

Untersuchungen von Einschlusskomplexen aus
Cyclodextrinen mit Aminosäuren und Dipeptiden

Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Claudia Meier, geb. Kahle
aus Göttingen

Würzburg 2005

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

An dieser Stelle möchte ich ihr für die stets gewährte freundliche Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und Anregungen und das in mich gesetzte Vertrauen, das mir den Freiraum zur selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeit gab, danken.

Herrn Prof. Dr. G. K. E. Scriba und Herrn Dr. Falko Süß danke ich für die Dipeptide, die den Anstoß zu einem großen Teil meiner Arbeit gaben, die Diskussionsbereitschaft und guten Ideen und nicht zuletzt für die schöne Zeit in Stockholm.

Herrn Prof. Dr. Bringmann und Herrn Dr. Michael Dreyer danke ich für die Möglichkeit, CD-Spektren der Cyclodextrin-Dipeptid-Komplexe zu messen und die Hilfe bei der Auswertung derselben.

Herrn Prof. Dr. Tacke und Herrn Thomas Schmid danke ich für die Bereitstellung der Silanyl- und Germanyl-Aminosäuren.

Herrn Dr. Curd Schollmayer und Dr. Ralph Deubner danke ich für die Messungen der ¹H-NMR-Spektren, die dann doch ziemlich viel Zeit in Anspruch genommen haben und die fachliche Hilfe beim Auswerten. Herrn Dr. Mathias Grüne und Frau Elfriede Ruckdeschel danke ich für die Messung der ROESY-NMR-Spektren und so manche gute Idee.

Herrn PD Dr. Knut Baumann und Herrn Josef „das ist überhaupt kein Problem“ Scheiber danke ich für die Hilfe bei mir unverständlichen dreidimensionalen Strukturen und gewissen mathematische Fragestellungen, die bunten Bildchen und die immer nette Atmosphäre im AK Baumann.

Herrn Dr. Nikolai Novachev und Frau Stefanie Laug danke ich für ihre Geduld und Hilfe bei meinen CE-Messungen und den CE-Mädels Susanne Kopec und Alexandra Deubel für die Geduld mit mir, meinen Chromat-Abfällen und den Last-minute-Abbildungen.

Den Kollegen aus dem Arbeitskreis danke ich für die schöne Zeit.

Jürgen Teichgräber, Andreas Heinze, Frank Wienen, Ralph Deubner, Holger Projahn und Daniela Ulmer danke ich für Cocktails, Zigarren und alle Tapas.

Ralph Deubner und Andreas Heinze danke ich für die vier tollen Jahre im Labor 105, den SPD-Ortsverband Hubland-West und den Mobbing-Schrank der Firma Erbstößer.

Martin, danke für alles.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Chiralität.....	1
1.1.1	Isomerie.....	1
1.1.2	Physikalische Grundlagen der Drehung von linear polarisiertem Licht	1
1.1.3	Arten der Chiralität	3
1.1.4	Nomenklatur von chiralen Verbindungen.....	4
1.2	Pharmazeutische Relevanz von Enantiomeren	5
1.3	Cyclodextrine	7
1.4	Cyclodextrin-Einschlusskomplexe.....	8
1.5	Trennung von Enantiomeren mit Hilfe von Cyclodextrinen.....	10
1.6	Aminosäuren und Dipeptide	14
1.6.1	Aminosäuren	14
1.6.2	Dipeptide	20
1.7	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	23
2	Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen	24
2.1	Einleitung	24
2.1.1	pK _s -Werte.....	24
2.1.2	Potentiometrie	25
2.1.3	Potentiometrische Bestimmungsmethode	27
2.2	Theoretische Grundlagen der angewandten Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten.....	29
2.2.1	Begriffsbestimmung.....	29
2.2.2	Herleitung.....	29
2.3	Experimentelles.....	32
2.3.1	Graphische Auswertung der Daten	32
2.3.2	Berechnung des Fehlers der ermittelten Bindungskonstanten	33
2.3.3	Titrationmethode	34
2.3.4	Chemikalien	35
2.4	Ergebnisse	35
2.4.1	Diskussion der Ergebnisse	39
2.5	Zusammenfassung.....	43

3	Untersuchung von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen mit UV- und CD-spektroskopischen und massenspektrometrischen Methoden.....	44
3.1	Allgemeines	44
3.1.1	Spektroskopie.....	44
3.1.2	Bestimmung von Bindungskonstanten mittels spektroskopischer Methoden	45
3.2	UV-Spektroskopie	48
3.2.1	Theoretische Grundlagen	48
3.2.2	Bestimmung der Stöchiometrie von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen.....	49
3.2.3	Job-Plots.....	50
3.2.4	Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen mittels UV-Spektroskopie.....	52
3.3	CD-Spektroskopie.....	54
3.3.1	Theoretische Grundlagen	54
3.3.2	Experimentelles	57
3.3.3	Ergebnisse und Diskussion	57
3.4	Massenspektrometrie	60
3.4.1	Theoretische Grundlagen	60
3.4.2	Experimentelles	61
3.4.3	Ergebnisse und Diskussion	61
3.5	Zusammenfassung	63
4	NMR-spektroskopische Untersuchungen von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen ...	64
4.1	Einleitung.....	64
4.1.1	Grundlagen der NMR-Spektroskopie	64
4.1.2	Ziel der Untersuchungen.....	66
4.2	pH-Wert-abhängige Untersuchungen von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen.....	67
4.3	Vergleich der verschiedenen ¹ H-NMR-Messmethoden	68
4.3.1	Methoden der Wasserunterdrückung	69
4.3.2	Vor- und Nachteile von WATERGATE und „Presaturation“	71
4.3.3	Wasserunterdrückung versus Lyophilisation und Wiederauflösen in Deuteriumoxid	72

4.4	Vergleich: Referenzierung auf HDO-Peak vs. „Interner externer Standard“:.....	73
4.5	Bestimmung von $\Delta\delta$ -Werten.....	75
4.5.1	Experimentelles.....	75
4.5.2	Chemikalien	76
4.6	ROESY-Experimente.....	76
4.6.1	Kern-Overhauser-Effekt.....	76
4.6.2	2D-NOESY-Experiment	77
4.6.3	2D-ROESY-Experiment	78
4.6.4	Experimentelles.....	79
4.7	Ergebnisse und Diskussion	79
4.7.1	^1H -NMR-Experimente	79
4.7.2	ROESY-Experimente.....	86
4.8	Zusammenfassung.....	88
5	„Molecular Modelling“-Studien über Cyclodextrin-Dipeptid-Einschlusskomplexe ...	89
5.1	„Molecular Modelling“	89
5.1.1	Wissensbasierte Ansätze	90
5.1.2	Kraftfeldmethoden	90
5.1.3	Moleküldynamik	91
5.2	Moleküldynamik-Simulationen von Dipeptiden mit β -Cyclodextrin ..	92
5.2.1	Experimentelles.....	93
5.2.2	Ergebnisse und Diskussion	96
5.3	Zusammenfassung.....	99
6	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen mit ungewöhnlichen Aminosäuren.....	100
6.1	Einleitung	100
6.1.1	Elektrophorese.....	100
6.1.2	Apparatur.....	100
6.1.3	Elektroosmotischer Fluss	101
6.1.4	Methoden der Kapillarelektrophorese.....	101
6.1.5	Enantiomerentrennungen mit Cyclodextrinen	102
6.2	Kapillarelektrophoretische Trennung der Enantiomere von tert.-Butylalanin sowie dessen Germanyl- und Silyl-Analoga	103

6.2.1	Experimentelles	104
6.2.2	Ergebnisse und Diskussion	104
6.3	Trennung der Enantiomere von tert.-Butylglycin mit indirekter Detektion.....	106
6.3.1	Experimentelles	107
6.3.2	Ergebnisse und Diskussion	108
6.4	Zusammenfassung	109
7	Vergleich der Ergebnisse aus den spektroskopischen, kapillarelektrophoretischen und potentiometrischen Messungen und den MD-Simulationen	110
8	Zusammenfassung.....	114
9	Summary	117
10	Anhang	120
10.1	Publikationsverzeichnis	120
10.1.1	Posterpräsentationen	120
10.1.2	Originalarbeiten	121
10.2	Lebenslauf.....	122
11	Literaturverzeichnis.....	123

1 Einleitung

1.1 Chiralität

1.1.1 Isomerie

Moleküle mit derselben Summenformel, aber unterschiedlichem räumlichen Aufbau, bezeichnet man als Isomere.¹ Strukturisomere unterscheiden sich in der Reihenfolge der aneinander gebundenen Atome. Mit dem Begriff Stereoisomere bezeichnet man Isomere, deren Atome in derselben Reihenfolge aneinander gebunden sind, die aber in der räumlichen Anordnung verschieden sind, oder aber Konfigurationsisomere, das sind die relativ stabilen cis-trans-Isomere. So können bei organischen Verbindungen durch Rotation um eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfachbindung Konformationsisomere (Konformere, Rotamere) entstehen.

Ein dritter Typ von Stereoisomeren sind Enantiomere (griech. *enantios*, entgegengesetzt): das sind Verbindungen, bei denen sich das Bild nicht mit dem Spiegelbild zur Deckung bringen lässt. Diese Verbindungen besitzen keine Spiegelebene, sie sind chiral (griech. *cheir*, Hand oder Händigkeit). Im Gegensatz dazu bezeichnet man Strukturen, die sich mit ihrem Spiegelbild zur Deckung bringen lassen, als achiral. Achirale Verbindungen besitzen mindestens ein Symmetriezentrum oder eine Symmetrieebene.

Enantiomere sind einander sehr ähnlich: alle Bindungen sind identisch, ihr Energiegehalt ist derselbe, deswegen sind auch die meisten physikalischen Eigenschaften von zwei verschiedenen Enantiomeren identisch. Man kann zwei Enantiomere nur unterscheiden, wenn man sie in eine chirale Umgebung bringt oder ihre Wechselwirkung mit linear polarisiertem Licht untersucht.²

1.1.2 Physikalische Grundlagen der Drehung von linear polarisiertem Licht

Elektromagnetische Wellen sind transversal, d. h. der elektrische und der magnetische Feldvektor stehen senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Licht, in dem das elektrische Feld immer nur in einer Richtung (oder der Gegenrichtung dazu) steht, heißt linear polarisiert. Die Richtung des elektrischen Vektors heißt Polarisationsrichtung. Die zu dieser Richtung

senkrechte Ebene, in der die Ausbreitungsrichtung und der Magnetfeldvektor liegen, wird manchmal irreführenderweise Polarisationssebene genannt.

Kristalle oder Filter, die aus natürlichem Licht polarisiertes machen, heißen Polarisatoren. Ein linearer Polarisator lässt nur Licht einer bestimmten Schwingungsebene passieren. Die Amplitude, die den Polarisator passiert, sei A . Ein anderer Polarisator, der gegen den ersten um den Winkel α verdreht ist, lässt von A wieder nur die Komponente $A' = A \cos \alpha$ durch, die in seine Durchlassebene fällt. Medien, in denen die Lichtgeschwindigkeit in allen Richtungen gleich ist, nennt man optisch isotrop, so z. B. Gase, die meisten homogenen Flüssigkeiten und feste Körper, sofern sie amorph sind (Glas) oder dem regulären (kubischen) Kristallsystem angehören (Steinsalz, Diamant). Die meisten Kristalle sind jedoch optisch anisotrop, d. h. die Geschwindigkeit des Lichtes ist im Kristall nicht in allen Richtungen gleich, sondern abhängig von seiner Polarisationsrichtung.

Manche Stoffe drehen linear polarisiertes Licht auch im flüssigen oder gelösten Zustand, weil ihre Molekülstruktur asymmetrisch ist: Man kann sich eine ebene, linear polarisierte Welle in zwei zirkular polarisierte Wellen zerlegt denken, die sich mit der gleichen Frequenz und Phasengeschwindigkeit ausbreiten. Haben diese beiden zirkular polarisierten Wellen die gleiche Frequenz und Phasengeschwindigkeit, dann ist das Medium optisch inaktiv, und es resultiert zu jedem Zeitpunkt t die ursprüngliche Schwingungsrichtung des Vektors \vec{E} . Haben diese beiden zirkular polarisierten Wellen die gleiche Frequenz, aber unterschiedliche Phasengeschwindigkeit, so resultiert daraus eine Drehung des linear polarisierten Lichtes. Möge die rechtsdrehende zirkular polarisierte Welle eine größere Phasengeschwindigkeit haben als die linksdrehende. Wenn der Vektor \vec{E}_l der linksdrehenden Welle nach mehreren Umläufen wieder die Anfangslage erreicht hat, hat der Vektor \vec{E}_r der rechtsdrehenden Welle am gleichen Ort schon darüber hinaus gedreht. Die Resultierende liegt nun in einer Ebene, die den Winkel zwischen \vec{E}_l und \vec{E}_r halbiert. Um diesen Winkel $\Psi/2 = \alpha$ hat sich also die Schwingungsrichtung der linear polarisierten Welle gedreht. Wenn nach der gleichen Zahl von Umläufen, also nach der doppelten Zeit, der Vektor der linksdrehenden Welle wieder die Anfangslage erreicht hat, ist der Winkel $\Psi = 2\alpha$, den der Vektor der rechtsdrehenden Welle mit \vec{E}_l einschließt, doppelt so groß geworden. Die resultierende lineare Schwingung hat sich wieder um $\Psi/2 = \alpha$ gedreht. So schraubt sich die linear polarisierte Welle auf einer Schraubenfläche durch die drehende Substanz hindurch. Der Winkel wächst mit jeder Schwingung, und daher muss der Drehwinkel der Schichtdicke proportional sein (siehe Abbildung 1.1-1).³

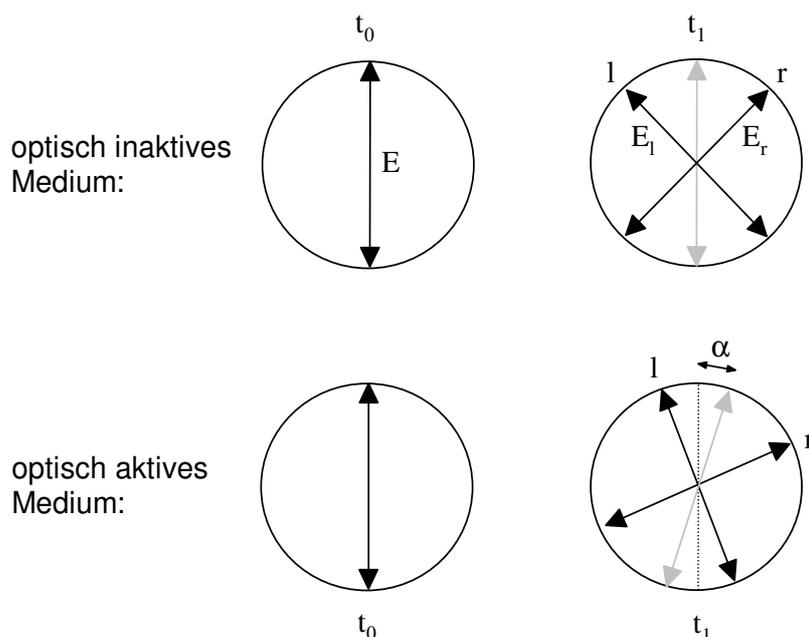


Abbildung 1.1-1: Zerlegung der linear polarisierten Lichtwelle in eine rechts- und eine linkszirkular polarisierte Lichtwelle.

Der Drehwinkel α hängt von der verwendeten Wellenlänge ab:

$$\alpha = \frac{180(n_l - n_r)l}{\lambda_0} \quad \text{Gleichung 1.1-1}$$

mit α = Drehwinkel in Grad

l = Schichtdicke

λ_0 = Vakuum-Wellenlänge in denselben Längeneinheiten

n_l, n_r = Brechzahlen⁴

1.1.3 Arten der Chiralität

Hat ein Molekül mehr als ein Chiralitätszentrum, kommt es zur Bildung von Diastereomeren. Dies sind Stereoisomere, die sich zueinander nicht wie Bild und Spiegelbild verhalten. Sie haben unterschiedliche physikalische Eigenschaften. Es ist nicht erforderlich, dass die Chiralitätszentren bei Diastereomeren direkt benachbart sind. Bei zwei gleich substituierten Chiralitätszentren gibt es nur drei anstatt vier Stereoisomere, eines davon ist die *meso*-Form (mesos, griech. Mitte). Alle Mesoverbindungen besitzen eine Spiegelebene, die das eine Chiralitätszentrum auf das andere abbildet. Sie sind also achiral.²

Je nach den in den Molekülen vorhandenen Chiralitätselementen kann man unterscheiden zwischen

- zentraler Chiralität: mit Chiralitätszentrum
- axialer Chiralität: mit Chiralitätsachse
- planarer Chiralität: mit Chiralitätsebene
- helicaler Chiralität: spiraling gebaute Moleküle

Die weitaus meisten organisch optisch aktiven Verbindungen sind von zentraler Chiralität, sie enthalten ein Kohlenstoffatom, das mit vier verschiedenen Substituenten verbunden ist. Es gibt jedoch auch eine ganze Reihe optisch aktiver Verbindungen ohne asymmetrisch substituierte C-Atome, und ebenso existieren Substanzen, die zwar asymmetrisch substituierte C-Atome enthalten, aber trotzdem nicht optisch aktiv sind. Das Vorhandensein eines asymmetrisch substituierten C-Atoms ist also weder eine notwendige, noch eine ausreichende Bedingung für das Auftreten optischer Aktivität.

Optische Aktivität ist sogar dann möglich, wenn das Chiralitätszentrum mit zwei verschiedenen Isotopen ein und desselben Elements verbunden ist. α -Deuteroethylbenzen (Abbildung 1.1-2) tritt in zwei optisch aktiven Enantiomeren auf.

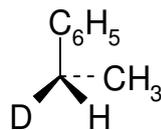


Abbildung 1.1-2: α -Deuterethylbenzen

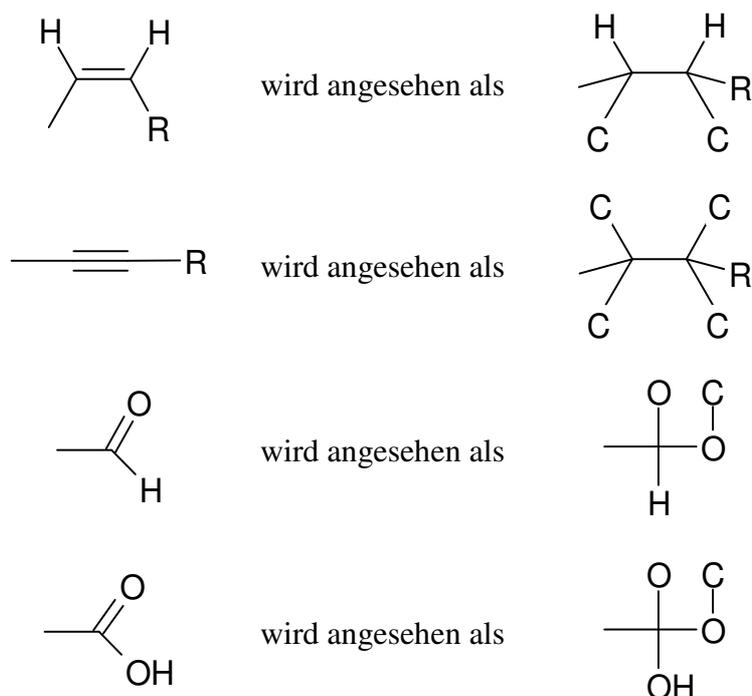
Selbst wenn die „symmetriestörenden“ Isotopen vom Chiralitätszentrum weiter entfernt sind, wie etwa in den Verbindungen $\text{CH}_3\text{-CHOH-CD}_3$ oder $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CHOH-CD}_3$, lassen sich die Enantiomere trennen und durch ihre spezifische Drehung charakterisieren. Diese ist in solchen Fällen allerdings meist sehr klein.⁵

1.1.4 Nomenklatur von chiralen Verbindungen

Ein Nomenklaturprinzip, welches die eindeutige Wiedergabe der Konfiguration eines asymmetrisch substituierten C-Atoms erlaubt, wurde von Cahn, Ingold und Prelog angegeben (Sequenzregel). Zu diesem Zweck ordnet man die an ein asymmetrisch substituiertes C-Atom gebundenen Substituenten nach abnehmender Priorität. Dazu gilt es, drei Grundregeln zu beachten

1. Die Priorität ergibt sich aus der Ordnungszahl des gebundenen Atoms. Ein Substituent mit höherer Ordnungszahl hat höhere Priorität als einer mit niedrigerer Ordnungszahl. Bei Isotopen desselben Elements hat dasjenige mit der größeren Masse die höhere Priorität.

2. Besitzen zwei Substituenten dieselbe Priorität, wenn man die direkt ans Chiralitätszentrum gebundenen Atome betrachtet, führt man dieselbe Einstufung entlang beider Ketten solange weiter, bis in beiden Ketten ein Unterschied in der Priorität auftaucht.
3. Doppel- und Dreifachbindungen werden wie gesättigte Verbindungen behandelt, wie im Folgenden gezeigt:



Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration kann man das Vorzeichen der optischen Drehung nicht heranziehen. Stattdessen muss man besondere Verfahren der Röntgenbeugung oder chemische Korrelationen benutzen.²

1.2 Pharmazeutische Relevanz von Enantiomeren

Eine Vielzahl von klinisch relevanten Arzneistoffen wird in Form von Racematen, d. h. aus gleichen Teilen von zwei Enantiomeren eingesetzt. Die Interaktion mit einem ebenfalls chiralen körpereigenen Protein (z. B. einem Rezeptor) lässt somit starke Unterschiede zwischen beiden Enantiomeren erwarten. In der Pharmakokinetik sind Unterschiede zwischen den Enantiomeren allerdings nur bei solchen kinetischen Prozessen zu erwarten, bei denen chirale körpereigene Makromoleküle beteiligt sind und mit den Enantiomeren Diastereomere mit unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften bilden. In der Resorption als einem in der Regel passiven Diffusionsvorgang unterscheiden sich Enantiomere nur selten. Beim aktiven Transport hingegen wird häufig ein Enantiomer bevorzugt. Bei der Plasmaproteinbindung und der Bindung an Gewebsproteine ist ebenfalls ein

Unterschied zwischen den Enantiomeren zu erwarten, da Proteine, wie oben schon erwähnt, hochchirale Moleküle darstellen.^{6,7,8,9}

Die stärksten Unterschiede in der Enantiomerenkinetik findet man jedoch in der Biotransformation. Durch Bindung eines Racemats an die optisch aktiven biotransformierenden Enzyme entstehen diastereomere Enzym-Substrat-Komplexe mit der Folge, dass die beiden Enantiomere mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und damit in verschiedenem Ausmaß metabolisiert werden können.¹⁰

Das stärker wirksame Enantiomere wird nach Ariens Eutomer, das schwächer (bis nicht) wirksame Enantiomer Distomer genannt.^{11,12,13} Bezüglich der pharmakodynamischen Unterschiede gilt die Pfeiffersche Regel: Je wirksamer eine Substanz ist, desto größer sind im Allgemeinen die Wirkungsunterschiede zwischen den Enantiomeren. Oder anders ausgedrückt: Da hohe Wirkstärke voraussetzt, dass das Pharmakon gut an bzw. in die Rezeptorbindungsstelle passt, machen sich Veränderungen in der Geometrie von hochaktiven Substanzen stark bemerkbar.

Aber nicht immer haben zwei Enantiomere unterschiedliche pharmakologische Wirkungen, wie das Beispiel des Lovastatins¹⁴ zeigt. Hier sind beide Enantiomere gleich wirksam. Dieser Effekt wurde von Ariens als „silent chirality“ bezeichnet, was bedeutet, dass das Asymmetriezentrum an der Wechselwirkung mit dem Rezeptor oder dem Enzym nicht beteiligt ist, weshalb die unterschiedliche Stereochemie keinen Einfluss auf die pharmakologische Wirkung hat.

Da eine Vielzahl von Arzneistoffen als Racemate und nicht als reine Enantiomere im Handel ist, hat die unterschiedliche Wirkung von Enantiomeren große theoretische und praktische Bedeutung. Sofern ein Enantiomer wirkt, das andere dagegen nicht, so bedeutet das nach Ariens, dass bei Gabe des Racemats 50 % des applizierten Arzneistoffs als unwirksame „Verunreinigung“, als „isomerer Ballast“ anzusehen sind.^{11,12,13,14} Diese globale Verdammung der Racemate ist allerdings nicht unbedingt berechtigt.¹⁵ Es ist zu beachten, dass Eutomer und Distomer sich aufgrund eines verschiedenen Wirkmechanismus auch ergänzen können, wie z. B. beim Bupivacain,¹⁶ oder das Distomer die Metabolisierung des Eutomers positiv beeinflussen kann, wie z. B. beim Amphetamin.¹⁷ Die US-amerikanische „Food and Drug Administration“ (FDA) und andere arzneimittelrelevante Behörden fordern verstärkt von den Arzneimittelherstellern vor der Einführung eines neuen Produkts Nachweise über die Wirkung, d. h. Pharmakologie und Toxikologie der einzelnen Enantiomere und des Racemats.¹⁸

1.3 Cyclodextrine

Cyclodextrine entstehen durch enzymatische Hydrolyse von Stärke mittels Glucosyltransferasen wie sie z. B. in *Bacillus macerans* vorkommen. Sie wurden zuerst im Jahre 1891 von Villiers entdeckt,¹⁹ ausführlich beschrieben wurden sie jedoch 1903 von Schardinger,^{20,21} weswegen man in der Literatur auch häufig den Namen „Schardinger-Dextrine“ findet. Sie bestehen aus sechs bis acht ringförmig α -1-4-verknüpften Glucosemolekülen und stellen dadurch hochchirale Moleküle dar. Abbildung 1.3-1 zeigt die Strukturformel von β -Cyclodextrin, das aus 7 Glucosemonomeren besteht.

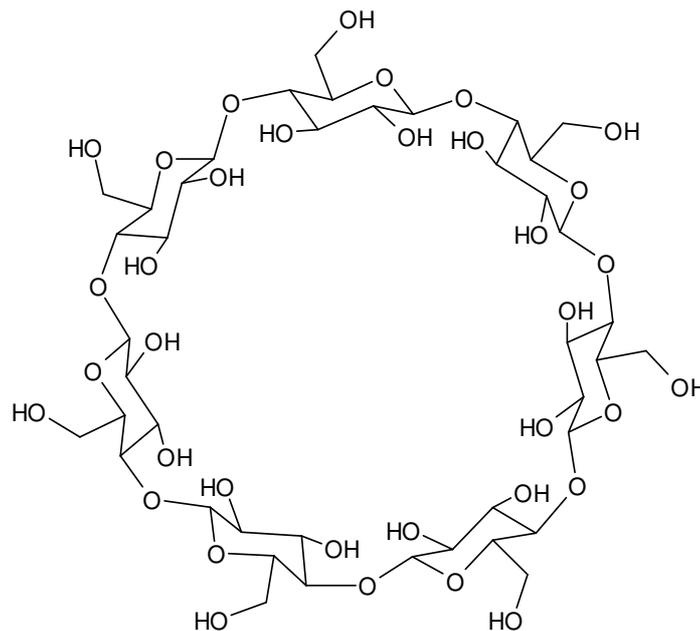


Abbildung 1.3-1: Struktur von β -Cyclodextrin

Durch die 4C_1 -Konformation der Glukopyranoseeinheiten ergibt es sich, dass sich alle sekundären Hydroxylgruppen am oberen, weiteren Rand des Torus befinden, wohingegen sich alle primären Hydroxylgruppen am unteren, engeren Rand des konischen Zylinders befinden. Im Inneren der Kavität befinden sich die Wasserstoffatome und die glykosidischen Sauerstoffbrücken. Die nichtbindenden Elektronen der glykosidischen Sauerstoffbrücken weisen in das Innere der Kavität hinein und erzeugen dort eine hohe Elektronendichte, was der Kavität Lewis-Basen-Charakter verleiht. Der Durchmesser der Cyclodextrin-Kavität ist auf der Seite, auf der sich die sekundären Hydroxylgruppen befinden, etwas größer als auf der Seite mit den primären Hydroxylgruppen, nachdem freie Rotation der letzteren den effektiven Durchmesser der Kavität reduzieren.

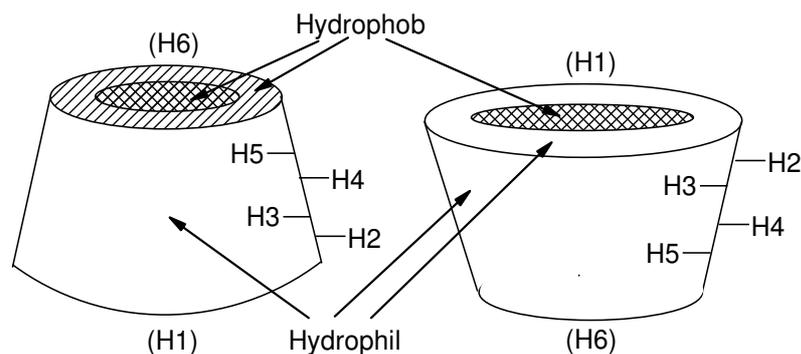


Abbildung 1.3-2: schematische Darstellung eines nativen Cyclodextrins

Die C-2-Hydroxylgruppe einer Glukopyranoseeinheit kann mit der C-3-Hydroxylgruppe der benachbarten Glukopyranoseeinheit eine Wasserstoffbrückenbindung bilden. Im β -Cyclodextrin bildet sich ein kompletter Gürtel aus diesen Wasserstoffbrückenbindungen, so dass sich eine rigide Struktur ausbildet. Das erklärt vermutlich, warum β -Cyclodextrin die geringste Löslichkeit von allen Cyclodextrinen besitzt. Im α -Cyclodextrin ist dieser Gürtel unvollständig, weil sich eine Glukopyranoseeinheit in einer verschobenen Position befindet, deswegen bilden sich statt der sechs möglichen Wasserstoffbrückenbindungen nur vier aus. Das γ -Cyclodextrinmolekül besitzt eine nichtplanare, flexiblere Struktur und ist deswegen das am besten lösliche der drei nativen Cyclodextrine.²²

Einige Eigenschaften der drei nativen Cyclodextrine sind in Tabelle 1-1 dargestellt:

Tabelle 1-1: Charakteristische Eigenschaften von α -, β - und γ -CD²²

Parameter	α -CD	β -CD	γ -CD
Anzahl der Glucoseeinheiten	6	7	8
Molmasse [Da]	972	1135	1297
Löslichkeit in H ₂ O bei R. T. [g/100 ml]	14,5	1,85	23,5
$[\alpha]_D$ bei 25 °C	150 ± 0,5	162 ± 0,5	177,4 ± 0,5
ø der Kavität [pm]	470 - 530	600 - 650	750 - 830
Höhe des Torus [pm]	790 ± 10	790 ± 10	790 ± 10
Äußerer ø [pm]	1460 ± 40	1540 ± 40	1750 ± 40
Volumen der Kavität [10 ⁶ pm ³]	174	262	427
pK _s bei 25 °C	12,332	12,202	12,81

1.4 Cyclodextrin-Einschlusskomplexe

Durch ihre ringförmige Struktur sind Cyclodextrine geradezu prädestiniert, andere kleinere Moleküle einzuschließen. Da dabei keine kovalenten Bindungen gebildet werden, ist das Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht eine der charakteristischsten Größen, um die Bildung eines Einschlusskomplexes in Lösung zu beschreiben.

Der Einschluss eines Gastmoleküls in die Cyclodextrin-Kavität ist im Wesentlichen eine Substitution der eingeschlossenen Wassermoleküle durch ein weniger polares Gastmolekül. Die Triebkraft dieser Komplexierung ist noch immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie ist aber in jedem Fall durch das Zusammenspiel mehrerer Effekte bedingt.²²

Je nach Art des Gastes und des Cyclodextrins können dies in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße sein:

- Sterische Anpassung („fit“)
- Van-der-Waals-Wechselwirkungen
- Dispersionskräfte
- Dipol-Dipol-Wechselwirkungen
- Charge-Transfer-Wechselwirkungen
- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Wasserstoffbrückenbindungen²³

Van-der-Waals-Kräfte resultieren aus Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und sind verhältnismäßig schwach. Ihr Energiegehalt ist proportional zur molekularen Polarisierbarkeit, die wiederum proportional zur molekularen Refraktion ist.

Wasser spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen, nachdem die Hydratisierung des Cyclodextrin-Einschlusskomplexes gegenüber der Hydratisierung der einzelnen Komponenten energetisch begünstigt ist. Dieses Phänomen wird als hydrophobe Wechselwirkungen bezeichnet und wird hauptsächlich durch die intrinsische Kohäsion des Wassers und nicht durch die Anziehung der beiden Komponenten hervorgerufen.

Die Bildung eines Cyclodextrin-Komplexes geschieht in den folgenden Schritten:

1. Die in der CD-Kavität eingeschlossenen Wassermoleküle verlassen die Kavität, wobei ihr Energieniveau gleich dem in der Gasphase ist.
2. Im Falle von α -CD und mit einem Deckel überbrücktem β -CD (capped β -CD) verringert sich durch Entspannung des CD-Ringes seine Konformationsenergie.
3. Das apolare Gastmolekül streift seine Hydrathülle ab und nimmt ebenfalls den Status eines idealen Gases an. Die leere Hydrathülle verliert ihre Struktur und arrangiert sich neu.
4. Das Gastmolekül dringt in die leere CD-Kavität ein. Der Komplex wird durch van-der-Waals-Wechselwirkungen und manchmal auch durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert.

5. Die aus der Kavität ausgetretenen Wassermoleküle, deren Energieniveau gleich dem in der Gasphase ist (siehe Schritt 1), „kondensieren“ in die flüssige Phase. Die daraus resultierenden Änderungen von Enthalpie und Entropie sind identisch mit denen der Wasser-Kondensation.
6. Die Struktur des Wassers um den aus der Kavität herausragenden Teil des Gastmoleküls herum wird wiederhergestellt und in die Cyclodextrin-Hydrathülle integriert.²²

1.5 Trennung von Enantiomeren mit Hilfe von Cyclodextrinen

Die analytische und/oder präparative Trennung von Molekülen, insbesondere von Enantiomeren, findet ihre Anwendung in vielen Bereichen der Chemie, so z. B. in der pharmazeutischen Chemie, Naturstoff- und Lebensmittelchemie. Dabei wird große Aufmerksamkeit auf den Mechanismus der Bildung von Einschlusskomplexen gelegt mit dem Ziel, selektivere, effizientere und empfindlichere Methoden zu entwickeln.

In Tabelle 1-2 sind einige Wirtsmoleküle aufgeführt, die in Chromatographie und Elektrophorese verwendet werden. Cyclodextrine und ihre Derivate haben dabei eine herausragende Stellung wegen ihrer ungewöhnlichen Eigenschaften, die es erlauben, eine große Bandbreite von Molekülen einzuschließen.

Tabelle 1-2: Wirtsmoleküle für Einschlusskomplexe, die in Chromatographie und/oder Elektrophorese verwendet werden.

<i>Kristallstruktur</i>	<i>Form der Kavität</i>		
	<i>Käfige</i>	<i>Kanäle</i>	<i>Schichten</i>
variabel	Hydrochinon Werner-Komplexe	Harnstoff Thioharnstoff tri- <i>O</i> -Thymotid	Cycloveratryl Me-Naphthalin
permanent	Cyclodextrine Kronenether Calixarene tri- <i>O</i> -Thymotid	Zeolithe Stärke Zellulose Cyclodextrine Kronenether	Graphit Bentonit

Die zurzeit üblichen Anwendungen von Cyclodextrinen und ihren Derivaten bei analytischen Trennmethode sind in Tabelle 1-3 dargestellt.

Tabelle 1-3: Die Verwendung von Cyclodextrinen bei analytischen Trennmethoden

<i>Methode</i>	<i>System</i>	<i>Verwendung des Cyclodextrins im System</i>
Chromatographische Methoden:		
Gaschromatographie	GSC	Aufbringen auf inertes Trägermaterial oder immobilisiert (chemisch gebunden)
	GLC	Selektive Komponente einer flüssigen stationären Phase oder flüssige CD-Derivate oder chemisch gebunden
Flüssigchromatographie	HPLC TLC HPTLC	chemisch gebundene stationäre Phase oder Additiv zur mobilen Phase
Überkritische Flüssigchromatographie	SFC	chemisch gebunden - immobilisiert
Elektromigrationsmethoden:		
Kapillarzonenelektrophorese	CZE	Additiv zum Hintergrundelektrolyten
(Mizellare) Elektrokinetische Chromatographie	EKC/ MEKC	geladene CD-Derivate als Transporter oder Additiv zu mizellaren Elektrolytsystemen
Elektrochromatographie und Kapillargelelektrophorese	EC/ CGE	chemisch gebunden an die innere Kapillarwand oder in die Gelmatrix inkorporiert
Isotachophorese	ITP	Additiv zum Leitelektrolyten

In der Gaschromatographie werden CDs und ihre Derivate immer als stationäre Phase verwendet, im Gegensatz zu den flüssigchromatographischen Methoden. Feste CDs auf inerten Trägern, chemisch gebundene oder auf andere Weise immobilisierte CDs werden in der Gas-Festphasenchromatographie (gas solid chromatography, GSC) verwendet, wohingegen niedrig schmelzende CD-Derivate oder CDs in Lösung die stationäre Phase in der Gas-Flüssigchromatographie (gas liquid chromatography, GLC) darstellen. Die Bildung von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen, die die Grundlage der selektiven Trennung darstellen, wurde zunächst in fester und flüssiger Phase untersucht und beschrieben. Diese Prozesse finden jedoch auch in der Gasphase statt, so dass sich Cyclodextrine und ihre Derivate als Trennmedien in der Gaschromatographie (GC) einsetzen lassen, und zwar einerseits zur Trennung chemisch und physikalisch sehr ähnlicher Komponenten und andererseits zur Trennung von Enantiomeren.²⁴

Die überkritische Flüssigchromatographie (supercritical fluid chromatography, SFC) ist in vielen Aspekten eine Zwischentechnik zwischen GC und LC. Die GC ist auf flüchtige Substanzen beschränkt, und Substanzen, die ohne sich zu zersetzen verdampft werden können, beispielsweise durch Derivatisierung, Pyrolyse oder spezielle chemische Reaktio-

nen. Im Falle der Enantiomerenanalytik kann hier eine Derivatisierung zu Racemisierung und Schwierigkeiten in der Spurenanalytik führen. Die SFC erweitert das Anwendungsbereich auf nichtflüchtige Verbindungen von hoher molekularer Masse, z. B. Pharmaka, Herbizide, Pestizide und thermolabile Substanzen. Ein anderer Vorteil, verglichen mit der Flüssigchromatographie, ist die Möglichkeit, einen Flammenionisationsdetektor (FID), wie in der GC üblich, einzusetzen. Mit angemessenen mobilen und stationären Phasen und gepackten Säulen kann mit der SFC die Effizienz der Gaschromatographie mit der Selektivität der Flüssigchromatographie kombiniert werden.^{25,26,27}

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) macht sich ebenfalls die hervorragenden Trenneigenschaften der Cyclodextrine zunutze, und zwar werden CDs einerseits als Additiva zur mobilen Phase verwendet, wie in der Dünnschichtchromatographie und in der Kapillarelektrophorese (s. u.), andererseits auch kovalent an das Packmaterial der Säule, meist Kieselgel, gebunden.²⁴

Die Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE) und ihre Modifikationen stellen eine andere effektive Anwendung für Cyclodextrine in analytischen Hochleistungstrennsystemen dar. Die Trennung wird in einer flüssigen Umgebung durchgeführt und kann sowohl Moleküle mit niedriger als auch mit hoher molekularer Masse berücksichtigen. Einige Verfahren und/oder Ergebnisse sind vergleichbar mit flüssigchromatographischen Trennungen, aber im Großen und Ganzen ist die CE eine zur Chromatographie orthogonale Technik. Die elektrophoretischen Methoden basieren auf der Trennung von Molekülen in einem elektrischen Feld. Die zu analysierenden Moleküle werden aufgrund ihrer unterschiedlichen effektiven Mobilität in einem geeigneten Trennmedium getrennt. Die Verwendung von Cyclodextrinen in diesem Gebiet ist wegen der Schnelligkeit und hoher Auflösung der Methode sehr verbreitet. Dabei werden die Cyclodextrine sowohl im Hintergrundelektrolyten verwendet als auch an die Oberfläche der Kapillare gebunden oder in das gegebenenfalls verwendete Polymergel eingebettet. In allen Fällen können die Cyclodextrine unterschiedlich starke Komplexe mit den zu trennenden Analyten bilden. Das kann zu unterschiedlichen effektiven Mobilitäten der komplexierten Spezies und somit zu einer Trennung führen.²⁸

Was bei all diesen Trenntechniken einen enormen Vorteil darstellt, ist, dass die nativen Cyclodextrine und auch die meisten ihrer Derivate durchsichtig für UV-Licht sind, d. h. die bei diesen Trenntechniken vorherrschende UV-Detektion kann störungsfrei angewendet werden.²⁴

Enantiomere lassen sich NMR-spektroskopisch nicht unterscheiden. Um dennoch feststellen zu können, ob ein reines Enantiomer oder ein Enantiomerengemisch vorliegt, kann man mit einem chiralen Hilfsreagenz Diastereomere erzeugen. Dabei ist es nicht notwendig, zwischen den beiden Komponenten eine kovalente Bindung zu knüpfen, sondern es genügt, wenn diastereomere Komplexe gebildet werden. Bestimmte Signale können dabei „auseinander rutschen“, und es lässt sich durch die Integration der nunmehr doppelt vorhandenen Signale das Enantiomerenverhältnis (die „optische Reinheit“) bestimmen.²⁹

Die Durchsichtigkeit der Cyclodextrine im Bereich des UV-Lichtes trifft für die ^1H -NMR-Spektroskopie nicht zu. Hier können Cyclodextrine zwar auch zur „Enantiomerentrennung“, in diesem Fall zur Aufspaltung bestimmter Signale des Analyten verwendet werden; es kommt also nicht zu einer wirklichen physikalischen Trennung. Jedoch nehmen die Cyclodextrin-Signale relativ viel Platz im ^1H -NMR-Spektrum ein, da die Cyclodextrine ja aus sechs bis acht chemisch äquivalenten Glucose-Einheiten bestehen, so dass ihre Signale bei einer 1:1-Mischung aus Analyt und Cyclodextrin sechs- bis achtfach größer sind als die des Analyten. Andererseits ist der Bereich der Cyclodextrin-Signale jedoch relativ schmal (er liegt zwischen 3,4 und 5,2 ppm, dazu kommen noch Signale von eventuellen Substituenten, z. B. Acetyl-Wasserstoffe bei ca. 2 ppm); Analyt-Signale, die nicht in diesem Bereich liegen, können sehr gut integriert und zur Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses herangezogen werden. Im Gegensatz zu anderen chiralen Verschiebungsreagentien (chiral shift agents, CSA) führen Cyclodextrine nicht zu Signalverbreiterungen und weisen eine gute Wasserlöslichkeit auf. Durch Ausweichen auf das Untersuchen anderer Kerne als ^1H , so zum Beispiel ^{15}N oder ^{31}P , wird das Problem der störenden Cyclodextrin-Signale gänzlich umgangen. Voraussetzung dafür ist natürlich das Vorhandensein entsprechender Kerne im Analyten.³⁰

Viele organische Analyte und auch einige Metallkomplexe, die schwach oder gar nicht in wässrigen Lösungen fluoreszieren, weisen eine immense Fluoreszenz in organischen Lösungsmitteln auf. Für viele dieser Analyte führt das Hinzufügen von Cyclodextrinen zu wässrigen Lösungen derselben zu einem starken Anstieg der Fluoreszenz, vorausgesetzt, das entsprechende Molekül wird von der Cyclodextrinkavität komplexiert. Die Kavität bietet eine „Mikroumgebung“, die ähnlich einem organischen Lösungsmittel ist. Die mikroskopische Polarität der Cyclodextrinkavität ist vergleichbar mit der von organischen Lösungsmitteln wie Dioxan, 1-Octanol, Isopropylether und *t*-Amylalkohol.²⁴

1.6 Aminosäuren und Dipeptide

1.6.1 Aminosäuren

Proteine sind die häufigsten Makromoleküle in lebenden Zellen. Sie stellen 50% oder mehr der Zelltrockenmasse dar und finden sich in allen Zellen und Zellteilen. Alle Proteine, egal ob sie aus den ältesten Bakterienarten stammen oder aus den höchsten Formen des Lebens, bestehen aus demselben Satz von 20 Aminosäuren, die kovalent zu charakteristischen Sequenzen miteinander verbunden sind. Da jede dieser Aminosäuren eine für sie typische Seitenkette besitzt, welche ihr eine chemische Individualität verleiht, kann diese Gruppe von 20 Bausteinmolekülen als das „Alphabet“ der Proteinstruktur angesehen werden.³¹

Der menschliche (und tierische) Organismus kann nicht alle proteinogenen Aminosäuren selbst herstellen. Auf dieser Tatsache beruht die Einteilung der Aminosäuren in zwei Gruppen: zum einen die essentiellen Aminosäuren, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, zum anderen die nicht-essentiellen Aminosäuren, die im Körper meist über wenige Stufen aus α -Ketocarbonsäuren durch Transaminierung synthetisiert werden.³²

Unter bestimmten Umständen (z. B. schnelles Wachstum, Stress, Trauma) kann der Körper keine ausreichenden Mengen an Arginin und Histidin herstellen und muss diesen erhöhten Bedarf mit der Nahrung ausgleichen. Man bezeichnet diese beiden Aminosäuren deswegen häufig als semiessentiell. Beim Säugling zählen auch Cystein und Tyrosin in den ersten Wochen zu den so genannten essentiellen Aminosäuren, da der Intermediärstoffwechsel noch nicht genügend ausgebildet ist, um diese Aminosäuren selbst zu synthetisieren.^{32,33}

Aus pharmazeutischer Sicht sind Aminosäuren von großem Interesse. Sie werden eingesetzt als Nutritiva (z. B. Infusionslösungen für die parenterale Ernährung, perorale Spezialdiäten, Nahrungsmitteladditiva), Salzbildner für Wirkstoffe (z. B. Lysin-Acetylsalicylsäure), Puffersubstanzen (z. B. Glycin in Antacida), Elektrolytschlepper (z. B. Kalium-Magnesium-Aspartat), Stoffwechselregulanzien (z. B. Leucin, Isoleucin und Valin bei Leberzirrhose), Precursorsubstanzen für biogene Amine sowie als Ausgangsprodukte bei der Synthese zahlreicher wichtiger Arzneistoffe.^{32,34}

In allen Aminosäuren außer Glycin besitzt das α -Kohlenstoffatom vier verschiedene Substituenten, die Amino- und die Carboxylgruppe, ein Wasserstoffatom und eine Seitenkette R und ist daher chiral.

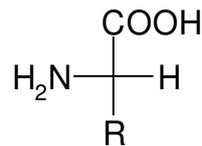


Abbildung 1.6-1: Allgemeine Struktur der in Proteinen enthaltenen Aminosäuren

Fast alle biologisch vorkommenden Verbindungen, die chirale Zentren enthalten, werden in der Natur nur in einer ihrer stereoisomeren Formen gefunden. Mit Ausnahme von Glycin, das kein chirales C-Atom besitzt, und Cystein, dessen β -Kohlenstoffatom eine Thiolgruppe trägt und deswegen erhöhte Priorität erhält, was zur R-Konfiguration (nach Cahn-Ingold-Prelog) führt, haben die 20 proteinogenen Aminosäuren, die in Tabelle 1-4 dargestellt sind, alle die S-Konfiguration (mit Ausnahme des Cysteins, das die R-Konfiguration besitzt) bzw. die L-Konfiguration (auch Cystein wird mit L bezeichnet). Bei Zuckern und Aminosäuren wird immer noch die D, L-Nomenklatur benutzt. Dabei steht „D“ für lateinisch „dexter“, das bedeutet „rechts“ und L für lateinisch „laevulus“, also „links“. Dazu wurde als Referenzverbindung Glycerinaldehyd gewählt, der einfachste Zucker mit einem asymmetrisch substituierten C-Atom. Seine Stereoisomeren, deren Konfigurationen durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurden, sind in Abbildung 1.6-2 dargestellt. Die beiden korrespondierenden Stereoisomeren der Aminosäure Alanin sind ebenfalls dargestellt.³¹

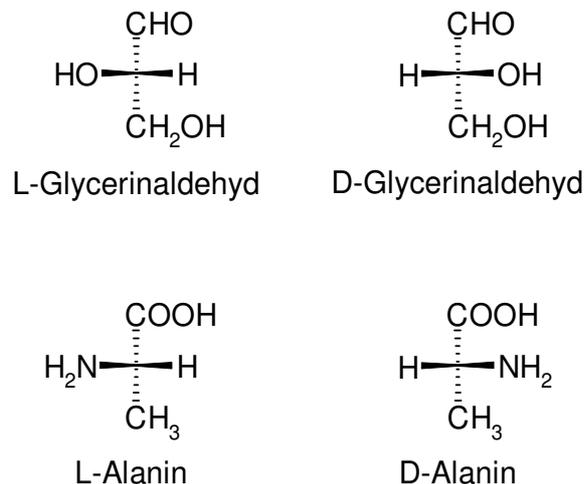


Abbildung 1.6-2: Sterische Beziehung der Enantiomere des Alanins zur absoluten Konfiguration des L- und D-Glycerinaldehyds

Aminosäuren sind in wässriger Lösung ionisiert und können als Säuren oder Basen wirken. Die in wässriger Lösung sauer wirkende Gruppe einer Aminosäure ist die $-\text{NH}_3^+$ -Gruppe, und der potentiometrisch bestimmbare pK_s -Wert misst die Säurestärke der protonierten

Aminogruppe. Die Basizität der Aminosäure (und der dazugehörige pK_b -Wert) wird durch die basische Wirkung der $-\text{COO}^-$ -Gruppe hervorgerufen. Dadurch existieren die freien Aminosäuren als „Zwitterionen“, weil das Carbonyl-Proton von der Aminogruppe gebunden wird.⁵

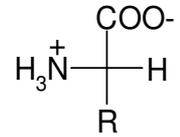
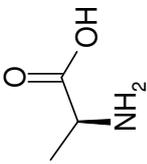
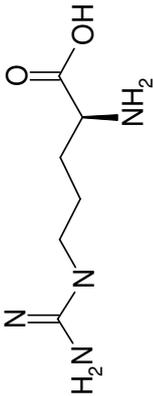
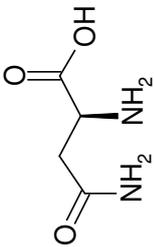
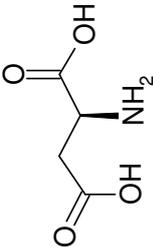
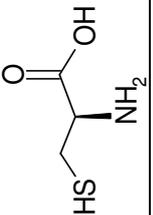
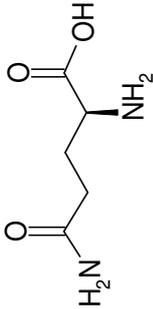
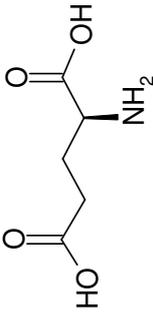
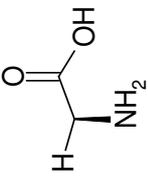
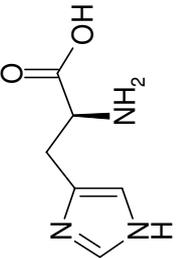
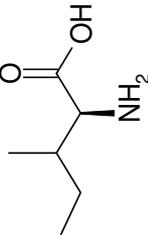
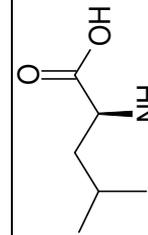
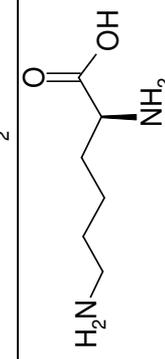
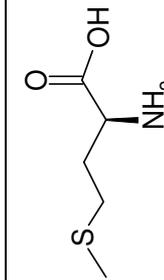
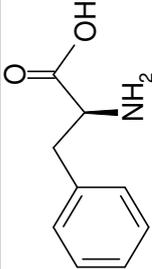
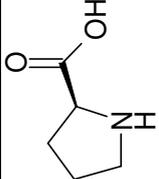
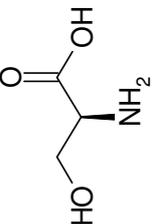
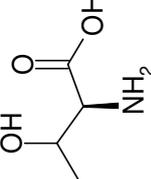
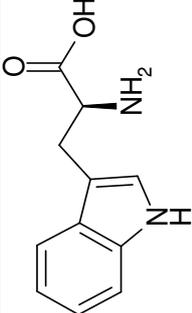
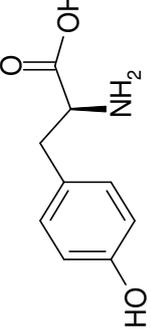
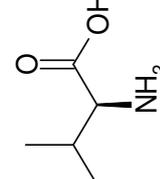


Abbildung 1.6-3: Zwitterionische Aminosäure

Tabelle 1-4: Die 20 proteinogenen Aminosäuren (nach Lit.³⁵)

Aminosäure	Struktur	3-Buchstaben-Code	1-Buchstaben-Code	Entdecker und erste Isolierung
L-Alanin		Ala	A	Weil aus Seidenfibroin (1888)
L-Arginin		Arg	R	Schulze et al. aus Lupinenkeimlingen (1886)
L-Asparagin		Asn	N	Vauquelin und Robiquet aus Spargelpflanzen (1806)
L-Asparaginsäure		Asp	D	Ritthausen aus Leguminosen (1866)
L-Cystein		Cys	C	Baumann aus Cystin durch Reduktion (1884)
L-Glutamin		Gln	Q	Schulze aus Zuckerrüben (1877)

L-Glutaminsäure		Glu	E	Ritthausen aus Leguminosen (1866)
Glycin		Gly	G	Braconnot aus Leim (1820)
L-Histidin		His	H	Kossel aus Sturin (1896)
L-Isoleucin		Ile	I	Ehrlich aus Melasse (1904)
L-Leucin		Leu	L	Proust aus Quark (1819)
L-Lysin		Lys	K	Drechsel aus Casein (1899)
L-Methiomin		Met	M	Müller aus Casein (1924)

L-Phenylalanin		Phe	F	Schulze und Bariberi aus Lupinenkeimlingen (1879)
L-Prolin		Pro	P	Fischer aus Casein (1901)
L-Serin		Ser	S	Cramer aus Seidenleim (1865)
L-Threonin		Thr	T	Rose et al. aus Fibrin (1935)
L-Tryptophan		Trp	W	Hopkins und Cole aus Casein (1901)
L-Tyrosin		Tyr	Y	Liebig aus Käse (1846)
L-Valin		Val	V	v. Corupbesanz aus Drüsenextrakten (1856)

Man unterscheidet vier Hauptklassen von Aminosäuren, nämlich solche mit

- a) unpolaren oder hydrophoben Seitenketten
- b) polaren, aber ungeladenen Seitenketten
- c) negativ geladenen Seitenketten und
- d) positiv geladenen Seitenketten

Hydrophobe Seitenketten sind ihrer Natur nach Kohlenwasserstoffe. Zu den Aminosäuren mit hydrophober Seitenkette zählen fünf Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten, nämlich Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Prolin, zwei mit aromatischen Ringen, Phenylalanin und Tryptophan und eine schwefelhaltige, Methionin. Beim Prolin liegt die α -Aminogruppe nicht frei vor, sondern ein Wasserstoff-Atom ist durch die Seitenkette unter Bildung einer cyclischen Struktur substituiert.

Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten enthalten funktionelle Gruppen, die Wasserstoffbrücken mit Wasser ausbilden. Zu ihnen gehören Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin und Glutamin. Cystein kann in Proteinen in zwei Formen vorkommen, entweder als Cystein selbst oder als Cystin. Letzteres besteht aus zwei Cysteinmolekülen, kovalent verbunden durch eine Disulfidbrücke, die durch Oxidation der Thiolgruppen entsteht. In manchen Proteinen sind die beiden Hälften des Cystinmoleküls als Bausteine in zwei verschiedenen Peptidketten verankert und verknüpfen diese durch die Disulfidbindung miteinander. Solche Quervernetzungen werden für gewöhnlich nicht in intrazellulären Proteinen gefunden, aber sie sind verbreitet in Proteinen, die in extrazelluläre Flüssigkeiten sezerniert werden und dort ihre Funktion ausüben.

Die beiden Aminosäuren, die bei pH 7 eine negativ geladene Seitenkette besitzen, sind Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Die Aminosäuren, die bei pH 7 eine positiv geladene Seitenkette haben, sind Lysin, welches eine zweite Aminogruppe in der ϵ -Position seiner aliphatischen Kette hat, Arginin, welches eine positiv geladene Guanidinogruppe besitzt, und Histidin, welches eine schwach ionisierte Imidazolgruppe enthält.³¹

1.6.2 Dipeptide

Zwei Aminosäuren können formal unter Wasserabspaltung zu einem Dipeptid kondensieren, man spricht von der Bildung einer Amidbindung (siehe Abbildung 1.6-4)

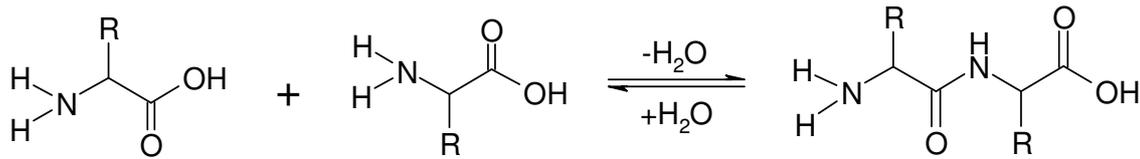


Abbildung 1.6-4: Kondensation zweier Aminosäuren (R = Seitenkette) zu einem Dipeptid

Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt bei Raumtemperatur allerdings ganz auf der linken Seite, da die Aminogruppe viel zu schwach nucleophil ist, um direkt mit der Carboxylgruppe ein Amid zu liefern. Die reaktiven Gruppen müssen also zunächst aktiviert werden, sei es nun im Labor durch chemische Modifikation der Carboxylgruppe oder im Organismus durch enzymatische Aktivierung. Man kann natürlich beliebig viele Aminosäuren aneinanderhängen; ein Molekül aus zwei Aminosäuren nennt man Dipeptid, eines aus drei Aminosäuren Tripeptid usw. bis hin zum Oligo- oder Polypeptid (griechisch: *oligos* = wenig, klein; *polymeres* = aus vielen Teilen).^{2,5}

Polypeptidketten bilden das primäre Strukturelement der Proteine. Auch gewisse Oligopeptide sind von großer biologischer Bedeutung: Glutathion, ein Tripeptid (γ -Glutamylcysteyl-glycin), das in den meisten lebenden Zellen auftritt, ist an Redoxvorgängen beteiligt. Gramacidin S ist ein cyclisches Peptid-Antibiotikum, das sich aus zwei identischen Pentapeptidketten zusammensetzt, die Kopf an Schwanz verbunden sind. Es enthält als Besonderheit zwei Moleküle D-Phenylalanin sowie Ornithin, ein niederes Homologes von Lysin. Aspartam (N-L- α -aspartyl-L-Phenylalanin-methylester, α -L-Asp-L-PheOMe, siehe Abbildung 1.6-5) ist ein kalorienarmes Süßungsmittel, das in zahlreichen Nahrungsmitteln, Getränken und pharmazeutischen Produkten angewendet wird.^{2,5}

Ogleich verhältnismäßig beständig in trockenem Zustand bei niedrigen Temperaturen, macht Aspartam einen pH- und temperaturabhängigen Abbau in Lösung durch. Die Abbaureaktionen schließen eine Zyklisierung sowie eine Hydrolyse der Ester- und Peptidbindungen ein.^{36,37} Die terminalen Abbauprodukte sind L-Asparaginsäure (Asp) und L-Phenylalanin (Phe). Zusätzlich wurde die Bildung von isomerem β -Aspartam (β -L-Asp-L-PheOMe)³⁸ sowie die Racemisierung von Asp- und Phe-Resten^{39,40} beobachtet. Die Halbwertszeiten der Racemisierung von Asp und Phe scheinen vom pH-Wert der Lösung abhängig zu sein.

Die Hydrolyse und die Oxidation, Isomerisierung und Racemisierung von Aminosäureresten sind als Mechanismen, die beim Altern von natürlichen Peptiden und Proteinen und bei der Inaktivierung von peptidischen pharmazeutischen Produkten während der Produktion und Lagerung eine Rolle spielen, erkannt worden.^{41,42} Asn und Asp neigen besonders zur

Isomerisierung und zur Racemisierung. Deswegen wurden die Enantiomere kleiner Asp-
Peptide im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. G. K. E. Scriba an der Universität Jena mit der
Kapillarelektrophorese getrennt.⁴³

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine wichtige analytische Technik geworden, die zur
HPLC und zur Gaschromatographie komplementär ist, für die Analyse von polaren Sub-
stanzen besonders gut anwendbar ist, und sich deshalb für die Analyse der Abbauprodukte
von Aspartam gut eignet. In der chiralen CE ist eine Umkehr der Migrationsreihenfolge ein
wichtiges Thema. Im Gegensatz zu chromatographischen Techniken, in denen normaler-
weise ein „Peak-Tailing“ beobachtet wird, kann in der CE sowohl ein „Tailing“ als auch
ein „Fronting“ der Peaks beobachtet werden. Abhängig von der Migration der Minorkom-
ponente verglichen mit der Migration des Hauptbestandteils, ist es häufig wünschenswert,
die Migrationsreihenfolge zu ändern, um die Nachweisgrenze und die quantitative Be-
stimmungsgrenze zu senken^{44,45} und die Reproduzierbarkeit zu erhöhen.⁴⁶ Dieses ist
besonders wichtig, wenn nur kleine Mobilitätsunterschiede zwischen der Verunreinigung
und dem Hauptbestandteil beobachtet werden. Die pH-abhängige Umkehr der Migrations-
reihenfolge der Enantiomere von kleinen Peptiden ist ein relativ neues Phänomen.^{47,48,49}

Ausgehend von den Abbauprodukten des Aspartams⁵⁰ wurden dann im Arbeitskreis von
Herrn Prof. Dr. G. K. E. Scriba an der Universität Jena systematische Studien über die
Trennung von Enantiomeren verschiedener Dipeptide mit einer Vielzahl von nativen und
derivatisierten Cyclodextrinen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt (siehe
Abbildung 1.6-5).^{51,52,53,54,55,56}

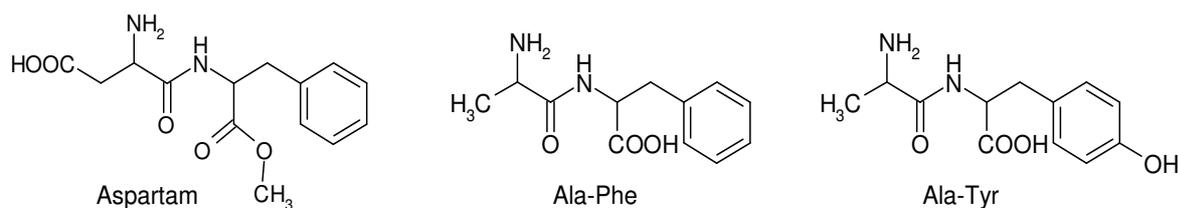


Abbildung 1.6-5: Aspartam und zwei der untersuchten Dipeptide

Bei der Trennung der Enantiomere von z. B. Ala-Phe oder Ala-Tyr mit β -Cyclodextrin
wurde eine Umkehr der Migrationsreihenfolge bei Erhöhung des Puffer-pH-Werts von 2,5
auf 3,5 festgestellt.⁵¹ Mit *Heptakis*-(6-sulfato)- β -cyclodextrin (HS- β -CD), *Heptakis*-(2,3-
O-diacetyl)- β -cyclodextrin (Diac- β -CD) und *Heptakis*-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -
cyclodextrin (HDAS- β -CD) wurde diese Umkehr der Migrationsreihenfolge nicht beo-
bachtet. Eine Übersicht liefert Tabelle 1-5.^{51,53,56}

Tabelle 1-5: Migrationsreihenfolge der Ala-Phe und Ala-Tyr-Enantiomere bei pH 2,5 und pH 3,5 mit jeweils 20 mg/ml des jeweiligen Cyclodextrins

	β -CD		HS- β -CD	
	pH 2.5	pH 3.5	pH 2.5	pH 3.5
Ala-Phe	LL>DD ^a	DD>LL	LL>DD	LL>DD
Ala-Tyr	LL>DD	DD>LL	LL>DD	LL>DD

	Diac- β -CD		HDAS- β -CD	
	pH 2.5	pH 3.5	pH 2.5	pH 3.5
Ala-Phe	DD>LL	kt ^b	DD>LL	DD>LL
Ala-Tyr	kt	kt	DD>LL	DD>LL

^a Das schneller migrierende Enantiomer ist zuerst aufgeführt. Die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge ist durch kursiven Fettdruck angedeutet.

^b kt, keine Trennung

Um Einblicke in die jeweiligen chiralen Erkennungsmechanismen zu bekommen, sollten in der vorliegenden Arbeit die Einschlusskomplexe von β -CD und den „Single Isomer“-Derivaten HS- β -CD, Diac- β -CD und HDAS- β -CD mit Alanyl-Dipeptiden mit Hilfe der Potentiometrie, CD-Spektroskopie, ¹H-NMR-Spektroskopie und „Molecular Modelling“-Methoden näher untersucht werden.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen Cyclodextrinen und Aminosäuren bzw. Dipeptiden gründlich und umfassend zu untersuchen. Dabei ging es in erster Linie um die Untersuchung der Mechanismen der chiralen Erkennung durch Cyclodextrine, die mit Hilfe von verschiedensten Analysemethoden, so vor allem potentiometrische Titration und NMR-Spektroskopie, untersucht werden sollte. Andere spektroskopische Methoden, v. a. die UV- und CD-Spektroskopie, sowie die Kapillarelektrophorese kamen als ergänzende Methoden zum Einsatz.

2 Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen

2.1 Einleitung

2.1.1 pK_s-Werte

Wenn ein Stoff in Wasser gelöst wird, kann er in seine korrespondierenden Ionen dissoziieren. Starke Elektrolyte sind in Wasser vollständig dissoziiert, schwache Elektrolyte dagegen nur unvollständig dissoziiert; dabei stehen gelöste Moleküle im Gleichgewicht mit Ionen. Für die Dissoziation einer Säure HA in Wasser gilt:



Das Massenwirkungsgesetz für die Dissoziationskonstante K lässt sich wie folgt formulieren:

$$K = \frac{c(\text{H}_3\text{O}^+) \cdot c(\text{A}^-)}{c(\text{HA}) \cdot c(\text{H}_2\text{O})} \quad \text{Gleichung 2.1-1}$$

Die Stoffmenge an H₂O, die zur Bildung von H₃O⁺-Ionen benötigt wird, ist sehr klein im Vergleich zur Stoffmenge des vorhandenen Wassers. Deshalb kann in verdünnten Lösungen die Konzentration des Wassers als konstant angesehen werden. Die konstante Größe c(H₂O) wird in die Gleichgewichtskonstante, die die Säuredissoziationskonstante K_s darstellt, mit einbezogen. Der Einfachheit halber wird die Bezeichnung c(H⁺) für c(H₃O⁺) verwendet; das so formulierte Massenwirkungsgesetz entspricht einer vereinfachten Reaktionsgleichung, in der das Wasser nicht vorkommt:



$$K_s = \frac{c(\text{H}^+) \cdot c(\text{A}^-)}{c(\text{HA})} \quad \text{Gleichung 2.1-2}$$

Daraus lässt sich die „Henderson-Hasselbalch-Gleichung“ (Gleichung 2.1-4) ableiten, die für Puffersysteme aus einer schwachen Säure und ihrer konjugierten Base gilt:

$$c(\text{H}^+) = K_s \frac{c(\text{HA})}{c(\text{A}^-)} \quad \text{Gleichung 2.1-3}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_s - \log \frac{c(\text{HA})}{c(\text{A}^-)} \quad \text{Gleichung 2.1-4}$$

Wenn $c(\text{HA}) = c(\text{H}^+)$, dann wird der Term $\log[c(\text{HA})/c(\text{A}^-)]$ gleich 0 und pH gleich $\text{p}K_s$, oder mit anderen Worten: der $\text{p}K_s$ -Wert einer Säure ist der pH-Wert, an dem das Verhältnis von Säure und konjugierter Base 1:1 beträgt.¹

2.1.2 Potentiometrie

Im Prinzip beruht die potentiometrische pH-Wert-Messung auf der Messung von Potentialdifferenzen zwischen zwei Halbzellen. Dafür hat man Messelektroden durch Kombination verschiedener Redoxpaare entwickelt, wobei sich heute die Einstabmessketten (Abbildung 2.1.1) durchgesetzt haben. Diese bestehen aus einem Doppelglasrohr aus zwei Halbzellen, einer äußeren Referenzelektrode und einer inneren Referenzelektrode, die über eine semipermeable Glasmembran mit der Messlösung verbunden ist. An dieser Glasmembran bildet sich eine Potentialdifferenz aus, die nur vom pH-Wert der Messlösung abhängt und von der Messkette gemessen wird.

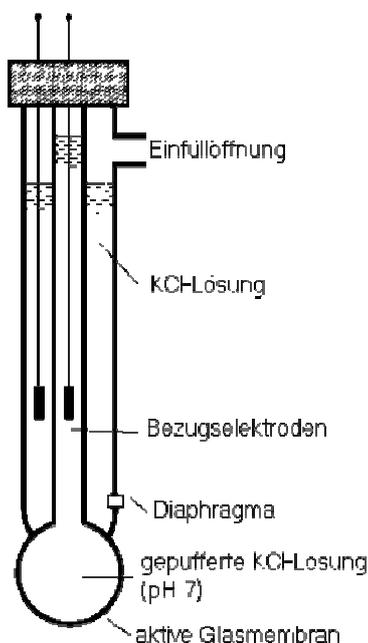


Abbildung 2.1.1: Längsschnitt durch eine pH-Einstabmesskette (nach Lit⁵⁷).

Eine Glaselektrode muss stets gut gewässert sein, was eine Quellung der äußeren Glasmembranwand zur Folge hat:



$\text{SiO}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ reagiert amphoter, d.h. es kann sowohl Protonen aufnehmen als auch abgeben. Besitzt nun die Messlösung einen geringen pH-Wert und demnach einen Überschuss an Hydroniumionen, so werden Protonen von der äußeren Glasmembranwand aufgenommen. Die äußere Seite der Glasmembran lädt sich damit positiv auf. Der Ladungstransport dieser positiven Ladung zur inneren Seite der Glasmembran erfolgt über die sich im Glas befindlichen Natrium-Ionen. An der inneren Seite der Glasmembran werden schließlich Protonen abgegeben, die von der Pufferlösung neutralisiert werden. Da für diesen Neutralisationsprozess Anionen verbraucht werden, müssen für einen Ladungsausgleich von der Ag/AgCl-Elektrode Cl^- -Ionen nachgeliefert und die dabei freiwerdenden Ag^+ -Ionen an der Ag-Elektrode reduziert werden. Die innere Bezugselektrode wird dadurch zur Kathode (Elektronen-Akzeptor). Gleichzeitig wird die äußere Bezugselektrode zur Anode (Elektronen-Donator). Dies bewirkt insgesamt eine Potentialdifferenz, die allein von der H^+ -Konzentration der Messlösung abhängt.⁵⁸

Die Größe der Potentialsprünge an der Vergleichs- und an der Ableitungselektrode sind für eine bestimmte Elektrode stets konstant, da ihr Potential nicht von der H^+ -Ionenkonzentration beeinflusst wird. Auch das Potential zwischen der inneren Gelschicht und der Pufferlösung ändert sich nicht. Lediglich das Potential an der Grenzfläche zwischen der Analysenlösung und der äußeren Gelschicht ist variabel und wird beschrieben durch die Gleichung:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{c(\text{H}^+; \text{Lsg.})}{c(\text{H}^+; \text{Gel})} = 0,059 \text{ Volt} \cdot \lg \frac{c(\text{H}^+; \text{Lsg.})}{c(\text{H}^+; \text{Gel})} \quad \text{Gleichung 2.1-6}$$

$c(\text{H}^+; \text{Gel})$ ist aber wegen der Pufferwirkung des Kieselsäure-Silicat-Puffers ebenfalls von der H^+ -Ionenkonzentration der Analysenlösung praktisch unabhängig, so dass der Potentialsprung an der Grenzfläche zwischen der Analysenlösung und der äußeren Gelschicht nur von $c(\text{H}^+; \text{Lsg.})$ abhängig ist:

$$E = E' + 0,059 \text{ Volt} \cdot \lg c(\text{H}^+; \text{Lsg.}) \quad \text{Gleichung 2.1-7}$$

Das Potential verschiebt sich bei einer Änderung der Konzentration um eine Zehnerpotenz (= eine pH-Einheit) um 59 mV.⁵⁹

Die Potentiometrie kann eine schnelle Möglichkeit zur Bestimmung von pK_a -Werten von Substanzen sein, vorausgesetzt, die Löslichkeit der Substanz beträgt mindestens 10^{-4} M. Lösungen, die bis zu einer Konzentration von 10^{-5} M verdünnt wurden, können dennoch analysiert werden, aber es muss der Elektrodenkalibrierung besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Kohlendioxid aus der Außenluft muss ausgeschlossen werden (oder es müssen Korrekturen im System für seine Anwesenheit gemacht werden). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Prozedur zum Kalibrieren der Glaselektrode verwendet, die auf einer Vier-Parameter-Gleichung⁶⁰ basiert und eine Fortführung der früheren Arbeit von Van Uitert und Haas darstellt.⁶¹

Die Reaktion der Glaselektrode ist abhängig von der Ionenstärke im Bereich von 0,05 bis 0,20 M (KCl)⁶⁰. Es ist möglich, akkurat im pH-Bereich von 1,5 bis 12,5 zu arbeiten, wenn entsprechende Sorgfalt angewendet wird.

2.1.3 Potentiometrische Bestimmungsmethode

Cyclodextrine können mit zahlreichen organischen (und anorganischen) Verbindungen Einschlusskomplexe bilden.⁶² Mit Hilfe der potentiometrischen Titration kann die Bindungskonstante solcher Einschlusskomplexe unter der Voraussetzung bestimmt werden, dass das Gastmolekül eine oder mehrere saure oder basische Gruppe(n) besitzt. Deren Dissoziationskonstanten in wässriger Lösung, die mittels potentiometrischer Titration ermittelt werden, können bei Komplexbildung mit einem Cyclodextrin im Vergleich zum unkomplexierten Gastmolekül größer oder kleiner werden.⁶³ Je mehr Cyclodextrin zu der Lösung hinzugegeben wird, desto größer sind die Verschiebungen der scheinbaren Dissoziationskonstanten von z. B. Aminosäuren.

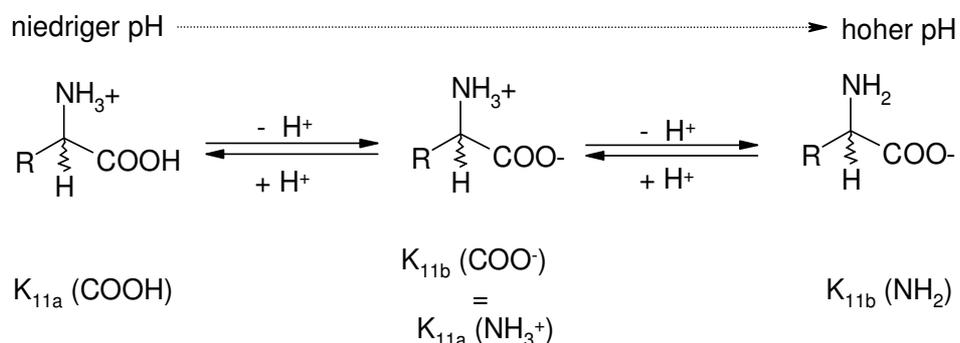
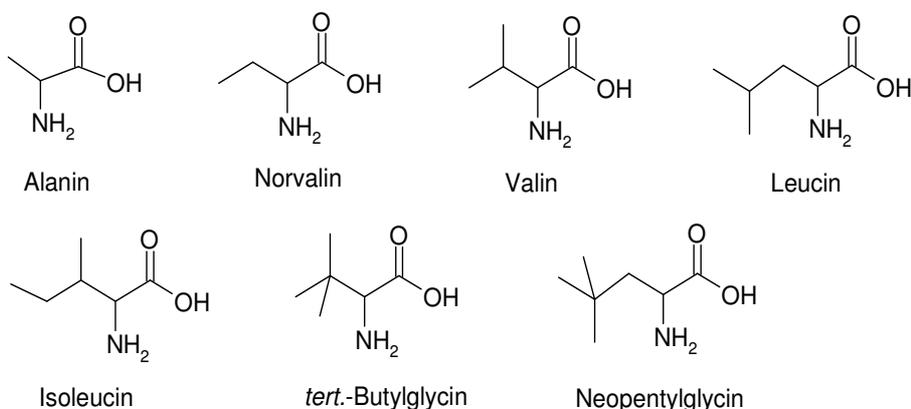


Abbildung 2.1.2: Verschiedene Protonierungszustände für Aminosäuren bei verschiedenen pH-Werten (der Index „11“ bezeichnet einen 1:1-Komplex, a und b stehen für die acidische bzw. basische Form der jeweiligen funktionellen Gruppe)

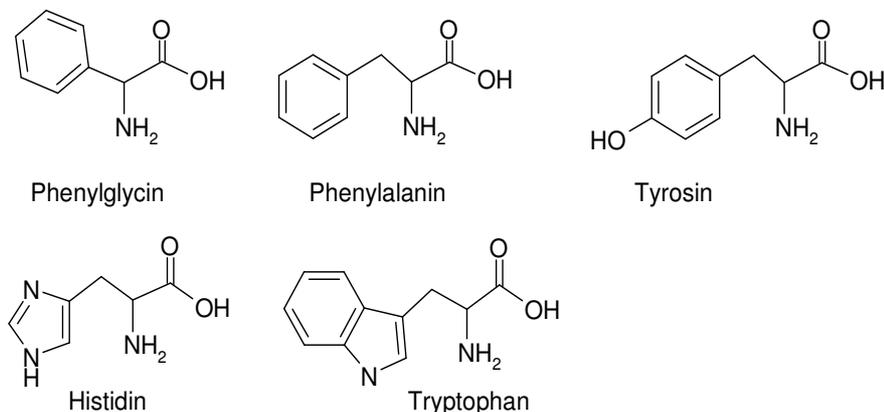
Mit Hilfe eines Benesi-Hildebrand-Plots⁶⁴ können die Bindungskonstanten für die protonierte und die deprotonierte Form des Gastmoleküls bestimmt werden. Da Aminosäuren mindestens zwei Dissoziationskonstanten aufweisen, eine für die Carboxylgruppe und eine für die Aminogruppe, kann für jede der drei verschiedenen Spezies der Aminosäure eine Bindungskonstante gefunden werden (siehe Abbildung 2.1.2).

In der vorliegenden Arbeit wurden viele verschiedene aliphatische und aromatische Aminosäuren mit Seitenketten unterschiedlicher Länge und unterschiedlichem Verzweigungsgrad untersucht; ebenso die Dipeptide Ala-Phe und Ala-Tyr. Besonderes Augenmerk wurde auf Unterschiede zwischen den Enantiomeren gelegt.

Aliphatische Aminosäuren



Aromatische Aminosäuren



Dipeptide

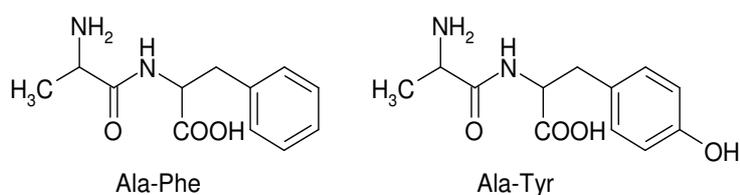


Abbildung 2.1.3: Aminosäuren und Dipeptide zur Komplexbildung mit Cyclodextrinen

2.2 Theoretische Grundlagen der angewandten Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten

2.2.1 Begriffsbestimmung

Die Gleichgewichtskonstante für die Bildung eines Komplexes ist ein fundamentales Maß für die Stabilität des Komplexes relativ zu den einzelnen Spezies unter den gegebenen Versuchsbedingungen (Medium, Temperatur, Druck). Die Terme „Stabilitätskonstante“, „Assoziationskonstante“, „Bindungskonstante“ und „Bildungskonstante“ sind synonym. Die Reziproke einer Stabilitätskonstante ist eine „Instabilitäts-“ oder „Dissoziationskonstante“. Im Folgenden wird die Komplexbildung als ein Gleichgewicht zwischen einem Wirt W und einem Gast G beschrieben, wobei im hier vorliegenden Fall immer ein Cyclodextrin den Wirt darstellt.

2.2.2 Herleitung

Eine potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen kann nur erfolgen, wenn das eingeschlossene Molekül eine Säure- oder Basenfunktion besitzt. Häufig ist es so, dass sich bei Komplexbildung durch ein Cyclodextrin-Molekül die Dissoziationskonstante der Säurefunktion (K_s) bzw. der Basenfunktion (K_b) der Gastverbindung verändert. Diese Verschiebung ist um so größer, je mehr Cyclodextrin sich in der Lösung befindet, d. h. je mehr Gastmoleküle komplexiert werden. Nach Ref.⁶³ sei

$$\Delta pK_s' = pK_s' - pK_s, \quad \text{Gleichung 2.2-1}$$

wobei pK_s' der (scheinbare) pK_s -Wert nach Komplexbildung mit Cyclodextrin ist. Wenn $\Delta pK_s'$ positiv ist, wird die Säure schwächer und die Base (Salz) wird stärker, wenn $\Delta pK_s'$ negativ ist, wird die Säure stärker und die Base (Salz) wird schwächer. $\Delta pK_s'$ ist eine Funktion der Cyclodextrinkonzentration.

In einer wässrigen Lösung sei nun H_2A^+ die protonierte Spezies einer Aminosäure, HA das Zwitterion und A^- die deprotonierte Spezies und W der Wirt (in diesem Fall α - oder β -Cyclodextrin). Wenn man annimmt, dass nur 1:1-Komplexe vorliegen, dann enthält die Lösung ionisierte und nichtionisierte Formen des Gastes, die alle vom Wirt komplexiert werden können. Die Säuredissoziationsgleichgewichte für die komplexierte und unkomplexierte Säure lassen sich wie folgt beschreiben:





In dieser Arbeit konnten die Dissoziationskonstanten für die protonierte Spezies wegen apparativer Restriktionen nicht bestimmt werden, deswegen werden im weiteren nur das Zwitterion (HA) und das Anion (A⁻) betrachtet. Die korrespondierenden Dissoziationsgleichgewichte zu Schema 2.2-3 und Schema 2.2-4 sind:

$$K_s = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{Gleichung 2.2-2}$$

$$K_s^c = \frac{[\text{H}^+][\text{AW}^-]}{[\text{HAW}]}, \quad \text{Gleichung 2.2-3}$$

Die Komplexbildungsgleichgewichte und Komplexstabilitätskonstanten (K_{11a} und K_{11b} sind die jeweiligen 1:1-Stabilitätskonstanten für die Säure und die Base) verhalten sich wie folgt:



$$K_{11a} = \frac{[\text{HAW}]}{[\text{HA}][\text{W}]} \quad \text{Gleichung 2.2-4}$$

$$K_{11b} = \frac{[\text{AW}^-]}{[\text{A}^-][\text{W}]} \quad \text{Gleichung 2.2-5}$$

Diese Gleichungen kann man leicht zu folgender Gleichung kombinieren:

$$\frac{K_s}{K_s^c} = \frac{K_{11a}}{K_{11b}}, \quad \text{Gleichung 2.2-6}$$

was zeigt, dass nur drei der vier Konstanten voneinander unabhängig sein können.

In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils eine scheinbare Konstante K_s' gemessen, die nicht identisch mit K_s^c ist, weil bei den potentiometrischen Messungen das Substrat im freien und komplexierten Zustand vorliegt.

Die scheinbare Assoziationskonstante K_s' lässt sich wie folgt definieren:

$$K_s' = \frac{[H^+]([A^-] + [AW^-])}{[HA] + [HAW]} \quad \text{Gleichung 2.2-7}$$

Substitution aus den vorherigen Gleichungen ergibt:

$$K_s' = K_s \frac{(1 + K_{11b}[W])}{(1 + K_{11a}[W])}, \quad \text{Gleichung 2.2-8}$$

was auch folgendermaßen geschrieben werden kann:

$$\Delta pK_s' = \log \frac{(1 + K_{11a}[W])}{(1 + K_{11b}[W])}. \quad \text{Gleichung 2.2-9}$$

Die Kombination von Gleichung 2.2-7 und Gleichung 2.2-8 ergibt

$$\frac{K_s'}{K_s} = 1 + \frac{(K_{11b} - K_{11a})[W]}{1 + K_{11a}[W]}, \quad \text{Gleichung 2.2-10}$$

was in einer doppelt reziproken Form (Benesi-Hildebrandt oder Lineweaver-Burk) wie folgt aussieht:

$$\frac{K_s}{(K_s' - K_s)} = \frac{1}{(K_{11b} - K_{11a}) * [W]} + \frac{K_{11a}}{(K_{11b} - K_{11a})} \quad \text{Gleichung 2.2-11}$$

Um Stabilitätskonstanten mit Hilfe o. a. Gleichung bestimmen zu können, ist es notwendig, die Konzentration des freien Wirts [W] zu kennen. Seien W_t und A_t jeweils die totalen (formalen) Konzentrationen von Wirt und Gast, dann können die Massengleichgewichtsgleichungen wie folgt geschrieben werden:

$$W_t = [W] + [HAW] + [AW^-] \quad \text{Gleichung 2.2-12}$$

$$A_t = [HA] + [A^-] + [HAW] + [AW^-] \quad \text{Gleichung 2.2-13}$$

Wenn $W_t \gg \gg A_t$, dann mag es akzeptabel sein, $[W] \approx W_t$ zu setzen. Bei den vorliegenden Messungen war das jedoch nicht möglich, da die optimale Konzentration an Aminosäure gerätebedingt 0,0025 M betrug und die maximale Konzentration an β -Cyclodextrin, bei der es sich noch verhältnismäßig gut löste, 0,015 M betrug. Wenn man die vorherigen Gleichungen mit Hilfe der vorher definierten Gleichgewichtskonstanten erweitert, dann erhält man:

$$W_t = [W] + K_{11a}[HA][W] + K_s K_{11b} \frac{[HA][W]}{[H^+]} \quad \text{Gleichung 2.2-14}$$

$$A_t = [\text{HA}] + K_s \frac{[\text{HA}]}{[\text{H}^+]} + K_{11a} [\text{HA}][\text{W}] + K_s K_{11b} \frac{[\text{HA}][\text{W}]}{[\text{H}^+]} \quad \text{Gleichung 2.2-15}$$

Nachdem $K_{11a} \neq K_{11b}$ und mit Fortschreiten der Titration ein steigender Anteil des Substrats in der anionischen Form vorliegt, variiert die effektive Stabilitätskonstante im Verlauf der Titration und $[\text{W}]$ variiert gemäß diesen Gleichungen. Um $[\text{W}]$ abzuschätzen, kann die Beziehung

$$[\text{W}] \approx W_t - A_t \quad \text{Gleichung 2.2-16}$$

verwendet werden, denn die Kombination von Gleichung 2.2-12 und Gleichung 2.2-13 ergibt:

$$W_t - A_t = [\text{W}] - ([\text{HA}] + [\text{A}^-]) \quad \text{Gleichung 2.2-17}$$

Dabei wird der Term $([\text{HA}] + [\text{A}^-])$ vernachlässigbar klein, wenn ein Überschuss an W_t vorliegt.

2.3 Experimentelles

2.3.1 Graphische Auswertung der Daten

Die Auswertung der gemessenen K_s - bzw. $\text{p}K_s$ -Werte fand mit Hilfe der Microsoft® Excel™ 2002-Software statt. Dazu werden die gemessenen Werte in einer linearisierten Form aufgetragen, man erhält so eine Gerade. Jede Gerade lässt sich durch ihre Steigung und die jeweilige Anfangsordinate (y-Achsenabschnitt) beschreiben:

y-Achsenabschnitt (β_0): Der y-Achsenabschnitt ist der y-Wert des Punktes, in dem die Gerade die y-Achse schneidet.

Steigung (β_1): Die Steigung β_1 einer Geraden lässt sich aus zwei Punkten der Geraden, (x_1, y_1) und (x_2, y_2) , gemäß der Beziehung

$$\beta_1 = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad \text{Gleichung 2.3-1}$$

berechnen.

Die Gleichung einer solchen Geraden lautet:

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x \quad \text{Gleichung 2.3-2}$$

Dabei ist der abhängige y-Wert eine Funktion der unabhängigen x-Werte. Sobald die Werte von β_0 und β_1 bekannt sind, kann man jeden Punkt der Geraden berechnen, indem man den jeweiligen y- oder x-Wert in die Gleichung einsetzt.

Für die Auswertung der gemessenen K_s - bzw. pK_s -Werte zur Bestimmung der Bindungskonstanten wird Gleichung 2.2-11 verwendet, die die Beziehung in einer linearisierten Form darstellt:

$$\frac{K_s}{(K'_s - K_s)} = \frac{1}{(K_{11b} - K_{11a}) * [W]} + \frac{K_{11a}}{(K_{11b} - K_{11a})} \quad \text{Gleichung 2.2-11}$$

wobei

$[W]$ = Konzentration des freien Liganden; $\approx W_t - A_t$

W_t = Ausgangskonzentration des Liganden

A_t = Ausgangskonzentration der Säure

K_{11a} = Komplexbildungskonstante der protonierten Verbindung mit dem Liganden

K_{11b} = Komplexbildungskonstante der deprotonierten Verbindung mit dem Liganden

Aufgetragen wird $\frac{K_s}{(K'_s - K_s)} \equiv y$ gegen $\frac{1}{W_t - A_t} \equiv x$

Daraus ergibt sich dann

$$K_{11a} = \frac{\beta_0}{\beta} \quad \text{Gleichung 2.3-3}$$

$$K_{11b} = \frac{(1 + \beta_0)}{\beta}. \quad \text{Gleichung 2.3-4}$$

mit β_0 = Abschnitt der Geraden auf der y-Achse und β = Steigung der Geraden.

2.3.2 Berechnung des Fehlers der ermittelten Bindungskonstanten

Die RGP-(=Regressionsparameter)-Feldfunktion in Microsoft® Excel™ 2002 berechnet die Statistik für eine Linie unter Verwendung der Methode der kleinsten Quadrate zur Berechnung einer geraden Linie, die für die Daten am geeignetsten ist, und gibt eine Matrix zurück, die die Linie beschreibt. RGP kann darüber hinaus zusätzliche Regressionskenngrößen bereitstellen, z. B. die Standardabweichung von β und β_0 .⁶⁵

Da gemäß Gleichung 2.3-3 und Gleichung 2.3-4 die Bindungskonstanten aus dem Quotienten aus Achsenabschnitt β_0 und der Steigung β berechnet werden, ist es nötig, die jeweiligen Fehler, die sich für diese beiden Parameter ergeben, nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz zu betrachten. Dieses besagt, dass bei mehreren Messreihen mit den Ergebnissen $x_i \pm m_{\bar{x}_v}$ ($i = 1, 2, \dots, r$) die Funktion $y = f(x_1, x_2, \dots, x_r)$ den mittleren Fehler

$$m_y = \pm \sqrt{\sum_{v=1}^r \left(\frac{\partial f}{\partial x_v} \right)^2 m_{\bar{x}_v}^2} \quad \text{Gleichung 2.3-5}$$

aufweist.⁶⁶

So beträgt der Fehler für K_{11a} (aus Gleichung 2.3-3)

$$m_{K_{11a}} = \pm \sqrt{\left(\frac{1}{\beta}\right)^2 \cdot \sigma(\beta_0)^2 + \left(\frac{\beta_0}{\beta^2}\right)^2 \cdot \sigma(\beta)^2} . \quad \text{Gleichung 2.3-6}$$

mit σ = Standardabweichung der Steigung bzw. des Achsenabschnitts.

Der Fehler für K_{11b} (aus Gleichung 2.3-4) beträgt dann

$$m_{K_{11b}} = \pm \sqrt{\left(\frac{1}{\beta}\right)^2 \cdot \sigma(\beta_0)^2 + \left(\frac{1+\beta_0}{\beta^2}\right)^2 \cdot \sigma(\beta)^2} . \quad \text{Gleichung 2.3-7}$$

mit σ = Standardabweichung der Steigung bzw. des Achsenabschnitts.

2.3.3 Titrationsmethode

Die potentiometrischen Titrationsen im Mikromaßstab wurden mit einem Sirius PCA-101 (Sirius Analytical Instruments Ltd., Forest Row, East Sussex, United Kindom) und die anschließende computergestützte Berechnung der Dissoziationskonstanten mit Hilfe des Programms pKaLOGP (V 5.1, © 1989-1998 Sirius Analytical Instruments Ltd., Forest Row, East Sussex, United Kindom) durchgeführt. Um eine konstante Ionenstärke in der wässrigen Lösung während der gesamten Titration zu gewährleisten, wurde wässrige 0,15 M KCl-Lösung als Lösungsmittel verwendet. Das Volumen der Lösung betrug 20 mL. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe von 0,5 M HCl auf 1,8 gesenkt. Dann wurde mit 0,5 M KOH nach pH 12,2 titriert. Die erhaltenen Titrationskurven wurden mit dem Programm pKaLOGP (s. o.) ausgewertet. Die Elektrode wurde mit Hilfe einer „Blank“-Titration, bei der nur die 0,15 KCl-Lösung titriert wurde, und anschließender computergestützter Bestimmung der „Four PlusTM“-Parameter kalibriert. Zu diesem Zwecke wurde die vier-Parameter-Gleichung

$$\text{pH} = \alpha + S(-\log[\text{H}^+]) + j_{\text{H}}[\text{H}^+] + j_{\text{OH}}K_{\text{w}}/[\text{H}^+] \quad \text{Gleichung 2.3-8}$$

verwendet. Die „Four PlusTM“-Parameter wurden durch eine gewichtete nichtlineare Prozedur der kleinsten Quadrate bestimmt. Der Achsenabschnittsparameter α korrespondiert in wässriger Lösung hauptsächlich mit dem negativen Logarithmus des Aktivitätskoeffizienten von H_3O^+ bei gegebener Arbeitstemperatur und Ionenstärke. S beschreibt die Nernstsche Steigung. Der Term $j_{\text{H}}[\text{H}^+]$ korrigiert die gemessenen nichtlinearen pH-Werte, die in mäßig saurer Lösung (pH 1,5 bis 2,5) auftreten, wohingegen der Term $j_{\text{OH}}K_{\text{w}}/[\text{H}^+]$ die nichtlinearen Effekte bei hohen pH-Werten (pH > 11) korrigiert.⁶⁷ Die Faktorbestimmung der 0,5 M KOH wurde mit Hilfe der Ursubstanz Kaliumhydrogenphthalat

durchgeführt und die so gefundenen Faktoren in die Computerdatensätze zur Bestimmung der pK_a -Werte eingefügt. Die Konzentration der jeweiligen Aminosäure, die titriert wurde, betrug 2,5 mM, die Cyclodextrinkonzentrationen betragen jeweils 5,0 mM, 7,5 mM, 10, 0 mM, 12,5 mM und 15,0 mM. Für jede Cyclodextrinkonzentration wurden fünf Messungen durchgeführt.

2.3.4 Chemikalien

α -Cyclodextrin und β -Cyclodextrin waren ein Geschenk der Wacker-Chemie (Burghausen, Deutschland), 0,5 M HCl, KCl und pH-7-Pufferlösung wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Die meisten der D- and L-Aminosäuren wurden von Fluka (Buchs SG, Schweiz) bezogen, L-*tert*-Butylglycin und 0,5 M KOH von Merck-Schuchard (Hohenbrunn, Deutschland), D-Alanin and D-Tyrosin von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), D-Tryptophan von Acros Organics (Geel, Belgien), D- und L-Neopentylglycin, D-Ala-D-Phe, L-Ala-L-Phe und L-Ala-L-Tyr von Bachem (Weil am Rhein, Deutschland). D-Ala-D-Tyr wurde durch die Reaktion von N-Benzyloxycarbonylgeschütztem D-Alanin-N-Hydroxysuccinimid mit D-Tyrosin in Dimethylformamid hergestellt,^{51,68} gefolgt von einer hydrogenolytischen Entschützung. Die Ala-Tyr-Dipeptide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. G. K. E. Scriba, Universität Jena, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

2.4 Ergebnisse

Die erhaltenen Daten wurden gemäß 2.3.1 ausgewertet und der Standardfehler gemäß 2.3.2 berechnet. Beispielhaft wird hier die Vorgehensweise für den K_s -Wert der Aminogruppe von L-Phenylalanin bei Komplexbildung mit β -Cyclodextrin gezeigt. Die entsprechenden Ergebnisse der RGP-Feldfunktion werden in Tabelle 2-1 bis Tabelle 2-3 dargestellt.

Tabelle 2-1: Werte zur Berechnung der Geraden für die Auswertung der Titration von L-Phenylalanin und β -CD

x-Werte [$1/(W_t - A_t)$]	y-Werte [$K_a/(K_a' - K_a)$]
404.5450093	6.999947495
201.1280626	4.281645221
133.4048235	3.099752898
100.1607625	2.565644692
80.14115948	2.406348429

Tabelle 2-2: Ausgabeformat der RGP-Parameter, wie sie durch Microsoft® Excel™ dargestellt werden

Regressionskoeffizient β_1	Regressionskoeffizient β_0
Standardabweichung (β_1)	Standardabweichung (β_0)
Bestimmtheitsmaß (R^2)	Standardabweichung (y)
F-Statistik	Freiheitsgrade
Quadratsumme der Regression	Fehlerquadratsumme

Tabelle 2-3: Die von Excel® ausgegebenen Regressionsparameter für die Auswertung der Titration von L-Phenylalanin und β -CD

$\beta_1 = 0.014394758$	$\beta_0 = 1.223817664$
Stabw. (β_1) = 0.000446638	Stabw. (β_0) = 0.097518773
$R^2 = 0.997120138$	y = 0.117584603
F-Stat.: 1038.716724	Freiheitsgrade: 3
QS der Repr. = 14.36144175	FQS = 0.041478417

Daraus ergeben sich dann für K_{11a} ein Wert von 85 M^{-1} , berechnet nach Gleichung 2.3-3 und für K_{11b} ein Wert von 154 M^{-1} , berechnet nach Gleichung 2.3-4. Der Standardfehler für K_{11a} beträgt 7 M^{-1} und der Standardfehler für K_{11b} beträgt 8 M^{-1} , berechnet nach Gleichung 2.3-6 und Gleichung 2.3-7. Eine graphische Darstellung ist in Abbildung 2.4.1 zu sehen.

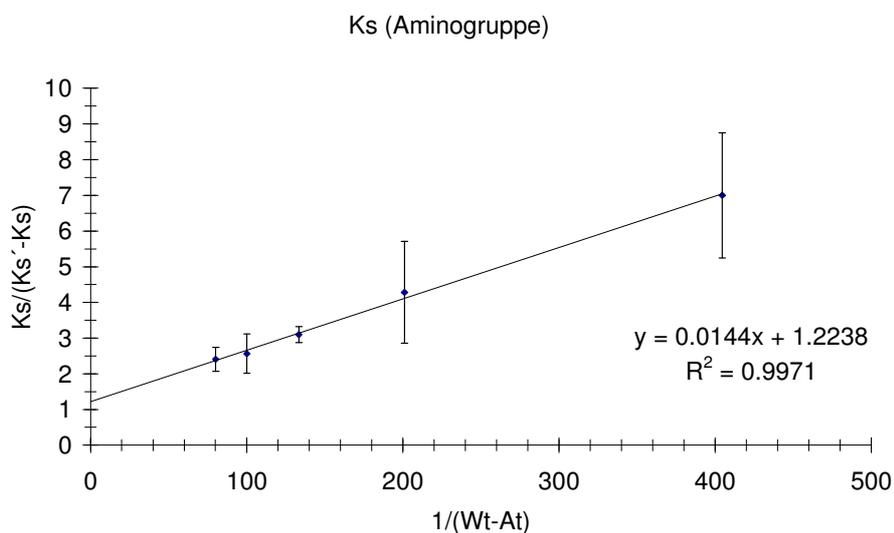


Abbildung 2.4.1: Graph für L-Phenylalanin mit β -Cyclodextrin

Die so erhaltenen Bindungskonstanten sind in Tabelle 2-4 bis Tabelle 2-8 aufgeführt. Zum Vergleich sind die Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen, die in der Literatur gefunden wurden, und die jeweiligen Bestimmungsmethoden mit angegeben.

Dabei handelte es sich um Kalorimetrie (Cal), ¹H-NMR- und UV-Spektroskopie (NMR bzw. UV), spektrophotometrische Verdrängungstitration mit Methylorange (SRT = Spectrophotometric Replacement Titration), spektrale Inhibierungstitration (SIT = Spectral Inhibition Titration), konzentrationsabhängige Änderung der Spannung zwischen den Phasen in Benzol/Wasser (CIT = Concentration-dependent Interfacial Tension in benzene/water) und Kapillarelektrophorese (CE = Capillary Electrophoresis).

Tabelle 2-4: Bindungskonstanten (in M⁻¹) aliphatischer Aminosäuren mit α-CD*

Aminosäure	K _{11a} (NH ₃ ⁺)	K _{11b} (NH ₂)	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Alanin	ka	ka	14.1 ^a	69	SRT
L-Alanin	ka	ka	17.8 ^a	69	SRT
D-Valin	ka	ka	28.2 ^a	69	SRT
L-Valin	ka	ka	32.4 ^a	69	SRT
D-Norvalin	ka	ka	nu		
L-Norvalin	ka	ka	12 ^b	70	Cal
D- <i>tert</i> -Butylglycin	586 ± 88	477 ± 74	nu		
L- <i>tert</i> -Butylglycin	268 ± 76	223 ± 69	nu		
D-Isoleucin	ka	ka	nu		
L-Isoleucin	ka	ka	74.1 ^a	69	SRT
D-Leucin	136 ± 37	197 ± 42	46.8 ^a	69	SRT
L-Leucin	211 ± 26	272 ± 30	114.8 ^a	69	SRT
D-Neopentylglycin	72 ± 27	123 ± 30	nu		
L-Neopentylglycin	507 ± 218	622 ± 260	nu		

*ka, keine Assoziation feststellbar; nu, nicht untersucht; SRT = Spektrophotometrische Verdrängungstitration, Cal = Kalorimetrie

^apH 1.0, ^bpH 7.0

Tabelle 2-5: Bindungskonstanten (in M⁻¹) aromatischer Aminosäuren mit α-CD*

Aminosäure	K _{11a} (NH ₃ ⁺)	K _{11b} (NH ₂)	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Histidin	ka	ka	nu		
L-Histidin	ka	ka	9 ^a , 12 ^d	70	Cal
D-Tyrosin	ka	ka	ka	70	Cal
L-Tyrosin	ka	ka	ka, 794 ^a	70,71	Cal
D-Phenylglycin	ka	ka	nu		
L-Phenylglycin	ka	ka	nu		
D-Phenylalanin	ka	ka	18.1 ^c , 20.6 ^c	72	Cal, SIT
L-Phenylalanin	ka	ka	15 ^a , 25 ^d , 8 ^e , 12589 ^a 33.3 ^a , 12.4 ^a , 15.5 ^c , 15.9 ^c	70,71, 72,73,74	Cal, NMR, UV, SIT
D-Tryptophan	805 ± 327	651 ± 269	nu	70	Cal
L-Tryptophan	190 ± 32	154 ± 30	19 ^a , 28 ^b , 31.6 ^a	70,71	Cal

*ka, keine Assoziation feststellbar; nu, nicht untersucht; Cal, Kalorimetrie; SIT, Spektrophotometrische Verdrängungstitration; NMR, ¹H-NMR-Spektroskopie; UV, UV-Spektroskopie. ^apH 7.0, ^bpH 9.0, ^cpH 11.0, ^dpH 11.3, ^epH 13.6

Tabelle 2-6: Bindungskonstanten (in M^{-1}) aliphatischer Aminosäuren mit β -CD*

Aminosäure	K_{11a} (NH_3^+)	K_{11b} (NH_2)	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Alanin L-Alanin	ka ka	ka ka	9.8 ^a	75	CIT
D-Valin L-Valin	ka ka	ka ka	nu 11.7 ^a	75	CIT
D-Norvalin L-Norvalin	ka ka	ka ka	nu nu		
D- <i>tert</i> -Butylglycin L- <i>tert</i> -Butylglycin	33 ± 44 104 ± 47	98 ± 48 182 ± 56	nu nu		
D-Isoleucin L-Isoleucin	ka ka	ka ka	nu nu		
D-Leucin L-Leucin	196 ± 77 258 ± 248	234 ± 84 301 ± 273	nu 18.5 ^a	75	CIT
D-Neopentylglycin L-Neopentylglycin	281 ± 78 196 ± 46	896 ± 201 699 ± 115	nu nu		

*ka, keine Assoziation feststellbar; nu, nicht untersucht; CIT = konzentrationsabhängige Änderung der Spannung zwischen den Phasen in Benzol/Wasser

^apH 7.0

 Tabelle 2-7: Bindungskonstanten (in M^{-1}) aromatischer Aminosäuren mit β -CD*

Aminosäure	K_{11a} (NH_3^+)	K_{11b} (NH_2)	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Histidin L-Histidin	ka ka	ka ka	nu nu		
D-Tyrosin L-Tyrosin	66 ± 16 41 ± 9	233 ± 23 180 ± 11	nu 147 ^b	70	Cal
D-Phenylglycin L-Phenylglycin	ka ka	ka ka	nu nu		
D-Phenylalanin L-Phenylalanin	83 ± 20 85 ± 7	164 ± 23 154 ± 8	nu 18 ^a , 106 ^b , ka, 11.3 ^a	70,71,75	Cal, CIT
D-Tryptophan L-Tryptophan	88 ± 17 447 ± 83	140 ± 18 571 ± 102	nu nu		

*ka, keine Assoziation feststellbar; nu, nicht untersucht; Cal = Kalorimetrie, CIT = konzentrationsabhängige Änderung der Spannung zwischen den Phasen in Benzol/Wasser

^apH 7.0, ^bpH 11.3

 Tabelle 2-8: Bindungskonstanten (in M^{-1}) von Alanyl-Dipeptiden mit β -CD*

Dipeptid	K_{11a} (NH_3^+)	K_{11b} (NH_2)	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Ala-D-Phe L-Ala-L-Phe	105 ± 45 274 ± 35	135 ± 51 403 ± 46	42 ^a , 33 ^c , 25 ^d , 12 ^e , 32 ^f 40 ^a , 28 ^c , 25 ^d , 14 ^e , 36 ^f	48,55 48,55	CE CE
D-Ala-D-Tyr L-Ala-L-Tyr	309 ± 76 217 ± 110	450 ± 102 293 ± 130	173 ^b , 110 ^e , 33 ^f 125 ^b , 82 ^e , 36 ^f	53,55 53,55	CE CE

*CE, Kapillarelektrophorese

^apH 1.8, ^bpH 2.5, ^cpH 2.7, ^dpH 3.0, ^epH 3.5, ^fpH 9.5

Die Verschiebungen der pK_s -Werte der Carboxylatgruppe konnten nicht bestimmt werden, weil diese pK_s -Werte zu niedrig sind (etwa 2 für Aminosäuren und etwa 3 für Dipeptide), um mit der verwendeten Glaselektrode korrekt gemessen werden zu können. Deswegen wurden nur die Bindungskonstanten K_{11a} (NH_3^+) und K_{11b} (NH_2), die die zwitterionische bzw. die anionische Spezies der entsprechenden Aminosäure oder des entsprechenden Dipeptids repräsentieren, bestimmt.

2.4.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Standardabweichungen der Bindungskonstanten sind in den Fällen von Neopentylglycin und Tryptophan mit α -CD und *tert*-Butylglycin, Leucin und den Dipeptiden mit β -CD sehr hoch. Dies könnte auf das Vorhandensein einer gemischten Komplexstöchiometrie hinweisen, nachdem die Bestimmung der Bindungskonstanten auf der Annahme einer 1:1-Komplexstöchiometrie beruht.⁷⁶ Wenn andere Komplexstöchiometrien auftreten, resultieren die aufgetragenen Daten in einer gekrümmten Linie, die zu hohen Standardabweichungen führt, was in den oben genannten Fällen zu beobachten war. Insgesamt gesehen sind deshalb die Absolutwerte der erhaltenen Bindungskonstanten mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Die Unterschiede der Bindungskonstanten der Enantiomere sind jedoch groß.

Im Gegensatz dazu weisen *tert*-Butylglycin und Leucin mit α -CD und die aromatischen Aminosäuren und Neopentylglycin mit β -CD relativ kleine Standardabweichungen der Bindungskonstanten auf, was auf das überwiegende Vorhandensein des angenommenen 1:1-Komplexes schließen lässt (die Existenz eines 1:1-Komplexes wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen untermauert^{77,78}).

In allen anderen Fällen sind die Bindungskonstanten, die mit Hilfe von SRT und CIT und auch der Kalorimetrie bestimmt wurden, nicht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Dies ist darauf zurückzuführen, dass all diese abweichenden Bindungskonstanten sehr klein sind, möglicherweise zu klein, um mit der potentiometrischen Titrationsmethode (PT) bestimmt werden zu können. Außerdem wurden die SRT-Werte bei einem pH-Wert von 1 bestimmt, wo das Kation die vorherrschende Spezies ist, wohingegen die PT-Werte die Bindungsverhältnisse bei ungefähr pH 4 bis 8 (K_{11a} , NH_3^+) und pH >11 (K_{11b} , NH_2) widerspiegeln, wo das Zwitterion bzw. das Anion vorherrschen. Die Referenzwerte für die Bindungskonstanten von L-Phenylalanin und β -CD sind sehr unterschiedlich, aber zumindest der kalorimetrisch bestimmte Wert für pH 11,3⁷⁰ ist dem durch potentiometrische Titration erhaltenen Wert sehr ähnlich.

Nachdem die Wechselwirkungen mit Cyclodextrinen hauptsächlich hydrophober Natur sind,⁷⁹ sind die Aminosäuren in den Tabellen 1 bis 3 nach steigender Lipophilie⁸⁰ geordnet. Die Größe und räumliche Ausdehnung des Gastmoleküls spielen jedoch eine weitere wichtige Rolle bei der Bildung eines Cyclodextrin-Einschlusskomplexes. Die aliphatischen Aminosäuren Alanin, Valin und Norvalin sind wegen ihrer geringen Hydrophobizität und ihrer kurzen aliphatischen Seitenkette nicht in der Lage, die CD-Kavität auszufüllen und so stabile Einschlusskomplexe mit α - oder β -CD zu bilden. Deswegen sind die betreffenden Bindungskonstanten zu klein, um gemessen werden zu können. Wenn man die räumliche Ausdehnung der aliphatischen Aminosäuren betrachtet, scheinen z. B. die *tert*-Butyl- oder Neopentyl-Seitenketten, wie in *tert*-Butylglycin oder Neopentylglycin, prädestiniert für eine starke hydrophobe Wechselwirkung mit der α - oder β -CD-Kavität zu sein. Sogar eine 1-Methylpropyl-Seitenkette wie im Leucin ist anscheinend raumfüllend genug, um mit der α - oder β -CD-Kavität wechselzuwirken. Für diese Aminosäuren wurden Bindungskonstanten im Bereich von 72 bis 896 M⁻¹ gefunden. Im Gegensatz dazu ist die 2-Methylpropyl-Seitenkette wie im Isoleucin offensichtlich zu klein für eine ausreichende Wechselwirkung; deswegen konnte keine Bindungskonstante bestimmt werden.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Aminosäuren sind *tert*-Butylglycin und Phenylglycin starre Moleküle mit nur einer drehbaren Bindung. Aber während die *tert*-Butyl-Gruppe sowohl mit α - als auch β -CD Wechselwirkungen eingeht, wahrscheinlich in der Nähe des breiteren Randes des Cyclodextrins, kann der Phenylring des Phenylglycins nicht weit genug in die Kavität eintauchen, um ausreichende Wechselwirkungen einzugehen. Dies geschieht, weil sich der Aromat zu nah an der Aminogruppe befindet, die mit den Hydroxylgruppen in Position 2 und 3 des Cyclodextrins über Wasserstoffbrücken wechselwirkt und deswegen davon abgehalten wird, hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Inneren der Kavität einzugehen. Im Gegensatz dazu scheint Phenylalanin, das eine Methylengruppe zwischen dem aromatischen Ring und der polaren Aminocarboxygruppe aufweist, wenigstens mit β -CD hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen, was zu einer messbaren Bindungskonstante führt. Dieses ist auf eine höhere Flexibilität des Moleküls, einen größeren Abstand zwischen hydrophoben und hydrophilen Molekülteilen und tieferes Eintauchen in die Cyclodextrinkavität zurückzuführen. Mit einem β -CD enthaltenden Trennpuffer können jedoch die Enantiomere von Phenylalanin in der Kapillarelektrophorese nicht getrennt werden,⁵⁴ was wahrscheinlich auf die geringen Unterschiede der Bindungskonstanten der Enantiomere zurückzuführen ist.

Die aromatische Aminosäure Histidin ist viel zu hydrophil, um in die Cyclodextrinkavität eingeschlossen werden zu können (ihr logP-Wert liegt bei -3^{80}) und weist deswegen keine messbare Bindungskonstante auf.

Interessanterweise bindet die aromatische Aminosäure Tryptophan sowohl an α -Cyclodextrin als auch an β -Cyclodextrin, wobei das D-Enantiomer viel stärker an α -CD und viel schwächer an β -CD bindet als das L-Enantiomer. Die Bindungskonstanten für Tryptophan und α -CD sind für das Zwitterion größer als für das Anion. Abgesehen von *tert*-Butylglycin und α -CD sind in allen anderen Fällen die Bindungskonstanten für das Anion größer als für das Zwitterion. In diesen zwei Fällen scheint eine protonierte Aminogruppe wichtig als Donor für Wasserstoffbrücken, die möglicherweise am breiteren Rand der Kavität gebildet werden, zu sein.

Es ist bekannt,⁶² dass die Kavität von α -CD nur einen Benzolring einschließen kann, wohingegen die Kavität von β -CD ein Naphthalinringsystem komplexieren kann.⁸¹ Deswegen ist es naheliegend, dass der Indolring des Tryptophans in die Kavität von β -CD hineinpasst. Dahingegen kann die Bindung von Tryptophan zu α -CD durch eher oberflächliche Wechselwirkungen am breiteren Rand der Kavität wie in Referenz⁸² und in Abbildung 2.4.2 B beschrieben werden. Die dort vorgeschlagene Struktur beruht auf NMR-spektroskopischen, insbesondere durch ROESY-NMR-Experimente erhaltenen Befunden.⁸² Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Wechselwirkung mit β -CD wahrscheinlich, wie weiter oben schon erwähnt, um einen klassischen Einschlusskomplex. Diese unterschiedlichen Bindungsmodi könnten eine Erklärung für die gegensätzlichen Bindungskonstanten der Enantiomere mit den beiden Cyclodextrinen (α - und β -CD) sein.

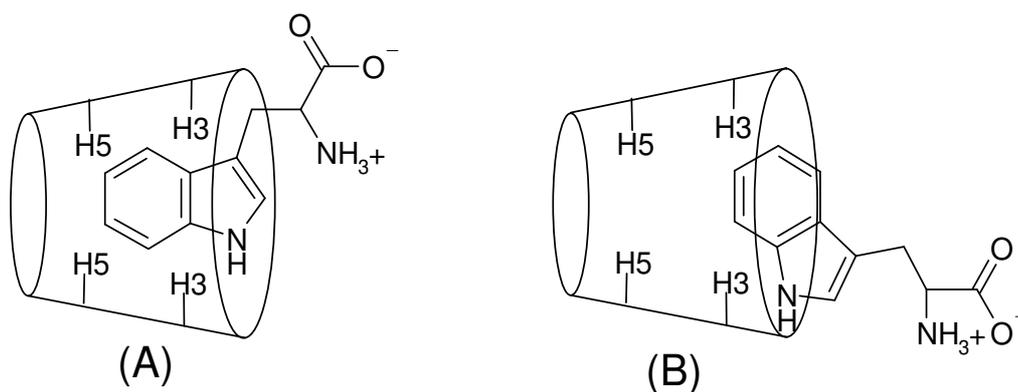


Abbildung 2.4.2: Mögliche Strukturen des Einschlusskomplexes von L-Tryptophan mit α -CD basierend auf „CPK space-filling“-Modellen.

Obwohl die Bindungskonstanten mit Unsicherheiten behaftet sind, sollten die Unterschiede zwischen den Enantiomeren von Tryptophan groß genug sein, um in der Kapillarelektro-

phorese mit einem α - oder β -CD enthaltenden Trennpuffer getrennt zu werden. Studien^{83,84,85} über die Trennung der underivatisierten Enantiomere von Tryptophan mit einem α -CD enthaltendem Trennpuffer berichten, dass das L-Enantiomer, das die kleinere Bindungskonstante aufweist, schneller migriert als das D-Enantiomer. Das L-Enantiomer von Tryptophan wird sehr viel stärker an β -CD gebunden als das D-Enantiomer, deswegen erscheint eine Enantiomerentrennung mittels CE mit einem β -CD enthaltendem Trennpuffer möglich, obwohl kein Bericht darüber gefunden werden konnte. Bei Versuchen im Rahmen dieser Arbeit, die Enantiomere von Tryptophan unter Standardbedingungen (100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, 12 mM β -CD) in der Kapillarelektrophorese zu trennen, konnten keinerlei Anzeichen einer möglichen Trennung gefunden werden. In diesem Falle wird die Trennung wohl nicht von Unterschieden in den Bindungskonstanten, sondern von den verschiedenen elektrophoretischen Mobilitäten der Einschlusskomplexe, die über die Unterschiede der Bindungskonstanten während der Trennung die Oberhand gewinnen, beherrscht.

Der Unterschied der Bindungskonstanten mit α - und β -CD für *tert*-Butylglycin und Neopentylglycin ist ähnlich groß wie für Tryptophan. Weil diese Aminosäuren jedoch keinen Chromophor für eine UV-Detektion besitzen, finden sich keine Berichte über eine kapillarelektrophoretische Trennung dieser beiden Aminosäuren mit α - oder β -CD, obwohl eine große Wahrscheinlichkeit für das Gelingen dieser Enantiomerentrennung besteht. Weiterhin finden sich keine Berichte über eine kapillarelektrophoretische Enantiomerentrennung von Tyrosin mit β -CD, obwohl diese Aminosäure prädestiniert für eine UV-Detektion ist. Sie zeigt jedoch nur kleine Unterschiede in den Bindungskonstanten der Enantiomere bei Komplexierung mit β -CD, deswegen sind die Enantiomere wohl nicht trennbar und deswegen in der Literatur auch nicht erwähnt.

Wenn man die Bindungskonstanten der einzelnen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin mit den entsprechenden Alanyl-Dipeptiden vergleicht, stellt man fest, dass die Dipeptide stärker an β -CD binden, was darauf hinweist, dass die Verlängerung der aliphatischen Seitenkette durch einen Peptidteil zu mehr Interaktionsmöglichkeiten und damit zu größeren Bindungskonstanten einerseits und zu einer Diskriminierung zwischen den Enantiomeren andererseits führt. Jedoch führt eine starke Bindung nicht notwendigerweise zu einer Trennung in der Kapillarelektrophorese.⁸⁶

Die mittels der potentiometrischen Methode ermittelten Bindungskonstanten für die Dipeptide Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -Cyclodextrin weisen einen größeren Wert auf als die mittels Kapillarelektrophorese ermittelten.^{48,53,55} Nachdem jedoch letztere bei einem pH-

Wert von 1,8 (wo die kationische Spezies des Dipeptids dominiert) und 3,5 (was nahe am pK_a -Wert der Carboxygruppe liegt und deswegen in einer 1:1-Mischung aus der kationischen und der zwitterionischen Spezies des Dipeptids resultiert) ermittelt wurden, beschreiben die Ergebnisse dieser Arbeit die Gegebenheiten bei viel höheren pH-Werten, i. e. 4-8 (zwitterionische Spezies des Dipeptids) bzw. >11 (anionische Spezies des Dipeptids). Wie in dieser Arbeit und auch von Süß et al.⁵⁵ festgestellt wurde, wird das DD-Enantiomer von Ala-Tyr stärker an β -CD gebunden als das LL-Enantiomer. Im Gegensatz dazu weisen die CE-Methoden^{48,55} nur einen geringen Unterschied in den Bindungskonstanten zwischen den Enantiomeren von Ala-Phe auf. Dennoch können die Enantiomere von Ala-Phe mittels CE unter den gleichen Bedingungen wie zur Ermittlung der Bindungskonstanten getrennt werden. Dies weist darauf hin, dass in diesem Falle eher die unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der jeweiligen Einschlusskomplexe und nicht so sehr die Unterschiede in den Bindungskonstanten die Trennung bestimmen.^{87,88}

2.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die potentiometrische Titrationsmethode vernünftige Bindungskonstanten für Cyclodextrin-Einschlusskomplexe mit Aminosäuren liefert. Außerdem konnte eine Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen für Aminosäuren und Cyclodextrine zeigen, dass ein gewisses Volumen der Aminosäure-Seitenkette und damit ein gutes Ausfüllen der Cyclodextrin-Kavität nötig ist, um den vollen Nutzen aus den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Aminosäure-Seitenkette und der Cyclodextrin-Kavität zu ziehen. Eine Verlängerung des hydrophilen Restes, der aus der Kavität herausragt, führt zu der Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen mit den Wasserstoffatomen am breiteren Rand der Cyclodextrin-Kavität und damit zu einer stärkeren Bindung an das Cyclodextrin.

3 Untersuchung von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen mit UV- und CD-spektroskopischen und massenspektrometrischen Methoden

3.1 Allgemeines

3.1.1 Spektroskopie

Spektroskopie ist ein Sammelbegriff für eine Klasse experimenteller Verfahren, die untersuchen, wie eine Probe Energie aufnehmen oder abgeben kann. Historisch bezeichnet der Begriff in erster Linie solche Verfahren, die die Absorption oder Emission von Licht untersuchen. Mit Hilfe eines Spektrometers wird dabei ein Lichtspektrum, das ist die Intensität des absorbierten oder ausgestrahlten Lichts in Abhängigkeit von der Wellenlänge, gemessen. Neben dem Bereich des sichtbaren Lichts deckt die Spektroskopie heute einen großen Teil des elektromagnetischen Spektrums ab, von den Radiowellen bis zur Gammastrahlung. Zur Spektroskopie werden auch solche Verfahren gezählt, bei denen die Wechselwirkung der Probe mit Teilchen, zum Beispiel Elektronen, abhängig von deren Energie, untersucht wird. Ziel der Spektroskopie ist es, aus dem erzielten Spektrum Rückschlüsse auf die Probe zu ziehen, zum Beispiel auf deren innere Struktur, stoffliche Zusammensetzung oder Dynamik. Die analytische Spektroskopie erkennt Atome oder Moleküle an der charakteristischen Form ihrer Spektren. Die Präzisionspektroskopie setzt sich zum Ziel, aus der genauen Lage von Spektrallinien physikalische Größen, zum Beispiel Naturkonstanten zu bestimmen oder Hypothesen über Naturgesetze zu testen. Die verschiedenen spektroskopischen Methoden, die in der Analytik verwendet werden, sind:

1. Atomspektroskopie

Atomabsorptionsspektroskopie (AAS/OAS)

Graphitrohrtechnik

Hydridtechnik

Atomemissionsspektroskopie (AES/OES)

Induktiv

Mikrowellen-Plasmafackel-AES

Atomfluoreszenzspektroskopie (AFS)

Elektronenspektroskopie

Auger-Elektronen-Spektroskopie

Röntgenspektroskopie (XRS)

Röntgenfluoreszenzanalyse

Röntgenbeugungsspektroskopie

Röntgenabsorptionsspektroskopie

2. Molekülspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopie

Infrarotspektroskopie (IR)

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Mikrowellenspektroskopie

Ramanspektroskopie

UV/VIS-Spektroskopie (UV/Vis)

3. Massenspektrometrie (MS)

4. Ultrakurzzeit-Spektroskopie

5. Laserspektroskopie

Die Massenspektrometrie ist kein spektroskopisches Verfahren im eigentlichen Sinne. Dennoch wird sie in diesem Zusammenhang häufig genannt, weil sie in der Analytik einen ähnlichen Zweck erfüllt.^{57,89}

3.1.2 Bestimmung von Bindungskonstanten mittels spektroskopischer Methoden

3.1.2.1 Arten der Datenauftragung

Bei der Bestimmung von Bindungskonstanten geht es in den meisten Fällen darum, eine Eigenschaft (meist eine spektrale) des Gastmoleküls oder auch des Wirtsmoleküls zu messen und ihre Veränderung bei Komplexbildung zu bestimmen. Meist ist es so, dass die Veränderung größer wird, je mehr man vom Komplexbildungsreagenz zum Gastmolekül hinzufügt. Diese Veränderung in Abhängigkeit von der Konzentration des Wirtsmoleküls kann man auf verschiedene Arten auswerten. Für die graphische Auswertung bietet es sich an, die Zusammenhänge zu linearisieren. Die 1:1-Bindungsisotherme⁹⁰ hat normalerweise eine hyperbolische Form, und um sie zu linearisieren, werden drei unterschiedliche Ansätze verwendet:⁹¹

1. die x-reziproke Form oder Scatchard-Plot.⁹² Hier ist eine Extrapolation zu unendlich verdünnten Lösungen notwendig. Der Datensatz ist geschlossen, d. h. die Gerade schneidet beide Achsen des Graphen.

2. die y-reziproke Form oder Scott-Plot.⁹³ Diese graphische Methode wird recht selten verwendet.
3. die doppelt reziproke Form oder Benesi-Hildebrand-Plot.⁶⁴ Hier sind die Daten für höhere Konzentrationen des Gastmoleküls dicht zusammengedrängt. Der Datensatz ist offen, d. h. die beiden Achsen reichen mit steigender Verdünnung bis in die Unendlichkeit hinein.

Alle drei Ansätze gehen von einem großen Überschuss an Wirtsmolekül und vom Vorhandensein eines 1:1-Komplexes aus. Um die Stöchiometrie eines Komplexes in Lösung bestimmen zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten, allen voran die so genannten „Job-Plots“ (siehe 3.2.2 und 3.2.3). Im Folgenden werden die verwendeten Arten der graphischen Auswertung bei den verschiedenen hier verwendeten Methoden näher erläutert.

3.1.2.2 Potentiometrie

Die potentiometrische Titration als Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten ist zwar keine spektroskopische Methode, dennoch wird an dieser Stelle auf sie verwiesen, weil im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“ eine detaillierte Herleitung der Benesi-Hildebrand-Gleichung zu finden ist, die, wie in 3.1.2.1 erläutert, auch für nicht-spektroskopische Methoden ihre Anwendung finden kann.

3.1.2.3 UV-Spektroskopie

Verwendet man die UV-Spektroskopie (siehe 3.2) zur Bestimmung von Bindungskonstanten, ist die graphische Auswertung wie folgt: Seien $[G]$ die Konzentration der Aminosäure (Konzentration des Gastmoleküls), A_0 die gemessene Absorption bei der Cyclodextrin-Konzentration (Konzentration des Wirtsmoleküls) $[W] = 0$ und A_i die gemessene Absorption bei $[W]_i = i \cdot [G]$ mit $i = 1, 2, \dots, 6$. Es sei außerdem $\Delta A = A_0 - A_i$. Die typische Bindungsisotherme⁶² für einen angenommenen 1:1-Komplex (Wirt:Gast) lässt sich dann gemäß Lit.⁶³ folgendermaßen beschreiben:

$$\frac{\Delta A}{d} = \frac{[G] \cdot K \cdot \Delta \epsilon \cdot [W]_i}{1 + K \cdot [G]} \quad \text{Gleichung 3.1-1}$$

mit d = Schichtdicke ($d = 1$ cm) und $\Delta \epsilon = \epsilon_{11} - \epsilon_{AS} - \epsilon_{CD}$.

Die Transformation von Gleichung 3.1-1 nach Benesi-Hildebrandt⁶⁴ führt zu

$$\frac{d}{\Delta A} = \frac{1}{[G] \cdot K \cdot \Delta \varepsilon \cdot [W]_i} + \frac{1}{[G] \cdot \Delta \varepsilon} \quad \text{Gleichung 3.1-2}$$

Aufgetragen wird $1/[W]$ gegen $1/\Delta A$, die sich daraus ergebende Gerade besitzt dann den Achsenabschnitt $\beta_0 = 1/[G] \cdot \Delta \varepsilon$ und die Steigung $\beta = 1/[G] \cdot K \cdot \Delta \varepsilon$. Die Bindungskonstante K (in M^{-1}) beträgt dann

$$K = \frac{\beta_0}{\beta} \quad \text{Gleichung 3.1-3}$$

Der Fehler der Bindungskonstante wird analog zum Fehler der Bindungskonstante K_{11a} der durch die potentiometrische Methode ermittelten Bindungskonstante errechnet (siehe dort).

3.1.2.4 CD-Spektroskopie

Verwendet man die CD-Spektroskopie (siehe 3.3) zur Bestimmung von Bindungskonstanten, ist die graphische Auswertung wie folgt: Die Unterschiede in der molaren Elliptizität am Maximum bzw. Minimum wurden als Funktion der CD-Konzentration gemessen. Die Daten wurden gemäß einer modifizierten Scott-Gleichung^{93,94} aufgetragen:

$$\frac{[W]_0 \cdot [G]_0}{\Delta \Theta} = \frac{K_d}{\Delta[\Theta]} + \frac{[W]_0 + [G]_0}{\Delta[\Theta]} \quad \text{Gleichung 3.1-4}$$

Aufgetragen wird $([W]_0 \cdot [G]_0)/\Delta \Theta$ gegen $([W]_0 + [G]_0)$, die sich daraus ergebende Gerade besitzt dann die Steigung $\beta = 1/\Delta[\Theta]$ und den Achsenabschnitt $\beta_0 = K_d/\Delta[\Theta]$. Die Dissoziationskonstante K_d (in M^{-1}) beträgt dann

$$K_d = \frac{\beta_0}{\beta} \quad \text{Gleichung 3.1-5}$$

Die Assoziations- oder Bindungskonstante K stellt den Kehrwert der Dissoziationskonstanten K_d dar⁶² und beträgt dann (in M^{-1})

$$K = \frac{\beta}{\beta_0} \quad \text{Gleichung 3.1-6}$$

Der Fehler der Bindungskonstante wird analog zum Fehler der Bindungskonstante K_{11a} der durch die potentiometrische Methode ermittelten Bindungskonstante errechnet (siehe dort). Allerdings müssen in der Gleichung zur Fehlerberechnung der Achsenabschnitt β_0 und die Steigung β gegeneinander ausgetauscht werden.

3.2 UV-Spektroskopie

3.2.1 Theoretische Grundlagen

Elektromagnetische Strahlung wird durch ihre Wellenlänge λ oder ihre Frequenz ν charakterisiert. Diese Größen sind durch die Gleichung

$$\lambda \cdot \nu = c \quad \text{Gleichung 3.2-1}$$

miteinander verknüpft. c ist die Lichtgeschwindigkeit (im Vakuum ca. $2,998 \cdot 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$). Ein Lichtquant der Frequenz ν hat die Energie

$$E = h \cdot \nu \quad \text{Gleichung 3.2-2}$$

Das Plancksche Wirkungsquantum h beträgt ca. $6,63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$. Die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen und Molekülen führt bei der Absorption im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts zur Anregung von Elektronen, im Allgemeinen Valenzelektronen. Trifft Licht mit geeigneter Frequenz ν auf ein Molekül im Grundzustand ψ_0 , dann kann es absorbiert werden und das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand ψ_1 anheben. Durch spontane Emission bzw. durch zusätzlich unter dem Einfluss der Lichtwelle stimulierte Emission kann das System in den Grundzustand zurückkehren. Das Wort „kann“ drückt dabei die Übergangswahrscheinlichkeiten für beide Strahlungsprozesse Absorption und Emission aus.

Fällt ein Lichtstrahl der Intensität I_0 auf ein homogenes, isotropes Medium der Schichtdicke d , dann kann er abgesehen von Reflexions- und Streuungsverlusten durch die Absorption geschwächt werden. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz folgt dann für die Absorption A

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 3.2-3}$$

mit I = Intensität des austretenden Strahles (Transmission), ε = substanzspezifische Konstante, c = Konzentration des gelösten Stoffes in mol/l, d = Schichtdicke in cm. Dieses Gesetz gilt für monochromatisches Licht und verdünnte Lösungen ($c \leq 10^{-2} \text{ mol/l}$).

Bestimmt man nun nach dem Lambert-Beerschen Gesetz für alle Wellenlängen λ_i die Absorption und daraus die substanzspezifische Größe ε , so gewinnt man die Absorptionskurve $\varepsilon(\lambda)$ und damit das UV-Spektrum. Aufgrund der Energiebreite der elektronischen Niveaus ist es ein Bandenspektrum. Die einzelnen Banden werden durch ihre Eigenschaften Lage, Intensität, Gestalt und Feinstruktur charakterisiert.

Eine Klassifizierung der Elektronenübergänge (Banden) lässt sich mit Hilfe der beteiligten Molekülorbitale treffen. Aus besetzten bindenden σ - oder π -Orbitalen oder aus den nicht-bindenden n -Orbitalen (einsame Elektronenpaare) kann ein Elektron in die leeren, antibindenden σ^* - oder π^* -Orbitale angehoben werden. Entsprechend werden die Elektronenübergänge (Banden) kurz mit $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ usw. bezeichnet. Die Lage einer Absorptionsbande hängt von der Natur des betreffenden Elektronenübergangs ab. Es können σ -, π - und n -Elektronen unterschiedlicher chromophorer Gruppen angeregt werden. Besitzt ein Molekül mehrere π - oder n -Orbitale, die nicht miteinander in Wechselwirkung stehen, so ist im Allgemeinen ein Spektrum zu erwarten, das sich additiv aus den Absorptionen der einzelnen isolierten Chromophore zusammensetzt.⁴

3.2.2 Bestimmung der Stöchiometrie von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen

Um verlässlich eine Bindungskonstante bestimmen zu können, muss die Stöchiometrie des Komplexes bekannt sein. Es ist die übliche Prozedur, zunächst eine 1:1-Stöchiometrie anzunehmen und dann zu überprüfen, ob verschiedene Hinweise mit dieser Annahme übereinstimmen oder ihr widersprechen. Informationsquellen, die verwendet werden können, sind:

- Die Methode der kontinuierlichen Variation (Job-Plot)⁹⁵
- Isolierung und chemische Analyse von kristallisierten Komplexen
- Interpretation von Löslichkeits-Phasen-Diagrammen
- Vergleich von Stabilitätskonstanten, die mit verschiedenen Methoden ermittelt wurden
- Spezifische experimentelle Hinweise wie z. B. isosbestische Punkte
- Schlussfolgerungen im Hinblick auf die Substratstruktur
- Anwendung eines erfolgreichen stöchiometrischen Modells auch für andere Konzentrationen

Informationen aus den Kristallstrukturen der CD-Einschlusskomplexe können zwar hilfreich sein, es muss aber berücksichtigt werden, dass die Art der Komplexierung in Lösung eine völlig andere sein kann.

Häufig liegt bei CD-Einschlusskomplexen eine 1:1-Stöchiometrie vor, nichtsdestotrotz sind andere Verhältnisse möglich, wie z. B. 1:2 (GW_2) oder 2:1 (G_2W). Vereinzelt wird auch von 2:2-Komplexen berichtet. In manchen Systemen scheinen sich auch „ternäre“ Komplexe der Stöchiometrie 1:1:1 (Gast:CD:Zusatz) zu bilden.⁶²

3.2.3 Job-Plots

Bei der Methode der kontinuierlichen Variation (Job-Plot) wird der Stoffmengenanteil $G_t/(G_t+W_t)$ variiert, während die Summe G_t+W_t konstant gehalten wird (G_t und W_t sind die totalen Konzentrationen von Gast- und Wirtsmolekül).⁹⁵ Dabei wird eine Eigenschaft der Lösung wie z. B. Absorption, Fluoreszenz oder (induzierter) Circular dichroismus gemessen. Wenn eine definierte Stöchiometrie $m:n$ vorliegt, wird bei dem Wert $G_t/(G_t+W_t)$, der dem entsprechenden stöchiometrischen Verhältnis entspricht, ein Maximum vorliegen. Diese Methode kann sehr hilfreich sein, wenn eine Komplexstöchiometrie dominiert, birgt aber Probleme in sich, wenn verschiedene Komplexstöchiometrien vorliegen.^{96,97,98,99}

In der vorliegenden Arbeit wurden die Job-Plots mit Hilfe der UV-Spektroskopie ermittelt. Die Bestimmung der Stöchiometrie mittels NMR-Spektroskopie liefert zwar im Allgemeinen gute Ergebnisse, jedoch ergeben sich bei der NMR-Spektroskopie von Proben, die Cyclodextrine enthalten, Probleme, die aus dem Vorhandensein von sechs bis acht chemisch äquivalenten Glucopyranoseringen im Cyclodextrinmolekül herrühren. Bei 1:1-Mischungen von einem Cyclodextrin mit einem Gast sind dann die Cyclodextrin-Signale im Falle des β -Cyclodextrins siebenfach größer als die Signale des Gastes. Für einen Job-Plot verwendet man üblicherweise Mischungsverhältnisse von 1:9 bis 9:1 (bzw. 2:8 bis 8:2), d. h. im ungünstigsten Falle wären dann die Cyclodextrin-Signale dann 56- bzw. 42-mal so groß wie die Signale des Gastmoleküls, was eine Auswertung sehr schwierig macht.

3.2.3.1 Experimentelles

Die untersuchten Aminosäuren und Cyclodextrine sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Die Bezugsquellen der Chemikalien finden sich im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“.

Der verwendete Puffer war immer ein 50 mM Phosphat-Puffer, nur bei dem mit * gekennzeichneten Experiment wurde ein 50 mM Acetat-Puffer verwendet. Die Mischungsverhältnisse betragen 1:9 bis 9:1 bei gleicher Konzentration der Stammlösungen. Aufgetragen wurden $\Delta A = A_i - A_0$ gegen $G_t/(G_t+W_t)$.

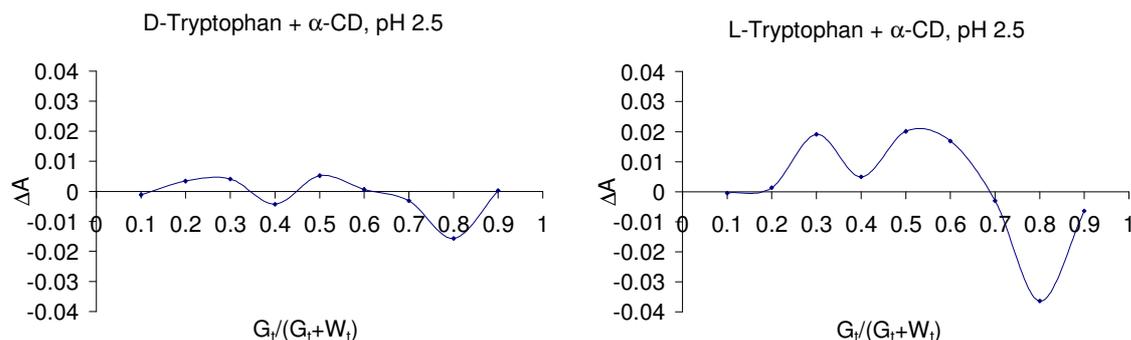
Die Messungen wurden auf einem Shimadzu UVmini-1240-Spektrometer (Shimadzu, Duisburg, D) bei einer Wellenlänge von 254 nm durchgeführt.

Tabelle 3-1: Die untersuchten Aminosäuren und Cyclodextrine

Aminosäure	Cyclodextrin	pH-Wert
L-Phenylalanin	α -CD	2.5
L-Phenylalanin	α -CD	8.0
L-Phenylalanin	β -CD	2.5
L-Phenylalanin	β -CD	5.5*
L-Phenylalanin	β -CD	8.0
L-Phenylalanin	β -CD	11.5
D-Phenylalanin	α -CD	2.5
D-Phenylalanin	α -CD	8.0
D-Phenylalanin	β -CD	2.5
D-Phenylalanin	β -CD	8.0
L-Phenylglycin	α -CD	2.5
L-Phenylglycin	β -CD	2.5
D-Phenylglycin	α -CD	2.5
D-Phenylglycin	β -CD	2.5
L-Tyrosin	α -CD	2.5
D-Tyrosin	α -CD	2.5
L-Tryptophan	α -CD	2.5
D-Tryptophan	α -CD	2.5

3.2.3.2 Ergebnisse und Diskussion

D- und L-Tryptophan wiesen mit der potentiometrischen Methode zur Bestimmung der Bindungskonstanten recht hohe Bindungskonstanten mit α -CD auf (siehe dort und Lit.¹⁰⁰). Die Job-Plots für das D- und das L-Enantiomer sind qualitativ ähnlich, mit lokalen Maxima bei 0.3 und 0.5 und lokalen Minima bei 0.4 und 0.8. Hier könnte eine Mischung aus einem 1:2- (Aminosäure:CD) und einem 1:1-Komplex vorliegen. Diese Mischung aus unterschiedlichen Komplexstöchiometrien in Lösung führt mit der potentiometrischen Methode zu hohen Bindungskonstanten, die jedoch auch mit großem Fehler behaftet sind, wohingegen im Job-Plot keine befriedigende Auflösung der Stöchiometrien erreicht wird. Die Mischung aus unterschiedlichen Komplexstöchiometrien erklärt auch die hohen Fehler der Bindungskonstanten (für D-Tryptophan und α -CD betragen die Bindungskonstanten 805 ± 327 bzw. $651 \pm 269 \text{ M}^{-1}$, für L-Tryptophan und α -CD 190 ± 32 bzw. $154 \pm 30 \text{ M}^{-1}$). Solche hohen Fehler treten immer dann auf, wenn die angenommene 1:1-Stöchiometrie nicht ausschließlich auftritt. Dies wird auch im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“ diskutiert.


 Abbildung 3.2-1: Job Plots für D- und L-Tryptophan mit α -CD, pH 2.5

Die Enantiomere von Phenylalanin zeigen bei allen pH-Werten und sowohl mit α - als auch mit β -CD keine definierten Komplexstöchiometrien, die Job-Plots sind noch weniger interpretierbar als die des Tryptophans. Mit α -CD war mit Hilfe der potentiometrischen Titration keine Bindungskonstante messbar, die mittels UV-Spektroskopie ermittelten Bindungskonstanten liegen bei 2.32 bzw. 2.60 M^{-1} , sind also sehr klein. Die potentiometrisch ermittelten Bindungskonstanten der Phenylalanin-Enantiomere mit β -CD sind mit 83 bzw. 86 M^{-1} ebenfalls relativ klein. Wahrscheinlich sind diese Bindungen, die eine bis zwei Zehnerpotenzen geringer ausfallen als die des Tryptophans (s. o.) zu klein, um mit Hilfe eines Job-Plots erfasst zu werden.

Phenylglycin scheint weder mit α - noch mit β -CD eine Bindung einzugehen¹⁰¹, deswegen verwundert es nicht, dass die Job-Plots keine definierte Komplexstöchiometrie liefern, sondern ganz und gar unauswertbar sind.

Tyrosin geht mit α -CD anscheinend ebenfalls keine Bindung ein^{70,100} und liefert deswegen nicht auswertbare Job-Plots.

3.2.4 Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen mittels UV-Spektroskopie

3.2.4.1 Experimentelles

Die Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen mittels UV-Spektroskopie wird analog zu der Bestimmung durch potentiometrische Titration durchgeführt.^{63,102} Zu einer festen Konzentration des den Chromophor tragenden Komplexpartners (in diesem Fall die Aminosäure) wird das Cyclodextrin in steigender Konzentration hinzu gegeben. Gemessen wird bei einer immer gleich bleibenden Wellenlänge am Maximum der unkomplexierten Aminosäure/des unkomplexierten Dipeptids. Die mit

Hilfe dieser Methode untersuchten Aminosäuren in Kombination mit α -CD sind in Tabelle 3-2 dargestellt. Der pH-Wert betrug dabei immer 2.5 (50 mM Phosphat-Puffer).

Die Bezugsquellen der Chemikalien finden sich im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“.

Tabelle 3-2: Die untersuchten Aminosäuren

Aminosäure	Konzentration der Aminosäure	Konzentrationsbereich des α -Cyclodextrins
D-Phenylalanin	6 mM	0 - 54 mM
L-Phenylalanin	6 mM	0 - 54 mM
D-Phenylglycin	3 mM	0 - 27 mM
L-Phenylglycin	3 mM	0 - 27 mM
D-Tyrosin	0,06 mM	0 - 0,54 mM
L-Tyrosin	0,06 mM	0 - 0,54 mM

Die Messungen wurden auf einem Shimadzu UVmini-1240-Spektrometer (Shimadzu, Duisburg, D) durchgeführt.

3.2.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Die nach 3.2.4.1 erhaltenen Bindungskonstanten sind in Tabelle 3-3 dargestellt:

Tabelle 3-3: Bindungskonstanten (in M^{-1}) aromatischer Aminosäuren mit α -CD bei pH 2.5*

Aminosäure	K	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Tyrosin	ka	ka	70	Cal
L-Tyrosin	ka	ka, 794 ^a	70,71	Cal
D-Phenylglycin	ka	nu		
L-Phenylglycin	ka	nu		
D-Phenylalanin	2.32 ± 0.57	18.1 ^c , 20.6 ^c	72	Cal, SIT
L-Phenylalanin	2.60 ± 0.40	15 ^a , 25 ^d , 8 ^e , 12589 ^a 33.3 ^a , 12.4 ^a , 15.5 ^c , 15.9 ^c	70,71, 72,73,74	Cal, NMR, UV, SIT

*ka = keine Assoziation feststellbar; nu = nicht untersucht; Cal = Kalorimetrie; SIT = Spektrophotometrische Verdrängungstitration; NMR = ¹H-NMR-Spektroskopie; UV = UV-Spektroskopie

^apH 7.0; ^bpH 9.0; ^cpH 11.0; ^dpH 11.3; ^epH 13.6

In Abbildung 3.2-2 werden die Graphen für D- und L-Phenylalanin mit α -CD bei pH 2.5 gezeigt.

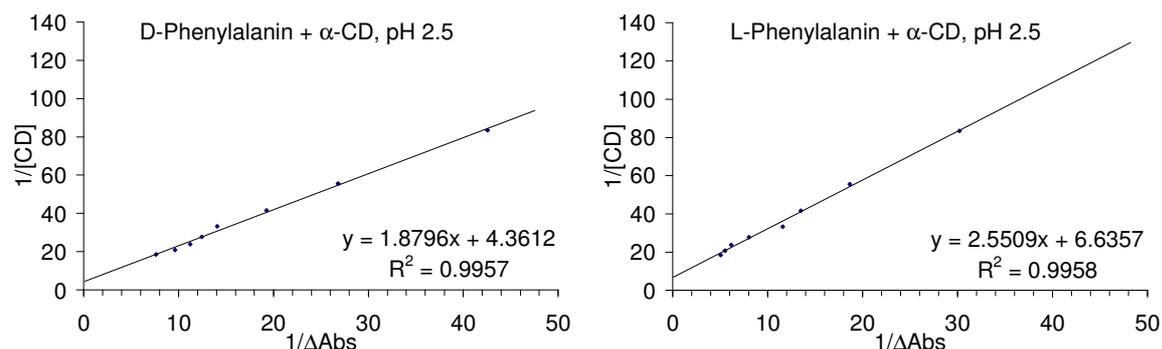


Abbildung 3.2-2: Plots für die Bindungskonstanten von D- und L-Phenylalanin mit α -CD bei pH 2.5

Die UV-Spektren der Enantiomere von Phenylalanin weisen einen bathochromen Shift von λ_{\max} bei Anwesenheit von α -CD auf. Dies ist wahrscheinlich auf die hohe Elektronendichte im Innern der hydrophoben Kavität zurückzuführen, die eine partielle Abschirmung der anregbaren Elektronen der Aminosäure bewirken, wenn sie sich im Innern der CD-Kavität befinden.

Die erhaltenen Bindungskonstanten für die Enantiomere von Phenylalanin mit α -CD sind recht klein, erheblich kleiner als die mit anderen Methoden ermittelten Werte. Dies rechtfertigt die im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“ Vermutung, die Bindungskonstanten für Phenylalanin und α -CD seien möglicherweise zu klein, um mit der potentiometrischen Methode erfasst zu werden. Dennoch weisen die relativ kleinen Standardabweichungen der mittels UV-Spektroskopie ermittelten Bindungskonstanten darauf hin, dass es sich um echte Bindungsphänomene und nicht um zufällige Übereinstimmungen mit dem Auftreten der entsprechenden Komplexe und der angenommenen 1:1-Stöchiometrie handelt. Die Unterschiede der Bindungskonstanten für D-Phenylalanin/ α -CD und L-Phenylalanin/ α -CD sind nicht signifikant.

3.3 CD-Spektroskopie

3.3.1 Theoretische Grundlagen

Bei der CD-Spektroskopie handelt es sich um eine chiroptische Methode, also eine optische Messmethode, die auf der Chiralität der untersuchten Stoffe basiert. Wie schon in Kapitel 1, Einleitung - Chiralität, erläutert, ist der Refraktionsindex α der Drehwinkel des linear polarisierten Lichtes in Abhängigkeit von Schichtdicke und Wellenlänge.

Einen Graphen, in dem der Refraktionsindex α gegen die Wellenlänge aufgetragen ist, nennt man Dispersionskurve. Die normale optische Rotationsdispersion (ORD) $\alpha(\lambda)$ bzw. $\Phi(\lambda)$ hat einen monotonen Kurvenverlauf, wohingegen die anomale ORD-Kurve im Bereich von Absorptionsbanden durch Überlagerung mit einem S-förmigen Anteil entsteht (siehe Abbildung 3.3-1).

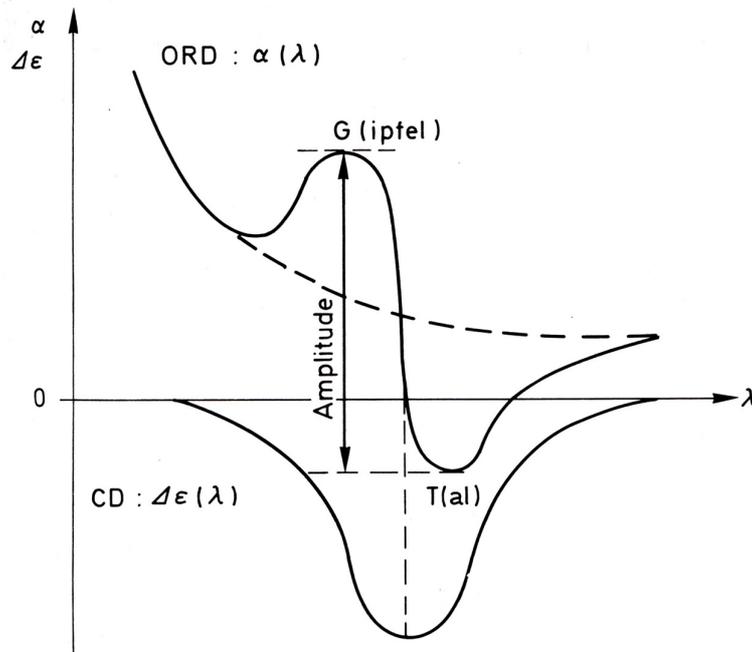


Abbildung 3.3-1: Cotton-Effekt: Zusammenhang zwischen ORD- und CD-Kurve; in diesem Beispiel ist der Circular dichroismus (CD) negativ und die normale optische Rotationsdispersion (ORD) (gestrichelte Kurve) positiv (nach Lit. ⁴)

$|E_r| \neq |E_l|$ bedeutet, dass die E-Vektoren der beiden entgegengesetzt zirkular polarisierten Lichtstrahlen nach dem Durchgang durch das optisch aktive Medium infolge unterschiedlicher Schwächung unterschiedliche Länge haben. Dadurch resultiert bei ihrer Überlagerung keine linear polarisierte Welle mehr, sondern das Vektordiagramm wird elliptisch. Durchläuft die Spitze des E-Vektors die Ellipse im Uhrzeigersinn, spricht man von einem positiven, anderenfalls von einem negativen Circular dichroismus (CD). Den Graphen der Funktion $\Delta\epsilon(\lambda)$, also Circular dichroismus in Abhängigkeit von der Wellenlänge, nennt man Circular dichroismus-Spektrum oder kurz CD-Spektrum. Anomale optische Rotationsdispersion und Circular dichroismus bilden zusammen den Cotton-Effekt.⁴

Die Bezeichnung „Circular dichroismus“ wird verwendet, weil die ursprünglichen Studien im sichtbaren Bereich durchgeführt wurden und dort festgestellt wurde, dass die betreffende Lösung ihre Farbe änderte, wenn sie mit rechts- oder linkspolarisiertem Licht bestrahlt wurde.¹⁰³

Ein Cotton-Effekt ist also an die Anwesenheit eines Chromophors gebunden. Nach Moscowitz¹⁰⁴ unterscheidet man zwei Typen: „Inhärent dissymmetrische“ Chromophore sowie Chromophore mit lokaler Symmetrie. Bei der Absorption von Licht wird ein Elektron aus einem (doppelt) besetzten Orbital in ein antibindendes unbesetztes Orbital überführt, und wenn diese beiden Orbitale (bedingt durch ein entsprechendes Gerüst) chiral sind, so ist bei der Wechselwirkung mit dem Lichtstrahl ein starker Cotton-Effekt zu erwarten.¹⁰³

Die meisten Chromophore haben hingegen eine lokale Symmetrie (Symmetrieebene); ihr Elektronensystem ist somit achiral und sollte mit einem links- und einem rechtszirkular polarisierten Lichtstrahl gleich stark interferieren. Sind derartige Chromophore aber in eine chirale Umgebung eingebaut, dann ist zumindest noch eine dissymmetrische Störung der ansonsten symmetrischen Orbitale festzustellen, die sich ebenfalls im Auftreten eines Cotton-Effektes äußert. Derartige Chromophore gehören dem Typ der „inhärent symmetrischen, aber dissymmetrisch gestörten“ Chromophore an.¹⁰³

Schließlich lassen sich auch noch Verbindungen ohne Chromophor (im üblichen Sinne) erfolgreich untersuchen, wenn man sie in Derivate überführt, die einen Cotton-Effekt geben: Wenn man z. B. ein Cyclodextrin zu einer wässrigen Lösung eines achiralen potentiellen Gastes gibt, wird der Gast chiral und man kann einen induzierten Cotton-Effekt in seinem Circular dichroismus-Spektrum beobachten. Dieser Effekt kann hauptsächlich auf die induzierte optische Aktivität zurückgeführt werden, die entsteht, wenn das Gastmolekül in eine chirale Umgebung gebracht wird. Der Cotton-Effekt wird nur dann beobachtet, wenn das Gastmolekül, oder genauer gesagt, seine chromophore Gruppe, in die Cyclodextrin-Kavität eingeschlossen wird. Eine oberflächliche Wechselwirkung des Gastes mit dem Äußeren des Cyclodextrins mag zwar u. U. andere spektrale Eigenschaften verändern, sie führt jedoch nicht zu einem induzierten Circular dichroismus. Das Vorzeichen und die Intensität des induzierten Circular dichroismus sind abhängig von der Orientierung des Chromophoren in der Cyclodextrin-Kavität. Wenn das elektrische Dipolmoment mit der Achse des Cyclodextrins übereinstimmt, ist ein positiver Cotton-Effekt zu beobachten, wenn sie senkrecht zueinander stehen, führt dies zu einem negativen Cotton-Effekt.²²

An Stelle von $\Delta\epsilon(\lambda)$ wird häufig die molare Elliptizität $[\Theta]_M$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen:

$$[\Theta]_M = \frac{\Theta \cdot M}{100 \cdot c \cdot l} = 3,3 \cdot 10^3 \cdot \Delta\epsilon \quad \text{Gleichung 3.3-1}$$

$$[\Theta]_M = 10^{-2} \cdot [\Theta] \cdot M \quad \text{Gleichung 3.3-2}$$

$$[\Theta] = \frac{\Theta}{c \cdot l} \quad \text{Gleichung 3.3-3}$$

mit

- Θ = Elliptizität in Grad
- C = Konzentration in g/ml
- L = Schichtdicke in dm
- M = Molmasse¹⁰³

3.3.2 Experimentelles

Die Bestimmung der Komplexbindungskonstanten mittels CD-Spektroskopie wird analog den Bestimmungen mittels UV-Spektroskopie und potentiometrischer Titration durchgeführt: Zu einer festen Konzentration des den Chromophor tragenden Komplexpartners (in diesem Fall das Dipeptid) wird das Cyclodextrin in steigender Konzentration hinzu gegeben. Es wird ein CD-Spektrum von 400-190 nm aufgenommen und das entsprechende CD-Spektrum des jeweiligen Cyclodextrins in der entsprechenden Konzentration subtrahiert.

Die CD-Spektren wurden mit Hilfe eines Jasco J-715-Spektrometers (JASCO Corp., Japan) aufgenommen. Sie wurden in 1-nm-Schritten aufgenommen mit jeweils drei Wiederholungsmessungen bei einer Temperatur von 25 °C. Mit Hilfe dieser Methode wurden die DD- und LL-Enantiomere von Ala-Phe und Ala-Tyr in Kombination mit β -CD, HS- β -CD (und HDAS- β -CD) in einem 50 mM Phosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 2.5 bzw. 3.5 untersucht.

Die Konzentration des Dipeptids betrug immer 0.07 mM, die CD-Konzentrationen betragen 0.6 mM, 1.2 mM, 3.0 mM, 6.0 mM und 9.0 mM.

Die Bezugsquellen der Chemikalien finden sich im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“. HS- und HDAS- β -Cyclodextrin wurden von Beckman (Fullerton, CA, USA) bezogen.

3.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Es wurden die DD- und LL-Enantiomere der Dipeptide Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -Cyclodextrin (β -CD), *Heptakis*-6-sulfato- β -cyclodextrin (HS- β -CD) und *Heptakis*-2,3-diacetyl-6-sulfato- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD) bei pH 2.5 und pH 3.5 untersucht, um die Ergebnisse bezüglich dieser Dipeptide in Kombination mit diesen Cyclodextrinen, die mit Hilfe der Kapillarelektrophorese^{48,53,55,105} und der NMR-Spektroskopie (siehe Kapitel „NMR-Spektroskopie“ und Lit.¹⁰¹) gewonnen wurden, weiter zu beleuchten.

Der Effekt, der sich bei Zugabe eines Cyclodextrins (β -CD oder HS- β -CD) zu einer Lösung von Ala-Phe oder Ala-Tyr einstellen kann, ist immer der Gleiche: Das Extremum bei 197 nm (Ala-Phe) bzw. 201 nm (Ala-Tyr) wird im Betrag immer kleiner, je mehr Cyclodextrin man zugibt. Dies sieht man z. B. deutlich bei den Enantiomeren von Ala-Phe bei pH 2.5 und Zugabe von β -CD, wie in Abbildung 3.3-2 dargestellt. Die Untersuchungen mit HDAS- β -CD führten zu nicht auswertbaren CD-Spektren, da das HDAS- β -CD eine Eigenabsorption besitzt, die auch durch Subtraktion der Spektren von HDAS- β -CD in Puffer (ohne Dipeptid) von den Spektren mit Dipeptid und HDAS- β -CD äußerst störend war.

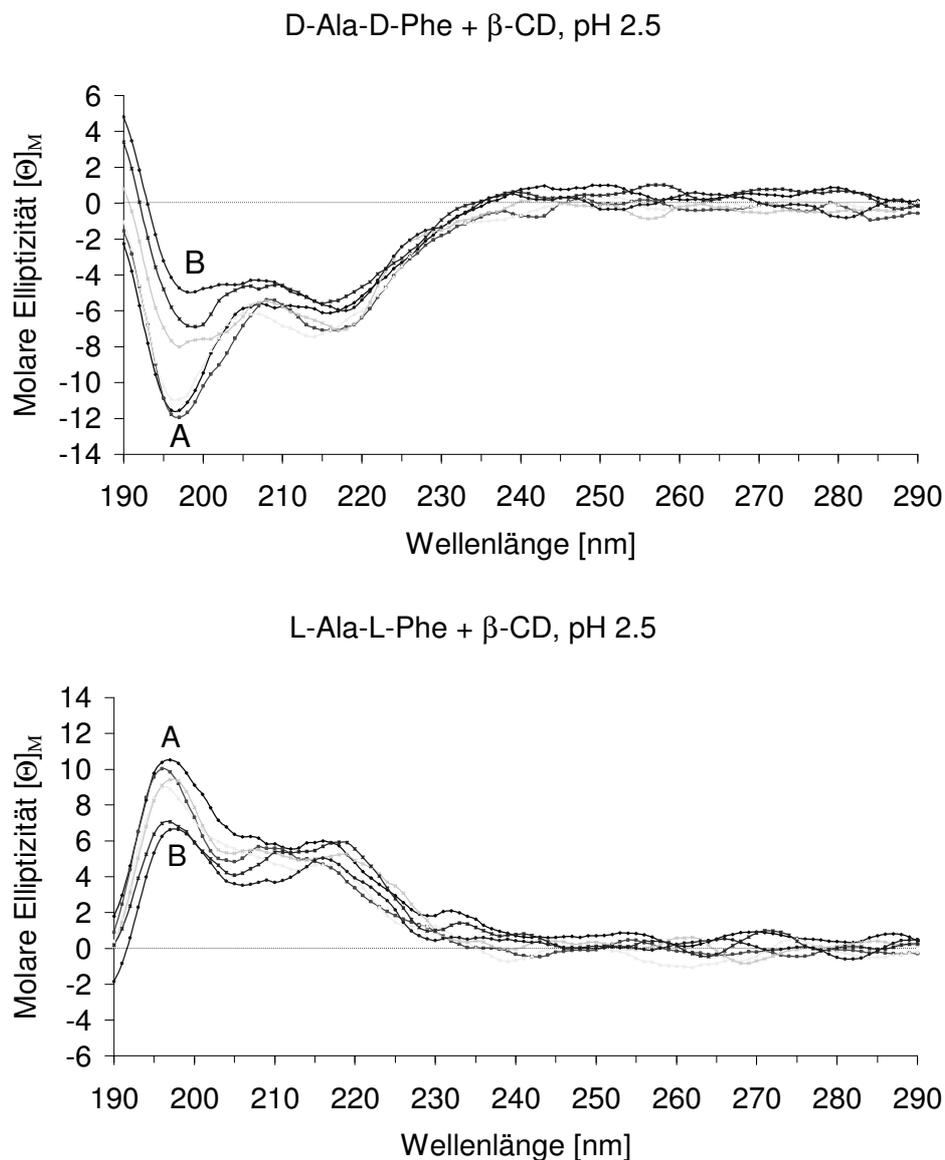


Abbildung 3.3-2: CD-Spektren von D-Ala-D-Phe und L-Ala-L-Phe bei variierenden β -CD-Konzentrationen: 0 mM, 0.6 mM, 1.2 mM, 3.0 mM, 6.0 mM und 9.0 mM (von A nach B). Die Konzentration von Ala-Phe beträgt jeweils 0.07 mM.

In Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5 sind die nach 3.3.2 ermittelten Bindungskonstanten bei den pH-Werten 2.5 und 3.5 dargestellt.

Tabelle 3-4: Bindungskonstanten (in M^{-1}) von Alanyl-Dipeptiden mit β -CD

Dipeptid	K pH 2.5	K pH 3.5	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Ala-D-Phe	126 ± 37	438 ± 193	42 ^a , 33 ^c , 25 ^d , 12 ^e , 32 ^f	48,55	CE*
L-Ala-L-Phe	185 ± 63	281 ± 271	40 ^a , 28 ^c , 25 ^d , 14 ^e , 36 ^f	48,55	CE
D-Ala-D-Tyr	319 ± 123	ka*	173 ^b , 110 ^e , 33 ^f	53,55	CE
L-Ala-L-Tyr	453 ± 150	ka	125 ^b , 82 ^e , 36 ^f	53,55	CE

*ka = keine Assoziation/Plot nicht auswertbar; CE = Kapillarelektrophorese

^apH 1.8; ^bpH 2.5; ^cpH 2.7; ^dpH 3.0; ^epH 3.5; ^fpH 9.5

Tabelle 3-5: Bindungskonstanten (in M^{-1}) von Alanyl-Dipeptiden mit HS- β -CD

Dipeptid	K pH 2.5	K pH 3.5	Literaturwerte für K	Ref.	Methode
D-Ala-D-Phe	370 ± 51	433 ± 122	214 ^a , 13.3 ^b	105	CE*
L-Ala-L-Phe	662 ± 282	ka*	169 ^a , 13.4 ^b	105	CE
D-Ala-D-Tyr	ka	555 ± 142	429 ^a , 19 ^b	105	CE
L-Ala-L-Tyr	ka	388 ± 148	307 ^a , 23 ^b	105	CE

*ka = keine Assoziation/Plot nicht auswertbar; CE = Kapillarelektrophorese

^apH 2.5; ^bpH 5.3

Wie bereits erwähnt, wird theoretisch ein Circular dichroismus induziert, wenn man ein achirales Molekül in eine chirale Umgebung bringt (in diesem Fall das Innere der Cyclodextrin-Kavität). Dies ließe vermuten, dass der in den vorliegenden, chiralen Dipeptiden inhärente Circular dichroismus noch verstärkt würde. Das ist jedoch in keinem der untersuchten Fälle passiert. Vermutlich hat der induzierte Circular dichroismus in unserem Fall ein genau entgegengesetztes Vorzeichen wie der inhärente Circular dichroismus, was das Kleinerwerden des Circular dichroismus bei Zugabe von Cyclodextrin erklären würde.

Die ermittelten Bindungskonstanten sind zwar größtenteils von der gleichen Größenordnung wie die in der Literatur gefundenen, aber dennoch mit Vorsicht zu betrachten. Leider sind die Standardabweichungen relativ hoch, so dass sich die Bindungskonstanten für die unterschiedlichen Enantiomere nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.4 Massenspektrometrie

3.4.1 Theoretische Grundlagen

Befinden sich in einem Massenspektrometer in der Gasphase beschleunigte, positiv geladene Teilchen, so werden sie durch ein homogenes Magnetfeld proportional zu ihrer Masse aufgetrennt. Die Ionenerzeugung und die Vorgänge im so genannten Analysatorteil des Massenspektrometers finden im Hochvakuum statt, um unfreiwillige Zusammenstöße zwischen Ionen und Molekülen oder Atomen zu vermeiden.

Von einem der Einlasssysteme (Gas- oder Direkteinlass) strömt ein feiner, möglichst konstanter Molekülstrahl in die Ionenquelle und trifft dort senkrecht auf einen Elektronenstrahl (zwischen Glühkathode und Anode). Durch Wechselwirkung der Elektronen mit den neutralen Molekülen entstehen positiv geladene Molekül-Ionen:



oder seltener



Die nichtionisierten Teilchen werden durch die Hochvakuum-Pumpen aus dem Ionenquellen-Raum entfernt. Die in der Ionenquelle entstandenen Molekül-Ionen hingegen werden nun beschleunigt und fokussiert. Die Beschleunigung der Teilchen geschieht durch Anlegen einer Spannung an die Quelle, wobei die Endgeschwindigkeit am Austrittsspalt erreicht wird. Die Fokussierung, d. h. Bündelung der Ionen, wird durch elektrostatische Zusatzfelder erreicht, am Austrittsspalt wird ein enger zentraler und damit homogener Bereich des Ionenstrahls in den Analysatorteil durchgelassen. Die Geschwindigkeit der Ionen ergibt sich dabei wie folgt:

$$z \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2} \quad \text{Gleichung 3.4-1}$$

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot z \cdot U}{m}} \quad \text{Gleichung 3.4-2}$$

wobei z die Ionenladung ($= n \cdot e$), m die Ionenmasse, v die Ionengeschwindigkeit und U die Beschleunigungsspannung darstellt.

Im Analysatorteil erfolgt die Auftrennung der Ionen aufgrund ihrer Masse. Die Auftrennung geschieht in einem Feld eines Elektromagneten, in dem unter den Teilchen gleicher Ladung die leichten stärker abgelenkt werden als die schwereren, d. h. die verschiedenen

schweren Teilchen fliegen auf masseabhängigen Ablenkradien. Für den Ablenkradius r_m gilt:

$$r_m = \frac{m \cdot v}{z \cdot B} \quad \text{Gleichung 3.4-3}$$

dabei ist B die Magnetfeldstärke.

Aus Gleichung 3.4-1 und Gleichung 3.4-3 ergibt sich die massenspektrometrische Grundgleichung

$$\frac{m}{z} = \frac{r_m^2 \cdot B^2}{2 \cdot U} \quad \text{Gleichung 3.4-4}$$

Das Masse/Ladungsverhältnis ist also abhängig von der Magnetfeldstärke, dem Ablenkradius und der Beschleunigungsspannung.

3.4.2 Experimentelles

Es wurden 0.6 mM L-Phenylalanin und 0.6 mM β -Cyclodextrin in Millipore-Wasser gelöst, filtriert und direkt in die Ionenfalle (Agilent LC-MSD-Trap-SL, Agilent Technologies, Waldbronn, D) injiziert. Es wurde im positiven Modus mit Elektronenspray-Ionisierung (ESI) gearbeitet. Proben mit geringerer Konzentration als 0.6 mM erbrachten keine befriedigenden Ergebnisse.

Die Bezugsquellen der Chemikalien finden sich im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“.

3.4.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Massenspektrometrie kann Hinweise über die Komplexbildung in der Gasphase geben. Obwohl in dieser völlig lösungsmittelfreien Umgebung die Komplexbildung u. U. ganz anderen Mechanismen folgt, kann man doch einige Hinweise und Schlussfolgerungen darüber erhalten, wie der Komplex in Lösung vorliegt. Um festzustellen, ob die Methode für unsere speziellen Fragestellungen geeignet ist, wurde als „Schnellschuss“ der Komplex zwischen L-Phenylalanin und β -Cyclodextrin untersucht, weil dieser mit Hilfe der potentiometrischen Methode (siehe dort und Lit.¹⁰⁰) einigermaßen große und verlässliche Bindungskonstanten mit kleinem Fehler aufweist (85 ± 7 bzw. $154 \pm 8 \text{ M}^{-1}$) und weil die beiden Komponenten preiswert und in ausreichender Menge verfügbar sind.

Das Massenspektrum der in 3.4.2 beschriebenen Probe liefert einige auffällige Signale, wie in Abbildung 3.4-1 zu sehen ist. Die Zuordnung dieser Signale ist in Tabelle 3-6 zusammengestellt.

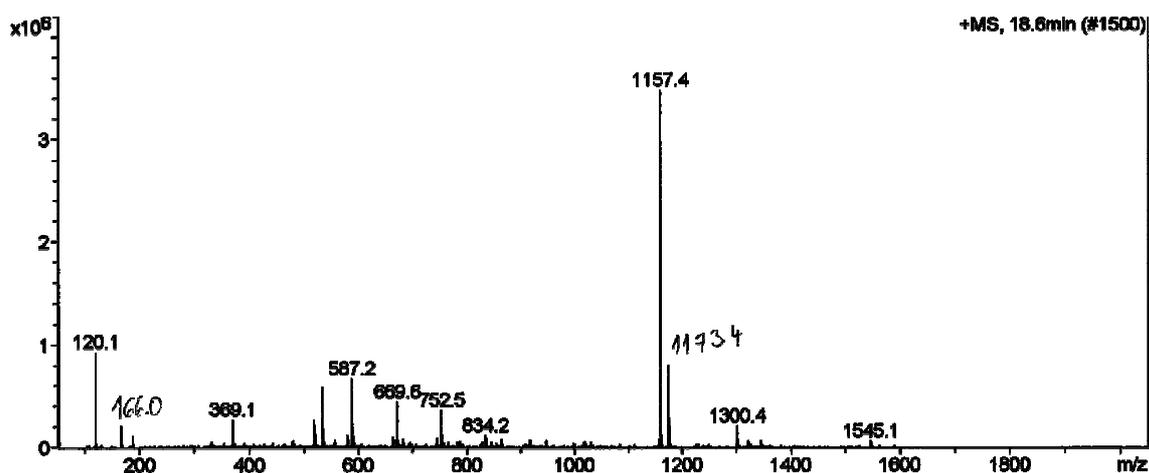


Abbildung 3.4-1: Massenspektrum einer 1:1-Mischung aus β -Cyclodextrin und L-Phenylalanin (jeweils 0.6 mM)

Tabelle 3-6: Signale des Massenspektrums von L-Phe ($M_r = 165$) und β -CD ($M_r = 1135$) im Verhältnis 1:1 (jeweils 0.6 mM) und ihre Zuordnung zu den entsprechenden Fragmenten

m/z	Zuordnung
120.1	$m(\text{L-Phenylalanin}) + m(\text{H}^+) - m(\text{CO}_2)$
166.0	$m(\text{L-Phenylalanin}) + m(\text{H}^+)$
369.1	?
587.2	?
669.6	?
752.5	?
1157.4	$m(\beta\text{-CD}) + m(\text{Na}^+)$
1173.4	?
1300.4	$m(\beta\text{-CD}) + m(\text{L-Phenylalanin}) + m(\text{H}^+)$
1320.4	$m(\beta\text{-CD}) + m(\text{L-Phenylalanin}) + m(\text{Na}^+)$
1344.4	?

Es dominiert hier das Signal für das unkomplexierte Cyclodextrin ($m/z = 1157.4$), ebenso sind Signale für die unkomplexierte Aminosäure ($m/z = 120.1$ und $m/z = 166.0$) zu finden. Jedoch ist auch ein kleiner Anteil des 1:1-Komplexes zu sehen ($m/z = 1300.4$ und $m/z = 1320.4$), wohingegen Signale, die einem 1:2- oder 2:1-Komplex entsprechen würden, nicht beobachtet werden. Die Stöchiometrie des β -CD/L-Phenylalanin-Komplexes beträgt demnach 1:1. Was bei diesen massenspektrometrischen Untersuchungen immer eine Unsicherheitsquelle darstellt, ist das Auftreten von Addukten bzw. Anlagerungs- und nicht Einlagerungskomplexen.¹⁰⁶ Um dieses ausschließen zu können, müssten jedoch weitere, detaillierte Untersuchungen durchgeführt werden.

3.5 Zusammenfassung

Es wurden UV-spektroskopisch die Stöchiometrien der Komplexe der D- und L-Enantiomere von Phenylalanin und Phenylglycin mit α - und β -CD und von Tyrosin und Tryptophan mit α -CD mittels so genannter „Job-Plots“ bestimmt. Dabei zeigte nur Tryptophan mit α -CD Anzeichen für ein tatsächliches Auftreten eines Einschlusskomplexes, und zwar wahrscheinlich mit einer Mischung aus den Stöchiometrien 1:2 (AS:CD) und 1:1. Alle anderen Job-Plots waren nicht auswertbar.

Massenspektrometrische Untersuchungen einer 1:1-Mischung von L-Phenylalanin und β -CD ergaben das Auftreten eines 1:1-Komplexes. Andere Komplexstöchiometrien wurden nicht beobachtet.

Des Weiteren wurden die Bindungskonstanten der D- und L-Enantiomere von Phenylalanin, Phenylglycin und Tyrosin mit α -CD UV-spektroskopisch bestimmt. Auch hier zeigten Phenylglycin und Tyrosin keine Anzeichen für das Auftreten eines Einschlusskomplexes mit α -CD. Für D-Phenylalanin und α -CD ergab sich eine Bindungskonstante von 2.32 ± 0.57 , für L-Phenylalanin und α -CD eine Bindungskonstante von 2.60 ± 0.40 .

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden die Bindungskonstanten der Einschlusskomplexe der DD- und LL-Enantiomere der Dipeptide Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -CD und HS- β -CD bestimmt. Die gefundenen Bindungskonstanten weisen alle recht hohe Standardabweichungen auf, so dass sich die Enantiomere nicht signifikant voneinander unterscheiden und teilweise im Widerspruch zu den im Zuge dieser Arbeit mit anderen Methoden gefundenen Bindungsphänomenen stehen.

4 NMR-spektroskopische Untersuchungen von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen

4.1 Einleitung

4.1.1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

Die meisten Atomkerne besitzen einen Eigendrehimpuls P (Kernspin) und damit ein magnetisches Moment

$$\mu = \gamma \cdot P \quad \text{Gleichung 4.1-1}$$

Das magnetische Verhältnis γ ist eine für die einzelnen Kernarten charakteristische Konstante und gibt an, „wie stark magnetisch“ ein bestimmtes Isotop ist. Der Eigendrehimpuls P ist gequantelt:

$$P = \sqrt{I(I+1)} \cdot \frac{h}{2\pi} \quad \text{Gleichung 4.1-2}$$

Nach Einsetzen von Gleichung 3.2-1 ergibt sich daraus:

$$\mu = \gamma \cdot \sqrt{I(I+1)} \cdot \frac{h}{2\pi} \quad \text{Gleichung 4.1-3}$$

I ist die Kerndrehimpuls- oder Kernspin-Quantenzahl des betreffenden Atomkerns und kann ganz- oder halbzahlige Werte haben ($I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, 5/2, 3, \dots$). Im homogenen, statischen Magnetfeld B_0 nimmt der Drehimpuls-Vektor P bestimmte ausgewählte Winkel zum B_0 -Vektor ein (Richtungsquantelung). In diesen Stellungen beträgt die Komponente von P in Feldrichtung

$$P_B = m \cdot \frac{h}{2\pi} \quad \text{Gleichung 4.1-4}$$

Für die Orientierungs- oder magnetische Quantenzahl m gilt dabei $m = +I, I-1, I-2, \dots, -I+1, -I$. Die insgesamt $(2I + 1)$ Eigenzustände sind energetisch aufgespalten. Für Wasserstoff ist $I = 1/2$ und somit $m = \pm 1/2$. Im thermischen Gleichgewicht gehen die ^1H -Kerne eine Boltzmann-Verteilung ein. Da die Energiedifferenz

$$\Delta E = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} B_0 \quad \text{Gleichung 4.1-5}$$

im Vergleich zur mittleren thermischen Energie sehr klein ist, wird der energieärmere Zustand nur ganz geringfügig stärker besetzt. Als Resonanzbedingung erhält man die Beziehung

$$h\nu = \gamma \cdot \frac{h}{2\pi} B_0 \quad \text{Gleichung 4.1-6}$$

Bei erfüllter Resonanzbedingung würde durch Absorptionsvorgänge der Besetzungsunterschied der beiden Energieniveaus bald aufgehoben, das System würde gesättigt werden, wenn nicht in ausreichendem Umfang der rückläufige Prozess, die Relaxation, stattfände.

Die beim Übergang eines Kerns vom höheren ins tiefere Niveau frei werdende Energie kann in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben werden (Spin-Gitter-Relaxation). Dieser Prozess vollzieht sich mit einer Geschwindigkeitskonstante $1/T_1$. Man nennt T_1 die longitudinale Relaxationszeit, weil dabei die Magnetisierung der Kerne in Feldrichtung geändert wird. Auch die transversale Magnetisierung unterliegt durch die Wechselwirkung der Kernmomente untereinander einer zeitlichen Änderung (Spin-Spin-Relaxation). Dementsprechend definiert man eine transversale Relaxationszeit T_2 .

Die exakte Resonanzfrequenz einer bestimmten Kernsorte hängt in charakteristischer Weise von der Kernumgebung ab. Die am Kernort effektive Magnetfeldstärke unterscheidet sich von B_0 um das induzierte Feld σB_0 .

$$B_{eff} = B_0 - \sigma B_0 \quad \text{Gleichung 4.1-7}$$

Die dimensionslose Abschirmungskonstante σ geht in die Resonanzbedingung ein

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma) \quad \text{Gleichung 4.1-8}$$

Je stärker ein Kern abgeschirmt ist, je größer also σ ist, desto kleiner wird B_{eff} , d. h. desto größer muss bei konstanter Frequenz das angelegte Feld B_0 sein, um den Kern in Resonanz zu bringen. Analog dazu muss ν bei konstantem B_0 -Feld mit wachsender Abschirmung abnehmen.

Die Lage der Kernresonanz-Absorptionen lässt sich wegen $\nu = f(B_0)$ nicht durch eine absolute Skala von ν oder B_0 angeben. Stattdessen bezieht man die Signallage auf eine Referenzverbindung. Bei der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie hat sich dafür Tetramethylsilan (TMS, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) bewährt. Bei der Messfrequenz ν ergibt sich für die Differenz der Signallagen von untersuchtem Kern X und TMS:

$$\Delta B = B(\text{X}) - B(\text{TMS}) \quad \text{Gleichung 4.1-9}$$

und entsprechend auf der Frequenzskala in Hz

$$\Delta\nu = \nu(\text{X}) - \nu(\text{TMS}) = \frac{\gamma}{2\pi} \Delta B \quad \text{Gleichung 4.1-10}$$

Zur Bestimmung der Signallage definiert man als chemische Verschiebung (chemical shift) δ des Kernes X den Zahlenwert

$$\delta(\text{X}) = 10^6 \frac{\Delta\nu}{\nu} \quad \text{Gleichung 4.1-11}$$

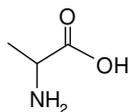
mit $\delta(\text{TMS}) = 0$. δ ist eine dimensionslose, von Messfrequenz bzw. Magnetfeldstärke unabhängige, für den betrachteten Kern in seiner Umgebung charakteristische Größe. Da $\Delta\nu$ im Vergleich zu ν sehr klein ist, hat man den Faktor 10^6 eingeführt und gibt δ in ppm (parts per million) an.⁴

4.1.2 Ziel der Untersuchungen

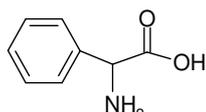
Die Strukturen von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen wurden bereits intensiv mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht.¹⁰⁷ Es ist bekannt, dass im Bereich der ^1H -NMR-Spektroskopie die Komplexbildung von Cyclodextrinen mit einem aromatischen Molekül eine signifikante Hochfeldverschiebung der Signale der Wasserstoffatome an C-5 und/oder an C-3, die sich im Innern der Cyclodextrin-Kavität befinden, bewirkt. Diese Hochfeldverschiebung wird durch einen Ringstromeffekt durch den eingeschlossenen Aromaten bewirkt. Dabei erhalten die verschiedenen Glucopyranoseeinheiten einen identischen Abschirmungseffekt bedingt durch viele mittelwertbildende Faktoren. Der sich am stärksten auswirkende Faktor ist dabei, dass die Rotation des Moleküls im Innern der Kavität zusammen mit dem Assoziations-Dissoziationsprozess der Komplexbildung durch das Cyclodextrin sehr schnell auf der NMR-Zeitskala ist.

Um Einblicke in die jeweiligen chiralen Erkennungsmechanismen zu bekommen, wurden die Einschlusskomplexe von β -CD und den „Single Isomer“-Derivaten HS- β -CD, Diac- β -CD und HDAS- β -CD mit Alanyl-Dipeptiden mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht (siehe Abbildung 4.1-1). Darüber hinaus wurden 2D-ROESY-Experimente durchgeführt, die mehr Informationen über den jeweiligen Einschlussmodus liefern sollten.

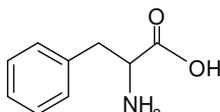
Aminosäuren



Alanin

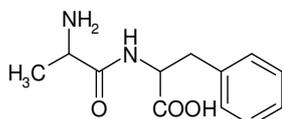


Phenylglycin

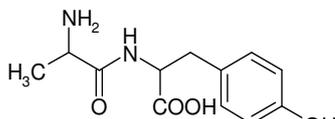


Phenylalanin

Dipeptide

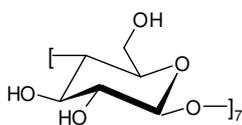


Ala-Phe

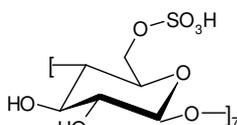


Ala-Tyr

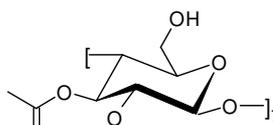
Cyclodextrine



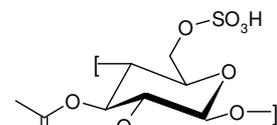
β -Cyclodextrin



HS- β -Cyclodextrin



Diac- β -Cyclodextrin



HDAS- β -Cyclodextrin

Abbildung 4.1-1: Die untersuchten Verbindungen

4.2 pH-Wert-abhängige Untersuchungen von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen

Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die pH-Wert-abhängige Bestimmung der Verschiebungen der chemischen Verschiebungen („complexation induced chemical shifts“, CICS oder $\Delta\delta$ -Werte) in wässrigen Puffern gerichtet. Da in „normalen“ $^1\text{H-NMR}$ -Messungen das Wassersignal so groß wird, dass es alle anderen Signale überdeckt, wird normalerweise deuteriertes Wasser (Deuteriumoxid oder D_2O) verwendet. Der in Deuteriumoxid mit einer normalen pH-Elektrode gemessene pH-Wert, bzw. korrekt ausgedrückt der pD-Wert, unterscheidet sich jedoch von dem pH-Wert, der gemessen werden würde, wäre der Analyt im Wasser (H_2O) gelöst.

Der Korrekturwert für pD-Werte, die mit einer Glaselektrode gemessen werden, wird z. B. von Hart¹⁰⁸ mit +0,4 pH-Einheiten angegeben, was von einer früheren Untersuchung¹⁰⁹ abweicht, in der der Korrekturwert mit 0,26 angegeben wird. Lumry *et al.*¹¹⁰ geben den Korrekturwert wiederum mit +0,4 pH-Einheiten in 99,8 % D_2O an. Mikkelsen und Nielsen¹¹¹ geben den Korrekturwert mit +0,44 pH-Einheiten an, ebenso Fife und Bruice.¹¹² Glasoe und Long¹¹³ und Mikkelsen und Nielsen¹¹¹ haben die folgenden Fakten bezüglich des Korrekturwerts ΔpD etabliert:

1. Die Potentialdifferenz ist nur von der Glaselektrode und nicht von Diffusionsphänomenen an der Flüssigkeitsbrücke (liquid junction) oder ähnlichem abhängig
2. Der Wert von ΔpD ist nicht davon abhängig, ob die Elektrode in H_2O oder in D_2O eingeweicht wurde.
3. ΔpD hängt nicht von der Acidität der untersuchten Lösungen ab, sondern bleibt invariant von pH 4 bis pH 12
4. Der ΔpD -Wert scheint unabhängig vom Typ der verwendeten Glaselektrode zu sein

Die Einzelionenaktivitäten α_H und α_D sind genau genommen nicht durch experimentelle Messungen zu bestimmen,¹¹⁴ aber ihre Summe $\alpha_H + \alpha_D$ kann mit hinreichender Genauigkeit durch $p(DH)$ -Messungen bestimmt werden (Gleichung 4.2-1):

$$p(DH) \approx -\log(\alpha_H + \alpha_D) \quad \text{Gleichung 4.2-1}$$

Um α_H und α_D einzeln zu bestimmen, muss man weitere extrathermodynamische Annahmen treffen. Dies geschieht z. B. in der Theorie von Gross und Butler,¹¹⁵ die von Purlee¹¹⁶ überarbeitet wurde. Die Gross-Butler-Purlee-Theorie führt zu folgender Gleichung:

$$\frac{\alpha_H}{\alpha_D} = \frac{1-n}{n} L^{0.5} \quad \text{Gleichung 4.2-2}$$

wo $n = D/[(D) + (H)]$ den Stoffmengenanteil von Deuterium im wässrigen Lösungsmittel und $L = 11.0$ bei $25^\circ C$ die Gleichgewichtskonstante für die Reaktion



darstellt. Wenn man $\alpha_H + \alpha_D$ und α_H/α_D kennt, ist es möglich, α_H und α_D separat zu berechnen.

Um dieses Problem der genauen Bestimmung des pD -Wertes zu umgehen, sollten die Messungen in H_2O bei genau eingestelltem pH -Wert durchgeführt werden, was zu Messungen mit unterdrücktem Wassersignal führte.

4.3 Vergleich der verschiedenen 1H -NMR-Messmethoden

Um große Wassersignale in den 1H -Spektren zu vermeiden, wurde entweder eine „Presaturation“-Methode zur Wasserunterdrückung verwendet oder lyophilisierte Probelösungen wurden in D_2O wieder aufgenommen und dann vermessen. Diese beiden Methoden wurden auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede der CICS und auf ihre gegenseitige Vergleichbarkeit geprüft.

4.3.1 Methoden der Wasserunterdrückung

Das Ziel einer Wasserunterdrückung ist es, die Größe der Wasserresonanz zu reduzieren und die Beobachtung von kleineren NMR-Signalen daneben zu ermöglichen. Man kann die Methoden zur Wasserunterdrückung in drei Bereiche einteilen:

- Methoden, die die Wasserresonanz vorabsättigen
- Methoden, die eine Netto-Anregung des Wassersignals von null erreichen
- Methoden, die die Wasserresonanz mit Hilfe von gepulsten Feldgradienten zerstören bzw. dephasieren¹¹⁷

Eine Übersicht über verschiedene Methoden der Wasserunterdrückung, die hier angewendet wurden, liefert Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1: Übersicht über die verwendeten Pulssequenzen

Name	Beschreibung	Referenz(en)
zgpr	cw-Vorabsättigung (cw presaturation)	118,119
zgcppr	Cw-Vorabsättigung mit zusammengesetzter Impulsfolge (presaturation using composite pulse)	120
p3919gp	Wasserunterdrückung mittels 3-9-19 Impulssequenz mit Gradienten (WATERGATE)	121, 122
zggpw5	Wasserunterdrückung mittels WATERGATE W5-Impulssequenz mit Gradienten durch Doppel-Echo	123

4.3.1.1 Presaturation

Eine einfache, robuste und weit verbreitete Methode zur Wasserunterdrückung ist die Vorabsättigung („Presaturation“). Ein Nachteil ist jedoch, dass austauschende Wasserstoffe ebenfalls unterdrückt werden können.

Für die „Presaturation“-Methode wird ein Impuls niedriger Energie und kontinuierlicher Wellenlänge im Frequenzbereich des zu reduzierenden Signals eingestrahlt, z. B. 1 bis 3 Sekunden vor der eigentlichen Messung, um so die Resonanz abzusättigen.¹¹⁷

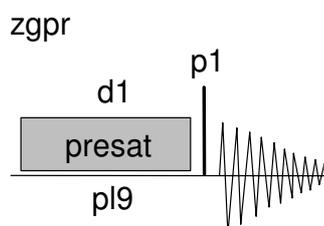


Abbildung 4.3-1: Schematische Darstellung der „Presaturation“-Impulssequenz

Ein wichtiger Parameter zur Durchführung dieses Experiments ist die Einstrahlungsleistung. Eine zu geringe Radiofrequenz-Leistung bedeutet, dass das abgesättigte Signal nicht

genügend unterdrückt wird. Eine zu hohe Radiofrequenz-Leistung kann zu großen negativen oder dispersiven Signalen in der Nähe der Absättigungsfrequenz oder Dämpfung von benachbarten Signalen sowie zu einer deutlichen Erwärmung der Probe führen. Im Vorfeld wurden dazu Versuche durchgeführt: so wurde die Einstrahlfrequenz auf das Wassersignal so optimiert, dass die Verstärkung des detektierten Signals möglichst hoch war. Die Leistung wurde zunächst mit 57 dB gesetzt, in späteren Messungen jedoch auf 60 dB erniedrigt, da dieses keinen Nachteil für die Messungen darstellte.

Ebenso wurde die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen überprüft, indem dieselben Proben an zwei aufeinander folgenden Tagen und eingefrorene und wieder aufgetaute Proben Wochen später vermessen wurden. Sie lieferten gute Übereinstimmungen.

4.3.1.2 WATERGATE

Der zurzeit effektivste Ansatz zur Wasserunterdrückung ist die Zerstörung der Netto-Lösungsmittel-Magnetisierung mittels gepulster Feldgradienten („pulsed field gradients“, PFG). Eine der populärsten Methoden ist hier die WATERGATE-Sequenz.

Die WATERGATE-Sequenz besteht aus zwei Gradientenimpulsen und einem selektiven 180° -Impuls. Zunächst findet eine Quermagnetisierung statt, die dann eine modifizierte Spin-Echo-Sequenz durchläuft. Die Gradienten verändern das Magnetfeld um die Probe herum; so können z. B. Spins, die sich am oberen Ende des Probenröhrchens befinden, eine größere Frequenz haben als Spins am Boden des Röhrchens. Der 180° -Impuls ist so ausgelegt, dass alle Signale mit Ausnahme des Wassersignals invertiert werden (Wasser ist normalerweise „on-resonance“). Jeder so invertierte Spin wird durch den zweiten Gradientenimpuls refokussiert. Jeder Spin, der nicht invertiert wurde (z. B. der von Wasser), wird durch den zweiten Gradientenpuls weiter defokussiert. Um dieses zu erreichen, eignet sich besonders ein „3-9-19“-Puls.¹¹⁷

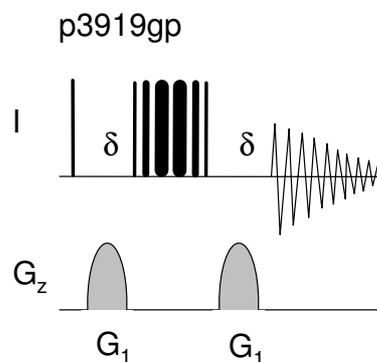


Abbildung 4.3-2: Schematische Darstellung der WATERGATE-Impulssequenz

4.3.2 Vor- und Nachteile von WATERGATE und „Presaturation“

Die WATERGATE-Methode hat sich neben der „Presaturation“-Methode weitestgehend etabliert.¹²⁴ Jedoch war es für die speziellen Anforderungen der durchzuführenden Studien erforderlich, gerade den Bereich dicht neben dem zu unterdrückenden Wassersignal genau untersuchen zu können. Deswegen wurden Vorversuche mit L-Phenylalanin (L-Phe), das ebenso wie Ala-Phe und Ala-Tyr das für unsere Messungen wichtige Wasserstoffsignal für H5 bei ca. 4.1 ppm aufweist (im Vergleich zu den Dipeptiden, für die das entsprechende Signal bei ca. 4.45 ppm liegt, ist es allerdings etwas hochfeldverschoben), und β -Cyclodextrin (β -CD) durchgeführt. Bei der WATERGATE-Methode werden die Signale dicht neben dem zu unterdrückenden Signal ebenfalls unterdrückt und können so u. U. nicht mehr genau genug ausgewertet werden, wie in Abbildung 4.3-3 zu sehen ist. Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit die „Presaturation“-Methode zur Wasserunterdrückung verwendet.

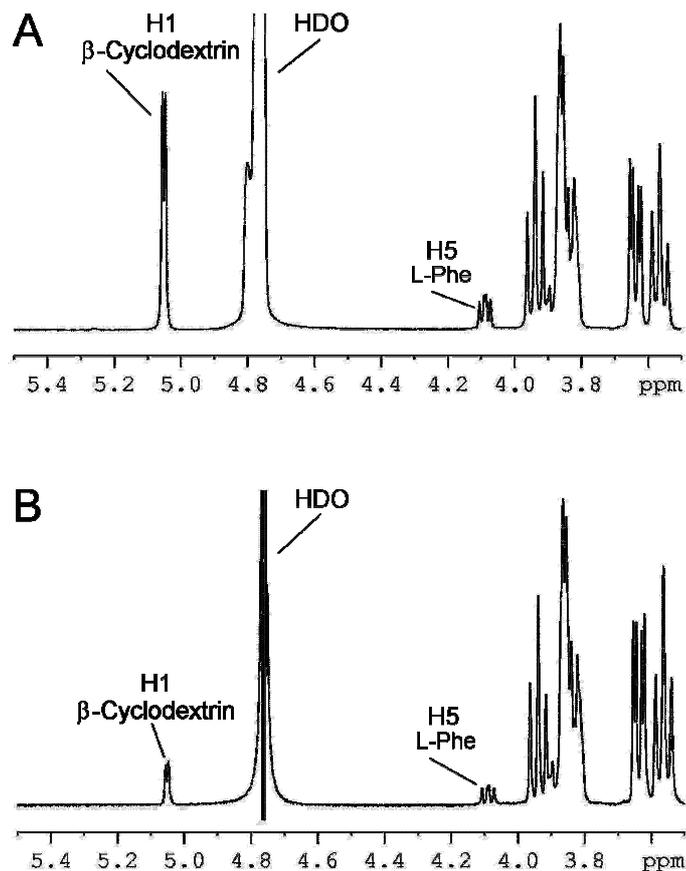


Abbildung 4.3-3: Unterschied der Signalstärke der Nachbarpeaks des zu unterdrückenden Wassersignals. A: Wasserunterdrückung mittels „Presaturation“, B: Wasserunterdrückung mittels WATERGATE

4.3.3 Wasserunterdrückung versus Lyophilisation und Wiederauflösen in Deuteriumoxid

Ein Teil der Messungen wurden auch mit im entsprechenden wässrigen Puffer gelösten, lyophilisierten und in D₂O wieder aufgelösten Proben wiederholt, um einen ganz anderen Ansatz zur Vermeidung großer Wassersignale zu testen. Dieses Verfahren ist für die Messungen von Lösungen mit genau eingestelltem pH-Wert durchaus anwendbar, da für Peptide und Proteine, die auf diese Weise behandelt werden, ein so genannter „pH-Memory-Effekt“ auftritt. Das bedeutet, dass der Protonierungszustand der im Puffer gelösten Peptide oder Proteine erhalten bleibt, auch wenn das Wasser ausgefroren wird.^{125,126}

Die lyophilisierten und in D₂O wieder aufgelöste Proben benötigen eine (zeit)aufwändigere Probenvorbereitung, höhere Kosten (größere Mengen an deuteriertem Lösungsmittel). Jedoch ist die Messung unkompliziert und kann unter Standardbedingungen mit einem Breitband-Direkt-Messkopf (broad band observer, BBO) durchgeführt werden. Beim BBO-Messkopf liegt die Breitbandspule innen und die Protonenspule außen.

Die Messungen mit Wasserunterdrückung (in unserem Falle die „Presaturation“-Methode) bietet eine einfache Probenvorbereitung und geringe Kosten (Millipore-Wasser als Lösungsmittel). Andererseits ist der Messaufwand groß: Es sollte ein Breitband-Invers-Messkopf (BBI) anstatt des standardmäßig verwendeten BBO-Messkopfes eingebaut werden. Beim BBI-Messkopf liegt die Breitbandspule außen und die Protonenspule innen, was für ¹H-Messungen zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Der BBI-Messkopf verfügt über kein automatisches „Tuning and Matching“, d. h. für jede Messung muss ein manuelles „Tuning and Matching“ durchgeführt werden.

In unserem Falle war es aufgrund der Menge der durchzuführenden Messungen sinnvoll, die Messungen mit Wasserunterdrückung durchzuführen, weil die Lyophilisation einen erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwand darstellt.

Die CICS für die wässrigen und die lyophilisierten und in D₂O wieder aufgelösten Proben sind sehr ähnlich. Allerdings ist das Signal für das Dipeptid-Proton H5 in D₂O, wie zu erwarten, ein Dublett eines Dubletts, wohingegen dasselbe Signal in H₂O, mit einer „Presaturation“-Technik gemessen, weit mehr aufgespalten ist und andere Kopplungskonstanten aufweist (siehe Abbildung 4.3-4).

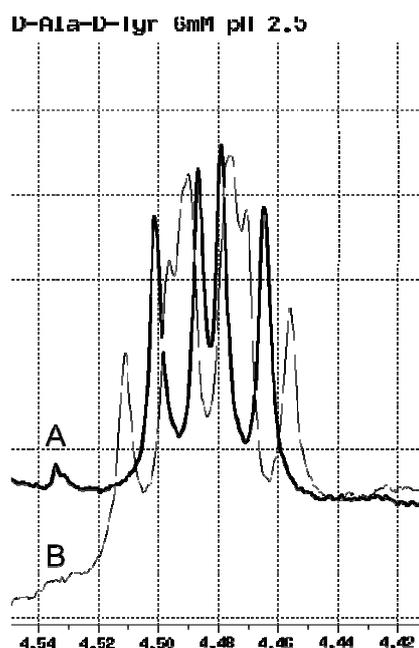


Abbildung 4.3-4: Signal für das Proton H5 von D-Ala-D-Tyr: A) in D₂O (schwarz) und B) in H₂O mit Wasserunterdrückung durch „Presaturation“ (grau)

Das betreffende Signal liegt sehr nahe am Wassersignal, deswegen liegt die Vermutung nahe, dass es im Zuge des Absättigungsprozesses, der mit einer Leistung von 60 dB stattfindet, beeinflusst wird. Eine andere Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass die Signale für die protonierten Stickstoffatome, die vom Wassersignal überlappt werden, vom Absättigungsprozess beeinflusst werden und so zu der Veränderung des Signals für das Wasserstoffatom H5 führen, das im molekularen Kontext sehr nahe am Stickstoffatom liegt. Alle anderen Kopplungskonstanten bleiben in beiden Lösungsmitteln (H₂O und D₂O) gleich.

Die Kopplungskonstanten von Dipeptid- und Cyclodextrin-Protonen bleiben in komplexiertem wie unkomplexiertem Zustand gleich, was darauf hindeutet, dass weder Dipeptid noch Cyclodextrin ihre Konformation bei Komplexbildung verändern. Dies liegt wohl daran, dass die Cyclodextrin-Kavität ausreichend Platz bietet, um den aromatischen Ring des Dipeptids vollständig einzuschließen.

4.4 Vergleich: Referenzierung auf HDO-Peak vs. „Interner externer Standard“:

Es ist allgemein üblich, beim Vermessen von NMR-Proben eine geeignete chemische Verbindung als Referenz für die chemische Verschiebung in die Probe zu geben (interne Referenzierung, interner Standard). In organischen Lösungsmitteln wird häufig Tetramethylsilan (TMS, 0.0 ppm) verwendet. Das wasserlösliche Äquivalent dazu ist teilweise

deutertes Natrium-3-trimethylsilylpropionat-d₄ (TSP-d₄), das ebenfalls zu 0.0 ppm referenziert wird. Manchmal fügt man gar keine externe Referenzsubstanz hinzu, sondern referenziert auf ein Lösungsmittel-Signal. Im Falle von wässrigen Lösungen ist dies der HDO-Peak bei 4.65 ppm.

Eine Alternative zum Hinzufügen von zusätzlichen Referenzierungsverbindungen ist die sogenannte externe Referenzierung, wo das Spektrum einer separaten Referenzsubstanz vor und/oder nach der eigentlichen Messung aufgenommen wird und in das eigentliche Spektrum übertragen wird. Dazu müssen bei allen Messungen exakt die gleichen Geräteparameter eingestellt werden.¹¹⁷

Die Referenzierung auf den HDO-Peak ist immer problematisch, da die Lage dieses Peaks stark pH-abhängig ist. Bei den Messungen mit Wasserunterdrückung ist diese Referenzierung ohnehin nicht möglich, da das Wassersignal verschwindet bzw. verzerrt wird. Auch bei den Messungen nach Lyophilisierung (Siehe 4.3.3), die bei definierten pH-Werten ablaufen, ist trotzdem eine Referenzierung auf einen externen Standard vorzuziehen, da die Unterschiede in den CICS der Enantiomere verglichen werden sollen, die in der Regel sehr klein sind. Schon kleinste pH-Wert-Schwankungen und damit kleinste Schwankungen in der Lage des Referenzpeaks können die Ergebnisse verfälschen.¹²⁷

Für den hier verwendeten „internen externen Standard“ benötigt man spezielle NMR-Röhrchen, in die ein koaxialer Einsatz eingeführt werden kann. Die Innen- und Außenröhrchen sind so gearbeitet, dass das innere Röhrchen genau zentriert ist. Diese Methode hat den entscheidenden Vorteil, dass sich der Standard direkt in der aktuell vermessenen Probe befindet, ohne jedoch mit der eigentlichen Probe Wechselwirkungen einzugehen.

Es wurden im Vorfeld auch Versuche mit Methanol und DSS als interne Standards in der Probenlösung durchgeführt, die keine Probleme bezüglich Wechselwirkungen mit den eingesetzten Cyclodextrinen in Lösung aufwerfen sollen.^{128,129,130,131} Diese internen Standards wurden dann aber zugunsten des „internen externen Standards“ verworfen. Beim „internen externen Standard“ wird die gelöste Referenzsubstanz in einem genau passenden, koaxialen Innenröhrchen in das NMR-Röhrchen eingeführt und geht so keinerlei Wechselwirkung mit der Probenlösung ein (siehe Abbildung 4.4-1). Die Probenvolumina betragen bei dieser Methode 530 µl im äußeren Röhrchen (Probe) und 65 µl (Referenz) im inneren Röhrchen.

Als Referenzsubstanz wurde Maleinsäure gewählt, weil deren einziger Peak im ¹H-NMR-Spektrum bei 6.3 ppm liegt und sich damit in den Spektren weder mit Signalen von Aminosäure/Dipeptid-Wasserstoffatomen noch mit Cyclodextrin-Wasserstoffatomen überlappt.



Abbildung 4.4-1: NMR-Röhrchen mit koaxialem Innenröhrchen

4.5 Bestimmung von $\Delta\delta$ -Werten

Vermessen wurden sowohl die einzelnen Aminosäuren, Dipeptide und Cyclodextrin als auch 1:1-Mischungen von jeweils einem Enantiomer der Aminosäure bzw. des Dipeptids und dem jeweiligen Cyclodextrin. Die Peaks wurden den jeweiligen Wasserstoffatomen zugeordnet und die Änderungen (Δ) der chemischen Verschiebung (δ) bestimmt. Hierbei wurde vom δ -Wert der Einzelsubstanz der δ -Wert der komplexierten Verbindung subtrahiert, und zwar sowohl für die Wasserstoffatome der Aminosäure bzw. des Dipeptids als auch für die Wasserstoffatome des jeweiligen Cyclodextrins.

$$\Delta\delta = \delta (\text{Einzelsubstanz}) - \delta (1:1\text{-Gemisch}) \quad \text{Gleichung 4.5-1}$$

Die $\Delta\delta$ -Werte sind also „Verschiebungen der chemischen Verschiebungen, die durch Komplexbildung induziert wurden“ (complexation induced chemical shifts, CICS).

4.5.1 Experimentelles

Die ^1H -NMR-Experimente wurden auf einem Bruker Avance 400 FT NMR-Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, D) mit einer Betriebsfrequenz von 400,132 MHz durchgeführt. Die verwendete Software war das XWIN-NMR Programm-Paket Version 3.5 mit Microsoft[®] Windows[™] NT 4.0 als Betriebssystem. Die Spektren wurden mit 128 Scans und einem Frequenzbereich von 4006.410 Hz in 48 K Datenpunkte aufgenommen, resultierend in einer digitalen Auflösung von 0,16 Hz/Punkt. Vor der Fouriertransformation wurde eine angemessene Fensterfunktion verwendet, um die spektrale Auflösung zu erhöhen.

Die Stammlösungen bestanden aus jeweils 12 mM (wegen der schlechten Löslichkeit von β -CD) Cyclodextrin, Aminosäure oder Dipeptid in einem Phosphatpuffer mit dem entsprechenden pH-Wert und wurden vor der Messung im Verhältnis 1:1 gemischt. Im 1:1-Gemisch lagen dementsprechend Konzentrationen von 6 mM vor. Einzelsubstanzen

wurden 1:1 mit Puffer gemischt, um die Konzentration von 6mM/L zu erhalten. Tyrosin (Tyr) konnte aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit in Wasser (maximal 2 mM) nicht vermessen werden. Die Messungen wurden jeweils bei den pH-Werten 2.5 und 3.5 durchgeführt. Um das Ausreten von CICS generell zu überprüfen, wurden zunächst Messungen bei pH 4.5 durchgeführt, indem für den Puffer 50 mM KH₂PO₄ in D₂O gelöst wurden, was einem pH-Wert von 4.5 entspricht. Bei den Messungen mit Wasserunterdrückung bestanden die Puffer aus 50 mM Natriumphosphat in H₂O, die pH-Werte von 2,5 und 3,5 wurden mit Phosphorsäure (10 %) eingestellt. Die Wasserunterdrückung wurde mit Hilfe der „Presaturation“-Methode durchgeführt. Der Transmitter-Offset war dabei auf die Wasser-Resonanz eingestellt. Die Spektren wurden auf den Maleinsäure-Peak bei 6,3 ppm referenziert. Die Maleinsäure wurde als „interner externer Standard“ (s. o.), 50 mM in D₂O, mit Hilfe eines Kapillarröhrchen der Firma Wilmad (Buena, NJ, USA) eingeführt.

4.5.2 Chemikalien

Die Bezugsquellen der Chemikalien finden sich im Kapitel „Potentiometrische Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen“. HS- und HDAS-β-Cyclodextrin wurden von Beckman (Fullerton, CA, USA) bezogen, Diac-β-Cyclodextrin wurde gemäß Lit.¹³² synthetisiert.

4.6 ROESY-Experimente

4.6.1 Kern-Overhauser-Effekt

Der Kern-Overhauser-Effekt („Nuclear Overhauser Effect“, NOE) bezeichnet eine Art der Wechselwirkung zwischen Kernen, die nicht, wie in 4.1.1 beschrieben ist, eine skalare Kopplung darstellt, sondern direkte durch den Raum reichende Wechselwirkungen (dipolare Kopplungen). Der NOE ist von der molekularen Rotationszeit τ_c und der Resonanzfrequenz ω abhängig. τ_c ist die Zeit, die ein Molekül für eine 360° Drehung benötigt. Sie wird hauptsächlich durch die molekulare Masse bestimmt. Je größer ein Molekül ist, desto langsamer die Neuorientierung der Spins, d. h. desto größer τ_c .

$$\tau_c \text{ [ps]} \approx \text{Molmasse [Da]} \quad \text{Gleichung 4.6-1}$$

$$\text{NOE} \sim \log(\omega \cdot \tau_c) \quad \text{Gleichung 4.6-2}$$

τ_c wird aber auch von anderen Parametern beeinflusst:

- Temperatur (je höher die Temperatur, desto kleiner τ_c)

- Viskosität des Lösungsmittels (je viskoser das Lösungsmittel, desto größer τ_c)
- Aggregationsvorgänge in der Lösung etc.

Gleichung 4.6-2 führt zu einem Nulldurchgang des NOEs. Für Cyclodextrine liegt der NOE mit den zur Verfügung stehenden Spektrometern nahe an 0. Dies wird durch Abbildung 4.6-1 illustriert.

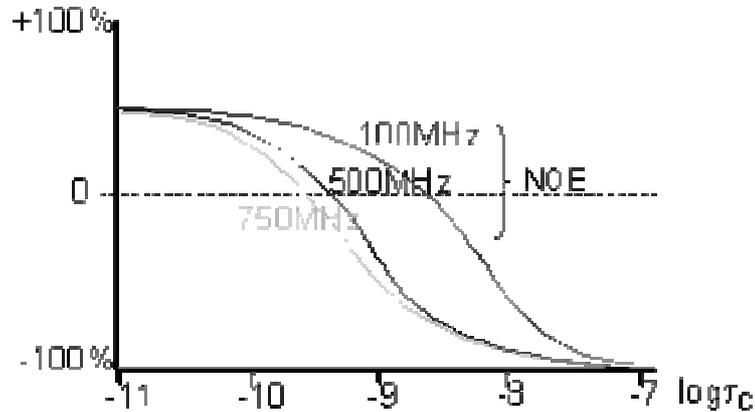


Abbildung 4.6-1: Abhängigkeit des NOE vom Produkt aus Resonanzfrequenz ω (MHz) und molekularer Korrelationszeit τ_c (ms) (nach Lit.¹¹⁷)

Eine lange Korrelationszeit bedeutet eine schwerfällige Rotation und sehr kleine Hochfrequenz-Anteile. Eine kurze Korrelationszeit bedeutet eine schnelle zufällige Rotation, d. h. eine viel breitere Frequenzstreuung und mehr Hochfrequenz-Anteile.

4.6.2 2D-NOESY-Experiment

Im zweidimensionalen (2D) NOESY-Experiment (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) resultieren Kreuzpeaks aus $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -Wechselwirkungen, die durch dipolare Kopplungen vermittelt wurden (Abstand $< 5 \text{ \AA}$). Die Größe der Kopplungen hängt nur vom Abstand der miteinander koppelnden Spins, jedoch nicht von der Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen ab. Artefakte im NOESY können sein:

- EXSY-(Austausch)-Peaks; sie haben meistens sehr hohe Intensitäten und dieselbe Signalphase wie die Diagonalpeaks (auch bei kurzen Mischzeiten). Solche Peaks werden z.B. zwischen Wasser und labilen OH-, NH-Protonen beobachtet.
- COSY-Peaks (anti-Phase COSY-Typ-Peak); u.a. bei miteinander skalar und dipolar koppelnden Protonen, wie z.B. geminale Protonen.
- t_1 -Noise und „rapid scanning“-Artefakte.

4.6.3 2D-ROESY-Experiment

Der NOE-Effekt beim NOESY-Experiment wird in einem statischen Magnetfeld („laboratory frame“) beobachtet. Im NOESY-Experiment wird eine spezielle Relaxation („cross polarisation“) verwendet. Im ROESY-Experiment hingegen, das ein „Spinlock“-Experiment darstellt, wird ein rotierendes Koordinatensystem („rotating frame“) verwendet.¹¹⁷

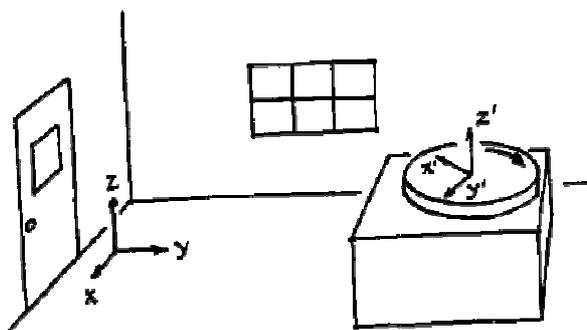


Abbildung 4.6-2: „Laboratory Frame“ versus „Rotating Frame“¹³³

Im ROESY-Spektrum sind genauso wie im NOESY-Spektrum auf beiden Frequenzachsen ¹H-chemische Verschiebungen aufgetragen. Kreuzpeaks resultieren ebenfalls aus dipolaren ¹H,¹H-Wechselwirkungen (Abstand < 5 Å). Das Problem des Vorzeichenwechsels der Signalphase der Kreuzsignale kann umgangen werden; der ROE ist für alle Moleküle unabhängig von der Molekülgröße positiv (siehe Abbildung 4.6-3).¹¹⁷

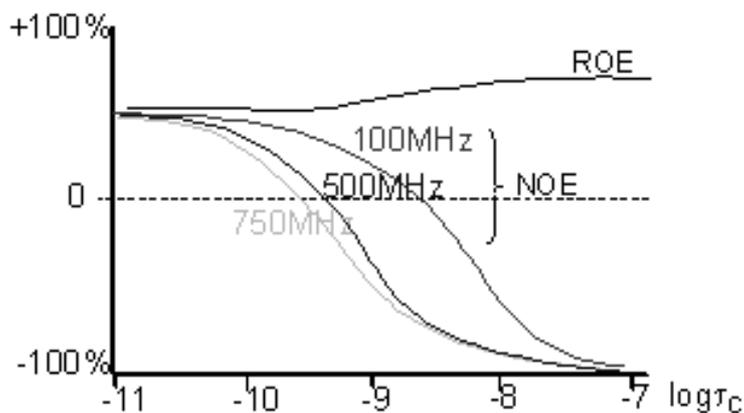


Abbildung 4.6-3: ROE und NOE (nach Lit.¹¹⁷)

Die Impulssequenz ist ähnlich der TOCSY-Impulssequenz. Die ROESY-Impulssequenz ist in Abbildung 4.6-4 dargestellt.

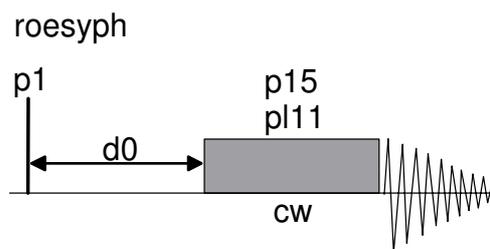


Abbildung 4.6-4: Schematische Darstellung der ROESY-Impulssequenz¹³⁴ (2D ROESY mit "continuous wave (cw) spin lock", phasensensitiv) mit: p1 = 90°-Impuls; d0 = Inkrementierte Verzögerung (2D); p15 = Impuls für ROESY „spin lock“; p11 = Energieniveau für ROESY „spin lock“

Das ROESY-Experiment ist besonders gut für Moleküle mittlerer Größe (1000 – 2000 Dalton) geeignet, für die mit dem NOESY-Experiment keine befriedigenden Spektren erhalten werden können. Für große Moleküle mit kurzen transversalen Relaxationszeiten ist das ROESY-Experiment ungeeignet. Artefakte im ROESY können sein:

- TOCSY-Peaks, (in-Phase, positiv)
- Spin-Diffusions-Peaks (ROE-ROE-Relay) (in-Phase, positiv)
- TOCSY-ROESY-Transfer-Peaks (in-Phase, negativ)

4.6.4 Experimentelles

Die ROESY-Experimente wurden auf einem Bruker DMX FT-NMR-Spektrometer mit einer Betriebsfrequenz von 600.13 MHz durchgeführt. Die verwendete Software war das XWIN-NMR Programm-Paket Version 2.0 mit Microsoft® Windows™ NT 4.0 als Betriebssystem. Der „Spin lock“-Impuls hatte eine Dauer von 200 bzw. 300 ms. Alle Proben wurden bei einer Temperatur von 300 K vermessen. Die Proben wurden im entsprechenden Puffer (siehe 4.5.1, ¹H-NMR-Spektroskopie) gelöst und gemischt, lyophilisiert, in D₂O wieder aufgelöst und in einem Schott (Mainz, Deutschland) NMR-Röhrchen ohne koaxiales Innenröhrchen vermessen. Die erhaltenen zweidimensionalen Diagramme wurden mit Hilfe von XWin-NMR hinsichtlich der Intensität der Kreuzsignale analysiert.

4.7 Ergebnisse und Diskussion

4.7.1 ¹H-NMR-Experimente

β-Cyclodextrin und HS-β-Cyclodextrin bilden mit Ala-Phe und Ala-Tyr echte Einlagekomplexe (belegt durch Δδ-Werte der Cyclodextrin-Wasserstoffatome H-3 und H-5

sowie die $\Delta\delta$ -Werte der arylischen und benzylichen Dipeptid-Wasserstoffatome) und durch die Ergebnisse der ROESY-Experimente. Einen Einblick in typische Spektren gibt Abbildung 4.7-1, hier werden exemplarisch die Spektren von D-Ala-D-Phe mit β -Cyclodextrin gezeigt.

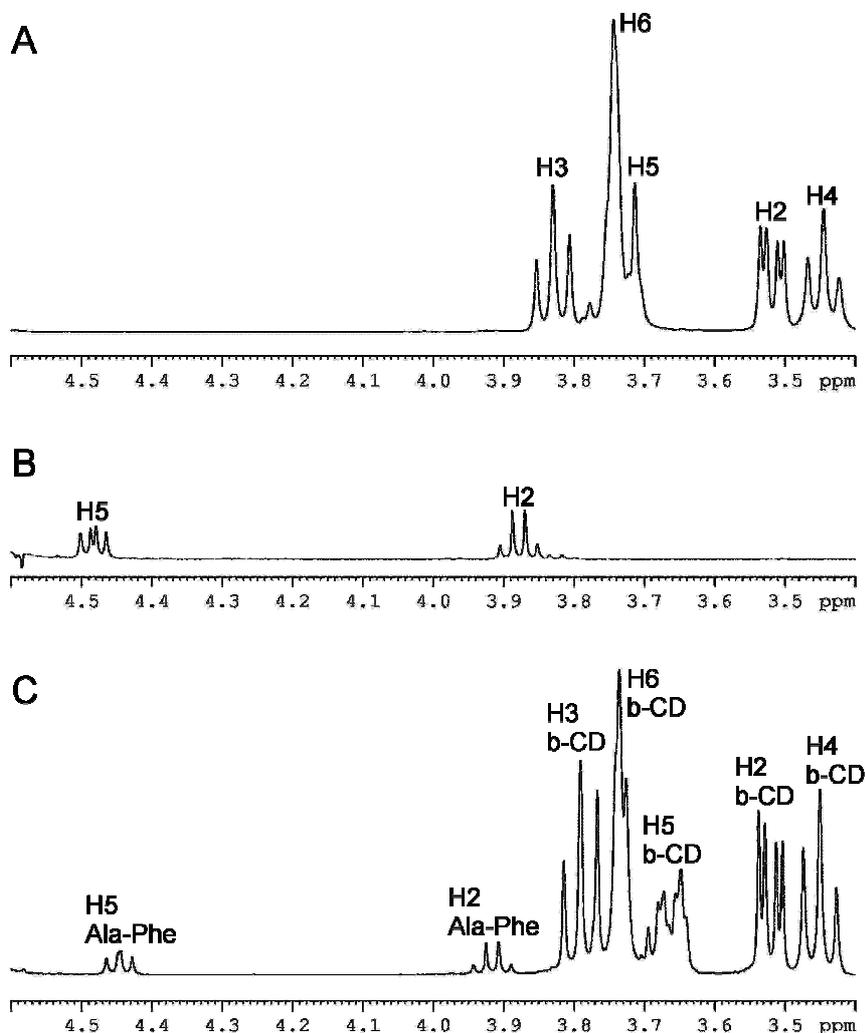


Abbildung 4.7-1: Der Bereich von 4.6 bis 3.4 ppm A: β -Cyclodextrin, B: D-Ala-D-Phe, C: β -CD + D-Ala-D-Phe (1:1); der pH-Wert beträgt jeweils 2.5

Diac- β -Cyclodextrin und HDAS- β -Cyclodextrin zeigen nur sehr schwache Wechselwirkungen mit Ala-Phe (Ergebnisse werden nicht gezeigt) und Ala-Tyr (siehe Abbildung 4.7-2); es bildet sich wahrscheinlich kein Einlagerungskomplex, sondern es findet eine andere Art der Wechselwirkung statt, vermutlich am engeren Rand der Cyclodextrin-Kavität.

Deswegen ist es unmöglich, Einblicke in die Komplexstruktur zu erlangen. Die schwachen Wechselwirkungen spiegeln sich auch in den Ergebnissen der Kapillarelektrophorese

wieder: Mit der Ausnahme von Ala-Phe bei einem pH-Wert von 2.5 kann keine Trennung von Ala-Phe oder Ala-Tyr mit Diac- β -CD oder HDAS- β -CD erzielt werden.⁵⁶

4.7.1.1 Einfluss auf die Cyclodextrin-Wasserstoffe

Wenn man β -CD und HS- β -CD in Kombination mit Ala-Phe betrachtet, sind die CICS für die Cyclodextrin-Wasserstoffe H3' und H5' recht hoch (Abbildung 4.7-3), was auf einen Einschluss von Ala-Phe in die Cyclodextrin-Kavität hinweist. Nachdem die CICS von H5' immer höher sind als die von H3', taucht der Phenylring wahrscheinlich tief in die Kavität ein.

HS- β -CD induziert sehr große Unterschiede der chemischen Verschiebungen bei Komplexbildung mit beiden Dipeptiden (sie sind sogar noch höher als mit β -CD), und zusätzlich dazu noch Wechselwirkungen mit dem Cyclodextrin-Wasserstoff H1', welches sich am weiteren Rand der Cyclodextrin-Kavität befindet. Bei beiden pH-Werten sind die CICS größer bei Wechselwirkung mit dem DD-Enantiomer von Ala-Phe, was auf eine stärkere Bindung als mit dem LL-Enantiomer hinweist. Mit β -CD sind die CICS sehr ähnlich für beide Enantiomere, deswegen können keine Aussagen über Unterschiede zwischen den Enantiomeren gemacht werden.

Bei Komplexbildung mit β -CD oder HS- β -CD verursacht Ala-Tyr sogar noch höhere CICS für die Wasserstoffe im Innern der Kavität als Ala-Phe (Abbildung 4.7-3). Wie schon mit Ala-Phe beobachtet, zeigt HS- β -CD zusätzliche Interaktionen für den Wasserstoff H1'. Die CICS für HS- β -CD bei Komplexbildung mit Ala-Tyr sind sehr ähnlich für beide Enantiomere; nur H5' zeigt eine stärkere Wechselwirkung mit dem LL-Enantiomer.

Ein anderes Bild ergibt sich für β -CD: Hier sind die CICS für den Wasserstoff H3' größer für das LL-Enantiomer bei pH 2.5 und größer für das DD-Enantiomer bei pH 3.5. Für den Wasserstoff H5' passiert genau das Gegenteil: Die CICS sind größer für das DD-Enantiomer bei pH 2.5 und größer für das LL-Enantiomer bei pH 3.5. Wenn man in Betracht zieht, dass sich der Wasserstoff H5' tiefer in der Kavität befindet als H3', kann man daraus schließen, dass bei pH 2.5 das DD-Enantiomer tiefer in die Kavität eintaucht und bei pH 3.5 das LL-Enantiomer.

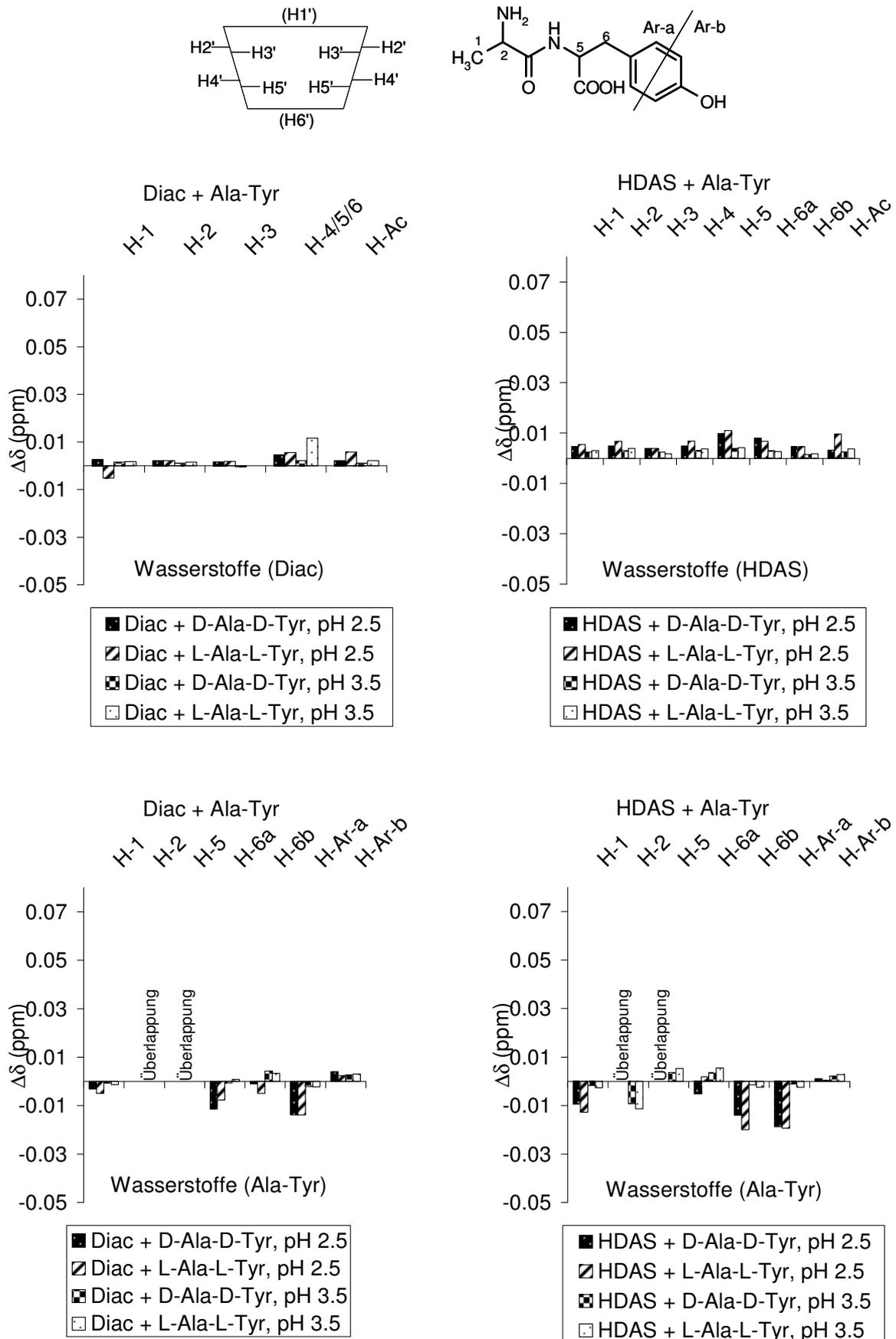


Abbildung 4.7-2: CICS für Ala-Tyr mit Diac- β -CD und HDAS- β -CD, CD- und Ala-Tyr-Wasserstoffe

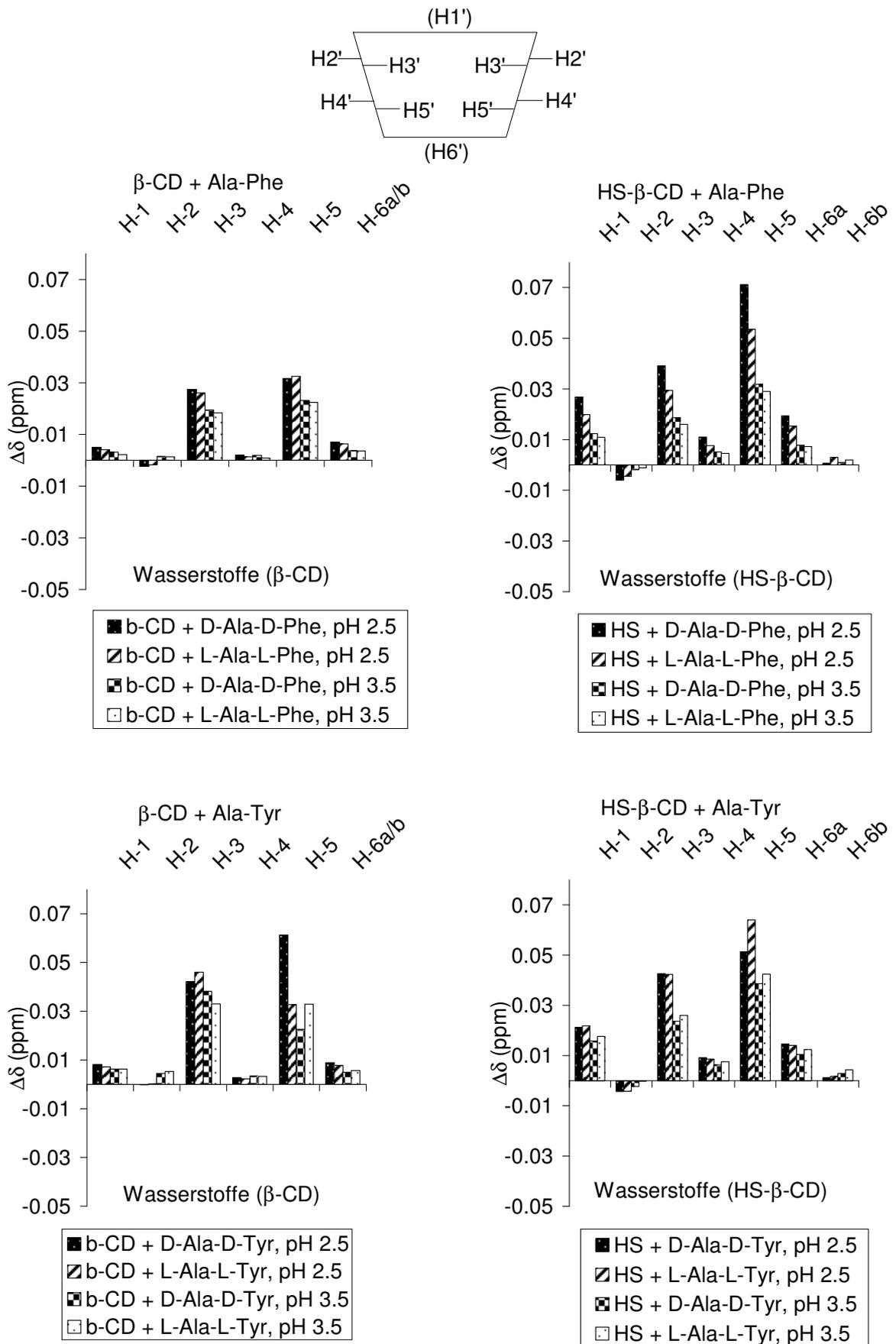


Abbildung 4.7-3: CICS für Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -CD und HS- β -CD, CD-Wasserstoffe

4.7.1.2 Einfluss auf die Dipeptid-Wasserstoffe

Wenn man die Ala-Phe-Wasserstoffe betrachtet, finden sich in der Tat Unterschiede zwischen den Enantiomeren bei beiden pH-Werten und mit sowohl β -CD als auch HS- β -CD (siehe Abbildung 4.7-4).

Bei Komplexierung mit β -CD sind für das DD-Enantiomer von Ala-Phe die CICS von H2 und H5 größer als für das LL-Enantiomer. Für den benzyllischen Wasserstoff H6-b sind die CICS für das LL-Enantiomer größer. Mit steigendem pH-Wert werden die CICS für die benzyllischen Wasserstoffe größer und für die Wasserstoffe der aliphatischen Seitenkette kleiner, was auf eine größere Wechselwirkung mit dem aromatischen Teil des Moleküls hindeutet. Mit HS- β -CD sind die CICS der benzyllischen Wasserstoffe und des Wasserstoffes H5 sogar noch unterschiedlicher als mit β -CD. Hier verursacht das DD-Enantiomer deutlich größere CICS und wird dementsprechend auch stärker gebunden.

Ala-Tyr weist große CICS für die aromatischen und benzyllischen Wasserstoffe bei Komplexierung mit β -CD und große CICS für die benzyllischen Wasserstoffe und Wasserstoff H5 bei Komplexierung mit HS- β -CD auf. Bei pH 2.5 sind letztere größer für das DD-Enantiomer, daraus lässt sich schließen, dass bei pH 2.5 das DD-Enantiomer stärker an HS- β -CD gebunden wird als das LL-Enantiomer.

Die Muster der CICS der Wasserstoffe von sowohl Ala-Phe als auch Ala-Tyr mit β -CD und auch HS- β -CD sind sehr ähnlich, was darauf schließen lässt, dass ein ähnlicher Einschlussmodus für beide Dipeptide mit dem jeweiligen Cyclodextrin vorhanden ist.

Nachdem die CICS generell bei pH 2.5 größer sind als bei pH 3.5, ist wohl auch die Wechselwirkung größer beim niedrigeren pH-Wert, was auf ein weniger tiefes Eintauchen bei pH 3.5 hinweist. Der pK_s -Wert der Carboxylgruppe beträgt nach eigenen Messungen 3.1, so sind bei pH 2.5 80 % der kationischen und 20 % der zwitterionischen Spezies vorhanden. Andererseits sind bei pH 3.5 30 % der kationischen und 70 % der zwitterionischen Spezies vorhanden. Dies führt zu dem Schluss, dass die kationische Spezies mehr Möglichkeiten zur Wechselwirkung und damit auch mehr Orte zur Wechselwirkung bietet als die zwitterionische Spezies.

Für Alanin (Daten nicht abgebildet) konnten keine signifikanten Wechselwirkungen mit keinem der verwendeten Cyclodextrine beobachtet werden. Für Phenylalanin (Daten nicht abgebildet) waren die Wechselwirkungen qualitativ dieselben, aber weniger ausgeprägt als bei Ala-Phe.

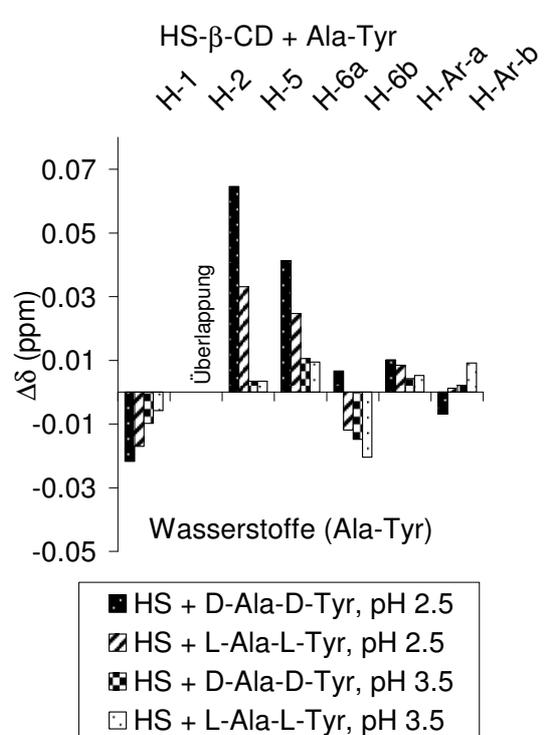
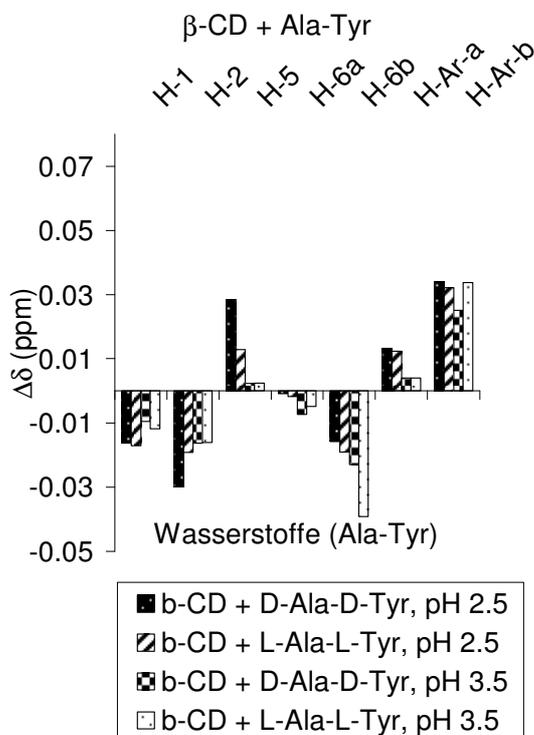
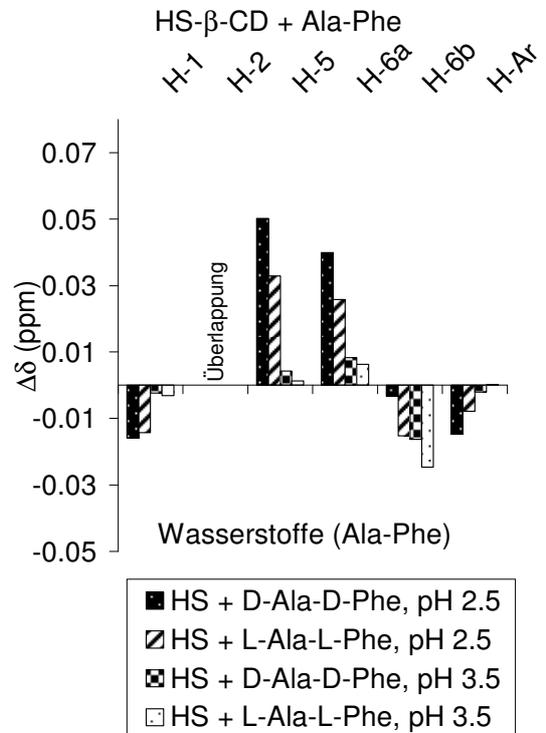
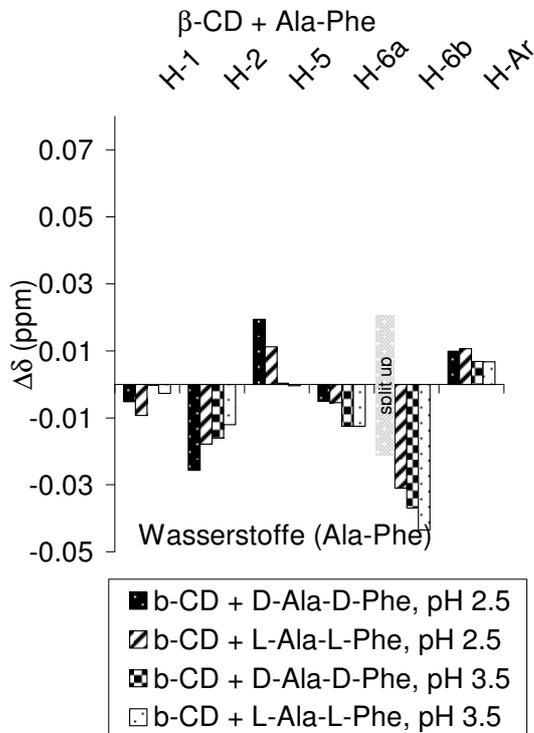
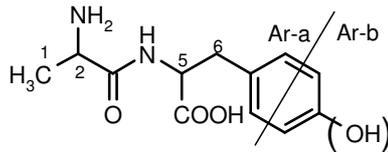


Abbildung 4.7-4: CICS für Ala-Phe und Ala-Tyr mit β-CD und HS-β-CD, Dipeptid-Wasserstoffe

Wenn man die CICS der Aminosäure mit dem korrespondierenden Dipeptid vergleicht, sieht man, dass das Dipeptid eine stärkere Bindung aufweist, was darauf hindeutet, dass die Verlängerung der aliphatischen Seitenkette durch eine peptidische Einheit die Zahl der Bindungsstellen zu erhöhen scheint und in größeren CICS resultiert.

Tyrosin, eine weitere einzelne Aminosäure, die mit den untersuchten Dipeptiden in Verbindung steht, wurde aufgrund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit nicht untersucht.

Phenylglycin, das keine Wechselwirkung mit Cyclodextrinen bei den potentiometrischen Untersuchungen zeigte,¹⁰⁰ wurde als Negativkontrolle ebenfalls untersucht und zeigte erwartungsgemäß keine signifikanten CICS mit den verwendeten Cyclodextrinen (Daten nicht abgebildet).

4.7.2 ROESY-Experimente

Um weitere Einblicke in den hier auftretenden chiralen Erkennungsmechanismus zu erlangen, wurden ROESY-Experimente durchgeführt, um die Interaktion des DD- und des LL-Enantiomers von Ala-Tyr mit β -CD und HS- β -CD bei pH 2.5 und pH 3.5 zu studieren. Ala-Tyr wurde deswegen ausgewählt, weil es im ¹H-NMR-Spektrum zwei Dubletts für den aromatischen Bereich liefert, was durch die *para*-Substitution des aromatischen Ringes hervorgerufen wird, die leicht den Molekülregionen Ar-a und Ar-b zugeordnet werden können (siehe Abbildung 4.7-5) und damit weitere Interpretationsmöglichkeiten bezüglich der Lage des aromatischen Ringes bieten. Ala-Phe dagegen liefert für den Aromatenbereich nur ein nicht aufgelöstes Multiplett, was schwer zu analysieren ist.

In Abbildung 4.7-5 ist zu sehen, dass starke Kreuzsignale zwischen den aromatischen Wasserstoffen von Ala-Tyr und den Wasserstoffen H3' und H5', die sich im Innern der Kavität befinden, den Einschluss des aromatischen Restes in die Kavität von sowohl β -CD als auch HS- β -CD bestätigen.¹³⁵ Ala-Tyr taucht vom weiteren Rand her in die Kavität von β -CD hinein, und zwar mit dem Phenylring zuerst. Dies wird dadurch belegt, dass die Kreuzsignale zwischen H-Ar-b (Ala-Tyr) und H6' (β -CD) größer sind als die Kreuzsignale zwischen H-Ar-a (Ala-Tyr) und H6' (β -CD).

Für β -CD sind die Kreuzsignale zwischen H-Ar-a (Ala-Tyr) und H3' (β -CD) größer als die Kreuzsignale zwischen H-Ar-b (Ala-Tyr) und H3' (β -CD) und die Kreuzsignale zwischen H-Ar-b (Ala-Tyr) und H5' (β -CD) sind größer als die Kreuzsignale mit H3' (β -CD). Diese Fakten bestätigen zusätzlich das Eindringen des Dipeptids mit dem Phenylring voran vom weiteren Rand aus in die Kavität.

Die Erhöhung des pH-Wertes von 2.5 auf 3.5 führt im Allgemeinen zu schwächeren Kreuzsignalen der aromatischen Dipeptidwasserstoffe mit Wasserstoff H5' (β -CD). Wahrscheinlich dringt der aromatische Rest bei pH 3.5 nicht so tief ein wie bei pH 2.5, was mit den Ergebnissen der CICS-Messungen übereinstimmt.

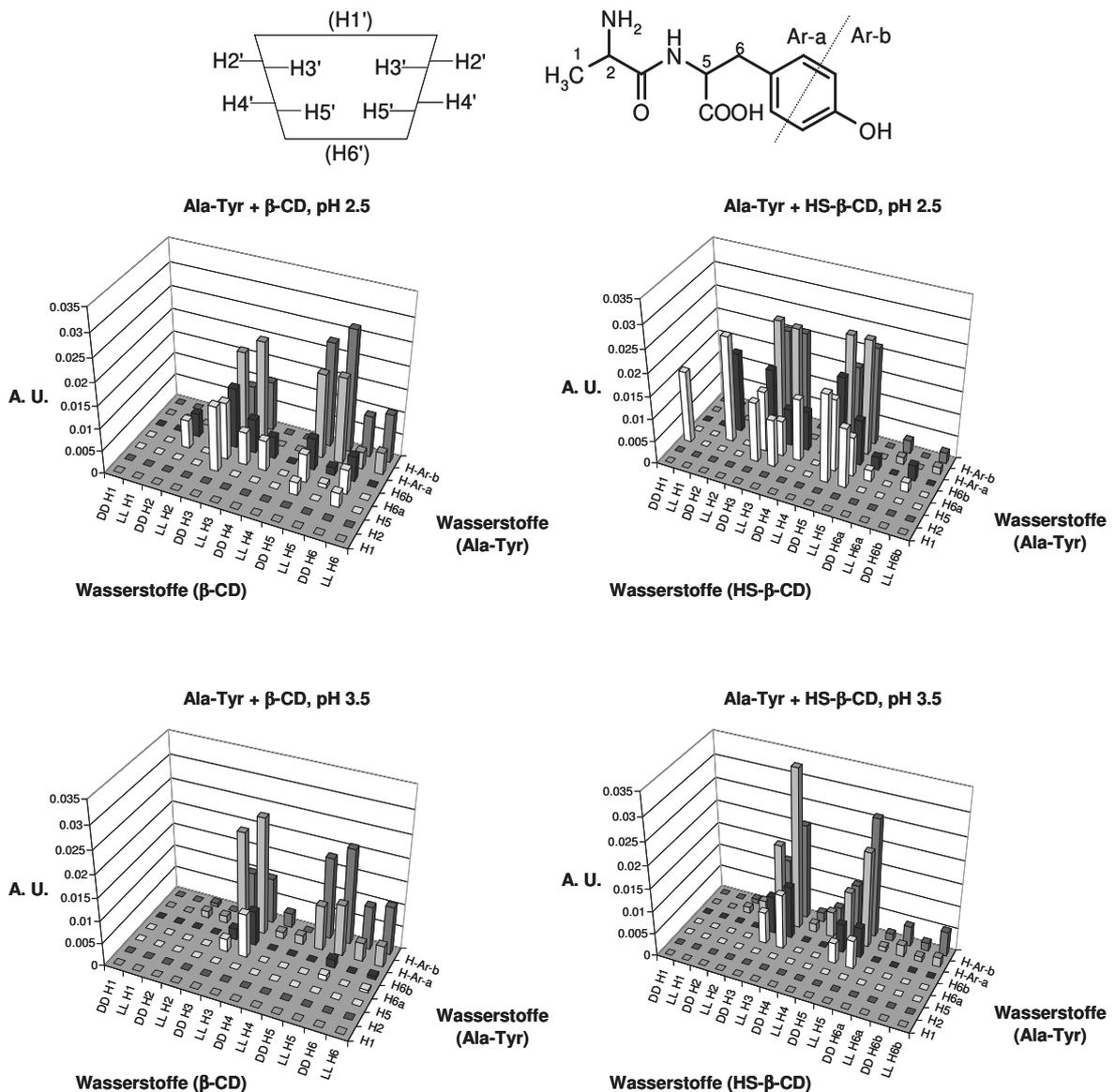


Abbildung 4.7-5: Relative Intensitäten der Kreuzsignale der ROESY-Experimente für Ala-Tyr mit β -CD und HS- β -CD (Signalintensitäten sind in willkürlichen Einheiten)

Bei pH 2.5 taucht das DD-Enantiomer tiefer in die Kavität ein als das LL-Enantiomer, weil schwächere Wechselwirkungen mit H3' (β -CD) auftreten, das über H5' (β -CD) liegt, und stärkere Wechselwirkungen mit H5' (β -CD), das tiefer in der Kavität liegt. Außerdem finden sich größere Kreuzsignale für die benzylichen Wasserstoffe des Dipeptids mit den

Wasserstoffen, die sich im Innern der Kavität befinden, was den tieferen Einschluss des DD-Enantiomers in die β -CD-Kavität weiter bestätigt. Bei pH 3.5 finden sich kaum Unterschiede zwischen den beiden Enantiomeren. Dies kann auch durch Experimente mit Hilfe der Kapillarelektrophorese, die zu keiner Trennung der Enantiomere von Ala-Tyr bei pH 3.5 in einem β -CD-haltigen Puffer (ohne Zugabe von Harnstoff) bestätigt werden.¹³⁶

Zusätzliche Kreuzsignale zwischen den benzylicischen Wasserstoffen von D-Ala-D-Tyr und den Cyclodextrin-Wasserstoffen H2' und H4', die sich außerhalb der Cyclodextrin-Kavität befinden, sind ziemlich häufig anzutreffen und werden normalerweise dadurch erklärt, dass ein dipolarer Transfer über ihre *J*-Kopplung zu H3' und H5' stattfindet und nicht, dass sich ein externer Wirts-Gast-Komplex bildet.¹³⁷

Die Kreuzsignale, die bei Komplexbildung mit HS- β -CD auftreten, sind schwieriger zu interpretieren. Sie stimmen nicht mit dem tieferen Einschluss eines bestimmten Enantiomers überein, obwohl kleine Unterschiede zwischen den Enantiomeren zu finden sind. Das Komplexbildungsverhalten von HS- β -CD kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

4.8 Zusammenfassung

Um den chiralen Erkennungsprozess von β -Cyclodextrin (β -CD) und einigen seiner Derivate, nämlich *Heptakis*-(6-sulfato)- β -cyclodextrin (HS- β -CD), *Heptakis*-(2,3-O-diacetyl)- β -cyclodextrin (Diac- β -CD) und *Heptakis*-(2,3-O-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD), zu verstehen, wurden NMR-Experimente, vor allem die Messung von „Verschiebungen der chemischen Verschiebungen, die durch Komplexbildung induziert wurden“ (complexation induced chemical shifts, CICS) und ROESY-Experimente, durchgeführt. Betrachtet man die CICS, die für die Diastereomeren der Paare Diac- β -CD/Ala-Phe, HDAS- β -CD/Ala-Phe, Diac- β -CD/Ala-Tyr und HDAS- β -CD/Ala-Tyr auftreten, dann zeigt sich, dass sie relativ klein sind und demnach auf eine eher schwache Wechselwirkung des jeweiligen Gastmoleküls mit dem Wirt hindeuten. Die CICS für β -CD und HS- β -CD bestätigten einen Einschluss des aromatischen Restes in die Cyclodextrin-Kavität. Es konnte gezeigt werden, dass bei pH 2.5 das DD-Enantiomer von Ala-Tyr tiefer in die Kavität von β -CD eintaucht als das LL-Enantiomer. Außerdem ist bei pH 3.5 die Eintauchtiefe in die Kavität geringer als bei pH 2.5, was durch die ROESY-Experimente unterstützt werden konnte.

5 „Molecular Modelling“-Studien über Cyclodextrin-Dipeptid-Einschlusskomplexe

5.1 „Molecular Modelling“

Der Begriff „Molecular Modelling“ steht für verschiedene computergestützte Techniken für die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung der realistischen dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften. Als Rohmaterial dienen Daten aus der Strukturanalyse. Das Handwerkszeug stellen quanten- und molekülmechanische Rechenverfahren dar.

Die wichtigsten Methoden des „Molecular Modelling“ sind:

- Erstellung interaktiver Computergraphiken (3D-Strukturen darstellen)
- Modellierung kleiner Moleküle (Strukturen erzeugen, Anwenden von quantenmechanischen Verfahren, Molekülmechanik und -dynamik, Konformationsanalyse, Berechnung von physikochemischen Eigenschaften)
- Molekülvergleiche (Volumenvergleiche, 3D-QSAR, Überlagerung von Molekülen nach Ähnlichkeit)
- Modellierung von Proteinen (Sequenzvergleiche, Simulation von Faltungen und Modellierung von Protein-Homologien)
- Modellierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen (Berechnung von Bindungskonstanten, Bestimmung von Dockingpositionen)
- Ligandendesign (strukturbasiertes und De novo-Design, 3D-Datenbankensuche)

Das Ziel des „Molecular Modelling“ ist der Aufbau eines Struktur-Modells. Hierzu nutzt man einerseits genaue Rechenverfahren (Quantenmechanik, Kraftfelder) und zusätzlich versucht man bei bekannten experimentellen Daten die Geometrie und physikochemische Eigenschaften zu extrapolieren. Man beginnt mit der Erzeugung eines Startmodells. Um möglichst nah an den experimentellen Daten zu bleiben, sucht man in Datenbanken nach Molekülen mit sehr ähnlichen experimentellen Eigenschaften. Anschließend wird das Startmodell mit Hilfe von Kraftfeldmethoden oder quantenmechanischen Berechnungen optimiert.¹³⁸

5.1.1 Wissensbasierte Ansätze

Bei einem wissensbasierten Ansatz versucht man, möglichst viel experimentelles Wissen (Molekül-, Kristall- und Proteinstrukturen usw.) für die effiziente Lösung der aktuellen Problemstellung zu nutzen. Dies geschieht z. B. durch Extrapolation bezüglich der Geometrie und der physikochemischen Eigenschaften der aktuellen Struktur.¹³⁹ Die experimentellen Daten können aus umfangreichen Datenbanken stammen, in denen man sowohl strukturelle (meist aus Kristallstrukturanalysen) als auch physikochemische Informationen findet:

- Cambridge-Datenbank (enthält mehr als 300.000 Kristallstrukturen von kleinen organischen Molekülen)¹⁴⁰
- Brookhaven-Protein-Datenbank (ca. 30.000 Protein- und DNA-Strukturen)¹⁴¹
- Beilstein-Datenbank (ca. 9,1 Millionen chemische Strukturen und physikochemische Eigenschaften)^{142,143,144}

5.1.2 Kraftfeldmethoden

Unter Kraftfeldmethoden versteht man empirische Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und -energien. Sie basieren auf der klassischen Newtonschen Mechanik und Elektrostatik. Man benutzt ein mechanisches Molekülmodell, in dem man die Atome als Kugeln mit definierter Masse und die Bindungen (kovalente und nichtkovalente) als Federn betrachtet. Ziel ist es, die dreidimensionale Molekülstruktur mit minimaler Energie zu finden. Die zentrale Idee ist dabei, dass Bindungslängen und Bindungswinkel des Moleküls nach Möglichkeit Standardwerte einnehmen (dort haben sie die minimale Energie). Durch sterische Wechselwirkungen (z.B. Abstoßung von benachbarten Gruppen) werden die Moleküle jedoch gezwungen, teilweise in Bezug auf Bindungslängen oder Bindungswinkeln von ihren Idealwerten abzuweichen. Auf der Suche nach der besten Kompromisslösung berechnet man die Energie verschiedener möglicher Konformationen für das Molekül, die sich aus folgenden Termen zusammensetzt:

- Bindungsdehnung oder -stauchung (Bindungsstreckungen)
- Bindungswinkeldehnung oder -stauchung (Winkeldeformationen)
- Drehungen um eine Bindung (Veränderungen des Torsionswinkels)
- van-der-Waals-Wechselwirkungen (Anziehung und Abstoßung)
- elektrostatischen Wechselwirkungen (Anziehung und Abstoßung)

Die einzelnen Terme werden unabhängig voneinander berechnet und anschließend zur Gesamtenergie aufsummiert. Anhand der Gesamtenergie kann man Aussagen über die

Wahrscheinlichkeit der Existenz der jeweiligen Konformation machen. Wichtig für die richtige Berechnung sind hierbei außerdem die Wahl des richtigen Systems (Berücksichtigen der Lösungsmittel-Wechselwirkungen, in biologischen Systemen meist Wasser) und die Wahl der Startgeometrie (die Berechnung kann in einem lokalen Minimum "hängen bleiben"). Mit Hilfe der Molekülmechanik kann man fast alle organischen Verbindungen berechnen. Da der Rechenaufwand im Vergleich zu den quantenmechanischen Verfahren relativ gering ist, eignen sich Kraftfeldmethoden auch für Verfahren, die eine große Anzahl von Berechnungen erfordern:

- Berechnung von Molekülen in Solvensumgebung (Berücksichtigung der Wassermoleküle in der Umgebung)
- Konformationsanalyse (Berechnung mehrerer Konformationen eines Makromoleküls)
- Moleküldynamik
- Docking¹⁴⁵

5.1.3 Moleküldynamik

Moleküle besitzen bei Raumtemperatur nicht nur potentielle, sondern auch kinetische Energie, da sie sich bewegen. Sie können diffundieren und ihre Gestalt verändern und nehmen somit unterschiedliche Konformationen ein. Die Flexibilität der Moleküle ist z. B. bei der Protein-Ligand-Wechselwirkung von großer Bedeutung (Konformation von Ligand und Bindungstasche müssen zueinander passen). Die Moleküldynamiksimulation (MD), auch „discrete element method“¹⁴⁶ genannt, soll diese Konformationsänderungen beschreiben. Dabei verfolgt man die Bewegung einiger Atome oder Moleküle unter festen Umgebungsbedingungen (bestimmtes Kraftfeld). Die Bewegungen der Teilchen beschreibt man mit Newtonschen Bewegungsgleichungen, die schrittweise über numerische Verfahren für alle Teilchen gleichzeitig gelöst werden.

Man beginnt die MD-Simulation mit einer Startstruktur (z.B. ein experimentell bestimmter Protein-Ligand-Komplex) und legt den Umfang der Solvathülle (nur Bindungstasche, komplettes Molekül, etc.) fest (siehe Abbildung 5.1-1). Daraus bestimmt man die Startkoordinaten. Danach bekommt jedes Atom eine zufällige Anfangsgeschwindigkeit, so dass im Mittel die gewünschte Temperatur erreicht wird. Jetzt berechnet man für jedes Atom die Kräfte, die von umgebenden Teilchen auf es einwirken. Man simuliert daraus eine Bewegung und berechnet die neuen Koordinaten. So kann man bei einer Schrittweite von meist 1 Femtosekunde (10^{-15} s) bis zu 10^7 Schritte berechnen. Das entspricht einer Simula-

tionsdauer von bis zu 10 Nanosekunden. Damit kann man Bewegungen von Seitenketten und Protein-Domänen beobachten. Um die Diffusion eines Wirkstoffs in die Proteinbindungstasche oder einer Proteinfaltung zu simulieren, reicht diese Zeit nicht aus.

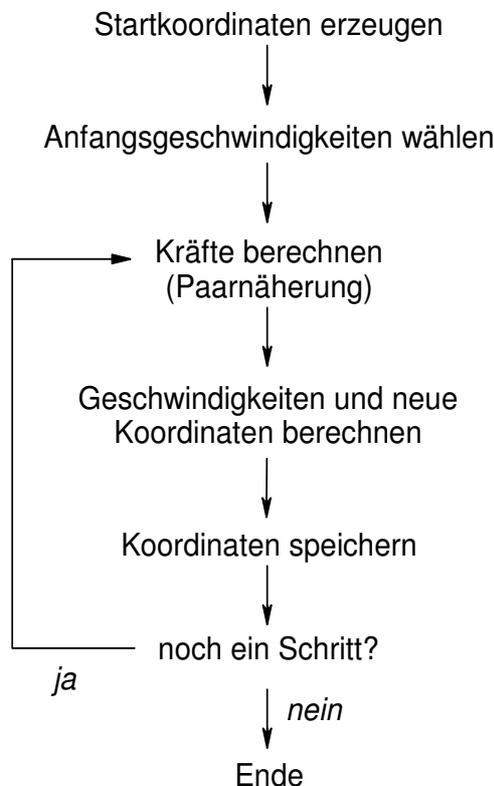


Abbildung 5.1-1: Ablaufschema einer Moleküldynamik-Simulation

Anwendungen von MD-Simulationen

- Simulation der Bewegung von Molekülen im Lösungsmittel
- Berechnung von Bindungsaffinitäten
- Berechnung günstiger Konformationen für die Konformationsanalyse¹⁴⁵

5.2 Moleküldynamik-Simulationen von Dipeptiden mit β -Cyclodextrin

Um einen besseren Einblick in die Bindungsmodi der Enantiomere von Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -Cyclodextrin (β -CD) bei unterschiedlichen pH-Werten zu erhalten, wurden Moleküldynamik-Simulationen (MD-Simulationen) durchgeführt. Die Simulationen wurden mit jedem Enantiomer von Ala-Phe und Ala-Tyr in jedem möglichen Protonierungszustand durchgeführt, d. h. Kation, Zwitterion und Anion. Nachdem der pK_s -Wert der Carboxylgruppe von sowohl Ala-Phe als auch Ala-Tyr mit 3.1 gemessen wurde (siehe auch Kapitel „NMR-Spektroskopie“), spiegeln die Simulationen für das Kation und das

Zwitterion jeweils die Zustände, die bei den vorher durchgeführten NMR-Experimente bei den pH-Werten 2.5 und 3.5 herrschen, gut wieder.

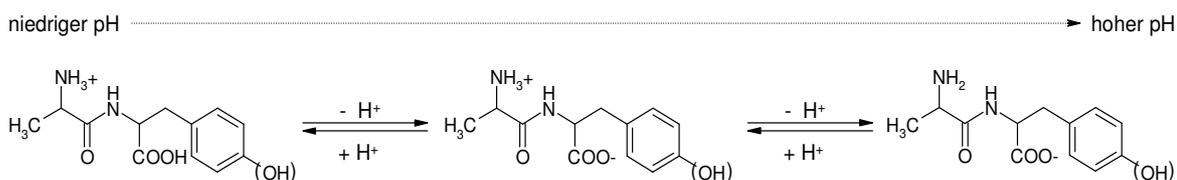


Abbildung 5.2-1: Die unterschiedlichen Protonierungszustände der Dipeptide

Zum ersten Mal wurden MD-Simulationen für eine größere Serie von unterschiedlichen Komplexen von Enantiomeren in verschiedenen Protonierungszuständen systematisch über den langen Zeitraum von 1 ns (=1000 ps) ausgeführt. Es sind viele MD-Simulationen bezüglich Cyclodextrin-Einschlusskomplexen in der Literatur zu finden (eine Übersicht bietet Lit.¹⁴⁷). Sie sind jedoch in allen Fällen entweder kürzer,^{148,149} oder sie beschäftigen sich nur mit einem einzigen Einschlusskomplex.^{150,151,152,153,154} Außerdem wurden viele frühere Simulationen *in vacuo* durchgeführt,^{155,156} was Vergleiche mit experimentellen Daten sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich macht.

Ein hauptsächliches Ziel der MD-Simulationen war die Charakterisierung der Eintauchtiefe des untersuchten Gastmoleküls. Die von uns zunächst durchgeführten Experimente, in denen die Eintauchtiefe durch Messung der Distanz zwischen jeweils einem einzelnen Atom von Wirt und Gast bestimmt wurde, lieferten nur eine unzureichende Beschreibung des Komplexes.

Um die Eintauchtiefe besser beschreiben zu können, wurde eine Ebene in die Cyclodextrin-Kavität eingepasst. Diese Methode spiegelt das Prinzip, mit dem NMR-Daten generiert werden, besser wider (in der NMR-Spektroskopie sieht man die durchschnittliche Wechselwirkung des Gastmoleküls mit allen chemisch äquivalenten H5'-Atomen des β -Cyclodextrins). Ein ähnlicher Ansatz wurde z. B. in Lit.¹⁵⁴ für die Untersuchung von Cyclodextrinen angewendet.

5.2.1 Experimentelles

Nachdem die Dipeptide ihre Konformation bei der Komplexierung nicht ändern (siehe ¹H-NMR-Ergebnisse: keine Änderung der Kopplungskonstanten), ist es legitim, das Dipeptid-Molekül zuerst hinsichtlich seiner Energie zu minimieren und es dann in der Cyclodextrin-Kavität zu platzieren. Zunächst wurde jede Dipeptid-Struktur von zweidimensional nach dreidimensional mittels „Accelrys DS Viewer Pro“¹⁵⁷ konvertiert. Die anschließende

Energieminimierung wurde mit dem Tripos-Programm SYBYL¹⁵⁸ und dem darin integrierten CHARMM-Kraftfeld *in vacuo* durchgeführt.

Es wurde dann eine dreidimensionale Ausgangsstruktur jedes β -CD-Komplexes mit dem spezifischen Dipeptid erstellt. Dazu wurde eine Struktur eines β -CD-Komplexes mit einer den zu simulierenden Dipeptiden ähnlichen Einschlussverbindung in der “Cambridge Structural Database” (CCD)¹⁴⁰ gesucht und mit der Struktur von β -Cyclodextrin/N-Acetyl-L-phenylalaninchlathrat¹⁵⁹, Code: AGAZIR, auch gefunden. Der entsprechende Datensatz wurde der CCD entnommen und mit Hilfe des „Accelrys DS Viewer Pro“¹⁵⁷ wie folgt modifiziert:

Ein einzelner Komplex wurde aus der Kristallstruktur extrahiert und als Vorlage gespeichert. Danach wurde jede energieminierte Dipeptid-Struktur (s. o.) manuell in das Zentrum der Cyclodextrin-Kavität platziert, und zwar in gleicher Art und Weise wie das ursprüngliche Gastmolekül (N-Acetyl-L-phenylalanin). Letzteres wurde danach entfernt. Auf diese Weise wurde für jeden Dipeptid- β -CD-Komplex ein einzelner Datensatz generiert.

Diese Strukturen wurden nun in das Tripos-Programm SYBYL¹⁵⁸ mit „OpenBabel“¹⁶⁰ transferiert (Dateiformatkonvertierung). Die Moleküle wurden mit Hilfe der SYBYL-Standardprozedur in einer Wasserbox, bestehend aus zwei Lagen des Lösungsmittels, gelöst und mit Hilfe von „VEGA“^{161,162,163} und selbst entwickelten Konvertierungsskripten zu NAMD-Startdateien^{164,165} umgewandelt. NAMD, das für die MD-Simulationen verwendet wurde, wurde von der „Theoretical and Computational Biophysics Group“ im „Beckman Institute for Advanced Science and Technology“ an der „University of Illinois at Urbana-Champaign“ entwickelt. Die Simulationen liefen auf einer Dual-3-GHz-Xeon-Maschine mit dem in NAMD integrierten CHARMM-Kraftfeld.¹⁶⁶

Zu Beginn der Simulation wurde jeder der vorher erwähnten Einschlusskomplexe, die bereits in Wasser gelöst waren (Wasserbox), für einen Zeitraum von 1000 fs in Zeitschritten von 0.5 fs energieminiert (das macht insgesamt 2000 Schritte). Danach wurde die MD-Simulation des Komplexes in der Wasserbox für 1 ns (1000 ps) in Zeitschritten von 0.5 fs bei einer Temperatur von 300 K durchgeführt. Während der Simulation wurde alle 500 fs eine Momentaufnahme in eine Datei zur weiteren Analyse geschrieben. Für jeden Komplex wurden sieben Atome - sechs vom β -Cyclodextrin, und zwar sechs der sieben C5'-Atome, die dann mit p₁ bis p₆ benannt wurden, und eines vom eingeschlossenen Dipeptid (C-Ar-1 bzw. C5, siehe Abbildung 5.2-2) - herausgenommen und in MATLAB¹⁶⁷

mit Hilfe von MATDCD¹⁶⁸ eingelesen. Danach wurde eine Ebene durch die Cyclodextrin-Kohlenstoffe C5' gelegt, um die Eintauchtiefe d_i zu bestimmen.

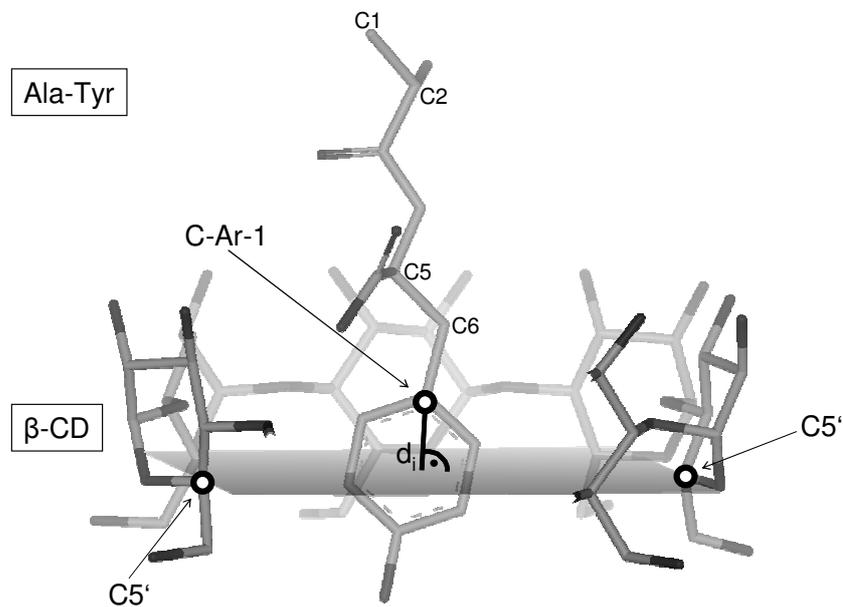


Abbildung 5.2-2: Ebene durch die Cyclodextrin-Kohlenstoffe C5', Eintauchtiefe d_i und Zuweisung der Dipeptid- und Cyclodextrin-Kohlenstoffe. Die CD-Kavität ist im Vordergrund aufgeschnitten, um die Position des Dipeptids besser sichtbar zu machen.

Die Werte für die Eintauchtiefe d_i wurden wie folgt ermittelt: Angefangen von den Kartesischen Koordinaten der β -Cyclodextrin-C5'-Atome für die Punkte p_1 bis p_6 wurden zwei Datensätze für die Datenanpassung berechnet: Für den ersten Datensatz wurden Punkt p_1 (first), p_3 (second) und p_5 (third), für den zweiten wurden Punkt p_2 (first), p_4 (second) und p_6 (third) verwendet. Beide Datenanpassungen verwenden dieselben Koordinaten des Atoms C-Ar-1 eines jeden Dipeptids. Die Gleichungen zur Berechnung der Eintauchtiefe d_i sind wie folgt definiert:

$$r_1 = p_{\text{second}} - p_{\text{first}} \quad \text{Gleichung 5.2-1}$$

$$r_2 = p_{\text{third}} - p_{\text{first}} \quad \text{Gleichung 5.2-2}$$

$$f = r_1 \times r_2 \quad \text{Gleichung 5.2-3}$$

$$v = [p_E - p_{\text{first}}]^T f \quad \text{Gleichung 5.2-4}$$

$$d_i = \frac{v}{\|f\|} \quad \text{Gleichung 5.2-5}$$

wobei p_E die Kartesischen Koordinaten des Dipeptidatoms repräsentiert. Der Operator „ \times “ steht für das normale Kreuzprodukt von Vektoren, der Operator $\|...\|$ bezeichnet die Euklidische Länge des entsprechenden Vektors.

Die Eintauchtiefe d_i wurde für jede zuvor gespeicherte Momentaufnahme berechnet. Nachdem d_i die Position des Dipeptidatoms C-Ar-1 relativ zu der Ebene repräsentiert, können sowohl positive als auch negative Werte resultieren. Für positive d_i ist C-Ar-1 oberhalb der Ebene, für negative d_i unterhalb der Ebene lokalisiert. Die endgültige Eintauchtiefe d_i wurde als Mittelwert der zwei verschiedenen Datenanpassungen übernommen (s. o.). Es stellte sich jedoch heraus, dass die Verwendung nur einer Datenanpassung die Resultate nicht wesentlich veränderte. Auch wurde zusätzlich die Eintauchtiefe des Dipeptid-Kohlenstoffatoms C5 bestimmt, das sich zwei Bindungslängen über dem hier angesprochenen Kohlenstoffatom C-Ar-1 befindet. Die daraus erhaltenen Diagramme wurden mit denen für C5 verglichen (siehe 5.2.2).

5.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Nachdem das Dipeptidmolekül manuell in die Cyclodextrin-Kavität platziert und dann energieminiert wurde, wurden die ersten 250 ps der Simulation als Äquilibrierzeitraum angesehen und deswegen in Abbildung 5.2-3 und Abbildung 5.2-4 nicht gezeigt. In diesen beiden Abbildungen werden die Eintauchtiefen von C-Ar-1 gezeigt, die Diagramme für C5 weisen qualitativ sehr ähnliche Eintauchtiefen auf und werden deshalb nicht gezeigt, da die Diagramme für C-Ar-1 zur Interpretation ausreichen.

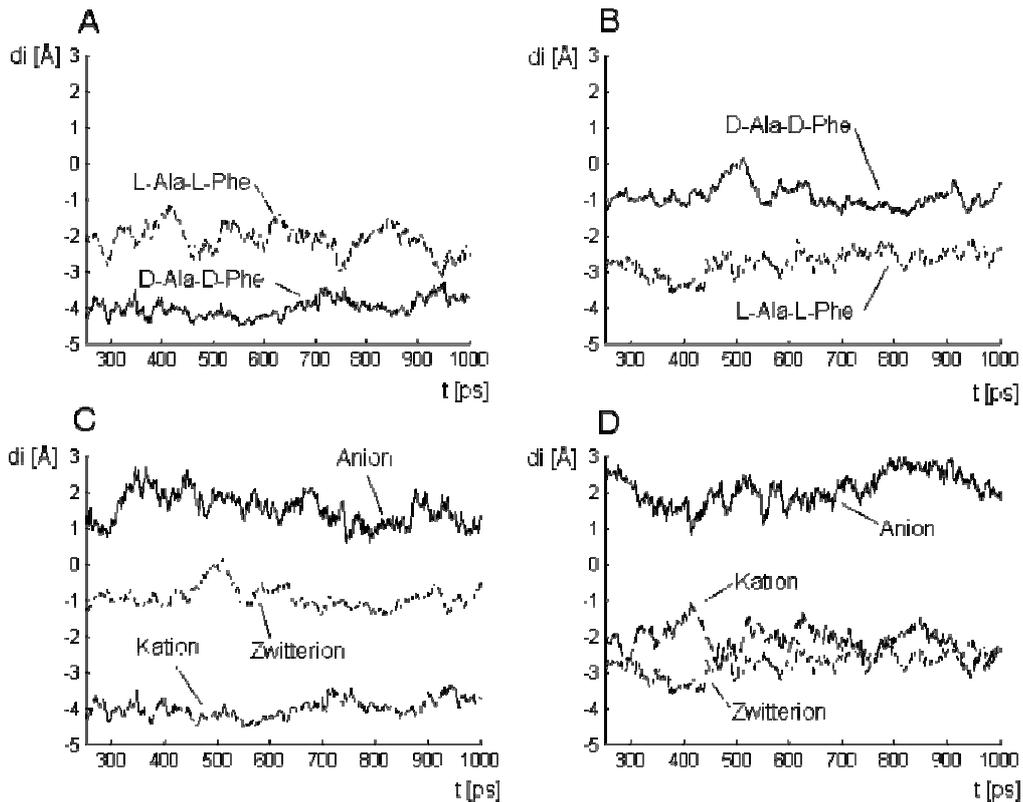


Abbildung 5.2-3: Eintauchtiefe d_i für C-Ar-1 von

- A) D-Ala-D-Phe-Kation (Linie) und L-Ala-L-Phe-Kation (Punkte)
- B) D-Ala-D-Phe-Zwitterion (Linie) und L-Ala-L-Phe-Zwitterion (Punkte)
- C) D-Ala-D-Phe-Kation (Punkte), D-Ala-D-Phe-Zwitterion (Strichpunkte) und D-Ala-D-Phe-Anion (Linie)
- D) L-Ala-L-Phe-Kation (Punkte), L-Ala-L-Phe-Zwitterion (Strichpunkte) und L-Ala-L-Phe-Anion (Linie)

Die Simulationen für die kationische Spezies von Ala-Phe, die die Verhältnisse bei pH 2.5 widerspiegeln, bestätigen einen tieferen Einschluss des DD-Enantiomers im Vergleich zum LL-Enantiomer in die Cyclodextrin-Kavität. Im Gegensatz dazu zeigen die Simulationen für das Zwitterion einen tieferen Einschluss des LL-Enantiomers (siehe Abbildung 5.2-3).

In Abbildung 5.2-4 A sieht man, dass die Eintauchtiefen für das DD- und LL-Enantiomer des Ala-Tyr-Kations sehr ähnlich sind; im Mittel taucht jedoch das DD-Enantiomer ein wenig tiefer in die Kavität ein, was mit den ^1H - und ROESY-NMR-Ergebnissen übereinstimmt.

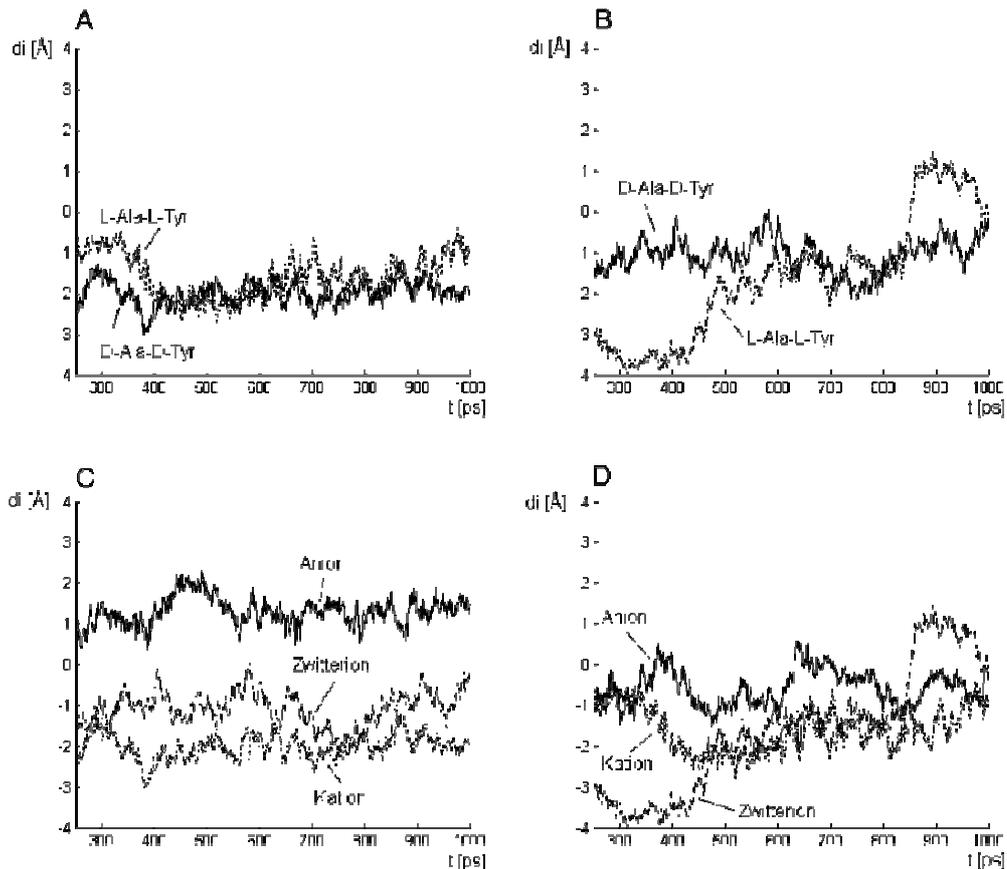


Abbildung 5.2-4: Eintauchtiefe d_i für C-Ar-1 von

- A) D-Ala-D-Tyr-Kation (Linie) und L-Ala-L-Tyr-Kation (Punkte)
- B) D-Ala-D-Tyr-Zwitterion (Linie) und L-Ala-L-Tyr-Zwitterion (Punkte)
- C) D-Ala-D-Tyr-Kation (Punkte), D-Ala-D-Tyr-Zwitterion (Strichpunkte) und D-Ala-D-Tyr-Anion (Linie)
- D) L-Ala-L-Tyr-Kation (Punkte), L-Ala-L-Tyr-Zwitterion (Strichpunkte) und L-Ala-L-Tyr-Anion (Linie)

Abbildung 5.2-4 B zeigt klare Unterschiede im Einschlussverhalten der Enantiomere des Ala-Tyr-Zwitterions. Im Gegensatz zum DD-Enantiomer, das im Laufe der Simulation eine mehr oder weniger konstante Eintauchtiefe zeigt, taucht das LL-Enantiomer zunächst tief in die Kavität ein. Schrittweise wird dann die Eintauchtiefe im Verlauf der Simulation reduziert. Diese Unterschiede zwischen den Enantiomeren können mit der NMR-Spektroskopie nicht erfasst werden, da bei dem dort verwendeten pH-Wert von 3.5 ein Verhältnis von ca. 30 % Kation zu 70 % Zwitterion vorliegt und immer ein Mittelwert aus beiden Protonierungszuständen im Spektrum zu sehen ist.

In Abbildung 5.2-4 C und D ist zu erkennen, dass die kationische Spezies von Ala-Tyr im Mittel die größte Eintauchtiefe aufweist, danach folgen die zwitterionische und dann die anionische Spezies. Diese Rangordnung wird durch die ^1H - und ROESY-NMR-Experimente bestätigt. Wie schon erwähnt, verhält sich das L-Ala-L-Tyr-Zwitterion etwas abweichend.

Alanin und Phenylglycin, die keine Wechselwirkung mit Cyclodextrinen in den potentiometrischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen (siehe die entsprechenden Kapitel dieser Arbeit und Lit.^{100,101}) zeigten, wurden als Negativkontrollen untersucht. Die Enantiomere von Phenylglycin (D und L) wiesen keine Wechselwirkungen mit der β -CD-Kavität auf und verließen deshalb die Kavität recht schnell. Alanin scheint viel zu klein für die nötigen Wechselwirkungen mit der Kavität zu sein und „tanzt“ innerhalb und außerhalb der Kavität hin und her (Daten nicht gezeigt).

5.3 Zusammenfassung

Die Eintauchtiefe der untersuchten Dipeptide wurde mit Hilfe einer in die Cyclodextrin-Kavität eingepassten Ebene berechnet. Auf diese Weise konnten Informationen über das unterschiedliche Einschlussverhalten der untersuchten Dipeptide erhalten werden. Die angewendete Methode lässt sich leicht auf andere Wirts-Gast-Komplexe übertragen und erleichtert die Datenerfassung auch in anderen Fällen.

Es konnte gezeigt werden, dass bei pH 2.5 das DD-Enantiomer von Ala-Phe tiefer in die Kavität von β -Cyclodextrin eintaucht als das LL-Enantiomer, wohingegen bei pH 3.5 der umgekehrte Fall vorliegt. Betrachtet man das Dipeptid Ala-Tyr, dann dringt bei pH 2.5 das DD-Enantiomer tiefer ein, wohingegen keine klare Aussage über das Eindringverhalten der Enantiomere bei pH 3.5 gemacht werden kann.

6 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen mit ungewöhnlichen Aminosäuren

6.1 Einleitung

6.1.1 Elektrophorese

Mit dem Begriff „Elektrophorese“ bezeichnet man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld in einer nichtleitenden Flüssigkeit. Dabei können sie mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in unterschiedliche Richtungen wandern. Durch die Ladung der Ionen ist die Migrationsrichtung vorgegeben. Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit haben folgende Ursachen: Verschiedene Ladungszahlen m/z (mit m = Masse des Teilchens und z = Ladung des Teilchens) bedeuten unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten im elektrischen Feld. Außerdem widersetzen sich die Ionen der elektrophoretischen Migration durch unterschiedlichen Reibungswiderstand aufgrund unterschiedlicher Größe bei gleicher effektiver Ladung.

Die Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis, CE) benutzt einerseits die Trenntechnik der klassischen Elektrophorese auf Platten, andererseits werden die Methoden der Detektion der Chromatographie (v. a. Hochleistungsflüssigchromatographie, HPLC) verwendet, nämlich die direkte Detektion der getrennten Proben in der Kapillare und damit eine einfach durchzuführende Identifizierung und Quantifizierung der Analyten.¹⁶⁹

In dünnen Kapillaren sind die Konvektionsströme bedingt durch die kleinen Innendurchmesser relativ gering. Die große Oberfläche der Kapillare, bezogen auf das Puffervolumen, erlaubt den schnellen effektiven Abtransport der Jouleschen Wärme $W = QU$ (mit Q = Ladung und U = Spannung)³ durch geeignete Kühlung bzw. Temperierung, so dass relativ hohe Spannungen verwendet werden können, d. h. hohe Analysegeschwindigkeiten möglich sind.¹⁶⁹

6.1.2 Apparatur

Üblicherweise überbrückt eine dünne Quarzkapillare (Innendurchmesser 20 bis 100 μm), oder korrekt ausgedrückt, eine Kapillare aus amorphem Siliziumdioxid (fused silica), mit

einer Länge von 20 bis 100 cm die beiden Puffergefäße, zwischen denen eine Spannung von bis zu etwa 30 000 Volt angelegt wird.

Die Detektion erfolgt in der Kapillarelektrophorese meist direkt in der Trennkapillare (online). Die Schichtdicke ist dabei die mittlere Weite der Trennkapillare, so dass die Konzentrationsempfindlichkeit geringer ist als z. B. in der HPLC. Deswegen werden hohe Anforderungen bezüglich Empfindlichkeit, Rauschen, Streulichteinfluss etc. an die Detektoren gestellt.^{169,170}

6.1.3 Elektroosmotischer Fluss

Der elektrophoretischen Wanderung kann ein mehr oder minder starker elektroosmotischer Fluss (electroosmotic flow, EOF) überlagert werden, der aktiv zum Transport der Probezonen, nicht aber zu ihrer Trennung beiträgt. Dieser EOF hängt stark vom pH-Wert des Puffers und von den Oberflächeneigenschaften der Kapillare ab. Er kann so groß sein, dass nicht nur neutrale Moleküle bewegt werden, sondern selbst negative Ionen entgegen ihrer elektrophoretischen Migration zum Detektor bewegt werden.

Der EOF hängt von der Verteilung der Ladungen in der Nähe der Kapillaroberfläche ab. Nahezu alle Oberflächen tragen eine Ladung. Im Falle von Quarzkapillaren sind das negative Ladungen durch Dissoziation der Silanolgruppen. Diesen Oberflächenladungen stehen entsprechend gegensinnig geladene Ionen der Flüssigkeit gegenüber. In dieser Doppelschicht überwiegen in Quarzkapillaren die positiven Ionen, die sich in einer starren und einer beweglichen Schicht an der Oberfläche anordnen. Das sich aufgrund der Ladungsverteilung aufbauende Potential nimmt im Bereich der starren Grenzschicht linear und im Bereich der beweglichen Grenzschicht exponentiell ab. Diese exponentielle Abnahme ist verantwortlich für die Elektroosmose und wird als ζ -Potential bezeichnet. Wird nun parallel zur Oberfläche ein elektrisches Feld angelegt, so zieht das Feld die Gegenionen in der mobilen Schicht längs der Achse an und bewegt so die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. In diesem Falle geht der EOF in Richtung der Kathode, weshalb in der üblichen Anordnung der Apparatur der Detektor in der Nähe des Kathodenraums angebracht wird.^{169,171}

6.1.4 Methoden der Kapillarelektrophorese

Die wichtigste und gebräuchlichste Methode der Kapillarelektrophorese ist die Kapillarezonenelektrophorese (capillary zone electrophoresis, CZE), die ausschließlich mit Elektrolyt gefüllten Kapillaren durchgeführt wird. Die Trennung beruht auf den Mobilitätsdifferenzen der Proben.

Für nichtionische Verbindungen steht darüber hinaus ein zusätzliches Trennverfahren in Form der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um eine echte chromatographische Trenntechnik, da der elektrophoretischen Migration die Verteilung der Analyten zwischen dem Puffer und den Mizellen überlagert ist und dies wesentlich zur Selektivität beiträgt. Dem Puffer werden mizellbildende Detergentien beigesetzt, die neutralen Moleküle verteilen sich zwischen Puffer und den Mizellen nach ihrer Hydrophobie. Die Trennung erfolgt aufgrund der Verteilung in die Mizellen und den Unterschieden im Transport der Proben innerhalb der Mizellen und außerhalb der Mizellen mit dem elektroosmotischen Fluss.¹⁷²

Als Optimierungsparameter für eine kapillarelektrophoretische Trennung sind neben dem pH-Wert die Konzentrationen des evtl. zugesetzten Selektors im verwendeten Puffersystem, das verwendete Puffersystem selbst (Art des Hintergrundelektrolyten) sowie andere Pufferadditive wie SDS, organische Lösungsmittel (organic modifier), Harnstoff u.v.m zu nennen.¹⁶⁹

6.1.5 Enantiomerentrennungen mit Cyclodextrinen

Die Auftrennung eines Enantiomerenpaares geschieht bei der elektrophoretischen Wanderung durch die „quasistationäre Phase“ (hier Cyclodextrin). Nachdem die Selektivitäten oft sehr niedrig sind (im Allgemeinen sind nur sehr geringe Unterschiede in den Mobilitäten zu beobachten), erhält man vollständige Auftrennung nur bei relativ großen Wanderungstrecken, auch wenn ein passender Selektor gefunden wurde.

Die Cyclodextrinkonzentration hat einen entscheidenden Einfluss auf die Trennung: schon geringe Mengen an zugesetzten neutralen Cyclodextrin bewirken eine starke Mobilitätsverringerung der Analyten. Die Trennung ist hier auf unterschiedliche Aufenthaltszeiten der Proben im Cyclodextrin aufgrund unterschiedlicher Wirts-Gast-Stabilitätskonstanten der beiden Enantiomere zurückzuführen. Das Enantiomer mit der längeren Aufenthaltszeit im Cyclodextrin weist die geringere Mobilität auf und wird näher zum EOF hin detektiert. Durch eine Konzentrationserhöhung des chiralen Selektors kann die Mobilität der Analyten so weit eingeschränkt werden, dass diese sehr nahe am EOF detektiert werden, was zu einem Verlust der chiralen Auftrennung führen kann.

Bei geladenen Cyclodextrinen liegt der Fall natürlich etwas anders, sie bewegen sich mit oder gegen den EOF, je nach Art der Ladung und Detektionsmodus. Zudem nimmt bei höheren CD-Konzentrationen die Viskosität des Puffers zu, wodurch der EOF verlangsamt

wird und die Analysenzeit erhöht wird. Mit Hilfe von Cyclodextrinen kann auch in vielen Fällen die Selektivität anderer, nichtchiraler Trennprobleme verbessert werden.^{169,173,174}

6.2 Kapillarelektrophoretische Trennung der Enantiomere von *tert.*-Butylalanin sowie dessen Germanyl- und Silyl-Analoga

Enantiomerenreine Aminosäuren mit unnatürlichen Seitenketten gewinnen immer mehr an Bedeutung in Chemie und Lebenswissenschaften.^{34,175,176,177} Synthetische unnatürliche Aminosäuren haben sich als nützlich erwiesen, um die strukturellen Anforderungen hinsichtlich einer biologischen Aktivität von unzähligen Peptiden und Proteinen zu evaluieren und dienen als Bausteine für die Synthese neuer biologisch aktiver Proteine. Darüber hinaus gewinnen unnatürliche Aminosäuren an Interesse für die Anwendung als Prekursor für Arzneistoffe und Pflanzenschutzmittel und werden als chirale Hilfsreagentien in asymmetrischen organischen Synthesen verwendet. Im Rahmen der systematischen Untersuchungen über Bioorganosilicium- und Bioorganogermanium-Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. R. Tacke stießen Silicium- und Germanium-enthaltende α -Aminosäuren und Peptide auf Interesse, vor allem die Silicium- und Germanium-enthaltenden Aminosäuren des Formeltyps $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{SiR}_3)\text{COOH}$ und $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{GeR}_3)\text{-COOH}$ ($\text{R} = \text{Organyl}$).^{178,179,180,181} Mit ihren CH_2SiR_3 - und CH_2GeR_3 -Gruppen sind diese β -(Triorganylsilyl)alanin- und β -(Triorganylgermyl)alanin-Derivate einzigartige Aminosäuren, die Hydrophobizität und Füllung des Raumes durch große, sterisch anspruchsvolle Reste mit dem üblichen hydrophilen Charakter von Aminosäuren vereinen.

Um die Enantiomerenreinheit der o. a. Synthesen überprüfen zu können, sollte eine Methode entwickelt werden, um die Enantiomere von *tert.*-Butylalanin (Neopentylglycin) sowie dessen Germanyl- und Silyl-Analoga zu trennen.

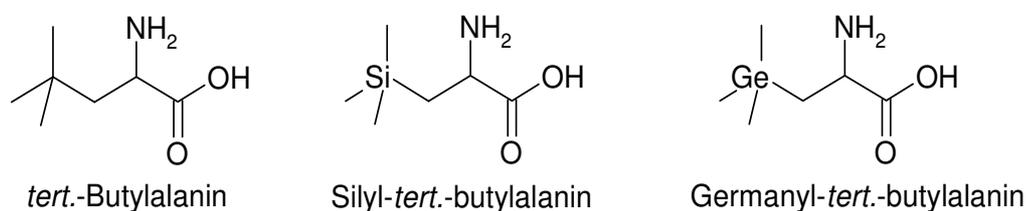


Abbildung 6.2-1: Die untersuchten Aminosäuren

Die zu analysierenden Aminosäuren wurden vor der Trennung mit FMOC (9-Fluorenylmethylchloroformat) derivatisiert, um eine UV-Detektion möglich zu machen. 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC) ist ein Derivatisierungsreagenz vom Chloroformat-

typ. Die Reaktionsbedingungen sind simpel und die entstehenden Derivate sehr stabil. Das überschüssige Reagenz hydrolysiert relativ schnell und es kann zusammen mit seinem Hydrolyseprodukt (FMOC-OH) mit n-Pentan extrahiert werden.

6.2.1 Experimentelles

Alle Aminosäureproben wurden in einem Boratpuffer (0.4 M Borsäure/Natriumhydroxid, pH 9,3) gelöst. Die Derivatisierung der Aminosäuren mit FMOC (9-Fluorenylmethylchloroformat) geschah folgendermaßen: Zu 1,2 ml Probelösung wurden 0,8 ml der FMOC-Lösung (eine 300 mM (ca. 80 mg/ml) Lösung von FMOC in Acetonitril) zugegeben. Die Mischung wurde für ca. 15 Sekunden vorsichtig homogen vermischt und für 2 Minuten bei RT unter Lichtausschluss stengelassen. Der Reagenzüberschuss und sein Hydrolyseprodukt wurden dreimal jeweils mit 2 ml n-Pentan extrahiert. Anschließend wurde die Probe zehnfach mit einer 20 mM Borsäurelösung 20 verdünnt.

Die Trennungen wurden auf einem Beckman Coulter P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA), ausgestattet mit einem UV-Detektor, durchgeführt. Die verwendete Kapillare war eine Kieselgelkapillare mit einer Gesamtlänge von 60 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA); die Länge bis zum Detektor betrug 50 cm und der innere Durchmesser 75 µm. Die Proben wurden durch Druckinjektion von 10 Sekunden bei 6895 Pa in die Kapillare geladen; die Injektion fand auf der Anodenseite statt. Die Spannung betrug 20 kV, die Temperatur 25 °C. Die Detektion für die Versuche mit derivatisierten Aminosäuren fand bei 254 nm statt (UV-Detektor).

Der endgültige Trennpuffer war ein 20 mM Boratpuffer, pH 9.3, 100 mM SDS, 23 % Methanol, 15 mM γ -Cyclodextrin.

6.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Methodenentwicklung resultierte in einem Puffer aus: 20 mM Borat, pH 9.4, 100 mM SDS, 23 % Methanol, 15 mM γ -Cyclodextrin, Detektion bei 254 nm im normalen Modus. Es handelt sich also hierbei um eine MEKC-Methode.

In Abbildung 6.2-2 ist die Zuordnung der Peaks für die Enantiomere von *tert.*-Butylalanin und überschüssiges Derivatisierungsreagenz zu sehen. Das FMOC-Signal ist weit genug von den Signalen des Analyten entfernt, so dass eine Zuordnung problemlos möglich ist.

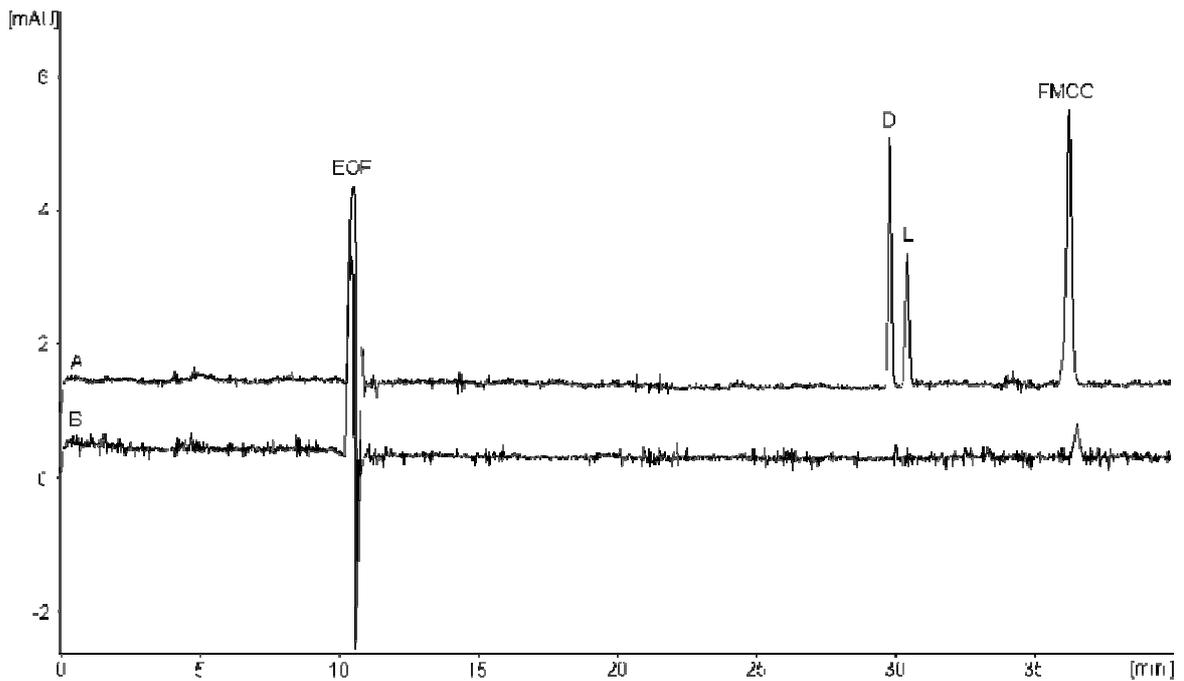


Abbildung 6.2-2: Trennung von D- und L-*tert.*-Butylalanin, A: mit FMOC derivatisiertes *tert.*-Butylalanin (D-Enantiomer gespikt), B: Lauf ohne Zusatz des Analyten („Blank“)

In Abbildung 6.2-3 sind die Trennungen der Enantiomere aller drei zu untersuchenden Aminosäuren, nämlich *tert.*-Butylalanin und seine Silyl- und Germanyl-Analoga, zu sehen.

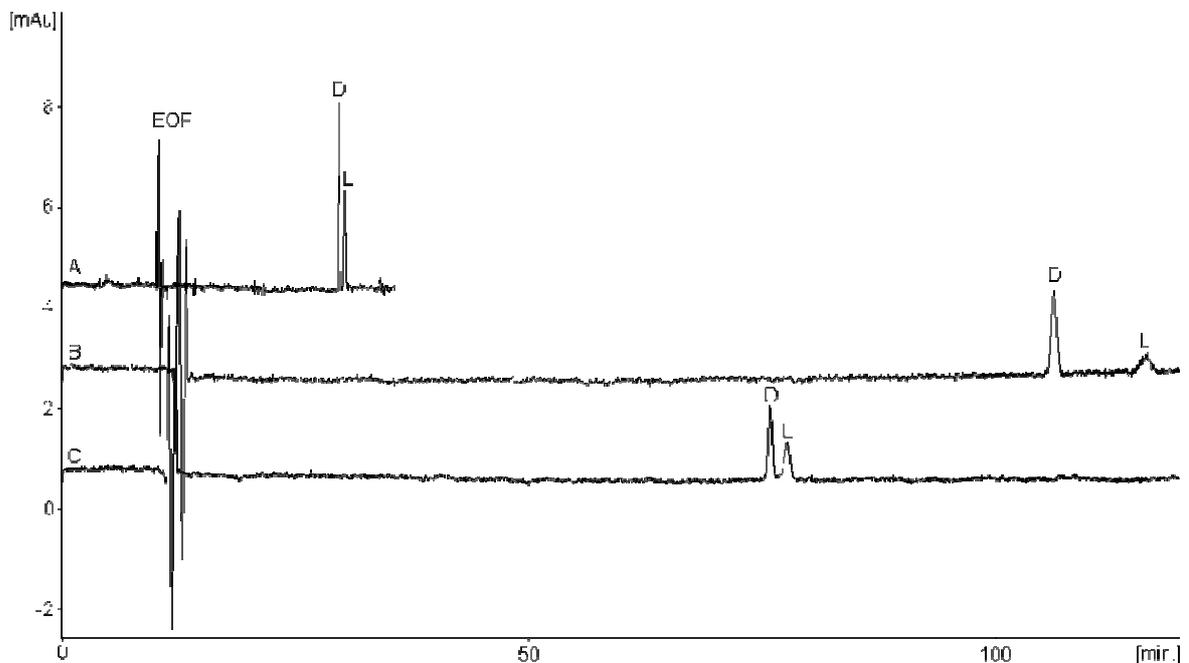


Abbildung 6.2-3: Trennung der mit FMOC derivatisierten C-, Si- und Ge-Analoga von D- und L-*tert.*-Butylalanin (20 mM Boratpuffer, pH 9.3, 100 mM SDS, 23 % Methanol, 15

mM γ -Cyclodextrin), A: Fmoc-*tert.*-Butylalanin, B: Fmoc-Silyl-*tert.*-butylalanin, C: Fmoc-Germanyl-*tert.*-butylalanin

Die Trennung ist zwar relativ zeitaufwändig (der Lauf für Silyl-*tert.*-butylalanin dauert zwei Stunden), nichtsdestotrotz lässt sich die Methode zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit verwenden, da die Enantiomere aller drei Aminosäuren basisliniengetrennt wurden. Die Auflösungen R_s der Enantiomeren liegen bei 2.73 für *tert.*-Butylalanin, 8.17 für Silyl-*tert.*-butylalanin und 2.07 für Germanyl-*tert.*-butylalanin.

Interessanterweise steigen die Migrationszeiten nicht mit steigendem Atomradius des α -ständigen Atoms ($C < Si < Ge$) an, sondern die Silicium-enthaltende Aminosäure migriert deutlich später (ca. 120 Minuten) als die das noch größere Germanium-Atom enthaltende Aminosäure (ca. 75 Minuten). Das Kohlenstoff-Analogon weist die kürzeste Migrationszeit von ca. 35 Minuten auf.

6.3 Trennung der Enantiomere von *tert.*-Butylglycin mit indirekter Detektion

Um die Bindungskonstanten der Aminosäuren mit Cyclodextrinen zu bestimmen, müssen sie underivatisiert verwendet werden, weil ansonsten die Bindungskonstante der derivatisierten Verbindung (in unserem Falle Fmoc-*tert.*-butylalanin) mit dem Cyclodextrin bestimmt würden. Da *tert.*-Butylalanin keinen Chromophor aufweist, eine direkte UV-Detektion also nicht möglich ist, wurden Versuche zur Trennung der Enantiomere von *tert.*-Butylalanin mit indirekter Detektion durchgeführt. Auch bei der indirekten UV-Detektion gilt das Lambert-Beersche Gesetz. Durch Zusatz eines UV-absorbierenden Ions zum Puffer wird ein hohes Hintergrundsignal erzeugt. Durch Verdrängung von UV-absorbierenden Ionen des Puffers durch Probenionen am Peakmaximum wird das Hintergrundsignal erniedrigt. Die höchste Empfindlichkeit erreicht man, wenn die Probenmoleküle überhaupt keine eigene Absorption aufweisen.^{169, 182}

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen benötigt man Pufferzusätze, die nicht mit dem Cyclodextrin in Wechselwirkung treten. In der Literatur sind Informationen zur chiralen CE mit indirekter Detektion kaum zu finden; entweder werden die Cyclodextrine nur als Pufferzusätze zur besseren Auflösung der Peaks von nicht-chiralen Trennproblemen verwendet, oder der Hintergrundelektrolyt tritt ebenfalls mit dem Cyclodextrin in Wechselwirkung, was zwar trotzdem zu einer Trennung der Enantiomere führen kann, aber zur Bestimmung von Bindungskonstanten nicht geeignet ist.¹⁸³ Deswegen fiel die Wahl schließlich auf Chromat als Hintergrundelektrolyten

(Detektion bei 254 nm) und ggf. Diethanolamin oder Borat als puffernde Substanz, nachdem die Pufferwirkung von Chromat sehr gering ist.^{184,185,186}

Diese Pufferzusätze verlangen einen basischen pH-Wert, d. h. die Aminosäure liegt hier als Anion vor. Die Trennung von Anionen in der CE in normaler Anordnung (mit dem Detektor auf der Seite der Kathode) ist etwas problematisch, da die Anionen gegen den EOF migrieren. Es gelingt nur, diejenigen Anionen zu detektieren, deren vektorielle Wanderung zur Anode geringer ist als der zur Kathode gerichtete EOF. Schnell wandernde Anionen entziehen sich der Detektion. Durch Umpolung der Spannungsquelle kann man diese schnellen Anionen detektieren, aber die langsameren Anionen wandern nach der Injektion mit dem EOF ins Kathodengefäß zurück. Kehrt man zusätzlich mit dem elektrischen Feld auch noch den EOF um, z. B. durch Beschichtung der Kapillaroberfläche mit einem Tensid mit quaternären Ammoniumgruppen, so gelingt die Trennung sowohl schneller als auch langsamer Anionen in einem Lauf.

Die Umkehrung des Elektroosmotischen Flusses geschieht folgendermaßen: Das kationische Tensid CTAB wird mit seinen positiv geladenen Molekülen an den negativen Silanolgruppen der Kapillarwand adsorbiert und bildet in sehr kleinen Konzentrationen (kleiner als 0,1 mM) eine Schicht, die die Ladung der Oberflächensilanolgruppen kompensiert. Durch diese Behandlung der Kapillare wird der elektroosmotische Fluss unterdrückt. Erhöht man die Konzentration auf 0,2 mM CTAB und höher, wird eine Doppelschicht an der Kapillarwand aufgebaut. Durch hydrophobe Wechselwirkungen lagert sich an die erste Schicht eine zweite, die nun mit den positiven Ladungen der CTAB-Moleküle ins Innere der Kapillare gerichtet ist. Die positiven Ladungen an der Außenseite dieser Doppelschicht sind nun Ursache für den elektroosmotischen Fluss, der folglich nicht mehr kathodengerichtet ist, sondern zur Anode verläuft. Bei noch größeren Konzentrationen besteht die Gefahr, dass das CTAB wie bei der MEKC Mizellen bildet und die Trennung aufgrund des völlig anderen Trennmechanismus nicht mehr effektiv ist.^{169,187}

6.3.1 Experimentelles

Die Apparatur war die gleiche wie in 6.2.1 beschrieben, nur wurde bei den Versuchen zur indirekten Detektion ein Dioden-Array-(PDA)-Detektor mit variabler Wellenlänge verwendet.

Es wurden drei verschiedene Trennsysteme getestet, die in Tabelle 6-1 beschrieben werden.

Tabelle 6-1: Übersicht über die getesteten Trennsysteme

System 1	Kapillare	fused silica 50 μm I.D., 60,2/50 cm Länge
	Detektion	PDA-Detektor, 254 nm
	Puffer	5 mM Na_2CrO_4 , 0,2 mM CTAB, 10 mM β -CD, pH 11,3
	Analyt	1 mM D,L- <i>tert.</i> -Butyalanin, Detektion im umgekehrten Modus (nach Lit. ¹⁸²)
System 2	Kapillare	fused silica 50 μm I.D., 60,2/50 cm Länge
	Detektion	PDA-Detektor, 254 nm
	Puffer	25 mM Diethanolamin, pH 10,7, 5 mM Na_2CrO_4 , 15 mM α -CD oder 15 mM β -CD
	Analyt	18 mg/ml D,L- <i>tert.</i> -Butylalanin, Detektion im normalen Modus (nach Lit. ¹⁸⁶)
System 3	Kapillare	fused silica 50 μm I.D., 60,2/50 cm Länge, PDA-Detektor
	Detektion	PDA-Detektor, 254 nm
	Puffer	5 mM Na_2CrO_4 , 3 mM Borat, 10 mM β -CD, pH 9,2
	Analyt	1 mM D,L- <i>tert.</i> -Butylalanin, Detektion im normalen Modus (nach Lit. ^{188,189,190})

6.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Kombination von Chromat und Cyclodextrinen in einem CE-Trennpuffer ist recht häufig bezüglich der Trennung von anorganischen Anionen zu finden, als Beispiel sei Lit.¹⁹¹ angeführt. Es handelt sich jedoch hierbei um keine chiralen Trennungen, sondern die Cyclodextrine werden zur Verbesserung der Auflösung, Verringerung der Migrationszeit etc. verwendet. Mit einer Methode, die sich der Gefrierpunktserniedrigung zur Bestimmung von Bindungskonstanten bedient, konnten für den Komplex von Chromat und α -CD eine Bindungskonstante von 32.7 M⁻¹, mit β -CD eine Bindungskonstante von 10.2 M⁻¹ und mit γ -CD eine Bindungskonstante von 18.3 M⁻¹ ermittelt werden,¹⁹² es kann also die Bildung eines Einschlusskomplexes stattfinden. Diese Bindungskonstanten sind jedoch u. U. so klein im Verhältnis zu den zu ermittelnden Bindungskonstanten der Cyclodextrin-Einschlusskomplexe mit den zu untersuchenden Aminosäuren, dass sie nicht in Gewicht fallen. Jedoch zeichneten sich alle drei verwendeten Trennsysteme durch Probleme in der Detektion (die Peaks waren nicht identifizierbar) und äußerst schlechte Reproduzierbarkeit aus. Die Verwendung von Chromat als Puffersubstanz ist demnach nicht zu empfehlen, abgesehen davon, dass diese Substanz aufgrund ihrer Toxizität und Cancerogenität erhebliche Vorsichtsmaßnahmen im Umgang erfordert.

Die Verwendung von Diethanolamin als zusätzlichen Puffersubstanz hat sich als problematisch erwiesen, da es anscheinend mit β -Cyclodextrin einen stärkeren Einschlusskomplex bildet als die zu untersuchenden Aminosäuren,¹⁹³ obwohl das System Cyclodextrin/Diethanolamin weit verbreitet ist.¹⁸⁶

Da es sehr schwierig ist, ein System zu finden, das einen Chromophor für die indirekte Detektion enthält, aber nicht mit dem zur Enantiomerentrennung verwendeten Cyclodextrin in Wechselwirkung tritt, wurde dieser Ansatz zur Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen underivatisierten, aliphatischen (d. h. keinen Chromophor enthaltenden) Aminosäuren und Cyclodextrinen nicht weiter verfolgt.

6.4 Zusammenfassung

Es wurde eine Methode zur Trennung der Enantiomere von tert.-Butylalanin und seiner Silyl- und Germanyl-Analoga entwickelt, die in einem Puffer aus: 20 mM Borat, pH 9.4, 100 mM SDS, 23 % Methanol, 15 mM γ -Cyclodextrin, Detektion bei 254 nm im normalen Modus resultierte. Es handelt sich hierbei um eine MEKC-Methode mit der Auflösungen R_s der Enantiomeren zwischen 2.07 und 8.17 erreicht werden konnten.

Versuche zur Trennung der underivatisierten Enantiomere von tert.-Butylalanin mit indirekter Detektion schlugen fehl, da der verwendete Hintergrundelektrolyt in allen seinen Modifikationen, der als Chromophor Chromat enthielt, keine identifizierbaren Peaks und nicht reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

7 Vergleich der Ergebnisse aus den spektroskopischen, kapillarelektrophoretischen und potentiometrischen Messungen und den MD-Simulationen

Um den chiralen Erkennungsprozess von β -Cyclodextrin (β -CD) und einigen seiner Derivate, nämlich *Heptakis*-(6-sulfato)- β -cyclodextrin (HS- β -CD), *Heptakis*-(2,3-diacetyl)- β -cyclodextrin (Diac- β -CD) und *Heptakis*-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD), zu verstehen, wurden NMR-Experimente, vor allem die Messung der „Verschiebungen der chemischen Verschiebungen, die durch Komplexbildung induziert wurden“ (complexation induced chemical shifts, CICS) und ROESY-Experimente, durchgeführt. Betrachtet man die CICS, die für die Paare Diac- β -CD/Ala-Phe, HDAS- β -CD/Ala-Phe, Diac- β -CD/Ala-Tyr und HDAS- β -CD/Ala-Tyr auftreten, dann zeigt sich, dass sie relativ klein sind und demnach auf eine eher schwache Wechselwirkung des jeweiligen Gastmoleküls mit dem Wirt hindeuten. So wundert es nicht, dass in den Kapillarelektrophorese-Versuchen (capillary electrophoresis, CE) nicht alle Dipeptide mit allen Cyclodextrinen getrennt werden können. Dies gilt insbesondere für die Paare Diac- β -CD mit jeweils Ala-Phe und Ala-Tyr bei pH 3.5 sowie mit Ala-Tyr bei pH 2.5, keine Trennung der Enantiomere erreicht werden. Bei Trennung mit HDAS- β -CD migrierte immer das DD-Enantiomer sowohl von Ala-Phe als auch von Ala-Tyr vor dem LL-Enantiomer.

Ausgeprägter sind die Ergebnisse mit β -CD und HS- β -CD. Die CICS-Messungen zeigen, dass bei pH 3.5 generell die Eintauchtiefe des aromatischen Restes des Dipeptids in die Kavität von β -CD oder HS- β -CD geringer ist als bei pH 2.5, was durch die Ergebnisse der ROESY-Experimente sowie im Falle von β -CD durch Moleküldynamik-(MD)-Simulationen abgesichert werden konnte. In der CE migriert bei pH 2.5 das DD-Enantiomer von Ala-Tyr mit β -CD langsamer als das LL-Enantiomer, was auf eine stärkere Komplexbildung des DD-Enantiomers bei diesem pH-Wert hinweist. Entsprechend konnte durch die CICS gezeigt werden, dass das DD-Enantiomer von Ala-Tyr bei pH 2.5 tiefer in die Kavität von β -CD eintaucht als das LL-Enantiomer, was durch die ROESY-Experimente und die MD-Simulationen bestätigt wird. Bei pH 3.5 migriert das LL-Enantiomer dagegen langsamer in der CE, was sich in einem tieferen Eintauchen des LL-Enantiomers widerspiegelt und durch die CICS NMR-spektroskopisch bestätigt wird.

Mit HS- β -CD migriert in der CE das DD-Enantiomer von Ala-Tyr bei pH 2.5 langsamer, ebenso wie bei pH 3.5. Bemerkenswerterweise bestätigen die CICS für pH 2.5 zwar kein

tieferes Eintauchen des Dipeptids, wohl aber sind stärkere Wechselwirkungen mit den Dipeptid-Protonen zu erkennen. Bei pH 3.5 sind mittels NMR-Spektroskopie (sowohl CICS als auch ROESY) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Enantiomeren zu erkennen, lediglich die CD-Spektroskopie liefert für HS- β -CD mit D-Ala-D-Tyr eine größere Bindungskonstante. Vermutlich werden in diesem Falle die unterschiedlichen Migrationszeiten der beiden Enantiomere in der CE durch kleinste Unterschiede in den Wechselwirkungen hervorgerufen, die sich im Verlauf der Trennstrecke zum beobachteten Effekt einer Enantiomerentrennung aufsummieren.

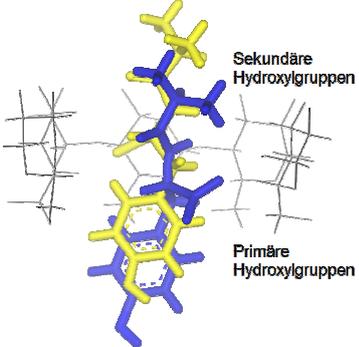
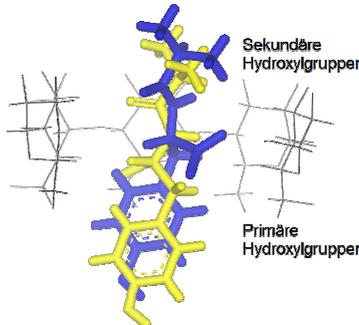
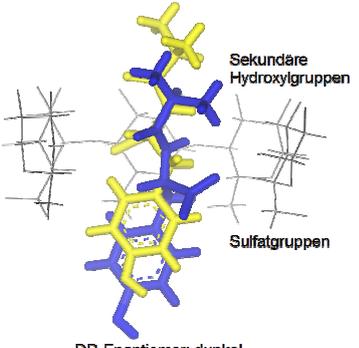
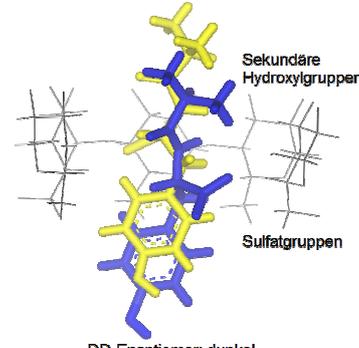
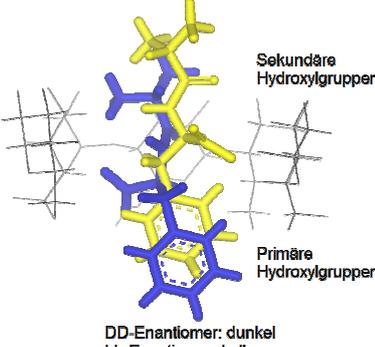
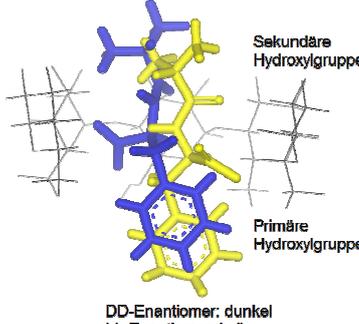
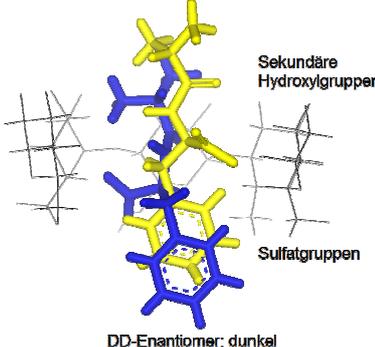
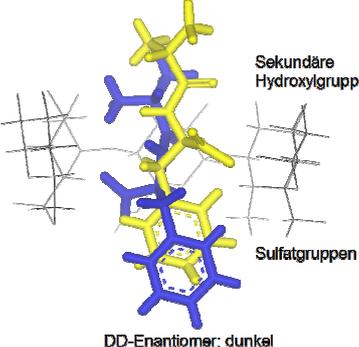
Wie bereits erwähnt, konnte durch die MD-Simulationen gezeigt werden, dass bei pH 2.5 das DD-Enantiomer von Ala-Phe tiefer in die Kavität von β -Cyclodextrin eintaucht als das LL-Enantiomer, wohingegen bei pH 3.5 der umgekehrte Fall vorliegt. Die Potentiometrie liefert auch für pH 3.5 eine größere Bindungskonstante für das LL-Enantiomer. Damit werden die Ergebnisse aus der CE, nach denen bei pH 2.5 das DD-Enantiomer und bei pH 3.5 das LL-Enantiomer langsamer migriert, untermauert.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Studien über das Einschussverhalten der Enantiomere von Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -CD und HS- β -CD bei den pH-Werten 2.5 und 3.5 ist in Tabelle 7-1 nochmals zusammengefasst und in Tabelle 7-2 visualisiert. Dabei sind die Eintauchtiefen der Dipeptide so dargestellt, wie sie die meiste Zeit über in den Moleküldynamik-Simulationen zu sehen sind. Teilweise ist der Aromat sehr weit in die Kavität eingedrungen bzw. sogar durch die Kavität hindurch „gerutscht“, so dass er sich schon fast wieder außerhalb der Kavität befindet. Wechselwirkungen des Aromaten mit H3' des Cyclodextrins sollten bei einer so großen Eintauchtiefe eigentlich nicht mehr auftreten. Dennoch wurden im ROESY-NMR-Experiment Kreuzsignale der aromatischen Protonen des Dipeptids mit H3' beobachtet. Dies mag daran liegen, dass die NMR-Zeitskala sehr groß ist und man immer einen Mittelwert der tatsächlichen Verhältnisse sieht. Deswegen spielen die Momente, in denen sich das Dipeptid weiter oben befindet, hier eine Rolle.

Tabelle 7-1 Vergleich der Ergebnisse aus den durchgeführten Experimenten

Ala-Tyr	CD-Spektroskopie	Potentiometrie	¹ H-NMR (CICS)	ROESY	MD-Simulation	CE
β-CD pH 2.5	Stärkere Bindung mit LL	-	DD taucht tiefer in die Kavität ein	DD taucht tiefer in die Kavität ein	DD taucht tiefer in die Kavität ein	DD migriert langsamer
β-CD pH 3.5	Keine Bindungskonstanten bestimmbar	Stärkere Bindung mit DD	LL taucht tiefer in die Kavität ein	Kein signifikanter Unterschied zwischen DD und LL	Keine Aussagen möglich	LL migriert langsamer
HS-β-CD pH 2.5	Keine Bindungskonstanten bestimmbar	-	Stärkere Wechselwirkungen mit DD (Dipeptid-Protonen)	Kein signifikanter Unterschied zwischen DD und LL	-	DD migriert langsamer
HS-β-CD pH 3.5	Stärkere Bindung mit DD	-	Kein signifikanter Unterschied zwischen DD und LL	Kein signifikanter Unterschied zwischen DD und LL	-	DD migriert langsamer
Ala-Phe	CD-Spektroskopie	Potentiometrie	¹ H-NMR (CICS)	ROESY	MD-Simulation	CE
β-CD pH 2.5	Stärkere Bindung mit LL	-	Kein signifikanter Unterschied zwischen DD und LL	-	DD taucht tiefer in die Kavität ein	DD migriert langsamer
β-CD pH 3.5	Stärkere Bindung mit DD	Stärkere Bindung mit LL	Kein signifikanter Unterschied zwischen DD und LL	-	LL taucht tiefer in die Kavität ein	LL migriert langsamer
HS-β-CD pH 2.5	Stärkere Bindung mit LL	-	DD taucht tiefer in die Kavität ein	-	-	DD migriert langsamer
HS-β-CD pH 3.5	Keine Bindungskonstanten bestimmbar	-	DD taucht tiefer in die Kavität ein	-	-	DD migriert langsamer

Tabelle 7-2: Graphische Darstellung der erhaltenen Ergebnisse (die Darstellungen sind rein schematisch und spiegeln häufig auftretende Geometrien wieder)

	Kation	Zwitterion
Ala-Tyr mit β -CD	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Primäre Hydroxylgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Primäre Hydroxylgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>
Ala-Tyr mit HS- β -CD	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Sulfatgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Sulfatgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>
Ala-Phe mit β -CD	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Primäre Hydroxylgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Primäre Hydroxylgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>
Ala-Phe mit HS- β -CD	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Sulfatgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>	 <p>Sekundäre Hydroxylgruppen</p> <p>Sulfatgruppen</p> <p>DD-Enantiomer: dunkel LL-Enantiomer: hell</p>

8 Zusammenfassung

Die Cyclodextrin-modifizierte Kapillarelektrophorese (CE) ist eine wichtige chirale analytische Technik geworden, die zur HPLC und zur Gaschromatographie komplementär ist und sich deshalb für die Analyse der Abbauprodukte von Aspartam gut eignet. Ausgehend von diesen Abbauprodukten wurden im Arbeitskreis Scriba an der Universität Jena systematische Studien über die Trennung von Enantiomeren verschiedener Dipeptide mit einer Vielzahl von nativen und derivatisierten Cyclodextrinen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Bei der Trennung der Enantiomere von z. B. Ala-Phe oder Ala-Tyr mit β -Cyclodextrin wurde eine Umkehr der Migrationsreihenfolge bei Erhöhung des Puffer-pH-Werts von 2,5 auf 3,5 festgestellt. Mit *Heptakis*-(6-sulfato)- β -cyclodextrin (HS- β -CD), *Heptakis*-(2,3-O-diacetyl)- β -cyclodextrin (Diac- β -CD) und *Heptakis*-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD) wurde diese Umkehr der Migrationsreihenfolge nicht beobachtet.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen Cyclodextrinen und Aminosäuren bzw. Dipeptiden gründlich und umfassend zu untersuchen. Dabei ging es in erster Linie um die Untersuchung der Mechanismen der chiralen Erkennung durch Cyclodextrine, die mit Hilfe von verschiedensten Analysemethoden, vor allem potentiometrische Titrations- und spektroskopische Methoden, wie der NMR-, UV- und CD-Spektroskopie durchgeführt werden sollten. Damit sollte auch die beobachtete Umkehr der Migrationsreihenfolge bei Erhöhung des pH-Wertes des Laufpuffers in der CE erklärt werden.

Die potentiometrische Titrationsmethode lieferte vernünftige Bindungskonstanten für Cyclodextrin-Einschlusskomplexe mit Aminosäuren. Eine Analyse der Struktur-Aktivitätsbeziehungen für Aminosäuren und Cyclodextrine ergab, dass ein gewisses Volumen der Aminosäure-Seitenkette und damit ein gutes Ausfüllen der Cyclodextrin-Kavität nötig ist, um den vollen Nutzen aus den hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Aminosäure-Seitenkette und der Cyclodextrin-Kavität zu ziehen. Eine Verlängerung des hydrophilen Restes, der aus der Kavität herausragt, wie es bei den untersuchten Dipeptiden Ala-Phe und Ala-Tyr der Fall, führt zu der Möglichkeit der Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen mit den Hydroxylgruppen am breiteren Rand der Cyclodextrin-Kavität und damit zu einer stärkeren Bindung an das Cyclodextrin.

UV-spektroskopisch wurden die Stöchiometrien der Komplexe der D- und L-Enantiomere von Phenylalanin und Phenylglycin mit α - und β -Cyclodextrin (CD) und von Tyrosin und Tryptophan mit α -CD mittels so genannter „Job-Plots“ bestimmt. Dabei zeigte nur Tryptophan mit α -CD Anzeichen für ein tatsächliches Auftreten eines Einschlusskomplexes, und zwar wahrscheinlich mit einer Mischung aus den Stöchiometrien 1:2 (Aminosäure: α -CD) und 1:1. Alle anderen Job-Plots waren nicht auswertbar. Massenspektrometrische Untersuchungen einer 1:1-Mischung von L-Phenylalanin und β -CD ergaben allerdings Hinweise für das Auftreten eines 1:1-Komplexes. Andere Komplexstöchiometrien wurden nicht beobachtet. Des Weiteren wurde versucht, die Bindungskonstanten der D- und L-Enantiomere von Phenylalanin, Phenylglycin und Tyrosin mit α -CD UV-spektroskopisch zu bestimmen, was aber zu keinen eindeutig auswertbaren Ergebnissen führte.

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie wurden die Bindungskonstanten der Einschlusskomplexe der DD- und LL-Enantiomere der Dipeptide Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -CD und HS- β -CD bestimmt. Die gefundenen Bindungskonstanten weisen alle recht hohe Standardabweichungen auf, so dass sich die Enantiomere im Verhalten nicht signifikant voneinander unterscheiden und teilweise sogar im Widerspruch zu den im Zuge dieser Arbeit mit anderen Methoden gefundenen Bindungsphänomenen stehen.

Um den chiralen Erkennungsprozess von β -CD und einigen seiner Derivate, nämlich HS- β -CD, Diac- β -CD und HDAS- β -CD, zu verstehen, wurden NMR-Experimente durchgeführt, und zwar wurden „Verschiebungen der chemischen Verschiebungen, die durch Komplexbildung induziert wurden“ (complexation induced chemical shifts, CICS) vermessen und mittels ROESY-Experimenten die Komplexgeometrie untersucht. Betrachtet man die CICS, die für die Paare Diac- β -CD/Ala-Phe, HDAS- β -CD/Ala-Phe, Diac- β -CD/Ala-Tyr und HDAS- β -CD/Ala-Tyr auftreten, dann zeigt sich, dass sie relativ klein sind und demnach auf eine eher schwache Wechselwirkung des jeweiligen Gastmoleküls mit dem Wirt hindeuten. Die CICS für β -CD- und HS- β -CD-Dipeptid-Komplexe bestätigten einen Einschluss des aromatischen Restes in die Cyclodextrin-Kavität. Es konnte gezeigt werden, dass bei pH 2.5 das DD-Enantiomer von Ala-Tyr tiefer in die Kavität von β -CD eintaucht als das LL-Enantiomer. Außerdem ist bei pH 3.5 die Eintauchtiefe in die Kavität geringer als bei pH 2.5, was durch die Ergebnisse der ROESY-Experimente bestätigt werden konnte.

Um einen besseren Einblick in die Bindungsmodi der Enantiomere von Ala-Phe und Ala-Tyr mit β -CD bei unterschiedlichen pH-Werten zu erhalten, wurden Moleküldynamik-(MD-)Simulationen durchgeführt. Die Simulationen wurden mit jedem Enantiomer von

Ala-Phe und Ala-Tyr in jedem möglichen Protonierungszustand durchgeführt, d. h. Kation, Zwitterion und Anion. Zum ersten Mal wurden MD-Simulationen für eine größere Serie von unterschiedlichen Komplexen von Enantiomeren in verschiedenen Protonierungszuständen systematisch über den langen Zeitraum von 1 ns (=1000 ps) ausgeführt.

Die Eintauchtiefe der untersuchten Dipeptide wurde mit Hilfe einer in die Cyclodextrin-Kavität eingepassten Ebene berechnet. Auf diese Weise konnten Informationen über das unterschiedliche Einschlussverhalten der untersuchten Dipeptide erhalten werden. Die angewendete Methode lässt sich leicht auf andere Wirts-Gast-Komplexe übertragen und erleichtert die Datenerfassung auch in anderen Fällen.

Es konnte gezeigt werden, dass bei pH 2.5 das DD-Enantiomer von Ala-Phe tiefer in die Kavität von β -Cyclodextrin eintaucht als das LL-Enantiomer, wohingegen bei pH 3.5 der umgekehrte Fall vorliegt. Betrachtet man das Dipeptid Ala-Tyr, dann dringt bei pH 2.5 das DD-Enantiomer tiefer ein, wohingegen keine klare Aussage über das Eindringverhalten der Enantiomere bei pH 3.5 gemacht werden kann. Die CICS und die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese weisen jedoch auf ein tieferes Eindringen des LL-Enantiomers hin.

Um die Enantiomerenreinheit der im Rahmen der systematischen Untersuchungen über Bioorganosilicium- und Bioorganogermanium-Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. R. Tacke synthetisierten Silicium- und Germanium-enthaltenden α -Aminosäuren und Peptide des Formeltyps $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{SiR}_3)\text{COOH}$ und $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{GeR}_3)\text{COOH}$ (R = Organyl) überprüfen zu können, wurde eine Methode entwickelt, um die Enantiomere von *tert.*-Butylalanin sowie dessen Germanyl- und Silyl-Analoga zu trennen. Die Methode zur Trennung und Quantifizierung der Enantiomere von *tert.*-Butylalanin und seiner Silyl- und Germanyl-Analoga, resultierte in einem Puffer aus: 20 mM Borat, pH 9.4, 100 mM SDS, 23 % Methanol, 15 mM γ -Cyclodextrin, Detektion bei 254 nm im normalen Modus. Es handelt sich hierbei um eine MEKC-Methode mit der Auflösungen R_s der Enantiomeren zwischen 2.07 und 8.17 erreicht werden konnten.

9 Summary

Cyclodextrin-modified capillary electrophoresis (CE) has become an important chiral analytic tool which is complementary to gas chromatography and HPLC. It is applicable for the analysis of polar substances particularly well, and is therefore suitable for the analysis of the degradation products of aspartame. On the basis of these degradation products, systematic studies on the separation of enantiomers of different dipeptides with a variety of native and derivated cyclodextrins at different pH values were accomplished by the group of Scriba at the University of Jena. While increasing the buffer pH value from 2.5 to 3.5, the separation of the enantiomers of Ala-Phe or Ala-Tyr with β -cyclodextrin revealed a reversal of the migration order. With *heptakis*-(6-sulfato)- β -cyclodextrin (HS- β -CD), *heptakis*-(2,3-O-diacetyl)- β -cyclodextrin (Diac- β -CD) and *heptakis*-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -cyclodextrin (HDAS- β -CD), this reversal of the migration order was not observed.

The goal of this work was to examine the interaction mechanisms between cyclodextrins and amino acids and/or dipeptides. The primary goal was the investigation of the chiral recognition mechanisms of cyclodextrins, which were examined by most diverse analysis methods, e. g. potentiometric titration and NMR spectroscopy as well as UV and CD spectroscopy. In addition, it was aimed to elucidate the reason of the reversed migration order observed with increasing pH value of the running buffer in CE.

The potentiometric titration method led to reasonable binding constants for cyclodextrin inclusion complexes with amino acids. An analysis of the structure activity relationship for amino acids and cyclodextrins resulted in the fact that a certain volume of the amino acid side chain and thus a good fit to the cyclodextrin cavity are necessary in order to take full advantage of the hydrophobic interactions between the amino acid side chain and the cyclodextrin cavity. An extension of the hydrophilic moiety, which protrudes out of the cavity, as present with the examined dipeptides Ala-Phe and Ala-Tyr, leads to the possibility of developing hydrogen bonds with the hydroxyl groups at the wider rim of the cyclodextrin cavity and thus to a stronger binding to the cyclodextrin.

The stoichiometries of the complexes of the D and L enantiomers of phenylalanine and phenylglycine with α - and β -cyclodextrin (CD) and tyrosine and tryptophan with α -CD were determined by means of so-called "Job plots". Only tryptophan in combination with α -CD showed an actual occurrence of an inclusion complex, probably a mixture of 1:2

(amino acid: α -CD) stoichiometry and 1:1 stoichiometry. All other Job plots could not be analysed. Mass spectrometric investigations of a 1:1 mixture of L-phenylalanine and β -CD resulted in the occurrence of a 1:1 complex. Other complex stoichiometries were not observed. Moreover, the binding constants of the D and L enantiomers of phenylalanine, phenylglycine and tyrosine with α -CD were to be determined by UV spectroscopy, which did not lead to defined results.

Using CD spectroscopy, the binding constants of the inclusion complexes of the DD and LL enantiomers of the dipeptides Ala-Phe and Ala-Tyr with β -CD and HS- β -CD were determined. All binding constants found exhibit relatively high standard deviations, so that the enantiomers do not differ significantly from each other and, even worse, contradict in parts the binding phenomena found with other methods during the course of this work.

In order to understand the chiral recognition process of β -CD and some of its derivatives, i.e. HS- β -CD, Diac- β -CD and HDAS- β -CD, NMR experiments were accomplished, namely “complexation induced chemical shifts” (CICS); and the complex geometry was examined by means of ROESY experiments. Regarding the pairs of Diac- β -CD/Ala-Phe, HDAS- β -CD/Ala-Phe, Diac- β -CD/Ala-Tyr and HDAS- β -CD/Ala-Tyr, the CICS occurred to be relatively small and thus exhibit rather weak interactions of the respective guest molecule with the host. The CICS for β -CD- and HS- β -CD-dipeptide complexes confirmed an inclusion of the aromatic moiety into the cyclodextrin cavity. It could be shown that at pH 2.5 the DD enantiomer of Ala Tyr immerses more deeply into the β -CD cavity than the LL enantiomer. Additionally, the immersion into the cavity is shallower at pH 3.5 than at pH 2.5, which could be confirmed by the results of the ROESY experiments.

In order to receive a better view of the binding modes of the Ala-Phe and Ala-Tyr enantiomers with β -CD at different pH values, molecular dynamics simulations (MD simulations) were carried out. The simulations were accomplished with each Ala-Phe and Ala-Tyr enantiomer in each possible state of protonation, i.e. cation, zwitterion and anion. For the first time MD simulations for a larger series of different complexes of enantiomers in different states of protonation were implemented systematically during the long period of 1 ns (= 1000 ps).

The immersion depth of the examined dipeptide was computed with the help of a plane fit into the cyclodextrin cavity. In this way information about the different inclusion behaviour of the examined dipeptide could be received. The applied method can be transferred easily to other host-guest complexes and facilitates the data acquisition in other cases, too.

It could be shown that at pH 2.5, the DD enantiomer of Ala-Phe immerses more deeply into the β -cyclodextrin cavity than the LL enantiomer, whereas at pH 3.5, the reversal is the case. Regarding the dipeptide Ala-Tyr, at pH 2.5 the DD Enantiomer penetrates the cavity more deeply, whereas no clear statement about the penetration behaviour of the enantiomers can be made at pH 3.5. The CICS and the capillary electrophoresis results refer, however, to a deeper penetration of the cavity by the LL enantiomer.

In order to be able to examine the enantiomeric purity of the silicon- and germanium-containing α -amino acids of the formula type $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{SiR}_3)\text{COOH}$ and $\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_2\text{GeR}_3)\text{COOH}$ (R = organyl), which were synthesised within the course of the systematic investigations on bioorganosilicium and bioorganogermanium chemistry in the group of Tacke in Würzburg, a method was developed in order to separate the enantiomers of *tert.*-butylalanine as well as its germanyl and silyl analogues. The method for the separation and quantification of the enantiomers of *tert.*-butylalanine and its silyl and germanyl analogues resulted in a buffer consisting of 20 mM borate, pH 9.4, 100 mM SDS, 23 % methanol, 15 mM γ -cyclodextrin, detection at 254 nm (normal mode). The applied method is a MEKC method which results in resolution of the enantiomers in a range of 2.07 to 8.17.

10 Anhang

10.1 Publikationsverzeichnis

10.1.1 Posterpräsentationen

2001 GDCh-Jahrestagung in Würzburg

C. Kahle, U. Holzgrabe

Determination of binding constants of cyclodextrin-amino acid inclusion complexes

DPhG-Jahrestagung in Halle

C. Kahle, U. Holzgrabe, M. Merget, R. Tacke

Enantioseparation of sila- and germa-analogs of β -*tert*-butylalanine by capillary electrophoresis and determination of the binding constants of the corresponding cyclodextrin inclusion complexes

2002 HPCE-Tagung in Stockholm/Schweden

C. Kahle, F. Süß, U. Holzgrabe, G. K. E. Scriba

Studies on the chiral recognition of peptide enantiomers by neutral and sulfated β -cyclodextrin and heptakis-2,3-di-O-acetyl)- β -cyclodextrin using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance

DPhG-Jahrestagung in Berlin

C. Kahle, C. Schollmayer, G. K. E. Scriba, U. Holzgrabe

^1H NMR Studies on cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and small peptides

2003 DPhG-Jahrestagung in Würzburg

C. Kahle, R. Deubner, U. Holzgrabe

Studies on the chiral recognition of amino acid and dipeptide enantiomers by cyclodextrins using NMR spectroscopy

2004 HPCE-Tagung in Salzburg/Österreich

C. Kahle, F. Süß, G. K. E. Scriba, U. Holzgrabe

Studies on the chiral recognition of dipeptide enantiomers by neutral and sulfated β -cyclodextrin derivatives using capillary electrophoresis and NMR spectroscopy

International Symposium on Chirality in New York/USA

G. K. E. Scriba, F. Süß, C. Kahle, U. Holzgrabe

Complex formation and complex mobility as stereoselective principles in the separation of peptide enantiomers by capillary electrophoresis

10.1.2 Originalarbeiten

1. C. Kahle, U. Holzgrabe
Determination of binding constants of cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and dipeptides by potentiometric titration
Chirality 2004, 16, 509–515
2. C. Kahle, R. Deubner, C. Schollmayer, J. Scheiber, K. Baumann, U. Holzgrabe
NMR spectroscopic and molecular modelling studies on cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes
Eur. J. Org. Chem., im Druck

10.2 Lebenslauf

Zur Person

Name	Claudia Meier, geborene Kahle
Geburtsdatum	24.02.1975
Geburtsort	Göttingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

08/1981 – 08/1985	Grundschule Bovenden
08/1985 – 07/1987	Orientierungsstufe Bovenden
08/1987 – 08/1994	Theodor-Heuss-Gymnasium Göttingen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1994 – 09/1995	Georg-August-Universität Göttingen; Studiengang Chemie (Diplom)
10/1995 – 12/1999	Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Studiengang Lebensmittelchemie (Staatsexamen)
12/1999	1. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
01/2000 – 01/2004	Promotionsstudium am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg; wissenschaftliche Mitarbeiterin und Betreuerin des 1. Semesters Pharmazie

Beruflicher Hintergrund

02/2004 - 07/2004	Berufspraktische Ausbildung am bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen
07/2004	2. Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
09/2004	Nachweis der Befähigung als staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin

11 Literaturverzeichnis

¹ C. E. Mortimer

Chemie: das Basiswissen der Chemie, 5. Auflage

Thieme: Stuttgart, New York, 1987

² K. P. C. Vollhardt

Organische Chemie, 1. Auflage

Wiley-VCH: Weinheim, Basel, Cambridge, New York, 1990

³ C. Gerthsen

Physik: ein Lehrbuch zum Gebrauch neben Vorlesungen, 17. Auflage / bearbeitet von
Helmut Vogel

Springer: Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona,
Budapest, 1993

⁴ M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh

Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 5., Auflage

Thieme: Stuttgart, New York, 1995

⁵ H. R. Christen

Grundlagen der organischen Chemie, 6. Auflage

Salle - Sauerländer: Frankfurt am Main, 1985

⁶ A. A. Somogyi, F. Bochner, B. C. Sallustio

Stereoselective Inhibition of Pindolol Renal Clearance by Cimetidine in Humans

Clin. Pharmacol. Ther. 1992, 51, 379-387

⁷ C. Nordin, L. Bertilsson

Active Hydroxymetabolites of Antidepressants – Emphasis on E-10-Hydroxy-nortryptiline

Clin. Pharmacokinet. 1995, 28, 26-40

⁸ Y. Kwon, A. V. Kamath, M. E. Morris

Inhibitors of P-glycoprotein-mediated daunomycin transport in rat liver canalicular membrane vesicles

J. Pharm. Sci. 1996, 85, 935-939

⁹ D. N. Wheatley, J. Slater, E. M. Love, A. Miseta,

Chirality differences in amino acid retention and release from the acid-extractable pool of cultured mammalian cells

Int. J. Biochem. Cell Biol. 1996, 28, 1349-1364

¹⁰ E. Mutschler

Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2001

¹¹ E. J. Ariens

in: E. J. Ariens, W. Soudijn, P. B. M. W. M. Timmermans (Editors)

Stereochemistry and Biological Activity of Drugs

Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1983

¹² E. J. Ariens

Stereochemistry, a Basis for Sophisticated Nonsense in Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology

Eur. J. Clin. Pharmacol. 1984, 26, 663-668

¹³ E. J. Ariens

Racemic Therapeutics - Ethical and Regulatory Aspects

Eur. J. Clin. Pharmacol. 1991, 41, 89-93

¹⁴ E. J. Ariens

Nonchiral, Homochiral and Composite Chiral Drugs

TIPS 1993, 14, 68-75

¹⁵ U. Holzgrabe, G. Bejeuhr

Racemate – Ihre Bedeutung in der Arzneimitteltherapie

DAZ 1994, 134, 2133-2144

¹⁶ R. Crossley

The relevance of chirality to the study of biological activity

Tetrahedron 1992, 48, 8155-8178

¹⁷ F. Jamali, R. Mehvar, F. M. Pasutto

Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutic pitfalls

J. Pharm. Sci. 1989, 78, 695-715

¹⁸ FDA

FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs

Chirality 1992, 4, 338-340

¹⁹ M. A. Villiers

Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique

Comp. Rend. 1891, 112, 536-538

²⁰ F. Schardinger

Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Milch, sowie über einige Umsetzungsprodukte derselben in kohlehydrathaltigen Nährlösungen, darunter kristallisierte Polysaccharide (Dextrine) aus Stärke

Zeitschr. f. Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel 1903, 6, 865-880

²¹ F. Schardinger

Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrine) aus Stärkekleister durch Microbien

Centr. Bakt. Parasitenk. 1911, Abt. II, 29, 188-197

²² J. Szejtli

Chemistry, Physical, and Biological Properties of Cyclodextrins

in: J. Szejtli, T. Osa (Herausgeber)

Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volume 3: Cyclodextrins

Elsevier Science Ltd.: Oxford, 1996

²³ F. Vögtle

Supramolekulare Chemie: Eine Einführung

Teubner: Stuttgart, 1989

- ²⁴ J. Snopek, E. Smolková-Keulemansová, T. Cserhádi, K. H. Gahm, A. Stalcup
Cyclodextrins in Analytical Separation Methods
in: J. Szejtli, T. Osa (Herausgeber)
Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volume 3: Cyclodextrins
Elsevier Science Ltd.: Oxford, 1996
- ²⁵ M. Schleimer, V. Schurig
in: B. Wenclawiak
Analysis with Supercritical Fluids
Springer: Berlin, 1992
- ²⁶ C. M. White, R. K. Houck
Supercritical fluid chromatography and some of its applications – a review
J. High Res. Chromatogr. 1986, 9, 4-17
- ²⁷ R. M. Smith
Supercritical fluids in separation science - the dreams, the reality and the future
J. Chromatogr. A 1999, 856, 83-115
- ²⁸ J. Snopek, E. Smolková-Keulemansová
in: D. Duchene (ed.)
New Trends in Cyclodextrins and Derivatives
Editions de Santé: Paris, 1991
- ²⁹ H. Friebolin
Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung, 3. Auflage
Wiley-VCH: Weinheim, 1999
- ³⁰ U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl
NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis
Wiley-VCH: Weinheim, 1999
- ³¹ A. L. Lehninger
Prinzipien der Biochemie
de Gruyter: Berlin, New York, 1987

-
- ³² S. Ebel, H. J. Roth
Lexikon der Pharmazie
Thieme: Stuttgart, New York, 1987
- ³³ B. Hoppe, J. Martens
Aminosäuren - Bausteine des Lebens
Chemie in unserer Zeit 1983, 17, 41-53
- ³⁴ A. Kleemann, W. Leuchtenberger, B. Hoppe, H. Tanner
Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry, 5th Edition, Vol. A 2
Verlag Chemie: Weinheim, 1985
- ³⁵ B. Hoppe, J. Martens
Aminosäuren - Herstellung und Gewinnung
Chemie in unserer Zeit 1984, 18, 73-86
- ³⁶ M. Prudel, E. Davidkova
Determination of the decomposition products of Usal in model systems and determination of dioxopiperazine in soft drinks by HPLC
Nahrung 1985, 29, 381-389
- ³⁷ M. Prudel, E. Davidkova, J. Davidek, M. Kiminek
Kinetics of decomposition of aspartame hydrochloride (Usal) in aqueous solutions
J. Food Sci. 1986, 51, 1393-1415
- ³⁸ J. A. Stamp, T. P. Labuza
Mass spectrometric determination of aspartame decomposition products. Evidence for β -isomer formation in solution
Food Add. Cont. 1989, 6, 397-414
- ³⁹ M. F. Boehm, J. L. Bada
Racemization of aspartic acid and phenylalanine in the sweetener aspartame at 100° C
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1984, 81, 5263-5266

⁴⁰ S. M. Gaines, J. L. Bada

Aspartame decomposition and epimerization in the diketopiperazine and dipeptide products as a function of pH and temperature

J. Org. Chem. 1988, 53, 2757–2764

⁴¹ T. Geiger, S. Clarke

Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides – succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation

J. Biol. Chem. 1987, 262, 785-794

⁴² M. C. Manning, K. Patel, R. T. Borchardt

Stability of protein pharmaceuticals

Pharm. Res. 1989, 6, 903-918

⁴³ S. Sabah, G. K. E. Scriba

Resolution of aspartyl dipeptide and tripeptide stereoisomers by capillary electrophoresis

J. Microcolumn Separations 1998, 10, 255-258

⁴⁴ T. Schmitt, H. Engelhardt

Optimization of enantiomeric separations in capillary electrophoresis by reversal of the migration order and using different derivatized cyclodextrins

J. Chromatogr. A 1995, 697, 561-570

⁴⁵ M. E. Swartz, J. R. Mazzeo, E. R. Grover, P. R. Brown

Validation of enantiomeric separations by micellar electrokinetic capillary chromatography using synthetic chiral surfactants

J. Chromatogr. A 1996, 735, 303-310

⁴⁶ L. Liu, M. A. Nussbaum

Control of enantiomer migration order in capillary electrophoresis separations using sulfobutyl ether β -cyclodextrin

J. Pharm. Biomed. Anal. 1995, 14, 65-72

⁴⁷ S. Sabah, G. K. E. Scriba

Electrophoretic stereoisomer separation of aspartyl dipeptides and tripeptides in untreated fused-silica and polyacrylamide-coated capillaries using charged cyclodextrins

J. Chromatogr. A 1998, 822, 137-145

-
- ⁴⁸ J. Li, K. C. Waldron
Estimation of the pH-independent binding constants of alanylphenylalanine and leucyl-phenylalanine stereoisomers with β -cyclodextrin in the presence of urea
Electrophoresis 1999, 20, 171-179
- ⁴⁹ S. Sabah, G. K. E. Scriba
pH-Dependent reversal of the chiral recognition of tripeptide enantiomers by carboxymethyl- β -cyclodextrin
J. Chromatogr. A 1999, 833, 261-266
- ⁵⁰ S. Sabah, G. K. E. Scriba
Determination of aspartame and its degradation and epimerization products by capillary electrophoresis
J. Pharm. Biomed. Analysis 1998, 16, 1089-1096
- ⁵¹ S. Sabbah, G. K. E. Scriba
Influence of the structure of cyclodextrins and amino acid sequence of dipeptides and tripeptides on the pH-dependent reversal of the migration order in capillary electrophoresis
J. Chromatogr. A 2000, 894, 267-272
- ⁵² F. Süß, W. Poppitz, C. Sängler-van de Griend, G. K. E. Scriba
Influence of the amino acid sequence and nature of the cyclodextrin on the separation of small peptide enantiomers by capillary electrophoresis using randomly substituted and single isomer sulfated and sulfonated cyclodextrins
Electrophoresis 2001, 22, 2416-2423
- ⁵³ S. Sabbah, F. Süß, G. K. E. Scriba
pH-dependence of complexation constants and complex mobility in capillary electrophoresis separations of dipeptide enantiomers
Electrophoresis 2001, 22, 3163-3170
- ⁵⁴ N. Sidamonidze, F. Süß, W. Poppitz, G. K. E. Scriba
Influence of the amino acid sequence and nature of the cyclodextrin on the separation of small peptide enantiomers by capillary electrophoresis using α -, β -, and γ -cyclodextrin and the corresponding hydroxypropyl derivatives
J. Sep. Sci. 2001, 24, 777-783

⁵⁵ F. Süß, W. Poppitz, G. K. E. Scriba

Separation of dipeptide and tripeptide enantiomers in capillary electrophoresis by the cationic cyclodextrin derivative 2-hydroxypropyltrimethyl-ammonium- β -cyclodextrin and by neutral β -cyclodextrin derivatives at alkaline pH

J. Sep. Sci. 2002, 25, 1147-1154

⁵⁶ F. Süß, C. Kahle, U. Holzgrabe, G. K. E. Scriba

Studies on the chiral recognition of peptide enantiomers by neutral and sulfated β -cyclodextrin and heptakis-(2,3-di-O-acetyl)- β -cyclodextrin using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance

Electrophoresis 2002, 23, 1301–1307

⁵⁷ G. Schwedt

Taschenatlas der Analytik

Wiley-VCH: Weinheim, 1996

⁵⁸ K. Schwabe

Physikalische Chemie, Band 2: Elektrochemie

Akademie-Verlag: Berlin, 1974

⁵⁹ J. Strähle, E. Schweda

Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum (einschließlich der quantitativen Analyse)/Jander; Blasius. 13., neu bearbeitete Auflage

Hirzel Verlag: Stuttgart, 1990

⁶⁰ A. Avdeef, J. Bucher

Accurate Measurements of the Concentration of Hydrogen Ions with a Glass Electrode: Calibrations Using the Prideaux and Other Universal Buffer Solutions and a Computer-Controlled Automatic Titrator

J. Anal. Chem. 1978, 50, 2137-2142

⁶¹ L. G. Van Uitert, C. G. Haas

Studies on coordination compounds. I. A method for determining thermodynamic equilibrium constants in mixed solvents

J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 451-455

⁶² J. Szejtli

Inclusion of guest molecules, selectivity and molecular recognition by cyclodextrins

in: J. Szejtli, T. Osa (Herausgeber)

Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volume 3: Cyclodextrins

Elsevier Science Ltd.: Oxford, 1996

⁶³ K. A. Connors, J. M. Lipari

Effect of cycloamyloses on apparent dissociation constants of carboxylic acids and phenols
- equilibrium analytical selectivity induced by complex formation

J. Pharm. Sci. 1976, 65, 379-383

⁶⁴ H. A. Benesi, J. H. Hildebrand

A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic
Hydrocarbons

J. Am. Chem. Soc. 1949, 71, 2703-2707

⁶⁵ Microsoft Excel-Hilfe zu Microsoft® Excel 2002

The Microsoft Corporation: Redmond, WA, USA

⁶⁶ H.-J. Bartsch

Mathematische Formeln, 16. Auflage

Fachbuchverlag GmbH: Leipzig, 1992

⁶⁷ A. Avdeef, J. E. A. Comer, S. J. Thomson

pH-metric logP. 3. Glass electrode calibration in methanol-water, applied to pKa determination of water-insoluble substances

Anal. Chem. 1993, 65, 42-49

⁶⁸ M. Bodanszky, A. Bodanszky

In: The Practice of Peptide Synthesis, 2nd ed.

Springer Verlag: Berlin, 1994

⁶⁹ Y. Liu, A. Qi, B. Han, Y. Li, Y. Zhang, R. Chen

Molecular recognition study on supramolecular system. 7. Chiral recognition of amino acids with alpha-cyclodextrin using competitive inclusion method

Chinese Sci. Bull. 1997, 42, 1189-1192

- ⁷⁰ G. Castronuovo, V. Elia, D. Fessas, A. Giordano, F. Velleca
Thermodynamics of the interaction of cyclodextrins with aromatic and α,ω -amino acids in aqueous solutions - a calorimetric study at 25 degrees C
Carbohydrate Res. 1995, 272, 31-39
- ⁷¹ E. A. Lewis, L. D. Hansen
Thermodynamics of binding of guest molecules to alpha-cyclodextrins and beta-cyclodextrins
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 1973, 2081-2085
- ⁷² S. Chokchainarong, O. Fennema, K. A. Connors
Binding constants for complexes of alpha-cyclodextrin with L-phenylalanine and some related substrates
Carbohydrate Res. 1992, 232, 161-168
- ⁷³ A. Cooper, D. D. MacNicol
Chiral host-guest complexes - interaction of alpha-cyclodextrin with optically active benzene derivatives
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 1978, 760-763
- ⁷⁴ Y. Inoue, F.-H. Kuan, R. Chûjô
H-1 NMR and C-13 NMR-studies of formation and molecular dynamics of methylated cyclodextrin inclusion complexes with phenylalanine
Bull. Chem. Soc. Jpn. 1987, 60, 2539-2545
- ⁷⁵ A. Kumar, A. Maitra
Suppression of residual hydrophobicity of amphiphilic amino acids by forming association complexes with beta-cyclodextrin
J. Indian Chem. Soc. 1996, 73, 516-519
- ⁷⁶ T. Loftsson, M. Másson, M. E. Brewster
Self-Association of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes
J. Pharm. Sci. 2004, 93, 1091-1099

-
- ⁷⁷ P. Camilleri, N. J Haskins, A. P. New, M. R. Saunders
Analyzing the complexation of amino acids and peptides with beta-cyclodextrin using electrospray-ionization mass-spectrometry
Rapid. Commun. Mass. Sp. 1993, 7, 949-952
- ⁷⁸ R. Ramanathan, L. Prokai
Electrospray-ionization mass-spectrometric study of encapsulation of amino acids by cyclodextrins
J. Am. Soc. Mass. Spectr. 1995, 6, 866-871
- ⁷⁹ P. D. Ross, M. V. Rekharsky
Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes
Biophys. J. 1996, 71, 2144-2154
- ⁸⁰ C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman
Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic and Steric Constants, Volume 2
Washington, DC: American Chemical Society; 1995
- ⁸¹ M. T. Butterfield, R. A. Agbaria, I. M. Warner
Extraction of volatile PAHs from air by use of solid cyclodextrin
Anal. Chem. 1996, 68, 1187-1190
- ⁸² J. Nishijo, M. Tsuchitani
Interaction of L-tryptophan with alpha-cyclodextrin: Studies with calorimetry and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy
J. Pharm. Sci. 2001, 90, 134-140
- ⁸³ S. Fanali, C. Desiderio, E. Olvecka, D. Kaniansky, M. Vojtek, A. Ferancova
Separation of enantiomers by on-line capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis
J. High. Resol. Chromatogr. 2000, 23, 531-538
- ⁸⁴ P. Dzygiel, P. Wieczorek, J. A. Jonsson
Enantiomeric separation of amino acids by capillary electrophoresis with alpha-cyclodextrin
J. Chromatogr. A 1998, 793, 414-418

- ⁸⁵ K. D. Altria, P. Harkin, M. G. Hindson
Quantitative determination of tryptophan enantiomers by capillary electrophoresis
J. Chromatogr. B 1996, 686, 103-110
- ⁸⁶ N. H. H. Heegard, M. H. Nissen, D. D. Y. Chen
Applications of on-line weak affinity interactions in free solution capillary electrophoresis
Electrophoresis 2002, 23, 815-822
- ⁸⁷ B. Chankvetadze
Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors
J. Chromatogr. A 1997, 792, 269-295
- ⁸⁸ B. Chankvetadze, G. Blaschke
Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends
J. Chromatogr. A 2001, 906, 309-363
- ⁸⁹ G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems
Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2001
- ⁹⁰ K. A. Connors
Measurement of Cyclodextrin complex stability constants
in: J. Szejtli, T. Osa (Herausgeber)
Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volume 3: Cyclodextrins
Elsevier Science Ltd.: Oxford, 1996
- ⁹¹ K. A. Connors
Binding constants: the measurement of molecular complex stability
Wiley: New York u.a., 1987.
- ⁹² G. Scatchard
The attractions of proteins for small molecules and ions
Ann. NY Acad. Sci. 1949, 51, 660-672

⁹³ R. L. Scott

Some comments on the Benesi-Hildebrand equation

Recl. Trav. Chim. Pay-B 1956, 75, 787-789

⁹⁴ S. Li, W. C. Purdy

Circular dichroism, ultraviolet, and proton nuclear magnetic resonance spectroscopic studies of the chiral recognition mechanism of β -cyclodextrin

Anal. Chem. 1992, 64, 1405-1412

⁹⁵ P. Job

Recherches sur la formation des complexes minéraux en solution, et sur leur stabilité

Ann. Chim. 1928, 9, 113-134

⁹⁶ F. Woldbye

On the method of continuous variations

Acta Chem. Scand. 1955, 9, 299-309

⁹⁷ T. W. Gilbert

Determination of association equilibria by the method of continuous variations

J. Phys. Chem. 1959, 63, 1788-1789

⁹⁸ W. Likussar, D. F. Boltz

Theory of continuous variations plots and a new method for spectrophotometric determination of extraction and formation constants

Anal. Chem. 1971, 43, 1265-1272

⁹⁹ V. M. S. Gil, N. C. Oliveira

On the use of the method of continuous variations

J. Chem. Educ. 1990, 67, 473-478

¹⁰⁰ C. Kahle, U. Holzgrabe

Determination of binding constants of cyclodextrin inclusion complexes with amino acids and dipeptides by potentiometric titration

Chirality 2004, 16, 509-515

¹⁰¹ C. Kahle, R. Deubner, C. Schollmayer, J. Scheiber, K. Baumann, U. Holzgrabe
NMR spectroscopic and molecular modelling studies on cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes

Eur. J. Org. Chem., in press

¹⁰² Y. L. Loukas

Evaluation of the methods for the determination of the stability constant of cyclodextrin-chloroambucil inclusion complexes

J. Pharm. Biomed. Anal. 1997, 16, 275-280

¹⁰³ John G. Foss

Absorption, dispersion, circular dichroism, and rotary dispersion

J. Chem. Educ. 1963, 40, 592-597

¹⁰⁴ A. Moscovitz

Some applications of the Kronig-Kramers theorem to optical activity

Tetrahedron 1961, 13, 48-56

¹⁰⁵ F. Süß, C. E. Sänger-van de Griend, G. K. E. Scriba

Migration order of dipeptide and tripeptide enantiomers in the presence of single isomer and randomly sulfated cyclodextrins as a function of pH

Electrophoresis 2003, 24, 1069-1076

¹⁰⁶ J. B. Cunniff, P. Vouros

False positives and the detection of cyclodextrin inclusion complexes by electrospray mass spectrometry

J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995, 6, 437-447

¹⁰⁷ H. J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda

NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes

Chem. Rev. 1998, 98, 1755-1785

¹⁰⁸ R. G. Hart

The relation of apparent to true pH in deuterium solutions

Natl. Research Council Can., Atomic Energy Project N.R.C., Report # CRE-423, 1949

-
- ¹⁰⁹ R. B. Fischer, R. A. Potter
US Atomic Energy Commission Report (MDDC-715) ADD (7), 1, 458, 1947
- ¹¹⁰ R. Lumry, E. L. Smith, R. R. Glantz
Kinetics of Carboxypeptidase Action. I. Effect of Various Extrinsic Factors on Kinetic Parameters
J Am. Chem. Soc. 1951, 73, 4330-4340
- ¹¹¹ K. Mikkelsen, S. O. Nielsen
Acidity Measurements with the Glass Electrode in H₂O-D₂O Mixtures
J. Phys. Chem. 1960, 64, 632-637
- ¹¹² T. H. Fife, T. C. Bruice
The Temperature Dependence of the ΔpD Correction for the Use of the Glass Electrode in D₂O
J. Phys. Chem. 1961, 65, 1079-1080
- ¹¹³ P. K. Glasoe, F. A. Long
Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide
J. Phys. Chem. 1960, 64, 188-190
- ¹¹⁴ E. A. Guggenheim
Conceptions of electric potential differences between two phases and the individual activities of ions
J. Phys. Chem. 1929, 33, 842-849
- ¹¹⁵ W. E. Nelson, J. A. V. Butler
Experiments with heavy water on the acid hydrolysis of esters and the alkaline decomposition of diacetone alcohol
J. Chem. Soc. 1938 957-962
- ¹¹⁶ E. L. Purlee
On the Solvent Isotope Effect of Deuterium in Aqueous Acid Solutions
J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 263-272

¹¹⁷ T. W. Claridge

High-resolution NMR techniques in organic chemistry

Elsevier Science Ltd: Kidlington, Oxford, 1999

¹¹⁸ I. D. Campbell, C. M. Dobson, G. Jeminet, R. J. Williams

Pulsed NMR methods for observation and assignment of exchangeable hydrogens – application to bacitracin

FEBS Lett. 1974, 49, 115-119

¹¹⁹ D. I. Hoult

Solvent peak saturation with single phase and quadrature Fourier transformation

J. Magn. Reson. 1976, 21, 337-347

¹²⁰ A. Bax

A spatially selective composite 90-degree radiofrequency pulse

J. Magn. Reson. 1985, 65, 142-145

¹²¹ M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar

Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR-spectroscopy of aqueous solutions

J. Biomol. NMR 1992, 2, 661 - 666

¹²² V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik, V. Saudek

Gradient-tailored water suppression for H-1-N-15 HSQC experiments optimized to retain full sensitivity

J. Magn. Reson., Series A 1993, 102, 241 -245

¹²³ M. Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J. K. Nicholson, J. C. Lindon

Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy

J. Magn. Reson. 1998, 132, 125 – 129

¹²⁴ G. S. H. Lee, M. A. Wilson, B. R. Young

The application of the "WATERGATE" suppression technique for analyzing humic substances by nuclear magnetic resonance

Org. Geochem. 1998, 28, 549-559

-
- ¹²⁵ A. Zaks, A. Klibanov
Enzyme-catalyzed processes in organic solvents
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985, 82, 3192–3196
- ¹²⁶ H. R. Costantino, K. Griebenow, R. Langer, A. M. Klibanov
On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups
Biotechnol. Bioeng. 1997, 53, 345-348
- ¹²⁷ S. A. Ross, G. Lowe
Downfield displacement of the NMR signal of water in deuterated dimethylsulfoxide by the addition of deuterated trifluoroacetic acid
Tetrahedron Lett. 2000, 41, 3225–3227
- ¹²⁸ Z. Z. Li, Q. X. Guo, T. Ren, X. Q. Zhu, Y. C. Liu
Can TMS and DSS be used as NMR references for cyclodextrin species in aqueous solution
J. Incl. Phenom. Mol. Recogn. Chem. 1993, 15, 37-42
- ¹²⁹ Y. Matsui, S. Tokunaga
Internal reference compounds available for the determination of binding constants for cyclodextrin complexes by H-1 NMR spectrometry
Bull. Chem. Soc. Jpn. 1996, 69, 2477-2480
- ¹³⁰ J. Ahmed, T. Yamamoto, Y. Matsui
Determination of binding constants for cyclodextrin complexes with alkanols by the H-1 NMR measurements of longitudinal relaxation time using tetramethylammonium chloride as an internal reference
J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2000, 38, 267-276
- ¹³¹ N. Funasaki, S. Ishikawa, S. Neya
NMR chemical shift methods for binding constant determination of an organic anion and α -cyclodextrin
Bull. Chem. Soc. Jpn. 2002, 75, 719-723

- ¹³² S. K. Branch, U. Holzgrabe, T.M. Jefferies, H. Mallwitz, M. Matchett
Chiral discrimination of phenethylamines with β -cyclodextrin and heptakis(2,3-di-O-acetyl) β -cyclodextrin by capillary electrophoresis and NMR spectroscopy
J. Pharm. Biomed. Anal. 1994, 12, 1507-1517
- ¹³³ E. Fukushima, S. B. Roeder
Experimental pulse NMR
Addison-Wesley: Reading, Mass., USA, 1996
- ¹³⁴ A. Bax, D.G. Davis
Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy
J. Magn. Reson 1985, 63, 207-213
- ¹³⁵ U. Holzgrabe, H. Mallwitz, S. K. Branch, T. M. Jefferies, M. Wiese
Chiral discrimination by NMR spectroscopy of ephedrine and N-methylephedrine induced by β -cyclodextrin, heptakis(2,3-di-O-Acetyl) β -cyclodextrin, and heptakis(6-O-acetyl) β -cyclodextrin
Chirality 1997, 9, 211–219
- ¹³⁶ C. Kahle, B. Waibel, J. Scheiber, U. Holzgrabe, G. K. E. Scriba
unpublished results
- ¹³⁷ T. Carofiglio, R. Fornasier, L. Jicsinszky, G. Saielli, U. Tonellato, R. Vetta
Capillary electrophoresis, ROESY NMR and molecular modelling study of the inclusion complex β -cyclodextrin/lipoic acid
Eur. J. Org. Chem. 2002, 1191-1196
- ¹³⁸ C. L. Probst, T. J. Perun
Introduction to computer-aided drug design
in: Computer-aided drug design: methods and applications
edited by T. J. Perun, C. L. Probst
Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, 1989

-
- ¹³⁹ T. J. O'Donnell
Uses of computer graphics in computer-assisted drug design
in: Computer-aided drug design: methods and applications
edited by T. J. Perun, C. L. Probst
Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, 1989
- ¹⁴⁰ F. H. Allen
The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising
Acta Crystallogr. B 2002, 58, 380-388
- ¹⁴¹ H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne
The Protein Data Bank
Nucleic Acids Res. 2000, 28, 235-242
- ¹⁴² Beilstein Database: Copyright © 1988-2005
Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften, Frankfurt a. M.
- ¹⁴³ C. Jochum
The Beilstein Information System is not a Reaction Database, or is it?
J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1994, 34, 71-73
- ¹⁴⁴ G. Wiggins
Caught in a CrossFire: Academic Libraries and Beilstein
J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1996, 36, 764-769
- ¹⁴⁵ S. K. Burt, D. Mackay, A. T. Hagler
Theoretical aspects of drug design: Molecular mechanics and molecular dynamics
in: Computer-aided drug design: methods and applications
edited by T. J. Perun, C. L. Probst
Marcel Dekker Inc.: New York, Basel, 1989
- ¹⁴⁶ P. A. Cundall, O. D. L. Strack
Discrete numerical-model for granular assemblies
Geotechnique 1979, 29, 47-65

¹⁴⁷ K. B. Lipkowitz

Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins

Chem. Rev. 1998, 98, 1829-1873

¹⁴⁸ G. Fronza, A. Mele, E. Redenti, P. Ventura

H-1 NMR and molecular modeling study on the inclusion complex beta-cyclodextrin indomethacin

J. Org. Chem. 1996, 61, 909-914

¹⁴⁹ H. Aki, T. Niiya, Y. Iwase, Y. Kawasaki, K. Kumai, T. Kimura

Multimodal inclusion complexes of ampicillin with beta-cyclodextrins in aqueous solution

Thermochim. Acta 2004, 416, 87-92

¹⁵⁰ K. B. Lipkowitz, C. M. Stoehr

Detailed experimental and theoretical analysis of chiral discrimination: Enantioselective binding of R/S methyl mandelate by beta-cyclodextrin

Chirality 1996, 8, 341-350

¹⁵¹ M. Ivanov, D. Salvatierra, C. Jaime

Experimental (NMR) and computational (MD) studies on the inclusion complexes of 1-bromoadamantane with alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrin

J. Org. Chem. 1996, 61, 7012-7017

¹⁵² H. Dodziuk, A. Ejchart, O. Lukin, M. O. Vysotsky

H-1 and C-13 NMR and molecular dynamics study of chiral recognition of camphor enantiomers by alpha-cyclodextrin

J. Org. Chem. 1999, 64, 1503-1507

¹⁵³ J. Varady, X. W. Wu, S. M. Wang

Competitive and reversible binding of a guest molecule to its host in aqueous solution through molecular dynamics simulation: Benzyl alcohol/beta-cyclodextrin system

J. Phys. Chem. B 2002, 106, 4863-4872

¹⁵⁴ P. Franchi, M. Lucarini, E. Mezzina, G. F. Pedulli

Combining magnetic resonance spectroscopies, mass spectrometry, and molecular dynamics: Investigation of chiral recognition by 2,6-di-O-methyl-beta-cyclodextrin

J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 4343-4354

-
- ¹⁵⁵ Y. Ikeda, S. Motoune, T. Matsuoka, H. Arima, F. Hirayama, K. Uekama
Inclusion Complex Formation of Captopril with α - and β -Cyclodextrins in Aqueous
Solution: NMR Spectroscopic and Molecular Dynamic Studies
J. Pharm. Sci. 2002, 91, 2390–2398
- ¹⁵⁶ A. Mele, G. Raffaini, F. Ganazzoli, A. Selva
 β -Cyclodextrin and 5-Methoxytryptammonium Ion Host-Guest Association *in vacuo*:
Simulation of Non-Covalent Inclusion by Molecular Dynamics
J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 2002, 44, 219–223
- ¹⁵⁷ http://www.accelrys.com/dstudio/ds_viewer/
Accelrys, San Diego, CA, USA
- ¹⁵⁸ <http://www.tripos.com/sciTech/inSilicoDisc/moleculeModeling/sybase.html>
Tripos, St.Louis, MO, USA
- ¹⁵⁹ J. M. Alexander, J. L. Clark, T. J. Brett, J. J. Stezowski
Chiral discrimination in cyclodextrin complexes of amino acid derivatives: beta-
cyclodextrin/N-acetyl-L-phenylalanine and N-acetyl-D-phenylalanine complexes
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 2002, 99, 5115-5120
- ¹⁶⁰ <http://openbabel.sourceforge.net/>
- ¹⁶¹ A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli
VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on
Windows-based PCs
J. Mol. Graph. 2002, 21, 47-49
- ¹⁶² A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli
VEGA - An open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in
architecture and script programming
J. Comput. Aided Mol. Des. 2004, 18, 167-173
- ¹⁶³ <http://www.ddl.unimi.it>

¹⁶⁴ L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, K. Schulten
NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics
J. Comput. Phys. 1999, 151, 283-312

¹⁶⁵ <http://www.ks.uiuc.edu/Research/NAMD>

¹⁶⁶ B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus
CHARMM – a Program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations
J. Comput. Chem. 1983, 4, 187-217

¹⁶⁷ The Mathworks Inc., Natick, MA, USA

¹⁶⁸ <http://www.ks.uiuc.edu/Development/MDTools/matdcd/>

¹⁶⁹ H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt
Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten
Vieweg: Braunschweig, Wiesbaden, 1994

¹⁷⁰ G. Bruin, G. Stegeman, A. van Asten, X. Xu, J. Kraak, H. Poppe
Optimization and evaluation of the performance of arrangements for UV detection in high-resolution separations using fused-silica capillaries
J. Chromatogr. 1991, 559, 163-181

¹⁷¹ A. W. Adamson
Physical Chemistry of Surfaces (4th Ed.)
Wiley & Son: New York, 1982

¹⁷² J. Vindevogel, P. Sandra
in: Chromatographic Methods, Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography
Hüthig: Heidelberg, 1992

¹⁷³ T. Schmitt, H. Engelhardt
Derivatized cyclodextrins for the separation of enantiomers in capillary electrophoresis
HRC 1993, 16, 525-529

-
- ¹⁷⁴ B. Chankvetadze
Enantiomer migration order in chiral capillary electrophoresis
Electrophoresis 2002, 23, 4022–4035
- ¹⁷⁵ A. Giannis, T. Kolter
Peptidomimetics for Receptor Ligands - Discovery, Development, and Medical Perspectives
Angew. Chem. 1993, 105, 1303-1326
- ¹⁷⁶ J. Gante
Peptidomimetics - tailored enzyme inhibitors
Angew. Chem. 1994, 106, 1780-1802
- ¹⁷⁷ H. Ishida, Y. Inoue
Peptides that contain unnatural amino acids: Toward artificial proteins
Rev. Heteroat. Chem. 1999, 19, 79-142
- ¹⁷⁸ Handmann, V. I.; Merget, M.; Tacke, R.
Sila-substitution of the alpha-amino acid proline: Synthesis of *rac*- and (R)-4,4-dimethyl-4-sila-proline ethyl ester
Z. Naturforsch. 2000, 55b, 133-138
- ¹⁷⁹ R. Tacke, M. Merget, R. Bertermann, M. Bernd, T. Beckers, T. Reissmann
Syntheses and Properties of Silicon- and Germanium-Containing α -Amino Acids and Peptides: A Study on C/Si/Ge Bioisosterism
Organometallics 2000, 19, 3486-3497
- ¹⁸⁰ M. Merget, K. Günther, M. Bernd, E. Günther, R. Tacke
Syntheses of racemic and non-racemic silicon- and germanium-containing α -amino acids of the formula type $H_2NCH(CH_2ElR_3)COOH$ (El=Si, Ge; R = organyl) and incorporation of D- $H_2NCH(CH_2SiMe_3)COOH$ and D- $H_2NCH(CH_2GeMe_3)COOH$ into biologically active decapeptides: a study on C/Si/Ge bioisosterism
J. Organomet. Chem. 2001, 628, 183–194

- ¹⁸¹ R. Tacke, V. I. Handmann
Derivatives of β -(Trimethylsilyl)alanine with SiCH₂NH₂, SiCH₂OH, or SiCH₂SH Functionality: Synthesis of the Silicon-Containing α -Amino Acids *rac*- and (R)-Me₂Si(CH₂R)CH₂CH(NH₂)COOH (R = NH₂, OH, SH)
Organometallics 2002, 21, 2619-2626
- ¹⁸² H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt
Capillary electrophoresis - methods and scope
Angew. Chem. 1993, 105, 659-679
- ¹⁸³ E. Rudzińska, Piotr Wieczorek, P. Kafarski
Separation of aminoalkanephosphonic acid enantiomers by indirect UV detection capillary electrophoresis with application of cyclodextrins
Electrophoresis 2003, 24, 2693–2697
- ¹⁸⁴ P. Doble, M. Macka, P. Andersson, P. R. Haddad
Buffered chromate electrolytes for separation and indirect absorbance detection of inorganic anions in capillary electrophoresis
Anal. Commun. 1997, 34, 351-353
- ¹⁸⁵ P. Doble, P. R. Haddad
Indirect photometric detection of anions in capillary electrophoresis
J. Chromatogr. A 1999, 834, 189-212
- ¹⁸⁶ P. Doble, M. Macka, P. R. Haddad
Design of background electrolytes for indirect detection of anions by capillary electrophoresis
Trac-Trends Anal. Chem. 2000, 19, 10-17
- ¹⁸⁷ F. Foret, S. Fanali, A. Nardi, P. Bocek
Capillary zone electrophoresis of rare-earth-metals with indirect UV absorbency detection
Electrophoresis 1990, 11, 780-783
- ¹⁸⁸ L. K. Goebel, H. M. McNair, H. T. Rasmussen, B. P. McPherson
Separation of ethoxylated alcohol sulfates by capillary electrophoresis using indirect UV detection
J. Microcol. Sep. 1993, 5, 47-50

¹⁸⁹ M. M. Rhemrev-Boom

Determination of anions with capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection
J. Chromatogr. A 1994, 680, 675-684

¹⁹⁰ C. A. Lucy, T. L. McDonald

Separation of Chloride Isotopes by Capillary Electrophoresis Based on the Isotope Effect on Ion Mobility

Anal. Chem. 1995, 67, 1074-1078

¹⁹¹ C. Stathakis, R. M. Cassidy

Control of relative migration of small inorganic and organic anions with cyclodextrins in capillary electrophoresis (CE)

Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim. 1998, 76, 194-198

¹⁹² M. Suzuki, K. Ito, C. Fushimi, T. Kondo

A study of cyclodextrin complex formation by a freezing point depression method

Chem. Pharm. Bull. 1993, 41, 942-945

¹⁹³ T. Steiner, G. Koellner, K. Gessler, W. Saenger

Isostructural replacement of an N-H \cdots O by a C-H \cdots O hydrogen bond in complex stabilisation: crystal structures of β -cyclodextrin complexed with diethanolamine and with pentane-1,5-diol

Chem. Commun. 1995, 511-512