





**Untersuchung des Verunreinigungsprofils von Aminosäuren  
aus fermentativer Herstellung mittels Kapillarelektrophorese**

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

vorgelegt von  
Nikolai Novatchev  
aus Sofia

Würzburg 2002

Eingereicht am:.....

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 jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die hervorragende Möglichkeit zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten in ihrem Arbeitskreis danken.

Dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen Kollegen des Arbeitskreises, besonders bei meinen Laborkollegen Stefanie Laug, Maïke Wedig und Frank Wienen, für das mehr als angenehme Arbeitsklima bedanken.



*Meiner Familie, Maya und Vladi*



## Inhaltsverzeichnis

1. Aminosäuren	1
1.1. Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften	1
1.2. Herstellung und Gewinnung von Aminosäuren	9
1.2.1. Synthetische Verfahren	9
1.2.1.1. Malonester-Synthese	9
1.2.1.2. Strecker-Synthese	10
1.2.1.3. Erlenmeyer-Synthese	11
1.2.1.4. Racematspaltung	11
1.2.2. Enzymatische Methoden	12
1.2.3. Hydrolytische Verfahren	12
1.2.4. Fermentation	13
1.2.4.1. Glutaminsäure	14
1.2.4.2. Lysin	16
1.2.4.3. Threonin	16
1.2.4.4. Isoleucin	17
1.2.4.5. Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan	17
2. Aminosäureanalytik- Bestandsaufnahme und Problemstellung	18
2.1. Dünnschichtchromatographie	20
2.1.1. Stationäre Phase	20
2.1.2. Fließmittel	21
2.1.3. Detektion	21
2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie	23
2.2.1. Isokratische Trennung und Gradientenelution	24
2.2.2. Ionen-, Reversed Phase- und chirale Hochdruckflüssigchromatographie	25
2.2.3. Derivatisierung	27
2.3. Kapillarelektrophorese	28
2.3.1. Detektion	33
2.3.1.1. UV-Detektion	33
2.3.1.2. Elektrochemische Detektion	35
2.3.1.3. Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF-Detektion)	35
2.3.1.4. Reagenzien zur Derivatisierung der Kohlenhydrate	44

3. Aminosäure-Derivate mit Fluoresceinisothiocyanat und 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol	47
4. Aminosäure-Derivate mit 9-Fluorenylmethylchloroformat	48
4.1. Optimierung der Derivatisierungsreaktion	48
4.2. Optimierung des Trennpuffers	51
4.3. Optimierung der Injektionsbedingungen	55
4.4. Validierung der Methode	58
5. Derivatisierung mit 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd	65
5.1. Optimierung der Derivatisierungsreaktion	65
5.2. Kapillarelektrophorese	72
5.3. Validierung der Methode	80
6. Nucleinsäuren	86
6.1. UV-Spektroskopie	86
6.2. Kapillarelektrophorese	97
7. Glutathion	110
8. Zusammenfassung	118
8. Summary	127
9. Experimenteller Teil	135
9.1. Allgemeine Angaben	135
9.2. Micellare elektrokinetische Chromatographie von Aminosäuren als 9-Fluorenylmethylchloroformat-Derivate	135
9.3. Micellare elektrokinetische Chromatographie von Aminosäuren als 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd -Derivate	136
9.4. UV-Spektroskopie	137
9.5. Kapillargelelektrophoretische Untersuchungen	138
9.6. Glutathion	139

10. Abkürzungen und Symbole	141
11. Literaturverzeichnis	144



## 1. Aminosäuren

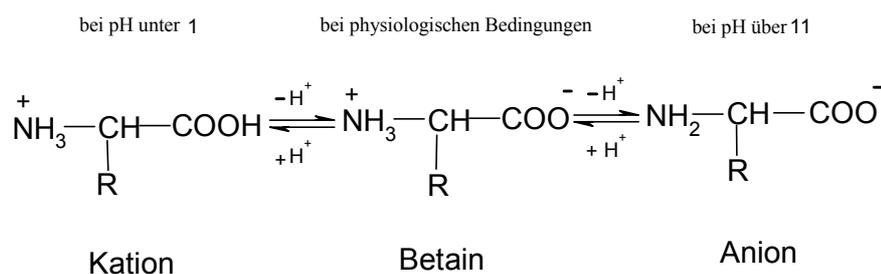
### 1.1. Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften

Seit mindestens drei Milliarden Jahren existieren die Aminosäuren auf der Erde [1]. Die in einer fast unüberschaubaren Vielzahl in der Natur auftretenden Proteine setzen sich aus einer relativ kleinen Zahl von Basisbausteinen zusammen, den  $\alpha$ -Aminosäuren. Darüber hinaus erfüllen die Aminosäuren Regulationsfunktionen im Metabolismus und werden für die Biosynthese anderer funktionaler Strukturen benötigt [2]. Die als Proteinbestandteil natürlich vorkommenden Aminosäuren scheinen während der Evolution von den Bakterien bis zum Menschen in ihrer Art und Anzahl unverändert geblieben zu sein. Sie haben alle ein gemeinsames Strukturmerkmal. Es handelt sich um  $\alpha$ -Aminocarbonsäuren, die sich nur durch den Rest  $R$  der Seitenkette voneinander unterscheiden.

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, und zum anderen die nicht-essentiellen Aminosäuren, die im Körper meist über wenige Stufen aus  $\alpha$ -Ketocarbonsäuren durch Transaminierung synthetisiert werden [3]. 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 sogenannten essentiellen Aminosäuren, da der Intermediärstoffwechsel noch nicht genügend ausgebildet ist, um diese Aminosäuren selbst zu synthetisieren [3,4].

Unter physiologischen Bedingungen liegen die Aminosäuren als innere Salze (Betaine) mit einer Carboxylat- und einer Ammonium-Funktion im gleichen Molekül vor (Siehe Abb.1-1).

Abb.1-1: Betainstruktur der Aminosäuren



Die polare Struktur der Aminosäuren ist verantwortlich für ihre Wasserlöslichkeit, die allerdings bei den einzelnen Aminosäuren sehr unterschiedlich ist. Aufgrund dieser zwitterionischen Struktur treten starke intermolekulare Kräfte auf. Diese sind auch für die teilweise geringe Wasserlöslichkeit einiger Aminosäuren verantwortlich. Bei dem pH-Wert, bei dem eine Aminosäure vollständig als Zwitterion vorliegt, am sogenannten isoelektrischen Punkt (IEP), weisen sie die geringste Löslichkeit auf.

In wässriger Lösungen unterliegen die Aminosäuren also einer pH-abhängigen Dissoziation.

Abb. 1-2: Dissoziationskonstanten der Aminosäuren

$$K_1 = \frac{[H^+] \times [H_3N^+ - CHR - COO^-]}{[H_3N^+ - CHR - COOH]} \quad K_2 = \frac{[H^+] \times [H_2N - CHR - COO^-]}{[H_3N^+ - CHR - COO^-]}$$

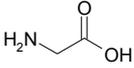
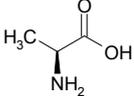
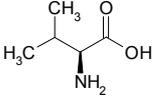
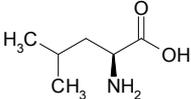
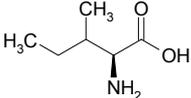
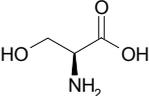
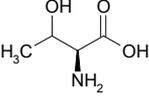
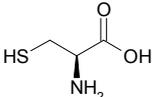
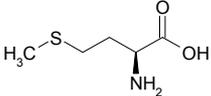
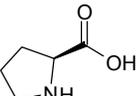
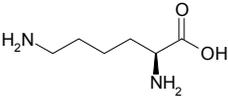
$K_1$  und  $K_2$  sind die charakteristischen Dissoziationskonstanten der Aminosäuren, die meist als pK-Werte ( $pK = -\log K$ ) ausgedrückt werden (Abb. 1-2). Der Rest R hat Einfluss auf die Dissoziationskonstanten [1].

Außer Glycin ( $R=H$ ) besitzen sämtliche aus Eiweiß isolierten  $\alpha$ -Aminosäuren mindestens ein asymmetrischsubstituiertes Kohlenstoffatom und können in Bild- und Spiegelbildform vorkommen. Sie gehören ohne Ausnahme der L-Reihe an und sind optisch aktiv.

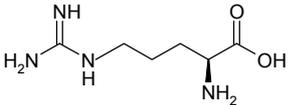
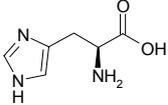
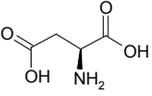
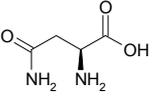
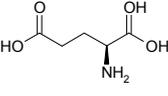
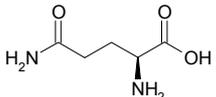
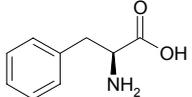
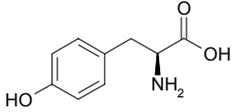
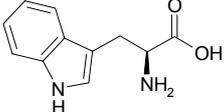
In der anschließenden Tabelle 1 befinden sich die Strukturformeln, die Symbole, der Entdecker und die isoelektrischen Punkte der wichtigsten natürlichen L-Aminosäuren, die als Bausteine in Proteinen vorkommen. Tabelle 2 listet deren wichtigsten physikalisch-chemischen Eigenschaften auf.

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, befinden sich in den Literaturangaben teilweise sehr unterschiedliche pKa-Werte. Der pKa-Wert einer Substanz leitet sich im Falle von Wasser als Lösemittel direkt aus dem Massenwirkungsgesetz her. Bestimmt wird dieser meistens mittels volumetrischer Titration mit potentiometrischer Endpunktanzeige. Er gibt Analytikern schon einen wichtigen Hinweis auf die Möglichkeiten und Grenzen bei der Entwicklung einer acidimetrischen Gehaltsbestimmung. Die unterschiedlichen Aciditätskonstanten (pKa-Werte) bzw. die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (IEP) der Aminosäuren spielen eine sehr große Rolle bei der Trennung der einzelnen Aminosäuren mittels Kapillarelektrophorese oder Ionenaustauschchromatographie.

Tabelle 1. Die wichtigsten natürlichen L-Aminosäuren, die als Bausteine in Proteinen vorkommen.

Trivialname	Strukturformel	Symbol	Entdecker und erste Isolierung [1]	Isoelektr. Punkt IEP [1]
<b>Aliphatische, neutrale Aminosäuren</b>				
Glycin		Gly	Braconnot aus Leim (1820)	5,97
L-Alanin		Ala	Weyl aus Seidenfibroin (1888)	6,00
L-Valin*		Val	v. Corupbesanez aus Drüsen-Extrakten (1856)	5,96
L-Leucin*		Leu	Proust aus Quark (1819)	5,98
L-Isoleucin*		Ile	Ehrlich aus Melasse (1904)	5,94
<b>Aliphatische, neutrale Hydroxyaminosäuren</b>				
L-Serin		Ser	Cramer aus Seidenleim (1865)	5,68
L-Threonin*		Thr	Rose et al. aus Fibrin (1935)	5,64
<b>Schwefelhaltige, neutrale Aminosäuren</b>				
L-Cystein		Cys	Baumann aus Cystin durch Reduktion (1884)	5,02
L-Methionin*		Met	Müller aus Casein	5,74
<b>Neutrale Aminosäuren</b>				
L-Prolin		Pro	Fischer aus Casein (1901)	6,30
<b>Basische Aminosäuren</b>				
L-Lysin*		Lys	Drechsler aus Casein (1899)	9,59

**Tabelle 1 (Fortsetzung). Die wichtigsten natürlichen L-Aminosäuren, die als Bausteine in Proteinen vorkommen.**

Trivialname	Strukturformel	Symbol	Entdecker und erste Isolierung [1]	Isoelektr. Punkt IEP [1]
<b>Basische Aminosäuren</b>				
L-Arginin(*)		Arg	Schulze et al. aus Lupinenkeimlingen (1886)	11,15
L-Histidin(*)		His	Kossel aus Sturin (1896)	7,47
<b>Saure Aminosäuren und deren Halbamide</b>				
L-Asparaginsäure		Asp	Ritthausen aus Leguminosen (1866)	2,77
L-Asparagin		Asn	Vauquelin und Robiquet aus Spargelpflanzen (1806)	5,41
L-Glutaminsäure		Glu	Ritthausen aus Leguminosen (1866)	3,2
L-Glutamin		Gln	Schulze aus Zuckerrüben (1877)	5,65
<b>Aromatische Aminosäuren</b>				
L-Phenylalanin *		Phe	Schulze und Barbieri aus Lupinenkeimlingen (1879)	5,48
L-Tyrosin		Tyr	Liebig aus Käse (1846)	5,66
L-Tryptophan*		Trp	Hopkins und Cole aus Casein (1901)	5,89

\*essentielle, (\*) semiessentielle Aminosäuren für den Menschen

Tabelle 2. Die relative molekulare Masse Mr, die Löslichkeit in Wasser und die pKa-Werte der wichtigsten proteinogenen Aminosäuren.

	<b>Mr</b>	<b>Löslichkeit in Wasser (g/100g, 25 °C)</b>	<b>pK<sub>a</sub> α-COOH</b>	<b>pK<sub>a</sub> α-NH<sub>3</sub></b>	<b>pK<sub>a</sub> seitenkettige Gruppe</b>
Ala	<b>89.10</b>	16.5 [5] 16.7 [9]	2.3 [6, 7, 8] 2.34 [5, 10, 11, 12, 13] 2.35 [11, 14, 15]	9.69 [5, 10, 11, 12, 13] 9.7 [6, 7] 9.87 [11, 14, 15]	
Arg	<b>174.21</b>	14.7 [9] 15.0* [5]	1.8 [8] 2.01 [11] 2.17 [5, 10] 2.18 [12, 13, 14] 2.2 [6, 7]	9.0 [6, 7, 8] 9.04 [5, 10, 11] 9.09 [12, 14]	<b>Guan.</b> 12.48 [10, 11] 12.5 [7, 8] 12.8 [6] 12.84 [5] 13.2 [12, 13, 14]
Asn	<b>132.12</b>	3.1 [5]	2.0 [6, 7, 8] 2.02 [5, 10, 11, 12, 13, 14]	8.60 [5] 8.80 [6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14]	
Asp	<b>133.11</b>	0.45 [9] 0.5 [5]	1.88 [5, 10, 12, 13, 14] 1.9 [6] 2.0 [8] 2.1 [7, 11]	9.6 [5, 6, 10, 12, 13, 14] 9.8 [7] 9.82 [11] 10.0 [8]	<b>-COOH</b> 3.65 [5, 10, 12, 13, 14] 3.7 [6] 3.86 [11] 3.9 [7] 4.5 [8]
Cys	<b>121.16</b>	sII [5] II [9]	1.7 [6, 7] 1.71 [5, 11, 12, 13, 14, 16] 1.8 [8] 1.96 [10]	10.28 [5, 10] 10.78 [11, 12, 13, 14] 10.8 [6, 7, 8] 10.87 [16]	<b>-SH</b> 8.27 [11] 8.3 [6, 7] 8.33 [12, 13, 14, 16] 8.6 [8]
Gln	<b>146.15</b>	2.5 [9] 3.6 [5]	2.17 [10, 11, 12, 13, 14] 2.2 [6, 7, 8]	9.1 [6, 7, 8] 9.13 [5, 10, 11, 12, 13, 14]	
Glu	<b>147.14</b>	0.84 [5] 0.86 [9]	2.10 [11] 2.16 [5] 2.19 [10, 12, 13, 14] 2.2 [6, 7, 8]	9.47 [11] 9.67 [5, 10, 12, 13, 14] 9.7 [7, 8] 10.0 [6]	<b>-COOH</b> 4.07 [11] 4.25 [10, 12, 13, 14] 4.3 [6, 7] 4.32 [5] 4.5 [8]
Gly	<b>75.07</b>	25 [5, 9]	2.3 [6, 7] 2.34 [5, 10, 12, 13, 14] 2.35 [11] 2.36 [15] 2.4 [8]	9.6 [5, 6, 7, 10, 12, 13, 14] 9.77 [15] 9.78 [11] 9.8 [8]	
His	<b>155.16</b>	4.18 [9] 7.59 [5]	1.77 [11] 1.78 [12, 13, 14] 1.8 [6, 7, 8] 1.82 [5, 10]	8.97 [12, 13, 14] 9.17 [5, 10] 9.18 [11] 9.2 [6, 7, 8]	<b>Im.</b> 5.97 [12, 14] 6.0 [5, 10, 6, 7, 13] 6.10 [11] 6.8 [8]
Ile	<b>131.18</b>	4.12 [5, 9]	2.26 [12, 13] 2.32 [14, 15] 2.36 [5, 10, 11] 2.4 [7, 8]	9.6 [10] 9.62 [12, 13] 9.68 [5, 11] 9.7 [7, 8] 9.76 [14, 15]	

**Tabelle 2 (Fortsetzung). Die relative molekulare Masse Mr, die Löslichkeit in Wasser und die pKa-Werte der wichtigsten proteinogenen Aminosäuren.**

	<b>Mr</b>	<b>Löslichkeit in Wasser (g/100g, 25 °C)</b>	<b>pK<sub>a</sub> α-COOH</b>	<b>pK<sub>a</sub> α-NH<sub>3</sub></b>	<b>pK<sub>a</sub> seitenkettiger Gruppe</b>
Leu	<b>131.18</b>	2.3 [5] 2.4 [9] 2.4 [7, 8]	2.33 [15] 2.36 [10, 11, 12, 13, 14]	9.6 [5, 7, 10, 11, 12, 13, 14] 9.74 [15]	
Lys	<b>146.19</b>	II [9] sII [5]	2.18 [5, 10, 11] 2.2 [6, 7, 8, 12, 13, 14]	8.90 [12, 13, 14] 8.95 [10, 11, 13] 9.1 [6] 9.12 [5] 9.2 [8]	ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> 10.1 [8] 10.28 [12, 13, 14] 10.5 [6, 7] 10.53 [5, 10, 11]
Met	<b>149.22</b>	3.5 [5]	2.28 [5, 7, 10, 11, 12, 13, 14] 2.3 [8, 11]	9.2 [7, 8] 9.21 [5, 10, 11, 12, 13, 14]	
Phe	<b>165.20</b>	2.94 [9] 2.97 [5]	1.8 [6, 7, 8] 1.83 [5, 10, 11, 12, 13] 2.58 [11, 14, 15]	9.1 [6, 7, 8] 9.13 [5, 10, 12, 13] 9.22 [15] 9.24 [11, 14]	
Pro	<b>115.14</b>	162.3 [5] 166.7 [9]	1.95 [15] 1.99 [5, 10, 12, 14] 2.0 [6, 7, 8, 11]	10.6 [5, 10, 11, 12, 6, 7, 8, 14] 10.64 [15]	
Ser	<b>105.10</b>	I [5, 9]	2.1 [8] 2.19 [15] 2.2 [6, 7] 2.21 [5, 10, 11, 12, 13, 14]	9.15 [5, 10, 11, 12, 13, 14] 9.2 [6, 7, 8] 9.21 [15]	
Thr	<b>119.12</b>	20.5 [5] II [9]	2.09 [10, 15] 2.15 [12, 13, 14] 2.6 [7, 8] 2.71 [5, 11]	9.1 [10, 15] 9.12 [12, 13, 14] 9.62 [5, 11] 10.4 [7, 8]	
Trp	<b>204.23</b>	1.14 [5] I [9]	2.38 [5, 11, 12, 13, 14] 2.4 [7, 8] 2.83 [10]	9.39 [5, 10, 11, 12, 13, 14] 9.4 [7, 8]	
Tyr	<b>181.20</b>	0.045 [9] 0.05 [5]	2.2 [5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15]	9.1 [6, 7, 8] 9.11 [5, 10, 11, 12, 13, 14, 15]	-OH 9.8 [8] 10.01 [6, 7] 10.07 [5, 10, 11, 13, 14, 15]
Val	<b>117.15</b>	8.85 [5]	2.29 [11, 14, 15] 2.3 [7, 8] 2.32 [5, 10, 12, 13]	9.6 [7, 8] 9.62 [5, 10, 12, 13] 9.72 [11, 14, 15]	

\* 21 °C

Definition nach Europäischem Arzneibuch

I- löslich (von 10 bis 30 Volumenteile Lösungsmittel für 1 Massenteil Substanz)

II- leicht löslich (von 1 bis 10 Volumenteile Lösungsmittel für 1 Massenteil Substanz)

sII- sehr leicht löslich (weniger als 1 Volumenteil Lösungsmittel für 1 Massenteil Substanz)

Tabelle 1-3: Industrielle Herstellung und Gewinnung von Aminosäuren

L-Amino-Säure	Protein-hydrolyse	chemische Synthese	enzymatische Synthese	Fermentation
Ala	*[10]	* Strecker-Synthese, ausgehend von Acetaldehyd; Racematspaltung [10]	*⊗ aus L-Asp mittels des Enzyms <i>L-Aspartat-β-decarboxylase</i> [10]	-
Arg	*⊗ Gelatine-Hydrolyse [9, 10]	* aus Ornithin, dessen δ-ständige Aminogruppe in die Guanidgruppe umgewandelt wird [9, 10]	-	*⊗ durch Mutanten von <i>Bacillus subtilis</i> und <i>Brevibacterium flavum</i> [9, 10]
Asn	*⊗ [10]	* [10]	-	-
Asp	-	-	*⊗ durch Umsetzung Fumarsäure und Ammoniak in Gegenwart von <i>L-Aspartase</i> [9, 10]	-
Cys	*⊗ [10]	-	*⊗ [10]	-
Gln	* Zuckerrüben-Hydrolyse [10]	-	-	*⊗ aus Glu [10]
Glu	-	-	-	*⊗ 1. aus Glucose und Ammoniak (als $\text{NH}_4^+$ durch Bakterienmutanten); 2. bakteriell mit <i>Brevibacterium flavum</i> und <i>Corynebacterium glutamicum</i> , die im Citratcyclus entstehende α-Oxoglutarinsäure durch reduktive Aminierung in L-Glu umsetzen [1, 9, 10]
Gly	-	*⊗ 1. Verseifung von Aminoacetonitril 2. Strecker-Synthese [9, 10]	-	-
His	* durch Blutmehlhydrolyse [9, 10]	-	-	*⊗ durch Mutanten von <i>Brevibacterium flavum</i> [9, 10]
Ile	* [10]	-	-	*⊗ durch gentechnologisch veränderte Mikroorganismen aus Kulturmedien, die Threonin enthalten [9, 10]
Leu	*⊗ aus Hydrolysaten von Hämoglobin [9, 10]	-	-	*⊗ durch Mutanten von <i>Brevibacterium lactofermentum</i> [9]
Lys	-	-	-	*⊗ aus Melasse mit Stämmen von <i>Corynebacterium glutamicum</i> oder <i>Brevibacterium lactofermentum</i> [9, 10]

Tabelle 1-3 (Fortsetzung): Industrielle Herstellung und Gewinnung von Aminosäuren

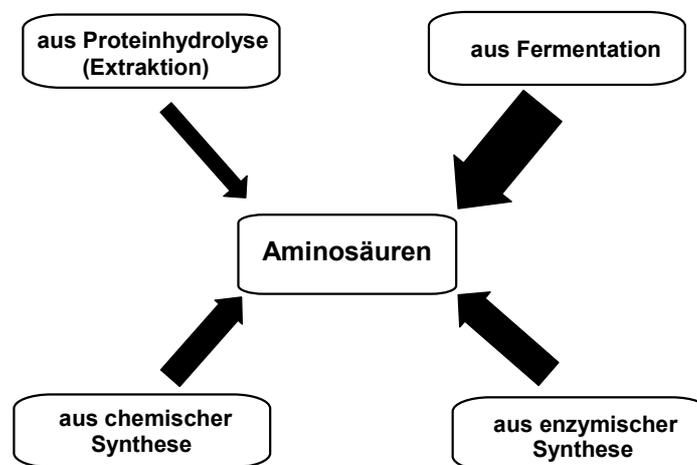
L-Aminosäure	Proteinhydrolyse (Extraktion)	chemische Synthese	enzymatische Synthese	Fermentation
Met	-	-	*⊗ vor allem Racematspaltung von N-Acetyl-D,L-methionin mittels stereospezifischer Acylasen [1, 2, 9, 10]	*Umwandlung von $\alpha$ -Hydroxymethylmercaptobuttersäure zu L-Met durch <i>Pseudomonas denitrificans</i> [9, 10]
Phe	* aus Ovalbumin, Lactalbumin, Zein, Fibrin [9]	*⊗ nach Erlenmeyer-Synthese ausgehend von Benzaldehyd [10]	*⊗ aus Asp [10]	*⊗ durch Mutanten von <i>Brevibacterium flavum</i> und <i>Bacillus subtilis</i> [9, 10]
Pro	* aus Gelatine [9, 10]	-	-	*⊗ durch Mutanten von <i>Brevibacterium flavum</i> , Stämme von <i>Corynebacterium</i> und <i>Microbacterium</i> [9, 10]
Ser	* (in Europa) [9, 10]	-	*⊗ [10]	*⊗ durch Mutanten von <i>Corynebacterium glycinophilum</i> und mit Stämmen von <i>Pseudomonas</i> und <i>Nocardia</i> ; Fermentation von Glycinsubstraten [9, 10]
Thr	* aus Hydrolysaten von Schweineborsten, Blutmehl, Hornspäne, Ei-Albumin [1, 9, 10]	*⊗ [1, 9, 10]	-	*⊗ durch Mutanten von <i>Serratia marcescens</i> oder <i>Brevibacterium flavum</i> [1, 9, 10]
Trp	-	*⊗ [10]	*⊗ 1. aus Indol und Ser in Gegenwart von <i>Tryptophansynthetase</i> ; 2. durch Umsetzung von Indol mit Brenztraubensäure und Ammoniak von <i>Tryptophanase</i> [9, 10]	*⊗ durch Mutanten von <i>Bacillus subtilis</i> aus Precursoren wie Anthranilsäure oder sogar nur Methanol als einziges Substrat [9, 10]
Tyr	*⊗ (ausschl.) [9, 10]	-	-	*⊗ [9, 10]
Val	* [9, 10]	*⊗ Strecker-Synthese und Racematspaltung [9, 10]	-	*⊗ durch Mutanten von <i>Brevibacterium</i> und <i>Corynebacterium</i> [9, 10]

\* Industrie weltweit  
 ⊗ japanische Industrie

## 1.2. Herstellung und Gewinnung von Aminosäuren

Aminosäuren werden für die Human- und Tierernährung, die Pharmazie, Kosmetik, Agrikultur und Technik benötigt. Insbesondere die Gewinnung der Protein bildenden  $\alpha$ -Aminosäuren ist von wesentlichem wirtschaftlichen Interesse. Allgemein werden die Aminosäuren durch Fermentation, chemische Synthese, enzymatische Verfahren oder aus Protein-Hydrolysaten gewonnen (Siehe Abb. 1-3). Die Pfeildicke gibt die Bedeutung der jeweiligen Herstellungsart wieder.

Abb. 1-3: Herstellung/Gewinnung von Aminosäuren.



Die spezifischen wirtschaftlich bedeutenden Herstellungsverfahren für die einzelnen Aminosäuren sind in Tabelle 1-3 angegeben.

### 1.2.1. Synthetische Verfahren

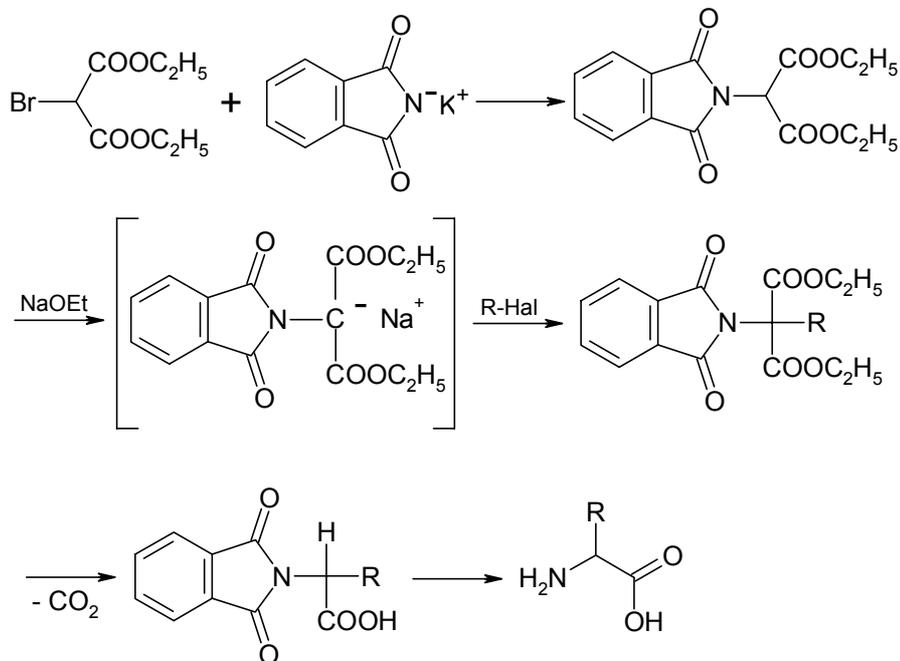
Es gibt zahlreiche Synthese-Möglichkeiten für die Aminosäuren. Im folgenden sollen die drei bekanntesten dargestellt werden. An dieser Stelle soll nicht auf spezielle Synthesen einzelner Aminosäuren eingegangen werden, sondern nur auf allgemein anwendbare synthetische Herstellungsverfahren.

#### 1.2.1.1. Malonester-Synthese

Eine allgemein anwendbare Methode für die Synthese von Aminosäuren benutzt eine Variante der Malonester-Synthese. Brommalonester reagiert in einer  $S_N$ -Umsetzung mit Kaliumphthalamid zu N-Phthalimidomalonsäureester. Nach dem Überführen mit Natriumethanolat in das Natriumsalz wird der Ester mit einem Alkylhalogenid alkyliert. Diese

Verbindung wird verseift und schließlich die  $\alpha$ -Aminosäure freigesetzt (Abb. 1-4) [5, 6, 12, 17, 18].

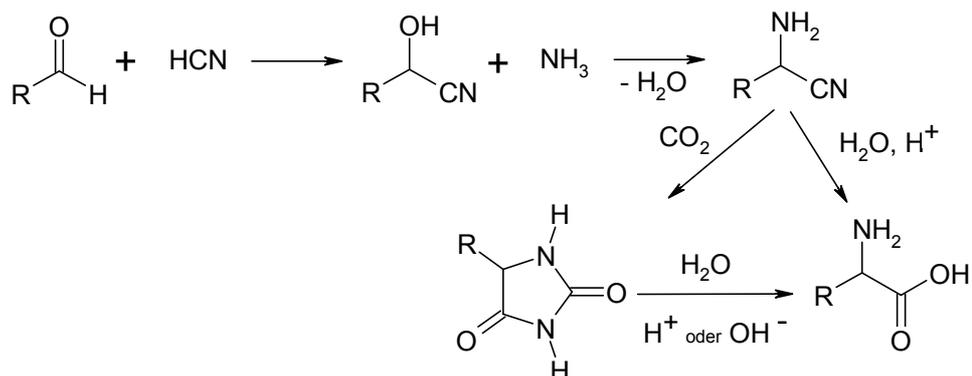
Abb. 1-4: Malonester-Synthese



### 1.2.1.2. Strecker-Synthese

Eine zweite allgemeine Methode zur Herstellung von  $\alpha$ -Aminosäuren ist die Hydrolyse von  $\alpha$ -Aminonitrilen [19]. Diese erhält man durch Behandlung von Aldehyden mit Acetonitril und Ammoniak. Das entstehende Cyanhydrin wird entweder direkt in Säuren oder nach Umsetzung mit  $\text{CO}_2$  und Ringschluss zum Hydantoin sauer oder alkalisch verseift. Es entsteht das Racemat der Aminosäure (Siehe Abb. 1-5) [4, 5, 6, 10, 12, 18, 19].

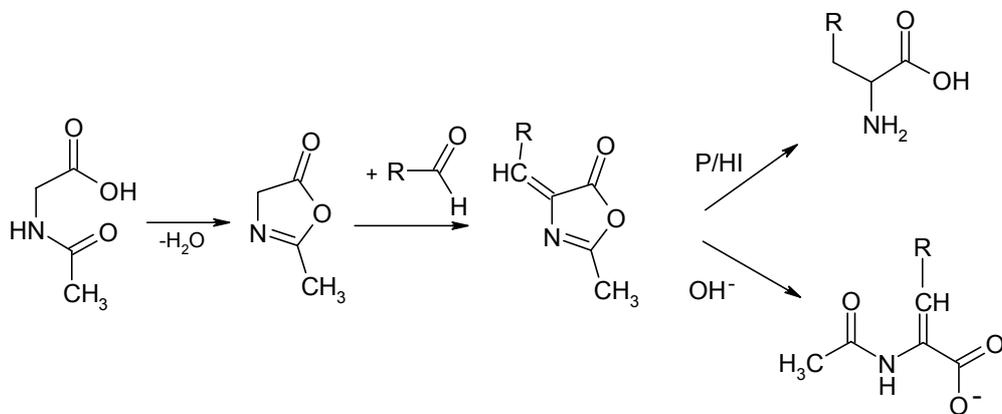
Abb.1-5: Strecker-Synthese



## 1.2.1.3. Erlenmeyer-Synthese

Bei der Azlacton-Synthese nach Erlenmeyer [20] wird ein Glycinderivat (im unten aufgeführten Reaktionsmechanismus wurde N-Acetylglycin gewählt) mit Acetanhydrid in ein Azlacton (Oxazolinon) überführt. Die Glycin-Methylen-Gruppe in diesem Ringsystem ist stark aktiviert und kann mit Aldehyden zum substituierten Azlacton reagieren. Dieses kann schließlich durch Erhitzen mit Phosphor und Iodwasserstoffsäure in die Aminosäure überführt werden. Wird das Azlacton alkalisch verseift, entstehen  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Aminosäuren (Abb. 1-6) [5, 6, 10, 12, 20].

Abb. 1-6: Erlenmeyer-Synthese



## 1.2.1.4. Racematspaltung

Bei den meisten synthetischen Verfahren erhält man als Endprodukt das Racemat der Aminosäure [10, 16]. Da üblicherweise das reine L-Enantiomer benötigt wird, muss im Anschluss an obige Synthesen eine Racematspaltung erfolgen. Diese Spaltung erreicht man z.B. durch Überführen der Aminosäuren mit Benzoylchlorid zum Amid, nachfolgend in diastereomere Salze des Brucins oder Strychnins und anschließende Trennung dieser Salze aufgrund ihres unterschiedlichen Kristallisationsverhaltens [19].

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung bietet der Einsatz von Enzymen, da deren katalytische Wirkung meist hoch enantioselektiv ist [16]. Die durch *AcyIase* katalysierte Racematspaltung wurde erstmals von der japanischen Firma Tanabe 1969 zur industriellen Herstellung von L-Aminosäuren eingesetzt [2].

### 1.2.2. Enzymatische Methoden

Bei einigen Aminosäuren ist es vorteilhaft, enzymatische Herstellungsmethoden anzuwenden, da sie den Vorteil haben, enantiomerenreine L- oder D-Aminosäuren zu liefern [1]. Die dafür benötigten Enzyme, Biokatalysatoren genannt, werden entweder in nativer Form oder an polymere Träger fixiert zur Umwandlung von meist synthetisch gut zugänglichen Ausgangsstoffen für die Aminosäuresynthese eingesetzt. Die Enzyme sind Katalysatoren mit extrem hoher Stereospezifität. Technische Bedeutung hat die Umwandlung des Aminosalzes der Fumarsäure in L-Asparaginsäure mit Hilfe des Enzyms *L-Aspartase* [1].

Auch die durch die mikrobielle *Tryptophanase* biokatalysierte Reaktion von Indol mit Brenztraubensäure und Ammoniak zu L-Tryptophan gehört zu den enzymatischen Synthesen. Statt Brenztraubensäure und Ammoniak kann man die Aminosäure Serin mit Indol unter dem Einfluss eines anderen Enzyms, der *Tryptophansynthetase*, zu Tryptophan umsetzen [1].

Für die Herstellung einiger Aminosäuren kann es nach wie vor günstiger sein, nach der synthetischen Methode zunächst racemische Vorstufen, z.B. N-Acetyl-D,L-aminosäuren, zu produzieren und diese anschließend einer Racematspaltung zu unterwerfen. Auf diese Weise wird z.B. D,L-Methionin in zwei Stufen in L-Methionin umgewandelt [1]. Zuerst wird das Racemat synthetisch acetyliert. Im zweiten Schritt wird das N-Acetyl-D,L-methionin mit einer äquimolaren Menge Natronlauge umgesetzt und die wässrige Lösung des Natriumsalzes von N-Acetyl-D,L-methionin wird bei pH 7,0 und 37 °C mit dem Enzym *L-Aminoacylase* behandelt. Die *Acylase* hydrolysiert stereoselektiv die Amidbindung des N-Acetyl-L-methionin, während das N-Acetyl-D-methionin unverändert als Natriumsalz in Lösung bleibt. Nach der enzymatischen Reaktion werden L-Methionin, N-Acetyl-D-methionin und Natriumacetat entweder unter Ausnutzung ihrer unterschiedlichen Löslichkeiten oder mit Hilfe von Ionenaustauschern in der Separatoreinheit getrennt.

### 1.2.3. Hydrolytische Verfahren

Zur Gewinnung von Aminosäuren aus Proteinen hydrolysiert man diese mit Säuren oder Basen. Meist werden die Peptidbindungen im Protein mit Hilfe von Salzsäure gespalten und dadurch die Aminosäuren freigesetzt. Bei der sauren oder alkalischen Hydrolyse werden allerdings einige Aminosäuren wie z.B. Tryptophan zerstört [10]. Nach der Neutralisation des salzsauren Hydrolysats fallen die in Wasser sehr schwer löslichen bzw. praktisch unlöslichen Aminosäuren Cystin und Tyrosin aus. Beim anschließenden Eindampfen reichert man im Bodensatz Leucin und Isoleucin und andere schwerlösliche Aminosäuren an. Die restlichen 16 proteinogenen Aminosäuren im Filtrat werden chromatographisch mittels organischem

Ionenaustauscher aufgetrennt [4, 10]. Obwohl durch dieses Verfahren ein relativ kleiner Anteil von den weltweit hergestellten Aminosäuren gewonnen wird, ist dieses Verfahren zur heutigen Zeit wirtschaftlich am günstigsten für die Aminosäuren Cystin, Tyrosin und Prolin [11].

#### 1.2.4. Fermentation

Die Fermentation ist ein Prozess, bei dem chemische Produkte durch die metabolischen Aktivitäten eines Mikroorganismus entstehen [1]. Unter günstigen Bedingungen produzieren sie organische Substanzen unterschiedlicher Stoffklassen mit hoher Geschwindigkeit. Die Fermentation ist oft wirtschaftlicher als die anderen Herstellungsprozesse. Ein besonderer Vorteil ist, dass man Fermentationsanlagen häufig für mehrere verschiedene Kulturen, d.h. für die Herstellung verschiedener Endprodukte einsetzen kann. Weiterhin zeichnen sich Fermentationprozesse dadurch aus, dass sie bei Temperaturen um 30 bis 40 °C und normalem Druck ablaufen, also keine druckfesten Fermenter benötigen. Es ist besonders bemerkenswert, dass im Falle der fermentativen Aminosäureproduktion nur die biologisch wertvolle L-Form gebildet wird. Nicht zuletzt sind auch die billigeren Rohstoffe, die bei Fermentation zu verwenden sind, zu erwähnen [1]

Die Biosynthese von Aminosäuren ist bei den in der Natur lebenden sog. Wildstämmen in der Regel streng reguliert, wobei z.B. die entstandenen Aminosäuren selbst die Bildung der benötigten Enzyme einschränken („Feedback Repression“) und/oder die Aktivität von sog. Schlüsselenzymen herabsetzen („Feedback Inhibition“) [2]. Bei einem für die Aminosäure-Produktion geeigneten Stamm müssen die Kontrollmechanismen weitestgehend aufgehoben, Nebenreaktionen wie der Abbau von Zwischenprodukten oder gar des Endproduktes blockiert und die ungehinderte Ausschleusung der Aminosäure gewährleistet werden. Zur Ausschaltung des Rückkopplungsmechanismus versucht man, die Aktivitäten eines inhibierenden Zwischen- und/oder Endproduktes des Metabolismus der Zelle zu unterdrücken. Dies kann üblicherweise durch Verwendung auxotropher Mutanten des Mikroorganismus erreicht werden [1]. Auxotrophe Mutanten sind Mikroorganismen, denen ein Enzym (oder mehrere) für die Biosynthese einer Aminosäure fehlt. Die gewünschten Stammeigenschaften können durch schrittweise Mutagenese und Selektion, also durch klassische genetische Stammentwicklung und neuerdings infolge der enormen Fortschritte bei der Gentechnologie durch gezielte genetische Eingriffe erreicht werden [2]. Wenn die direkte fermentative Produktion einer Aminosäure aus Zucker schwierig ist, setzt man entsprechende

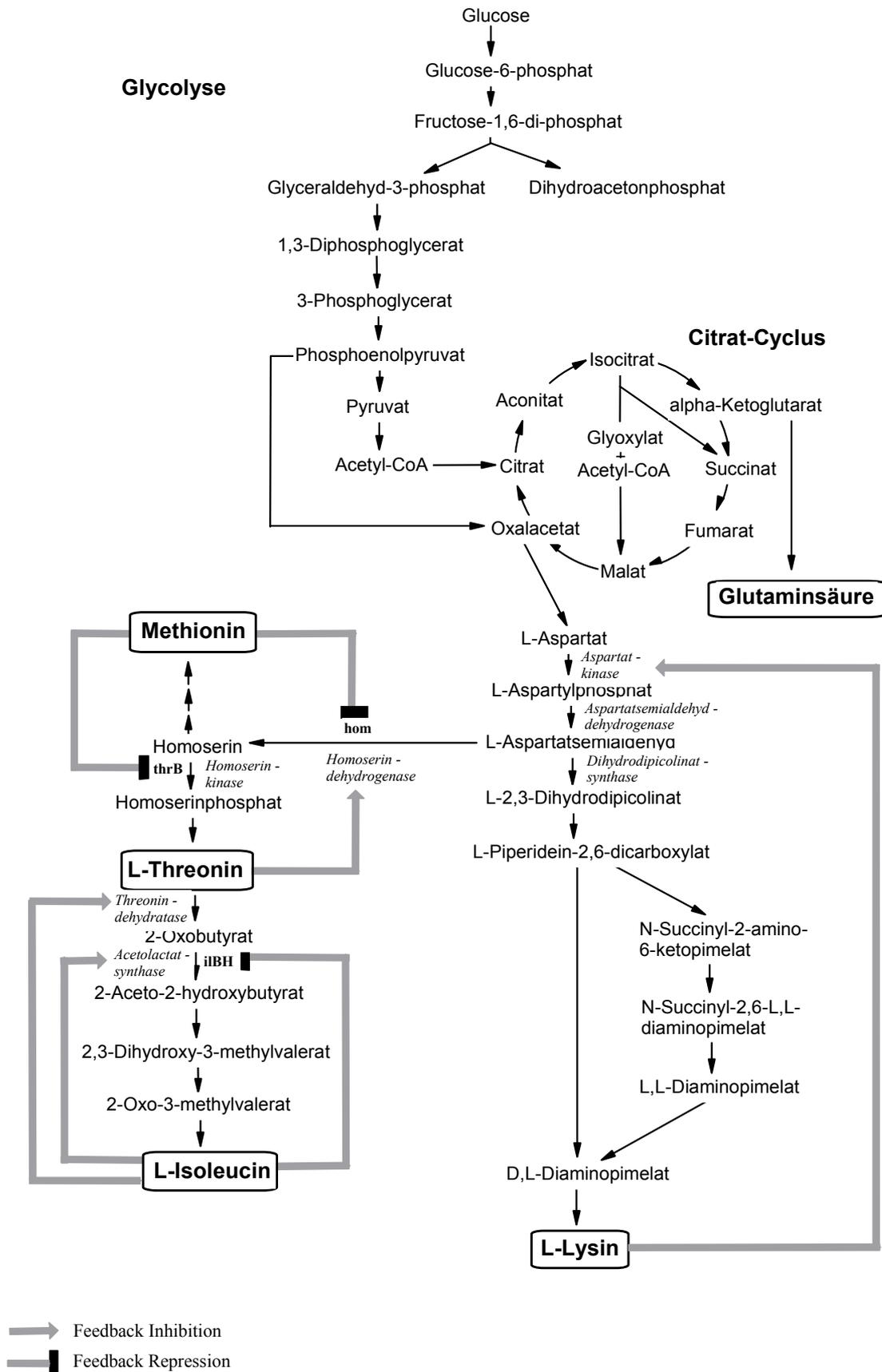
Vorstufen ein. Beispielweise kann man Isoleucin durch Fermentation in Kulturmedien herstellen, die Threonin enthalten [1].

Der Beginn der industriellen Produktion von Aminosäuren durch Fermentation war Mitte der fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts, als in Japan ein Bakterium, das große Mengen Glutaminsäure im Kulturmedium produzieren und ausschleusen kann, isoliert wurde [21, 22, 23]. Bei optimalen Bedingungen wandelt dieses Bakterium ca. 100 g/l Glucose in 50 g/l Glutaminsäure in einigen Tagen um. Durch dieses Bakterium werden bis heute ca.  $1 \times 10^6$  T/Jahr Glutaminsäure hergestellt [24, 25]. In den letzten 35 Jahren sind verschiedene Stämme des *Corynebacterium glutamicum* isoliert worden, die auch andere Aminosäuren in großen Mengen produzieren können. Weltweit werden zum heutigen Datum jährlich ca.  $1,5 \times 10^6$  T Aminosäuren hergestellt [26]. L-Glutaminsäure und L-Lysin, die den größeren Teil von dieser Jahresmenge darstellen, werden ausschließlich durch *Corynebacterium glutamicum* hergestellt [23]. Die am häufigsten zur Herstellung von Aminosäuren verwendeten Bakterien sind coryneforme Bakterien – *Corynebacterium* und *Brevibacterium*. Kürzlich vorgenommene DNS-DNS-Hybridisations-Untersuchungen zeigen sehr kleine Unterschiede zwischen *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* und *Corynebacterium glutamicum*. *Corynebacterium* Species sind gram-positiv, irregulär, nicht sporenbildend und streng aerob [27]. Sie haben einen zentralen Platz bei der Produktion der Aminosäuren Glutamin, Lysin, Threonin, Isoleucin, Tryptophan und Phenylalanin. Im Folgenden sind in Kürze einige allgemeine Aspekte der Biosynthese dieser Aminosäuren in den am häufigsten für kommerzielle Produktion verwendeten coryneformen Bakterien aufgelistet.

#### 1.2.4.1. Glutaminsäure

Die fermentative Produktion von L-Glutaminsäure ist ein typisches Beispiel für die mikrobielle Herstellung einer Aminosäure. Mikroorganismen wandeln Glucose in Brenztraubensäure um, letztere wird zu  $\alpha$ -Ketoglutar Säure metabolisiert, deren reduktive Aminierung Glutaminsäure ergibt (Abb. 1-7) [1]. Die meisten Mikroorganismen stellen nur so viel Glutaminsäure her, wie gerade zu ihrem Wachstum und zur Lebenserhaltung notwendig ist. Einige Mikroorganismen, etwa *Brevibacterium flavum* und *Corynebacterium glutamicum*, besitzen eine ausgesprochen große Enzymkapazität zur L-Glutaminsäureerzeugung und schleusen das gebildete Glutamat aus der Zelle aus. In der technischen L-Glutaminsäure-Fermentation wird anstelle von reiner D-Glucose die billigere Melasse (Abfallstoff der Zuckerfabrikation) als Kohlenstoffquelle verwendet [1].

Abb. 1-7: Biosynthese einiger Aminosäuren in coryneformen Bakterien



#### 1.2.4.2. Lysin

Lysin ist vom wirtschaftlichem Standpunkt aus eine der wichtigsten essentiellen Aminosäuren. Industriell wird Lysin durch Fermentation vor allem von Species von *Corynebacterium* und *Brevibacterium* in Mengen von ca. 180.000 T/Jahr hergestellt [22, 23]. Gemeinsam mit Threonin, Methionin und Isoleucin gehört Lysin zu der sogenannten Aspartat-Familie. Die Biosynthese dieser Aminosäuren erfolgt über Asparaginsäure (Abb. 1-7). Das Aspartat stammt direkt vom Oxalacetat, das im Citrat-Cyclus gebildet oder durch Carboxylierung von Phospho-enolpyruvat aus Glucose synthetisiert wird. Durch ein klassisches Screening-Programm wurden Stämme gefunden, die fähig sind, große Mengen Aminosäuren der Aspartat-Familie herzustellen. Die Biosynthese von Lysin folgt dem Diaminopimelat-Weg. Insgesamt sechs Enzyme nehmen an der Umwandlung des Aspartats bis zum Lysin teil, von denen nur zwei für die Kontrolle des Metabolitlaufes in diesem biosynthetischen Weg verantwortlich sind – die *Aspartat-kinase* und die *Aspartat-semialdehyd-dehydrogenase* (Abb. 1-7) [23]. Das sind die Enzyme, die an der Katalyse der ersten zwei Reaktionen teilnehmen. Im Allgemeinen ist die Regulation der Biosynthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie relativ einfach. Beim *Corynebacterium* wird keine Regulation jedes Enzyms des Lysin-Wegs beobachtet. Die hauptsächliche Kontrolle erfolgt durch „Feedback-Inhibition“ der *Aspartat-kinase* durch Lysin in Konzentrationen über 1 mM zusammen mit Threonin über 5 mM [23]. Die Kondensation von L-Aspartatsemialdehyd mit Pyruvat zum L-2,3-Dihydrodipicolinat ist ein Grundschrift der Lysin-Synthese. Die Reaktion wird von *Dihydrodipicolinat-synthase* katalysiert. Dieses Enzym hat eine wesentlich kleinere Affinität gegenüber Aspartatsemialdehyd im Vergleich zu dem konkurrierenden Enzym *Homoserin-dehydrogenase*. Die Erhöhung der spezifischen Aktivität der *Dihydrodipicolinat-synthase* durch Überexpression des jeweiligen Genes lenkt die Umsetzung des L-Aspartat-semialdehyd in Richtung Lysin. Man muss bemerken, dass es bei *Corynebacterium glutamicum* zwei Varianten zur Biosynthese von D,L-Diaminopimelat gibt (Abb. 1-7).

#### 1.2.4.3. Threonin

Der Weg der Derivate der Aspartat-Aminosäuren verzweigt sich beim Aspartatsemialdehyd (Abb.1-7). Der eine Zweig führt zur Synthese von D,L-Diaminopimelat und Lysin und der andere zu Threonin, Methionin und Isoleucin.

Wie schon gesagt wurde, bestimmt die relative Affinität der zwei konkurrierenden Enzyme *Homoserin-dehydrogenase* und *Dihydrodipicolinat-synthase* die Verteilung des gemeinsamen Substrates L-Aspartatsemialdehyd zu den verschiedenen Threonin- und Lysin-

Biosynthesewegen (Abb.1-7) [28]. Auf Grund der 15fach höheren Affinität zum Substrat seitens *Homoserin-dehydrogenase* ist der Kohlenstofffluss in Richtung Threonin [29]. Aber die Aktivität von *Homoserin-dehydrogenase* ist sehr empfindlich gegen allosterische Hemmung durch L-Threonin ( $K_i=0,16$  mM). Bei genügender Menge Threonin geht das Aspartatsemialdehyd in den Lysin-Weg. Eine ähnliche allosterische Hemmung übt auch das L-Isoleucin aus, aber in bedeutend höheren Konzentrationen ( $K_i=5$  mM). Zusätzlich wird die Biosynthese der beiden Enzyme bei Zugabe von L-Methionin zum Kulturmedium ca. 3fach gehemmt.

#### 1.2.4.4. Isoleucin

Isoleucin wird von Threonin in fünf Enzym-katalysierten Reaktionen gewonnen (Abb.1-7). Nur das erste der fünf Enzyme – *Threonin-dehydratase* ist Isoleucin-spezifisch, die anderen vier beteiligen sich auch an der Biosynthese von Valin und Leucin [23]. Dieses Enzym, zusammen mit dem Enzym, das die nächste Reaktion katalysiert, die *Acetolactat-synthase*, nehmen an der Regulation des Kohlenstoffflusses von Threonin zum Isoleucin teil. Isoleucin ist negativer allosterischer Effektor der *Threonin-dehydrogenase*, der deutlich den  $K_m$ -Wert für Threonin von 21 auf 78 mM anhebt, wobei das Valin als positiver allosterischer Effektor wirkt, in dem er diesen  $K_m$ -Wert auf 12 mM reduziert [30, 31]. Das andere für den Kohlenstofffluss verantwortliche Enzym, die *Acetolactat-synthase*, ist bis auf ca. 50% von den drei Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin „feedback“ gehemmt [32]. Die Menge der *Acetolactat-synthase* in der Zelle ist streng reguliert. Die Zugabe von 2-Oxobutyrat führt zu mehr als 20facher Erhöhung der spezifischen Aktivität dieses Enzyms, das zur starken Einschränkung der Biosynthese von Leucin und Valin führt. Mit Zugabe des Prekursors 2-Oxobutyrat kann eine Ansammlung von Isoleucin im Kulturmedium bis 19 g/l erzielt werden.

#### 1.2.4.5. Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan

Die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan im *Corynebacterium* wird mit der Teilnahme von mindestens 17 verschiedenen Enzymen und einer Gruppe von Regulationsmechanismen durchgeführt [33]. Ihre Biosynthese ist bis zur Stufe des Chorismat gleich, beschreitet aber ab dort drei unterschiedliche Wege. Die Kontrolle des Kohlenstoffflusses wird an der ersten Stelle mit „Feedback-Inhibition“ durchgeführt.

## 2. Aminosäureanalytik – Bestandsaufnahme und Problemstellung

Für die proteinogenen Aminosäuren befinden sich bereits Monographien im Europäischen [34] beziehungsweise im Deutschen Arzneibuch [35]. Hier werden Qualitätsanforderungen bezüglich der Reinheit einzelner Aminosäuren festgehalten. Da die pharmazeutische Analytik einer stetigen Weiterentwicklung unterworfen ist, handelt es sich bei diesen Monographien nicht um starre Vorschriften. Sie werden immer wieder neu überarbeitet, um neue Erkenntnisse zu berücksichtigen, oder aber im Zuge der Harmonisierung sich einer für ganz Europa gültigen Version anzupassen. Das bekannte Beispiel dürfte in diesem Zusammenhang die so genannte „Tryptophanaffäre“ sein, die weltweit Bestrebungen ausgelöst hat, die Prüfung auf Reinheit zu verbessern [10]. Im Jahr 1989 erscheint die erste Veröffentlichung, die Fälle von Eosinophilie-Myalgie-Syndrom mit Trp-haltigen Produkten verbindet. Eine Reihe von Berichten aus den USA, Europa und Japan veranlassten systematische Untersuchungen im Center for Disease Control, FDA und anderen Labors über die Natur und den Mechanismus dieser toxikologischen Reaktion. Einige Verunreinigungen im Spurenbereich wurden in Batches von Tryptophan gefunden, die von einem einzelnen Hersteller in Japan stammen [36, 37, 38]. Eine Verunreinigung, „Peak E“, wurde als 1,1-Ethylidenbistryptophan [39] identifiziert und eine zweite, die mit Eosinophilie-Myalgie-Syndrom verbunden ist, „Peak UV-5“ [40], als 3-Phenylamino-L-alanin [41, 42]. Es wurde festgestellt, dass dieses verunreinigte Tryptophan durch ein biotechnologisches Verfahren mit genmanipulierten Mikroorganismen hergestellt worden war. Nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand handelt es sich bei beiden Verunreinigungen um Artefakte, die erst während des Reinigungsprozesses entstehen [10]. Die nachgewiesenen Mengen an Verunreinigungen in den kontaminierten Chargen waren sehr gering und ließen sich mit der im Arzneibuch beschriebenen DC-Methode wegen ihrer niedrigen Empfindlichkeit nicht erfassen. Zum heutigen Zeitpunkt ist im Europäischen Arzneibuch eine zusätzliche Analyse für „1,1-Ethylidenbistryptophan und andere verwandte Substanzen“ enthalten [34]. Es handelt sich um ein hochempfindliches HPLC-Verfahren mit Gradientenelution. 1,1-Ethylidenbistryptophan wird auf 10 ppm begrenzt. Die Begrenzung anderer verwandter Substanzen erfolgt durch zwei Grenzwerte, von 100 ppm für die Summe der Verunreinigungen vor dem Tryptophanpeak und 300 ppm für die Summe der Verunreinigungen nach dem Tryptophanpeak. N-Acetyltryptophan dient als interner Standard. Es wird bei 220 nm detektiert.

Als ein anderes Beispiel kann 5-Hydroxy-L-tryptophan angegeben werden. Fast im gleichen Zeitraum, in dem die „Tryptophanaffäre“ ausgebrochen war, erschienen auch Veröffentlichungen, die Fälle von Eosinophilie-Myalgie-Syndrom mit 5-Hydroxy-L-tryptophan verbanden [43, 44, 45, 46, 47]. Bei den Untersuchungen des Verunreinigungsprofils des 5-Hydroxy-L-tryptophans wurden einige Verunreinigungen erfasst. Von denen wurde der sogenannte Peak „X“ in den verunreinigten Batches auf einem deutlich höheren Niveau quantifiziert [48, 49, 50].

In den letzten Jahrzehnten wurde die Produktion der Aminosäuren weltweit von chemischen Synthesen auf die wirtschaftlich günstigeren enzymatischen Verfahren oder Fermentation umgestellt. Manche Aminosäuren wie z.B. Glutaminsäure werden ausschließlich durch Fermentation hergestellt. Mit dem Wechsel des Herstellungsverfahrens stellt sich die Frage nach der Aktualität der in den jeweiligen offiziellen Monographien eingeschlossenen dünn-schichtchromatographischen Methode zur Beurteilung der Reinheit von Aminosäuren. Die Veränderung des Produktionsprozesses führt unvermeidlich auch zur Veränderung des Verunreinigungsprofils der Aminosäuren. Dies erfordert mindestens eine Überprüfung der Selektivität dieser dünn-schichtchromatographischen Methode, oder mit anderen Worten gesagt, eine Überprüfung der Fähigkeit dieser Methode zur Erfassung der eventuellen neuen organischen Verunreinigungen, die mit der Veränderung des Produktionsschemas erscheinen. Außer einer Überprüfung der Selektivität ist auch eine Beurteilung ihrer Sensitivität, d.h. ihrer Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, notwendig. Der Tryptophan-Fall zeigt zweifellos, dass Verunreinigungen mit hoher Toxizität von dieser Methode nicht erfasst werden können, d.h. mit ihr kann die Reinheit von Tryptophan auf einem Niveau, adäquat der Toxizität dieser Verunreinigungen, nicht beurteilt werden. Das alles zeigt, dass die Verunreinigungsprofile der Aminosäuren mit neuen, empfindlicheren instrumentellen Methoden intensiv untersucht werden müssen sowie dass die Forderungen bezüglich ihrer Reinheit angesichts der erhaltenen Ergebnisse neu überdacht werden müssen. Im Europäischen Arzneibuch sind Prüfungen auf verwandte Substanzen mittels HPLC, außer in der Monographie von Tryptophan, auch in den Monographien von Acetyltryptophan und Acetylcystein enthalten [34]. Im Fall dieser Monographien ersetzt die HPLC-Methode den zumeist verwendeten Test auf Ninhydrin-nachweisbare Substanzen. Im Fall von Acetyltryptophan handelt es sich übrigens um die gleiche HPLC-Methode, die in der Monographie von Tryptophan enthalten ist, mit dem Unterschied, dass die potentiellen Verunreinigungen auf einem bedeutend höheren Niveau – einzeln auf 0,25 % und insgesamt auf 0,5 % begrenzt werden. Die in der Monographie Acetylcystein enthaltene HPLC-Methode mit isokratischer Elution limitiert die

Verunreinigungen individuell und insgesamt auf 0,5%. Auch hier wird eine UV-Detektion bei 220 nm durchgeführt. Trotz der unbestrittenen Vorteile der im Europäischen Arzneibuch enthaltenen Methoden zur Prüfung auf Reinheit von Tryptophan, Acetyltryptophan und Acetylcystein im Vergleich zu der dünnschichtchromatographischen Methode, muss gesagt werden, dass es sich um eine UV-Detektion handelt. Somit können große Stoffgruppen der zu erwartenden Verunreinigungen nicht erfasst werden, da sie in ihrer Struktur weder Chromophore noch Fluorophore besitzen. Zu der Gruppe der potentiellen Verunreinigungen gehören unter anderem der größte Teil der Aminosäuren. In diesem Zusammenhang war das Ziel dieser Studie die Suche nach besseren Detektionsmöglichkeiten, mit denen auch andere für den UV-Detektor „unsichtbare“ Verunreinigungen erfasst werden können.

Auf den nächsten Seiten ist eine kurze Übersicht des aktuellen Stands der Aminosäureanalytik im Europäischen Arzneibuch im Speziellen und Allgemeinen wiedergegeben.

### 2.1. Dünnschichtchromatographie

Im Europäischen Arzneibuch wird für alle Aminosäuren, außer Acetylcystein, bei der „Prüfung auf Identität“ eine dünnschichtchromatographische Prüfung vorgeschrieben. Die genauen Versuchsparameter werden in der Monographie allerdings erst bei der Prüfung auf Reinheit in der Vorschrift „mit Ninhydrin nachweisbare Substanzen“ angegeben. Dieser Test heißt bei Acetyltyrosin und bei D,L-Methionin „verwandte Substanzen“, aber im Grunde handelt es sich um dieselbe Prüfung mit der Ergänzung, dass beim Acetyltyrosin zusätzlich auch UV-Detektion unter der UV-Lampe bei 254 nm durchgeführt wird. Ausnahmen sind die Aminosäuren Glycin und N-Acetyltryptophan, bei denen die Dünnschichtchromatographie ausschließlich bei der Prüfung auf Identität eingesetzt wird. Bei N-Acetyltryptophan wird die Detektion nur unter UV-Licht bei 254 nm durchgeführt.

Das Europäische Arzneibuch schreibt bei der Prüfung auf Identität einen Vergleich mit einer auf derselben Platte entwickelten Referenzsubstanz vor. Die chemischen Referenzsubstanzen (CRS) sind beim Sekretariat der Europäischen Arzneikommission erhältlich. In den Aminosäuremonographien des Europäischen Arzneibuchs, bei denen es sich um „mit Ninhydrin nachweisbare Substanzen“ handelt, wird die „Eignung“ des chromatographischen Systems mit Hilfe der zusätzlichen Referenzsubstanz überprüft. Ein Eignungstest ist auch in der Prüfung auf Identität von N-Acetyltryptophan enthalten.

### 2.1.1. Stationäre Phase

Als stationäre Phase schreibt das Europäische Arzneibuch lediglich die Verwendung einer Schicht aus Kieselgel R vor. Nur im Fall von DL-Methionin ist die Verwendung von Kieselgel GR (Kieselgel mit einem anorganischen Bindemittel) als stationäre Phase vorgeschrieben. Bei Acetyltyrosin und N-Acetyltryptophan enthält die Kieselgelschicht zusätzlich einen Fluoreszindikator, der die UV- Detektion bei 254 nm ermöglicht.

### 2.1.2. Fließmittel

Normalerweise sollte ein chromatographisches System ausgewählt werden, bei dem alle Aminosäuren und anderen verwandten Substanzen aufgetrennt werden. Aufgrund der großen Anzahl der strukturell teilweise sehr ähnlichen Aminosäuren ergeben sich erwartungsgemäß Schwierigkeiten. Im Europäischen Arzneibuch werden für die Dünnschichtchromatographie der Aminosäuren insgesamt fünf unterschiedliche Fließmittelzusammensetzungen angegeben (Siehe Tabelle 2-1.). Fließmittel 1 wird im Europäischen Arzneibuch am häufigsten verwendet. Die Chromatographie soll mit Kammersättigung durchgeführt werden.

**Tabelle 2-1. Im Europäischen Arzneibuch vorgeschriebene Fließmittel der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen von Aminosäuren.**

<b>Fließmittel</b>	<b>Monographien</b>	<b>Zusammensetzung</b>
1	Ala, Asp, Cys.HCl.H <sub>2</sub> O, (CysS) <sub>2</sub> , Glu, His, Ile, Leu, DL-Met, Met, Phe Pro, Ser, Thr, Trp, Val	20 VT Essigsäure 98 % R + 20 VT Wasser R + 60 VT 1-Butanol R
2	N-Acetyltryptophan	25 VT Essigsäure 98 % R + 25 VT Wasser R + 50 VT 1-Butanol R
3	Arg, Arg.HCl, Lys.HCl	30 VT konz. Ammoniak-Lösung R + 70 VT 2-Propanol R
4	Gly, Tyr	30 VT konz. Ammoniak-Lösung R + 70 VT 1-Propanol R
5	N-Acetyltyrosin	10 VT Wasser R + 15 VT Essigsäure 98 % R + 75 VT Ethylacetat R

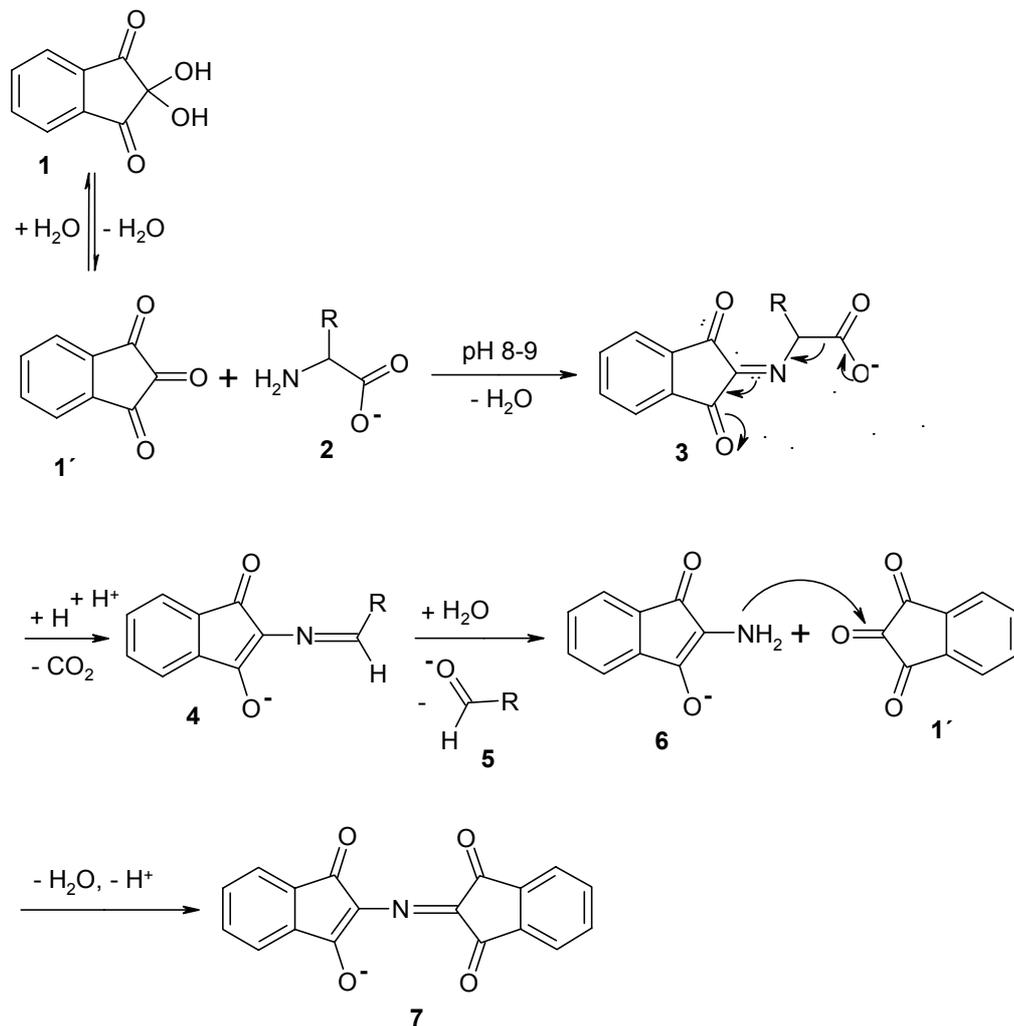
VT- Volumenteile

### 2.1.3. Detektion

Da die meisten Aminosäuren keine Chromophore besitzen, ist eine direkte Detektion (ohne Vorbehandlung) im UV- oder sichtbaren Bereich nicht möglich. Es ergibt sich daher die

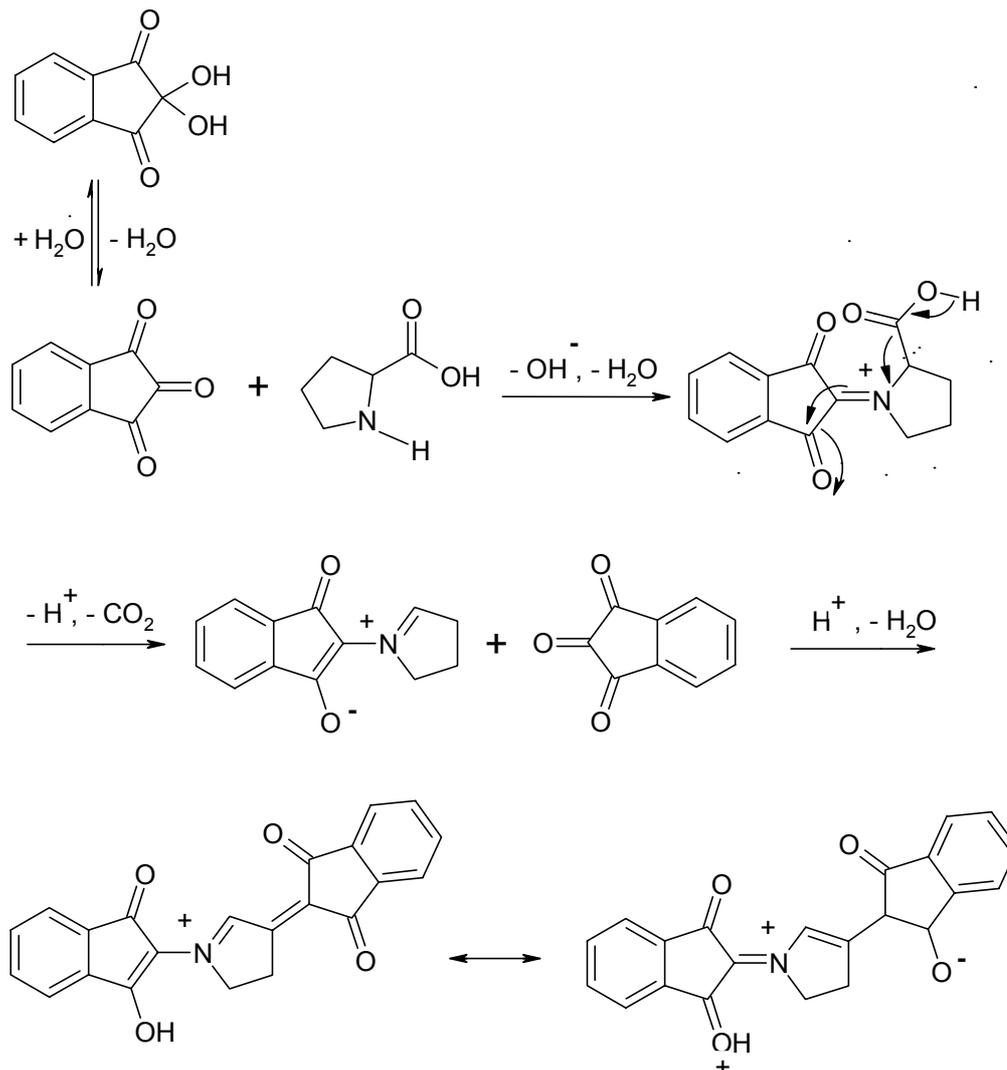
Notwendigkeit, diese nach der chromatographischen Entwicklung mit Hilfe eines geeigneten Sprühreagenzes sichtbar und damit das Chromatogramm auswertbar zu machen [6, 13]. Hierzu schreibt das Europäische Arzneibuch vor, die Platte nach der Entwicklung trocknen zu lassen. Bei den ammoniakhaltigen Fließmitteln wird nach der Entwicklung zusätzlich das Erhitzen auf 100 bis 105°C bis zum Verschwinden des Ammoniaks vorgeschrieben. Anschließend soll die Platte mit *Ninhydrin-Lösung R* besprüht und 15 min lang bei 100 bis 105°C erhitzt werden. Im Anschluss erfolgt die Auswertung der Platte am Tageslicht [34, 35]. Die Detektion der Aminosäuren beruht auf der bekannten Ninhydrin-Reaktion [6, 10, 17, 51, 52]. Bei einem pH-Wert von 8 bis 9 reagiert zuerst ein Molekül Ninhydrin (**1**) mit einem Aminosäuremolekül (**2**) unter Wasserabspaltung zur Schiffsbasis (**3**). Diese wird nach Decarboxylierung (Reaktionsprodukt **4**) zur Verbindung **6** und dem Aldehyd **5** hydrolysiert. Anschließend reagiert **6** mit einem weiteren Molekül Ninhydrin unter Wasserabspaltung und Deprotonierung zum blauviolett gefärbten Ruhemanns Violett (Reaktionsprodukt **7**) (Abb. 2-1)

Abb. 2-1



Für die Aminosäure Prolin (**8**) verläuft die Reaktion anders. Da hier kein primäres aliphatisches Amin vorliegt, sondern ein sekundäres, reagiert Prolin unter den gegebenen Versuchsbedingungen über den folgenden Reaktionsmechanismus zu dem gelb gefärbten Endprodukt [10] (Abb. 2-2).

Abb. 2-2



## 2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie

In der Literatur finden sich zahlreiche Vorschriften zur flüssigkeitschromatographischen Trennung von Aminosäuren, anhand derer sich sehr gut die Weiterentwicklung auf dem Gebiet der HPLC verfolgen lässt. So hat schon 1938 R. L. M. Synge zur Bestimmung der Aminosäuresequenz in Wollfasern eine Gegenstromapparatur entwickelt. Diese wurde später, um die Trennung zu verbessern, durch eine mit Kieselgel gefüllte Glassäule ersetzt. Der

Grundstein zu der heute gebräuchlichen säulenchromatographischen Trennung war gelegt [53].

Ältere Vorschriften liefern zumeist eine schlechte Trennung der Aminosäuren, eine geringe Empfindlichkeit und sind mit einem großen zeitlichen Aufwand verbunden [54, 55, 56].

Durch den gerätetechnischen Fortschritt wie z.B. die Verwendung von Gradientenpumpen, neuen Detektoren und kürzeren Säulen, die mit immer kleineren Teilchen gepackt sind, konnten die Analysenzeiten stark verkürzt und die Detektionsgrenzen deutlich herabgesetzt werden. Heute hat die Hochdruckflüssigchromatographie einen führenden Platz unter den sogenannten instrumentellen Trennungstechniken.

Mittlerweile werden in der Industrie sogenannte „Amino-Acid-Analyzer“ eingesetzt, bei denen die Derivatisierung und die flüssigkeitschromatographische Trennung der Aminosäuren vollautomatisch durchgeführt werden kann [57, 58, 59, 60].

Die sehr unterschiedlichen Verfahren zur chromatographischen Auftrennung der Aminosäuren können nach folgenden Kriterien klassifiziert werden:

- Isokratische oder Gradienten-Elution
- Ionen-, Reversed Phase- und chirale Chromatographie
- mit und ohne Derivatisierung der Aminosäuren; hierbei wird zwischen der Vor- und Nachsäulen-Derivatisierung unterschieden.

Im folgenden Kapitel werden diese unterschiedlichen Methoden ausführlich dargestellt und beurteilt.

### 2.2.1. Isokratische Trennung und Gradientenelution

Die Vorteile der isokratischen HPLC liegen zum einen in dem geringeren apparativen Aufwand, da mit einer Pumpe und konstantem Fluss gearbeitet werden kann. Für die Gradientenentwicklung sind mindestens zwei programmierbare Pumpen notwendig, um die Zusammensetzung der mobilen Phase während eines Laufes variieren zu können. Die Vorschriften zur Aminosäuretrennung mit isokratischer Entwicklung verlieren jedoch aufgrund der schlechten Trennergebnisse an Bedeutung [61]. Entweder sind die früh eluierenden Aminosäuren wenig bis gar nicht getrennt, oder die Chromatographie dauert so lange, dass die spät eluierenden Aminosäuren nur sehr breite, schlecht integrierbare Peaks liefern [53]. Trotzdem wird in einigen Fällen, z. B. in der Monographie „Acetylcystein“ im Europäischen Arzneibuch, eine isokratische Elution bevorzugt, nicht nur wegen der einfacheren instrumentellen Ansprüche, sondern auch wegen der prinzipiell besseren Reproduzierbarkeit der isokratischen Entwicklung.

Bei der Gradientenelution wird die Elutionskraft der mobilen Phase im Laufe der chromatographischen Trennung langsam erhöht [62]. Auf diese Weise versucht man ein Chromatogramm zu erhalten, bei dem die früh eluierenden Aminosäuren aufgrund der anfangs geringen Elutionskraft der mobilen Phase noch getrennt werden und die Aminosäuren, die bei isokratischer Trennung sehr spät eluieren, noch akzeptable Retentionszeiten aufweisen. Die Gradientenelution ist zwangsläufig fehleranfälliger und stellt deutlich höhere Ansprüche an die Leistungsfähigkeit der einzelnen Pumpen, was sich auch in dem damit verbundenen Mehraufwand bei der Validierung des HPLC-Systems zeigt. Ein weiterer Nachteil der Gradientenelution ist der häufig auftretende Drift der Basislinie. Sie wird durch die sich ändernde Zusammensetzung der mobilen Phase verursacht und kann zu erheblichen Fehlern bei der Integration führen. Dies gilt insbesondere für Niederdruckgradienten, weniger für Hochdruckgradienten. Aus diesen Gründen findet man bei der Gradientenelution oft eine schlechtere Reproduzierbarkeit sowohl bei den Retentionszeiten als auch bei den integrierten Flächen [53, 62].

Dank der großen Fortschritte im apparativen Bereich der HPLC in den letzten Jahren und aufgrund der besseren und schnelleren Auftrennung der Aminosäuren hat dennoch die Gradientenelution die isokratische Entwicklung fast vollständig verdrängt. Auch für den Einsatz im Europäischen Arzneibuch zur Prüfung auf Identität bzw. Reinheit von Tryptophan und N-Acetyltryptophan ist aus oben genannten Gründen die Gradientenelution vorgeschrieben.

### 2.2.2. Ionen-, Reversed Phase- und chirale Hochdruckflüssigchromatographie

Bei der chromatographischen Trennung kommen Ionen-, Reversed Phase- oder chirale Systeme zum Einsatz.

Unter dem Begriff Ionen-Chromatographie versteht man verschiedene chromatographische Techniken wie z.B. Ionenaustausch-Chromatographie (High Performance Ion Chromatography, HPIC), Ionenausschluss-Chromatographie (High Performance Ion Chromatography Exclusion, HPICE) und Ionenpaar-Chromatographie (Reversed-Phase Ion Pair Chromatography, RPIPC).

HPIC beruht auf einem Ionenaustausch-Prozess zwischen der mobilen Phase und den Austauschgruppen am Trägermaterial. Es handelt sich dabei üblicherweise entweder um Sulfonsäure-Gruppen (Kationenaustauscher) oder um quartäre Ammoniumgruppen (Anionenaustauscher). Es können Substanzen getrennt werden, die in stark polaren Eluenten wenigstens teilweise ionogen vorliegen. Die Trennung beruht auf den Affinitätsunterschieden der Ionen zu ihren Gegenionen an der Ionenaustauschermatrix und zu den im Eluenten

gelösten Ionen. Durch Änderung des pH-Wertes des Eluenten kann die Dissoziation der gebundenen bzw. der gelösten Ionenpaare beeinflusst werden. So gelingt z.B. die Trennung von Aminosäuren, die sich in ihren  $pK_a$ -Werten unterscheiden, durch Anwendung eines pH-Gradienten. Durch Veränderung der Ionenstärke der Pufferlösung kann das Austauschgleichgewicht verschoben werden. Eine Veränderung der Ionenstärke hat einen weitaus größeren Einfluss auf die Retentionsvolumina als eine Veränderung des pH-Wertes. Auch Ligandenaustauschreaktionen an mit Schwermetallionen beladenen Austauschern werden zur Trennung verwendet. Da hier nur die Komplexbildungstendenz des Ionenaustauscher-Metallions zur Trennung (z.B. von Aminosäuren an mit Kupferionen beladenen Austauschern) verwendet wird, handelt es sich um eine Ligandenaustausch-Chromatographie [63, 64]. Da es sich bei den Aminosäuren um sehr polare Substanzen handelt, liegt der Vorteil der Ionenaustauschchromatographie in der Möglichkeit, diese underivatisiert zu trennen [55, 56]. Nachteilig sind allerdings die oft sehr langen Analysenzeiten. Aufgrund der schlechten UV-Absorption der Aminosäuren tritt häufig das Problem der Detektion auf, so dass sich an die Ionenaustauschchromatographie in der Regel auch eine Derivatisierung (Nachsäulen-Derivatisierung) anschließt [65, 66, 67, 68, 69].

In der HPICE wird der Trennmechanismus durch Donnan-Ausschluss, sterischen Ausschluss und Sorption bestimmt. Als Trennphase dient ein total sulfonierter Kationenaustauscher hoher Kapazität auf der Basis Polystyrol/Divinylbenzol. Die Ionenausschluss-Chromatographie dient vor allem der Trennung von anorganischen und organischen Säuren geringer Säurestärke von den vollständig dissoziierten Säuren, die im Totvolumen als Summenpeak eluieren. Infolge des Donnan-Anschlusses werden vollständig dissoziierte Säuren von der stationären Phase nicht zurückgehalten und eluieren daher innerhalb der Totzeit als Summenpeak. Undissoziierte Verbindungen können dagegen in die Poren des Harzmaterials eindringen, da sie dem Donnan-Ausschluss nicht unterliegen. In diesem Fall basiert die Trennungen auf nicht-ionischen Wechselwirkungen zwischen den Soluten und der stationären Phase. Die Trennung von Aminosäuren an total sulfonierten Kationenaustauschern gehört bis zum heutigen Tag zu den am häufigsten angewendeten Methoden der Aminosäureanalytik. Als Amphotere können die Aminosäuren in Abhängigkeit vom pH-Wert anionisch, kationisch oder zwitterionisch vorliegen (Siehe Abb.1-1.). Je nach Struktur des Restes **R** unterscheidet man zwischen sauren, neutralen und basischen Aminosäuren (Siehe Tabelle 1.). In der kationischen Form können Aminosäuren mit den negativ geladenen Sulfonatgruppen des Kationenaustauschers in Wechselwirkungen treten. Bei sehr niedrigen pH-Werten werden die Aminosäuren stark an der stationären Phase zurückgehalten. Wird der pH des Eluenten

langsam angehoben, verlieren die Aminosäuren ihre positive Ladung je nach ihren  $pK_a$ -Werten und eluieren demzufolge sehr schnell mit dem Elutionsmittel, da sie nicht mehr zurückgehalten werden können.

Ionenpaar-Chromatographie ist eine willkommene Alternative der Ionenaustausch-Chromatographie, wenn es sich um Aminosäureanalytik handelt [70, 71, 72]. Da bei der Ionenpaar-Chromatographie die Selektivität der Trennung im Wesentlichen durch die Art der mobilen Phase bestimmt wird, können mit dieser Methode sowohl anionische als auch kationische Verbindungen getrennt werden. Gerade diese universelle Einsetzbarkeit ist es, die der Ionenpaar-Chromatographie zu ihrer heutigen Bedeutung verhalf. Bei dieser Technik können durch Hinzufügen lipophiler Ionen wie Alkylsulfonsäuren oder quartärer Alkylammoniumverbindungen zur mobilen Phase Solut-Ionen mit entgegengesetzter Ladung an einer chemisch gebundenen Umkehrphase getrennt werden. Wegen der stationären Phase hat sich für diese Technik die Bezeichnung „Reversed-Phase Ion Pair Chromatography“ (RPIPC) durchgesetzt.

Bei der Trennung mittels Reversed-Phase-Chromatographie müssen die Aminosäuren vorher derivatisiert werden (Pre-column-Derivatisierung), um ihre Polarität herabzusetzen. Hierbei handelt es sich um das bevorzugte Verfahren im Bereich der Aminosäureanalytik. Es gibt unzählige Vorschriften mit ganz unterschiedlichen Derivatisierungsreagenzien, die je nach Problemstellung eingesetzt werden.

Bei der chiralen Flüssigchromatographie gibt es zwei grundlegende Möglichkeiten, die D- und L-Enantiomere der Aminosäuren zu trennen. Zum einen kann mit chiralen stationären Phasen gearbeitet werden, an denen die Enantiomere entweder direkt (z.B. durch Trennung über Komplexbildung mit am Kieselgel gebundenem Kupfer-Prolin als chirale, stationäre Phase) [67] oder nach vorheriger Derivatisierung (z.B. mit Dansylchlorid und anschließender Trennung auf Cyclodextrin als chirale stationäre Phase) getrennt werden [73]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Aminosäuren mit einem chiralen Reagenz so zu derivatisieren, dass sie anschließend mit gebräuchlichen Reversed-Phase-Säulen getrennt werden können (z.B. Trennung nach Umsetzung der Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd und einem chiralen Thiol) [74, 75].

### 2.2.3. Derivatisierung

Es existieren zwar Möglichkeiten die Aminosäuren ohne Derivatisierung zu detektieren, wie z.B. mit Hilfe des neu entwickelten „light-scattering-detector“ [76, 77] oder mit Hilfe des polarimetrischen Detektors, der die optische Aktivität der Aminosäuren ausmisst. Die

Empfindlichkeit dieser Detektoren reicht aber kaum an die in der HPLC weit verbreiteten UV- und Fluoreszenz-Detektoren heran.

Bei der Derivatisierung der Aminosäuren wird üblicherweise ein aromatischer Rest eingeführt, der eine Detektion über UV-Absorption oder Fluoreszenz ermöglicht. Es muss aber betont werden, dass die Auswahl eines geeigneten Derivatisierungsreagenzes, besonders wenn es um Reinheitsprüfungen geht, mit einer Vielzahl von Anforderungen verbunden ist, welche im Kapitel 2.3. „Kapillarelektrophorese“ diskutiert werden. Dort werden auch die am häufigsten verwendeten Derivatisierungsreagenzien angegeben sowie der Mechanismus der jeweiligen Reaktionen. Hier sei nur angemerkt, dass sowohl eine Vorsäulen- als auch eine Nachsäulen-Derivatisierung möglich ist. Die Vorteile der Vorsäulen-Derivatisierung liegen im geringeren apparativen Aufwand und in den geringeren Einschränkungen bei den Reaktionsbedingungen. Nachteil sind die unter Umständen auftretenden zusätzlichen Peaks durch überschüssiges Reagenz nicht ausreichender Reinheit oder durch Artefaktbildung. Die Vorteile der Nachsäulen-Derivatisierung liegen in ihrer leichten Automatisierbarkeit, da ein kontinuierliches Verfahren vorliegt. Es treten in diesem Fall keine Störungen durch überschüssiges Reagenz oder durch Nebenprodukte auf. Es sind aber aufgrund des chromatographischen Prozesses einige Einschränkungen zu machen. Da sich die Derivatisierung direkt an den chromatographischen Prozess anschließt, ist z.B. das Lösemittel der Reaktion nicht frei wählbar, da die Substanz in der mobilen Phase gelöst vorliegt. Außerdem muss die Reaktion schnell genug, d.h. im Rahmen von Minuten erfolgen. Das schließt die Möglichkeit der Verwendung von Derivatisierungsreagenzien aus, deren Reaktionen mit den Aminosäuren mehr Zeit in Anspruch nehmen.

### 2.3. Kapillarelektrophorese

Die erste Trennung in einer offenen Glasröhre wurde von Hjerten [78] beschrieben, der die Stabilisierung der Lösung durch Rotation des Rohres um seine Achse erreichte. Die eigentliche Entwicklung der Kapillarelektrophorese begann mit den Pionierarbeiten von Mikkers und Everearts [79] gegen Ende der 70er Jahre und von Jorgenson und Lukacs [80, 81] zu Beginn der 80er Jahre. Seit 1988 gibt es käufliche CE-Apparaturen, was zum Einsatz der Kapillarelektrophorese in allen analytischen Bereichen führte. Die einzelnen Geräte zeigen kaum prinzipielle Unterschiede, da das eigentliche Trennsystem sehr einfach ist.

Unter dem Begriff Kapillarelektrophorese fasst man verschiedene Trenntechniken zusammen. Bei der *Kapillarzonenelektrophorese* (CZE), die ausschließlich in mit Elektrolyt gefüllten Kapillaren durchgeführt wird, beruht die Trennung auf den Mobilitätsdifferenzen der Analyten. Sie stellt das zur Zeit am häufigsten verwendete Verfahren in der Kapillar-

elektrophorese dar. Das Verfahren ähnelt der Elutionschromatographie, die Zonen wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Trennsystem und sind im Optimalfall voneinander durch den Elektrolyt getrennt.

Die Ionen bewegen sich im elektrischen Feld aufgrund ihres Masse/Ladungsverhältnisses. Dabei haben sie eine konstante Geschwindigkeit. Eine zunehmende Spannung und die damit wachsende Feldstärke führen stets zu einer Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  der Ionen und damit zu höheren Analysengeschwindigkeiten. Die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  der Ionen verbindet die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit  $u$  und die Feldstärke  $E$ :

$$u = \mu_{ep} \cdot E = \frac{L_{eff}}{M_t} \quad (1)$$

$u$ : Ionengeschwindigkeit

$\mu_{ep}$ : elektrophoretische Mobilität

$E$ : angelegtes elektrisches Feld

$L_{eff}$ : effektive Kapillarlänge (bis zum Detektor)

$M_t$ : Migrationszeit

Die entsprechende Mobilität  $\mu$  bei Anlegen einer Spannung ergibt sich aus folgendem Zusammenhang:

$$\mu_{ep} = \frac{L_{eff}}{M_t \cdot E} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{M_t \cdot U} \quad (2)$$

$E$ : Feldstärke

$L_{ges}$ : Gesamtlänge der Kapillare

$U$ : angelegte Spannung

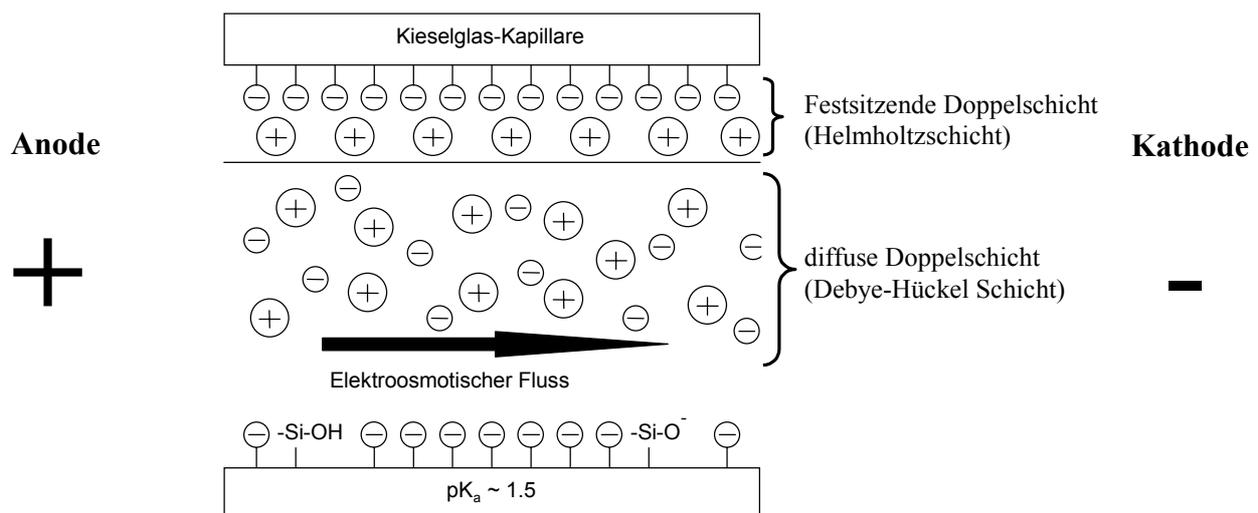
In unbehandelten Siliziumdioxid-Kapillaren setzt sich die zu beobachtende Gesamtmobilität  $\mu_{ges}$  aus folgenden Termen zusammen:

$$\mu_{ges} = \mu_{ep} + \mu_{EOF} \quad (3)$$

$\mu_{EOF}$ : elektroosmotische Mobilität

Da die Silanolgruppen an der Kapillarwand einen  $pK_a$ -Wert von  $\approx 1.5$  haben, tritt zur elektrophoretischen Mobilität ( $\mu_{ep}$ ) der Liganden ab pH-Werten von etwa 3.5 ein weiteres Phänomen hinzu, der sogenannte elektro- oder endosmotische Fluss (EOF) (Siehe Abb. 3.1). Er kommt dadurch zustande, dass die Silanolgruppen ab diesem pH-Wert nahezu vollständig deprotoniert sind. Da es sich bei der CE um ein geschlossenes System handelt, verbleiben die Protonen im System. An die nun negative Kapillaroberfläche lagern sich positiv geladene Ionen in einer starren (Helmholtz-Schicht) und einer beweglichen Schicht (Debye-Hückel-Schicht) an. Legt man nun ein elektrisches Feld an, so wandern die Kationen aufgrund ihrer Ladung zur Kathode und ziehen dabei durch ihre Hydrathüllen die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. Die meisten Moleküle wandern dann in eine einheitliche Richtung, selbst Anionen wandern in Richtung Kathode.

Abb. 2-3: Entstehung des EOF



Da die Wanderung der Ionen von der Kapillarwand ausgeht, wird die Reibung durch den EOF kompensiert. Daraus resultiert ein im Gegensatz zur HPLC stempelförmiges Strömungsprofil. Eine Peakverbreiterung durch Radialdiffusion kann daher nicht auftreten.

Der EOF trägt nur aktiv zum Transport der Probenzonen, nicht aber zur Trennung der Teilchen bei. Wie aus den obigen Ausführungen zu ersehen, ist seine Stärke abhängig vom verwendeten pH-Wert des Trennelektrolyten und auch von dessen Ionenstärke. Mit steigendem pH-Wert nimmt der EOF ebenso zu wie mit abnehmender Ionenstärke.

Damit stellen diese beiden Parameter wichtige Komponenten bei der Entwicklung von Trennmethoden dar.

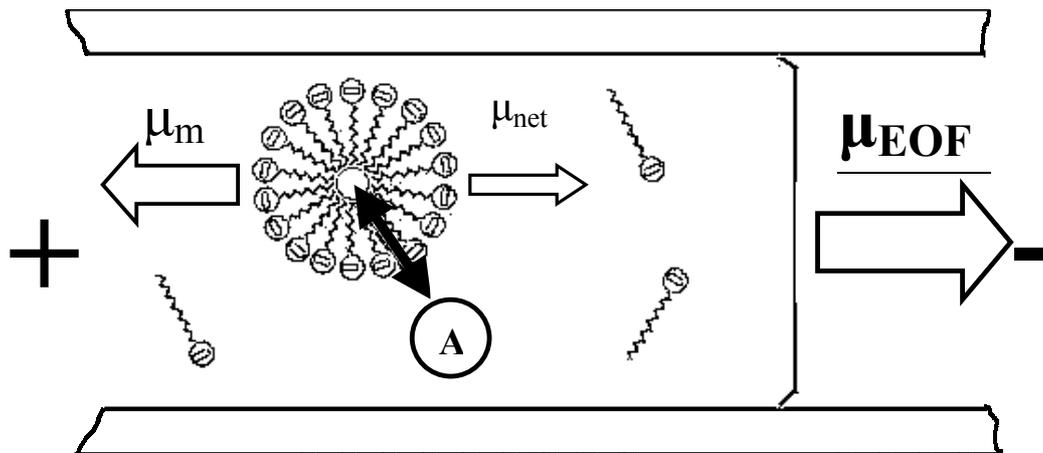
Gegenüber der HPLC weist die CE durch eine geringere Trennstufenhöhe und den Wegfall des Massentransferterms eine sehr hohe Trenneffizienz auf, wobei nur geringe Volumina an Probe und Selektor - der Verbrauch liegt in der Regel im Nanoliter-Bereich - benötigt werden. Die Trennmedien können schnell gewechselt werden, da nur der Trennelektrolyt verändert werden muss.

Bei der *Kapillargelelektrophorese* (CGE) ist die Kapillare mit einer Polymerlösung oder einem Gel gefüllt. Die elektrophoretische Migration von Makromolekülen ist durch die Gelmatrix behindert. Der Transport der Probe durch die Kapillare beruht auf der Ladung der Makromoleküle, die Trennung ist von der Molekülgröße abhängig.

Ungeladene Moleküle können mittels *micellarer elektrokinetischer Chromatographie* (MEKC) getrennt werden. Diese Trenntechnik wurde zum ersten Mal von Terabe zur Trennung von derivatisierten und nativen Aminosäuren 1984 eingesetzt [82]. Dem Puffer werden Detergenzien zugesetzt, die neutralen Analyte verteilen sich zwischen Puffer und den Micellen nach ihrer Hydrophobie. Die Trennung beruht auf der Mobilität der meist negativ geladenen Micellen und dem Transport der Proben außerhalb der Micellen mit dem elektroosmotischen Fluss (EOF). Dabei handelt es sich um einen Verteilungsprozess, so dass es sich in diesem Fall um ein chromatographisches Verfahren handelt. Auch hier sind die Proben durch Elektrolyte voneinander getrennt. Der Trennbereich liegt zwischen der Wanderung der Verbindungen, die sich nicht in der Micelle aufhalten, also mit dem EOF wandern, und denen, die permanent in der Micelle eingeschlossen sind (Siehe Abb. 2-4). Moleküle verteilen sich nach ihrer Polarität in- und außerhalb der Micellen. Verschiedene Moleküle werden durch unterschiedliche Affinität zu den Micellen getrennt. Es findet Retention in der verlangsamt, als pseudostationär bezeichneten micellaren Phase statt.

In der MEKC wird in der Regel so gearbeitet, daß der Betrag der elektrophoretischen Mobilität der Micellen  $\mu_m$  kleiner ist als der Betrag der elektroosmotischen Mobilität  $\mu_{EOF}$  ( $\mu_m < \mu_{EOF}$ ), d.h. die resultierende Wanderungsmobilität der Micellen  $\mu_{net}$  ist mit der Bewegungsrichtung des EOF identisch. Als Beispiel für das am häufigsten verwendete micellenbildende Reagenz kann das Natriumdodecylsulfat genannt werden. Es handelt sich um ein typisches anionisches micellenbildendes Reagenz, dessen kritische micellbildende Konzentration 8,2 mM und Aggregationszahl 62 sind. MEKC wird nicht nur erfolgreich angewandt, wenn es sich um die Trennung ungeladener Analyten handelt, sondern auch bei geladenen Substanzen und zwar mit dem Ziel der Erhöhung der Trennleistung des elektrophoretischen Systems. Ein prominentes Beispiel dafür sind die Aminosäuren, die nach der Derivatisierung am häufigsten mittels MEKC getrennt werden.

Abb. 2-4: Micellare elektrokinetische Chromatographie



Nicht unerwähnt sein soll, dass es noch andere spezifische Trenntechniken in der Kapillarelektrophorese gibt: die *isoelektrische Fokussierung* (IEF), bei der die Auftrennung in einem pH-Gradienten erfolgt; die *Elektrochromatographie* (EC), bei der stationäre Phasen der HPLC verwendet werden und die Strömung des Eluenten und der Transport der Proben durch den EOF allein oder auch in Kombination mit Druck erzielt werden; die *Isotachophorese* (ITP), die am häufigsten zur Probenaufkonzentration verwendet wird.

Die Kapillarelektrophorese wird heute häufig in der chiralen Analytik [83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94] sowie im Bereich der Arzneistoffanalytik eingesetzt. In den letzten Jahren wurde immer wieder diskutiert, ob die Kapillarelektrophorese für diesen Bereich wirklich geeignet ist [95, 96]. Seit 2001 ist sie im Europäischen Arzneibuch als offizielle instrumentelle Methode beschrieben. Der erste Einsatz der Kapillarelektrophorese findet sich in der Monographie „*Levocarbastinhydrochlorid*“ bei der Prüfung auf verwandte Substanzen. Zum heutigen Zeitpunkt wird die Zahl der veröffentlichten Artikel, die CE-Methoden für Reinheitsprüfungen, Gehaltsbestimmungen, Stabilitätsuntersuchungen, Freisetzungstests für Wirkstoffe sowie für Arzneiformen beschreiben, in hunderten gemessen [97, 98, 99, 100, 101]. K. Altria zeigt systematisch an ausgewählten Beispielen die Anwendung der Kapillarelektrophorese in der Arzneistoffanalytik auf [102].

Obwohl Aminosäuren oft ein Objekt der Untersuchungen in der Kapillarelektrophorese sind, muss bemerkt werden, dass sich nur eine geringe Zahl der Publikationen mit ihrer Quantifizierung oder mit der Bewertung ihrer Reinheit befasst. Die Kapillarelektrophorese wird zur Trennung und Quantifizierung von N-Acetylcystein und dessen Verwandten Substanzen unter 0,1 % [103, 104] und zur Untersuchung der Enantiomeren-Reinheit von Tryptophan im Spurenbereich verwendet [85, 105].

Das Problem der Reinheitsuntersuchungen der Aminosäuren liegt in der Detektion. In den oben genannten Beispielen von N-Acetylcystein und Tryptophan handelt es sich um UV-Detektion. Es ist aber klar, dass eine solche Detektion nicht bei allen Aminosäuren aufgrund der Tatsache angewendet werden kann, dass sie mit wenigen Ausnahmen keine Chromophore in ihrer Struktur besitzen.

### 2.3.1. Detektion

Die Detektion erfolgt in der CE in den meisten Fällen direkt in der Trennkapillare (*on-line*), nur in den seltensten Fällen, z.B. bei der Kopplung der CE mit einem Massenspektrometer oder mit einem amperometrischen oder Leitfähigkeitsdetektor, erfolgt die Detektion außerhalb der Trennkapillare. Im Gegensatz zur Chromatographie, bei der die Wanderungsgeschwindigkeit aller Komponenten der Probe durch den Detektor gleich ist, wandern die zu untersuchenden Substanzen in der CE mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Detektionsfenster und zwar, um so größer die absolute Migrationszeit ist, desto langsamer wandern sie durch das Fenster. Bei der quantitativen Auswertung über die Peakflächen ist deshalb die unterschiedliche Verweilzeit der Proben im Detektorfenster zu berücksichtigen. Normalerweise wird die Auswertung über die korrigierten Peakflächen gemacht, wobei die Peakflächen durch die Migrationszeit dividiert werden. Bei der CE, besonders wenn es sich um hydrodynamische Injektion handelt, wie auch bei der HPLC wird die Verwendung eines inneren Standards empfohlen, damit die Injektionsfehler kompensiert werden können. Mit dieser Technik wird eine bedeutende Verbesserung der Reproduzierbarkeit bei den quantitativen Untersuchungen und eine relative Standardabweichung einer Analysenreihe unter 2 % erreicht.

#### 2.3.1.1. UV-Detektion

Die am häufigsten verwendeten Detektoren sind modifizierte HPLC-Detektoren zur Messung der UV-Absorption. Um Effizienzverluste durch Vermischungseffekte außerhalb der Kapillare zu vermeiden, erfolgt die Detektion direkt in der Kapillare. Wegen der geringen Schichtdicke (mittlerer Kapillarinne Durchmesser) werden hohe Anforderungen bezüglich Empfindlichkeit, Rauschen, Streulichteinfluss etc. an die Detektoren gestellt. Typische Bandbreiten der Zone in der Kapillare liegen bei etwa 5 mm, was einem Volumen von 10 nL in einer 50 µm dicken Kapillare entspricht.

Eine wichtige Größe ist die Konzentrationsempfindlichkeit. Diese ist, bedingt durch den kurzen Absorptionsweg, eher bescheiden. Verglichen mit der HPLC werden bei der UV-

Detektion in der CE 30 bis 100fach geringere Empfindlichkeiten gefunden. Diese hängen bei querdurchstrahlten Kapillaren neben der effektiven Schichtdicke, die von der nominellen Schichtdicke (Kapillarinne Durchmesser) nach unten hin abweicht auch vom Detektorrauschen ab. Die Detektionsempfindlichkeit kann aber durch sogenanntes „Sample stacking“ erhöht werden, was einer Probenkonzentrierung gleichkommt [106, 107, 108, 109]. Konzentrierungs-effekte werden erhalten, wenn man mit diskontinuierlichen Puffersystemen arbeitet. Im einfachsten Fall wird die Probe aus einer rein wässrigen Lösung injiziert. Durch die Unterschiede in der Leitfähigkeit zwischen Puffer und Probenlösung werden die Proben zuerst bis zur Grenzfläche zwischen Puffer und Probenlösung mit einer hohen Feldstärke beschleunigt, wandern aber nach Eintritt in den Pufferbereich in der dort niedrigeren Feldstärke langsamer weiter. Liegt keine Probenlösung mit hohem Widerstand vor, so kann vor der eigentlichen Probenaufgabe ein Wasserpfropfen in die Kapillare injiziert werden. Der Spannungsabfall ist über dem „Nichtleiter“ Wasser so hoch, dass die nachfolgende Probenzone im dort vorliegenden, wesentlich höheren Feld aufkonzentriert wird. Es gibt auch andere Spezialtechniken zur Aufkonzentrierung der Probe wie die *Isoelektrische Fokussierung* [110] und die *Isotachophorese* [111, 112]. Prinzipiell kann gesagt werden, dass die Aufkonzentrierung der Probe sehr wichtig ist, und zwar nicht nur, wenn es sich um UV-Detektion handelt, sondern auch ganz allgemein. Zum großen Teil wird die Empfindlichkeit der jeweiligen CE-Methode von den richtig ausgewählten Bedingungen zur Probenaufnahme und Proben-aufkonzentrierung bestimmt. Im Allgemeinen kann diese Empfindlichkeit 10-1000fach erhöht werden, was einer jeweiligen 10-1000fachen Erniedrigung der Nachweisgrenze entspricht. Auf diese Weise kann die niedrigere Empfindlichkeit der CE im Vergleich zur HPLC kompensiert werden.

Es existieren viele Versuche zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit bei der UV-Detektion in der Kapillarelektrophorese durch Vergrößerung der Detektionsschichtdicke. Neben dem Einsatz von rechtwinklig geformten Kapillaren wurde auch versucht, die aus der Mikro-HPLC bekannten Z-Zellen in der Kapillarelektrophorese zu verwenden. Außerdem konnte durch Aufweitung der Kapillaren an der Detektionsstelle die Nachweisempfindlichkeit verbessert werden. Der Einsatz von rechtwinkligen Kapillaren kann die Detektion im günstigsten Fall um das 10-fache verbessern. Ein praktischer Nutzen dieser Verbesserung konnte wegen starker Probleme bei der Injektion und Blasenbildung in den Ecken nicht erzielt werden. Der Einsatz der einfachen Z-Zellen brachte in der Kapillarelektrophorese direkt keine Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit, da neben dem Signal auch das Rauschen durch das Streulicht stark anstieg. Durch Einsatz einer Kugellinse an der Stelle der Lichtquelle

direkt vor dem Knick der Kapillare kann das Streulicht minimiert werden [113]. Dadurch kann bei einer Z-Zelle mit einer Länge des Lichtweges von 3 mm eine Verbesserung der Empfindlichkeit um den Faktor 11 erzielt werden. Das hat aber sicherlich einen Einfluss auf die Effizienz und damit auf die Auflösung von Probenzonen, besonders, wenn innerhalb kurzer Analysenzeiten hohe Effizienzen erzielt werden. Ein Peak, der nach 5 Minuten mit einer Bodenzahl von 500.000 an der Stelle der Detektion vorbeiwandert, nimmt in der Kapillare eine Länge von ca. 1 mm ein. Dies zeigt deutlich die Diskrepanz zwischen Peak- und Detektionsvolumen bei diesen Z-Zellen. Dieses Problem ist weniger relevant bei den Kapillaren mit blasenförmigen Detektionszellen („bubble“), da das Peakvolumen beim Durchwandern der Detektorzelle annähernd konstant bleibt, die Peaklänge in der Kapillare damit aber kürzer wird.

Wie bereits erwähnt wurde, ist die begrenzte Anwendung der UV-Detektion in der Aminosäureanalytik ohne Derivatisierung durch die spektralen Eigenschaften der Aminosäuren sowie des größten Teils der erwarteten Verunreinigungen wie andere Aminosäuren, Peptide und Aminosucker, bedingt. Die Möglichkeiten zur Derivatisierung dieser Stoffgruppen sind in Kapitel „Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion“ beschrieben. Nur Nucleinsäuren als potentielle Verunreinigungen in Aminosäuren aus biotechnologischer Produktion können direkt, d.h. ohne Derivatisierung, bei 260 nm detektiert werden, da diese bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum haben.

#### 2.3.1.2. Elektrochemische Detektion

Leitfähigkeitsdetektion und auch andere elektrochemische Detektionstechniken bieten sich an, sind aber derzeit noch nicht kommerziell erhältlich. Die genaue Justierung der Elektroden am Kapillarende ist sehr schwierig und verhindert derzeit noch den praktischen Einsatz außerhalb von Forschungslabors. Bei der Leitfähigkeitsdetektion stellt sich das Problem, dass neben der Grundleitfähigkeit des Elektrolyten die nur geringfügig höhere Leitfähigkeit in der Substanzzone bestimmt wird. Im Allgemeinen sind diese Detektoren sehr empfindlich gegenüber Umgebungsbedingungen, was mit Schwierigkeiten beim Erreichen von befriedigenden Reproduzierbarkeiten verbunden ist.

#### 2.3.1.3. Laserinduzierte Fluoreszenzdetektion (LIF-Detektion)

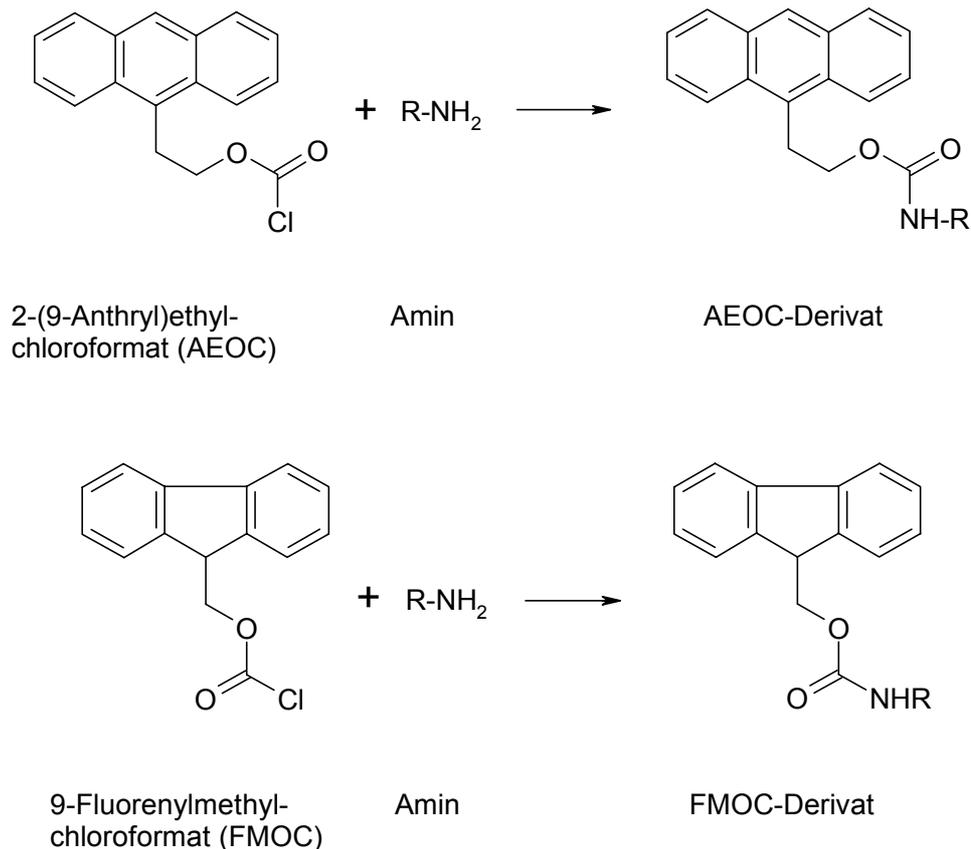
Selbstverständlich lassen sich in UV-inaktiven und nicht fluoreszierenden Proben wie dem größten Teil der Aminosäuren sowie ihrer potentiellen Verunreinigungen Peptide und Aminosucker mit den bekannten Derivatisierungsreagenzien vor der Trennung Chromophore

oder Fluorophore einführen. Es soll erwähnt werden, dass in vielen der Fälle neben dem Chromophor/Fluorophor gleichzeitig die entsprechenden Ladungen für eine erfolgreiche Trennung mit eingeführt werden. Das Prinzip der LIF-Detektion ist wie folgt.

Als Ergebnis der Derivatisierungsreaktion weist die Struktur der Probe einen Chromophor/Fluorophor auf. Nach dessen Anregung bei einer bestimmten Wellenlänge, meistens über 300 nm, fangen die derivatisierten Moleküle an zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz wird durch den Detektor bei ihrem Maximum gemessen. Zur Anregung werden neben den gebräuchlichen Deuterium- und Xenon-Blitzlampen auch Lasersysteme verwendet, wobei die Anregung hier im sichtbaren Wellenlängenbereich erfolgt. Entscheidend in der Wahl einer geeigneten Anregungsquelle sind die spektralen Eigenschaften der zu derivatisierenden Stoffe, d.h. der entsprechende Laser muss so gewählt werden, dass seine Arbeitswellenlänge im Bereich des Maximums der zu untersuchenden Derivate liegt. Weiterhin ist die Auswahl eines geeigneten Derivatisierungsreagenzes mit der Natur der untersuchenden Stoffe sowie mit dem Charakter des eigentlich zu lösenden Problems verbunden. In unserem Fall, wo es sich um Reinheitsuntersuchungen mit einer Quantifizierungsgrenze von 0,1 % handelt, muss das Derivatisierungsreagenz einigen spezifischen Bedingungen genügen. Erstens müssen die bei der Derivatisierungsreaktion erhaltenen Produkte entweder im UV-/Vis-Bereich absorbieren oder fluoreszieren. Ein Vorteil wäre, wenn das Derivatisierungsreagenz allein nicht absorbiert/fluoresziert oder mindestens nicht bei der Wellenlänge, bei der die Reaktionsprodukte absorbieren bzw. fluoreszieren. Zweitens muss das Derivatisierungsreagenz in hoher Reinheit verfügbar sein. Als Kompromiss kann es eine kleine Anzahl von Verunreinigungen aufweisen, die von den Analyten abtrennbar und viel kleiner als das 0,1%-Niveau sind. Das gleiche gilt auch für die Nebenprodukte der Reaktion. Optimalerweise sollten keine Nebenprodukte entstehen oder als Kompromiss nur eine kleine Anzahl trennbare Nebenprodukte, die die Auswertung des Elektropherogrammes nicht stören. Die Reinheit des Reagenzes ist von größter Bedeutung, da alle Derivatisierungsreaktionen normalerweise mit einem 10 bis 100fachen Überschuss des Reagenzes durchgeführt werden. Die Existenz einer großen Anzahl von Verunreinigungen des Reagenzes und von Nebenprodukten der Reaktion, besonders wenn sie sich auf einem ziemlich hohen Niveau befinden, würde die Auswertung des Elektropherogramms erschweren oder gar unmöglich machen, da sie einen großen Teil der Grundlinie überdecken würden. Drittens, das Derivatisierungsreagenz muss stabil sein und quantitative Derivatisierung der Analyten sicherstellen. Viertens und letztens müssen die erhaltenen Derivate genügend stabil sein, d.h. nicht während der Analyse zerfallen.

Die am häufigsten verwendeten Reagenzien zur Derivatisierung von Aminosäuren und Peptiden sind zusammen mit Daten zu den Bedingungen der Derivatisierungsreaktionen, Detektionsmöglichkeiten und Literaturstellen in der Tabelle 2-2. angegeben. Im folgenden sind die entsprechenden Derivatisierungsreaktionen mit einem kurzen Kommentar bezüglich ihrer Vor- und Nachteile zusammengestellt.

*2-(9-Anthryl)ethylchloroformat (AEOC) und 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC)*



2-(9-Anthryl)ethylchloroformat und 9-Fluorenylmethylchloroformat sind Derivatisierungsreagenzien vom Chloroformattyp. Die Reaktionsbedingungen für beide Derivatisierungsreagenzien sind simpel (siehe Tabelle 2-2.) und die entstehenden Derivate sehr stabil. Beide Reagenzien haben ausgezeichnete spektrale Eigenschaften, wobei AEOC eine stärkere UV-Absorption und Fluoreszenz aufweist [114]. Eine ca. 5fach höhere Empfindlichkeit der AEOC-Aminosäuren ist im Vergleich zu FMOC-Aminosäuren bei Verwendung von LIF-Detektion nach Anregung mit einem Argon-Ion-Laser erzielt worden. Beide Reagenzien reagieren sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminen. Das überschüssige Reagenz hydrolysiert relativ schnell und es kann zusammen mit seinem Hydrolyseprodukt (FMOC-OH bzw. AEOC-OH) mit n-Pentan extrahiert werden.

Tabelle 2-2. Reagenzien zur Derivatisierung von Aminosäuren und Peptiden

Reagenz	Reaktions- bedingungen	Stabilität der Derivate	Fluoreszenz des Reagenzes	$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ (nm)* UV $\lambda_{\text{max}}$ (nm)**	Laser, Anregungs- wellenlänge, nm	Nachweisgrenze, Bereich	Literatur
AEOC	RT***/5 min	stabil	hoch (Zersetzungs- produkt)	348/366 256	Argon-Ion, 351	amol	[114]
AQC	50 °C/10 min	stabil	hoch	360/395 214/254		fmol	[115, 116, 117]
CBQCA	RT/10 h****	stabil	keine	450/550	Argon-Ion, 488	zmol	[118, 119, 120, 121, 122, 123, 124]
NBD-F	60 °C/ min	stabil	hoch	488/520	Argon-Ion, 488	fmol	[125, 126, 127]
NDA	RT/30 min	stabil	keine	442/490	He-Cd, 442	amol	[128, 129, 130, 131, 132, 133, 134]
DNS-Cl	RT/120 min	stabil	hochfluoreszierendes Zersetzungsprodukt	360/570 214, 254, 256	He-Cd, 325	fmol	[135, 136, 137, 138, 139, 140, 141]
FS	RT/s	stabil	keine	390/475	Pulsed Diode, 355	fmol	[142, 143]

Tabelle 2-2. Reagenzien zur Derivatisierung von Aminosäuren und Peptiden (Fortsetzung)

Reagenz	Reaktions- bedingungen	Stabilität der Derivate	Fluoreszenz des Reagenzes	$\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ (nm)* UV $\lambda_{\text{max}}$ (nm)**	Laser, Anregungs- wellenlänge, nm	Nachweisgrenze, Bereich	Literatur
<b>FITC</b>	RT/über Nacht	stabil	hochfluoreszierende Reagenz	488/520	Argon-Ion, 488	zmol-amol	[128, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151]
<b>FMOC</b>	RT/1-2 min	stabil	hoch	265/310 256	Argon-Ion, 351	fmol-amol	[152, 153, 154, 142, 155, 156, 157]
<b>OPA</b>	RT/1 min .	unstabil	keine	340/475 260	He-Cd, 325	amol	[128, 134, 142, 158]
<b>PTH</b>	RT/5 min			254			[136, 137, 159, 160]

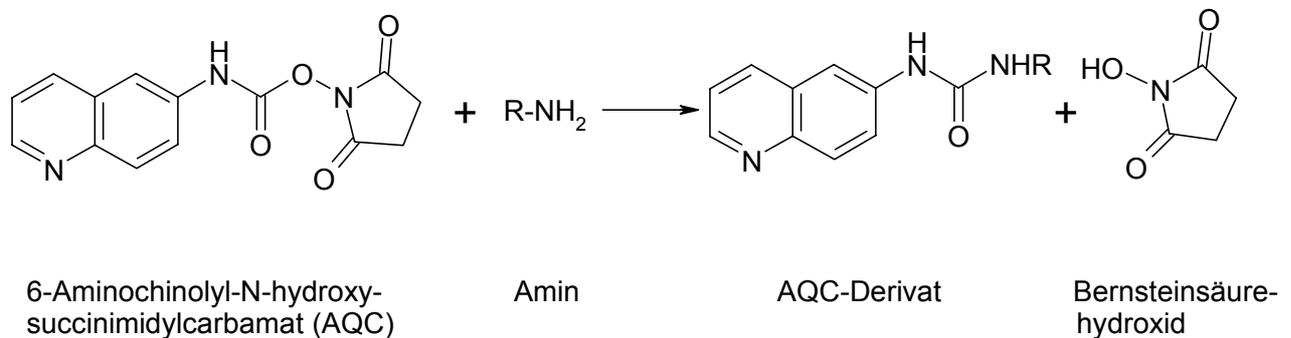
\* LIF-Detektion

\*\* UV-Detektion

\*\*\* Raumtemperatur

\*\*\*\* nach eigener Untersuchungen

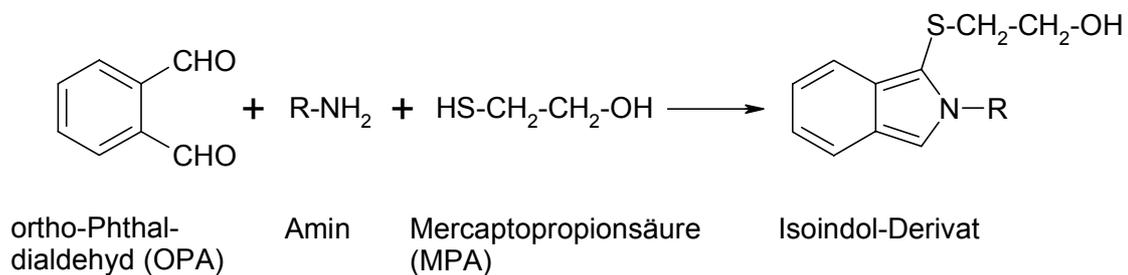
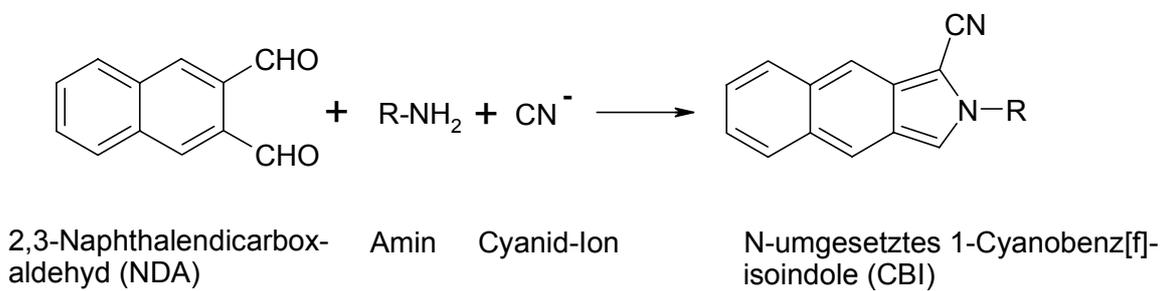
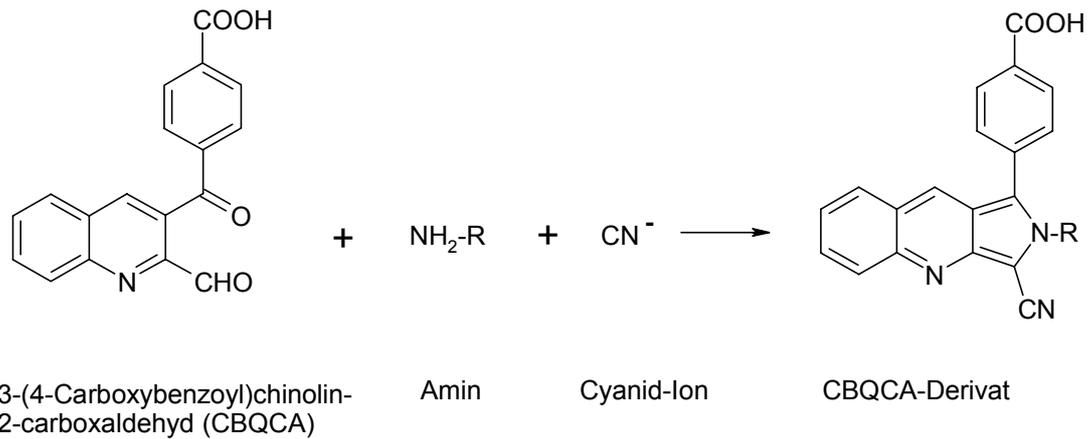
**Abkürzungen:****AEOC**- 2-(9-Anthryl)ethylchloroformat**AQC**- 6-Aminochinoly-N-hydroxysuccinimidylcarbamate**CBQCA**- 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd**NBD-F**- 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol**NDA**- 2,3-Naphthalendicarboxyaldehyd**DNS-Cl**- 5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylchlorid**FS**- Fluorescamin**FITC**- Fluoresceinisothiocyanat**FMOC**- 9-Fluorenylmethylchloroformat**OPA**- ortho-Phthaldialdehyd**PTH**- Phenylthiohydantoin

*6-Aminochinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate (AQC)*

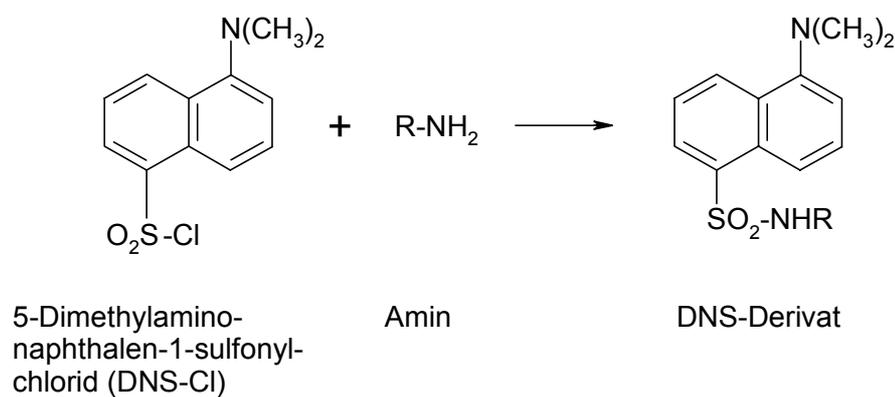
Bei der Umsetzung mit 6-Aminochinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate handelt es sich um eine der neueren Derivatisierungsmethoden. Entwickelt wurde sie 1993 von S. A. Cohen und D. P. Michaud [115]. Hierbei werden sowohl primäre als auch sekundäre Amine erfasst. Die fluoreszierenden Derivate entstehen in wenigen Minuten, aber auch der Reagenzüberschuss hydrolysiert innerhalb von 2 min zu 6-Aminochinolin. Die Reaktion wird bei 50°C durchgeführt. Die Derivate sind stabil.

*3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd (CBQCA), 2,3-Naphthalendicarboxaldehyd (NDA) und ortho-Phthaldialdehyd (OPA)*

Alle drei Reagenzien bilden mit primären Aminen hochfluoreszierende Isoindolderivate. Bei der OPA-Reaktion können verschiedene Mercaptane eingesetzt werden. Von der Natur des konkret eingesetzten Mercaptanes ist die Stabilität der Derivate abhängig. Im Allgemeinen sind sie aber instabil und photosensitiv. Bei den anderen zwei Reaktionen nimmt an Stelle der Thiolkomponente das Cyanid-Ion teil. Diese zwei Reaktionen, besonders die CBQCA-Reaktion, erfordern längere Zeit, aber die erhaltenen Derivate sind stabil und haben eine ausgezeichnete Spektralcharakteristik. Die CBQCA- und NDA-Derivate haben ihre Absorptionsmaxima bei höheren Wellenlängen (>440 nm), d.h. dass bei der Durchführung einer LIF-Detektion die Grundlinie ruhiger wird, was das Erreichen einer mehrmals niedrigeren Nachweis- bzw. Quantifizierungsgrenze ermöglicht. Der gemeinsame Vorteil der drei Reagenzien ist, dass sie allein nicht fluoreszierend sind, d.h. dass ihr Überschuss bei der Detektion der Derivate nicht stören wird.

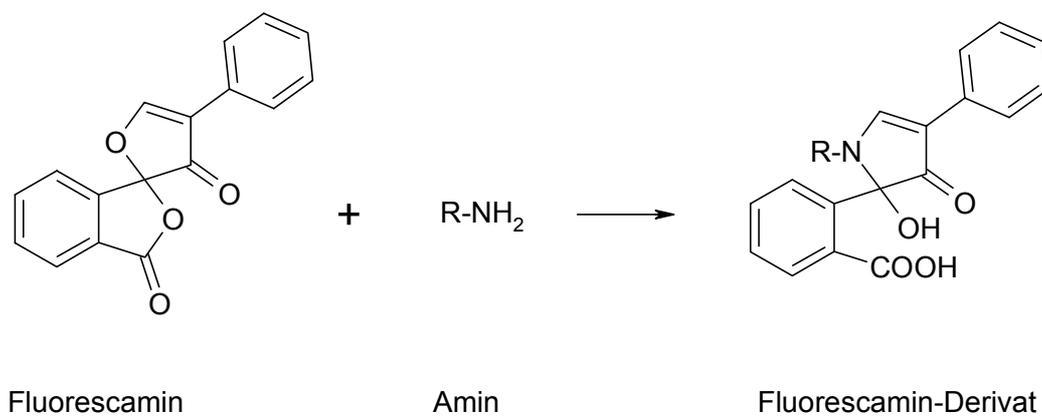


*5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylchlorid* (Dansylchlorid, DNS-Cl)



5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylchlorid ist eines der ältesten Reagenzien, das zur Derivatisierung der Amine angewendet wird. Ursprünglich wurde Dansylchlorid bei der Endgruppenbestimmung von Peptiden und Proteinen eingesetzt. 1981 wurde es erstmals zur Aminosäureanalytik verwendet. Es reagiert mit primären und sekundären Aminen zu stark fluoreszierenden Derivaten. Die Reaktion braucht relativ lange Zeit und läuft nicht vollständig ab. Während der Reaktion zersetzt sich das Reagenz zu einem hoch-fluoreszierenden Produkt, der 5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonsäure.

### *Fluorescamin*

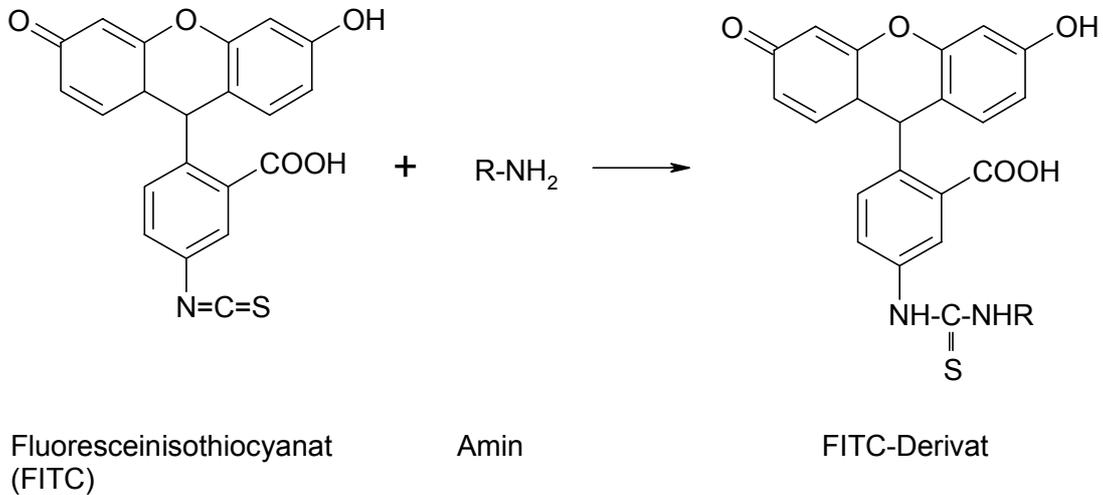


Diese Reaktion verläuft in wenigen Millisekunden. Das Reagenz ist nicht fluoreszierend, was es geeignet für die Vorsäulen- sowie für die Nachsäulen-Derivatisierung macht. Wegen der geringen Stabilität der erhaltenen Derivate sowie wegen der relativ hohen Nachweisgrenzen ist dieses Reagenz in der quantifizierenden Aminosäureanalytik nicht sehr populär.

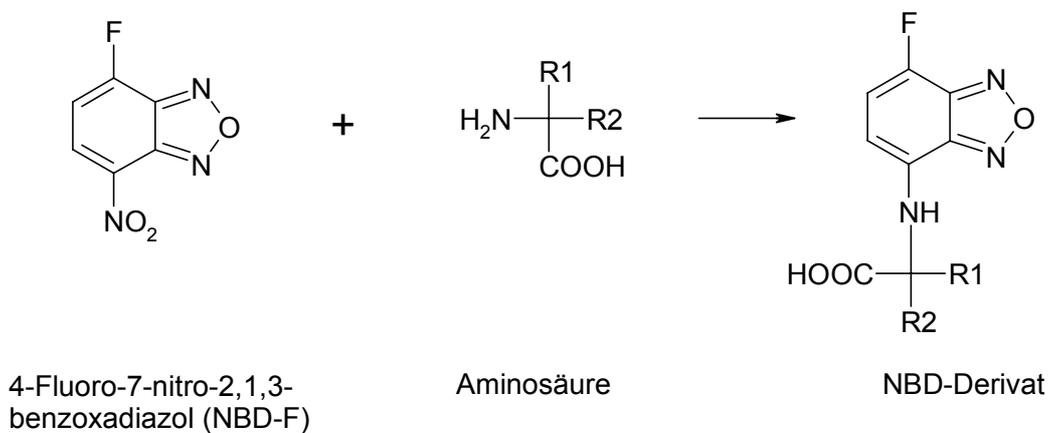
### *Fluoresceinisothiocyanat (FITC)*

Fluoresceinisothiocyanat sichert eine sehr hohe Detektionsempfindlichkeit (zmol Bereich). Vorteile sind seine Fähigkeit mit primären als auch mit sekundären Aminen zu reagieren sowie seine Anwendung in Kombination mit dem populären Argon-Ion-Laser (488 nm) als Anregungsquelle. Nachteil ist das Vorhandensein von vielen Verunreinigungen und Nebenprodukten der Derivatisierungsreaktion, welche die Auswertung der Elektropherogramme schwieriger machen, besonders wenn es sich um Analysen im Spurenbereich handelt. Das Problem kommt daher, dass das Reagenz in einem großen Überschuss eingesetzt werden muss, damit die Reaktion quantitativ abläuft. Wie in Kapitel 3 diskutiert wird, führten die Versuche zur Reinigung des Reagenzes durch Umkristallisation sowie die Versuche zur

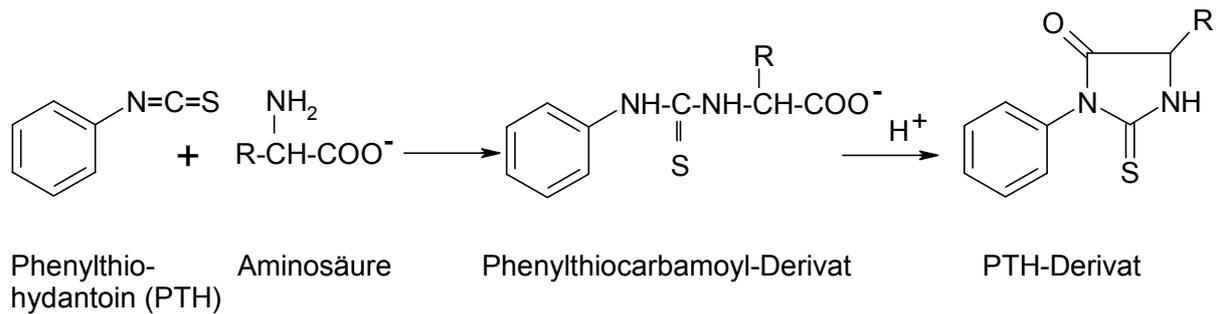
Optimierung der Trennbedingungen, mit Ziel möglichst weniger Reagenzpeaks zu erhalten, zu keinen positiven Ergebnissen.



#### 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F)



4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol ist auch zur Arbeit mit dem populären Argon-Ion-Laser (488 nm) geeignet. Die Derivatisierungsreaktion wird bei höheren Temperaturen (60°C) durchgeführt und die Reaktionszeit ist relativ kurz (ca. 1 Stunde). Die Derivate haben zwar hohe Responsfaktoren, aber auch Reagenzpeaks, die einen großen Teil der Grundlinie überdecken, was wie im Fall von FITC die Auswertung der Elektropherogramme erschwert. Damit die Reaktion quantitativ abläuft, muss das Reagenz auch hier in einem großen Überschuss eingesetzt werden.

*Phenylthiohydantoin (PTH)*

Die Reaktion ist relativ schnell. Hierbei reagieren primäre und sekundäre Amine zu den relativ stabilen Phenylthiocarbamoyl-Aminosäuren. Nach Abschluss der Reaktion muss das Reaktionsgemisch im Hochvakuum getrocknet werden, bevor der Rückstand in einem geeigneten Lösemittel aufgenommen wird. Durch Säurebehandlung werden die Phenylthiocarbamoyl-Aminosäuren in Phenylthiohydantoin-Aminosäuren überführt. Die Detektion erfolgt photometrisch meist bei einer Wellenlänge von 254 nm. Aber auch hier existiert das Problem der Vielzahl von unerwünschten Nebenprodukten der Reaktion.

## 2.3.1.4. Reagenzien zur Derivatisierung der Kohlenhydrate

Die Kohlenhydrate sind eine potentielle Verunreinigungsgruppe, deren Auftreten in biotechnologisch hergestellten Aminosäuren mit der Zugabe zum Kulturmedium als Kohlenstoffquelle erklärt werden kann. Außerdem entstehen sie als Nebenprodukt des Metabolismus der Mikroorganismen-Produzenten. Analytisch sind die Kohlenhydrate nicht weniger problematisch als die Aminosäuren. Neben dem Fehlen eines Chromophores/Fluorophores in ihrer Struktur muss berücksichtigt werden, dass außer einigen natürlichen Mono- und Oligozuckern der größte Teil von ihnen keine Seitenketten besitzt, die Ladung tragen. Anders ausgedrückt, ihre elektrophoretische Mobilität muss durch Einführung einer Ladung in die Moleküle erzeugt werden, was ihre Trennung während der Kapillarelektrophorese vereinfacht. Wie bereits erwähnt, trägt ein Großteil der Derivatisierungsreagenzien eine solche Ladung. Die wichtigsten Derivatisierungsreagenzien sind in Tabelle 2-3. aufgelistet.

In den dort aufgeführten Derivatisierungsreagenzien ist auch CBQCA zu finden, das bereits als Derivatisierungsreagenz für Aminosäuren und Peptide in Frage kam. Damit ist es geeignet, gleichzeitig zur Detektion und Quantifizierung von Aminosäuren, Peptiden und Zucker eingesetzt zu werden. Natürlich müssen in diesem Fall die Reaktionsbedingungen so optimiert werden, dass die Reaktion für alle oben genannten Stoffgruppen quantitativ verläuft.

Tabelle 2-3. Reagenzien zur Derivatisierung von Kohlenhydraten

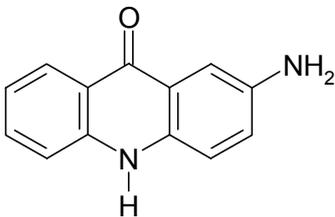
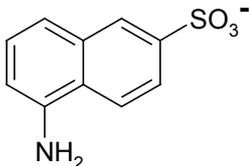
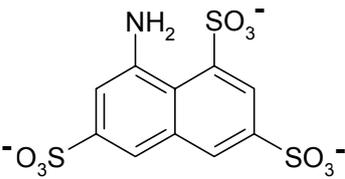
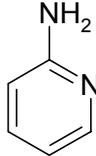
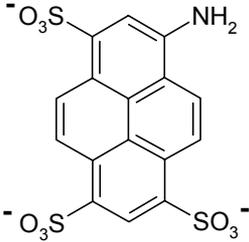
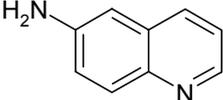
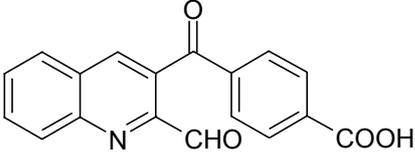
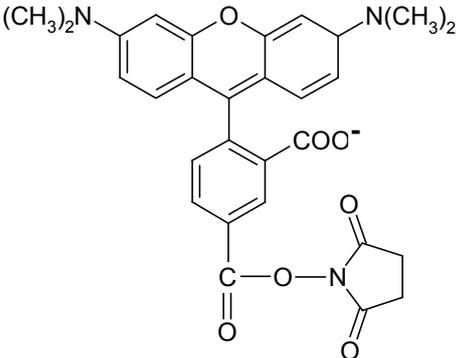
Reagenz	Laser, Arbeitswellenlänge, nm $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ , nm	Literatur
 2-Aminoacridon (2-AA)	Argon-Ion-Laser, 488 425/520	[161]
 5-Aminonaphthalen- 2-sulfonsäure (5-ANSA)	He-Cd-Laser, 325 235/475	[162]
 8-Aminonaphthalen-1,3,6- trisulfonsäure (ANTS)	He-Cd-Laser, 325 325/520	[163, 164]
 2-Aminopyridin (2-AP)	He-Cd-Laser, 325 240/375	[162]

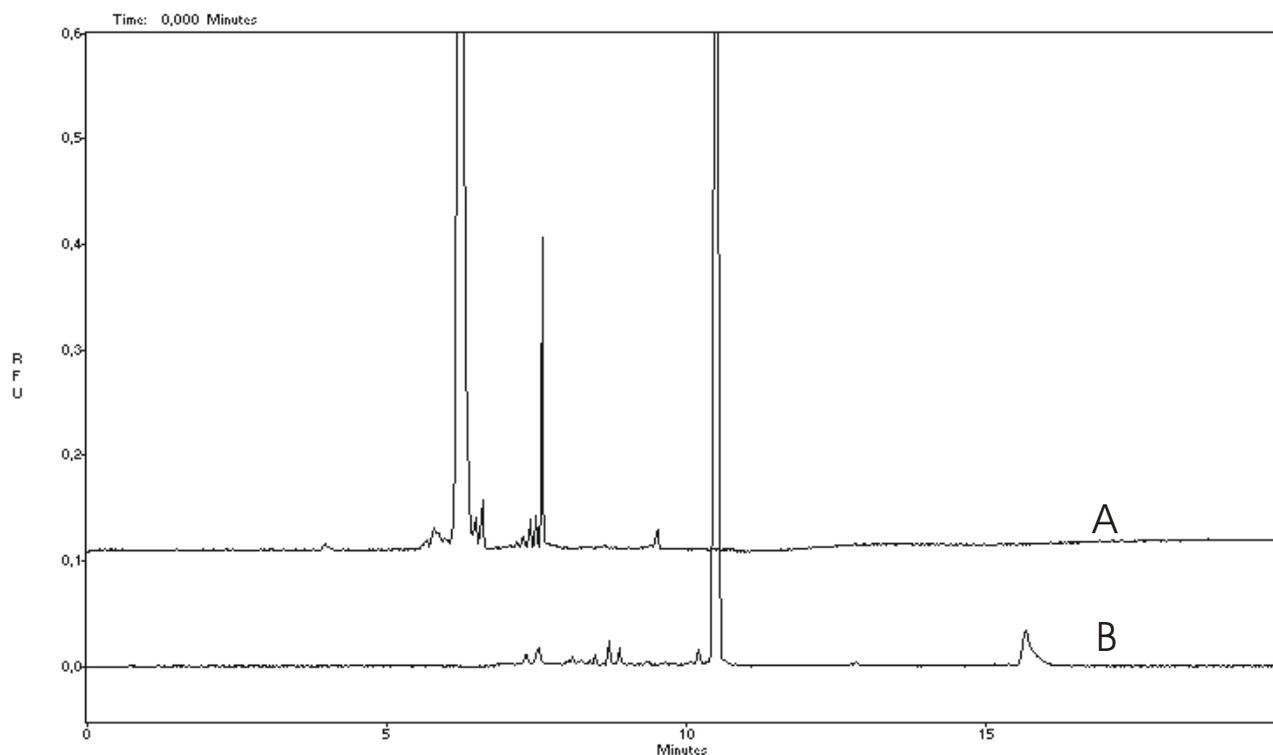
Tabelle 2-3. Reagenzien zur Derivatisierung von Kohlenhydraten (Fortsetzung)

Reagenz	Laser, Arbeitswellenlänge, nm $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ , nm	Literatur
	Argon-Ion-Laser, 488 455/512	[165, 166, 167]
9-Aminopyren-1,4,6-trisulfonsäure (APTS)		
	He-Cd-Laser, 325 270/>495	[162]
6-Aminochinolin (6-AQ)		
	Argon Ion Laser, 457 oder 488 He-Cd-Laser 442 442/552 488/520 457/-	[119, 168, 169, 170, 171, 172, 173]
<b>3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd (CBQCA)</b>		
	He-Ne-Laser, 543 543/580	[174, 175]
5-Carboxytetramethylrhodamin-succinimidylester (TRSE)		

### 3. Aminosäure-Derivate mit Fluoresceinisothiocyanat und 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol

In ersten Experimenten wurden zwei von den am häufigsten verwendeten Reagenzien zur Derivatisierung von primären und sekundären Aminen, FITC und NBD-F, eingesetzt. Sie wurden auf Grund der Tatsache ausgewählt, dass ihre Aminosäurederivate hoch fluoreszierend sind, was ihre Detektion und ihre Quantifizierung auf sehr niedrigen Niveaus in dem Fall ermöglicht, wenn eine LIF-Detektion ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 488/520 \text{ nm}$ ) eingesetzt wird (Siehe Tabelle 2.2). Die Derivatisierungsreaktionen wurden unter den von Takizawa und Nakamura [148] bzw. Hu und Li [126] beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Versuche zeigten aber eine Vielzahl von Reagenzpeaks, die einen großen Teil der Grundlinie der Elektropherogramme überdecken. So ist eine Quantifizierung von Verunreinigungen im Spurenbereich nahezu unmöglich. Weder Versuche zur Reinigung der Reagenzien durch Umkristallisation noch Variationen der Trennbedingungen mit Ziel der Reduktion der Zahl der Reagenzpeaks führten zu positiven Ergebnissen. Typische Elektropherogramme sind in Abb. 3 angegeben.

Abb. 3: Elektropherogramme von Blind-Proben (A) FITC  $2,5 \times 10^{-7} \text{ M}$  und (B) NBD-F  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ . CE: Elektrolyt: Borat 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM; Kapillare: Kieselgel 60,2/50 cm, 50  $\mu\text{m}$  i.d. (75  $\mu\text{m}$   $\varnothing$  für NBD-F); Spannung: 20 kV; Temperatur: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; Injektion: 0,5 psi, 5 s; Detektion: LIF 488/520 nm



#### 4. Aminosäure-Derivate mit 9-Fluorenylmethylchloroformat

##### 4.1. Optimierung der Derivatisierungsreaktion

FMOC-Cl wird zur Derivatisierung von Aminosäuren in Kombination mit UV- sowie mit LIF-Detektion verwendet (Siehe Tabelle 2.2). Obwohl in der Regel die UV-Detektion eine niedrigere Empfindlichkeit zeigt, wurde nach einer Reihe von Vorversuchen festgestellt, dass die direkte Absorptionsmessung bei 254 nm eine Möglichkeit zur Arbeit in einem breiten Konzentrationsbereich eröffnet. Zuerst wurde die Derivatisierungsreaktion bei den von Chan und Mitarb. [153] beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zu 1,2 ml Aminosäurelösung in 0,4 M Borsäure-Natronlauge wurden 0,8 ml der jeweiligen FMOC-Cl-Lösung in Acetonitril zugegeben und das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für eine Minute stengelassen. Der Reagenzüberschuss und sein Hydrolyseprodukt wurden jeweils zweimal mit 2 ml n-Pentan extrahiert. Anschließend wurde die Probe mit Wasser verdünnt. Die Reaktionsbedingungen bezüglich der Reaktionszeit und besonders bezüglich der Konzentrationen der Proben bzw. des Derivatisierungsreagenzes mussten soweit optimiert werden, dass erstens die Reaktion in einem sehr großen Bereich von 0,1 % bis 100 % reproduzierbare Ergebnisse liefert und dass zweitens diese Niveaus mit den Möglichkeiten der Kapillarelektrophorese in Übereinstimmung sind. Das bedeutet, dass das Niveau der potentiellen Verunreinigungen (0,1 %) gut detektierbar sein muss und gleichzeitig die Menge an Hauptsubstanz (100 %) nicht die Säule überladen darf. In diesem Zusammenhang musste Folgendes bedacht werden: Die Reaktion muss in jedem Fall mit einem Überschuss an Derivatisierungsreagenz bezogen auf die Hauptsubstanz durchgeführt werden, da die Möglichkeit besteht, dass die Analyten, besonders die, die sich auf 0,1%-Niveau befinden, nicht komplett derivatisiert werden. In dieser Hinsicht wurde einerseits nach der höchsten Konzentration des Derivatisierungsreagenzes und andererseits nach ihrem kleinsten Überschuss, bei dem die Reaktion noch quantitativ verläuft, gesucht. Wenn die Empfindlichkeit der Detektion auf 0,1%-Niveau nicht ausreicht, wurden nach weiteren Möglichkeiten zur ihrer Erhöhung gesucht: Erstens, Reduktion der Proben-Verdünnung nach der Derivatisierung, zweitens Verwendung von Kapillaren mit größerem Durchmesser, die zur größeren Massensensitivität der Methode führen würden, was seinerseits die Derivatisierung bei kleineren Proben- bzw. Reagenzkonzentrationen ermöglichen würde, und drittens Erhöhung des Injektionsvolumens. Es wurde festgestellt, dass bei Konzentrationen des Derivatisierungsreagenzes von mehr als 300 mM die Derivatisierung wegen begrenzter Löslichkeit von FMOC-Cl in Wasser-Acetonitril-Gemischen erschwert wird. Das Erhöhen des Acetonitrilanteils, das die

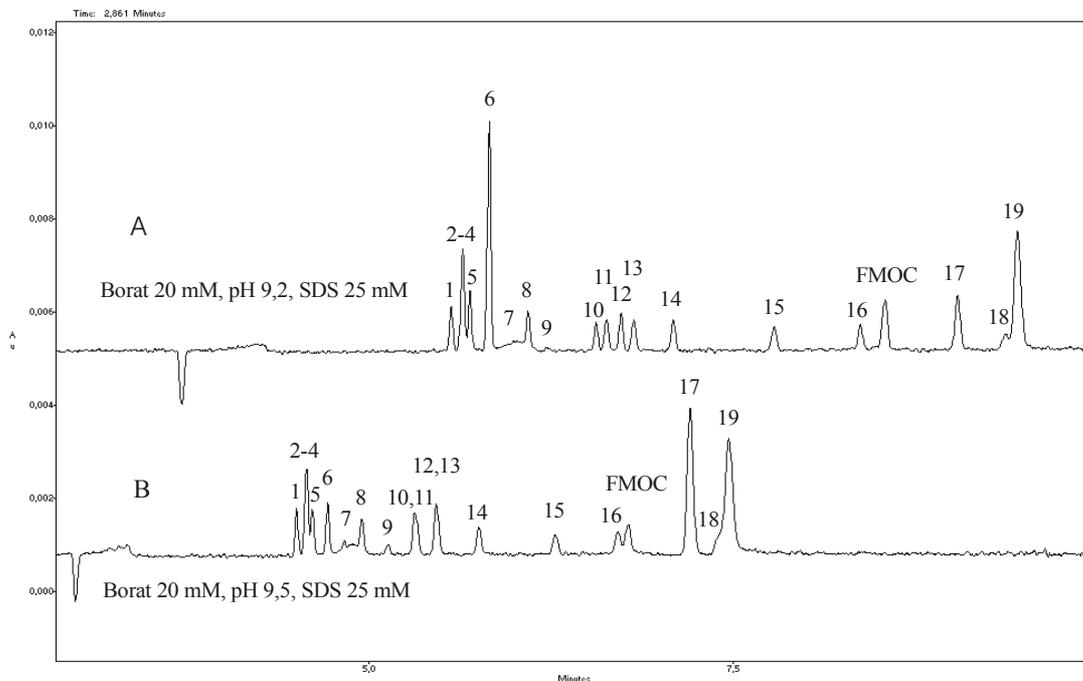
Löslichkeit von Fmoc-Cl erhöht, wirft aber wiederum Löslichkeitsprobleme bei den Aminosäuren auf und beeinflusst den Verlauf der eigentlichen Reaktion. Im nächsten Schritt wurde nach der kleinsten Verdünnung der Probe nach der Derivatisierung, bei der die Effizienz der Auftrennung unverändert bleibt, gesucht. Die Versuche wurden mit einer Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:20 durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass der große Gehalt an Acetonitril in der Probenzone nach der Injektion bei den Verdünnungen kleiner als 1:10 die Auftrennung der Analyten in der Kapillarelektrophorese negativ beeinflusst. Dann wurden eine Reihe von Experimenten mit verschiedenen Molverhältnissen Fmoc-Cl/Hauptsubstanz von 2 bis 15 bei einer konstanten Fmoc-Cl-Konzentration von 300 mM durchgeführt. Als Probe wurde eine Modellmischung aus Phe gespikt mit 0,1 % w/w „anderer“ Aminosäuren verwendet. Hier stellte sich heraus, dass bei Molverhältnissen kleiner als 5 die Derivatisierung der Aminosäuren auf kleinerem Niveau deutlich weniger reproduzierbar war im Vergleich mit Ergebnissen bei größeren Molverhältnissen. Deshalb wurde in allen folgenden Experimenten das Molverhältnis von ca. 10 gewählt. Die Konzentrationen des Derivatisierungsreagenzes und der Probe sind ca. 80 mg/ml bzw. 3,5 mg/ml. Die Konzentration von 3,5 mg/ml wurde im Durchschnitt für alle Aminosäuren angenommen und musste einen ca. 10-fachen Molüberschuss an Derivatisierungsreagenz garantieren.

Schließlich musste die Reaktionszeit gefunden werden, bei der quantitativer Ablauf der Derivatisierung auch für Aminosäuren im Spurenbereich garantiert ist. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Reaktionszeit von 1 auf 2 Minuten zu besser reproduzierbaren Ergebnissen führte. Längere Reaktionszeiten zeigten keinerlei Einfluss auf das Ergebnis der Reaktion.

Die Elektropherogramme zweier unter optimierten Bedingungen derivatisierter Proben, bestehend aus verschiedenen Aminosäuren, bei zwei verschiedenen pH-Werten des Elektrolyten sind in Abb.4-1 dargestellt.

Unter den so optimierten Bedingungen der Derivatisierungsreaktion sind die Konzentrationen der Analyten in der Probe vor der Injektion 0,175 mg/ml für die Hauptkomponente bzw. 0,000175 mg/ml für die potentiellen Verunreinigungen auf 0,1%-Niveau. Bei diesen Konzentrationen wurde festgestellt, dass der größere Teil dieser Aminosäuren nicht detektiert werden kann, wenn Kapillaren mit einem Durchmesser von 50 µm eingesetzt werden. Die Erhöhung der Massenempfindlichkeit der Methode kann durch Erhöhen des Lichtwegs bei der Detektion erzielt werden, d.h. durch Nutzung einer Kapillare mit größerem Durchmesser.

Abb. 4-1: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe eines Modellgemisches, bestehend aus 19 Aminosäuren jeweils 0,05 mg/ml (Tyr 0,2 mg/ml, A: Gly 0,2 mg/ml, B: Cystin 0,2 mg/ml). CE: Kapillare: Kiesegel 60,2/50 cm, 50 µm i.d.; Spannung: 25 kV; Temperatur: 25 °C; Injektion: 0,5 psi, 5 s; Detektion: UV-254 nm; Peaks: 1- Ser; 2-4- Thr, Asn, Gln; 5- Ala; 6- Gly; 7- Pro; 8- Val; 9- Tyr; 10- Met; 11- Glu; 12- Ile; 13- Asp; 14- Leu; 15- Phe; 16- Trp; 17- Cystin; 18- Arg; 19- Lys.



Im nächsten Schritt musste die Reproduzierbarkeit verbessert werden. Ein wesentlicher Grund für die nicht zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Kapillarelektrophorese in Bezug auf Quantifizierung sind die relativ großen Abweichungen im Injektionsvolumen, besonders wenn die hydrodynamische Injektion eingesetzt wurde. Sie können bis zu 10 % betragen. Alternativ könnte die elektrokinetische Injektion genutzt werden. Sie hat aber den Nachteil, dass aufgrund der verschiedenen elektrophoretischen Mobilitäten der Analyten das Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander in der eingelassenen Probe verändert würde, was zu falschen Ergebnissen führt. Der Einsatz eines inneren Standards (IS) kann die großen Volumenabweichungen bei der hydrodynamischen Injektion kompensieren, so dass nach einer geeigneten Substanz, die folgenden Kriterien entspricht, gesucht wurde: 1.) Die Substanz muss den Analyten chemisch ähnlich sein, in diesem Fall eine Aminosäure; 2.) Ihre elektrophoretische Mobilität muss nahe der elektrophoretischen Mobilität der anderen Analyten liegen; 3.) Ausserdem darf sie nicht in den zu untersuchenden Proben enthalten sein und 4.) Sie musste von den anderen Analyten gut abtrennbar sein. Die drei Aminosäuren Taurin, L-Citrullin und 6-Amino-capronsäure (6-ACS), die den ersten drei Kriterien genügen, wurden daraufhin geprüft, ob sie von den anderen Analyten bei den schon teilweise optimierten Arbeitsbedingungen der Kapillarelektrophorese abtrennbar sind. In ersten

Untersuchungen wurden zu Modellmischungen, die nur die „schnellsten“ Aminosäuren Ser, Thr, Asn, Glu, Ala, Gly, Pro und Val, enthielten, Taurin, L-Citrullin und 6-ACS einzeln zugegeben, um das elektrophoretische Verhalten der potentiellen Kandidaten als IS auszuloten. Die entsprechenden Elektropherogramme sind in Abb. 4-2 dargestellt. Sie zeigen, dass bei diesen Trennbedingungen die Peaks von L-Citrullin und Taurin die Peaks von Gly bzw. die Peaks von Val und Pro überdecken. 6-ACS ist dagegen gut von den übrigen Aminosäuren abgetrennt. Da ihre elektrophoretische Mobilität kleiner als die elektrophoretischen Mobilitäten aller Aminosäuren von der Modellmischung ist, musste im nächsten Schritt geprüft werden, ob 6-ACS auch von der Gruppe der „mittelschnellen“ Aminosäuren abgetrennt wird. Dazu wurde eine zweite Modellmischung, die zusätzlich Tyr und Met enthielt, hergestellt. Es wurde erwartet, dass die Migrationszeiten dieser Aminosäuren hinter der Migrationszeit von 6-ACS liegen. In Versuchen konnte mehrfach eine gute Abtrennung von Tyr gezeigt werden (Siehe Abb. 4-3), wobei die Auflösung unabhängig von der Spannung in einem Bereich von 15 kV bis 20 kV war; jedoch waren die Migrationszeiten der Analyten bei Erhöhung der angelegten Spannung kleiner (Siehe Abb. 4-4). Auch das Einlassvolumen beeinflusst die Auflösung nicht (Siehe Abb. 4-5). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass 6-ACS als IS die Reproduzierbarkeit der Methode verbessern kann. Bei allen quantitativen Auswertungen wurden die korrigierten Peakflächen auf die korrigierte Peakfläche des IS bezogen.

#### 4.2. Optimierung des Trennpuffers

Prinzipiell ist die MEKC zur Auftrennung von Aminosäuren in nativer oder in derivatisierter Form am populärsten. Am häufigsten werden als Trennelektrolyt Borat-Puffer mit pH-Werten zwischen 9,0 und 9,5 eingesetzt, zu denen als micellbildende Komponente SDS in Konzentrationen von 20 bis 150 mM zugegeben wird. In einigen Fällen kann die Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie z.B. Acetonitril, Methanol und anderen in Konzentrationen bis 15 % die Auftrennung von komplexen Mehrkomponenten-Gemischen drastisch verbessern, in dem sie das so genannte Migrationsfenster der Analyten erweitern. Als Ausgangspunkt zur Optimierung des Trennelektrolytes wurde Borat-Puffer 25 mM, pH 9,2, SDS 25 mM eingesetzt, der nach [153] eine gute Auftrennung fast aller nativer Aminosäuren sicherstellen müsste. Unter diesen Versuchsbedingungen und bei einer normalen Arbeitstemperatur von 25°C war die Auftrennung von Thr, Asn und Gln problematisch. Auch Ala konnte nur teilweise von dieser Gruppe abgetrennt werden, und die Paare Pro, Val und Arg,

Lys sowie die Dreiergruppe Glu, Ile, Asp konnten nicht reproduzierbar voneinander getrennt werden.

Abb. 4-2: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung aus 8 Aminosäuren jeweils 0,0035 mg/ml und IS 6-ACS (A), L-Citrullin (B) oder Taurin (C) jeweils 0,0175 mg/ml. CE: Elektrolyt: Borat 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM; Kapillare: Kieselgel 60,2/50 cm, 75 µm i.d.; Spannung: 20 kV; Temperatur: 25 °C; Injektion: 1,0 psi, 10 s; Detektion: UV- 254 nm; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1

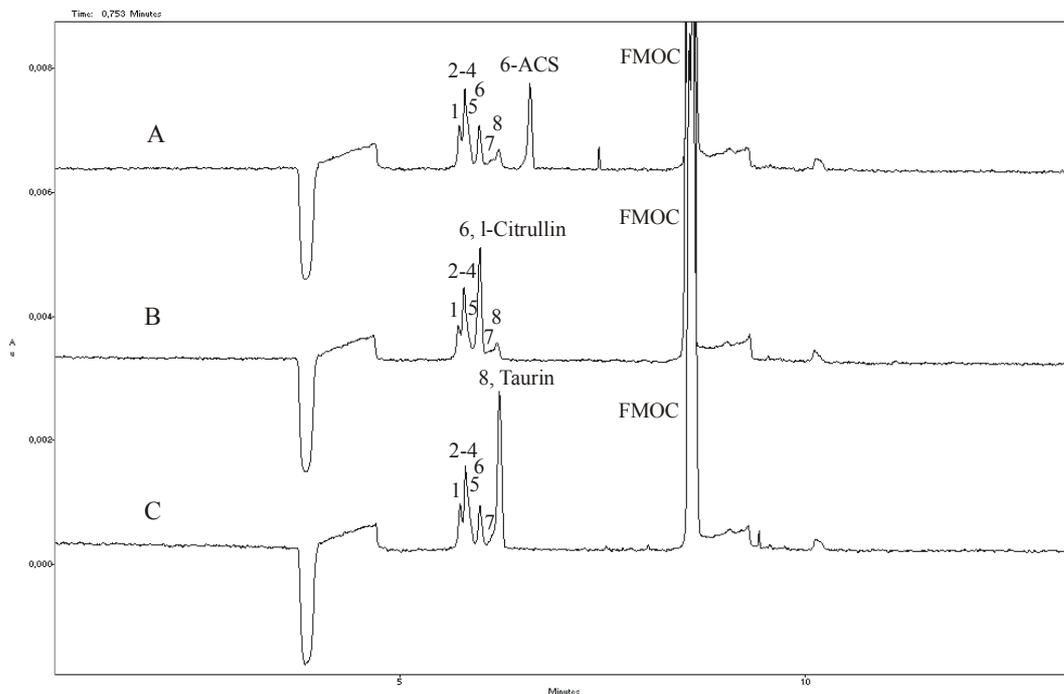


Abb. 4-3: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung aus 10 Aminosäuren jeweils 0,0035 mg/ml und IS 6-ACS 0,0175 mg/ml. CE: Kapillare: Kieselgel 70/60 cm, 75 µm i.d.; Spannung: 18 kV; CE-Bedingungen wie in Abb. 4-2; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1.

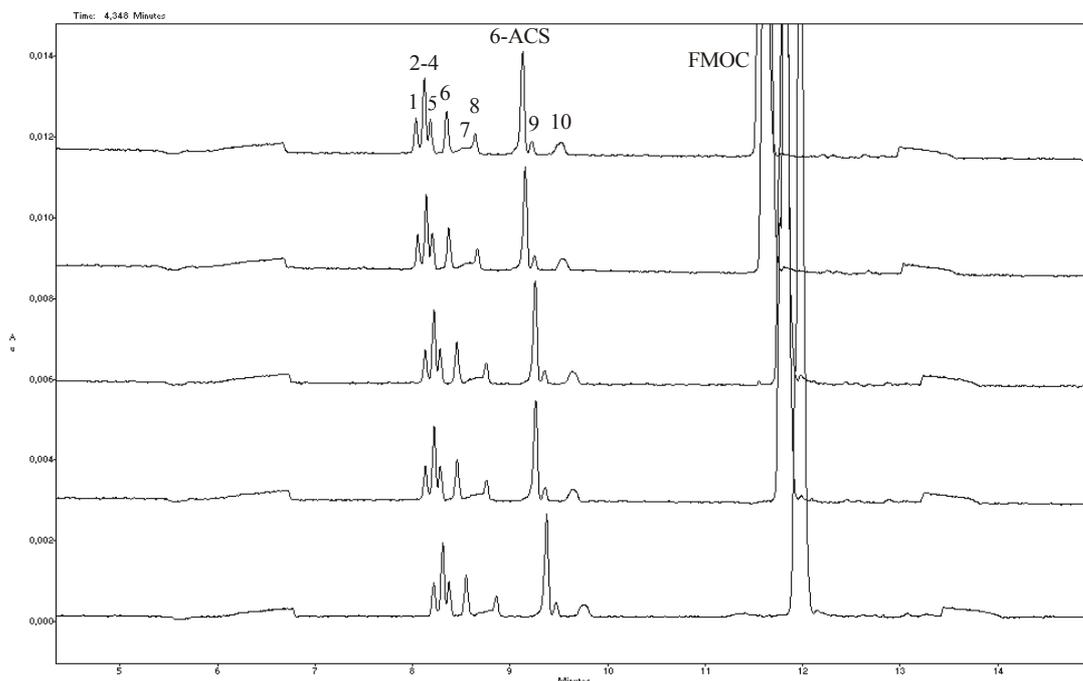


Abb. 4-4: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung wie in Abb. 4-3 CE-Bedingungen wie in Abb. 4-3; Variation der Spannung; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1

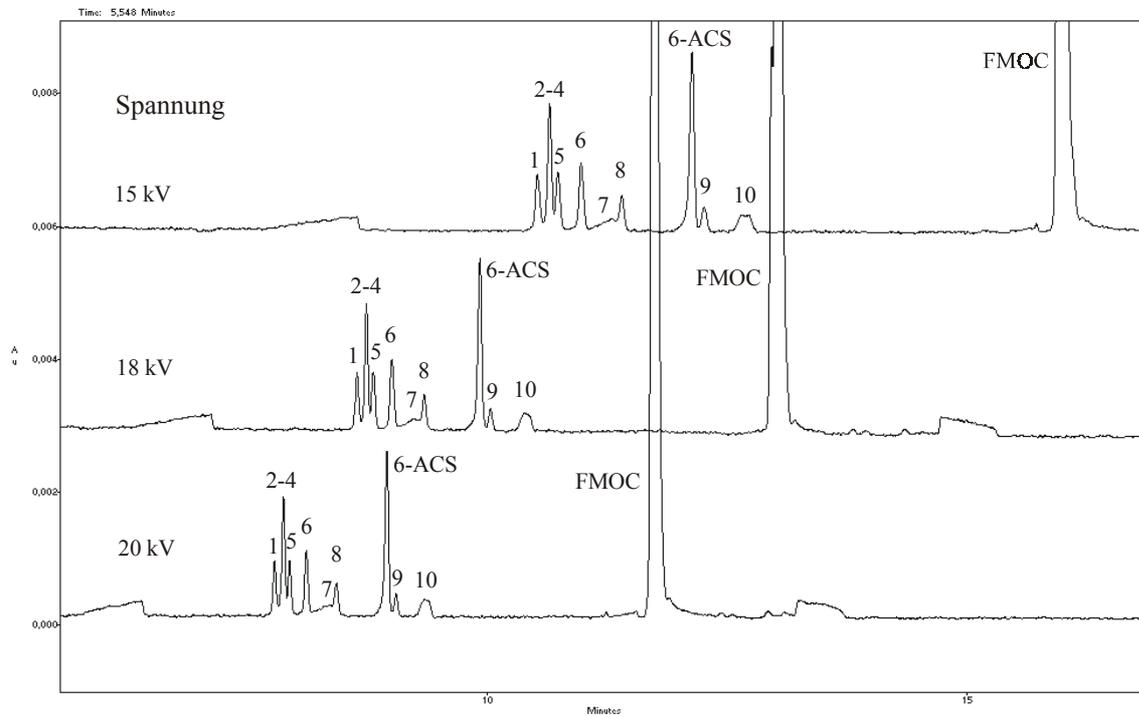
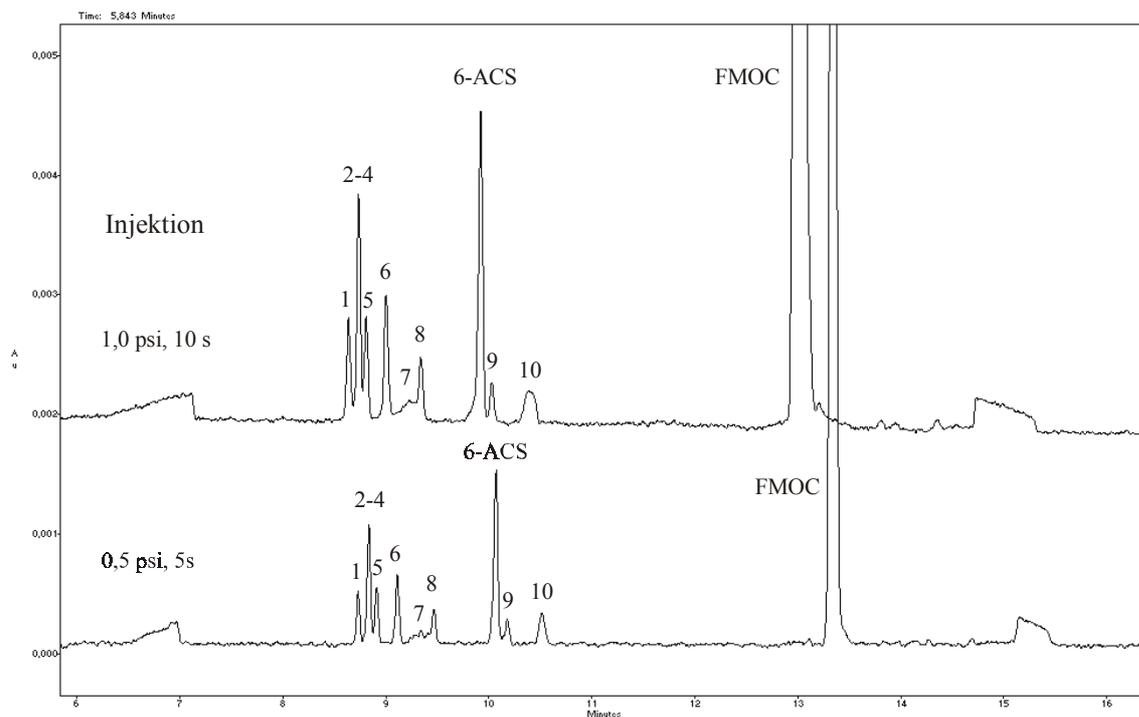
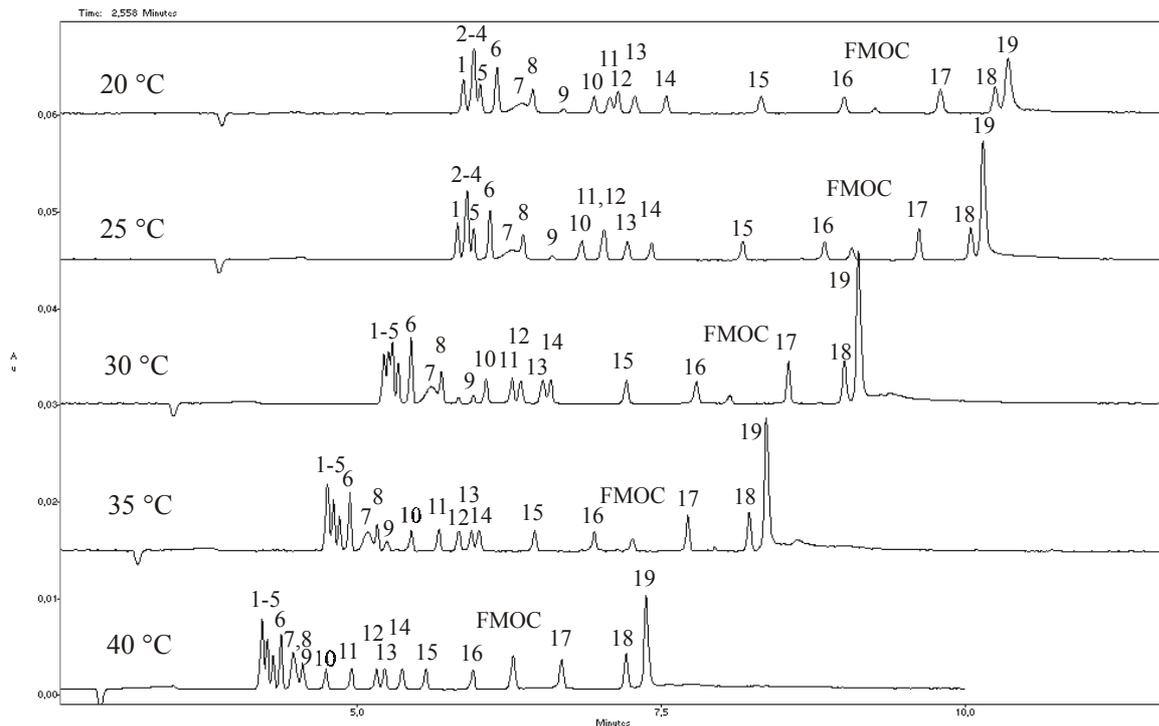


Abb. 4-5: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung wie in Abb. 4-3 CE-Bedingungen wie in Abb. 4-3; Variation der Injektion; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1



Durch Variieren der Temperatur wurde versucht, die Trennung zu verbessern. Wie in Abb. 4-6 zu sehen konnte aber keine vollständige Auftrennung erreicht werden. Deswegen wurde im Folgenden eine Arbeitstemperatur von 25 °C ausgewählt.

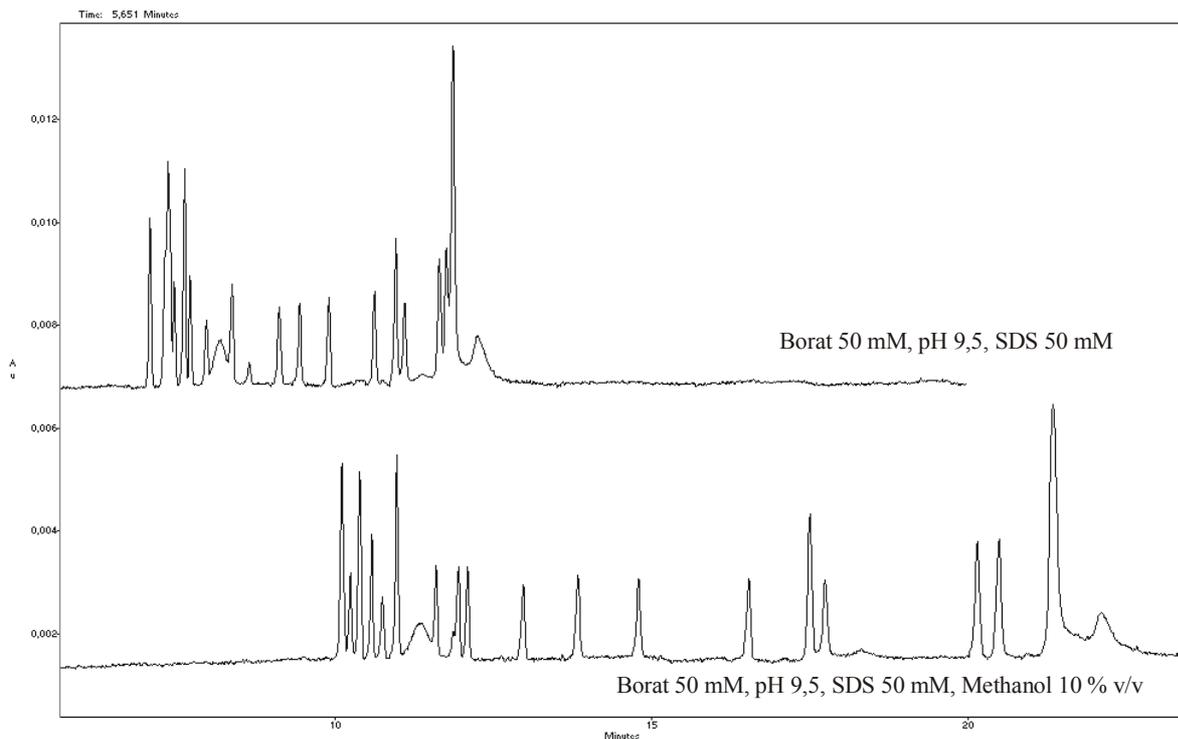
Abb. 4-6: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung aus 19 Aminosäuren jeweils 0,0035 mg/ml. CE-Bedingungen wie in Abb. 4-1 mit Ausnahme Spannung, 20 kV, des Durchmessers der Kapillare, 75 µm, Variation der Temperatur; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1



In den anschließenden Experimenten wurden folgende Variationen vorgenommen: 1. Die Konzentration der Borationen von 20 bis 100 mM; 2. Der pH-Wert des Trennelektrolyten von 9,0 bis 9,5; 3. Die Konzentration des micellbildenden Reagenzes von 20 bis 100 mM. Zusätzlich wurde in einigen Fällen zum Elektrolyt Methanol, Aceton oder Acetonitril in Konzentrationen bis zu 15 % mit dem Ziel der Erweiterung des Migrationsfensters und der Erhöhung der Trennleistung des Systems zugegeben. Aber in keinem der Fälle wurde eine vollständige Trennung aller einzelner Komponenten der Modellmischung erreicht. Mit einem Borat-Trennpuffer (50 mM, pH 9,5, SDS 50 mM, Methanol 10 % v/v) konnte eine vollständige Auftrennung der ersten Gruppe von fünf Aminosäuren Ser, Thr, Asn, Gln, Ala und Gly erreicht werden (Siehe Abb. 4-7, die ersten fünf Peaks in dieser Reihenfolge), die prinzipiell am schwierigsten trennbar ist. Der relativ hohe Gehalt an Methanol im Elektrolyten führt jedoch zu Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten, was durch Stromschwankungen verursacht wird. Deshalb konnte dieser Trennelektrolyt nicht

für Routinearbeit verwendet werden. Allerdings könnte in Fällen von Verunreinigungen im Bereich der ersten Gruppe von Aminosäuren dieser Elektrolyt eine gute Alternative zur genauen Identifizierung der Verunreinigungen sein.

Abb. 4-7: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung wie in Abb. 4-6. CE-Bedingungen wie in Abb. 4-1 mit Ausnahme des Durchmessers der Kapillare, 75  $\mu\text{m}$ , und des Trennelektrolytes.



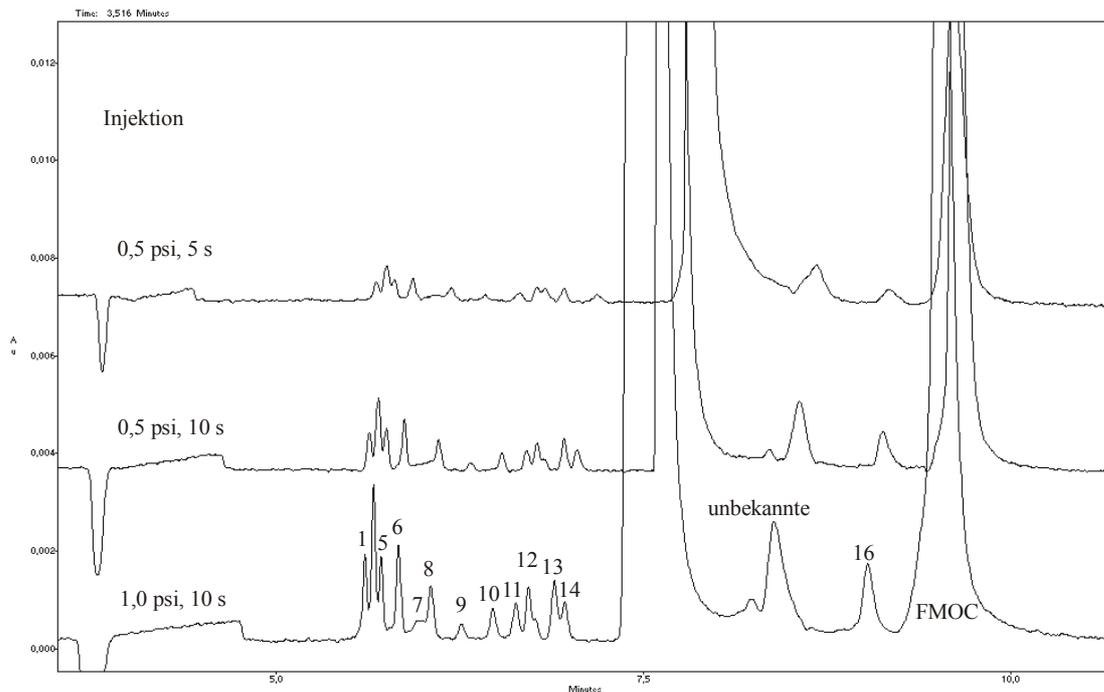
### 4.3. Optimierung der Injektionsbedingungen

Die ersten Experimente wurden mit Probeeinlass bei Standardbedingungen von 5 s bei 0,5 psi (3448 Pa) durchgeführt. Wie in Abb. 4-8 (das oberste Elektropherogramm) zu sehen ist, können selbst bei einer doppelt-konzentrierten Probe die Aminosäuren auf 0,1 % Niveau nicht gut detektiert werden, da die große Überladung der Kapillare durch die Hauptkomponente (100 % Niveau) zur Verbreiterung der Zonen der weniger konzentrierten Komponenten führt. Dieser Effekt wird nicht beobachtet, wenn die Hauptkomponente in der Modellmischung fehlt ( Siehe Abb. 4-9).

Da für eine vollständige Derivatisierung mit doppelt verdünnten Proben gearbeitet werden muss, werden die Komponenten auf 0,1%-Niveau kaum detektierbar sein. Deshalb musste nach Möglichkeit des sogenannten „sample stacking“ gesucht werden. Die Experimente wurden mit einer Modellmischung, bestehend aus Phe 3,5 mg/ml und 18 anderen Aminosäuren von jeweils 0,0035 mg/ml durchgeführt. Nach der Derivatisierung wurden die

Proben mit verschiedenen Lösungsmitteln sowie dem Elektrolyt (Borat-Puffer 20 mM, pH 9,3, Wasser oder Borsäure 20 mM) verdünnt (Abb. 4-10).

Abb. 4-8: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung, bestehend aus Phe 6,65 mg/ml und anderen Aminosäuren von jeweils 0,1 % w/w. CE-Bedingungen wie in Abb. 4-1 mit Ausnahme des Durchmessers der Kapillare, 75  $\mu\text{m}$ , der Spannung, 20 kV, und der Injektion; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1.



Die besten Ergebnisse wurden bei Verdünnung mit Borsäure (Siehe Abb. 4-10, D) erzielt. Hierbei wurden nicht nur die höchsten und schärfsten Peaks sondern auch die beste Auftrennung erhalten. Eine mögliche Erklärung für die beobachtete Aufkonzentrierung in der Probenzone ist die kleinere Geschwindigkeit des EOF in dieser Zone, deren pH Wert ca. 5 beträgt. So kann in dieser Zone eine Änderung der Migrationsrichtung der Micellen aufgrund der Tatsache erwartet werden, dass  $\mu_m > \mu_{\text{EOF}}$  ( $\mu_m$  und  $\mu_{\text{EOF}}$  weisen in verschiedene Richtungen, Siehe Abb. 2-4). Bei Anlegung der Spannung sind die Micellen, die sich an der Anodenseite der Probenzone befinden und schon in Richtung Kathode beschleunigt sind, gezwungen, ihre Geschwindigkeit zu reduzieren und sogar ihre Migrationsrichtung zu ändern. Gleichzeitig werden die Micellen, die sich an der Kathodenseite der Probenzone befinden, verlangsamt und in Richtung Anode gezogen. Dieser Prozess läuft bis zum Ausgleich der pH-Werte der Probenzone und der anderen Zonen in der Kapillare. Als Folge wird eine Aufkonzentrierung der Analyten, die von den Micellen von den Rändern der Probenzone zu ihrer Mitte gezogen werden, beobachtet.

Abb. 4-9: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung, bestehend aus 19 Aminosäuren mit jeweils 0,04 mg/ml. CE: Elektrolyt: Borat 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM; Kapillare: Kieselgel 60,2/50 cm, 75  $\mu\text{m}$  i.d.; Spannung: 20 kV; Temperatur: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1

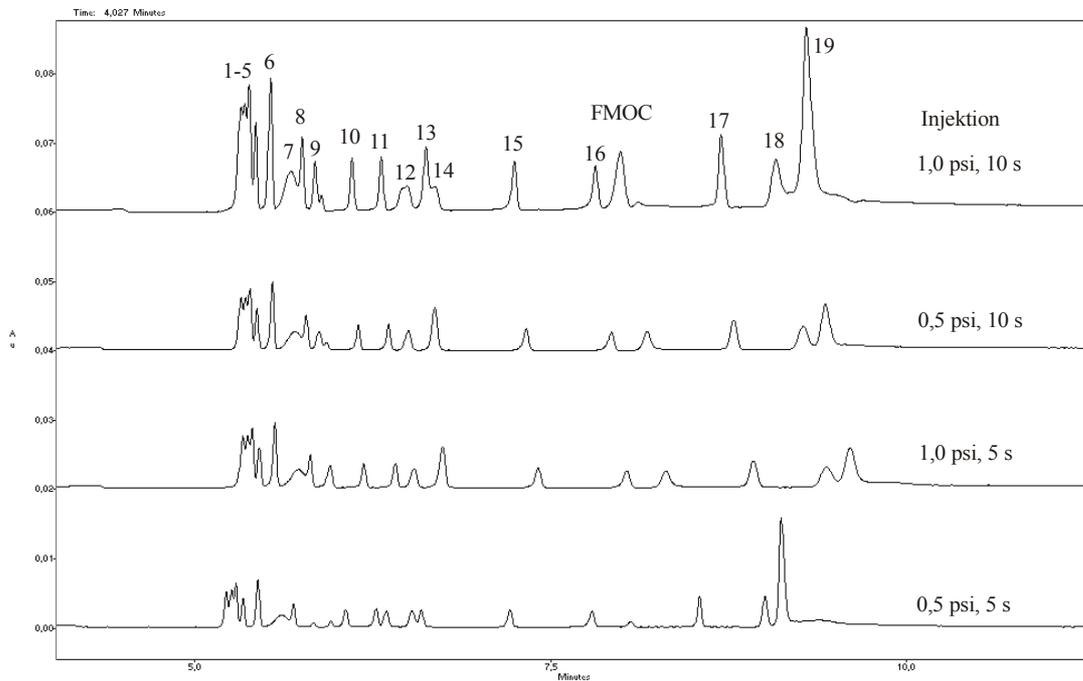
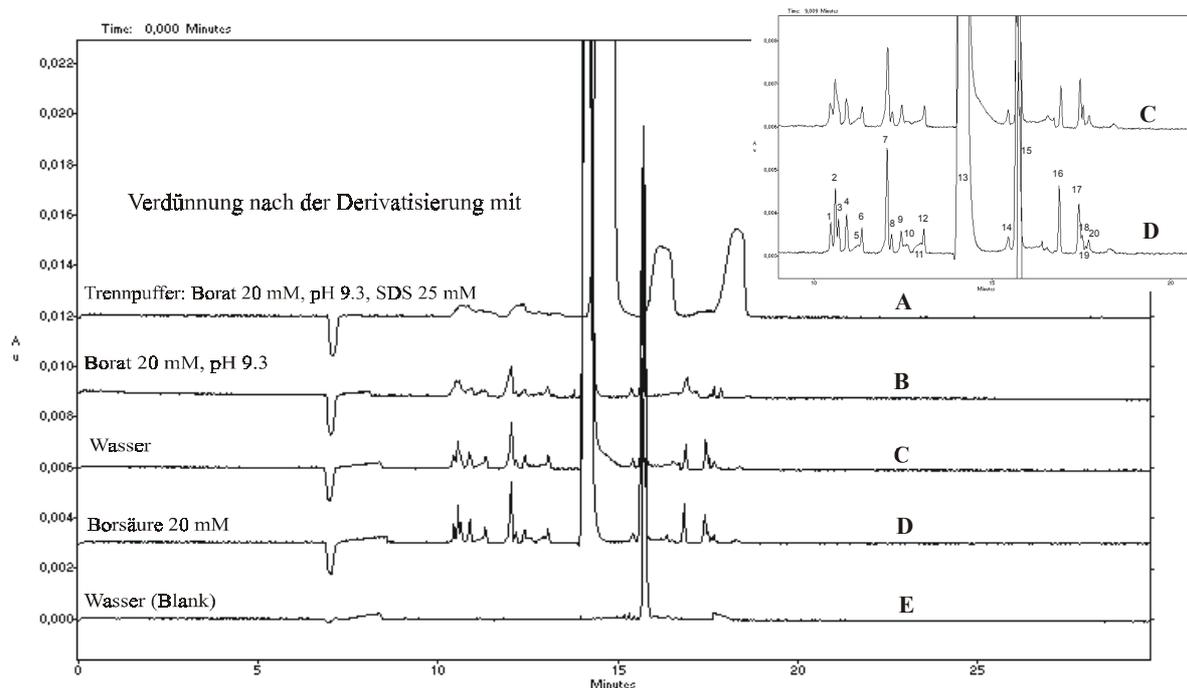


Abb. 4-10: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe einer Modellmischung, bestehend aus Phe 3,5 mg/ml und anderen Aminosäuren von jeweils 0,0035 mg/ml, die nach der Derivatisierung mit verschiedenen Lösungsmitteln verdünnt wurden. CE: Trennelektrolyt: Borat 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM; Kapillare: Kieselgel 70/60 cm, 75  $\mu\text{m}$  i.d.; Spannung: 15 kV; Temperatur: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; Injektion: 1,0 psi, 10 s; UV-Detektion: 254 nm; Zuordnung der Peaks wie in Abb. 4-1.



#### 4.4. Validierung der Methode

Nach der Optimierung der Derivatisierungsreaktionen, des Trennelektrolyten und der Injektion wurde die Methode in Bezug auf Selektivität, LOD/LOQ, Linearität, Präzision und Richtigkeit validiert.

*Selektivität:* Die Selektivität der Methode wurde mit Hilfe der Trennfähigkeit bewertet. Es wurde eine Modellmischung bestehend aus Phe 3,5 mg/ml und 18 anderen Aminosäuren mit jeweils 0,0035 mg/ml (0,1 % w/w) verwendet. Wie in Abb. 4-10 (Elektropherogramm D) zu sehen ist, ist Phe gut genug von allen anderen Aminosäuren abgetrennt, was ihre Detektion bei deren Anwesenheit in realen Proben auf 0,1%-Niveaus ermöglicht.

*LOD/LOQ:* Mit einer fortlaufenden Verdünnungsreihe der Modellmischung wurden die Konzentrationen bestimmt, bei denen das Signal/Rausch-Verhältnis 3 bzw. 10 ist. Es wurden die kleineren Responsfaktoren einiger Aminosäuren, Tyr und Pro, in Betracht gezogen. Die Nachweisgrenze (LOD) beträgt 0,00024 mg/ml und die Bestimmungsgrenze 0,0008 mg/ml; das heisst, dass in realen Proben mit 3,5 mg/ml Phe die Existenz der anderen 18 Aminosäuren auf Niveaus höher als 0,007 % w/w nachgewiesen werden kann und ein Gehalt größer als 0,023 % w/w quantifiziert werden kann.

*Präzision:* Die Präzision der Methode, d.h. ihre Fähigkeit, immer genau die gleichen Ergebnisse zu erzielen, wurde mit einer Modellmischung, bestehend aus Phe 3,5 mg/ml, 6-ACS 0,0175 mg/ml (0,5 % w/w), Leu, Ile und Val mit jeweils 0,0035 mg/ml (0,1 % w/w) überprüft. Es wurden Leu und Ile ausgesucht, da in realen Proben von Phe diese beiden Aminosäuren durch „spiken“ nachgewiesen wurden (Siehe Abb. 4-11 und Abb. 4-12). Val wurde zufällig ausgewählt. Die Präzision der Methode wurde auf zwei Ebenen beurteilt: Run-to-run-Präzision und Gesamtpräzision. Die Run-to-run-Präzision wurde durch sechs aufeinander folgende Injektionen einer derivatisierten Probe überprüft, und die Gesamtpräzision wurde mit sechs Proben des gleichen Batches getestet, die nacheinander derivatisiert und analysiert wurden. Die Ergebnisse sind als relative Standardabweichung (RSA), % der korrigierten Peakflächen bzw. der Migrationszeiten der Analyten bezogen auf die korrigierte Peakfläche bzw. die Migrationszeit des IS in Tabelle 4-1 angegeben. Die erhaltenen Werte für die RSA des Flächenverhältnisses, die kleiner als 4 % sind, wurden als genügend beurteilt.

Abb. 4-11: Elektropherogramme derivatisierter Proben Phe 3,5 mg/ml von zwei Herstellern. CE-Bedingungen wie in Abb. 4-10: Peaks: a, b, c, d, e, f, g- unbekannt.

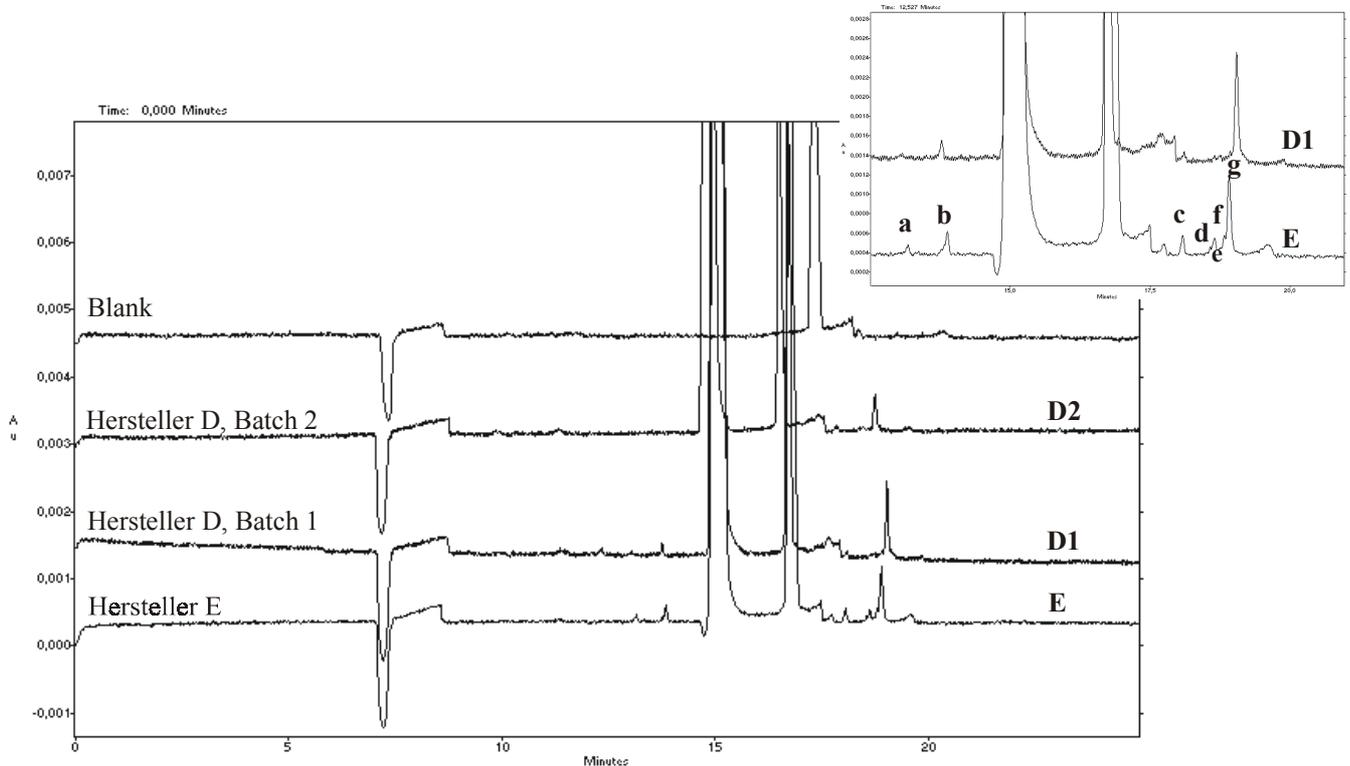


Abb. 4-12: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe von Phe 3,5 mg/ml von Hersteller E, nicht gespikt (A), und gespikt mit Ile (B), Leu (C), Cystin (D), Arg (E) und Lys (F) jeweils 0,0035 mg/ml (0,1 % w/w). CE-Bedingungen wie in Abb. 4-10.

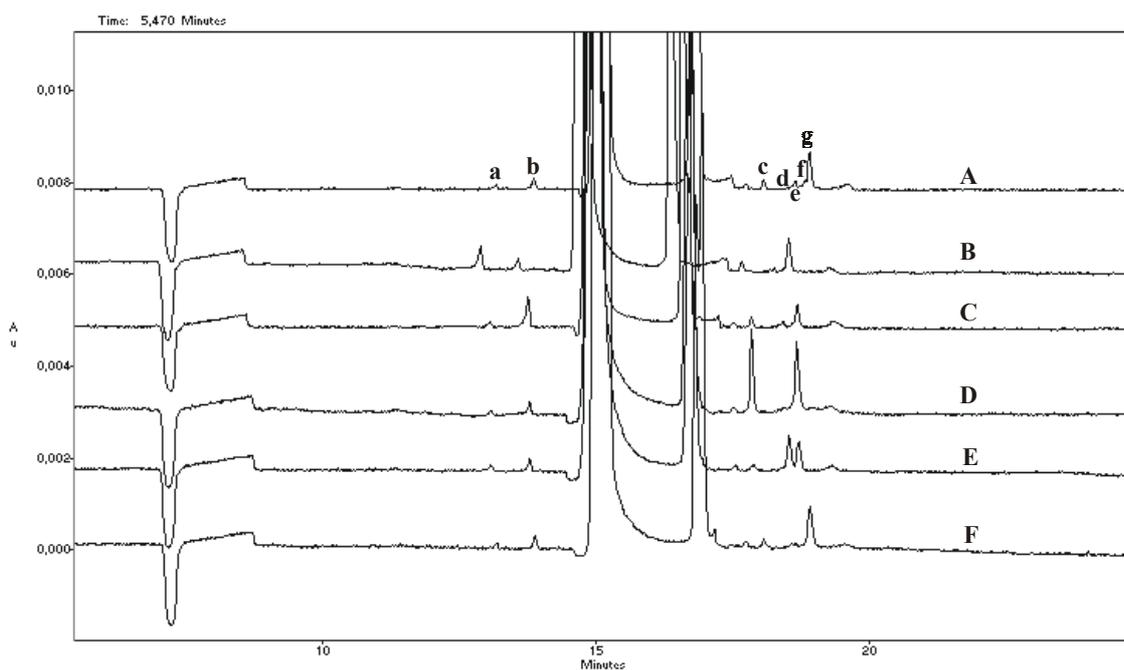
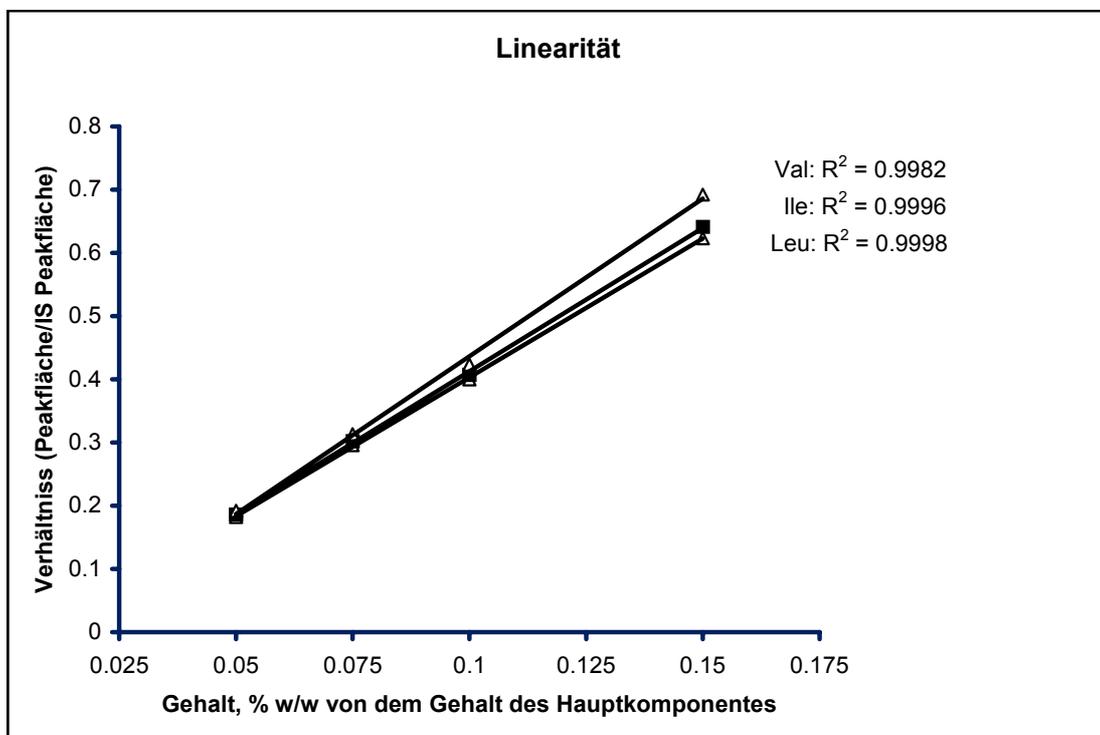


Tabelle 4-1: Präzision der Methode

Substanz	Run-to-run-Präzision		Gesamtpräzision	
	RSA des Verhältnisses	RSA des Verhältnisses	RSA des Verhältnisses	RSA des Verhältnisses
	Peakfläche/IS Peakfläche, %	Migrationszeit/IS Migrationszeit, %	Peakfläche/IS Peakfläche, %	Migrationszeit/IS Migrationszeit, %
Leu	3,0	0,12	3,6	0,14
Ile	3,1	0,11	3,4	0,13
Val	2,6	0,09	3,3	0,12

*Linearität:* Die Linearität der Methode wurde mit den Modellgemischen wie bei den Präzisionsuntersuchungen untersucht, wobei der jeweilige Gehalt von Leu, Ile und Val im Bereich von 0,05 – 0,15 % w/w variiert wurde. Im Diagramm 4 sind die korrigierten Peakflächen der einzelnen Aminosäuren bezogen auf die korrigierte Peakfläche des IS gegen deren Gehalt in der Probe aufgetragen. Die Korrelationskoeffizienten wurden mittels linearer Regression ausgerechnet. Sie sind alle größer als 0,998 und damit als befriedigend zu betrachten.

Diagramm 4: Linearität der methode



*Richtigkeit:* Die Richtigkeit der Methode wurde anhand der Wiederfindung abgeschätzt. Proben mit 3,5 mg/ml Phe wurden mit Leu, Ile und Val auf drei Niveaus gespik: 0,0026 mg/ml, 0,0035 mg/ml und 0,0044 mg/ml. In diesem Fall, in dem das Niveau von 0,1 % w/w (0,0035 mg/ml) von 100 % angenommen wird, würden die übrigen zwei Konzentrationen jeweils 0,75 % und 125 % entsprechen. Jede der Proben wurde dreimal analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 4-2 als Konfidenzintervalle angegeben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Selektivität, LOD/LOQ, Präzision, Linearität und Richtigkeit der Methode zufriedenstellend bezogen auf die Quantifizierungskriterien sind, d.h. die Methode kann zur Kontrolle der Reinheit von Phe in Bezug auf andere Aminosäuren auf 0,1%-Niveaus angewandt werden.

Der Gehalt von Ile und Leu in Phe-Batch vom Hersteller E (Siehe Abb. 4-11) wurden auf 0,02 bzw. 0,038 % w/w festgestellt.

**Tabelle 4-2: Genauigkeit der Methode ausgedrückt als Wiederfindung auf drei Niveaus, 75 %, 100 % und 125 % des zu erwartenden Niveaus von 0,1 % w/w**

Substanz	Wiederholung	Wiederfindung des theoretischen Gehaltes bei Niveau,			Konfidenzintervall ( $\alpha=0.05$ , $n=9$ )
		75 %	100 %	125 %	
Leu	1	104,2	97,4	103,4	2,73
	2	98,7	104,6	98,2	
	3	103,1	102,3	101,6	
Ile	1	94,6	98,3	98,2	3,1
	2	104,1	103,5	102,4	
	3	102,0	95,1	100,1	
Val	1	97,1	104,6	100,4	3,5
	2	97,3	99,3	93,1	
	3	103,1	103,1	97,6	

Die Methode wurde auch auf Proben von Ser, Trp, Pro und Ile aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern angewandt. Die entsprechenden Elektropherogramme sind in Abb. 4-13, 4-14, 4-15 und 4-16 gezeigt. Drei unbekannte Peaks wurden in allen drei Batches Ser detektiert. Bei Peak **a** handelt es sich um ein Zersetzungsprodukt, da festgestellt wurde, dass dieser Peak in einer bereits derivatisierten Probe mit der Zeit immer größer wird. Die

Migrationszeiten von Peaks **b** und **c** sind den Migrationszeiten der basischen Aminosäuren Arg, Lys und His ähnlich. Es sei aber angemerkt, dass Peaks mit ähnlichen Migrationszeiten auch in Proben von Trp und Pro gefunden wurden. Obwohl die Möglichkeit, dass es sich um Nebenprodukte der Derivatisierungsreaktion handelt, nicht ausgeschlossen werden kann, ist es wahrscheinlicher, dass auf Grund von nicht vollständiger Beseitigung der basischen Aminosäuren während des Reinigungsprozesses einige von ihnen in der Tat in den Proben vorhanden sind. Außerdem sei darauf hingewiesen, dass mittels dieser Methode bei Ser das eventuelle Vorhandensein von Thr, Asn, Gln und Ala nicht nachgewiesen werden kann, da ihre Peaks von dem Ser-Peak überdeckt würden. Das Gleiche gilt für Pro in Bezug auf Val und Tyr. Bei Pro wurde Ser in einem Gehalt von 0,024 % w/w festgestellt (Siehe Abb. 4-15). In Batches von Trp wurden Phe und Leu in Mengen unter 0,05 % quantifiziert. Bei Ile wurden drei unbekannte Peaks **a**, **b** und **c** detektiert. Die Probe wurde nacheinander mit Val, Leu und Phe gespikt. Die Ergebnisse zeigen, dass es sich hier wahrscheinlich um diese drei Aminosäuren als Verunreinigungen handelt. Deren Gehalt wurden auf ca. 0,2 % w/w geschätzt. Die Anwesenheit von Phe (Peak **c** in Abb. 4-16, A) wurde auch mittels UV-Messungen bestätigt (Siehe Kapitel UV Spektroskopie).

Abb. 4-13: Elektropherogramme derivatisierter Proben Ser 3,5 mg/ml von drei Herstellern. CE-Bedingungen wie in Abb. 4-10: Peakzuordnung: a, b, c- unbekannt.

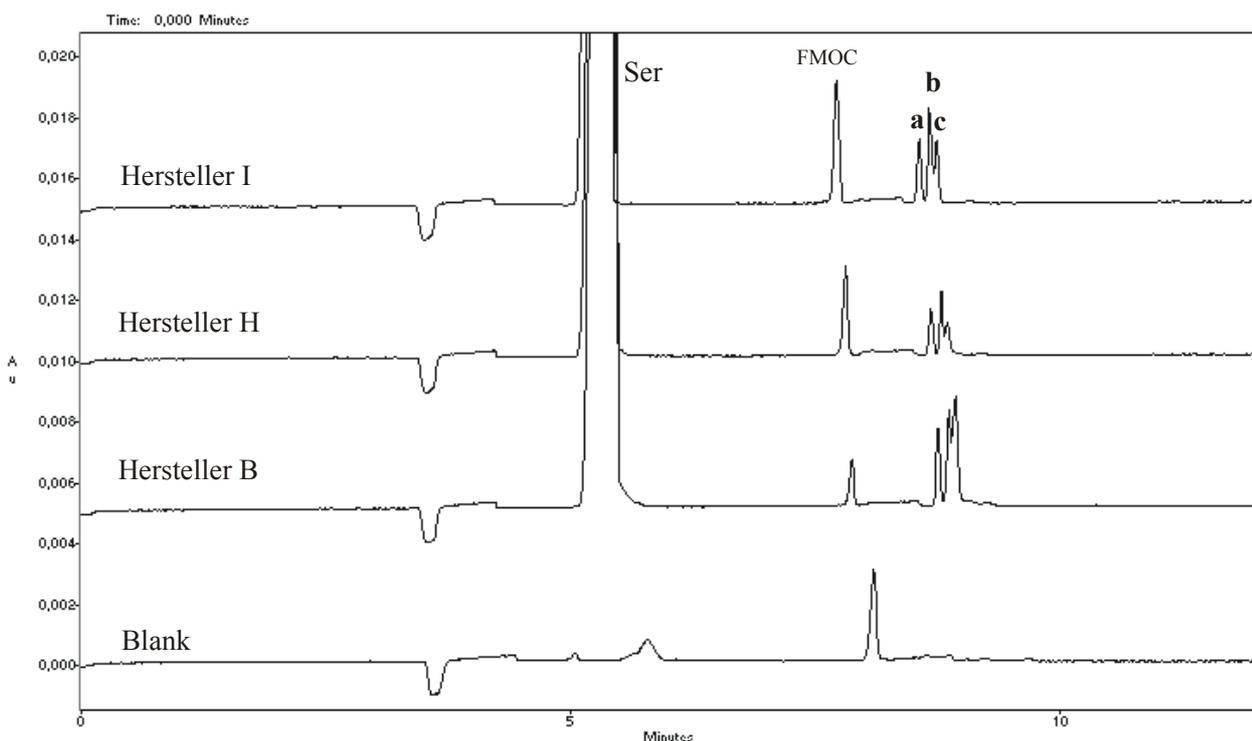


Abb. 4-14: Elektropherogramme derivatisierter Proben Trp 3,5 mg/ml von fünf Herstellern. CE-Bedingungen wie in Abb. 4-10: Peakzuordnung: a- Leu, b- Phe, c und d- unbekannt.

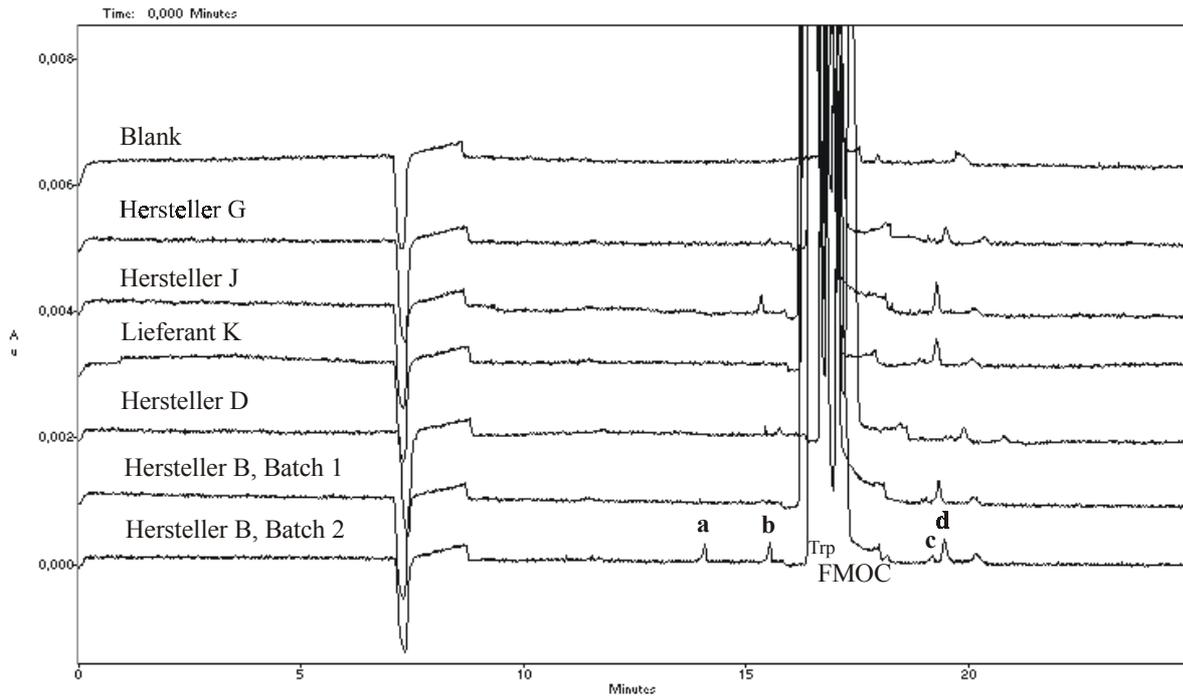


Abb 4-15: Elektropherogramme derivatisierter Proben Pro 3,5 mg/ml, nicht gespikt (A) und gespikt mit 18 Aminosäuren mit jeweils 0,0035 mg/ml (B). CE-Bedingungen: Trennelektrolyt: Borat 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM; Kapillare: Kieselgel 60,2/50 cm, 75  $\mu$ m i.d.; Spannung: 20 kV; Temperatur: 25  $^{\circ}$ C; Injektion: 1,0 psi, 10 s; UV-Detektion: 254 nm; Peakzuordnung wie in Abb. 4-1.

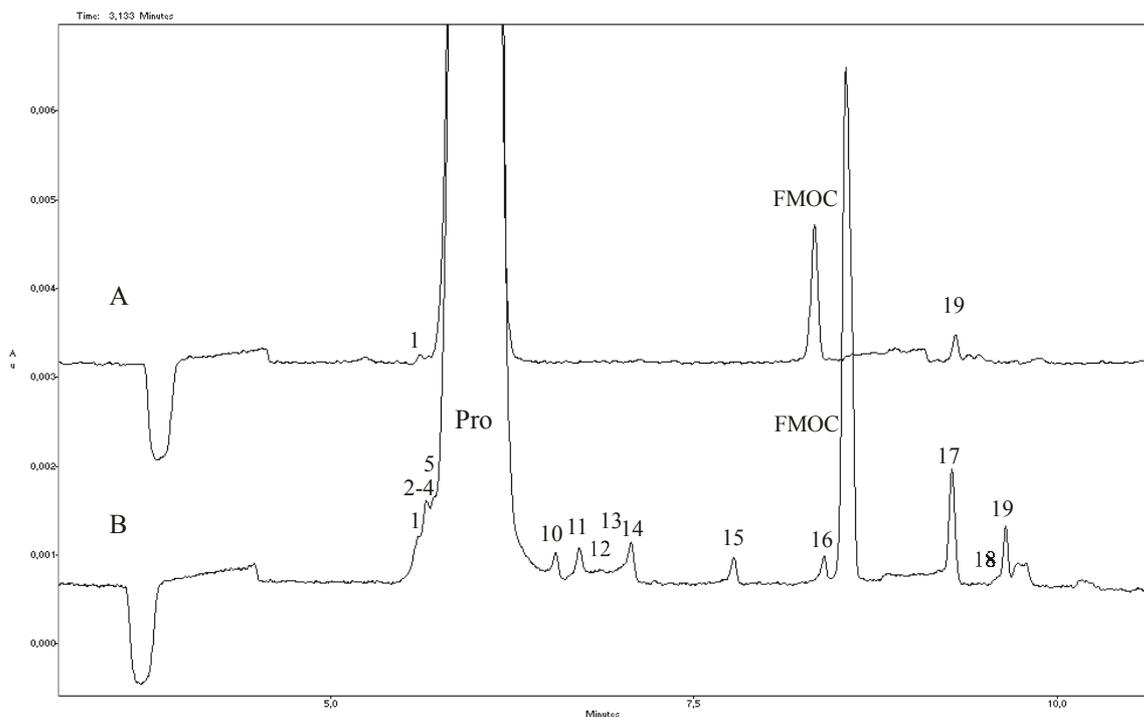
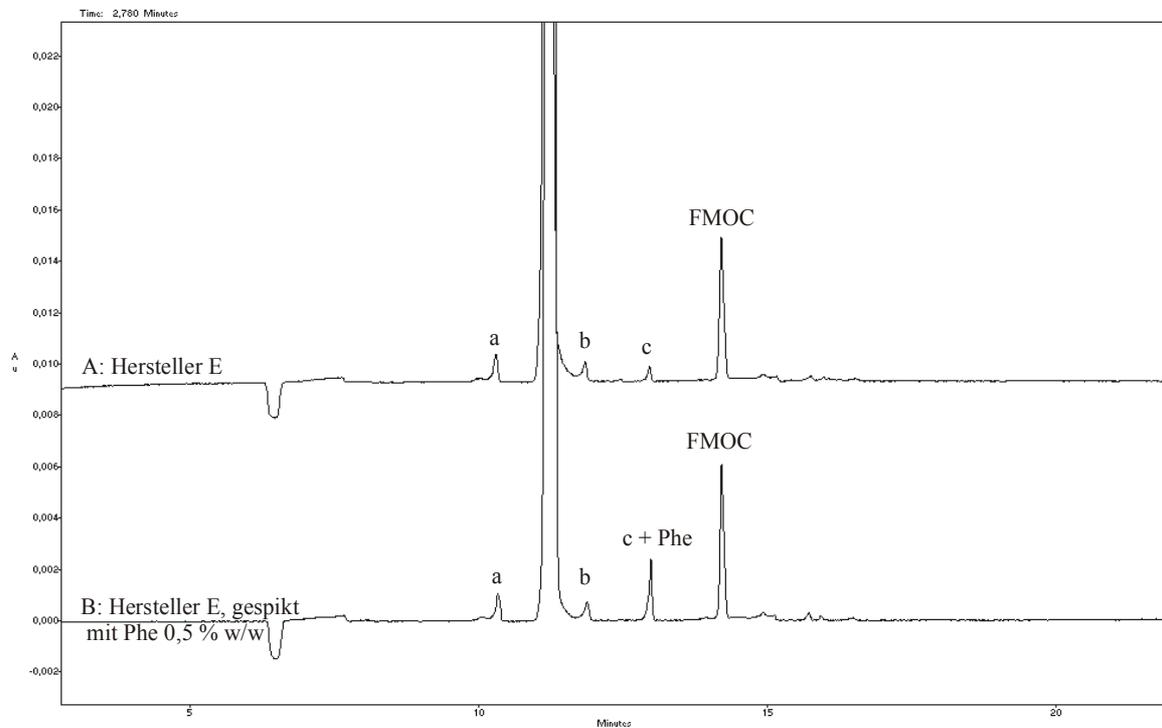


Abb 4-16: Elektropherogramme derivatisierter Proben: (A) Ile 3,5 mg/ml, ungespikt und (B) gespikt mit Phe 0,5 % w/w. CE-Bedingungen: Trennelektrolyt: Borat 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM; Kapillare: Kieselgel 70/60 cm, 75  $\mu\text{m}$  i.d.; Spannung: 15 kV; Temperatur: 25  $^{\circ}\text{C}$ ; Injektion: 1,0 psi, 10 s; Detektion: UV- 254 nm; Peakzuordnung: a- Val, b- Leu, c- Phe.



## 5. Derivatisierung mit 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass Fmoc-Cl zur Beurteilung der Reinheit der Aminosäuren in Bezug auf den Gehalt anderer Aminosäuren sehr geeignet ist. Um die Gruppe der verwandten Substanzen, die erfasst werden können, zu erweitern, wurde CBQCA als Derivatisierungsreagenz getestet. Dieses Reagenz ist in der Lage Isoindolderivate mit allen Stoffgruppen zu bilden, die eine primäre Aminogruppe aufweisen, wie z.B. Aminosäuren, Aminosucker, Peptide, Proteine oder aminhaltige Oligozucker. Die gebildeten Isoindole haben ein Absorptionsmaximum im Bereich von 450-500 nm. Nach Anregung bei einer Wellenlänge in diesem Bereich, z. B. bei 488 nm mit dem häufig verwendeten Argon-Ion-Laser, fluoreszieren sie. Die hochempfindliche LIF-Detektion und der breite Anwendungsbereich des Derivatisierungsreagenzes sind eine gute Kombination für die Detektion und Quantifizierung verschiedener Stoffgruppen potentieller Verunreinigungen.

### 5.1. Optimierung der Derivatisierungsreaktion

Für die Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde eine Modellmischung, bestehend aus D(+)-Glucosamin, D(+)-Galactosamin, Gly-Pro-Gly-Gly, Gly-Gln, Phe und Ser genutzt. Diese Substanzen wurden als jeweilige Repräsentanten ihrer Stoffgruppe ausgewählt, um die Optimierung der Reaktionsbedingungen vorzunehmen.

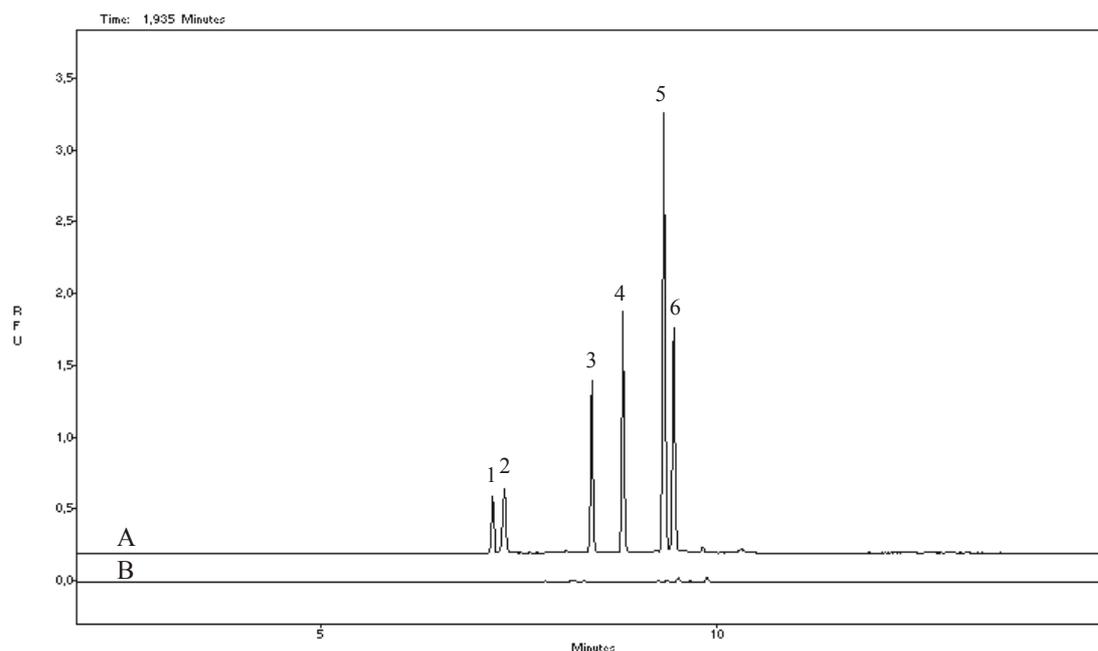
Im ersten Schritt wurde die Derivatisierungsreaktion bei den von Novotny und Mitarb. [118, 171] beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zu 10 µl Probelösung wurden 10 µl 10 mM CBQCA-Lösung in Dimethylsulphoxid und 10 µl 10 mM wässrige KCN-Lösung gegeben. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde stengelassen und die Probe wurde anschließend mit Wasser 100fach verdünnt. Ein typisches Elektropherogramm ist in Abb. 5-1 gezeigt.

In Bezug auf den Ablauf der Reaktion wurden verschiedene pH-Werte des Puffers getestet, da für die Aminosäuren und für die Aminosäuren der empfohlene Bereich bei pH 7,0 bzw. 8,5-9,5 liegt, d.h. dass der optimale pH-Wert im neutralen bis leicht alkalischen Bereich ist. Außerdem muss die Art und die Ionenstärke des Puffers optimiert werden. Zuerst wurde der Einfluss der Pufferart auf den Verlauf der Reaktion untersucht.

Die einzelnen Substanzen wurden in drei verschiedenen Lösungsmitteln, deren pH-Wert im neutralen Bereich eingestellt wurde, gelöst und danach einzeln oder als Mischung bei gleichen Reaktionsbedingungen derivatisiert. Mit Hilfe der erhaltenen Elektropherogramme

wurde jeweils die Ausbeute der Reaktion abgeschätzt. Die Ergebnisse zeigten klare Vorteile des Phosphat-Puffers im Vergleich zum Borat-Puffer und Wasser.

Abb. 5-1: Elektropherogramme: (A) einer derivatisierten Probe einer Modellmischung, bestehend aus D(+)-Glucosamin (Peak 1), D(+)-Galactosamin (Peak 2), Gly-Pro-Gly-Gly (Peak 3), Gly-Gln (Peak 4), Phe (Peak 5) und Ser (Peak 6) jeweils 0,1 mM; (B) einer Blindprobe. CE: Kapillare: Kieselgel 70/60 cm, 75  $\mu$ m i.d.; Trennelektrolyt: Borat-Puffer 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM; Spannung: 20 kV; Temperatur: 25 °C; Injektion: 0,5 psi, 5 s; Detektion: LIF 488/520 nm.



Unter anderem wurde festgestellt, dass bei D(+)-Glucosamin (Siehe Abb. 5-2) die Peakfläche im Fall von Phosphat-Puffer 2fach bzw. 14fach größer war als beim Gebrauch von Borat-Puffer oder Wasser. Das bedeutet natürlich nicht, dass in den zwei anderen Fällen die Reaktion nicht quantitativ abläuft, aber es zeigt zumindest, dass in Phosphat-Puffer als Lösungsmittel die Reaktionsgeschwindigkeit größer ist. Auf Grund dessen wurde im Folgenden Phosphat-Puffer verwendet, dessen pH-Wert und Ionenstärke nun optimiert werden musste.

Im nächsten Schritt wurde der pH-Wert des Phosphat-Puffers im Bereich von 6,0 bis 9,5 variiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reaktionsausbeuten für D(+)-Glucosamin und D(+)-Galactosamin bei einem pH-Wert von 6,5 ihre maximalen Niveaus erreichen und dass die Ausbeute bis zum pH-Wert von 9,5 gleich bleibt (Siehe Abb. 5-3). Die beiden Dipeptide erreichen ihr Ausbeutemaximum bei pH 7,0, wobei für Gly-Gln die Ausbeute der Reaktion nicht ganz optimal ist. Abb. 5-3 zeigt, dass bei einem pH-Wert von 7,0 fast alle Bestandteile

der Modellmischung die höchste Ausbeute zeigen; Ausnahmen sind Phe und Ser, bei denen die Ausbeute bei steigendem pH-Wert noch geringfügig gesteigert werden kann. Da noch andere Parameter optimiert werden mussten, stellt der pH 7,0 einen guten Kompromiss dar.

Abb. 5-2: Elektropherogramme einer derivatisierten Probe 5 mM D(+)-Glucosamin in: (A) Phosphat-Puffer 50 mM, pH 7,0; (B) Borat-Puffer 100 mM, pH 7,5; (C) Wasser. CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1.

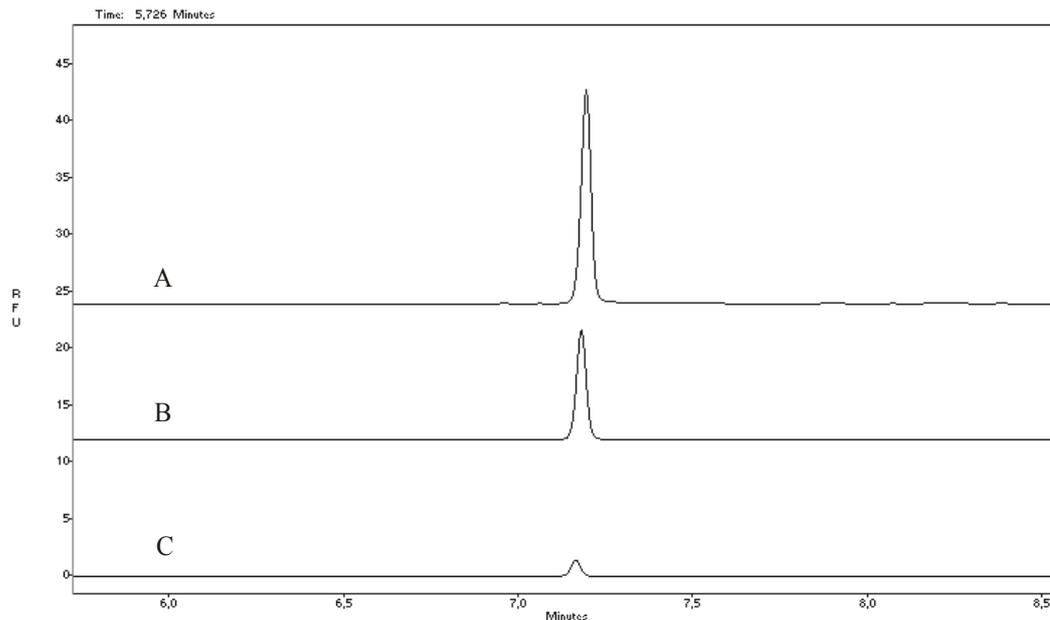
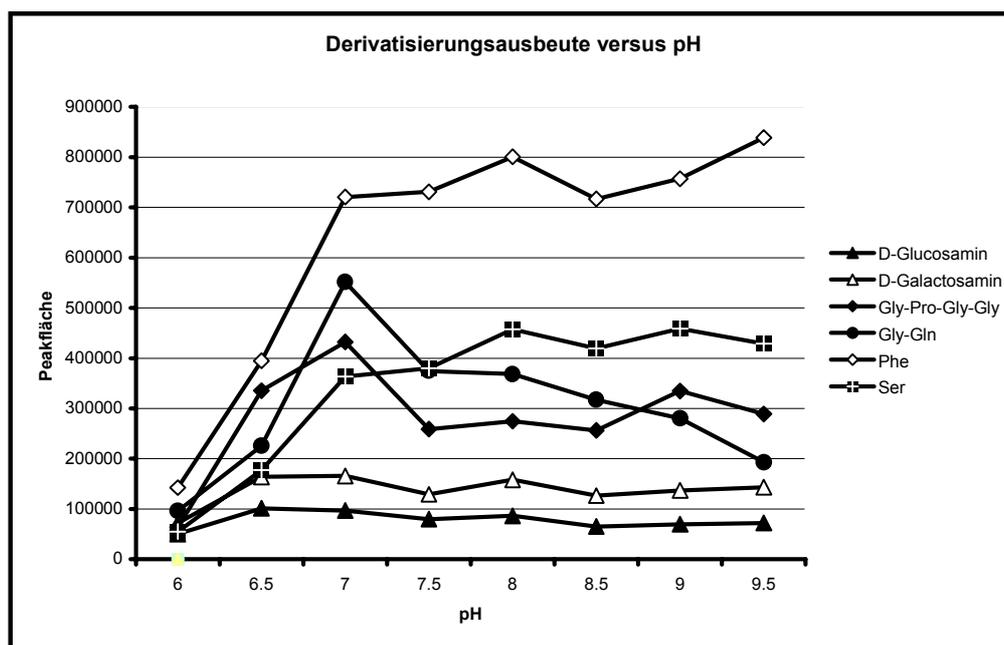
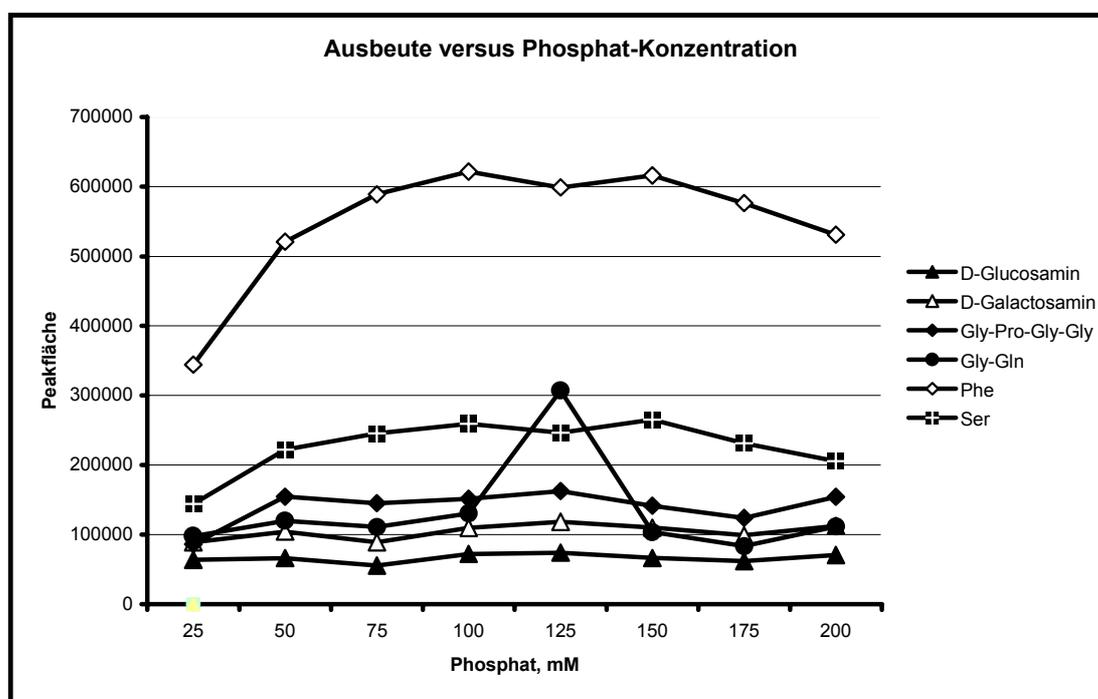


Abb. 5-3: Einfluss des pH-Wertes des Puffers auf die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion



Als nächstes wurde überprüft, ob die Reaktion von der Ionenstärke des Puffers beeinflusst wird. Die Phosphat-Konzentration wurde zwischen 25 und 200 mM variiert. Die Ergebnisse zeigten, dass in diesem Bereich die Reaktionsausbeute für D(+)-Glucosamin und D(+)-Galactosamin unbeeinflusst bleibt. Für Gly-Pro-Gly-Gly haben Phosphat-Konzentrationen über 50 mM ebenfalls keinen Einfluss auf den Ausgang der Reaktion. Für Phe und Ser wurde festgestellt, dass die Reaktionsausbeute bei Phosphat-Konzentrationen zwischen 75 und 175 mM auf ihrem maximalen Niveau bleibt. Für das zweite Dipeptid, Gly-Gln, wurde ein klares Maximum bei 125 mM Phosphatpuffer festgestellt (Siehe Abb. 5-4). Da sich bei einer Konzentration von 125 mM Phosphatpuffer die übrigen Komponenten des Modellgemisches im Maximum der Ausbeute befinden, wurde diese Konzentration als optimal betrachtet.

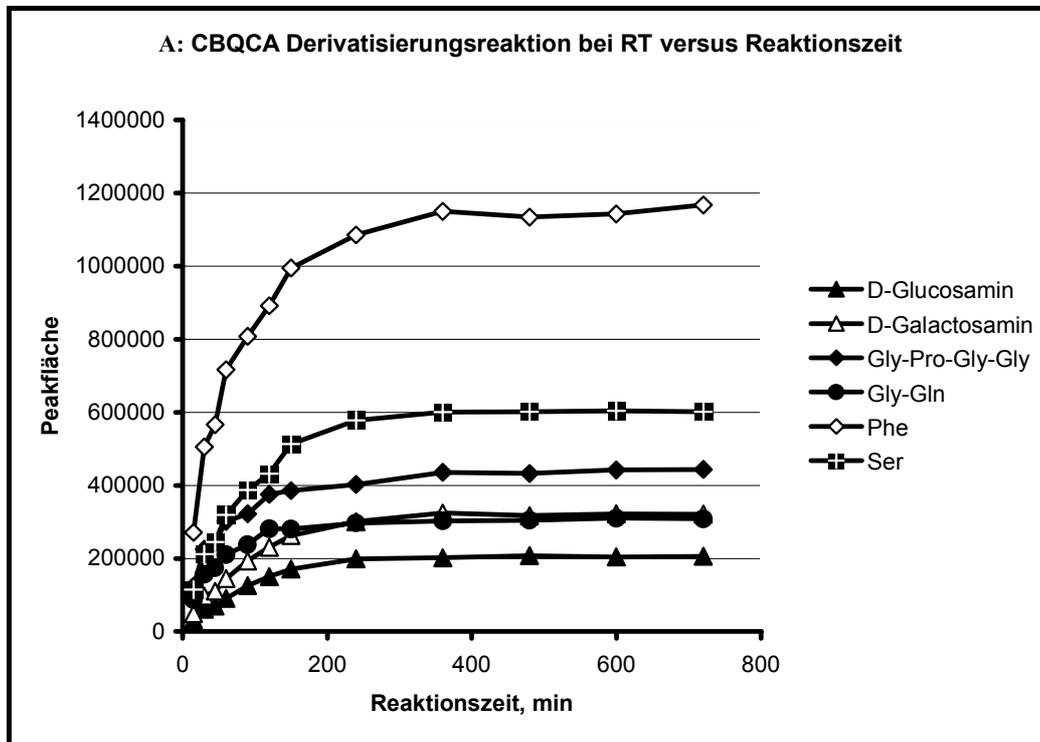
Abb. 5-4: Einfluss der Ionenstärke des Puffers auf die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion



Novotny und Mitarb. geben eine Reaktionszeit von einer Stunde als genügend für eine vollständige Derivatisierung der Aminozucker und der Aminosäuren an. Da es sich in unserem Fall um sehr niedrige Konzentrationen dieser Analyten in der Probe handelt, musste überprüft werden, ob diese Zeit auch in Fällen von sehr verdünnten Proben ausreichend ist. Um dies festzustellen, wurde die Reaktion mit der Modellmischung, bestehend aus allen sechs Analyten für zwölf Stunden bei RT durchgeführt. In bestimmten Abständen wurden aus dem Reaktionsgemisch Proben entnommen und analysiert, um den Zeitpunkt zu bestimmen, bei

dem die Ausbeute nicht mehr steigt. Abb. 5-5 zeigt, dass die Reaktion erst nach sechs Stunden vollständig beendet zu sein scheint.

Abb. 5-5: Einfluss der Reaktionszeit bei RT auf die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion



Da sechs Stunden Reaktionszeit für eine Derivatisierungsreaktion im Zeitbetrieb eigentlich zu lang ist, wurde versucht, durch Erhöhung der Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen. Die Reaktion wurde deshalb bei 30°C, 37°C und 50°C durchgeführt. Wie in Abb. 5-6, 5-7 und 5-8 zu sehen ist, verläuft die Reaktion zwar schneller, aber es ist eine klare Tendenz zur Zersetzung der Derivate zu erkennen, besonders bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C. Da eine Zersetzung der Derivate sich negativ auf die Reproduzierbarkeit der Derivatisierung auswirkt, kann nicht bei erhöhten Temperaturen sondern nur bei RT gearbeitet werden.

Da bei RT die Derivate der zu untersuchenden Substanzen auch nach zwölf Stunden noch stabil sind (Siehe Abb. 5-5), wurde die Reaktionszeit sogar auf zehn Stunden erhöht, um auf diese Weise eine vollständige Derivatisierung auch der Analyten, die nicht in dem Modellgemisch vorhanden sind und die eventuell längere Reaktionszeiten verlangen würden, zu garantieren.

Abb. 5-6: Einfluss der Reaktionszeit bei 30 °C auf die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion

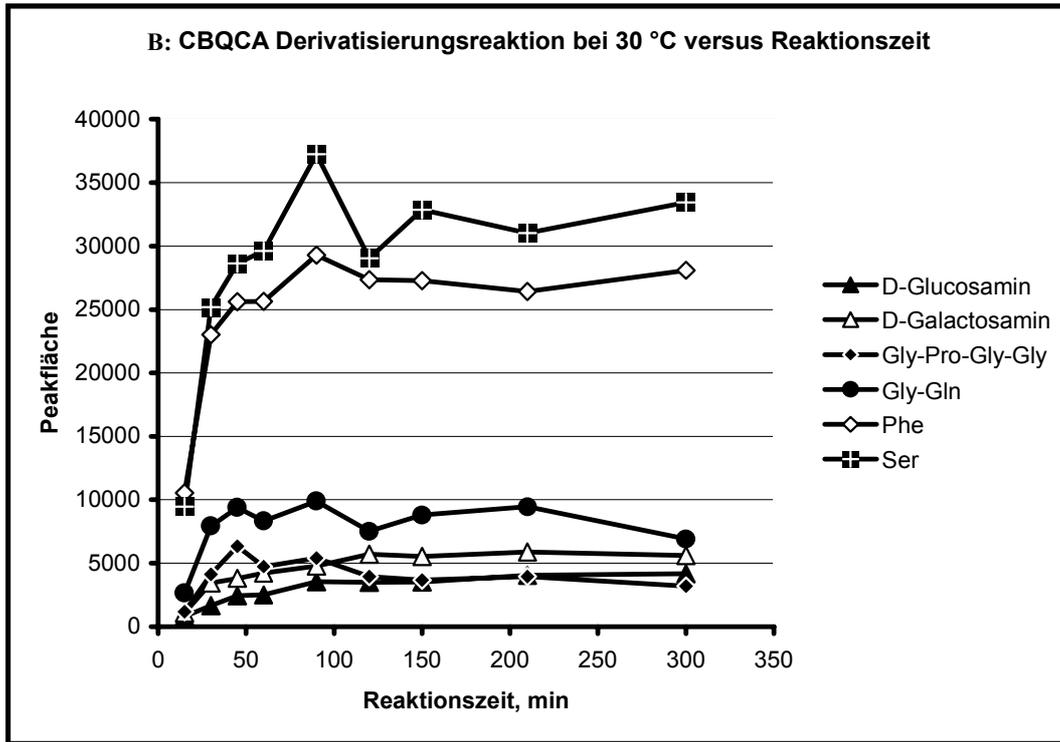


Abb. 5-7: Einfluss der Reaktionszeit bei 37 °C auf die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion

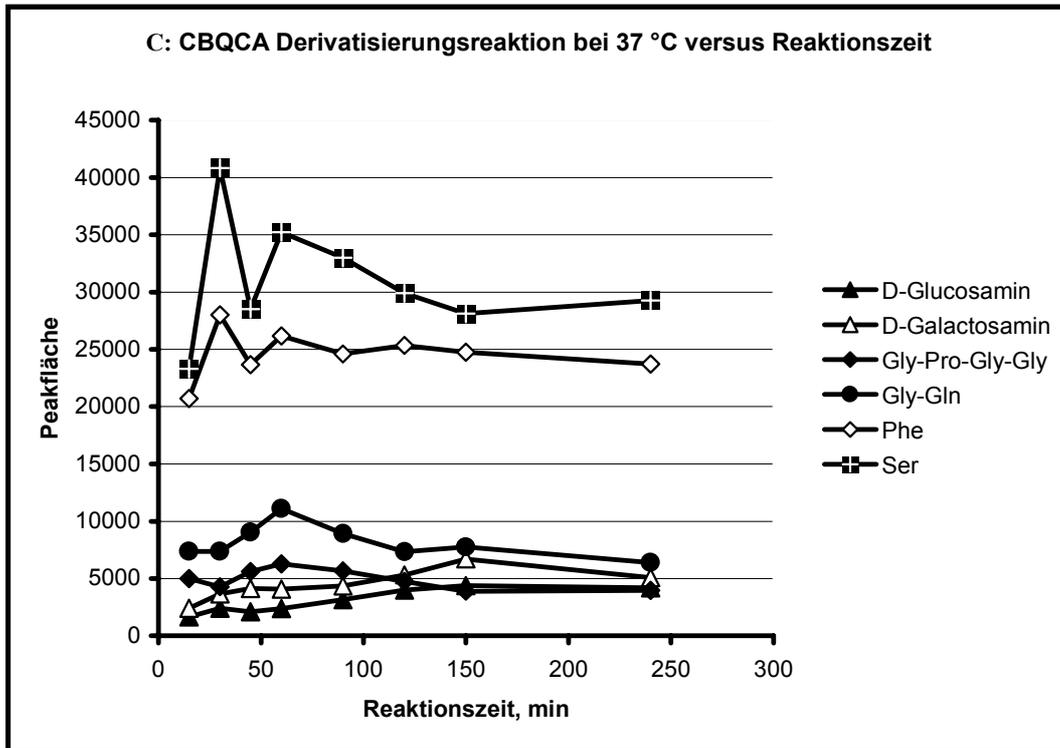
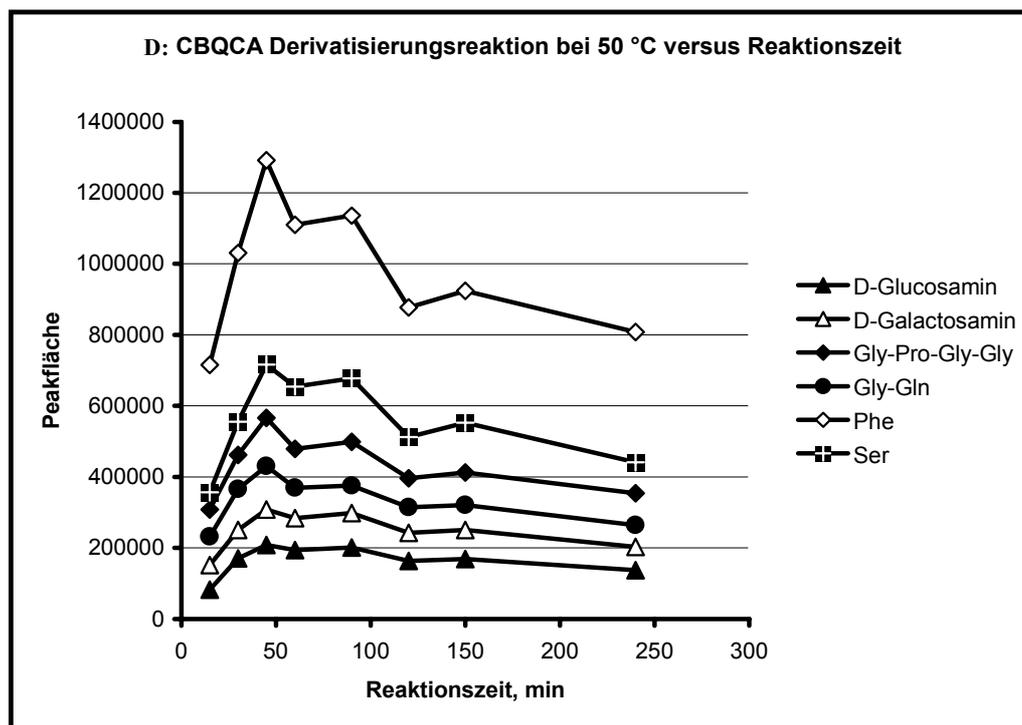


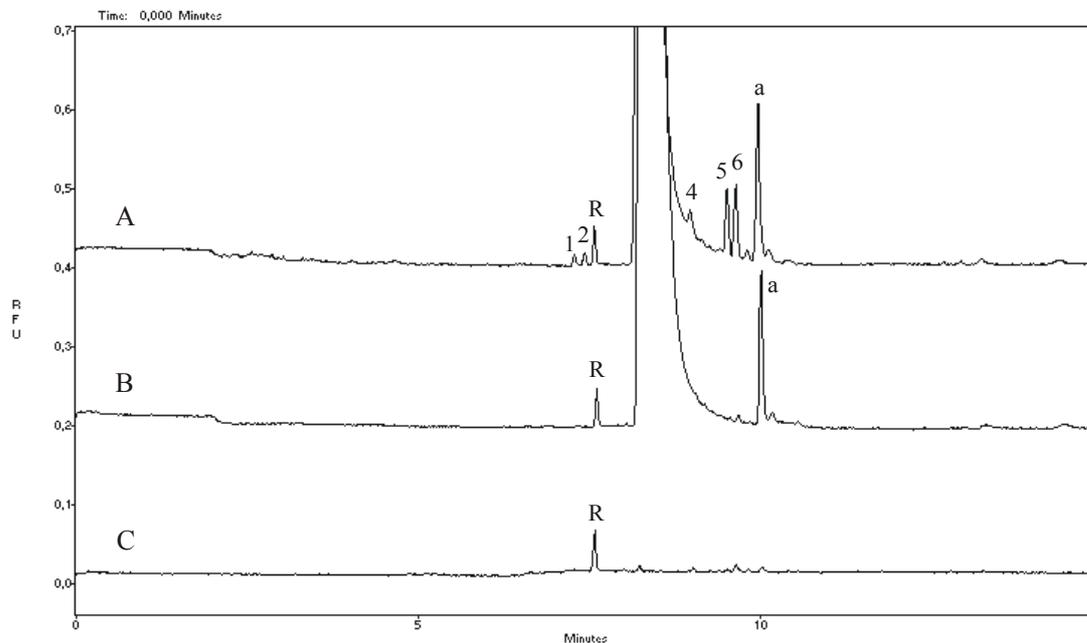
Abb. 5-8: Einfluss der Reaktionszeit bei 50 °C auf die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion



Weiterhin wurden bei der Optimierung der Derivatisierungsreaktion die Stoffmengen/Konzentrationen der repräsentativen Verunreinigungen bei einer fixen Konzentration des Derivatisierungsreagenzes von 10 mM gesucht, bei der der Hauptreagenzpeak größtmäßig vergleichbar mit den Peaks der Analyten ist und gleichzeitig die übrigen Reagenzpeaks vernachlässigbar klein sind, sodass sie nicht die Bewertung der Elektropherogramme erschweren. Mit Hilfe von seriellen Verdünnungen der Modellmischung und anschließender Derivatisierung wurde festgestellt, dass eine Konzentration von 0,00045 mg/ml für die jeweiligen Analyten diese Bedingungen erfüllt, d.h. bei dieser Konzentration sind die einzelnen Komponenten der Modellmischung im Elektropherogramm gut erkennbar. Diese Konzentration wurde als 0,1%-Niveau gesetzt und dementsprechend wurde das 100%-Niveau zu 0,45 mg/ml errechnet. Ein typisches Elektropherogramm ist in Abb. 5-9 gezeigt.

Die Konzentration von 0,45 mg/ml umgerechnet auf die einzelnen Aminosäuren als Hauptkomponenten einer realen Probe entsprechen einem Bereich von 6 mM für Gly bis 1,9 mM für (CysS)<sub>2</sub>, welches bedeutet, dass die Reaktion mit einem ca. 2 bis 5fachen Überschuss des Derivatisierungsreagenzes, bezogen auf die Hauptkomponente, durchgeführt wird. Das kommt dem von Novotny und Mitarb. empfohlenen Niveau eines ca. 5fachen Überschusses des Reagenzes gleich.

Abb. 5-9: Elektropherogramme (B) einer derivatisierten Probe Arg 0,45 mg/ml; (A) gleicher Probe wie in (B), gespikelt mit D(+)-Glucosamin, D(+)-Galactosamin, Gly-Pro-Gly-Gly, Gly-Gln, Phe und Ser jeweils 0,00045 mg/ml; (C) einer Blindprobe. CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1. Peakzuordnung: 1,2,4-6- wie in Abb. 5-1, R-Reagenzpeak a- unbekannt.



## 5.2. Kapillarelektrophorese

Auf Grund der gleichen Überlegungen wie bei den FMOC-Derivaten wurden in der CE Kapillaren mit einem Durchmesser von 75  $\mu\text{m}$  vorgezogen. In diesem Fall war keine Optimierung der Injektion notwendig, da bei der Standardarbeitsweise der Injektion, 3448 Pa für 5 sec, die Peaks von Komponenten auf 0,1%-Niveau genügend gut detektierbar sind.

Bei der Optimierung des Elektrolyten wurde nach den Bedingungen gesucht, bei denen die Zahl der unbekannt Peaks, die in den Proben gefunden wurde, maximal groß ist. Die Experimente wurden mit realen Proben durchgeführt, da die Auswahl der einzelnen Komponenten der Modellmischung rein zufällig war und damit die Wahrscheinlichkeit, sie in realen Proben zu finden, gering ist. Die Modellmischungen dienten lediglich der Optimierung der Derivatisierungsreaktion verschiedener aminohaltiger Stoffgruppen und zwar in relativ kleinen Analytkonzentrationen. Desweiteren wurden die Modellmischungen für die Überprüfung der Anwendbarkeit der Methode in Bezug auf Quantifizierungskriterien genutzt, d.h. um herauszufinden, inwiefern die Methode reproduzierbare, fehlerfreie Ergebnisse sicherstellen kann sowie in welchem Bereich die Methode angewandt werden kann.

Bei der Optimierung des Trennelektrolytes wurden reale Proben von Arg, His, Ile, Phe und Ser verwendet. Bemerkenswert ist, dass hier die besten Ergebnisse mit den schon für die FMOC-Derivate optimierten Trennelektrolyten erzielt wurden.

Bei den Arg-Proben wurde ein unbekannter Peak, Peak *a*, gefunden (Siehe Abb. 5-10 und 5-11). Da derselbe Peak in allen getesteten Arg-Batches von verschiedenen Herstellern und zwar auf einem Niveau, das größer als 0,1 % ist, festgestellt wurde, wurde zusätzlich überprüft, ob es sich nicht um ein Nebenprodukt bzw. um ein Zersetzungsprodukt der Derivatisierungsreaktion handelt. Zuerst wurde die Reaktion bei längeren Reaktionszeiten durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass Peak *a* in zehn Stunden seine Maximalgröße erreicht, längere Reaktionszeiten haben keinen Einfluss. Zweitens wurde die Reaktion bei verschiedenen Reagenzüberschüssen, 4fache, 8fache und 16fache molare Überschüsse, durchgeführt. In den Versuchen war die Konzentration des Reagenzes immer 10 mM. Es wurde die Konzentration des Arg in der Probe variiert: 0,45 mg/ml, 0,225 mg/ml und 0,1125 mg/ml, indem zu den Proben von D(+)-Glucosamin, D(+)-Galactosamin, Gly-Pro-Gly-Gly, Gly-Gln, Phe und Ser immer die gleiche Konzentration von 0,00045 mg/ml zugefügt wurde. Ihre Peaks sollten in der Form eines internen Standards zur Bewertung des Verhaltens von Peak *a* in Abhängigkeit von der Höhe des Reagenzüberschusses dienen. Anders ausgedrückt, es musste die Vergrößerung oder Verkleinerung des Peaks *a* auf Grund von Analyten, gegenüber denen der Reagenzüberschuss bei allen Proben unverändert bleibt, festgestellt werden. In Abb. 5-11 und 5-12 ist eindeutig zu sehen, dass die Verkleinerung des Peaks *a*: 1. proportional der Verminderung der Konzentration des Arg in der Probe ist; 2. dessen Größe unbeeinflusst von dem Grad des Reagenzüberschusses bleibt. Demzufolge ist es klar, dass es sich sehr wahrscheinlich um eine wirkliche Verunreinigung handelt. Es muss aber betont werden, dass diese Verunreinigung nicht in FMOC-Cl derivatisierten Proben der gleichen Batches detektiert wurde. Eine Erklärung dieser Tatsache kann sein, dass der Peak dieser Verunreinigung entweder vom Arg-Peak oder vom FMOC-Peak überdeckt wird, oder dass die Substanz, die hinter dem Peak *a* steckt, nicht mit FMOC-Cl derivatisiert werden kann.

Mit dieser Methode wurden auch Proben von Ile, His, Phe und Ser von verschiedenen Batches und Herstellern getestet. Die entsprechenden Elektropherogramme sind in den Abbildungen 5-14 bis 5-21 dargestellt.

In den Ile-Proben wurden keine unbekannt Peaks detektiert (Siehe Abb. 5-14 und 5-15), was die Ergebnisse der Versuche mit FMOC als Derivatisierungsreagenz nicht bestätigt, da bei den FMOC-Untersuchungen drei Verunreinigungen von Ile, Peaks *a* (Val), *b* (Leu) und *c* (Phe), gefunden wurden (Siehe Abb. 4-16). Als CBQCA-Derivate werden bei diesen Trennbedingungen die oben genannten Verunreinigungen nicht vollständig oder nur teilweise (Phe) von dem Phe-Peak abgetrennt. Mit einer weiteren Optimierung des Elektrolytes, bezogen konkret auf Phe, könnte eine Auftrennung dieser Verunreinigungen versucht werden.

Abb. 5-10: Elektropherogramme von Arg-Proben mit jeweils 0,45 mg/ml aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern. CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1. Zuordnung der Peaks: 1,2,4-6- wie in Abb. 5-1, R- Reagenzpeak, a- unbekannt.

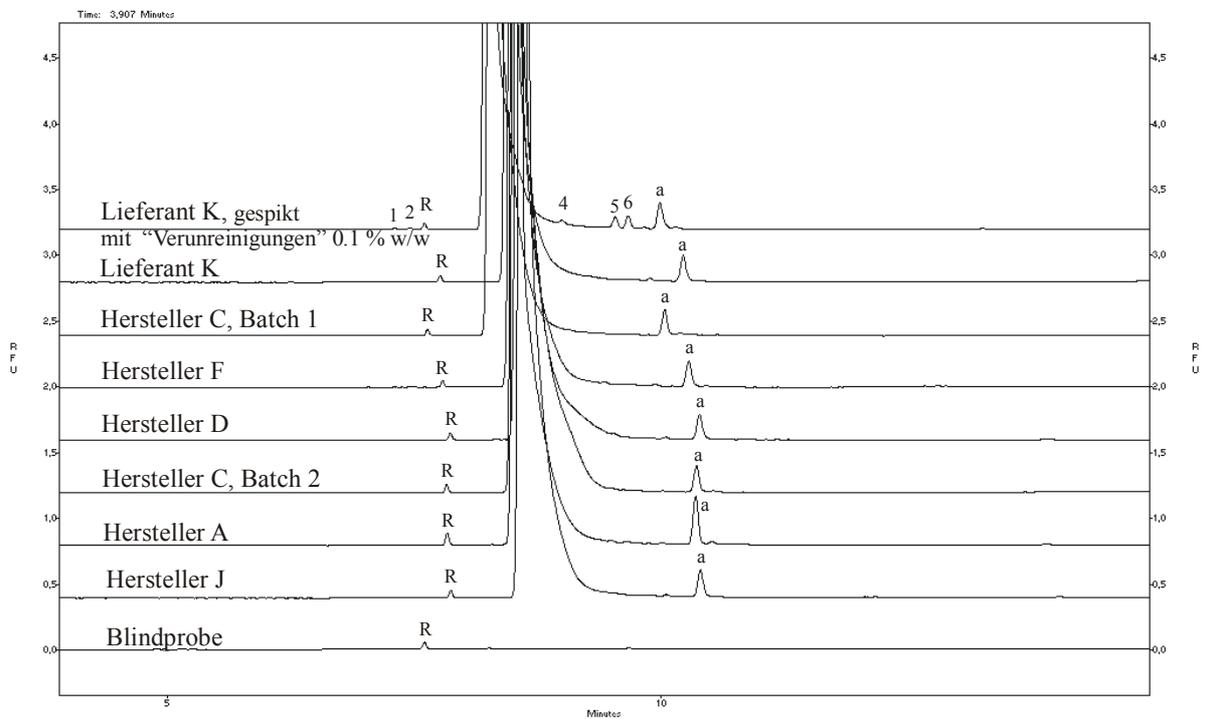


Abb. 5-11: Vergrößerung des Elektropherogramms (aus Abb. 5-10) einer 0,45 mg/ml Arg-Probe von Lieferant K, gespikt mit „Verunreinigungen“ jeweils 0,1 % w/w.

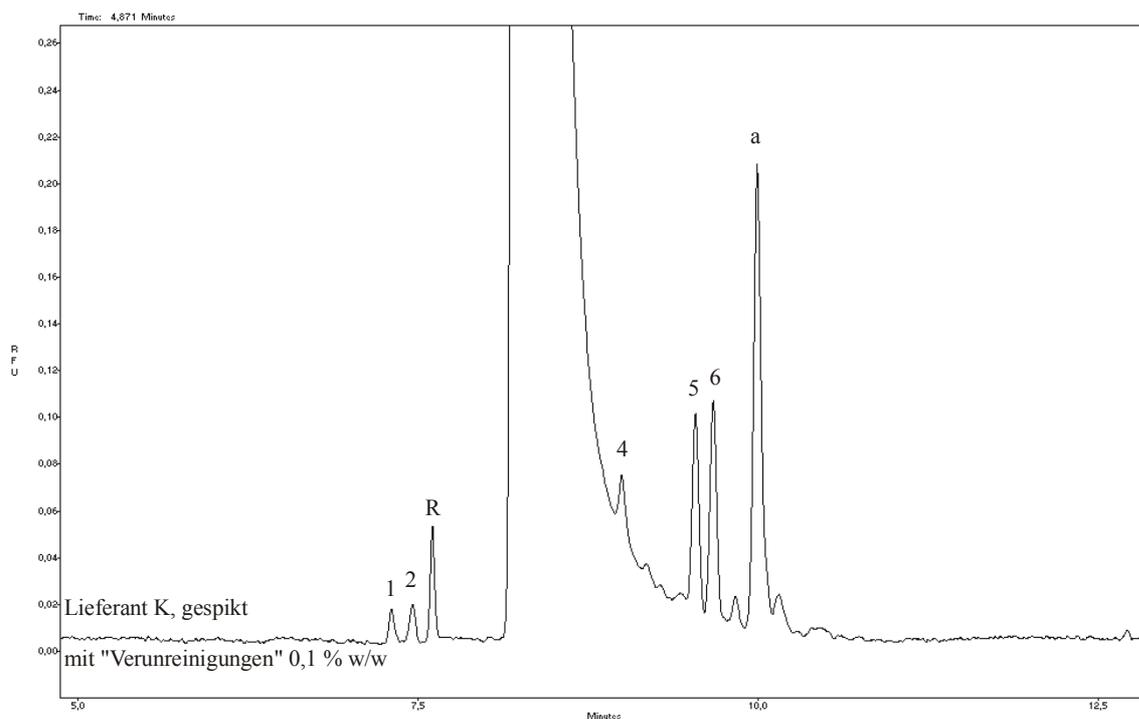


Abb. 5-12: Elektropherogramme bei verschiedenen Reagenzüberschüssen derivatisierter Proben Arg: (A) 0,45 mg/ml (4facher Reagenzüberschuss); (A1) wie in (A), gespikt mit D(+)-Glucosamin, D(+)-Galactosamin, Gly-Pro-Gly-Gly, Gly-Gln, Phe und Ser jeweils 0,00045 mg/ml; (B) 0,225 mg/ml (8facher Reagenzüberschuß); (B1) wie in (B), gespikt wie in (A1); (C) 0,1125 mg/ml (16facher Reagenzüberschuss); (C1) wie in (C), gespikt wie in (A1). CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1. Peakzuordnung: 1,2, 4-6- wie in Abb. 5-1, R- Reagenzpeak, a- unbekant

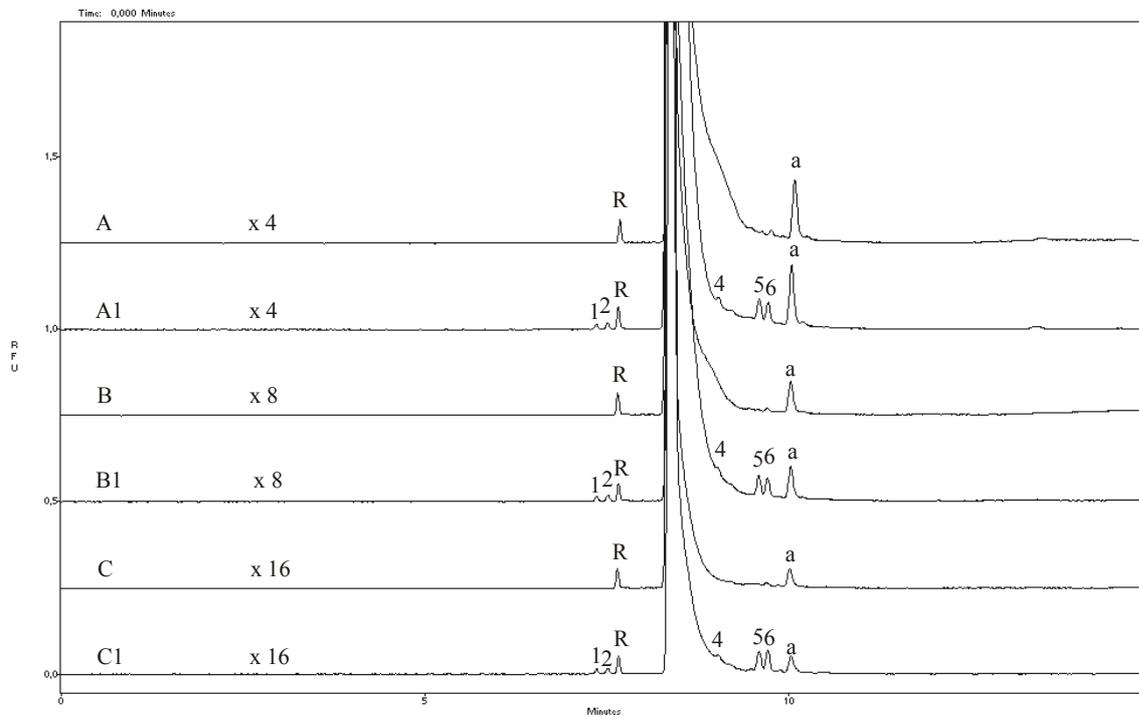


Abb. 5-13: Abb. 5-12 in einem anderen Maßstab, in dem der Arg-Peak zu sehen ist.

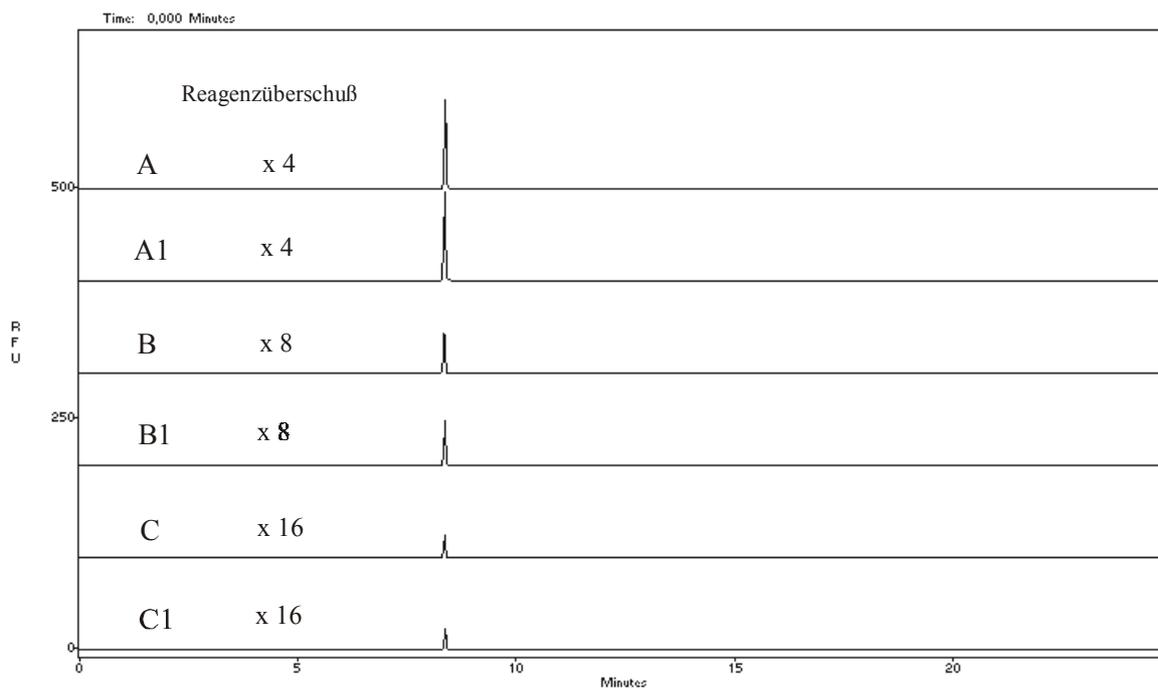


Abb. 5-14: Elektropherogramme von Ile-Proben: (A) Ile 0,45 mg/ml; (B) Ile 0,45 mg/ml, gespikt mit „Verunreinigungen“ jeweils 0,1 % w/w; (C) „Verunreinigungen“ jeweils 0,1 % w/w; (D) Blindprobe. CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1. Peakzuordnung: 1-6- wie in Abb. 5-1, R- Reagenzpeak.

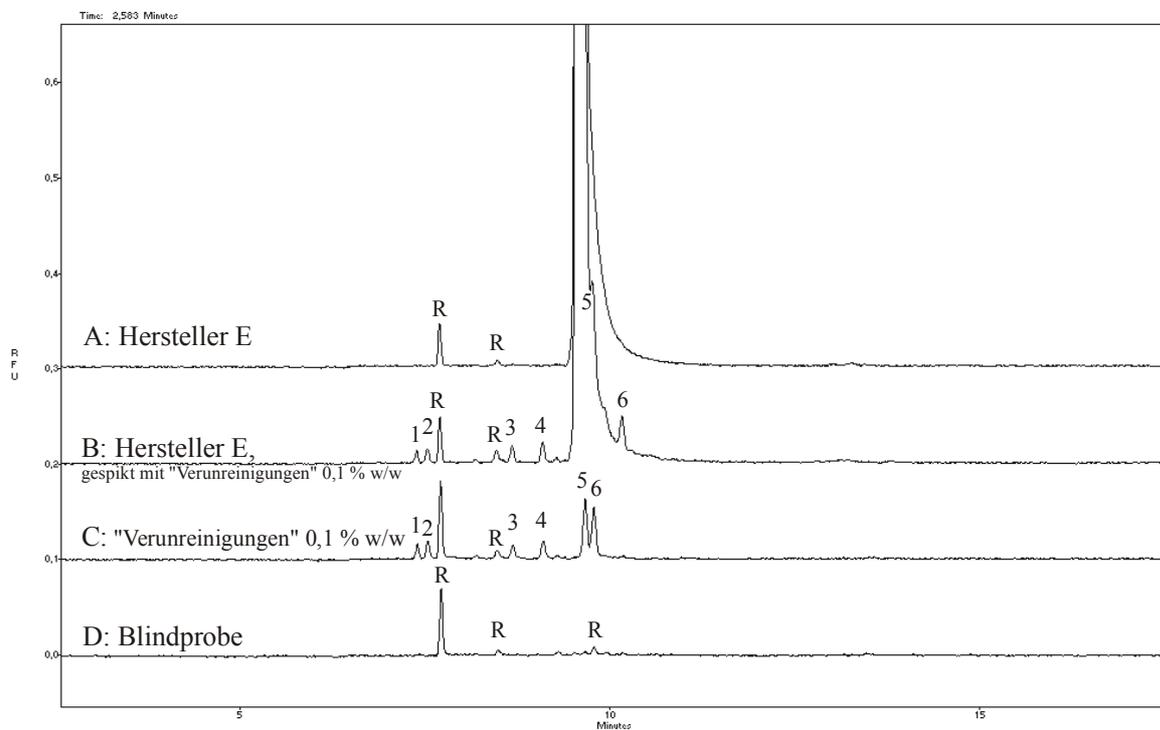


Abb. 5-15: Vergrößerung des Elektropherogramms (aus Abb. 5-14) einer 45 mg/ml Ile-Probe von Hersteller E, gespikt mit „Verunreinigungen“ jeweils 0,1 % w/w..

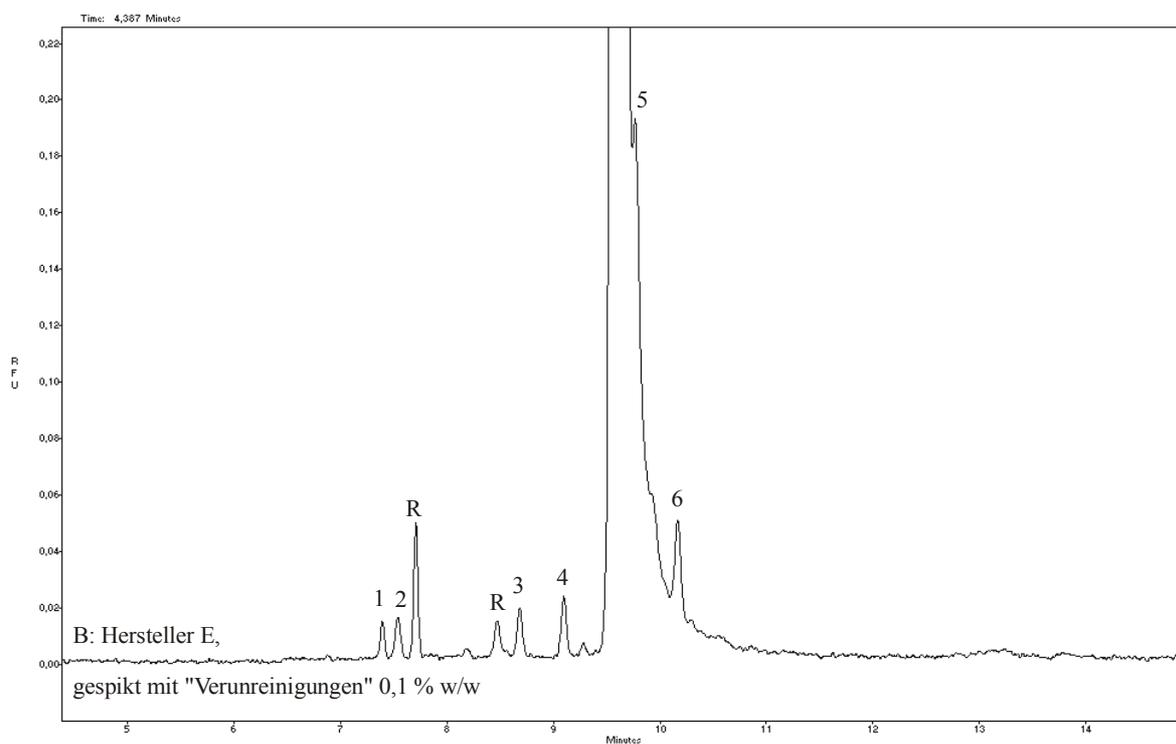


Abb. 5-16: Elektropherogramme von His-Proben jeweils 0,45 mg/ml aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern. CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1. Peakzuordnung: 1-6- wie in Abb. 5-1, R- Reagenzpeak, a-o- unbekannt.

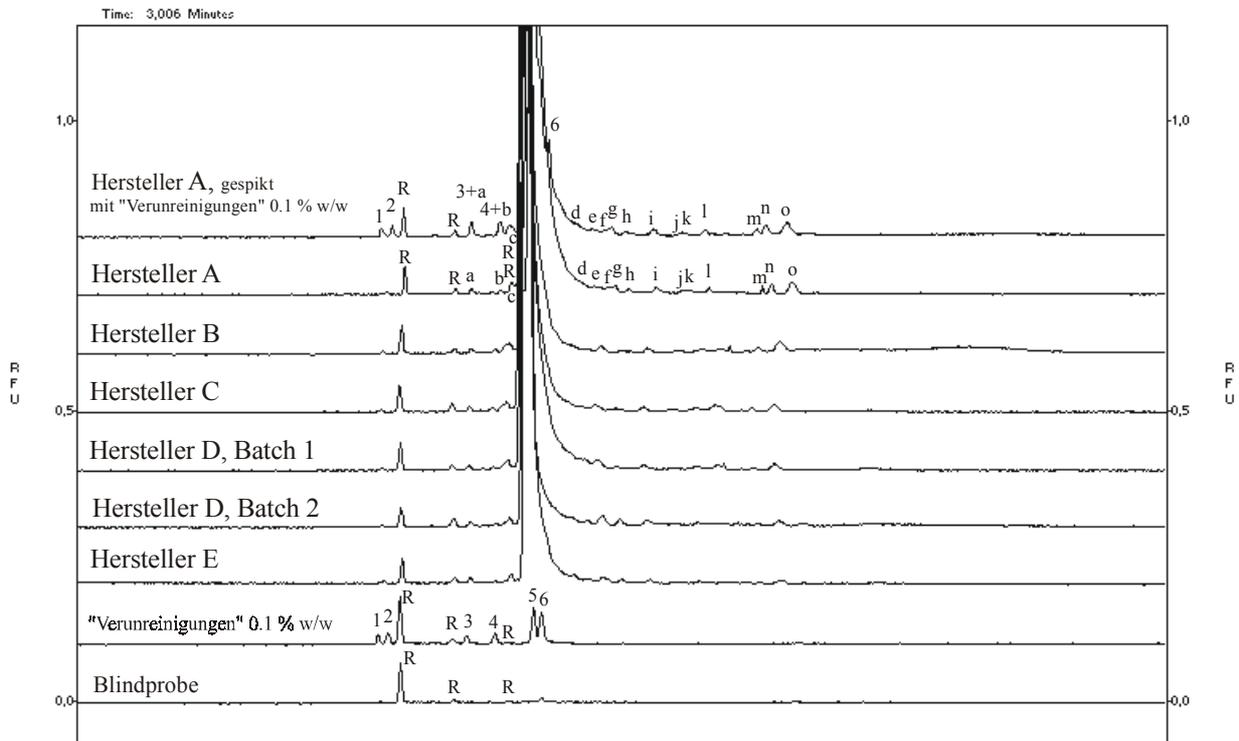


Abb. 5-17: Vergrößerung des Elektropherogramms (aus Abb. 5-16) einer 0,45 mg/ml His-Probe von Hersteller A.

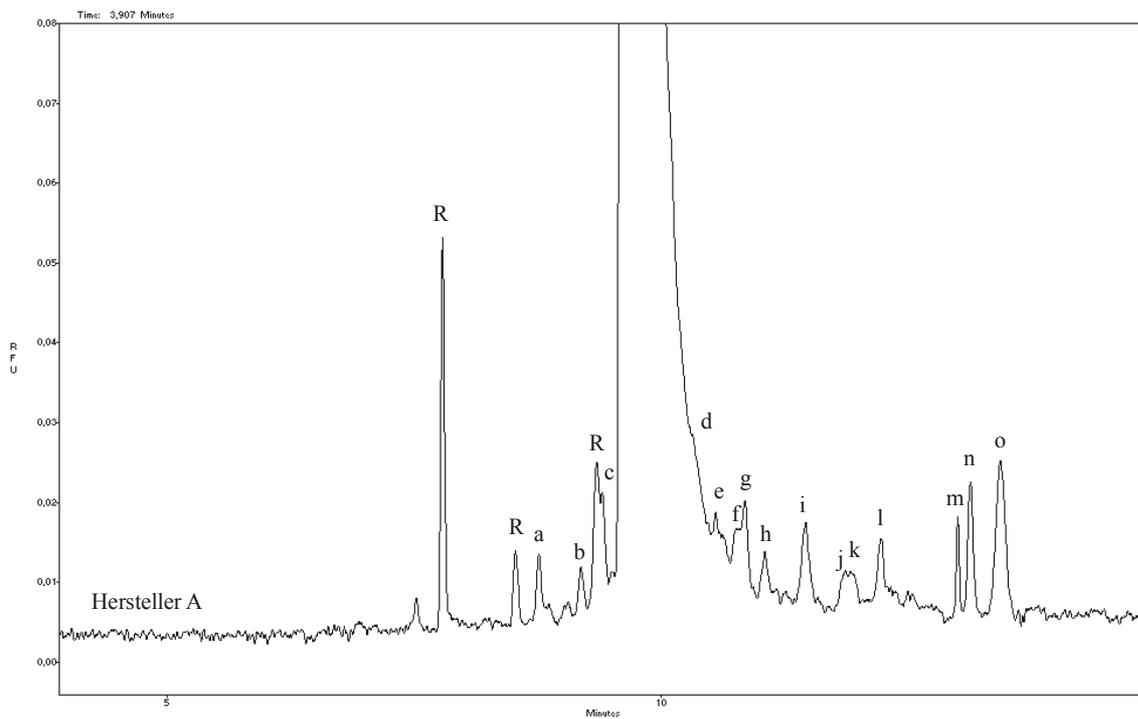


Abb. 5-18: Elektropherogramme von Phe-Proben jeweils 0,45 mg/ml aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern. CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1. Peakzuordnung: 1-6- wie in Abb. 5-1, R-Reagenzpeak, a-d- unbekannt.

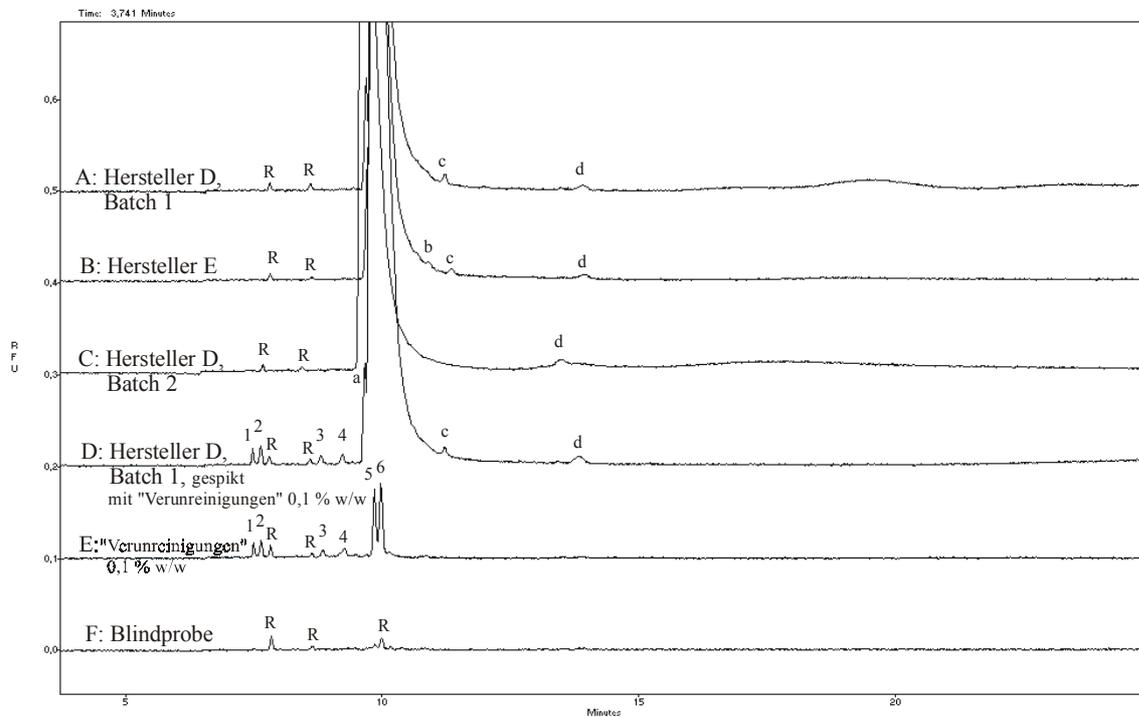


Abb. 5-19: Vergrößerung des Elektropherogramms (aus Abb. 5-18) einer 0,45 mg/ml Phe-Probe von Hersteller D gespikt mit „Verunreinigungen“ jeweils 0,1 % w/w.

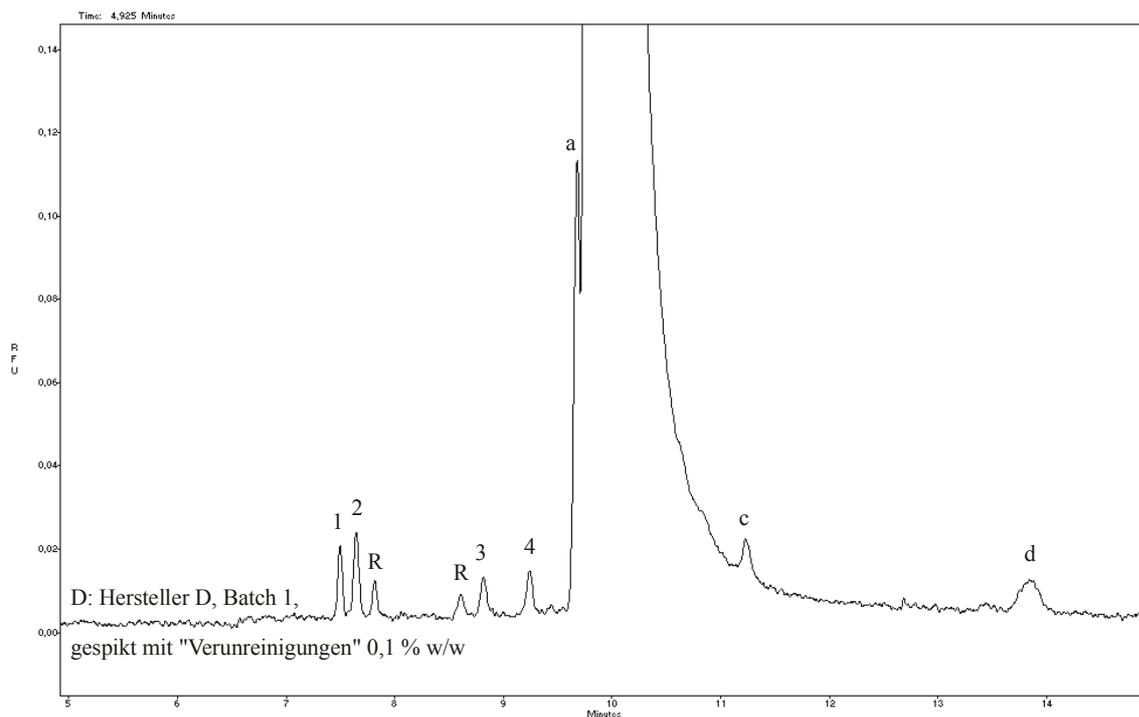


Abb. 5-20: Elektropherogramme von Ser-Proben jeweils 0,45 mg/ml aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern. CE-Bedingungen wie in Abb. 5-1. Peakzuordnung: 1-6- wie in Abb. 5-1, R-Reagenzpeak, a, b- unbekannt.

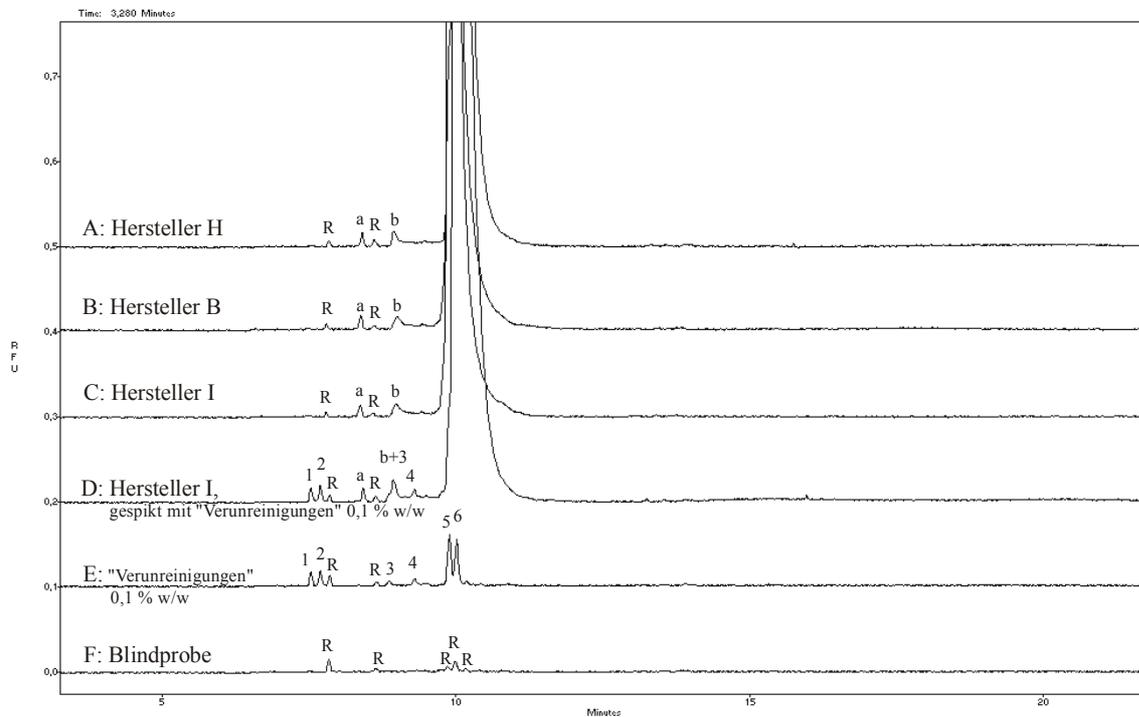
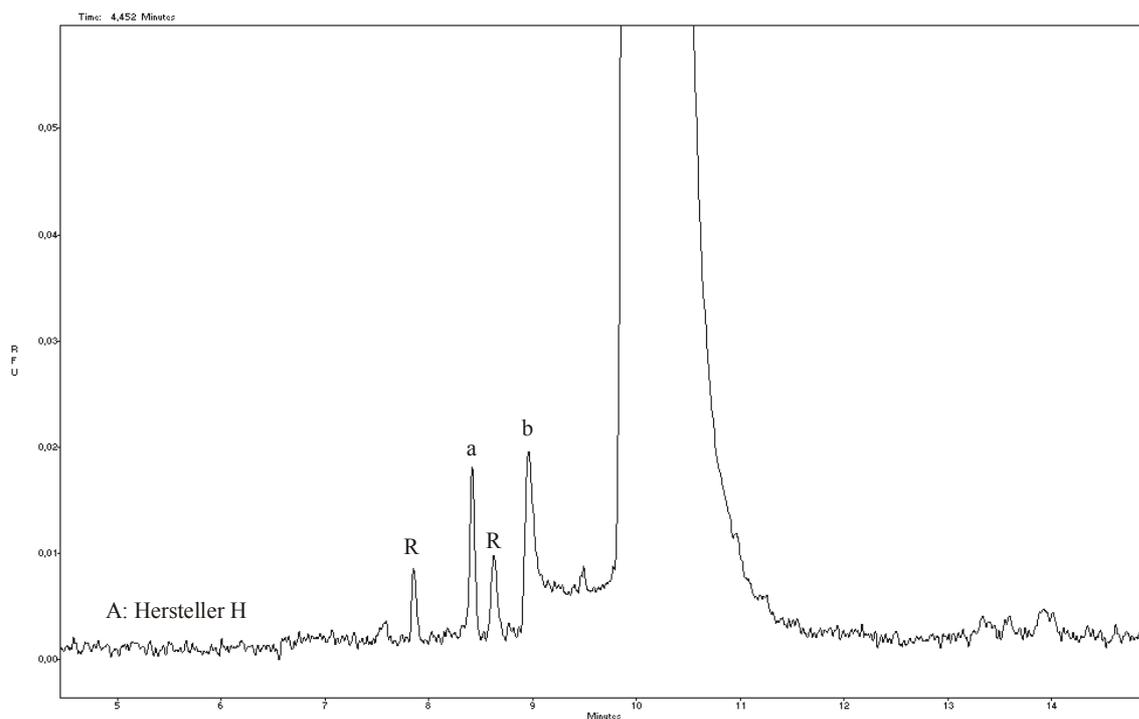


Abb. 5-21: Vergrößerung des Elektropherogramms (aus Abb. 5-20) einer 0,45 mg/ml Ser-Probe 0,45 mg/ml von Hersteller H.



In den His-Proben wurden in allen getesteten Batches ca. fünfzehn verschiedene Verunreinigungen mit 0,1 % detektiert, wenn als Maßstab für diese Grenze der Mittelwert der Peaks von D(+)-Glucosamin, D(+)-Galactosamin, Gly-Pro-Gly-Gly, Gly-Gln, Ser und Phe angenommen wird. Diese wurden den His-Proben mit Ziel der Quantifizierung zugesetzt (Siehe Abb. 5-16 und 5-17).

Im Fall der Phe-Proben sind die Ergebnisse mit denjenigen der FMOC-Derivatisierungen vergleichbar (Siehe Abbildungen 4-1, 5-18 und 5-19). Der Gehalt der einzelnen Verunreinigungen liegt unterhalb von 0,1 %. Die Grösse von Peak *a* kann nicht sehr korrekt bewertet werden, da er nicht vollständig vom Hauptpeak abgetrennt ist. Wenn man die Größen von den Ser- und Phe-Peaks berücksichtigt (Abb. 5-18, E, Peaks 5 und 6), würde man keinen Grund zur Annahme haben, dass der Gehalt der Substanz, die hinter diesem Peak steht, die Grenze von 0,1 % w/w überschreitet.

Zwei unbekannte Peaks wurden in allen drei Ser-Proben festgestellt (Abb. 5-20 und 5-21). Da es sich bei Peak *b* aufgrund der unsymmetrischen Peakform wahrscheinlich um zwei Substanzen handelt, stimmt das mit den Ergebnissen der Untersuchungen mit FMOC-Cl überein. Keiner von diesen beiden Peaks überschreitet die Grenze von 0,1 %; dies gilt nur mit Vorbehalt, da die Responsfaktoren der Substanzen für Peaks *a* und *b* nicht bekannt sind. Das Gleiche gilt übrigens auch für die Verunreinigung *a* in den Arg-Proben. Wenn als Vergleichsbasis die Größen der Peaks der beiden Aminosäuren Ser und Phe (Abb. 5-11, Peaks 5 und 6) genommen werden, würde Peak *a* in der Grössenordnung von ca. 0,2 % w/w bewertet werden. Im Vergleich zu den Peaks der beiden Aminozucker D(+)-Glucosamin und D(+)-Galactosamin gesehen (Peaks 1 und 2 in der gleichen Abb.) würde der Gehalt von Substanz *a* sogar 1,0 % w/w überschreiten. In jedem Fall ist es empfehlenswert, die Substanz von Peak *a* zu identifizieren.

### 5.3. Validierung der Methode

Zwei Modellmischungen wurden für die Validierung der Methode benutzt: Modellmischung 1, bestehend aus Ile als Hauptsubstanz und D(+)-Glucosamin, D(+)-Galactosamin, Gly-Gln, Gly-Pro-Gly-Gly, Phe und Ser als „Verunreinigungen“; Modellmischung 2, bestehend aus Arg, gespikkt mit den gleichen „Verunreinigungen“. Da die Peaks von Phe und Ser nicht gut von der Hauptsubstanz der Modellmischung 1 abgetrennt werden können (Siehe Abb. 5-15), wurde für ihre quantitative Bewertung Modellmischung 2 verwendet (Siehe Abb. 5-11). D(+)-Glucosamin wurde als IS benutzt mit dem Ziel, Injektionsfehler zu kompensieren sowie Fehler, die bei der Probenvorbereitung auftreten könnten. In allen Experimenten war die

Konzentration des IS 0,00045 mg/ml (0,1 % w/w). Es wurden bei allen Berechnungen die korrigierten Peakflächen der Analyten, bezogen auf die korrigierte Peakfläche des IS verwendet.

*Linearität:* Die Linearität der Methode wurde mit Hilfe beider Modellmischungen bewertet. Proben von Ile und Arg wurden mit „Verunreinigungen“ in vier Konzentrationsbereichen (wie in Tabelle 5-1) gespikt. Die jeweiligen Korrelationskoeffizienten, die in der gleichen Tabelle angegeben sind, wurden mittels linearer Regression errechnet.

*Präzision:* Die Gesamtpräzision des analytischen Systems wurde mit den Modellmischungen 1 und 2 beurteilt. Sechs unabhängige Proben von jedem Gemisch, die „Verunreinigungen“ auf 0,1%-Niveau enthalten, wurden nacheinander derivatisiert und analysiert. Die sogenannte Run-to-run-Präzision wurde mittels sechs aufeinander folgender Injektionen einer derivatisierten Probe bewertet. Die Ergebnisse von den beiden Tests, präsentiert als %-RSA, sind in Tabelle 5-1 angegeben.

*LOD/LOQ:* LOD (Signal/Rausch-Verhältnis = 3) bzw. LOQ (Signal/Rausch-Verhältnis = 10) der „Verunreinigungen“ der Modellgemische wurden mittels serieller Verdünnungen der Konzentrationen in den Proben festgestellt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 5-1 angegeben.

*Richtigkeit:* Die Richtigkeit der Methode wurde durch ihre Wiederfindung auf drei Niveaus, 0,05 % w/w, 0,1 % w/w und 0,2 % w/w, bewertet. Jede Probe wurde dreimal derivatisiert bzw. analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-2 als Konfidenzintervalle angegeben.

*Robustheit:* Die Robustheit der Methode wurde in Bezug auf zwei Parameter untersucht: das Derivatisierungsreagenz und die Kapillare. Zwei Batches des Derivatisierungsreagenzes wurden in den Experimenten eingesetzt. Es wurden praktisch keine Unterschiede festgestellt. In beiden Fällen wurden die Zahl und die Größe der Reagenzpeaks in den vorgesehenen Grenzen gefunden. Wenn die Reagenzlösungen im Tiefkühlschrank (bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) aufbewahrt werden, können sie mindestens drei Monate ohne Verlust an Reaktionsfähigkeit oder ein Kennzeichen der Zersetzung verwendet werden. Drei Batches von Kapillaren wurden während der Entwicklung und der Validierung der Methode eingesetzt. Es wurden keine Unterschiede gegenüber der Methode festgestellt. Die kleinen Abweichungen der Migrationszeiten der Analyten blieben im normalen Rahmen und es wurde keine Tendenz gefunden, die mit den konkreten Batches verbunden sein könnte.

Tabelle 5-1: Linearität, Präzision und LOD/LOQ der Methode

Substanz	Modellmischung	Linearität: Konzentrationsbereich			Präzision			LOD/LOQ, als Gehalt in % bezogen auf die Hauptkomponente
		mM	µg/ml	als % von 0,1 % Niveau	Korrelations- koeffizient	Run-to-run RSA (%)	Gesamtpräzision RSA (%)	
<b>D-(+)-Glucosamin (IS)</b>	-/1	0.0021	0.45	100	-	-	-	0.017/0.039
<b>D-(+)-Galactosamin</b>	1	0.001-0.01	0.18-1.8	40-400	0.9921	2.6	2.7	0.016/0.035
<b>Gly-Gln</b>	1	0.001-0.01	0.29-2.9	44-444	0.9999	2.3	2.5	0.013/0.027
<b>Gly-Pro-Gly-Gly</b>	1	0.001-0.01	0.25-2.5	64-644	0.9976	2.8	3.1	0.014/0.029
<b>Phe</b>	2	0.001-0.01	0.17-1.7	37-367	0.9999	2.1	2.8	0.008/0.023
<b>Ser</b>	2	0.001-0.01	0.11-1.1	23-233	0.9977	2.2	2.6	0.007/0.019

Tabelle 5-2: Richtigkeit der Methode, abgeschätzt als Wiederfindung auf drei Niveaus- 50 %, 100 % and 200 % von dem Niveau 0,1 % w/w

Substanz	Modellgemisch	Wiederholung	Wiederfindung des erwarteten Gehaltes bewertet in %			Konfidenzintervall ( $\alpha=0.05$ , n=9)
			50	100	200	
<b>D-(+)-Glucosamin (IS)</b>	-	-	-	-	-	-
<b>D-(+)-Galactosamin</b>	1	1	101.3	98.2	103.2	± 1.29
		2	99.4	102.4	102.6	
		3	97.8	99.6	98.3	
<b>Gly-Pro-Gly-Gly</b>	1	1	103.6	97.3	99.4	± 1.59
		2	104.7	102.4	98.7	
		3	100.0	98.6	103.2	
<b>Gly-Gln</b>	1	1	96.7	101.4	103.2	± 2.41
		2	103.2	102.6	100.4	
		3	99.4	97.2	97.9	
<b>Phe</b>	2	1	98.2	99.6	102.3	± 1.56
		2	104.3	104.1	104.6	
		3	101.2	100.5	98.2	
<b>Ser</b>	2	1	102.3	97.3	100.8	± 1.85
		2	104.5	98.6	102.6	
		3	96.2	104.5	99.9	

Zusätzlich wurde festgestellt, dass kleine Variationen des pH-Wertes des Trennelektrolytes ( $\pm 0,1$ ), der Arbeitstemperatur ( $\pm 2\text{ °C}$ ), der Konzentration des micellbildenden Reagenzes ( $\pm 1\text{ mM}$ ) oder der Spannung ( $\pm 1\text{ kV}$ ) die Ergebnisse der Messungen nicht beeinflussen. Die Ergebnisse aus der Validierung zeigen damit, dass die Methode zur Untersuchung von Verunreinigungsprofilen der Aminosäuren gegenüber aminhaltigen Substanzen in Konzentrationen von 0,1 % w/w sowie für ihre Quantifizierung geeignet ist.

Das Europäische Arzneibuch beschreibt zur Zeit zur Beurteilung der Reinheit von Aminosäuren eine DC-Methode zum Nachweis von „ninhydrin-positiven“ Substanzen (Siehe Kapitel 2.1 Dünnschichtchromatographie). Die in diesem Kapitel beschriebene CE-Methode wurde in Bezug auf die Empfindlichkeit mit dieser DC-Methode verglichen. Proben von His, Ile, Phe, Ser und Arg aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern wurden mit beiden Methoden getestet. Die Ergebnisse, die in Tabelle 5-3 zusammengefasst sind, zeigen deutlich, dass die Fähigkeiten der DC-Methode, was Empfindlichkeit und Selektivität betrifft, zur Bewertung der Reinheit der Aminosäuren nicht ausreicht. Mittels dieser Methode wurden Verunreinigungen in keiner der getesteten Proben gefunden. Mit Ausnahme von Ile wurden mittels CE Verunreinigungen in allen getesteten Proben festgestellt, und im Fall von His war ihre Anzahl größer als 10.

Tabelle 5-3: Verunreinigungsprofile von einigen biotechnologisch hergestellten Aminosäuren, abgeschätzt mittels Dünnschichtchromatographie und Kapillarelektrophorese

Aminosäure	Hersteller/Batch	Zahl der detektierten Verunreinigungen	
		mittels DC	mittels CE (als CBQCA-Derivate)
<b>His</b>	A	-	> 10
	B	-	> 10
	C	-	> 10
	D/1	-	> 10
	D/2	-	> 10
	E	-	> 10
<b>Ile</b>	E	-	-
<b>Arg</b>	<b>Lieferant K</b>	-	1
	C/1	-	1
	F	-	1
	D	-	1
	C/2	-	1
	A	-	1
	J	-	1
<b>Phe</b>	D/1	-	2
	E	-	3
	D/2	-	1
<b>Ser</b>	H	-	2
	B	-	2
	I	-	2

## 6. Nucleinsäuren

### 6.1. UV-Spektroskopie

Da die Basen der Nucleinsäuren aromatische Ringe besitzen, können die Nucleinsäuren (NS) spektrophotometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm detektiert und quantifiziert werden. Eine Lösung, die 50 µg/ml doppelsträngige DNS enthält und bei einer Schichtdicke von 1 cm vermessen wird, besitzt einen Absorptionswert von 1 (sogenannte Optische Dichte, OD). Dieser OD-Wert dient zur Bestimmung der Konzentration einer unbekanntes Desoxyribonucleinsäure (DNS-Lösung). Nicht basengepaarte Nucleinsäuren besitzen eine höhere Absorption, ein Effekt, der als Hyperchromie bezeichnet wird. Es gelten daher für Ribonucleinsäuren (RNS) sowie einzelsträngige DNS andere Werte (Siehe Tabelle 6) [176].

Tabelle 6: Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäurelösungen. Die photometrisch bestimmte Oligonucleotidkonzentration kann über die Annäherungswerte einzelsträngiger DNS oder aber - bei bekannter Sequenz - aus der Summe der molaren Absorptionskoeffizienten der Basen des Oligonucleotids berechnet werden.

1 OD <sub>260</sub> entspricht	50 µg/ml	doppelsträngiger	DNS
	40 µg/ml	einzelsträngiger	DNS
	33 µg/ml	einzelsträngiger	RNS

Molare Absorptionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide

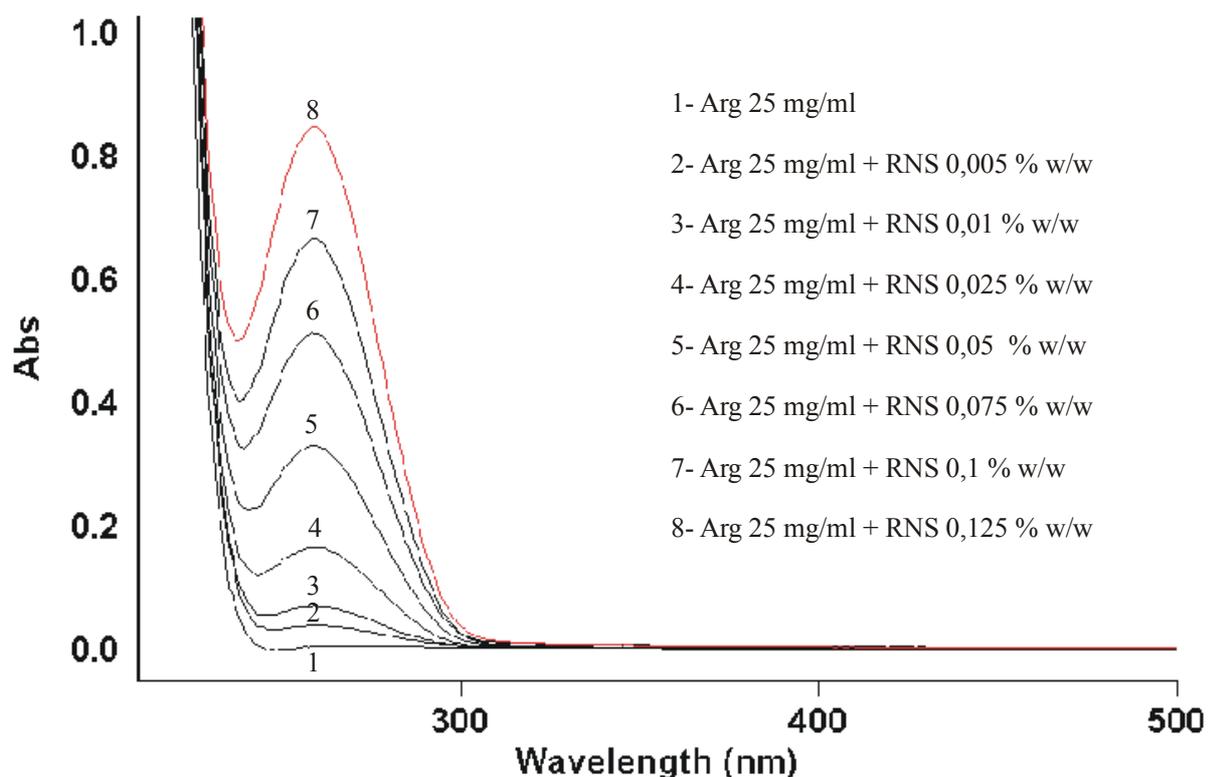
	$\epsilon$ in mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
(dATP)	15,4
(dCTP)	9,0
(dGTP)	13,7
(dTTP)	10,0

$\Sigma[\epsilon(\text{dNTP})_{\text{Oligonucleotid}}]$  entspricht 1 µmol/ml

Da der größere Teil der Aminosäuren keine Chromophore besitzt und damit eine Absorption im Bereich ca. 260 nm fehlt, ist zu erwarten, dass eine eventuell anwesende NS in den obengenannten Aminosäuren nachgewiesen werden kann. Dies trifft natürlich nur zu, wenn der Gehalt der NS in der Probe über der Nachweisgrenze liegt. Das bedeutet, dass zuerst die Konzentration der Nucleinsäuren gefunden werden muss, bei der sie spektrophotometrisch bei 260 nm detektiert werden können. Die Experimente wurden mit RNS aus *Torula utilis* durchgeführt. Die Stammlösung und alle Verdünnungen wurden in Tris-HCl-Puffer (10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) vorbereitet. Die Stammlösung wurde soweit seriell verdünnt, bis die

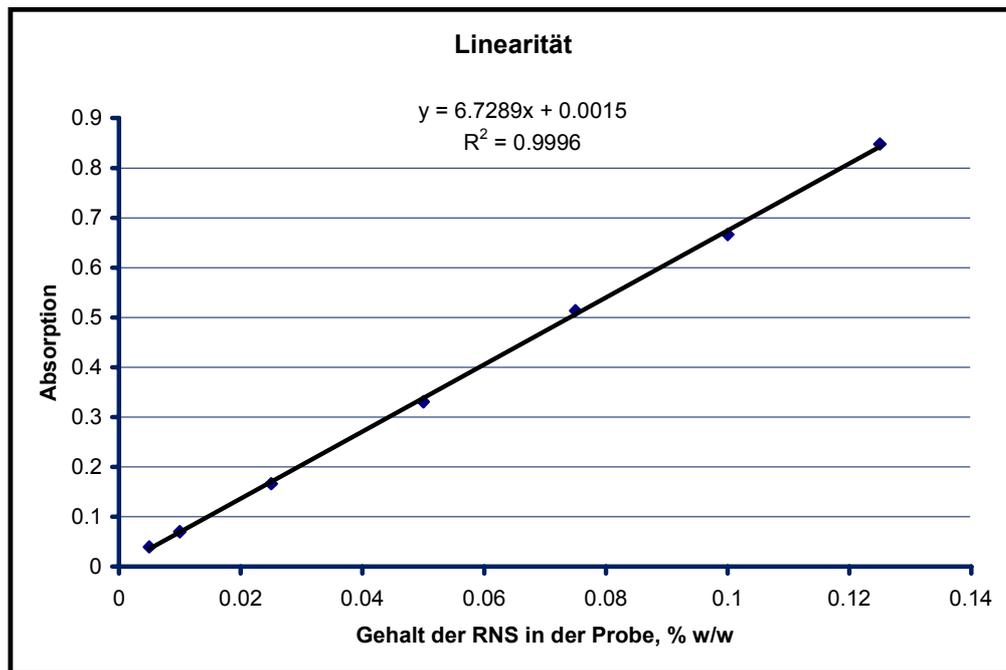
bei 260 nm gemessene Absorption ca. 0,5 betrug. Bei einer Konzentration von 0,025 mg/ml wurde eine Absorption  $A_{260}$  von 0,492 gemessen. Wenn also eine RNA-Konzentration von 0,1 % w/w detektiert werden soll, muss die Konzentration der Aminosäure in der Lösung 25 mg/ml sein. Da die Absorption einer 0,025 mg/ml Ribonucleinsäurelösung bei 260 nm relativ hoch ist (ca. 0,5), wird bei dieser Aminosäurekonzentration auch eine Detektion der doppel- und einzelsträngigen DNS, deren kleinere optische Dichte berücksichtigt werden muss (Siehe Tabelle 6), auf dem 0,1%-Niveau gesichert. Die UV-Spektren von Arg-Proben der Konzentration 25 mg/ml, versetzt mit verschiedenen Mengen RNA, sind in Abb. 6-1 daegestellt. Wie man sieht, kann ein RNS-Gehalt von 0,005 % w/w detektiert werden. Wie aus Diagramm 6 zu entnehmen ist, besteht eine sehr gute Linearität im Bereich von 0,005 bis 0,125 % w/w. Die Methode ist also geeignet, den Gehalt von Nucleinsäuren in verschiedenen Aminosäuren zu quantifizieren.

Abb. 6-1: UV-Spektren von Arg-Lösungen 25 mg/ml, versetzt mit verschiedenen Mengen RNS



Unter den so beschriebenen Bedingungen wurden Arg-Proben von verschiedenen Herstellern und Batches sowie auch Proben von Pro, His, Ile und Ser untersucht. Die entsprechenden UV-Spektren sind in Abbildungen 6-2, 6-3, 6-4, 6-5 und 6-6 wiedergegeben.

Diagramm 6: Linearität der Absorption der RNS in Arg-Proben bezogen auf ihren Gehalt



Die UV-Spektren zeigen für alle getesteten Proben von Arg, His und Pro keine Absorption im Bereich von 260 nm; d.h. dass in diesem Probenmaterial keine Nucleinsäuren in Konzentrationen größer als 0,005 % w/w anwesend sind. In den UV-Spektren einer Ser-Probe (Hersteller I, Siehe Abb. 6-6) und einer Ile-Probe (Hersteller E, Siehe Abb. 6-5) sind jedoch Absorptionen im Bereich über 250 nm sichtbar. Das Aussehen der UV-Spektren in diesem Bereich sowie die Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Ser weisen aber daraufhin, dass es sich in beiden Fällen höchstwahrscheinlich nicht um die Anwesenheit von Nucleinsäure handelt, sondern um Verunreinigungen anderer Natur. Dafür kommen z.B. einige der drei aromatischen Aminosäuren, d.h. Phe, Tyr und Trp, in Frage. UV-Spektren dieser Aminosäuren sind in Abbildungen 6-7, 6-8 und 6-9 gezeigt.

Es stellt sich die Frage, ob diese aromatischen Aminosäuren spektrophotometrisch auf 0,1%-Niveau in den anderen Aminosäuren nachgewiesen werden können. Um dies herauszufinden, wurde eine Serie von Experimente mit Arg-Proben der Konzentration 25 mg/ml durchgeführt, zu denen einzeln oder zusammen entweder Tyr, Trp, Phe und RNS in Konzentrationen von 0,1%- oder 0,05% zugegeben wurden. Die entsprechenden UV-Spektren sind in Abbildungen 6-10 und 6-11 wiedergegeben. Die Ergebnisse zeigten, dass jede der drei aromatischen Aminosäuren einzeln auf 0,1%-Niveau in Arg-Proben nachgewiesen werden kann, wobei Trp und Tyr sogar eine weit niedrigere Nachweisgrenze aufweisen.

Abb. 6-2: UV-Spektren von Arg-Proben der Konzentration 25 mg/ml von verschiedenen Herstellern und Batches, rein und versetzt mit RNS 0,05 % w/w

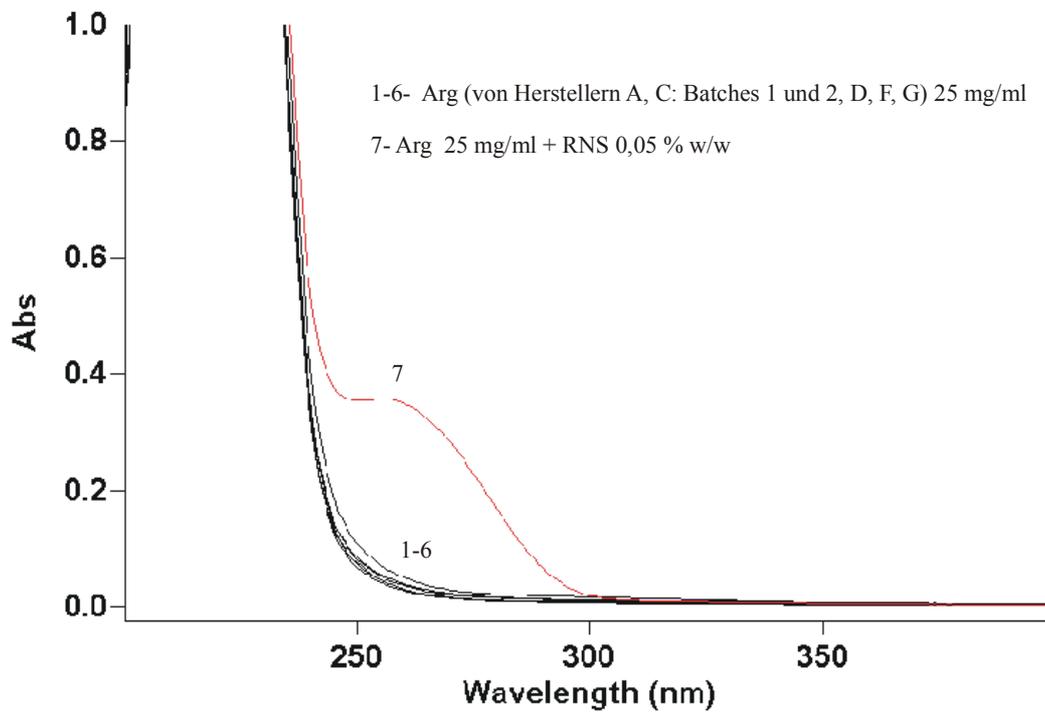


Abb. 6-3: UV-Spektren einer Pro-Probe der Konzentration 25 mg/ml, sowie einer mit 0,05 % w/w RNS versetzten Pro-Probe gleicher Konzentration

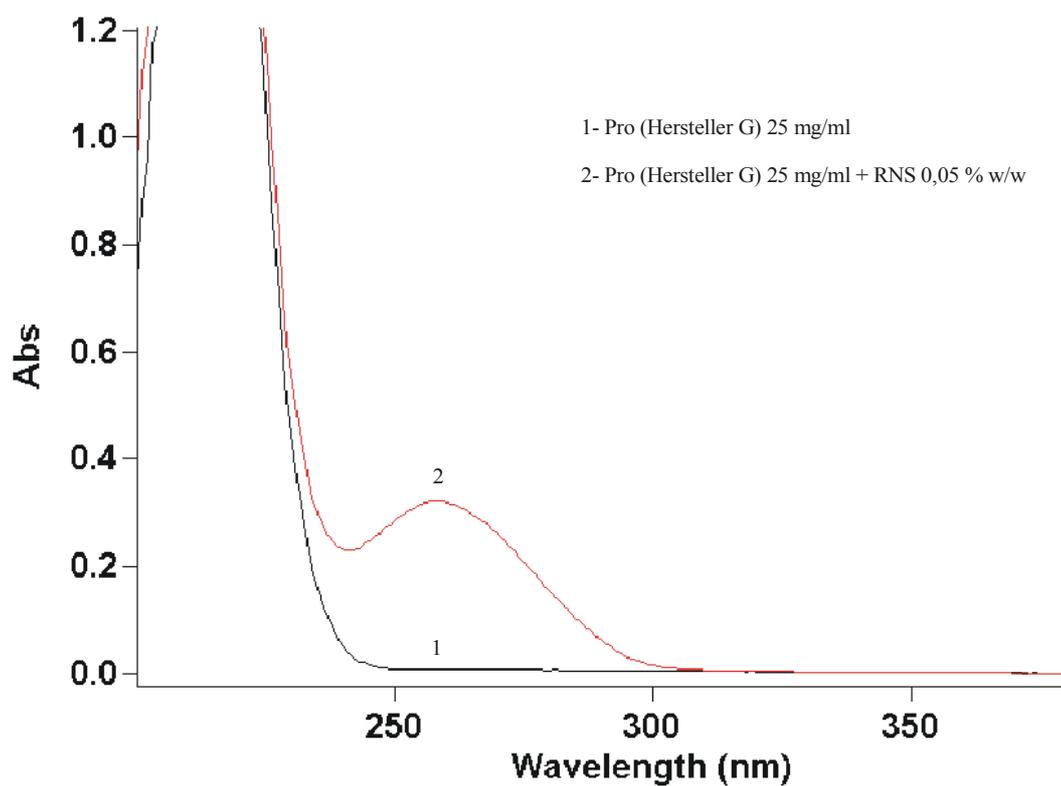


Abb. 6-4: UV-Spektren von His-Proben der Konzentration 25 mg/ml von verschiedenen Herstellern und Batches, rein und versetzt mit RNS 0,05 % w/w

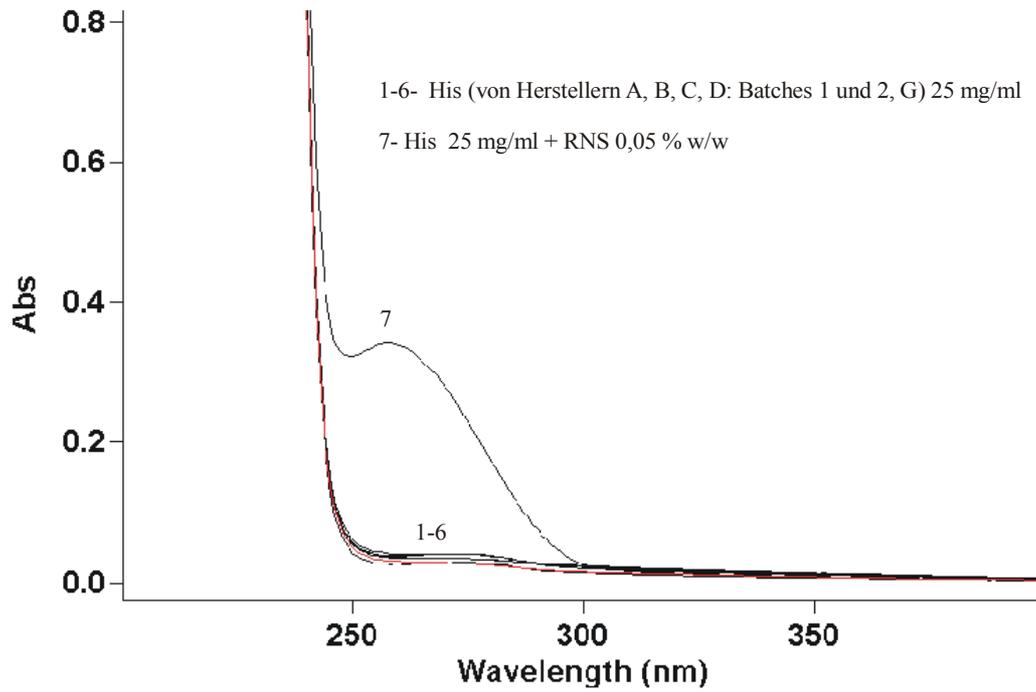


Abb. 6-5: UV-Spektren einer Ile-Probe der Konzentration 25 mg/ml, sowie einer mit 0,05 % w/w RNS versetzten Ile-Probe gleicher Konzentration

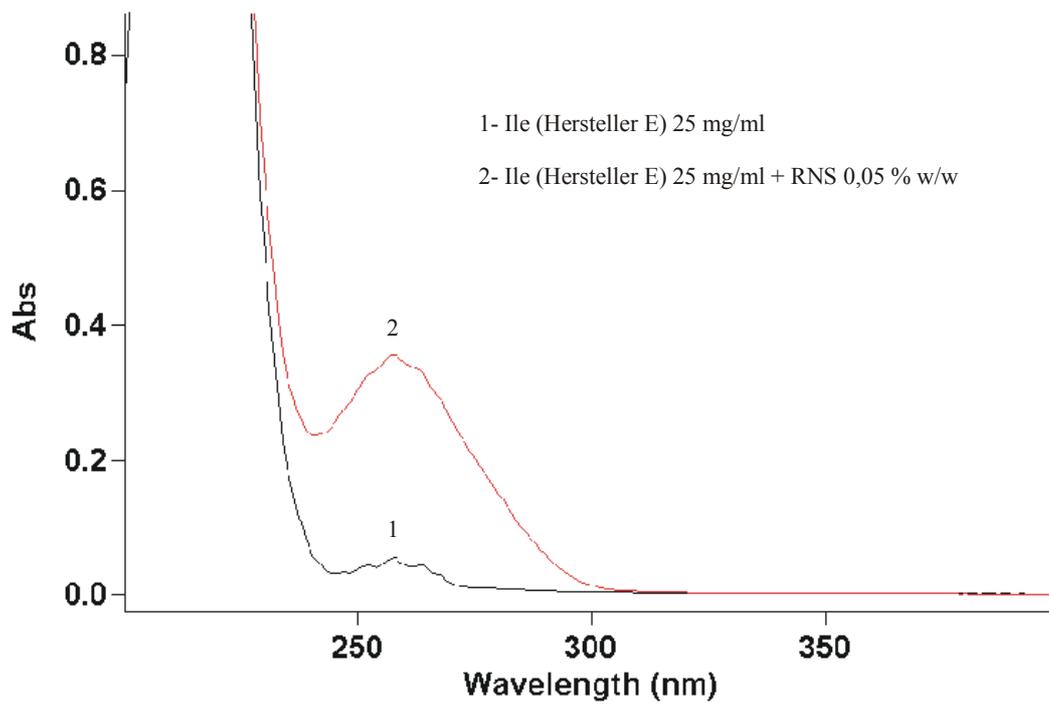


Abb. 6-6: UV-Spektren von Ser-Proben der Konzentration 25 mg/ml von verschiedenen Herstellern, rein und versetzt mit RNS 0,05 % w/w

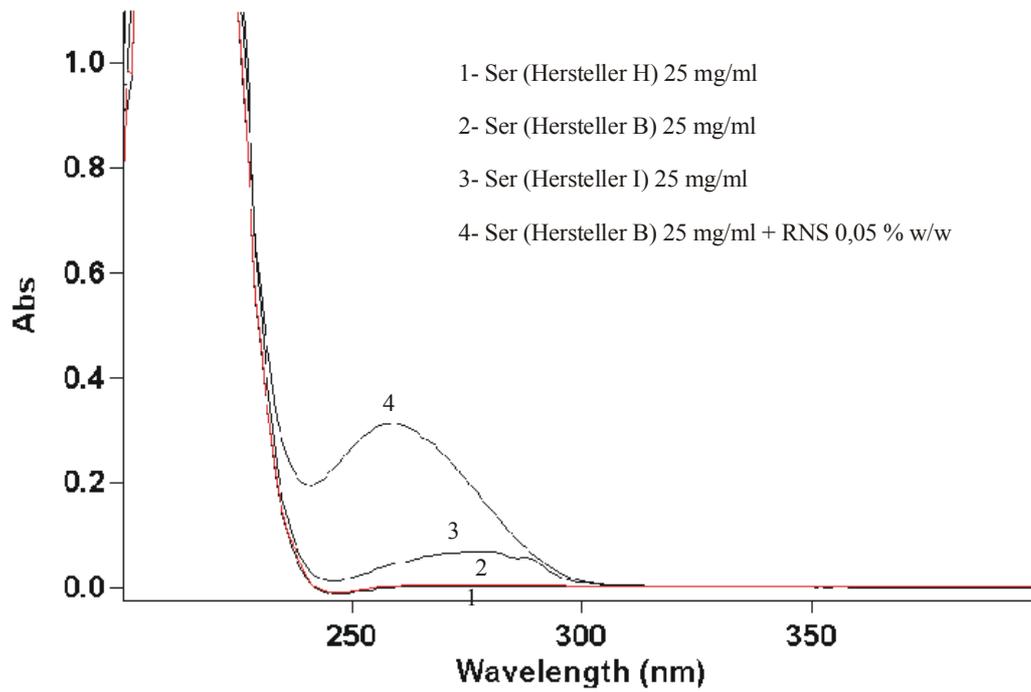


Abb. 6-7: UV-Spektrum von Phe der Konzentration 0,025 mg/ml

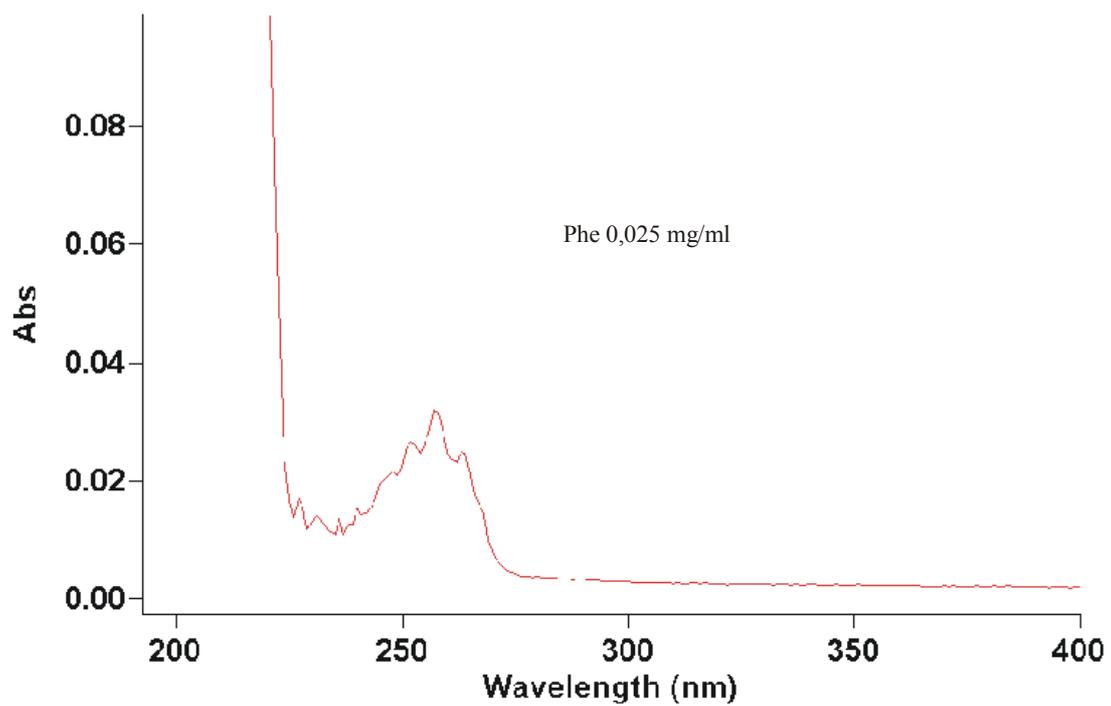


Abb. 6-8: UV-Spektrum von Tyr der Konzentration 0,025 mg/ml

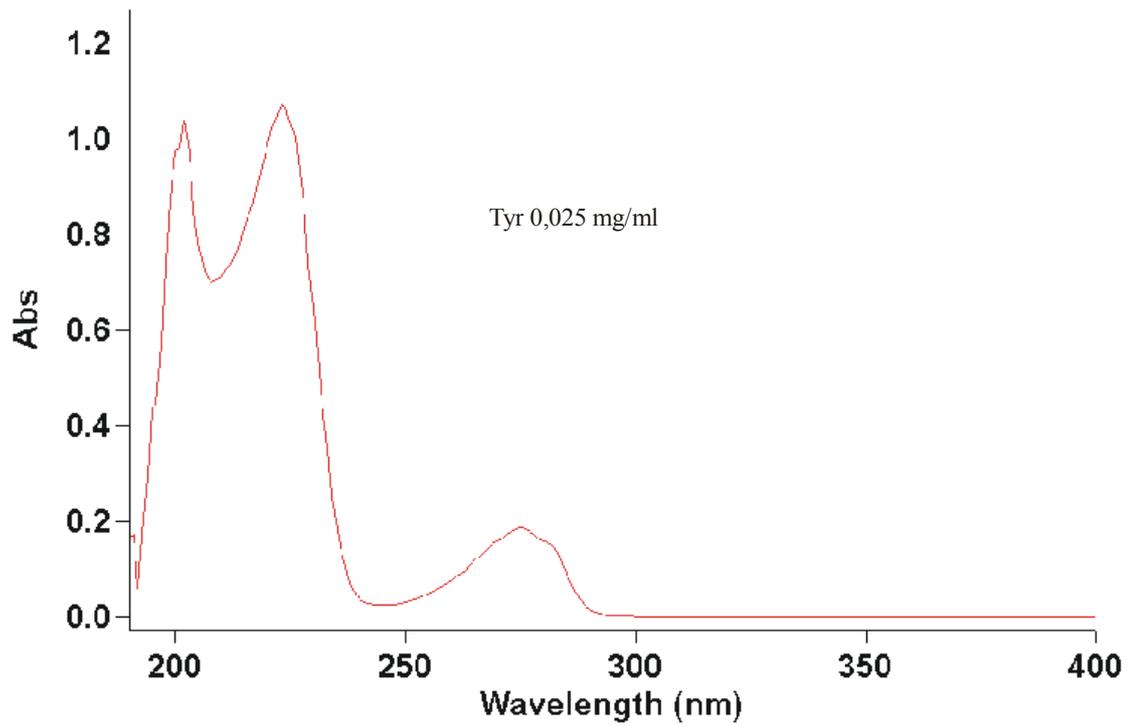


Abb. 6-9: UV-Spektrum von Tryptophan (Trp) der Konzentration 0,0125 mg/ml

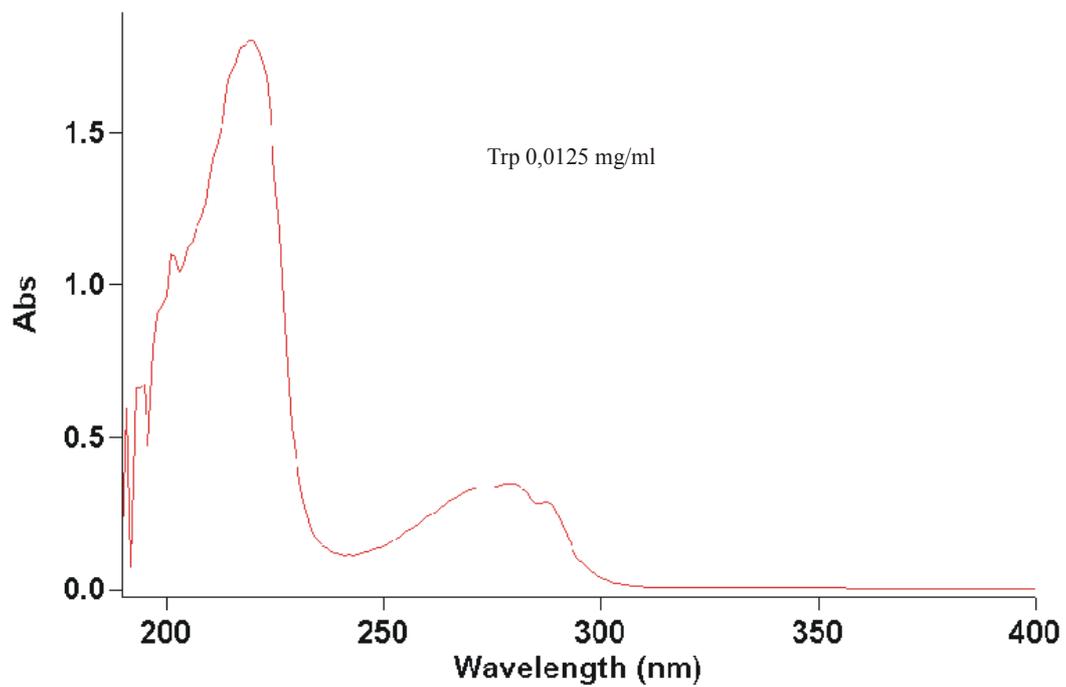


Abb. 6-10: UV-Spektren von Arg-Proben der Konzentration 25 mg/ml, rein und einzeln versetzt mit Phe, Tyr, RNS und Trp jeweils 0,1 % w/w

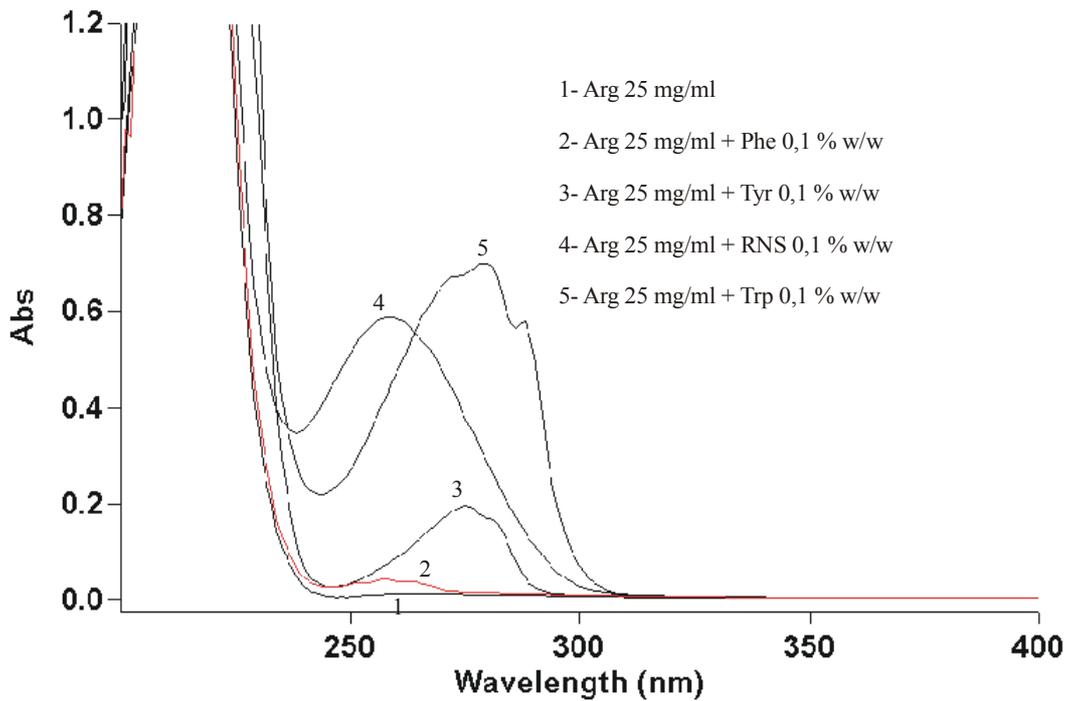
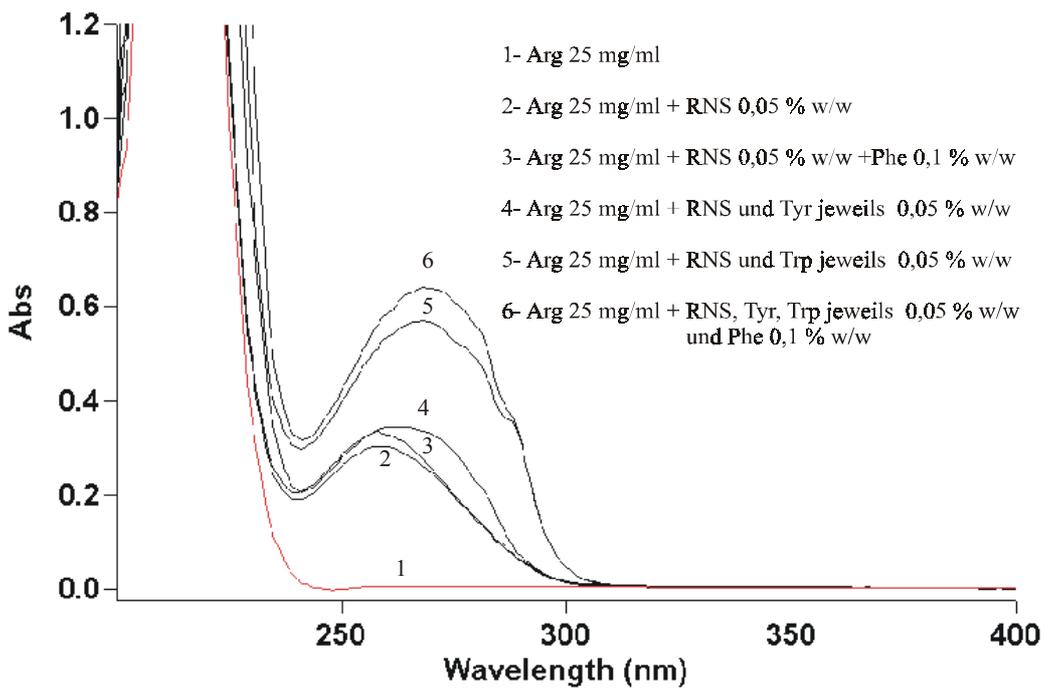


Abb. 6-11: UV-Spektren von Arg-Proben der Konzentration 25 mg/ml, rein und versetzt mit RNS 0,05 % w/w allein oder zusammen mit Tyr und Trp jeweils 0,1 % w/w und Phe 0,1 % w/w.



Im Fall von Ser (Hersteller I, Siehe Abb. 6-6) weist das UV-Spektrum im Bereich von 250-300 nm auf die Anwesenheit von Trp oder Tyr hin. Im Fall von Ile (Hersteller E, Siehe Abb. 6-5) liegt aufgrund der Ähnlichkeit des Phe-Spektrums mit dem Ile-Spektrum im Bereich von 250-300 nm die Vermutung nahe, dass Ile mit Phe verunreinigt ist. Ausgehend von diesen Vermutungen wurden die Spektren von Ser- und Ile-Proben der entsprechenden Batches mit Spektren von Trp und Tyr bzw. Phe verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 6-12 und 6-13 zu sehen.

Da es sich im Fall von Ser von Hersteller I höchstwahrscheinlich um die Anwesenheit von Trp in der Probe handelte, wurde zur Absicherung der Vermutung die Konzentration der Probe nochmals dreifach erhöht, was zu einem deutlicheren Spektrum im Bereich 250-300 nm führte (Siehe Abb. 6-14). Die Vermutung wurde bestätigt; der Gehalt von Trp in der Probe beträgt ca. 0,006 % w/w. Dieser kleine Gehalt an Trp erklärt, warum in den CE-Untersuchungen Trp in der gleichen Probe von Ser nicht detektiert wurde, wenn Ser als FMOC-Derivat untersucht wird. Im Fall der FMOC-Derivate liegt die Nachweisgrenze bei 0,007 % w/w, also über dem mit der UV-Spektroskopie gefundenen Gehalt.

Abb. 6-12: UV-Spektrum einer Ser-Probe der Konzentration 25 mg/ml und Vergleichsspektren von Tyr der Konzentration 0,025 mg/ml und Trp der Konzentration 0,0125 mg/ml

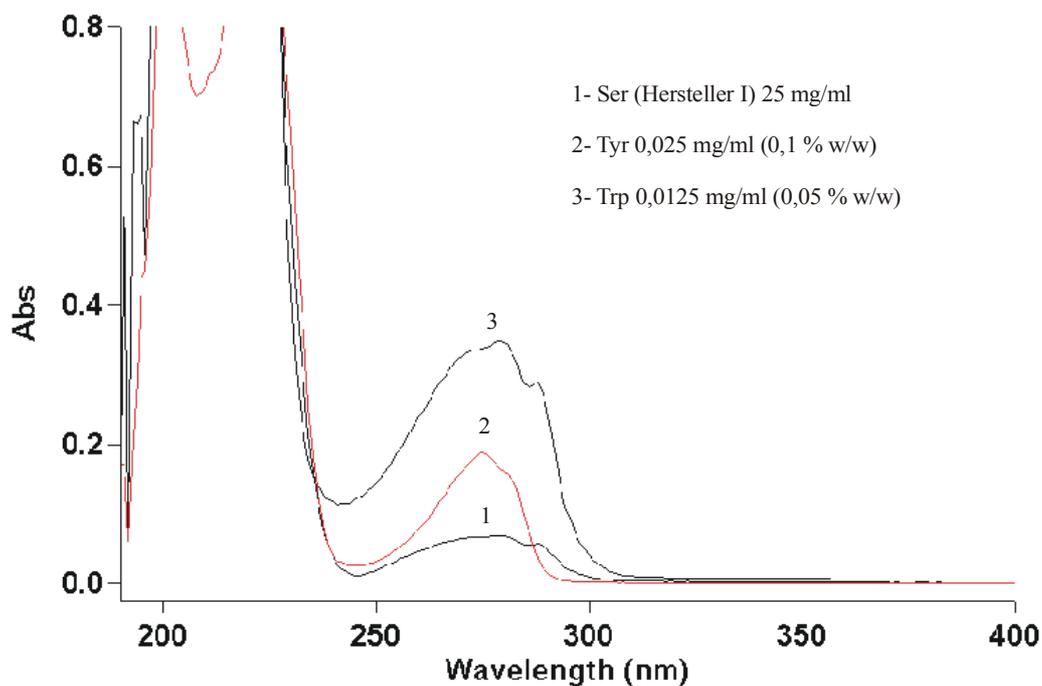


Abb. 6-13: UV-Spektren von Ile-Proben von verschiedenen Herstellern mit Konzentrationen von jeweils 25 mg/ml und einer Phe-Probe der Konzentration 0,025 mg/ml (Vergleichsspektrum)

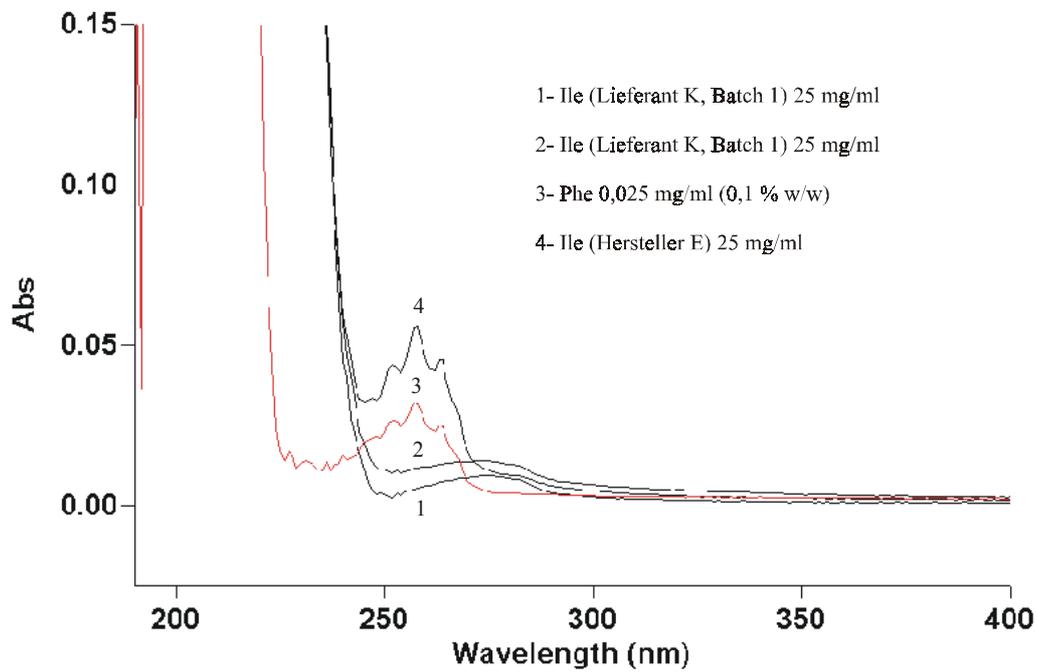


Abb. 6-14: UV-Spektrum einer Ser-Probe der Konzentration 75 mg/ml und Vergleichsspektrum einer Trp-Probe der Konzentration 0,0125 mg/ml

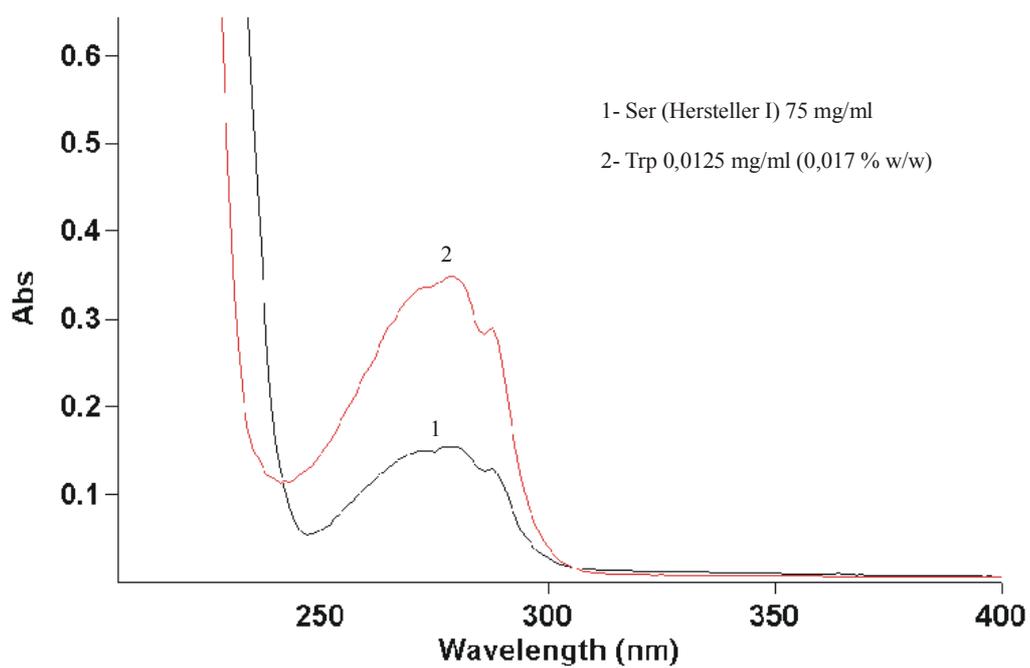
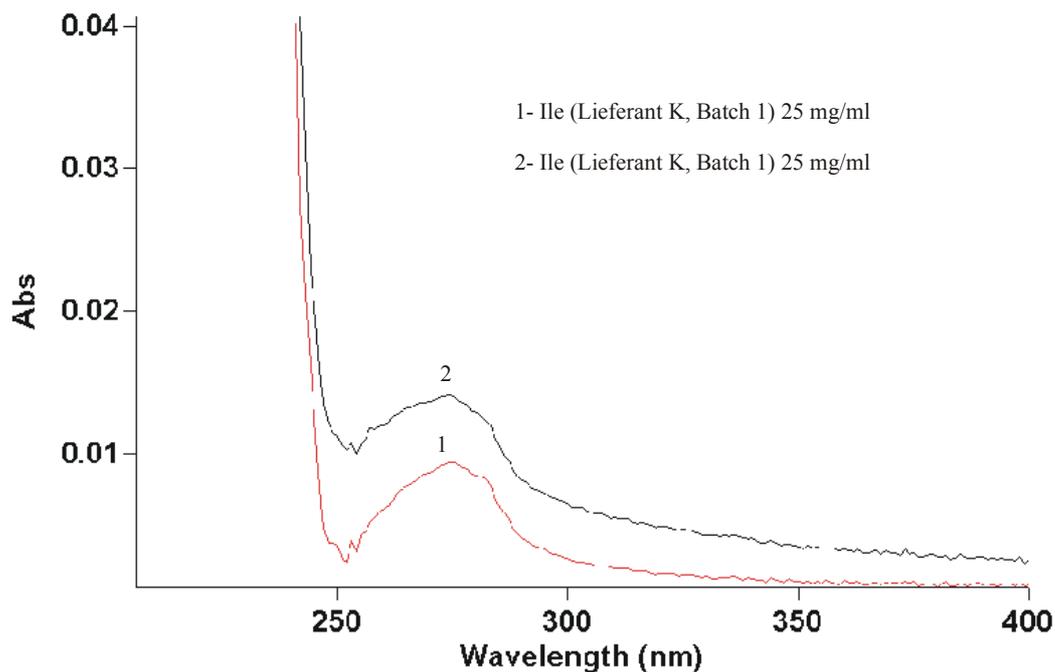


Abb. 6-15: UV-Spektren von Ile-Proben jeweils 25 mg/ml von zwei verschiedenen Batches



Aus den UV-Spektren (Siehe Abb. 6-13) der Ile-Probe von Hersteller E geht hervor, dass Phe anwesend ist und zwar in einer Konzentration von ca. 0,2 % w/w, was mit den Ergebnissen aus den CE-Untersuchungen mit FMOC-Derivatisierung übereinstimmt. In den zwei anderen Ile-Proben von Lieferant K wurde kein Phe nachgewiesen, welches seine Anwesenheit nicht völlig ausschließt, sondern nur bedeutet, dass der Gehalt unter 0,05 % w/w liegt, was der Nachweisgrenze entspricht. Auch die Anwesenheit von Tyr in den Ile-Proben von Lieferant K kann nicht ausgeschlossen werden (Siehe Abbildungen 6-15 und 6-8). Aber auch dieser Gehalt würde unter 0,01 % liegen.

## 6.2. Kapillarelektrophorese

Der Einsatz von Gelen in der Kapillarelektrophorese als Siebmatrix wird damit begründet, dass Biopolymere als Polyanionen bzw. Polykationen mit dem gleichen Oberfläche/Ladungsverhältnis vorliegen, und somit eine Auftrennung im normalen elektrischen Feld ohne weitere Hilfsmittel nicht möglich ist. Da sich diese Biopolymere allerdings stark in ihrer Größe unterscheiden, kann durch den Einsatz eines Gels die Mobilität der großen Polymere stärker beeinflusst werden als bei den kleinen. Dies führt dann zu einer Trennung nach Molekülgröße, d.h. nach steigendem Molekulargewicht. Von den in der klassischen Flachbett-Gelelektrophorese verwendeten Geltypen wurden in Kapillaren hauptsächlich Acrylamide, Agarose, Cellulose und deren Derivate als Matrix verwendet [177]. Diese Gele unterscheiden sich stark in ihren physikalischen Eigenschaften, wobei als wichtigste die Viskosität, die Stabilität im elektrischen Feld, die Porenstruktur und Porengröße zu nennen sind. Im Allgemeinen unterscheidet man Gele, die einen gewissen Grad an Quervernetzung aufweisen („crosslinked gels“, bestehend aus zwei Monomerbausteinen) und Gele, die nur aus einem Monomerbaustein aufgebaut sind, die man als lineare Gele bezeichnet. Diese Gele sind somit aus einem Geflecht aus linearen Polymerketten aufgebaut, und ihr Zusammenhalt basiert nur auf physikalischen Wechselwirkungen („physikalische Gele“). Demgegenüber stehen die quervernetzten Gele, bei denen die einzelnen Polymerketten miteinander vernetzt sind und die sich dadurch wesentlich rigider in ihrem physikalischen Verhalten zeigen („chemische Gele“, da kovalente Bindungen zwischen den Fasern vorhanden sind).

Beide Geltypen haben Vorteile und Nachteile, aber im Allgemeinen werden zur Arbeit mit der CE physikalische Gele bevorzugt. Mit ihnen kann leicht eine homogene Siebstruktur in der gesamten Kapillare erhalten werden. Außerdem sind die physikalischen Gele reproduzierbar, was zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Diese Gele sind flüssig, können hydrodynamisch in die Kapillare gedrückt und nach jeder Trennung ausgewechselt werden. Nicht ohne Bedeutung ist ihre relativ einfache Vorbereitung. Normalerweise handelt es sich um einfaches Auflösen. Ihre Bestandteile sind kommerziell zugänglich und zwar zu akzeptablen Preisen. Die populärsten physikalischen Gele, die in der Kapillarelektrophorese der Nucleinsäuren eingesetzt werden, sind Polysaccharide. Zur Auftrennung von DNS-Restriktionsfragmenten und Produkten aus der PCR („polymerase chain reaction“) werden Hydroxypropylmethylcellulose [178, 179, 180, 181], Methylcellulose [180, 182], Hydroxyethylcellulose [183], Hydroxymethylcellulose [184], sowie auch in der Natur vorkommende Stoffe wie z.B. Glucomannane [185] verwendet. Diese Trennmatrizen haben

den Vorteil, dass sie im Vergleich zu den Polyacrylamid-Gelen eine bessere UV-Durchlässigkeit im Bereich von 260 nm sichern, was die UV-Detektion der NS bei ihrem Absorptionsmaximum ermöglicht. Die wichtigste Voraussetzung für die Verwendung eines Gels in einer Kapillare ist die vollständige Unterdrückung des EOFs. Wenn diese Bedingung nicht in ausreichendem Maße erfüllt ist, wird das Gel durch den EOF aus der Kapillare heraustransportiert, und eine Trennung ist damit unmöglich [177]. Der EOF kann durch Beschichtung oder Modifikation der Kapillarwand eliminiert werden. Bei einer solchen Behandlung wird nicht nur der EOF unterdrückt, sondern es werden auch unerwünschte Wandadsorptionseffekte zwischen den Analyten und der Kapillarwand herabgesetzt.

Wie bei den FMOC- und CBQCA-Derivaten wurden auch bei der Untersuchung auf NS Modellmischungen eingesetzt. Einerseits sollte die Fähigkeit der CE-Methode, NS auf 0,1%-Niveau nachzuweisen, beurteilt werden und andererseits der NS-Gehalt in den untersuchten Proben bestimmt werden. Zwei DNS-Mischungen, ØX 174 DNA Marker Hae III Digest, bestehend aus elf Fragmenten mit 72 Basenpaaren (bp), 118 bp, 194 bp, 234 bp, 271 bp, 281 bp, 310 bp, 603 bp, 872 bp, 1078 bp und 1353 bp und Lambda DNA Marker EcoR I Digest, bestehend aus sechs Fragmenten mit 3530 bp, 4878 bp, 5643 bp, 5804 bp, 7421 bp und 21226 bp wurden in den Untersuchungen eingesetzt. Diese zwei Mischungen wurden auf Grund der unterschiedlichen Kettenlänge der Bestandteile ausgewählt, da die CE-Methode in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber kurz-kettiger und lang-kettiger DNS optimiert werden sollte. Eine Mischung aus neun RNA-Fragmenten, 200 Basen (b), 500 b, 1000 b, 1500 b, 2000 b, 3000 b, 4000 b, 6000 b, 10000 b, wurde als Repräsentant für die RNS genutzt. Es muß erwähnt werden, dass es sich in den Fällen, in denen die Probe mit 0,1 % w/w NS versetzt wird, um den Gesamtgehalt der NS handelt. Demzufolge ist der Gehalt der einzelnen Komponenten der Modellmischung viel kleiner, was bedeutet, dass die tatsächliche Detektion auf einem deutlich kleineren als dem 0,1%-Niveau erfolgt.

Die CE-Untersuchungen wurden mit einer mit 50 % Phenylmethylpolysiloxan beschichteten Kapillare (2 µm Filmdicke) durchgeführt. Diese Kapillare ist in der Gaschromatographie als DB-17 bekannt. Der Innendurchmesser der Kapillare war 100 µm. Prinzipiell ist bei der Kapillar-Gelelektrophorese (CGE) die Verwendung von Kapillaren mit kleineren Innendurchmessern mit Schwierigkeiten verbunden, da aufgrund ihrer hohen Viskosität die Gele in engen Kapillaren nicht gedrückt werden können. Der populärste Trennelektrolyt bei CGE von DNS ist ein Puffer bestehend aus Tris 89 mM - Borsäure 89 mM – EDTA 2mM, dessen pH-Wert zwischen 8,0 und 8,5 liegt. Zu dem Puffer werden gelbildende Stoffe, meistens Cellulose-Derivate in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 % zugegeben [178, 179, 180,

181, 183, 184, 185]. Bei einem Trennelektrolyt mit einem solch basischen pH-Wert liegen die NS als Anionen vor. Das bedeutet, dass die CE mit umgekehrter Polarität durchgeführt werden muss (Injektion an der Kathodenseite), damit die Analyten in Richtung Detektor (Anodenseite) wandern. Normalerweise werden die Proben elektrokinetisch geladen und die Injektion erfolgt genauso wie die Trennung bei umgekehrter Polarität. Bei leicht alkalischen Puffern liegen die Aminosäuren, die die Hauptkomponenten der Proben sind, als Betainstrukturen vor, d.h. dass sie bei einer solchen Injektionsart nicht in die Kapillare gelangen. Das wurde durch Untersuchungen mit Phe-Proben bestätigt. Das bedeutet, dass die Aminosäuren von den eventuell anwesenden NS und anderen negativ geladenen Verunreinigungen schon bei der Injektion abgetrennt werden. Für den unwahrscheinlichen Fall, dass Aminosäuren zum Detektor gelangen, ist eine Interferenz mit den NS nicht möglich, da mit Ausnahme der aromatischen Aminosäure keine Absorption bei 260 nm zu erwarten ist (Siehe Kap. 6.1). Somit muss in dieser Beziehung keine Optimierung der Trennbedingungen erfolgen, mit anderen Worten, es können die für reine NS-Proben gefundenen Bedingungen auch für aminosäurehaltige Proben verwendet werden. Die Trennung der einzelnen Fragmente des ØX 174 DNA Marker Hae III Digest wurde mit dem Trennelektrolyt bestehend aus Tris 89 mM - Borsäure 89 mM – EDTA 2mM bei pH 8,5 erzielt, zu dem Hydroxypropylmethylcellulose (4000 cP bei 25°C) als gelbildende Komponente in einer Konzentration von 0,4 % zugegeben wurde [179]. Bei Variationen des Puffer-pH-Wertes von 8,2 bis 8,5 wurde gefunden, dass der pH 8,33 am besten geeignet ist. Die Konzentrationen der Proben in Bezug auf die Aminosäuren als Hauptkomponenten und die NS als „Verunreinigungen“ auf dem 0,1%-Niveau wurden so ausgewählt, dass die einzelnen Komponenten der NS-Mischungen in den gespikten Proben gut zu erkennen sind. In Abb. 6-16 – 6-23 sind Elektropherogramme von Proben von Trp, Arg, Ser, His, Phe, Ile, Lys und Pro von verschiedenen Herstellern und Batches in der Konzentration von 40 mg/ml in dem oben genannten Puffer, sowie mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikte Proben der jeweiligen Aminosäuren gezeigt. Bei Trp handelt es sich aufgrund seiner begrenzten Löslichkeit in Wasser um Extrakte. Wie in den obengenannten Abbildungen zu sehen ist, wurden keine unbekannt Peaks in allen getesteten Proben gefunden.

Abb. 6-16: Elektropherogramme von Trp-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern (B – F); (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten Trp-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen: Kapillare: µSIL-DB-17, 50,2/40 cm, 100 µm i.d., 2 µm Filmdicke; Trennlektrolyt: Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP); Injektion: 10 kV (umgekehrte Polarität), 10 s; Spannung: 10 kV (umgekehrte Polarität); Temperatur: 25 °C; Detektion: UV- 254 nm. Die Peaks der einzelnen DNS-Fragmente sind mit der Anzahl ihrer Basenpaaren gekennzeichnet.

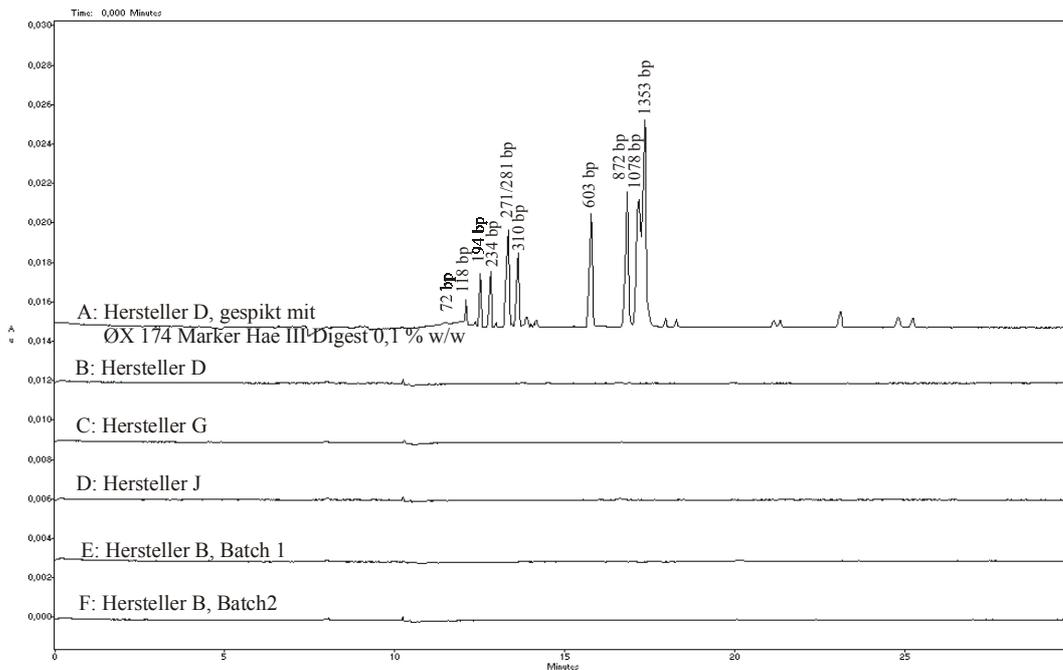


Abb.6-17: Elektropherogramme von Arg-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern (B – G); (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten Arg-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16

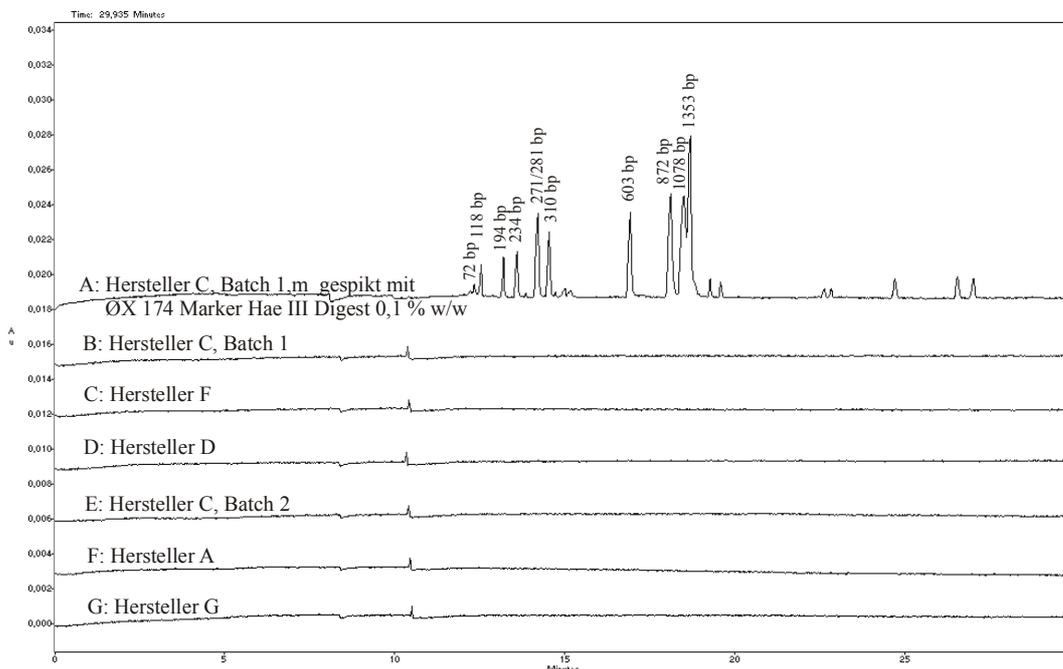


Abb.6-18: Elektropherogramme von Ser-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM von verschiedenen Herstellern (B – D); (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten Ser-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16

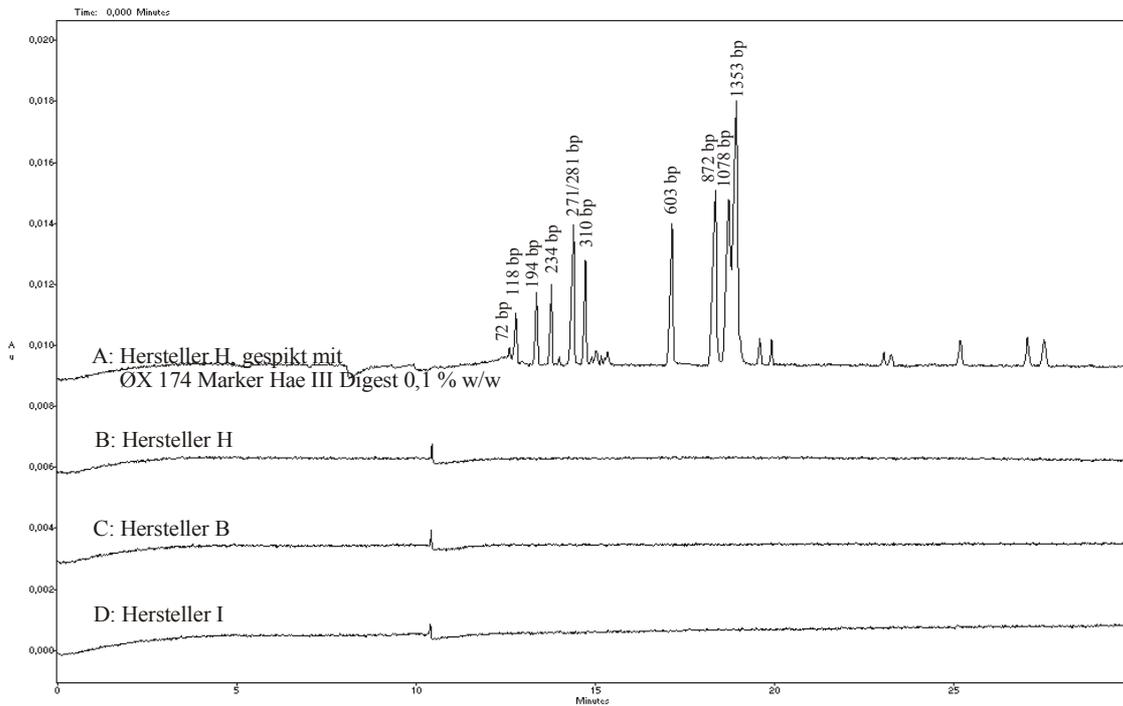


Abb.6-19: Elektropherogramme von His-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern (B – G); (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten His-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16

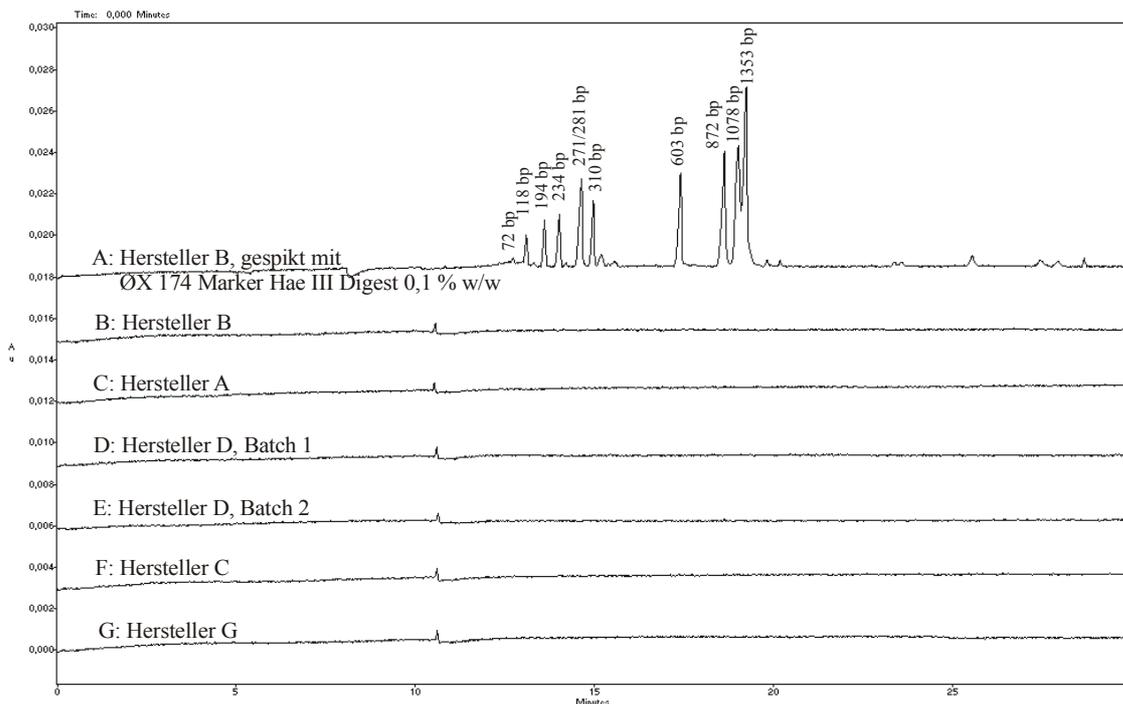


Abb.6-20: Elektropherogramme von Phe-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM von verschiedenen Herstellern (B und C); (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten Phe-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16

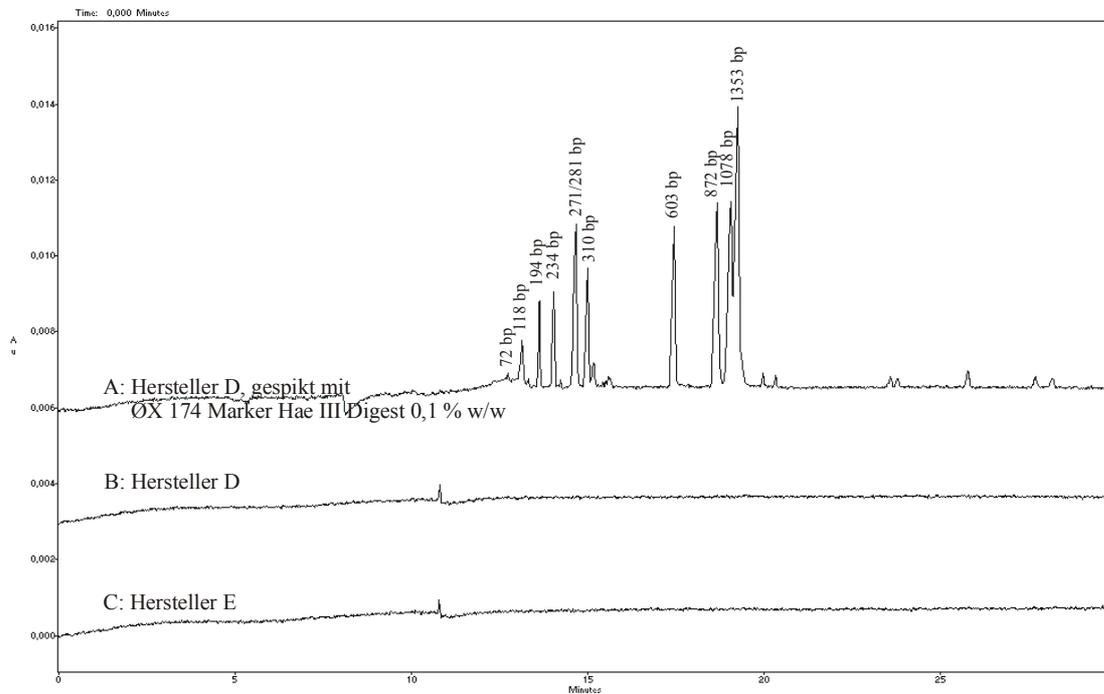


Abb.6-21: Elektropherogramme von (B) einer Ile-Probe von Lieferant K 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM; (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten Ile-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16

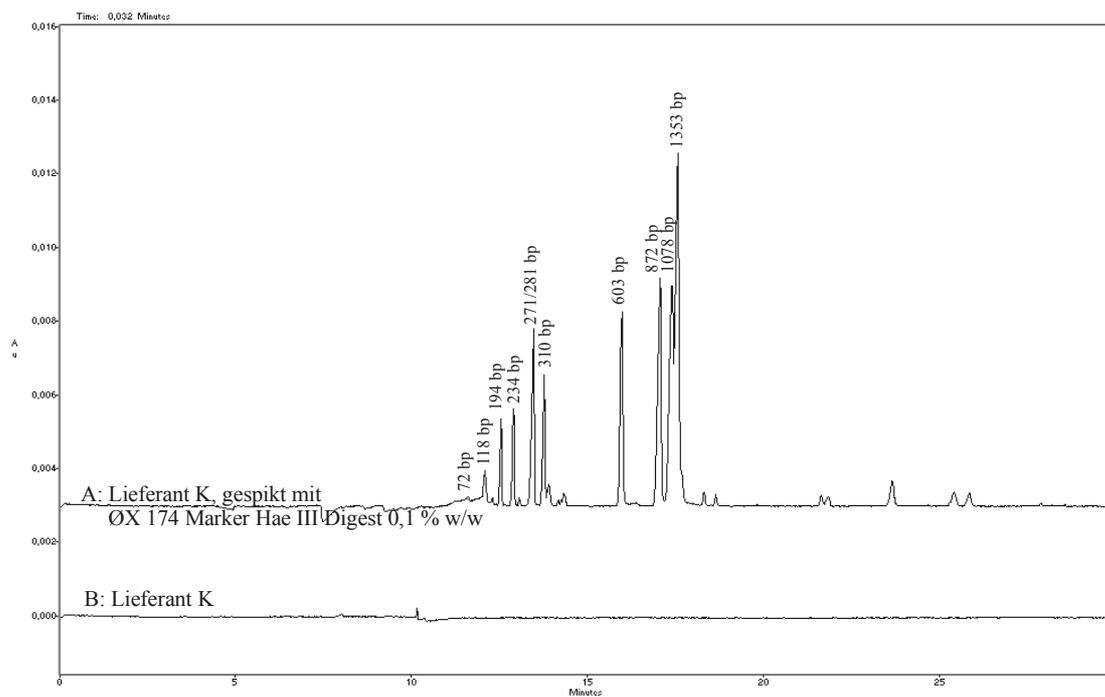


Abb.6-22: Elektropherogramme von (B) einer Lys-Probe von Lieferant K 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM; (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten Lys-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16

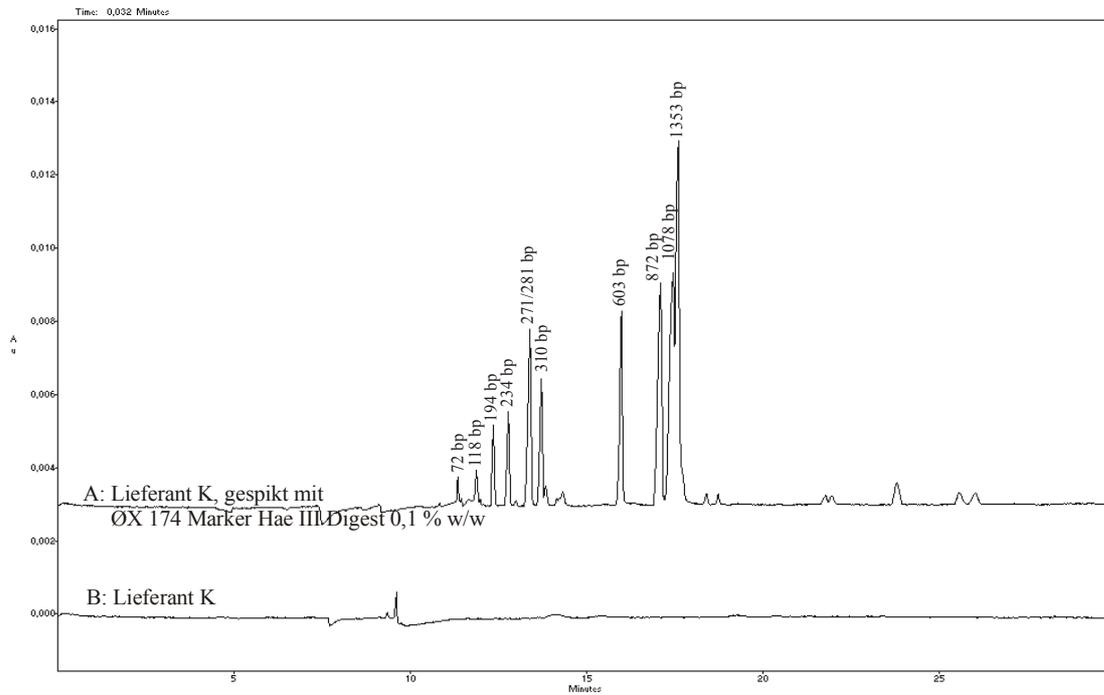
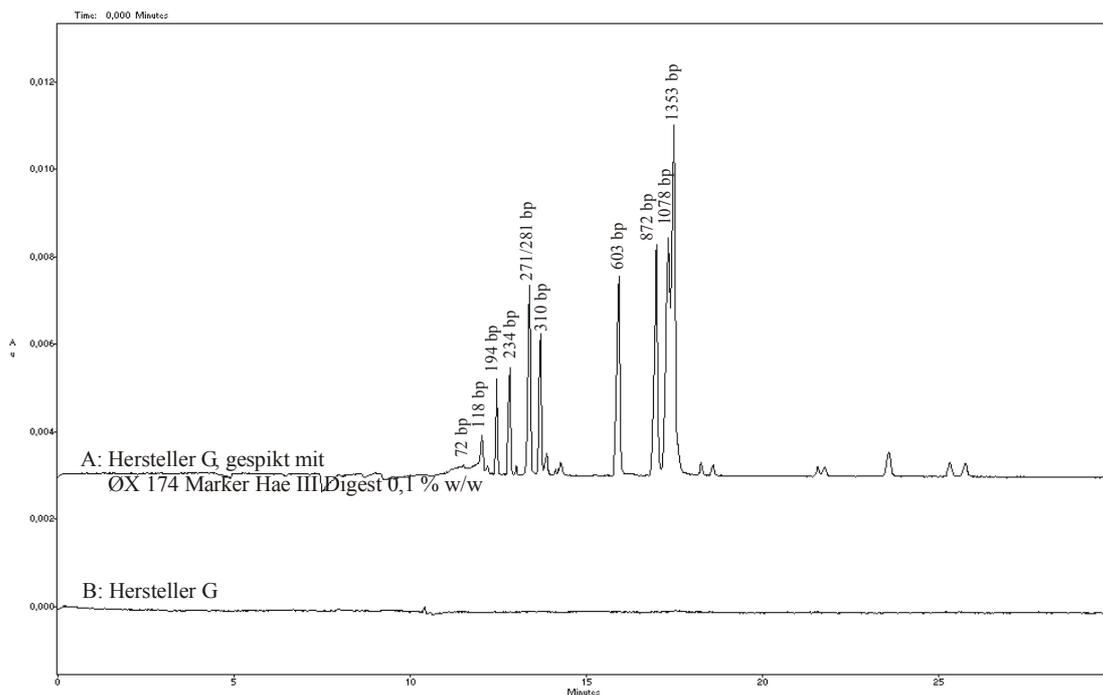
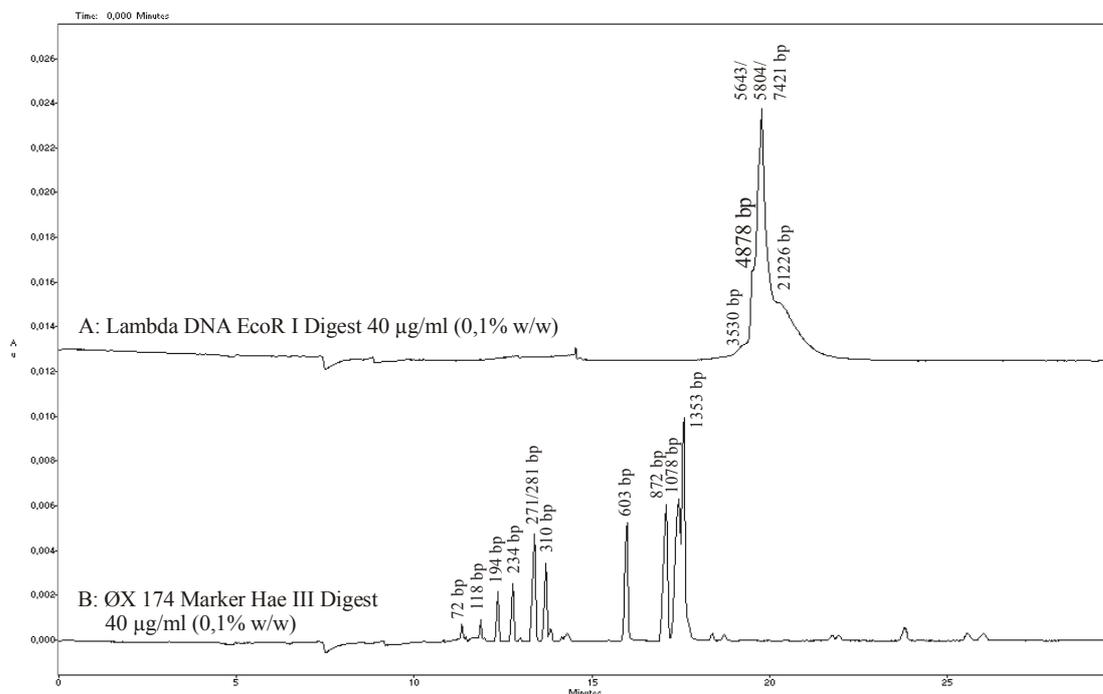


Abb.6-23: Elektropherogramme von (B) einer Pro-Probe von Hersteller G 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM; (A) einer mit 0,1 % w/w ØX 174 DNA Marker Hae III Digest gespikten Pro-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16



Es wurde weiter geprüft, ob mit dieser Methode auch länger-kettige DNS detektiert werden kann. Dazu wurde Lambda DNA Marker EcoR I Digest eingesetzt. Obwohl die einzelnen Fragmente dieses Markers bei diesen Bedingungen nicht vollständig abgetrennt werden können, wie in Abb. 6-24 zu sehen ist, ist es trotzdem möglich, sie in den Aminosäuren nachzuweisen. In allen Elektropherogrammen (Siehe Abb. 6-16 – 6-23) ist aber der Bereich von 18 bis 23 min frei von Peaks, d. h. dass die Proben auch frei von langkettigen DNS-Fragmenten sind.

Abb. 6-24: Elektropherogramme von (A) Lambda DNA Marker EcoR I Digest 40 µg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM; (B) ØX 174 DNA Marker Hae III Digest 40 µg/ml im gleichen Puffer. CE-Bedingungen und Peakzuordnung wie in Abb. 6-16.



Bei den nächsten Untersuchungen wurde der RNS-Marker eingesetzt. Da normalerweise in der CGE von RNS Schwierigkeiten bei ihrer Auftrennung aufgrund ihrer dreidimensionalen Struktur auftreten, wird oft Harnstoff als Schmelzmittel zum Trennelektrolyt zugegeben [186]. Die Experimente haben gezeigt, dass eine Zugabe von 4 mM Harnstoff zu dem Trennelektrolyt die besten Ergebnisse liefert (Abb. 6-25). Deshalb wurden die Untersuchungen auf Abwesenheit von RNS in den Aminosäuren mit einem so modifizierten Trennelektrolyten durchgeführt. Wieder wurden gespikete Proben von einzelnen Aminosäuren verwendet, um festzustellen, dass RNS auf 0,1%-Niveau nachweisbar ist. Die Ergebnisse sind in Abb. 6-26 – 6-33 gezeigt.

Abb. 6-25: Elektropherogramme von RNS Marker (200 – 10000 b) 40 µg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16, mit dieser Ausnahme, dass zu dem Trennelektrolyt verschiedene Konzentrationen Harnstoff zugegeben sind. Die Peaks der einzelnen RNS-Fragmente sind mit der Anzahl ihrer Basen gekennzeichnet.

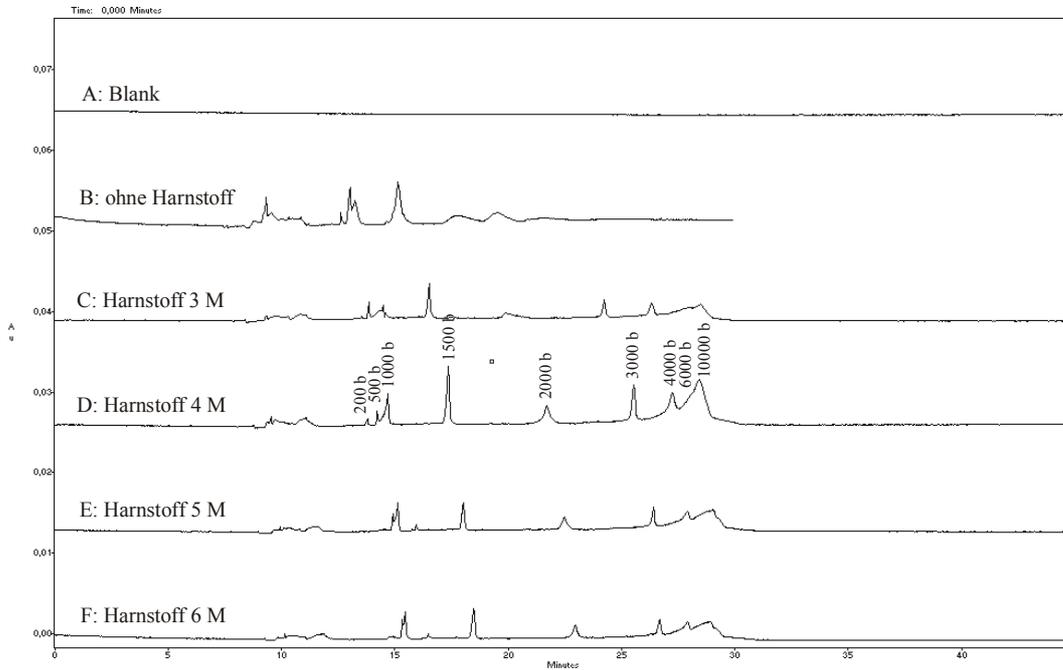


Abb. 6-26: Elektropherogramme von Trp-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern (B – F); (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespickten Trp-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25; Peak a- Abbauprodukt.

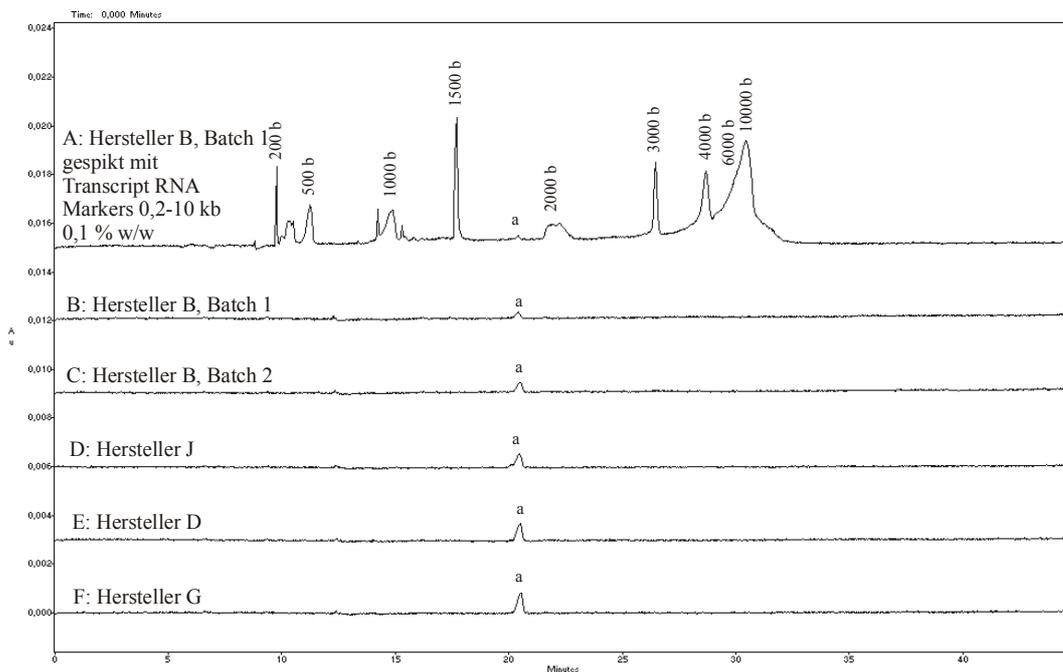


Abb. 6-27: Elektropherogramme von Arg-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern (B – G); (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespickten Arg-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25.

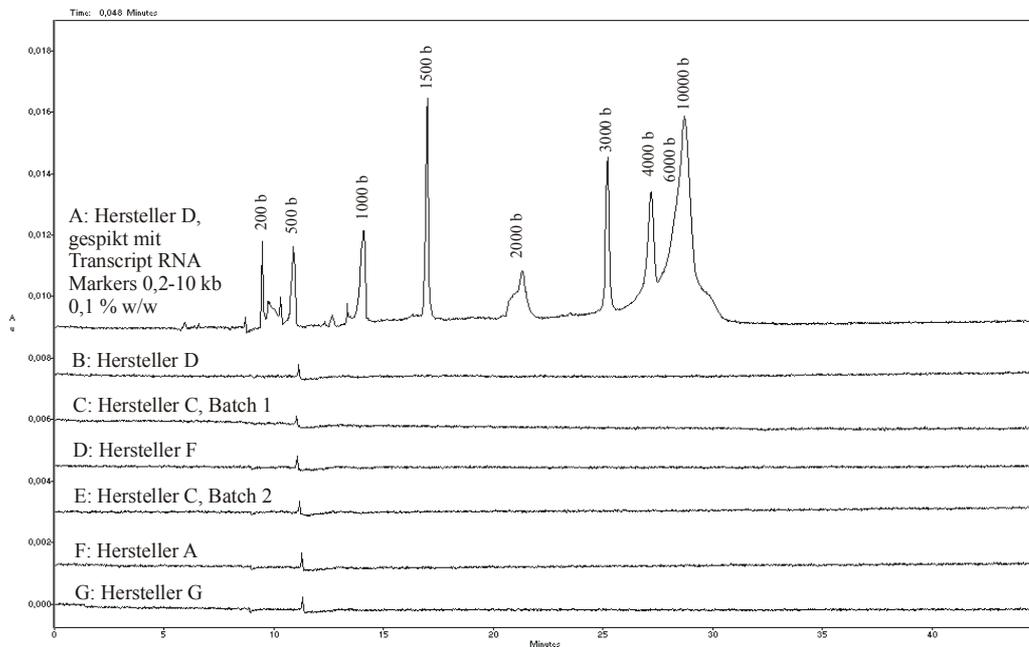


Abb. 6-28: Elektropherogramme von Ser-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff von verschiedenen Herstellern (B – D); (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespickten Ser-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25.

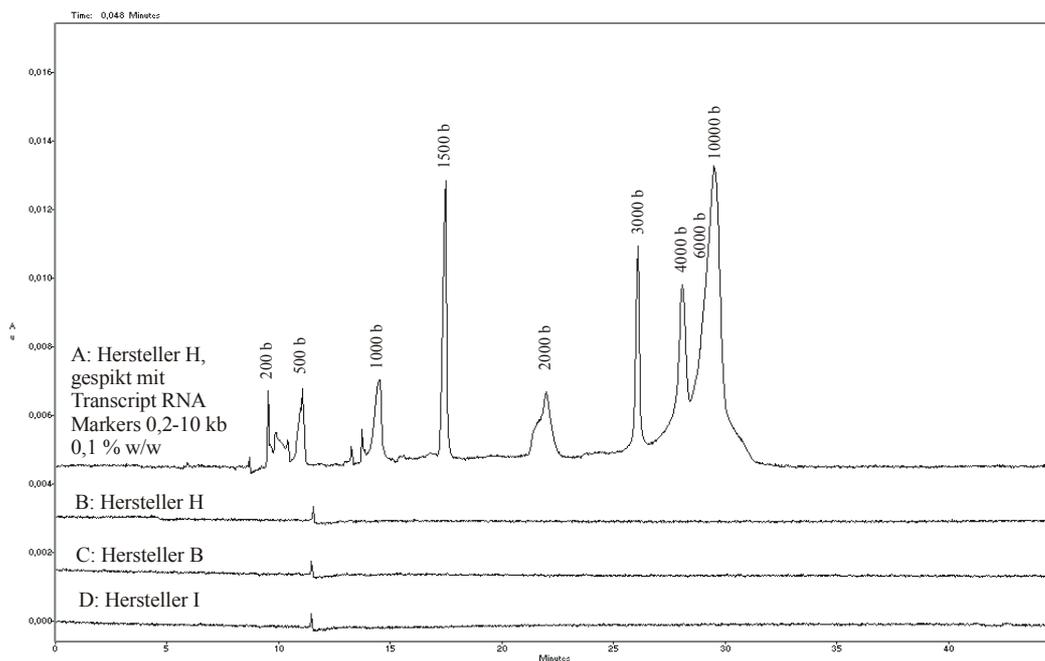


Abb. 6-29: Elektropherogramme von His-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff aus verschiedenen Batches von verschiedenen Herstellern (B – G); (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespikten His-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25.

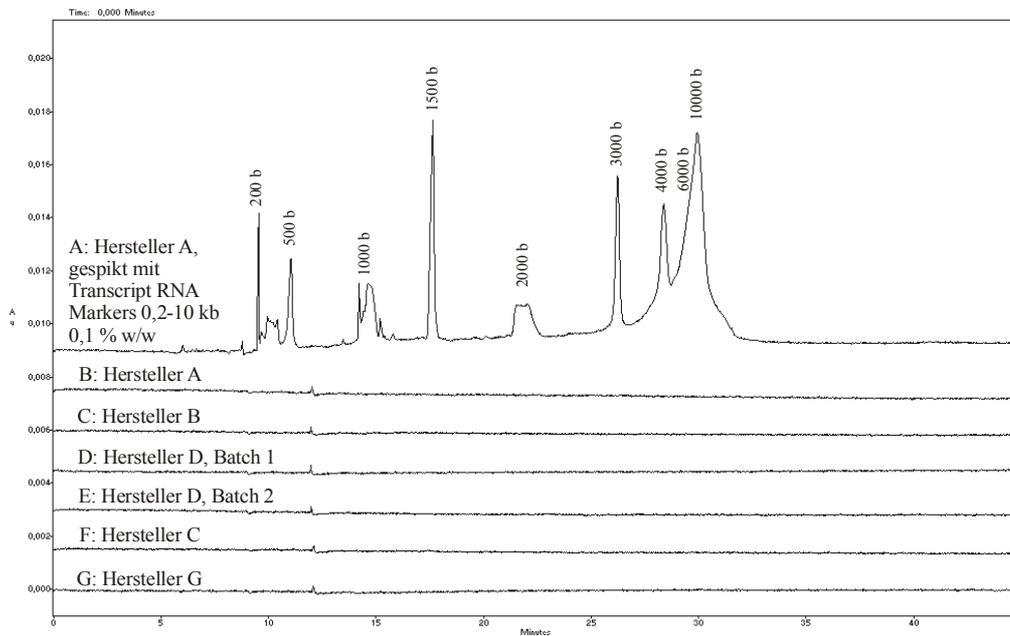


Abb. 6-30: Elektropherogramme von Phe-Proben mit jeweils 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff von verschiedenen Herstellern (B – D); (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespikten Phe-Probe gleicher Konzentration. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25; Peaks a und b sind unbekannt.

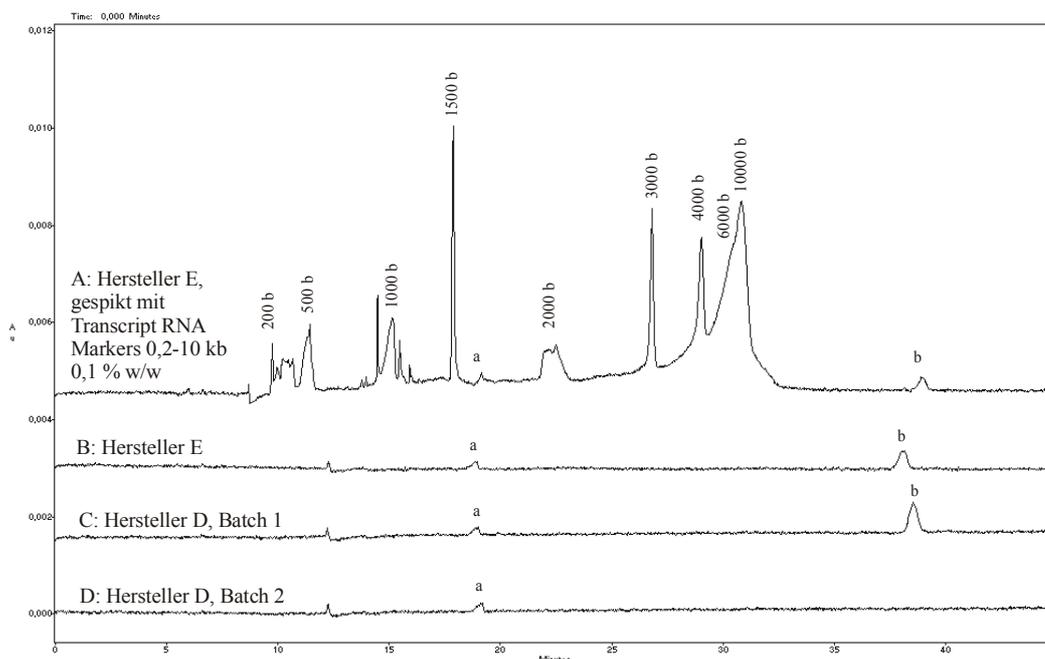


Abb. 6-31: Elektropherogramme: (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespikten Ile-Probe 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff; (B) einer Ile-Probe von Hersteller E 40 mg/ml im gleichen Puffer. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25.

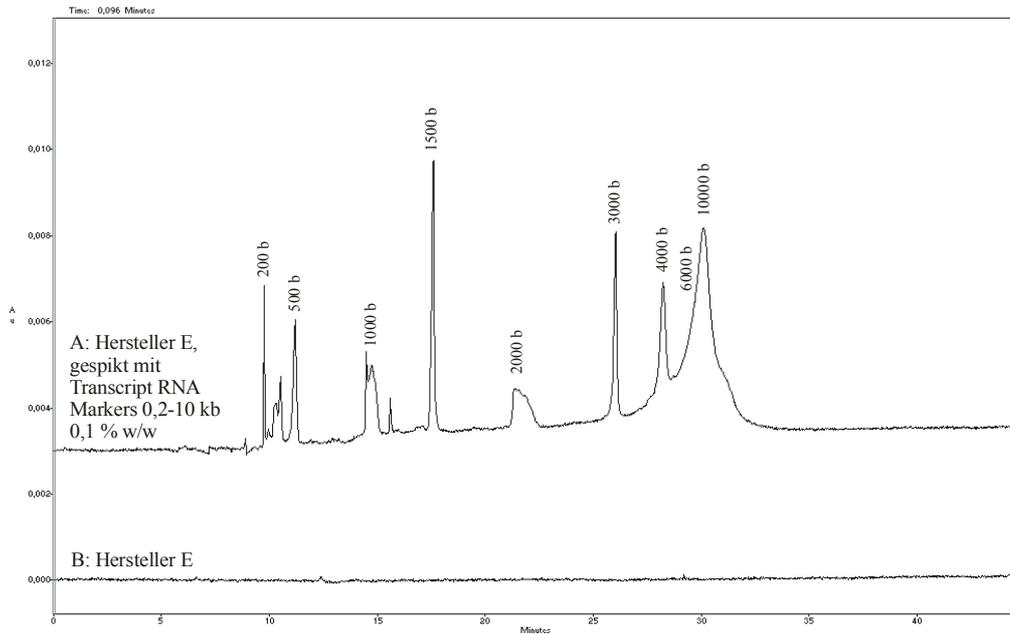


Abb. 6-32: Elektropherogramme: (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespikten Lys-Probe 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 4 M Harnstoff; (B) einer Lys-Probe von Lieferant K 40 mg/ml im gleichen Puffer. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25.

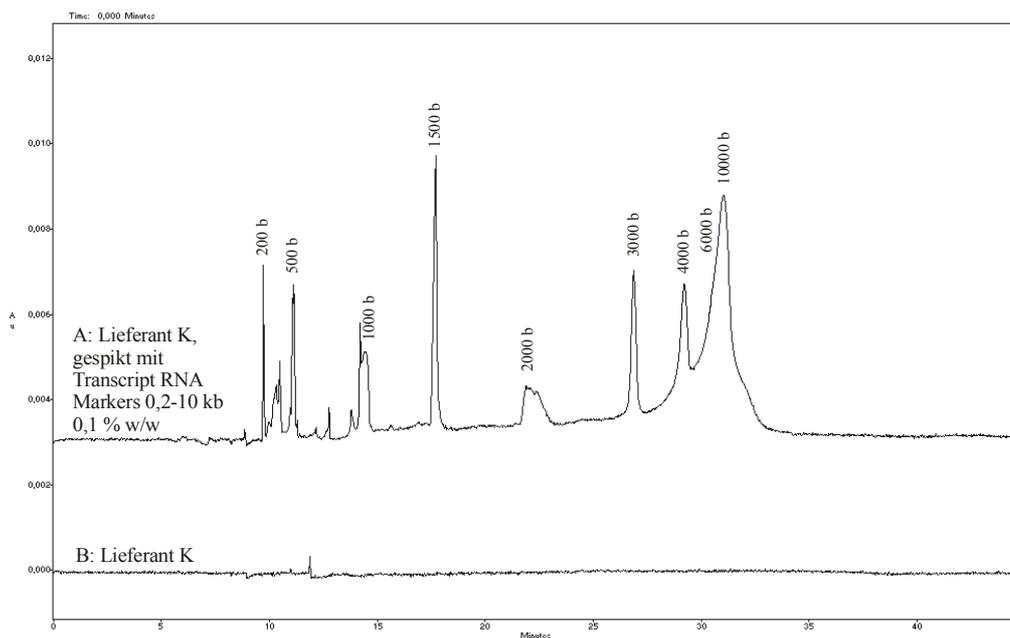
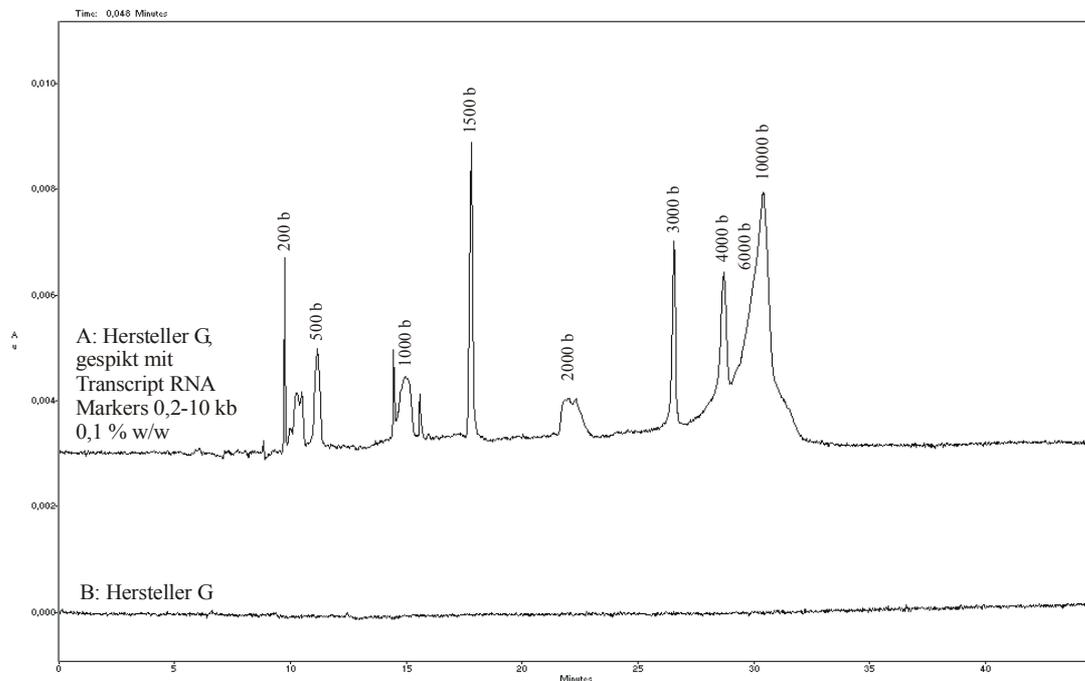


Abb. 6-33: Elektropherogramme: (A) einer mit 0,1 % w/w RNS-Marker (200 – 10000 b) gespikten Pro-Probe 40 mg/ml in Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM Harnstoff, 4 M; (B) einer Pro-Probe von Hersteller G 40 mg/ml im gleichen Puffer. CE-Bedingungen: wie in Abb. 6-16 mit Ausnahme des Trennelektrolytes, in diesem Fall Tris 89 mM – Borsäure 89 mM – EDTA 2 mM, 0,5 % w/w HPMC (4000 cP), 4 M Harnstoff. Peakzuordnung: wie in Abb 6-25.



Nur in den Fällen von Trp- und Phe-Proben wurden unbekannte Peaks detektiert. Es wurde festgestellt, daß es sich bei Trp um ein Abbauprodukt (Peak *a*, Siehe Abb. 6-26) handelt, da in frischen Trp-Proben dieser Peak kaum zu erkennen ist, wobei er proportional zur Zeit wächst. Bei Phe sind die Peaks *a* und *b* allerdings tatsächlich existierende Verunreinigungen, wobei Peak *a* in allen getesteten Phe-Proben zu finden ist (Siehe Abb. 6-30). Ob es sich um NS handelt oder um eine andere Art von Verunreinigungen, die bei pH 8,33 auch negativ geladen ist und demzufolge in Richtung Anode wandert, konnte mit der UV-Spektroskopie nicht bestätigt werden, da Phe bei 260 nm eine eigene Absorption hat. In jedem Fall sind aber beide Verunreinigungen viel kleiner als 0,1 % w/w, wenn als Maß für dieses Niveau die Summe der Peakflächen aller RNS-Fragmente genommen wird.

## 7. Glutathion

Glutathion (GSH) ist ein intrazelluläres Tripeptid, L- $\gamma$ -Glutamyl-L-cysteinylglycin, welches sich an zellulären Oxidations-Reduktionsreaktionen beteiligt. GSH liegt meist in der reduzierten Form vor, obwohl die Produktion von Oxidationsmitteln, freien Radikalen, ionisierenden Agentien und anderen Verbindungen GSH in seine oxidierte Form (GSSG) umwandeln können. Als nicht enzymatisches Antioxidans spielt GSH eine wesentliche Rolle beim Schutz der Zellen [187, 188]. Das Verhältnis von oxidierte zur reduzierte Form ist ein Indikator für oxidativen Stress oder den pathologischen Zustand der Zellen. Dieses Verhältnis ist ein zuverlässiger Index für die Fähigkeit der Zellen, den freien Radikalen und anderen toxischen Agentien entgegenzuwirken. GSSG wird unter Beteiligung des Enzymes *Glutathion-Reduktase* zu GSH reduziert.

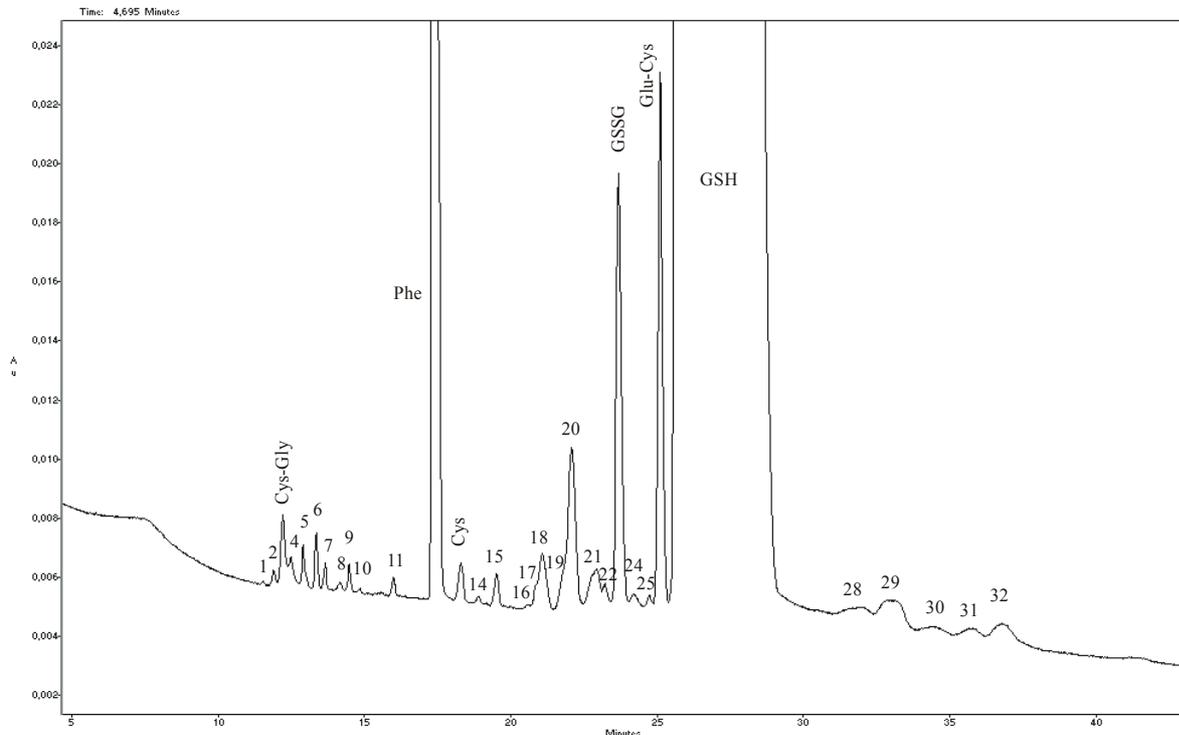
Als Arzneimittel wird GSH zur Behandlung von Intoxikationen mit Schwermetallen, Alkohol und Medikamenten verwendet. GSH wird auch bei idiopatischer Lungenfibrose sowie bei vielen anderen Krankheitszuständen von z.B. Leberstörungen, Hornhautstörungen, Ekzemen und zur Abschwächung der Effekte der antineoplastischen Therapie einschließlich der Neurotoxizität des Cisplatins eingesetzt [189].

Weltweit wird GSH für pharmazeutische Anwendungen meistens biotechnologisch hergestellt. Dafür werden grüne Algen (*Dunaliella*), Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) und gentechnologisch manipulierte Stämme von *Escherichia coli* verwendet [9]. Im Zusammenhang mit der Ausarbeitung einer kompletten Monographie von Glutathion sollte das Verunreinigungsprofil untersucht werden. Dazu musste eine geeignete analytische Methode entwickelt werden.

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Quantifizierung von GSH mit verschiedenen Trenn- bzw. Detektionsverfahren beschrieben. Es wurde eine Methode zur Quantifizierung der reduzierten und oxidierten Formen von Glutathion mittels RP-HPLC mit elektrochemischer Detektion veröffentlicht [190]. Bei einer anderen HPLC-Methode zur Quantifizierung von GSH in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten werden UV- und Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung mit 4-(6-Methylnaphthalen-2-yl)-4-oxo-2-butensäure verwendet [191]. Auch von *ortho*-Pthalaldehyd wurde als einem geeigneten Derivatisierungsreagenz berichtet [192, 193]. In den letzten Jahren wurden einige CE-Methoden mit einer direkten UV-Detektion von GSH bei kurzen Wellenlängen veröffentlicht [194, 195]. Diese Detektion wurde ebenso erfolgreich auch in der CE anderer thiolhaltiger Stoffe eingesetzt. CE-Methoden zur Trennung und Quantifizierung von N-Acetylcystein und seinen verwandten Verunreinigungen unter 0,1 % wurden von Wätzig [104] und Jaworska

[103] publiziert. Es wurde eine Reihe von CE-Vorversuchen mit GSH und dessen erwarteten Verunreinigungen, GSSG, Glutamylcystein (Glu-Cys), Cys und Cysteinyl-glycin (Cys-Gly), durchgeführt, um festzustellen, ob eine UV-Detektion bei einer kurzen Wellenlänge wie z.B. 200 nm eine ausreichende Empfindlichkeit der Methode sichern kann. Mit anderen Worten, es musste geprüft werden, ob die notwendige Empfindlichkeit der Methode (0,1 % w/w) der Sensitivität des Detektors angepasst werden kann, ohne das Trennsystem zu überlasten. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass diese Bedingung mit einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  erfüllt werden kann. Aufgrund der chemischen Eigenschaften des GSH muss berücksichtigt werden, dass die Probenlösungen sowie der Trennelektrolyt einen sauren pH-Wert haben müssen, da anderenfalls GSH in seine oxidierte Form umgewandelt wird, was aus Sicht der Quantifizierungskriterien unerwünscht ist. Bei einem sauren pH-Wert unter 2 werden die Silanolgruppen der Oberfläche der Kapillare vollständig protoniert, was bedeutet, dass der EOF quantitativ unterdrückt wird. Aufgrund seiner  $\text{pK}_a$ -Werte ( $\text{pK}_{a1}$ - 2,12,  $\text{pK}_{a2}$ - 3,53,  $\text{pK}_{a3}$ - 8,66,  $\text{pK}_{a4}$ - 9,12 [14] ) ist GSH bei pH-Werten kleiner als 2 positiv geladen. Es war zu erwarten, dass bei solchen pH-Werten auch die bekannten Verunreinigungen als Kationen vorliegen werden, so dass die Trennung mittels Injektion auf der Anodenseite durchgeführt werden kann. Bei der Methodenentwicklung wurden Phosphat- sowie Acetatpuffer mit verschiedenen Ionenstärken und pH-Werten im sauren Bereich getestet. Die beste Auftrennung wurde mit einem Phosphatpuffer pH 1,8 (Natriumdihydrogenphosphat 50 mM Lösung, deren pH-Wert mit Phosphorsäure 85 % auf 1,8 gebracht wird) erreicht, wobei zu bemerken ist, dass bei diesem pH-Wert alle bekannten Verunreinigungen schneller als GSH wandern, was grundsätzlich die Auswertung der Elektropherogramme erleichtert. Während der Optimierung des Trennpuffers wurde nicht nur nach den Bedingungen gesucht, bei denen die Auftrennung der bekannten Verunreinigungen am besten ist, sondern es wurden auch die Zahl und die Größe der unbekannt Peaks berücksichtigt. Aus den bereits erwähnten Gründen wurde ein interner Standard gesucht. Dazu wurden die drei aromatischen Aminosäuren - Phe, Tyr und Trp - eingesetzt. Es wurden diese drei Aminosäuren ausgewählt, weil sie den Analyten chemisch ähnlich sind und auch eine gute Absorption bei 200 nm haben. Aufgrund seiner Lage auf dem Elektropherogramm sowie der Tatsache, dass es keine der 30 beobachteten Verunreinigungen überdeckt, wurde Phe als IS ausgewählt und weiterhin in den quantitativen Untersuchungen eingesetzt. Ein typisches Elektropherogramm einer GSH-Probe ist in Abb. 7-1 gezeigt. Die Peaks der bekannten Verunreinigungen wurden mit gespikten Proben identifiziert.

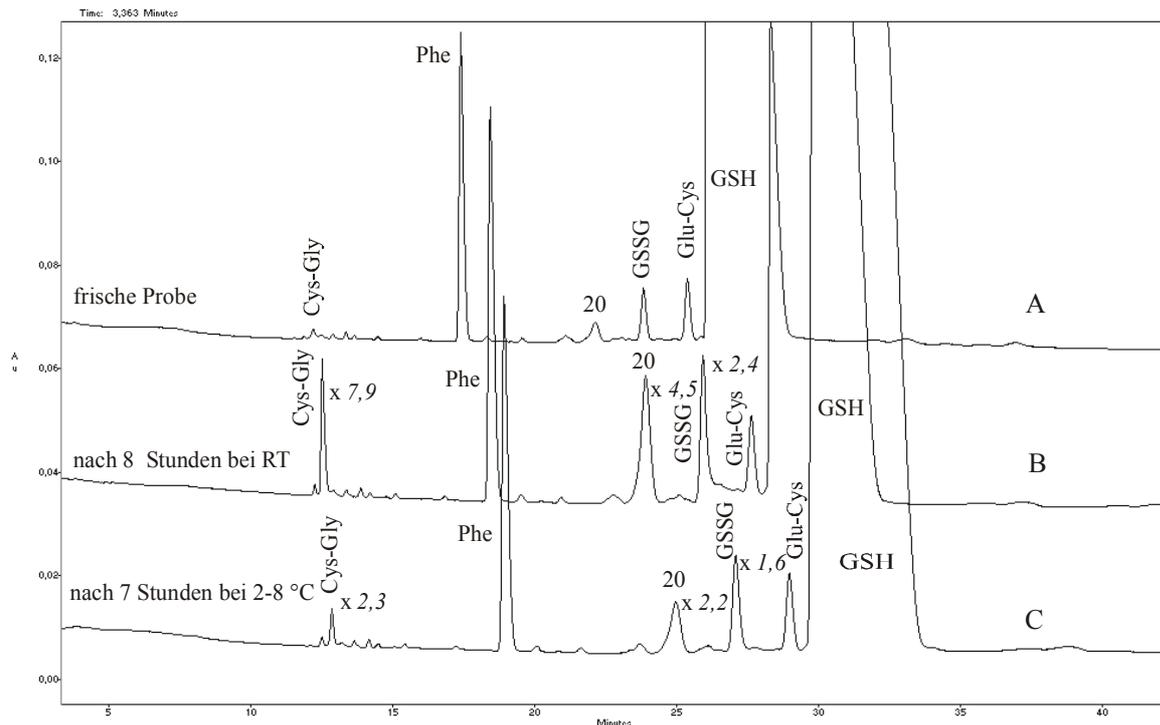
Abb. 7-1: Elektropherogramm einer 20 mg/ml GSH-Probe in Trennelektrolyt, versetzt mit 1 % w/w Phe (IS). CE-Bedingungen: Trennelektrolyt: Natriumdihydrogenphosphat 50 mM, pH 1,8 (eingestellt mit Phosphorsäure 85 %); Kapillare: Kiesegel 60,2/50 cm, 75  $\mu\text{m}$  i.d.; Spannung: 20 kV; Temperatur: 25 °C; Injektion: 3448 Pa, 5 s; Detektion: UV- 200 nm: Peaks 1,2, 4-11, 14-22, 24, 25, 28-32 – unbekannt.



Insgesamt 30 Verunreinigungen wurden in allen drei getesteten Batches gefunden, wobei sich Glu-Cys und GSSG als Hauptverunreinigungen erweisen (Siehe Tabelle 7-1). Da eine Oxidation des GSH während der Probenvorbereitung und der Analyse nicht ausgeschlossen werden konnte, was zu einer Erhöhung des tatsächlichen Gehaltes des GSSG in der Probe führt, musste die Stabilität der GSH-Lösung geprüft werden. Die Stabilitätsuntersuchungen wurden bei zwei verschiedenen Aufbewahrungstemperaturen, RT und 2-8°C, durchgeführt, wobei in verschiedenen Zeitabständen Proben aus den Lösungen entnommen und analysiert wurden. Es wurde festgestellt, dass die Peaks von Cys-Gly und GSSG sowie ein unbekannter Peak mit der Zeit zunehmen. Dies ist bei der bei RT aufbewahrten Probe nach 30 Minuten zu beobachten. Bei der im Kühlschrank aufbewahrten Probe wurde ein „Wachsen“ der Peaks der obengenannten Verunreinigungen erst nach 60 Minuten festgestellt. Elektropherogramme einer frisch hergestellten GSH-Probe sowie von zwei Proben, die sieben bzw. acht Stunden bei verschiedenen Temperaturen gelagert wurden, sind in Abb. 7-2 dargestellt. Bei der für acht Stunden bei RT gelagerten Probe wurde eine Vergrößerung der korrigierten Flächen der Peaks von Cys-Gly, Verunreinigung 20 und GSSG von ca. 7,9 bzw. 4,5 und 2,4fach festgestellt. Diese Ergebnisse deuteten nicht nur daraufhin, dass die Probe unverzüglich nach

Lösen analysiert werden muss, sondern auch, dass Cys-Gly und GSSG als Verunreinigungen, die aus der Herstellung kommen, ebenfalls als Zersetzungs- bzw. Umwandlungsprodukte betrachtet werden müssen.

Abb. 7-2: Elektropherogramme einer frisch hergestellten 20 mg/ml GSH-Probe in Trennelektrolyt (A) und gleicher Proben, gelagert bei RT für acht Stunden (B) und bei 2-8 °C für sieben Stunden (C). CE-Bedingungen wie in Abb. 7-1.



Da Cys-Gly, GSSG und Glu-Cys nicht als Referenzsubstanzen in genügend guter Qualität zur Verfügung stehen, musste ihr Gehalt in der Probe als Anteil ihrer korrigierten Peakflächen bezogen auf die korrigierte Peakfläche eines externen GSH-Standards ausgerechnet werden. Dabei müssen die Responsfaktoren der einzelnen Substanzen berücksichtigt werden. Diese wurden mittels Modellmischungen bestimmt, die GSH in einer Konzentration von 0,2 mg/ml (0,1 % w/w Niveau), Phe in gleicher Konzentration und alle bekannten Verunreinigungen in Konzentrationen von 0,02 bis 0,2 mg/ml enthalten. Das Elektropherogramm einer dieser Modellmischungen ist in Abb. 7-3 gezeigt.

Der Responsfaktor des GSH wurde gleich eins gesetzt und die Responsfaktoren der Verunreinigungen wurden auf Basis des Verhältnisses ihrer korrigierten Peakflächen zu der korrigierten Peakfläche des GSH ausgerechnet. Es wurden die folgenden Responsfaktoren festgestellt: Cys-Gly = 1; Cys = 2,8; Glu-Cys = 1,6; GSSG = 1,1. Diese Responsfaktoren werden als Korrekturfaktoren bei der Ausrechnung des jeweiligen Gehaltes der bekannten

Verunreinigungen durch den externen Standard angewendet. Die Gehälter von Cys, Glu-Cys und GSSG in den getesteten Proben, sind in Tabelle 7-1 angegeben.

Abb. 7-3: Elektropherogramm einer Modellmischung, bestehend GSH, Phe (IS), Cys-Gly, Cys, GSSG, Glu-Cys jeweils 0,2 mg/ml. CE-Bedingungen wie in Abb. 7-1.

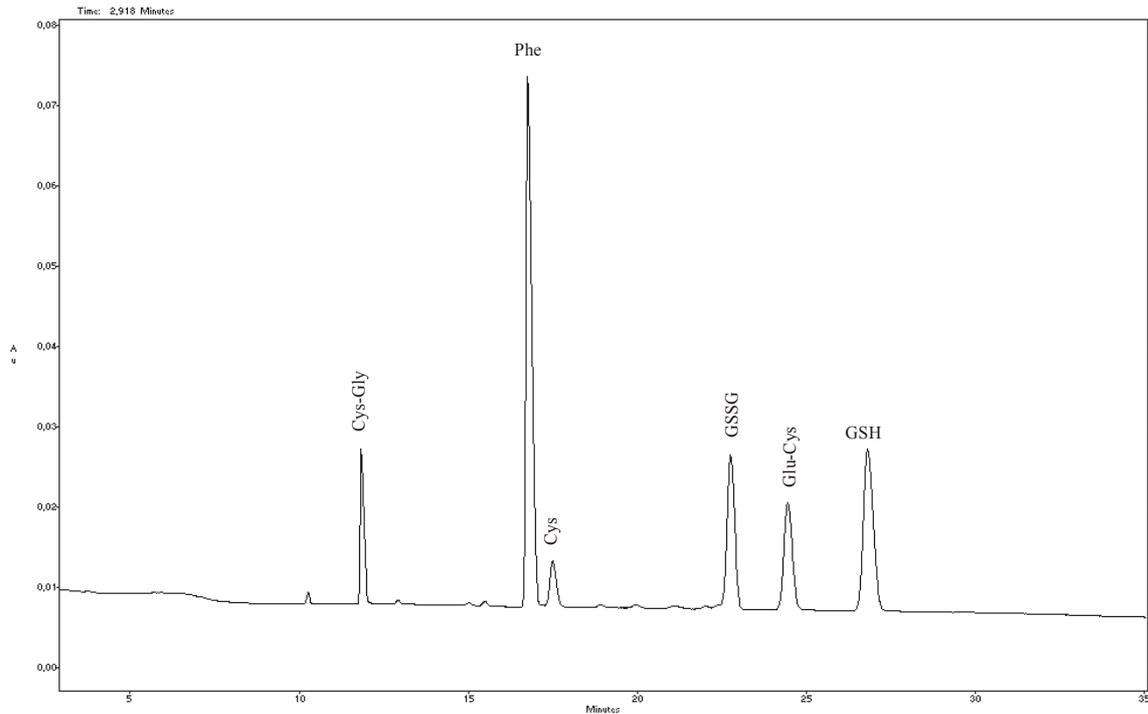


Tabelle 7-1: Verunreinigungsprofil von Glutathion

Verunreinigungen	Gehalt, % w/w						
	ohne Anwendung eines Korrekturfaktors			Korrekturfaktor	nach Anwendung eines Korrekturfaktors		
	Batch		Batch				
	14969	14970	14971		14969	14970	14971
Cys-Gly*	0,09	0,07	0,1				
Cys	0,04	0,04	0,04	2,8	0,11	0,11	0,11
Peak 20*	0,20	0,17	0,24				
GSSG*	0,35	0,35	0,44	1,1	0,39	0,39	0,48
<b>Glu-Cys</b>	0,40	0,33	0,34	1,6	0,64	0,53	0,54
total (about 30)	1,78	1,52	1,84				

\* vorkommend nicht nur aus den Herstellungs- und Reinigungsprozessen, sondern auch als Zersetzungs-/Umwandlungsprodukt

### Validierung der Methode

Bei der Validierung der Methode wurden Modellmischungen, die GSH, Phe (IS) und bekannte Verunreinigungen in entsprechenden Konzentrationen enthalten, eingesetzt. In allen Auswertungen wurden die korrigierten Peakflächen der Analyten bezogen auf die korrigierte Peakfläche des IS verwendet.

*Linearität:* Die Linearität der Methode wurde mit sechs Konzentrationen im Bereich von 0,005 – 0,2 mg/ml durch lineare Regression bewertet. Dieser Bereich, bezogen auf die Konzentration des GSH in den Modellmischungen (20 mg/ml), entspricht 0,025 – 1,0 % w/w der Verunreinigungen. Phe wurde in allen Proben in einer Konzentration von 0,2 mg/ml zugegeben. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 7-2 angegeben.

*LOD/LOQ:* Das LOD (Signal/Rausch-Verhältnis = 3) und das LOQ (Signal/Rausch-Verhältnis = 10) wurden für die bekannten Verunreinigungen mit einer Verdünnungsreihe gesucht, wobei die Konzentrationen des GSH und des IS in den Modellmischungen immer gleich, 20 mg/ml bzw. 0,2 mg/ml, gehalten wurden. Die Ergebnisse zeigen eine bemerkenswerte Empfindlichkeit. Die Methode ist in der Lage, die einzelnen bekannten Verunreinigungen auf 0,01%-Niveau zu quantifizieren (Siehe Tabelle 7-2).

*Präzision:* Um die Präzision des analytischen Systems zu beurteilen, wurden sechs Proben eines GSH-Batches analysiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7-2 als relative Standardabweichung (RSA) ausgewertet.

*Richtigkeit:* Mit drei Modellmischungen, die jeweils alle bekannten Verunreinigungen in Konzentrationen von 0,05 mg/ml (0,25 % w/w), 0,1 mg/ml (0,5 % w/w) oder 0,2 mg/ml (1,0 % w/w) enthalten, wurde die Wiederfindung der Methode beurteilt. Jede Modellmischung wurde dreimal analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-2 als Konfidenzintervalle angegeben.

*Robustheit:* Wie in Abb. 7-1 zu sehen ist, kann die Auftrennung bei den Paaren Phe/Cys und Glu-Cys/GSH als kritisch betrachtet werden. Es wurde in diesem Zusammenhang untersucht, inwiefern das Variieren des pH-Wertes und der Ionenstärke des Trennelektrolyten sowie die angelegte Spannung die Auftrennung dieser Paare beeinflussen kann. Es wurden keine bedeutenden Unterschiede festgestellt, wenn der pH-Wert im Bereich von  $1,8 \pm 0,05$ , die Ionenstärke des Puffers im Bereich von  $50 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$  und die Spannung mit  $\pm 1 \text{ kV}$  variiert wurden. In allen Fällen wurde für beide Paare eine Auflösung größer als 2,5 beobachtet. Die Auflösung von 2,5 für diese Paare kann als Systemeignungstest eingesetzt werden.

Tabelle 2: Validierungsdata

Verunreinigung	Linearität			LOD/LOQ		Präzision (n = 6) RSA, %	Richtigkeit (Wiederfindung)				
	Konzentrationsbereich		Korrelations- koeffizienten	mg/ml	als Gehalt, bezogen auf GSH, % w/w		Wiederholung	Wiederfindung von dem erwarteten Gehalt, %			Konfidenzintervall ( $\alpha=0,05$ , n=9)
	mg/ml	als Gehalt, bezogen auf GSH, % w/w						0,05 mg/ml (0,25 %)	0,1 mg/ml (0,5 %)	0,2 mg/ml (1,0 %)	
Cys-Gly	0,005 - 0,2	0,025 – 1,0	0,9995	0,00036 / 0,001	0,0018 / 0,005	4,57	1 2 3	105,3 99,6 102,3	100,2 96,7 98,6	99,6 102,3 104,0	$\pm 1,68$
Cys	0,005 - 0,2	0,025 – 1,0	0,9934	0,0016 / 0,004	0,008 / 0,02	3,38	1 2 3	98,4 103,2 101,6	100,2 97,1 104,1	98,5 99,1 100,0	$\pm 1,43$
GSSG	0,005 - 0,2	0,025 – 1,0	0,9953	0,00044 / 0,0012	0,0022 / 0,006	4.12	1 2 3	103,7 97,4 102,9	102,4 98,1 104,7	100,7 102,8 101,6	$\pm 1,52$
Glu-Cys	0,005 - 0,2	0,025 – 1,0	0,9988	0,00072 / 0,002	0,0036 / 0,01	2.02	1 2 3	100,5 102,3 98,1	97,8 102,6 100,7	99,1 103,6 97,4	$\pm 1,4$

Die Ergebnisse aus den Validierungsuntersuchungen wurden als zufriedenstellend befunden. Die Methode kann zur Prüfung auf verwandte Substanzen in der Monographie von Glutathion eingesetzt werden.

## 8. Zusammenfassung

### 8.1. Aminosäuren

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchungen von Verunreinigungsprofilen von Aminosäuren aus biotechnologischer Herstellung. Dazu sollten die Aminosäuren Arg, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Ser und Trp von verschiedenen Herstellern und aus unterschiedlichen Batches genauer unter die Lupe genommen werden. Mit der im Europäischen Arzneibuch beschriebenen dünnschichtchromatographischen Methode (DC-Methode) für „mit Ninhydrin nachweisbare Substanzen“ können ausschließlich Fremdaminosäuren nachgewiesen werden und dies nur, wenn der jeweilige Gehalt relativ hoch ist. Andere Stoffgruppen, die aus der biotechnologischen Herstellung stammen, werden aufgrund der Trennbedingungen sowie der Detektionsart der DC-Methode nicht erfasst. Deshalb mussten neue Methoden entwickelt werden. Laut Vorschriften der International Conference of Harmonisation (ICH) müssen unbekannte Verunreinigungen in Wirkstoffen für orale Therapeutika auf 0,1 % w/w begrenzt werden können. In die Untersuchungen wurden neben den Fremdaminosäuren auch Peptide, Amino Zucker und Nucleinsäuren als potentielle Verunreinigungen, die aus der Herstellung bzw. aus dem Reinigungsprozess kommen, einbezogen. Diese zusätzlichen Stoffgruppen können aus den „Nebenaktivitäten“ der Mikroorganismen entstehen. Aminosäuren, Peptide und Amino Zucker wurden versucht, kapillarelektrophoretisch zu quantifizieren. Für die Bestimmung von Nucleinsäuren wurde zusätzlich die UV-Spektroskopie eingesetzt.

Zur Prüfung auf Fremdaminosäuren wurde eine spezielle kapillarelektrophoretische Methode und zwar eine micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) zur Trennung entwickelt und validiert. Da Aminosäuren zumeist keine Chromophore aufweisen, wurden sie als 9-Fluorenylmethylchloroformat-Derivate (Fmoc-Derivate) detektiert. Die Trennung erfolgt in einer Kieselgelkapillare mit einer Gesamtlänge von 70 cm, einer effektiven Länge von 60 cm und einem Durchmesser von 75 µm. Als Trennelektrolyt wird Borat-Puffer (20 mM, pH 9,3), zu dem Natriumdodecylsulfat als micellbildendes Reagenz in einer Konzentration von 25 mM zugegeben wird, verwendet. Die Proben werden hydrodynamisch bei 6895 Pa für 10 Sekunden auf die Anodenseite der Kapillare geladen. Die Trennung wird bei 15 kV und Raumtemperatur durchgeführt. 6-Aminocapronsäure wird als interner Standard verwendet. Die Detektion erfolgt UV-spektroskopisch bei 254 nm. Für die Aminosäuren Ile, Phe, und Trp konnten alle Fremdaminosäuren vom jeweiligen Hauptpeak abgetrennt werden. Im Fall von Pro überdeckt der Hauptpeak die Peaks von Val und Tyr und im Fall von Ser die Peaks von

Thr, Asn, Gln und Ala, so dass eine Quantifizierung für diese Peaks nicht vorgenommen werden kann. Für Arg, His und Lys ist die Methode wegen Löslichkeitsproblemen der entstehenden FMOC-Derivate sowie Mehrfach-Derivatisierungen nicht anwendbar.

Bei den Untersuchungen der verschiedenen Batches mit dieser Methode wurde Folgendes festgestellt: in der Ile-Probe waren Val, Leu und Phe jeweils mit einem Gehalt von ca. 0,2 % w/w enthalten; in Phe-Proben wurde Leu, Ile, Cystin und zwei unbekannte Verunreinigungen mit weniger als 0,1 % w/w sowie eine dritte Verunreinigung mit einem Gehalt von ca. 0,2 % w/w festgestellt; in den Ser-Proben sind zwei unbekannte Verunreinigungen von ca. 0,2 % w/w nachgewiesen worden; in der Pro-Probe wurde 0,024 % w/w Ser und eine unbekannte Verunreinigung, deren Gehalt unterhalb von 0,1 % w/w lag, gefunden; in den Trp-Proben wurde jeweils 0,05 % w/w Phe und Leu sowie zwei unbekannte Verunreinigungen kleiner als 0,1 % w/w festgestellt (Siehe Tabelle 8).

Mit der Entwicklung einer zweiten MEKC-Methode, die sich der Laser-Induced-Fluorescence-Detektion (488/520 nm) nach einer Derivatisierung mit 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd (CBQCA) bedient, konnte der Bereich der Verunreinigungen, die quantifiziert werden sollen, auf Stoffe, die primäre Aminogruppen enthalten, erweitert werden. Es werden die gleichen Kapillaren und der gleiche Trennelektrolyt wie bei der FMOC-Methode verwendet. Die Proben werden durch Druckinjektion von 5 Sekunden bei 3448 Pa auf die Anodenseite der Kapillare geladen. Die Trennung erfolgt bei 20 kV und Raumtemperatur. Mit dieser Methode können Aminozucker, Peptide und Fremdaminosäuren bis zu Konzentrationen von 0,1 % w/w nachgewiesen und quantifiziert werden. Sie ist für Arg, His, Ile, Phe und Ser anwendbar. Bei Proben von Trp und Lys wurde eine nicht reproduzierbare mehrfache Derivatisierung beobachtet. Pro kann mit CBQCA nicht derivatisiert werden, da es keine primäre Aminogruppen enthält. Die Methode wurde als eine allgemeine Methode für Arg, His, Ile, Phe und Ser entwickelt. Dabei wurde bei der Optimierung der Trennbedingungen nicht auf beste Auftrennung der einzelnen Aminosäuren, sondern es wurde auf die Zahl und die Größenordnung der tatsächlich nachgewiesenen anderen Verunreinigungen geachtet. Demzufolge konnten mit dieser Methode die in Ile als FMOC-Derivate nachgewiesenen Verunreinigungen Val, Leu und Phe nicht festgestellt werden (Siehe Tabelle 8).

Batches von Arg, His, Phe, Ser und Ile wurden mit der CBQCA-Methode untersucht: in den Arg-Proben wurde eine Verunreinigung, deren Gehalt viel größer als 0,1 % sein kann, gefunden; in den His-Proben wurden ca. 15 Verunreinigungen, deren Gehalt um die 0,1%-

Grenze liegt, nachgewiesen; in den Phe-Proben wurden drei Verunreinigungen von 0,1 % nachweisbar; in den Ser-Proben waren zwei unbekannte Verunreinigungen, deren Gehalt kleiner als 0,1 % war, festgestellt und in der Ile-Probe wurden keine Verunreinigungen nachgewiesen (Siehe Tabelle 8).

Damit ist die Methode geeignet, die Monographien der oben genannten 5 Aminosäuren ausschließlich in Bezug auf Verunreinigungen anderer Art zu ergänzen. Mit ihr können Verunreinigungen anderer Art auf dem 0,1%-Konzentrationsniveau kontrolliert werden. Prinzipiell müssen in Zukunft die Trennbedingungen für jede einzelne Aminosäure individuell optimiert werden, so dass die Selektivität auch gegenüber Fremdaminosäuren ausreichend ist. Wenn dies zum Verlust der Selektivität gegenüber Verunreinigungen anderer Natur führt, ist zu empfehlen, zwei Methoden zur Reinheitsprüfung einzusetzen.

Mit der im Europäischen Arzneibuch beschriebenen DC-Methode auf „Ninhydrin-positive Substanzen“ wurden in allen getesteten Proben keine Verunreinigungen festgestellt (Siehe Tabelle 8). Dies zeigt, wie unempfindlich die dünnschichtchromatographische Methode im Vergleich mit der hier enthaltenen MEKC-Methode ist.

Zur Bestimmung von eventuell in Aminosäuren vorkommenden Nucleinsäuren wurde eine UV-spektroskopische Methode entwickelt. Nucleinsäuren zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, das zur Quantifizierung genutzt werden kann. Mit dieser Methode können Nucleinsäuren in Aminosäuren wie Arg, Ile, Ser, His und Pro, die im Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren nicht absorbieren, UV-spektroskopisch bis zu Konzentrationen von 0,01 % w/w kontrolliert werden. Die Untersuchungen zeigten, dass alle getesteten Proben frei von Nucleinsäuren sind (Siehe Tabelle 8). In einer Ser-Probe zeigt das UV-Spektrum eine erhöhte Absorption im Bereich von 260 nm. Der Absorptionsverlauf weist aber daraufhin, dass es sich sehr wahrscheinlich um Trp in einer Konzentration von ca. 0,006 % w/w handelt. Eine ähnliche erhöhte Absorption im Bereich von 260 nm wurde auch bei Ile-Proben festgestellt. Auf Grund der Form des Spektrums handelt es sich um ca. 0,2 % w/w Phe in der Ile-Probe von Hersteller E bzw. um Tyr in einer Konzentration kleiner als 0,01 % w/w in den Ile-Proben von Lieferant K.

Die Abwesenheit von Nucleinsäuren konnte in kapillargelelektrophoretischen Untersuchungen bestätigt werden. Es wurde eine mit (50 % - Phenyl)-methylpolysiloxan beschichtete 50 cm lange Kapillare (2 µm Filmdicke) mit einem Innendurchmesser von 100

µm und einer effektiven Länge der Kapillare von 40 cm verwendet. Der Trennelektrolyt war ein Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat-Puffer (89 mM, pH 8,33, Ethylendiamintetraessigsäure 2 mM), zu dem als gelbildende Komponente Hydroxypropylmethylcellulose in einer Konzentration von 0,5 % w/w gegeben wurde. In den Untersuchungen auf Ribonucleinsäuren wurde Harnstoff als Schmelzmittel in einer Konzentration von 4 M zugegeben. Die Proben wurden elektrokinetisch bei 10 kV für 10 Sekunden in die Kathodenseite der Kapillare geladen. Die Trennung wurde bei umgekehrter Polarität durchgeführt. Die UV-Detektion erfolgte bei 254 nm. Mit Ausnahme von Phe- und Trp-Proben wurden keine Peaks in allen anderen Aminosäuren nachgewiesen (Siehe Tabelle 8). In Trp wurde ein Zersetzungsprodukt, das während der Lagerung der Probe entsteht, gefunden. Der Gehalt der zwei Verunreinigungen, die in den Phe-Proben detektiert wurden, ist viel kleiner als 0,01 % w/w, falls es sich um Nucleinsäuren handelt. Es ist aber wahrscheinlicher, dass es sich um Verunreinigungen anderer Art, besonders im Fall von Verunreinigung *b* (Siehe Abb. 6-30), handelt, da die entsprechende Nucleinsäure viel größer als 10.000 Basen sein müsste. Beim Reinigungsprozess werden aber alle so großen Moleküle durch das Filtrationsverfahren entfernt.

Vergleicht man die Ergebnisse der verschiedenen Methoden, so lässt sich folgendes sagen:

1. Die FMOC-Methode kann alle Fremdaminosäuren mit höherer Empfindlichkeit als die im Europäischen Arzneibuch beschriebene DC-Methode auf „ninhydrinpositive Substanzen“ erfassen. Deshalb ist sie als Referenzmethode in Bezug auf Fremdaminosäuren bei der Anpassung der CBQCA-Methode für Ile, Phe und Trp verwendbar.
2. Die MEKC-Methode mit CBQCA-Derivatisierung kann als eine zweite Methode zur Prüfung auf Reinheit in den Monographien von Arg, His, Ile, Phe und Ser eingesetzt werden. Mit ihr können primäre Amine wie Aminosäuren, Peptide oder Aminozucker evaluiert werden.
3. Nucleinsäuren konnten nicht nachgewiesen werden. Deshalb ist eine Prüfung auf Anwesenheit von Nucleinsäuren in den Monographien von Arg, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Ser und Trp nicht notwendig.
4. Die Ergebnisse aller Untersuchungen sind in Tabelle 8. zusammengefasst.

## 8.2. Glutathion

Es wurde eine CE-Methode mit UV-Detektion bei 200 nm zur Prüfung auf Reinheit von Glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-cysteinylglycin) aus biotechnologischer Herstellung auf 0,1%-Konzentrationsniveau entwickelt und validiert. Die Trennung erfolgt in einer Kieselgelkapillare mit einer Gesamtlänge von 60 cm und einer effektiven Länge von 50 cm. Als Trennelektrolyt wird Phosphat-Puffer (50 mM, pH 1,8) verwendet. Die Proben werden in die Anodenseite der Kapillare durch Druckinjektion von 5 Sekunden bei 3448 Pa geladen. Die Trennung wird bei 20 kV und Raumtemperatur durchgeführt. Die Methode weist ausgezeichnete Trennleistung und Empfindlichkeit gegenüber Verunreinigungen, die aus dem Herstellungs- bzw. Reinigungsprozess kommen, auf. Mit dieser Methode wurde festgestellt, dass die Hauptverunreinigungen von Glutathion seine oxidierte Form und Glu-Cys sind, wobei das oxidierte Glutathion sowie Cys-Gly und eine unbekannte Verunreinigung, „Peak 20“, Umwandlungs- bzw. Abbauprodukte sind. Demzufolge kann diese Methode möglicherweise auch für Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt werden. Die Gesamtzahl der detektierten Verunreinigungen in allen drei getesteten Batches betrug ca. 30. Von allen unbekanntem Verunreinigungen wird die 0,1%-Grenze nur von „Peak 20“ überschritten. Dessen Gehalt wurde zu ca. 0,2 % in den untersuchten Batches berechnet. Es ist eine Identifizierung dieser Verunreinigung zu empfehlen.

Die Methode ist geeignet, die verwandten Substanzen in Glutathion zu kontrollieren.

**Tabelle 8:** Verunreinigungsprofile der untersuchten Aminosäuren aus biotechnologischer Herstellung

Aminosäure	Hersteller/Batch	Untersuchung auf				
		Anwesenheit von Aminosäuren und anderen aminhaltigen Substanzen			Anwesenheit von Nucleinsäuren	
		Zahl, Identität und Grössenordnung der Verunreinigungen, festgestellt mittels				
		MEKC: FMOC-Derivate UV-Detektion: 254 nm	MEKC: CBQCA-Derivate LIF-Detektion: 488/520 nm	DC: ninhydrinpositive Substanzen	UV-Spektroskopie: 260 nm	CGE: UV-Detektion, 254 nm
Arg	C/Batch 1	nicht anwendbar	1, unbekannt, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	C/Batch 2		1, unbekannt, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	F		1, unbekannt, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	D		1, unbekannt, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	A		1, unbekannt, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	G		1, unbekannt, >> 0,1 %	-	-	-
His	A		nicht anwendbar	> 10, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %	-	-
His	B	> 10, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %		-	-	-
His	D/Batch 1	> 10, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %		-	-	-

**Tabelle 8:** Verunreinigungsprofile der untersuchten Aminosäuren aus biotechnologischer Herstellung (Fortsetzung)

Aminosäure	Hersteller/Batch	Untersuchung auf				
		Anwesenheit von Aminosäuren und anderen aminhaltigen Substanzen			Anwesenheit von Nucleinsäuren	
		Zahl, Identität und Grössenordnung der Verunreinigungen, festgestellt mittels				
		MEKC: FMOC-Derivate UV-Detektion: 254 nm	MEKC: CBQCA-Derivate LIF-Detektion: 488/520 nm	DC: ninhydrin-positive Substanzen	UV-Spektroskopie: 260 nm	CGE: UV-Detektion, 254 nm
His	D/Batch 2		> 10, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %	-	-	-
His	C	nicht anwendbar	> 10, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %	-	-	-
His	G		> 10, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %	-	-	-
Ile	E	3, Val, Leu, Phe, jeweils ca. 0,2 % w/w	-	-	Phe, ca. 0,2 % w/w	-
Lys	K	nicht anwendbar	nicht anwendbar	-	nicht anwendbar	-
Phe	D/Batch 1	2, Leu ca. 0,05 % w/w und eine unbekannte ca. 0,2 %	2, unbekannt, ca. 0,1 %	-	nicht anwendbar	2, unbekannt, jeweils << 0,1 %
Phe	D/Batch 2	1, unbekannt, ca. 0,1 %	1, unbekannt, ca. 0,1 %	-		1, unbekannt, << 0,1 %

**Tabelle 8:** Verunreinigungsprofile der untersuchten Aminosäuren aus biotechnologischer Herstellung (Fortsetzung)

Aminosäure	Hersteller/Batch	Untersuchung auf				
		Anwesenheit von Aminosäuren und anderen aminhaltigen Substanzen			Anwesenheit von Nucleinsäuren	
		Zahl, Identität und Grössenordnung der Verunreinigungen, festgestellt mittels				
		MEKC: FMOC-Derivate UV-Detektion: 254 nm	MEKC: CBQCA-Derivate LIF-Detektion: 488/520 nm	DC: ninhydrin-positive Substanzen	UV-Spektroskopie: 260 nm	CGE: UV-Detektion, 254 nm
Phe	E	7, Leu, Ile, Cystin, Arg und zwei unbekannte jeweils < 0,1 %; eine dritte unbekannte ca. 0,2 %	3, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %	-	nicht anwendbar	1, unbekannt, << 0,1 %
Pro	G	2, Ser 0,024 % w/w und eine unbekannte ca. 0,1 %	nicht anwendbar	-	-	-
Ser	H	2, unbekannt, jeweils ca. 0,2 %	2, unbekannt, jeweils < 0,1 %	-	-	-
Ser	B	2, unbekannt, jeweils ca. 0,1 %	2, unbekannt, jeweils < 0,1 %	-	-	-
Ser	I	2, unbekannt, jeweils ca. 0,2 %	2, unbekannt, jeweils < 0,1 %	-	Trp, 0,006 % w/w	-

**Tabelle 8:** Verunreinigungsprofile der untersuchten Aminosäuren aus biotechnologischer Herstellung (Fortsetzung)

Aminosäure	Hersteller/Batch	Untersuchung auf				
		Anwesenheit von Aminosäuren und anderen aminhaltigen Substanzen			Anwesenheit von Nucleinsäuren	
		Zahl, Identität und Grössenordnung der Verunreinigungen, festgestellt mittels				
		MEKC: FMOC-Derivate UV-Detektion: 254 nm	MEKC: CBQCA-Derivate LIF-Detektion: 488/520 nm	DC: ninhydrin-positive Substanzen	UV-Spektroskopie: 260 nm	CGE: UV-Detektion, 254 nm
Trp	B/Batch 1	1, unbekannt, < 0,1 %	nicht anwendbar	-	nicht anwendbar	-
Trp	B/Batch 2	4, Phe und Leu jeweils ca. 0,05 % w/w und zwei unbekannte, jeweils < 0,1 %	nicht anwendbar	-	nicht anwendbar	-
Trp	D	2, Phe < 0,05 % w/w und eine unbekannte ca. 0,05 %	nicht anwendbar	-	nicht anwendbar	-
Trp	J	2, Phe ca. 0,05 % w/w und eine unbekannte ca. 0,1 %	nicht anwendbar	-	nicht anwendbar	-
Trp	G	2, Phe < 0,05 % w/w und eine unbekannte < 0,1 %	nicht anwendbar	-	nicht anwendbar	-

## 8. Summary

### 8.1. Amino acids

Aim of the present work was to investigate the impurity profiles of amino acids of biotechnological origin. Eight amino acids were included: Arg, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Ser and Trp. The amino acid samples originating from different producers and different batches had to be studied in deeper detail. The thin-layer chromatographic method (TLC-method) of “ninhydrin-positive substances”, as described in the European Pharmacopoeia, is able to detect primarily other amino acids, if their respective content is relatively high. Other groups of substances of biotechnological origin cannot be detected due to the separation conditions and the detection principle of the TLC-method. Therefore new methods had to be developed. In accordance with the guidelines of the International Conference of Harmonisation (ICH), the content of unknown impurities in active ingredients for oral therapeutics should be limited to 0,1 % w/w. Apart from other amino acids, the study included peptides, amino sugars and nucleic acids as potential impurities, originating from production or purification processes. These additional groups of substances are byproducts of the biosynthesis pathways of microorganisms. An attempt was made to quantify the amino acids, peptides and amino sugars by means of capillary electrophoresis. UV-spectrophotometry was additionally used for the determination of nucleic acids.

A method based on micellar electrokinetic chromatography (MEKC) for quantification of other amino acids as 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives (FMOC-derivatives) was developed and validated. The separation is carried out in a fused-silica capillary with a total length of 70 cm, effective length of 60 cm and a diameter of 75  $\mu\text{m}$ . A borate buffer (20 mM, pH 9,3), is used as a separation electrolyte; sodium dodecylsulfate in concentration of 25 mM is added as a micelle-forming compound. The samples are loaded hydrodynamically at 6895 Pa for 10 seconds on the anode site of the capillary. The separation is carried out at 15 kV and room temperature. 6-aminocaproic acid is used as an internal standard. The detection is performed UV-spectroscopically at 254 nm. The method could be generally applied to the Ile, Phe, Pro, Ser and Trp amino acids. However, in the case of Pro the main peak covers the peaks of Val and Tyr peaks, and in the case of Ser the peaks of Thr, Asn, Gln and Ala cannot be evaluated. The method is not applicable to Arg, His and Lys due to the solubility problems of the FMOC-derivatives formed and to the multiple derivatization.

Studying the different batches using this method the following findings were made: Val, Leu and Phe were present in the Ile-sample with a content of approx. 0,2 % w/w; Leu, Ile, Cystin, two unknown impurities with less than 0,1 % w/w, as well as a third impurity with a content of approx. 0,2 % w/w were present in Phe samples; two unknown impurities were detected in the Ser samples with approx. 0,2 % w/w; Ser with a content of 0,024 % w/w and one unknown impurity with a content lower than 0,1 % w/w were detected in the Pro-sample; 0,05 % w/w of Phe and Leu, as well as two unknown impurities with less than 0,1 % w/w were detected in the Trp samples (see Table 8).

The development of a second MEKC-method employing laser-induced-fluorescence-detection (LIF-detection) (488/520 nm) after derivatisation with 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA), extended the range of detectable impurities containing primary amino groups. Capillaries and separation electrolyte of the type employed in the FMOC-method are used. The samples are loaded on the anode site of the capillary by pressured injection for 5 seconds at 3448 Pa. The separation is carried out at 20 kV and room temperature. The method could detect and quantify amino sugars, peptides and other amino acids down to concentration of 0,1 % w/w. It is applicable to Arg, His, Ile, Phe and Ser. Non-reproducible multiple derivatization was observed with Trp and Lys samples. Pro cannot be derivatized with CBQCA, as it contains no primary amino groups. The method was developed as a general method for Arg, His, Ile, Phe and Ser. The optimization of the separation conditions did not aim to achieve the best possible separation of the amino acids, but rather to establish the number and order of the other impurities actually detected. Therefore, in the case of Ile the method could not detect the established impurities Val, Leu and Phe which are detected in the same sample as FMOC-derivatives (see Table 8).

Batches of Arg, His, Phe, Ser and Ile were studied by means of the CBQCA-method: one impurity with an estimated content of more than 0,1 % was detected in the Arg samples; approx. 15 impurities with a content of about 0,1% were detected in the His samples; three impurities of 0,1 % were detected in Phe samples; two unknown impurities with a content of less than 0,1 % were detected in the Ser samples and no impurities were detected in the Ile sample (see table 8).

The method is thus complementary to the TLC-method for „ninhydrin-positive substances“ contained in the monographs of the 5 amino acids mentioned above. By means of the CBQCA-method impurities of another type at a concentration level of 0,1 % could be controlled. In principle, the separation conditions for each amino acid has to be optimized

individually, so that the selectivity with respect to “other amino” acids is sufficient. If this optimization leads to a loss of selectivity to impurities of different nature, it is recommended to have two methods for purity testing.

Using the TLC-method for „ninhydrin-positive substances“ described in the European Pharmacopoeia no impurities were detected in the samples tested (see Table 8).

An UV-spectroscopic method was developed for the detection of nucleic acids in amino acids. Nucleic acids are characterized by an absorption maximum at 260 nm, which can be used for their quantification. The UV-spectroscopy method can be employed to control nucleic acids in amino acids such as Arg, Ile, Ser, His and Pro, having no absorption maximum at 260 nm, down to concentrations of 0,01 % w/w. The studies demonstrated that none of the samples tested contained nucleic acids (see Table 8). In one Ser-sample the UV-spectrum showed an absorption in the range of 260 nm. The absorption curve indicates the probable presence of Trp in concentration of approx. 0,006 % w/w. A similar increased absorption in the range of 260 nm was also detected in the Ile-samples. Based on the spectrum shape, a concentration of 0,2 % w/w Phe in the Ile-sample of producer E, respectively Tyr in concentration of less than 0,01 % w/w in the Ile-samples of supplier K were established.

Capillary gel electrophoretic studies also established the absence of nucleic acids. A 50 cm long capillary coated with 50%-phenyl-methylpolysiloxane (2 µm film-thickness) with an effective length of 40 cm and an internal diameter of 100 µm was used. To the separation electrolyte, a tris(hydroxymethyl)aminomethane-borate buffer (89 mM, pH 8,33, ethylenediaminetetraacetic acid 2 mM) hydroxypropylmethylcellulose was added in concentration of 0,5 % w/w as a gelforming component. Studying ribonucleic acids, urea in a concentration of 4 M was added as a melting agent. The samples were electrokinetically loaded at 10 kV for 10 seconds on the cathode site of the capillary. The separation was carried at reversed polarity mode. UV-detection at 254 nm was used. No unknown peaks were detected in all other amino acids except for the Phe and Trp samples (see Table 8). A degradation product was detected in Trp, which was formed during the sample storage. In the case of two impurities detected in Phe samples are nucleic acids, their content is much less than 0,01 % w/w. It is more likely that these are impurities of a different type, especially in the case of impurity *b* (see 6-30), as a corresponding nucleic acid should be much larger than 10.000 bases. In the purification process such large molecules are eliminated through filtration.

1. The FMOC-method is characterized by high sensitivity compared to the TLC-method for „ninhydrin-positive substances“ described in European Pharmacopoeia. It can be used as a reference method with respect to other amino acids by the adaptation of the CBQCA-method to Ile, Phe and Trp.
2. The MECK-method with CBQCA-derivatization can be used as a second purity testing method in the monographs of Arg, His, Ile, Phe and Ser to evaluate primary amines such as amino acids, amino sugars and peptides.
3. No nucleic acids could be detected. Therefore a test for nucleic acids in the monographs of Arg, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Ser and Trp is considered to be irrelevant.
4. The results from the tests are summarized in Table 8.

## 8.2. Glutathione

A CE-method with UV-detection at 200 nm was developed and validated to test the purity of glutathione of biotechnological origin at 0,1%-level. The separation is carried out in a fused-silica capillary with a total length of 60 cm and effective length of 50 cm. A phosphate buffer, 50 mM, pH 1,8 was used as a separation electrolyte. The samples were loaded on the anode site of the capillary by pressured injection for 5 seconds at 3448 Pa. The separation is carried out at 20 kV and room temperature. The method demonstrates excellent separation efficiency and sensitivity with respect to impurities originating from production or purification processes. Using this method as the main impurities of glutathione its oxidized form and Glu-Cys were found. The oxidized glutathione, Cys-Gly and one unknown impurity, „peak 20“, are products of conversion and degradation. As a result, the method could be also applied to stability tests. The total number of impurities detected in all three batches tested was about 30. Of all unknown impurities, only „peak 20“ exceeded the 0,1 % limit. Its content in the batches tested was calculated to approx. 0,2 % w/w. It is recommended to identify this impurity. The method is suitable for controlling of related substances in glutathione.

**Table 8:** Impurity profile of the amino acids tested.

Amino acid	Manufacturer/ Batch	Test for				
		presence of amino acids and other amine-containing substances			presence of nucleic acids	
		Number, identity and content of the impurities, established by means of				
		MEKC: Fmoc-derivatives UV-detection: 254 nm	MEKC: CBQCA-derivatives LIF-detection: 488/520 nm	TLC: ninhydrin-positive substances	UV-spectroscopy: 260 nm	CGE: UV-detection, 254 nm
Arg	C/Batch 1	not applicable	1, unknown, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	C/Batch 2		1, unknown, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	F		1, unknown, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	D		1, unknown, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	A		1, unknown, >> 0,1 %	-	-	-
Arg	G		1, unknown, >> 0,1 %	-	-	-
His	A		not applicable	> 10, unknown, each about 0,1 %	-	-
His	B	> 10, unknown, each about 0,1 %		-	-	-
His	D/Batch 1	> 10, unknown, each about 0,1 %		-	-	-

**Table 8:** Impurity profile of the amino acids tested (continuation).

Amino acid	Manufacturer/ Batch	Test for				
		presence of amino acids and other amine-containing substances			presence of nucleic acids	
		Number, identity and content of the impurities, established by means of				
		MEKC: Fmoc-derivatives UV-detection: 254 nm	MEKC: CBQCA-derivatives LIF-detection: 488/520 nm	TLC: ninhydrin-positive substances	UV-spectroscopy: 260 nm	CGE: UV-detection, 254 nm
His	D/Batch 2	not applicable	> 10, unknown, each about 0,1 %	-	-	-
His	C		> 10, unknown, each about 0,1 %	-	-	-
His	G		> 10, unknown, each about 0,1 %	-	-	-
Ile	E	3, Val, Leu, Phe, each about 0,2 % w/w	-	-	Phe, about 0,2 % w/w	-
Lys	K	not applicable	not applicable	-	not applicable	-
Phe	D/Batch 1	2, Leu ca. 0,05 % w/w and one unknown about 0,2 %	2, unknown, about 0,1 %	-	not applicable	2, unknown, each << 0,1 %
Phe	D/Batch 2	1, unknown, about 0,1 %	1, unknown, about 0,1 %	-		1, unknown, << 0,1 %

**Table 8:** Impurity profile of the amino acids tested (continuation).

Amino acid	Manufacturer/ Batch	Test for				
		presence of amino acids and content amine-containing substances			presence of nucleic acids	
		Number, identity and content of the impurities, established by means of				
		MEKC: FMOC-derivatives UV-detection: 254 nm	MEKC: CBQCA-derivatives LIF-detection: 488/520 nm	TLC: ninhydrin-positive substances	UV-spectroscopy: 260 nm	CGE: UV-detection, 254 nm
Phe	E	7, Leu, Ile, Cystin, Arg and two unknown each < 0,1 %; one third unknown about 0,2 %	3, unknown, each about 0,1 %	-	not applicable	1, unknown, << 0,1 %
Pro	G	2, Ser 0,024 % w/w and one unknown about 0,1 %	not applicable	-	-	-
Ser	H	2, unknown, each about 0,2 %	2, unknown, each about 0,1 %	-	-	-
Ser	B	2, unknown, each about 0,1 %	2, unknown, each < 0,1 %	-	-	-
Ser	I	2, unknown, each about 0,2 %	2, unknown, each < 0,1 %	-	Trp, 0,006 % w/w	-

**Table 8:** Impurity profile of the amino acids tested (continuation).

Amino acid	Manufacturer/ Batch	Test for				
		presence of amino acids and other amine-containing substances			presence of nucleic acids	
		Number, identity and content of the impurities, established by means of				
		MEKC: FMOC-derivatives UV-detection: 254 nm	MEKC: CBQCA-derivatives LIF-detection: 488/520 nm	TLC: ninhydrin-positive substances	UV-spectroscopy: 260 nm	CGE: UV-detection, 254 nm
Trp	B/Batch 1	1, unknown, < 0,1 %	not applicable	-	not applicable	-
Trp	B/Batch 2	4, Phe und Leu each about 0,05 % w/w and two unknown, each < 0,1 %	not applicable	-	not applicable	-
Trp	D	2, Phe < 0,05 % w/w and one unknown about 0,05 %	not applicable	-	not applicable	-
Trp	J	2, Phe ca. 0,05 % w/w and one unknown about 0,1 %	not applicable	-	not applicable	-
Trp	G	2, Phe < 0,05 % w/w and one unknown < 0,1 %	not applicable	-	not applicable	-

## 9. Experimenteller Teil

### 9.1. Allgemeine Angaben

Aminosäuren- und Glutathion-Proben wurden vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte zur Verfügung gestellt.

Zur Entwicklung der Methoden wurden Aminosäuren von Fluka (Buchs, Schweiz) benutzt.

Alle wässrigen Lösungen wurden mit hochgereinigtem Wasser, erzeugt durch Milli-Q Water System (Millipore, Bedford, MA, USA), hergestellt und durch einen Membranfilter 0,22 µm (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.

Alle Chemikalien hatten p.a. Qualität.

### 9.2. Micellare elektrokinetische Chromatographie von Aminosäuren als 9-Fluorenylmethylchloroformat-Derivate

#### *Spezielle Chemikalien:*

FMOC: Sigma (St. Louis, MO, USA)

SDS: Fluka (Buchs, Schweiz)

#### *Lösungen:*

Proben: Alle Aminosäureproben werden in einem Boratpuffer (Borsäure 0,4 M – Natriumhydroxid, pH 9,3) gelöst. Die Konzentrationen sind im allgemeinen Teil angegeben.

Trennpuffer: Boratpuffer 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM.

FMOC-Lösung: eine 300 mM (ca. 80 mg/ml) Lösung von FMOC in Acetonitril.

#### *Derivatisierung:*

Zu 1,2 ml Probelösung werden 0,8 ml der FMOC-Lösung zugegeben. Die Mischung wird für ca. 15 Sekunden vorsichtig homogen vermischt und für 2 Minuten bei RT unter Lichtausschluss stehengelassen. Der Reagenzüberschuss und sein Hydrolyseprodukt werden dreimal jeweils mit 2 ml n-Pentan extrahiert. Anschließend wird die Probe 10fach mit einer 20 mM Borsäurelösung 20 verdünnt.

*Kapillarelektrophorese:*

Gerät:	Beckman Coulter P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA), ausgestattet mit einem UV-Detektor.
Kapillaren:	Kieselgelkapillaren einer Gesamtlänge von <b>70</b> oder 60 cm (Beckman Coulter oder Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA); die Länge bis zum Detektor betrug <b>60</b> bzw. 50 cm und der innere Durchmesser 75 µm.
Injektion:	Die Proben wurden durch Druckinjektion von <b>10</b> Sekunden bei <b>6895</b> Pa in die Kapillare geladen. Injektion auf der Anodenseite.
Spannung:	20 kV im Fall von 60 cm und <b>15</b> kV im Fall von <b>70</b> cm langen Kapillaren.
Temperatur:	25 °C
Detektion:	UV bei 254 nm
Konditionierung:	Die Kapillare wird zur Konditionierung 10 Minuten mit 0,1 M HCl, 20 Minuten mit 0,1 M NaOH und 10 Minuten mit destilliertem Wasser bei einem Druck von 137920 Pa gespült. Zwischen den Läufen wird die Kapillare 5 Minuten mit 0,1 M NaOH, 5 Minuten mit destilliertem Wasser und 5 Minuten mit dem jeweiligen Trennelektrolyten bei einem Druck von 137920 Pa gespült.

### 9.3. Micellare elektrokinetische Chromatographie von Aminosäuren als 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd -Derivate

*Spezielle Chemikalien und Referenzmaterialien:*

CBQCA:	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
KCN:	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
SDS:	Fluka (Buchs, Schweiz)
D(+)-Glucosamin:	Fluka (Buchs, Schweiz)
D(+)-Galactosamin:	Fluka (Buchs, Schweiz)
Gly-Pro-Gly-Gly:	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Gly-Gln:	Sigma (St. Louis, MO, USA)

*Lösungen:*

Proben:	Alle Aminosäureproben werden in einem Phosphatpuffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 125 mM, pH 9,3) gelöst.
Trennpuffer:	Boratpuffer 20 mM, pH 9,3, SDS 25 mM.
CBQCA-Lösung:	eine 10 mM Lösung von CBQCA in DMSO.
KCN-Lösung:	eine 10 mM Lösung von KCN in Wasser.

*Derivatisierung:*

Zur 10  $\mu\text{l}$  Probelösung werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der CBQCA-Lösung und der KCN-Lösung zugegeben. Die Mischung wird für ca. 30 Sekunden mit einem Vortex homogenisiert und für 10 Stunden bei RT unter Lichtausschluss stengelassen. Anschließend wird das Probenvolumen auf 1,0 ml mit Wasser aufgefüllt.

*Kapillarelektrophorese:*

Gerät:	Beckman Coulter P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA), ausgestattet mit einem LIF-Detektor (520 nm) und dem entsprechenden Argon-Ion-Laser (488 nm).
Kapillare:	Kieselgelkapillare einer Gesamtlänge von 70 cm (Beckman Coulter oder Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA); die Länge bis zum Detektor betrug 60 und der innere Durchmesser war 75 $\mu\text{m}$ .
Injektion:	Die Proben werden durch Druckinjektion von 5 Sekunden bei 3448 Pa in die Kapillare geladen. Injektion auf der Anodenseite.
Spannung:	20 kV
Temperatur:	25 °C
Detektion:	LIF- 488/520 nm
Konditionierung:	wie unter 9.1.

## 9.4. UV-Spektroskopie

*Referenzmaterialien:*

Ribonucleinsäure aus *Torula utilis*: Fluka (Buchs, Schweiz)

*Probelösungen:*

Die Aminosäureproben werden in einem Tris-Puffer (10 mM - HCl, pH 8,0, EDTA 1 mM ) gelöst.

*Gerät:*

CARY 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer: Varian Inc. (Palo Alto, CA, USA)

## 9.5. Kapillargelelektrophoretische Untersuchungen

*Referenzmaterialien:*

ØX 174 DNA Marker Hae III Digest: Sigma (St. Louis, MO, USA)  
Lambda DNA Marker EcoR I Digest: Sigma (St. Louis, MO, USA)  
RNA Marker 0,2-10 kb: Sigma (St. Louis, MO, USA)  
HPMC (4000 cP at 25 °C): Fluka (Buchs, Schweiz)

*Probelösungen:*

Alle Proben werden in einem Tris–Borsäure-Puffer (89 mM, pH 8,33, EDTA 2 mM) gelöst. Die Nucleinsäurelösungen werden mit dem gleichem Puffer verdünnt. Zu den Proben, die auf RNS untersucht werden sollen, sowie zu der RNS-Referenzlösung werden 4 M Harnstoff zugegeben.

*Vorbereitung des Gels:*

0,50 g HPMC (4000 cP at 25 °C) wird unter Rühren in 100,0 ml Tris–Borsäure-Puffer (89 mM, pH 8,33, EDTA 2 mM) gelöst (dazu 4 M Harnstoff bei den Untersuchungen auf RNS). Anschließend wird das Gel filtriert, für ca. zwei Minuten in einem Ultraschallbad entgast und hydrodynamisch mit 344800 Pa in die Kapillare gedrückt.

*Kapillarelektrophorese:*

Gerät: Beckman Coulter P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA), ausgestattet mit einem UV-Detektor.

Kapillare: µSIL-DB-17 mit einem inneren Durchmesser von 100 µm und eine Filmdicke von 2 µm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Die Gesamtlänge betrug 50,2 cm und die Länge bis zum Detektor 40 cm.

Injektion:	Die Proben werden elektrokinetisch bei 10 kV für 10 Sekunden in die Kapillare geladen. Injektion auf der Kathodenseite.
Spannung:	10 kV (umgekehrte Polarität)
Temperatur:	25 °C
Detektion:	UV bei 254 nm
Konditionierung:	Eine neue Kapillare wird 30 Minuten mit destilliertem Wasser bei 137920 Pa gespült. Das Gel wird hydrodynamisch in die Kapillare bei 344800 Pa gedrückt. Zwischen den Läufen wird die Kapillare 10 Minuten mit destilliertem Wasser bei 137920 Pa gespült.

### 9.6. Glutathion

#### *Referenzmaterialien:*

GSSG:	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Cys-Gly:	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Glu-Cys:	Sigma (St. Louis, MO, USA)

#### *Lösungen:*

Trennelektrolyt:	Natriumdihydrogenphosphat 50 mM, pH 1,8 (eingestellt mit Phosphorsäure 85 %).
Probelösungen:	Die Proben werden im Trennelektrolyt gelöst.

#### *Kapillarelektrophorese:*

Gerät:	Beckman Coulter P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA), ausgestattet mit einem UV-Detektor.
Kapillaren:	Kieselgelkapillaren mit einer Gesamtlänge 60,2 cm (Beckman Coulter oder Polymicro Technologies, Phoenix, Arizona, USA); die Länge bis zum Detektor betrug 50 cm und der innere Durchmesser 75 µm.
Injektion:	Die Proben wurden durch Druckinjektion von 5 Sekunden bei 3448 Pa in die Kapillare geladen. Injektion auf der Anodenseite.
Spannung:	20 kV

---

Temperatur:	25 °C
Detektion:	UV bei 200 nm
Konditionierung:	Eine neue Kapillare wird 20 Minuten mit 0,1 M HCl und 10 Minuten mit destilliertem Wasser bei 137920 Pa gespült. Zwischen den Läufen wird die Kapillare 10 min bei 34500 Pa mit dem Trennelektrolyten gespült. Zur vollständigen Equilibrierung einer neuen Kapillare sind auch drei Blindläufe erforderlich.

**10. Abkürzungen und Symbole**

A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
2-AA	2-Aminoacridon
6-ACS	6-Aminocaprinsäure
AEOC	2-(9-Anthryl)ethylchloroformat
Ala	Alanin
5-ANSA	5-Aminonaphthalen-2-sulfonsäure
2-AP	2-Aminopyridin
APTS	9-Aminopyren-1,4,6-trisulfonsäure
6-AQ	6-Aminochinolin
AQC	6-Aminochinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
b	Base
bp	Basenpaar
CBQCA	3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd
CE	Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
CRS	Chemische Referenzsubstanz
Cys	Cystein
Cys-Gly	L-Cysteinyl-Glycin
(CysS) <sub>2</sub>	Cystin
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DC	Dünnschichtchromatographie
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DNS-Cl	5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)
E	elektrische Feldstärke [ $V \cdot cm^{-1}$ ]
EC	Elektrochromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EOF	elektroosmotischer Fluss
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

---

Fmoc	9-Fluorenylmethylchloroformat
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Glu-Cys	$\gamma$ -L-Glutamyl-Glycin
Gly	Glycin
Gly-Gln	Glycyl-L-Glutamin
Gly-Pro-Gly-Gly	Glycyl-L-Prolyl-Glycyl-Glycin
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
His	Histidin
HPIC	Ionenaustausch-Chromatographie (high performance ion chromatography)
HPICE	Ionenausschluss-Chromatographie (high performance ion chromatography exclusion)
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
ICH	International Conference of Harmonisation
i.d.	innerer Durchmesser
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEP	isoelektrischer Punkt
Ile	Isoleucin
IS	interner Standard
ITP	Isotachophorese
$L_{\text{eff}}$	effektive Kapillarlänge
Leu	Leucin
$L_{\text{ges}}$	Gesamtlänge der Kapillare
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
LOD	Nachweisgrenze (limit of detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
Lys	Lysin
M	Molarität [mol/l]
MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
Met	Methionin
Mr	relative molare Masse
$M_t$	Migrationszeit

NBD-F	4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
NDA	2,3-Naphthalendicarboxaldehyd
NS	Nucleinsäure
OD	optische Dichte
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
Phe	Phenylalanin
pK <sub>a</sub>	negativer dekadischer Logarithmus der Aciditätskonstante K <sub>a</sub>
Pro	Prolin
PTH	Phenylthiohydantoin
RNS	Ribonucleinsäure
RPIPC	Ionenpaar-Chromatographie (reversed-phase ion pair chromatography)
RSA	relative Standardabweichung [%]
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
TRSE	5-Carboxytetramethylrhodaminsuccimidylester
Tyr	Tyrosin
U	Spannung [V]
u	elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (Ionengeschwindigkeit)
Val	Valin
$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Berechnung des Konfidenzintervalls
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{ex}$	Erregungswellenlänge
$\mu_{EOF}$	elektroosmotische Mobilität
$\mu_{ep}$	elektrophoretische Mobilität der Ionen
$\mu_{ges}$	Gesamtmobilität der Ionen
$\mu_m$	elektrophoretische Mobilität der Micellen
$\mu_{net}$	Wanderungsmobilität der Micellen

**11. Literaturverzeichnis**

- 
- [1] B. Hoppe, J. Martens, *Chemie in unserer Zeit* 18, 73-84, 1984
- [2] W. Leuchtenberger, U. Plöcker, *Chem.-Ing.-Techn.* 60, 16-23, 1988
- [3] S. Ebel, H. J. Roth, *Lexikon der Pharmazie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1987
- [4] B. Hoppe, J. Martens, *Chemie in unserer Zeit* 17, 41-53, 1983
- [5] G. C. Barret, *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids*, Chapman and Hall, New York, 1985
- [6] E. Breitmaier, G. Jung, *Organische Chemie II*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1983
- [7] J. Sherma, B. Fried, *Chromatographic Science*, Vol. 55: Handbook of Thin-Layer-Chromatography, Kapitel 14: Amino Acids and Their Derivatives, R. Bhushan, Marcel Dekker INC, New York, 1991
- [8] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry Part I*, W. H. Freeman, S. 49, 1980
- [9] F. v. Bruchhausen, G. Dannhardt, S. Ebel, A. W. Frahm, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993
- [10] K. Hartke, H. Hartke, E. Mutschler, G. Rücker, M. Wichtl, *Kommentar zum DAB 10, Wissenschaftliche Erläuterungen zum Deutschen Arzneibuch*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt, 1991 + 1997
- [11] A. Kleeman, W. Leuchtenberger, B. Hoppe, H. Tanner, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. Edition, Vol. A2, Verlag Chemie GmbH Weinheim, 1985
- [12] K. Lübke, E. Schröder, G. Kloss, *Thieme Taschenbuch der organischen Chemie*, B Spezielle Gebiete: Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine I + II, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1975
- [13] J. P. Greenstein, M. Winitz, *Chemistry of the Amino acids*, Vol.1, John Wiley & Sons Ltd, 1961
- [14] S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith, P. E. Heckelman, J. F. Kinneary (Hrsg.), *The Merck Index Twelfth Edition*, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, 1996
- [15] F. Kober, *Der pH-Wert der Lösungen von Aminocarbonsäuren*, Praxis der Naturwissenschaften, Chemie, Heft 3, 45, Aulis Verlag Deubner & Co KG, Köln, 27-34, 1996
- [16] J. Jones, *Synthese von Aminosäuren und Peptiden*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1995

- 
- [17] A. Streitwieser, C. H. Heathcock, E. M. Kosower, Organische Chemie II, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1983
- [18] S. P. L. Sørensen, Über Synthesen von  $\alpha$ -Aminosäuren durch Phthalimidmalonester, Hoppe-Seyler's Zt. Physiol. Chem. 44, 448-460, 1905
- [19] A. Strecker, Über die künstliche Bildung der Milchsäure und einen neuen, dem Glycocoll homologen Körper, Annalen Chemie 75, 27-45, 1850
- [20] E. Erlenmeyer jun., Über die Condensation der Hippursäure mit Phthalsäureanhydrid und mit Benzaldehyd, Annalen Chemie 275, 1, 1893
- [21] S. Kinoshita and K. Nakayama, Amino acids In : Primary products of Metabolism (Rose, A. H., Ed.), Academic Press, London, 209-261
- [22] H. Sahm, Folia Microbiol. 40, 23-30, 1995
- [23] H. Sahm, L. Eggeling, B. Eikmanns, R. Krämer, FEMS Microbiol. Reviews 16, 243-252, 1995
- [24] L. Eggeling, H. Sahm, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 146-153, 1999
- [25] K. M. Nampoothiri, C. Hoischen, B. Bathe, B. Mockel, W. Pfefferle, K. Krumbach, H. Sahm, L. Eggeling, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 89-96, 2002
- [26] <http://www.fz-juelich.de/ibt/amino/amino.html>
- [27] M. S. M. Jetten, A. J. Sinskey, Critical Rev. Biotechnol. 15, 73-103, 1995
- [28] M. T. Follettie, O. P. Peoples, C. Agoropoulou, A. J. Sinskey, J. Bacteriol. 175, 4096-5103, 1993
- [29] I. Shiiro, A. Yokota, Y. Toride, S. Sugimoto, Agric. Biol. Chem. 53, 41, 1989
- [30] R. Miyajama, I. Shiiro, J. Biochem. 71, 951-960, 1972
- [31] B. Möckel, L. Eggeling, H. Sahm, J. Bacteriol. 174, 8065-8072, 1992
- [32] I. Eggeling, C. Cordes, L. Eggeling, H. Sahm, Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 346-354, 1987
- [33] I. Shiiro, Biotechnology of Amino Acids Production, K. Aida, L. Chibita, K. Nakayama, K. Tokinami, H. Yamada, Eds., Elsevier, Amsterdam, S. 188, 1986
- [34] Europäisches Arzneibuch, 4. Ausgabe 2002
- [35] Deutsches Arzneibuch, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1999 + 2001
- [36] L. Slutsker, F. C. Hoesly, L. Miller, L. P. Williams, J. C. Watson, D. W. Fleming, J. Am. Med. Assoc. 264, 213-217, 1990
- [37] E. A. Belongia, C. W. Hedberg, G. J. Gleich, K. E. White, A. N. Mayeno, D. A. Loegering, S. L. Dunnette, P. L. Pirie, K. L. MacDonald, M. T. Osterholm, New Engl. J. Med. 323, 357-365, 1990

- 
- [38] J. Varga, J. Uitto, S. A. Jimenez, *Ann. Intern. Med.* 116, 140-147, 1992
- [39] A. N. Mayeno, F. Lin, C. S. Foote, D. A. Loegering, M. M. Ames, C. W. Hedberg, G. J. Gleich, *Science* 250, 1707-1708, 1990
- [40] T. Toyooka, T. Yamazaki, T. Tanimoto, K. Sato, M. Sato, M. Toyoda, M. Ishibashi, K. Yoshihira, M. Uchiyama, *Chem. Pharm. Bull.* 39, 820-822, 1991
- [41] Y. Goda, J. Suzuki, T. Maitani, K. Yoshihira, M. Takeda, M. Uchiyama, *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2236-2238, 1992
- [42] A. N. Mayeno, E. A. Belongia, F. Lin, S. K. Lundy, G. J. Gleich, *Mayo Clin. Proc.* 67, 1134-1139, 1992
- [43] O. P. Hornstein, M. E. Olszewsky, D. Flugel, W. P. Kaschka, *Nervenheilkunde* 8, 239-242, 1989
- [44] S. Farinelli, A. Mariano, A. Grimaldi, M. Mariani, A. Iannessi, F. De Rosa, *Recenti Prog. Med.* 82, 381-384, 1991
- [45] C. Garcia, *Nervenarzt* 63, 303-307, 1993
- [46] A. Lampert, P. Joly, E. Thomine, J. C. Ortoli, P. Lauret, *Ann. Dermatol. Venereol.* 119, 209-211, 1992
- [47] D. Hatch, J. Garona, L. Goldman, K. Waller, *Pediatrics* 88, 810-813, 1991
- [48] D. Michelson, S. W. Page, R. Casey, M. Trucksess, L. A. Love, S. Milstien, C. Wilson, S. G. Massaquoi, L. J. Crofford, M. Hallett, P. W. Gold, E. M. Sternberg, *J. Rheumatol.* 21, 2261-2265, 1994
- [49] B. L. Williamson, K. Klarskov, A. J. Tomlinson, G. J. Gleich, S. Naylor, *Nat. Med.* 4, 983, 1998
- [50] K. Johnson, K. Klarskov, L. Benson, B. L. Williamson, G. J. Gleich, S. Naylor, *J. Rheumatol.* 26, 2714-2717, 1999
- [51] H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer, *Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden*, Bd. 1 a + b, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1989 + 1993
- [52] Reaktionsmechanismus der Ninhydrinprobe, *Praxis der Naturwissenschaften* 45, 18-20, 1996
- [53] J. Böcker, *Chromatographie, Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese*, Vogel Buchverlag, 1997
- [54] D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore, *Anal. Chem.* 30, 1190-1206, 1958
- [55] J. C. Giddings, R. A. Keller, *Ion Exchange Chromatography of Amino Acids: Recent Advances in Analytical Determinations*, *Adv. Chromatogr.* 2, 3-62, 1966

- [56] J. C. Giddings, E. Grushka, J. Cazen, P. Brown, High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids: Ion-Exchange and Reversed-Phase Strategies, *Adv. Chromatogr.* 22, 37-69, 1983
- [57] D. Fekkes, A. v. Dalen, M. Edelman, A. Voskuilen, *J. Chromatogr. B* 669, 177-186, 1995
- [58] K. Venema, W. Leewer, J. O. Bakker, G. Haayer, J. Korf, *J. Chromatogr.* 260, 371-376, 1983
- [59] G. Georgi, C. Pietsch, G. Sawatzki, *J. Chromatogr.* 613, 35-42, 1993
- [60] M. O. Fleury, D. V. Ashley, *Anal. Biochem.* 133, 330-335, 1983
- [61] G. J. Hughes, K. J. Wilson, *J. Chromatogr.* 242, 337-341, 1982
- [62] L. R. Snyder, J. L. Glajch, J. J. Kirkland, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons Ltd, 1988
- [63] G. Galaverna, R. Corradini, F. Dallavelle, G. Folesani, A. Dossena, R. Marchelli, *J. Chromatogr. A* 922, 151-163, 2001
- [64] M. Remelli, D. Trombin, C. Conato, *Chromatographia* 55(5/6), 301-306, 2002
- [65] A. Fiorino, G. Frigo, E. Cucchetti, *J. Chromatogr.* 476, 83-92, 1989
- [66] S. Palmero, D. de Marchis, M. Prati, E. Fugassa, *J. Liquid Chromatogr.* 9(8), 1689-1710, 1986
- [67] M. Griffin, J. Leah, N. Mould, G. Compton, *J. Chromatogr.* 431, 285-295, 1988
- [68] J. Weiß, *Ionenchromatographie*, 2 Aufl., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 233-245, 1991
- [69] P. Kucera, H. Umagat, *J. Chromatogr.* 255, 563-579, 1983
- [70] N. Shindo, S. Nojimo, T. Fujimura, H. Taka, R. Mineki, K. Mirayama, *Anal. Biochem.* 249, 79-82, 1997
- [71] K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 961, 9-21, 2002
- [72] J. Qu, Y. Wang, G. Luo, Z. Wu, C. Yang, *Anal. Chem.* 74, 2034-2040, 2002
- [73] D. W. Armstrong, *J. Liquid Chromatogr.* 7(S-2), 353-376, 1984
- [74] H. Brückner, S. Haasmann, M. Langer, T. Westhauser, R. Wittner, *J. Chromatogr. A* 666, 259-273, 1994
- [75] H. Brückner, M. Langer, M. Lüpke, T. Westhauser, H. Godel, *J. Chromatogr. A* 697, 229-245, 1995
- [76] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A* 870, 245-254, 2000
- [77] J. A. Peterson, L. J. Lorenz, D. S. Risley, B. J. Sandmann, *J. Liquid Chromatogr. & Rel. Tech.* 22, 1009-1025, 1999

- 
- [78] S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.* 9, 122, 1967
- [79] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.* 169, 11-20, 1979
- [80] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.* 218, 209-216, 1981
- [81] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53, 1298-1302, 1981
- [82] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56, 111-113, 1984
- [83] E. C. Rickard, R. J. Bopp, *J. Chromatogr. A* 680, 609-621, 1994
- [84] M. W. F. Nielen *J. Chromatogr.* 637, 81-90, 1993
- [85] K. D. Altria, P. Harkin, M. G. Hindson, *J. Chromatogr. B* 686, 103-110, 1996
- [86] L. Liu, L. M. Osborne, M. A. Nussbaum, *J. Chromatogr. A* 745, 45-52, 1996
- [87] K. H. Assi, A. M. Abushoffa, K. D. Altria, B. J. Clark, *J. Chromatogr. A* 817, 83-90, 1998
- [88] M. Fillet, L. Fotsing, J. Crommen, *J. Chromatogr. A* 817, 113-119, 1998
- [89] M. Thunhorst, B. W. K. Diehl, U. Holzgrabe, *Pharmazie* 54, 746-750, 1999
- [90] M. A. Nussbaum, *Electrophoresis* 20, 2664-2669, 1999
- [91] T. Christians, D. Diewald, C. Wessler, Y. Otte, J. Lehmann, U. Holzgrabe, *J. Chromatogr. A* 853, 455-240, 1999
- [92] T. Christians, U. Holzgrabe, *Electrophoresis* 21, 3609-3617, 2000
- [93] J. H. McB. Miller, U. Rose, *Pharmeuropa* 13, 3-7, 2001
- [94] U. Schmitt, S. K. Branch, U. Holzgrabe, *J. Sep. Sci.*, *im Druck*
- [95] K. D. Altria, *Pharmeuropa* 10, 524-526, 1998
- [96] H. Brokopp, *Pharmaeuropa* 11, 443, 1999
- [97] A. E. Bretnall, M. M. Hodgkinson, G. S. Clarke, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15, 1071-1075, 1997
- [98] K. P. Stubberud, O. Astrom, *J. Chromatogr. A* 826, 95-102, 1998
- [99] G. S. Wynia, G. Windhorst, P. C. Post, F. A. Maris, *J. Chromatogr. A* 773, 339-350, 1997
- [100] K. D. Altria, J. Elgey, J. S. Howells, *J. Chromatogr. B* 686, 111-117, 1996
- [101] M. Wedig, N. Novatchev, T. Worch, S. Laug, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 983-990, 2002
- [102] K. D. Altria, *Progr. Pharm. Biomed. Anal.* 4 (Identification and Determination of Impurities in Drugs), 323-345, 2000
- [103] M. Jaworska, G. Szulinska, M. Wilk, J. Tautt, *J. Chromatogr. A* 853, 479-485, 1999

- 
- [104] H. Wätzig, C. Dette, A. Aigner, L. Wilschowitz, *Pharmazie* 49, 249-252, 1994
- [105] K. H. Assi, A. M. Abushoffa, K. D. Altria, B. J. Clark, *J. Chromatogr. A* 817, 83-90, 1998
- [106] G. Hempel, *Electrophoresis* 21, 691-698, 2000
- [107] D. S. Burgi, R.-L. Chien, in: J.P. Landers (Ed.), *Handbook of Electrophoresis*, 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1997
- [108] Z. K. Shihabi, in: S. Palfrey (Ed.), *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis*, Humana Press, Totowa, NJ, 1999
- [109] Z. K. Shihabi, in: J.P. Landers (Ed.), *Handbook of Electrophoresis*, 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1997
- [110] R. Rodriguez-Diaz, in: J.P. Landers (Ed.), *Handbook of Electrophoresis*, 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1997
- [111] S. Chen, M. Lee, *Anal. Chem.* 72, 816-820, 2000
- [112] L. Krivankova, P. Pantukova, P. Bocek, *J. Chromatogr. A* 838, 55-70, 1999
- [113] J. P. Chervet, United States Patent 5,057,216, Oktober 15, 1991
- [114] A. Engström, P. E. Andersson, B. Josefsson, W. D. Pfeffer, *Anal. Chem.* 67, 3018-3022, 1995
- [115] S. A. Cohen, D. P. Michaud, *Anal. Biochem.* 211, 279-287, 1993
- [116] R. Vespalec, H. Corstjens, H. A. H. Billiet, J. Frank, K. Ch. A. M. Luyben, *Anal. Chem.* 67, 3223-3228, 1995
- [117] K. M. De Antonis, P. R. Brown, Y.-F. Cheng, S. A. Cohen, *J. Chromatogr. A* 661, 279-285, 1994
- [118] J. Liu, Y.-Z. Hsieh, D. Wiesler, M. Novotny, *Anal. Chem.* 63, 408-412, 1991
- [119] J. Liu, V. Dolnik, Y.-Z. Hsieh, M. Novotny, *Anal. Chem.* 64, 1328-1336, 1992
- [120] O. Boulat, D. G. McLaren, E. A. Arriaga, D. D. Y. Chen, *J. Chromatogr. B* 754, 217-228, 2001
- [121] E. A. Arriaga, Y. Zhang, N. J. Dovichi, *Anal. Chim. Acta* 299, 319-326, 1995
- [122] M. Ummadi, B. C. Weimer, *J. Chromatogr. A* 964, 243-253, 2002
- [123] N. Novatchev, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28, 475-486, 2002
- [124] N. Novatchev, U. Holzgrabe, *Pharmeuropa* 14, 640-647, 2002
- [125] H. Ruyters, S. van der Wal, *J. Liq. Chromatogr.* 17, 1883-1897, 1994
- [126] S. Hu, P. C. H. Li, *J. Chromatogr. A* 876, 183-191, 2000
- [127] I. Beijersten, D. Westerlund, *J. Chromatogr. A* 716, 389-399, 1995

- 
- [128] B. Nickerson, J. W. Jorgenson, *J. High Resol. Chromatogr., Chromatogr. Com.* 11, 878-881, 1988
- [129] T. Ueda, F. Kitamura, R. Mitchell, T. Metcalf, T. Kuwana, A. Nakamoto, *Anal. Chem.* 63, 2979-2981, 1991
- [130] T. Ueda, R. Mitchell, F. Kitamura, T. Metcalf, T. Kuwana, A. Nakamoto, *J. Chromatogr.* 593, 265-274, 1992
- [131] G. N. Okafo, P. Camilleri, *J. Microcol. Sep.* 5, 149, 1993
- [132] P. de Montigny, J. F. Stobaugh, R. S. Givens, R. G. Carlson, K. Srimavasachar, L. A. Sternson, T. Higushi, *Anal. Chem.* 59, 1096-1101, 1987
- [133] B. Matuszewski, R. Givens, K. Srimavasachar, R. J. Carlson, T. Higushi, *Anal. Chem.* 59, 1102-1195, 1987
- [134] N. J. Reinhoud, U. R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr. A* 673, 255-266, 1994
- [135] J. Liu, T. T. Dabrah, J. A. Matson, S. E. Klohr, K. J. Volk, E. H. Kerns, M. S. Lee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 207-214, 1997
- [136] B. O. Eggum, H. Sørensen, in: M. Friedman (Ed.), *Absorption and Utilization of Amino Acids, Vol. III*, CRC Press, Boca Raton, FL, 265-291, 1989
- [137] M. W. Skidmore, in: K. Blau, J. M. Halket (Eds), *Handbook of Derivatives for Chromatography*, Wiley, New York, Chapter 10, 215-252, 1993
- [138] N. Matsubara, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 680, 311-315, 1994
- [139] S. Michaelsen, P. Møller, H. Sørensen, *J. Chromatogr. A* 680, 299-310, 1994
- [140] E. Skocir, J. Vindevogel, P. Sandra, *Chromatographia* 39, 7-10, 1994
- [141] C. P. Ong, C. L. Ng, H. K. Lee, S. F. Y. Li, *J. Chromatogr.* 559, 537-545, 1991
- [142] M. Albin, R. Weinberger, E. Sapp, S. Moring, *Anal. Chem.* 63, 417-422, 1991
- [143] K. C. Chan, G. M. Muschik, H. J. Issaq, *Electrophoresis* 21, 2062-2066, 2000
- [144] L.-J. Liu, I. Rodriguez, S. F. Y. Li, *Electrophoresis* 20, 1538-1545, 1999
- [145] Y.-F. Cheng, N. J. Dovichi, *Science* 242, 562, 1988
- [146] S. Wu, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr.* 480, 141-155, 1989
- [147] I. Rodriguez, H. K. Lee, S. F. Y. Li, *Electrophoresis* 20, 1862-1868, 1999
- [148] K. Takizawa, H. Nakamura, *Anal. Sciences* 14, 925-928, 1998
- [149] S. P. D. Lalljie, P. Sandra, *Chromatographia* 40, 513-518, 1995
- [150] J. Mattusch, K. Dittrich, *J. Chromatogr. A* 680, 279-285, 1994
- [151] S. P. D. Lalljie, P. Sandra, *Chromatographia* Vol. 40, 9/10, 519-526, 1995
- [152] S. Einarsson, B. Josefsson, S. Lagerkvist, *J. Chromatogr.* 282, 609-618, 1983
- [153] K. C. Chan, G. M. Janini, G. M. Muschik, H. J. Issaq, *J. Chromatogr.* 653, 93-97, 1993

- 
- [154] H. Wan, P. E. Andersson, A. Engström, L. G. Blomberg, *J. Chromatogr. A* 704, 179-193, 1993
- [155] J.-W. Kang, Y.-T. Yang, J.-M. You, Q.-Y. Ou, *J. Chromatogr. A* 825, 81-87, 1998
- [156] H. Wan, L. Blomberg, *J. Chromatogr. Sci.* 34, 540-546, 1996
- [157] N. Novatchev, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 779-789, 2001
- [158] K. C. Chan, G. M. Janini, G. M. Muschik, H. J. Issaq, *J. Chromatogr. A* 622, 269-273, 1993
- [159] R. M. Seifar, J. C. Kraak, H. Poppe, W. T. Kok, *J. Chromatogr. A* 832, 133-140, 1999
- [160] K. Otsuka, K. Karuhaka, M. Higashimori, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 680, 317-320, 1994
- [161] P. Camilleri, G. B. Harland, G. Okafo, *Anal. Biochem.* 230, 115-122, 1995
- [162] M. Stefansson, M. V. Novotny, *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11573-11580, 1993
- [163] C. Chiesa, C. Horváth, *J. Chromatogr.* 645, 337-352, 1993
- [164] M. Stefansson, M. Novotny, *Anal. Chem.* 66, 1134-1140, 1994
- [165] F. Chen, R. A. Evangelista, *Anal. Biochem.* 230, 273-280, 1995
- [166] R. A. Evangelista, M.-S. Liu, F.-T. A. Chen, *Anal. Chem.* 67, 2239-2245, 1995
- [167] A. Guttman, F. Chen, R. A. Evangelista, N. Cooke, *Anal. Biochem.* 233, 234-242, 1996
- [168] J. Liu, O. Shirota, D. Wiesler, M. V. Novotny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2302-2306, 1991
- [169] J. Liu, O. Shirota, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* 64, 973-975, 1992
- [170] Y. Zhang, E. Arriaga, P. Diedrich, O. Hindsgaul, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr. A* 716, 221-229, 1995
- [171] J. Liu, O. Shirota, M. Novotny, *Anal. Chem.* 63, 413-417, 1991
- [172] J. Liu, O. Shirota, M. Novotny, *J. Chromatogr.* 559, 223-235, 1991
- [173] M. Stefansson, M. Novotny, *Carbohydrate Res.* 258, 1-9, 1994
- [174] J. Y. Zhao, P. Diedrich, Y. Zhang, O. Hindsgaul, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr. B* 657, 307-313, 1994
- [175] X. Le, C. Scaman, Y. Zhang, J. Zhang, N. J. Dovichi, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Chromatogr. A* 716, 215-220, 1995
- [176] T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1989
- [177] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*, Friedr. Vieweg&Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1994

- 
- [178] Y. Kim, M. D. Morris, *Anal. Chem.* 66, 1168-1174, 1994
- [179] H. E. Schwartz, K. Ulfelder, F. J. Sunzeri, M. P. Busch, R. G. Brownlee, *J. Chromatogr.* 559, 267-283, 1991
- [180] Y. Baba, N. Ishimaru, K. Samata, M. Tsuchiko, *J. Chromatogr. A* 653, 329-335, 1993
- [181] H. E. Schwartz, K. Ulfelder, *Anal. Chem.* 64, 1737-1740, 1992
- [182] Y. Kim, M. D. Morris, *Anal. Chem.* 66, 3081-3085, 1994
- [183] P. D. Grossman, D. S. Soane, *J. Chromatogr.* 559, 257-266, 1991
- [184] M. Zhu, D. L. Hansen, S. Burd, Frank Gannon, *J. Chromatogr.* 480, 311-319, 1989
- [185] T. Izumi, K. Yoneda, T. Isobe, T. Okuyama, T. Shinoda, *J. Chromatogr. A* 652, 41-46, 1993
- [186] T. I. Todorov, O. de Carmejane, N. G. Walter, M. D. Morris, *Electrophoresis* 22, 2442-2447, 2001
- [187] A. Meister, M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711-760, 1983
- [188] A. Meister, *Science* 220, 471, 1984
- [189] E. F. Reynolds, Ed., *Martindale, The Extra Pharmacopeia*, Pharmaceutical Press, London, 31th ed., 1996
- [190] L. Manna, L. Valvo, P. Betto, *J. Chromatogr. A* 846, 59-64, 1999
- [191] R. Gotti, V. Andrisano, V. Cavrini, A. Bongini, *Chromatographia* 39, 23-28, 1994
- [192] R. Paroni, E. DeVecchi, G. Gighetti, C. Arcelloni, I. Fermo, A. Grossi, P. Bonini, *Clin. Chem.* 41, 448, 1995
- [193] G. Morineau, M. Azoulay, F. Frappier, *J. Chromatogr.* 467, 209, 1989
- [194] Z. K. Shihabi, M. E. Hinsdale, C. P. Cheng, *Electrophoresis* 22, 2351-2354, 2001
- [195] C. Carru, A. Zinellu, G. M. Pes, G. Marongiu, B. Tadolini, L. Deiana, *Electrophoresis* 23, 1716-1721, 2002





## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Familienname: Novatchev  
Vorname: Nikolai  
Geburtsdatum: 15.04.1967  
Geburtsort: Nova Zagora, Bulgarien  
Staatsangehörigkeit: Bulgarien  
Familienstand: verheiratet, ein Kind

### Bildungsweg

1974-1981 Grund- und Hauptschule  
1981-1985 Mathematisches Gymnasium  
Stara Zagora, Bulgarien  
(1985-1987 Armee)  
1987-1992 Hochschulstudium in  
Sofioter Universität „St. Kliment Ochridski“,  
Biotechnologiezentrum der Fakultät für Biologie,  
Sofia, Bulgarien  
1992 Diplomarbeit, Studiumabschluss als Dipl.-Biotechnologe,  
Fach „Enzymatische Biotechnologie“

### Berufstätigkeit

1993 Analytiker in Labor für Qualitätssicherung  
der Firma Zentromet AG, Vraza, Bulgarien  
1994-1999 Experte in der analytischen Abteilung des  
Nationalen Instituts für Arzneimittel,  
Sofia, Bulgarien  
1999- Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie und  
Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg





