

# Cyclodextrine als chirale Selektoren in der kapillarelektrophoretischen Enantiomerentrennung

**Dissertation**

zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ulrich Schmitt

aus Aschaffenburg

Würzburg 2004

Eingereicht am: .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....  
2. Gutachter: .....  
der Dissertation

1. Prüfer: .....  
2. Prüfer: .....  
3. Prüfer: .....  
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie des Fachbereiches Chemie und Pharmazie 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 Arbeiten in ihrem Arbeitskreis danken.

*Wer zu diesem Werk hat beigetragen,  
mir Antwort gab auf meine Fragen,  
mit Rat und Tat zur Seite stand,  
dem sag ich hiermit vielen Dank!*

*U. Schmitt*

*„Der Blick in den Spiegel ist immer ein Trugbild:  
Rechts wird zu Links!  
Links wird zu Rechts!  
Und drei Dimensionen werden auf zwei reduziert!“*

Andrea Redmann  
(\*1959), deutsche Autorin

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
1.1 Chiralität .....	8
1.1.1 Die Physik .....	8
1.1.2 Die Chemie .....	13
1.1.3 Die Pharmazie .....	18
1.2 Cyclodextrine .....	21
1.2.1 Unsubstituierte Cyclodextrine .....	21
1.2.2 Substituierte Cyclodextrine .....	23
1.2.3 Einsatz und Verwendung von Cyclodextrinen .....	27
1.2.4 Raman-spektroskopische Untersuchungen .....	28
1.3 Kapillarelektrophorese .....	29
1.3.1 Theoretische Grundlagen .....	29
1.3.2 Aufbau und Funktionsweise der Kapillarelektrophorese .....	33
1.3.3 Chirale Trennung in der Kapillarelektrophorese .....	34
1.3.4 Entwicklung einer Trennmethode .....	38
<b>2. Analytik</b> .....	<b>40</b>
2.1 Thiobarbiturate .....	40
2.1.1 Die Probe .....	40
2.1.2 Die Methode .....	42
2.1.3 Die Ergebnisse .....	43
2.2 Furaneol .....	52
2.2.1 Die Probe .....	52
2.2.2 Die Methode .....	53
2.2.3 Die Ergebnisse .....	53
2.3 Atropin .....	58
2.3.1 Die Probe .....	58
2.3.2 Die Methode .....	60
2.3.3 Die Ergebnisse .....	61
2.4 1,1'-Binaphthalin-2,2'-diyl-phosphat .....	68
2.4.1 Die Probe .....	68
2.4.2 Die Methode .....	69
2.4.3 Die Ergebnisse .....	70
2.4.4 Zirkular-Dichroismus-Messungen .....	85
2.5 2-Hydroxymethyl-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl) naphthalin .....	89

2.5.1 Die Probe .....	89
2.5.2 Die Methode .....	89
2.5.3. Die Ergebnisse .....	90
<b>3. Synthese .....</b>	<b>93</b>
3.1 Aufgabenstellung und Strategie .....	93
3.2 Experimentalteil.....	95
3.2.1 Acetylierung .....	95
3.2.2 Methylierung .....	104
3.3 Diskussion der Ergebnisse.....	105
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>110</b>
<b>5. Summary .....</b>	<b>113</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>122</b>
<b>Publikationen und Poster.....</b>	<b>123</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Ac- $\beta$ -CD	randomisiert acetyliertes $\beta$ -Cyclodextrin
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CHARM	charged resolving agent migration
DC	Dünnschichtchromatographie
Diac	<i>Heptakis</i> -(2,3-di- <i>O</i> -acetyl)- $\beta$ -cyclodextrin
DM	<i>Heptakis</i> -(2,6-di- <i>O</i> -methyl)- $\beta$ -cyclodextrin
DMF	N,N-Dimethylformamid
ee	Enantiomerenüberschuss
EOF	elektroosmotischer Fluss
ESI	Elektrospray-Ionisation
HDAS	<i>Heptakis</i> -(2,3-di- <i>O</i> -acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin
HDMS	<i>Heptakis</i> -(2,3-di- <i>O</i> -methyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HS	<i>Heptakis</i> -(6-sulfato)- $\beta$ -CD
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie
MS	durchschnittlicher molekularer Substitutionsgrad
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance)
RP	Umkehrphase (reversed phase)
R <sub>s</sub>	Auflösung (resolution)
RT	Raumtemperatur
TAPS	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure
TBDMS	<i>tert.</i> -Butyldimethylchlorsilan
TFA	Trifluoressigsäure
TM	<i>Heptakis</i> -(2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl)- $\beta$ -cyclodextrin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZD	Zirkular-Dichroismus

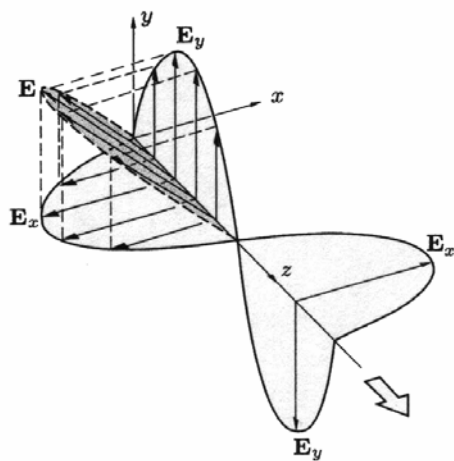
# 1. Einleitung

## 1.1 Chiralität

### 1.1.1 Die Physik

Licht kann als transversale elektromagnetische Welle betrachtet werden. Nimmt man zwei harmonische, linear polarisierte Lichtwellen gleicher Frequenz, die sich durch denselben Raum in die gleiche Richtung bewegen und deren Feldvektoren parallel sind, so überlagern sich die Schwingungen einfach zu einer linear polarisierten Welle. Stehen dagegen die elektrischen Felder der beiden Lichtwellen senkrecht aufeinander, so können unterschiedliche Arten der Überlagerung auftreten. Die resultierende optische Welle ist die vektorielle Summe der beiden zueinander senkrecht stehenden Wellen.

$$E(z,t) = E_x(z,t) + E_y(z,t)$$



$E$ : elektrischer Feldvektor

$x, y, z$ : Raumkoordinaten

$t$ : Zeit

Abbildung 1: Entstehung von linear polarisiertem Licht durch Überlagerung zweier senkrechter, phasengleicher Wellen.<sup>a</sup>

Sind die Wellen in Phase, d.h. ihr relativer Phasenunterschied ist 0 oder ein ganzzahliges Vielfaches von  $2\pi$ , so ist die resultierende Welle ebenfalls *linear polarisiert*. Sind die Amplituden der Einzelwellen zwar gleich, aber liegt eine relative

<sup>a</sup> Abbildung aus: Eugen Hecht, *Optik*, 3. Auflage, Oldenbourg Verlag, München, 2001.



Phasenverschiebung von  $\pi/2$  vor, so ist die skalare Amplitude von  $E$  konstant, aber ihre Richtung ändert sich mit der Zeit und ist nicht mehr auf eine Ebene beschränkt. Der resultierende elektrische Feldvektor  $E$  dreht sich mit der Kreisfrequenz  $\omega$  um die z-Achse.

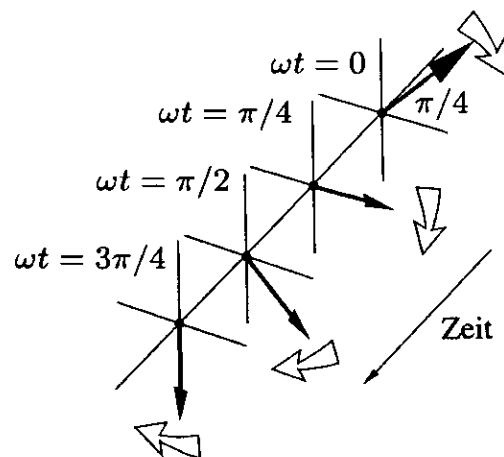


Abbildung 2: Entstehung von polarisiertem Licht durch Überlagerung zweier Wellen, die um  $180^\circ$  phasenverschoben sind.<sup>a</sup>

Diese Art von Lichtwelle bezeichnet man als *zirkular polarisiert*. Dreht sich der E-Vektor für einen Beobachter, der zur Lichtquelle schaut und die Welle auf sich zukommen sieht, im Uhrzeigersinn, so spricht man von *rechtszirkular* polarisiertem Licht (+), dreht der E-Vektor entgegen dem Uhrzeigersinn entsprechend von *linkszirkular* polarisiertem Licht (-). Eine linear polarisierte Welle kann aus zwei entgegengesetzt zirkular polarisierten Wellen gleicher Amplitude zusammengesetzt werden.

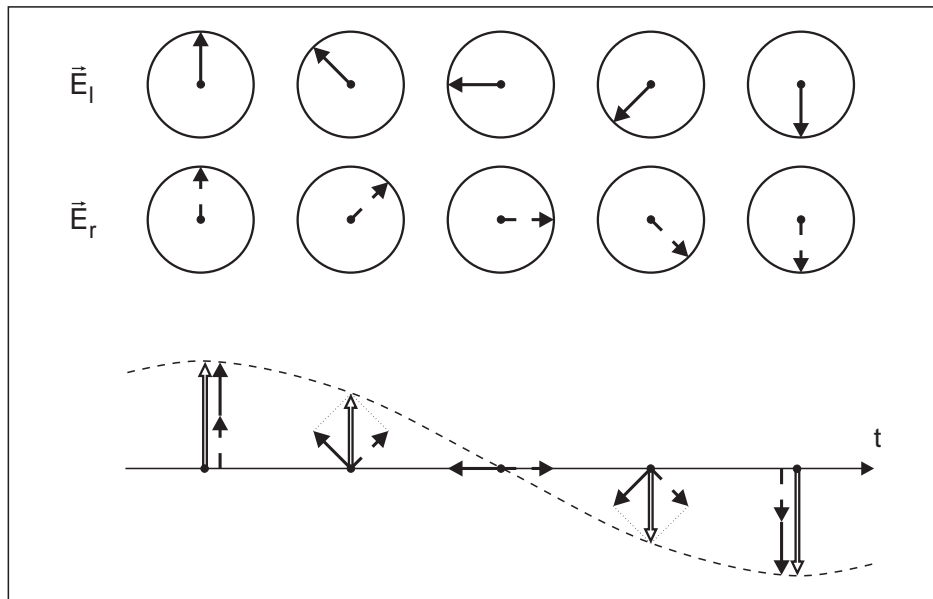


Abbildung 3: Vektoraddition der elektrischen Feldvektoren  $E_r$  und  $E_l$  von rechts- und linkszirkularem Licht gleicher Intensität zum resultierenden  $E$ -Vektor für linear polarisiertes Licht.

Unterscheiden sich jedoch die Amplituden von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht, so entsteht *elliptisch* polarisiertes Licht.

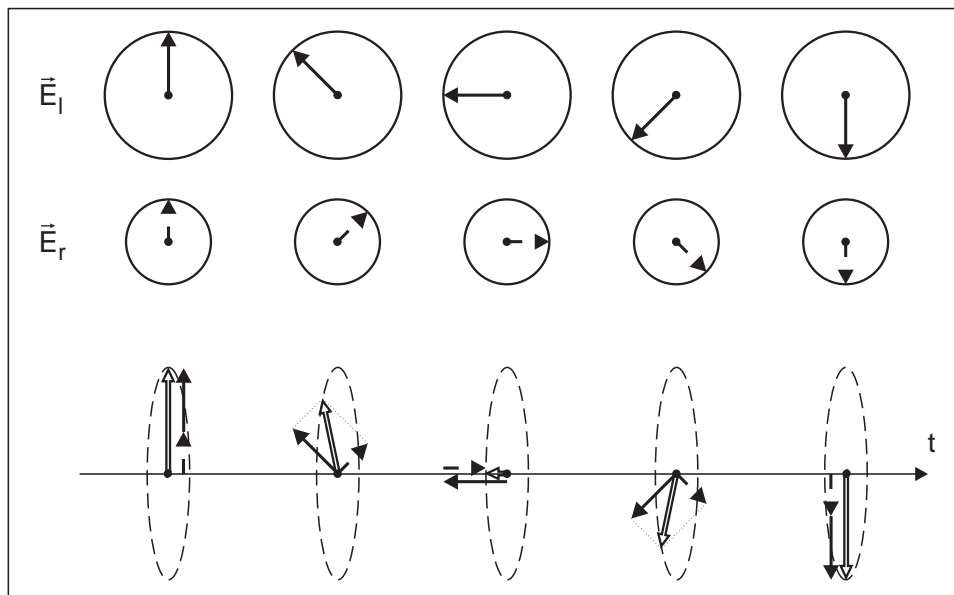


Abbildung 4: Vektoraddition der elektrischen Feldvektoren  $E_r$  und  $E_l$  von rechts- und linkszirkularem Licht unterschiedlicher Intensität zum resultierenden  $E$ -Vektor für elliptisch polarisiertes Licht.

Ähnlich dem zirkularpolarisierten Licht läuft der resultierende elektrische Feldvektor  $E$  auf einer schraubenförmigen Bahn. Er ändert hierbei nur jetzt periodisch seinen Betrag.

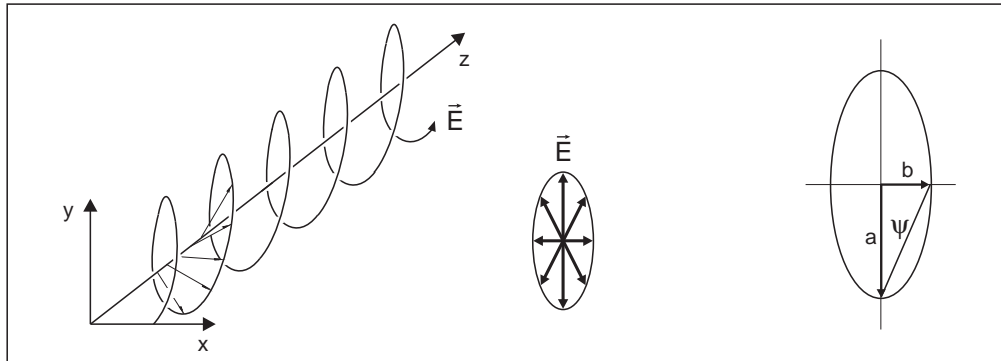


Abbildung 5: Der elektrische Feldvektor  $E$  elliptisch polarisierten Lichtes beschreibt eine elliptische Bahn um seine Ausbreitungsrichtung.

Die charakteristische Größe des elliptisch polarisierten Lichtes ist die *Elliptizität*  $\psi$ , definiert wie folgt:

$$\psi = \tan \frac{a}{b}$$

Hierbei sind a und b die beiden Halbachsen der Ellipse.

### *Chiroptische Analysenmethoden*

Wie bereits oben erwähnt, entsteht linear polarisiertes Licht durch Überlappung von rechts- und linkszirkular polarisiertem Licht. Trifft nun das linear polarisierte Licht auf eine chirale Verbindung, so treten diastereomorphe Wechselwirkungen auf. Zum einen werden links und rechts polarisiertes Licht von dem Medium, welches sie durchlaufen, unterschiedlich stark gebrochen, was direkt zur Folge hat, dass sie sich mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten  $c$  im chiralen Medium fortbewegen. Daraus folgt wiederum mit  $c = \lambda \cdot \nu$ , dass bei konstanter Frequenz  $\nu$  unterschiedliche Wellenlängen  $\lambda$  vorliegen müssen. Das Ergebnis ist ein um einen charakteristischen Winkel  $\alpha$  gedrehtes polarisiertes Licht beim Austritt aus der Probe. Wählt man nun die Wellenlänge des Lichtes so, dass man den Absorptionsbereich des Mediums trifft, so lässt sich eine weitere Wechselwirkung beobachten. Hier pflanzen sich

rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht nicht nur unterschiedlich schnell in der Probe fort, sondern es wird auch unterschiedlich stark absorbiert. Dieses Phänomen bezeichnet man als Zirkular-Dichroismus (ZD), da sich das Medium bezüglich der beiden zirkular polarisierten Lichtstrahlen „zweifartig“ verhält. Dies hat zur Folge, dass links oder rechts polarisiertes Licht in der Intensität stärker abgeschwächt wird. Aus diesem Grund ist das Licht beim Verlassen der chiralen Probe nicht nur um den Winkel  $\alpha$  gedreht, sondern auch elliptisch polarisiert.

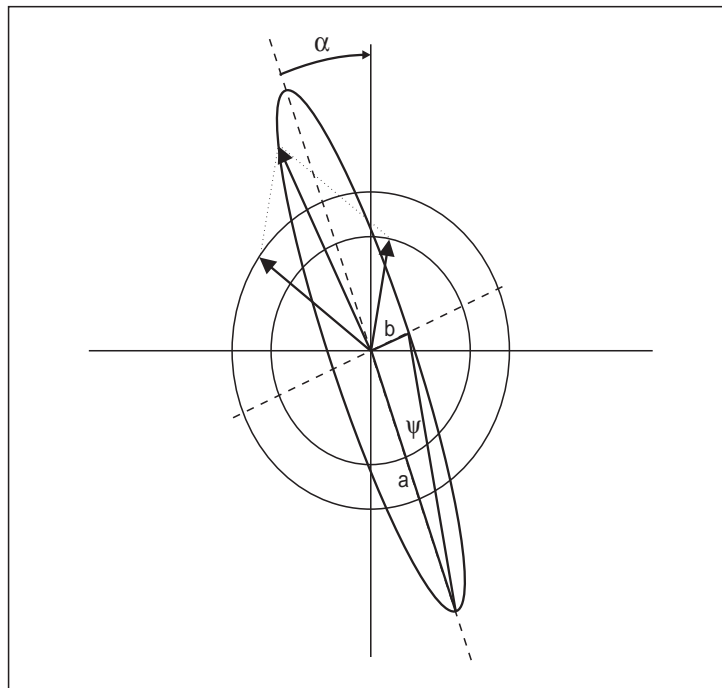


Abbildung 6: Zirkular-Dichroismus: zusätzlich zum Auftreten des Drehwinkels  $\alpha$  ist der aus der chiralen Probe austretende Lichtstrahl elliptisch polarisiert. Die Elliptizität  $\psi$  ist ein Maß für den ZD-Effekt.

Besser als die oben erwähnte Elliptizität  $\psi$  eignet sich für chemische Anwendungen die molare Elliptizität  $\theta$ . Sie ist definiert als:

$$\theta = \frac{\psi \cdot \text{Molmasse}}{l \cdot c \cdot 100}$$

mit  $l$  = Probenlänge und  $c$  = Konzentration.

Das experimentelle Vergleichsspektrum wird mit einem Dichrographen aufgenommen. Das Licht der Messlampe wird durch einen Monochromator

dispergiert und durch einen nachfolgenden Polarisator linear polarisiert. Der sich anschließende Modulator wirkt als Phasenschieber und erzeugt so links- bzw. rechtszirkular polarisiertes Licht mit einer Wechselfrequenz im Bereich einiger Kiloherz, das dann auf die Probe trifft. Das Transmissionslicht wird von einem Photomultiplier detektiert. Im Lock-in-Verstärker wird das Signal mit dem Referenzsignal des Modulators verglichen und somit die Differenz der Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht ermittelt.

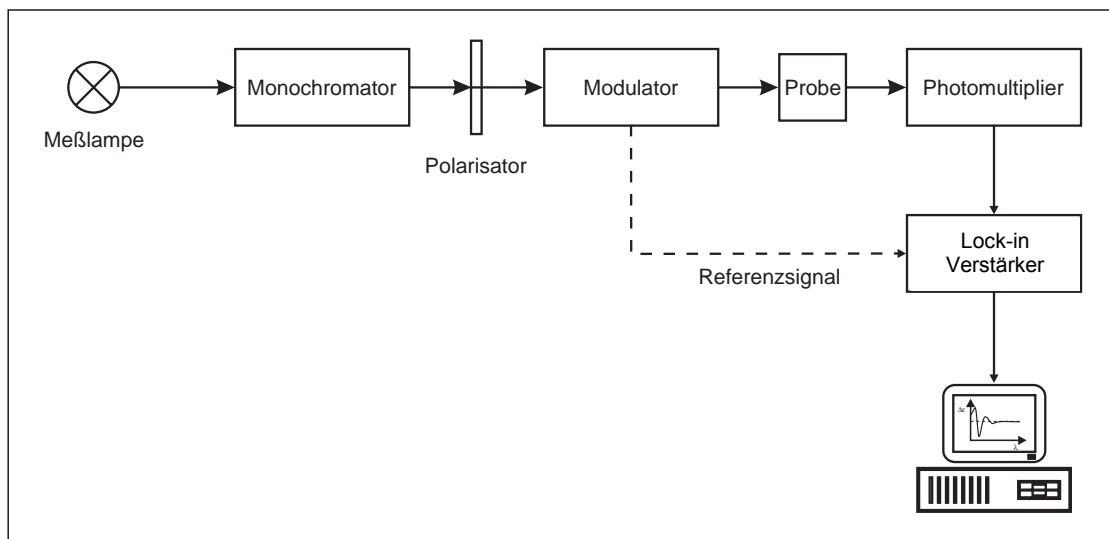


Abbildung 7: Schaltbild eines ZD-Spektrometers (Dichrograph)

### 1.1.2 Die Chemie

*Stereoisomere* sind Verbindungen gleicher Konstitution, aber verschiedener Anordnung der Atome im Raum. Die Moleküle von Stereoisomeren sind nicht deckungsgleich (nicht kongruent). Zwei Stereoisomere, deren Moleküle sich zueinander wie Objekt und Spiegelbild verhalten, heißen *Enantiomere*. Besteht ein Stoff zu gleichen Teilen aus beiden Enantiomeren, so spricht man von einem *racemischen Gemisch* oder *Racemat*. Zwei oder mehrere Stereoisomere, deren Moleküle sich zueinander nicht wie Objekt und Spiegelbild verhalten, heißen *Diastereomere*.

Die optische Isomerie der Weinsäure (2,3-Dihydroxybutandisäure) wurde von Pasteur im Jahre 1848 entdeckt. Beim langsamen Eindunsten einer wässrigen Lösung des Natriumsalzes der Traubensäure, die optisch inaktiv ist, beobachtete er das Abscheiden eines Salzes. Dieses Salz war ein Gemisch von zwei Kristallsorten,

die sich wie Objekt und Spiegelbild verhielten. Er trennte das Konglomerat durch manuelle Auslese der Kristalle und stellte fest, dass die eine Sorte, in Wasser gelöst, die Polarisationssebene des Lichts in die eine Richtung und die andere Sorte um den gleichen Betrag in die entgegengesetzte Richtung drehte.

Enantiomere können nach dem im Molekül vorhandenen Chiralitätselementen in verschiedene Gruppen unterteilt werden: Chiralitätszentrum, Chiralitätsachse / Helix und Chiralitätsebene. Das Vorhandensein eines Chiralitätselements ist für die optische Aktivität eines Moleküls eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung. Moleküle, die in ihre optischen Antipoden getrennt werden können, dürfen weder eine Spiegelebene noch ein Inversionszentrum besitzen. Das Wort chiral kommt vom griechischen Wort „cheir“, was Hand bedeutet. Die menschlichen Hände stehen zueinander in einer Bild-Spiegelbild-Beziehung.

### *Zentrale Chiralität*

Ein Atom mit einer tetraedrischen Umgebung (zur Vereinfachung gehen wir im Folgenden von einem Kohlenstoffatom aus) mit vier verschiedenen Liganden wird als asymmetrisch substituiertes C-Atom bezeichnet. Dieses ist das am häufigsten auftretende Chiralitätselement und wird auch als stereogenes Zentrum bezeichnet. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wird das von Cahn, Ingold und Prelog entwickelte Sequenzverfahren verwendet (CIP-System: *R,S*-System).<sup>1</sup> Die vier Liganden bekommen in der Reihenfolge der abnehmenden Ordnungszahlen, der direkt an das Chiralitätszentrum gebundenen Atome, Prioritäten zugeordnet. (Für komplexere Fälle sei an dieser Stelle auf die Lehrbücher verwiesen). Nachdem die Sequenz der vier Liganden festgelegt ist, betrachtet man nun das Molekül so, dass der Ligand mit der niedrigsten Priorität nach hinten steht. Entspricht die Sequenz fallender Priorität der anderen drei Substituenten einer Drehung im Uhrzeigersinn, also nach rechts, so erhält das Chiralitätszentrum den Deskriptor *R*, ist die Bewegung entgegen dem Uhrzeigersinn, nach links, erhält das Atom ein *S*.

### *Axiale Chiralität und Helix*

Sind in einem Molekül vier Liganden paarweise um eine Achse angeordnet, die nicht in einer Ebene liegen und sind in jedem Paar ungleiche Liganden, so liegt eine Enantiomerie vor.

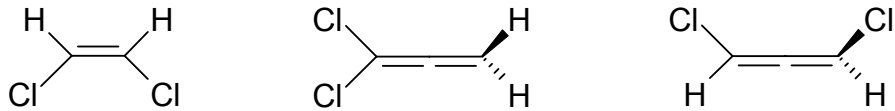


Abbildung 8: 1,2-Dichlorethen (links) ist planar und somit achiral, 1,1-Dichlorallen (mittig) besitzt ebenfalls eine Spiegelebene und ist somit auch achiral, 1,3-Dichlorallen (rechts) hat keine Spiegelebene es ist chiral, zu der abgebildeten Struktur existiert ein Enantiomer.

Diese Form der Enantiomerie ist nicht an das Vorhandensein von einem asymmetrisch substituierten Atom gebunden. Man findet sie außer bei Allenen beispielsweise auch bei Spiranen und Biphenylderivaten. Bei letzteren liegen die beiden Ringsysteme infolge der Torsionsspannung normalerweise in verschiedenen Ebenen. Um ihre Enantiomeren zu isolieren, muss die freie Drehbarkeit um die Achse durch Substituenten eingeschränkt sein. Die Stereodeskriptoren beziehen sich bei dieser Form der Chiralität auf die Chiralitätsachse. Man betrachtet das Molekül entlang dieser Achse und legt die Sequenz entsprechend der Priorität zunächst für die beiden am vorderen C-Atom gebundenen Liganden fest (1, 2), anschließend für die am hinteren Ende der Achse (1', 2'). In Anlehnung an die Zentrochiralität gibt es für die axiale Chiralität die Deskriptoren *aR* und *aS* (a für axial). Für die Bestimmung dieser Deskriptoren ist folgende Sequenz maßgebend: 1, 2, 1'. Die Zuordnung erfolgt analog über den Drehsinn der Abfolge. Alternativ können die Deskriptoren *P* und *M* (Plus und Minus) verwendet werden. Hierfür wird die Sequenz 1, 1' betrachtet. Eine Zuordnung von *aR* nach der ersten Methode würde im zweiten Fall zu *M* führen. Aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen entspricht hier also der Deskriptor *aR* dem *M*.

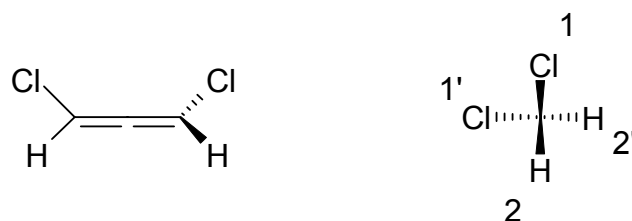


Abbildung 9: 1,3-Dichlorallen in zwei verschiedenen Projektionen, rechts mit Angabe der Prioritäten der Atome zur Bestimmung des axialen Deskriptors.

Es sei noch angemerkt, dass die Deskriptoren (+) und (-), mit denen die Drehung der Polarisationssebene des Lichts beschrieben wird, ausschließlich empirisch ermittelt werden können und nicht mit den in diesem Kapitel beschriebenen stereochemischen Deskriptoren korrelieren müssen.

Die Helizität stellt einen Sonderfall der axialen Chiralität dar. Helices sind chirale Objekte, die recht- oder linksgängig sein können. Der Drehsinn für die Zuordnung des Deskriptors wird durch das Abfolgen der Helix in vom Betrachter entfernender Weise festgesetzt. Die Zuordnung erfolgt analog zu den Achsen: Drehung im Uhrzeigersinn *P* entgegen demselben *M*. Ein typisches Beispiel für diese Klasse ist das Hexahelicen.

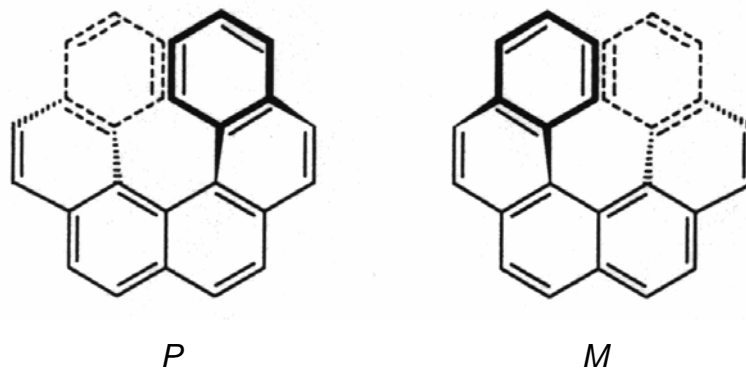


Abbildung 10: Ein Beispiel für helikale Chiralität: *P*- und *M*-Hexahelicen

Als weitere Beispiele wäre die Doppelhelix der DNA zu nennen, die in der Natur nur in der *P*-Form vorkommt. Ebenfalls in diese Klasse einzuordnen ist das im vorhergehenden Kapitel beschriebene zirkular polarisierte Licht. Wäre dies nicht selber chiral, so könnte es nicht zwischen zwei Enantiomeren einer Verbindung differenzieren.

### *Planare Chiralität*

Hat ein Molekül eine Chiralitätsebene, bezüglich dieser beide Seiten des Moleküls verschieden sind, die also keine Spiegelebene darstellt, so liegt eine Planarchiralität vor. Beispiele für diese Art von Chiralität sind nichtplanare zyklische Verbindungen mit Doppelbindung oder Aromaten.



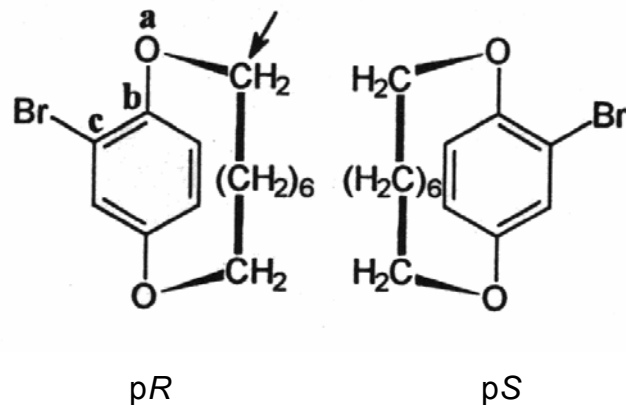


Abbildung 11: Ein Beispiel für Planarchiralität:  $pR$ - und  $pS$ -14-Brom-1,12-dioxa[12]-paracyclophan, das Leitatom ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, die Prioritätsabfolge durch die Buchstaben a, b und c angegeben.

Zur Bestimmung der Deskriptoren  $pR$  und  $pS$  ( $p$  für planar) wird das Doppelbindungssystem (hier der Aromat) in die Papierebene gelegt. Von den Atomen, die direkt an diese Ebene anschließen, also als erste nicht mehr in der Papierebene liegen, wird das ranghöchste zum Leitatom (Pfeil in Abbildung 11). Die von dem Leitatom in der Papierebene nächsten drei Atome werden mit a, b und c gekennzeichnet. Verzweigt sich das Molekül, so ist der Weg zu wählen, gemäß dessen das Atom nach der Verzweigung entsprechend der Sequenzregel die höhere Priorität hat. Beschreibt die Abfolge a, b, c nun eine Drehung im Uhrzeigersinn, so liegt das  $pR$ -Enantiomer vor.

#### *Trennung von Enantiomeren*

Enantiomere besitzen die gleichen physikalischen Eigenschaften, z.B. Schmelzpunkt, Siedepunkt, Dichte usw., und zeigen die gleiche chemische Reaktivität gegenüber achiralen Reaktionspartnern. Sie verhalten sich jedoch unterschiedlich gegenüber chiralen physikalischen Medien wie polarisiertes Licht und gegenüber chiralen Reagenzien. Eine Differenzierung von Enantiomeren ist also nur in einem chiralen Milieu möglich.

In der heutigen Zeit ist es spektroskopisch möglich, verglichen zu der klassischen Polarimetrie, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie durch Einsatz von chiralen Verschiebungsreagenzien den Anteil der beiden Enantiomeren in einem Gemisch sehr genau zu bestimmen. Um ein Gemisch jedoch zu trennen, greift man auf chromatographische oder elektroforetische Techniken zurück wie die

Gaschromatographie (GC), die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder die Kapillarelektrophorese (CE); letztere hat in dieser Arbeit Anwendung gefunden. Bei allen drei Methoden wird das Gemisch durch das Durchlaufen einer chiralen stationären Phase aufgetrennt.

Steht kein chirales Medium zur Verfügung, so besteht noch die Möglichkeit, die Enantiomere mit einem weiteren chiralen, jedoch enantiomerenreinem Reagenz zu derivatisieren. Die so erhaltenen Diastereomere unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften und können auch in nicht chiralen Medien getrennt werden.

Heute ist es auch möglich, Moleküle gezielt stereoselektiv zu synthetisieren. Darauf soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden; es sei nur erwähnt, dass diese Art von Synthese immer noch eine große Herausforderung darstellt. So wurden auch deshalb im Jahre 2001 drei Wissenschaftler mit dem Chemie-Nobelpreis ausgezeichnet, die sich auf diesem Gebiet besonders verdient gemacht haben: William Knowles<sup>2,3</sup> und Ryoji Noyori<sup>4,5</sup> für ihre Arbeiten über chirale katalysierte Hydrierungsreaktionen und Barry Sharpless<sup>6</sup> für chirale katalysierte Oxidationsreaktionen.<sup>7</sup>

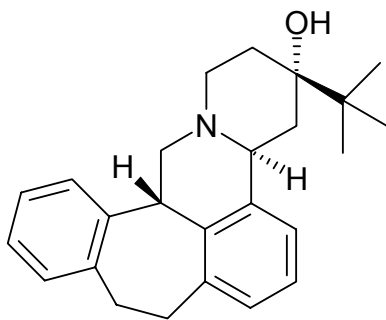
Sowohl die Synthese wie auch die Analytik von chiralen Stoffen verlangt ein hohes Maß an Wissen und Können. Dass das Forschen in der Welt von Bild und Spiegelbild nicht nur dazu dient, rein akademische Fragen zu beantworten, sondern dass es gerade im Bereich der Pharmazie eine absolute Notwendigkeit zur Lösung konkreter Problemstellungen darstellt, soll im nächsten Kapitel aufgezeigt werden.

### **1.1.3 Die Pharmazie**

Die Erkenntnis, dass zwei Enantiomere eines Arzneistoffes nicht die gleiche Wirkung haben müssen, wurde auf eine sehr bedauerliche Art und Weise erlangt. Am 1. Oktober im Jahre 1957, zu einer Zeit, als man der Stereochemie von Arzneistoffen und der Stereochemie im Allgemeinen noch keine sehr große Aufmerksamkeit widmete, kam ein Arzneimittel mit dem Wirkstoff Thalidomid auf den Markt. Das neue Medikament wurde nicht nur bei Schlaflosigkeit, sondern auch gegen Übelkeit in der Schwangerschaft eingesetzt. Einige Zeit später wurden Kinder mit fehlenden Gliedmaßen (Phokomelie) oder geschädigten Organen geboren. Es dauerte vier Jahre, bis der Kinderarzt Dr. Widukind Lenz als erster den Zusammenhang mit dem verabreichten Medikament erkannte. Im Jahre 1961 wurde daraufhin das

Medikament vom Markt genommen. Doch die schreckliche Bilanz von 2.700 Kindern alleine in Deutschland mit fehlenden Gliedmaßen und etwa 3.000, die die ersten Monate auf Grund der Einwirkungen auf ihre inneren Organe nicht überlebten, sind der Grund dafür, dass diese Medikament mit dem Wirkstoff Thalidomid auch heute noch unter seinem damaligen Handelsnamen in den Köpfen der Bevölkerung verankert ist: Contergan<sup>®</sup>.<sup>8</sup>

Mittlerweile sind einige Wirkstoffe bekannt, die das Schicksal, dass ihre Enantiomere unterschiedliche pharmakologische Wirkung zeigen, mit Thalidomid teilen. Nach Ariens<sup>9</sup> bezeichnet man Enantiomere, die unterschiedliche Aktivität haben als Eutomer und Distomer, wobei das Eutomer jenes Enantiomer ist, das die höhere Affinität bzw. Aktivität zeigt. Das Verhältnis von Aktivität Eutomer zu Aktivität Distomer ist das eudismische Verhältnis. Der Logarithmus desselben heißt eudismischer Index.



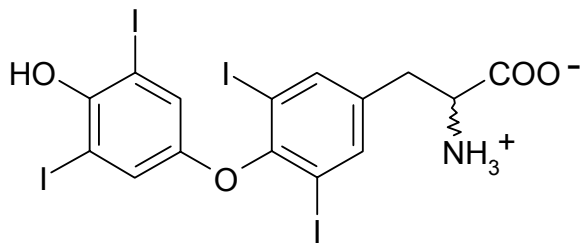
Eudismische Verhältnisse:

$\alpha_1$ -Rezeptor	73
D <sub>2</sub> -Rezeptor	1250
5-HT <sub>1</sub> -Rezeptor	8
5-HT <sub>2</sub> -Rezeptor	73
Muscarin-Rezeptor	0.5

Butaclamol (+)-Enantiomer

Abbildung 12: Eudismische Verhältnisse der Affinität der Enantiomeren (+/-) von Butaclamol zu verschiedenen Rezeptoren bzw. deren Subtypen.<sup>10,11</sup>

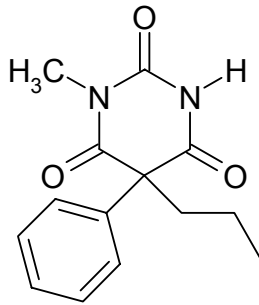
Die Pfeiffersche Regel besagt, dass ein Wirkstoff mit hoher Aktivität eine entsprechend hohe Stereoselektivität (Eudismisches Verhältnis ist groß) aufweist, während ein weniger aktiver Stoff eine geringere Stereoselektivität zeigt (Eudismisches Verhältnis ist klein). Diese Regel ist immer dann anwendbar, wenn das Stereozentrum an der Wechselwirkung mit dem Enzym / Rezeptor beteiligt ist. Ist das nicht der Fall, so spricht man von einer „silent“ Chiralität. Die folgende Übersicht soll noch einige Beispiele für chirale Arzneistoffe mit unterschiedlichen, zum Teil gegensätzlichen Wirkungsweisen der Enantiomere zeigen.



(R): hormonell inaktiv

(S): Schilddrüsenhormon

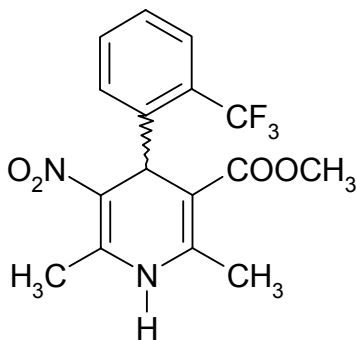
Levothyroxin / Dextrothyroxin



(R): erleichtert  $\text{Cl}^-$ -Einstrom durch GABA-regulierung, hypnotische Wirkung

(S): blockiert  $\text{Cl}^-$ -Einstrom durch GABA-regulierung, konvulsive Wirkung

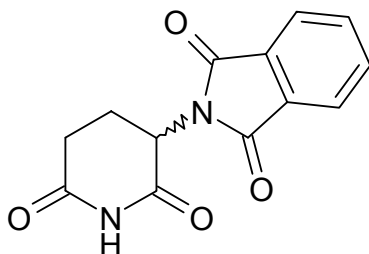
N-Methyl-5-phenyl-5-propylbarbitursäure



(R): stabilisiert  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in offener Form, wirkt als Agonist,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Öffner positiv inotrope Wirkung

(S):  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonist,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker, negativ inotrope Wirkung bei 10 bis 50-facher Konzentration

Bay K 8644



(R): ausschließlich sedativ

(S): extrem teratogen

Thalidomid

Abbildung 13: Beispiele für Enantiomerenpaare mit unterschiedlicher Wirkungsweise

Die Enantiomere von Thalidomid können sowohl mit cyclodextrin-modifizierter HPLC<sup>12</sup> wie auch CE<sup>13</sup> getrennt werden; dies bringt aber keinen Vorteil, da bei Applikation der enantiomeren-reinen *R*-Form von Thalidomid durch eine schnelle Racemisierung *in vivo* durch De- und Reprotonierung am Stereozentrum wieder die teratogene (*S*)-Form im Körper vorliegen würde.<sup>14</sup>

## 1.2 Cyclodextrine

### 1.2.1 Unsubstituierte Cyclodextrine

Die erste publizierte Isolierung eines Cyclodextrins (CD) stammt aus dem Jahr 1891 von Villiers. Durch den Verdau von 1 kg Stärke mit einer Kultur von *Bacillus amylobacter*, welche mit Sporen des hitzebeständigen *Bacillus macerans* kontaminiert war, erhielt Villiers etwa 3 g Cyclodextrin.<sup>15</sup> Genauer untersucht wurden die CDs in den darauf folgenden Jahren von Schradinger, weshalb in der älteren Literatur CDs auch als „Schradinger-Dextrine“ bezeichnet werden. Schradinger stieß bei seinen Untersuchungen an Bakterien, die den Kochvorgang überlebten, und somit potentielle Gefahren in Bezug auf Lebensmittelvergiftungen darstellten, auf besagten *Bacillus macerans*.<sup>16-18</sup>

Industriell werden die nativen CD auch heute noch durch enzymatische Spaltung von Stärke mit Cyclodextrin-Transglycosylase, welches in besagtem *Bacillus macerans* vorhanden ist, gewonnen.

CDs sind zyklische Oligosaccharide, deren Monomere,  $\alpha$ -D-Glucopyranose,  $\alpha(1\rightarrow4)$ -glykosidisch verbunden sind. Die griechischen Buchstaben  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  stehen für die Anzahl der Monomere: 6, 7 bzw. 8.

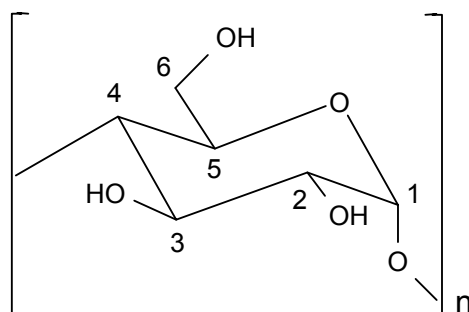


Abbildung 14: Monomerer Baustein eines nativen CDs

Die folgende Abbildung zeigt Struktur und Form der drei häufigsten nativen CDs:

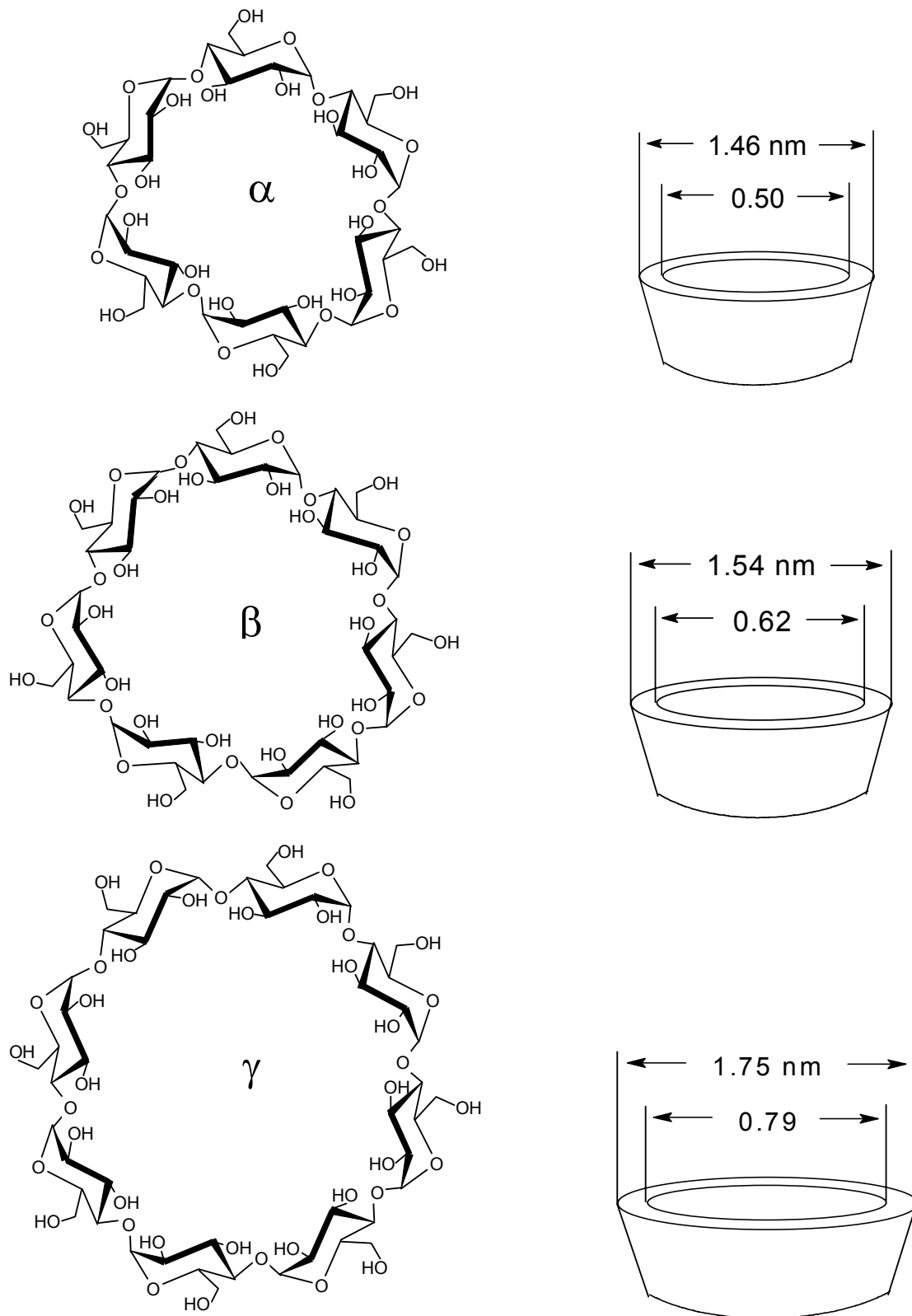


Abbildung 15: Strukturformeln von  $\alpha$ - ,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD unter Angabe des jeweiligen Innen- und Außendurchmessers des entsprechenden Torus [nm].

Eine Auswahl ihrer physikalischen Daten ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst<sup>19</sup>:

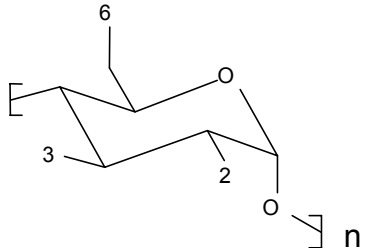
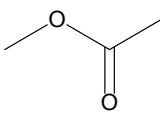
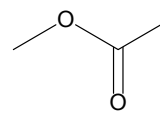
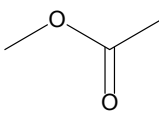
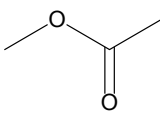
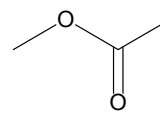
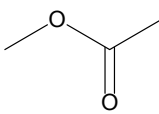
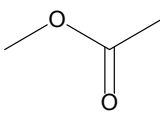
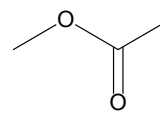
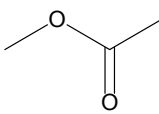
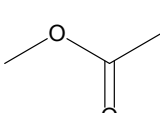
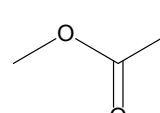
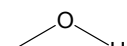
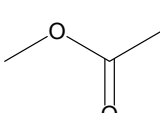
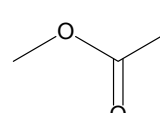
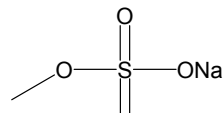
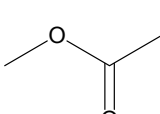
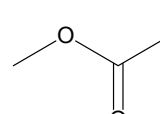
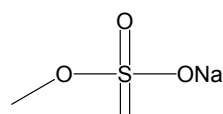
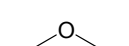
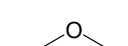
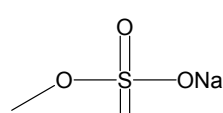
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Anzahl der Glucosemonomere	6	7	8
Molekulargewicht [g/mol]	972	1135	1297
Löslichkeit in Wasser [g/100 ml]	14.5	1.85	23.2
$[\alpha]_D$ bei 25° C	150.0	162.5	177.4
pK <sub>a</sub> -Wert	12.3	12.2	12.1
Innenraumvolumen [nm <sup>3</sup> ]	0.174	0.262	0.427
Höhe des Torus [nm]	0.79	0.79	0.79

Der Bau der CDs gleicht einem Kegelstumpf (Torus), der, obwohl er durch intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert ist, noch bedingt flexibel ist. Der Glukosebaustein selbst, liegt in einer relativ starren Sesselkonformation vor. Am oberen, weiteren Ende befinden sich die sekundären Hydroxylgruppen (C<sub>2</sub>-OH und C<sub>3</sub>-OH) am unteren, engeren Ende die primären Alkoholfunktionen (C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-OH). Erstere stehen äquatorial, wobei die C<sub>2</sub>-OH-Gruppe nach innen gerichtet ist und die C<sub>3</sub>-OH-Gruppe nach außen steht. Die Protonen H<sub>3</sub> und H<sub>5</sub> zeigen in das Innere des Torus; H<sub>2</sub> und H<sub>4</sub> nach außen. Der Innenraum, auch Kavität genannt, hat eher lipophilen, die Außenseite hydrophilen Charakter. Diese Bauweise der Cyclodextrine gestattet es ihnen mit einer Vielzahl von Molekülen Einschlussverbindungen zu bilden, wodurch die meisten ihrer Einsatzgebiete bestimmt werden.

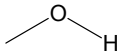
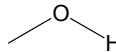
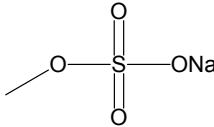
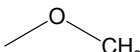
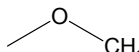
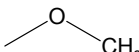
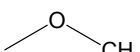
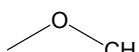
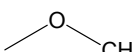
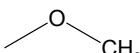
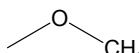
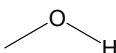
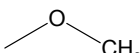
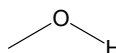
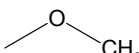
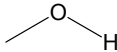
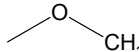
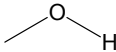
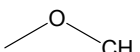
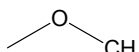
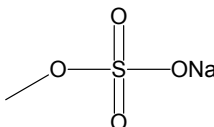
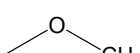
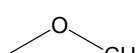
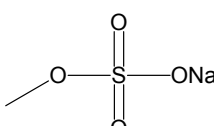
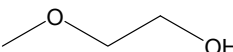
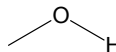
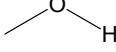
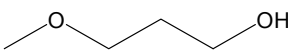
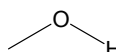
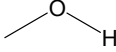
### 1.2.2 Substituierte Cyclodextrine

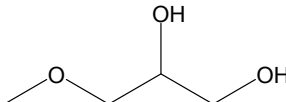
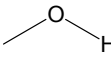
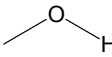
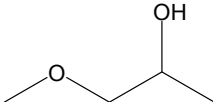
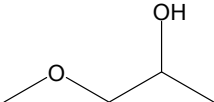
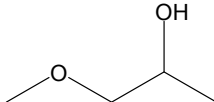
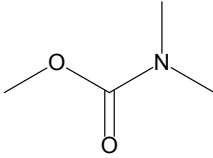
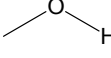
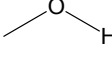
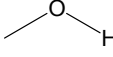
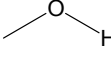
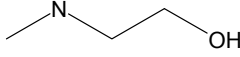
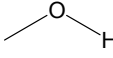
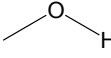
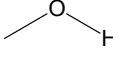
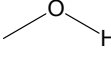
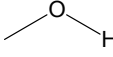
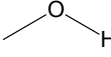
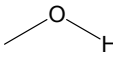
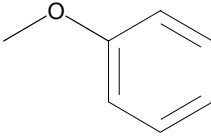
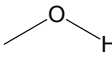
Neben den wenigen natürlichen CDs gibt es eine Vielzahl von synthetischen Derivaten. Einige ältere Übersichtsartikel<sup>20,21</sup> geben noch einen Überblick über den synthetische erreichten Status quo, seit jedoch die Tausendermarke gefallen ist, ist selbst in einem Übersichtsartikel kaum noch möglich, die gesamte Fülle an CDs zu erfassen. Während früher vor allem zufällig substituierte (randomisierte) CDs hergestellt wurden, liegt das Ziel heute im Bereich der isomerenreinen CDs,<sup>22</sup> d.h. jedes Glucosemonomer ist gleich substituiert. Von ersteren konnte für jede Charge nur der durchschnittliche Grad an substituierten Positionen angegeben werden (average degree of molecular substitution: MS), während die Monomerenbausteine

eines CDs von letzteren alle gleichartig substituiert sind. Eine weitere Gruppe neuerer substituierter CDs stellen die monosubstituierten CDs dar.<sup>23,24</sup> In diesen ist gezielt nur eine Glucoseeinheit substituiert. Die am häufigsten zu findenden Substituenten sind Methyl-, Acetyl-, Amino- oder Sulfatreste. Die substituierten CDs kann man des weiteren in zwei Gruppen aufteilen: geladene und ungeladene CDs. Die folgende Tabelle zeigt eine Auswahl der gängigen Cyclodextrine, wobei n die Anzahl der Monomeren angibt:

Verbindung	n				Lit
		R = 2	3	6	
<i>Hexakis</i> -(2,3,6-tri-O-acetyl)- $\alpha$ -CD	6				25
<i>Heptakis</i> -(2,3,6-tri-O-acetyl)- $\beta$ -CD	7				
<i>Octakis</i> -(2,3,6-tri-O-acetyl)- $\gamma$ -CD	8				
<i>Heptakis</i> -(2,3-di-O-acetyl)- $\beta$ -CD	7				22
<i>Heptakis</i> -(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD	7				26
<i>Octakis</i> -(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\gamma$ -CD	8				27
<i>Heptakis</i> -(6-O-sulfato)- $\beta$ -CD	7				28



<i>Octakis</i> -(6-O-sulfato)- $\gamma$ -CD	8				29
<i>Hexakis</i> -(2,3,6-tri-O-methyl)- $\alpha$ -CD	6				30
<i>Heptakis</i> -(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -CD	7				31
<i>Hexakis</i> -(2,3-di-O-methyl)- $\alpha$ -CD	6				
<i>Heptakis</i> -(2,3-di-O-methyl)- $\beta$ -CD	7				30
<i>Octakis</i> -(2,3-di-O-methyl)- $\gamma$ -CD	8				
<i>Heptakis</i> -(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD	6				32
<i>Heptakis</i> -(3-O-methyl)- $\beta$ -CD	7				33
<i>Heptakis</i> -(2,3-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD	7				34
<i>Octakis</i> -(2,3-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD	8				35
<i>Heptakis</i> -(2-O-hydroxyethyl)- $\beta$ -CD	7				36
<i>Heptakis</i> -(2-O-hydroxypropyl)- $\beta$ -CD	7				36

<i>Heptakis-(2-O-(2,3-dihydroxypropyl))-β-CD</i>	7	  	36
<i>Heptakis-(2,3,6-tri-O-hydroxypropyl)-β-CD</i>	7	  	37
<i>Heptakis-(2-N,N-dimethylcarbamoyl)-β-CD</i>	7	  	38
<i>Heptakis-(6-hydroxyethylamino-6-deoxy-β-CD)</i>	7	  	39
Glucuronyl glucosyl-β-CD	1	  <p>Glu-glu</p>	40
Monomaltosyl-β-CD	1	  <p>Mal</p>	41
Dimaltosyl-β-CD	2	  <p>Mal-mal</p>	
Mono-3-O-phenyl-carbamoyl-β-CD	1	  	42

### 1.2.3 Einsatz und Verwendung von Cyclodextrinen

Cyclodextrine haben mittlerweile in praktisch allen naturwissenschaftlichen Bereichen Einzug gefunden. Hauptgrund hierfür ist ihre bereits erwähnte Fähigkeit, mit anderen Molekülen Einschlussverbindungen zu bilden. Die eingeschlossenen Moleküle ändern hierdurch beispielsweise ihre Reaktivität, Löslichkeit, Diffusions- und Resorptionsverhalten oder ihr spektroskopischen Eigenschaften. CDs kommen zum Einsatz in der Biotechnologie<sup>43-45</sup> und Lebensmittelchemie,<sup>46,47</sup> ebenso wie in praktisch allen Teilgebieten der Pharmazie,<sup>48-53</sup> sei es zur Verbesserung der Stabilität von Arzneistoffen<sup>54</sup> oder als Transportmittel („carrier“) für einen Wirkstoff.<sup>55</sup> Eines der Haupteinsatzgebiete von CDs stellt jedoch das Feld der Analytik dar, so zum Beispiel in der UV/VIS-Spektroskopie,<sup>56</sup> wo ein komplexiertes Molekül andere Absorptionseigenschaften im Bezug auf Wellenlänge und Intensität zeigen kann wie das unkomplexierte oder die Lumineszenz-Spektroskopie<sup>57,58</sup> (Fluoreszenz & Phosphoreszenz), in der die Signaländerung auf mehrere Faktoren zurückzuführen ist: eingeschränkte Torsions- bzw. Rotationsfreiheit, begrenzte Wechselwirkungsmöglichkeit mit dem Lösungsmittel, Schutz vor externen Quenchvorgängen. Der Einsatz von CDs ermöglicht einen höheren Grad an Spezifikation in diesen analytischen Bereichen. Des weiteren finden sie Anwendung in der NMR-Spektroskopie,<sup>59</sup> in der die Komplexierung durch ein CD zu einem Signalschiff führt. Auch in verschiedenen Bereichen der Elektrochemie haben CDs analytische Anwendung gefunden: in der Potentiometrie,<sup>60</sup> Polarographie und Voltammetrie,<sup>61,62</sup> Zykelvoltammetrie<sup>63</sup> und der Amperometrie.<sup>64</sup>

Nicht zu guter Letzt wären noch die chromatographischen Methoden zu nennen. So werden CDs in der Dünnschichtchromatographie (DC) sowohl als Zusatz zur mobilen, wie auch als stationäre Phase eingesetzt. Die wässrigen CD-haltigen Lösungen haben gegenüber den klassischen organischen Fließmitteln gewisse Vorteile: sie beheben Löslichkeitsprobleme, erhöhen die Laufzeitdifferenzen und ermöglichen die simultane Chromatographie von polaren und unpolaren Substanzen. Selbst mit dieser relativ einfachen analytischen Technik gelang es, durch die Ausbildung von Einschlusskomplexen, Enantiomere zu trennen<sup>65</sup>. Auch in der Gaschromatographie (GC)<sup>66</sup> bzw. gekoppelt mit der Massenspektroskopie (GC-MS)<sup>67</sup> sind eine Vielzahl von Anwendungen beschrieben, ebenso wie in der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC),<sup>68,69</sup> bei der es neben dem stationären Einsatz auch wieder die Möglichkeit als Zusatz zur mobilen Phase gibt.<sup>70</sup>

Das Trennpotential für Enantiomere von CDs in der Kapillarelektrophorese (CE) wird im Rahmen dieser Arbeit unter Beweis gestellt werden.

Die Fähigkeit der CDs Einschlußkomplexe zu bilden, ermöglicht einen höheren Grad an Differenzierung zwischen Molekülen, die gleiche oder ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise sehr ähnliches Laufverhalten bei der Dünnschichtchromatographie. Die Verstärkung der geringen Unterschiede der physikalischen Eigenschaften beruht auf der unterschiedlichen Art und Weise der Wechselwirkung zwischen den Molekülen und dem CD. Diese kann durch den Ort an dem das Molekül mit dem CD wechselwirkt (Innen-/Außenseite) gegeben sein, durch die Eintauchtiefe in das CD oder durch die Stärke der Komplexbindung (Komplexstabilität). Letztendlich gibt uns dies sogar die Möglichkeit zwischen Enantiomeren, die identische physikalische Eigenschaften besitzen, zu differenzieren, da es sich bei den Enantiomer-CD-Komplexen um Diastereomere handelt.

#### **1.2.4 Raman-spektroskopische Untersuchungen**

Moderne Techniken, die sich des zirkular polarisierten Lichtes bedienen, wie SCP-ROA („scattered circularly polarized Raman optical activity“)<sup>71</sup> oder ICP-ROA („incident circular polarization Raman optical activity“)<sup>72,73</sup> ermöglichen es, enantiomeren-reine Probe direkt auf Verunreinigungen durch das Enantiomer zu prüfen. Diese Techniken sind allerdings technisch sehr aufwändig. Der Einsatz von Cyclodextrinen sollte es ermöglichen, mit einfachen kommerziellen Raman-Spektrometern Enantiomere differenzieren zu können. Spivey und Swofford<sup>74</sup> gelang es erstmals einen Einschlußkomplex von N-Benzoylleucin und  $\beta$ -CD Raman-spektroskopisch nachzuweisen. Hierzu wurden beide Substanzen in sehr wenig Wasser gelöst und gemischt. Anschließend wurde das Wasser mittels Gefriertrocknung wieder entfernt. Die Raman-Spektren von N-Benzoyl-L-leucin, dem Einschlußkomplex mit  $\beta$ -CD und einem unbehandelten Feststoffgemisch aus  $\beta$ -CD und N-Benzoyl-L-leucin wurden aufgenommen und verglichen. Das Spektrum des losen Gemisches wies verglichen mit dem des Einschlußkomplex erkennbare Unterschiede auf.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Wechselwirkung des CDs mit dem Einschlußmolekül in der Pufferlösung mit den in der Kapillarelektrophorese vergleichbaren Konzentration nachzuweisen. Dies scheiterte an der zu geringen

Signalintensität. Selbst der Einsatz einer gesättigten  $\beta$ -CD-Lösung führte zu keiner ausreichenden Signalstärke.

## 1.3 Kapillarelektrophorese

### 1.3.1 Theoretische Grundlagen

Bei allen elektrophoretischen Methoden beruht die Trennung von Ionen auf deren unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten ( $v$ ) im elektrischen Feld ( $E$ ).

$$v = \mu_e \cdot E$$

mit

$v$  = Wanderungsgeschwindigkeit

$\mu_e$  = elektrophoretische Mobilität und

$E$  = angelegtes elektrisches Feld.

Das elektrische Feld ist eine Funktion der an die Kapillare angelegten Spannung. Die Mobilität ist eine für ein Ion charakteristische Konstante. Diese ist bestimmt durch den Quotienten aus der Stärke des elektrischen Feldes ( $F_E$ ) und Reibungskraft ( $F_R$ ):

$$\mu_e \approx \frac{F_E}{F_R}$$

Die elektrische Feldstärke  $F_E$  ist gegeben durch:

$$F_E = q \cdot E$$

mit  $q$  = Ionenladung.

Die Reibungskraft für in erster Näherung kugelförmige Moleküle ist durch das Stokesche Gesetz beschrieben:

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

mit  $\eta$  = Viskosität der Lösung und  $r$  = Ionenradius.

Während der Elektrophorese stellt sich nun ein Gleichgewicht zwischen Feldstärke und Reibungskraft ein:

$$q E = 6\pi\eta r v$$

Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Gleichungen ergibt sich somit für die elektrophoretische Mobilität:

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

Aus dieser Formel ist klar ersichtlich, dass kleine hoch geladene Teilchen eine große Mobilität, große Teilchen mit geringer Ladung hingegen nur eine geringe Mobilität besitzen. Der in der Praxis zu findende Unterschied wird allerdings durch Solvation herabgesetzt. Die elektrophoretische Mobilität  $\mu_e$  stellt im Gegensatz zur Geschwindigkeit  $v$  eine stoffspezifische, von  $E$  unabhängige Größe dar.

Ein grundlegendes Phänomen der Kapillarelektrophorese (CE) ist der elektroosmotische Fluss (EOF). Dieser beschreibt den bulkartigen Fluss der Flüssigkeit in der Kapillare, welcher eine direkte Folge der Ausbildung und Wanderung der an der Kapillarenwand vorhandenen Schichten und der von außen angelegten Spannung ist.

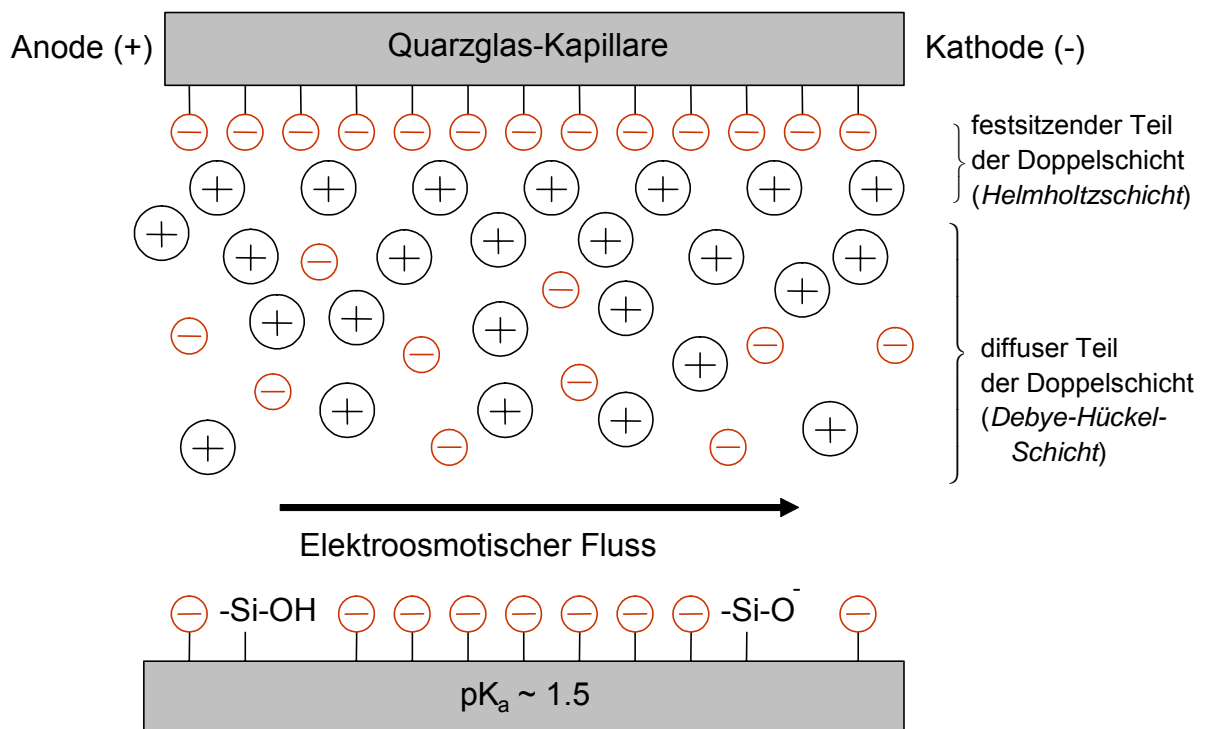


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Schichtenbildung und des EOFs im Kapillareninneren

Die bei einer unbeschichteten Quarzglas Kapillaren an der Innenseite liegenden Silanolgruppen können, abhängig von pH-Wert des Laufpuffers, des so genannten Hintergrundelektrolyten (background electrolyte: BGE), protoniert oder deprotoniert vorliegen. Ab etwa pH 3 sind die Silanolgruppen ( $pK_a \sim 1.5$ ) deprotoniert. Die jetzt negativ geladene Kapillareninnenwand lagert nun Kationen aus dem Puffer an, die eine feste Schicht an der Wand bilden. Die Gesamtladung der Kationen reicht jedoch nicht aus, um die negative Ladung der Kapillarenwand zu kompensieren; es bildet sich eine zweite Schicht von Kationen über der ersten aus. Die zweite Schicht steht jedoch auf Grund ihrer größeren Abstände zu den Silanolanionen nur noch in schwacher Wechselwirkung mit dieser und kann nicht mehr fixiert werden. Dieser Teil der Doppelschicht wird als diffus bezeichnet. Wird nun eine Spannung angelegt, so wandern die Kationen der diffusen Schicht Richtung Kathode. Hierbei ziehen sie den gesamten Hintergrundelektrolyten inklusive gelöster Probenmoleküle mit zur Kathode. Die zwischen der festen und mobilen Phase herrschende Potentialdifferenz wird als Zeta-Potential  $\zeta$  bezeichnet. Die Stärke des EOF kann mit Hilfe der Geschwindigkeit ( $v_{EOF}$ ) oder der Mobilität ( $\mu_{EOF}$ ) beschrieben werden:

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} E$$

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta}$$

mit  $\epsilon$ : Dielektrizitätskonstante und  $\zeta$ : Zeta-Potential.

Das Zeta-Potential hängt im Wesentlichen von der Ladung an der Kapillarenwand ab, was nochmals die quantitative Abhängigkeit des EOF vom pH-Wert aufzeigt.

Der EOF ist auch für das Strömungsprofil, welches der CE, im Unterschied zur HPLC, zueigen ist, verantwortlich: das Stempelprofil.

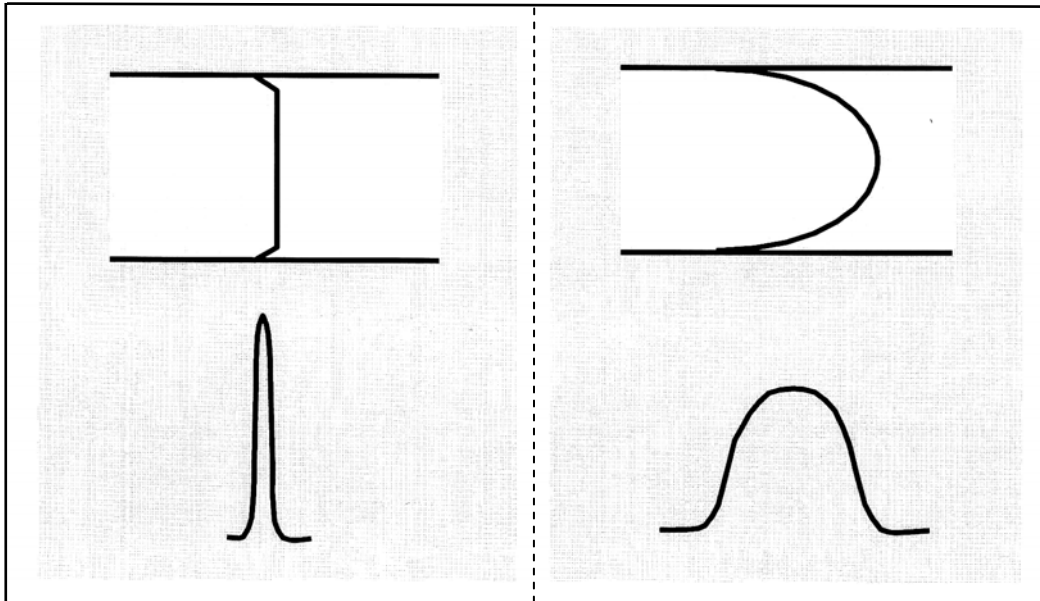


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Strömungsprofil und Peakbreite: links EOF, rechts laminare Strömung

Der EOF transportiert die gesamte Lösung gleichförmig durch die Kapillare, es existiert, abgesehen von einer schmalen Randzone, im Querschnitt der Kapillare kein Kräftegefälle. Das hieraus resultierende Stempelprofil führt zu einer engen Probenzone und somit zu einem schmalen Peak. Liegt hingegen als Triebkraft des Flusses ein Druckgefälle an oder wird die Schwerkraft genutzt, so entsteht bei einem runden Querschnitt das typische parabolische Strömungsprofil einer laminaren Strömung, was zu einer Verbreiterung des Peaks führt. Dies gilt für die klassische Säulenchromatographie sowie für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie.



### 1.3.2 Aufbau und Funktionsweise der Kapillarelektrophorese

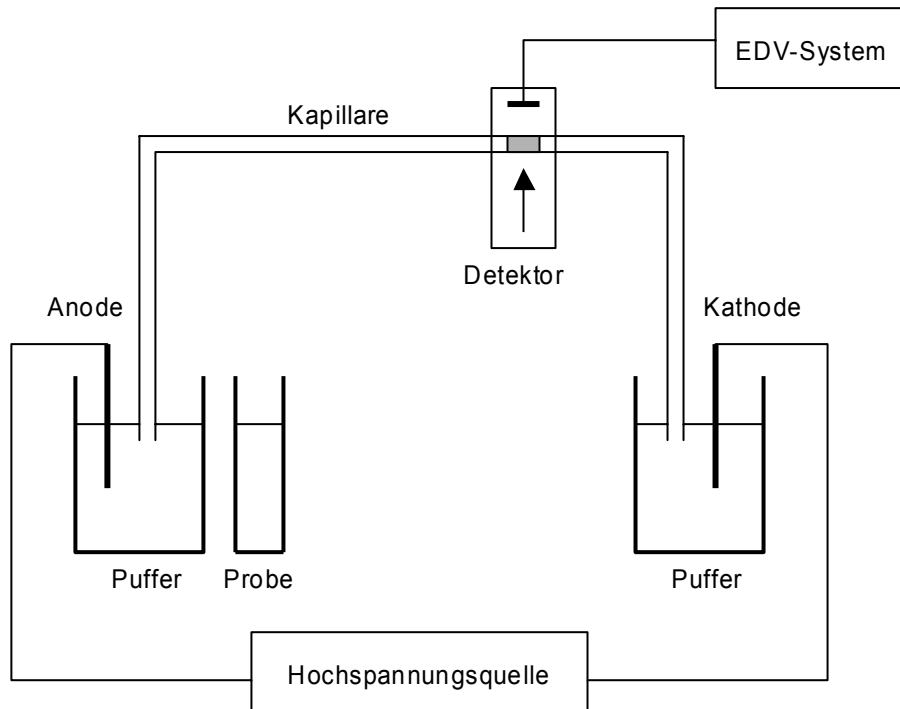


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Grundbausteine einer CE.

Abbildung 18 zeigt die wesentlichen Grundbausteine der Kapillarelektrophorese. Die Länge der Kapillare liegt in der Regel zwischen 30 und 60 cm und der Innendurchmesser beträgt 50 bis 100  $\mu\text{m}$ . Etwa 10 cm vor dem Auslassende befindet sich das Detektionsfenster (in der Abbildung grau unterlegt).

Die Kapillare wird vor jeder Messung gespült und mit Puffer aus dem Reservoir gefüllt. Anschließend wechselt das Einlassende der Kapillare in das Probengefäß und die Injektion der Probe erfolgt nun über Druck oder Spannung. Nach dem Rückwechsel in das Puffergefäß wird an die beiden Elektroden über eine Hochspannungsquelle eine Spannung von 5 bis 30 kV angelegt. Die Polung kann nach Bedarf in ihrer Richtung geändert werden. Die elektrophoretische Trennung der Probenlösung beginnt. Die Probe wird „online“, also noch in der Kapillare selbst detektiert. Hierzu stehen verschiedene Detektorvarianten zur Verfügung: z.B. Ultraviolett (UV), Photodiodenarray (PDA), laserinduzierte Fluoreszenz (LIF) und Massenspektrometrie (MS). Die Wahl des Detektortyps hängt in erster Linie vom Absorptionsbereich des Analyten aber auch von der Detektionsgrenze des Detektors bzw. der vorhandenen Probenkonzentration ab.

### 1.3.3 Chirale Trennung in der Kapillarelektrophorese

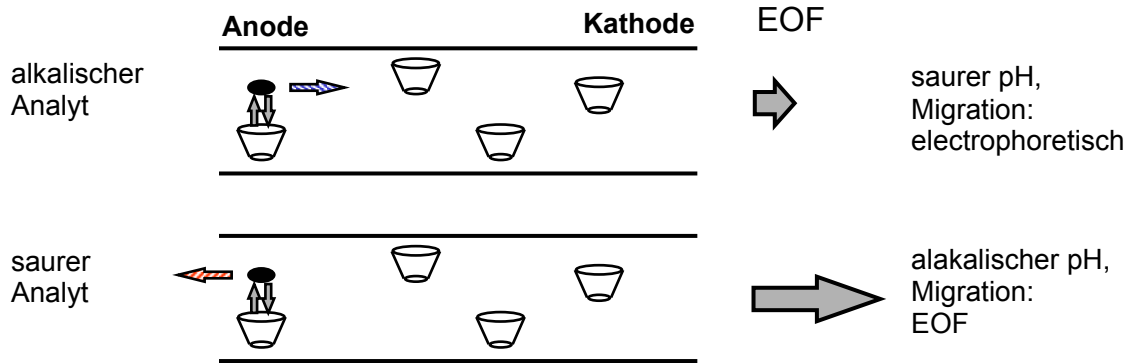
Von der Trennung von Enantiomeren mittels Kapillargelelektrophorese (CGE) berichtete erstmalig Guttman<sup>75</sup> und ein Jahr später mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE) Fanali.<sup>76</sup> Die freien Enantiomere besitzen die gleiche elektrophoretische Mobilität und somit die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit in der Kapillare. Bilden die Enantiomere mit Cyclodextrinen Einschlussverbindungen, so handelt es sich bei den neu gebildeten Komplexen, da CDs selbst chiral sind, um Diastereomere. Komplexe mit geladenen CDs können aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität getrennt werden. Ausschlaggebend für eine gute Trennung sind zum einen der Unterschied der elektrophoretischen Mobilitäten der zwischenzeitlich gebildeten Diastereomerenkomplexe, sowie zum anderen eine unterschiedliche Komplexstabilität, d.h. die unterschiedliche Verweilzeit des Enantiomers im Cyclodextrin.

Das Gastmolekül ist bestrebt, sich so in die CD-Kavität einzulagern, dass die Summe der Wechselwirkungskräfte maximiert wird. Die gesamte Wechselwirkung (WW) kann sich aus van der Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-WW, Wasserstoffbrücken und hydrophobe WW zusammensetzen. Dipole von Gast und Wirt werden bestrebt sein, eine anti-parallele Ausrichtung anzunehmen.<sup>77</sup> Hydrophobe bzw. van der Waals-WW treten vor allem im inneren der CD-Kavität auf. Alternativ kann man diese Wechselwirkungen, je nach Art der Substitution der OH-Gruppen z.B. größere organische Reste, auch zwischen den Substituenten und dem Gastmolekül beobachten. Wasserstoffbrücken treten beispielsweise zwischen den OH-Gruppen des CDs und einer Keto-Gruppe des Gastes auf. Für die Enantiomere von Carvon<sup>78</sup> wurden die WW-Energie für zwei verschiedene Einlagerungen berechnet: einmal so, dass die Keto-Gruppe mit den OH-Gruppen des oberen, weiteren Randes wechselwirkt (up) und einmal mit dem unteren, engeren Rand (down). Die Berechnungen lieferten folgende Zahlenwerte in kJ/mol: S-down -87, R-down -73 und S-up -76, R-up -76. Die Ergebnisse zeigen, dass sich zwischen S- und R-Carvon nur dann eine Energiedifferenz ergibt, wenn die Ketofunktion mit dem unteren Rand des CDs in Wechselwirkung tritt. Neben der Art und Weise, wie sich das Gastmolekül in die CD-Kavität einlagern kann ist die Stabilitätskonstante  $K_C$  des ausgebildeten Komplexes der zweite wichtige Parameter. Diese kann z.B. mit Hilfe der UV-Spektroskopie bestimmt werden, wie es im Fall der Enantiomere von Terbutalin/Hydroxypropyl- $\beta$ -CD gemacht wurde:  $R = 236 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $S = 332 \text{ M}^{-1}$ .<sup>79</sup>

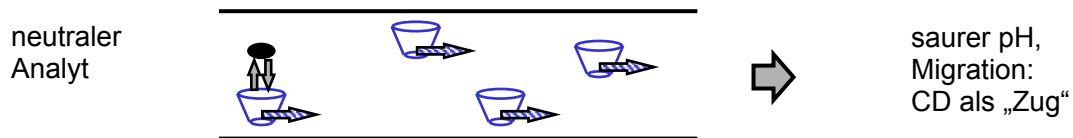
Ebenfalls mit der UV-Methode und zusätzlich mit HPLC wurde  $K_C$  für die Enantiomerenkomplexe von Metoprolol/Carboxymethyl- $\beta$ -CD bestimmt: UV:  $R = 244 / S = 231 \text{ M}^{-1}$  und HPLC:  $R = 362 / S = 332 \text{ M}^{-1}$ .<sup>80</sup>

In der CE kann man in Bezug auf die Ladung des eingesetzten Cyclodextrins drei Fälle unterscheiden: neutral, positiv oder negativ geladen. Eine weitere Differenzierung ist nach dem pH-Wert des Hintergrundelektrolyten (BGE) möglich. Diese Parameter sind für das Migrationsverhalten des Analyten ausschlaggebend.

### Neutrale CDs



### Positiv geladene CDs



### Negativ geladene CDs

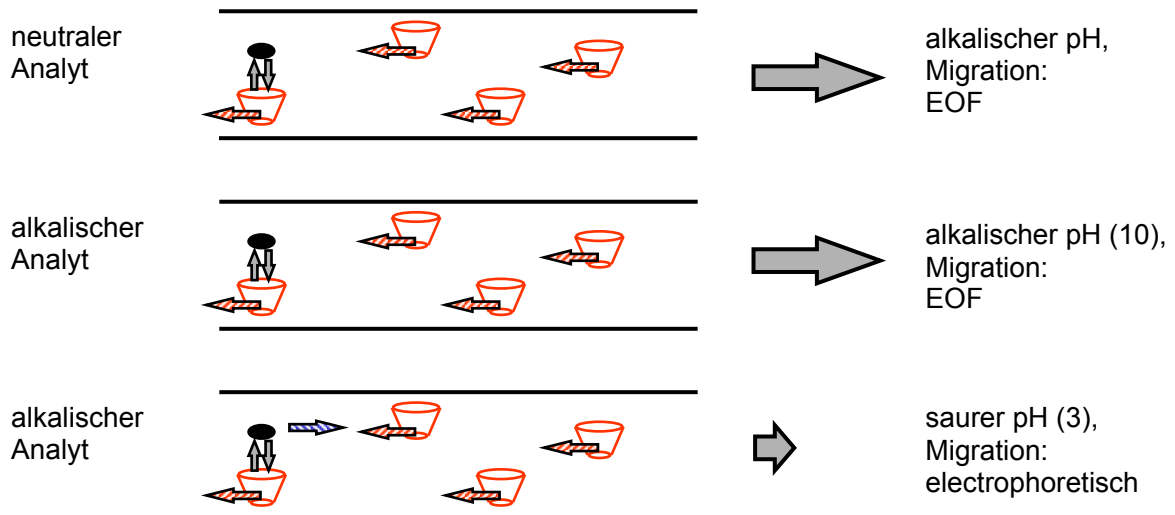


Abbildung 19: Übersicht über die verschiedenen Migrationsverhalten untergliedert nach der CD-Ladung bzw. Analytenbasizität.

Beim Einsatz von neutralen CDs tragen diese nicht zum aktiven Analytentransport bei. Sie verhalten sich wie eine quasi stationäre Phase. Ein Analyt hat hier zwei Möglichkeiten zur Kathode zu gelangen: Ist der Analyt basisch, so ist er auf Grund

seiner Basizität und dem sauren pH-Wert des BGE selbst positiv geladen und wandert aufgrund seiner elektrophoretischen Mobilität zur Kathode. Ist der Analyt sauer, so wird er durch den EOF, der auf Grund des alkalischen BGE vorliegt, zur Kathode transportiert, obwohl der saure Analyt eine negative Eigenladung trägt.

Ist das eingesetzte CD positiv geladen, so wandert es aus elektrophoretischen Gründen zur Kathode; es kann aktiv zum Analytentransport beitragen. Die eingelagerte Substanz kann das Cyclodextrin als „Mitfahrgelegenheit“ nutzen.

Verwendet man hingegen ein negativ geladenes CD, wandert es aufgrund seiner elektrophoretischen Mobilität Richtung Anode. Im Alkalischen liegt jedoch ein starker EOF vor, so dass die Probe dennoch zum Detektor gelangt. Liegt ein saurer Puffer vor und handelt es sich um einen basischen Analyten, so wandert dieser aus eigener Kraft auf Grund seiner positiven Eigenladung Richtung Kathode.

Ein quantitativer Ansatz zur Beschreibung der Trennleistung von Enantiomeren unter Einsatz von geladenen Cyclodextrinen wurde von Williams und Vigh<sup>81</sup> entwickelt. Das so genannte CHARM-Modell („charged resolving agent migration“) zeigt, dass bei gleicher enantioselektiven Wechselwirkung geladene CDs eine besseren Auflösung erzielen, als ungeladene. Die Trennung von starken Elektrolyten, d.h. Analyten, die voll dissoziiert vorliegen, mit mehrfach geladenen CDs in Abwesenheit eines EOFs beim Einsatz von neutral beschichteten Kapillaren führt unabhängig vom pH-Wert zu ähnlichen Auflösungen. Für schwache Elektrolyte zeigt sich eine hohe Auflösung bei einem niedrigen pH-Wert für die nicht ionenselektive Trennung von schwachen Säuren und die ionenselektive Trennung von schwachen Basen. Hingegen findet man eine gute Trennung bei hohen pH-Werten für die ionenselektive Trennung von schwachen Säuren und die nicht ionenselektive Trennung von schwachen Basen.

Ziel jeder Trennung ist es, eine hohe Auflösung („resolution“:  $R_s$ ) zu erreichen, was in diesem Falle eine große Differenz in der Migrationszeit der beiden Enantiomeren bedeutet. Ab einer Auflösung von 1.4 sind die zwei Peaks basislinien getrennt. Die Auflösung lässt sich berechnen durch:

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1}$$

mit  $t_{1/2}$ : Migrationszeit und  $w_{1/2}$ : Basislinienbreite des Peaks [Zeit].

Liegt das Gemisch nicht als Racemat vor, und man will die Anteile der beiden Enantiomeren angeben, so berechnet man den so genannten Enantiomerenüberschuss (ee [%]), hier angegeben für das Beispiel, dass das *R*-Enantiomer im Überschuss vorliegt:

$$ee = \frac{R - S}{R + S} \cdot 100$$

*R*: Peakfläche des überschüssigen Enantiomers

*S*: Peakfläche des zu geringerem Anteil vorhandenen Enantiomers

Je größer jedoch der Überschuss eines Enantiomers ist, desto größer muss die erzielte Auflösung sein, um eine Basislinientrennung der beiden Peaks zu erreichen und somit eine Quantifizierung des Überschusses zu ermöglichen.<sup>82</sup>

### 1.3.4 Entwicklung einer Trennmethode

Bevor man sich der Trennung widmen kann, muss man sich im ersten Schritt des Entwicklungsprozesses ein „gutes“ Ausgangselektropherogramm erarbeiten. Dies ist der Fall, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind: 1) Die Grundlinie sollte möglichst rauscharm sein. Sie wird durch den Hintergrundelektrolyten bestimmt. Hier ist die richtige Wahl des Puffersystems, sowie der Lösung, mit der der pH-Wert eingestellt wird, ausschlaggebend. 2) Der Peak (noch ist kein chiraler Selektor vorhanden und deshalb sollte auch nur ein einziger Peak zu sehen sein) sollte möglichst schmal sein und eine Gaußform besitzen. Die Form ist vom Hintergrundelektrolyten sowie teilweise von der injizierten Probenmenge abhängig. 3) Das Signal sollte bei einer kurzen Kapillare innerhalb von 20 Minuten detektiert werden. Die Migrationszeit der Probe hängt von dem zurückzulegenden Weg, der Länge der Kapillare bis zum Detektor sowie von der Wanderungsgeschwindigkeit ab. Letztere wiederum wird bestimmt durch die Eigenladung der Probe, abhängig vom pK<sub>a</sub>-Wert der Probe, der elektrophoretischen Mobilität, die von der Größe des Moleküls abhängt, sowie vom Stromfluss und dem pH-Wert des Hintergrundelektrolyten. Der Strom lässt sich über die angelegte Spannung sowie die Konzentration des Hintergrundelektrolyten steuern.

Hat man diese Parameter so eingestellt, dass man ein gutes Signal erhält, kann man im zweiten Schritt der Methodenentwicklung die Trennung der Enantiomeren in

Angriff nehmen. Man wird mit der Zugabe der Cyclodextrine zum dem in Schritt eins optimierten BGE in einer geringen Konzentration von jeweils 1 mmol/l starten. Wird keine Trennung sichtbar, springt man direkt auf eine hohe CD-Konzentration, z.B. 10 mmol/l. Ist eine Antrennung zu erkennen, so nimmt man diese CDs und variiert ihre Konzentration in kleinen Schritten (2 mmol/l). Kommt es nach der Optimierung der CD-Konzentration noch immer zu keiner Basislinientrennung, so muss man die Länge der Kapillare erhöhen. Man sollte jedoch, um Zeit bei den ersten Probenläufen zu sparen, erst einmal mit einer kurzen Kapillare starten. Weitere Möglichkeiten die Migrationszeit zu erhöhen und eine Basislinientrennung zu erzielen, bestehen im Herabsetzen der Temperatur, d.h. im Kühlen der Kapillare, oder in der Reduktion des Stroms, was über die angelegte Spannung oder die Konzentration des Hintergrundelektrolyten erfolgen kann. Bei Zusatz von geladenen Cyclodextrinen muss auf Grund der jetzt gestiegenen Zahl der Ladungsträger im Hintergrundelektrolyten die Spannung der Ausgangsmethode noch einmal nachoptimiert werden. Liegt nur noch eine kleine Überlappung der Enantiomerenpeaks vor, und sind diese sehr breit, so kann eine Reduktion der Injektionsmenge, durch Herabsetzen der Injektionszeit, zur Basislinientrennung führen. Des Weiteren kann man versuchen, die Auflösung durch Zusatz organischer Lösungsmittel, so genannter „organic modifier“,<sup>83</sup> wie Methanol, Isopropanol oder Acetonitril zu steigern. Dies führt immer dann zum Erfolg, wenn eine Basislinientrennung der Enantiomeren aufgrund zu starker Komplexbildung mit dem CD nicht erreicht werden konnte. Die zugefügten Lösungsmittel konkurrieren mit dem Analyten um die Einlagerung in die CD-Kavität und senken dadurch die Komplexbildungsrate, wodurch häufig eine bessere Trennung erzielt werden kann.

Hat man bis hier keinen Trennungserfolg erzielt, empfiehlt es sich eine neue Ausgangsmethode, am besten im entgegengesetzten pH-Bereich, zu entwickeln.

## 2. Analytik

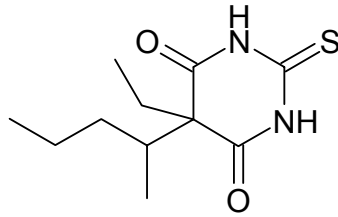
### 2.1 Thiobarbiturate

#### 2.1.1 Die Probe

Thiobarbiturate werden als Injektionsnarkotikum vor allem für die Einleitung der Narkose verwendet. Aus der Gruppe der Barbiturate werden in der Anästhesie nur noch N-methyliertes Methohexital (Brevimytal® Natrium) und Thiopental (Trapanal®) eingesetzt. Der Vorteil der Barbituratnarkosen besteht im sofortigen Eintreten der Wirkung. Bei der intravenösen Injektion reichert sich das Barbitursäurederivat rasch im Zentralnervensystem an, die Wirkung klingt aber auch rasch wieder ab. Für die Dauer der Narkose ist die Umverteilung vom Gehirn in das Plasma und die Muskulatur maßgebend. Trotz der hohen Lipophilie des Thiopentals wird erst nach Stunden das Verteilungsgleichgewicht zwischen Plasma und Fettgewebe eingestellt. Thiopental-Natrium wird nur für die Einleitung einer Narkose eingesetzt. Es ist nicht für eine länger dauernde Narkose geeignet. Um eine Narkose einzuleiten, müssen 0,05 – 0,1 g (2 – 4 ml einer 2,5 prozentigen Lösung) injiziert werden.

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist der eigentliche Wirkmechanismus der Barbiturate bezüglich ihrer narkotischen Wirkung noch nicht aufgeklärt. Sie scheinen das Membranpotential von Nervenzellen zu stabilisieren. Dies geschieht vermutlich unter anderem durch Förderung der Funktion der inhibitorischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, wodurch die Erregbarkeit der Neuronen durch Überträgersubstanzen vermindert wird. Barbiturate kommen deshalb als Antiepileptika und als Schlafmittel zum Einsatz. Der Wirkmechanismus der antiepileptischen Wirkungsweise hingegen ist bekannt. Die Barbiturate binden an den GABA-Rezeptor. Sie wirken dort als allosterische Modulatoren von GABA und beeinflussen so die Öffnung des Cl<sup>-</sup>-Kanals. Die Ausbildung des GABA-Barbiturat-Komplexes führt zu einem verstärkten Einstrom von Chloridionen und damit zu einer Hyperpolarisation der Nervenzellen. Die Bindungsstelle ist spezifisch, stereoselektiv und entspricht nicht der der Benzodiazepine.



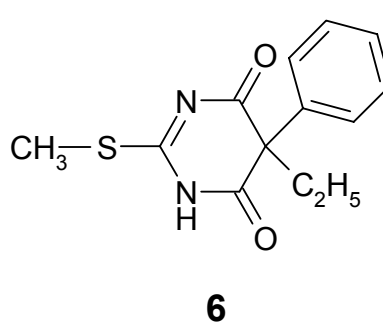
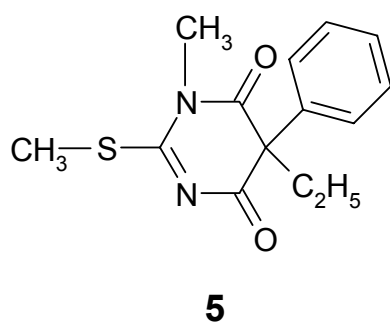
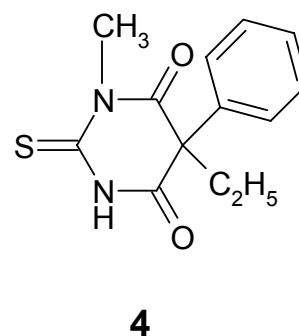
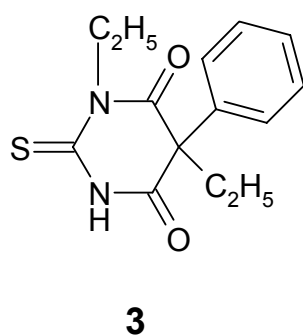
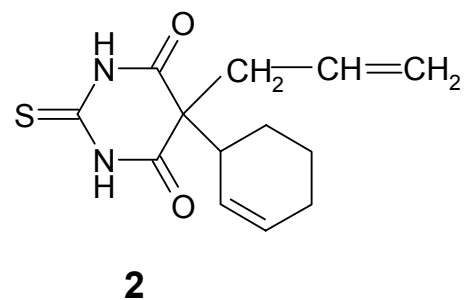
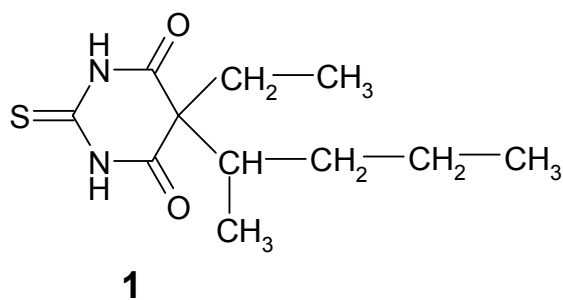


Thiopental ist chiral, wobei die Chiralität durch die verzweigte Seitenkette gegeben ist. Das *S*-Enantiomer ist stärker narkotisch wirksam als das *R*-Enantiomer.<sup>84-88</sup> Die unterschiedliche Wirkungsweise der Barbiturat-Enantiomere auf das zentrale Nervensystem des Menschen wurde bereits in den 70er Jahren von Knabe<sup>89,90</sup> erforscht. Er konnte zeigen, dass das *R*-Enantiomer von *N*-Methyl-5-butyl-5-phenylbaributsäure narkotisch wirksam ist, wohingegen das *S*-Enantiomer konvulsiv ist.

Aus Thiopental entsteht metabolisch durch den Austausch des Schwefels gegen Sauerstoff Pentobarbital.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs verschiedene Thiobarbiturate untersucht. Bei den Substanzen **1** und **2** ist das Chiralitätszentrum in der Seitenkette, während bei den restlichen vier Verbindungen, aufgrund der unsymmetrischen Substitution des Rings, das Chiralitätszentrum im Ring zu finden ist.

Das Ziel war es, CE-Methoden zur Trennung der Enantiomeren dieser sechs Barbiturate zu entwickeln, und insbesondere den Einfluss der Konzentration des als chiralen Selektor zugesetzten Cyclodextrins zu untersuchen.



## 2.1.2 Die Methode

### *Chemikalien*

Thiopental (5-Ethyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbitursäure) und Thialbarbital (5-Allyl-5-(2-cyclohexenyl)-2-thiobarbitursäure) wurden von Abbott (North Chicago, IL, USA) bezogen. 1,5-Diethyl-5-phenyl-2-thiobarbitursäure and 5-Ethyl-1-methyl-5-phenyl-2-thiobarbitursäure wurden durch Kondensation von Diethyl-ethylphenylmalonat mit N-Ethylthioharnstoff bzw. N-Methylharnstoff hergestellt. S-Methyl- und N,S-Dimethyl-5-ethyl-5-phenyl-2-thiobarbitursäure wurden durch Methylierung von 5-Ethyl-5-phenylbarbitursäure synthetisiert.<sup>91</sup>

$\alpha$ - ,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD waren eine Spende des Konsortiums für Elektrochemische Industrie (Burghausen, Deutschland). *Heptakis*-(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD (HDAS) und *Heptakis*-(2,3-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD (HDMS) wurden von Regis (Regis Technologies, Inc., Morton Grove, USA) und *Heptakis*-(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD (DM) von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Das Dinatriumhydrogenphosphat (p.a.) wurde ebenfalls bei Fluka gekauft.

### *CE-Parameter*

Die Experimente wurden mit einem Beckman P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA) durchgeführt. Die eingesetzte Quarzglas Kapillare (BGB Analytik, Schloßböckelheim) hatte eine Gesamtlänge von 60.2 cm bzw. eine Länge von 50 cm bis zum Detektor. Der Innendurchmesser der Kapillare betrug 50  $\mu$ m. Die Injektionszeit der Proben war 5 s. Die Trennung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und einer Spannung von 20 kV. Das Signal wurde bei 220 nm mit einem Dioden-Array-Detektor (PDA) aufgenommen. Die Kapillare wurde vor jeder Messreihe für 20 Minuten mit 0.1 M NaOH und 10 Minuten mit Milliporewasser konditioniert. Vor jeder Messungen wurde sie für 5 Minuten mit 0.1 M NaOH, 5 Minute mit Wasser nochmals für 2 Minuten mit 0.1 M NaOH und 1 Minute mit Wasser und abschließend für 2 Minuten mit dem entsprechenden Hintergrundelektrolyt gespült. Eine 100 mM Lösung von Dinatriumhydrogenphosphat mit einem pH von 9.4 wurde als Hintergrundelektrolyt eingesetzt. Die Auflösung in Abhängigkeit von der CD-Konzentration wurde über einen Konzentrationsbereich von 1 mM bis 15 mM bzw. 18 mM getestet. Die Probenvorbereitung erfolgte durch Lösen von 1 mg Barbiturat in 1 ml Methanol. 250  $\mu$ l dieser Lösung wurden anschließend mit Milliporewasser auf 5 ml verdünnt. Vor dem Einsatz wurden die cyclodextrin-haltigen Pufferlösungen mit einen 0.22  $\mu$ m Spritzenfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefiltert.

### **2.1.3 Die Ergebnisse**

In Vorversuchen wurden verschiedene alkalische Puffersysteme im pH-Bereich von 8.0 bis 9.5 getestet wie TAPS, TRIS,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Letzterer erwies sich für diese Versuche aufgrund seines Pufferbereiches und der glättesten Basislinie am besten geeignet. Der Phosphatpuffer wurde anschließend bei drei verschiedenen pH-Wert verwendet. Bei pH 3 konnte kein Signal detektiert werden,

was zu erwarten war, da Barbiturate auf Grund ihrer fehlenden elektrophoretischen Mobilität nicht zur Kathode wandern können, und somit ein EOF, also ein pH-Wert größer als 4 nötig ist. Bei pH 9 erfolgte die Einstellung des Puffers mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , was zu einem merklichen Rauschen in der Grundlinie führte. Die Entscheidung fiel somit auf einen 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, dessen natürlicher pH-Wert bei 9.4 liegt.

In den folgenden Abbildungen ist die eingesetzte CD-Konzentration des jeweils verwendeten Cyclodextrins gegen die Auflösung ( $R_s$ ) aufgetragen. Sie muss mindestens 1.4 betragen, um eine Basislinientrennung zu erhalten.  $\alpha$ -CD und  $\beta$ -CD wurden jeweils in Konzentrationen bis 15 mM getestet  $\gamma$ -CD, DM und HDMS bis 18 mM. Die Nummern in der Legende entsprechen den zugehörigen Thiobarbituraten (siehe Abb. 20 - 24). In den Graphen sind nur die Messpunkte mit  $R_s > 1$  abgebildet.

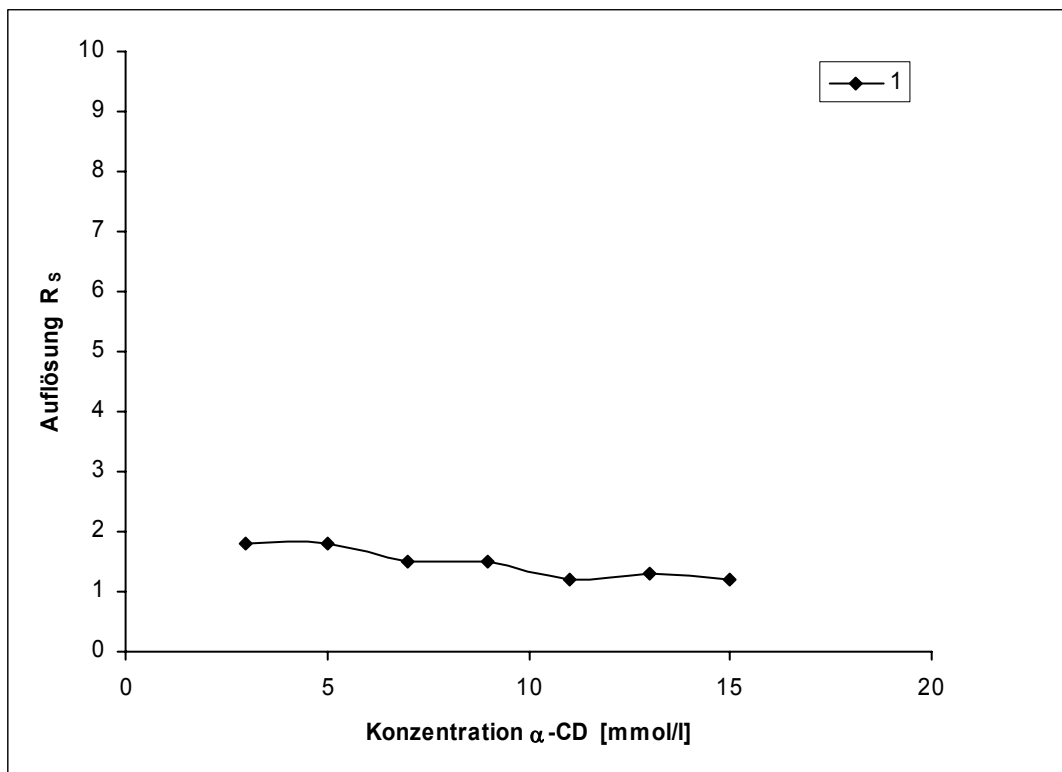


Abbildung 20: Auflösung  $R_s$  in Abhängigkeit der  $\alpha$ -CD-Konzentration

Mit Ausnahme von **1** konnte mit  $\alpha$ -CD keines der Barbituratracemate getrennt werden. Wie aus der Abbildung ersichtlich konnte selbst bei **1** keine Auflösung über zwei erzielt werden, auch nicht mit sehr hohen CD-Konzentrationen. Es wurde aber zumindest für dieses Molekül eine Basislinientrennung erreicht.  $\alpha$ -CD, welches nur

aus sechs Monomeren besteht, ist vom Innendurchmesser das kleinste der hier eingesetzten CDs. Es kann nur gut mit solchen Molekülen in Wechselwirkung treten, die über kleine, bezüglich des Volumen nicht der Länge, Reste verfügen. **1** hat eine lange Seitenkette, die nach dem Chiralitätszentrum nicht mehr verzweigt ist. Dies ermöglicht eine tiefe Einlagerung in die Kavität und somit eine gute Möglichkeit der Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen in Inneren des CDs. Das Chiralitätszentrums befindet sich in der Nähe des Cyclodextrinrandes, was letztendlich für die Basislinientrennung ausschlaggebend gewesen sein könnte.

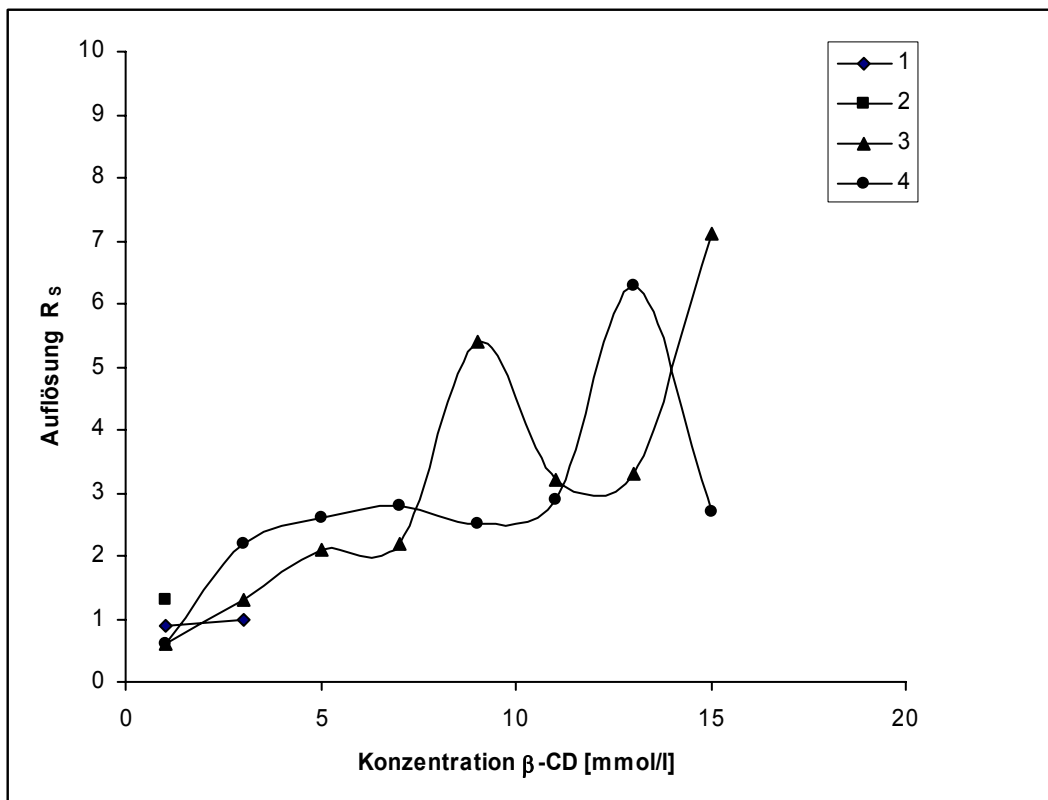


Abbildung 21: Auflösung  $R_s$  in Abhängigkeit der  $\beta$ -CD-Konzentration

Im Gegensatz zu  $\alpha$ -CD konnte mit  $\beta$ -CD für **1** keine Basislinientrennung erzielt werden. Für **1** und **2** wurde bei kleinen CD-Konzentrationen nur eine Antrennung beobachtet. Bei größeren Konzentrationen konnte nicht einmal mehr diese erzielt werden. Anders jedoch bei den Molekülen **3** und **4**, für die jeweils sehr gute Auflösungen fast über den gesamten Konzentrationsbereich zu sehen sind. Für **3** ist ein lokales Maximum bei 9 mM und ein weiteres über dem ersten liegendes Maximum bei der höchsten verwendeten Konzentration von 15 mM zu beobachten.

Das Trennmaximum von **4** liegt bei einer Konzentration von 13 mM. Für die Moleküle **5** und **6** konnte mit den getesteten CD-Konzentrationen keine Trennung erreicht werden.

$\beta$ -CD besteht aus einem Glukose-Monomer mehr als  $\alpha$ -CD und verfügt somit über eine größere Kavität. Es ist von seinem Innendurchmesser am besten geeignet, Moleküle in der Größe eines Phenyl- oder Naphthylrestes so einzulagern, dass daraus eine erfolgreiche Trennung resultiert. Die am Schwefelatom unsubstituierten Thiobarbiturate **1** – **4** können offensichtlich besser in Wechselwirkung mit  $\beta$ -CD treten als die Verbindungen **5** und **6**. Vergleicht man insbesondere das Barbituratpaar **4** (max.  $R_s = 6$ ) und **5** ( $R_s = 0$ ), so liegt nahe zu vermuten, dass der Schwefel an der Wechselwirkung beteiligt ist. **5** und **6** waren wohl aufgrund des Substituenten am Schwefelatom nicht in der Lage mit  $\beta$ -CD ausreichend wechselzuwirken.

Das Phänomen des doppelten Maximums bei **3** könnte dafür sprechen, dass zwei verschiedene Komplexe gebildet werden. Es könnte neben dem 1:1-Komplexe zusätzlich der Fall auftreten, dass hier auch Wechselwirkungen mit zwei CDs gleichzeitig eingegangen werden.

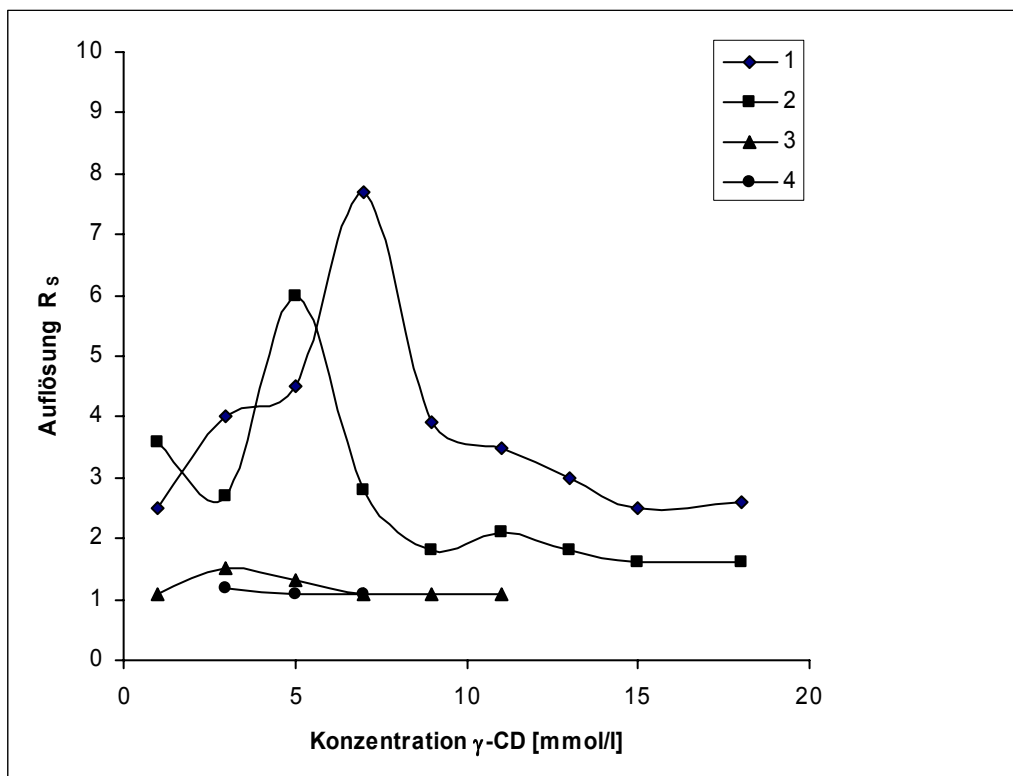


Abbildung 22: Auflösung  $R_s$  in Abhängigkeit der  $\gamma$ -CD-Konzentration

Betrachtet man nun die Trennleistung von  $\gamma$ -CD, so zeigt sich ein fast umgekehrtes Bild im Vergleich zu  $\beta$ -CD. Die zuvor sehr gut getrennten Enantiomerenpaare **3** und **4** kommen hier über die „1.5-Marke“ für die Auflösung nicht hinaus. Während dessen die mit  $\beta$ -CD nur angetrennten Barbiturate **1** und **2** hier hervorragend getrennt werden. Die Kavität des  $\gamma$ -CD ist nochmals größer als die von  $\beta$ -CD. Das höhere Maß an Flexibilität führte bei **1** und **2** offenbar zu einer besseren Differenzierung der Enantiomeren. Die mit  $\beta$ -CD möglicherweise nur in einer eher lockeren Wechselwirkung stehenden, aufgrund ihrer N-Substituenten größeren Moleküle **3** und **4** können jetzt durch den vergrößerten Innenraum ganz eingelagert werden, was zu einer starrereren Wechselwirkung wie zuvor und somit zu einer geringen Trennleistung führen kann.

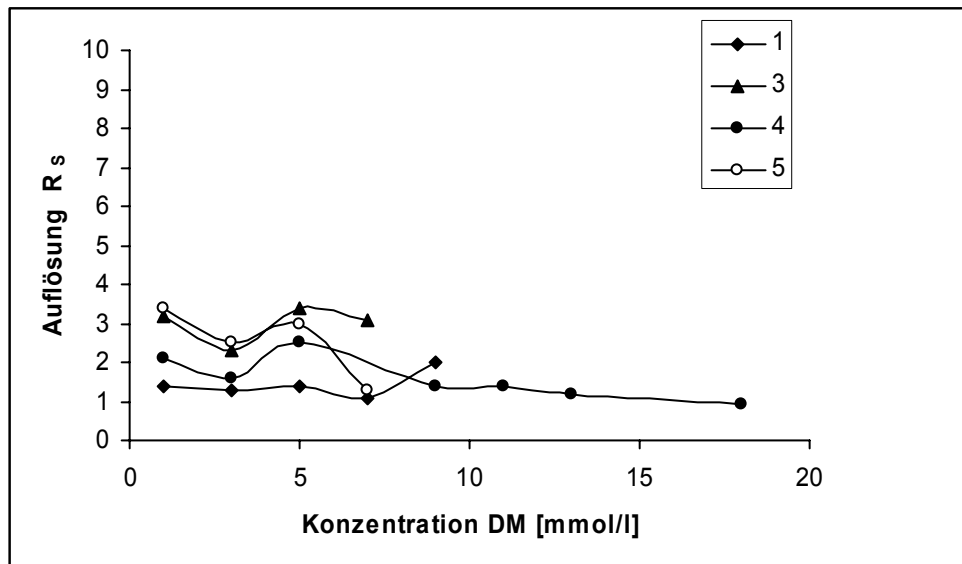


Abbildung 23: Auflösung  $R_s$  in Abhängigkeit der DM-Konzentration

Das 2,6-dimethylierte  $\beta$ -CD (DM) zeigt bereits bei einer Konzentration von 1 mM für immerhin vier Thiobarbiturate gute Auflösung. Lediglich bei **1** musste die Konzentration erhöht werden, um eine Basislinientrennung zu erhalten. **2** hingegen fällt hier ganz aus dem Muster und konnte nur bei der kleinsten der eingesetzten Konzentrationen angetrennt werden ( $R_s = 0.9$ , nicht abgebildet). Mit Ausnahme von **1** zeigten alle anderen Moleküle ab einer Konzentration von 5 mM eine mit weiter steigender CD-Konzentration tendenziell fallende Auflösung. Die Enantiomeren von **5** konnten ausschließlich mit diesem CD getrennt werden. Man kann die O-

Methylierung in 2-Position als eine Verlängerung des oberen CD-Randes betrachten, was dem Molekül, welches nicht in die Kavität des CDs eintauchen kann, jetzt immerhin eine kleine, hydrophobe Wechselwirkungsmöglichkeit mit dem CD gibt. Mit DM konnten die N-alkylierten Barbiturate **3** – **5** gut getrennt werden.

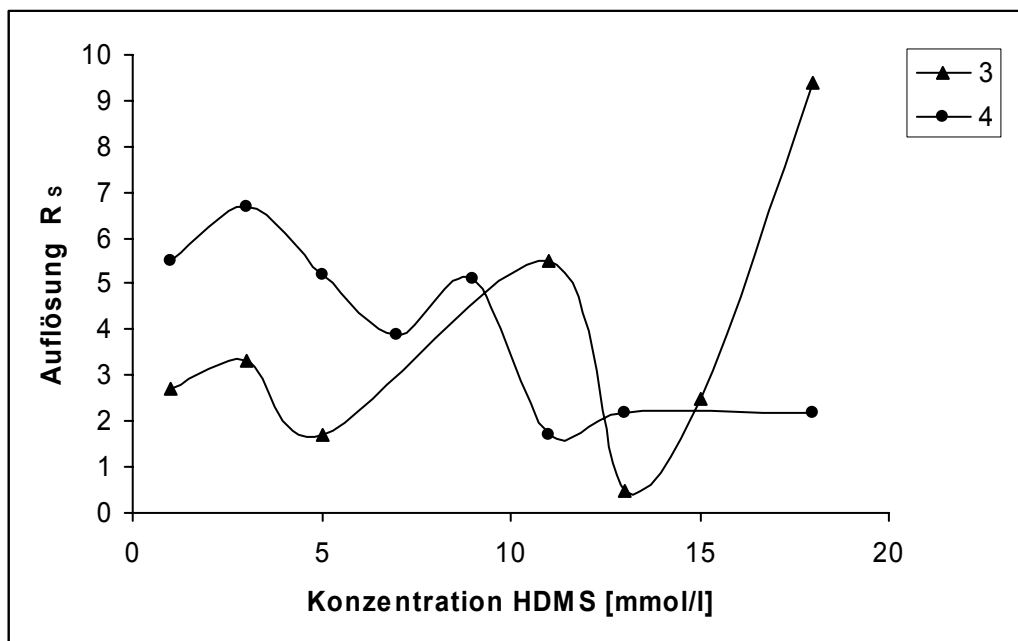


Abbildung 24: Auflösung  $R_s$  in Abhängigkeit der HDMS-Konzentration

Bei *Heptakis*-(2,3-di-*O*-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin (HDMS) handelt es sich um ein geladenes CD, welches bei einem pH-Wert von 9.4 vollständig deprotoniert vorliegt, d.h. siebenfach negativ geladen ist. Die Enantiomere von **1** und **2** zeigten keine Trennung über den gesamten Konzentrationsbereich. Die von **3** und **4** hingegen konnten sehr gut getrennt werden. Während **4** schon sein Maximum bei 3 mM findet, ist das von **3** erst bei der höchsten getesteten Konzentration von 18 mM erreicht. Bei beiden Verbindungen kann man mehr als ein Maximum finden, was für **3** bereits bei  $\beta$ -CD beobachtet werden konnte. Wie in der Abbildung auch zu erkennen ist, wurden beim Einsatz von HDMS die größten Schwankungen in der Auflösung gefunden. Des weiteren benötigten die Proben beim Durchlaufen der mit dem negativ geladene CDs versetzten Pufferlösung deutlich längere Zeiten verglichen mit den neutralen CDs (vgl. Tabelle 1), was darauf zurückzuführen ist, dass sich erstere auf Grund ihrer Ladung während der Trennung Richtung Anode bewegen.



Der Einsatz von HDAS führte bei keinem der getesteten Thiobarbiturate zu einer Trennung.

Die folgenden Abbildungen zeigen jetzt exemplarisch Läufe mit  $\gamma$ -CD bzw. DM als chiralen Selektor bei jeweils einer ausgewählten Konzentration.

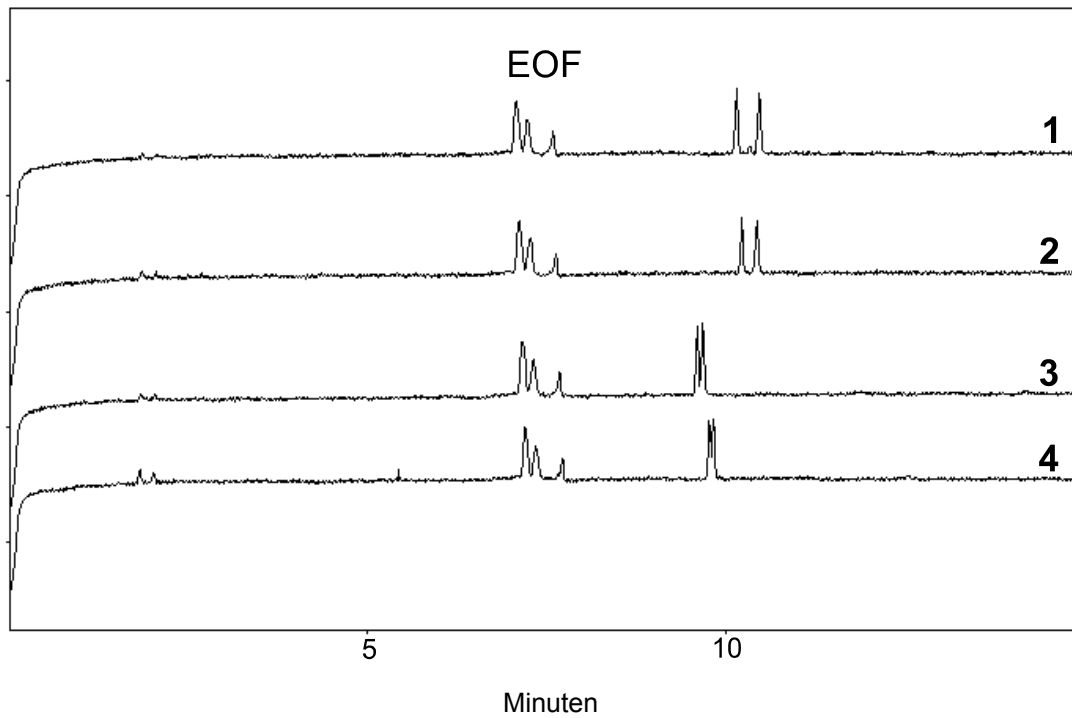


Abbildung 25: Elektropherogramme der Verbindungen **1** – **4** erzielt durch den Zusatz von 7 mM  $\gamma$ -CD zum 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer von pH 9.4

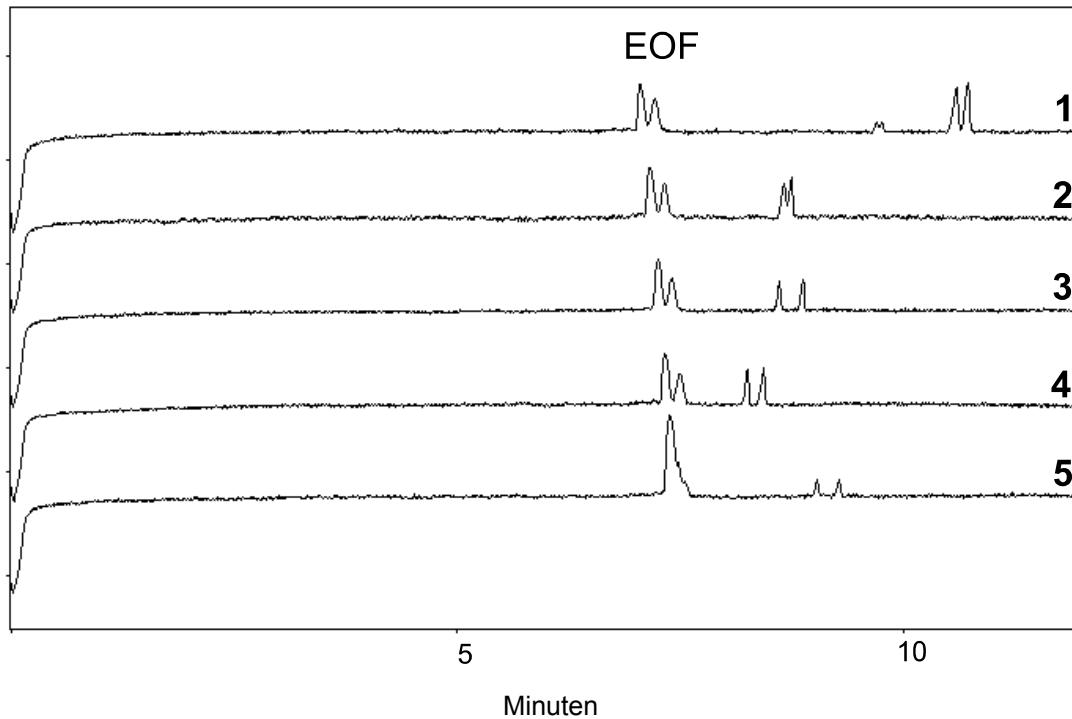


Abbildung 26: Elektropherogramme der Verbindungen **1** – **5** erzielt durch den Zusatz von 1mM DM zum 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer von pH 9.4

Die anschließende Tabelle zeigt noch einmal ausgewählte Trennungen, die hier zum direkten Vergleich miteinander gelistet sind.

Tabelle 1: Übersicht von ausgewählten Ergebnissen

Probe	CD	Konzentration [mmol/l]	MigZeit t <sub>M1</sub> [min]	MigZeit t <sub>M2</sub> [min]	Auflösung R <sub>S</sub>
<b>1</b>	α	3	10.71	10.86	1.8
<b>1</b>	γ	5	10.54	10.91	4.5
<b>2</b>	γ	5	10.66	10.91	6.0
<b>3</b>	β	13	9.09	9.29	3.3
<b>4</b>	β	13	8.88	9.06	6.3
<b>3</b>	DM	5	7.78	7.88	3.4
<b>4</b>	DM	5	7.70	7.76	2.5
<b>3</b>	HDMS	3	12.85	13.22	3.3
<b>4</b>	HDMS	3	13.08	13.87	6.7

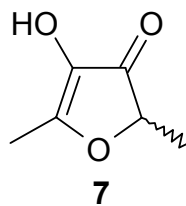
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Thiobarbiturate **1** und **2** sowie **3** und **4** jeweils paarweise ähnliches Trennverhalten gezeigt haben, wobei sich die Paare untereinander im gegenseitigen Vergleich deutlich unterschieden. **1** und **2** zeigten mit dem größten CD,  $\gamma$ -CD, eine sehr gute Trennung, wohingegen **3** und **4** sowohl mit  $\beta$ -CD wie auch mit den beiden  $\beta$ -Derivaten, DM und HDMS, gut getrennt werden konnten. Das S-substituierte Barbiturat **5** konnte lediglich mit einem CD, mit DM, getrennt werden, das zweite S-substituierte, **6**, mit keinem der verwendeten CDs.

## 2.2 Furaneol

### 2.2.1 Die Probe

Furaneol, 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon, ist ein weit verbreiteter natürlicher Aromastoff. Er wurde erstmalig in der Ananas identifiziert.<sup>92</sup> Mittlerweile wurde der Aromastoff auch in anderen Früchten wie der Himbeere,<sup>93</sup> der Mango<sup>94</sup> und der Passionsfrucht<sup>95</sup> ausfindig gemacht. Furaneol findet sich aber auch in anderen Naturprodukten wie Wein<sup>96</sup> und Tee.<sup>97</sup> Es stellt eines der Schlüsselaromen der Erdbeere<sup>98</sup> dar, dessen Gesamtaroma sich aus etwa 360 Bestandteilen zusammensetzt.<sup>99</sup> In der Erdbeere liegt Furaneol als Racemat vor, die Enantiomere weisen jedoch unterschiedliche Geruchscharakteristika auf. Das Aroma von beiden wird als malzig und süß beschrieben. Während dem einen zusätzlich ein Röstaroma zugesprochen wird, wird das andere Enantiomer als fruchtig klassifiziert.<sup>100</sup>

Reines Furaneol erhält man durch Isolierung aus oben genannten Nahrungsmitteln oder durch Fermentation unter Einsatz der Hefe *Zygosaccharomyces rouxii*.<sup>101</sup>



Zur Klärung der Biosynthese und –transformation von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanon (**7**) bzw. zur Bestimmung der Herkunft und aromatischen Variation des in Lebensmitteln sehr oft eingesetzten Aromastoffes ist es notwendig, das Verhältnis der beiden Enantiomere bestimmen zu können. Die Trennung gelang bereits durch Einsatz von multidimensionaler Gaschromatographie (MDGC) mit Hilfe einer cyclodextrin-modifizierten Phase, jedoch konnten die Enantiomerenanteile aufgrund einer Racemisierung im System nicht quantifiziert werden.<sup>102</sup>

Die Aufgabenstellung bestand in der Entwicklung einer CE-Methode, die eine Trennung und Quantifizierung der beiden Enantiomere in Extrakten aus Erdbeeren und aus *Zygosaccharomyces rouxii* ermöglicht. Des Weiteren sollte die Stabilität gegenüber Racemisierung in Abhängigkeit des pH-Wertes untersucht werden.

## 2.2.2 Die Methode

### *Chemikalien*

Furaneol-Referenzsubstanz (**a**) wurde von Aldrich (Deisendorf, Deutschland) bezogen, *Heptakis*-(2,3-*O*-diacetyl-6-*O*-sulfato)- $\beta$ -CD (HDAS), von Fluka (Deisendorf, Deutschland). Ammoniumacetat für den Hintergrundelektrolyten stammt von Merck (Darmstadt, Deutschland). Alle Lösungen wurden mit Milliporewasser hergestellt.

Neben der Referenz wurden zwei verschiedene Testproben vermessen: zum einen ein aus Erdbeeren extrahierte (**b**) und zum anderen eine mit *Zygosaccharomyces rouxii* (**c**) gezüchtete Furaneolprobe.

### *CE-Parameter*

Die Experimente wurden auf einem Beckman P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA) durchgeführt. Das Signal wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm mit einem variablen UV-Detektor aufgenommen. Die Quarzglaskapillare hat eine Gesamtlänge von 40.2 cm, eine Länge von 30 cm bis zum Detektor. Der Innendurchmesser betrug 50  $\mu$ m. Die Probe wurde für 10 Sekunden mit einem Druck von 0.5 psi injiziert und bei 25 °C mit einer Spannung von 10 kV getrennt. Die Konzentration des Ammoniumacetatpuffers betrug 50 mM; er wurde mit Essigsäure p.a. auf pH 4.0 eingestellt. *Heptakis*-(2,3-*O*-diacetyl-6-*O*-sulfato)- $\beta$ -CD (HDAS) wurden in einer Konzentration von 20 mM eingesetzt. Die Kapillare wurde zwischen den Läufen für 2 Minuten mit 0.1 NaOH und 2 weitere Minuten mit Laufpuffer gespült. Alle Lösungen wurden vor ihrem Einsatz durch einen Spritzenfilter 0.22  $\mu$ m gefiltert.

## 2.2.3 Die Ergebnisse

Es wurden Trennversuche mit folgenden CDs unternommen:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, DM, HDAS und HDMS. Nachdem anfängliche Versuche mit einer CD-Konzentration von 1 mM bei keinem der eingesetzten CDs zu einer Trennung führten, wurde die Konzentration auf 10 mM erhöht. Hier zeigte nur *Heptakis*-(2,3-*O*-diacetyl-6-*O*-sulfato)- $\beta$ -CD (HDAS) eine Antrennung. Die weiteren Optimierungen konzentrierten sich nun auf das Auffinden der optimalen HDAS-Konzentration, welche letztendlich mit 20 mM ermittelt wurde.

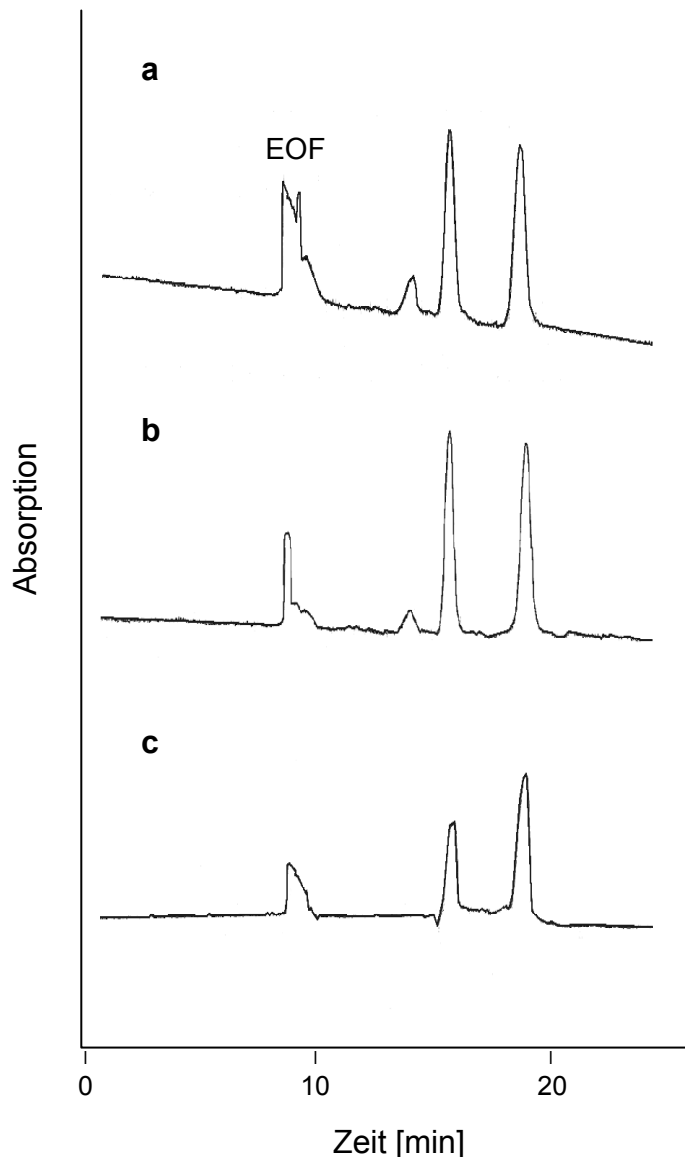


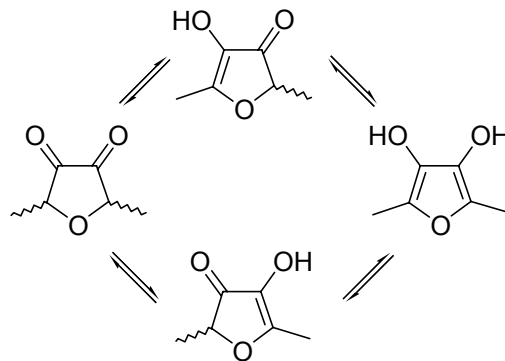
Abbildung 27: Elektropherogramme der drei Furaneolproben: Referenzprobe (**a**), das aus Erdbeeren isolierte Furaneol (**b**) und das mit Hilfe von *Z. rouxii* gewonnene (**c**). 50 mM NH<sub>4</sub>Ac-Puffer pH 4.0, 20 mM HDAS, 10 kV, 280 nm.

In der Abbildung sind drei Elektropherogramme dargestellt, und zwar von der gekauften Referenzprobe (**a**), von dem aus Erdbeeren isolierten Furaneol (**b**) und von dem mit Hilfe von *Z. rouxii* gewonnene Furaneol (**c**).

Es ist gut zu sehen, dass im Elektropherogramm **b** wie auch bei der Referenz **a** die Enantiomerenpeaks flächengleich sind, was bedeutet, dass Furaneol in der Erdbeere als Razemat vorliegt. Ebenso deutlich ist zu erkennen, dass dies in der dritten Probe

nicht der Fall ist. Der Enantiomerenüberschuß (ee) beträgt 40 % zugunsten des (+)-Enantiomers.

Furaneol unterliegt aufgrund einer Keto-Enol-Tautomerie der Racemisierung:



Um später zuverlässige Aussagen über die Enantiomerenverhältnisse machen zu können, ist es notwendig, die Proben unter Bedingungen zu handhaben, bei denen sie möglichst geringer Racemisierung unterliegen. Hierzu wurden Tests bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

Mit Hilfe chiraler HPLC (Nucleospher NT) wurde eine Probe auf 95 % ee angereichert. Anschließend wurde sie in wässrigen Pufferlösungen von verschiedenen pH-Werten gelöst: 2, 3,8, 5 und 7. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 50 Stunden gelagert und nach unterschiedlichen Zeiten vermessen (Abb. 28).

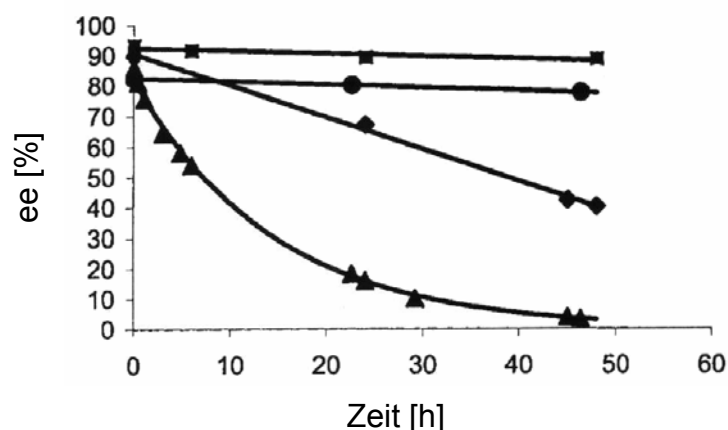


Abbildung 28: Zeitliches Racemisierungsverhalten von vier Furaneolproben, die bei verschiedenen pH-Werten gelagert wurden: pH 2 (◆), pH 3,8 (●), pH 5 (■), pH 7 (▲). 50 mM NH<sub>4</sub>Ac-Puffer pH 4,0, 20 mM HDAS, 10 kV, 280 nm.

Bei einem neutralen pH-Wert (pH 7; Abb. 28 ▲) konnte ein exponentieller Abfall des Enantiomerenüberschusses von anfänglich 86 % bis auf 3.5 % nach 48 Stunden beobachtet werden. Im stark Sauren (pH 2, Abb. 28 ◆) wurde ebenfalls ein deutlicher Abfall, von 90% auf 40 %, hier aber nur mit einer linear Kinetik, beobachtet. Bei den pH-Werten von 3.8 und 5 (Abb. 28 ● bzw. ■) zeigte sich die Probe über den gesamten Zeitraum recht stabil. Der ee verringerte sich lediglich von 83 % auf 79 % bzw. von 94 % auf 87%. Dieser pH-Bereich scheint somit für weitere Untersuchungen auch im Hinblick auf die Enzymaktivität am besten geeignet.

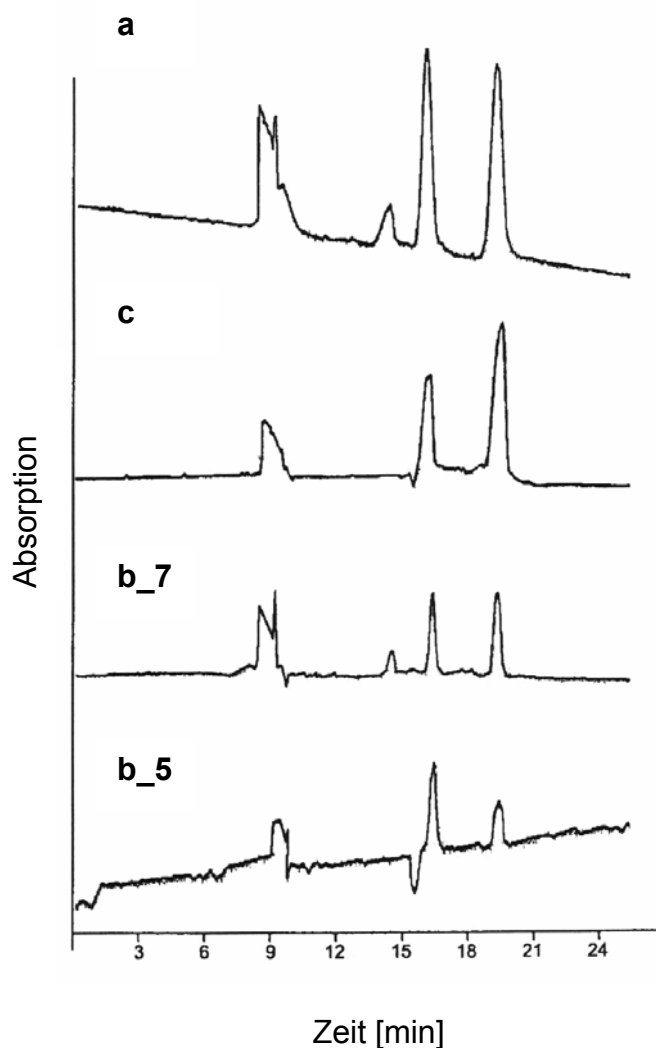


Abbildung 29: Elektropherogramme vier verschiedener Furaneolproben:

(a) Referenzsubstanz, (c) Furaneol gebildet von *Z. rouxii*, (b\_7) / (b\_5) Furaneol gebildet durch ein Erdbeerprotein bei den entsprechenden pH-Wert 5 und 7. 50 mM NH<sub>4</sub>Ac-Puffer pH 4.0, 20 mM HDAS, 10 kV, 280 nm.



Das erste Elektropherogramm in Abbildung 29 zeigt wie schon in Abbildung 27, die käuflich erworbene racemische Referenz (a). Die von *Z. rouxii* extrahierten Probensubstanz (c) wurden direkt in einen Ammoniumacetat-Puffer mit pH 4 überführt und in diesem vermessen, um einer Verfälschung der Ergebnisse durch Racemisierung nach der Isolierung entgegenzuwirken. Aufgrund der Annahme, dass mindestens ein Schritt der Biosynthese von Furaneol mit Hilfe der Hefe *Zygosaccharomyces rouxii* enzymatisch katalysiert wird, kann man von einer möglichen enantiomeren Anreicherung ausgehen. Das zweite Elektropherogramm (c) zeigt, einen Enantiomerenüberschuß von 27 %, was bedeutet, dass ein Enantiomer in *Zygosaccharomyces rouxii* im Überschuss gebildet wird. Die beiden letzten Elektropherogramme stellen beide von Erdbeerproteinextrakt gebildetes Furaneol dar. Das Erdbeerproteinextrakt wurde mit D-Fruktose-1,6-diphosphat und NADH einmal bei pH 5 (Abb. 29 b\_5) und in einem zweiten Versuch bei pH 7 (Abb. 29 b\_7) inkubiert. Das gebildete Furaneol wurde mit Diethylether extrahiert und ebenfalls in einem Hintergrundelektrolyten von pH 4 vermessen, um weitere Racemisierung zu unterbinden. Die bei pH 7 inkubierte Probe liegt als Racemat vor, in der bei pH 5 inkubierten Probe hingegen konnte ein Enantiomerenüberschuß von 32 % nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hier eine CE-Methode entwickelt wurde, die es im Gegensatz zu vorhandenen HPLC- und GC-Methoden ermöglicht, die Enantiomeren ohne Racemisierung vollständig zu trennen, und somit den Enantiomerenüberschuß zu quantifizieren. Erstmals konnte die enantioselektive Biosynthese von Furaneol mit Hilfe von Erdbeerproteinextrakt nachgewiesen werden. Aus der Erdbeere selbst konnten bis jetzt nur racemische Proben isoliert werden, dies lässt darauf schließen, dass Furaneol in solchen Regionen der Erdbeere gebildet wird, die einen neutralen pH-Wert besitzen, und somit eine sehr schnelle Racemisierung erfolgt.

## 2.3 Atropin

### 2.3.1 Die Probe

Atropin ist ein Alkaloid, das aus verschiedenen Solanaceen-Arten gewonnen werden kann, wie zum Beispiel aus der Tollkirsche (*Atropa belladonna*), dem Bilsenkraut (*Hyoscyamus niger*) oder dem Stechapfel (*Datura stramonium*). In den Pflanzen kommt nur das S-Enantiomer (S-Hyoscyamin), welches auch das pharmakologisch wirksame ist, vor. Atropin entsteht durch Racemisierung des S-Hyoscyamin bei der Isolierung aus der Pflanze.

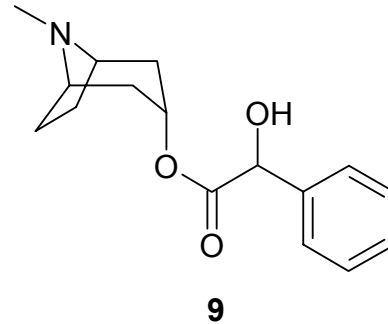
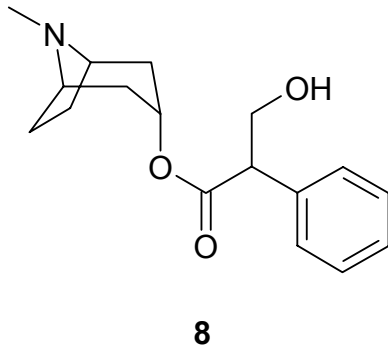
In der Tollkirsche liegt S-Hyoscyamin in der höchsten Konzentration in den Blättern mit bis zu 1,5 % vor. Zumeist sind es jedoch die Früchte, welche die Ursache für eine Vergiftung sind. Sie enthalten das Alkaloid noch bis zu 0,7 Prozent. In Israel kam es während des Golfkrieges 1991 zu einer Massenvergiftung durch S-Hyoscyamin, da viele Leute sich prophylaktisch dieses Mittel, aus Angst vor einem irakischen Giftgasangriff, verabreicht hatten.<sup>103</sup> Atropin wird als Antidot bei Vergiftungen mit irreversiblen Cholinesterase-Hemmstoffen vom Organophosphat-Typ eingesetzt.

Atropin hemmt die Wirkung des am parasymphatischen Nervenende freigesetzten Acetylcholin durch Konkurrenz am Rezeptor. Es besitzt wie das Acetylcholin eine hohe Affinität zum Rezeptor, ohne jedoch diesen zu erregen. Hierbei handelt es sich um eine rein kompetitive Hemmung, die Acetylcholin-Freisetzung an sich wird nicht beeinträchtigt. Als Folge der Atropingabe werden alle muscarinartigen Acetylcholin-Wirkungen abgeschwächt.

Atropin hebt durch Tonussenkung des *M. ciliaris* die Akkommodationsfähigkeit des Auges auf. Infolge der gleichzeitigen Erschlaffung des *M. sphincter pupillae* wird die Pupille erweitert. Diesen Effekt machte man sich bereits im Altertum und im Mittelalter zu Nutze. Extrakte aus den Beeren der Tollkirsche wurden als Augentropfen eingesetzt. Das Ziel war jedoch nicht pharmakologischer, sondern kosmetischer Natur. Frauen nutzten den Effekt der Pupillenerweiterung um ihre Attraktivität zu steigern („bella donna“).

Homatropin wird in der Augenheilkunde in Form 0,5–1-prozentiger Lösung als Mydriatikum angewandt. Seine Wirkdauer ist wesentlich kürzer als die von Atropin, die Beeinträchtigung der Akkommodation ist vergleichsweise auch geringer.

Atropin ist unter anderem in folgenden Handelspräparaten enthalten: Atropin Dispersa<sup>®</sup>, Atropin EDO<sup>®</sup>, Atropinol<sup>®</sup>, Atropin-POS<sup>®</sup>, Dysurgal N<sup>®</sup>. Homatropin ist als Homatropin-POS<sup>®</sup> in Augentropfen erhältlich.<sup>104-110</sup>



Es stellt sich grundsätzlich die Frage, ob eine mit dem CD eines Herstellers entwickelte Trennung sich im gleichen Maße mit dem eines anderen Produzenten reproduzieren lässt. Dies stellt, gerade im Hinblick auf die Validierung einer Methode, eine entscheidende Frage dar.

Die Aufgabenstellung bestand in diesem Fall darin, eine Trennung für die Enantiomere von Atropin bzw. Homatropin zu entwickeln, diese dann über die CE-Parameter in einen kritischen Bereich, also nur noch eine Antrennung, einzustellen. Im Folgenden sollte an Hand dieser Methode das Trennverhalten von sulfatierten CDs verschiedener Hersteller verglichen werden. Aus publizierten Trennungen war bekannt, dass das sulfatierte  $\beta$ -CD wohl zu den aussichtsreichsten Kandidaten im Bezug auf eine Trennung der Enantiomere von Atropin und Homatropin galt.<sup>111-113</sup>

Die Frage, die sich hier jedoch stellt, ist, ob ein Wiederholungsversuch der publizierten Trennung mit einem Cyclodextrin eines anderen Herstellers zum identischen Ergebnis führen würde. Gerade bei der Validierung<sup>114</sup> einer Methode ist es notwendig, dass alle Parameter so charakterisiert werden, dass eine 100%-ige Reproduzierbarkeit möglich ist. Sollten in Zukunft cyclodextrin-modifizierte CE-Methoden in den Reinheitsprüfungen der internationalen Arzneibücher die Polarimetrie ablösen, gilt es im Vorfeld zu klären, in wie weit diese Methoden Gültigkeit besitzen, bzw. wie genau das eingesetzte Cyclodextrin charakterisiert sein muss.

### 2.3.2 Die Methode

#### *Chemikalien*

Die Proben Atropin und Homatropin wurden von Aldrich (Milwaukee, USA) bezogen. 1 mg Probensubstanz wurde in 5 ml Milliporewasser gelöst. Als Puffer wurde Dinatriumhydrogenphosphat von Fluka (Fluka Chemie GmbH, Schweiz) gelöst in Milliporewasser eingesetzt. Die Konzentration des Puffers betrug 50 mM der pH-Wert 9.4. Vier verschiedene sulfatierte CDs wurden als chirale Selektoren verglichen:

- *Heptakis-6-sulfato-β-CD*; No. 733400; Lot 3186; Regis Technologies, Inc., USA; **(R)**
- β-CD, sulfatiert; No. 38,915-3; Lot 05706HI; Aldrich Chem., USA; **(A)**  
(Produktkommentar: typische Substitution 7-11 moles/mole)
- β-CD, sulfatiert; No. 28248; Lot 431742/1 43402; Fluka Chemie GmbH, Schweiz; **(F)**
- β-CD, sulfatiert; No. T-3821; Lot 101K2248; Sigma-Aldrich Co., USA; **(S)**  
(Produktkommentar: ~18 mol sulfatiert pro mol Cyclodextrin)

Die CD-Konzentration im jeweiligen Hintergrundelektrolyten betrug 1 mM.

#### *CE-Parameter*

Die Elektrophorese wurde mit einem Beckman P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA) ausgestattet mit einem variablen UV-Detektor durchgeführt. Das Signal wurde bei einer Wellenlänge von 214 nm detektiert. Die Gesamtlänge der Quarzglas Kapillare betrug 31.2 cm, die Länge bis zum Detektor 21 cm und der Innendurchmesser 50 µm. Die Probe wurde mit einem Druck von 0.5 psi für 5 Sekunden injiziert. Die Trennungsspannung betrug 10 kV, die Temperatur 25 °C. Vor jeder Messung wurde die Kapillare für 2 Minuten mit 0.1 M NaOH, für 1 Minute mit Wasser und abschließend 2 Minuten mit der Pufferlösung gespült.

### 2.3.3 Die Ergebnisse

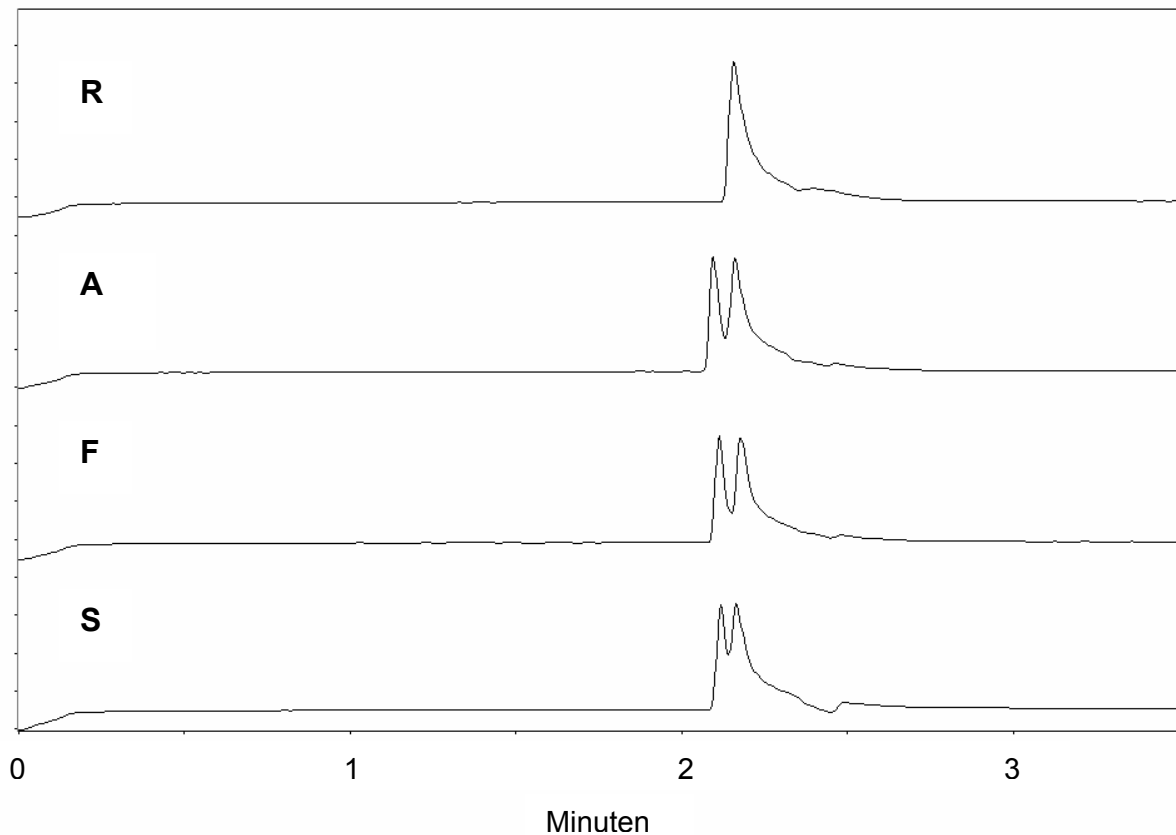


Abbildung 30: Vergleich der Trennleistung vier sulfatierter CDs (Regis **R**, Aldrich **A**, Fluka **F** und Sigma **S**) an Hand einer kritischen Trennung der Enantiomere von Atropin. Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer der Konzentration 50 mM und einem pH von 9.4. Die CD-Konzentration beträgt jeweils 1 mM.

Der Einsatz der Cyclodextrine in einer Konzentration von nur einem Millimol pro Liter und der Gebrauch einer relativ kurzen Kapillare führen zu der gewünschten kritischen Trennung, d.h. die Peaks sind nur angetrennt. Die Abbildung 30 lässt deutlich erkennen, dass die eingesetzten sulfatierten CDs eine unterschiedliche Auflösung bezüglich der Enantiomere von Atropin erbringen. Das erste sulfatierte CD von Regis (**R**) kann zwischen den Enantiomeren nicht differenzieren. Die Elektropherogramme zwei und drei wurden mit den CDs der Firmen Aldrich (**A**) bzw. Fluka (**F**) erzielt. Beide zeigen eine ähnliche Auflösung, die Peaks sind bis unter die halbe Höhe hinaus getrennt. Im untersten Elektropherogramm, welches mit dem CD der Firma

Sigma (**S**) erzielt wurde, ist eine deutliche Antrennung zu sehen, die aber nicht ganz bis zur halben Höhe des Peaks reicht. In allen vier Elektropherogrammen kann ein Tailing beobachtet werden, welches in praktisch allen publizierten Atropin-Elektropherogrammen zu sehen ist, und somit ein Methoden-unabhängiges, substanzbezogenes Phänomen darstellt.

Das isomerenreinste CD von Regis (**R**) hatte in diesem Falle nur die geringste, nämlich keine Trennung erbracht, während das bereits vom Hersteller als Gemisch deklarierte CD von Aldrich (**A**) die beste Auflösung erbrachte.

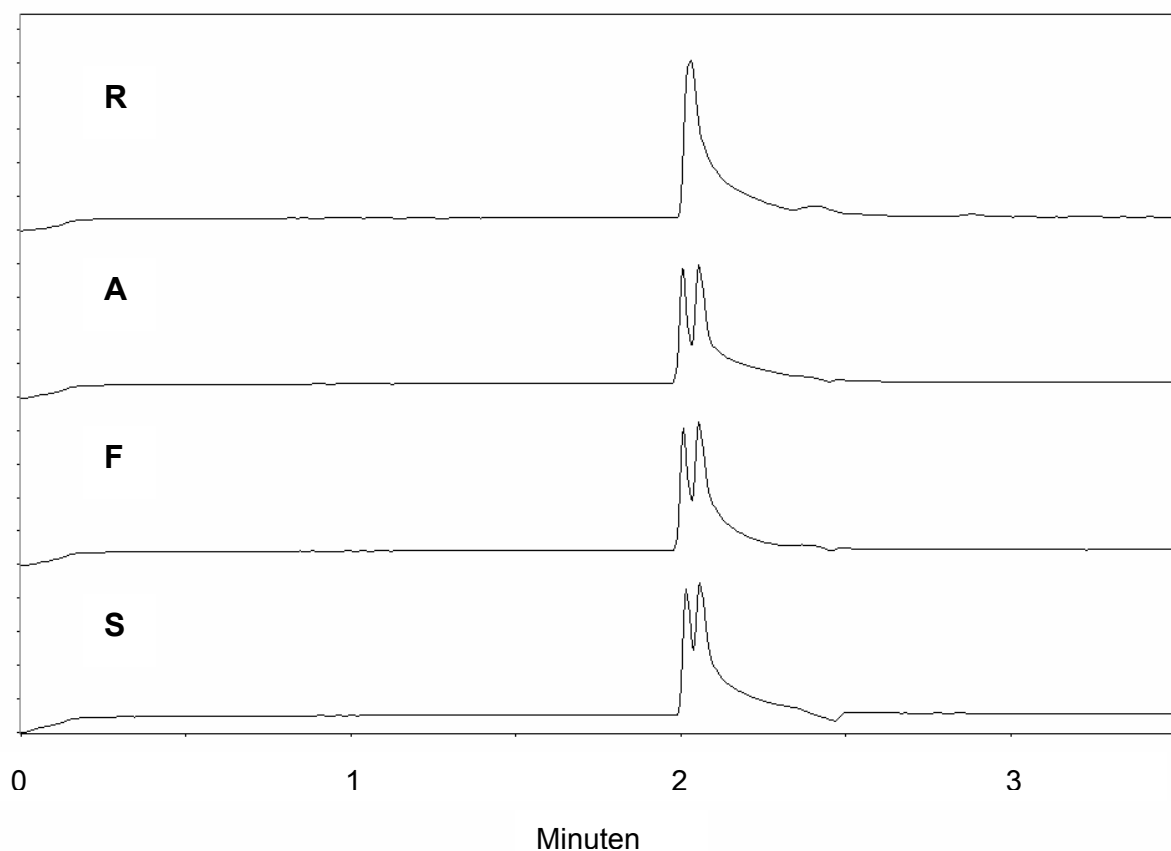


Abbildung 31: Vergleich der Trennleistung vier sulfatierter CDs (Regis **R**, Aldrich **A**, Fluka **F** und Sigma **S**) an Hand einer kritischen Trennung der Enantiomere von Homatropin. Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4^-$ -Puffer der Konzentration 50 mM und einem pH von 9.4. Die CD-Konzentration beträgt jeweils 1 mM.

Die bei Atropin beobachteten Unterschiede erkennt man für alle vier Cyclodextrine auch bei den entsprechenden Homatropinanalysen wieder (Abb. 31). Die Trennleistungen der CDs bezüglich Atropin und Homatropin sind analog.

Während der Experimente fiel auf, dass in verschiedenen Atropin-Elektropherogrammen ein weiterer Peak zu sehen war. Bei genauerer Betrachtung der Elektropherogramme trat der Verdacht auf, dass die Peakgröße mit dem Probenalter korrelierte. Um diese Vermutung zu prüfen, wurde eine zeitabhängige Messreihe durchgeführt.

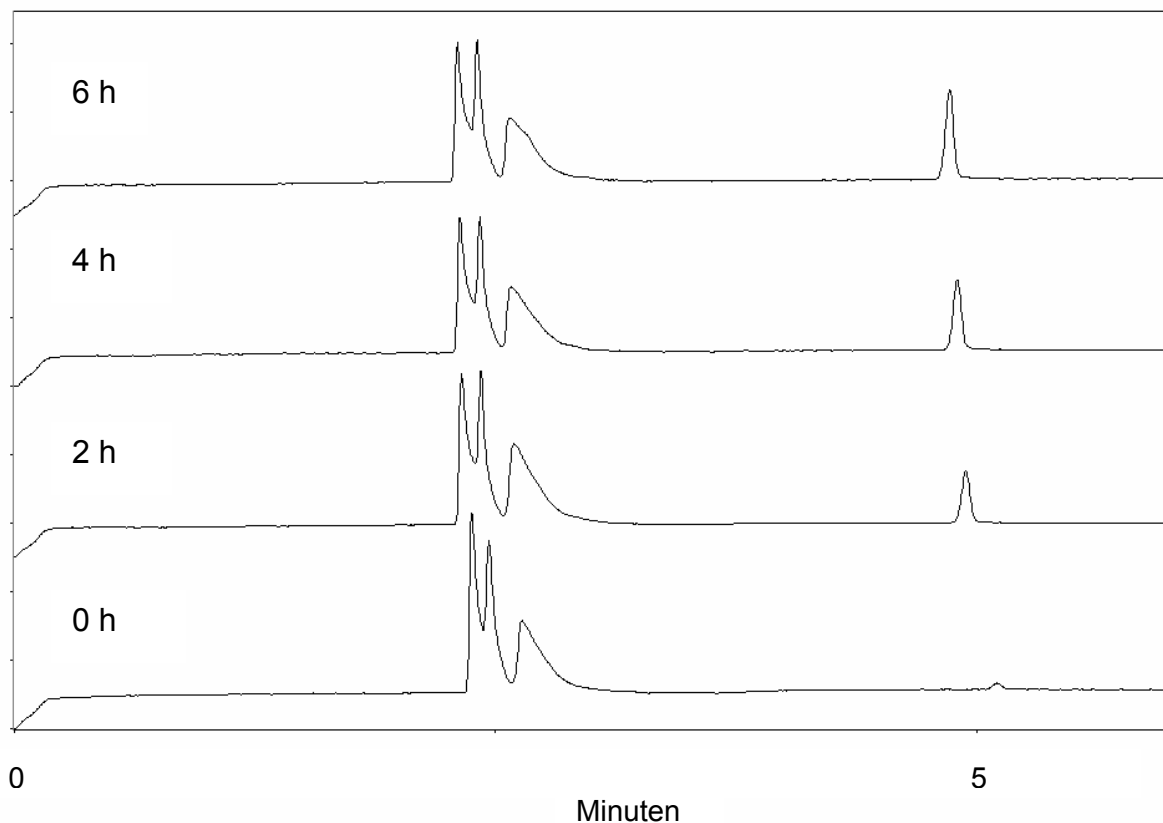


Abbildung 32: Vier Elektropherogramme der gleichen Atropinprobe nach unterschiedlicher Lagerungszeit (0h, 2h, 4h, 6h). Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer der Konzentration 50 mM und einem pH von 9.4. Es wurde das sulfatierte CD von Aldrich in einer Konzentration von 2 mM zugesetzt.

Die Abbildung 32 zeigt Elektropherogramme der identischen Probe nach 0, 2, 4 und 6 Stunden (von unten nach oben) Lagerung. Die Atropin-Enantiomere wurden hier mit dem sulfatierten CD von Aldrich angetrennt. Es ist deutlich ein Anwachsen eines neuen Peaks bei ca. 5 min. zu erkennen. Die nun erwiesene zeitliche Abhängigkeit bezüglich der Peakgröße warf die Vermutung auf, dass es sich bei dem in der Größe zunehmenden Peak um ein Zerfallsprodukt von Atropin handeln könnte.

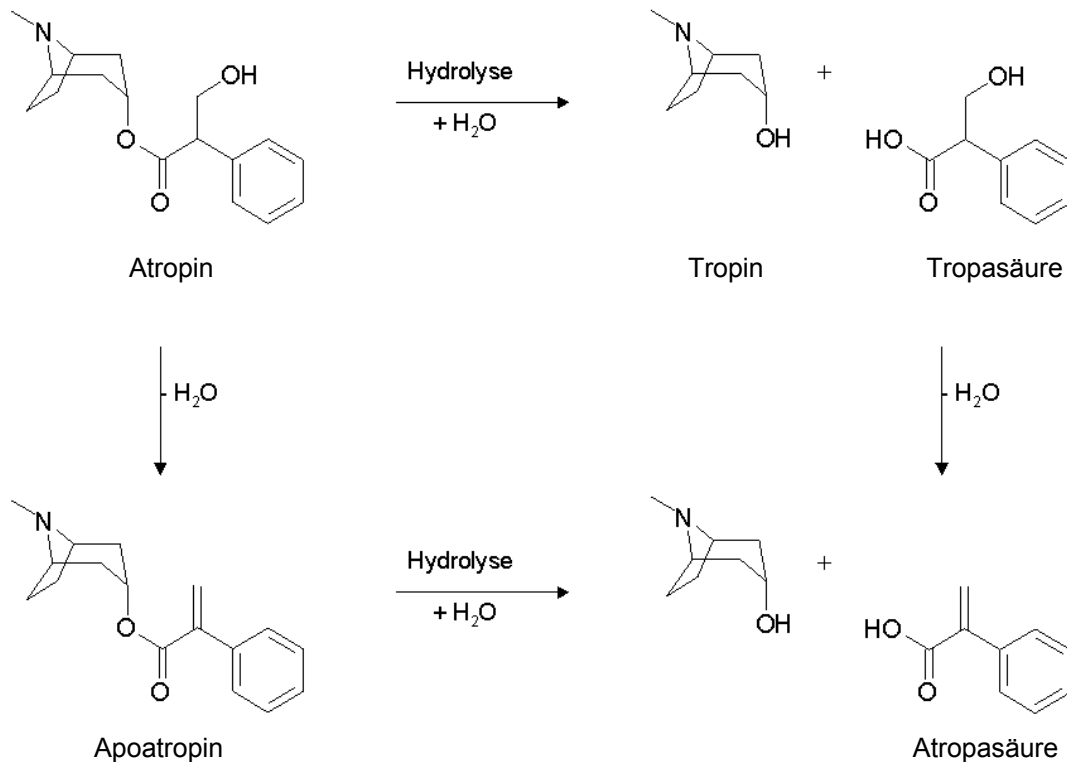


Abbildung 33: Mögliche Zerfallsreaktionen von Atropin

Betrachtet man die möglichen Hydrolyse- und Eliminationsprodukte, so fällt auf, dass nur bei einem Zerfallsprodukt, der Tropasäure, das Chiralitätszentrum erhalten bleibt, wohingegen bei den anderen drei, Tropin, Apotropin und Atropasäure, eine achirale Substanz vorliegt. Da es sich aber bei den obigen Atropin-Elektropherogrammen gemäß der Aufgabenstellung um kritische Trennungen handelt, wäre es auch gut möglich, dass eine Trennung oder Antrennung des eventuell racemischen Zerfallproduktes erst durch Anhebung der CD-Konzentration erreicht werden könnte. Um dies zu erproben, wurde die Konzentration auf 15 mM angehoben. Da die Zahl



der Ionen dadurch deutlich erhöht wurde und somit der Stromfluss zu stark ansteigen würde, wurde im Gegenzug die Spannung auf 5 kV reduziert.

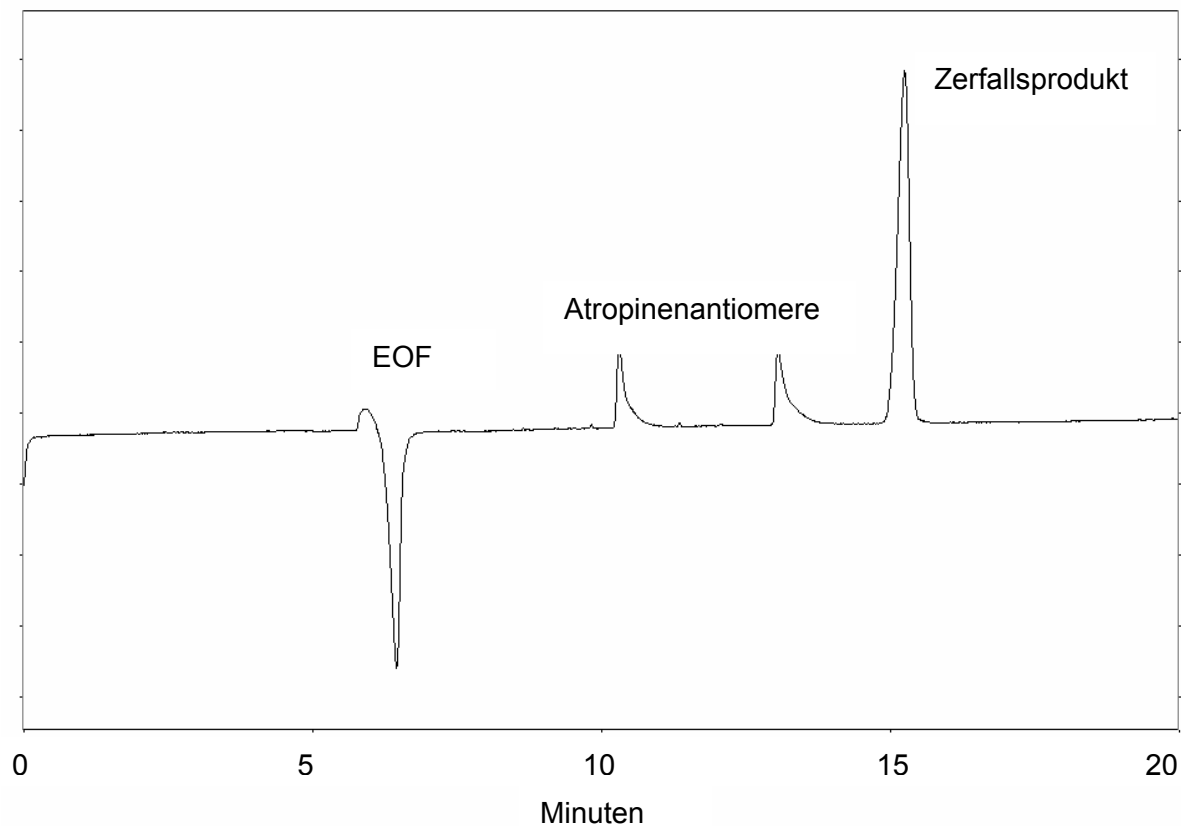


Abbildung 34: Elektropherogramm einer über 24 h alten Atropinprobe mit Zusatz von 15 mM CD. Das Zerfallsprodukt zeigt keine Trennung.

Die Abbildung 34 zeigt ein Elektropherogramm der jetzt bereits über 24 Stunden alten Probe. Die beiden Enantiomeren des Atropins zeigen deutliche Unterschiede in der Migrationszeit ( $R_s \cong 11$ ), der dritte Peak hingegen ist nicht einmal angetrennt, ein Indiz dafür, dass es sich hierbei nicht um Tropasäure handelt. Betrachtet man die Struktur von Atropin genauer, so könnte man davon ausgehen, dass der Phenylrest in das Cyclodextrin eingelagert wird und das benachbarte Chiralitätszentrum gut mit den Ränder des Torus wechselwirken kann, was dieses überaus gute Trennergebnis erklären würde. Dem alkoholischen Teil des Esters, dem Tropin, käme somit nur eine unbedeutende Rolle im Bezug auf die Trennbarkeit der Enantiomere zu, und man würde für Tropasäure ein zumindest ähnliches Trennverhalten prognostizieren. Die bis jetzt erhärtete These, dass es sich bei dem Zerfallsprodukt nicht um Tropasäure

handelt, sollte nun entweder bewiesen oder falsifiziert werden. Hierzu wurde „spike“-Experimente durchgeführt.

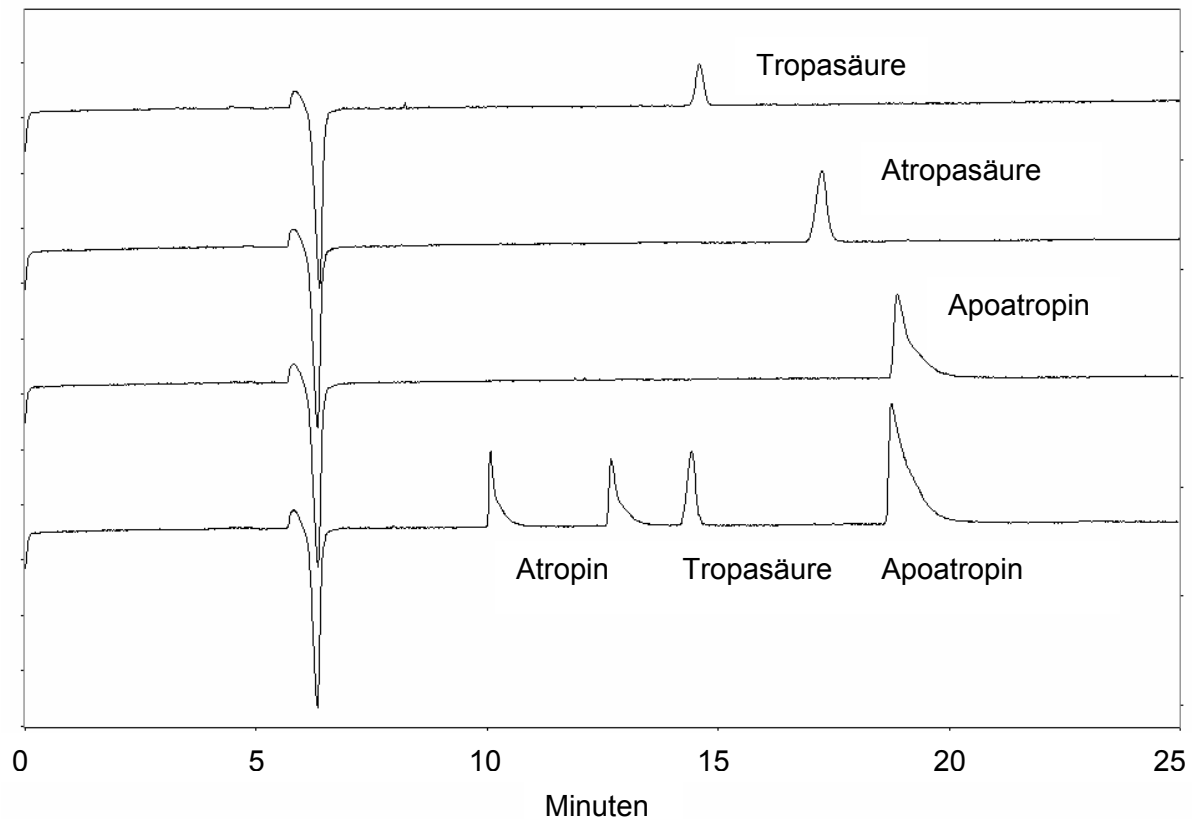


Abbildung 35: Spike-Experimente zur Identifizierung des Zerfallsproduktes. Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer der Konzentration 50 mM und einem pH von 9.4. Die Konzentration des sulfatierten Cyclodextrins (Aldrich) betrug 15 mM.

In Abbildung 35 sind die Elektropherogramme (von oben nach unten) von Tropasäure, Atropasäure und Apoatropin jeweils als Einzelsubstanzen zu sehen. Das letzte Elektropherogramm zeigt eine Atropinprobe, welche sich zum Teil schon wieder zersetzt hatte, versetzt mit Tropasäure und Apoatropin. Der Zusatz von Tropasäure führte zu keinem neuen Peak, sondern zum Anwachsen des bis jetzt nicht identifizierten Peaks, die Zugabe von Apoatropin hingegen zu einem neuen Peak. Hiermit konnte eindeutig, entgegen der bisherigen Vermutung, gezeigt werden, dass es sich bei dem Zerfallsprodukt doch um Tropasäure handelt. Offensichtlich sind die Messbedingungen für die Trennung der Tropasäure-Enantiomere nicht

geeignet. Das bei der Esterspaltung zusätzlich entstehende Tropin ist bei dieser Wellenlänge nicht detektierbar.

Diese Messreihe führte gleich zu mehreren interessanten Ergebnissen: 1) Es konnte gezeigt werden, dass Atropin (8) und Homatropin (9) ein sehr ähnliches Trennverhalten zeigen. 2) Es konnte der Unterschied der Trennleistungen verschiedener sulfatierter CDs aufgezeigt und herausgestellt werden, dass nicht das isomerenreine Produkt auch die beste Trennleistung liefern muss. 3) Ein zusätzlicher Peak konnte eindeutig einem Zerfallsprodukt von Atropin, der Tropasäure, zugeordnet werden.

## 2.4 1,1'-Binaphthalin-2,2'-diyl-phosphat

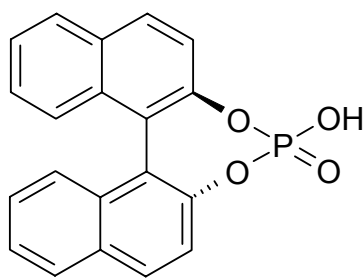
### 2.4.1 Die Probe

Binaphthyle/aryle und ihre Derivate gehören zu der Gruppe der Atropisomeren, deren chirales Element eine Achse darstellt. Um die Enantiomere solcher Systeme differenzieren bzw. trennen zu können, muss die freie Drehbarkeit um diese Achse gehindert sein. Zur Bestimmung der Racemisierungsbarriere von Binaphthylderivaten sind Versuche<sup>115,116</sup> bzw. Berechnungen<sup>117</sup> beschrieben. Für das unsubstituierte 1,1'-Binaphthylsystem wurde bei 50 °C in Dimethylformamid eine Energiebarriere für die Racemisierung ( $\Delta G_{\text{rac}}$ ) von 98.5 kJ/mol sowie eine Halbwertszeit für die Racemisierung ( $\tau_{\text{rac}}^{1/2}$ ) von 14.5 min berechnet. Die Berechnungen für das 1,1'-Binaphthyl-2,2'-diol bei 220 °C in Diphenylether ergaben ein  $\Delta G_{\text{rac}}$  von 158 kJ/mol und  $\tau_{\text{rac}}^{1/2}$  von 60 min.

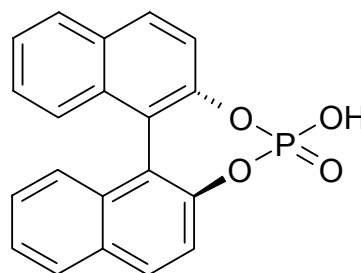
Binaphthylderivate werden als Katalysatoren zur stereoselektiven Synthese mittlerweile schon auf industrieller Ebene eingesetzt.<sup>118,119</sup> Der Grundstein für den Einsatz von Binaphthylderivaten wurde von Noyori gelegt, auf dessen Arbeiten hier verwiesen werden soll.<sup>120</sup>

Unter den Biarylen finden sich auch pharmakologisch interessante Vertreter, die im Kampf gegen Malaria eingesetzt werden können, wie das Knipholon,<sup>121</sup> und die Dioncophylline,<sup>122,123</sup> oder die Michellamine,<sup>124,125</sup> welche anti-HIV Aktivität zeigen. Untersuchungen haben gezeigt, dass auch die zytotoxischen Effekte von Gossypol<sup>126,127</sup> in Tumorzellen von dessen Stereochemie abhängen. (-)-Gossypol inhibiert die Vermehrung von Krebs epithelzellen und Wucherung von Bindegewebszellen, wo hingegen bei (+)-Gossypol keiner der beiden Effekte beobachtet werden konnte. Es konnte des weiteren bewiesen werden, dass die Atropisomere von chlorierten Biphenylen<sup>128</sup> unterschiedliche Effekte auf die Induktion von Enzymen, die unter anderem für die Metabolisierung von Arzneistoffen zuständig sind (z. B. Cytochrom P450), haben.

Die Aufgabenstellung bestand in diesem Kapitel darin, den Einfluss des Substitutionsgrades/-musters von acetyliertem und methyliertem  $\beta$ -CDs auf die Trennung der Enantiomere von 1,1'-Binaphthalin-2,2'-diyl-phosphat (**10**) zu untersuchen.



**R-10**



**S-10**

## 2.4.2 Die Methode

### *Chemikalien*

1,1'-Binaphthalin-2,2'-diyl-phosphat (**10**) wurde von Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Deutschland) in der jeweiligen enantiomerenreiner Form bezogen. Der Puffer, Dinatriumhydrogenphosphat p.a., stammt von Fluka (Buchs, Schweiz).

Die natürlichen CDs sowie das randomisiert acetylierte  $\beta$ -CD (Ac- $\beta$ -CD) waren Proben der Firma Wacker (Burghausen, Deutschland). *Heptakis*-(2,3-diacetyl)- $\beta$ -cyclodextrin (Diac) wurde selbst in zwei Chargen synthetisiert<sup>129</sup> sowie ein randomisiert methyliertes  $\beta$ -CD.<sup>130-132</sup> *Heptakis*-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (TM) und *Heptakis*-(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (DM)<sup>133,134</sup> wurden von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Alle Lösungen wurden mit Milliporewasser angesetzt.

### *CE-Parameter*

Die Messungen wurden auf einem Beckman P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA), ausgestattet mit einem variablen UV-Detektor, durchgeführt. Das Signal wurde bei einer Wellenlänge von 214 nm detektiert. Die Probe wird mit Druck (0.5 psi) für 5 Sekunden injiziert. Die Trennung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und einer konstanten Spannung von 20 kV. Der Kapillarinne Durchmesser betrug 50  $\mu$ m die Länge 60.2/50 cm, wobei die zweite Zahl die Länge bis zum Detektor angibt. Der pH-Wert des Phosphatpuffers betrug 9.4, seine Konzentration 100 mM, die Konzentration der jeweils zugesetzten Cyclodextrine 1 mM. Die Probenbereitung erfolgte durch Lösen von 1 mg S- und 1 bzw. 2 mg R-Enantiomer in jeweils 1 ml MeOH. Von den vereinigten methanolischen Lösungen wurden 500  $\mu$ l entnommen und mit 10 ml Milliporewasser verdünnt. Die Kapillare wurde vor jeder Messung für 2 Minuten mit 0.1 M NaOH, für 1 Minute mit Wasser und 2 Minuten mit der Pufferlösung gespült.

## MS-Parameter

Es wurden MALDI-TOF und ESI-Massenspektren der substituierten Cyclodextrine aufgenommen.

Die MALDI-TOF-Messungen erfolgten auf einem Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonik, Bremen). Die hierfür verwendete Matrix bestand aus einer gesättigten  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-zimtsäurelösung in 0.1 % TFA/MeCN. Die Probenpräparation erfolgte auf dem Target mit 0.5  $\mu$ l Matrix und 0.5  $\mu$ l Probe (gelöst in MeOH). Es wurden bei jeder Messung 150 Schüsse akkumuliert.

Die ESI-Massenspektren wurden mit einem LC/MS Agilent 1100, Agilent Technologies (Waldbronn) gekoppelt mit einer Ionenfalle Esquire 3000plus von Bruker (Bruker Saxonia Analytik, Leipzig) aufgenommen. Die Messparameter waren wie folgt: Nebuliser: 20 psi; Trocknungsgas: 5 ltr./min, 350 °C; Kapillarenspannung: -3500 V; Fragmentorspannung (Kapillarensausgangsspannung): 150 V; Skimmer: 40 V; Infusion: 5  $\mu$ l/min.

### 2.4.3 Die Ergebnisse

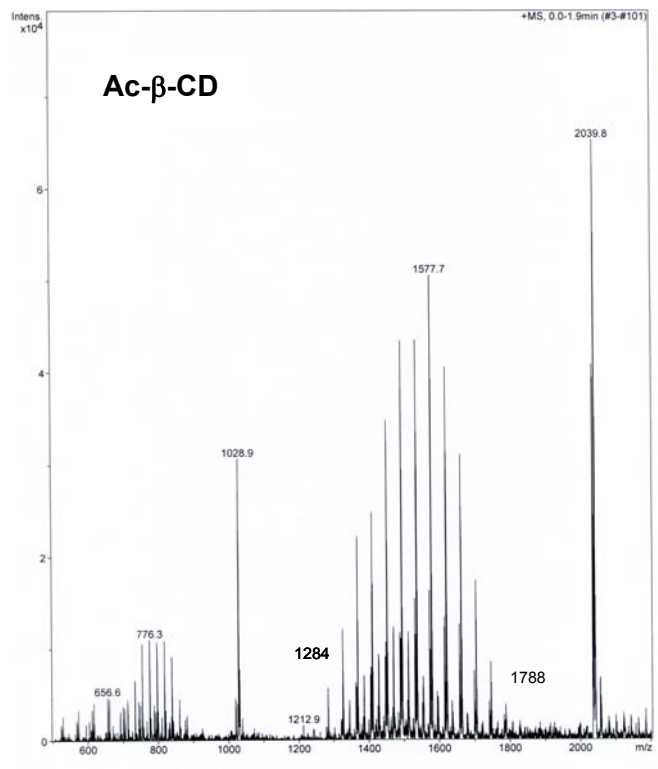
Viele der sich im Handel befindlichen randomisiert substituierten CDs werden über den durchschnittlichen Substitutionsgrad (MS) klassifiziert. Dies ist nicht sonderlich aussagekräftig, da es weder angibt aus wie vielen CDs das Gemisch zusammengesetzt ist, noch in welchem genauen Mengenverhältnis die verschiedenen substituierten CDs zueinander stehen. Da in diesem Teil der Arbeit die Trennleistung solcher randomisiert substituierten CDs untereinander und mit der von reinen („single isomer“) CDs verglichen werden sollte, war es notwendig sie genauer zu charakterisieren. Hierzu wurde auf die Massenspektroskopie zurückgegriffen. Mit dem Massenspektrum lässt sich die Anzahl der im Gemisch vorhandenen CDs, sowie die jeweiligen Anteile bestimmen.

Da die Trennleistung der verschiedenen CD-Gemische quantitativ verglichen werden sollten, mussten Idealerweise die Trennbedingungen so gestaltet werden, dass auch das Gemisch, welches die schlechteste Trennung erzielt, zumindest noch eine Antrennung bewirkt. Sind die Trennleistungen der im direkten Vergleich zueinander

stehenden CDs ähnlich, so lassen sie sich an Hand einer kritischen Trennung besser vergleichen.

### Acetyliertes $\beta$ -Cyclodextrin

In einer ersten Versuchsreihe wurde ein Enantiomergemisch von **10** ( $S/R = 1/2$ ) mit drei verschiedenen acetylierten  $\beta$ -CDs getrennt: mit dem randomisiert acetylierten  $\beta$ -CD von Wacker (**Ac- $\beta$ -CD**) sowie zwei selbst synthetisierten Chargen Diac (**A / B**). Von diesen drei Proben wurde vor ihrem Einsatz ESI-Massenspektren aufgenommen.



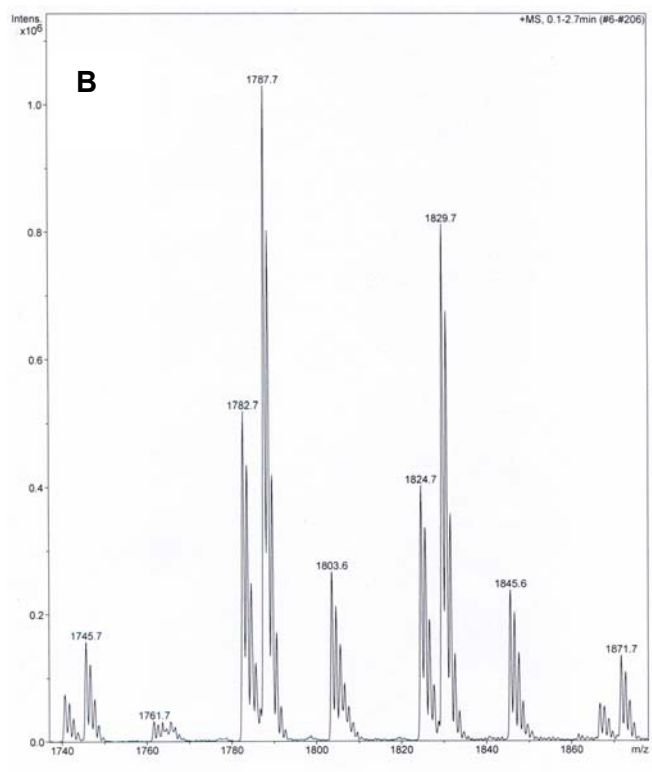
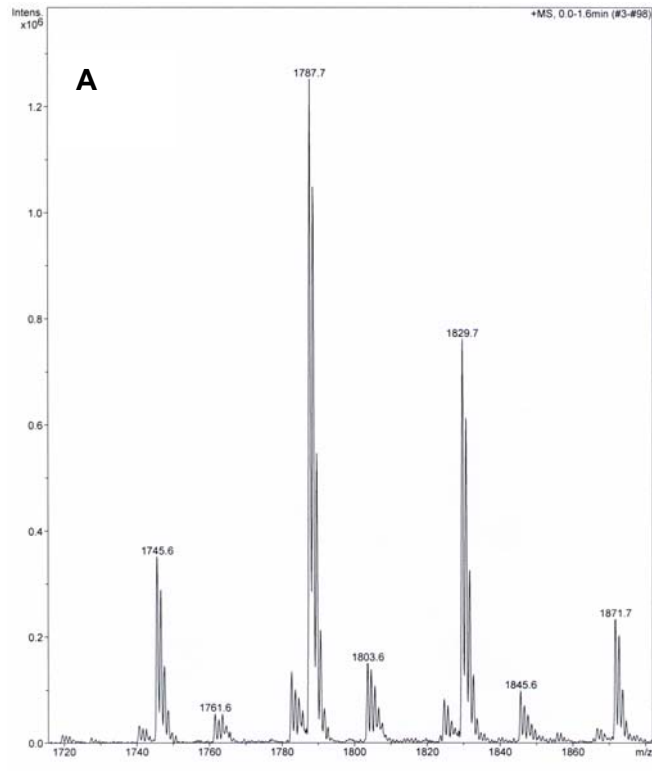


Abbildung 36: ESI-Massenspektren des randomisiert acetylierten CD (Ac- $\beta$ -CD), sowie von zwei Diac-Chargen (A / B).



Im Massenspektrum von Ac- $\beta$ -CD (Abb. 36 oben) ist deutlich der Peak des vollacetylierten Cyclodextrins bei 2040 (Na-Addukt) zu erkennen. Nach einer Lücke folgen mehrere Peaks, die ein Muster bilden, welches an eine Gauß-Kurve erinnert. Diese startet bei 1788, was 15 Acetylgruppen entspricht, und endet bei 1284, welches die Masse eines dreifach acetylierten  $\beta$ -CDs ist. Die Spitze der Glockenkurve nimmt das zehnfach substituierte  $\beta$ -CD (1578) ein.

In den Massenspektren der beiden Diac-Chargen A und B entspricht der Hauptpeak bei 1788 einem 15-fach acetylierten  $\beta$ -CD, was eine einfache Überacetylierung darstellt. Bei 1830 bzw. 1872 sieht man die Peaks des zweifach bzw. dreifach überacetylierten Diac, bei 1745 den Diac-Peak. Der Anteil an Diac ist in der Charge A fast doppelt so groß wie in Charge B.

Die folgende Abbildung zeigt die Elektropherogramme, in denen diese drei chiralen Selektoren zur Trennung der Enantiomeren von **10** eingesetzt wurden.

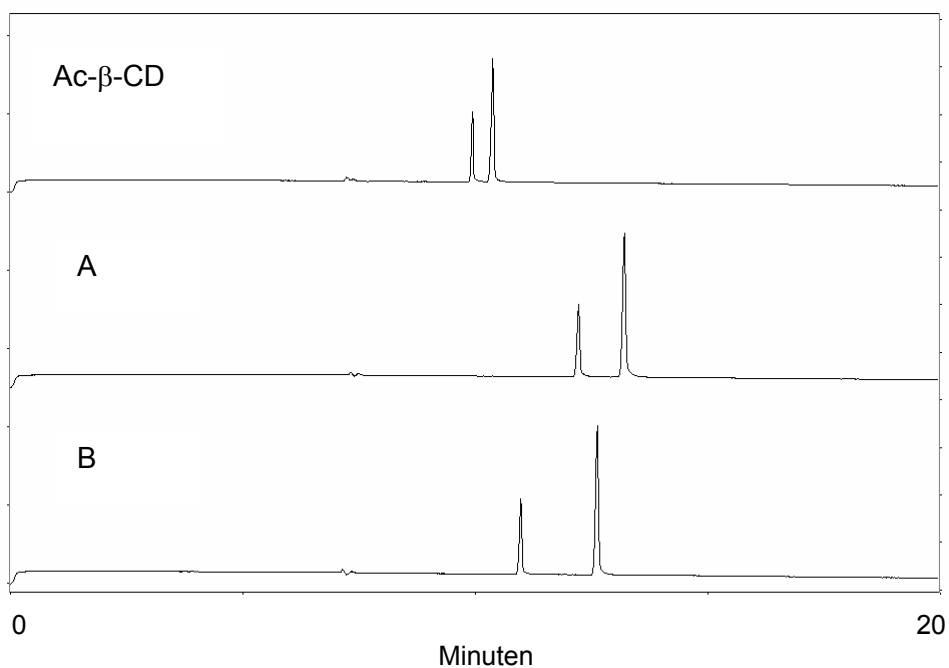


Abbildung 37: Vergleich der Trennleistung des randomisiert acetylierten CD (Ac- $\beta$ -CD) sowie von zwei Diac-Chargen (A / B) gegenüber den Enantiomeren von **10**. Der pH-Wert des 100 mM Phosphatpuffers betrug 9.4, die Konzentration der jeweils zugesetzten Cyclodextrine 1 mM.

In Abbildung 37 ist deutlich zu erkennen, dass das Cyclodextringemisch der Charge B eine bessere Trennleistung liefert, als das von A, obwohl ersteres weniger Diac enthält. Die Charge A zeigt aber noch eine deutlich bessere Trennleistung als das randomisiert acetylierte Ac- $\beta$ -CD.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde das Gemisch aus randomisiert acetyliertem Cyclodextrin (Ac- $\beta$ -CD) mit Hilfe der Säulenchromatographie in Unterfraktionen aufgetrennt. Als Fließmittel wurde hierzu ein Gemisch aus Ethylacetat/MeOH im Verhältnis 6 : 4 verwendet. Die nach der Säule aufgefangenen Fraktionen wurden zu vier Chargen (**I-IV**) vereint und ihr durchschnittlicher Acetylierungsgrad über Integration der CH<sub>3</sub>-Gruppe des Acetylrestes in den NMR-Spektren bestimmt: **I**: 4.09, **II**: 3.90, **III**: 3.22, **IV**: 2.82.

Um die Elektropherogramme dieser vier Gemische besser vergleichen zu können, wurde die in 2.4.2 beschriebene Methode so modifiziert, dass es nur noch zu einer kritischen Trennung kommt. Hierzu wurde die Kapillare auf 31.2/21 cm verkürzt, die Spannung auf 10 V verringert und die Pufferkonzentration auf 50 mM herabgesetzt. Es wurde jetzt ein racemisches Gemisch von **10** vermessen.

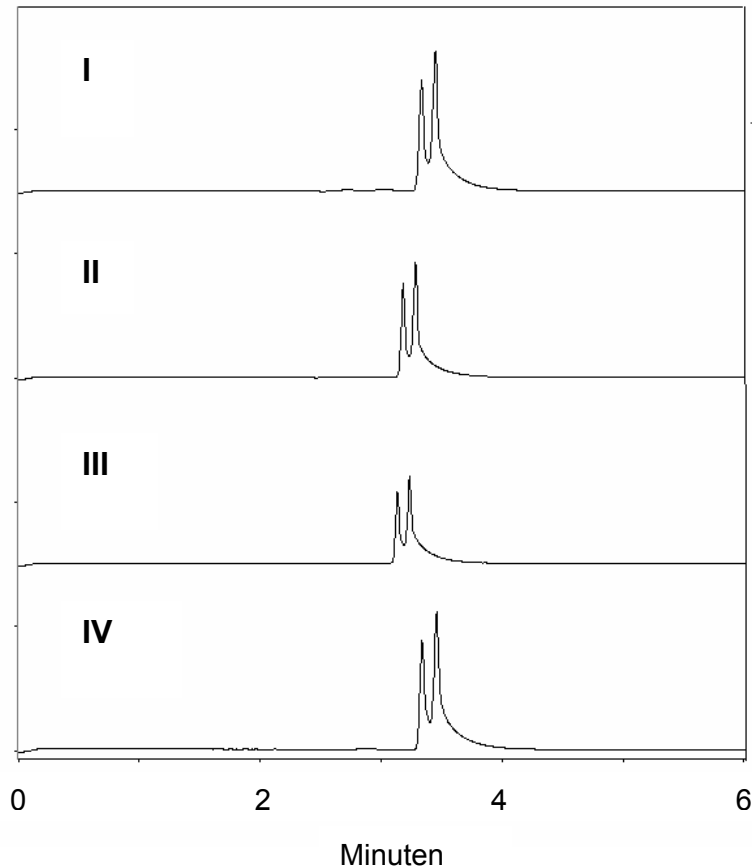


Abbildung 38: Vergleich der Trennleistung von vier Fraktionen des randomisiert acetylierten  $\beta$ -CD bezüglich der Enantiomere von **10**. Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer der Konzentration 50 mM und einem pH von 9.4. Die CD-Konzentration beträgt jeweils 1 mM.

Bemerkenswerterweise kann man bei den vier Elektropherogrammen keinen nennenswerten Unterschied in der Trennleistung der vier Gemische feststellen.

### Methyliertes $\beta$ -Cyclodextrin

#### *$\beta$ -Cyclodextrin und Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (TM)*

Aus einem 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer wurden zwei Stammlösungen hergestellt. Eine enthielt 1 mM  $\beta$ -CD, die andere 1 mM TM. Mit diesen Stammlösungen wurde eine Serie von Hintergrundelektrolyten gemischt, deren  $\beta$ -CD/TM-Verhältnis von 9:1 (**0.1**) bis 1:9 (**0.9**) reichte. Zusammen mit den reinen Cyclodextrinen ergibt sich eine Serie aus 11 Pufferproben. Diese Serie wurde dreimal hintereinander vermessen.

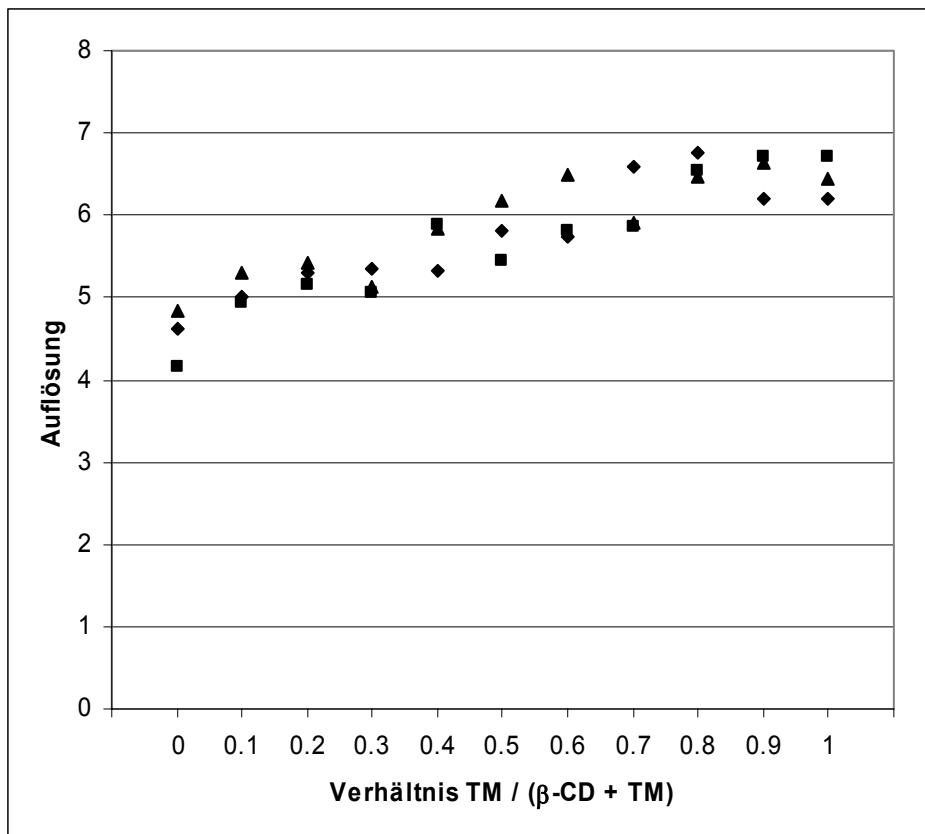


Abbildung 39: Die Auflösung dargestellt in Abhängigkeit Molenbruchs von TM im eingesetzten  $\beta$ -CD/TM-Gemisches.

In Abbildung 39 ist der Molenbruch von TM im Cyclodextringemisch gegen die erzielte Auflösung aufgetragen. Die Skalierung der x-Achse entspricht dem Molenbruch von TM und somit dem durchschnittlichen molaren Substitutionsgrad (MS) bezüglich der Methylgruppen, den man für die Cyclodextringemische bestimmen würde. Mit allen eingesetzten CD-Systemen konnte eine sehr gute Auflösung ( $R_S > 4$ ) erzielt werden, insbesondere unter der Berücksichtigung, dass die aufsummierte Konzentration der CDs lediglich 1 mM beträgt. Das reine  $\beta$ -CD lieferte, relativ betrachtet, die schlechteste Auflösung, welche selbst noch über einer Auflösung von 4.0 liegt. Trotz einer gewissen Streuung lässt sich deutlich eine Tendenz in der Serie erkennen: mit ansteigendem Anteil an TM wächst auch die Auflösung.

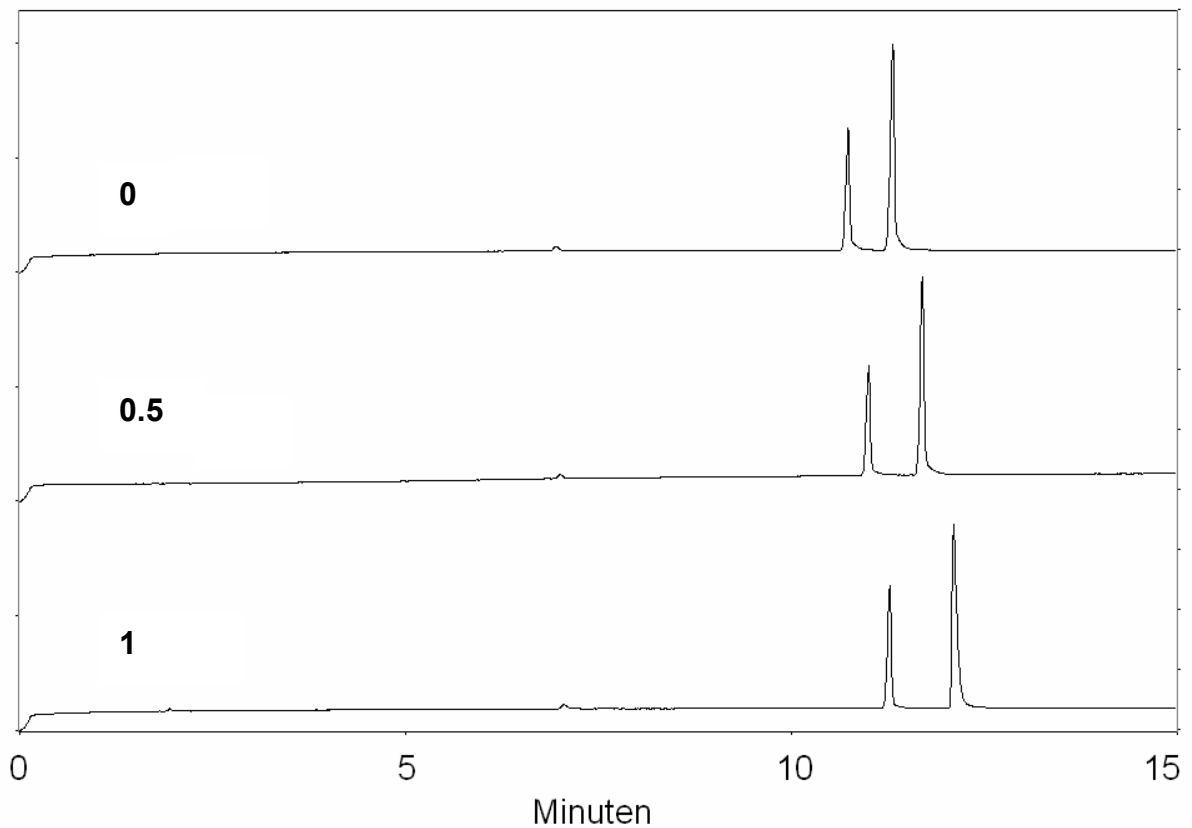


Abbildung 40: Elektropherogramme erzielt mit verschiedener CD-Zusammensetzung: reines  $\beta$ -CD (**0**),  $\beta$ -CD/TM-Gemisch im Verhältnis 1:1 (**0.5**) und reines TM (**1**). Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer der Konzentration 100 mM und einem pH von 9.4. Die CD-Konzentration beträgt jeweils 1 mM.

Betrachtet man die drei Elektropherogramme in Abbildung 40, so stellt man fest, dass die Enantiomeren von **10** in allen drei Fällen sehr gut getrennt wurden und dass die Auflösung mit steigender Methylierung zunimmt. Man könnte nun schlussfolgern, dass eine Methylierung des CD-Grundkörpers zu einer Verbesserung der Trennung führt.

*Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin (DM)*

Das käuflich erworbene Cyclodextrin ist an allen 2er und 6er Position methyliert. Die Reinheit wird vom Hersteller mit > 98% angegeben. Rein rechnerisch erhält man auf der Basis aller OH-Gruppen für dieses Cyclodextrin somit einen MS von 0.67.

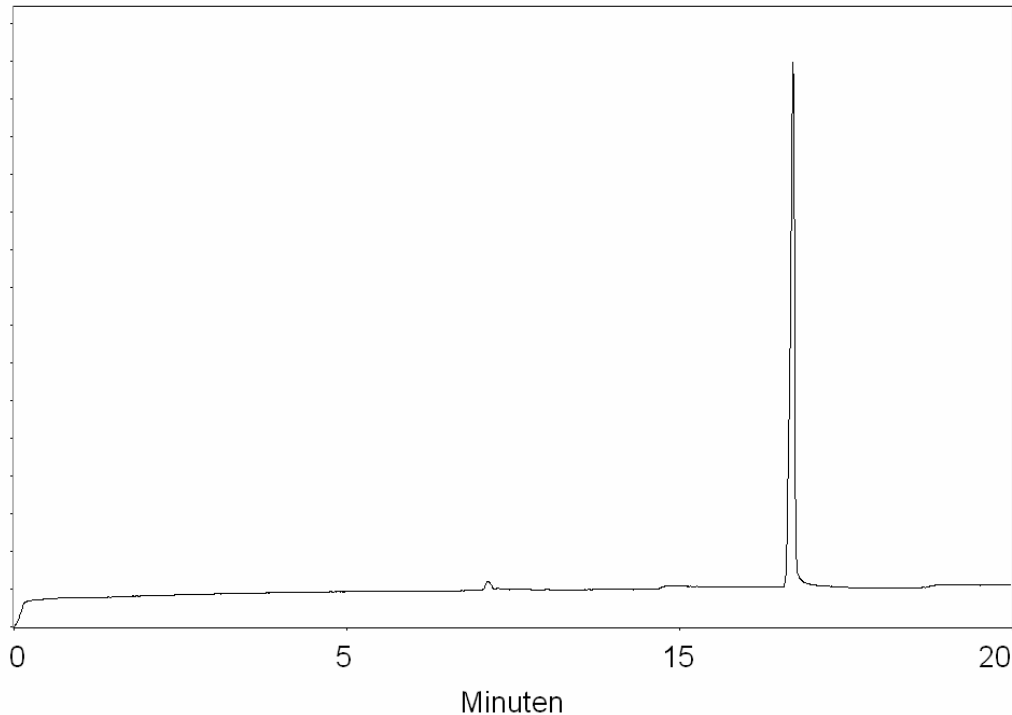
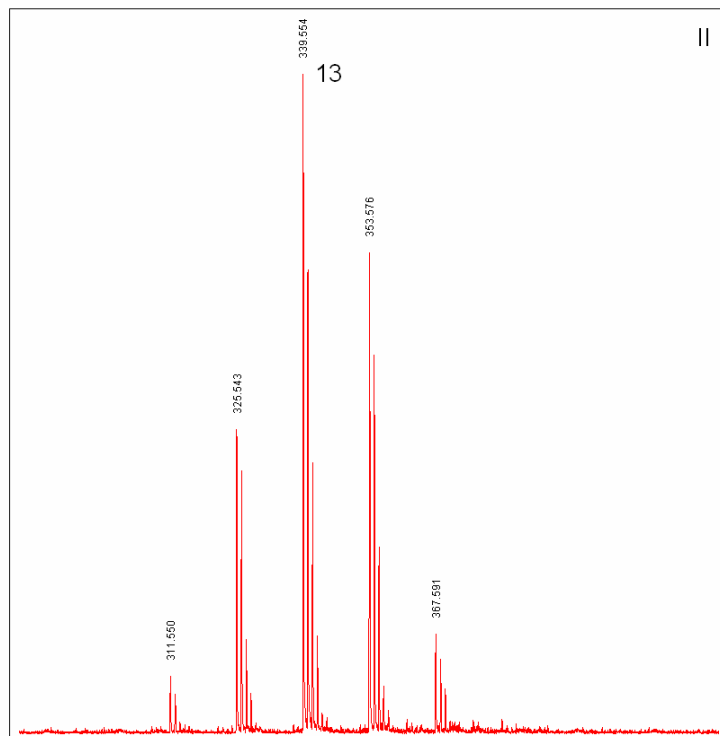
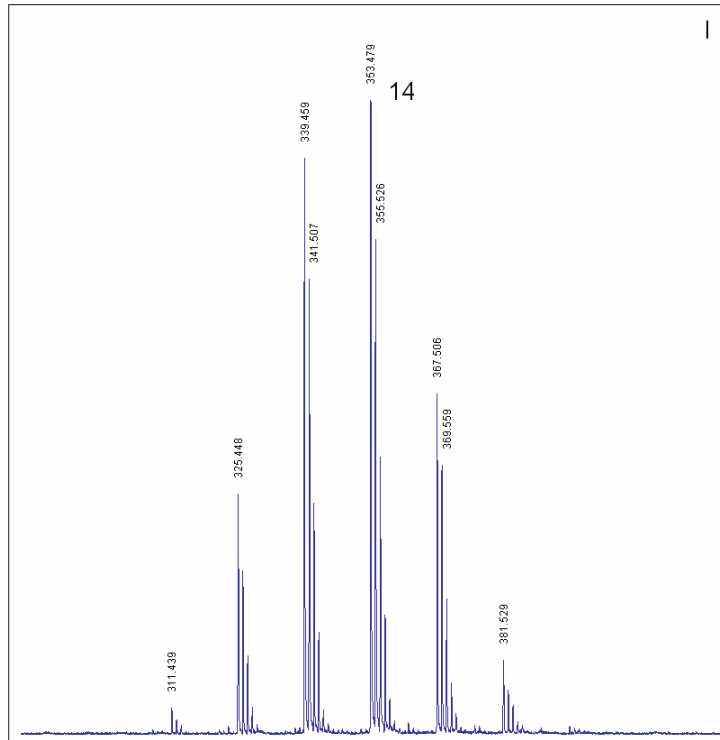


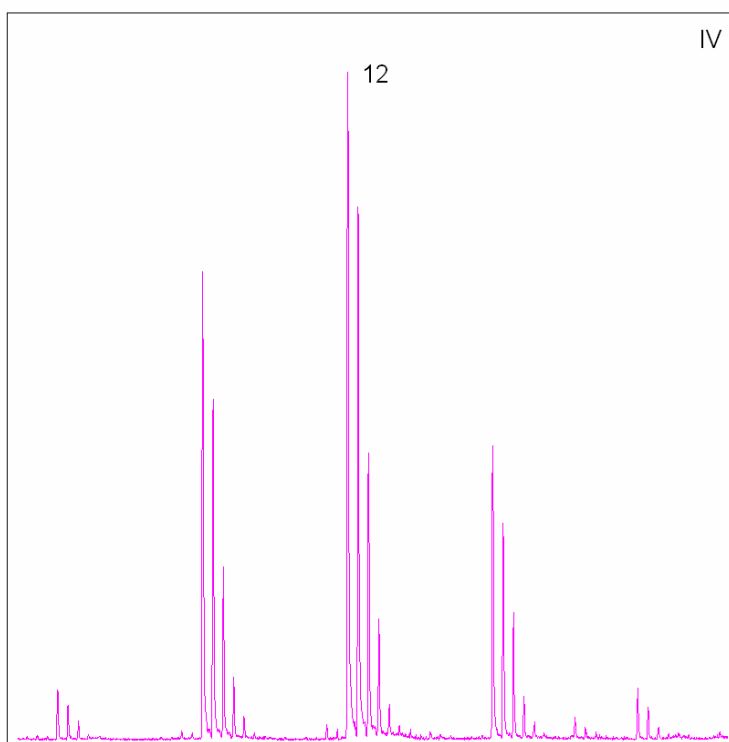
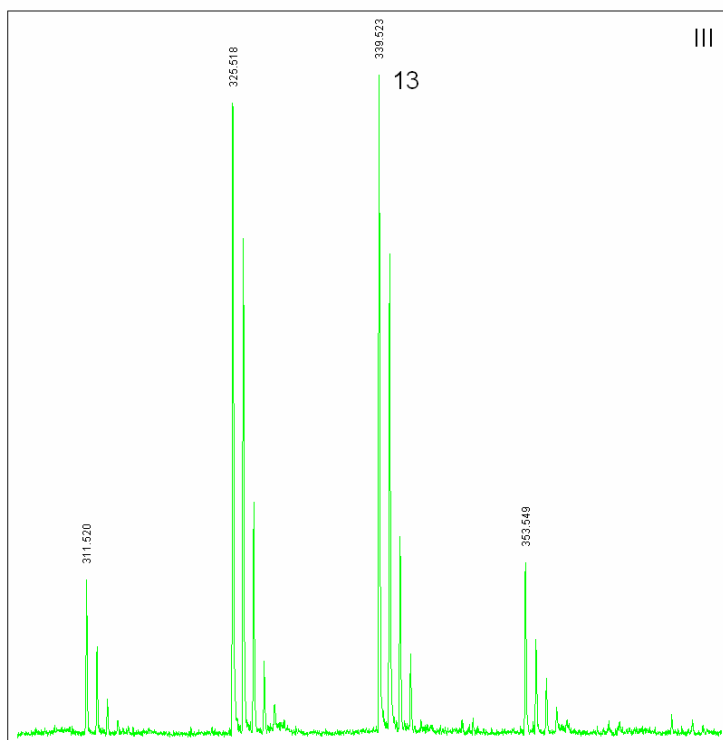
Abbildung 41: Elektropherogramm mit DM als chiralen Selektor. Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer der Konzentration 100 mM und einem pH von 9.4. Die CD-Konzentration an DM beträgt 1 mM.

In Abbildung 41 ist das Elektropherogramm mit 1 mM DM als chiraler Selektor zu sehen, die anderen Trennbedingungen entsprechen denen der Elektropherogramme mit den  $\beta$ -CD/TM-Gemischen. Man stellt fest, dass es mit DM zu keiner Trennung kommt, und somit der Einfluss der Methylgruppen komplexer ist, als zuvor vermutet. Eine Methylierung in 2- und 6-Position ohne gleichzeitige Methylierung in Position 3 führt offensichtlich zu keiner Trennung, obwohl selbst das reine  $\beta$ -CD, welches natürlich in 3-Position auch nicht methyliert ist, eine sehr gute Trennung zeigte. Die unterseitig gelegene Position 6 kann hier also nicht ausschlaggebend sein. Offensichtlich ist in diesem Fall ein Zusammenspiel der Positionen 2 und 3 für eine gute Trennung maßgebend.

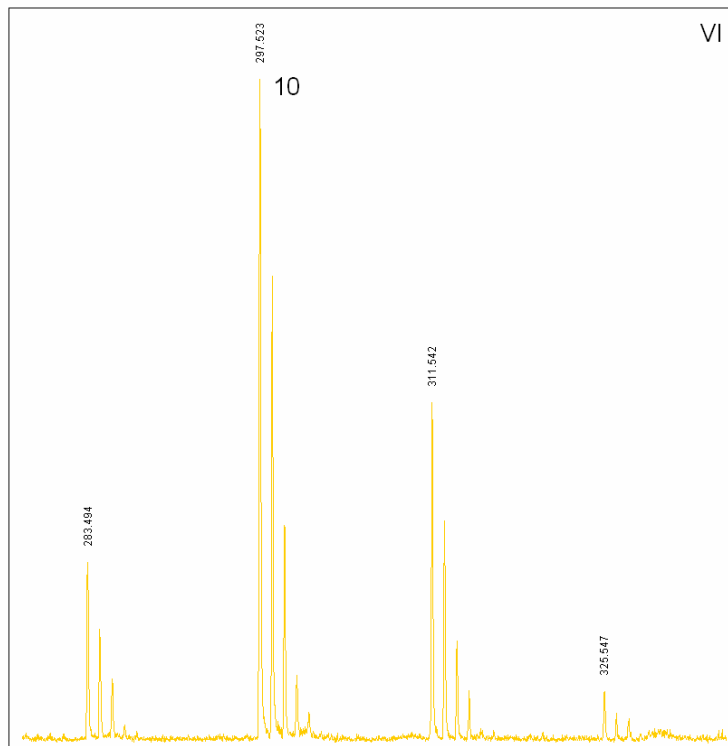
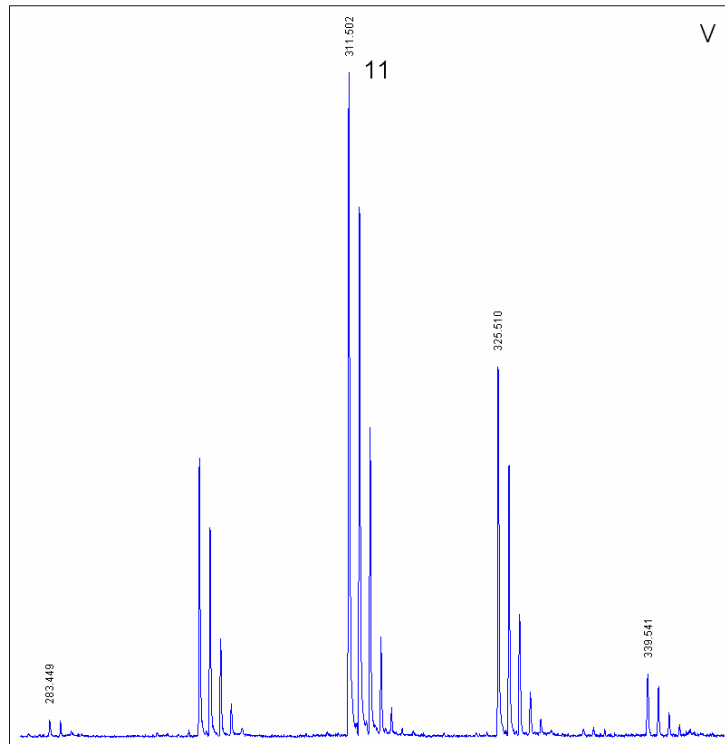
### Randomisiert methyliertes $\beta$ -Cyclodextrin

$\beta$ -CD wurde randomisiert methyliert (vgl. Kap. 3.2.2). Das erhaltene Reaktionsgemisch wurde säulenchromatographisch in sieben Chargen (I-VII) getrennt und jede mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektroskopie charakterisiert.









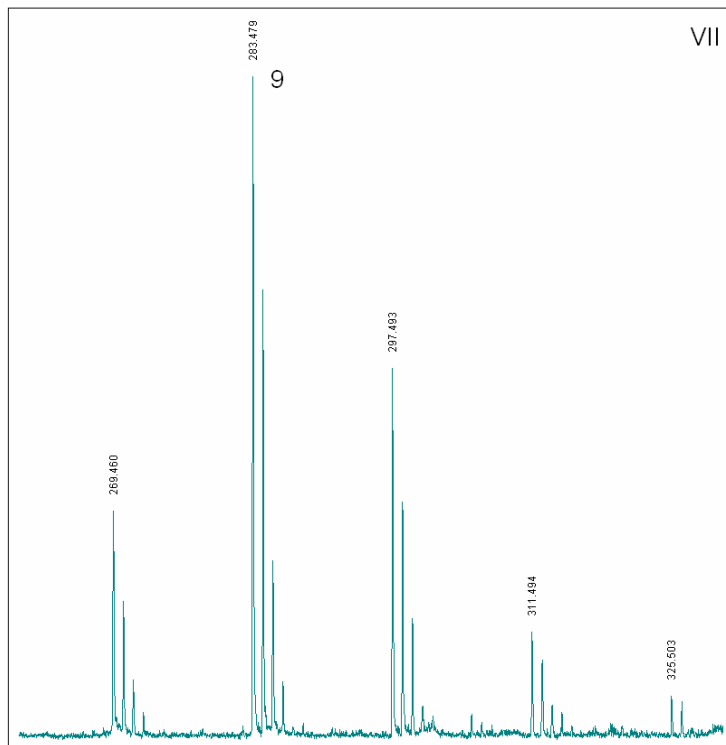


Abbildung 42: MALDI-TOF-Massenspektren der sieben Chargen des randomisiert methylierten CDs unter Angabe der Methylgruppenzahl des am stärksten vertretenen Moleküls (arabische Zahl am höchsten Peak).

Die Abbildung 42 zeigt die MALDI-TOF-Spektren der Chargen I bis VII. Die arabische Zahl am Hauptpeak gibt an, wie viele Methylgruppen das am stärksten vertretene Cyclodextrin besitzt. Wie zu erwarten war, nimmt die Zahl der Methylgruppen des Hauptpeaks von Charge zu Charge ab, da für die weniger methylierten CDs, aufgrund ihrer stärkeren Wechselwirkung mit dem Kieselgel der Säule, längere Retentionszeiten erwartet wurden. Das Feinmuster in den Massenspektren spiegelt die natürliche Isotopenverteilung wider. Die Peakgruppen unterscheiden sich jeweils um eine Masse von 14, was einer Methylgruppe entspricht. So sind im Massenspektrum der Charge VII Signale von  $\beta$ -CD mit 8 bis 12 Methylgruppen zu sehen, wobei das neunfach methylierte CD am stärksten vertreten ist.

Um die Leistungsfähigkeit der beiden Massentechniken zu prüfen und zu vergleichen wurde von der Charge VII unter den gleichen Bedingungen wie zuvor bei den acetylierten CDs ein ESI-Spektrum aufgenommen.

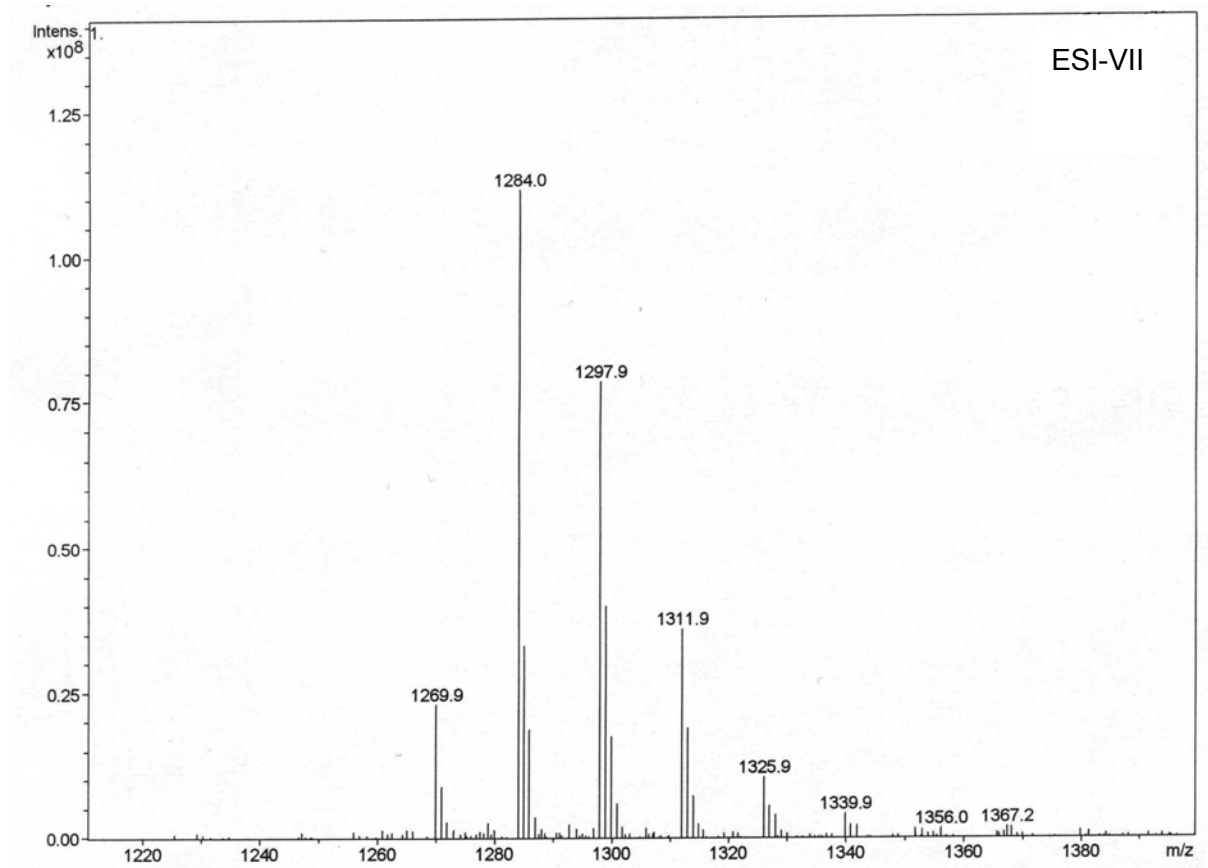


Abbildung 43: ESI-Massenspektrum der siebten Charge des randomisiert methylierten CDs gelöst in Methanol/Wasser 1:1 in einer Konzentration von 0.6 mg/ml. Die Messmethode entspricht der der acetylierten CDs.

Die beiden Messtechniken MALDI-TOF und ESI liefern beide vergleichbare Ergebnisse. Die erhaltenen Massen sind identisch so wie das Peakmuster, lediglich die relative Peakhöhe weist leichte Unterschiede auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Vergleichen.<sup>135</sup>

Jedes der Gemische I bis VII wurde in einer Konzentration von jeweils 1 mM dem Hintergrundelektrolyten zugesetzt. Als Basis zur Berechnung der Einwaage wurde die Masse des Hauptpeaks angenommen.

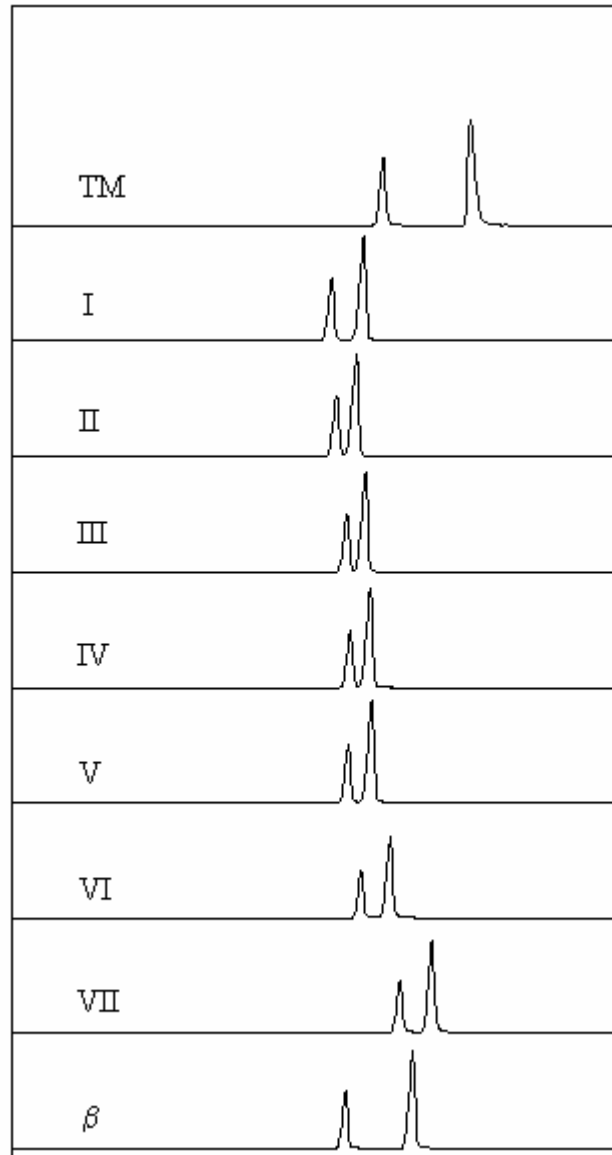


Abbildung 44: Ausschnitte aus den Elektropherogrammen der sieben Fraktionen des randomisiert methylierten CD und reinem TM bzw.  $\beta$ -CD.

Das erste und das letzte Elektropherogramm wurden jeweils mit den reinen CDs, TM bzw.  $\beta$ -CD durchgeführt und zeigen die bereits aus der ersten Versuchsreihe bekannte Trennung. Die randomisiert methylierten CDs zeigen jedoch nicht den Trend, den man bei den  $\beta$ -CD/TM-Gemischen beobachten konnte. Hier nimmt die Trennleistung ab, durchläuft ein Minimum und steigt dann wieder an.

Zusammenfassend lässt sich zu den Experimenten mit den Enantiomeren von 1,1'-Binaphthalin-2,2'-diyl-phosphat sagen, dass sich die Trennleistung von randomisiert substituierten CDs nur sehr eingeschränkt vorhersagen lässt. Des weiteren kann

man schlussfolgern, dass eine einfache Charakterisierung der CDs über den durchschnittlichen molekularen Substitutionsgrad (MS) nicht ausreicht, um mit randomisiert substituierten CDs zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen. Eine homogene Charge mit MS 0.67, wie es ein reines 2,6-Di-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin darstellt, zeigt ein gänzlich anderes Trennverhalten wie ein auf den selben MS gemischtes heterogenes  $\beta$ -CD/TM-System. Diese Ergebnisse zeigen, dass für die Validierung von CE-Methoden nur reine, exakt definierte CDs geeignet sind oder definierte CD-Gemische, die in ihrer Zusammensetzung genau reproduziert und charakterisiert werden können. Der Einsatz von Gemische, die lediglich eine statistisch/durchschnittlich vergleichbare Zusammensetzung aufweisen, wie es der MS darstellt, können zu deutlich Abweichungen in den Ergebnissen gegenüber der validierten Methode führen.

#### **2.4.4 Zirkular-Dichroismus-Messungen**

##### *Die Methode*

1,1'-Binaphthalin-2,2'-diyl-phosphat besitzt zwei Chromophore in Form der beiden Binaphthylsysteme. Diese sind über die Chiralitätschse miteinander verbunden. Sie liegen nicht in einer Ebene, sondern sind in einem bestimmten Winkel gegeneinander verdreht. Dieser Winkel, der von den beiden Chromophoren gebildet wird, sollte das Absorptionsverhalten des gesamten Moleküls wesentlich mitbestimmen. Wird das BNP in ein Cyclodextrin eingelagert, so könnte man eine Änderung des Winkels und somit des Absorptionsverhalten erwarten.

Die Cyclodextrin-Ketoprofen-Komplexe<sup>136</sup> der beiden Enantiomeren wurden ZD-spektroskopisch vermessen. Es wurde der Einfluss der CD-Konzentration sowie des CD-Typs auf das ZD-Spektrum untersucht. Die Variation der CD-Konzentration wirkte sich bei beiden Enantiomeren nur schwach auf die Bande bei 250 nm und nicht auf die bei 220 nm aus. Der Einsatz von unterschiedlichen CDs führte jedoch v.a. beim S-Enantiomer zu starken Intensitätsveränderungen beider Banden. Dies hat zur Folge, dass die ZD-Spektren der beiden Enantiomeren nicht mehr wie Bild und Spiegelbild aussehen, und sich ihre Summe nicht mehr auf Null addiert. Somit konnte eine Methode zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses mittels ZD-Spektroskopie kalibriert werden.

Als Basislösung wurde analog zu den CE-Messungen ein 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer verwendet. Hydroxypropyl-β-CD (MS 0.8) wurde in Konzentrationen von 1 bis 15 mmol/l in zweier Schritten, so wie zusätzlich 20, 25 und 30 mmol/l im Puffer gelöst; Diac wurde in den Konzentrationen von 1, 3 und 5 mmol/l zugegeben. Mit der das jeweilige CD enthaltenen Pufferlösung wurde vor jeder Messung ein Nullabgleich gemacht, um bei der Messung nur das Signal des BNP zu erhalten. 5 mg von S-BNP bzw. R-BNP wurden in jeweils 5 ml Methanol gelöst. 250 µl dieser Stammlösung wurden für jede Messung entnommen und zu 5 ml Pufferlösung gegeben, was einer Endkonzentration von 0.14 mM an BNP in der Probenlösung entspricht. Die Aufnahme der ZD-Spektren erfolgte mit einem ZD-Spektrometer des Typs Dichrograph CD 6 der Firma Jobin Yvon (München, Deutschland).

### Die Ergebnisse

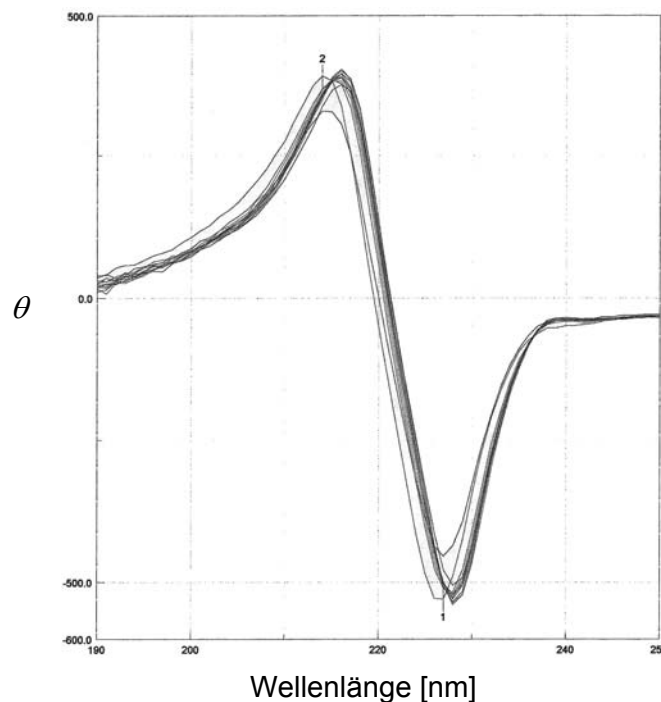


Abbildung 45: ZD-Spektrum von R-BNP unter Zusatz von Hydroxypropyl-β-CD in den Konzentrationen von: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 25 und 30 mmol/l.

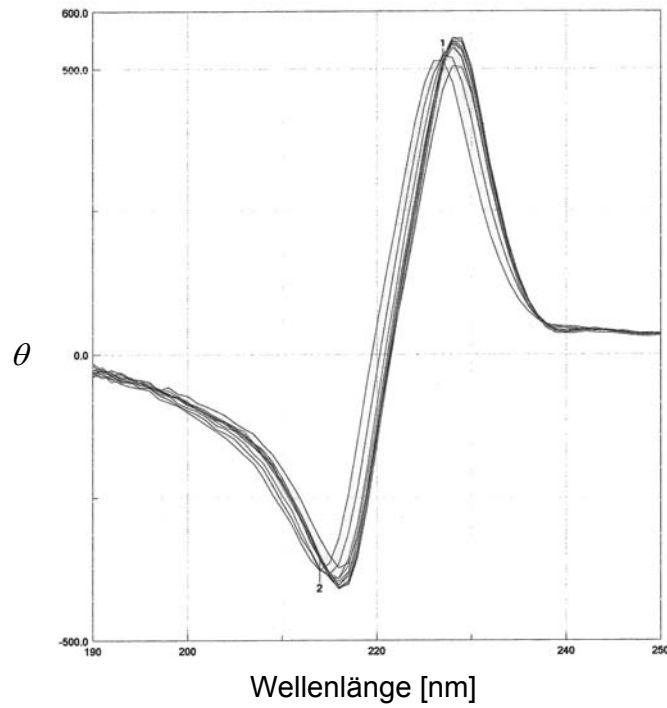


Abbildung 46: ZD-Spektrum von S-BNP unter Zusatz von Hydroxypropyl- $\beta$ -CD in den Konzentrationen von: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 20, 25 und 30 mmol/l.

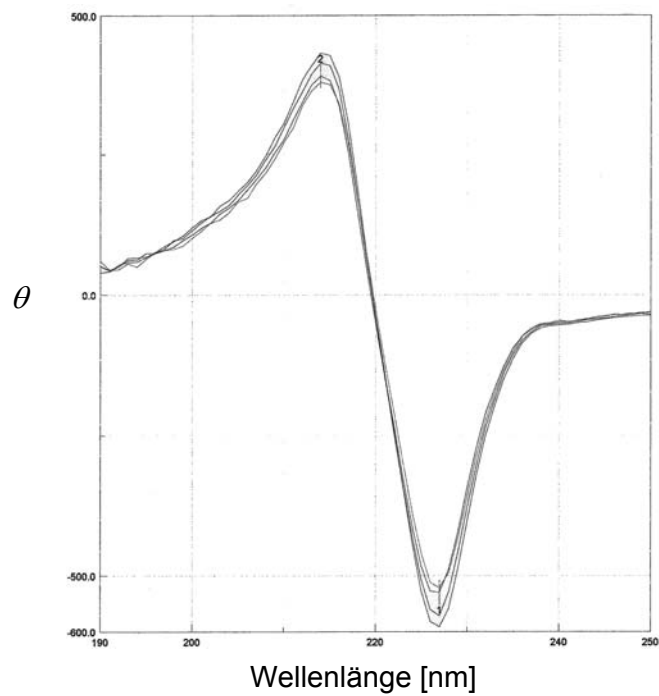


Abbildung 47: ZD-Spektrum von R-BNP unter Zusatz von Diac in den Konzentrationen von: 0, 1, 3 und 5 mmol/l.

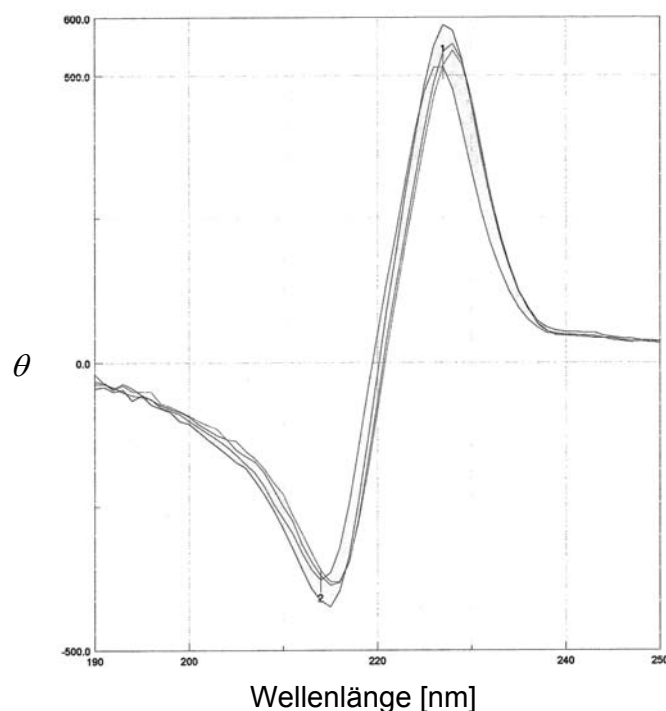


Abbildung 48: ZD-Spektrum von S-BNP unter Zusatz von Diac in den Konzentrationen von: 0, 1, 3 und 5 mmol/l.

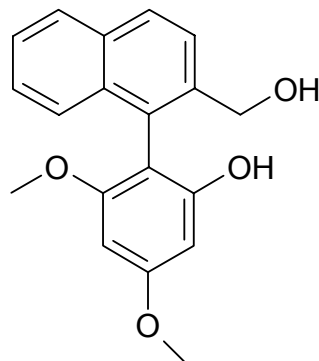
Bei allen vier aufgenommenen ZD-Serien zeigt sich durch den Zusatz des Cyclodextrins nur eine leichte, nicht signifikante Verschiebung des ZD-Spektrums. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Shift des Spektrums und der zugesetzten CD-Konzentration ermittelt werden. Die erwartete Änderung des Absorptionsverhaltens konnte nicht beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass der nicht-komplexierte Teil an BNP in der Probenlösung weitaus größer ist, als der komplexierte, oder dass die Wechselwirkungen zwischen CD und BNP so schwach sind, dass sie das Absorptionsverhalten nicht beeinflussen. Nichtsdestoweniger wurden unter vergleichbaren Bedingungen in der Kapillarelektrophorese Enantiomerentrennung beobachtet.



## 2.5 2-Hydroxymethyl-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)naphthalin

### 2.5.1 Die Probe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde noch ein weiteres Atrop-Enantiomerenpaar untersucht: 2-Hydroxymethyl-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)naphthalin (**11**). Im Gegensatz zu 1,1'-Binaphthalin-2,2'-diyl-phosphat (**10**) wird hier die freie Drehung um die Chiralitätsachse nicht durch einen geschlossenen Ring, sondern lediglich durch die Substituenten am NaphthalinGrundgerüst in 2-Position und am Phenylrest in 2- und 6-Position eingeschränkt.



**11**

### 2.5.2 Die Methode

#### *Chemikalien*

Das 2-Hydroxymethyl-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)naphthalin (**11**) wurde im Arbeitskreis Bringmann synthetisiert.<sup>137,138</sup>

*Heptakis*-(6-sulfato)- $\beta$ -CD (HS) und *Heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD (HDAS) wurden von Regis (Regis Technologies, Inc., Morton Grove, USA) bezogen. Das Dinatriumhydrogenphosphat (p.a.) wurde bei Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft.

#### *CE-Parameter*

Die Experimente wurden mit einem Beckman P/ACE System MDQ (Fullerton, CA, USA) durchgeführt. Die eingesetzte Quarzglas Kapillare hatte eine Gesamtlänge von 60.2 cm bzw. 50 cm bis zum Detektor. Der Innendurchmesser der Kapillare betrug 50  $\mu$ m. Die Injektionszeit der Proben war 5 s. Die Trennung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und einer Spannung von 20 kV. Das Signal wurde bei 214 nm

mit einem UV-Detektor aufgenommen. Die Kapillare wurde vor jeder Messreihe für 20 Minuten mit 0.1 M NaOH und 10 Minuten mit Milliporewasser konditioniert. Vor jeder Messungen wurde sie für 2 Minuten mit 0.1 M NaOH, 1 Minute mit Wasser und abschließend für 2 Minuten mit dem entsprechenden Hintergrundelektrolyt gespült. Eine 100 mM Lösung von Dinatriumhydrogenphosphat mit einem pH von 9.4 wurde als Hintergrundelektrolyt eingesetzt. Die Probenbereitung erfolgte durch Lösen von 1 mg **11** in 1 ml Methanol. 250 µl dieser Lösung wurden anschließend mit Milliporewasser auf 5 ml verdünnt. Vor dem Einsatz wurden die Pufferlösungen mit einen 0.22 µm Spritzenfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gefiltert.

### 2.5.3. Die Ergebnisse

Bei der Methodenentwicklung wurden folgende CDs getestet:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, *Heptakis*-(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (DM), *Heptakis*-(6-sulfato)- $\beta$ -CD (HS), *Heptakis*-(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin (HDAS) und *Heptakis*-(2,3-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin (HDMS). Alle CDs wurden im Konzentrationsbereich von 1 mM bis 15 mM in 2mM-Schritten eingesetzt. Mit den unsubstituierten CDs sowie mit HDMS konnte über den gesamten Konzentrationsbereich kein Trennerfolg erzielt werden. Bei DM konnte von 1 mM bis 7 mM eine Antrennung beobachtet werden. Die beste Auflösung ( $R_S = 0.9$ ) wurde hier mit 3 mM erreicht. HS zeigte eine erste Antrennung bei 7 mM; die Trennung verbesserte sich unter weiterer Erhöhung der CD-Konzentration. Die höchste Auflösung ( $R_S = 2.0$ ) wurde somit auch mit der höchsten getesteten CD-Konzentration (15 mM) erzielt. Ähnlich verhält es sich mit HDMS, wobei hier die erste Antrennung schon bei einer CD-Konzentration von 3 mM beobachtet werden konnte, und mit 15 mM eine Auflösung von  $R_S = 2.6$  erreicht wurde.

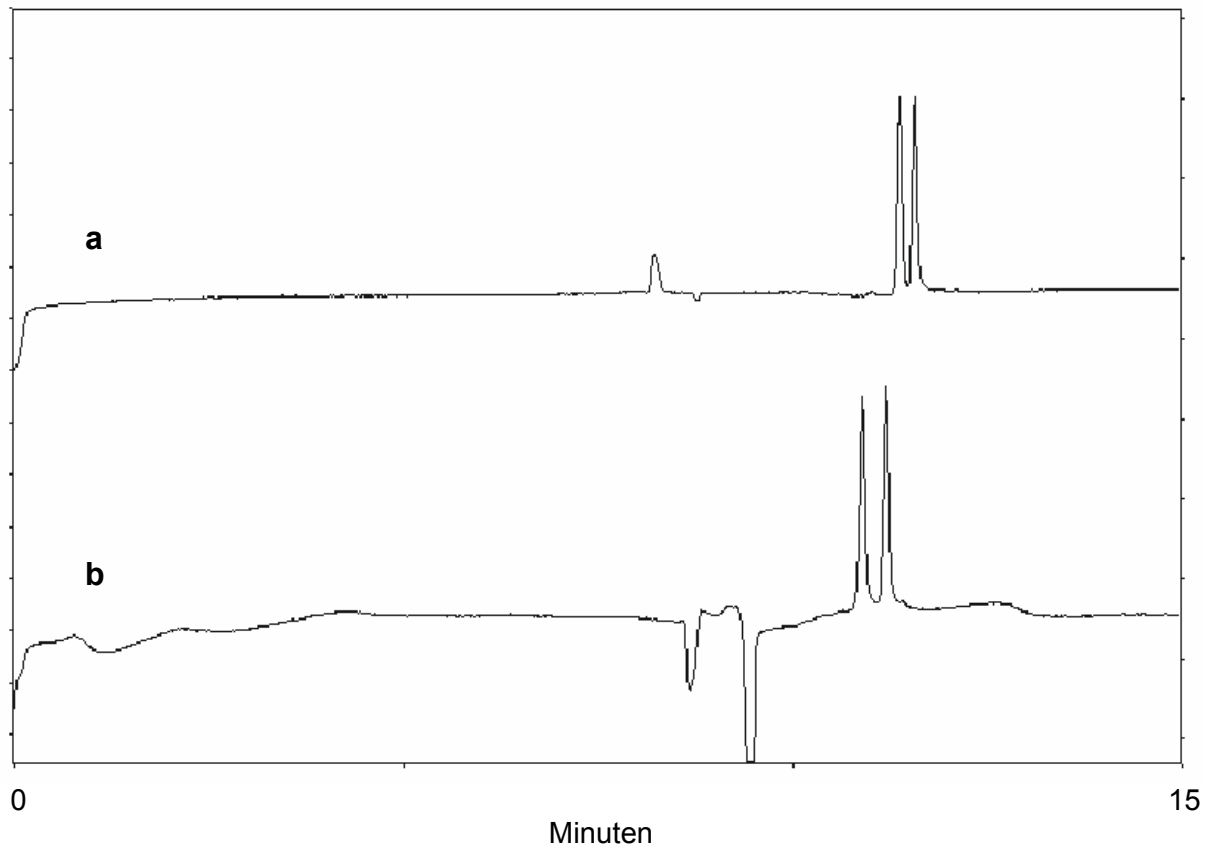


Abbildung 49: Elektropherogramme erzielt mit **a)** HS und **b)** HDAS. Die Trennung erfolgte in einem  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer der Konzentration 100 mM und einem pH von 9.4. Die CD-Konzentration beträgt jeweils 15 mM.

In Abbildung 49 sind die Elektropherogramme dargestellt, die mit HS (oben) bzw. HDAS (unten) erzielt wurden. Um eine Basislinientrennung zu erzielen waren bei HS eine CD-Konzentration von 13 mM, bei HDAS von 9 mM nötig. Man kann davon ausgehen, dass eine weitere Erhöhung der CD-Konzentration dieser beiden Cyclodextrine über einen gewissen Bereich noch zu einer höheren Auflösung führen wird. Bemerkenswert ist, dass das dritte sulfatierte CD, HDMS, selbst bei 15 mM noch keine Antrennung erkennen ließ. Dies lässt darauf schließen, dass hier für eine Trennung das Zusammenspiel der Substituenten an oberen und unteren Rand der CD-Kavität maßgebend ist. Man könnte schlussfolgern, dass **11** mit der Methoxygruppe an der 4-Position des Phenylrestes voraus durch die größere Öffnung in die Kavität einlagert und der Sauerstoff der Methoxygruppe mit den OH-Gruppen der 6-Position des HS Wasserstoffbrücken ausbilden kann bzw. in Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit den Ketofunktionen des HDAS tritt. Mit den

Methoxygruppen des HDMS wahren eher eine abstoßende, den Komplex destabilisierende Wechselwirkungen zu erwarten.

# 3. Synthese

## 3.1 Aufgabenstellung und Strategie

Wie bereits im analytischen Teil dieser Arbeit erwähnt wurde ein Cyclodextrin, *Heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl)- $\beta$ -CD (Diac), selbst synthetisiert. Edukt dieser Synthese ist das native  $\beta$ -CD.

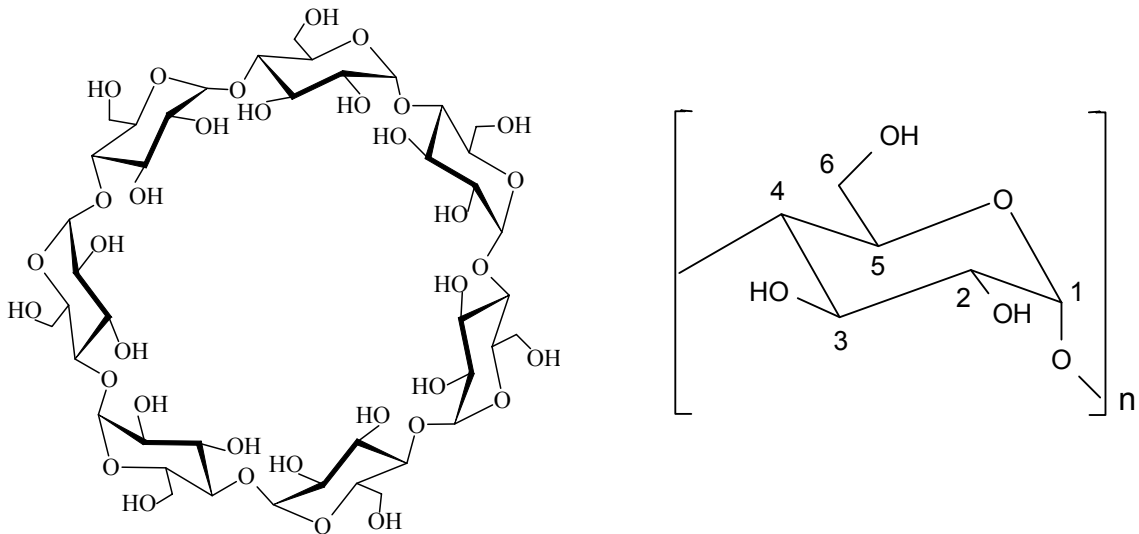


Abbildung 50: Strukturformel von  $\beta$ -CD und eines Monomerbausteins.

Das aus sieben Glucose-Monomeren aufgebaute  $\beta$ -CD besitzt 7 primäre, an Position 6 lokalisierte und 14 sekundäre, an den Positionen 2 und 3 gelegene Hydroxylgruppen. Will man nicht alle Hydroxylgruppen auf die gleiche Art und Weise derivatisieren, so ist eine Differenzierung notwendig. Bedingt durch ihre Lage, Basizität und Nucleophilie werden die primären Hydroxylgruppen bevorzugt im Vergleich zu den sekundären von Elektrophilen angegriffen, was eine Unterscheidung ermöglicht. Das Problem der Derivatisierung von Oligomere gegenüber einem Monomer ist statistischer Natur. So ist es wohl relativ unproblematisch, ein Glucose-Molekül in Position 6 zu substituieren; das Problem der CD-Chemie liegt darin, dass in jedem Monomer diese Position derivatisiert sein soll, ohne dass auch nur eine einzige Derivatisierung in Position 2 oder 3 stattfindet. Die Aufgabenstellung bestand in der Synthese des *Heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl)- $\beta$ -CD (Diac). Die Synthesestrategie war wie folgt: erst die reaktivere Position 6 mit einer Thexylschutzgruppe schützen, die freien sekundären Hydroxylgruppen acetylieren

und abschließend die Schutzgruppe wieder abspalten. Diese Strategie wurde bereits von Takeo<sup>139</sup> und Fügedi<sup>140</sup> unter Einsatz einer *tert.*-Butyldimethylchlorsilan (TBDMS) Schutzgruppe beschrieben. TBDMS wurde von Coleman durch Dimethyl-1,1,2-trimethylpropylchlorsilan (Thexyl) ersetzt. Letzteres ist bei Raumtemperatur flüssig, wären TBDMS bei Raumtemperatur zu zerfließen beginnt und somit weniger gut zu handhaben ist. Des Weiteren liefert die Thexylschutzgruppe auch bessere Ausbeuten. Die Acetylierung erfolgt durch Erhitzen in Acetanhydrid, die Abspaltung der Schutzgruppe durch Zugabe von Trifluorboretharat.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, das nur an sechs Glucose-Monomeren acetylierte  $\beta$ -CD zu synthetisieren. Wie aus früheren Arbeiten<sup>141</sup> mit *Oktakis*-(2,3-di-O-acetyl)- $\beta$ -CD bekannt war, kann das Fehlen der Acetylgruppen an einer einzigen Monoreneinheit bereits eine große Auswirkung auf die Trennung von Enantiomeren haben. Zwei Strategien wurden erprobt, um gezielt dieses unteracetyliertes  $\beta$ -CD zu erhalten. Zum einen sollte ein  $\beta$ -CD, welches in allen 6-Positionen und zusätzlich in einer 2-Position Silylschutzgruppen trägt, Ausgangssubstanz für den Acetylierungsschritt sein. Diese Verbindung fällt bei der Diac-Synthese in der ersten Stufe als Nebenprodukt an. Der Anteil des Nebenproduktes kann dadurch gesteigert werden, dass man die Reaktionszeit erhöht. Die zweite Route ging von reinem *Heptakis*-(6-O-dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl)- $\beta$ -CD aus, welches in einer separaten Reaktion an einem Monomer gezielt an 2- und 3-Position gleichzeitig geschützt werden sollte. Hierzu wurden folgende Schutzgruppen getestet: 1,2-Diphenyl-2-propanon, Dimethyldichlorsilan, Benzaldehyd, Methylphenyldichlorsilan, Tetramethyldisiloxan und 1,2-Bis(chlorodimethylsilyl)ethan. Mit keiner der eingesetzten Substanzen konnte gezielt ein Monomer gleichzeitig an 2- und 3-Position geschützt werden. In den meisten Fällen erfolgte beim Syntheseversuch kein Stoffumsatz.

Durch weitere Umsetzung des 7+1-geschützten  $\beta$ -CD konnte das Synthesziel auch nicht erreicht werden. Die Reaktionskontrolle mittels NMR erwies sich hier als unmöglich, da das Aufheben der Symmetrie zu einem Spektrum führt, welches sich nicht mehr interpretieren lässt. Aus diesem Grund lässt sich die genaue Ursache für das Scheitern dieser Route auch nicht bestimmen.

Es sollten weiterhin  $\beta$ -CD randomisiert methyliert, so dass ein Cyclodextringemisch entsteht, dessen Einzelcyclodextrine sich in ihrem durchschnittlichen molekularen Substitutionsgrad unterscheiden.

## 3.2 Experimentalteil

### Chemikalien

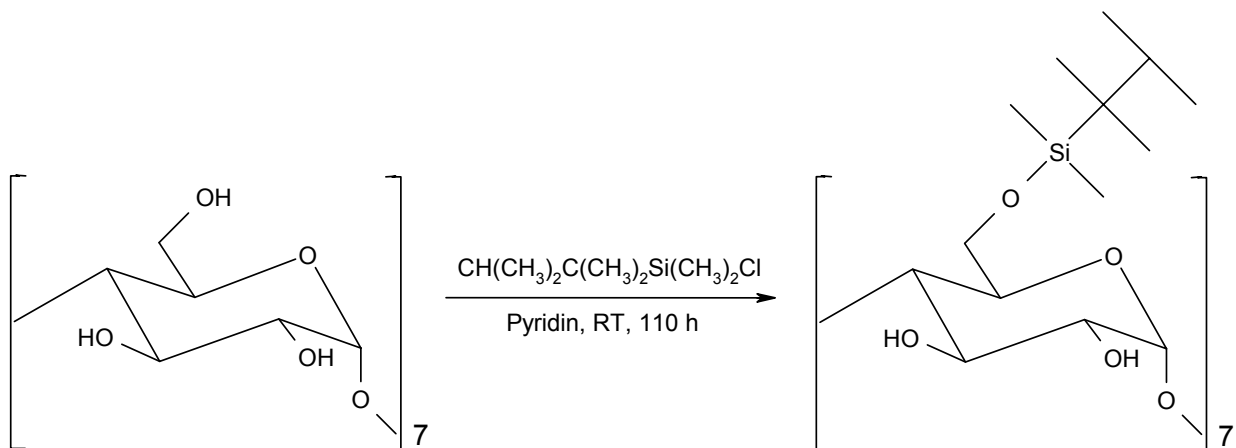
Das  $\beta$ -CD (Lot-Nr. 1511) stammt von Wacker (Burghausen, Deutschland). Das Thexyldimethylchlorsilan und das Bortrifluorid-ethyletherat wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft. Das Essigsäureanhydrid wurde von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) bezogen.

### NMR

Alle NMR-Spektren wurden auf einem Avance 400 MHz NMR-Septrometer (400.132 MHz) der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde THF- $d_8$  verwendet. Das Lösungsmittelsignal wurde im  $^1\text{H-NMR}$  auf 3.58 ppm kalibriert.

### 3.2.1 Acetylierung

#### Schützen der 6-Position



	Edukt	Produkt
Summenformel	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{35}$	$\text{C}_{98}\text{H}_{196}\text{O}_{35}\text{Si}_7$
molare Masse [g/mol]	1135.0	2131.2

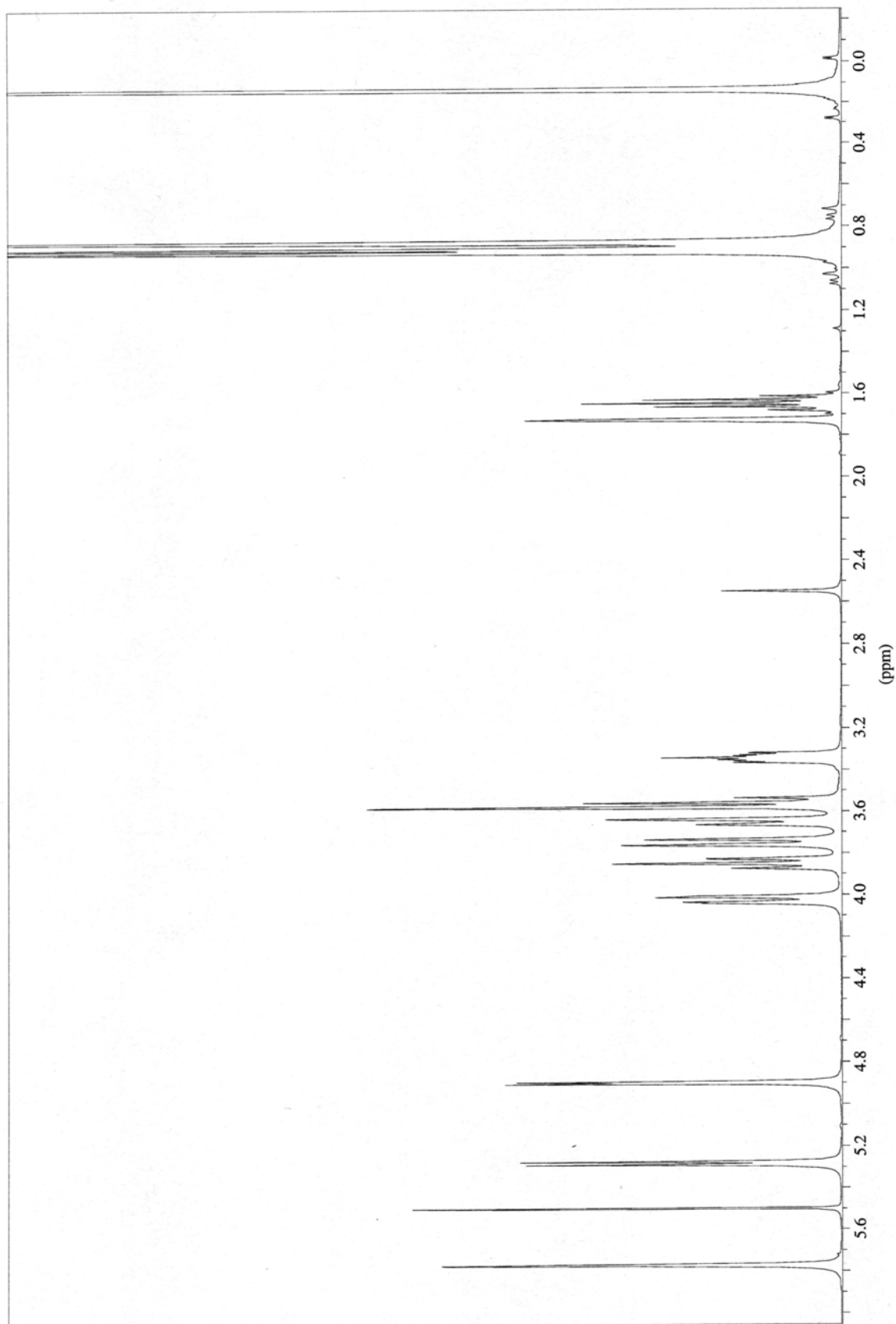
3,0 g (2.64 mmol)  $\beta$ -CD werden in 100 ml Pyridin gelöst. 9.4 g (52.8 mmol) des Chlorsilans werden unter Schutzgas und Eiskühlung langsam unter Rühren zugetropft. Das Reaktionsgemisch rührt für 4 h bei 0° C und anschließend 110 h bei Raumtemperatur.

Das Pyridin wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in wenig  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen. Die organische Phase wird mit 1 M HCl und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach dem Waschen werden die wässrigen Phasen noch einmal mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  extrahiert, um das möglicherweise in Wasser in Lösung gegangene Produkt zurückzugewinnen. Die vereinigten organischen Phasen werden mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung neutralisiert und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert.

Das Rohprodukt wird über eine mit RP18-Kieselgel gepackte MPLC mit dem Fließmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 3 : 7 gereinigt. Die Fraktionen werden mit Hilfe von RP-DCs geprüft, vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Die Ausbeute betrug 2.01 g (0.94 mmol) *Heptakis*-(6-O-(dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl))- $\beta$ -CD, 36 %.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d_8$ -THF):  $\delta$  (ppm) = 0.13 (42 H, d, Si- $\text{CH}_3$ ), 0.87 / 0.91 (84 H, dd, C- $\text{CH}_3$ ), 1.64 (7 H, sep, C-H), 3.34 (7 H, m, C<sup>2</sup>-H), 3.55 und 3.65 (14 H, 2 d, C<sup>4</sup>-H und C<sup>5</sup>-H), 3.75 (7 H, d, C<sup>6</sup>-H<sub>2</sub>), 3.85 (7 H, t, C<sup>3</sup>-H), 4.02 (7 H, dd, C<sup>6</sup>-H<sub>2</sub>), 4.90 (7 H, d, C<sup>1</sup>-H), 5.28 (7 H, d, C<sup>2</sup>-OH), 5.77 (7 H, s, C<sup>3</sup>-OH).





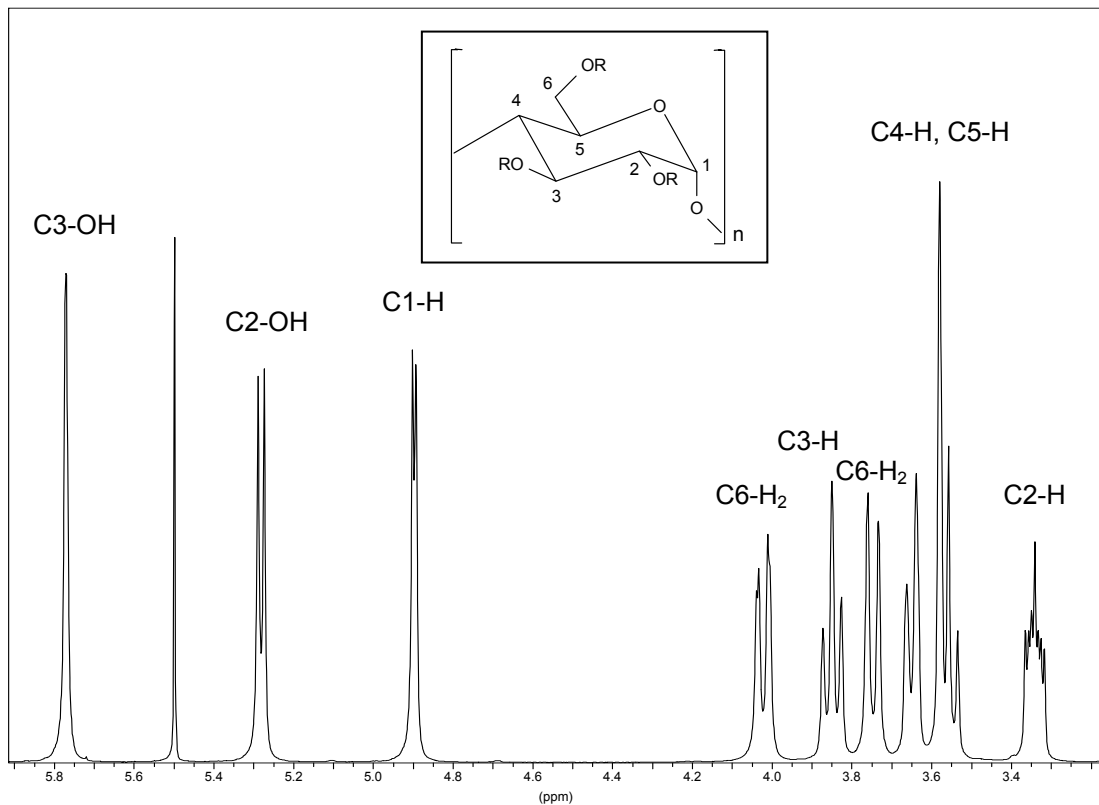
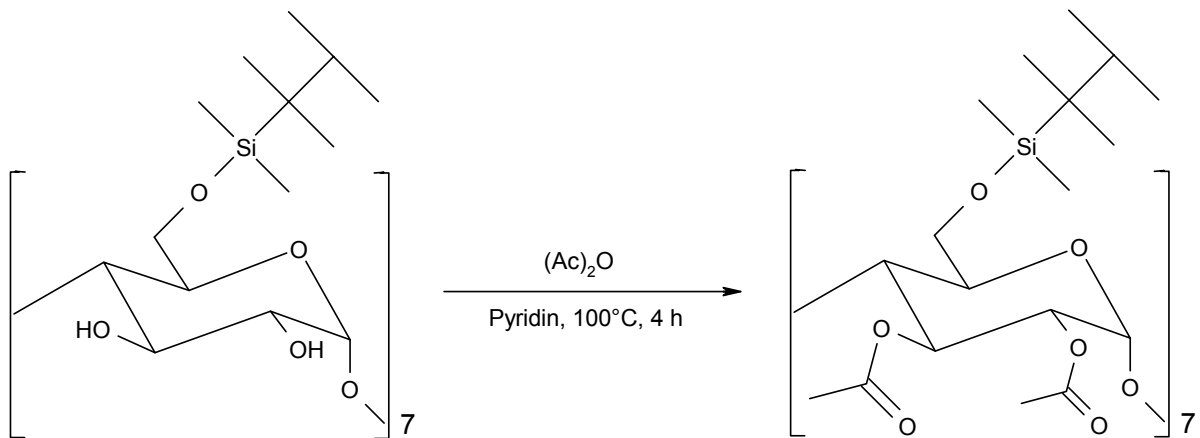


Abbildung 51:  $^1\text{H-NMR}$  von Heptakis-(6-O-dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl)- $\beta$ -CD aufgenommen in THF- $d_6$ : Übersicht und Ausschnitt.

### Acetylierung der 2- und 3-Position



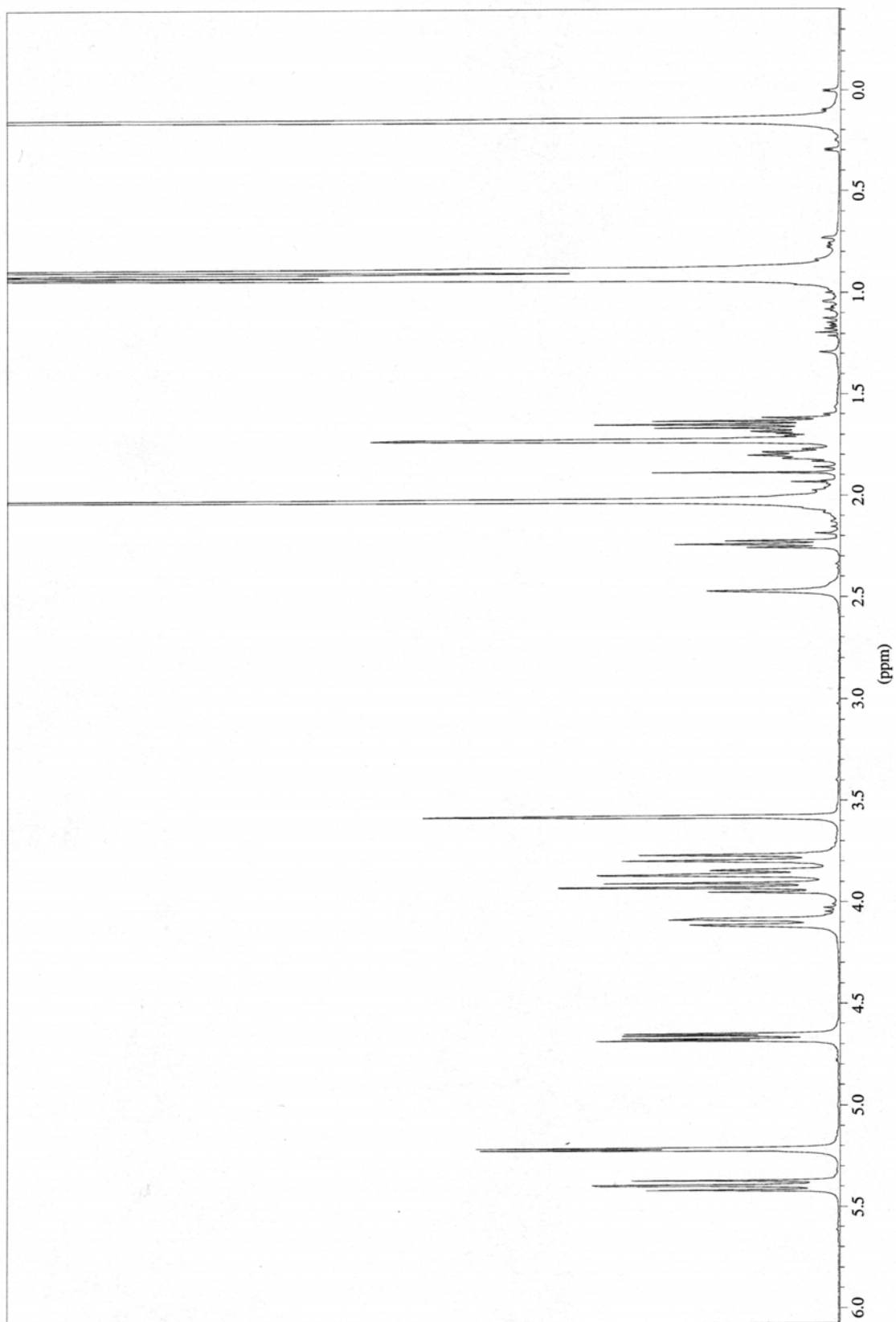
	Edukt	Produkt
Summenformel	$\text{C}_{98}\text{H}_{196}\text{O}_{35}\text{Si}_7$	$\text{C}_{126}\text{H}_{224}\text{O}_{49}\text{Si}_7$
molare Masse [g/mol]	2131.2	2719.7

1.84 g (0.863 mmol) *Heptakis*-(6-*O*-dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl)- $\beta$ -CD werden in einem Gemisch aus 20 ml Essigsäureanhydrid und 25 ml Pyridin gelöst. Das Reaktionsgemisch wird für 4 h auf 100° C erhitzt.

Das überschüssige Anhydrid wird zusammen mit dem Pyridin im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in wenig CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> aufgenommen. Die organische Lösung wird erst mit 1 M HCl und dann mit Wasser gewaschen. Nach dem Waschen werden die wässrigen Phasen noch einmal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> im Vakuum abdestilliert.

Das Rohprodukt wird über eine Kieselgel-60-Säule mit dem Fließmittel Essigsäureethylester : Petrolether (40-60) = 7 : 3 gereinigt. Nach DC-Kontrolle werden die Fraktionen vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Die Ausbeute betrug 1.3 g (0.48 mmol) *Heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-(dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl))- $\beta$ -CD, 55 %.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>8</sub>-THF):  $\delta$  (ppm) = 0.15 (42 H, d, Si-CH<sub>3</sub>), 0.89 und 0.92 (84 H, dd und d, C-CH<sub>3</sub>), 1.65 (7 H, sep, C-H), 2.02 (42 H, s, CO-CH<sub>3</sub>), 3.78 (7 H, d, C<sup>6</sup>-H<sub>2</sub>), 3.85 und 3.93 (14 H, d und t, C<sup>4</sup>-H und C<sup>5</sup>-H), 4.10 (7 H, dd, C<sup>6</sup>-H<sub>2</sub>), 4.67 (7 H, dd, C<sup>2</sup>-H), 5.21 (7 H, d, C<sup>1</sup>-H), 5.39 (7 H, dd, C<sup>3</sup>-H).



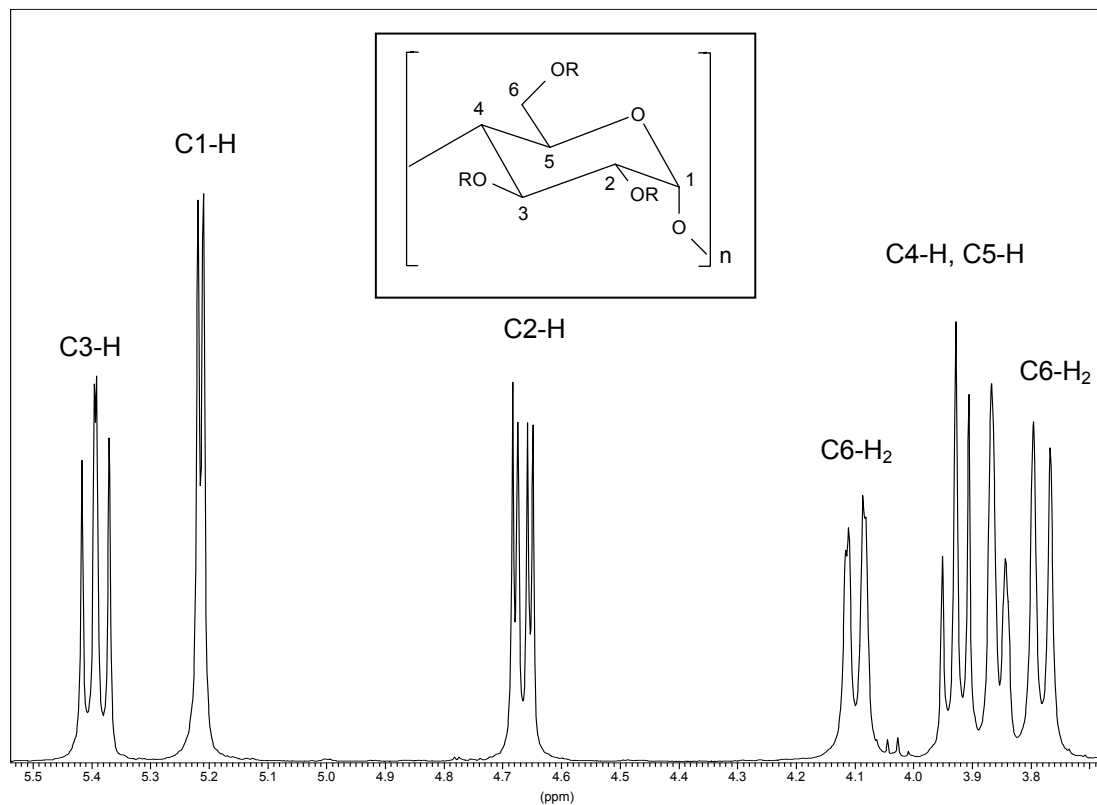
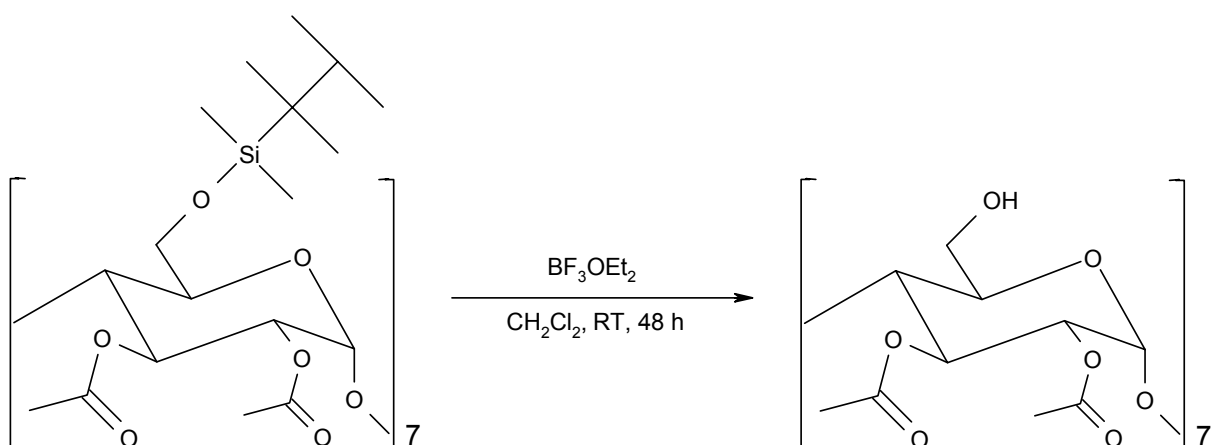


Abbildung 52:  $^1\text{H-NMR}$  von Heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O-(dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl))- $\beta$ -CD aufgenommen in  $\text{THF-d}_8$ : Übersicht und Ausschnitt.

### Abspalten der Silylschutzgruppe



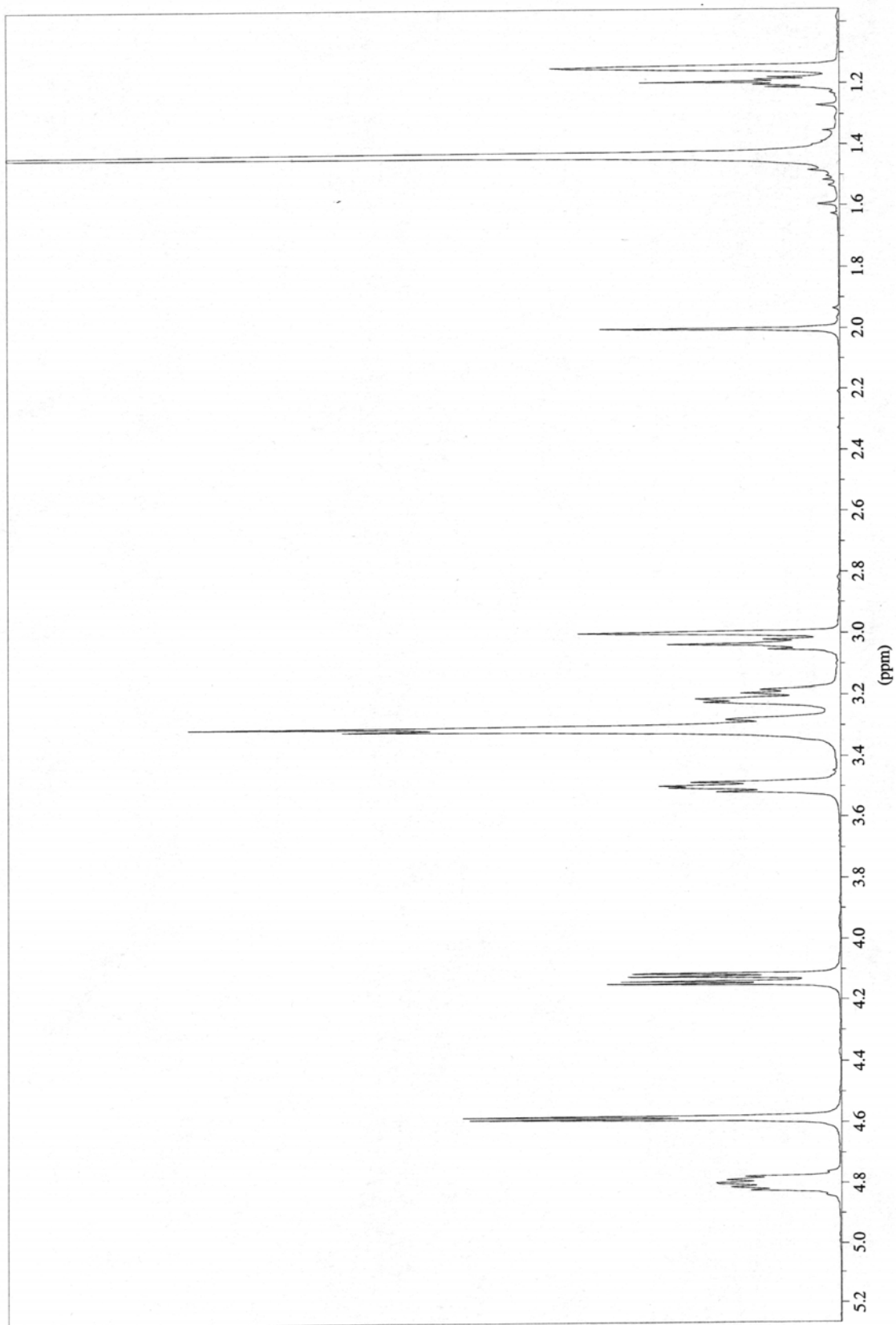
	Edukt	Produkt
Summenformel	$\text{C}_{126}\text{H}_{224}\text{O}_{49}\text{Si}_7$	$\text{C}_{70}\text{H}_{98}\text{O}_7$
molare Masse [g/mol]	2719.7	1723.5

1.2 g (0.7 mmol) *Heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-(dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl))- $\beta$ -CD werden in 40 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 2.05 g (14.4 mmol) Bortrifluorid-ethyletherat zugetropft. Das Reaktionsgemisch rührt bei Raumtemperatur für 48 h.

Die Reaktionslösung wird in einen Scheidetrichter mit Eiswasser gegossen. Anschließend wird die organische Phase mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wird noch einmal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> im Vakuum abdestilliert.

Das Rohprodukt wird über eine Kieselgel-60-Säule mit Ethylacetat : MeOH = 85 : 15 gereinigt. Die Ausbeute betrug 0.5 g (0.3 mmol) *Heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl)- $\beta$ -CD (Diac), 40 %.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, d<sub>8</sub>-THF):  $\delta$  (ppm) = 2.01 (42 H, s, CO-CH<sub>3</sub>), 3.78 (7 H, dd, C<sup>6</sup>-H<sub>2</sub>), 3.89 (21 H, m, C<sup>4</sup>-H und C<sup>5</sup>-H und C<sup>6</sup>-H<sub>2</sub>), 4.08 (7 H, dd, C<sup>6</sup>-OH), 4.71 (7 H, dd, C<sup>2</sup>-H), 5.16 (7 H, d, C<sup>1</sup>-H), 5.38 (7 H, m, C<sup>3</sup>-H).



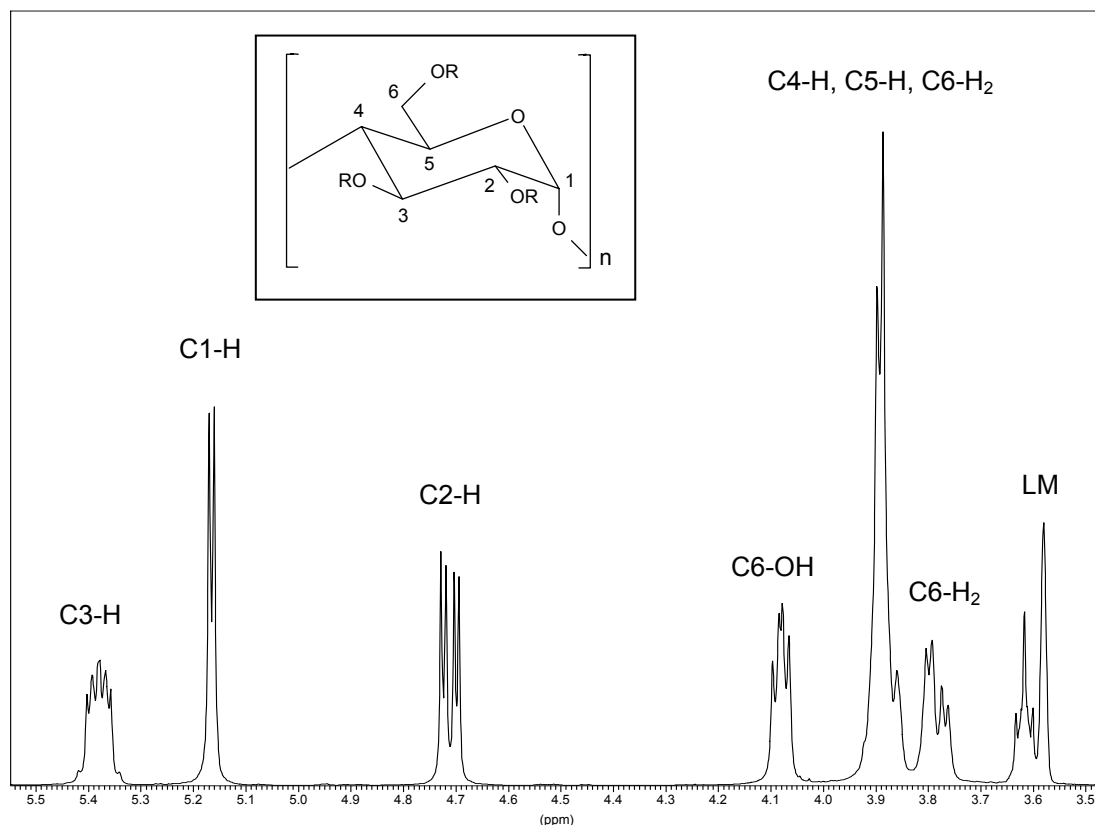


Abbildung 53: <sup>1</sup>H-NMR von *Heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl)-β-CD aufgenommen in THF-d<sub>8</sub>: Übersicht und Ausschnitt.

### 3.2.2 Methylierung

3.41 g (3.0 mmol) β-CD, welches zuvor über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet wurde, wurde in 70 ml DMF gelöst. Unter Stickstoff wurden bei 0 °C erst 1.6 g NaH zur Lösung zugegeben, anschließend 5.97 ml Methyljodid zugetropft. Die Lösung wurde 2 h bei 0 °C und weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das überschüssige NaH wurde durch Zugabe von MeOH zerstört. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in 150 ml CHCl<sub>3</sub> aufgenommen und mit Wasser, Natriumthiosulfatlösung, erneut mit Wasser und mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach dem Trocknen über MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde mit einem Gemisch aus Ether/n-Pentan 1:1 gewaschen. Die Ausbeute betrug 81 Prozent. Es wurde ein Schmelzbereich von 154-160 °C gemessen.



Das Cyclodextringemisch wurde anschließend mit Hilfe einer Flash-Kieselgelsäule (Korngröße 0.032-0.063 mm) mit einem Ethylacetat/Methanol-Gradienten (1:0 bis 1:1) in sieben Fraktionen aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen (I-VII) wurden mit Hilfe der Massenspektroskopie charakterisiert. Die MALDI-TOF-Massenspektren sind in Kapitel 2.4.3 Abbildung 42 wiedergegeben.

### 3.3 Diskussion der Ergebnisse

Wie schon in der Aufgabenstellung erwähnt, liegt die Syntheseproblematik darin, dass man es bei den Cyclodextrinen mit einem Oligomer zu tun hat. Das Problem der Synthese ist, jeweils selektiv alle Hydroxylgruppen einer Position umzusetzen; hier im ersten Schritt die der Position 6. Die erste Stufe der ist somit auch der Schlüsselschritt der gesamten Synthese. Erhält man hier kein reines Produkt, so sind Nebenprodukte in den Folgestufen bereits vorprogrammiert. Eine Reinigung des Rohproduktes mit Hilfe einer Säule ist somit unumgänglich. Eine eindeutige Charakterisierung der Zwischen- bzw. Endstufe mittels NMR ist nur bei reinen Substanzen, bei denen die Symmetrie nicht aufgehoben wurde, eindeutig möglich.

Beim Einfügen der Acetylgruppen kann man davon ausgehen, dass alle nicht geschützten OH-Gruppen acetyliert werden, wenn man genügend lange erhitzt. Dies hat das Zustandekommen von Nebenprodukten zur Folge, sollte eine OH-Gruppe in Position 6 im ersten Schritt nicht geschützt worden sein.

Die Abspaltung der Schutzgruppe, welches nur eine Frage der Zeit bzw. der Reagenzmenge ist, erweist sich als unproblematisch, da es hier zu keiner „Überreaktion“ kommen kann. Die erste Stufe hingegen muss möglichst genau an dem Zeitpunkt abgebrochen werden, an dem der Anteil des siebenfach geschützten  $\beta$ -CDs am größten ist.

Ein weiteres Problem liegt in der Trennung des entstandenen Reaktionsgemisches. Da die entstandenen Produkte sehr ähnliche physikalische Eigenschaften besitzen, ist für die Trennung eine Säule mit hoher Trennleistung von Nöten. Trotz Einsatz einer entsprechenden MPLC-Säule mit RP18-Kieselgel gelingt es nicht immer, die Produkte gänzlich voneinander zu trennen, d.h. man erhält Mischfraktionen. Neben der Bildung von über- bzw. untersubstituierten CDs stellen diese Mischfraktionen den Hauptgrund für die, trotz hohen Stoffumsatzes, geringe Reinausbeute dar. Diese

kann durch wiederholtes Säulen der jeweils erhaltenen Mischfraktionen gesteigert werden.

Abbildung 53 zeigt Chromatogramme verschiedener Fraktionen der ersten Stufe. Als stationäre Phase wurde RP 18-Material verwendet. Zur Detektion wurde Thymol/Schwefelsäure eingesetzt. Das Fließmittel entspricht dem der Säule ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 3 : 7).

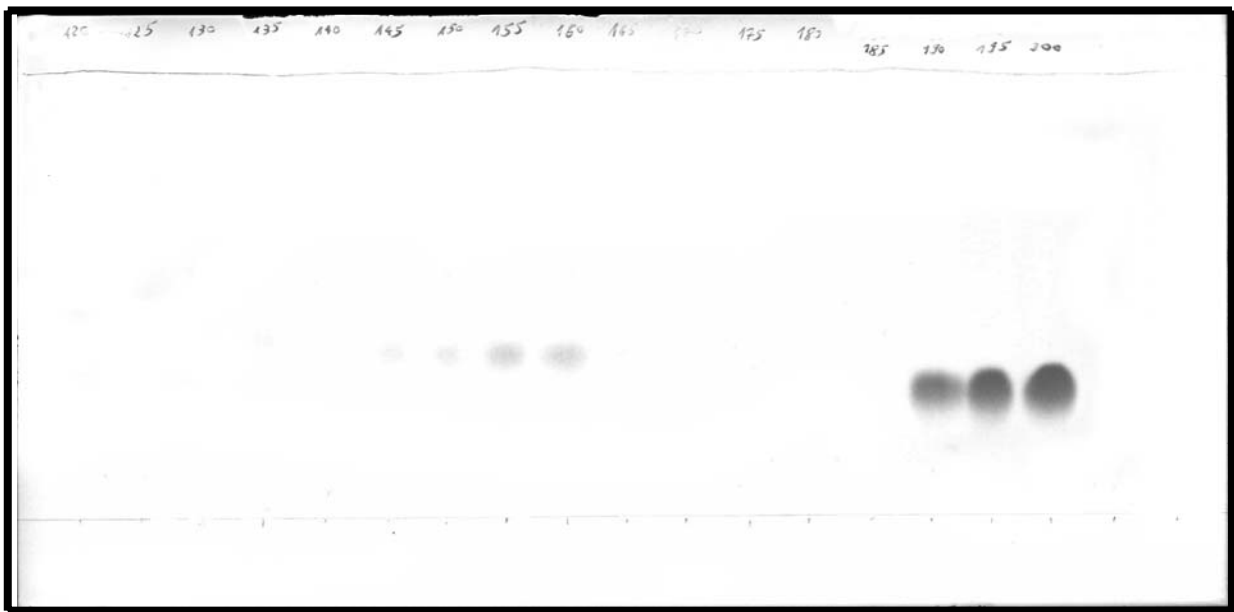


Abbildung 54: DC-Platte mit den Flecken von 6-fach und 7-fach (also in Position 6 vollständig) geschütztem  $\beta$ -CD.

Auf dem oben abgebildetem Chromatogramm sind kurz vor der Mitte schwach die Flecken des 6-fach geschützten  $\beta$ -CD zu sehen. Die später eluierten Fraktionen sind bei kleinerem  $R_f$ -Wert (0.30) als sehr viel stärkeren Flecken zu sehen und stellen das gewünschten an allen sieben primären Hydroxylgruppen geschützten Produkt dar.

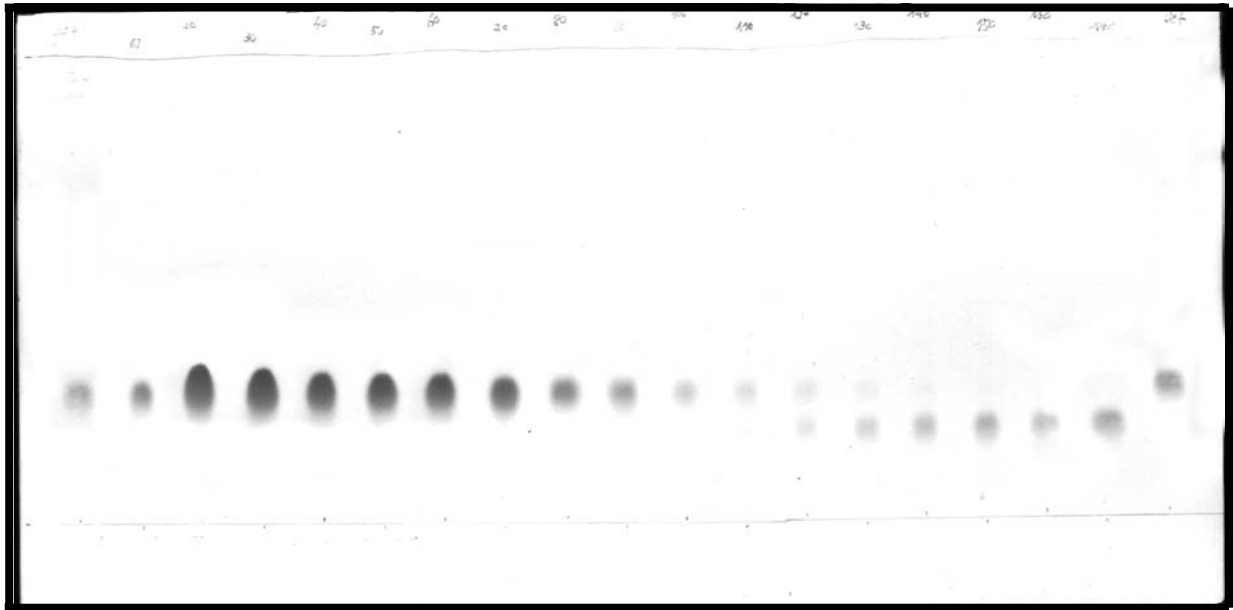


Abbildung 55: DC-Platte mit Flecken von 7-fach geschütztem  $\beta$ -CD und Flecken von Molekülen, bei denen zusätzlich bereits eine 2-Position mit der Schutzgruppe reagiert hat. Die beiden äußersten Flecken sind *Heptakis*-(6-*O*-dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl)- $\beta$ -CD-Referenzen.

Das Chromatogramm in Abbildung 55 zeigt von links startend die 7-fach geschützte Stufe I, *Heptakis*-(6-*O*-dimethylsilyl-1,1,2-trimethylpropyl)- $\beta$ -CD. Nach etwa 2/3 der Platte ist ein Bereich mit Mischfraktionen zu erkennen. Der hier unter dem Produkt zusätzlich auftretende Fleck, ist das an einer 2-Position zusätzlich geschützte  $\beta$ -CD. Die beiden äußersten Flecken sind Referenzen.

Das Gemisch aus randomisiert methylierten Cyclodextrinen konnten mit Hilfe einer Flash-Kieselgelsäule in sieben Chargen (I-VII) aufgetrennt werden, die im Anschluss an Hand ihrer MALDI-TOF-Massenspektren (Abb. 42 I-VII) im Bezug auf ihre genaue Zusammensetzung charakterisiert werden konnten. Die folgende Abbildung zeigt Chromatogramme verschiedener Fraktionen der Säule. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 verwendet. Zur Detektion wurde Thymol/Schwefelsäure eingesetzt. Das Fließmittelgemisch bestand zu gleichen Teilen aus Ethylacetat und Methanol.

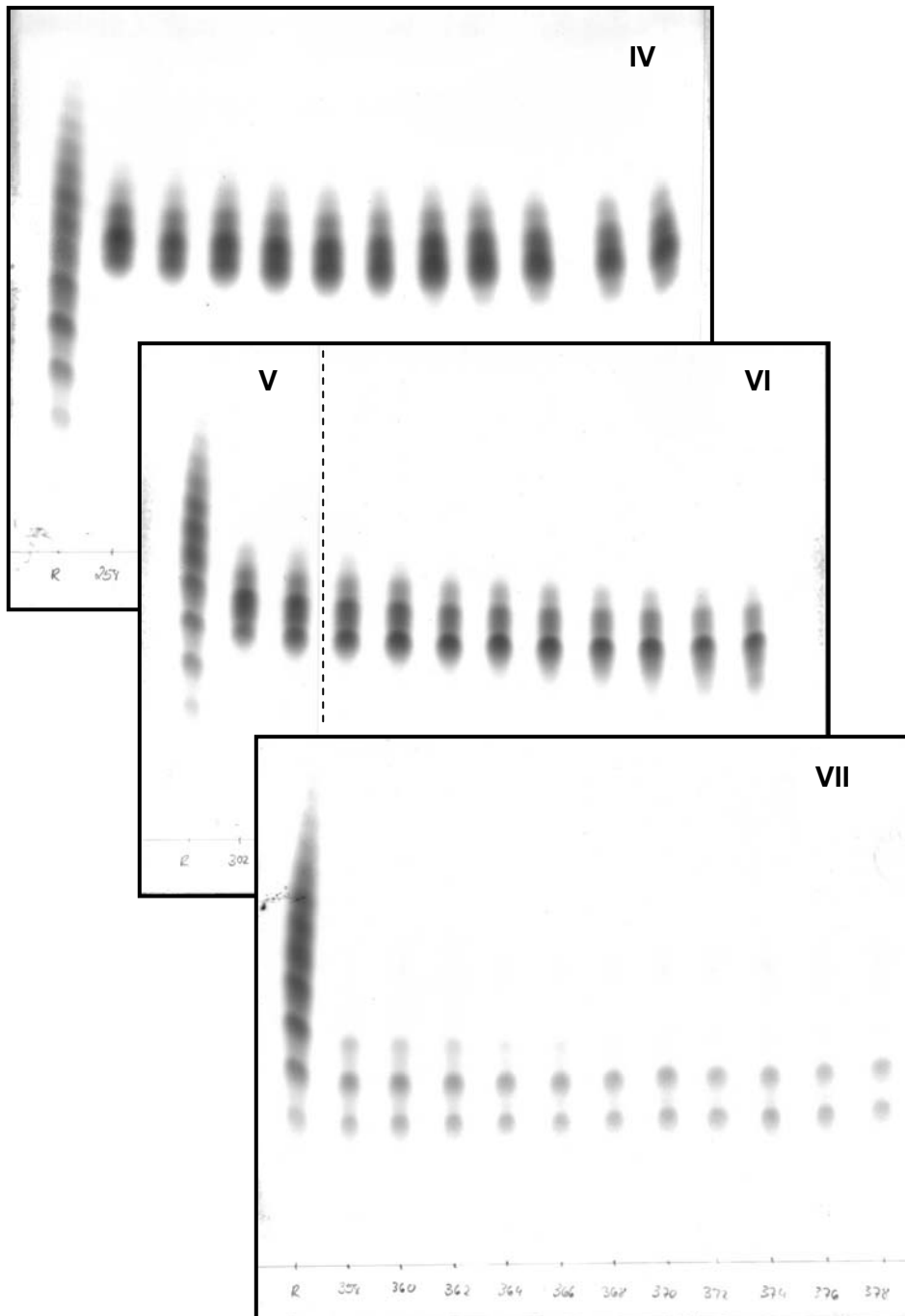


Abbildung 56: DC-Platten mit ausgewählten Fraktionen des randomisiert methylierten  $\beta$ -CD. Jeweils links außen auf jeder DC-Platte wurde das Gesamtgemisch aufgetragen. Die römischen Ziffern geben an, zu welcher der sieben Chargen die aufgetragenen Fraktionen vereinigt wurden.

Was bereits in den zugehörigen Massenspektren, die in Abbildung 42 wiedergegeben sind, zu erkennen war, zeichnet sich auch hier in den Chromatogrammen ab: eine vollständige Auftrennung der einzelnen CDs wurde nicht

erreicht. Wie fließend hierbei die Übergänge sind ist auf der mittleren DC-Platte zu erkennen, wo die ersten beiden Fraktionen der Charge **V** die folgenden der Charge **VI** zugeordnet wurden.

## 4. Zusammenfassung

Die vielfältigen isomeren Substanzen, die in dieser Arbeit getrennt wurden, zeigen, dass die cyclodextrin-modifizierte Kapillarelektrophorese eine sehr leistungsfähige Technik für die Trennung von Enantiomeren darstellt. Als kritisch erweist sich jedoch das Auffinden des richtigen Cyclodextrins bzw. dessen optimale Konzentration. Die Vorhersagbarkeit dieser Parameter ist noch zu gering, um hier vor den ersten Versuchen alleine anhand der Struktur des Moleküls sichere Aussagen machen zu können. So sind zur Zeit noch Versuchsreihen mit verschiedenen Cyclodextrinen und Bedingungen nötig, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Für die Zukunft wäre es wünschenswert, durch das Sammeln von mehr Erfahrungen und Ergebnissen, wie sie hier gezeigt wurden, schon möglichst direkt aus den Strukturen der zu trennenden Zielmoleküle eine Aussage über die Beschaffenheit des Cyclodextrins oder der CE-Methode machen zu können.

Von sechs verschiedenen schwach basischen Thiobarbituratracematen konnten fünf erfolgreich in ihr Enantiomeren getrennt werden. Unter den fünf erfolgreich getrennt Barbituraten waren zwei am Stickstoff alkyliert und ein weiteres sowohl am Stickstoff als auch am Schwefel. Die drei N-Phenyl- und N-Ethyl-substituierten Thiobarbiturate haben in 5-Position das Chiralitätszentrum. Bei den beiden nicht N-substituierten Thiobarbituraten liegt dieses jeweils in einer der Seitenketten, welche an die 5-Position gebunden sind. Es konnte die Abhängigkeit der Trennleistung von der Konzentration fünf verschiedener kommerzieller CDs aufgezeigt werden. Die Konzentration, die zur besten Trennleistung führte, variierte von sehr kleinen (1 mmol/l) bis hin zu größeren (18 mmol/l). Die Thiobarbiturate, die am Stickstoffatom keinen Substituenten tragen, konnten mit  $\gamma$ -CD am besten getrennt werden ( $R_S > 6$ ). Hingegen konnte für die beiden nur am Stickstoff alkylierten Barbiturate mit  $\beta$ -CD und HDMS jeweils Auflösungen über  $R_S = 6$  erzielt werden. Bei der Abhängigkeit der Auflösung von der CD-Konzentration wurden neben den absoluten auch lokale Maxima beobachtet.

Für den in der Erdbeere vorhandene Schlüsselaromastoff 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon, Furaneol, konnte eine CE-Methode entwickelt werden, die es zum einen ermöglicht, die Enantiomere vollständig zu trennen, und zum anderen so beschaffen ist, dass es bei der Trennung selbst zu keiner Racemisierung kommt, wie es bei der bisher verwendeten Gaschromatographie der Fall war. Die CE-Methode machte es erstmalig möglich, die enantioselektive Biosynthese von Furaneol in

Erdbeerproteinextrakten nachzuweisen. Zusätzlich wurde noch die Racemisierungsgeschwindigkeit von einem angereichertem Gemisch bei vier verschiedenen pH-Werte getestet, was für weitere Arbeiten mit Furaneol-Proben von Bedeutung ist. Die Racemisierungsgeschwindigkeit erwies sich für den pH-Bereich von 3.8 bis 5 am langsamsten. Im neutralen Bereich wurde die schnellste Racemisierung beobachtet.

Bei den Experimenten mit Atropin und dem verwandten Homatropin sollte geprüft werden, ob der Einsatz sulfatierter Cyclodextrine von vier verschiedenen Herstellern zu identischen Ergebnissen führt. Es konnten anhand einer kritischen Trennung gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Die Trennleistung variierte von keiner Trennung, über leichte Antrennung ( $\approx 1/3$ ) bis zur deutlichen Antrennung, bei der die beiden Peaks der Enantiomeren zu  $2/3$  getrennt wurden. Die Trennleistung der Cyclodextrine in Bezug auf den Vergleich Atropin/Homatropin war hierbei sehr ähnlich. Ein bei diesen Arbeiten zusätzlich entstandener Peak konnte eindeutig einem Zerfallsprodukt des Atropins, der Tropasäure, zugeordnet werden.

Mit Hilfe von Experimenten mit den Atropisomeren von 1,1'-Binaphthalin-2,2'-diylphosphat sollte erprobt werden, ob eine Charakterisierung von randomisiert substituierter CDs über den durchschnittlichen molekularen Substitutionsgrad (MS) ausreicht, um beim erneuten Einsatz eines vergleichbaren Produktes reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen. Die Trennleistung von unterschiedlich randomisiert substituierten acetylierten und methylierten Cyclodextrinen wurde hierzu getestet, und mit der von  $\beta$ -CD und *Heptakis*-(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin, bzw. deren Gemischen in Verhältnis von 1:9 bis 9:1 verglichen. Der Vergleich dieser Messergebnisse führte zu dem Schluss, dass eine einfache Charakterisierung randomisiert substituierter Cyclodextrine über den durchschnittlichen molekularen Substitutionsgrad (MS) nicht ausreicht, um reproduzierbare Ergebnisse beim Einsatz solcher Cyclodextrine zu erreichen. Die Aufnahme von Massenspektren ermöglichte es hingegen, randomisiert substituierte CDs aussagekräftig zu charakterisieren. Will man eine CE-Methode validieren, in der ein randomisiertes Cyclodextrin zu Einsatz kommt, so sollte man dieses mittels Massenspektroskopie charakterisieren und sich dessen bewusst sein, dass die Validierung nur für diese eine Charge des Herstellers bzw. für Chargen mit vergleichbaren Massenspektren Gültigkeit besitzt.

Für das im Arbeitskreis Bringmann racemisch synthetisierte 2-Hydroxymethyl-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)naphthalin sollte eine Trennmethode für die

Atropisomere entwickelt werden, da für die Zukunft eine enantioselektive Synthese geplant ist. Unter Einsatz der chiralen Selektoren *Heptakis*-(6-sulfato)- $\beta$ -CD (HS) und *Heptakis*-(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin (HDAS) konnten zwei Trennmethoden gefunden werden, die bei einer jeweiligen Cyclodextrinkonzentration von 15 mM zu einer guten Trennung der Enantiomeren führte. Dies ermöglicht eine Quantifizierung des Enantiomerenüberschuß (ee) für eine nicht-racemische Syntheseroute.



## 5. Summary

The manifold of isomeric substances being separated within the frame of this thesis shows the power of cyclodextrin-modified capillary electrophoresis concerning to the separation of enantiomers. The major problem is still to find the appropriate cyclodextrin respectively the optimum concentration. The possibility to predict these parameters only on the basis of the molecule structure is still too small. Thus, it is still necessary, to perform experiments to find the suitable cyclodextrin. It would be desirable for the future, to make this possible by collecting more experiences and information.

The enantiomers of five of six weakly basic thiobarbiturates could be successfully separated. Two of these five barbiturates were N-substituted, one N-substituted as well as S-substituted. The three N-substituted thiobarbiturates characterized by phenyl- and ethyl-substituent in five positions being the chiral centre. In the two other molecules the chiral centre is located in the side chain, bound at the five position. Furthermore the dependence of the cyclodextrin concentration on the resolution power of five commercial cyclodextrins could be shown. The concentration leading to the best resolution was varying from the smallest (1 mmol/l) to the highest (18 mmol/l) concentrations which were used. The thiobarbiturates without a substituent at the nitrogen atom could be separated best by using  $\gamma$ -CD ( $R_S > 6$ ). Whereas the two barbiturates carrying a N-alkyl substituent reach their best resolution with  $\beta$ -CD and HDMS (both  $R_S > 6$ ). Beside the absolute maxima local maxima were observed.

For the key flavouring substance of the strawberry, 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon, furaneol, a CE-method was developed, which makes it possible to separate the enantiomers without racemisation, which happens when using gas chromatography. This makes it possible to verify enantioselective biosynthesis of furaneol in strawberry protein extract for the first time. Additionally the rate of racemisation of enantiomeric enriched samples at four different pH-values were tested, which is important for further experiments with furaneol.

The studies on atropine and the related homatropine were performed to show, whether four sulphated cyclodextrins of four different manufacturers lead to identical results. By means of a critical separation the differences of the resolution powers could be shown. It varies from no resolution over separation 1/3 of the peak to 2/3. The resolution power to the atropine enantiomeres was comparable to the one of

homatropine. An additional peak, which was found in the tests, was assigned to a decomposition product of atropine being tropic acid.

By means of a study with the atrop-isomers of 1,1'-binaphthalin-2,2'-diyl-phosphate it was checked, whether the characterisation of randomly substituted cyclodextrins via the average molecular degree of substitution (MS) is sufficient to obtain comparable results in CD-modified CE. The resolution power of different randomly substituted acetylated and methylated cyclodextrins were tested and compared to the one of  $\beta$ -CD and *heptakis*-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin and their mixtures in a ratio of 1:9 to 9:1. The comparison of these results shows, that a simple classification of randomly substituted cyclodextrins by the average molecular degree of substitution (MS) is not sufficient to reproduce the results of measurements done with such kind of cyclodextrins. To validate a CE-method, in which a randomly substituted cyclodextrin is used, a mass spectrum of this cyclodextrin should be recorded and it should be clear, that the validation is effective only for this batch of the producer or for batches which have comparable mass spectra.

For 2-hydroxymethyl-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)naphthalin, which was racemically synthesized in the group of Prof. Bringmann, a separation method for the atrop-isomers was developed, because a enantioselective synthesis is planned in the future. Using either *heptakis*-(6-sulfato)- $\beta$ -CD (HS) or *heptakis*-(2,3-di-*O*-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin (HDAS) as chiral selectors at a cyclodextrin concentration of 15 mM a good separation was obtained. This makes a quantification of the enantiomeric excess (ee) for enantioselective synthesis routes possible.

# Literaturverzeichnis

---

- <sup>1</sup> Cahn R. S., Ingold C. K., Prelog V., *Angew. Chem.* **1966**, 78, 413.
- <sup>2</sup> Knowles W. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1998-2007.
- <sup>3</sup> Knowles W. S., *Adv. Syn. & Cat.* **2003**, 345, 3-13.
- <sup>4</sup> Noyori R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2008-2022.
- <sup>5</sup> Noyori R., *Adv. Syn. & Cat.* **2003**, 345, 15-32.
- <sup>6</sup> Sharpless K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2024-2032.
- <sup>7</sup> Stibbs B., *Can. Chem. News* **2002**, 54, 26-27.
- <sup>8</sup> Eriksson T., Bjorkman S., Hoglund P., *Eur. J. Clin. Pharm.* **2001**, 57, 365-376.
- <sup>9</sup> Ariens E. J., Stereoselectivity of Bioactive Agents, General Aspects, in: *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*, (Hrsg.: Ariens E. J., Soudijn W., Timmermans P.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1983**.
- <sup>10</sup> Voith K., Cummings J. R., *Can. J. Physio. Pharm.* **1976**, 54, 551-560.
- <sup>11</sup> Hynes M. D., McCarten M. D., Shearman G., Lal H., *Life Sci.* **1978**, 22, 133-136.
- <sup>12</sup> Reepmeyer J. C., *Chirality* **1996**, 8, 11-17.
- <sup>13</sup> Meyring M., Chankvetadze B., Blaschke G., *Electrophoresis* **1999**, 20, 2425-2431.
- <sup>14</sup> Eriksson T., Bjoerkman S., Roth B., Fyge A., Hoeglund P., *Chirality* **1995**, 7, 44-52.
- <sup>15</sup> Villiers M. A., *Compt. Rend.* **1891**, 112, 536-538.
- <sup>16</sup> Schradinger F., *Z. Untersuch. Nahr. u. Genussm.* **1903**, 6, 865.
- <sup>17</sup> Schradinger F., *Wien. Klein. Wochschr.* **1904**, 17, 207.
- <sup>18</sup> Schradinger F., *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd.* **1905**, 14, 772.
- <sup>19</sup> Szejtli J., *Cyclodextrin Technology*, Kluwer, Dordrecht, **1988**.
- <sup>20</sup> Boger J., Corcoran R., Lehn J. M., *Helv. Chim. Acta* **1978**, 61, 2190.
- <sup>21</sup> Croft A. P., Bartsch R. A., *Tetrahedron* **1983**, 39, 1417-1474.
- <sup>22</sup> Branch S. K., Holzgrabe U., Jefferies T. M., Mallwitz H., Matchett M. W., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, 12, 1507-1517.

- 
- <sup>23</sup> Tian S., Zhu H., Forgo P., D'Souza V. T., *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2624-2630.
- <sup>24</sup> Duval R., Leveque H., Prigent Y., Aboul-Enein H. Y., *Biomed. Chromatogr.* **2001**, *15*, 202-206.
- <sup>25</sup> French D., Levine M. L., Pazur J. H., Norberg E., *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 353-356.
- <sup>26</sup> Vincent J. B., Sokolowski A. D., Nguyen T. V., Vigh G., *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 4226-4233.
- <sup>27</sup> Zhu W., Vigh G., *J. Chromatogr.* **2000**, *A 892*, 499-507.
- <sup>28</sup> Vincent J. B., Kirby D. H., Nguyen T. V., Vigh G., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4419-4428.
- <sup>29</sup> Zhu W., Vigh G., *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1394-1398.
- <sup>30</sup> Boger J., Corcoran R. J., Lehn J. M., *Helv. Chim. Acta.* **1978**, *61*, 2190.
- <sup>31</sup> Szejtli J., Liptak A., Jodal I., Fügedi P., Nanasi P., Neszmelyi A., *Stärke* **1980**, *32*, 165.
- <sup>32</sup> Snopek J., Soini H., Novotny M., Smolkova-Keulemansova E., Jelinek I., *J. Chromatogr.* **1991**, *559*, 215-222.
- <sup>33</sup> Bergeron R. J., Meeley M. P., Machida Y., *Bioorg. Chem.* **1976**, *5*, 121.
- <sup>34</sup> Cai H., Nguyen T. V., Vigh G., *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 580-589.
- <sup>35</sup> Busby M. B., Maldonado O., Vigh G., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 456-461.
- <sup>36</sup> Che B., Ling Y., Dai R., Gu J., Fu R., *Huaxue Shiji* **1997**, *19*, 129-130.
- <sup>37</sup> Zeng Z., Liu M., Ding Y., Li Y., Zhang R., *Fenxi Huaxue* **1998**, *26*, 940-944.
- <sup>38</sup> Christians T., Holzgrabe U., *J. Chromatogr.* **2001**, *A 911*, 249-257.
- <sup>39</sup> O'Keeffe F., Shamsi S. A., Darcy R., Schwinte P., Waren I. M., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4773-4782.
- <sup>40</sup> Matsunaga H., Haginaka J., *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3382-3388.
- <sup>41</sup> Tarnai M., Szakacs Z., Buvári-Barcza A., Barczaa L., *Chromatographia* **1998**, *48*, 383-387.
- <sup>42</sup> Li G., Lin X., Zhu C., Hao A., Guan Y., *Anal. Chim. Acta* **2000**, *421*, 27-34.
- <sup>43</sup> Szejtli J., *J. Carbohydr. Polym.* **1990**, *12*, 375-392.

- 
- <sup>44</sup> Bar R., Proceedings of the International Symposium on Cyclodextrins, 8th, Budapest, Mar. 31-Apr. 2, **1996**, 521-526.
- <sup>45</sup> Singh M., Sharma R., Banerjee U. C., *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 341-359.
- <sup>46</sup> Korpela T., Mattsson P., Hellman J., Paavilainen S., Makela M., *Food Biotechnology*, New York, United States, **1989**, *2*, 199-210.
- <sup>47</sup> Luong J. H. T., Bouvrette P., Male K. B., *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 369-377.
- <sup>48</sup> Stella V. J., Rajewski R. A., *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 556-567.
- <sup>49</sup> Mishra P. R., Mishra M., Namdeo A., Jain N. K., *Indian J. Pharm. Sci.* **1999**, *61*, 193-198.
- <sup>50</sup> Loftsson T., Brewster M. E., *Pharm. Technol. Eur.* **1997**, *9*, 26-34.
- <sup>51</sup> Alberts E., Mueller B. W., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **1995**, *12*, 311-337.
- <sup>52</sup> Nalluri B. N., Chowdary K. P. R., Murthy K. V. R., *Int. J. Pharm. Excip.* **2002**, 79-91.
- <sup>53</sup> Uekama K., *J. Incl. Phenom. Macrocyc. Chem.* **2003**, *44*, 3-7.
- <sup>54</sup> Loftsson T., Brewster M. E., *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017-1025.
- <sup>55</sup> Uekama K., Hirayama F., Irie T., *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045-2076.
- <sup>56</sup> Szente L., Szejtli J., *Analyst* **1998**, *123*, 735-741.
- <sup>57</sup> Kuroda Y., Ito M., Sera T., Ogoshi H., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7003-7004.
- <sup>58</sup> Kim Y. H., Cho D. W., Yoom M., *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 15670-15676.
- <sup>59</sup> Schneider H. J., Hacket F., Rudiger V., Ikeda H., *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1755-1786.
- <sup>60</sup> Stefan R. I., van Staden J. K. F., Aboul-Enein H. Y., *Electroanal.* **1999**, *11*, 192-194.
- <sup>61</sup> Bersier P. M., Bersier J., Klingert B., *Electroanal.* **1991**, *3*, 443-455.
- <sup>62</sup> Pospisil L., Trskova R., Colombini M. P., Fuoco R., *J. Incl. Phenom. Mol.* **1998**, *31*, 57-70.
- <sup>63</sup> McCormack S., Russell N. R., Cassidy J. F., *Electrochim. Acta* **1992**, *37*, 1939-1944.
- <sup>64</sup> Zhang G. R., Wang X. L., Shi X. W., Sun T. L., *Talanta* **2000**, *51*, 1019-1025.

- 
- <sup>65</sup> Armstrong D. W., Faulkner J. R., Han S. M., *J. Chromatogr.* **1988**, A 452, 323-330.
- <sup>66</sup> Spanik I., Krupcik J., *Chem. Listy* **2000**, 94, 10-14.
- <sup>67</sup> Schleuder M., Durrbeck A., Jira T., *Pharmazie* **1998**, 53, 381-386.
- <sup>68</sup> Ciucanu I., Konig W. A., *J. Chromatogr.* **1994**, A 685, 166-171.
- <sup>69</sup> Stalcup A. M., Gahm K. H., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1369-1374.
- <sup>70</sup> Gazdag M., Szepesi G., Huszar L., *J. Chromatogr.* **1988**, A 436, 31-38.
- <sup>71</sup> Spencer K. M., Edmonds R. B., Rauh R. D., Carrabba M. M., *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1269-1273.
- <sup>72</sup> Spencer K. M., Edmonds R. B., Rauh R. D., *Appl. Spectro.* **1996**, 50, 681-685.
- <sup>73</sup> Hecht L., Phillips A. L., Barron L. D., *J. Raman Spectro.* **1995**, 26, 727-732.
- <sup>74</sup> Spivey R., Swofford R. L., *Appl. Spectro.* **1999**, 53, 435-438.
- <sup>75</sup> Guttman A., Paulus A., Cohen A. S., Grinberg N., Karger B., *J. Chromatogr.* **1988**, A 448, 41-53.
- <sup>76</sup> Fanali S., *J. Chromatogr.* **1989**, A 470, 123-129.
- <sup>77</sup> Kitagawa M., Hoshi H., Sakurai M., Inoue Y., Chujo R., *Carbohydr. Res.* **1987**, 163, C1- C3.
- <sup>78</sup> Da Silva A. M., Empis J., Teixeira-Dias J. J. C., *J. Inclus. Phenom.* **1999**, 33, 81-97.
- <sup>79</sup> Kim K. H., Park Y. H., *Int. J. Pharm.* **1998**, 175, 247-253.
- <sup>80</sup> Park K.-L., Kim K. H., Jung S.-H., Lim H.-M., Hong C.-H., Kang J.-S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 27, 569-576.
- <sup>81</sup> Williams B. A., Vigh G., *J. Chromatogr.* **1997**, A 777, 295-309.
- <sup>82</sup> Blomberg L. G., Wan H., *Electrophoresis* **2000**, 21, 1940-1952.
- <sup>83</sup> Van Eeckhaut A., Detaevernier M. R., Crommen J., Michotte Y., *J. Sep. Sci.* **2004**, 27, 21-27.
- <sup>84</sup> Dickinson R., de Sousa S. L. M., Lieb W. R., Franks N. P., *Anesthesiology* **2002**, 96, 884-892.
- <sup>85</sup> Downie D. L., Franks N. P., Lieb W. R., *Anesthesiology* **2000**, 93, 774-783.

- 
- <sup>86</sup> Cordato D. J., Mather L. E., Gross A. S., Herkes G. K. *Anesthesiology* **1999**, *91*, 1693-1702.
- <sup>87</sup> Nguyen K. T., Morgan D. J., *Chirality* **1996**, *8*, 477-480.
- <sup>88</sup> Mather L. E., Upton R. N., Huang J. L., Ludbrook G. L., Gray E., Grant C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *279*, 291-297.
- <sup>89</sup> Knabe J., Rummel W., Buch H. P., Franz N., *Arzneim. Forsch.* **1978**, *28*, 1048-1056.
- <sup>90</sup> Knabe J., Buech H. P., Gradmann V., Wolff I., *Archiv Pharm.* **1977**, *310*, 421-427.
- <sup>91</sup> Kubaszek M., Paluchowska M., Chmiel E., Bojarski J., *Polish J. Chem.* **1994**, *68*, 117-124.
- <sup>92</sup> Rodin J. O., Himmel R. M., Silverstein R. M., Leeper R. W., Gartner W. A., *J. Food Sci.* **1965**, *30*, 280-285.
- <sup>93</sup> Honkanen E., Pyyalo T., Hirvi T., *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1980**, *171*, 180-182.
- <sup>94</sup> Pickenhagen W., Velluz A., Passerat J. P., Ohloff G., *J. Sci. Food Agric.* **1981**, *32*, 1132-1134.
- <sup>95</sup> Werkhoff P., Guentert M., Krammer G., Sommer H., Kaulen J., *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1073-1093.
- <sup>96</sup> Ferreira V., Jarauta I., López R., Cacho J., *J. Chromatogr.* **2003**, *A 1010*, 95-103.
- <sup>97</sup> Ito Y., Sugimoto A., Kakuda T., Kubota K., *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4878-4884.
- <sup>98</sup> Re F., Maurer G., Ohloff G. A., *Helv. Chim. Acta* **1973**, *56*, 1882-1894.
- <sup>99</sup> Zabetakis I., Holden M. A., *J. Sci. Food Agricult.* **1997**, *74*, 421-434.
- <sup>100</sup> Fischer N., Hammerschmidt F.-J., *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* **1992**, *14*, 141-148.
- <sup>101</sup> Schwab W., Roscher R., *Recent R. Dev. Phytochem.* **1997**, *1*, 643-673.
- <sup>102</sup> Mosandl A., Bruche G., Askari C., Schmarr H.G., *J. High Res. Chromatogr.* **1990**, *13*, 660-662.
- <sup>103</sup> Bös B., GIFTPFLANZEN.COMpendium; [http://www.giftpflanzen.com/atropa\\_belladonna.html](http://www.giftpflanzen.com/atropa_belladonna.html)
- <sup>104</sup> Kaila T., Korte J.-M., Saari K. M., *Acta Ophthal. Scand.* **1999**, *77*, 193-196.

- 
- <sup>105</sup> Kentala E., Kaila T., Iisalo E., Kanto J., *Int. J. Clin. Pharmacol., Therapy and Toxicol.* **1990**, 28, 399-404.
- <sup>106</sup> Dei S., Bellucci C., Gualtieri F., Romanelli M. N., Scapecchi S., Teodori E., Bartolini A., Ghelardini C., *Farmaco* **1995**, 50, 303-309.
- <sup>107</sup> Tune L. E., Bylsma F. W., Hilt D. C., *J. Neuropsych. Clin. Neurosci.* **1992**, 4, 195-197.
- <sup>108</sup> Khurana A. K., Ahluwalia B. K., Rajan C., *Acta Ophthal.* **1988**, 66, 721-724.
- <sup>109</sup> Kay C. D., Morrison J. D., *Quarterly J. Exp. Physiol.* **1988**, 73, 511-519.
- <sup>110</sup> Kay C. D., Morrison J. D., *Ophthal. Physio. Optics* **1987**, 7, 21-30.
- <sup>111</sup> Tahara S.-I., Okayama A., Kitada Y., Watanabe T., Nakazawa H., Kakehi K., Hisamatu Y., *J. Chromatogr.* **1999**, A 848, 465-471.
- <sup>112</sup> Wedig M., Holzgrabe U., *Electrophoresis* **1999**, 20, 1555-1560.
- <sup>113</sup> Jin L. J., Wang Y., Xu R., Go M. L., Lee H. K., Li S. F. Y., *Electrophoresis* **1999**, 20, 198-203.
- <sup>114</sup> Heine S., Ebert K., Blaschke G., *Electrophoresis* **2003**, 24, 2687-2692.
- <sup>115</sup> Baciocchi R., Zenoni G., Valentini M., Mazzotti M., Morbidelli M., *J. Phys. Chem. A* **2002**, 106, 10461-10469.
- <sup>116</sup> Friary R. J., Spangler M., Osterman R., Schulman L., Schwerdt J. H., *Chirality* **1996**, 8, 364-371.
- <sup>117</sup> Meca L., Reha D., Havlas Z., *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5677-5680.
- <sup>118</sup> Kumobayashi H., Miura T., Sayo N., Saito T., Zhang X., *Synlett* **2001**, Spec. Issue, 1055-1064.
- <sup>119</sup> Pu L., *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2227-2232.
- <sup>120</sup> Noyori R., Editor: Trost B. M., *Stereo. Org. Syn.* **1994**, 1-15. Publisher Blackwell, Oxford, UK.
- <sup>121</sup> Bringmann G., Menche D., Kraus J., Mühlbacher J., Peters K., Peters E.-M., Brun R., Bezabih M., Abegaz B. M., *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 5595-5610.
- <sup>122</sup> Bringmann G., Messer K., Wolf K., Mühlbacher J., Grüne M., Brun R., Louis A. M., *Phytochem.* **2002**, 60, 389-397.
- <sup>123</sup> Bringmann G., Saeb W., Rübenacker M., *Tetrahedron* **1999**, 55, 423-432.



- 
- <sup>124</sup> Boyd M. R., Hallock Y. F., Cardellina J. H., Manfredi K. P., Blunt J. W., McMahon J. B., Buckheit R. W., Bringmann G., Schäffer M., Cragg G. M., Thomas D. W., Jato J. G., *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1740-1745.
- <sup>125</sup> Upender V., Pollart D. J., Liu J., Hobbs P. D., Olsen C., Chao W., Bowden B., Crase J. L., Thomas D. W., *J. Heterocyc. Chem.* **1996**, *33*, 1371-1384.
- <sup>126</sup> Shelly M. D., Hartley L., Fish R. G., Groundwater P., Morgan J. J. G., Mort D., Mason M., Evans A., *Cancer Letters* **1999**, *135*, 171-180.
- <sup>127</sup> Liu S., Kulp S. K., Sugimoto Y., Jiang J., Chang H.-L., Dowd M. K., Wan P., Lin Y. C., *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 33-38.
- <sup>128</sup> Puettmann M., Mannschreck A., Oesch F., Robertson L., *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 1345-1352.
- <sup>129</sup> Coleman A. W., Zhang P., Ling C. C., Parrot-Lopez H., Galons H., *Carbohydr. Res.* **1992**, *224*, 307-309.
- <sup>130</sup> Cramer F., Meckensen G., Senses K., *Chem. Ber.* **1969**, *102*, 494-508.
- <sup>131</sup> Takeo K., Uemura K., Mitoh H., *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 293-308.
- <sup>132</sup> Szejtli J., Liptak A., Jodal I., Fügedi P., Nanasi P., Neszmelyi A., *Stärke* **1980**, *32*, 165-169.
- <sup>133</sup> Machida Y., Bergeron R., Flick P., Bloch K., *J. Bio. Chem.* **1973**, *248*, 6246-6247.
- <sup>134</sup> Casu B., Reggiani M., Sanderson G. R., *Carbohydr. Res.* **1979**, *76*, 59-66.
- <sup>135</sup> Chankvetadze B., Endresz G., Blaschke G., Juza M., Jakubetz H., Schurig V., *Carbohydr. Res.* **1996**, *287*, 139-155.
- <sup>136</sup> Blanco M., Coello J., Iturriaga H., Maspoch S., Pérez-Maseda C., *Anal. Chim. Acta* **2000**, *407*, 233-245.
- <sup>137</sup> Bringmann G., Hartung T., *Synthesis* **1992**, *5*, 433-435.
- <sup>138</sup> Bringmann G., Breuning M., Henschel P., Hinrichs J., *Org. Synth.* **2003**, *79*, 72-83.
- <sup>139</sup> Takeo K., Mitoh H., Uemura K., *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 203-221.
- <sup>140</sup> Fügedi P., *Carbohydr. Res.* **1989**, *192*, 366-369.
- <sup>141</sup> Thunhorst, M., Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Bonn, 1998.

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Schmitt Ulrich
Geburtsdatum	01. 09. 1973
Geburtsort	Aschaffenburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

## Bildungsweg

09/80-07/84	Grundschule Johannesberg
09/84-07/86	Karl-Theodor-von-Dalberg Gymnasium, Aschaffenburg
09/86-07/93	Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Aschaffenburg, Abitur
07/93-06/94	Wehrdienst als Stabsdienstsoldat in Volkach
10/94-11/99	Studium Chemie/Diplom an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
01/00-08/00	Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Universität Würzburg, Diplom
10/00-04/02	Studium der Pharmazie an der Universität Würzburg Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10/00-07/04	Promotion am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg

---

## Publikationen

Schmitt, U.; Ertan, M.; Holzgrabe, U. *Chiral capillary electrophoresis: Facts and fiction on resolution with randomly substituted cyclodextrins*. *Electrophoresis* **2004** in Druck.

Raab, T.; Schmitt, U.; Hauck, T.; Knecht, A.; Holzgrabe, U.; Schwab, W. *Capillary electrophoretic resolution of the enantiomers of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone, the key flavor compounds in strawberry fruit*. *Chromatographia* **2003**, 57(7/8), 501-504.

Raab, Thomas; Hauck, Tobias; Knecht, Anja; Schmitt, Ulrich; Holzgrabe, Ulrike; Schwab, Wilfried. *Tautomerism of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone: Evidence for its enantioselective biosynthesis*. *Chirality* **2003**, 15(7), 573-578.

Schmitt, Ulrich; Branch, Sarah K.; Holzgrabe, Ulrike. *Chiral separations by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis - determination of the enantiomeric excess*. *Journal of Separation Science* **2002**, 25(15-17), 959-974.

Schmitt, Ulrich; Bojarski, Jacek; Holzgrabe, Ulrike. *Enantioseparation of chiral thiobarbiturates using cyclodextrin-modified capillary electrophoresis*. *Electrophoresis* **2001**, 22(15), 3237-3242.

## Poster

Ulrich Schmitt, Albert Sickmann and Ulrike Holzgrabe, *Chiral capillary electrophoresis: Resolution with randomly methylated cyclodextrins and defined mixtures of corresponding single isomers*, 17<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separation and Analysis, Salzburg, Österreich, 2004.

Ulrich Schmitt and Ulrike Holzgrabe, *Influence of the substitution pattern of acetylated cyclodextrins on the resolution in chiral CE*, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Würzburg, 2003.

Ulrich Schmitt, Thomas Raab, Tobias Hauck, Wilfried Schwab and Ulrike Holzgrabe, *First chiral phase CE method for the enantiomeric analysis of 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3[2H]-furanone, the key aroma compound in strawberry fruits*, 16<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separation and Analysis, San Diego, USA, 2003.

Ulrike Holzgrabe and Ulrich Schmitt, *Influence of the variable composition of cyclodextrin derivatives on the resolution of racemates by means of capillary electrophoresis*, 16<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separation and Analysis, San Diego, USA, 2003.

Ulrich Schmitt and Ulrike Holzgrabe, *Enantioseparation of chiral thiobarbiturates using cyclodextrin-modified capillary electrophoresis*, Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Halle, 2001.