut und werden entsprechend der Anzahl dieser Grundbausteine benannt. Da ein CD mit fünf Glucoseeinheiten natürlich nicht vorkommt, beginnt man mit dem CD von sechs Einheiten, welches  $\alpha$ -CD genannt wird. Die weiteren CDs mit sieben und acht Einheiten werden danach folglich  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD genannt (siehe Abbildung 1.5.1).

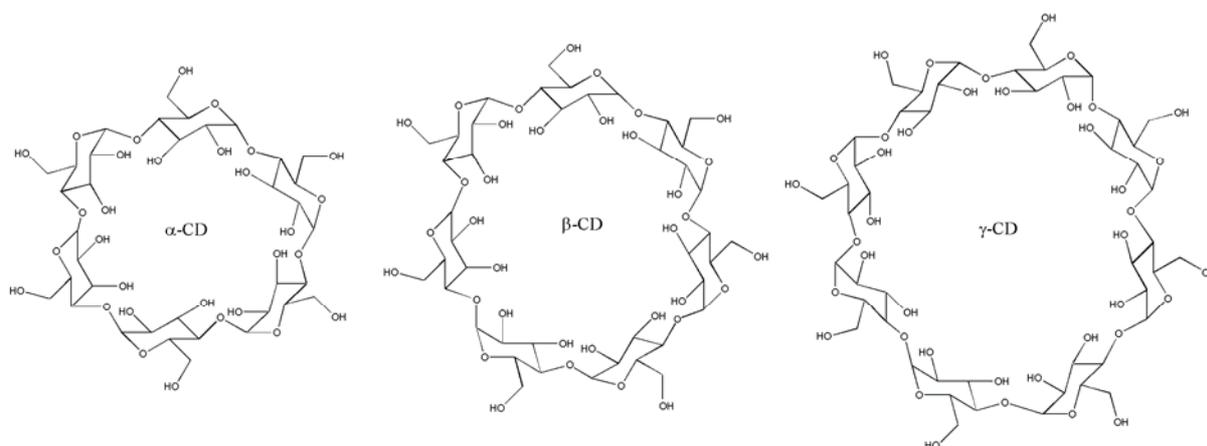


Abbildung 1.5.1: Strukturen der nativen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD [Jaus, 2000]

Diese drei CD-Formen bilden die einzigen in der Natur vorkommenden CDs und decken auch alles in allem fast die Hauptmenge an grossindustriell hergestellten Cyclodextrinen ab [Gübitz und Schmid, 2000]. Eine eindeutige Nomenklatur für CDs ist nicht vorhanden, weshalb auch andere Namen, im Speziellen für diese drei wichtigsten CDs, im Gebrauch sind (siehe Tabelle 3). CDs, welche mehr als acht Glucoseeinheiten beinhalten, werden nur sehr selten verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der gebräuchlichen Namen und Abkürzungen der drei meistverwendeten CDs [Szejtli, 1982]

| $\alpha$ -Cyclodextrin          | $\beta$ -Cyclodextrin          | $\gamma$ -Cyclodextrin          |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Schardinger's $\alpha$ -Dextrin | Schardinger's $\beta$ -Dextrin | Schardinger's $\gamma$ -Dextrin |
| Cyclomaltohexaose               | Cyclomaltoheptaose             | Cyclomaltooctaose               |
| Cyclohexaglucan                 | Cycloheptaglucan               | Cyclooctaglucan                 |
| Cyclohexaamylose                | Cycloheptaamylose              | Cyclooctaamylose                |
| ACD                             | BCD                            | GCD                             |
| C6A                             | C7A                            | C8A                             |

Das grösste bislang hergestellte und untersuchte CD enthält 150 Glucoseeinheiten.

$\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CDs sind kristalline, wasserlösliche, homogene und nicht hygroskopische Substanzen, deren cyclisch angeordnete Glucopyranoseeinheiten räumlich einen torusähnlichen Makroring bilden. Dieser besitzt einen zentralen Hohlraum [Szejtli, 1998]. Der Durchmesser dieser Öffnung nimmt dabei entsprechend der Anzahl zusätzlich eingebauter Glucosebausteine zu, die Tiefe der Kavität jedoch bleibt gleich [Fanali, 1997]. Diese zyklische Orientierung der Oligosaccharide kann auch als Strukturanordnung eines abgeschnittenen Kegels angesehen werden, in welchem ausserhalb die hydrophilen/lipophoben Hydroxylgruppen und innerhalb die hydrophoben/lipophilen Zuckerstrukturen zu liegen kommen (siehe Abbildung 1.5.2).

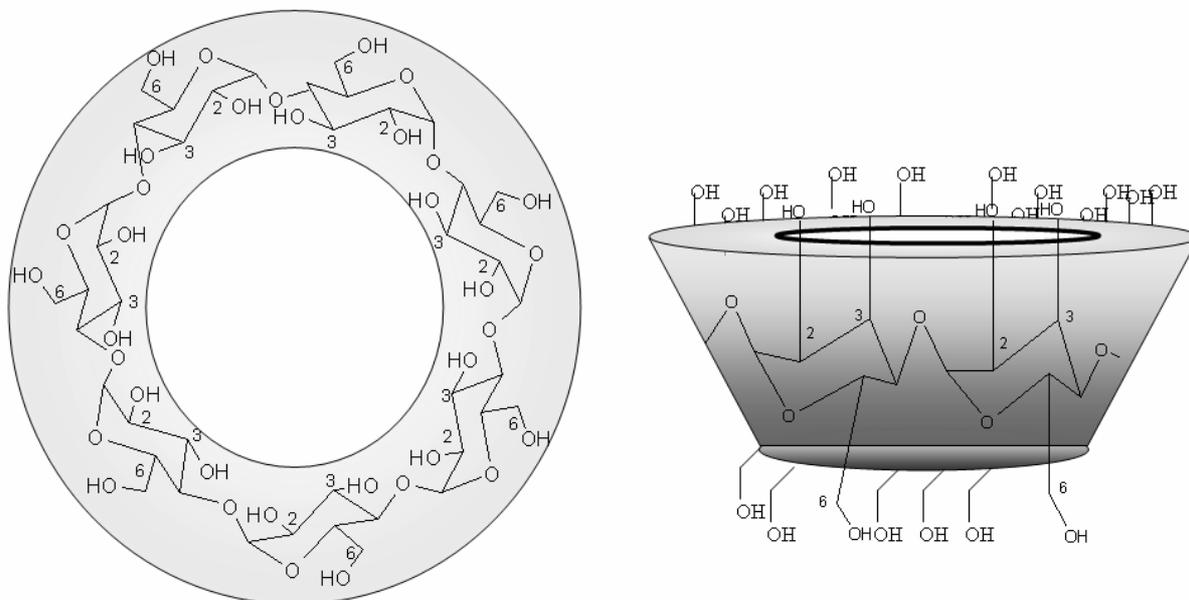


Abbildung 1.5.2: Toroidale Struktur mit einem zentralen hydrophoben Hohlraum eines  $\beta$ -Cyclodextrins. Sicht von oben und von der Seite

Diese Kegelform und die hydrophobe Kavität ermöglichen einen Einschluss von unpolaren Molekülen (z.B. Substanzen aromatischer Natur oder Moleküle mit sehr unpolaren Gruppen). CDs werden deshalb als „Gastgeber“-Moleküle (*host molecules*) bezeichnet, in welchen individuelle Gästemoleküle (Enantiomere) „eingefangen“ werden können [Szejtli, 1982]. Diese bilden sogenannte Einschlusskomplexe.

Die Komplexbildung basiert auf der Einlagerung des hydrophoben Teils eines Moleküls in die Kavität und zusätzlich einer seitlichen Dipol-Dipol Interaktion mit den Hydroxylgruppen in den Positionen C-2 und C-3 am oberen Rand, dem „Mund“ des CD. Der Analyt positioniert somit sein chirales Zentrum nahe an die Hydroxylgruppen und ermöglicht dabei die Bildung von Diastereomeren mit grösseren Eigenschaftsunterschieden als bei einer tiefen Eindringung [Gübitz und Schmid, 1997; Chankvetadze *et al.*, 2000]. Diese zusätzlichen Wechselwirkungen am Rande können auch mit anderen Substituenten (siehe Kapitel 1.5.4 Cyclodextrinderivate) erfolgen [Verleysen und Sandra, 1998a; Van Eeckhaut *et al.*, 2000]. Der gebildete Einschlusskomplex ist relativ labil und ermöglicht somit ein Gleichgewicht von ungebundenen

und gebundenen Analyten. Eine Trennung des chiralen Analyten ist somit möglich, wenn die diastereomeren Komplexe entweder unterschiedliche Mobilitäten oder unterschiedliche Stabilitätskonstanten aufweisen.

### 1.5.3 Synthese

Die CDs wurden 1891 erstmals in der Literatur erwähnt. Zuvor war deren physikalische Struktur absolut unbekannt. 1891 isolierte Villiers aus einer „*Bacillus amylobacter*“-Kultur in Gegenwart von Stärke eine kleine Menge einer kristallinen Substanz. Villiers ermittelte eine Summenformel von  $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3H_2O$  und nannte sein Produkt „Cellulosine“ wegen dessen saurer Hydrolysebeständigkeit und fehlender Reduzierbarkeit. Des weiteren vermutete er, dass zwei unterschiedliche „Cellulosine“ gebildet wurden, vermutlich  $\alpha$ - und  $\beta$ -CD [Szejtli, 1998]. Zwölf Jahre später isolierte Schardinger bei der Untersuchung des Abbaus von Stärke mit unterschiedlichen Mikroorganismen ebenfalls  $\alpha$ - und  $\beta$ -CDs, welche er als identisch den „Cellulosinen“ identifizierte. Die grössten Ausbeuten erhielt er mit *Bacillus macerans* [Schardinger, 1903].

Erst 1936 konnte Freudenberg die Struktur und den Aufbau der beiden CDs ermitteln, kurze Zeit später sogar die vom  $\gamma$ -CD. Nach weiteren intensiven Forschungen wurde 1953 das erste Patent von CDs eingereicht, in welchem ein grosser Teil der wichtigsten Aspekte zur Anwendung in der Arzneimittelformulierung, dem Hauptanwendungsgebiet der CDs, abgehandelt wurde. Die heutigen Synthesemethoden basieren noch grösstenteils auf diesem Verfahren [Szejtli, 1982].

### 1.5.4 Cyclodextrinderivate

Obschon die neutralen, nicht derivatisierten Cyclodextrine mengenmässig den grössten Teil der Weltproduktion beinhalten, wird ein immer grösserer Teil davon derivatisiert. Rawjee *et al.* (1994), Vigh und Sokolowski (1997), Vespalec und Boček (1997), aber auch de Boer *et al.* (2000) beschreiben in umfangreichen Übersichtsartikeln die verschiedenen zur Zeit in der CE verwendeten Cyclodextrinderivate. Durch die Derivatisierung wird die Löslichkeit in Wasser und die Kavitätstiefe für das eintretende Molekül erhöht. Derivatisierungen erfolgen an den Hydroxylpositionen 2, 3 und 6. Dadurch kann die Enantioselektivität drastisch verändert werden.

Die nach Gübitz und Schmid (1997) meist verwendeten derivatisierten, neutralen CDs sind Heptakis-O-methylcyclodextrin (M-CD), Heptakis-(2,6-di-O-methyl)cyclodextrin (DM-CD), Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)cyclodextrin (TM-CD), Hydroxyethylcyclodextrin (HE-CD) und Hydroxypropylcyclodextrin (HP-CD). Diese chiralen Selektoren sind relativ billig, wasserlöslich und haben eine kleine UV-Absorption [Altria, 1999]. Sie zeigen einen grossen Anwendungsbereich und Methoden lassen sich schnell optimieren.

Viele Beispiele zur Enantiomerentrennung und chiralen Reinheitsbestimmung von Wirkstoff oder Arzneimittel sind publiziert. [Fabre und Altria, 2001]. Nachweisgrenze (LOQ) und Detektionsgrenze (LOD) sind dabei normalerweise bei 0,1%-0,2% LOQ und 0,04% LOD des „unerwünschten“ Enantiomers [Nussbaum, 1999; Chankvetadze, 2001; Jimidar *et al.*, 2002].

Neben den neutralen sind aber immer mehr die geladenen CDs von grossem Interesse [Gübitz und Schmid, 1997]. Mit ihnen ist es möglich, neben den geladenen auch neutrale Moleküle zu analysieren [Tait *et al.*, 1994]. Dieses „Analysefenster“ wird am grössten, wenn der chirale Selektor die umgekehrte Ladung der zu trennenden Substanz (bei gewähltem pH-Wert) trägt.

---

Somit ist es sogar möglich, die ganze Bandbreite von geladenen und ungeladenen (sauren, basischen aber auch neutralen) Molekülen zu trennen. Die sulfatierten CDs und speziell die hochsulfatierten Cyclodextrine (HSCDs) werden mehr angewendet [Jin und Li, 1998; Verleyesen *et al.*, 1998b; Verleyesen *et al.*, 1999; Vescina *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003; Rudaz *et al.*, 2003; Lipka *et al.*, 2004; Rochelau, 2005].

HSCDs können ebenfalls mit ungeladenen Analyten durch hydrophobe Wechselwirkungen einen Einschlusskomplex ausbilden. Mit kationischen Analyten ist dies ebenfalls sehr gut möglich, wobei dort die Wechselwirkung elektrostatischer Natur und daher besonders stark ist [Gahm und Stalcup, 1996; Wang und Khaledi, 1999; Lipka *et al.*, 2004]. Anionisch geladene Analyten können infolge Abstossung nicht in Wechselwirkung treten. Dennoch kann durch geeignete Wahl des pH-Wertes der Ladungszustand neutralisiert und somit eine hydrophobe Wechselwirkung ermöglicht werden. Durch die hohe negative Ladung der HSCDs bleibt der diastereomere HSCD-Analyt-Komplex mit kationischen Analyten und natürlich auch mit neutralen Analyten gesamthaft immer noch stark negativ geladen und migriert immer Richtung Anode [Tait *et al.*, 1994; Vincent *et al.*, 1997; Amini 2001; Chen *et al.*, 2001; Perrin *et al.*, 2001].

HSCDs werden mit unterschiedlichen Substitutionsgraden und Substitutionen an verschiedenen Positionen des CDs angeboten. Dabei gibt der Substitutionsgrad, die Anzahl der Sulfatgruppen pro CD an und die Substitutionsposition die drei substituierbaren Hydroxylgruppen (Position 2, 3 und 6). Beispiele sind die zufällig sulfatierten von Aldrich, Gillingham, UK ( $\beta$ -sCD), welche einen durchschnittlichen Substitutionsgrad von 7 bis 11 pro  $\beta$ -CD aufweisen (siehe Kapitel 2.1) [Chen *et al.*, 2001]. Dabei kann eine sehr starke Chargen-Variabilität auftreten. Eine weitere Form sind die selektiv sulfatierten CDs ( $\beta$ -S-sCDs) von Antek, Houston, TX, welche unter dem Namen *single Isomer* bekannt sind (siehe Kapitel 2.1). Sie haben eine

---

sehr gute Reproduzierbarkeit durch die exakte Sulfatierung in Position 6 des CD-Moleküls. Bei den bei  $\beta$ -CDs resultiert diese exakte Sulfatierung in einem Substitutionsgrad von 7 [Li und Vigh, 2004]. Die jedoch zur Zeit am meisten verwendeten HSCDs sind die hochsulfatierten CDs (HS-CDs) von Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA. Auch sie weisen keine Chargen-Variabilität auf, sind allerdings nicht positionsgenau sulfatiert. Ihr Substitutionsgrad wird mit 12 (bei HS- $\beta$ -CD) angegeben [Chen *et al.*, 2001].

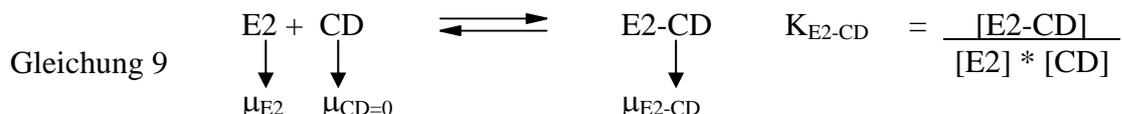
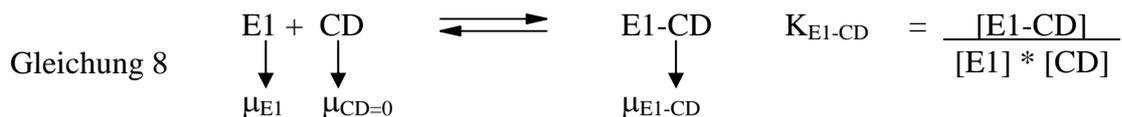
### 1.5.5 CE-Trennprinzip mit sulfatierten Cyclodextrinen

In der CE finden sich für die Beschreibung der Trennung von Enantiomeren verschiedene theoretische Ansätze, wobei prinzipiell alle auf zwei stark vereinfachte Modelle reduziert werden können. Das eine nimmt an, dass die Migrationszeiten der aus Analyt und CD gebildeten Diastereomerenkomplexe identisch sind und einzig durch die unterschiedlichen Komplexierungskonstanten der beiden Komplexe eine Auftrennung der Enantiomere möglich wird (Komplexierungskonstantenmodell). Das andere Modell basiert darauf, dass die beiden Diastereomerenkomplexe nicht identische Migrationszeiten besitzen und dadurch eine Trennung der Enantiomere zustande kommt [Chankvetadze *et al.*, 2004] (Migrationszeitenmodell). Nachfolgend sind die beiden vereinfachten Modelle detaillierter beschrieben.

#### 1.5.5.1 Komplexierungskonstantenmodell

Wren und Rowe postulierten 1992 ein erstes Modell, in welchem der Einfluss der Gleichgewichtskonstanten und der Konzentrationen ungeladener CDs auf die Auflösung des Systems beschrieben wird [Wren und Rowe, 1992a]. Dabei wird von zwei Gleichgewichten  $K_{E1-CD}$  und  $K_{E2-CD}$  der Enantiomere E1 und E2 mit neutralen CDs ausgegangen (siehe Gleichung 8 und Gleichung 9). Die beiden Enantiomere haben in unkomplexierter Form die Mobilität  $\mu_{E1}$  re-

spektive  $\mu_{E2}$  und in Verbindung mit neutralem CD  $\mu_{E1-CD}$  respektive  $\mu_{E2-CD}$ . Ein CD, welches neutral vorliegt, hat keine Mobilität, oder falls vorhanden diejenige des EOFs.



Wenn nun die beiden Enantiomere unterschiedliche Wechselwirkungen mit den CDs aufweisen und somit die Mobilitäten in freier und komplexierter Form nicht identisch sind ( $\mu_{E1} \neq \mu_{E1-CD}$  respektive  $\mu_{E2} \neq \mu_{E2-CD}$ ), so ist eine Auftrennung der Enantiomere E1 und E2 möglich. Das Modell zeigt, dass die Auflösung des Systems und somit die gemessene Mobilitätsdifferenz der beiden Enantiomere abhängig von der CD Konzentration ist. Penn *et al.* (1993) zeigte, dass man mit diesem Modell Bindungskonstanten ermitteln konnte.

Dieses Modell wurde dann von Rawjee und Biggin [Rawjee *et al.*, 1993a; Rawjee *et al.*, 1993b; Rawjee *et al.*, 1994; Biggin *et al.* 1995] erweitert, so dass auch der pH-Wert des Puffers respektive von schwachen chiralen Säuren und Basen in Betracht gezogen werden konnte. Gesamthaft wurden diese Modelle im CHARM-Model von Williams und Vigh (1997) zusammengefasst und später von de Boer *et al.* (2000) ergänzt.

### 1.5.5.2 Migrationszeitenmodell

Chankvetadze postulierte 1997, dass es auch möglich wäre, eine Auftrennung der Enantiomere mit CDs ohne unterschiedliche Komplexierungskonstanten zu erreichen. Die Trennung sollte auf den unterschiedlichen Migrationszeiten der beiden Diastereomerkomplexe, welche

durch unterschiedliche hydrodynamische Radien zustande kommen, beruhen. Diese Theorie wurde oftmals erwähnt, findet jedoch nicht grossen Anklang. In der Publikation von Chankvetadze *et al.* (2004) werden Trennungen bei identischer Komplexierungskonstante aufgezeigt [Chankvetadze *et al.*, 2004].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass wohl in allen Trennungen Faktoren beider Modelle einfließen, jedoch das Komplexierungskonstantenmodell bei weitem mehr Anhänger hat.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Material und Reagenzien

#### 2.1.1 Hochsulfatierte Cyclodextrine

- Hochsulfatierte- $\alpha$ -Cyclodextrin (HS- $\alpha$ -CD), Lösung 20% w/v in Wasser, mit durchschnittlichem Substitutionsgrad von 11 bezogen von Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA, Bestellnummer: 713349
- Hochsulfatierte- $\beta$ -Cyclodextrin (HS- $\beta$ -CD) Lösung 20% w/v in Wasser, mit durchschnittlichem Substitutionsgrad von 12 bezogen von Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA, Bestellnummer: 713347
- Hochsulfatierte- $\gamma$ -Cyclodextrin (HS- $\gamma$ -CD) Lösung 20% w/v in Wasser, mit durchschnittlichem Substitutionsgrad von 13 bezogen von Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA, Bestellnummer: 713350
- Hochsulfatiertes- $\beta$ -Cyclodextrin mit durchschnittlichem Substitutionsgrad von 7-11 ( $\beta$ -sCD) bezogen von Aldrich, Gillingham, UK, Bestellnummer: 38,915-3.
- Hochsulfatierte- $\beta$ -Cyclodextrine (SsCD) an Position 6 mit einem Substitutionsgrad von 7, heptakis(2,3-dihydroxy-6-O-sulfo)cyclo-maltoheptaose ( $\beta$ -SsCD) bezogen von Antek, Houston, TX, USA
- Hochsulfatierte- $\gamma$ -Cyclodextrine (SsCD) an Position 6 mit einem Substitutionsgrad von 8, octakis(2,3-dihydroxy-6-O-sulfo)cyclo-maltooctaose ( $\gamma$ -SsCD) bezogen von Antek, Houston, TX, USA

## 2.1.2 Reagenzien, Kapillaren

- Modellsubstanzen zur Untersuchung (siehe Tabelle 4, 13 hydrierte Enantiomerenpaare und deren 13 nicht hydrierte Edukte (Imine, Olefine, Enamide und Ketone)) wurden bereitgestellt von Dr. F. Spindler der Synthese-Katalyse, Solvias AG Basel, Schweiz.
- Migrationszeitindikator: 1,3,6,8-Pyrentetrasulfonat (PTS) 10 mM in H<sub>2</sub>O von Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA, Bestellnummer: 713328
- Phosphatpuffer, pH 2,5 (50 mM Triethylammonium Phosphatpuffer) von Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA, Bestellnummer: 477422
- Kapillar-Konditionierlösung von Beckman Coulter Fullerton, CA, USA, Bestellnummer: 713333

Zusammensetzung gemäss Angaben Beckman Coulter:

- 25 mM Lithiumacetat (Qualität der Chemikalie nicht angegeben)
- 0.4% PEO (Polyethylenoxid, MW 300'000 g/mol) (Qualität der Chemikalie nicht angegeben)
- 10% Ethylenglykol (Qualität der Chemikalie nicht angegeben)
- pH 4,75

Migrationszeitindikator, Phosphatpuffer und Kapillar-Konditionierlösung sind im „Test-Kit“ von Beckman Coulter Fullerton, CA, USA Bestellnummer 149869 erhältlich.

- Aminmodifizierte Kapillare eCAP, von Beckman Coulter Fullerton, CA, USA, Bestellnummer: 477431 (Amintyp wird vom Hersteller nicht deklariert, ausser, dass es sich um eine mit einem Polymer vernetzten quartären Ammoniumverbindung handelt).
- Neutraloberflächenmodifizierte Kapillare eCAP, von Beckman Coulter Fullerton, CA, USA,

Bestellnummer: 477441 (Belegung wird vom Hersteller nicht deklariert, ausser, dass es sich um Polyacrylamid handelt).

- Wasser für die Herstellung von Trennpuffer und Proben wurde hergestellt mit einem Milli-Q Wassersystem ( $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $<20 \text{ ppb TOC}$ ; Millipore, Milford, MA, USA).
- Methanol, Ethanol, Acetonitril, Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden mit dem Reinheitsgrad "HPLC-grade" von Fluka, Buchs, SG, Schweiz verwendet.
- 1M NaOH und 1 M HCl sind Stammlösungen des Reinheitsgrad „pro analysis“ von Fluka, Buchs, SG, Schweiz.
- ortho- $\text{H}_3\text{PO}_4 \geq 85\%$  und 1,4-Diaminobutan,  $\geq 99,0\%$  wurden bezogen von Fluka, Buchs, SG, Schweiz.

Tabelle 4: Chemische Strukturen und Abkürzungen der verwendeten Modellsbstanz.

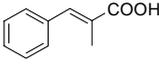
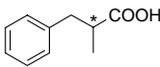
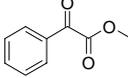
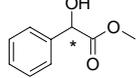
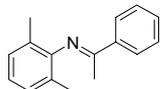
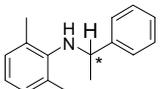
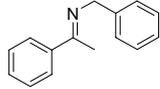
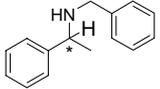
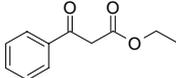
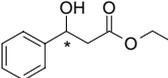
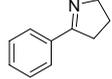
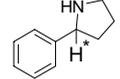
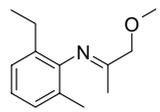
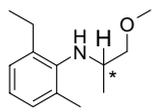
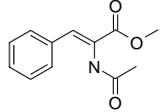
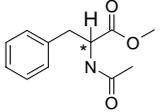
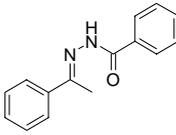
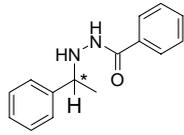
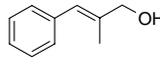
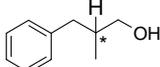
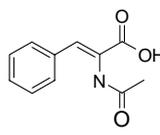
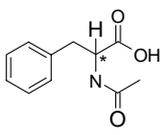
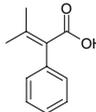
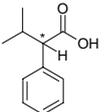
| Edukt   | Name   | Enantiomer<br>R und S   | Name   |
|---|--|---|--|
|    | 2-Methyl-3-phenylacrylsäure<br>( $\alpha$ -Methyl-zimtsäure) |    | (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure                         |
|    | Oxophenylessigsäuremethylester                               |    | (RS)-Hydroxyphenyl-essigsäuremethylester                   |
|    | 1-Phenylethanon<br>(Acetophenon)                             |    | (RS)-1-Phenylethanol                                       |
|    | 2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyliden)-amin                  |    | (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyliden)-amin           |
|    | Benzyl-(1-phenylethyliden)-amin                              |    | (RS)-Benzyl-(1-phenylethyl)-amin                           |
|  | 3-Oxo-3-phenylpropansäureethylester                          |  | (RS)-3-Hydroxy-3-phenylpropansäureethylester               |
|  | 5-Phenyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol                               |  | (RS)-2-Phenylpyrrolidin                                    |
|  | 2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyliden)-amin    |  | (RS)-2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyl)-amin |
|  | 2-Acetylamino-3-phenylacrylsäuremethylester                  |  | (RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropansäuremethylester          |
|  | Benzoesäure-(1-phenylethyliden)-hydrazid                     |  | (RS)-Benzoesäure-N-(1-phenylethyl)-hydrazid                |
|  | 2-Methyl-3-phenylprop-2-en-1-ol                              |  | (RS)-2-Methyl-3-phenylpropan-1-ol                          |
|  | 2-Acetylamino-3-phenylacrylsäure                             |  | (RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropansäure                     |
|  | 3-Methyl-2-phenylbut-2-ensäure                               |  | (RS)-3-Methyl-2-phenylbutansäure                           |

Tabelle 5: Oktanol / Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log K_{OW}$ ) and negativ dekadisch logarithmische Darstellung der Säuredissoziationskonstante ( $pK_a$  des ungeladenen Moleküls) respektive der Basendissoziationskonstante ( $pK_b$  des ungeladenen Moleküls) berechnet für alle Modellsubstanzen in der Untersuchung (Tabelle 4) durch Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V4.67 von SciFinder (2005). Substanzen mit einem  $\log K_{OW} \geq 3$  benötigen organisches Lösungsmittel, um eine Lösung von ca. 1mg/ml Substanz zur Analyse herzustellen.

| Enantiomere  | $\log K_{OW}$ | $pK_a$ | $pK_b$ | Edukte   | $\log K_{OW}$ | $pK_a$ | $pK_b$ |
|--|---------------|--------|--------|--|---------------|--------|--------|
| (RS)-Hydroxyphenyl-essigsäuremethylester                   | <b>1</b>      | -      | -      | 5-Phenyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol                               | <b>1</b>      | -      | 7,3    |
| (RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropansäure                     | <b>1</b>      | 3,6    | -      | Oxophenylelessigsäure-methylester                            | <b>1</b>      | -      | -      |
| (RS)-3-Hydroxy-3-phenylpropansäureethylester               | <b>1</b>      | 13,6   | -      | 2-Acetylamino-3-phenylacrylsäure-methylester                 | <b>2</b>      | 12,6   | -      |
| (RS)-1-Phenylethanol                                       | <b>1</b>      | -      | -      | 1-Phenylethanon (Acetophenon)                                | <b>2</b>      | -      | -      |
| (RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropansäure-methylester         | <b>1</b>      | -      | -      | 3-Oxo-3-phenyl-propansäureethylester                         | <b>2</b>      | 9,9    | -      |
| (RS)-2-Phenylpyrrolidin                                    | <b>2</b>      | -      | 3,5    | 2-Acetylamino-3-phenylacrylsäure                             | <b>2</b>      | 3,2    | -      |
| (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure                         | <b>2</b>      | 4,7    | -      | 2-Methyl-3-phenylprop-2-en-1-ol                              | <b>2</b>      | -      | -      |
| (RS)-2-Methyl-3-phenylpropan-1-ol                          | <b>2</b>      | -      | -      | 2-Methyl-3-phenylacrylsäure<br>( $\alpha$ -Methyl-zimtsäure) | <b>3</b>      | 4,2    | -      |
| (RS)-3-Methyl-2-phenylbutansäure                           | <b>3</b>      | 4,3    | -      | Benzoessäure-(1-phenylethyliden)-hydrazid                    | <b>3</b>      | -      | 8,5    |
| (RS)-Benzoessäure-N-(1-phenylethyl)-hydrazid               | <b>3</b>      | -      | 11,9   | 2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyliden)-amin    | <b>3</b>      | -      | 9,5    |
| (RS)-2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyl)-amin | <b>3</b>      | -      | 9,6    | 3-Methyl-2-phenylbut-2-ensäure                               | <b>4</b>      | 4,7    | -      |
| (RS)-Benzyl-(1-phenylethyl)-amin                           | <b>4</b>      | -      | 5,2    | Benzyl-(1-phenylethyliden)-amin                              | <b>4</b>      | -      | 8,8    |
| (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyliden)-amin           | <b>4</b>      | -      | 10,2   | 2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyliden)-amin                  | <b>4</b>      | -      | 9,4    |

## 2.2. Arbeitsgeräte und Hilfsmittel

### 2.2.1 CE-Geräte

- ABI-270A mit UV-Detektor; Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- ABI-270A-HT mit UV-Detektor; Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
- HP<sup>3D</sup>-CE G1602 mit Dioden-Array-Detektor; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA

### 2.2.2 Geräteeinstellungen, Kapillaren

Für die Durchführung der Messungen wurden die Kapillarelektrophoresegeräte ABI-270A, ABI-270HT (ABI) von Applied Biosystems und HP<sup>3D</sup>-CE G1602 (Agilent) von Agilent Technologies verwendet. Die beiden ABI-Geräte sind bis auf den Autosampler baugleich. Deshalb werden im Folgenden die beiden Geräte nur noch unter dem Kürzel ABI erwähnt. Kapillaren aus Quarz (fused silica) mit einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  und 375  $\mu\text{m}$  Ausendurchmesser wurden von Polymicro (Technologies, Phoenix, AZ, USA) bezogen (abweichende Kapillargrößen werden im Elektropherogramm angegeben).

Vor der erstmaligen Benutzung wurden die Kapillaren jeweils entweder mittels Vakuum (67,6 kPa Unterdruck, ABI) oder Druck (100 kPa, Agilent) für 5 min mit NaOH (1M), 5 min mit Wasser, 5 min mit Kapillar-Konditionierlösung, 5 min mit HCl (1M) und 10 min mit Trennpuffer gespült. Vor jeder Trennung wurden die Kapillaren jeweils mittels Vakuum (67,6 kPa Unterdruck, ABI) oder Druck (100 kPa, Agilent) für 2 min mit Kapillar-Konditionierlösung

---

und 2 min mit Trennpuffer gespült. Die Kapillaren wurden je nach Kapillarelektrophoresegerät mit einer Länge von 30 cm (50 cm bis zum Detektionsfenster, ABI) bzw. 31 cm (39,5 cm bis zum Detektionsfenster, Agilent) zugeschnitten.

Die Kapillare wurde auf 28 °C (ABI, da keine Kühlung möglich) bzw. 15 °C (Agilent, Luftkühlung) thermostatisiert. Abweichende Kapillartemperaturen werden im Elektropherogramm angegeben. Die Detektion mittels UV-Absorption erfolgte bei 200 nm. Soweit keine anderen Angaben gemacht werden, betrug die Trennungsspannung -11 kV (ABI) bzw. -15 kV (Agilent). Die Messung wurde im umgekehrten Polaritätsmodus ausgeführt (Anode an Detektorseite). Der Strom stieg dabei von ca. 60 µA bis max. 80 µA (ABI) und von ca. 130 µA bis max. 150 µA (Agilent) während der Trennung (max. 50 min. Trennzeit) infolge Pufferabreicherung (Überführung von HSCD während der Trennung von der Kathode zur Anode) an.

Die Injektion erfolgte hydrodynamisch mittels Vakuum (16,9 kPa Unterdruck, ABI) oder Überdruck (1 kPa, Agilent). Normalerweise wurde eine Injektionszeit von 0,2 s (ABI), welche 1,24 nl Injektionsvolumen und 0,21% der Kapillarlänge entspricht (jeweils berechnet mit Beckman Coulter CE Expert Version 1.0 (1997)) bzw. 13 s (Agilent) (4,4 nl Injektionsvolumen, entspricht 0,7% der Kapillarlänge), gewählt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde als Hintergrundelektrolyt ein saurer Phosphatpuffer (25 mM, pH 2,5) verwendet (Ausführung siehe Kapitel 2.3). Eine 3D-CE ChemStation A.09.01 (1206) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) wurde zur Steuerung und Datenaufnahme des Agilent-Gerätes verwendet. Das ABI wurde mit der Dionex Software AI-450 (Dionex, Olten, Schweiz) angesteuert.

---

## 2.3. Methoden / Elektrolyte / Probenvorbereitungen

### 2.3.1 Elektrolytherstellung

Die Cyclodextrinkonzentrationen sind in % (w/v) angegeben, obschon eine Konzentrationsangabe in mol/l für Vergleichszwecke von Vorteil wäre. Dies ist aber infolge der ungenauen Derivatisierungsangaben beziehungsweise Molekulargewichte der HSCDs nicht exakt möglich.

Die beiden Trennpuffer, Elektrolyt 1 und Elektrolyt 2, wurden in Konzentrationen von 2%, 5% oder 10% (w/v)  $\gamma$ -HSCD für Elektrolyt 1 und  $\beta$ -HSCD für Elektrolyt 2 in einem 25 mM Triethylammoniumphosphatpuffer (50% Wasser, 50% Triethylammoniumphosphatpuffer (50 mM, pH 2,5) von Beckman Coulter) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit ortho- $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf pH 2,5 eingestellt.

### 2.3.2 Herstellung der Probenlösungen

Die in den Trennpuffern löslichen Modellsubstanzen (siehe Tabelle 5, alle Substanzen mit  $K_{\text{OW}}$  1 oder 2) wurden in den beiden Elektrolyten mit einer Substanzkonzentration von ungefähr 0,1 mg/ml gelöst. Diese Probenvorbereitung wird nachfolgend Probenvorbereitung 1 genannt.

Die Modellsubstanzen mit einem  $\log K_{\text{OW}}$  von 3 oder 4 (siehe Tabelle 5) wurden zuerst in einem organischem Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Acetonitril oder DMSO) mit einer Probenkonzentration von ungefähr 2,5 mg/ml gelöst. Diese Lösung wurde dann mit 25 mM HSCD-Elektrolyten so verdünnt, dass die gewünschte organische Lösungsmittelkonzentration wie auch eine Probenkonzentration von ungefähr 0,1 mg/ml erhalten wurden. Die dabei resul-

tierende CD-Konzentration in der Probenlösung ist kleiner als die im Trennpuffer. Diese Probenvorbereitung wird nachfolgend Probenvorbereitung 2 genannt.

Ausserdem wurden für einige Messungen Probelösungen hergestellt, bei denen die CD-Konzentrationen in den Proben und in den Trennpuffern exakt gleich waren. Dies wurde durch Zugabe von HSCD in konzentrierter Lösung (HS-CD) oder in reiner fester Form (Antek und Aldrich) bewerkstelligt. Diese Probevorbereitung wird nachfolgend Probenvorbereitung 3 genannt.

## **3 Resultate und Diskussion**

### **3.1. Einleitung**

Zuerst wurde ein Trennsystem für alle wasserlöslichen chiralen Modellschubstanzen (siehe Tabelle 5,  $\log K_{OW}$  1-2) entwickelt. Dazu wurden hochsulfatierte Cyclodextrine (HSCDs) von Beckman Coulter eingesetzt. Diese mehrfach negativ geladenen Cyclodextrine ermöglichen eine Trennung von unterschiedlich geladenen Komponenten mit einer Methode im Gegensatz zu einfach oder ungeladenen Cyclodextrinen [Chen *et al.*, 2001].

Als Standardpuffer für HSCDs wurde ein Phosphatpuffer mit niedrigem pH-Wert verwendet [Altria, 1998]. Eine Übersicht der Vor- und Nachteile des niedrigen pH-Wertes sind in Tabelle 6 erörtert.

Tabelle 6: Übersicht der pH-Wertänderungen des Hintergrundelektrolyten und die Auswirkungen auf das Trennsystem

|                                      |                                      | Analyteigenschaften  |                        |                                     |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--|------------------------|-------------------------------------|
|                                      |                                      | sauer  | neutral                | basisch                             |
| Hintergrundelektrolyt<br>pH-Wert < 7 | Ladungszustand des Analyten          | neutral  | neutral                | positiv                             |
|                                      | Wandadsorption                       | keine  | keine                  | <b>Vorteil:</b> Abstossung          |
|                                      | Elektroosmotischer Fluss             | Gering und in gleicher Richtung wie HSCD   |                        |                                     |
|                                      | Wechselwirkung des Analyten mit HSCD | nur Inklusionskomplexe   | nur Inklusionskomplexe | Elektrostatische Anziehung/Komplexe |
| Hintergrundelektrolyt<br>pH-Wert > 7 | Ladungszustand des Analyten          | negativ  | neutral                | neutral/negativ                     |
|                                      | Wandadsorption                       | <b>Nachteil:</b> gross   | keine                  | <b>Nachteil:</b> gross              |
|                                      | Elektroosmotischer Fluss             | stark, <b>Nachteil:</b> EOF ist in umgekehrter Richtung und deshalb verändert sich die Trennzeit |                        |                                     |
|                                      | Wechselwirkung des Analyten mit HSCD | keine Komplexe,<br>keine Trennung möglich  | nur Inklusionskomplexe | schwache Inklusionskomplexe         |

---

Hervorzuheben ist dabei, dass der elektromotische Fluss (EOF), welcher normalerweise die Migrationszeit verkürzt, infolge umgekehrter Richtung zum HSCD-Transport stört und so weit wie möglich unterdrückt werden sollte. Deshalb wurde der pH des Elektrolytsystems auf den tiefen pH-Wert von 2,5 eingestellt (Elektrolyt 1 und 2). Dies eliminiert weitgehend den EOF und die mehrfach negativ geladenen Analyt-HSCD-Komplexe migrieren hauptsächlich durch ihre eigene Mobilität zur Kathode. Ausserdem ist bei diesem tiefen pH-Wert die unerwünschte Wandadsorption von basischen Analyten und/oder der HSCDs minimiert. Durch das zusätzliche dynamische Belegen mit Triethylamin (TEA) [Gómez-Gomar *et al.*, 2003] oder auch 1,3-Diaminopropan [Cavallaro *et al.*, 1995] als Gegenion im Phosphatpuffer kann die Adsorption fast vollständig unterdrückt werden, was ein sehr robustes CE-Puffersystem ergibt.

Beim pH-Wert von 2,5 sind die HSCDs vollständig deprotoniert und die basische Analyten protoniert. Durch die umgekehrte Ladung wird die grösstmögliche Trennung erzielt [Tait *et al.*, 1994]. Das kommt daher zu Stande, da der basische Analyt ungebunden in die entgegengesetzte Richtung des HSCDs respektive aller mit den HSCD komplexierten Molekülen migriert. Durch diese umgekehrte Ladung wird ein stabiler elektrostatischer Komplex ausgebildet und durch die hohe Ladung des HSCDs eine schnelle Migration ermöglicht [de Boer *et al.*, 2000]. Zudem sind, wie in der Tabelle 6 aufgezeigt, beim pH-Wert von 2,5 die sauren Verbindungen kaum deprotoniert, welche eine elektrostatische Abstossung zwischen den negativ geladenen Molekülen und den HSCDs zur Folge hätte und eine Enantiomerentrennung verhindert.

Die Komplexierungskonstante zwischen den sauren Modellsubstanzen und den HSCD ist somit bei pH-Wert 2,5 um ein Vielfaches grösser als bei einem pH-Wert von 7. Neutrale Modellsubstanzen können bei dem gewählten pH-Wert ebenfalls getrennt werden, da bei ihnen

---

nur hydrophobische Wechselwirkungen auftreten und der pH-Wert keinen Einfluss auf die Komplexierung hat. Ein Vorteil des tiefen pH-Werts ist, dass der EOF praktisch unterdrückt ist [Tait *et al.*, 1994; Perrin *et al.*, 2001; Rudaz *et al.*, 2003; Rocheleau, 2005].

### **3.2. Chirale Trennung wasserlöslicher Modellsubstanzen**

Durch die Anwendung des kommerziell erhältlichen chiralen „Trenn-Kits“ von Beckman Coulter Fullerton, CA, USA konnten relativ rasch gute Ergebnisse erzielt werden. Alle wasserlöslichen Modellsubstanzen mit  $\log K_{OW}$  1-2 (siehe Tabelle 5) konnten mit den Elektrolyten 1 und 2 (5% w/v  $\gamma$ -HS-CD von Beckman Coulter und 5% w/v  $\beta$ -HS-CD von Beckman Coulter) und der Probenvorbereitung 1 (Modellsubstanz im Runpuffer gelöst, siehe Kapitel 2.3) in Enantiomere und in die zugehörigen Edukte getrennt werden. Die Auflösung  $R_S$  der Enantiomere variiert von 1 bis 9 (berechnet mit Gleichung 2).

Ein typisches mit diesen Bedingungen aufgenommenes Elektropherogramm von  $\alpha$ -Methylzimsäure und den hydrierten chiralen Produkten ist in Abbildung 3.2.1 gezeigt.

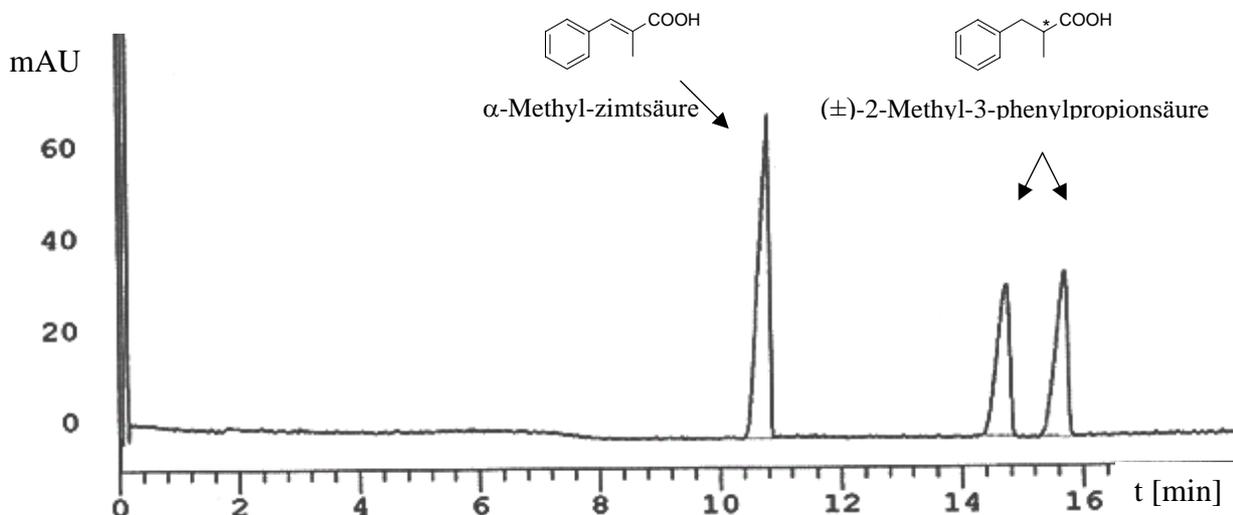


Abbildung 3.2.1: CE-Trennung von Edukt  $\alpha$ -Methyl-zimtsäure (2-Methyl-3-phenylacrylsäure) und dem Produkt (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure. Die Auflösung beträgt 2,1. HS- $\beta$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter wurde als Trennpuffer verwendet und die Substanzen wurden im Trennpuffer gelöst (Probenvorbereitung 1). Trennbedingungen: ABI 270A-HT, -11 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 30/50 cm, Kapillartemperatur: 28 °C, Injektionszeit: 0,2 s (1,24 nl Injektionsvolumen, entspricht 0,21% der Kapillarlänge), Injektionsdruck: 16,9 kPa.

Wie erwartet, konnten 3 Signale (Edukt und beide Enantiomere) detektiert werden. Die Trennung aller wasserlöslichen chiralen Verbindungen ist in Abbildung 3.2.2 und Abbildung 3.2.3 gezeigt, wobei jedoch bei allen Trennungen die Probe einen 5% (v/v) Dimethylsulfoxidgehalt enthielt (Probenvorbereitung 2). Die Migrationszeiten aller Modellsubstanzen (Edukte mit Enantiomerenpaaren) sind in Tabelle 7 aufgelistet.

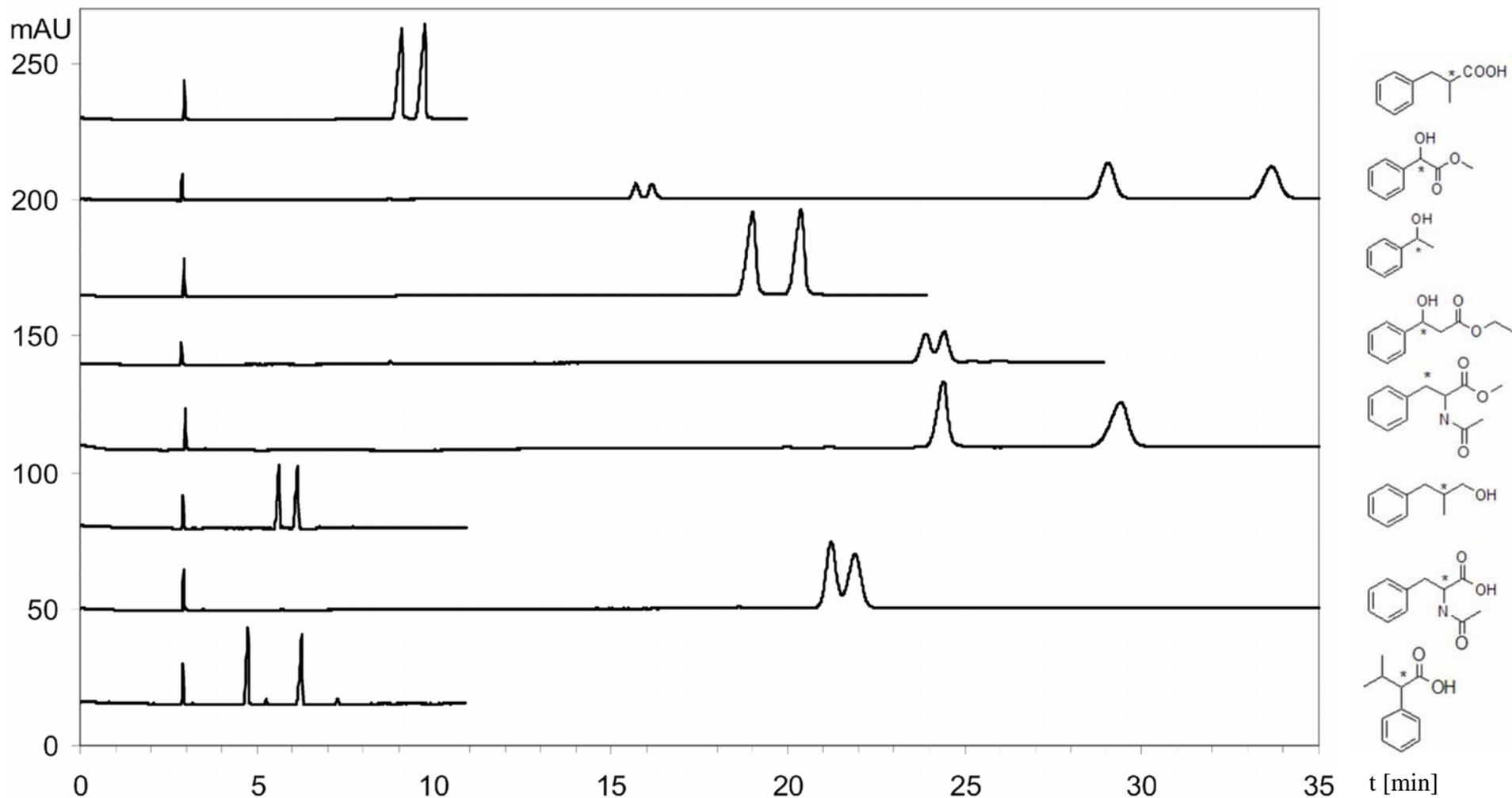


Abbildung 3.2.2: CE-Trennung aller wasserlöslichen Modellsubstanzen mit einem  $\log K_{OW}$  von 1-2 (siehe Tabelle 5). HS- $\beta$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid und Trennpuffer (Dimethylsulfoxidgehalt 5% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa.

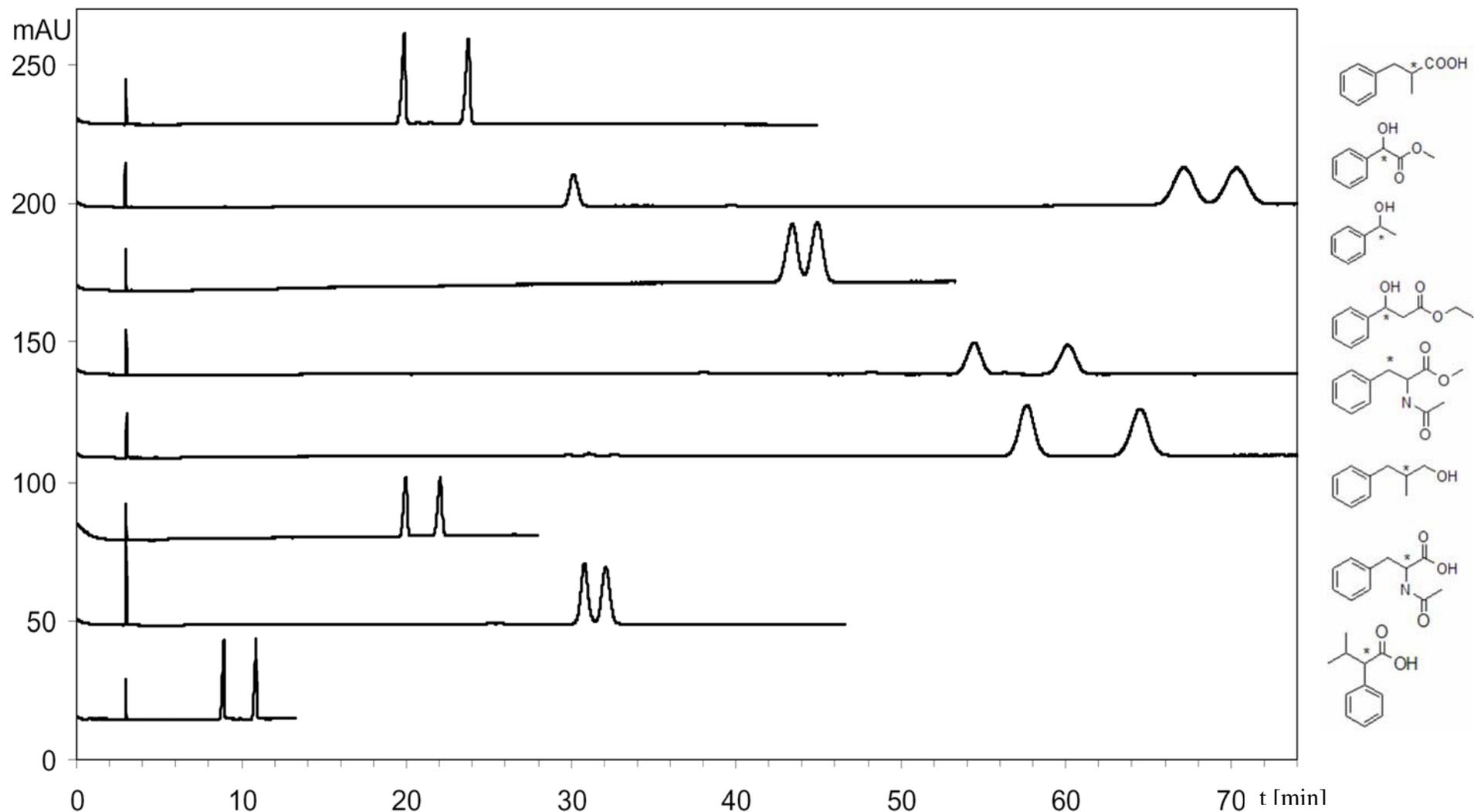


Abbildung 3.2.3: CE-Trennung aller wasserlöslichen Modellsubstanzen mit einem  $\log K_{OW}$  von 1-2 (siehe Tabelle 5). HS- $\gamma$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid und Trennpuffer (Dimethylsulfoxidgehalt 5% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa.

Tabelle 7: Übersicht der Migrationszeiten und Auflösung Rs (siehe Gleichung 2) aller Enantiomerenpaare sowie Edukte mit 5% HS- $\beta$ -CD beziehungsweise HS- $\gamma$ -CD (Beckman Coulter) und ausgewählte Modellsubstanzen mit <sup>+</sup> SsCDs von Antek respektive <sup>#</sup>sCDs von Aldrich. Trennbedingungen und Probenvorbereitung wie in Abbildung 3.2.2 und Abbildung 3.2.3.

| Modellsubstanzen:<br>Edukte<br>Enantiomere (E1/E2)  | Standard CE-system 1 ( $\gamma$ -CD) |                     |                     |                    | Standard CE-system 2 ( $\beta$ -CD) |                     |                     |                     |
|---|--------------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|   | Migrationszeit (min)                 |                     |                     | Auflösung          | Migrationszeit (min)                |                     |                     | Auflösung           |
|   | Edukt                                | E 1                 | E 2                 |                    | Edukt                               | E 1                 | E 2                 |                     |
| 2-Methyl-3-phenylacrylsäure ( $\alpha$ -Methyl-zimtsäure)<br>(RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure                         | 18                                   | 20, <sup>+</sup> 12 | 24, <sup>+</sup> 13 | 7, <sup>+</sup> 3  | 7                                   | 9, <sup>#</sup> 13  | 10, <sup>#</sup> 15 | 3, <sup>#</sup> 4   |
| Oxophenyllessigsäure-methylester<br>(RS)-Hydroxyphenyl-essigsäuremethylester  | 38                                   | 67                  | 70                  | 1                  | 18                                  | 29, <sup>#</sup> 42 | 34, <sup>#</sup> 49 | 6, <sup>#</sup> 5   |
| 1-Phenylethanon (Acetophenon)<br>(RS)-1-Phenylethanol   | 37                                   | 43                  | 45                  | 1                  | 20                                  | 19                  | 21                  | 3                   |
| 2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyliden)-amin<br>(RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyliden)-amin                         | 18                                   | 5, <sup>+</sup> 17  | 7, <sup>+</sup> 19  | 19, <sup>+</sup> 5 | 13                                  | 3, <sup>#</sup> 3   | 6, <sup>#</sup> 5   | 26, <sup>#</sup> 12 |
| Benzyl-(1-phenylethyliden)-amin<br>(RS)-Benzyl-(1-phenylethyl)-amin   | -                                    | 10, <sup>+</sup> 12 | 11, <sup>+</sup> 13 | 4, <sup>+</sup> 5  | -                                   | 6                   | 6                   | 0                   |
| 3-Oxo-3-phenyl-propansäureethylester<br>(RS)-3-Hydroxy-3-phenyl-propansäureethylester                                   | 48                                   | 54                  | 60                  | 4                  | 22                                  | 24                  | 24                  | 1                   |
| 5-Phenyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol<br>(RS)-2-Phenylpyrrolidin   | 16                                   | 11                  | 12                  | 1                  | 5                                   | 6                   | 6                   | 0                   |
| 2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyliden)-amin<br>(RS)-2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyl)-amin | 11                                   | 8                   | 9                   | 7                  | 16                                  | 10                  | 11                  | 3                   |
| 2-Acetylamino-3-phenylacrylsäure-methylester<br>(RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropansäure-methylester                      | 74                                   | 58                  | 65                  | 4                  | 36                                  | 24                  | 29                  | 6                   |
| Benzoessäure-(1-phenylethyliden)-hydrazid<br>(RS)-Benzoessäure-N-(1-phenylethyl)-hydrazid                               | 40                                   | 24                  | 28                  | 7                  | 8                                   | 8                   | 9                   | 9                   |
| 2-Methyl-3-phenylprop-2-en-1-ol<br>(RS)-2-Methyl-3-phenylpropan-1-ol  | 22                                   | 20                  | 22                  | 5                  | 6                                   | 5                   | 6                   | 3                   |
| 2-Acetylamino-3-phenylacrylsäure<br>(RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropansäure  | 48                                   | 31                  | 32                  | 2                  | 31                                  | 21                  | 22                  | 1                   |
| 3-Methyl-2-phenylbut-2-ensäure<br>(RS)-3-Methyl-2-phenylbutansäure  | 16                                   | 9, <sup>+</sup> 8   | 11, <sup>+</sup> 8  | 8, <sup>+</sup> 1  | 7                                   | 5                   | 6                   | 9                   |

### 3.3. Chirale Trennung nicht wasserlöslicher Modellsubstanzen

#### 3.3.1 Auftreten unerwarteter Signale

In weiteren Schritten wurde versucht, die nicht wasserlöslichen Modellsubstanzen mit  $\log K_{OW}$  3-4 (siehe Tabelle 5) zu trennen. Die Trennbedingungen waren die gleichen wie für die wasserlöslichen Verbindungen, aber zur Löslichkeitsverbesserung wurde der Probenlösung Methanol als organisches Lösungsmittel zugesetzt (siehe 2.3 Methoden, Probenvorbereitung 2). Bei der Trennung der Enantiomere von R, S-Benzyl-(1-phenylethyl)amin mit einem nicht abgemessenen Zusatz an Methanol in der Probenlösung traten vier statt der erwarteten zwei Signale auf (Abbildung 3.3.1 (a)). Auch ein Wechsel von HS- $\gamma$ -CD 5% (w/v) zu HS- $\alpha$ -CD 5% (w/v) ergab eine ähnliche, wenn auch nicht so gute Trennung (Abbildung 3.3.1(b)). Dies zeigte, dass das Auftreten dieser Zusatzsignale von der Art der verwendeten HSCDs unabhängig ist.

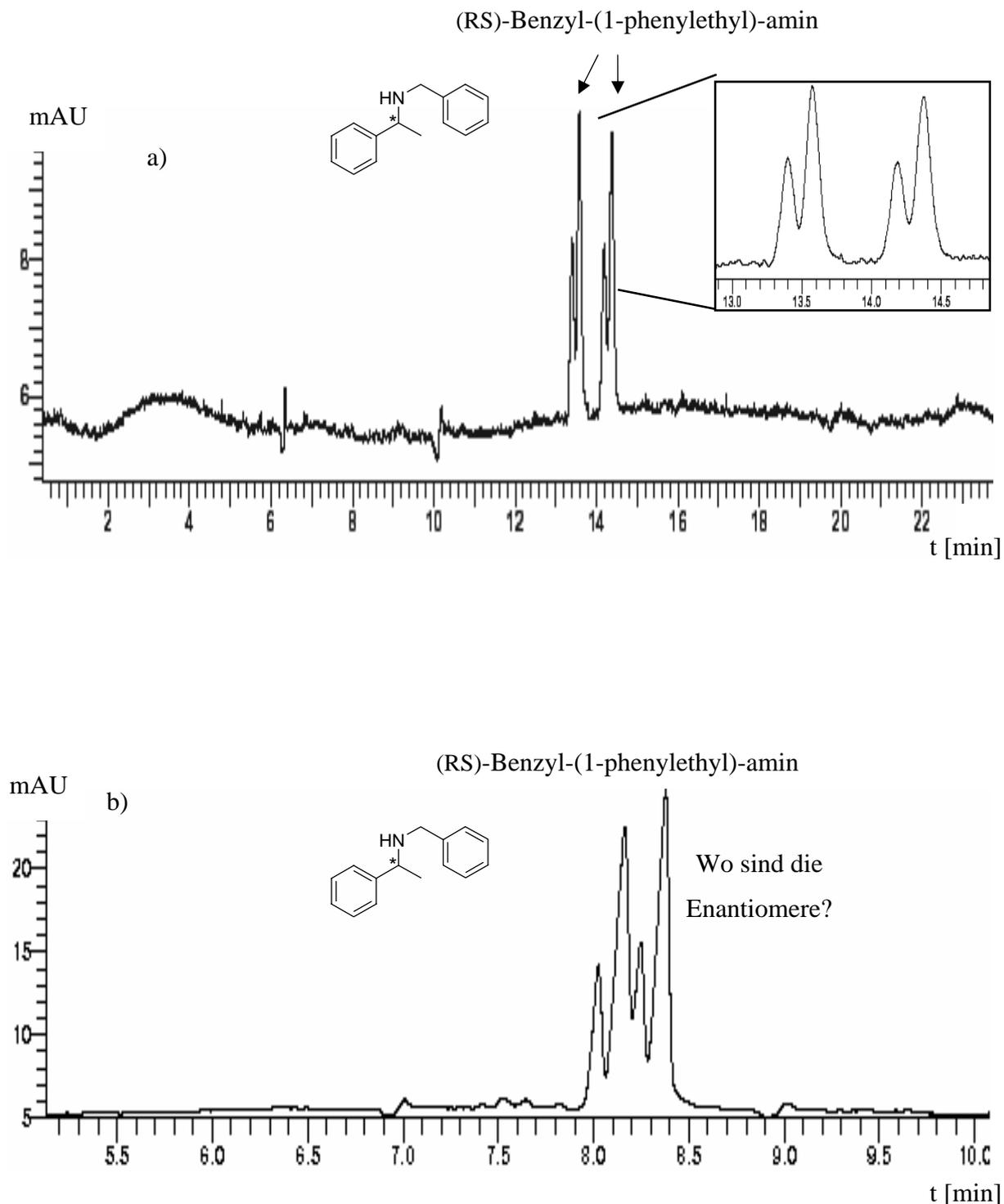


Abbildung 3.3.1: CE-Trennung der Enantiomere R-,S-Benzyl-(1-phenylethyl)-amin. HS- $\gamma$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) wurde in (a) und HS- $\alpha$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter in (b) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt ungefähr 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: ABI 270A-HT, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 30/50 cm, Kapillartemperatur: 28 °C, Injektionszeit: 0,2 s (1,24 nl Injektionsvolumen, entspricht 0,21% der Kapillarlänge), Injektionsdruck: 16,9 kPa.

Die beiden Trennungen liessen deshalb auf eine Verunreinigung des Racemats schliessen. Allerdings wurde der gleiche Effekt unter ähnlichen Trennbedingungen, für die folgende chirale Verbindungen beobachtet:

- (RS)-2,6-Dimethyl-phenyl-(1-phenylethyl)-amin
- (RS)-Benzyl-(1-phenylethyl)-amin
- (RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropansäuremethylester
- (RS)-Benzoessäure-N-(1-phenylethyl)-hydrazid

Sowie bei deren Edukte traten ähnliche Effekte auf:

- 2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyliden)-amin
- 2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyliden)-amin (Abbildung 3.3.2)
- Benzoessäure-(1-phenylethyliden)-hydrazid

Benzyl-(1-phenylethyliden)-amin (wurde nicht gemessen)

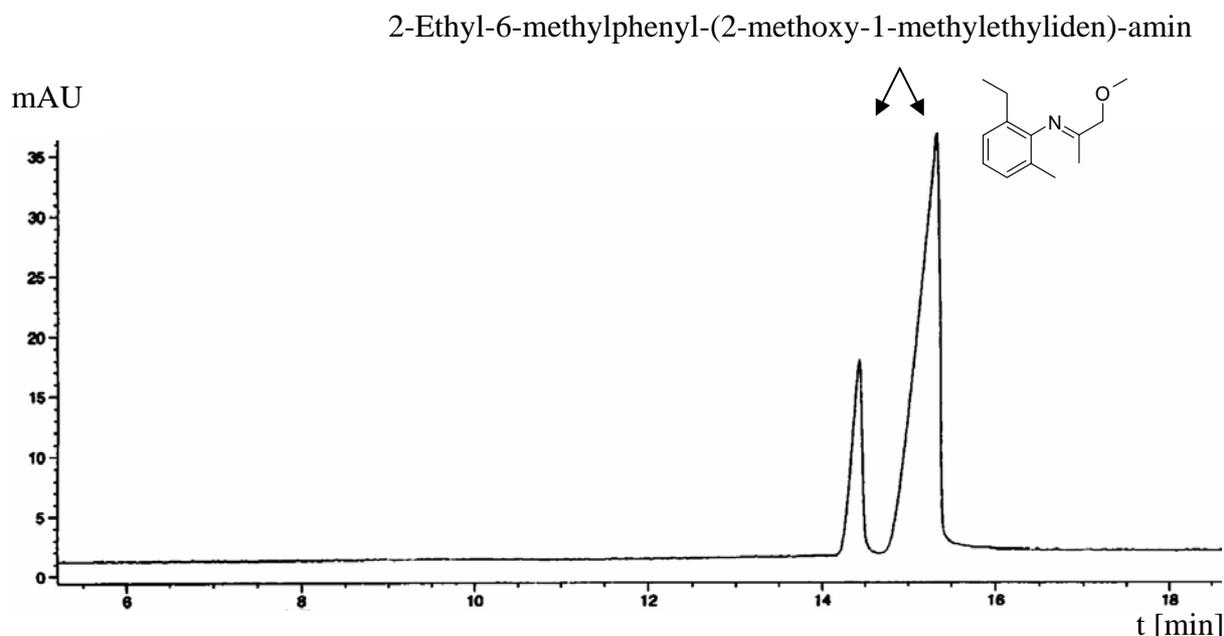


Abbildung 3.3.2: CE-Trennung von Edukt 2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyliden)-amin. HS- $\gamma$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt ungefähr 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 6 s (2,04 nl Injektionsvolumen, entspricht 0,34% der Kapillarlänge), Injektionsdruck: 1 kPa.

2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyliden)-amin ergab mit 60% Methanol (v/v) im Elektrolyt 1 zwei Signale. Allen diesen Verbindungen ist eine schlechte Wasserlöslichkeit und das Vorliegen von Kationen bei pH 2,5 gemeinsam.

Dieser Effekt wurde entweder bislang in der Literatur gar nicht beschrieben oder bei Auftreten wurde keine plausible Erklärung gegeben. Deshalb wurden weitere Untersuchungen in Bezug auf Ursache im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen.

Folgende Parameter der CE-Trennung wurden zunächst variiert:

- Länge des Injektionspfropfen, das heisst die Injektionsdauer der Probenlösung
- Menge an Methanol in der Probenlösung

- Verwendung anderer organischer Lösungsmittel in der Probenlösung
- Verschiedene Kapillaroberflächen (Unterdrückung EOF)
- Unterschiedliche Kapillartemperaturen
- Unterschiedliche Geräte
- Unterschiedliche Basizität der Modellsubstanzen
- Variation der Löslichkeit der Modellsubstanzen

### 3.3.2 Einfluss der Injektionspfropfenlänge auf die Signalteilung

Eine Serie von Messungen mit unterschiedlichen Injektionszeiten wurde vorgenommen. Diese Proben wurden in 60% (v/v) Methanol und 40% (v/v) Trennpuffer gelöst. Racemisches (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin wurde als Modellverbindung verwendet. Bei einer Injektionszeit von einer Sekunde konnten die beiden Enantiomere gut getrennt werden (siehe Abbildung 3.3.3). Ihre relativen Flächen (siehe relative Flächenberechnung mit Gleichung 3) entsprechen mit 0,98 : 1,02 dem Racemat. Eine Erhöhung der Injektionszeit auf 7 Sekunden ergibt ein ganz anderes Elektropherogramm. Bei den ursprünglichen Migrationszeitpunkten erscheinen weiterhin die Enantiomerensignale, jedoch ist deren Höhe/Fläche um einiges verkleinert. Zusätzlich sind zwei neue Hauptsignale bei späteren Migrationszeiten sichtbar. Diese Signale werden Artefaktsignale AF genannt, da sie vortäuschen, dass es sich hierbei um eine unreine Probe handelt. AF1 steht für das „Verunreinigungssignal“ des Enantiomers E1 und AF2 für Enantiomer E2. Die relativen Flächen der beiden Signalpaare sind zueinander jeweils unterschiedlich (also AF1 zu AF2 respektive E1 zu E2), also nicht in einem racemischen Verhältnis.

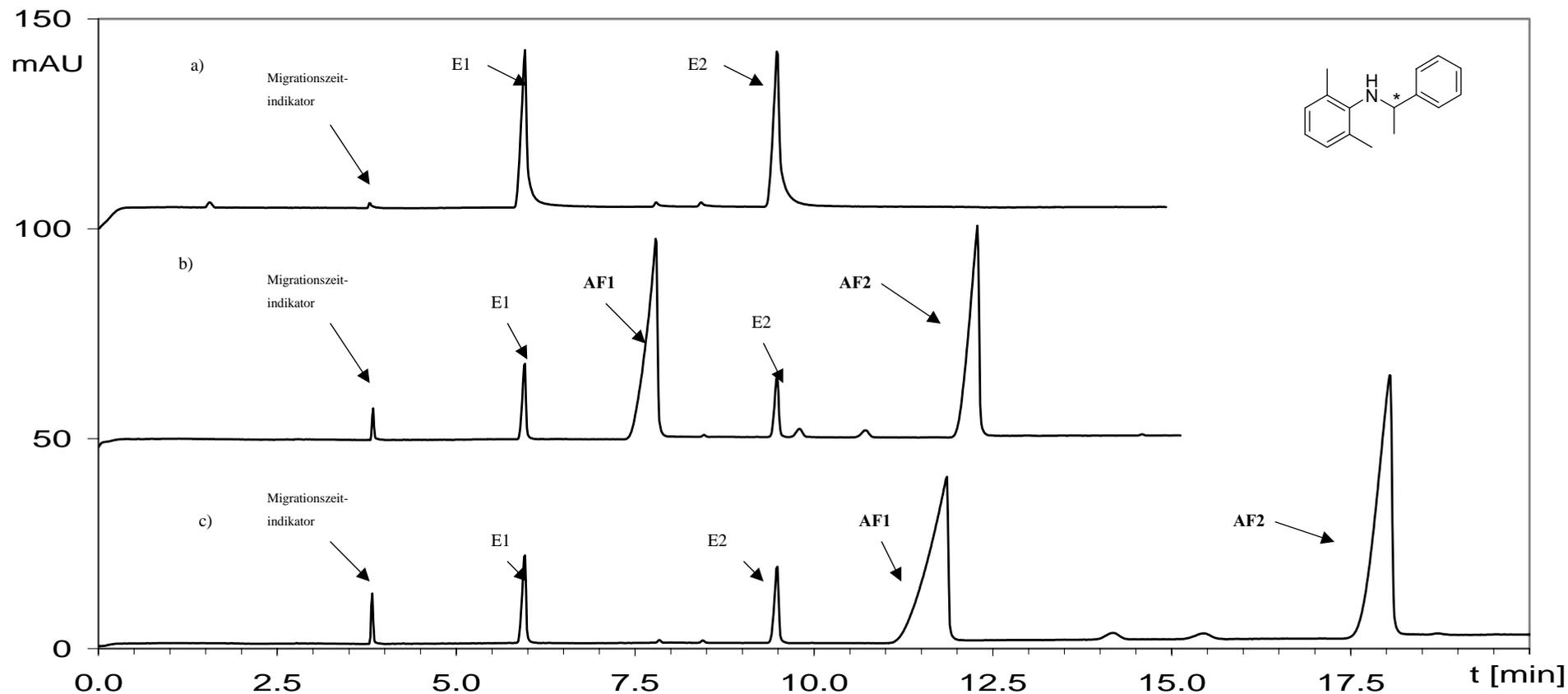


Abbildung 3.3.3: Einfluss der Injektionspfropfenlänge auf den Signalteilungseffekt. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 5% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanz wurde in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, unterschiedlichen Injektionszeiten: (a) 1 s (0,34 nl Injektionsvolumen, entspricht 0,06% der Kapillarlänge) (b) 7 s (2,38 nl Injektionsvolumen, entspricht 0,4% der Kapillarlänge), (c) 12 s (4,09 nl Injektionsvolumen, entspricht 0,67% der Kapillarlänge), Injektionsdruck: 1 kPa.

Eine weitere Erhöhung der Injektionszeit auf 12 Sekunden erhöht die Migrationszeit der AF-Signale noch stärker. AF1 migriert dabei sogar erst nach E2, was auf eine sehr starke Reduktion der Mobilität schliessen lässt. Auch bei 12 Sekunden Injektionszeit sind nur die relativen Signalsummen und nicht die einzelnen Signale im racemischen Verhältnis. Die beiden Enantiomerensignale sind wie bei 7 Sekunden Injektionszeit immer noch in der gleichen Position (gleiche Mobilität) wie bei der Injektionszeit von einer Sekunde.

Eine ähnliche Situation wird beobachtet, wenn statt des Elektrolyten 2 (HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter) Elektrolyt 1 (HS- $\gamma$ -CD von Beckman Coulter) verwendet wird (siehe Abbildung 3.3.4). Auch hier ist bei 1 s Injektionszeit keine Signalteilung festzustellen, nach 2 s wird sie jedoch sichtbar und nimmt anschliessend konstant zu. Ebenfalls sind die Mobilitäten der beiden Enantiomere E1 und E2 für alle Injektionszeiten konstant. Die Migrationszeiten von AF1 und AF2 nehmen jedoch mit der Erhöhung der Injektionszeiten kontinuierlich ab.

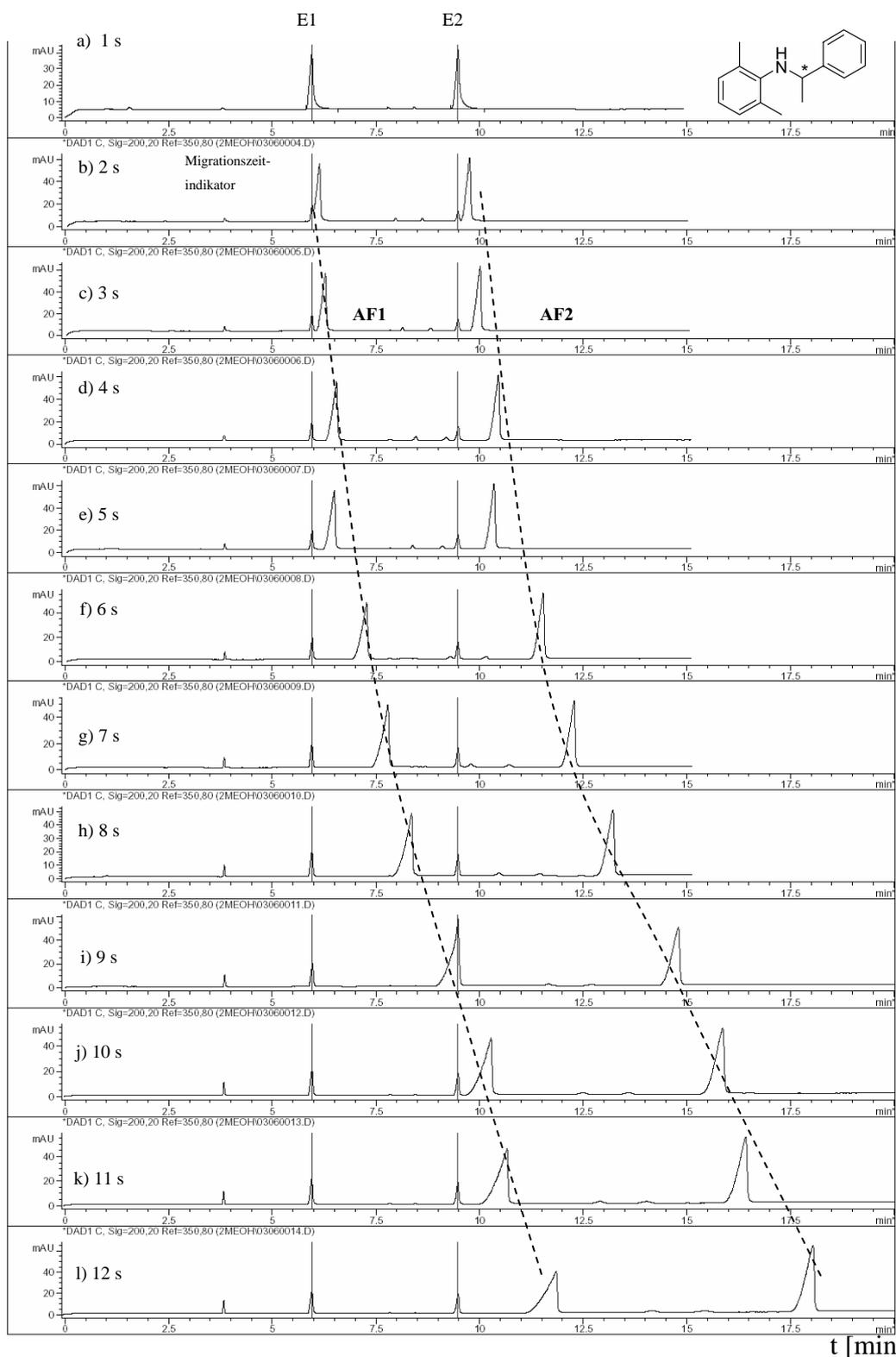


Abbildung 3.3.4: Einfluss der Injektionspfropfenlänge auf den Signalteilungseffekt. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 5% (w/v) HS- $\gamma$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanz wurde in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, unterschiedlichen Injektionszeiten: (a)- (l) 1 s-12 s (% der Kapillarlänge siehe Abbildung 3.3.3), Injektionsdruck: 1 kPa.

### 3.3.3 Einfluss der Methanolkonzentration der Probe auf den Signalteilungseffekt

Eine Änderung der Probenvorbereitung wurde für die genauere Untersuchung dieses Effekts vorgenommen, da sich bei Probenvorbereitung 2 die HSCD Konzentration in Proben- und Trennpufferlösung unterscheidet und dadurch ein Kapazitätsmangel (Verminderung der HSCD-Konzentration durch Ionen-transport zwischen den beiden Puffergefäßen) an HSCD nicht ausgeschlossen werden kann. Deshalb wurde für alle weiteren Untersuchungen die Probenvorbereitung 3 angewendet, welche gleiche Konzentration von HSCD in Probe und Puffer hat.

Für die Untersuchung des Signalteilungseffekts wurde ebenfalls die Menge an Modellsubstanz konstant gehalten. Einzig der Gehalt an Methanol in der Probe wurde variiert. Als Modellsubstanz wurde das Racemat (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin eingesetzt (siehe Abbildung 3.3.5). Die HSCD-Menge wurde wegen Schwerlöslichkeit in Lösungen mit hohem Methanolanteil auf 2 % (w/v) reduziert.

Ohne Methanol in der Probe zeigte sich keinerlei Signalaufteilung und ein racemisches Signalverhältnis. Bei dieser Probe muss aber berücksichtigt werden, dass nur ein Teil der Substanz in Lösung ging. Die Erhöhung des Methanolgehalts auf 40% zeigte nun eine Signalaufteilung des später migrierenden Enantiomers E2. Eine weitere Erhöhung auf 50% Methanolgehalt in der Probenlösung verstärkte diesen Effekt, wobei klar sichtbar wurde, dass das Enantiomerensignal E2 die Mobilität beibehielt, das AF2-Signal hingegen langsamer migrierte. Eine nochmalige Konzentrationserhöhung auf 60% Methanol bestätigte diesen Effekt. Zudem konnte auch eine beginnende Aufteilung des Enantiomers E1 in AF1 beobachtet werden.

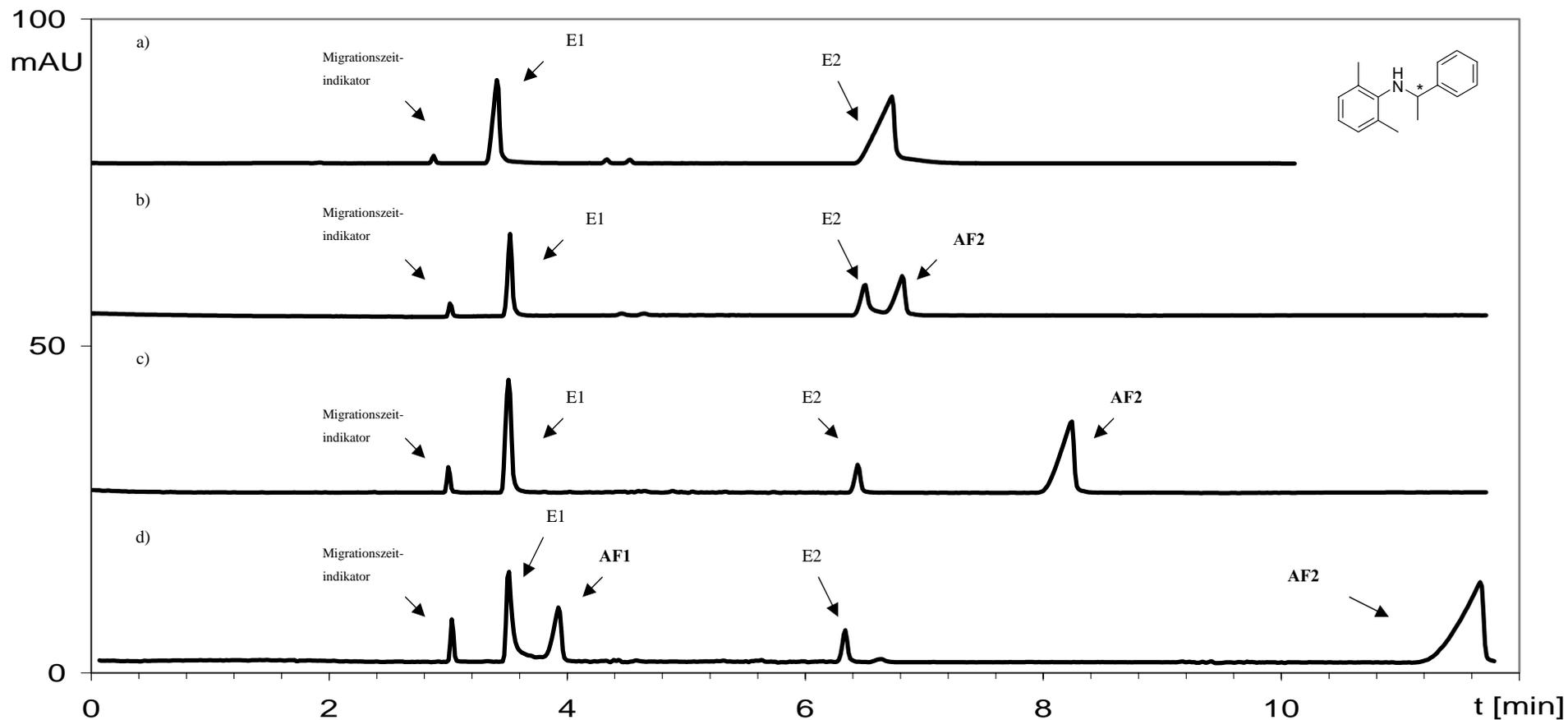


Abbildung 3.3.5: Einfluss der Methanolkonzentration der Probe auf den Signalteilungseffekt. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 2% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa. Die Substanz wurde (a) in 100% (v/v) Trennpuffer (Probe nicht komplett gelöst) gelöst, (b) in 40% (v/v) MeOH, (c) in 50% (v/v) MeOH, (d) in 60% (v/v) MeOH gelöst. Die HSCD-Konzentration in der Probelösung wurde jeweils auf 2% (w/v) eingestellt (Probenvorbereitung 3).

### 3.3.4 Einfluss des Lösungsmittels auf den Signalteilungseffekt

Anstelle von Methanol wurden auch andere organische Lösungsmittel wie Ethanol (EtOH), Acetonitril (ACN) und Dimethylsulfoxid (DMSO) untersucht. Abbildung 3.3.6 zeigt den Signalteilungseffekt für Acetonitril. Alle Lösungsmittel zeigten Signalteilungen. Bei höheren Lösungsmittelkonzentrationen zeigten sich gegenüber Methanol mit den anderen organischen Lösungsmitteln Mobilitätsverschiebungen. So vermindert sich, z.B. die Mobilität des Artefaktsignals AF2 (Abbildung 3.3.6) ab einer ACN-Konzentration von 40% (v/v) kontinuierlich. Die Ursachen könnten Viskositäts- und Polaritätsunterschiede der Lösungsmittel sein.

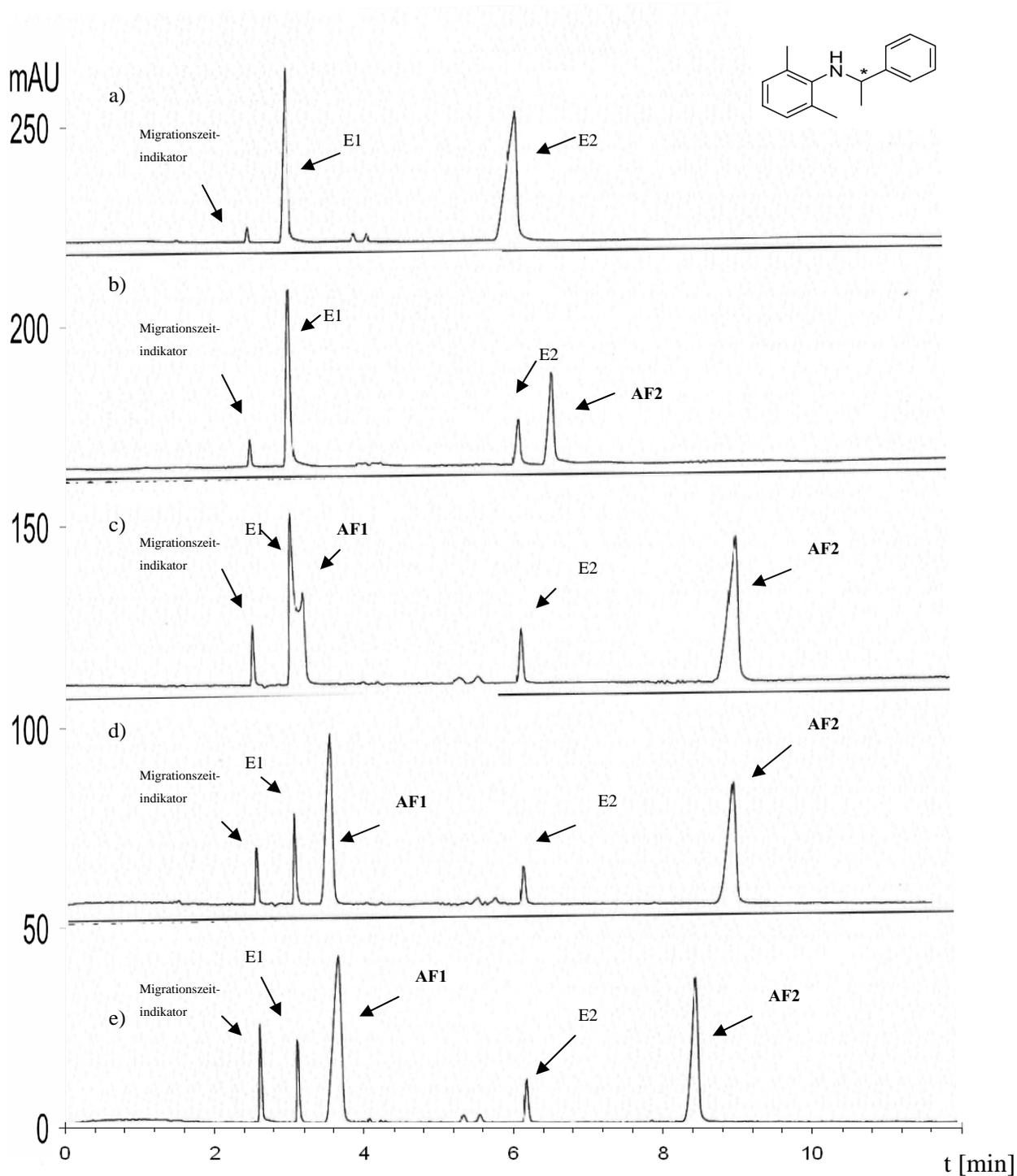


Abbildung 3.3.6: Einfluss der Acetonitrilkonzentration der Probe auf den Signalteilungseffekt. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 2% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa. Die Substanz wurde (a) in 100% (v/v) Trennpuffer (Probe nicht komplett gelöst), (b) in 30% (v/v) ACN, (c) in 40% (v/v) ACN, (d) in 50% (v/v) ACN, (e) in 60% (v/v) ACN gelöst. Die HSCD-Konzentration in der Probelösung wurde jeweils auf 2% (w/v) eingestellt (Probenvorbereitung 3).

### 3.3.5 Signalflächenverhältnisse

Bei der Untersuchung der korrigierten Signalflächenverhältnisse von E1, E2, AF1 und AF2 auf unterschiedliche Injektionsmengen, wurde eine Injektionsserie von 13 s bis 26 s Injektionszeit durchgeführt. Als Probenlösungsmittel wurde 50% (v/v) ACN und die Probenvorbereitung 3 (siehe unter 2.3 Methoden) verwendet. Die korrigierten Peakflächen (Gleichung 3) von E1, E2 beziehungsweise AF1 und AF2 in Bezug auf unterschiedlichen Injektionszeiten sind in Abbildung 3.3.7 dargestellt. Man erkennt, dass die Summe aller korrigierten Peakflächen (also  $E1+E2+AF1+AF2$ ) mit längerer Injektionszeit und dadurch grösserer Probenmenge kontinuierlich wächst. Im Allgemeinen nehmen die korrigierten Peakflächen von AF1 und AF2 zu. Die korrigierten Signalflächen von E1 und E2 sind jedoch praktisch konstant trotz der Verdoppelung der Injektionszeit von 13 s auf 26 s.

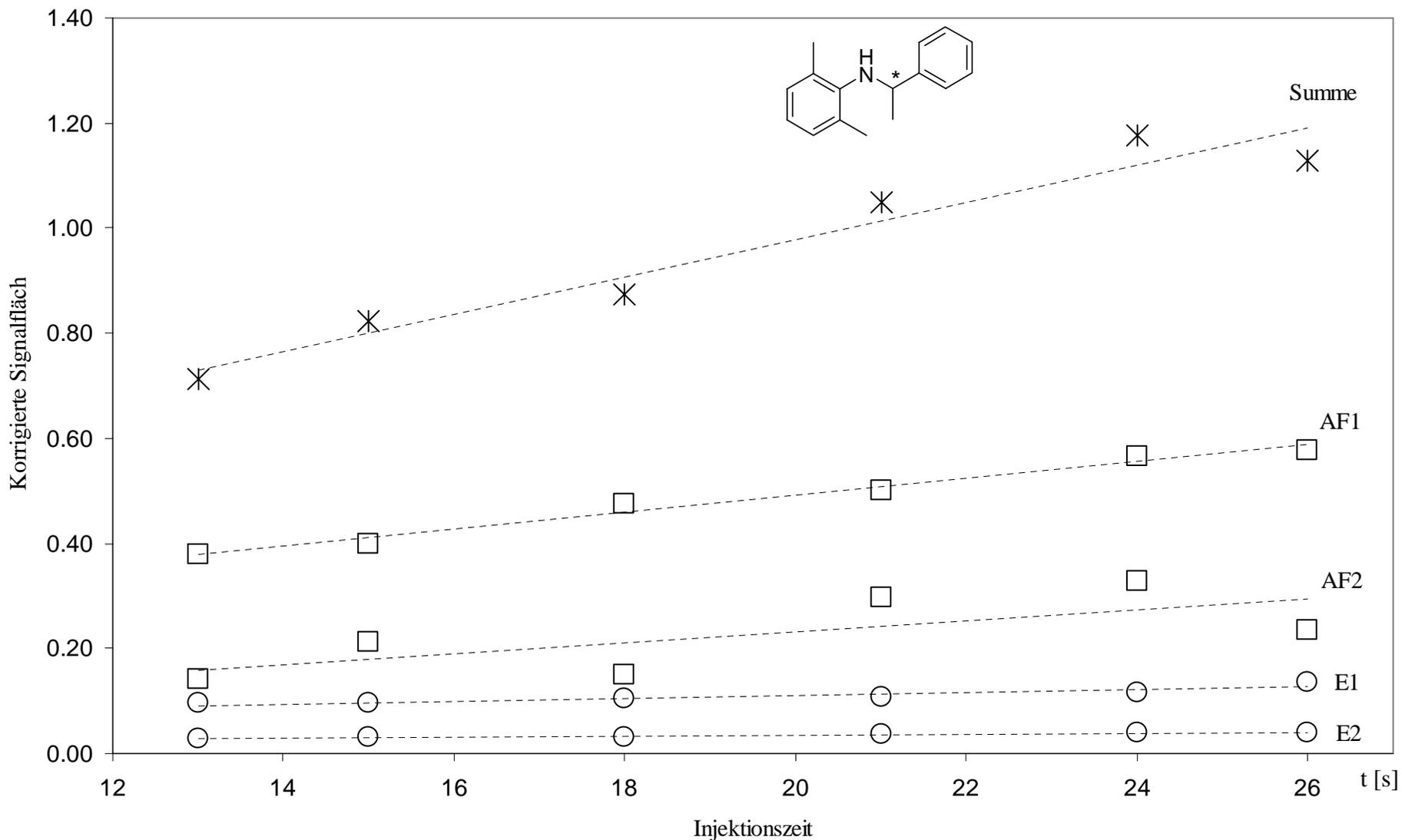


Abbildung 3.3.7: Einfluss der Injektionszeit auf die korrigierten Signalfächen von E1, E2 respektive AF1 und AF2 mit der Gesamtsumme aller vier Signalfächen. Racemisches (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin wurde mit 2% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) getrennt. Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionsdruck: 1 kPa, Probenvorbereitung 3, Lösungsmittel 50% (v/v) ACN.

### 3.3.6 Relative Mobilitätsdifferenz $\delta_m$

Um die Signalteilung zu beschreiben und zu charakterisieren, wurde die relative Mobilitätsdifferenz  $\delta_m$  eingeführt.  $\delta_m$  wurde bereits von Ma und Horvath (1997) sehr erfolgreich zur Charakterisierung der Selektivität von chiralen CE-Systemen angewendet.  $\delta_m$  wird deshalb zur Charakterisierung der Selektivität zwischen den E1 und E2 Signalen, zwischen AF1 und AF2, sowie zwischen E1 und AF1 beziehungsweise E2 und AF2 verwendet.

Gleichung 10

$$\text{Relative Mobilitätsdifferenz } \delta_m = \frac{\Delta\mu_{e1/e2}}{\mu_{\text{Durchschnitt}}} = 2 \cdot \frac{\mu_{e1} - \mu_{e2}}{\mu_{e1} + \mu_{e2}}$$

#### 3.3.6.1 Einfluss der Methanolkonzentration der Probe auf die Selektivität $\delta_m$

In Abbildung 3.3.8 ist der Einfluss der Methanolkonzentration in der Probe auf die relative Mobilitätsdifferenz  $\delta_m$  dargestellt. Die Selektivität  $\delta_m$  für E1/E2 ist praktisch konstant. Die beiden Artefaktsignale zeigen jedoch eine Erhöhung der Selektivität oberhalb einer Methanolkonzentration von 20% (v/v) in der Probe. Das gilt auch für die Selektivität  $\delta_m$  E2/AF2 und E1/AF1. Eine Erhöhung der Selektivität durch die Addition von Methanol oder Acetonitril wurde ebenfalls von Gratz und Stalcup berichtet [Gratz und Stalcup, 1998].

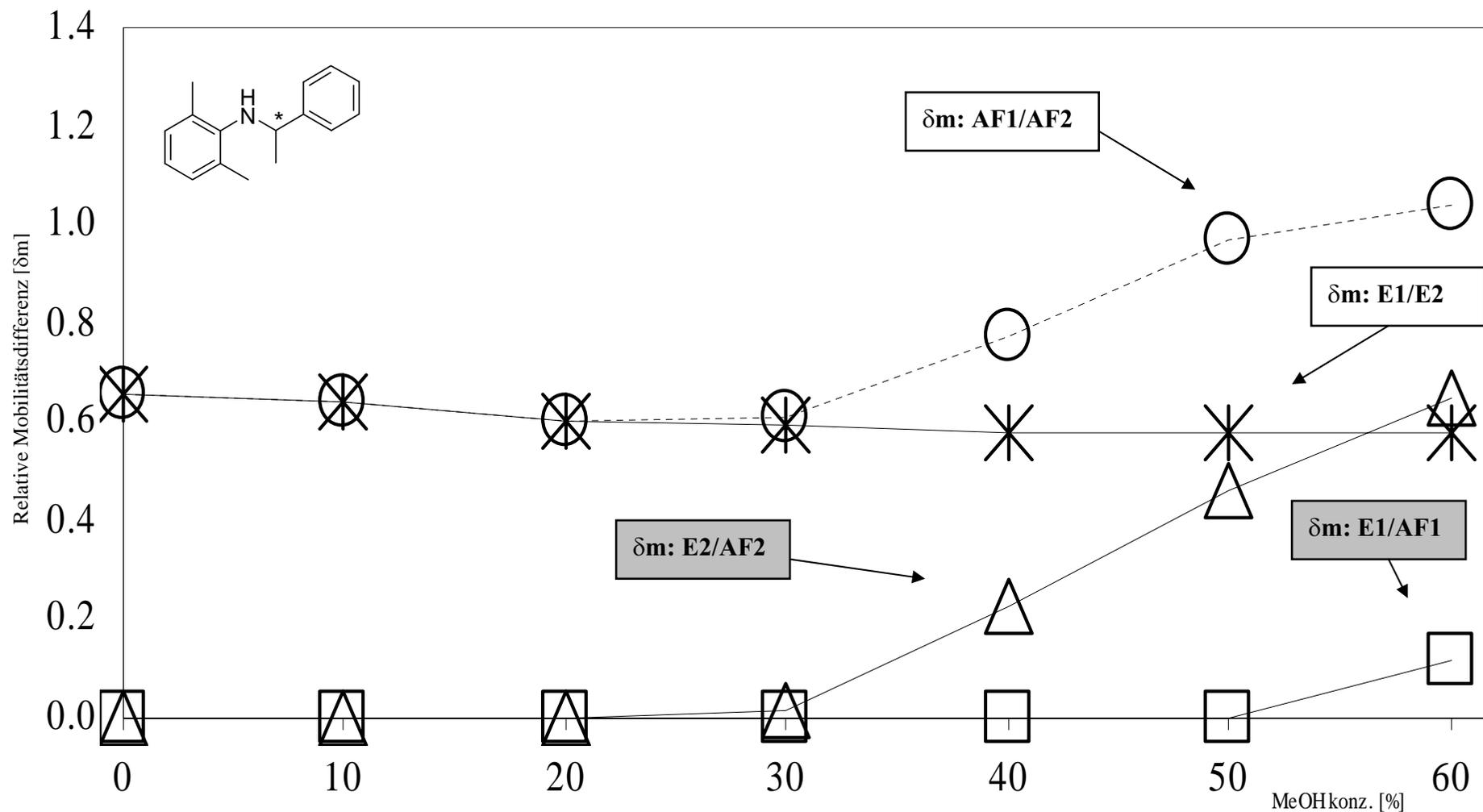


Abbildung 3.3.8: Einfluss der Methanolkonzentration auf die Selektivität  $\delta_m$  für das Racemat (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin (Trennbedingungen wie bei Abbildung 3.3.5). Die Selektivität  $\delta_m$  ist fast konstant für E1/E2. Ab einer Methanolkonzentration von >20% (v/v) in der Probe, erhöht sich jedoch die Selektivität von AF1/AF2 wie auch bei E1/AF1 und E2/AF2.

### 3.3.6.2 Einfluss der Injektionszeit auf die Selektivität $\delta_m$

In Abbildung 3.3.9 ist der Einfluss der Injektionszeit auf die relative Mobilitätsdifferenz  $\delta_m$  dargestellt. Die  $\delta_m$  von E1/E2 ist wiederum praktisch unabhängig von der Injektionszeit analog zur Methanolkonzentration. Das gleiche gilt für AF1/AF2. Die Selektivität E1/AF1 nimmt dagegen mit Verlängerung der Injektionszeit fast linear zu. Den Trend beobachtet man ebenfalls für E2/AF2. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich hierbei um zwei unabhängige Systeme E1/E2 und AF1/AF2 handelt, welche beide eine konstante Selektivität aufweisen. E1/AF1 und E2/AF2 zeigen allerdings eine deutliche Zunahme der Selektivität in Bezug auf Vergrößerung der Injektionszeit.

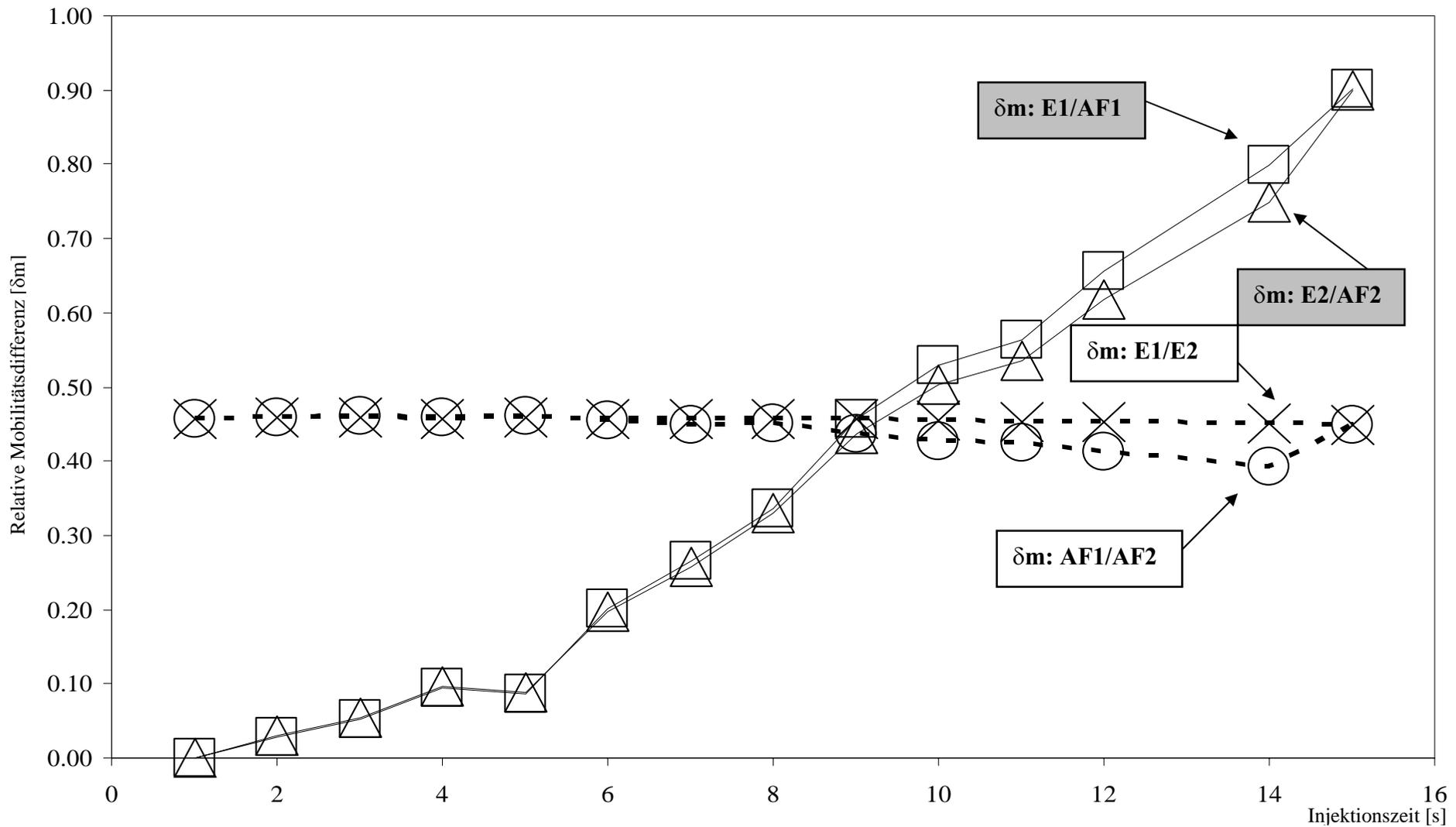


Abbildung 3.3.9: Einfluss der Injektionszeit auf die Selektivität  $\delta m$  für das Racemat (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin (Probenvorbereitung 3, Lösungsmittel 60% (v/v) MeOH und Trennbedingungen wie bei Abbildung 3.3.5). Die Selektivität  $\delta m$  ist fast konstant für E1/E2 und AF1/AF2. Für E1/AF1 und E2/AF2 jedoch, führt eine Vergrößerung der Injektionszeit zur Erhöhung der Selektivität .

### 3.3.7 Einfluss der Kapillaroberflächeneigenschaften auf die Signalteilung

Der Zusatz von organischen Lösungsmitteln könnte neben anderen Oberflächeneffekten auch die Ablösung der vor jeder Trennung aufgetragenen Kapillar-Konditionierlösung verursachen und so den beobachteten Effekt hervorrufen. Deshalb wurde der Einfluss verschiedener Kapillaroberflächen auf die Signalaufteilung untersucht.

Es wurden entweder dynamische oder statische Belegungen verwendet. Bei der dynamischen Methode wurde 50 mM 1,4-Diaminobutan dem Puffer und der Probenlösung zugesetzt. Wie in Abbildung 3.3.10 sichtbar ist, wurde durch den relativ hohen Anteil an Diaminobutan die Komplexbildung von HSCDs mit (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin gestört und eine Enantiomertrennung war nicht mehr möglich. Allerdings trat auch hier das ebenfalls nicht getrennte Artefaktsignal auf. Dessen Bildungsmechanismus ist gleich wie bei den unbelegten Kapillaren, was mit einer Erhöhung der Injektionszeit bewiesen werden konnte. Dies ergab eine starke Mobilitätsverminderung des Artefaktsignals bei unveränderter Mobilität des Enantiomerensignals (E1/E2).

Der Einfluss einer statischen Belegung wurde mit einer Kapillare von Beckman Coulter eCAP (Polymer vernetzte quartäre Ammoniumverbindung, 477431) untersucht. Die HSCD-Konzentration wurde zwecks Verbesserung der Trennung auf 10% (w/v) im Elektrolyt und in der Probe erhöht (allerdings entspricht die HSCD-Konzentration in der Probe nicht der HSCD-Konzentration des Trennpuffers gemäß Probenvorbereitung 2). Die damit erhaltene Injektionszeitserie ist in Abbildung 3.3.11 gezeigt. Die dabei auftretende Signalaufteilung ist ähnlich, aber etwas schwächer als bei den unbelegten Kapillaren. Es wird daher der gleiche Mechanismus angenommen.

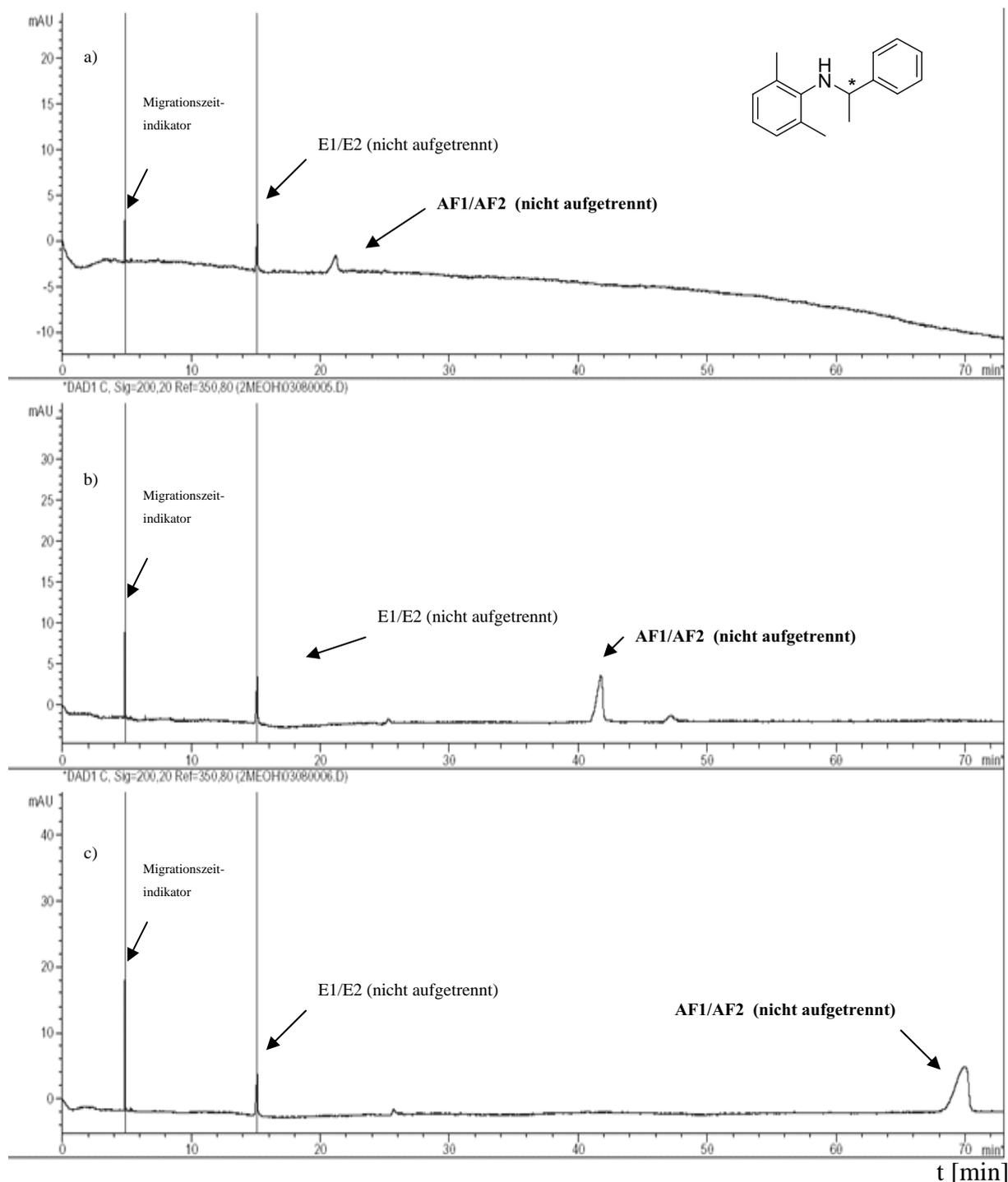


Abbildung 3.3.10: Einfluss der Injektionspfropfenlänge auf den Signalteilungseffekt bei einer dynamischen Kapillaroberflächenbelegung. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 5% (w/v) HS- $\gamma$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) mit 50mM 1,4-Diaminobutan wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanz wurde in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Die Kapillare wurde nicht vor jeder Trennung mit Kapillar-Konditionierlösung gespült. Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, unterschiedlichen Injektionszeiten: (a) 13 s, (b) 18 s, (c) 25 s, (% der Kapillarlänge siehe Abbildung 3.3.3), Injektionsdruck: 1 kPa.

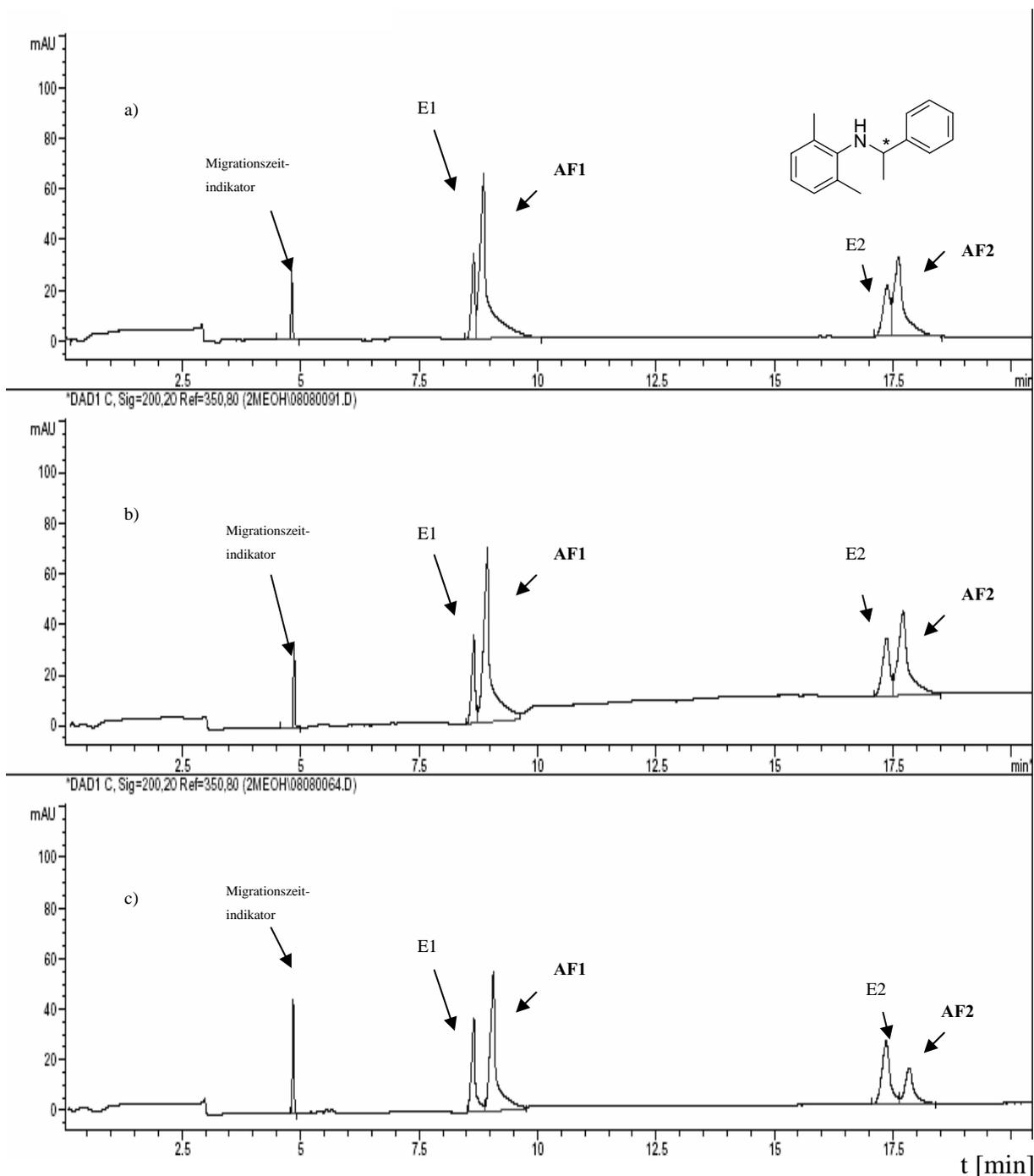


Abbildung 3.3.11: Einfluss der Injektionspfropfenlänge auf den Signalteilungseffekt bei einer statischen Kapillaroberflächenbelegung (Aminmodifizierte Kapillare). CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 10% (w/v) HS- $\gamma$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanz wurde in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Die Kapillare wurde nicht vor jeder Trennung mit Kapillar-Konditionierlösung gespült. Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, unterschiedlichen Injektionszeiten: (a) 13 s, (b) 18 s, (c) 25 s, (% der Kapillarlänge siehe Abbildung 3.3.3), Injektionsdruck: 1 kPa.

Die Messungen mit dynamisch und statisch belegten Kapillaren zeigt, dass die Signalaufteilung nicht durch die Kapillar-Konditionierlösung verursacht wird. Dies wurde durch weitere Trennungen auf einer mit Polyacrylamid belegten Kapillare von Beckman Coulter (neutral eCAP 477441) untermauert, welche derjenigen auf der aminmodifizierten Kapillare ähnlich ist (Resultate nicht gezeigt).

### 3.3.8 Einfluss der Kapillartemperatur auf die Signalaufteilung

Der Einfluss der Kapillartemperatur auf die Signalaufteilung ist in Abbildung 3.3.12 gezeigt. Die Trennung wurde bei 15 °C, 30 °C und 60 °C auf- und absteigend vorgenommen. Es wurden keine Unterschiede beobachtet. Die Reduktion des Migrationszeitindikators zeigt klar eine Reduktion der Viskosität des Elektrolyten. Diese erhöht die Mobilität, was zu stark reduzierten Migrationszeiten fast aller Signale führt. Einzig das AF2-Signal zeigt eine wenig veränderte Mobilität, trotz Reduktion der Viskosität des Elektrolyten.

Die Flächenverhältnisse zwischen E1 und AF1 wie auch zwischen E2 und AF2 bleiben bei der Temperaturänderung in etwa gleich, was auch nicht auf irgendwelche Aggregate oder Dimere schließen lässt. Schlussendlich kann durch diese Flächenverhältnisse auch ein joule'scher Heizeffekt ausgeschlossen werden [Jorgenson 1983]. Ein joule'scher Heizeffekt würde in einer viel stärkeren Änderung der Flächenverhältnisse resultieren.

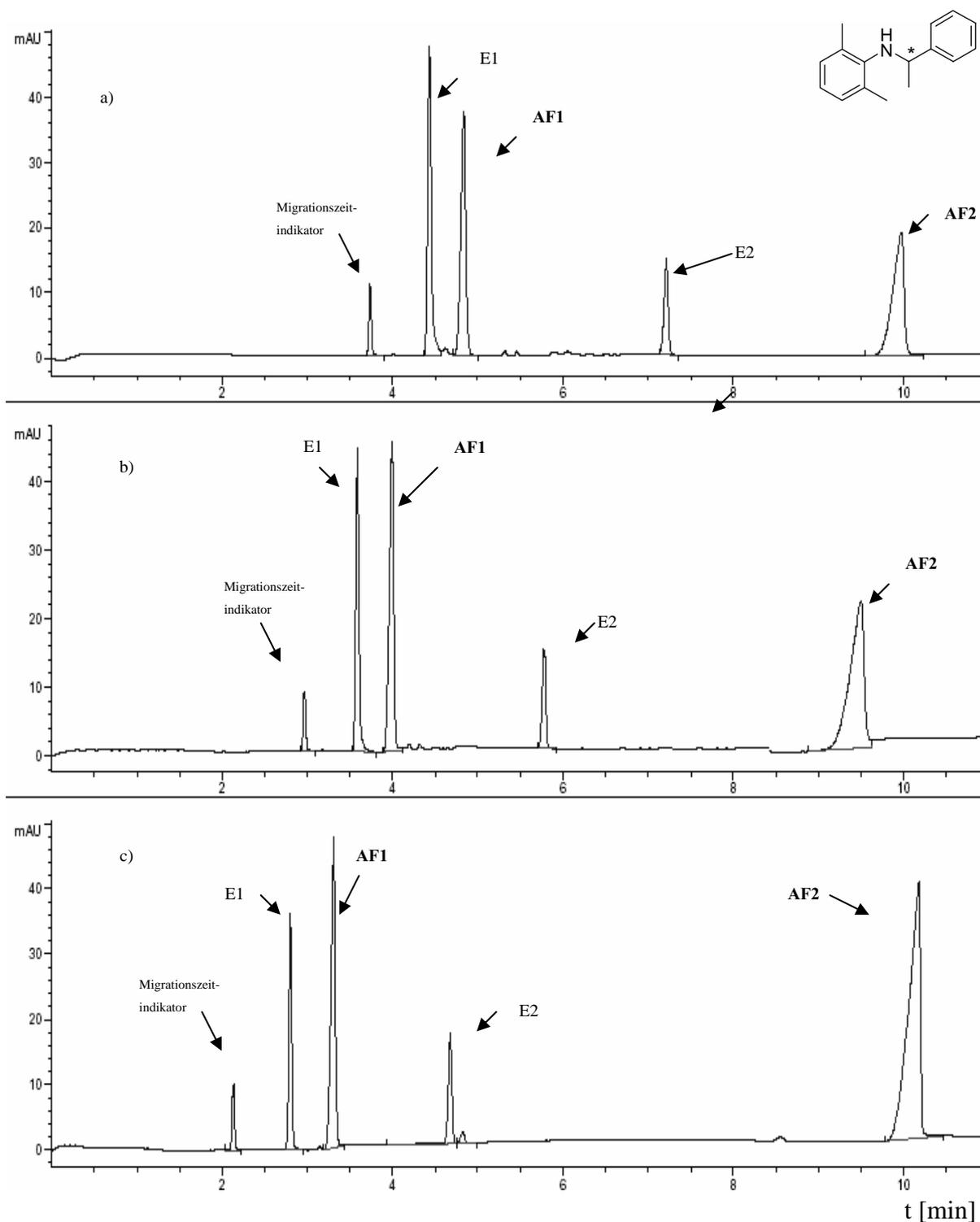


Abbildung 3.3.12: Einfluss der Kapillartemperatur auf den Signalteilungseffekt. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 5% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanz wurde in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa, Kapillartemperaturen: (a) 15 °C, (b) 30 °C, (c) 60 °C.

### 3.3.9 Geräteunabhängigkeit der Signalaufteilung

Alle vorhandenen Geräte (siehe Liste im experimentellen Teil) zeigen für die Modellverbindungen (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin, (RS)-Benzyl-(1-phenylethyl)-amin und (RS)-2-Ethyl-6-methylphenyl-(2-methoxy-1-methylethyl)-amin das gleiche Problem der Signalaufteilung. Dieses ist somit nicht auf einen Geräteartefakt zurückzuführen.

### 3.3.10 Einfluss der Basizität und Löslichkeit der Modellsubstanzen auf die Signalteilung

Zur Untersuchung des Einflusses der Basizität und Löslichkeit der verwendeten Komponenten wurden Modellsubstanzen hoher Basizität (tiefer  $pK_b$ -Wert) und niedriger Basizität (hoher  $pK_b$ -Wert oder  $pK_a$ -Wert) verglichen. Modellsubstanzen niedriger Basizität haben im Allgemeinen eine niedrige Löslichkeit (hoher  $\log K_{OW}$ ). Die Mehrheit der hier betrachteten Basen haben jedoch ein aromatisches System, in welchem die Mesomerie durch die Protonierung beeinflusst wird und somit eine Auswirkung auf die Löslichkeit hat. Deshalb findet in diesem Vergleich auch die Löslichkeit grosse Beachtung.

Die Signalpaare (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin und (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure wurden mit gleichen Trennbedingungen, Probenvorbereitungen, Substanzkonzentrationen und Methanol als Lösungsmittel verglichen. Wie in Abbildung 3.3.13 zu sehen ist, zeigt das Racemat von (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure ( $\log K_{OW} = 2$ ,  $pK_a = 4.7$ ) einen sehr geringen Artefakteffekt im Vergleich zum Racemat (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin, das eine bedeutend niedrigere Löslichkeit ( $\log K_{OW} = 4$ ) und höhere Basizität ( $pK_b = 10.2$ ) aufweist.

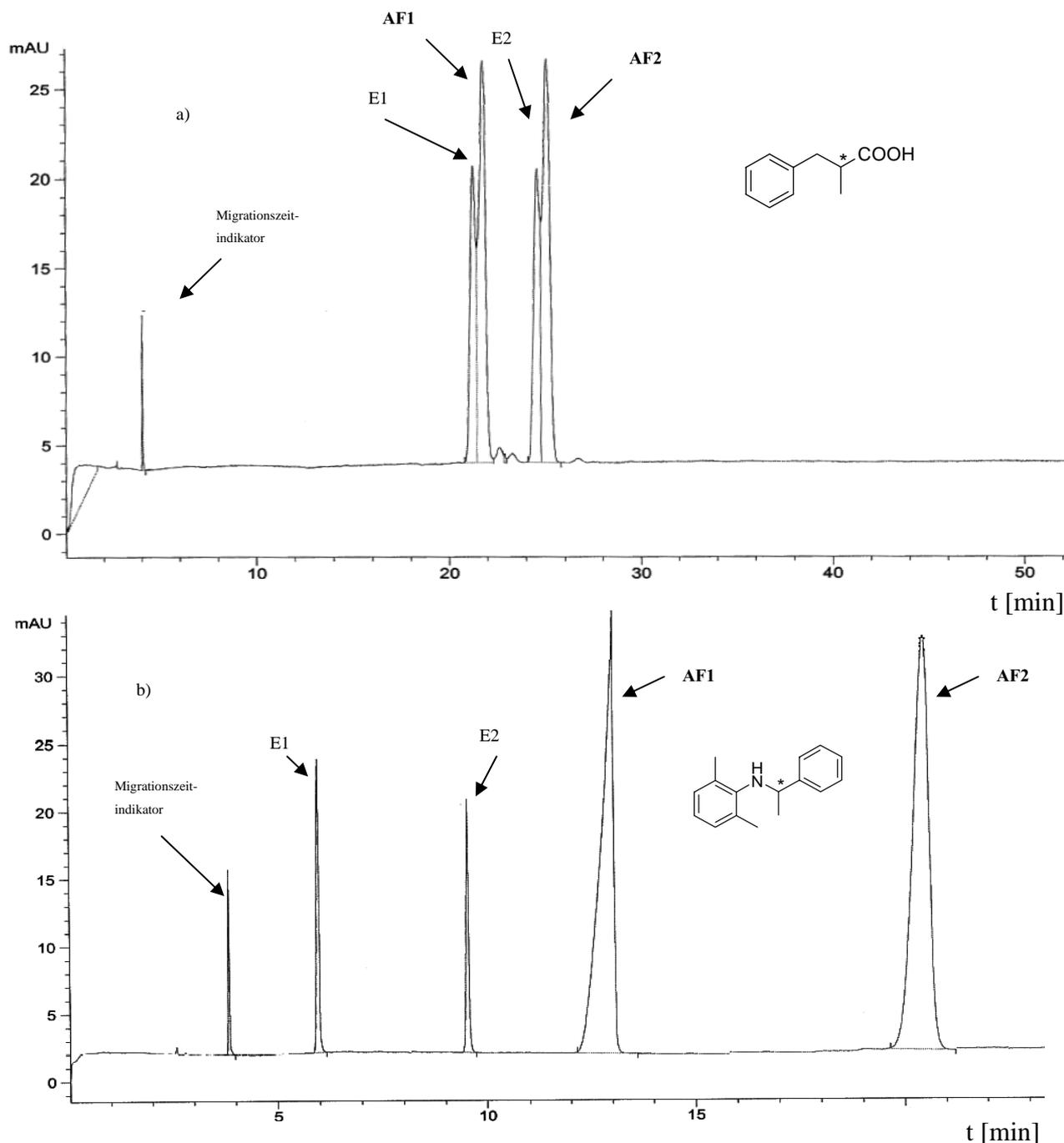


Abbildung 3.3.13: Einfluss der Basizität und Löslichkeit auf die Signalteilung. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure ( $\log K_{OW} = 2$ ,  $pK_a = 4.7$ ) (a) und eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin ( $\log K_{OW} = 4$ ,  $pK_b = 10.2$ ) (b) 5% (w/v) HS- $\gamma$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa.

### 3.3.11 Einfluss des pH-Wertes der Probelösung auf die Signalteilung

Die Probelösungen wurden auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt (mit ortho- $\text{H}_3\text{PO}_4$  respektive TEA), um zu untersuchen, ob die zu geringe Protonierung durch das Gegenion ein Grund für den Aufteilungseffekt ist (siehe Ermakov *et al.* (1994) und Andersson und Hägglund (2000a)). Alle Proben wurden mit Methanol als organisches Lösungsmittel mit 60% (v/v) Methanol und 40% (v/v) Trennpuffer hergestellt (Probenvorbereitung 2). Als Modellsubstanz wurde das Enantiomerenpaar (RS)-2,6-Dimethyl-phenyl-(1-phenylethyl)-amin verwendet. Probe a) wurde auf pH-Wert 1,92, Probe b) auf 2,50 und Probe c) auf 6,64 eingestellt (siehe Abbildung 3.3.14).

Dabei wurde sichtbar, dass eine Erniedrigung des pH-Wertes in der Probe zur Erhöhung der Protonierung der basischen Modellsubstanz keinen Einfluss auf den Aufteilungseffekt im Vergleich zur Probe bei einem pH-Wert von 2,50 hat. Eine Erhöhung des pH-Wertes auf 6,64 hingegen zeigt eine kleine Veränderung, welche jedoch auf die grossen pH-Wert-Unterschiede des Injektionspfropfs zur restlichen Elektrolytmenge in der Kapillare und der daraus resultierenden Diffusion zurückzuführen ist.

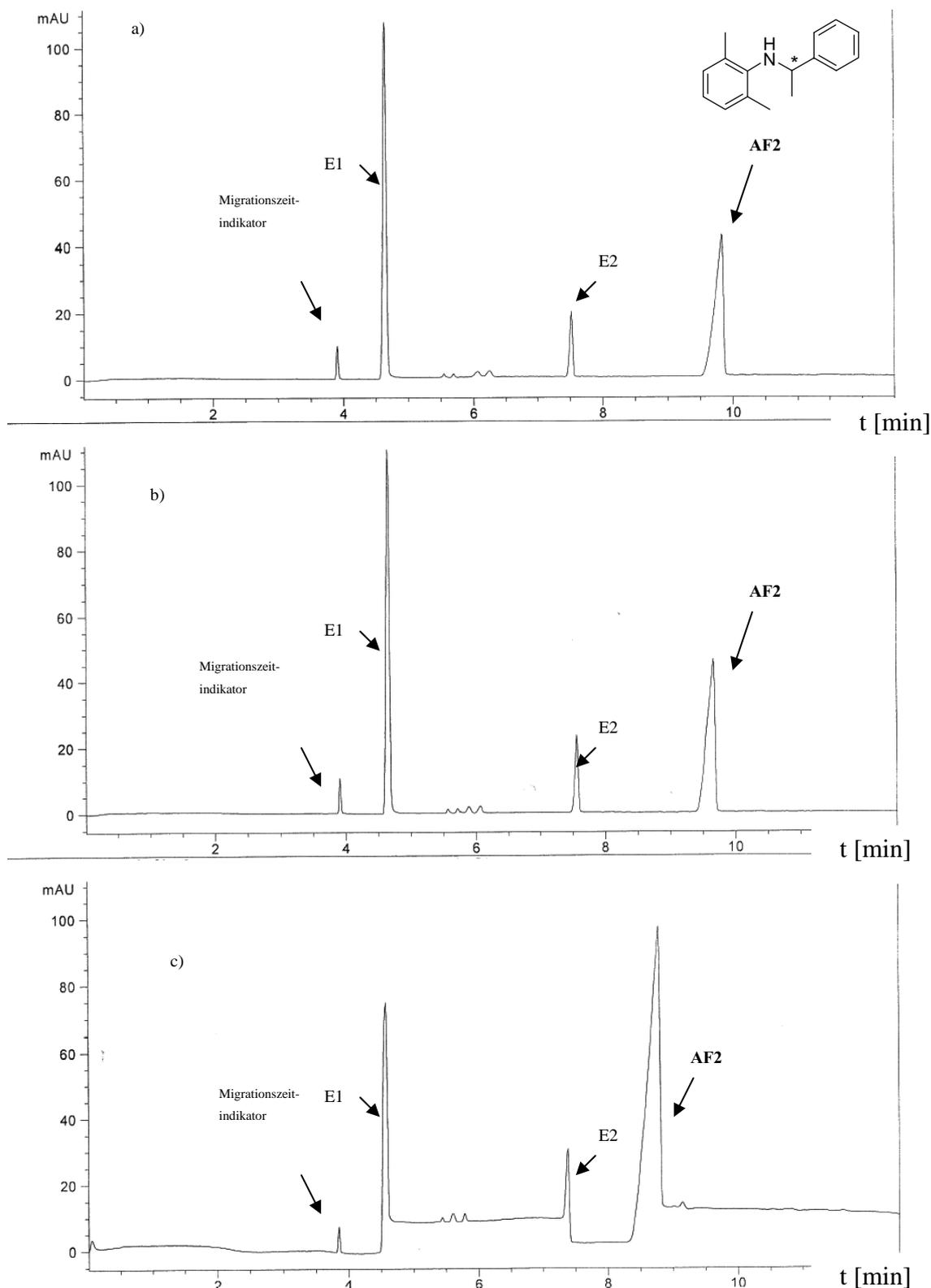
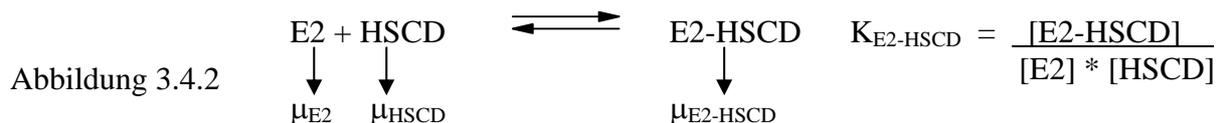
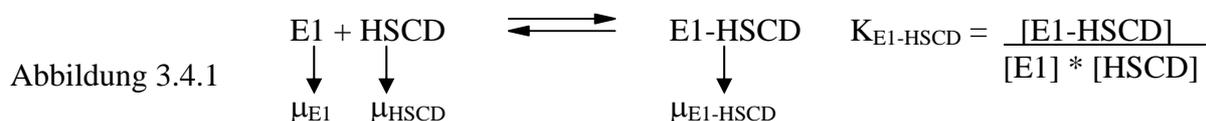


Abbildung 3.3.14: Einfluss des pH-Wertes der Probenlösung auf die Signalteilung. CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin. 5% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -12 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillatemperatur: 15 °C, Inkjektionszeit: 13s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa. Die Substanzen wurden in Methanol und Trennpuffer (Methanolgehalt 60% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). pH anschliessend mit ortho-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> respektive TEA eingestellt (a) pH Probe 1,92, (b) pH Probe 2,50, (c) pH Probe 6,64.

### 3.4. Hypothese der Artefaktbildung

Der Einfluss der verschiedenen Parameter auf die Signalartefaktbildung erlaubte, eine Hypothese zu deren Ursache aufzustellen. Die beiden bekannten Modelle (siehe 1.5.5) werden dabei berücksichtigt und an die hier angewandeten Bedingungen angepasst. Das Modell von Wren und Rowe (Gleichung 8 und Gleichung 9), welches von einer Auftrennung der Enantiomere mit CDs über unterschiedliche Komplexierungskonstanten ausgeht, wird durch die Eigenmobilität der HSCDs im elektrischen Feld erweitert (Abbildung 3.4.1 und Abbildung 3.4.2).



Weiterhin gilt, wie nach Wren und Rowe (1992a) postuliert, dass eine Trennung möglich ist, wenn die Komplexierungsrate zwischen den Enantiomeren (E1/E2) und den HSCDs schneller als die Zeitskala der Trennung in der Kapillare ist und die beiden gebildeten HSCD-Einschlusskomplexe (E1-HSCD/E2-HSCD) unterschiedliche Stabilitätskonstanten besitzen ( $K_{\text{E1-HSCD}} \neq K_{\text{E2-HSCD}}$ ).

Die beiden HSCD-Komplexierungskonstanten  $K_{\text{E1-HSCD}}$  und  $K_{\text{E2-HSCD}}$  sind demnach verschieden gross und kommen im wässrigen, sauren Puffersystem mit basischen Enantiomeren (gros-

---

se elektrostatische Wechselwirkung) stark auf der Seite der Komplexe zum liegen. Durch den nun in der Probelösung enthaltenen grossen organischen Lösungsmittelanteil wird die wässrige, polare Umgebung der HSCDs in der Probelösung unpolarer. Die unpolaren Enantiomere können dadurch verbessert in Lösung gehen, was zur Folge hat, dass das Komplexierungsgleichgewicht sich in Richtung unkomplexierte Enantiomere verschiebt. Die HSCD-Komplexierungskonstanten  $K_{E1-HSCD}$  und  $K_{E2-HSCD}$  werden kleiner.

Diese Reduktion der Komplexierungskonstanten mit nicht derivatisierten CDs unter Zugabe von Methanol wurde erstmals von Penn *et al.* (1994) erwähnt und von Wren und Rowe (1998b) in ihr Modell miteinbezogen. Von Zhou *et al.* (1997; 2003) wurde diese Reduktion der Komplexierungskonstante ebenfalls bei HSCDs mit Ethanol, 2-Propanol und Acetonitril gezeigt.

In Abbildung 3.4.3 ist eine schematische Darstellung des um die HSCD-Eigenmobilität erweiterten Modells wiedergegeben. Es wird von einem CE-Trennsystem mit HSCDs, zwei Enantiomeren E1/E2, einer grossen Menge an organischem Lösungsmittel in der Probelösung/Injektionspfropf und gleichen HSCD-Konzentrationen im Injektionspfropf und Trennpuffer (Probenvorbereitung 3) ausgegangen. In der schematischen Darstellung wird das elektrophoretische Trennsystem in zwei Zonen aufgeteilt:

- In die organische Lösungsmittel-Zone der Probelösung (organische Zone)
- Den restlichen Teil der schematischen Kapillare, die wässrigen Puffer-Zone (wässrige Zone).

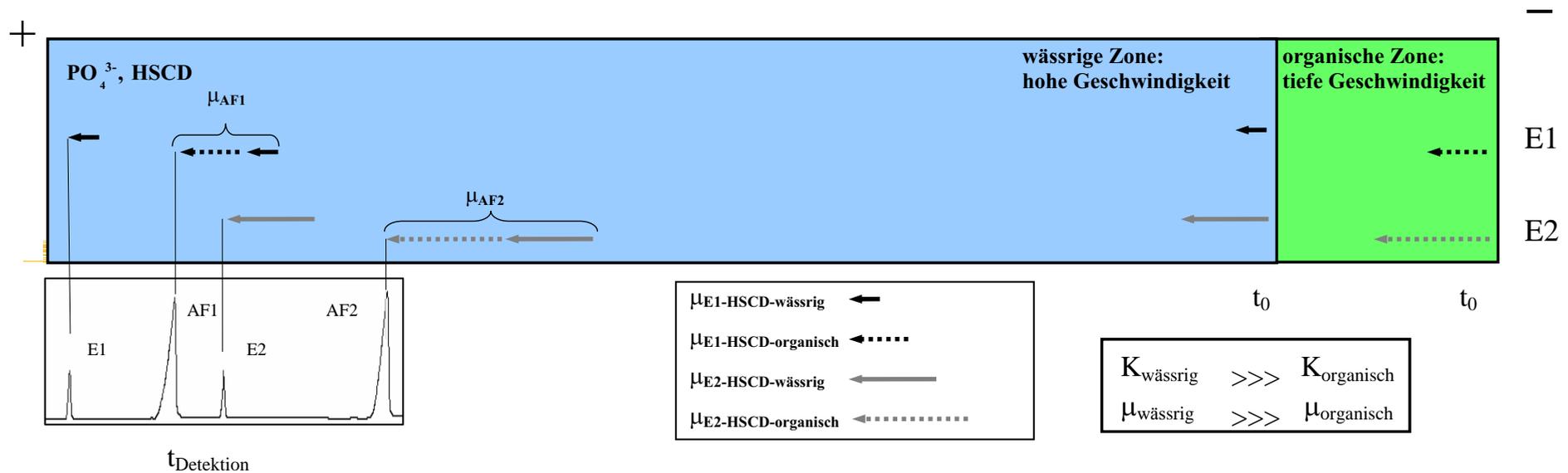


Abbildung 3.4.3: Schematische Illustration des Bildungsprozesses von Artefaktensignalen der CE-Trennung von Enantiomeren bei grossem Gehalt an organischem Lösungsmittel im Probenpfropf (organische Zone). Durch unterschiedliche Komplexierungskonstanten in den beiden Teilabschnitten der Kapillare (Zonen) resultieren unterschiedliche Mobilitäten. Die Pfeile symbolisieren die Mobilitäten der Enantiomere E1 und E2 (langer Pfeil entspricht kleiner Mobilität/Geschwindigkeit/Komplexierungskonstante beziehungsweise kurzer Pfeil entspricht grosser Mobilität/Geschwindigkeit/Komplexierungskonstante).

Enantiomer E1 in der organischen Zone besitzt dabei die geringe Mobilität  $\mu_{E1-HSCD-organisch}$ . Diese vergrössert sich allerdings stark in der wässrigeren Zone zu  $\mu_{E1-HSCD-wässrig}$ . Enantiomer E2 hat in beiden Zonen eine kleinere Mobilität als E1. Die Trennung startet in der organischen Zone, wobei ein geringer Teil an Enantiomeren durch Diffusion bereits in die wässrige Phase transferiert ist. Durch den Übergang von der organischen in die wässrige Zone wird die Mobilität von E1 und E2 vergrössert und am Detektor wird zuerst E1 (kleine Menge mit  $\mu_{E1-HSCD-wässrig}$ ), anschliessend AF1 ( $\mu_{AF1}$  grosse Menge), E2 (kleine Menge mit  $\mu_{E2-HSCD-wässrig}$ ) und danach AF2 ( $\mu_{AF2}$  grosse Menge), detektiert.

In der Probelösung befindet sich eine Mischung aus organischem Lösungsmittel, wässrigem Trennpuffer, HSCDs und den beiden Enantiomeren E1 und E2. Die wässrige Zone ist eine Mischung aus wässrigem Trennpuffer mit HSCDs gleicher Konzentration wie in der Probelösung. Beide Zonen sind während des gesamten elektrophoretischen Trennprozesses stationär, da angenommen wird, dass der elektrosmotische Fluss vernachlässigbar klein ist.

Die HSCD-Komplexierungskonstanten der Enantiomere E1 und E2 sind in der wässrigen Zone grösser als die HSCD-Komplexierungskonstanten in der organischen Zone, was zur Folge hat, dass die Mobilitäten in der wässrigen Zone grösser sind als in der organischen Zone.

$$K_{E1-HSCD-wässrig} > K_{E1-HSCD-organisch} > K_{E2-HSCD-wässrig} > K_{E2-HSCD-organisch}$$

$$\mu_{E1-HSCD-wässrig} > \mu_{E1-HSCD-organisch} > \mu_{E2-HSCD-wässrig} > \mu_{E2-HSCD-organisch}$$

Abbildung 3.4.4: Vergleich der HSCD-Komplexierungskonstanten in wässriger und organischer Zone und der daraus resultierenden Mobilitäten der Enantiomerenkomplexe

E1 in reinem Trennpuffer mit HSCD besitzt die grösste Mobilität ( $\mu_{E1-HSCD-wässrig}$ ), E1 in organischer Umgebung hat eine bedeutend geringere Mobilität ( $\mu_{E1-HSCD-organisch}$ ) und die Mobilitäten von E2 in wässriger und organischer Umgebung fallen noch geringer aus (in Sonderfällen, wenn  $\mu_{E1-HSCD-organisch} = \mu_{E2-HSCD-wässrig}$ , ist sogar ein Überschneiden der Signale möglich).

Jedes Enantiomer bewegt sich somit in jeder Zone mit einer anderen Mobilität. Auf die Abbildung 3.4.3 bezogen heisst dies, dass sich auf der rechten Seite der Pfropf mit der organischen Zone befindet, in welcher die beiden Enantiomere E1 und E2 gelöst respektive teilweise mit HSCD komplexiert sind. Ein geringer Anteil an Enantiomeren wandert allerdings bereits durch Diffusion in die wässrige Zone und bildet dort durch die bedeutend geringere Löslichkeit starke Inklusionskomplexe mit den dort vorhandenen HSCDs. Diese stark komple-

---

xierten Enantiomere besitzen dadurch die hohen Mobilitäten  $\mu_{E1-HSCD-wässrig}$  und  $\mu_{E2-HSCD-wässrig}$  (grauer und schwarzer ausgezogener Pfeil entspricht hoher Geschwindigkeit).

Die grössten Mengen an Enantiomeren befinden sich allerdings immer noch in der organischen Zone und besitzen die Mobilitäten  $\mu_{E1-HSCD-organisch}$  und  $\mu_{E2-HSCD-organisch}$  (grauer und schwarzer gestrichelter Pfeil entspricht niedriger Geschwindigkeit). Im elektrischen Feld bewegen sich die geringen Anteile von E1 und E2, welche sich bereits in der wässrigen Zone befinden, sehr schnell vom Injektionspfropf weg und werden gemäss ihren unterschiedlichen Mobilitäten am Detektor aufgetrennt eintreffen.

Die grosse Menge an E1 und E2 im Injektionspfropf hingegen bewegt sich bedeutend langsamer im elektrischen Feld Richtung Detektor. In der organischen Zone tritt ebenfalls wie in der wässrigen Zone eine Auftrennung der beiden Enantiomere E1 und E2 durch ihren Mobilitätsunterschied auf. Beim Übertritt der getrennten Enantiomere von der organischen in die wässrige Zone vergrössern sich die Mobilitäten stark (grauer und schwarzer Pfeil sind ausgezogen gedruckt) und eine weitere Auftrennung erfolgt bis zur Detektion. E1 besitzt nun eine sehr hohe Mobilität und kann deshalb auch den kleinen Anteil E2, der in der wässrigen Zone gestartet ist, „überholen“ und früher am Detektor eintreffen.

Durch die quasi zwei Startpunkte vor und im Pfpfropf sowie der auf den Mobilitätsdifferenzen beruhenden kontinuierlichen Trennung, registriert man schlussendlich am Detektor vier einzelne Signale unterschiedlicher Intensität und Mobilität. Dabei wird das Signal AF1 vor dem Signal E2, oder wie in Abbildung 3.4.3, bei genügend grosser Trennstrecke sogar nach E2 auftreten.

Das Migrationszeitenmodell von Chankvetadze *et al.* (2004), welches auf den unterschiedlichen Migrationszeiten der Diastereomerenkomplexe aufbaut, kann auch für die Betrachtung der beiden Zonen zugezogen werden. Die Parameter, welche die Mobilitäten der Enantiomere beziehungsweise Enantiomerenkomplexe in den beiden Zonen beeinflussen, sind die Viskosität und der Radius. Die Viskositätsunterschiede in den beiden Zonen sind allerdings nicht die Ursache der Artefaktsignale, da bei der Selektivitätsbetrachtung von  $\delta_m$  in Gleichung 10 die Viskosität eliminiert ist. Der Radius des hydratisierten Moleküls respektive Komplexes wird nicht exakt gleich gross sein, jedoch wohl nicht einen genügend grossen Einfluss ausüben, um diese Signalteilung hervorzurufen. Deshalb wird in der weiteren Analyse dem Migrationszeitenmodell von Chankvetadze *et al.* (2004) nicht weiter Beachtung geschenkt.

### **3.5. Diskussion der Artefaktbildung anhand des Komplexbildungskonstantenmodells**

#### **3.5.1 Einfluss der Pfropfenlänge**

Durch eine Vergrösserung der Pfropfen- respektive Injektionslänge wird die Migrationsstrecke der Enantiomere E1 und E2 in der organischen Zone länger und der „Vorsprung“ auf die bereits in der wässrigen Zone migrierenden Enantiomere grösser. Der Aufteileffekt wird in Abbildung 3.3.3 (siehe Kapitel 3.3.2) klar sichtbar. Im Beispiel a) mit einer Sekunde Injektionszeit findet keine Aufteilung der Enantiomere E1/E2 von deren AF1/AF2 statt, da die Propfenlänge nicht genügend gross ist. Die Injektionslänge beträgt, bezogen auf die 39,5 cm lange Kapillare, nur 0,2% der effektiven Kapillarlänge, das heisst 0,6 mm. Sie liegt somit in

einem Bereich, in dem die Diffusion den Methanolgehalt in der Probe so stark erniedrigt, dass keine genügend grosse Reduktion der Komplexierungskonstanten auftritt. Alternativ ist bei dieser effektiven Kapillarlänge die Trennstrecke zu klein, um die Migrationszeitenunterschiede zu detektieren und somit den Aufteilungseffekt zu sehen.

Die Vergrößerung der Injektionszeit in b) und c) von Abbildung 3.3.3 und der entsprechend grösseren Menge an Enantiomer zeigt im Einklang mit dem postulierten Artefaktbildungsmodell vergrösserte Signalfächen von AF1 und AF2 und beinahe gleichbleibende Signalfächen von E1 und E2. In Abbildung 3.3.7 ist dieser konstante Diffusionsanteil von E1 und E2 über einen Injektionsbereich von 13 s bis 26 s ebenfalls sichtbar.

Der Grund für das frühere Aufteilen des später migrierenden AF2-Signals, wie in Abbildung 3.3.4 bei b) und c) sichtbar, liegt darin, dass AF2 durch die kleinere Komplexierungskonstante gegenüber AF1 langsamer migriert und somit länger braucht, die organische Zone zu verlassen. Dadurch ist AF2 länger der Verminderung der Komplexierungskonstante ausgesetzt als AF1. Ausserdem ist bei b) sichtbar, dass die Injektionsmenge respektive der Probenpfropf für AF1 genügend klein ist, so dass die Diffusionszone ausreicht, um AF1 nicht auszubilden.

### 3.5.2 Einfluss des organischen Lösungsmittels

Das organische Lösungsmittel in der Probelösung beeinflusst durch seine Polarität respektive Löslichkeit die Trennung und somit auch die Artefaktbildung. Durch die Hydrophobizitätszunahme im Probenpfropf wird die Komplexierungskonstante zwischen Modellsubstanz und HSCD stark vermindert. Die untersuchten wassermischbaren Lösungsmittel (Methanol, Ethanol, Acetonitril, Dimethylsulfoxid) besitzen einen relativ kleinen Polaritätsunterschied zu Wasser. Ein sehr unpolares Lösungsmittel hingegen wäre nicht mit Wasser mischbar. Deshalb

---

ist eine Einteilung der Signalteilungsstärke nur im beschränkten Rahmen möglich. Des Weiteren wirkt auch die Löslichkeit der jeweiligen Modellsubstanz im organischen Lösungsmittel auf den Signalteilungseffekt ein. Allerdings nicht immer im gleichen Umfang oder Stärke wie dies bei der Polaritätsreduktion der Fall ist. Insgesamt zeigen Ethanol und Acetonitril eine gegenüber Methanol oder Dimethylsulfoxid erhöhte Tendenz schon bei geringen Konzentrationen eine Artefaktbildung hervorzurufen.

In dieser Lösungsmittelbetrachtung muss ein weiterer nicht vernachlässigbarer Einflussfaktor berücksichtigt werden: die Viskosität. Sie ist wohl der Grund dafür, dass in Abbildung 3.3.6 die sichtbare Mobilität von AF2 bei der Probenkonzentration von 50% und 60% ACN nicht mehr weiter ab- sondern zunimmt. Diese Mobilitätssteigerung beruht auf der Abnahme der Viskosität der Acetonitril-Puffer-Mischung in der organischen Zone im Vergleich zur Viskosität des reinen Puffers in der wässrigen Zone. Mischungen von Acetonitril und Wasser zeigen gegenüber Wasser eine Reduktion der Viskosität ab einer Konzentration von 40% bis zu 100% (v/v) (siehe Abbildung 3.5.1).

Auch in Abbildung 3.3.5 kann eine solche Viskositätsabhängigkeit festgestellt werden, da jedoch mit MeOH und einer Mobilitätszunahme (siehe MeOH-Gehalt von 50% und 60% bei c) und d) am Signal AF2). Denn Methanol-Wasser-Mischungen zeigen gegenüber ACN nicht eine Reduktion, sondern eine Erhöhung der Viskosität. Diese Viskositätszunahme hat ihr Maximum bei ca. 45% (v/v) (siehe Abbildung 3.5.1). Somit kann geschlossen werden, dass die Mobilität von AF2 in Abbildung 3.3.5 größer sein müsste.

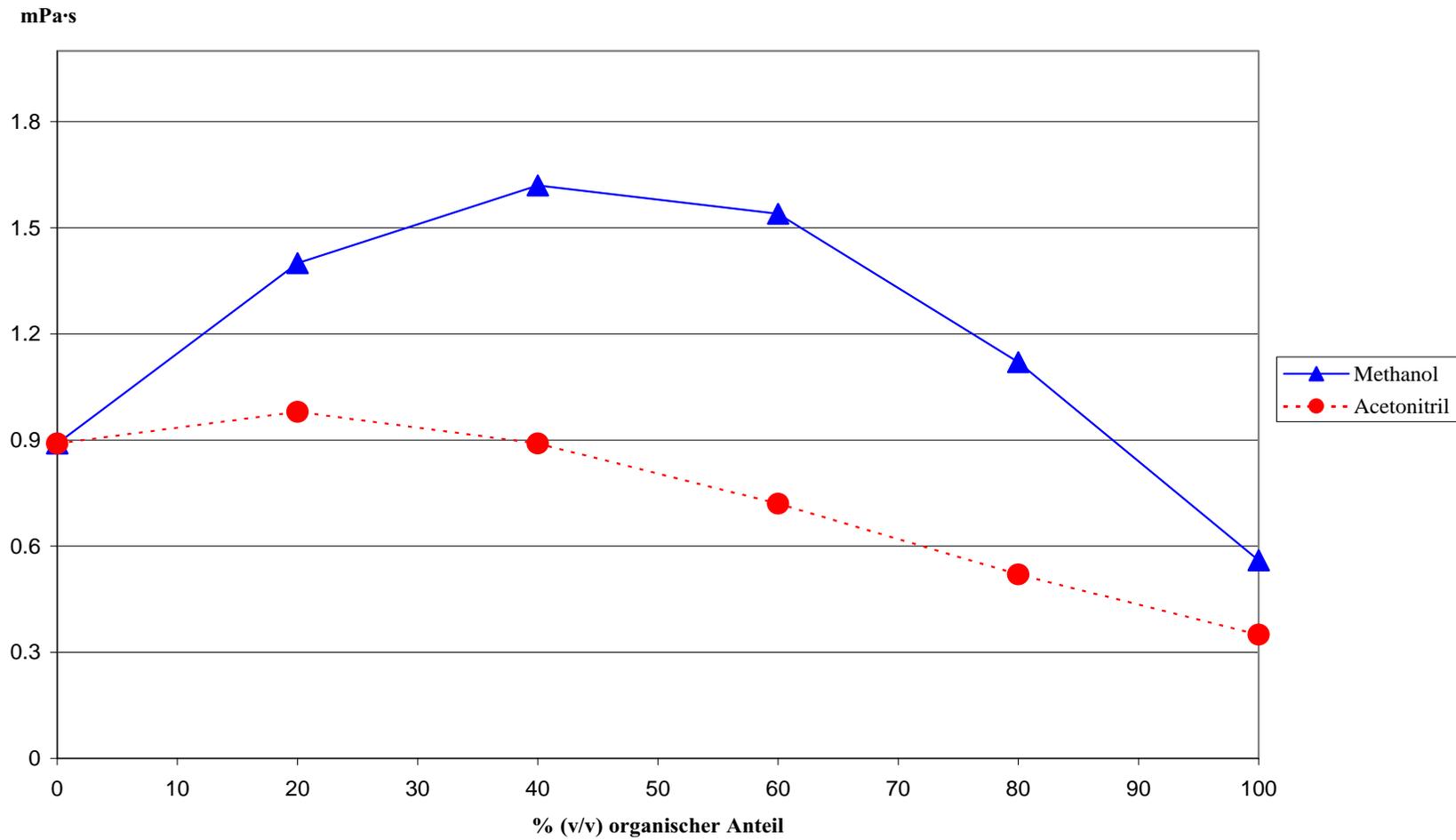


Abbildung 3.5.1: Viskositätsverlauf von Acetonitril- und MeOH-Mischungen mit Wasser (Viskosität von Wasser bei 25 °C: 0,9mPa·s) [Dolan und Snyder, 1989].

### 3.5.3 Einfluss der Konzentration des organischen Lösungsmittels

Der Signalteilungseffekt ist abhängig von der Konzentration des organischen Lösungsmittels in der Probenlösung. Zur Artefaktbildung benötigt es eine Minimalkonzentration an organischem Lösungsmittel in der Probelösung. Diese liegt, je nach Art des organischen Lösungsmittels bei 20% bis 40% (v/v). Allerdings kann angenommen werden, dass diese Minimalkonzentration auch kleiner sein kann, wenn Modellsubstanzen geringerer Löslichkeit oder höherer Konzentration sowie organische Lösungsmittel tieferer Polarität und höhere HSCD-Konzentrationen verwendet werden. Weiterhin könnte die Minimalkonzentration durch elektrophoretische und gerätetechnische Parameter auch noch verringert werden.

### 3.5.4 Einfluss der Kapillartemperatur

Mit dem postulierten Modell der Artefaktbildung anhand des Komplexierungskonstantenmodells kann das in Abbildung 3.3.12 beobachtete Verhalten wie folgt erklärt werden: Bei der Erhöhung von 15 °C auf 30 °C nimmt die Viskosität des rein wässrigen Elektrolyten ab (siehe Abbildung 3.5.2). Die Viskosität des mit Methanol versetzten Probenkopf hingegen reduziert sich weniger stark. Diese unterschiedliche Viskositätsabnahme wirkt sich auf die Mobilitäten der Modellsubstanzen aus. Die Mobilitäten vom Migrationszeit-Indikator, Enantiomer E1 und E2 werden jeweils grösser und deren Migrationszeit wird stark verkürzt. Für die Signale AF1 und besonders AF2, welche sich lange im Methanol-Propf aufhalten, ist diese Erhöhung der Migrationszeit bedeutend geringer.

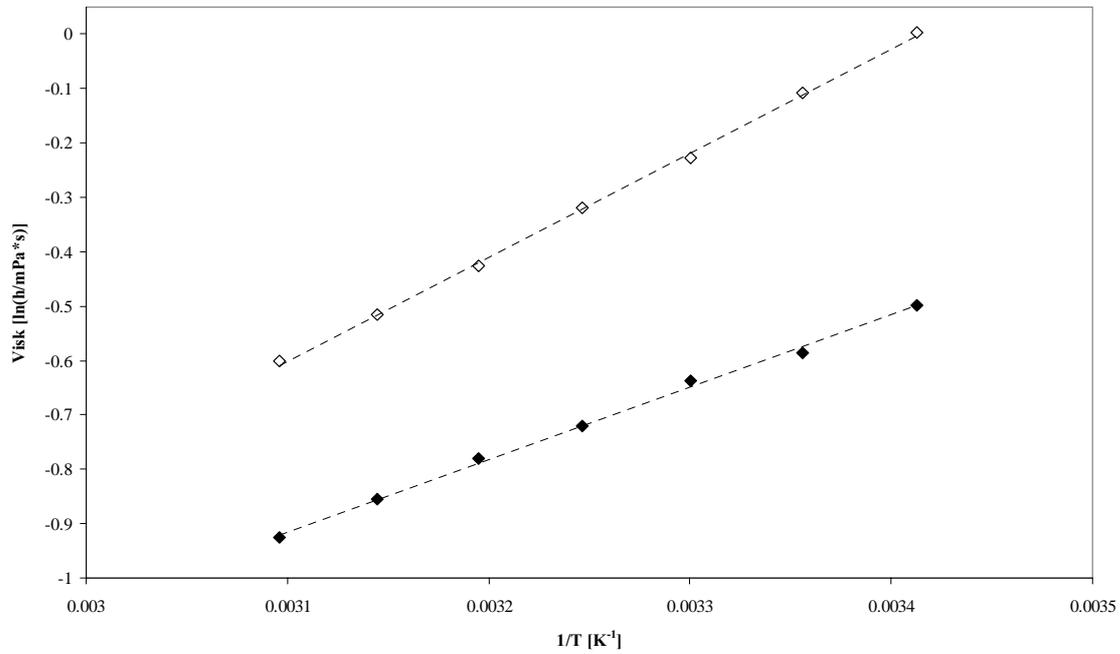


Abbildung 3.5.2: Dynamischer Viskositätsverlauf ( $\ln \eta$ ) von Wasser (◇) und Methanol (◆) in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 50 °C ( $1/T$ ) [PHYWE, 2006].

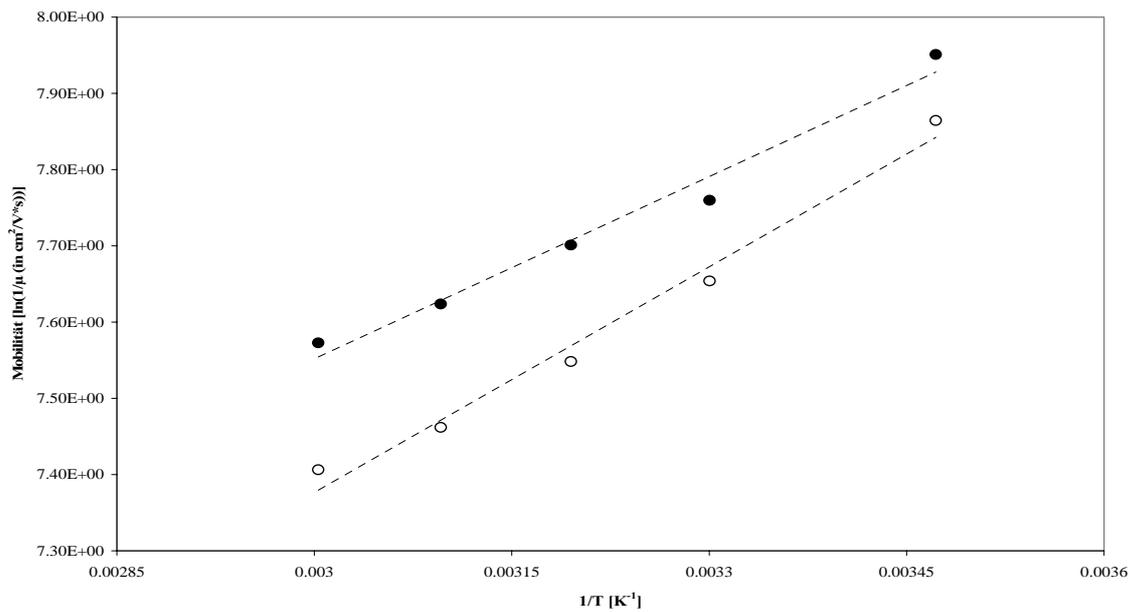


Abbildung 3.5.3: Logarithmischer Mobilitätsverlauf ( $\ln(1/\mu)$ ) von E1 (○) und AF1 (●) in einem Temperaturbereich von 15 °C bis 60 °C ( $1/T$ )

Da sich die Mobilität  $\mu$  zur Viskosität gemäss Gleichung 7 reziprok proportional verhält, ist in Abbildung 3.5.3 der Kehrwert der Temperaturerhöhung gegen den Logarithmus des Kehrwerts der Mobilitäten von E1 und AF1 aufgetragen. Dabei wird der vorher postulierte Trend der verminderten Abnahme (kleinere Steigung) von AF1 gegenüber E1 sichtbar. In Abbildung 3.3.12 kann ein ähnliches Abnahmeverhalten bei AF2 beobachtet werden. Dort nimmt die Migrationszeit bei 60 °C Kapillartemperatur im Vergleich zu der Messung bei 30 °C Kapillartemperatur sogar ein wenig zu. Dies kann durch die erhöhte Diffusion des Lösungsmittelpfropfs und der dabei vergrösserten Pfropflänge kombiniert mit dem Viskositätsabfallunterschied erklärt werden.

### 3.5.5 Einfluss der Löslichkeit und Basizität der Modellsubstanz

Auch die Basizitäts- und Löslichkeitsphänomene können mit dem Artefaktbildungsmodell erklärt werden. Das Enantiomerenpaar (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin in Abbildung 3.3.13 (b) zeigt eine intensive Auftrennung der Artefaktssignale von den Enantiomerensignalen. Diese besonders starke Auftrennung kommt zu Stande, weil bei einem pH-Wert von 2,5 die beiden Enantiomere ( $pK_b = 10,2$ ) protoniert und somit positiv geladen sind. Dies ermöglicht zwar eine grosse elektrostatische Wechselwirkung mit den negativ geladenen HSCDs, bewegt aber die unkomplexierten Moleküle in die entgegengesetzte Richtung als die HSCDs (Richtung Detektor). Deswegen durchqueren die Moleküle den Lösungsmittelpfropf nur sehr langsam und bleiben somit länger dem Einfluss der organischen Zone ausgesetzt. Dies zeigt Abbildung 3.3.13 (a) für das Enantiomerenpaar (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure, welches bei dem pH-Wert des Elektrolyten nicht protoniert ist. Die Aufspaltung ist deswegen sehr viel kleiner und nur bei genügend grosser Injektionspfropflänge sichtbar.

---

Die Basizität der Modellsubstanz erklärt auch, weshalb das hintere Signal AF2 immer als Erstes nach kürzerer Zeit erscheint/aufgesplittet wird (siehe Abbildung 3.3.5). Gemäss dem Artefaktbildungsmodell diffundieren zu Beginn der Trennung die Enantiomere E1 und E2 in die wässrigen Zone (Elektrolyt) und werden von dort über die restliche Trennstrecke aufgetrennt. Das Signal AF1, welches in der organischen Zone vermindert voran kommt, wird bei genügend kurzer Pfropfenlänge oder bei tiefer organischer Lösungsmittelkonzentration gemeinsam mit E1 am Detektor ankommen, weil durch die hohe Basizität und der dadurch hohen entgegengerichteten Ladung eine starke elektrostatische Wechselwirkung mit den HSCDs stattfindet. Folglich kann nur ein sehr geringer Anteil in unkomplexierter Form als AF1 auftreten und deswegen ist bei geringer Lösungsmittelkonzentration oder kurzer Propfenlänge E1 verbreitert oder AF1 nur sehr schwach sichtbar.

AF2 hingegen bildet wie AF1 durch seine positive Ladung mit dem HSCD einen starken elektrostatischen Komplex, wobei dieser in der organischen Zone bedeutend schwächer ist. Dies hat zur Folge, dass das Enantiomer E2 grösstenteils unkomplexiert in AF2 vorliegt und dabei in die „verkehrte“ Richtung migriert. Dabei wird der Aufenthalt in der organischen Zone, in welcher die Komplexierungswechselwirkung verringert ist, noch vergrössert, was schlussendlich eine Verstärkung der Aufteilung der Signale auch schon bei sehr kleinen Injektionszeiten und Lösungsmittelkonzentrationen zur Folge hat.

Eine hohe Basizität der verwendeten Modellsubstanz resultiert in einer geringen Löslichkeit (siehe Tabelle 5). Dies ist für die Basen mit aromatischem System typisch, in welchem die Mesomerie durch die Protonierung beeinflusst wird und somit eine Reduktion der Löslichkeit mit sich bringt. Wie stark die Löslichkeit der Modellsubstanz zur Artefaktbildung beiträgt, konnte mit den verwendeten Modellsubstanzen nicht abgeklärt werden. Die  $\log K_{ow}$  Werte der Löslichkeit wurden zudem für neutrale Oktanol/Wasser-Systeme ermittelt. Somit

---

sollten entweder die Messungen bei neutralem pH-Wert durchgeführt oder die  $\log K_{OW}$  Werte auf den pH-Wert von 2,5 berechnet werden, um den Einfluss der Löslichkeit auf die Artefaktbildung abklären zu können.

### 3.6. Standard CE-System

Durch Lösen der Modellsubstanzen in DMSO und den Elektrolyten 1 oder 2 (je 5% (w/v) HS-CD, DMSO-Gehalt 10% (v/v) und Probenvorbereitung 2) konnten alle Modellsubstanzen in die Enantiomere aufgetrennt und auch von ihren Edukten getrennt werden (siehe Abbildung 3.2.2, Abbildung 3.2.3, Abbildung 3.6.1 und Abbildung 3.6.2). Zudem ist keine vorhergehende Derivatisierung mehr notwendig.

In Tabelle 7 sind die Migrationszeiten und die Auflösung  $R_s$  für alle Edukte und Enantiomerenpaare aufgelistet. Wie in Tabelle 7 sichtbar ist, können bei einigen Modellsubstanzen mit HS-CDs von Beckman Coulter bessere Trennungen (zum Beispiel (RS)-2,6-Dimethyl-phenyl-(1-phenylethyl)-amin) und kürzere Trennzeiten als unter Verwendung von SsCDs, sCDs von Antek oder Aldrich erzielt werden. Bei den Modellsubstanzen (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure und (RS)-Benzyl-(1-phenylethyl)-amin sind die SsCDs von Antek allerdings bezüglich Auflösung und Trennzeiten besser. Kein HSCD-Typ ist daher für die Trennung aller Modellsubstanzen optimal. Wie bereits Phinney *et al.* (2002) erwähnte, haben der Grad und die Position des Sulfatsubstituenten einen grossen Einfluss auf den chiralen Erkennungsprozess.

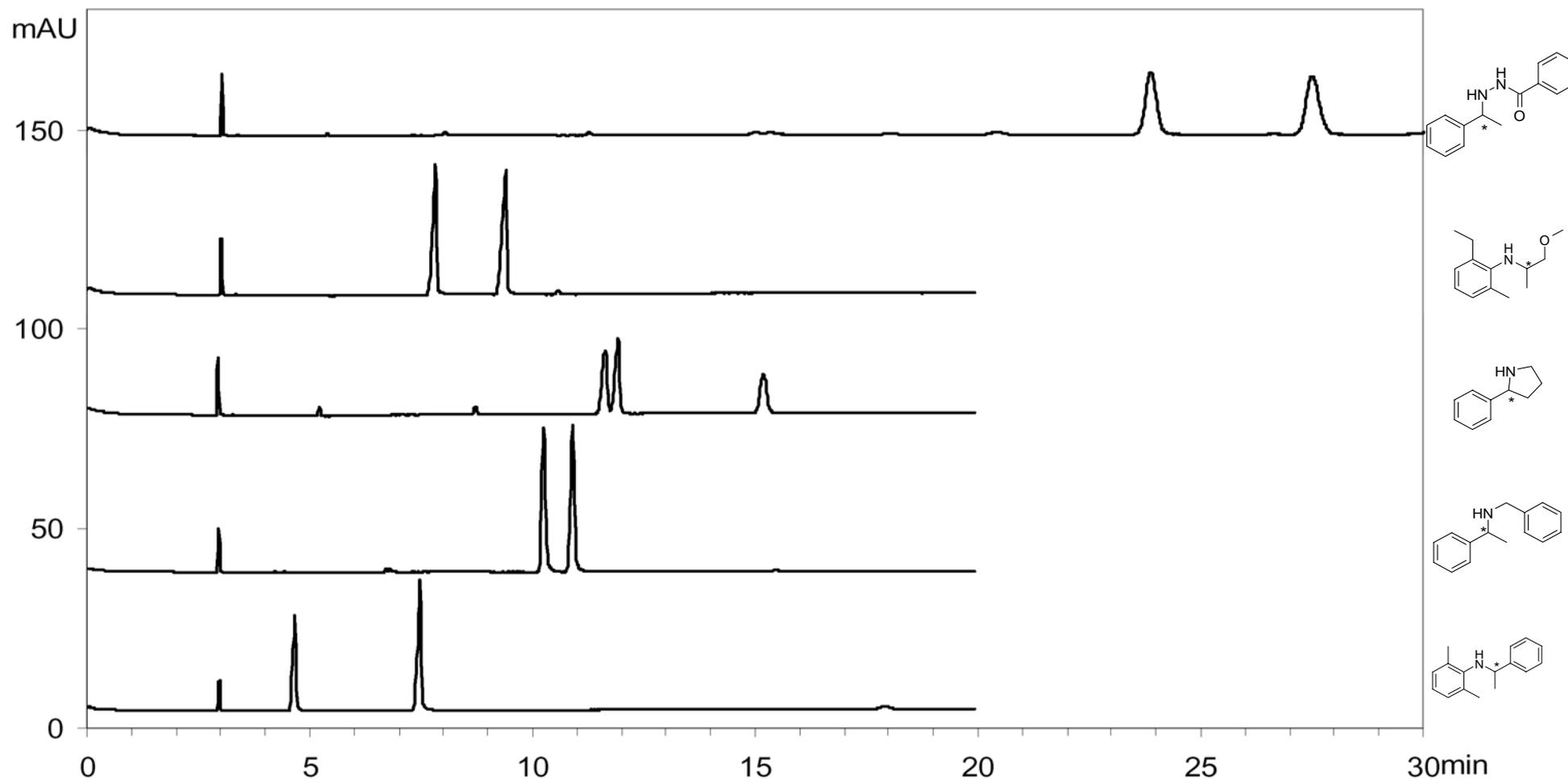


Abbildung 3.6.1: CE-Trennung aller nicht wasserlöslichen Modellsubstanzen mit einem  $\log K_{OW}$  von 3-4 (siehe Tabelle 5). HS- $\gamma$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter (Elektrolyt 1) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid und Trennpuffer (Dimethylsulfoxidgehalt 5% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa.

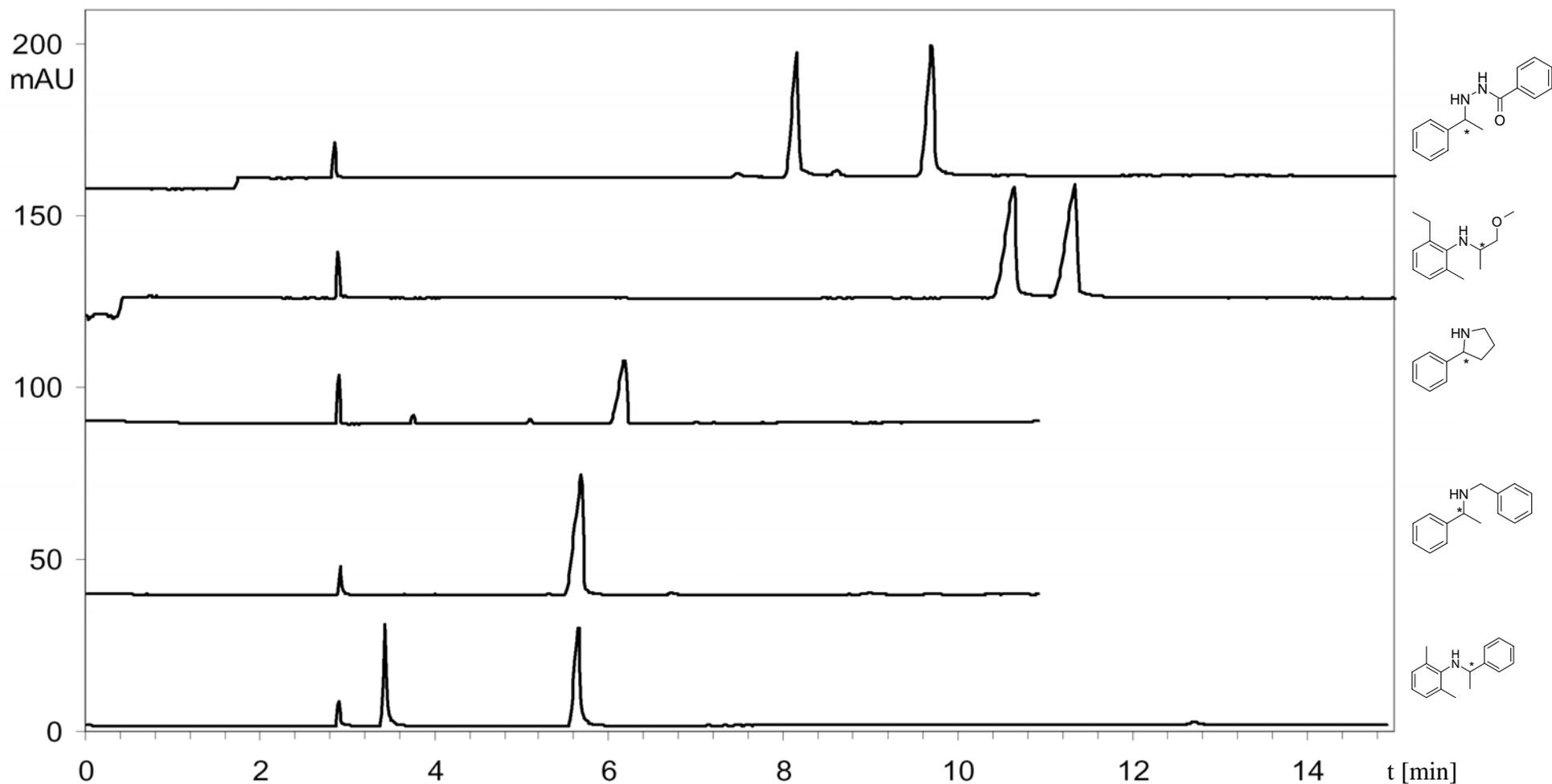


Abbildung 3.6.2: CE-Trennung aller nicht wasserlöslichen Modellsubstanzen mit einem  $\log K_{OW}$  von 3-4 (siehe Tabelle 5). HS- $\beta$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid und Trennpuffer (Dimethylsulfoxidgehalt 5% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s (% der Kapillarlänge siehe 2.2.2), Injektionsdruck: 1 kPa.

Gleichwohl können daraus keine Voraussagen zur Trennung getroffen werden, was zur Folge hat, dass bei fast identischen Verbindungen und chiralen Selektoren unterschiedliche elektrophoretische Ergebnisse resultieren können. Die beiden Elektrolyte 1 oder 2 (je 5% (w/v) HS-CD konnten ohne zusätzliche Spülschritte oder Kapillarwechsel hintereinander eingesetzt werden.

Mit dem Elektrolyten 1, HS- $\gamma$ -CD 5% (w/v) von Beckman Coulter, den Standardbedingungen und dem Enantiomerenpaar (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin konnte eine Wiederholbarkeit über 25 Trennungen bei der Standardabweichung der Mobilität  $\mu_{E1}$  von 0,2% beziehungsweise 0,6 % für  $\mu_{E2}$  erzielt werden (Standardabweichung für n=25). Die Präzision lag für die Signalflächen bei 3,8%. Aus den in Abbildung 3.6.3 dargestellten Elektropherogrammen kann eine Nachweisgrenze (LOD) von 0,2% abgeleitet werden.

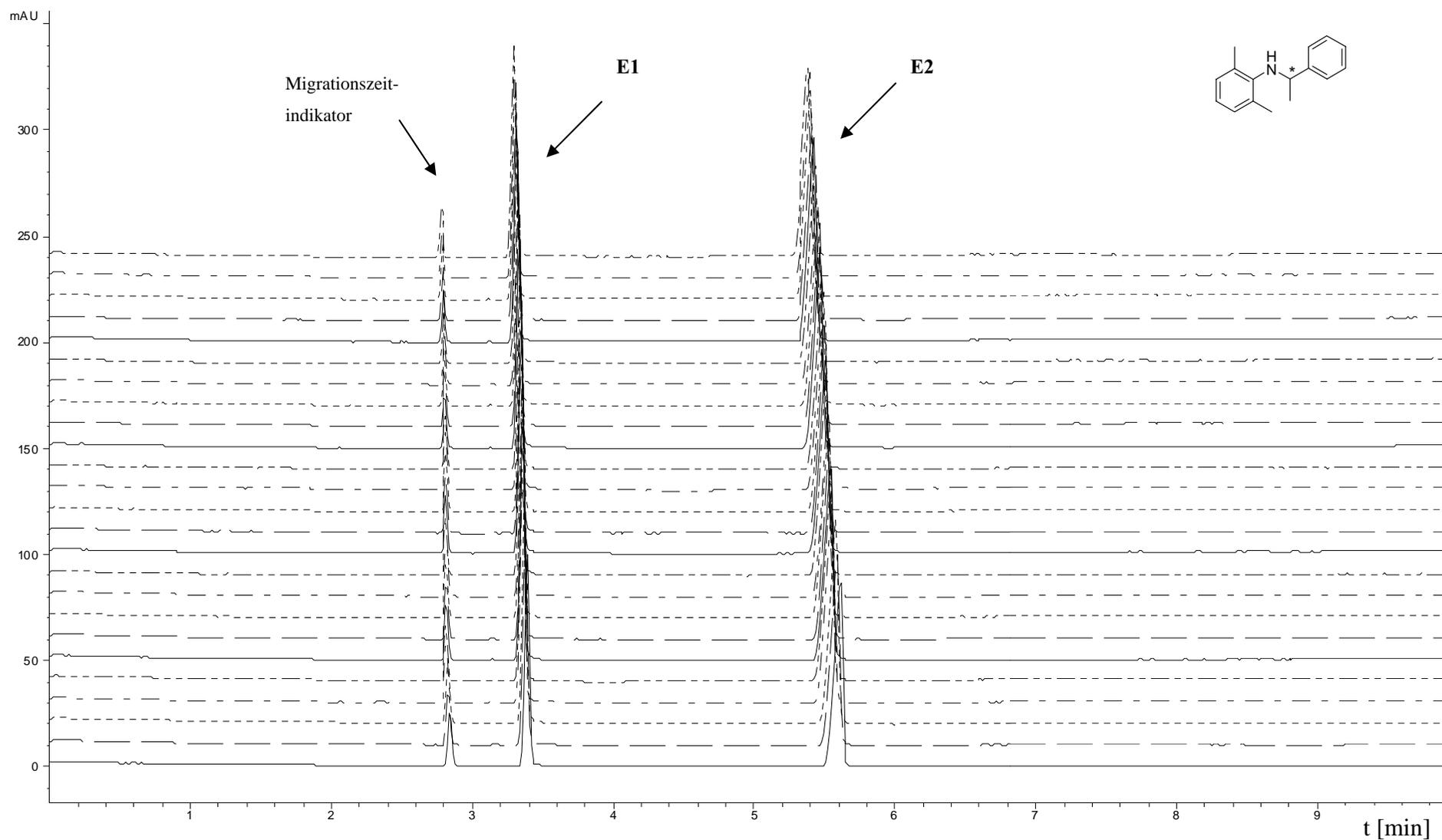


Abbildung 3.6.3: Wiederholbarkeit der CE-Standardmethode. 25 CE-Trennungen eines Enantiomerenpaares von (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin mit 5% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2). Trennbedingungen siehe Abbildung 3.6.2.

### 3.7. Hochdurchsatzmethoden (*high throughput*)

In der Zielsetzung wurde auch eine Entwicklung von „*high throughput*“ Techniken erwähnt. Zwei mögliche Techniken, die „*Short End*“- und die „*Multirun*“-Technik, wurden genauer untersucht.

#### 3.7.1 Short End Technik

Bei der „*Short End*“-Injektions-Technik [Perrin, 2003; Perrin, 2001] wird die enorm hohe Trennstufenzahl der CE ausgenutzt. Oftmals ist die Auflösung einer Enantiomerentrennung viel zu gut. Erst eine Reduktion der Trennstrecke beziehungsweise Kapillarlänge würde ein Optimum zwischen benötigter Auflösung und minimaler Migrationszeit ergeben. Da aber gerätebedingt die minimalen, effektiven Kapillarlängen (Injektor – Detektor) oft sehr lang sind (ABI ca. 20 cm, Beckman 2000/5010 ca. 17 cm, Beckman MDQ ca. 20 cm, Agilent HP<sup>3D</sup>-CE ca. 25 cm), wird eine spezielle Injektionstechnik angewendet. Dabei wird die Probe an dem Ende der Kapillare injiziert, welche dem Detektionsfenster am nächsten ist (deshalb „*Short End*“, siehe Abbildung 3.7.1). Durch die signifikante Kapillarlängenverkürzung kann somit die Migrationszeit der Substanzen reduziert werden.

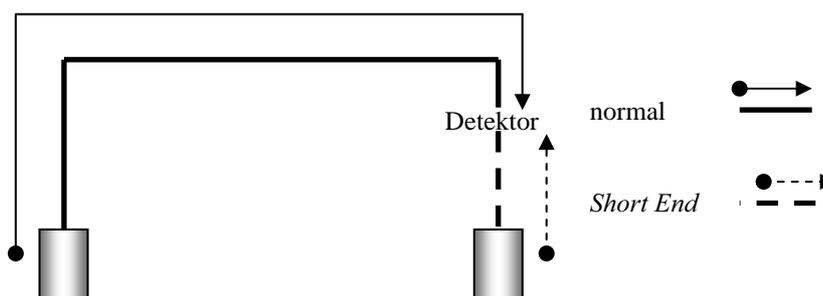


Abbildung 3.7.1: Vergleich von Normal- zu „*Short End*“-Injektion.

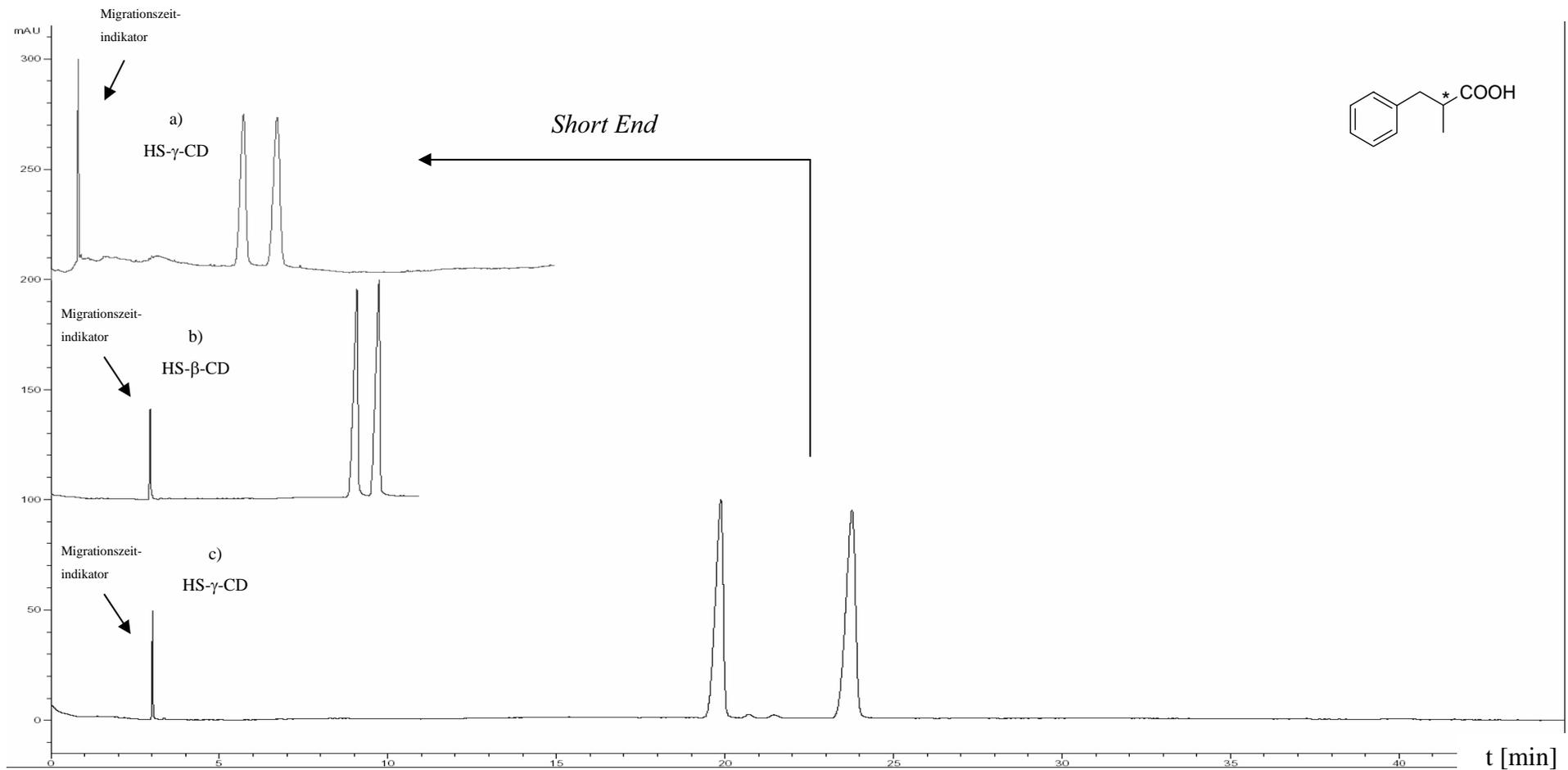


Abbildung 3.7.2: CE-Trennung eines Enantiomerenpaares von (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure. In a) und c) wurden 5% (w/v) HS- $\gamma$ -CD und in b) 5% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden jeweils in Dimethylsulfoxid und Trennpuffer (Dimethylsulfoxidgehalt 10% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s. In a) +15 kV und Injektionsdruck/vakuum: -1 kPa (*Short End*). In b) und c) -15 kV und Injektionsdruck: +1 kPa.

Diese Injektionsmethode funktioniert aber nicht auf allen Geräten, weshalb sie hier nur auf dem Agilent HP<sup>3D</sup>-CE am Beispiel des Enantiomerenpaares (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure aufgezeigt wird. In Abbildung 3.7.2 (c) sieht man, dass die Auflösung  $R_s$  von 20 viel zu gross ist und eine Reduktion der Trennstrecke beziehungsweise Kapillarlänge für eine optimale Trennzeit nötig wäre. In (b) wäre die Migrationszeit zwar fast um die Hälfte kürzer als in (c), aber die Auflösung lässt keine Reduktion der Kapillarlänge mehr zu.

Auf (c) angewandt liefert die „Short End“-Injektions-Technik die Trennung, die in (a) (siehe Abbildung 3.7.2) gezeigt wird. Es wird statt 13 s Injektionszeit bei +1 kPa Injektionsdruck auf der Injektionsseite und -15 kV Trennungsspannung, nun das Probeglässchen an der Detektorseite angelegt, für 13 s bei -1 kPa injiziert und mit +15 kV separiert. Die Auflösung sinkt dabei zwar stark, ist aber noch genügend gross, um eine eindeutige Trennung der beiden Enantiomere durchführen zu können. Die Trennzeiterparnis liegt in diesem Beispiel bei einem Faktor von ca. 3.5.

### 3.7.2 Multirun

Bei der *Multirun*-Technik wird sowohl die sehr hohe Selektivität der enantioselektiven CE als auch die sehr hohe totale Anzahl von Trennstufen ausgenutzt. Dadurch ist es möglich, mit ausgewählten Mischungen von Modellsubstanzen unterschiedlicher Mobilität eine Trennung aller Komponenten in einem einzigen Elektropherogramm zu erzielen. Ein Beispiel ist in Abbildung 3.7.3 wiedergegeben, wobei eine Mischung der Enantiomerenpaare (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure, (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin, (RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropionsäure und (RS)-3-Methyl-2-phenylbutansäure mit HS-CDs in alle Komponenten aufgetrennt wurde.

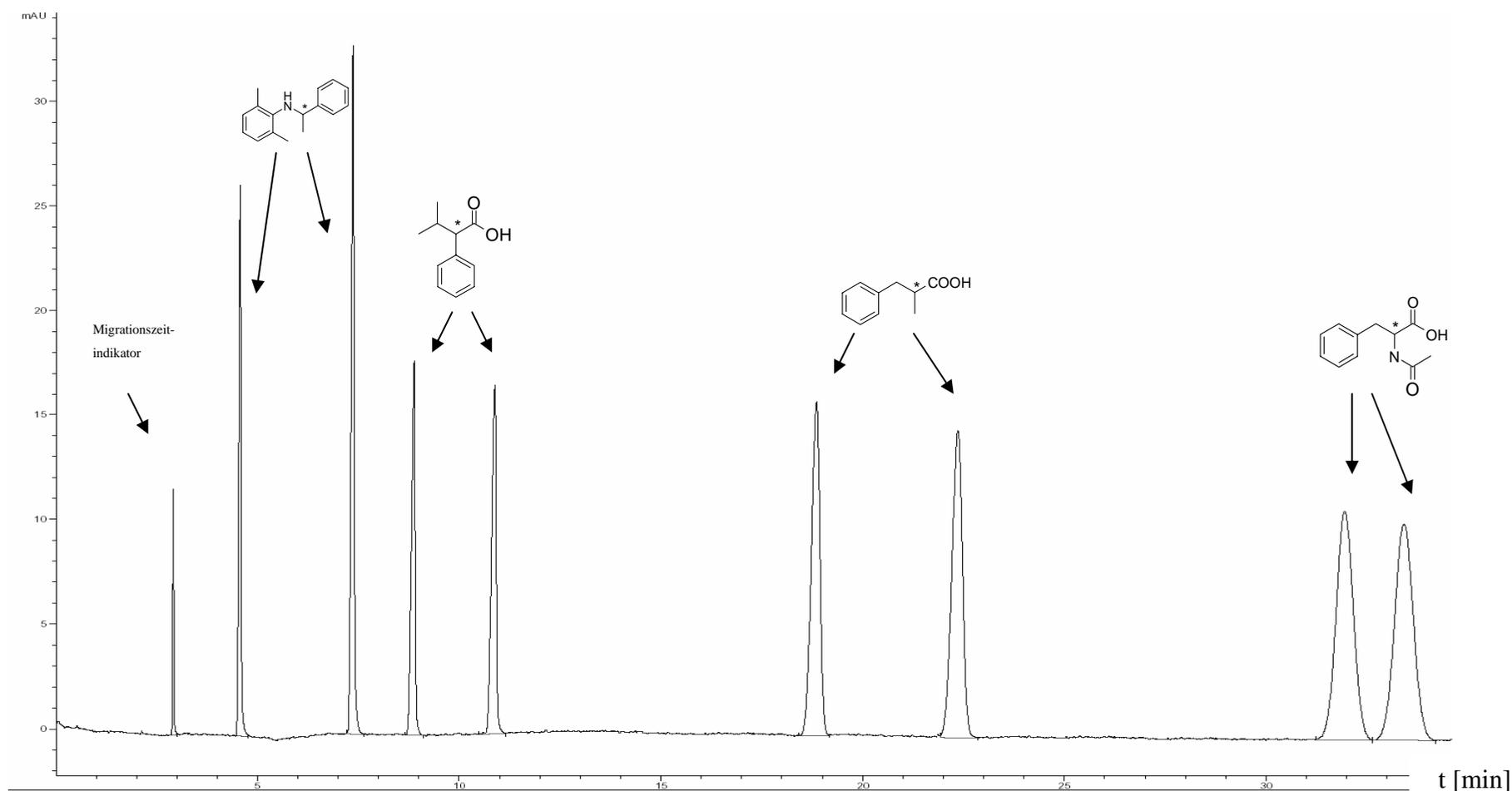


Abbildung 3.7.3: CE-Trennung eine Mischung folgender Enantiomerenpaare: (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin, (RS)-3-Methyl-2-phenylbutansäure, (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure, (RS)-2-Acetylamino-3-phenylpropionsäure. 5% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter (Elektrolyt 2) wurde als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid und Trennpuffer (Dimethylsulfoxidgehalt 10% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39.5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s, Injektionsdruck: 1 kPa.

---

### 3.8. Vergleich HSCDs von Beckman Coulter mit Aldrich anhand der Multiruntechnik

In Abbildung 3.8.1 wurden die Enantiomerenpaare (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin, (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure und (RS)-Hydroxyphenyl-essigsäuremethylester mit HSCDs von Beckman Coulter aufgetrennt (b). Die Auftrennung der gleichen Enantiomerenpaare mit sCDs von Aldrich (a) zeigt keine Veränderung der Auflösung  $R_s$ . Im Vergleich der Migrationszeiten der getrennten Enantiomere zeigt sich allerdings eine Erhöhung bei der Verwendung von Aldrich sCDs als chiraler Selektor im Gegensatz zu den HSCDs von Beckman Coulter. Zudem ist das Basislinienrauschen mit sCDs von Aldrich um einiges höher. Dies ist wahrscheinlich auf den niedrigeren Sulfatierungsgrad und die nicht so hohe Reinheit der sCDs von Aldrich zurückzuführen. Auch Verleysen *et al.* (1998b) zeigte, dass bei Trennsystemem mit sCDs von Aldrich erhöhte Migrationszeiten und verstärktes Rauschen auftreten.

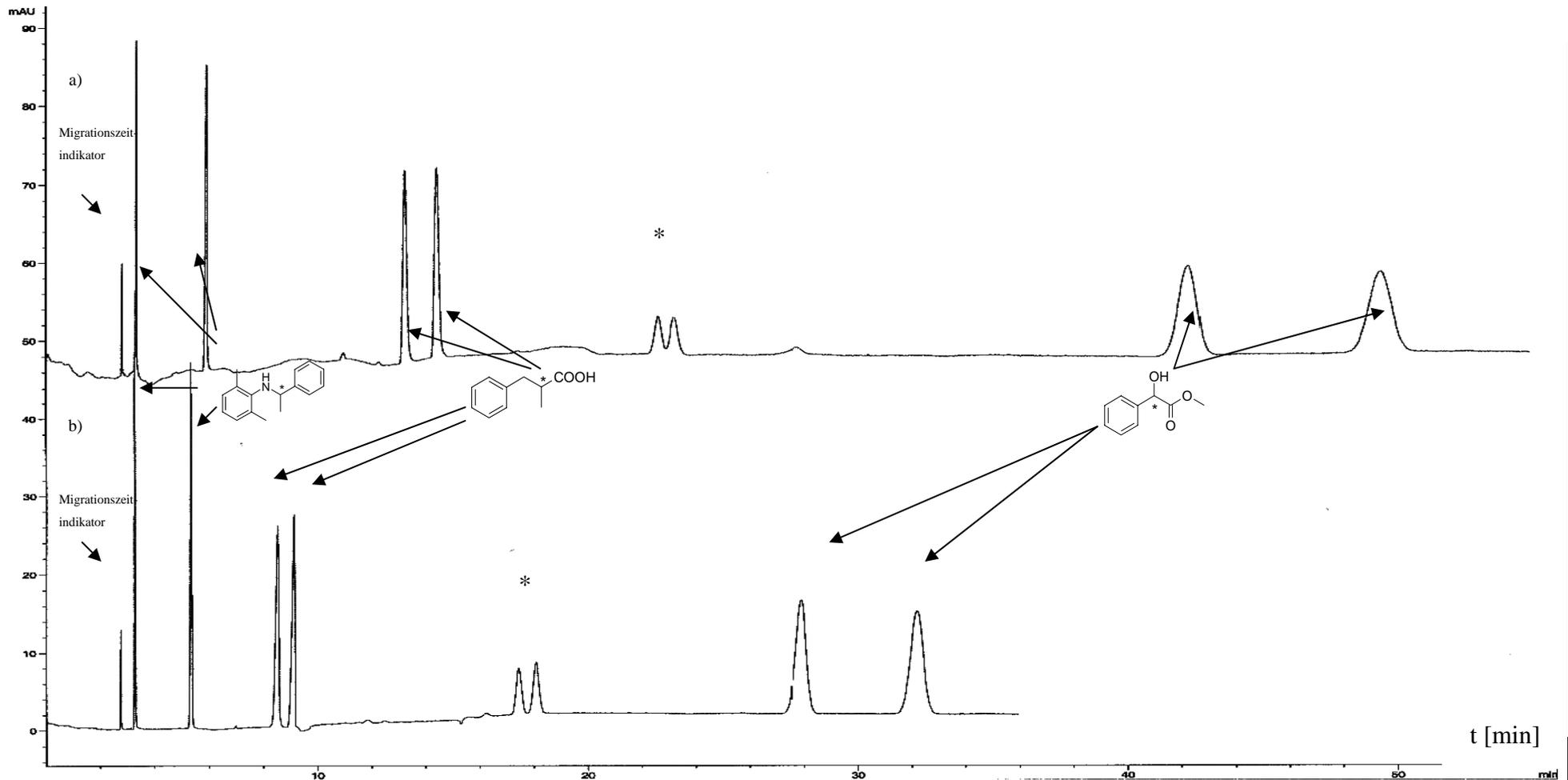


Abbildung 3.8.1: CE-Trennung einer Mischung folgender Enantiomerenpaare: (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin, (RS)-2-Methyl-3-phenylpropionsäure und (RS)-Hydroxyphenyl-essigsäuremethylester. 5% (w/v)  $\beta$ -sCDs von Aldrich wurde in a) und 5% (w/v) HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter wurde in b) als Trennpuffer verwendet. Die Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid und Trennpuffer (Dimethylsulfoxidgehalt 10% (v/v)) gelöst (Probenvorbereitung 2). (\*) sind Verunreinigungen. Trennbedingungen: HP<sup>3D</sup>-CE, -15 kV, 200 nm; Kapillarlänge: Fenster/Total: 31/39,5 cm, Kapillartemperatur: 15 °C, Injektionszeit: 13 s, Injektionsdruck: 1 kPa.

### 3.9. Ermitteln der Komplexierungskonstanten

Die Komplexierungskonstanten zwischen den Modellsubstanzen und den HSCDs können durch unterschiedliche Methoden bestimmt werden. In der Literatur sind dazu eine grosse Bandbreite von Methoden beschrieben [Kuhn und Erni, 1992; Wren und Rowe, 1992a; Wren und Rowe, 1992b; Penn und Goodall, 1993; Penn *et al.*, 1994; Tait *et al.*, 1994; Baomy *et al.*, 1995; Penn *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1996; Rundlett und Amström, 1996; Tanaka *et al.*, 1996; Rundlett und Amström, 1997; Van Eeckhaut *et al.*, 2000].

Im Fall der Komplexe mit HSCDs beschrieben Gratz und Stalcup (1998) ein Modell (siehe Gleichung 11 und Gleichung 12), bei welchem auch die Einflüsse von organischen Lösungsmitteln und deren Reduktion auf die Komplexierungskonstanten berücksichtigt wurden.

Gleichung 11

$$\frac{1}{\mu_{korr} - \mu_f} = \frac{1}{(\mu_{HSCD} - \mu_f)K} \cdot \frac{1}{[HSCD]} + \frac{1}{\mu_{HSCD} - \mu_f}$$

Gleichung 12

$$\mu_{korr} = \left[ (\mu_{obs}) - (\mu_{eof}) \right] \cdot \left( \frac{\eta_0}{\eta_x} \right)$$

Dabei ist  $\mu_{korr}$  die korrigierte Mobilität des Analyten bei der definierten Cyclodextrinkonzentration [HSCD],  $\mu_{obs}$  die gemessene Mobilität des Analyten,  $\mu_{eof}$  die Mobilität des Migrationszeitindikators,  $\eta_x$  die dynamische Viskosität bei dieser herrschenden HSCD-

Konzentration und  $\eta_0$  die dynamische Viskosität des Puffers ohne HSCD. Des weiteren ist  $\mu_{\text{HSCD}}$  die Mobilität des HSCD-Analytkomplexes und  $\mu_f$  die Mobilität des unkomplexierten, freien Analyten.

Um die Komplexierungskonstante  $K$  vereinfacht zu bestimmen wird  $(\mu_{\text{kor}} - \mu_f)^{-1}$  gegen  $[\text{HSCD}]^{-1}$  aufgetragen. Die Komplexierungskonstante  $K$  entspricht dabei dem Verhältnis Achsenabschnitt zu Steigung. Somit kann die experimentell schwierige Bestimmung der Mobilität des HSCD-Analytkomplex  $\mu_{\text{HSCD}}$  umgangen werden.

Zur Verifizierung des Aufspalteffekts wurden die Komplexierungskonstanten mit diesem Modell untersucht. Als Analyt wurde das Enantiomerenpaar (RS)-2,6-Dimethylphenyl-(1-phenylethyl)-amin und HS- $\beta$ -CDs von Beckman Coulter gewählt. Die Konzentrationspunkte HS- $\beta$ -CDs lagen bei 2,5%, 2,0%, 1,5%, 1,0% und 0,5 % (w/v). Alle Proben wurden nach Probenvorbereitung 3 mit einem Gehalt an Methanol von 60 % (v/v) hergestellt. Mit dem Migrationszeitindikator PTS wurden alle Trennungen auf etwaige Schwankungen der Trennungen korrigiert.

Von allen HSCD-Konzentrationen mit 60% und mit 0% MeOH-Gehalt wurden die kinematischen Viskositäten ermittelt (siehe Abbildung 3.9.1). Da in der Viskositätskorrekturberechnung der Mobilitäten jeweils nur die Verhältnisse aus den Viskositäten benötigt werden, konnte auf die Dichtemessung (für die Ermittlung der dynamischen Viskosität) verzichtet werden. Ebenfalls konnte durch die Verwendung sehr tiefer Konzentrationen an HSCDs, die Joule Wärmeentwicklung vernachlässigt werden.

---

Auch der EOF in der Kapillare wurde in dieser Arbeit nicht weiter beachtet und als nicht vorhanden angenommen (siehe Gleichung 12, Schraffierung ). Da bei der Messung von  $\mu_{\text{eof}}$  mit einem neutralen Migrationszeitindikator wie von Williams und Vigh (1997) erwähnt, nicht auszuschliessen wäre, dass der Migrationszeitindikator ebenfalls eine Wechselwirkung mit den HSCDs eingehen könnte. Des weiteren, wird durch den Zusatz von TEA und der Kapillar-Konditionierlösung von Beckman Coulter (wurden beide von Gratz und Stalcup (1998) nicht verwendet), der EOF stark unterdrückt. Daher wird der EOF wahrscheinlich nur einen äusserst geringen Einfluss auf die Komplexierungskonstanten haben.

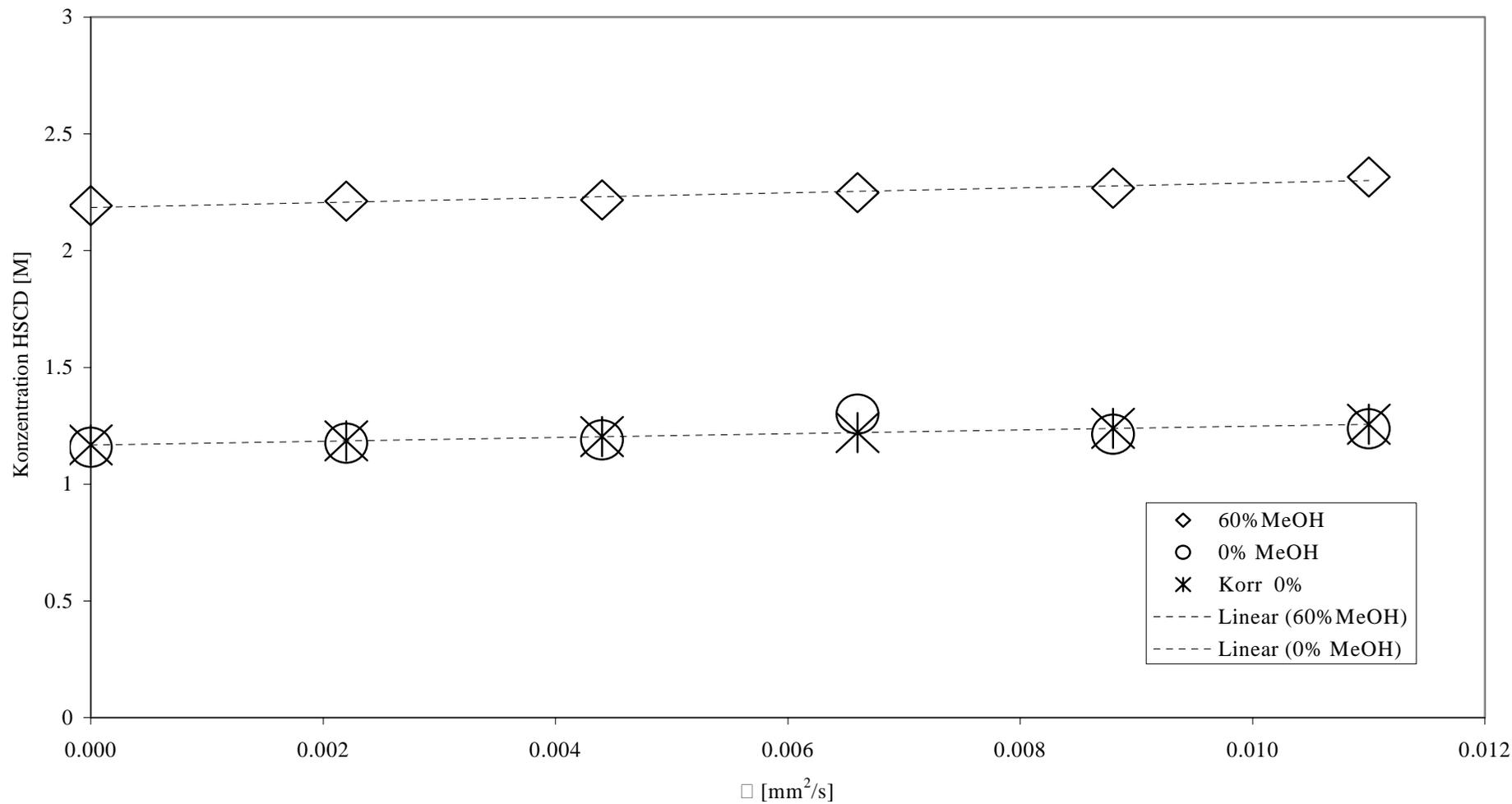


Abbildung 3.9.1: Kinematische Viskositätsmessungen von Puffern unterschiedlicher HS-β-CD Konzentration von Beckman Coulter. Jeweils gemessen mit und ohne Zugabe von 60% MeOH (v/v). Die Probe mit 6,6 mM HS-β-CD von Beckman Coulter ohne MeOH wurde aus den linearisierten Werten berechnet.

Aus den Grössen des Modells der Artefaktbildung (siehe Abbildung 3.9.2) können somit die Komplexierungskonstanten von E1, E2 und den Artefaktsignalen AF1 und AF2, also den Enantiomeren in 60% (v/v) MeOH- Umgebung, mit den HSCDs ermittelt werden.

Dazu werden die Mobilitäten  $\mu_{\text{obs}}$ , der nach dem Artefaktmodell bereits aus dem Probenpfropf hinausdiffundierten Enantiomere E1 und E2 unter Berücksichtigung der durch die Ppropfenlänge reduzierten Migrationsstrecke nach Gleichung 13 berechnet. Dabei entspricht  $L_{\text{eff}}$  der effektiven Länge der Kapillare (Start-Detektor),  $L_{\text{Ppropfenlänge}}$  der Länge der mit den Injektionsparametern erhaltenen Ppropfenlänge  $t_m$  der Migrationszeit der untersuchten Komponente und  $E$  dem E-Feld (in V/cm).

Gleichung 13

$$\mu_{\text{obs}} = \frac{L_{\text{eff}} - L_{\text{Ppropfenlänge}}}{t_m \cdot E}$$

Aus der Kombination von Gleichung 12 und Gleichung 13 kann die korrigierte Mobilität  $\mu_{\text{korr}}$  in Bezug auf die Enantiomeren E1 und E2 erhalten werden (siehe Gleichung 14).

Gleichung 14

$$\mu_{\text{korr}} = \frac{L_{\text{eff}} - L_{\text{Ppropfenlänge}}}{t_m \cdot E} \cdot \left( \frac{\eta_0}{\eta_x} \right)$$

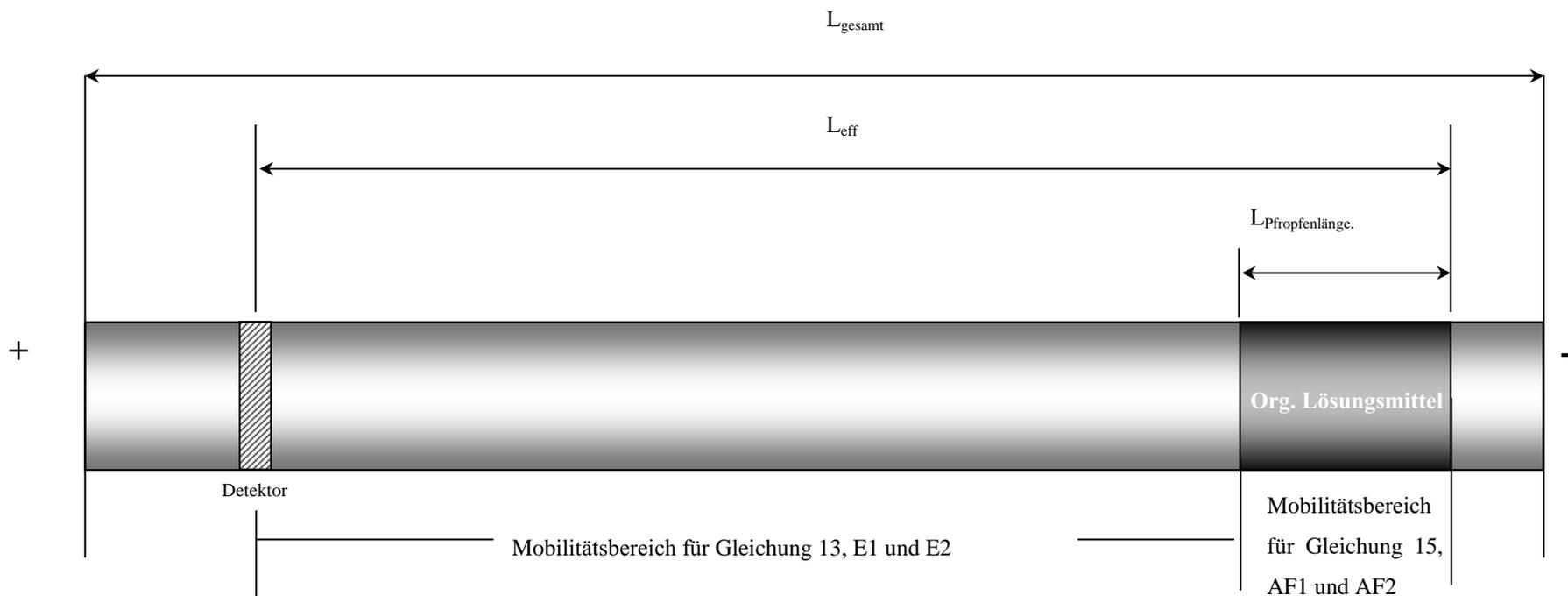


Abbildung 3.9.2: Schema zur Benennung aller Größen für die Berechnung der Komplezierungskonstanten.

Die viskositätskorrigierten Mobilitäten der Enantiomere  $\mu_{E1\text{kor}}^{\text{r}}$  und  $\mu_{E2\text{kor}}^{\text{r}}$  bei unterschiedlichen HSCD-Konzentrationen wurden gemäss Gleichung 11 aufgetragen und deren Komplexierungskonstanten ermittelt (siehe Abbildung 3.9.3).

Um eine höhere Präzision zu erreichen, wurden die Messungen mit Injektionszeiten von 13 und 15 Sekunden ermittelt (siehe Abbildung 3.9.3 mit und Abbildung 3.9.4 ohne Berücksichtigung von  $\mu_f$ ). Die erhaltenen Komplexierungskonstanten von E1 und E2 liegen in einer ähnlichen Grössenordnung wie die von Gratz und Stalcup (1998).

- $E1=20307 \text{ M}^{-1}$ ,  $E2=1021 \text{ M}^{-1}$  mit Berücksichtigung von  $\mu_f$
- $E1=13337 \text{ M}^{-1}$ ,  $E2=315 \text{ M}^{-1}$  ohne Berücksichtigung von  $\mu_f$
- Gratz und Stalcup ( $1730 \text{ M}^{-1}$ ,  $1590 \text{ M}^{-1}$ )

Die grosse E1-Komplexierungskonstante im Vergleich zu den Verbindungen von Gratz und Stalcup zeigt die starke Wechselwirkung vom Enantiomer E1 mit den HSCD. Ausserdem widerspiegelt der Grössenunterschied von E1 zu E2 die hohe Auflösung die bei dieser Trennung erlangt werden kann.

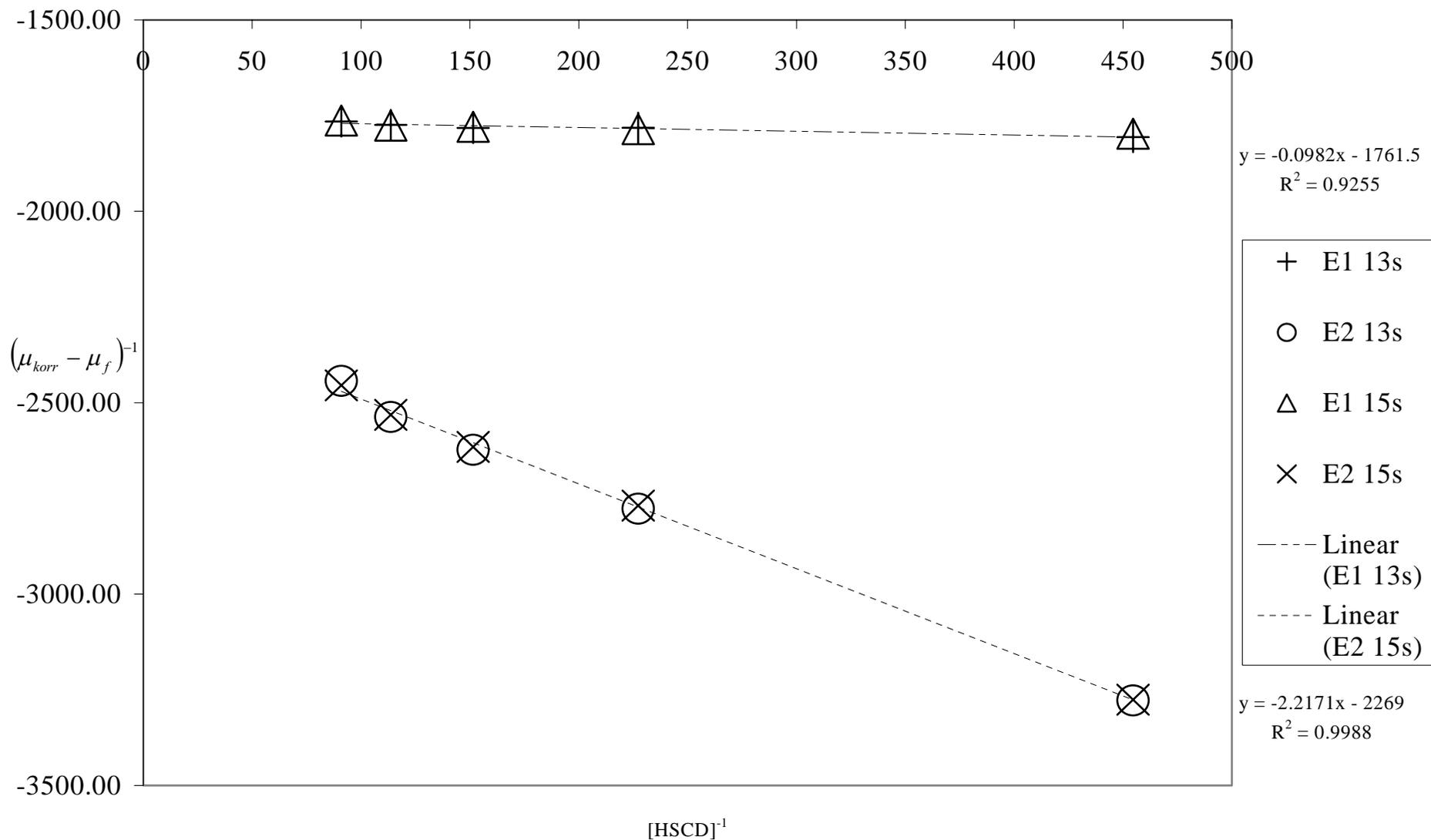


Abbildung 3.9.3: Komplexierungskonstanten von E1 (Mittelwert aus 13 s/15 s Injektionszeiten =  $20307 \text{ M}^{-1}$ ) und E2 (Mittelwert aus 13 s/15 s Injektionszeiten =  $1021 \text{ M}^{-1}$ ) ermittelt aus Gleichung 11 (mit Berücksichtigung von  $\mu_f$ ).

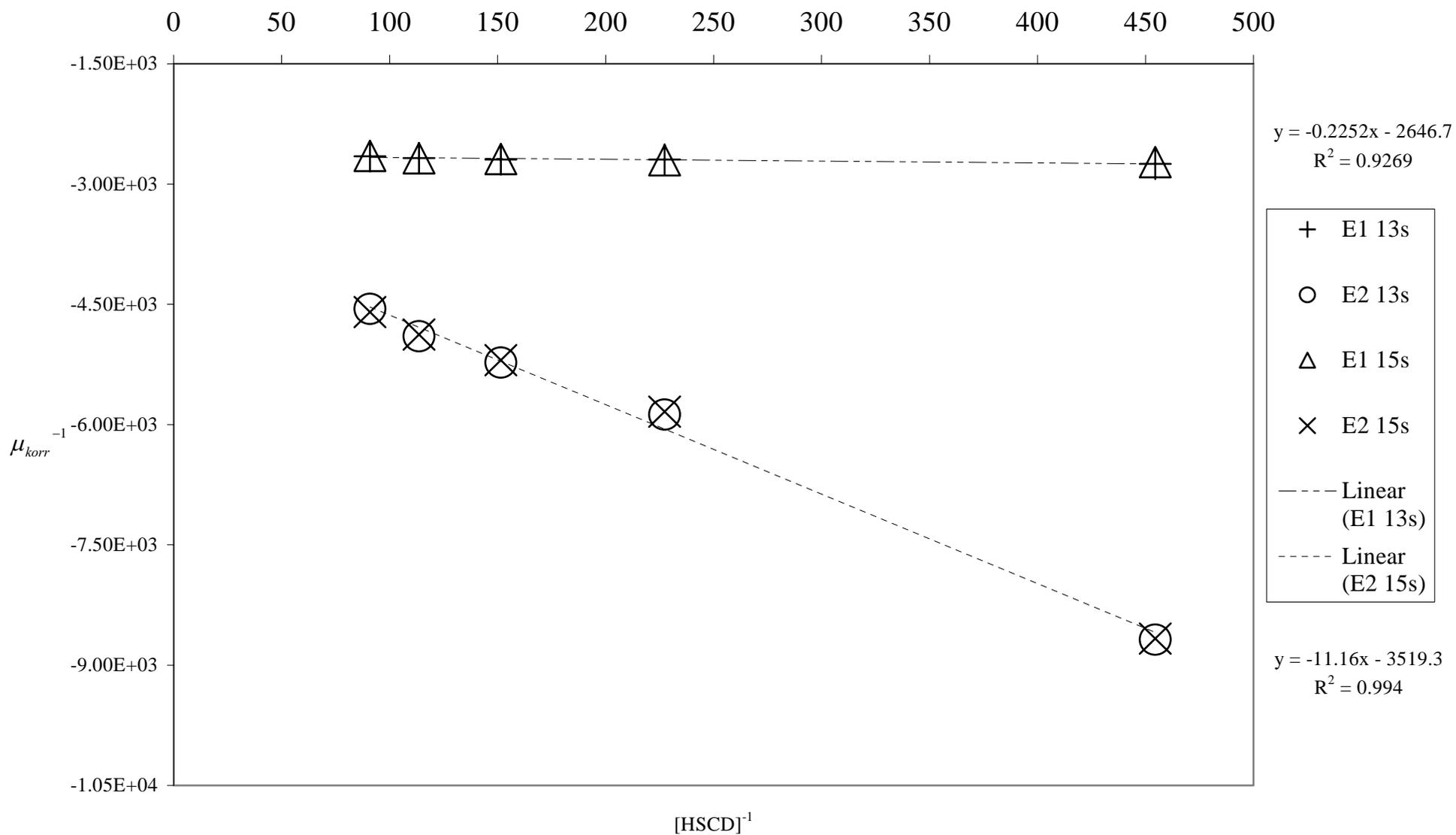


Abbildung 3.9.4: Komplexierungskonstanten von E1 (Mittelwert aus 13 s/15 s Injektionszeiten =  $13337 \text{ M}^{-1}$ ) und E2 (Mittelwert aus 13 s/15 s Injektionszeiten =  $315 \text{ M}^{-1}$ ) mit HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter ermittelt aus Gleichung 11 (ohne Berücksichtigung von  $\mu_f$ ).

Für die Ermittlung der Mobilitäten von AF1 und AF2 wurde die Gleichung 13 abgeändert. Anstelle der Migrationsstrecke in der wässrigen Zone wurde nur die Migrationsstrecke der organischen Zone, also die Pfropfenlänge, betrachtet. Das E-Feld im Pfropf wird als gleich gross über die gesamte Kapillare angenommen. Die Migrationszeit  $\Delta t$  wird aus der Differenz der Migrationszeit des Artefaktsignals und dem entsprechenden Enantiomerensignal ermittelt. Die Mobilität  $\mu_f$  des unkomplexierten Analyten wird als vernachlässigbar angenommen. Wie schon bei der Betrachtung von E1 und E2 wird die Viskositätskorrektur aus Gleichung 12 einbezogen und ergibt die Gleichung 15.

Gleichung 15

$$\mu_{korr} = \frac{L_{\text{Pfropfenlänge}}}{\Delta t \cdot E} \cdot \left( \frac{\eta_0}{\eta_x} \right)$$

Diese Berechnung ist sehr stark vereinfacht, soll aber auch nur die Möglichkeit der Abschätzung der Komplexierungskonstanten bei sehr hohen organischen Lösungsmittelkonzentrationen aufzeigen.

In Abbildung 3.9.5 sind Komplexierungskonstanten für die Artefaktsignale AF1 und AF2 mit den Injektionszeiten von 13 und 15 Sekunden ohne Berücksichtigung von  $\mu_f$  ermittelt worden. Die beiden Werte liegen in einer zu erwartenden Grössenordnung, wobei der Wert von AF2 ein wenig zu hoch erscheint. Dies wird aber relativiert, da es sich um den Mittelwert aus 8 und 57 handelt. Die Werte bei der Messserie mit 15 s Injektionszeit streuen stärker als die bei 13 s. Deshalb wird angenommen, dass die Komplexierungskonstante von AF2 eher bei  $8 \text{ M}^{-1}$  liegt.

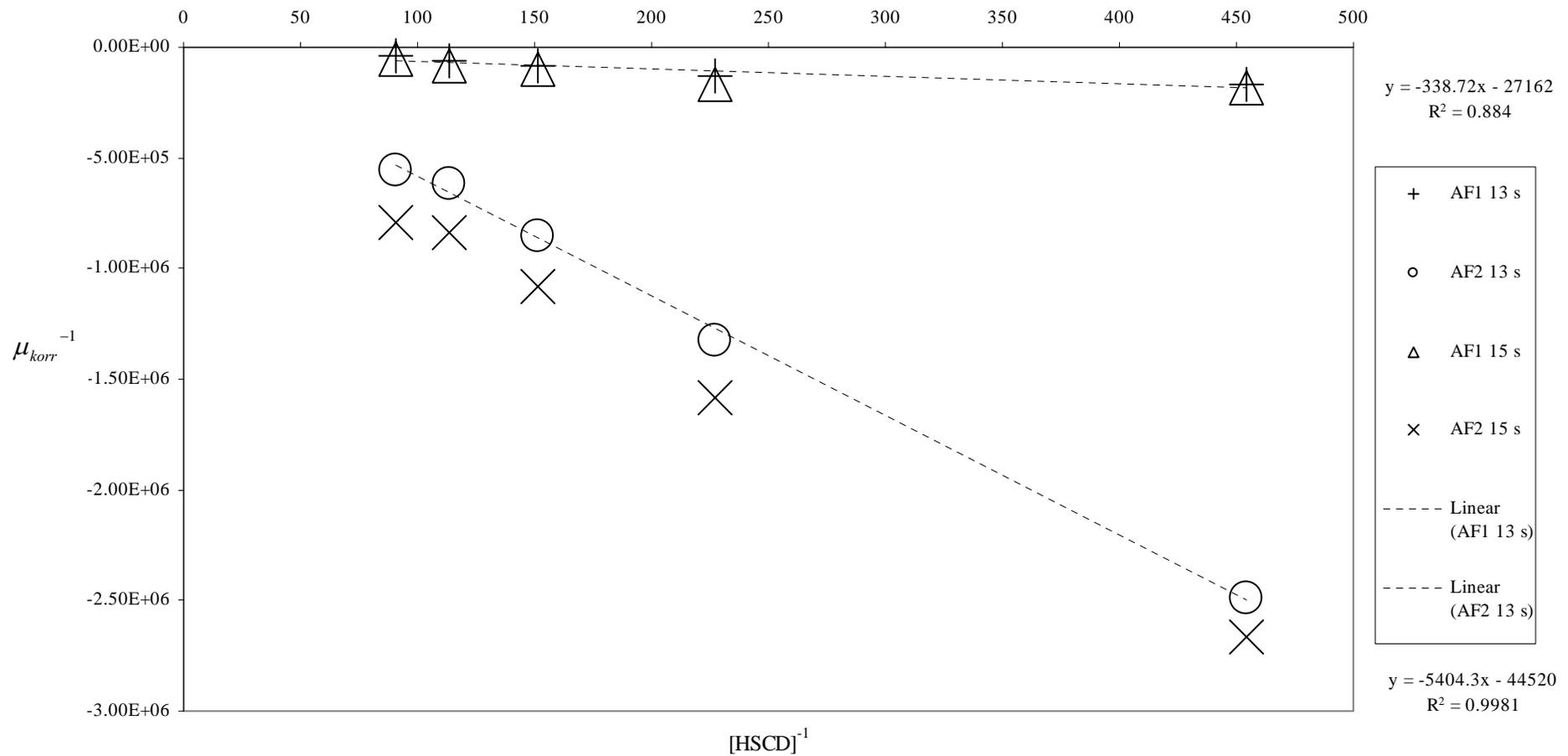


Abbildung 3.9.5: Komplexierungskonstanten von AF1 (Mittelwert aus 13 s/15 s Injektionszeiten =  $119 \text{ M}^{-1}$ ) und AF2 (Mittelwert aus 13 s/15 s Injektionszeiten =  $33 \text{ M}^{-1}$ ) mit HS- $\beta$ -CD von Beckman Coulter ermittelt aus Gleichung 11 (ohne Berücksichtigung von  $\mu_f$ ).

Die Vereinfachungen des E-Feldes und der Migrationsstrecke können vernachlässigt werden, da diese in der K-Berechnung beziehungsweise in  $\Delta t$  keinen Einfluss hat. Diese Abschätzung zeigt sehr deutlich, dass der Aufteilungseffekt auf den unterschiedlichen Komplexierungskonstanten in wässriger und organischer Zone basiert und wahrscheinlich nur sehr gering von dem Puffer und Ladungszuständen des Analyten abhängig ist. Somit ist der Aufteilungseffekt bei höherer Lösungsmittelkonzentration viel stärker als der von Ermakov und Andersson (Ermakov, 1994; Ermakov 1995; Andersson, 2002a; Andersson, 2002b) beschriebenen Puffer und Ladungszustandseinfluss.

## 4 Literaturverzeichnis

Altira K.D., Essential Peak Area Normalization for Quantitative Impurity Content Determination by Capillary Electrophoresis *Chromatographia* 35 (1993) 177-182.

Altira K.D., Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. I *Trends in analytical chemistry* 17 (1998) 204-214.

Altria K.D., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A.* 1 (1999) 1-21.

Amini A., Recent developments in chiral capillary electrophoresis and applications of this technique to pharmaceutical and biomedical analysis, *Electrophoresis* 22 (2001) 3107-3130.

Andersson E.K.M., Hägglund I., Increase of sample load without peak deterioration by careful selection of electrolyte in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 953 (2002a) 227-237.

Andersson E.K.M., Hägglund I., Sample matrix influence on the choice of the background electrolyte for the analysis of bases with capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 979 (2002b) 11-25.

Baomy Ph., Morin Ph., Dreux M., Viaud M.C., Boye S. Guillaumet G., Determination of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex constants for 3,4-dihydro-2-H-1-benzopyran enantiomers by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 707 (1995) 311-326.

Biggin M.E., Williams R.L., Vigh G., Experimental evidence for the existence of duoselective (Type III) enantiomer separations in the capillary electrophoretic analysis of chiral weak acids, *J. Chromatogr. A.* 692 (1995) 319-325.

Blaser H.U., Buser H.P., Coers K., Hanreich R., Jalett H.P., Jelsch E., Pugin B., Schneider

---

H.D., Spindler F., Wegmann A., The Chiral Switch of Metolachlor: The Development of a Large Scale Enantioselective Catalytic Process, *Chimia* 53 (1999) 275-288.

Blaser H.U., Spindler F., Studer M., Enantioselective Catalysis in Fine Chemicals Production, *Applied Catalysis A: General* 221 (2001) 119-143.

de Boer T., de Zeeuw R. R., de Jong G. J., Ensing K., Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis, *Electrophoresis* 21 (2000) 3220-3239.

Botting J., The History of Thalidomide, *Drug News & Perspectives* 15 (2002) 604-611.

Buser H., Francotte E., Stereoselective Analysis in Crop Protection, *American Chemical Society* (1997) 93-138.

Cahn R.S., Ingold C.K., Prelog V., Spezifikation der molekularen Chiralität, *Angew. Chem.* 78 (1966) 413-447.

Cavallaro A., Piangerelli V. Nerini F., Cavalli S., Reschitto C., Selective determination of aromatic amines in water samples by capillary zone electrophoresis and solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 709 (1995) 361-366.

Chankvetadze B., Burjanadze N., Pintore G., Bergenthal D., Bergander K., Mühlenbrock C., Breitzkreuz J. Blaschke G., Separation of brompheniramine enantiomers by capillary electrophoresis and study of chiral recognition mechanisms of cyclodextrins using NMR-spectroscopy, UV spectroscopy, electrospray ionization mass spectrometry and X-ray crystallography, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 471-484.

Chankvetadze B., Enantioseparation of chiral drugs and current status of electromigration techniques in this field, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 691-705.

Chankvetadze B., Lindner W., Scriba G.K.E., Enantiomer Separation in Capillary Electrophoresis in Case of Equal Binding Constants of the Enantiomers with a Chiral Selector: Commentary on the Feasibility of the Concept, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4256-4260.

---

Chen F.-T. A., Shen G., Evangelista R.A., Characterization of highly sulfated cyclodextrins *J. Chromatogr. A.* 924 (2001) 523-532.

Dalgliesh C.E., The Optical Resolution of Aromatic Amino-acids on Paper Chromatograms, *J. Chem. Soc.* 137 (1952) 3940-3942.

Dolan J.W., Snyder L.R., Troubleshooting LC Systems: a comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separations, Clifton, New Jersey Humana Press (1989) 84-85.

Van Eeckhaut A., Boonkerd S., Detaevernier M.R., Michotte Y., Development and evaluation of a linear regression method for the prediction of maximal chiral separation of basic drug racemates by cyclodextrin-mediated capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 903 (2000) 245-254.

Engelhardt H., Beck W., Schmitt T., Kapillarelektrophorese, *Vieweg Brunschweig/Wiesbaden* (1994) ISBN 3-540-67007-6.

Ermakov S.V., Zhukov M.Y., Capelli L., Righetti P.G., Artifactual Peak Splitting in Capillary Electrophoresis. 2. Defocusing Phenomena for Ampholytes, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2957-2965.

Ermakov S.V., Zhukov M.Y., Capelli L., Righetti P.G., Experimental and Theoretical Study of Artifactual Peak Splitting in Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 66 (1994) 4034-4042.

Fabre H., Altria K.D., Validating CE Methods for Pharmaceutical Analysis, *LC•GC Europe* May (2001) 302-306.

Fanali S., Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 735 (1996) 77-121.

Fanali S., Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion-complexation, *J. Chromatogr. A.* 792 (1997) 227-267.

Ferguson P.D., Goodall D.M., Loran J.S., Systematic approach to the treatment of enantiomeric separations in capillary electrophoresis and liquid chromatography III. A binding constant-retention factor relationship and effects of acetonitril on the chiral separation of tioconazole, *J. Chromatogr. A.* 745 (1996) 25-35.

Gahm K.-H., Stalcup A.M., Sulfated Cyclodextrins for the chiral Separations of Catecholamines Related Compounds in the Reversed Electrophoretic Polarity Mode, *Chirality* 8 (1996) 316-324.

Gómez-Gomar A., Ortega E., Calvet C. Andaluz B. Mercé R. Frigola J., Enantioseparation of basic pharmaceutical compounds by capillary electrophoresis using sulfated cyclodextrins Application to E-6006, a novel antidepressant, *J. Chromatogr. A.* 990 (2003) 91-98.

Gratz S.R., Stalcup A.M., Enantiomeric Separations of Terbutaline by CE with a Sulfated  $\beta$ -Cyclodextrin Chiral Selector: A Quantitative Binding Study, *Anal. Chem.* 70 (1998), 5166-5171.

Gübitz G., Schmid M.G., Chiral separation principles in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 792 (1997) 179-225.

Gübitz G., Schmid M.G., Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 21 (2000) 4112-4135.

Guo L., Lin S.J., Yang Y.F., Qi L., Wang M.X., Chen Y., Fast enantioseparation of argylglycine amides by capillary electrophoresis with highly sulfated- $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector, *J. Chromatogr. A.* 998 (2003) 221-228.

Hsiao Y., Rivera N.R., Rosner T., Krska S.W., Njolito E., Wang F., Sun Y., Armstrong J.D., Grabowski E.J.J., Tillyer R.D., Spindler F., Malan C., Highly Efficient Synthesis of  $\beta$ -Amino Acid Derivatives via Asymmetric Hydrogenation of Unprotected Enamines, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9918-9919.

Jaus A., Characterisation of selected alkylated cyclodextrins and their application as gas chromatographic phase for the enantioselective separation of polychlorinated compounds,

---

*Dissertationsschrift Philosophisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Basel*,  
(2000) 6.

Jimidar M., Van Ael W., De Smet M., Cockaerts P., Method Validation and Robustness Testing of an Enantioselective CE Method for Chemical Quality Control, *LC•GC Europe* April (2002) 2-9.

Jin L.J., Li S.F.Y., Comparison of chiral recognition capabilities of cyclodextrins for the separation of basic drugs in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. B.* 708 (1998) 257-266.

Jorgenson J.W., Lukacs K.D., Capillary Zone Electrophoresis, *Science* 222 (1983) 266-272.

Jorgenson J.W., Lukacs K.D., Free-Zone Electrophoresis in Glass Capillaries, *Clin. Chem.* 27/9 (1981) 1551-1981.

Juvancz Z., Jicsinszky L., Markides K.E., Phosphated Cyclodextrins as New Acidic Chiral Additives for Capillary Electrophoresis, *J. Microcolumn Sep.* 9(8) (1997) 581-589.

Kuhn R., Erni F., Chiral Recognition and Enantiomeric Resolution Based on Host-Guest Complexation with Crown Ethers in Capillary Zone Electrophoresis, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2815-2820.

Li S., Vigh G., Single-isomer sulfated  $\alpha$ -cyclodextrins for capillary electrophoresis. Part 2. Hexakis(6-O-sulfo)- $\alpha$ -cyclodextrin: Synthesis, analytical characterization, and initial screening tests, *Electrophoresis* 25 (2004) 1201-1210.

Lipka E., Daniel C., Vaccher M.-P., Glaçon V., Ewing D., Mackenzie G., Len C., Bonte J.-P., Vaccher C., Enantioseparation of new nucleoside analogs, related to d4T and acyclovir, by chiral capillary electrophoresis using highly sulfated  $\beta$ -cyclodextrins, *Electrophoresis* 25 (2004) 444-453.

Ma S., Horvath Cs., Capillary zone electrophoresis at subzero temperatures II: chiral separation of biogenic amines, *Electrophoresis* 18 (1997) 873-883.

---

Maftouh M., Grainer-Loyaux C., Chavana E., Marini J., Pradines A., Vander Heyden Y., Picard C., Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery, *J. Chromatogr. A.* 1088 (2005) 67-81.

Maier N.M., Franco P., Lindner W., Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A.* 906 (2001) 3-33.

Nussbaum M.A., When a truck becomes a motorcycle : The impact of sample load on achiral capillary electrophoresis separation using mixtures of neutral and sulfated cyclodextrins, *Electrophoresis* 20 (1999) 2664-2669.

Penn S.G., Goodall D.M., Differential binding of tioconazole nantiomers to hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin studied by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr.* 636 (1993) 149-152.

Penn S.G., Bergström E.T., Goodall D.M., Loran J.S., Capillary Electrophoresis with Chiral Selectors: Optimization of Separation and Determination of Thermodynamic Parameters for Binding of Tioconazole Enantiomers to Cyclodextrins, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2866-2873.

Penn S.G., Bergström E.T., Knights I., Liu G. Ruddick A., Goodall D.M., Capillary Electrophoresis a Method for Determining Binding Constants: Application to the Binding of Cyclodextrins and Nitrophenolates, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 3875-3880.

Perrin C., Heyden Y.V., Maftouh M., Massart D.L., Rapid screening for chiral separations by short-end injection capillary electrophoresis using highly sulfated cyclodextrins as chiral selectors, *Electrophoresis* 22 (2001) 3203-3215.

Perrin C., Fabre H., Maftouh M., Massart D.L., Heyden Y.V., Robustness testing of chiral separations by capillary electrophoresis using highly-sulfated cyclodextrins, *J. Chromatogr. A.* 1007 (2003) 165-177.

Phinney K.W., Jackson J.W., Sander L.C., Enantioselective Chiral recognition of functionalized cyclodextrins in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* (2002) 1308-1313.

---

Phinney K.W., Sander L.C., Enantioselective separations in capillary electrophoresis with dextran sulfate as the chiral selector, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 763-768.

Phinney K.W., Sander L.C., Dynamically Coated Capillaries for Enantioselective Separations by Capillary Electrophoresis, *Chirality* 17 (2005) 65-69.

PHYWE series of publications, Viscosity measurements with the falling ball viscometer, Laboratory Experiments Physics *PHYWE SYSTEME GMBH* 37070 Göttingen, Germany LEP 1.4.04 (2006) 2-4

Raab T., Schmitt U., Hauck T. Knecht A., Holzgrabe U., Schwab W., Capillary Electrophoretic Resolution of the Enantiomers of 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, the Key Flavor Compounds in Strawberry Fruit, *Chromatographia* 57 (2003) 501-504.

Rawjee Y.Y., Staerk D.U., Vigh G., Capillary electrophoretic chiral separations with cyclodextrin additives I. Acids: chiral selectivity as a function of pH and the concentration of  $\beta$ -cyclodextrin for fenoprofen and ibuprofen, *J. Chromatogr.* 635 (1993a) 291-306.

Rawjee Y.Y., Williams R.L., Vigh G., Capillary electrophoretic chiral separations using  $\beta$ -cyclodextrin as resolving agent II. Bases: chiral selectivity as a function of pH and the concentration of  $\beta$ -cyclodextrin, *J. Chromatogr. A.* 652 (1993b) 233-245.

Rawjee Y.Y., Williams R.L., Vigh G., Capillary electrophoretic chiral separations using cyclodextrin additives III. Peak resolution surfaces for ibuprofen and homatropine as a function of the pH and the concentration of  $\beta$ -cyclodextrin, *J. Chromatogr. A.* 680 (1994) 599-607.

Rocheleau M.-J., Generic capillary electrophoresis conditions for chiral assay in early pharmaceutical development, *Electrophoresis* 26 (2005) 2320-2329.

Rudaz S., Calleri E., Geiser L., Cherkaoui S., Prat J., Veuthey J.-L., Infinite enantiomeric resolution of basic compounds using highly sulfated cyclodextrins as a chiral selector in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 24 (2003) 2633-2641.

---

Rundlett K.L., Amstrong D.W., Examination of the origin, variation, and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 173-186.

Rundlett K.L., Amstrong D.W., Methods for the estimating of binding constants by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 18 (1997) 2194-2202.

Schardinger F., Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlenhydrathaltigen Nährlösungen, darunter kristallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke, *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* 6 (1903) 865-880.

Schleimer M., Schurig V., Enantiomer Separation by Capillary Supercritical Fluid Chromatography, *Anal. Supercrit. Fluids*, Extr. Chromatogr. (1992) 134-150.

Schmitt T., Beiträge zur Enantiomerentrennung in der Kapillarelektrophorese, *Deutscher Universitäts Verlag Wiesbaden* (1995) ISBN 3-8244-2063-5.

Schmitt U., Branch S.K., Holzgrabe U., Chiral separations by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis – Determination of the enantiomeric excess, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 959-974.

Stalcup A. M., Gahm K.H., A Sulfated Cyclodextrin chiral Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1369-1374.

Steiner F., Beck W., Engelhardt H., Optimization of indirect ultraviolet detection in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 738 (1996) 11-23.

Surapaneni S., Ruterbories K., Lindstrom T., Chiral separation of neutral species by capillary electrophoresis Evaluation of a theoretical model, *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 249-257.

Sutton R.M.C., Sutton K.L., Stalcup A.M., Chiral capillary electrophoresis with noncyclic oligo- and polysaccharide chiral selectors, *Electrophoresis* 18 (1997) 2297-2304.

---

Szejtli J., *Cyclodextrins and their inclusion complexes* Akademia Kiado Budapest (1982)17-29.

Szejtli J., Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743-1753.

Tait R.J., Thompson D.O., Stella V.J., Stobaugh J.F., Sulfobutyl Ether  $\beta$ -Cyclodextrin as a Chiral Discriminator for Use with Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 66 (1994) 4013-4018.

Tanaka Y., Yanagawa M., Terabe S., Separation of Neutral and Basic Enantiomers by Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography Using Anionic Cyclodextrin Derivatives as Chiral Pseudo-Stationary Phases, *J. High. Resol. Chromatogr.* 19 (1996) 421-433.

Thommen M., Homogeneous asymmetric hydrogenation: Mature and fit for early stage drug development, *Speciality Chemicals Magazine* 25(4) (2005) 26-28.

United States Pharmacopoeia, General Chapters 05 <727> Capillary electrophoresis SP 29-NF24 Page 296 (2006)

Verleysen K., Sandra P., Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 19 (1998a) 2789-2833

Verleysen K., Sabah S., Scriba G., Chen A., Sandra P., Evaluation of the enantioselective possibilities of sulfated cyclodextrins for the separation of aspartyl di- and tripeptides in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 824 (1998b) 91-97.

Verleysen K., den Bosch T.V., Sandra P., Comparison of highly sulfated  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -cyclodextrins and 18-crown-6-tetracarboxylic acid for the enantiomeric separation of some amino acids and derivatives by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 20 (1999) 2650-2655.

---

Vescina M.C., Fermier A. M., Guo Y., Comparing cyclodextrin derivatives as chiral selectors for enantiomeric separation in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 973 (2002) 187-196.

Vespalec R., Boček P., Chiral separations in capillary electrophoresis: Present state of the art, *Electrophoresis* 18 (1997) 843-852.

Vespalec R., Boček P., Chiral separations in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 20 (1999) 2579-2591.

Vigh G., Sokolowski A.D., Capillary electrophoretic separations of enantiomers using cyclodextrin-containing background electrolytes, *Electrophoresis* 18 (1997) 2305-2310.

Villiers A. *Compt. Rendu.* Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. 112 (1891) 536-538.

Vincent J.B., Kirby D.M., Nguyen T.V., Vigh G., A Family of Single-Isomer Chiral Resolving Agents for Capillary Electrophoresis. 2. Hepta-6-sulfato- $\beta$ -cyclodextrin, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4419-4428.

Wagner H., Blasius E., Praxis der Elektrophoretischen Trennmethoden, *Springer Verlag Berlin* (1989) ISBN 3-540-19205-0.

Wang F., Khaledi M.G., Capillary Electrophoresis Chiral Separations of Basic Pharmaceutical Enantiomers with Different charges Using Sulfated  $\beta$ -Cyclodextrin, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 11-21.

Wren S.A.C, Rowe R.C., I. Initial evaluation of a model, *J. Chromatogr.* 603 (1992a) 235-241.

Wren S.A.C, Rowe R.C., II The role of the organic solvent, *J. Chromatogr.* 609 (1992b) 363-367.

---

Williams B.A., Vigh G., Dry look at the CHARM (charged resolving agent migration) model of enantiomer separations by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 777 (1997) 295-309.

Yanes E.G., Gratz S.R., Sutton R.M.C., Stalcup A.M., A comparison of phosphated and sulfated  $\beta$ -cyclodextrins as chiral selectors for capillary electrophoresis, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 412-417.

Zhou L., Trubig J., Dovletoglou A., Locke D.C., Enantiomeric separation of the novel growth hormone secretagogue MK-0677 by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 773 (1997) 311-320.

Zhou L., Thompson R., Reamer R.A., Miller C., Welch C., Ellison D.K., J.M. Wyvratt, Mechanistic study of enantiomeric recognition with native  $\gamma$ -cyclodextrin by capillary electrophoresis, reversed-phase liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, electrospray mass spectrometry and circular dichroism techniques, *J. Chromatogr. A.* 987 (2003) 409-420.

---

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Vorträgen und Publikationen bereits erschienen:

**Vorträge:**

STAPF F., KIESSIG S. & KÁLMÁN F.

Referent am User Meeting:

"Chiral separations by CE in the pharmaceutical industry – lessons learned "

1<sup>st</sup> CE user meeting Beckman Coulter, 5.-6. September 2005, Potsdam (Deutschland)

STAPF F., KIESSIG S. & KÁLMÁN F.

Beitrag zu Pharmaceutical Analysis:

"Chiral separations by CE in the pharmaceutical industry – lessons learned"

20<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separation and Capillary Electrophoresis  
MSB'2006, 22.-26. Januar 2006, Amsterdam (Niederlande)

STAPF F., KIESSIG S. & KÁLMÁN F.

Beitrag zu Pharmaceutical Analysis I:

"Artifacts obtained during chiral separation with sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis"

30<sup>th</sup> International Symposium & Exhibit on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC'2006, 17.-23. Juni 2006, San Francisco, Kalifornien (USA)

KÁLMÁN F., STAPF F., & KIESSIG S.

Beitrag zu Small Molecule and Chiral Separation Analysis Plenary Session:

" Peak Splitting / Artificial Impurity Effects in Chiral Capillary Electrophoresis with Sulfated Cyclodextrins"

8<sup>th</sup> Symposium on the Practical Applications for the Analysis of Proteins, Nucleotides and Small Molecules CEPharm 2.-6. Oktober 2006, Jersey City, New Jersey (USA)

**Publikationen:**

STAPF F., OEHME M., KIESSIG S., SCHWARZ M., & KÁLMÁN F.

Peak splitting in the CE separation of enantiomers caused by organic solvents in the sample,  
Eingereicht bei Electrophoresis