

Enantiomeranalytik mittels
Cyclodextrin-Selektoren in der
GC, CEC und CE

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von
Meri Leena Banspach

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2005

Dekan: Professor Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Professor Dr. V. Schurig

2. Berichterstatter: Professor Dr. K. Albert

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. V. Schurig in der Zeit von November 2001 bis Mai 2005 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. V. Schurig, danke ich für die Themenstellung, seine hilfreichen Anregungen und Diskussionen, den Freiraum zur selbständigen Arbeit, der angenehmen Atmosphäre und der Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises Prof. Dr. Schurig danke ich für die gute Zusammenarbeit: Anja Bogdanski, Harri Czesla, Dr. Ashraf Ghanem, Dr. Jingwu Kang, Dr. Waldemar Iwanek, Dr. Melanie Junge, Clarissa Reiner, Dr. Alexander Ruderisch, Pavel Levkin, Graeme Nicholson, Giuseppe Sicoli, Drs. Gabriele und Oliver Trapp und ganz besonders Dr. Dorothee Wistuba für die Unterstützung, die praktischen Tipps und die Diskussionen über kapillarelektrophoretische und chromatographische Problemstellungen.

Dank an meinen Kooperationspartner Timo Kohles aus dem Arbeitskreis Prof. Dr. K.-A. Kovar vom Institut für Pharmazie (Universität Tübingen) für die erfolgreiche und freundschaftliche Zusammenarbeit zur Prüfung der Enantiomerenreinheit der Amphetaminderivate.

Frau Elke Nadler danke ich für die Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop und ihrem Interesse, diese Aufnahmen immer weiter zu verbessern.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die großzügige Förderung durch ein Promotionsstipendium sowie für die Reise- und Sachmittel im Rahmen des Graduiertenkollegs „Chemie in Interphasen“.

Jan, Dorothee und Melanie danke ich für das Korrekturlesen.

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Besonders möchte ich mich bei denen bedanken, durch die meine Zeit in Tübingen unterhaltsam und interessant wurde.

Allen voran danke ich meinen Eltern, die mir mit ihrer großen Unterstützung meine akademische Ausbildung ermöglichten.

Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, dass plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher eines gegeben hat.

Torsten Bunde Velben (1857-1929)

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeines.....	1
1.2	Struktur und Eigenschaften	2
1.3	Anwendungen	4
1.3.1	Cyclodextrine in der Forschung.....	6
1.3.1.1	Anwendung der Cyclodextrine in der Chromatographie	7
1.3.1.1.1	Anwendung in der GC	8
1.3.1.1.2	Anwendung in der CE und CEC	10
2	Problemstellung.....	13
3	Untersuchungen zu der Spacer-Position in Chirasil- β -Dex.....	15
3.1	Chirasil- β -Dex.....	15
3.2	Selektive Synthesen der 3 regioisomeren Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -cyclodextrine	17
3.3	Analyse der Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -cyclodextrine mittels LC/MS	21
3.4	Gaschromatographische Untersuchungen	24
3.4.1	Schurig Test und Grob Test	25
3.4.2	Enantiomerentrennungen von Menthol, Menthylacetat, Menthylpropionat und Menthylbutyrat.....	28
3.4.3	Weitere Enantiomerentrennung mit O-2-, O-3- bzw. O-6-Chirasil- β -Dex.....	31
3.4.4	Ergebnisse der GC-Messungen	35
4	Allgemeines zur CE und CEC	36
4.1	Kapillarelektrophorese (CE)	36
4.1.1	Chirale CE.....	37
4.2	Kapillarelektrochromatographie (CEC).....	38
4.3	Theoretische Grundlagen der CE und CEC	41
4.3.1	Aufbau des Gerätes des Gerätes und Trennprinzip	41

4.3.2	Elektrophoretische Wanderung	43
4.3.3	Elektroosmotischer Fluss (EOF)	44
4.3.4	Parameter zur Beschreibung der Trennleistung des elektro- phoretischen bzw. elektrochromatographischen Systems	47
5	Kapillarelektrochromatographie	49
5.1	Enantiomerentrennung atropisomerer polychlorierter Biphenyle (PCB) mittels verschiedener CEC-Methoden	49
5.1.1	Eigenschaften, Toxizität und Vorkommen	49
5.1.2	Atropisomere	50
5.1.3	Motiv der enantioselektiven Analyse	50
5.1.4	Die eingesetzten CEC-Methoden	51
5.1.5	Diskussion der Trennergebnisse	56
5.1.5.1	Einfluss des organischen Modifiers und des Puffers	60
5.1.5.2	CEC und LC	60
5.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
5.2	Weiterentwicklung der o-CEC	65
5.2.1	Direkte Anbindung des Selektors an die Kapillarwand	65
5.2.2	Anätzung der Kapillaren und weitere chemische Modifikation	68
5.2.2.1	Anätzung	68
5.2.2.2	Anbindung des Selektors an die angeätzte Kapillarwand	72
5.2.2.3	Diskussion der Ergebnisse	73
6	Optimierung und Validierung einer CE-Methode zur Untersuchung der Enantiomerenreinheit von MDA, MDE und MDMA	76
6.1	Wirkung und Toxizität von MDA, MDE und MDMA	76
6.2	Gründe für den Bedarf einer zuverlässigen Reinheitskontrolle	79
6.3	<i>Status quo</i> und Vorteile der CE	79
6.4	Methodenentwicklung	80
6.4.1	Auswahl eines geeigneten Selektors	81
6.4.1.1	Theorie zu chiralen Trennungen mittels CE	81
6.4.1.2	Untersuchungen der Selektoren mittels ESI-MS	84
6.4.1.3	Untersuchung der CD-Selektoren in der CE	87
6.4.2	Einfluss der Selektor- und Pufferkonzentration	92

6.4.2.1	Einfluss der Selektorkonzentration	92
6.4.2.2	Einfluss der Pufferkonzentration	93
6.4.3	Die optimale Spannung	96
6.4.3.1	Joule'sche Wärme und Ohm'scher Plot	96
6.4.3.2	Ermittlung der optimalen Spannung	96
6.4.4	Auswahl des internen Standards	100
6.5	Validierung des Systems	102
6.6	Darstellung der Enantiomere von MDA, MDE und MDMA	104
6.7	Reinheitsbestimmung der synthetisierten Enantiomere	105
7	Experimenteller Teil	111
7.1	Materialien	111
7.2	Geräte	114
7.3	Synthesen	117
7.3.1	Darstellung von Mono(octen-7-enyl)- β -CD	117
7.3.2	Darstellung von Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD	118
7.3.3	Darstellung von (10% Hydromethyl) (90% Dimethyl)polysiloxan	119
7.3.4	Darstellung von Chirasil- β -Dex	119
7.4	Herstellung der Trennkapillaren	120
7.4.1	Herstellung der Chirasil- β -Dex-Kapillaren für die GC	120
7.4.2	Herstellung der Chirasil- β -Dex-Kapillaren für die o-CEC	120
7.4.3	Herstellung einer Chira-Dex-Trennkapillare für die o-CEC	121
7.4.3.1	Direkte Anbindung des Selektors an die Kapillarwand	121
7.4.3.2	Anätzung der Kapillaren und Anbindung des Selektors	122
7.5	Validierung	123
7.5.1	Ohm'scher Plot	123
7.5.2	Bedingungen der CE/UV-Bestimmungen	124
7.5.3	Herstellung der Standardlösungen	124
7.5.4	Validierung der CE-Methode	125
7.5.4.1	Festlegung der Arbeitsbereiche	125
7.5.4.2	Rohdaten	126
7.5.4.3	Prüfung auf Normalverteilung	128

7.5.4.4	Linearität.....	129
7.5.4.5	Varianzenhomogenität.....	130
7.5.4.6	Präzision.....	131
7.5.4.7	Richtigkeit (relative systematische Abweichung)	132
7.5.4.8	Selektivität	133
7.5.4.9	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	133
7.5.4.10	Robustheit	135
7.5.4.11	Weitere Kalibrierkenndaten	136
8	Zusammenfassung	137
9	Literaturverzeichnis	140

Abkürzungen und Symbole

ACN	Acetonitril
Abb.	Abbildung
bge	background electrolyte (Hintergrundelektrolyt)
BtmG	Betäubungsmittelgesetz
cal	Kalorie
CD	Cyclodextrin
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CEC	capillary electrochromatography (Kapillarelektrochromatographie)
CM- β -CD	Carboxymethyl- β -CD
CSP	chiral stationary phase (chirale Stationärphase)
DAD	dioden array detection
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ee	enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)
eff.	effektiv
ESI	Elektrosprayionisation
er	enantiomeric ratio (Enantiomerenverhältnis)
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flammenionisationsdetektor
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GC	Gaschromatographie
GMP	good manufacturing practice
HEPT	theoretische Bodenhöhe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HP	Hydroxypropyl
hs- γ -CD	hochsulfatiertes γ -Cyclodextrin
HV	high voltage, Hochspannung
ICH	International Conference on Harmonisation
i. d.	Innendurchmesser
Intens.	Intensität
ISTD	interner Standard
Kap.	Kapitel

LC	liquid chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
MeOH	Methanol
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
Me	methyl
MS	Massenspektrometrie
kV	1000 Volt
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
o-	open tubular
p-	packed (mit gepackten Säulen)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RI	refractive index, Brechungsindex
R _s	resolution, Auflösung
RT	Raumtemperatur
SFC	Supercritical Fluid Chromatography
SIC	single ion current (Einzelionenscan)
Tab.	Tabelle
TIC	total ion chromatogram/current
t _x	Elutionszeit von Peak X
UV	ultraviolette Strahlung
(v/v)	Verhältnis Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen
(w/w)	Verhältnis Gewicht zu Gewicht

1 Einleitung

In dieser Arbeit werden Enantiomerentrennungen anhand von Cyclodextrinen und Cyclodextrinderivaten (CD-Derivaten) untersucht. Zunächst wird ein Überblick über die Eigenschaften und die daraus resultierenden, vielfältigen Anwendungsgebiete der Cyclodextrine und ihrer Derivate gegeben.

1.1 Allgemeines

Cyclodextrine sind cyclisch angeordnete D-Glucopyranose-Einheiten, die α -1,4-glycosidisch verknüpft sind. Diese Verknüpfung ist analog der Amylose, die neben Amylopektin Hauptbestandteil der Stärke¹ ist. Die Oligomere aus sechs, sieben und acht D-Glucose-Einheiten werden als α -, β - und γ -CD bezeichnet (s. Abb. 1-1). Kleinere Cyclodextrine existieren aus sterischen Gründen nicht, aber es konnten großringige Cyclodextrine bis zu 100 und mehr Glucose-Bausteinen hergestellt werden [1].

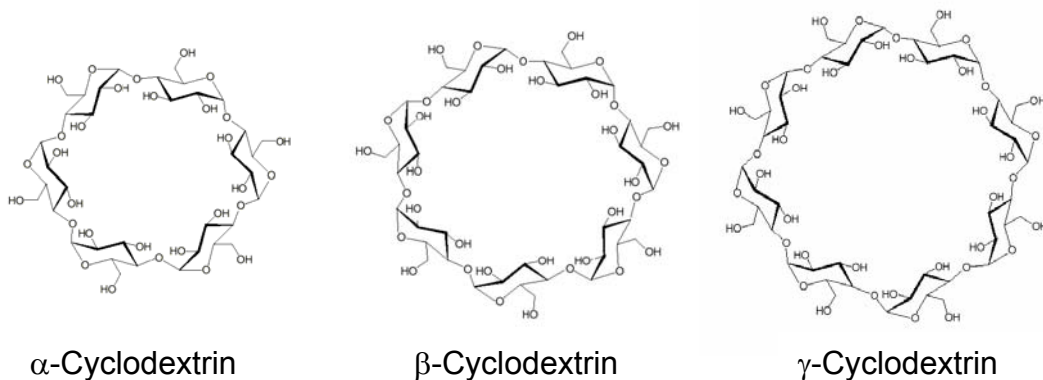


Abb. 1-1: Strukturformel der kommerziell erhältlichen Cyclodextrine

Cyclodextrine werden enzymatisch aus Stärke (oft aus Maisstärke) mittels Cyclodextrin-Glycosyltransferasen (CGTasen), welche in den Mikroorganismen *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* und anderen nachgewiesen und aus ihnen gewonnen werden konnten, gebildet [2]. Dabei werden je nach eingesetzter CGTase und Reaktionsbedingungen hauptsächlich Cyclodextrine mit

¹ Anteile in Stärke: durchschnittlich 20-30% Amylose und 79-80% Amylopektin

sechs bis acht Glucose-Einheiten erhalten. Dass insbesondere diese Größen gebildet werden, ist auf Windungsumgang der Amylose-Helix, die 6-7 Glucose-Einheiten trägt, zurückzuführen.

1891 isolierte Villiers als erster Cyclodextrine aus Abbauprodukten der Stärke [3]. Zwölf Jahre später reinigte auch Schardinger diese kristallinen Produkte auf und untersuchte ihre Eigenschaften [4]. Zwischen 1911 und 1935 war Pringsheim der führende Cyclodextrin-Forscher und entdeckte die Eigenschaft der Cyclodextrine zur Komplexbildung mit organischen Verbindungen [5,6]. 1936 postulierten Freudenberg *et al.* [7] die cyclische Struktur. Freudenberg, Cramer und Plinienger verfassten 1953 ein Patent, in dem die wichtigsten Anwendungen der Cyclodextrine in pharmazeutischen Formulierungen angegeben sind [8]. Bis zum Ende der sechziger Jahre wurde die Herstellung der Cyclodextrine im Labormaßstab, ihre Struktur, ihre physikalischen Eigenschaften und ihre Komplexbildungseigenschaften erforscht. Sie waren zu diesem Zeitpunkt sehr teure Feinchemikalien. Heute beträgt der Produktionsumfang des α -, β - und γ -CD jährlich tausende von Tonnen. Es werden auch einige Derivate wie das Hydroxypropyl- β - und γ -CD, statistisch methylierte Cyclodextrine, Maltosyl- β -CD und acetylierte Cyclodextrine industriell hergestellt. Daneben werden noch eine große Zahl an weiteren Derivaten als Feinchemikalien angeboten [2].

1.2 Struktur und Eigenschaften

Die Glucosemoleküle ordnen sich der Sessel-Konformation (4C_1 -Konformation) an und bilden einen konischen Zylinder (s. Abb. 1-2).

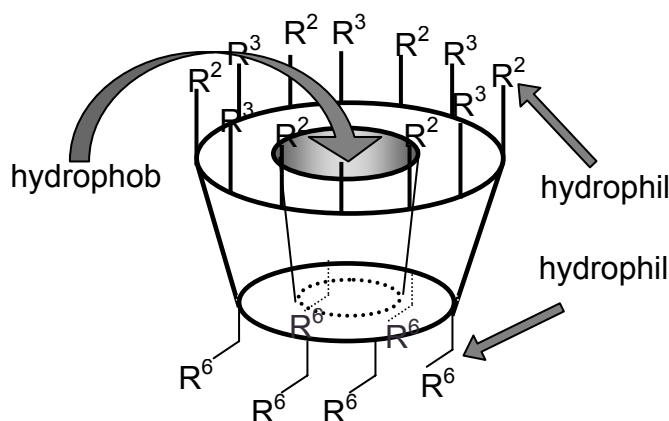


Abb. 1-2: Schematische Gesamtstruktur des α -Cyclodextrins, R^2 , R^3 bzw. R^6 : Hydroxylgruppe in O-2-, O-3- bzw. O-6-Position

An der schmalen Öffnung des Zylinders befinden sich die primären Hydroxylgruppen in O-6-Position (R^6) und an der breiteren Öffnung die sekundären Hydroxylgruppen in der O-2- und O-3-Position (R^2 und R^3). Im mittleren Bereich des Zylinders liegen die Kohlenstoffatome und das Sauerstoffatom der α -1,4-glycosidischen Bindung. Im Inneren der Kavität des Cyclodextrin-Moleküls besteht aufgrund der äußeren Stellung der Hydroxylgruppen ein hydrophober Hohlraum. Die Außenseite ist dagegen hydrophil.

Eine Besonderheit des β -Cyclodextrins ist die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen in O-2- und O-3-Position benachbarter Glucoseeinheiten. So bildet das native β -CD eine relativ starre Struktur und seine Wasserlöslichkeit ist gegenüber dem α - oder γ -CD deutlich vermindert (s. Tab. 1-1). Bei entsprechend derivatisierten β -CD steigern selbst hydrophobe Substituenten die Wasserlöslichkeit.

	α -CD	β -CD	γ -CD
Anzahl der Glucoseeinheiten	6	7	8
Molekulargewicht	972	1135	1297
Durchmesser der Kavität [Å]	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Höhe des Torus [Å]	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,1
Außendurchmesser [Å]	14,6±0,4	15,4±0,4	17,5±0,14
Volumen der Kavität [Å ³] in 1 g [mL]	0,1	0,14	0,2
Wasserlöslichkeit bei RT [mg/mL]	145	18,5	232
$[\alpha]_D$ bei 25 °C	+150,0	+162,5	+177,4
pK _a	12,3	12,2	12,1

Tab. 1-1: Dimensionen und physikalische Eigenschaften von α -, β - und γ -CD nach [9,10]

Cyclodextrine gehören zu den nicht-reduzierenden Kohlenhydraten und sind sehr stabil in alkalischen Lösungen. In sauren Medien werden sie hydrolysiert. Sie sind bis etwa 200 °C stabil und ihre Wasserlöslichkeit steigt mit steigender Temperatur. In Gegenwart organischer Moleküle sinkt die Löslichkeit aufgrund der Komplexbildung. Ein oder mehrere Cyclodextrine können einen „Gast“ komplexieren. Das häufigste Wirt:Gast-Verhältnis ist 1:1, aber auch Verhältnisse wie 2:1, 1:2, 2:2 und kompliziertere Einschlusskomplexe (Inklusionen) existieren oft auch gleichzeitig [2].

1.3 Anwendungen

Vor allem aufgrund ihrer Neigung Einschlusskomplexe mit Gastmolekülen zu bilden, können Cyclodextrine prinzipiell dafür eingesetzt werden, Eigenschaften anderer Substanzen zu verändern. Sie können die Löslichkeit und Stabilität verbessern oder die Flüchtigkeit reduzieren. Daraus resultieren vielfältige Anwendungsgebiete [11,12,13]:

Durch Cyclodextrin komplexierte pharmazeutische Wirkstoffe können beispielsweise unangenehme Gerüche der Wirkstoffe, z. B. Allicin bei Knoblauchkapseln, reduzieren oder die Wasserlöslichkeit und damit die Bioverfügbarkeit für den menschlichen Organismus erhöhen, beispielsweise dient β -CD als Löslichkeitsvermittler bei dem schwer wasserlöslichen, entzündungshemmenden Schmerzmittel Ibuprofen. Zudem zeigen die komplexierten Wirkstoffe eine höhere Stabilität, daher wird Nitroglycerin für die Behandlung von *Angina Pectoris* mit β -CD komplexiert. Daneben können Wirkstoffe mithilfe von Cyclodextrinen in kontrollierten Dosen über längere Zeiträume im Körper freigesetzt werden.

Bei kosmetischen Mitteln wird die erhöhte Stabilität und Wasserlöslichkeit und die Maskierung unangenehmer Gerüche bestimmter Wirkstoffe durch den Einsatz von Cyclodextrinen genutzt, wobei sie gleichzeitig als Depot für Geruchsstoffe dienen. Beispielsweise wird γ -CD als Stabilisator und Geruchsbinder des instabilen Dihydroxyacetons in Selbstbräunern eingesetzt.

Ein bekanntes Beispiel für den Einsatz von Cyclodextrinen im Haushalt sind Textilerfrischungsmittel (Febreze). Aber auch in Waschmitteln finden sie Verwendung, um Geruchsstoffe länger an Textilien zu binden. Bei einer direkten Anbindung von CD-Derivaten an Kleidungsfasern (sog. intelligente Kleidung) können einerseits Duftstoffe und antimikrobielle Substanzen, die sich bei Feuchtigkeit langsam freisetzen, abgegeben werden, andererseits können unangenehme Gerüche aufgenommen werden.

Der Einsatz von Cyclodextrinen ist auch bei chemischen Reaktionen nützlich. Durch Komplexierung des Eduktes kann eine regioselektive Substitution ablaufen, da nur bestimmte Positionen am Edukt frei zugänglich sind.

Auch bei Lebensmitteln kann der Einsatz von Cyclodextrinen technologisch von Vorteil sein:

- Erhöhung der Stabilität (Lagerdauer) gegen Sauerstoff, Licht und thermische Belastung (Zersetzung und Flüchtigkeit), z. B. Vitamine, Pflanzenöle
- Entfernen schädlicher Verbindungen, Maskierung von Bitterstoffen
- Extraktion wertvoller Verbindung zur Aufwertung von Lebensmitteln
- Überführung von Flüssigkeiten in Pulver (z. B. Säfte, Honig)
- Verlängerung des Geschmacks, beispielsweise Aromastoffe in Kaugummi

Der Einsatz der Cyclodextrine in den aufgeführten Bereichen ist möglich, da native Cyclodextrine als dermatologisch unbedenklich und als nicht toxisch eingestuft werden. α -Amylase kann das α -CD nicht, das β -CD kaum und γ -CD recht schnell metabolisieren [9], somit werden α - und β -CD unverändert ausgeschieden. Die Abbauprodukte (lineare Oligomere aus D-Glucose) sind unbedenklich, jedoch darf β -CD nicht durch Injektion in die Blutbahn gelangen, da es mit Cholesterin Niederschläge bildet.

In einigen Ländern sind Cyclodextrine in der Lebensmittelindustrie schon seit über 25 Jahren im Einsatz und β -CD in vielen Ländern für die orale Einnahme offiziell zugelassen. Seit 1997 ist es in den USA in die GRAS-Liste (**g**enerally **r**ecognized **a**s **s**ave) aufgenommen und darf daher bis zu 2% u. a. in Kaugummi und Pudding enthalten sein. Auch das γ -CD darf in den USA in einigen diätetischen Lebensmitteln und Vitaminpräparaten bis zu 80-90% zugesetzt werden. Die WHO hält eine Menge von 6 mg β -CD pro kg Körpergewicht als unbedenklich.

Im Zuge der Umsetzung von Richtlinien der EU-Kommission in deutsches Recht wurde β -CD in der Zusatzstoffzulassungsverordnung (ZZuIV, „Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken“) mit der E-Nummer E 459 aufgenommen und darf in „Lebensmitteln in Tabletten- und Dragéeform“ *quantum satis* („...nach der guten Herstellungspraxis nur in der Menge verwendet werden, die erforderlich ist, um die gewünschte Wirkung zu erzielen...“ (s. ZZuIV, §7, Abs. 2)) eingesetzt werden. β -CD darf auch als Trägerstoff in Lebensmitteln bis zu 1 g/kg verwendet werden [14].

Nach der Novel Food Verordnung (NFV) zur Zulassung neuartiger Lebensmittel, die zu den am besten kontrollierten Lebensmitteln gehören, hat Italien 2001 γ -CD als Lebensmittelzusatz beantragt, dies wurde jedoch abgewiesen [15].

1.3.1 Cyclodextrine in der Forschung

Die Anzahl der Publikationen über Cyclodextrine ist in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich angestiegen (s. Abb. 1-3).

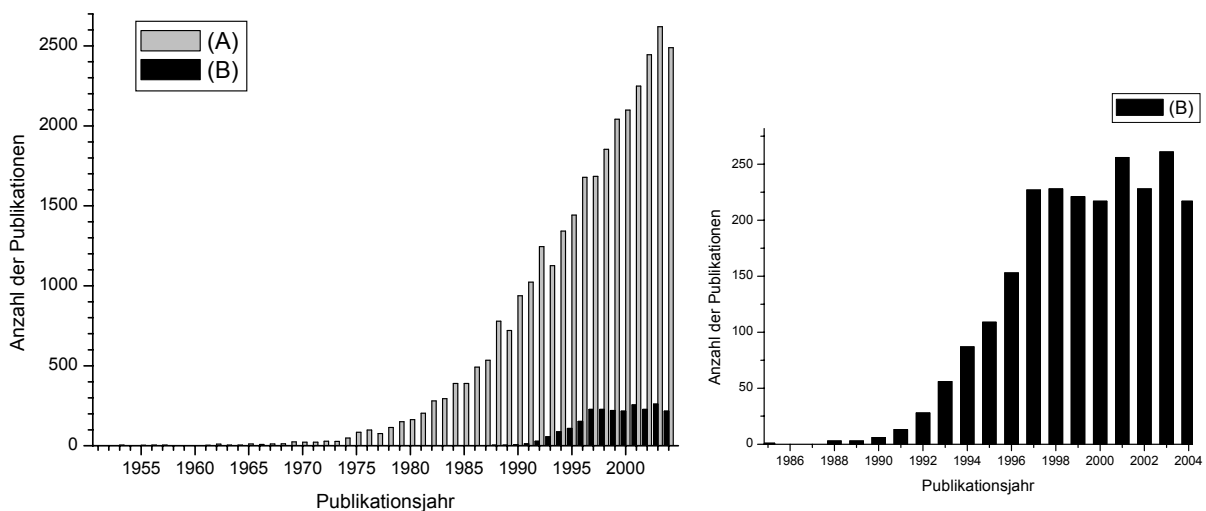


Abb. 1-3: Anzahl der jährlichen Publikationen für die Suchworte: (A) Cyclodextrin (B) Cyclodextrin, „capillary electrophoresis“, Stand: 28.02.05, ermittelt mit SciFinder², Programm für Literaturrecherche

Vielfältige Forschungsgebiete beschäftigen sich mit Cyclodextrinen. Ein Gebiet stellt die Grundlagenforschung der CD-Chemie und ihrer Eigenschaften dar. Weiterhin wird die Produktion der Cyclodextrine, die Synthese ihrer Derivate und ihre Toxizität untersucht. Ein großes Arbeitsgebiet ist die Erforschung der Inklusionsphänomene, die u. a. mittels unterschiedlicher spektroskopischer Methoden (NMR, FT-IR, Röntgenstrukturanalyse, usw.) untersucht werden. Die meisten Publikationen (ca. 25%) sind im Bereich der pharmazeutischen Anwendungen angesiedelt. Ein wesentlich kleinerer Teil der Veröffentlichungen über Cyclodextrine sind über Lebensmittel und kosmetische Artikel, obwohl ca. 70% der produzierten

² SciFinder Scholar, Version: 2004, © 2003 American Chemical Society

Cyclodextrine hier verbraucht werden. In etwa 20% der Publikationen wurden auf dem Gebiet der analytischen Chemie veröffentlicht, wobei hier hauptsächlich die Chromatographie im Vordergrund steht [2].

1.3.1.1 Anwendung der Cyclodextrine in der Chromatographie

Cyclodextrine und ihre Derivate sind die einzigen Selektoren, die in allen Gebieten der Chromatographie zur Trennung von Enantiomeren verwendet werden [16]. Sie werden als Selektoren in chiralen Stationärphasen (CSP) in der GC, SFC, HPLC, DC und CEC und als chirale Additive in der mobilen Phase in der DC, HPLC, CEC und CE eingesetzt [17]. Fast alle Substanzklassen verschiedenster Polaritäten können mit den entsprechenden Cyclodextrinderivaten in Enantiomere getrennt werden. Die Mechanismen der chiralen Erkennung durch Cyclodextrin(-Derivate) ist jedoch im wesentlichen unverstanden. Oft sind keine logischen Zusammenhänge in der Form, Größe und Derivatisierung des Selektors und des Selektanden zu erkennen. Es scheint ein multimodaler Prozess vorzuliegen, bei dem Inklusionen, Wasserstoffbrückenbindungen, Dispersionskräfte, Dipol-Dipol-, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen usw. eine Rolle spielen können [18]. Eine Inklusion des Analyten in die Kavität des Cyclodextrins ist jedoch nicht unbedingt von vorherrschender Bedeutung für die Enantioselektivität, da Enantiomerentrennungen auch auf per-*n*-pentylierter Amylose möglich sind [19]. Sogar mit linearen, derivatisierten Dextrinen mit 7 und 8 Glucoseeinheiten konnten kürzlich eine Reihe verschiedener Verbindungen (z. B. Aminosäure, Alkohole, Ester) mit teilweise höheren Trennfaktoren als mit dem entsprechenden Cyclodextrinderivat getrennt werden [20].

Eine Vorhersage der Elutionsreihenfolge aufgrund der absoluten Konfiguration mittels molekularer Berechnung ist bei den allermeisten Trennungen schwierig, da der Fehlerbereich bis zu 1 kcal/mol (das entspricht einem chiralen Trennfaktor von $\alpha \gg 2$, der mit Cyclodextrinen selten auftritt) erreichen kann [18].

Im Folgenden werden einige Anwendung von Cyclodextrinen für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Analysemethoden genauer besprochen.

1.3.1.1.1 Anwendung in der GC

1983 beschrieben Kościelski *et al.* [21] die erste gaschromatographische Enantiomerentrennung an einer auf Cyclodextrinen basierenden CSP. Sie trennten die Racemate der Terpene α - und β -Pinen an einer gepackten Säule, die mit nativen α -CD in Formamid belegt war. Die Trennfaktoren α waren zwar hoch, aber die Effizienz und die Lebensdauer der Säulen waren gering.

Der wirkliche Durchbruch der enantioselektiven GC mit Cyclodextrin-Selektoren als eine in einem breiten Anwendungsgebiet einsetzbare Technik kam 1987-1988, als CSP aus verschiedenen Cyclodextrinderivaten eingeführt wurden. Die Bedeutung der bisher eingesetzten chiralen Komplexbildungs-GC nahm im Zuge dessen ab [22,23]. Juvancz *et al.* zeigten, dass Kapillarsäulen mit unverdünntem permethylierten β -CD (2,3,6-Tri-O-methyl- β -CD) belegt und bei hohen Temperaturen eingesetzt werden können [24]. Um den hohen Schmelzpunkt des permethylierten β -CD von 175 °C [25] und damit den eingeschränkten anwendbaren Temperaturbereich zu umgehen, wurden zwei Ansätze entwickelt [18].

Einerseits stellten bereits 1987 Schurig und Nowotny das Konzept vor, bei dem permethyliertes β -CD in dem Polysiloxan OV 1701 gelöst wird [26]. So kann die Enantioselektivität des Cyclodextrins mit den guten chromatographischen Eigenschaften von Polysiloxanen kombiniert und in einem weiten Temperaturbereich eingesetzt werden [27]. CSP mit permethyliertem β -CD sind die Stationärphasen mit dem umfangreichsten Anwendungsgebiet und den meisten Publikationen [22,28].

Andererseits wurden CD-Derivate mit niedrigen Schmelzpunkten synthetisiert. Die drei Hydroxylgruppen in einem Cyclodextrin können verschieden derivatisiert werden, vor allem lassen sie sich leicht O-alkylieren bzw. O-acetylieren (zur Reaktivität s. Kap. 3.2). Die Substitutionen liefern eine große Anzahl unterschiedlicher, oft nicht regioisomerenreiner Derivate. Dabei werden die Eigenschaften (z. B. Polarität) und auch die makrocyclische Konformation (eine Alkylierung komprimiert beispielsweise die Kavität) verändert. Dies kann eine Erklärung für eine starke Änderung der Enantioselektivität sein, wenn nur eine kleine Variation im Substitutionsmuster auftritt [29].

Die per-*n*-pentylierten Cyclodextrine (Lipodex) nach König *et al.* [29], beispielsweise perpentyliertes α -, β - oder γ -CD, Hexakis(3-O-acetyl-di-O-pentyl)- α -CD und Heptakis(3-O-acetyl-di-O-pentyl)- β -CD, sind bei Raumtemperatur flüssig. So können

auch Trennungen bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden. Derivate wie das Octakis(3-O-butanoyl-2,6-di-O-n-pentyl)- γ -CD (Lipodex E) sind für viele Verbindungsklassen hoehenantioselektiv [30]. Armstrong *et al.* verwendeten polarere CD-Derivate, z. B. Hexakis(per-O-(S)-2-hydroxypropyl)-per-O-methyl)- α -CD [31]. Die Einführung von sperrigen Substituenten, wie der *tert.*-Butyldimethylsilylgruppe [32] in der O-6-Position hat einen starken Einfluss auf die Enantioselektivität, da der Zugang am schmalen Rand des Cyclodextrins blockiert ist, und die Löslichkeit im Polysiloxan ist verbessert [23]. Heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-O-*tert.*-butyldimethylsilyl)- β -CD und Heptakis(2,3-di-O-methyl-6-O-*tert.*-butyldimethylsilyl)- β -CD sind bedeutende, komplementäre CSP in der GC [33,34].

Das Lösen verschiedener CD-Derivate in semipolaren Polysiloxanen nach Schurig und Nowotny wurde für fast alle CD-Derivate übernommen und wird routinemäßig auch bei kommerziell erhältlichen enantioselektiven Trennkapillaren eingesetzt [35,36]. Mehr als 50 verschiedene CD-Derivate wurden bislang in der GC erfolgreich für Enantiomerentrennungen verwendet [28]. Eine weitere Verbesserung der Trennkapillaren erfolgte durch die kovalente Anbindung des Cyclodextrins an ein Polysiloxan, wie anhand der polymeren Stationärphasen Chirasil- β -Dex (Selektor: permethyliertes β -CD) [37] und Chirasil- γ -Dex (Selektor: Octakis(3-O-butanoyl-2,6-di-O-n-pentyl)- γ -CD) [38] gezeigt wurde.

Heutzutage werden auf Cyclodextrinen basierende GC-Trennphasen vielseitig und weitverbreitet in der Enantiomerentrennung eingesetzt [39]. Vor allem für flüchtige und unzersetzt verdampfbare Analyte ist die enantioselektive GC zur Zuordnung der absoluten Konfiguration, Bestimmung von Enantiomerenverhältnissen und der Reaktionskontrolle die Methode der Wahl. Sowohl in der pharmazeutischen und der klinischen Analytik als auch bei Umweltanalysen (z. B. Organochlor-Pestizide, Alkyl-nitrate) wurde eine Vielzahl von Enantiomeren verschiedenster Verbindungsklassen getrennt [18,22]. Bei der Authentizitätsbewertung von Aromen aufgrund ihrer Zusammensetzung und ihrem Enantiomerenverhältnis, beispielsweise von ätherischen Ölen [40,41], ist die enantioselektive GC mit CD-Derivaten, oft auch gekoppelt mit einer achiralen Phase in der zweidimensionalen GC [42], unersetzlich.

In den Gebieten der GC und LC mit Cyclodextrinen hat die jährliche Anzahl der wissenschaftlichen Publikationen ein Plateau erreicht [28]. Auch die jüngste Technik, die CE mit Cyclodextrinen, hat nach einem extremen Anstieg Anfang der 90er Jahre

seit 1997 ein gleichbleibendes Niveau erreicht (s. Abb. 1-3), wobei hier noch wesentlich mehr Publikationen jährlich veröffentlicht werden als in der GC und LC.

1.3.1.1.2 Anwendung in der CE und CEC

Cyclodextrine werden als Selektoren in zwei Drittel aller in der Literatur aufgeführten Enantiomerentrennungen in der CE (s. Kap. 6.4.1.1) eingesetzt, da sie auch hier eine gute Enantioselektivität für eine weites Feld von Analyten zeigen [28]. Zudem ist die fehlende UV-Aktivität der Cyclodextrine und ihre gute Wasserlöslichkeit sehr vorteilhaft. Günstig ist auch die schnelle Kinetik bei der Bildung und Dissoziation der diastereomeren Komplexe mit den chiralen Analyten, um genügend schmale Peaks zu erhalten [43]. Cyclodextrine und ihre Derivate zeigen meist mittelmäßige Enantioselektivitäten. Dies kann in der CE mit den hohen Effizienzen (oft Bodenzahlen von $n > 100000$) ausgeglichen werden, während in der GC in der Regel dementsprechend lange Kapillaren eingesetzt werden müssen. In der HPLC dagegen haben die gepackten Säulen eine begrenzte Effizienz, daher werden hier hochselektive Selektoren (wie z. B. Cellulose- oder Amylolederivate, Pirkle-Selektoren) als CSP benötigt. Dennoch sind Cyclodextrine aufgrund ihrer fehlenden UV-Aktivität auch in der HPLC die am häufigsten eingesetzten chiralen Additive [28].

Der große Anstieg von Publikationen auf dem Gebiet der CE mit Cyclodextrinen (s. Abb. 1-3) zeigt einerseits das steigende Interesse an der CE als Methode überhaupt und zudem wurden die Vorteile, die die Methode auch auf dem Gebiet der Enantiomerentrennungen mit sich bringt, erkannt. Gerade für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von (schwerflüchtigen) Pharmazeutika sind schnelle Routinemethoden, wie sie die CE bieten kann, von großer Bedeutung. In den 70er und 80er Jahren wurden 85-90% der Pharmazeutika als Racemate eingesetzt, heutzutage werden ca. 65% der chiralen Wirkstoffe enantiomerenrein entwickelt [44]. Neben der pharmazeutischen Entwicklung und Forschung ist die enantioselektive CE natürlich auch für andere Gebiete, wie z. B. biomedizinische und umweltrelevante Studien, von Nutzen.

Als erstes wurden native Cyclodextrine als chirales Additiv eingesetzt, in jüngster Zeit liegt das Interesse aber meist bei substituierten Derivaten, vor allem bei denen des β -CD, da die Löslichkeit des nativen β -CD relativ niedrig ist (s. Tab. 1-1), wobei aber eine Substitution zu anderen Enantioselektivitäten führt. Neutrale CD-Derivate

werden immer noch weitverbreitet angewandt, vor allem Cyclodextrine mit unterschiedlichem Methylierungsgrad und Hydroxypropylderivate. Auch positiv geladene CD-Derivate, z. B. Heptakis(6-deoxy-6-methoxyethylamino)- β -CD, werden zu Enantiomerentrennungen eingesetzt [10,45].

Eine schnell zunehmende Anwendungsbreite erfuhren anionische Derivate, vor allem Cyclodextrine unterschiedlichen Sulfatierungsgrades und Carboxymethyl-Derivate. Heutzutage gibt es eine ganze Reihe verschiedener neutraler und geladener CD-Derivate zur Trennung geladener und neutraler Enantiomere [45].

Gerade mit mehrfach geladenen Cyclodextrinen, wie carboxymethyl-, sulfoalkyl- und methylaminoalkylsubstituierte, sulfatierte und phosphatierte Cyclodextrine, kann man hohe Enantioselektivitäten, hohe Bodenzahlen und daher schnelle Trennungen erreichen, da die Bodenzahlen von der effektiven Ladung der Analyten abhängig sind. Die meisten derivatisierten Cyclodextrine sind Mischungen unterschiedlich substituierter (Regio-)Isomere (s. Kap. 3.1 und Kap. 6.4.1.2). Dies kann zu Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen führen. Zur Untersuchung von chiralen Erkennungsmechanismen sind Selektoren aus einem einzelnen Isomer sinnvoll. Aber es werden auch definierte Mischungen einiger CD-Derivate eingesetzt, was die Enantioselektivität positiv beeinflussen kann [43].

In der enantioselektiven CEC-Analytik sind Cyclodextrine wichtige chirale Selektoren und in allen CEC-Modi (o-CEC, p-CEC, rod-CEC, s. Kap. 5.1.4) anzutreffen. Bei der Untersuchung von chiralen Pharmazeutika hat die enantioselektive CEC sich zu einer wichtigen und leistungsstarken Technik entwickelt [46].

Die ersten Enantiomerentrennungen von 1,1'-Binaphthyl-2,2'-diylhydrogenphosphat und 1-Phenylethanol mittels o-CEC zeigten Mayer und Schurig 1992 mit einer Chirasil- β -Dex belegten, immobilisierten Kapillare [47]. Armstrong *et al.* [48] beschreiben einen ähnlichen Ansatz, bei dem permethyliertes β -CD über einen Trimethylen-Spacer an ein Dimethylpolysiloxan gebunden wurde. Die mit dem chiralen Polymer belegte Kapillare konnte Mephobarbital trennen. Auch permethyliertes γ -CD, das durch einen Octamethylen-Spacer an ein Polysiloxan gebunden ist (dort Chirasil- γ -Dex benannt), wurde zur Enantiomerentrennung verschiedener Profene eingesetzt [49]. Sezemán und Ganzler verwendeten 1994 eine mit γ -CD und Acrylamid belegte Kapillare und trennten Epinephrin in seine Enantiomere [50].

Pesek *et al.* [51] band 2-Hydroxy-3-methacryloylpropyl- β -CD an die angeätzte Innenwand von Kapillaren. Wang *et al.* [52] entwickelte eine „open tubular“ Kapillare, an deren Kapillarwand mittels Sol-Gel-Prozess 2,6-Di-*n*-butyl- β -CD kovalent in eine monolithische Matrix gebunden wurde. Mit diesem Ansatz konnten die Enantiomere von Ibuprofen und Binaphthol erfolgreich getrennt werden.

In der CEC mit Silica-Monolithen kann das Cyclodextrin entweder während des Sol-Gel-Prozesses eingebunden werden oder ein bestehender Monolith, der durch einen Sol-Gel-Prozess [53] oder durch sintern nativer Silicapartikel [54] gebildet wurde, nachträglich mit dem chiralen Polymer Chirasil- β -Dex modifiziert werden. Auch eine nachträgliche kovalente Anbindung von nativen β - und γ -CD an einen Silica-Monolithen ist möglich [55].

In der p-CEC gibt es einige Ansätze mit Cyclodextrinen als chirale Selektoren, jedoch werden auch andere Selektoren verwendet, da häufig LC-Packungsmaterial eingesetzt wird. Li und Lloyd [56] verwendeten für die Trennung neutraler (Hexobarbital) und anionischer (derivatisierte Aminosäuren) Racemate natives β -CD als Stationärphase. Auch an Silica gebundenes Hydroxypropyl- β -CD konnte zur Trennung der Enantiomere von Chlorthalidon und Mianserin eingesetzt werden [57]. Permethyliertes β -CD wurde als Chirasil- β -Dex [58] und Chira-Dex-Silica [59] (s. Kap. 5) eingesetzt. Es gibt speziell für die p-CEC entwickeltes, auf Cyclodextrinen basierendes Packungsmaterial [60]: An einer sulfatierten unteren Schicht eines Silicapartikels wird Hydroxypropyl- β -CD immobilisiert. Dadurch wird neben dem chiralen Selektor auch ein relativ starker EOF erhalten, der aufgrund des geringen Restsilanolgehaltes, speziell bei den normalerweise verwendeten LC-Packungsmaterialen, recht gering ist [61]. Mit Kronenether und Cyclam derivatisiertes β -CD, das an Silicapartikel gebunden wurde, hat aufgrund der kooperativen Effekte der zwei vorhandenen chiralen Selektoren eine hohe Enantioselektivität [62,63].

2 Problemstellung

Chirasil- β -Dex ist ein Poly(hydromethyl)-dimethylsiloxan, an das permethyliertes β -Cyclodextrin als chiraler Selektor mittels eines Octamethylen-Spacers chemisch gebunden ist. Der Octenyl-Spacer kann entweder in O-2-, O-3- oder O-6-Position der Glucoseuntereinheit gebunden sein. Daher ergeben sich drei regioisomere Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -Cyclodextrine und damit das O-2-, O-3- bzw. O-6-Chirasil- β -Dex. Bislang war nicht geklärt, welches Chirasil- β -Dex bei der herkömmlichen Synthese entsteht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte zudem geprüft werden, wie sich die Veränderung verschiedener Reaktionsparameter, wie Lösemittel, Base und Aufreinigungsschritte, auf die Zusammensetzung der regioisomeren Selektoren auswirkt. Von besonderer Bedeutung waren gaschromatographische Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Spacer-Position auf Enantiomeren-trennungen, da die Anzahl, Art und Position der Substituenten am Cyclodextrin-Selektor unter Umständen große Auswirkungen auf seine Wechselwirkungen mit den zu trennenden chiralen Analyten haben kann. Wenn sich die Zugänglichkeit des Cyclodextrin-Selektors bzw. die intermolekularen Wechselwirkungen mit dem Analyten und damit die chirale Diskriminierung verändern, können auch regioisomere Selektoren unterschiedliche Retentionsfaktoren, Effizienzen und Selektivitäten erzielen. Um die Unterschiede dieser Selektor-Selektand-Wechselwirkungen in der Gaschromatographie zu prüfen, mussten Kapillarsäulen mit möglichst identischen Parametern hergestellt werden, um einen Vergleich der Trennverhalten zu ermöglichen. So sollte geklärt werden, ob durch den Einsatz eines regioselektiv synthetisierten Selektors die Güte und Reproduzierbarkeit der Kapillaren verbessert werden können und damit zu einer Optimierung der Stationärphase beitragen.

Auch in der Kapillarelektrochromatographie sollte Chirasil- β -Dex als Stationärphase eingesetzt werden. Hier sollten atropisomere, polychlorierte Biphenyle (PCB) getrennt werden. Die Trennung der Atropisomere ist wegen ihrer toxikologischen und physiologischen Bedeutung interessant, zudem können aufgrund von Enantiomeren-anreicherung der als Racemate in die Umwelt eingebrachten PCB Aussagen über die Abbauege getroffen werden.

Die Atropisomere sollten durch unterschiedlichen kapillarelektrochromatographischen Methoden, mit „open tubular“ Kapillaren (o-CEC), mit gepackten Kapillaren (p-CEC) und mit monolithischen Kapillaren (rod-CEC) getrennt werden.

Mit der Methodenoptimierung zur Trennung der Atropisomere sollte ein Vergleich der Effizienzen der Methoden erfolgen. So stand die Untersuchung des Einflusses der Stationärphasen, des Puffers und des organischen Modifiers bei Trennung dieser stark lipophilen Substanzen im Vordergrund.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den Hauptwirkstoffen in Ecstasy: 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), *N*-Methyl-3,4-methylendioxyamphetamin (MDMA, „Ecstasy“) und *N*-Ethyl-3,4-methylendioxyamphetamin (MDE). Sie sind die am häufigsten illegal synthetisierten und konsumierten Drogen in Europa und den USA.

Die untersuchten Amphetaminderivate sind chirale Verbindungen, daher sind die Wirkungen und Wirkungsmechanismen der einzelnen Enantiomere von besonderem Interesse. Für diese Untersuchungen an Tier und Mensch ist eine zuverlässige Reinheitskontrolle der Amphetaminderivate hinsichtlich ihrer enantiomeren Verunreinigungen und auch eventueller Verunreinigungen mit anderen Amphetaminderivaten durch die Synthese von zentraler Bedeutung, damit eindeutige und nachvollziehbare Ergebnisse erzielt werden können. Eine überlagernde Wirkung der Amphetaminderivate und ihrer Enantiomere soll so ausgeschlossen werden können. Bislang wurden HPLC-Methoden zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von MDA, MDMA und MDE verwendet. Da für die Analyse drei verschiedene Stationärphasen erforderlich sind, sollte eine CE-Methode entwickelt werden, die eine schnellere und exaktere Bestimmung der Reinheit von MDA, MDE und MDMA ermöglicht. Um eine genaue Einschätzung der Güte der Analysenergebnisse zu erlangen, musste die entwickelte und optimierte Methode einer Validierung unterzogen werden. Schließlich sollte die Bestimmung der Reinheiten verschiedener enantiomerer Amphetaminderivate, die für Tierstudien synthetisiert wurden, erfolgen.

3 Untersuchungen zu der Spacer-Position in Chirasil-β-Dex

3.1 Chirasil-β-Dex

In der Kapillar-GC werden unter anderem Stationärphasen verwendet, bei denen des Cyclodextrinderivat entweder gelöst oder chemisch angebunden ist. CD-Derivate (permethylierte β-CD) werden in semipolaren Polysiloxanen (OV 1701) gelöst, wobei die chemische Selektivität und die chromatographische Effizienz kombiniert werden können [27,35]. Eine kovalente Bindung des Selektors an ein Polysiloxan und dessen Immobilisierung bieten einige Vorteile gegenüber dem gelösten System, wie beispielsweise eine verbesserte Temperaturstabilität, ein reduziertes Säulenbluten, eine längere Lebensdauer, die Verwendung höherer Selektorkonzentrationen unabhängig von der Löslichkeit im (evtl. unpolaren) Polymer und die Verwendbarkeit der Kapillaren in der o-LC bzw. o-CEC. Daher konnte eine einzige Chirasil-β-Dex-Kapillare im „unified approach“ sowohl in der GC, SFC, o-LC als auch in der o-CEC erfolgreich zur Enantiomerentrennungen eingesetzt werden [64,65]. Aber auch in der p-LC [66], p-CEC [58] und in der rod-CEC mit gesinterten [54] und Sol-Gel prozessierten [53] Monolithen wurde Chirasil-β-Dex als Stationärphase eingesetzt. Der Temperaturbereich, in dem das Chirasil-β-Dex in der GC eingesetzt werden kann, reicht von -25 bis 250 °C.

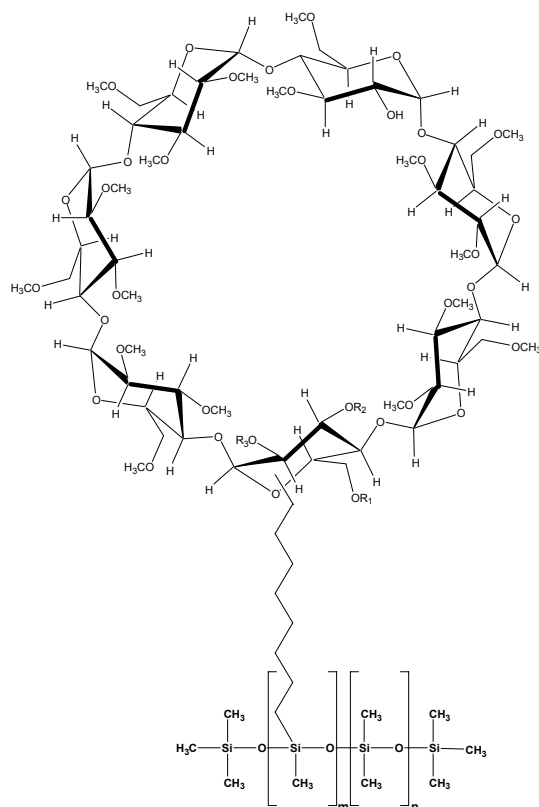
Chirasil-β-Dex (Chirasil: chirales Polysiloxan) ist ein Poly(hydromethyl)-dimethylsiloxan, an das permethyliertes β-Cyclodextrin als chiraler Selektor mittels eines Octamethylen-Spacers chemisch gebunden ist [37,67]. Der Octenyl-Spacer kann dabei entweder in O-2-, O-3- oder O-6-Position der Glucoseuntereinheit gebunden sein (s. Abb. 3-1).

Die herkömmliche Synthese [37,68] des Selektors Mono(octen-7-enyl)-permethyl-β-CD³ besteht aus 2 Schritten:

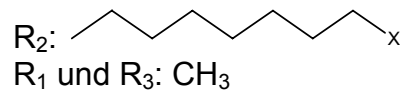
³ Dieser vereinfachte Name steht für die 2^{1-VII},3^{1-VII},6^{1-VI}-Eicosa-O-methyl-6¹-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose, 2^{1-VII},3^{1-VI},6^{1-VII}-Eicosa-O-methyl-3¹-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose und/oder 2^{1-VI},3^{1-VII},6^{1-VII}-Eicosa-O-methyl-2¹-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose.

1. Octenylierung des β -CD mit 8-Brom-1-octen in DMSO mit NaOH als Base
2. Permethylierung mit CH_3I und NaH in DMF

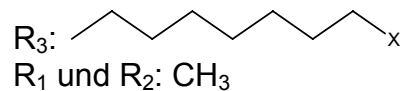
Zur Synthese von Chirasil- β -Dex wurde das Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD an ein Poly(hydromethyl)-dimethylsiloxan durch die Reaktion der Doppelbindung und der Si-H-Gruppen (ca. 10%) durch eine Hydrosilylierungsreaktion gebunden, wobei H_2PtCl_6 als Katalysator diente und eine Si-C-Bindung entsteht. Die durchschnittliche Kettenlänge des Polymers wurde durch die Menge an Hexamethyldisiloxan (HMDSO), dem „Endcapper“, reguliert.



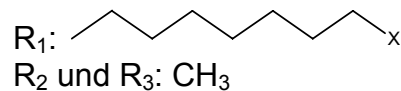
O-2-Chirasil- β -Dex:



O-3-Chirasil- β -Dex:



O-6-Chirasil- β -Dex:



X: Si-H-haltiges Dimethylpolysiloxan

Abb. 3-1: Strukturformel von O-2-, O-3- und O-6-Chirasil- β -Dex

Nachdem der Belegung der Kapillare mit dem Polymer (üblicherweise $0,25 \mu\text{m}$ Filmdicke), wird dieses an der Kapillarwand thermisch immobilisiert. Durch die kovalenten Si-O-Si-Bindungen zwischen dem Polysiloxan und der Kapillaroberfläche bzw. der starken Quervernetzung der Polymerstränge untereinander kann die Phase nicht mehr ausgewaschen werden [68,69]. Für die Immobilisierung sind die nach der Bindung des Selektors verbleibenden Si-H-Gruppen im Polymer verantwortlich.

Aus den drei verschiedenen Möglichkeiten der Spacer-Position ergeben sich die drei regioisomeren Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -cyclodextrine und damit das O-2-, O-3- bzw. O-6-Chirasil- β -Dex. Es sollte nun geklärt werden, wie das herkömmlich

hergestellte Chirasil- β -Dex zusammengesetzt ist, d. h. in welchen Positionen der Spacer am Selektor gebunden ist. Zudem sollte der Einfluss der Spacer-Position auf die Selektor-Selektand-Wechselwirkungen und damit auf die Enantiomeren-trennungen in der GC untersucht werden. Die Spacer-Position kann einen Effekt auf den Retentionsfaktor, die Effizienz und die Enantioselektivität haben, da die Substituenten die Zugänglichkeit des Cyclodextrins bestimmen können. Somit war zu prüfen, ob in diesem Fall die Verwendung eines regioisomerenreinen Selektors einen Einfluss auf die Güte und Reproduzierbarkeit der Trennung hat und damit zur einer Verbesserung der Stationärphase beitragen kann. Zudem ist der Syntheseweg der Stationärphase für die kommerziell erhältlichen Trennkapillaren (Chrompack International-Varian, Middelburg, Niederlande) nicht bekannt. Aus diesem Grund war es wichtig zu klären, ob die Änderung der Reaktionsparameter Einfluss auf die Spacer-Position hat und wie diese wiederum die Trennung beeinflusst.

Um dies zu prüfen, wurden die regioisomerenreinen Selektoren benötigt. Nach ihrer Reinheitskontrolle mittels LC/MS konnten sie als Standards für die Zuordnung der Produkte der herkömmlichen Synthese eingesetzt werden und der Einfluss der verschiedenen Reaktionsparameter (Lösemittel, Base) modifizierter Reaktionsansätze untersucht werden. Außerdem waren regioisomerenreine Selektoren zur Herstellung der O-2-, O-3- bzw. O-6-Chirasil- β -Dex Stationärphasen für die GC-Untersuchungen erforderlich.

3.2 Selektive Synthesen der 3 regioisomeren Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -cyclodextrine

Die selektiven Synthesen⁴ der 3 regioisomeren Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD beruhen auf der Tatsache, dass die Hydroxylgruppen des β -CD in der O-2-, O-3- bzw. O-6-Position unterschiedliche Eigenschaften und damit eine unterschiedliche Reaktivität haben [70,71,72,73].

⁴ Die selektiven Synthesen der Selektoren bzw. der regioisomeren Chirasil- β -Dex-Polymere wurden von Dr. Oliver Trapp und Dr. Hervé Cousin durchgeführt und für die nachfolgenden LC/MS- und GC-Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Die Hydroxylgruppen in

- O-2-Position sind am acidesten,
- O-6-Position sind sehr reaktiv, meist am nucleophilsten und sterisch begünstigt,
- O-3-Position am wenigsten zugänglich.

Somit werden in der herkömmliche Synthese keine Reaktionsprodukte mit dem Spacer in O-3-Position erhalten [74], da zur Derivatisierung dieser Hydroxylgruppen drastischere Bedingungen notwendig sind. Also können verschiedene Reaktionsparameter, wie verwendete Base, Lösemittel und Aufreinigungsschritte die Spacer-Position beeinflussen. Daher werden für die modifizierten Syntheseansätze unterschiedliche Zusammensetzungen der regioisomeren Produkte erwartet.

Selektive Synthese der $2^{I-VII}, 3^{I-VII}, 6^{I-VI}$ -Eicosa-O-methyl-6^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose (O-6-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD)

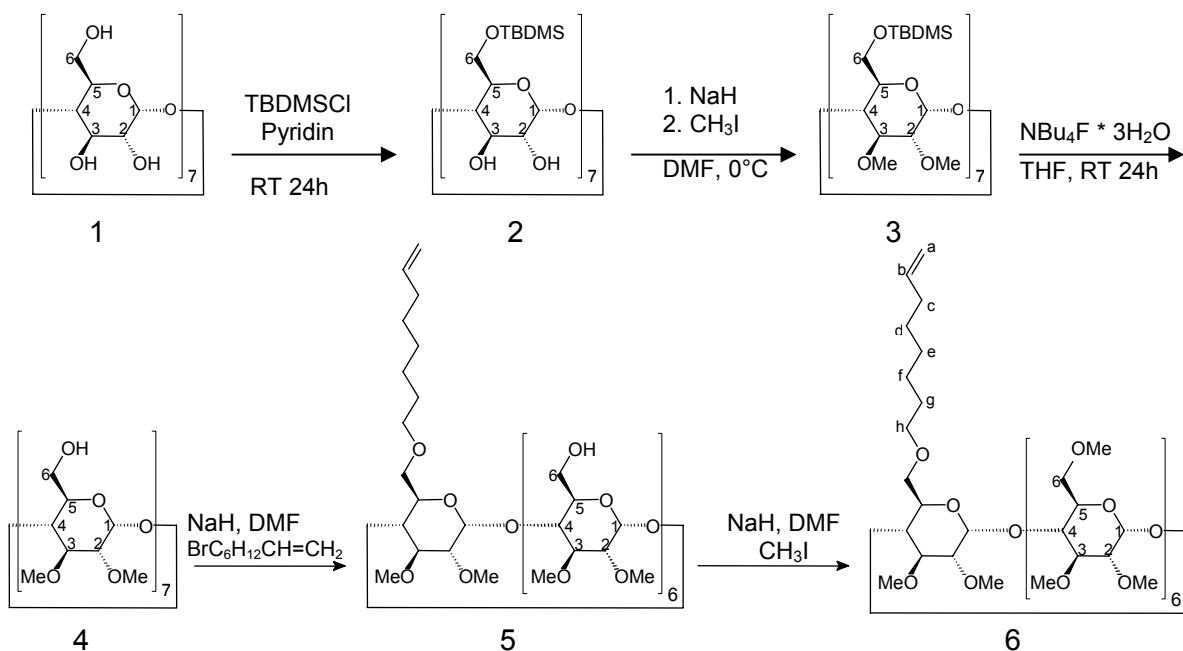


Abb. 3-2: Synthese von $2^{I-VII}, 3^{I-VII}, 6^{I-VI}$ -Eicosa-O-methyl-6^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose über die Mono-octenylierung und Permethylierung von $2^{I-VII}, 3^{I-VII}$ -Tetradeca-O-methylcyclomaltoheptaose [74]

Bei einem der beschriebenen Synthesewege aus [74] für die $2^{I-VII}, 3^{I-VII}, 6^{I-VI}$ -Eicosa-O-methyl-6^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose, hier kurz O-6-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD genannt, wird aus dem nativen β -CD (1) in 3 Schritten die $2^{I-VII}, 3^{I-VII}$ -

Tetradeca-O-methyl-cyclomaltoheptaose (4) dargestellt [75,76] (s. Abb. 3-2). Da die Hydroxylgruppen in O-6-Position die reaktivsten sind, wurde durch Silylierung mit *tert.*-Butyldimethylsilylchlorid die Verbindung (2) selektiv gebildet. Nach der Permethylierung der sekundären Hydroxylgruppen (3) und der Desilylierung zu (4) wurde eine regioselektive Monoctenylierung durchgeführt, wobei (5) in 28% Ausbeute erhalten wurde. Nach Methylierung der sechs verbleibenden Hydroxylgruppen in O-6-Position wurde das erwünschte O-6-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD (6) erhalten.

Selektive Synthese der 2^{I-VII},3^{I-VI},6^{I-VII}-Eicosa-O-methyl-3^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose (O-3-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD)

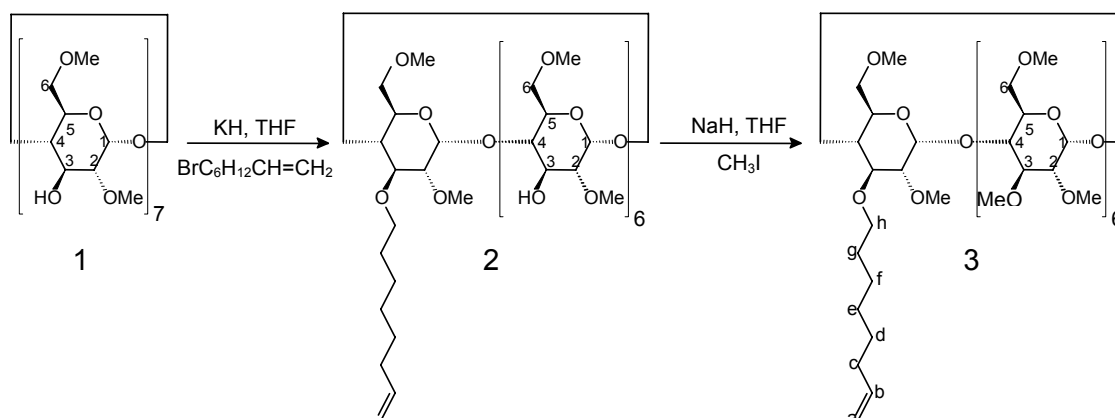


Abb. 3-3: Synthese von 2^{I-VII},3^{I-VI},6^{I-VII}-Eicosa-O-methyl-3^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose mittels Monoctenylierung und anschließender Permethylierung des 2^{I-VII},6^{I-VII}-Tetradeca-O-methylcyclomaltoheptaose [74]

Das 2^{I-VII},3^{I-VI},6^{I-VII}-Eicosa-O-methyl-3^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose, (kurz: O-3-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD) wurde aus der kommerziell erhältlichen 2^{I-VII},6^{I-VII}-Tetradeca-O-methylcyclomaltoheptaose (1) synthetisiert (s. Abb. 3-3). Nach der Monoctenylierung zu (2) und Aufreinigung, wobei 30% Ausbeute erreicht wurde, erfolgte die Methylierung der restlichen 6 Hydroxylgruppen in O-3-Position zum Produkt (3), die nach Aufreinigung eine Ausbeute von 90% ergab.

Selektive Synthese der 2^{I-VI},3^{I-VII},6^{I-VII}-eicosa-O-methyl-2^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose (O-2-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD)

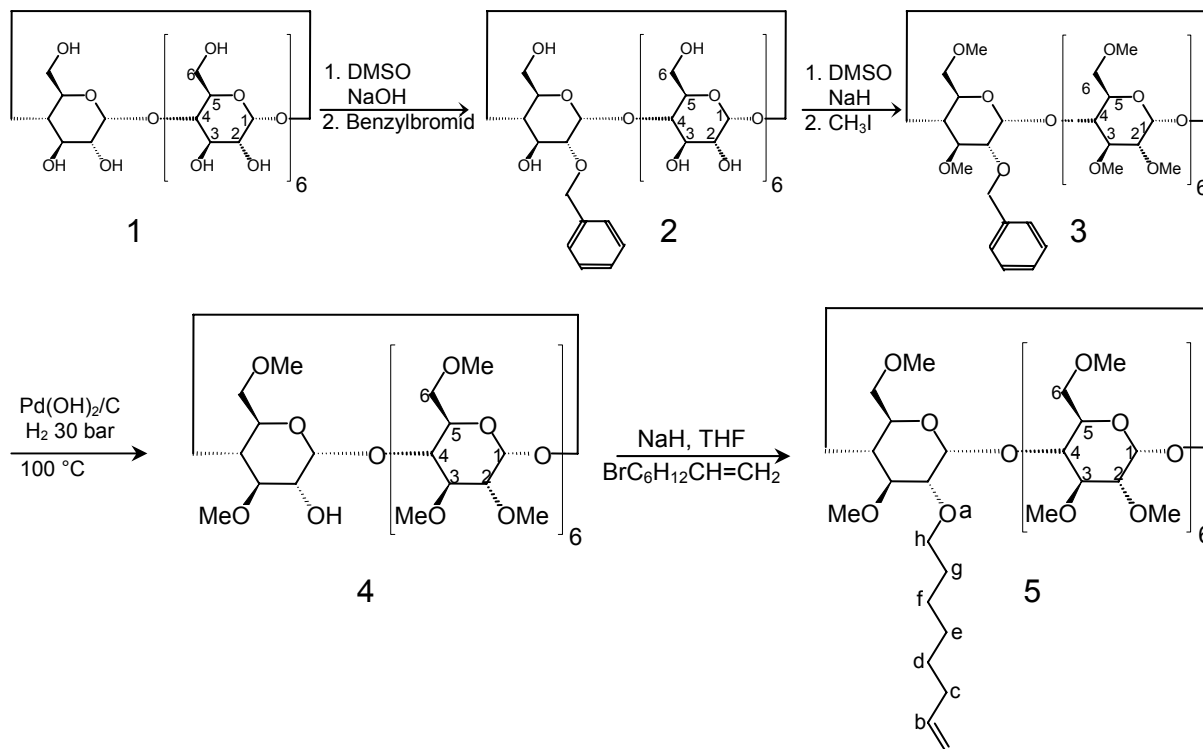


Abb. 3-4: Synthese von 2^{I-VI},3^{I-VII},6^{I-VII}-Eicosa-O-methyl-2^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose über Mono-octenylierung von 2^{I-VI}, 3^{I-VII}, 6^{I-VII}-eicosa-O-methyl-cyclomaltoheptaose [74]

Zur Synthese der 2^{I-VI},3^{I-VII},6^{I-VII}-Eicosa-O-methyl-2^I-O-(oct-7-enyl)-cyclomaltoheptaose (kurz: O-2-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD) wurde als Edukt β -CD eingesetzt (s. Abb. 3-4). Dieses wurde in O-2-Position benzyliert. Die Reaktion läuft selektiv ab, da die O-2-Hydroxylgruppe bevorzugt in Anwesenheit einer starken Base deprotoniert wird und dann als nucleophilste Spezies in der Reaktionsmischung mit dem Benzylum-Kation reagiert [77]. Nach der Permethylierung der 20 verbleibenden Hydroxylgruppen wurde die Benzylgruppe wieder abgespalten und eine Mono-octenylierung durchgeführt, wobei (5) entstand.

3.3 Analyse der Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -cyclodextrine mittels LC/MS

Da in herkömmlichen Synthese aufgrund der Eigenschaften der Hydroxylgruppe in O-3-Position keine O-3-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD gebildet werden (s. Kap. 3.2), wurde in den folgenden Untersuchungen das Hauptaugenmerk nur auf die beiden möglichen Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD gerichtet, um die Selektivität der herkömmlichen Synthese zu untersuchen.

Da Cyclodextrine und die hier untersuchten Derivate nicht mittels UV-Detektor detektiert werden konnten, wurden zunächst HPLC/RI-Messungen unternommen, um das System für die LC/MS-Analyse zu optimieren. Aufgrund der Unempfindlichkeit der RI-Detektion, war das System nicht für die eigentliche Analyse geeignet.

Bei den LC/MS-Messungen der selektiv synthetisierten Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD mit dem Octenyl-Spacer in O-2- oder O-6-Position zeigten die SIC der Natriumaddukte der Molekülmassepeaks ($[M+Na^+]$ $m/z = 1547$, s. Abb. 3-5 A und B), dass der Spacer weitgehend regioselektiv in entsprechender Position an das CD-Derivat gebunden war. Es waren nur geringe Verunreinigungen durch das andere Regioisomer vorhanden. Mit den selektiv hergestellten Regioisomeren konnte eine Zuordnung der Reaktionsprodukte in der herkömmlichen Synthese gemacht werden: Bei dem Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD, welches bei der herkömmlichen Synthese (1. Schritt in DMSO) entsteht, war zum Großteil der Spacer in O-2-Position (Abb. 3-5 C) gebunden. Durch säulenchromatographische Aufreinigung des Zwischenproduktes konnte neben der Abtrennung zwei- oder mehrfach octenylierter Produkte eine weitere Anreicherung des Hauptregioisomers erreicht werden (Abb. 3-5 D).

Die SIC in Abb. 3-6 A und B zeigen den Einfluss des Lösemittels bei der Octenylierung. Wenn DMSO durch DMF ersetzt wurde, änderten sich die Verhältnisse der gebildeten Regioisomere stark. Statt überwiegend Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD mit dem Octenyl-Spacer in O-2-Position erhielt man das Produkt mit dem Spacer in O-6-Position in größerer Ausbeute.

Bei einer „one pot“-Reaktion mit NaH als Base wurde die Permethylierung direkt nach dem Octenylierungsschritt durchgeführt. Neben di- und polyoctenylierten Produkten, die bei allen nicht säulenchromatographisch aufgereinigten Ansätzen

nachgewiesen werden konnten, wurde wesentlich mehr O-6-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD als bei der herkömmlichen Synthese gebildet, wobei auch hier das Hauptprodukt den Spacer in O-2-Position trug. Diese Untersuchungen sind wichtig, da bisher davon ausgegangen wurde, dass sich der Spacer ausschließlich in der O-6-Position befindet.

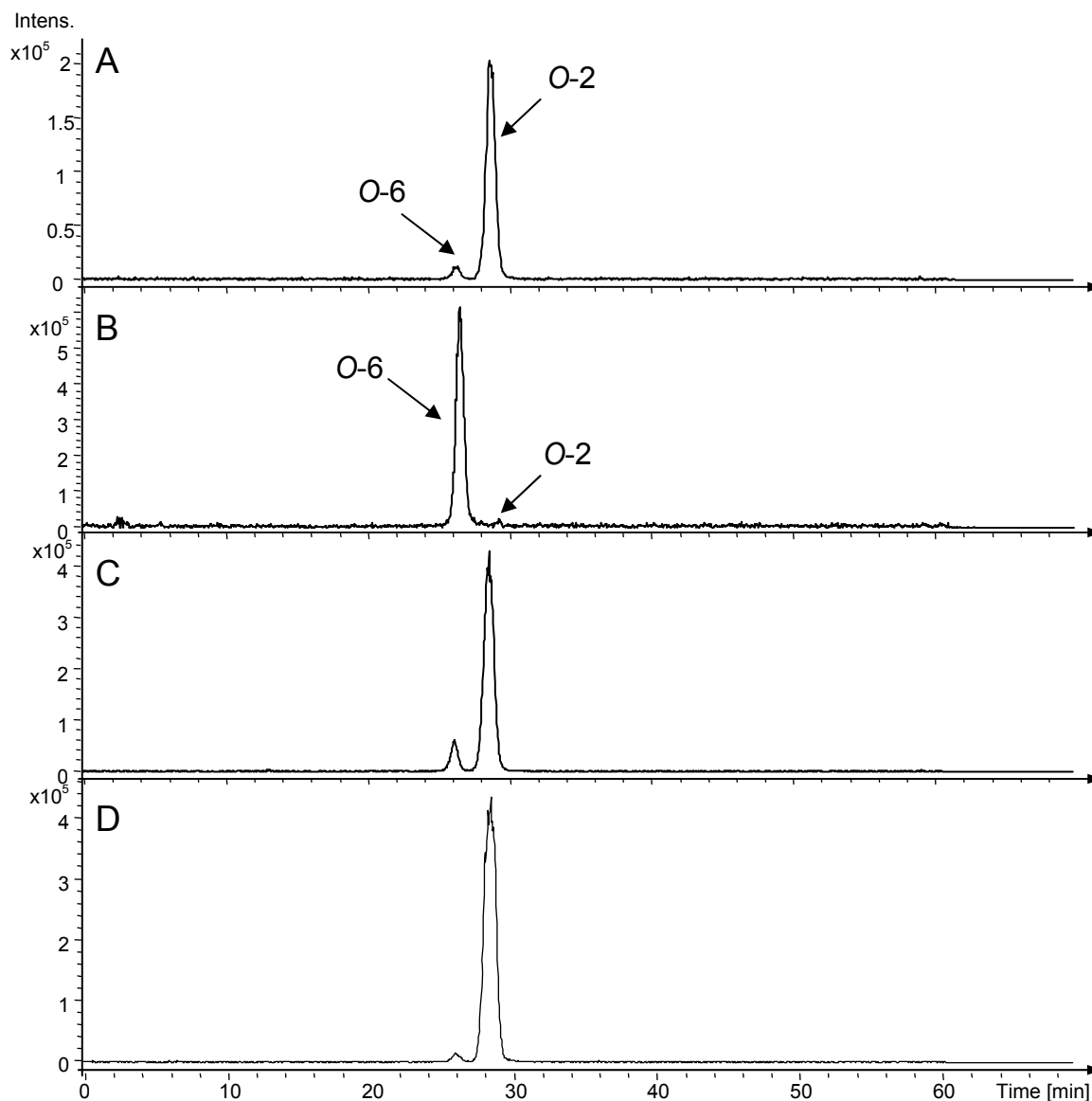


Abb. 3-5: LC/ESI-MS-Analyse regioisomerer Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD, Bedingungen: Säule: Nucleosil- C_6H_5 , 100-5, 4,6 mm x 250 mm, mobile Phase: ACN:H₂O (1:1), Fluss: 0,5 mL/min, SIC (selected ion current) bei $[M+Na^+]$ $m/z = 1547$,
 A: O-2-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD aus der selektiven Synthese
 B: O-6-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD aus der selektiven Synthese
 C: Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD aus der herkömmlichen Synthese, unaufgereinigt, Octenylierung in DMSO
 D: Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD aus der herkömmlichen Synthese, aufgereinigt, Octenylierung in DMSO

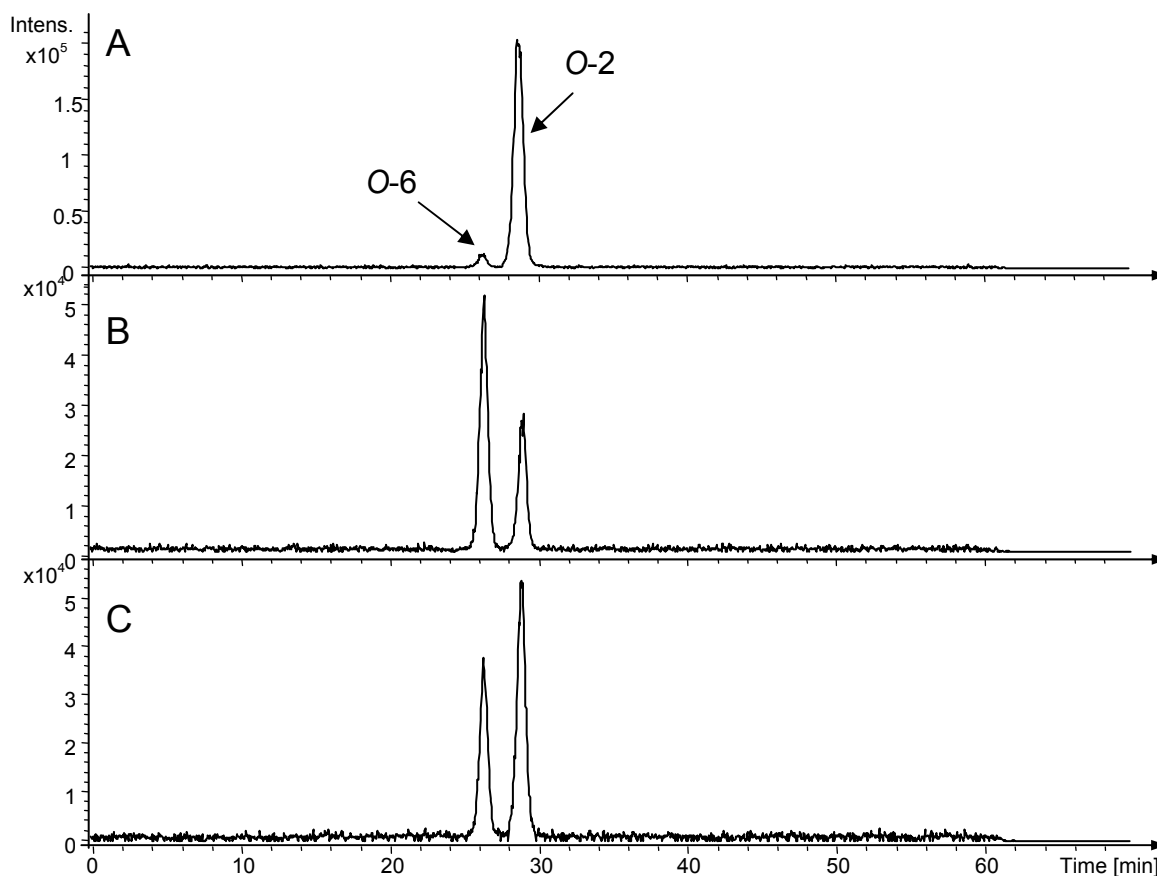


Abb. 3-6: Einfluss des Lösemittels und der Base,

LC/ESI-MS-Analyse regioisomerer Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD,

Bedingungen: Säule: Nucleosil-C₆H₅, 100-5, 4,6 mm x 250 mm, mobile Phase: ACN:H₂O (1:1),

Fluss: 0,5 mL/min, SIC (selected ion current) bei $[M+Na^+]$ $m/z = 1547$,

A: Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD, Octenylierung in DMSO, NaOH als Base

B: Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD, Octenylierung in DMF, NaOH als Base

C: Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD, „one pot“-Reaktion in DMF, Base NaH

Anmerkung:

Bei diesen Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass die Ionisierungswahrscheinlichkeiten der Regioisomere vergleichbar groß sind, da so anhand von Peakflächen aus den SIC eine mengenmäßige Abschätzung der entstandenen Reaktionsprodukte möglich wurde. Es konnten relative Aussagen der verschiedenen Ansätze gemacht werden, in denen das Verhältnis von O-2- und O-6-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD verglichen wurde.

3.4 Gaschromatographische Untersuchungen

Für die in der vorliegenden Arbeit unternommenen GC-Untersuchungen wurden die Selektoren an ein Poly(hydromethyl)-dimethylsiloxan mit einem Si-H-Gruppengehalt von 12,3% gebunden. Die resultierenden Polymere hatten einen Cyclodextringehalt von ca. 44% (w/w).

Ein unterschiedliches Trennverhalten der drei Säulentypen (belegt mit O-2-, O-3- bzw. O-6-Chirasil- β -Dex) würde auf unterschiedliche Wechselwirkungen von Analyt und Selektor hindeuten. Daher mussten die verschiedenen Kapillaren in folgenden Eigenschaften übereinstimmen, um miteinander verglichen werden zu können:

- Kapillarlänge und -durchmesser
- Filmdicke
- Selektorgehalt im Polymer (Molalität)
- Oberflächendesaktivierung
- Reinheitsgrad des Chirasil- β -Dex-Polymeren (Platinspuren des Katalysators!)
- Belegungseffizienz
- Immobilisierungsgrad

Eine Reihe von Trennkapillaren wurde möglichst identisch hergestellt und die mit den besten Trennleistungen zum Vergleich verwendet. Trotzdem waren klare Unterschiede der Kapillaren im Trennverhalten zu erkennen. Um eine bessere empirische Vergleichbarkeit der Chromatogramme zu erhalten, wurden den Testlösungen inerte Referenzstandards (n-Alkane) zugesetzt und der Trägergasfluss dementsprechend angepasst, dass sie in den Chromatogrammen die gleichen Gesamtretentionszeiten t_R aufwiesen. Dabei ergaben sich große Unterschiede in den angelegten Trägergasdrücken (vgl. Tab. 3-1 bis Tab. 3-5), wobei die O-2-Kapillare immer den höchsten Trägergasdruck benötigte, da diese den größten Retentionsfaktor sowohl für die Standards als auch alle Analyte aufwies. Dies ist eventuell auf eine versehentlich größere Belegung an Stationärphase zurückzuführen. Wichtig ist jedoch, dass alle Analyten sehr ähnliche relative Retention r_i zeigten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Selektoren in fast identischen Konzentrationen im Polysiloxan vorlagen.

Die relative Retention r_i des Analyten i ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$r_i = \frac{t'_i}{t'_{\text{Standard}}} \quad (1)$$

mit t'_i : reduzierte Retentionszeit des Analyten i , t'_{Standard} : reduzierte Retentionszeit des Standards.

Die übrigen Parameter wie die reduzierte Retentionszeit t' , der Retentionsfaktor k und der chirale Trennfaktor α erfolgten nach [78].

3.4.1 Schurig Test und Grob Test

Die Aktivität der Oberfläche von Kapillaren, d. h. der verbleibende Einfluss der Kapillarinnenwand nach der Desaktivierung, saure und basische Eigenschaften und die Gesamttrennleistung von flüssigen Stationärphasen kann mit der von Grob 1978 entwickelten Testmischung [79,80] geprüft werden. Darin sind 12 Verbindungen verschiedener Substanzklassen und Polaritäten enthalten.

Der Schurig-Test, der ursprünglich für das permethylierte β -CD in OV 1701 entwickelt wurde, enthält chirale Substanzen verschiedener Polaritäten (α -Pinen, *trans*- und *cis*-Pinan, *rac.*- und *meso*-2,3-Butandiol, γ -Valerolacton, 1-Phenylethylamin, 1-Phenylethanol und 2-Ethylhexansäure) [81]. Auch hier wird das Säure- bzw. Base-Verhalten des Untergrundes getestet. Es sind auch einige kritische polare Enantiomere, wie beispielsweise das γ -Valerolacton oder die 2-Ethylhexansäure, enthalten. Auch hier zeigen Veränderungen in den Peakformen wie Tailing und verminderte Bodenzahlen aktive Charakteristika einer Trennkapillare. So kann eine Beurteilung der Inertheit einer Trennkapillare mit CD-Selektoren vorgenommen werden.

Daher wurden die hergestellten Trennkapillaren zunächst mit dem Grob- und Schurig-Test untersucht, um Kapillaren mit ähnlich guten Eigenschaften bezüglich der Desaktivierung des Untergrundes für den Vergleich auszuwählen, da die Säulen trotz gleicher Desaktivierung teilweise andere Adsorptionseigenschaften aufwiesen. Abb. 3-7 und Tab. 3-1 zeigen die Chromatogramme bzw. die mit dem Schurig-Test erhaltenen Daten.

Für das 2,3-Butandiol und das 1-Phenylethylamin wurden wahrscheinlich aufgrund der mangelnden Desaktivierung keine Peaks erhalten. Dies ist akzeptabel, da an einer gekauften Chirasil- β -Dex-Vergleichskapillare (Chrompack) nicht nur für diese Substanzen keine Signale erhalten wurden, sondern auch die 2-Ethylhexansäure keinen Peak zeigte. Diese äußerst kritische polare Substanz wies hingegen gute Peakformen bei Verwendung der selbsthergestellten Kapillaren auf. Prinzipiell waren die Elutionsmuster für alle drei Chirasil- β -Dex-Kapillaren sehr ähnlich. Da ein Temperaturprogramm benutzt wurde, konnten keine Trennfaktoren α für diese Trennungen berechnet werden. Auch die Auflösung R_S wurde durch verschiedene Effizienzen (vgl. 1-Phenylethanol in Abb. 3-7, O-6) beeinträchtigt. Das γ -Valerolacton wurde von der O-6-Kapillare nicht aufgelöst.

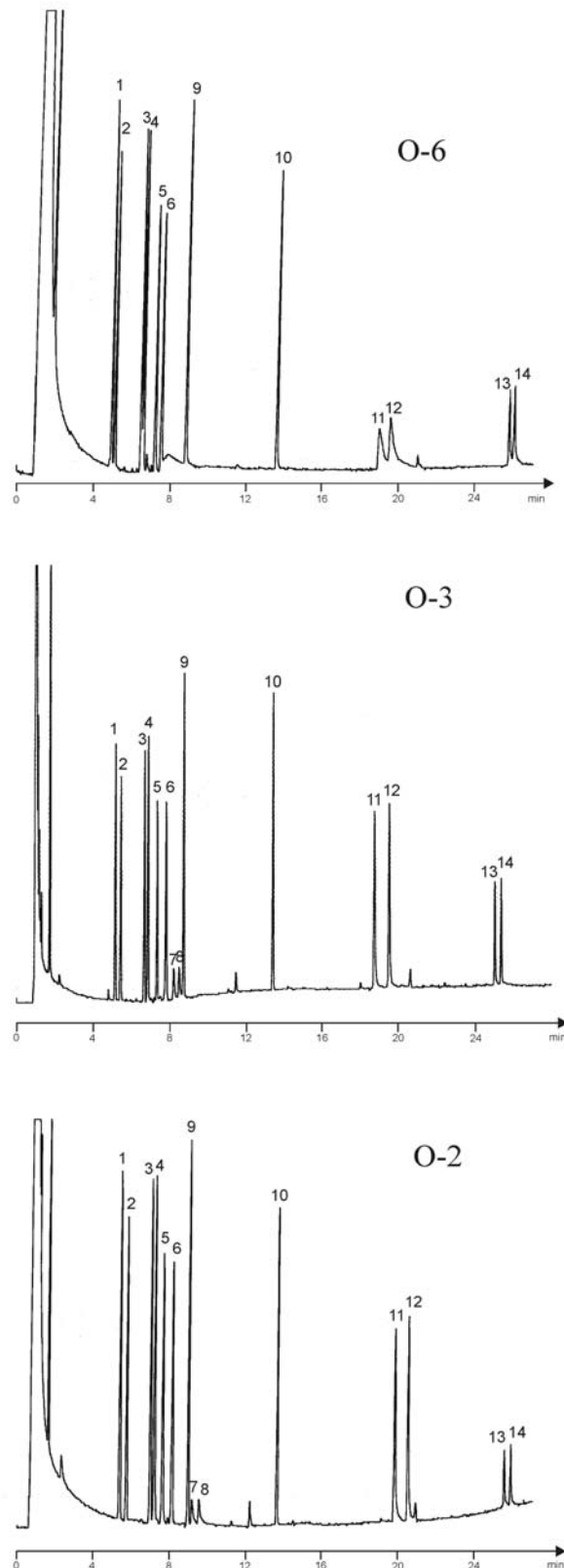


Abb. 3-7: Schurig-Test, Daten der GC-Enantiomerentrennungen von α -Pinen (1,2), *trans*-Pinen (3,4), *cis*-Pinen (5,6), γ -Valerolacton (7,8), 1-Phenylethanol (11,12) und 2-Ethylhexansäure (13,14), Referenzstandards *n*-Undecan (9) und *n*-Dodecan (10) bei einem Temperaturprogramm von 70 °C/5 min//3 °C/min//160 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex (oben), O-3-Chirasil- β -Dex (mitte) und O-2-Chirasil- β -Dex (unten) [74], weitere GC-Parameter s. Tab. 3-1

	O-6	O-3	O-2
Druck	0,7 bar H ₂	0,61 bar H ₂	1,0 bar H ₂
t _M	54 s	55 s	46 s
k _{C11}	8,82	8,57	10,62
k _{C12}	14,20	13,62	16,71
k _{α-Pinen1}	4,50	4,66	5,95
k _{α-Pinen2}	4,70	4,99	6,42
k _{trans-Pinan1}	6,23	6,35	8,03
k _{trans-Pinan2}	6,37	6,55	8,29
k _{cis-Pinan1}	7,04	7,08	8,86
k _{cis-Pinan2}	7,40	7,58	9,49
k _{γ-Pentalacton1}	-	8,01	10,86
k _{γ-Pentalacton2}	-	8,32	11,35
k _{1-Phenylethanol1}	20,12	19,43	24,66
k _{1-Phenylethanol2}	20,77	20,27	25,58
k _{2-Ethylhexansäure1}	27,72	26,29	32,21
k _{2-Ethylhexansäure2}	28,02	26,65	32,65

Tab. 3-1: Schurig-Test, Daten der GC-Enantiomerentrennungen von α -Pinen, *trans*-Pinan, *cis*-Pinan, γ -Valerolacton, 1-Phenylethanol und 2-Ethylhexansäure, Referenzstandards *n*-Undecan und *n*-Dodecan bei einem Temperaturprogramm von 70 °C/5 min//3 °C/min//160 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex, O-3-Chirasil- β -Dex oder O-2-Chirasil- β -Dex [74]

3.4.2 Enantiomerentrennungen von Menthol, Menthylacetat, Menthylpropionat und Menthylbutyrat

Die Racemate Menthol, Menthylacetat, Menthylpropionat und Menthylbutyrat konnten mit sehr hohen chiralen Trennfaktoren α getrennt werden (s. Abb. 3-8 und Tab. 3-2). Daher sollte ein eventuell vorhandener, wenn auch nur kleiner Einfluss der Spacer-Position hier stärker zum Tragen kommen, als bei Trennungen mit kleineren Trennfaktoren.

Für die O-6-Kapillare ist die Enantioselektivität (α) gegenüber der O-2 und O-3-Kapillare geringer, wobei aus den durchschnittlich gleichen relativen Retentionen r_i ein gleicher Wechselwirkungsmechanismus der Analyte mit den verschiedenen Selektoren abgeschätzt werden kann.

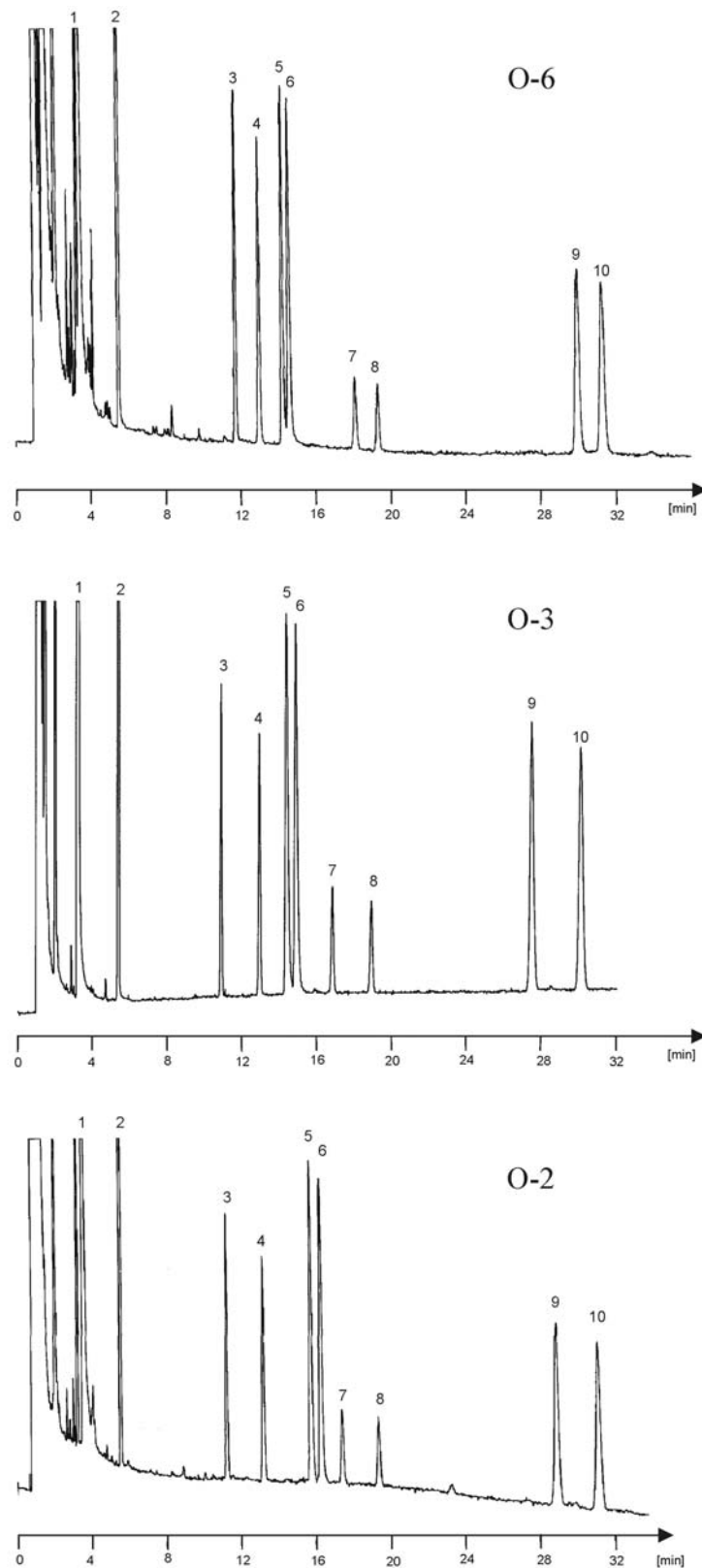


Abb. 3-8: GC-Enantiomertrennungen von Menthylacetat (3,4), Menthol (5,6), Menthylpropionat (7,8) und Menthylbutyrat (9,10), Referenzstandards *n*-Undecan (1) und *n*-Dodecan (2) bei 100 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex (oben), O-3-Chirasil- β -Dex (mitte) und O-2-Chirasil- β -Dex (unten) [74], weitere GC-Parameter s. Tab. 3-2

	O-6	O-3	O-2
Druck	0,64 bar H ₂	0,60 bar H ₂	0,84 bar H ₂
t _M	61 s	61 s	50 s
k _{C11}	2,21	2,17	2,87
k _{C12}	4,39	4,27	5,67
k _{Menthylacetat1}	10,49	9,66	12,48
k _{Menthylacetat2}	11,74	11,68	14,86
k _{Menthol1}	12,95	13,05	17,90
k _{Menthol2}	13,29	13,53	18,57
k _{Menthylpropionat1}	16,74	15,45	19,94
k _{Menthylpropionat2}	17,92	17,49	22,27
k _{Menthylbutyrat1}	28,36	25,93	33,76
k _{Menthylbutyrat2}	29,67	28,48	36,46
$\Gamma_{\text{Menthylacetat1/C11}}$	4,75	4,45	4,35
$\Gamma_{\text{Menthylacetat2/C11}}$	5,31	5,38	5,18
$\Gamma_{\text{Menthylacetat1/C12}}$	2,39	2,26	2,20
$\Gamma_{\text{Menthylacetat2/C12}}$	2,67	2,74	2,62
$\Gamma_{\text{Menthol1/C11}}$	5,86	6,01	6,24
$\Gamma_{\text{Menthol2/C11}}$	6,01	6,24	6,47
$\Gamma_{\text{Menthol1/C12}}$	2,95	3,06	3,16
$\Gamma_{\text{Menthol2/C12}}$	3,03	3,17	3,28
$\Gamma_{\text{Menthylpropionat1/C11}}$	7,57	7,12	6,95
$\Gamma_{\text{Menthylpropionat2/C11}}$	8,11	8,06	7,76
$\Gamma_{\text{Menthylpropionat1/C12}}$	3,81	3,61	3,52
$\Gamma_{\text{Menthylpropionat2/C12}}$	4,08	4,10	3,93
$\Gamma_{\text{Menthylbutyrat1/C11}}$	12,83	11,95	13,76
$\Gamma_{\text{Menthylbutyrat2/C11}}$	13,43	13,12	12,70
$\Gamma_{\text{Menthylbutyrat1/C12}}$	6,45	6,07	5,95
$\Gamma_{\text{Menthylbutyrat2/C12}}$	6,76	6,66	6,43
$\alpha_{\text{Menthylacetat}}$	1,12	1,21	1,19
α_{Menthol}	1,02	1,04	1,04
$\alpha_{\text{Menthylpropionat}}$	1,07	1,13	1,12
$\alpha_{\text{Menthylbutyrat}}$	1,05	1,10	1,08

Tab. 3-2: Daten der GC-Enantiomerentrennungen von Menthylacetat, Menthol, Menthylpropionat und Menthylbutyrat, Referenzstandards *n*-Undecan und *n*-Dodecan bei 100 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex, O-3-Chirasil- β -Dex oder O-2-Chirasil- β -Dex [74]

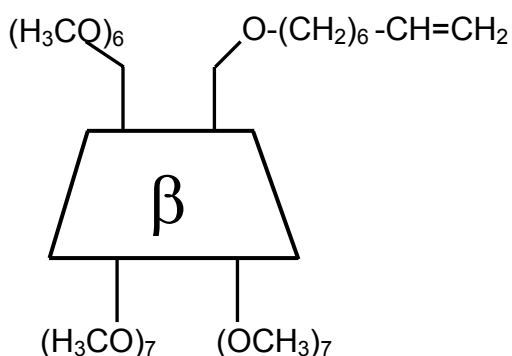


Abb. 3-9: Schematischer Aufbau des O-6-Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -cyclodextrins

Daraus folgt eine sehr wichtige Schlussfolgerung: Die Enantioselektivität scheint verringert zu sein, wenn der Octamethylen-Spacer an die schmalere Seite des Cyclo-dextrinkörpers (O-6-Position) gebunden ist (s. Abb. 3-9). Zwischen der O-2- und O-3-Position kann kein entscheidender Unterschied festgestellt werden.

Im Folgenden werden Trennungen mit kleineren, in der GC bei den meisten Applikationen erzielten Trennfaktoren besprochen.

3.4.3 Weitere Enantiomerentrennung mit O-2-, O-3- bzw. O-6-Chirasil- β -Dex

Die Enantiomerentrennung von 1-(Pentafluorphenyl)ethanol wies für O-3-Chirasil- β -Dex den größten Trennfaktor ($\alpha = 1,24$) auf (s. Abb. 3-10 und Tab. 3-3), wobei auf der O-2- und O-6-Chirasil- β -Dex-Kapillare ein α von 1,14 bzw. 1,13 erhalten wurde. Bei den Enantiomerentrennungen von *N*-Trifluoracetylprolinethylester waren die Trennfaktoren α mit 1,04, 1,05 bzw. 1,03 für die O-2-, O-3- bzw. O-6-Stationärphase sehr ähnlich (s. Abb. 3-11 und Tab. 3-4).

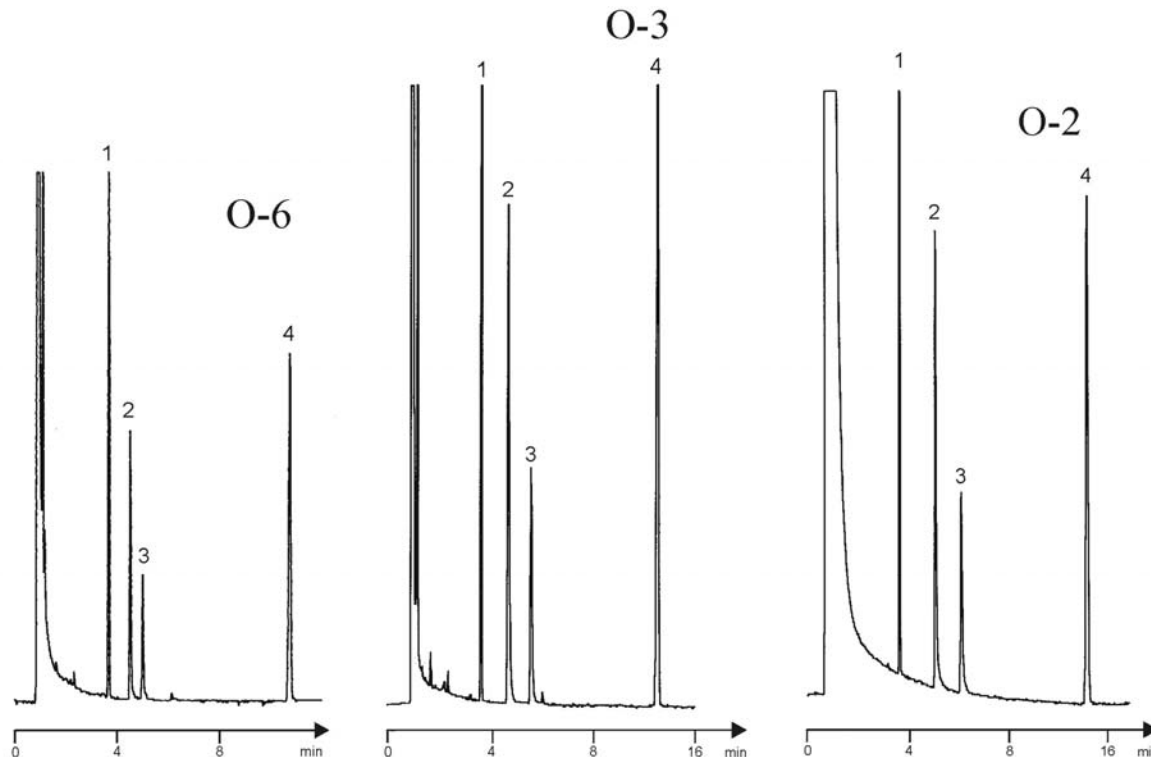


Abb. 3-10: GC-Enantiomerentrennungen von 1-(Pentafluorphenyl)ethanol (2,3) (Mischung aus den beiden Enantiomeren), Referenzstandards *n*-Dodecan (1) und *n*-Tetradecan (4) bei 110 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex (links), O-3-Chirasil- β -Dex (mitte) und O-2-Chirasil- β -Dex (rechts) [74], weitere GC-Parameter s. Tab. 3-3

	O-6	O-3	O-2
Druck	0,84 bar H ₂	0,66 bar H ₂	1,0 bar H ₂
t _M	48 s	60 s	48 s
k ₁	4,59	3,72	5,39
k ₂	5,20	4,63	6,70
k _{C12}	3,51	2,65	3,56
k _{C14}	12,39	9,60	13,06
$\Gamma_{\text{peak1/C12}}$	1,31	1,40	1,51
$\Gamma_{\text{peak2/C12}}$	1,48	1,75	1,88
$\Gamma_{\text{peak1/C14}}$	0,37	0,39	0,41
$\Gamma_{\text{peak2/C14}}$	0,42	0,48	0,51
α	1,13	1,24	1,14

Tab. 3-3: Daten der GC-Enantiomerentrennungen von 1-(Pentafluorphenyl)ethanol, der Referenzstandards *n*-Dodecan und *n*-Tetradecan bei 110 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex, O-3-Chirasil- β -Dex oder O-2-Chirasil- β -Dex [74]

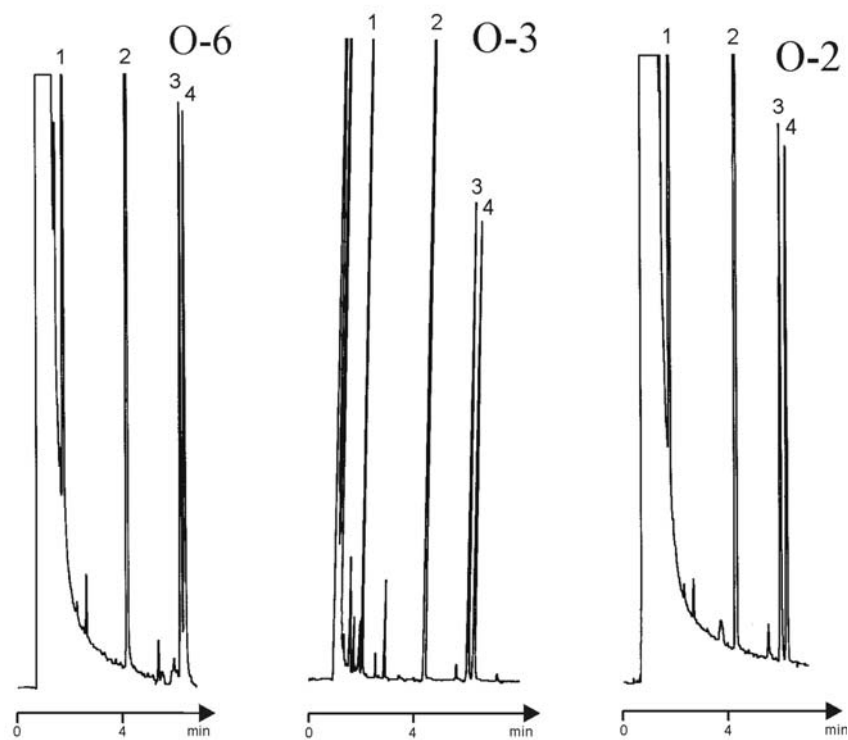


Abb. 3-11: GC-Enantiomerentrennungen von *N*-Trifluoracetylprolinethylester (3,4), Referenzstandards *n*-Undecan (1) und *n*-Tridecan (2) bei 120 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex (links), O-3-Chirasil- β -Dex (mitte) und O-2-Chirasil- β -Dex (rechts) [74], weitere GC-Parameter s. Tab. 3-4

	O-6	O-3	O-2
Druck	0,84 bar H ₂	0,66 bar H ₂	1,0 bar H ₂
t _M	50 s	54 s	42 s
k ₁	6,75	5,63	7,64
k ₂	6,92	5,90	7,99
k _{C11}	1,18	1,18	1,55
k _{C13}	4,19	3,83	5,19
$\Gamma_{\text{peak1/C11}}$	5,72	4,77	4,93
$\Gamma_{\text{peak2/C11}}$	5,86	5,00	5,15
$\Gamma_{\text{peak1/C13}}$	1,61	1,40	1,47
$\Gamma_{\text{peak2/C13}}$	1,65	1,54	1,54
α	1,03	1,05	1,04

Tab. 3-4: Daten der GC-Enantiomerentrennungen von *N*-Trifluoracetylprolinethylester, Referenzstandards *n*-Undecan und *n*-Tridecan bei 120 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex, O-3-Chirasil- β -Dex oder O-2-Chirasil- β -Dex [74]

Bei den Enantiomerentrennungen der diastereomeren 3-Menthanole (Neomenthol, Menthol und Isomenthol, Abb. 3-12 und Tab. 3-5) waren die Trennfaktoren für das O-6-Chirasil- β -Dex geringfügig schlechter. Das O-2- und das O-6-Chirasil- β -Dex zeigten wieder nahezu übereinstimmende Werte.

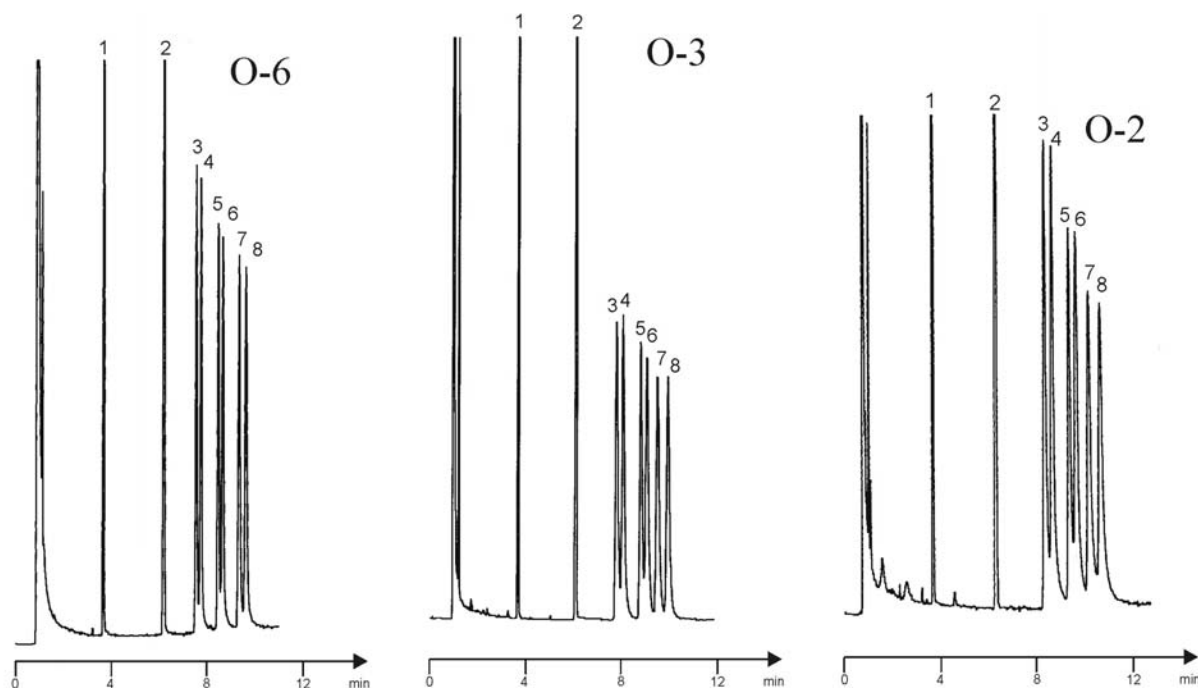


Abb. 3-12: GC-Enantiomerentrennungen von Neomenthol (3,4), Menthol (5,6) und Isomenthol (7,8) Referenzstandards *n*-Dodecan (1) und *n*-Tridecan (2) bei 110 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex (links), O-3-Chirasil- β -Dex (mitte) und O-2-Chirasil- β -Dex (rechts) [74], weitere GC-Parameter s. Tab. 3-5

	O-6	O-3	O-2
Druck	0,84 bar H ₂	0,66 bar H ₂	1,0 bar H ₂
t _M	48 s	52 s	48 s
k _{C12}	3,59	3,22	3,56
k _{C13}	6,74	5,99	6,86
k _{Neomenthol1}	8,41	7,95	9,40
k _{Neomenthol2}	8,65	8,25	9,80
k _{Menthol1}	9,55	9,22	10,66
k _{Menthol2}	9,79	9,39	11,04
k _{Isomenthol1}	10,64	9,89	11,71
k _{Isomenthol2}	10,99	10,39	12,30
r _{Neomenthol1/C12}	2,34	2,47	2,64
r _{Neomenthol2/C12}	2,41	2,56	2,75
r _{Neomenthol1/C13}	1,25	1,33	1,37
r _{Neomenthol2/C13}	1,28	1,38	1,43
r _{Menthol1/C12}	2,66	2,86	2,99
r _{Menthol2/ C12}	2,73	2,92	3,10
r _{Menthol1/C13}	1,42	1,54	1,55
r _{Menthol2/C13}	1,45	1,57	1,61
r _{Isomenthol1/C12}	2,96	3,07	3,29
r _{Isomenthol2/C12}	3,06	3,23	3,46
r _{Isomenthol1/C13}	1,58	1,65	1,71
r _{Isomenthol2/C13}	1,63	1,73	1,79
α _{Neomenthol}	1,03	1,04	1,04
α _{Menthol}	1,02	1,02	1,04
α _{Isomenthol}	1,03	1,05	1,05

Tab. 3-5: Daten der GC-Enantiomerentrennungen von Neomenthol, Menthol und Isomenthol, Referenzstandards *n*-Dodecan und *n*-Tridecan bei 110 °C, Kapillare: 25 m x 0,25 mm (i. d.), Film: 0,25 μ m O-6-Chirasil- β -Dex, O-3-Chirasil- β -Dex oder O-2-Chirasil- β -Dex [74]

3.4.4 Ergebnisse der GC-Messungen

Durch Auswählen von Trennkapillaren mit ähnlicher Untergrunddesaktivierung aufgrund des Grob- und Schurig-Tests konnten die Voraussetzungen für einen sinnvollen Vergleich geschaffen werden. So zeigten die verschiedenen Trennkapillaren ein ähnliches Elutionsprofil, wobei es trotzdem eindeutige Unterschiede in der Trennleistung gab. Die relativen Retentionen r_i jedoch ergaben sehr ähnliche Werte, daher war die Voraussetzung für die gleiche Molalität der Phasen gegeben. Die Retentionszuwächse der Substanzen durch die Stationärphase haben für alle Trennkapillaren unter Berücksichtigung des Fehlerbereichs die gleiche Größenordnung. Bei hohen Trennfaktoren konnte eine verringerte Enantioselektivität für die O-6-Chirasil- β -Dex-Phase festgestellt werden. Zwischen der O-2- und O-3-Chirasil- β -Dex-Phasen gab es nur unwesentliche Unterschiede.

Fazit:

Prinzipiell waren keine ausgeprägten Unterschiede in ihrer chiralen Trennleistung für alle Chirasil- β -Dex-Polymere zu erkennen, jedoch zeigte das O-2- und O-3-Chirasil- β -Dex in den meisten untersuchten Applikationen höhere Trennfaktoren als das O-6-Chirasil- β -Dex. Da durch die LC/MS-Analyse der regioisomeren Selektoren geklärt werden konnte, dass das aufgereinigte Produkt der herkömmlichen Synthese den Octamethylen-Spacer fast ausschließlich in O-2-Position trägt, ist es nicht nötig, eine aufwendige Schutzgruppenchemie zur Synthese der regioisomerenreinen Selektoren durchzuführen. Durch die herkömmliche Synthese kann die wohl bestmögliche Chirasil- β -Dex-Phase erzielt werden.

In früheren Publikationen wurde (u. a. ausdrücklich in [68,82]) das Chirasil- β -Dex nach der herkömmlichen Synthese (Octenylierung in DMSO) als O-6-Regioisomer oder auch als Mischung aus O-6- und eventuell O-2-Regioisomer [18] formuliert. Unter den dort beschriebenen Reaktionsbedingungen wurde jedoch praktisch das enantiomerenreine O-2-Produkt, das nach säulenchromatographischer Aufreinigung mindestens ebenso regioisomerenrein wie das aus der selektiven O-2-Synthese ist, erhalten.

4 Allgemeines zur CE und CEC

4.1 Kapillarelektrophorese (CE)

Die leistungsstärksten Trenntechniken beruhen auf dem Prinzip der Elektrophorese. Beispielsweise wird im Arbeitsgebiet der Proteomics meist die zweidimensionale Gelelektrophorese, eine Kombination aus isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewandt, da damit bis zu 10.000 verschiedene Proteine aufgelöst werden können.

In einem elektrophoretischem System bewegen sich geladene Teilchen in einem elektrisch leitenden flüssigen Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes je nach Ladung und Größe. Die Beschreibung des Prinzips der Elektrophorese geht auf Kohlrausch zurück, der bereits 1897 die Grundgleichungen für die Ionenwanderungen in einem elektrischen Feld aufstellte [83]. Um die Konvektion, die durch die Joule'sche Wärme hervorgerufen wird, zu verringern, wurde Papier und später Polyamid- und Agarosegele von Tiselius eingesetzt [84,85] mit denen man verschiedenen Trenntechniken wie Zonenelektrophorese oder die isoelektrische Fokussierung entwickeln konnte [86]. Jedoch sind diese Techniken durch die Herstellung der Gele, Probenaufgabe, Anfärbung und lange Analysezeiten sehr zeitaufwendig.

1967 beschrieb Hjertén die Zonenelektrophorese in Lösung [87]. Er benutzte 1-3 mm dicke, mit Methylcellulose belegte Quarzkapillaren, wobei durch Rotation um die Längsachse eine weitere Verminderung der Konvektion erzielt wurde.

Virtanen verwendete 1974 dünnere Glaskapillaren von 200-500 μm i. d. [88]. Der Vorteil der kleinen Kapillardurchmesser ist die schnelle Abfuhr der Joule'schen Wärme durch das hohe Oberflächen/Volumen-Verhältnis und damit eine geringere Konvektion. Dadurch können höhere Spannungen angelegt und so die Analysezeiten verkürzt werden. Auch Mikkers *et al.* [89] stellten dies bei der Verwendung von 0,2 mm breiten Teflonschläuchen fest. Trotz hoher Bodenzahlen war die Methode aufgrund der Leitfähigkeitsdetektion relativ unempfindlich. Ein weiteres Problem der Kapillarzonenelektrophorese mit Fused-Silica-Kapillaren bestand zu diesem Zeitpunkt in der Elektroosmose.

1981 konnten Jørgenson und Lukacs diese Probleme beseitigen, indem sie die Elektroosmose nicht weiter unterdrückten, sondern das stempelförmige Profil des

elektroosmotischen Flusses (EOF), der sich in dünnen Fused-Silica-Kapillaren bildet, ausnutzen. Die Analyten wurden mit geringerer Dispersion durch die Kapillare transportiert, daher erhielten sie sehr schmale Peaks und höhere Bodenzahlen als in der HPLC. Zudem benutzten Jørgenson und Lukacs einen Online-Fluoreszenzdetektor und konnten damit die Empfindlichkeit erhöhen [90,91].

In den darauffolgenden Jahren entwickelte sich die CE zu einer wichtigen Methode, die die Vorteile der HPLC mit denen der Elektrophorese verknüpft: hohe Effizienz (Bodenzahlen von bis zu 1 Million pro Meter), hohe Analysengeschwindigkeit, kleine Probenvolumen und breites Anwendungsspektrum, da sowohl kleine Moleküle (z. B. Aminosäuren) als auch hochpolymere Stoffe (z. B. synthetische Polymere, Proteine) getrennt werden können.

4.1.1 Chirale CE

Erstmals gelang es Gassmann *et al.* 1985 Enantiomere mittels CE zu trennen [92]. Sie trennten D- und L-Dansylaminosäuren mit einem Kupfer(II)-Komplex aus L-Histidin als chiralem Additiv.

Es gibt verschiedene CE Modi, in denen Enantiomere getrennt werden können [93]:

- Kapillarzonenelektrophorese (CZE)
- Kapillargelelektrophorese (CGE)
- Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) nach Terabe [94]
- Isotachophorese (ITP)
- Isoelektrische Fokussierung [95,96]
- Kapillarelektrochromatographie (CEC)

In der CE wird der chirale Selektor dem Puffer hinzugefügt (detailliert in Kap. 6.4.1.1), während er in der HPLC und CEC als stationäre Phase immobilisiert ist (s. Kap. 5). Viele der in der Kapillarelektrophorese verwendeten Mechanismen der chiralen Trennung konnten aus der HPLC übernommen werden.

Der größte Nachteil der CE ist die rein analytische Anwendbarkeit, da ein präparatives System bislang nicht umsetzbar ist. Auch die niedrige Empfindlichkeit der UV-Detektion sei hier als Nachteil erwähnt, wobei die Kopplung mit anderen Detektoren (z. B. Fluoreszenz oder ESI-MS [97]) Abhilfe schafft.

4.2 Kapillarelektrochromatographie (CEC)

Die Entwicklung der Chromatographie in den letzten 100 Jahren⁵ wird auch in der Weiterentwicklung der Triebkraft, mit der die mobile Phase bewegt wird, deutlich.

Während in der klassischen Säulenchromatographie die Schwerkraft das Lösemittel durch die Trennsäule befördert, nutzt die Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie die Kapillarwirkung des Trägermaterials. In der HPLC werden hydraulische Pumpen eingesetzt und in die CEC bewegt der EOF die mobile Phase durch die Trennkapillare [100].

Bereits 1939 berichtete Strain, dass er die Elektrophorese und Chromatographie kombinierte, indem er an die beiden Enden eine Tswett'sche Adsorptionssäule ein elektrisches Potential anlegte und so eine Verbesserung beider Methoden beobachtete [101]. Als erstes wurde die CEC 1974 von Pretorius *et al.* [102] beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass die mobile Phase aus Wasser/Methanol durch eine mit *n*-Oktan belegtem Partisil gepackte, 1 mm dicke Glasröhre mittels des EOF getrieben werden kann. Hierbei ergaben sich geringere Bodenhöhen als in dem hydrodynamisch betriebenen System und entlang der Säule fand kein Druckabfall statt. Als problematisch erwies sich jedoch das Injektions- und Detektionssystem. 1981 konnten Jørgenson und Lukacs [90] eine elektrokinetisch angetriebene Trennung von 9-Methylantracen und Perylen an einer mit C₁₈-Partikeln gepackten Säule zeigen. Diese wies eine hohe Effizienz im Vergleich zu einer herkömmlichen hydrodynamisch betriebenen mobilen Phase auf, trotzdem schien die Verbesserung die auftauchenden Probleme durch die Verwendung des EOF nicht zu rechtfertigen. Trotz der Schwierigkeiten den EOF zu kontrollieren und anzuwenden, waren seine Vorteile (s. Kap. 4.3.3) zu verlockend und dementsprechend wurde die CEC weiterentwickelt.

Als erstes konnten Guttman *et al.* 1998 in der Kapillargelelektrophorese Enantiomere trennen, indem sie Cyclodextrine in Gele inkorporierten [103]. Bei der Verwendung von Silica-Materialien kann der chirale Selektor durch direkte kovalente Anbindung,

⁵ 1903 präsentierte Tswett auf einem Treffen der Biologischen Sektion der Warschauer Gesellschaft der Naturwissenschaftler seine erste Arbeit über Chromatographie, dabei trennte er Blattpigmente an festen Adsorbentien (Calciumcarbonat) mit einem Petrolethereluenten [98,99]. Dieser Vortrag wurde in den Proceedings der Gesellschaft im selben Jahr publiziert. Deshalb bezeichnet man dieses Jahr als das Geburtsjahr der Chromatographie.

durch Belegung mit Polymer oder durch Adsorption als Stationärphase eingebracht werden.

Die CEC kann in drei verschiedenen Modi betrieben werden:

(1) p-CEC

Der EOF sollte in Kieselgelteilchen unabhängig vom Teilchendurchmesser sein und in die gleiche Richtung gehen wie bei einer leeren Kapillare. Daher kann die Selektivität der HPLC mit der Trennschärfe der CE in der CEC gekoppelt werden [104]. Knox und Grant untersuchten die Faktoren, die den EOF bei gepackten Säulen beeinflussen [105,106]. 1994 trennten Smith und Evans Arzneimittelgemische an C₁₈-Phasen und zeigten damit den Nutzen der CEC für die pharmazeutische Industrie [107]. Einen wichtigen Beitrag zur chiralen CEC leisteten Wolf *et al.* [108] mit der Whelk-O-Phase und einer aus Naproxen abgeleiteten Phase.

Die p-CEC stellt die am häufigsten eingesetzte elektrochromatographische Methode dar. Üblicherweise werden Kapillaren mit einem Durchmesser von 100 µm und einer Länge von 20-50 cm verwendet. Das Packungsmaterial ist meist Kieselgel (HPLC-Packungsmaterial), an dem der chirale Selektor immobilisiert ist. Es wird von Fritten in der Kapillare gehalten. Typische chirale Selektoren sind Cyclodextrin- oder Cellulosederivate, Proteine, Glycoproteine, macrocyclische Antibiotika, von Chinin abgeleitete Selektoren, Pirkle-Selektoren, Polyacrylamide und MIP (molecularly imprinted polymers) [82].

(2) rod-CEC

Die rod-CEC bedient sich monolithischer Trägermaterialien. Monolithe (von griech.: *mono* = eins, *lithos* = Stein) sind nach Gusev *et al.* [109]: einheitliche, durchgängige, poröse Phasen, die *in situ* durch Polymerisation oder Abscheidung in der Kapillare hergestellt werden. Die Oberfläche kann dann nach Bedarf nachträglich funktionalisiert werden, falls der Selektor nicht schon in der Reaktionslösung enthalten war. Monolithe vereinigen die erwünschten Eigenschaften wie Robustheit, Stabilität und hohe Ladungskapazität.

Die monolithischen Phasen können in zwei Gruppen geteilt werden:

1. **Organische**, auf Polymeren basierende **Monolithe**, die durch Polymerisation organischer Monomere in Gegenwart eines Porogens gebildet werden [110,111].
2. **Anorganische Monolithe**, die mittels Sol-Gel-Prozess generiert werden. Entweder wird der Monolith *in situ* in der Kapillare [112,113,53] bzw. an der Kapillarwand gebildet [114,52] oder durch Sintern einer gepackten Säule [115,54]. Eine weitere Möglichkeit ist das Einbetten („embedded“) oder Verkleben („clued“) der Kieselgelpartikel in eine monolithische Matrix, die durch einen Sol-Gel-Prozess ebenfalls *in situ* in der Kapillare gebildet wird [116,117].

(3) o-CEC

In der „open tubular“ CEC wird der chirale Selektor direkt an die Kapillarwand absorbiert bzw. mittels kovalenter Bindungen immobilisiert. 1982 wendeten Tsuda *et al.* eine mit C₁₈ belegte Kapillare (30 µm i. d.) an [118]. Die ersten Enantiomerentrennungen einiger entzündungshemmender Arzneimittel mittels o-CEC konnten von Mayer und Schurig 1992 gezeigt werden [47]. In der o-CEC hat eine Erhöhung der Belegungsdicke einen negativen Einfluss auf die Effizienz [49].

Der Vorteil gegenüber den gepackten Säulen liegt in der einfacheren Herstellung. Zudem bleibt eine Blasenbildung aus, und die Kapillare kann ganz einfach bei Bedarf gekürzt werden.

Üblicherweise werden Kapillaren mit 25-50 µm i. d. verwendet, wobei sowohl die Retention als auch die Effizienz ansteigt, wenn der Innendurchmesser verkleinert wird. Jedoch treten in diesem Fall erhöhte Probleme in der Detektion und der Ladungskapazität, dem größten Nachteil der o-CEC, auf [119].

Die Enantiomerentrennung in der CEC ist in den letzten Jahren immer attraktiver geworden. Die hohe Effizienz, geringer Proben- und Lösemittelverbrauch und die Kopplung zum MS bieten Vorteile und den Zugang zu wichtigen Anwendungsgebieten wie z. B. der Analyse von chiralen Pharmazeutika. Neben der einfacheren Kopplung mit dem MS bietet die CEC gegenüber der CE den Vorteil, dass hohe Anteile an organischem Lösemittel zur Analyse lipophiler Substanzen eingesetzt

werden können. Zudem kann die Detektion in der chiralen CE problematisch sein, da die diastereomeren Komplexe aus CD und Enantiomer unterschiedliche Absorptionskoeffizienten haben kann.

Dennoch steckt die CEC noch immer in den Kinderschuhen, obwohl sie fast zeitgleich mit der CE entwickelt wurde. Dies beruht wahrscheinlich auf technischen Problemen bei der Säulenherstellung, die bei der CE entfallen. Vor allem monolithische Phasen scheinen der CEC in letzter Zeit wieder einen Aufschwung zu geben.

4.3 Theoretische Grundlagen der CE und CEC

4.3.1 Aufbau des Gerätes des Gerätes und Trennprinzip

In Abb. 4-1 ist der Aufbau einer CE-Apparatur gezeigt.

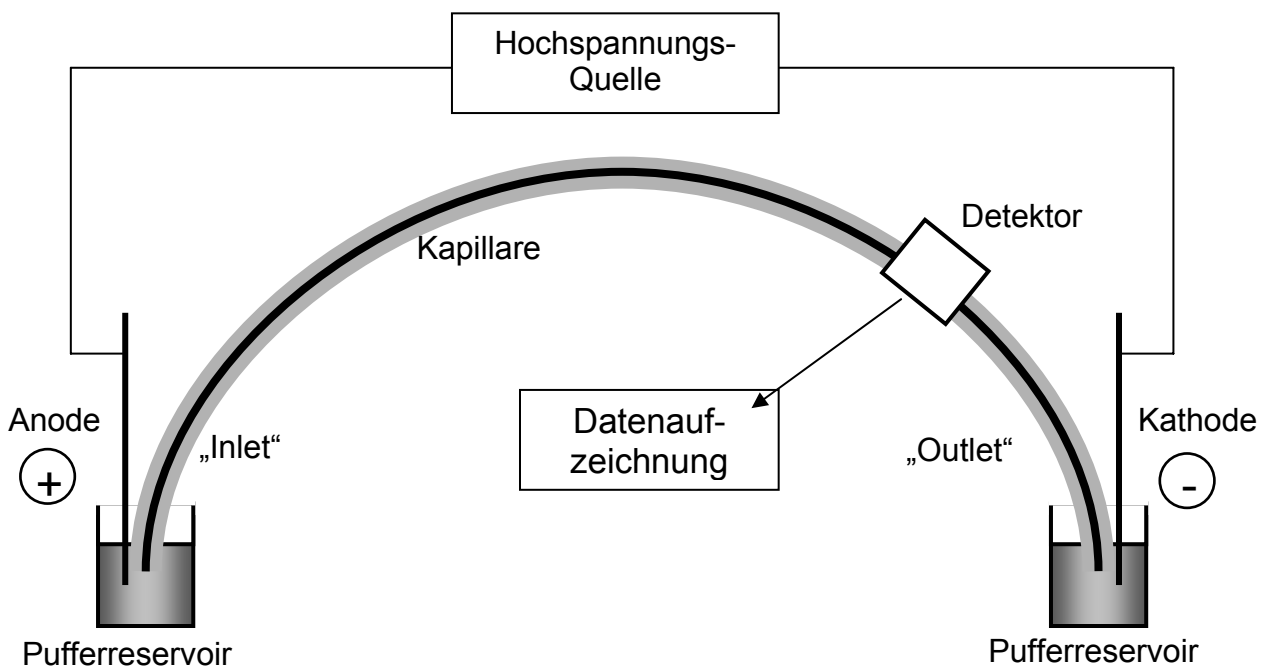


Abb. 4-1: Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophoresegerätes bei positiver (normaler) Polung

Die beiden Kapillarenden und die Elektroden tauchen in die Puffer, wobei an einem Ende der Kapillare entweder elektrokinetisch, hydrodynamisch oder hydrostatisch ein kleiner Probenpfropfen aufgegeben wird. Die restliche Kapillare ist mit dem Puffer

befüllt. Durch Anlegen der Gleichspannung wird die Probe aufgrund unterschiedlicher Migrationsgeschwindigkeiten im Idealfall in Einzelkomponenten (s. Kap. 4.3.2 und Kap. 4.3.3) getrennt.

In Tab. 4-1 sind typische CE-Parameter wiedergegeben.

Parameter	übliche Werte
Kapillarlänge	20-100 cm
Kapillardurchmesser	10-100 μm (oft 50 μm)
Probenvolumen	1-20 nL (bis zu 50 nL)
Länge des Probepfropfens*	0,5-10,3 mm (bis zu 25,4 mm)
angelegte Spannung	-30 kV bis +30 kV
Stromstärke	-200 μA bis +200 μA
Feldstärke	100-500 V/cm
Wärmeentwicklung	0,1-10 W

- * Zur Berechnung dieser Parameter diente das Programm CE-Expert (Version 1.0, H. Whatley © 1997, Beckman Instruments Inc.) (Kapillare: 40 cm eff. Länge x 50 μm i. d.).

Tab. 4-1: Übliche CE-Parameter

In der CEC, einem Hybrid aus einem chromatographischen und einem elektro-phoretischen System, kann die Trennung geladener Analyten einerseits auf dessen Verteilung in der mobilen und der stationären Phase zurückgeführt werden, andererseits kann auch eine unterschiedliche elektro-phoretische Wanderungsgeschwindigkeit (jedoch nicht im Fall von Enantiomeren oder neutralen Analyten) zur Trennung beitragen. Zudem stellt auch die Geschwindigkeit des EOF einen wichtigen Parameter dar (s. Kap. 4.3.3).

Die Detektion in der CEC und CE erfolgte in den folgenden Messungen immer mittels Online-UV-Detektion, wobei der Nachteil die kurze optische Weglänge (Durchmesser der Kapillare) und damit die Konzentrationsunempfindlichkeit ist. Eine empfindlichere Detektionsmethode stellt die Fluoreszenz-Detektion dar, hier werden jedoch fluoreszierende Verbindungen benötigt, so dass für die meisten Analyte eine Proben-derivatisierung durchgeführt oder eine indirekte Fluoreszenzdetektion angewandt werden muss. Die Kopplung mit einem massensensitiven Detektor stellt eine sehr elegante Methode dar, wobei eine Beimischung von Additiven (z. B. chirale Selektoren) oder Mizellbildnern (z. B. SDS) bei der MEKC wiederum die Detektion

erschweren kann. Weiterhin sei noch der Leitfähigkeitdetektor als mögliches Detektionssystem erwähnt.

4.3.2 Elektrophoretische Wanderung

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Ionen in einem elektrischen Feld erhöht sich bei zunehmender Spannung und damit zunehmender Feldstärke E . Die elektrophoretische Mobilität μ der Ionen verbindet die Wanderungsgeschwindigkeit und die Feldstärke E :

$$u = \mu \cdot E = \frac{L_{\text{eff}}}{t_m} \quad (2)$$

mit L_{eff} : effektive Länge, d. h. Kapillarlänge von Inlet bis Detektor und t_m : Migrationszeit.

Ein Ion, das in einem elektrischen Feld wandert, unterliegt der Beschleunigungskraft K_B , mit der es in Richtung seiner Gegenelektrode beschleunigt wird:

$$K_B = \frac{z \cdot F \cdot E}{N_A} \quad (3)$$

mit F : Faradaykonstante, N_A : Avogadrozahl, z : effektive Ladung des Ions.

Dieser Kraft wirkt die Reibungskraft K_R entgegen, die durch das Stoke'sche Gesetz angenähert wird:

$$K_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot u \quad (4)$$

mit η : dynamischen Viskosität und r : Stoke'schen Radius des Ions.

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit u ist somit gegeben durch

$$u = \frac{z \cdot F \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot N_A} \quad (5)$$

Die Trennung erfolgt aufgrund der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten der Probe im Trennpuffer. Die Mobilität μ , mit der die Ionen im elektrischen Feld beschleunigt werden, lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$\mu = \frac{L_{\text{eff}}}{t \cdot E} = \frac{L_{\text{eff}} \cdot L_{\text{ges}}}{t \cdot u} \quad (6)$$

mit L_{ges} : gesamte Kapillarlänge, t : Migrationszeit

Elektrophoretische Trennungen sind also nur möglich, wenn sich Ionen in der Mobilität unterscheiden.

4.3.3 Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Neben den probenspezifischen Parametern (Ladung und Größe) wird die Migration der Probe auch durch Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke des Trennpuffers, Feldstärke und Temperatur beeinflusst. Die elektrophoretische Trennung von Teilchen bedarf unterschiedlicher Mobilitäten, während der EOF eine kathodengerichtete Strömung des Puffers ist. Der EOF ist von der Art und Anzahl der Ladungen an der Kapillaroberfläche abhängig und ist somit nur in der Kapillarelektrophorese zu beobachten.

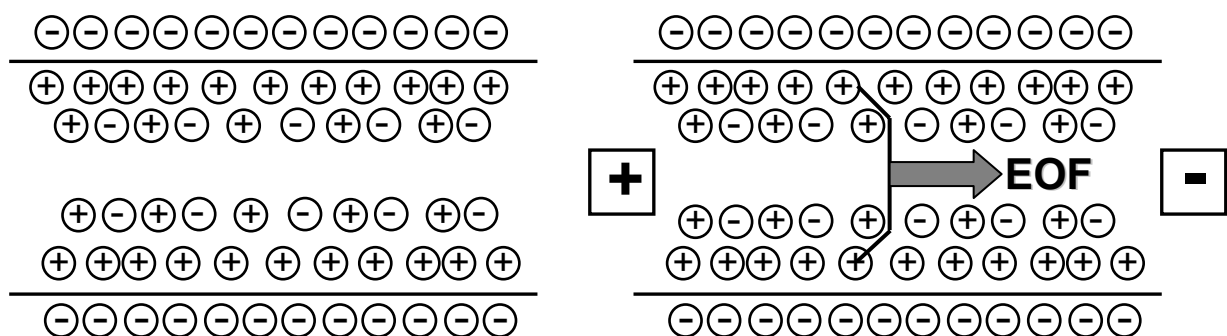


Abb. 4-2: Entstehung des elektroosmotischen Flusses,

links: negativ geladene Kapillarenwand aus Quarz mit angelagerten, hydratisierten Kationen, rechts: mit angelegtem elektrischen Feld wandert die Lösung zur Kathode

Bei einem pH-Wert von größer 2,5 werden die Silanolgruppen von Fused-Silica-Kapillaren deprotoniert, demnach ist die Oberfläche negativ geladen. Kationen in der Lösung lagern sich in der Nähe der Oberfläche an und bilden eine elektrische

Doppelschicht, die eine Potenzialdifferenz, das ζ (zeta)-Potential, verursacht. Liegt parallel zur Oberfläche ein elektrisches Feld an, so zieht das Feld die solvatisierten Kationen in der mobilen Schicht längs seiner Achse an und bewegt so die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. Dieser elektroosmotische Fluss unterscheidet sich von einem druckbetriebenen System, bei dem ein Hagen-Poiseuille'sches Strömungsprofil auftritt, da hier die Triebkraft entlang der Kapillare einheitlich ist und daher kein Druckgefälle entsteht. Daraus resultiert ein sehr flaches, stempelförmiges Strömungsprofil, kein parabolisches wie bei hydrodynamisch betriebenen Systemen, und man erhält nur sehr geringe Bandverbreiterungen (Abb. 4-3). Bei typischen elektrophoretischen Bedingungen zeigen Berechnungen, dass sich die Flüssigkeit bereits im Abstand von 10 nm von der Quarzoberfläche gleichförmig bewegt.

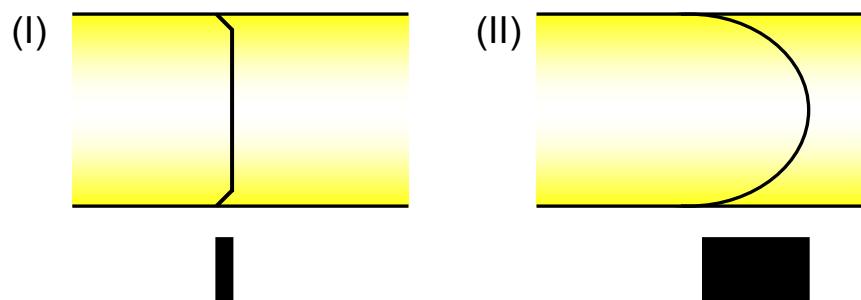


Abb. 4-3: Darstellung eines durch den EOF verursachten, stempelförmigen Flussprofils (I) und eines durch Druck verursachten, parabolischen Flussprofils (II), unten: Bandenverbreiterungen

Weitere Vorteile des EOF gegenüber einem druckbetriebenen System sind

- die Möglichkeit zur Generierung sehr kleiner Flussraten,
- das pulsfreie Arbeiten bei Atmosphärendruck (vorteilhaft bei der Kopplung mit dem MS).

Die Geschwindigkeit v_{EOF} des EOF lässt sich mit der Helmholtz-Gleichung beschreiben:

$$v_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (7)$$

und für die elektroosmotische Mobilität μ_{EOF} gilt:

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{\eta} \quad (8)$$

mit ε : Dielektrizitätskonstante, E : angelegte Feldstärke, ζ : ζ -Potential, η : dynamische Viskosität.

Demnach sinkt der EOF bei Fused-Silica-Kapillaren mit zunehmender Konzentration des Elektrolyten. Bei Zusatz organischer Komponenten wird die elektrische Doppelschicht komprimiert und ein kleineres ζ -Potential entsteht. v_{EOF} steigt bei Fused-Silica-Kapillaren mit dem pH-Wert an, da die Größe des ζ -Potentials von der Oberflächenladung der Kapillarwand und damit stark vom pH-Wert abhängig ist.

Die resultierende Geschwindigkeit eines Analyten ergibt sich aus der Summe der Vektoren seiner elektrophoretischen Migrationsgeschwindigkeit und des EOF. Demnach können beispielsweise bei starken EOF nicht nur Kationen und neutrale Analyten, sondern auch Anionen detektiert werden, wenn der EOF größer als ihre elektrophoretische Migrationsgeschwindigkeit ist. Abb. 4-4 zeigt schematisch den Transport und die Trennung der Analyten in der Kapillare, bei denen die elektrophoretische Wanderung und der elektroosmotische Fluss beteiligt sind. Neutralteilchen werden hierbei nicht getrennt, sondern bewegen sich mit der Geschwindigkeit des EOF. Daher können sie als EOF-Marker dienen, d. h. v_{EOF} anzeigen.

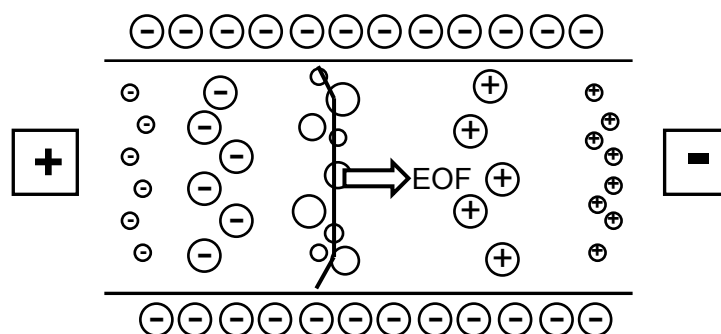


Abb. 4-4: Überlagerung der elektrophoretischen Wanderung und des EOF,
 Anionen: Detektion möglich, wenn $v_{\text{EOF}} > \mu_{\text{Anion}}$
 neutrale Spezies: wandern mit v_{EOF}
 Kationen: sind schneller als v_{EOF}

4.3.4 Parameter zur Beschreibung der Trennleistung des elektro-phoretischen bzw. elektrochromatographischen Systems

Die Differenz der Mobilitäten unterschiedlicher Analyte ist für die elektro-phoretische Trennung verantwortlich. Die Auflösung der Peaks ist jedoch von der Effizienz des Trennsystems abhängig. Um die Dispersion der Banden in der CE (CEC) zu beschreiben, wurden bekannte Größen wie die theoretische Bodenzahl N und Bodenhöhe H aus der Chromatographie übernommen. Die theoretische Bodenzahl N berechnet sich wie folgt:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t}{w_h} \right)^2 \quad (9)$$

mit t : Migrationszeit des Peaks, w_h : Peakbreite in halber Höhe.

Meist ist in der CE und CEC die Bodenzahl pro Meter Kapillare angegeben, um die Vergleichbarkeit der Effizienzen verschiedener Trennsysteme zu vereinfachen.

Die theoretische Trennstufenhöhe (oder Bodenhöhe) HEPT ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\text{HEPT} = \frac{L_{\text{eff}}}{N} \quad (10)$$

In der CE sind nicht wie in der HPLC die drei Terme der Longitudinaldiffusion, der Eddy-Diffusion und des Massentransfer-Terms ausschlaggebende Ursache für die Bandenverbreiterung, sondern ausschließlich die Longitudinaldiffusion und folgende Effekte, die sich additiv verhalten:

- Wandabsorption der Probe
- Temperatureffekte verändern stempelförmiges Profil
- Überlagerung des EOF mit einem Druckprofil
- sehr lange Probenpfropfen
- zu große Probenkonzentrationen (Überladungseffekte)
- Mobilitätsdifferenz der Analytionen und Pufferionen (Elektrodispersion)

Die Durchflusszeit t_0 stellt in der CEC die Zeit dar, die ein ungeladener Analyt benötigt, bis er die effektive Länge L_{eff} der Kapillare durchwandert hat, ohne mit der Stationärphase in Wechselwirkung zu treten. Da die Migrationszeiten t_R geladener

Analyte unter bestimmten Voraussetzungen schneller sein können als die Durchflusszeit t_0 (dies ist in der klassischen Chromatographie nicht möglich), ist dieser Wert problematisch.

Der Migrations- bzw. Retentionsfaktor k berechnet sich wie folgt:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (11)$$

In der Chromatographie ist der Trennfaktor α definiert als

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}, \quad \text{mit } t_2 \geq t_1 \quad (12)$$

mit k_1 bzw. k_2 : Retentionsfaktor der ersten bzw. zweiten Komponente, t_1 bzw. t_2 : Retentionszeit der ersten bzw. zweiten Komponente, t_0 : Durchflusszeit.

In Analogie zu dieser Definition wurde der Trennfaktor, vor allem für chirale Trennungen, auch in die CE eingeführt. Da in der CE nicht wie in der Chromatographie sinnvoll von der Durchflusszeit gesprochen werden kann, ist α definiert als:

$$\alpha = \frac{t_2}{t_1}, \quad \text{mit } t_2 \geq t_1 \quad (13)$$

Die Auflösung R_S zweier Peaks in einem Elektropherogramm kann wie in der Chromatographie wie folgt berechnet werden:

$$R_S = 1,177 \frac{t_2 - t_1}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (14)$$

mit w_{h1} bzw. w_{h2} : Peakbreite in halber Höhe.

Damit wird die Effizienz des Trennprozesses beschrieben, die bei Trennungen mittels CE sehr hoch ist. Daher kann ein Trennfaktor von $\alpha = 1,01$ bei hohen Bodenzahlen bereits für eine Basislinientrennung ausreichen. Somit ist eine weniger hohe Selektivität als in chromatographischen Methoden nötig.

5 Kapillarelektrochromatographie

5.1 Enantiomerentrennung atropisomerer polychlorierter Biphenyle (PCB) mittels verschiedener CEC-Methoden

5.1.1 Eigenschaften, Toxizität und Vorkommen

Polychlorierte Biphenyle (PCB) gehören weltweit zu den wichtigsten Umweltkontaminanten anthropogenen Ursprungs. Aufgrund ihrer Eigenschaften (hohe thermische und chemische Belastbarkeit, schwere Entflammbarkeit, Chemikalienresistenz und niedrige elektrische Leitfähigkeit) wurden sie in großer Menge und weit verbreitet eingesetzt. Sie wurden u. a. in Kühlmitteln, Flammschutz- und Imprägniermitteln, Kondensatoren, Transformatoren, Weichmachern, Isolierflüssigkeiten und Schmiermitteln verwendet. Je nach Verwendungszweck wurden niedriger oder höher chlorierte Gemische (Chlorgehalt von 30-60%) eingesetzt, wobei die technischen Produkte (z. B. Aclor, Clophen, Elaol) 50-70 verschiedene Kongenere enthielten.

Aufgrund ihrer hohen Persistenz und ihrer Lipophilie reichern sich PCB in der Nahrungskette vor allem bei Organismen auf hoher trophischer Stufe und damit in fettreichen Lebensmitteln wie Milch, Fleisch und Fisch an [120]. Dies gilt insbesondere für die hoch substituierten PCB mit Substituenten in *ortho*-Position, die von Mikroorganismen nur langsam abgebaut werden [121]. Die akute Toxizität ist verhältnismäßig gering, längerfristige Belastungen führen zu Leber- und Nierenschädigungen. Neben weiteren chronisch toxischen Wirkungen wie Chlorakne, Haarausfall und Hyperpigmentierung, stehen die PCB auch im Verdacht cancerogen zu sein [122].

Die PCB wurden etwa um 1930 entwickelt. Aufgrund ihrer höchst bedenklichen Wirkung ist ihre Verwendung seit 1978 nur in geschlossenen Systemen erlaubt. 1983 wurde in der Bundesrepublik die Produktion von PCB eingestellt. Sie zählen zu den zwölf organischen, toxischen Verbindungsklassen, dem sogenannten „dirty dozen“, die durch die Stockholmer Konvention vom 22. Mai 2001 weltweit verboten wurden.

5.1.2 Atropisomere

Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl und verschiedener Substitutionsmuster der Chloratome am Biphenylring der PCB existieren 209 verschiedene Kongenere, die nach der Ballschmieder-Nomenklatur normiert werden [123]. Die allgemeine Strukturformel ist in Abb. 5-1 gegeben.

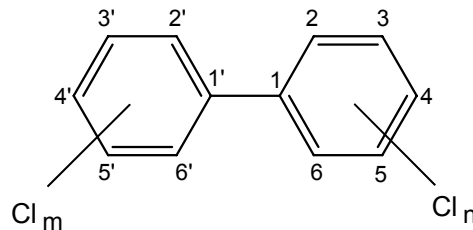


Abb. 5-1: Allgemeine Strukturformel der PCB

78 Kongenere weisen eine unsymmetrische Substitution in beiden Ringen auf und zeigen demnach axiale Chiralität in ihren nichtplanaren Konformationen. Die beiden Atropisomere können jedoch durch Rotation um die sp^2 - sp^2 -C-C-Einfachbindung ineinander überführt werden. 19 dieser 78 Kongenere bilden bei Raumtemperatur stabile Atropisomere, da diese Kongenere drei oder vier Chlor-Substituenten in *ortho*-Position besitzen [121,124].

5.1.3 Motiv der enantioselektiven Analyse

Für die Atropisomere eines PCB können unterschiedliche toxische und physiologische Eigenschaften angenommen werden, wobei sich die Aufnahme in den Organismus, Transportprozesse und enzymatischer Abbau unterscheiden können. Um Informationen über Abbauewege zu erhalten, wurden Enantiomerenverhältnisse in verschiedenen Organismen, z. B. in Haifischen [125] und Sedimenten von Seen [126], bestimmt. Dabei wurden Abweichungen von dem Enantiomerenverhältnis 1:1, mit dem die synthetischen PCB in die Umwelt gelangen, festgestellt. In Muttermilchproben wurden auch Enantiomerenanreicherungen der Atropisomere beobachtet [127]. Der Enantiomerenanalytik von atropisomeren PCB kommt somit eine wichtige Bedeutung zu, um Informationen über enantioselektive Prozesse zu erlangen.

5.1.4 Die eingesetzten CEC-Methoden

Mit drei verschiedenen kapillarelektrochromatographischen Methoden wurden atropisomere PCB an Chirasil- β -Dex (s. Abb. 3-1) bzw. Chira-Dex-Silica (s. Abb. 5-8) in die Atropisomere getrennt. In Abb. 5-2 sind die verschiedenen kapillarelektrochromatographischen Säulentypen abgebildet: (i) die offene („wall coated open tubular“) Kapillare (o-CEC), (ii) die gepackte Kapillare (p-CEC) und (iii) die monolithische Kapillare (rod-CEC) [128].

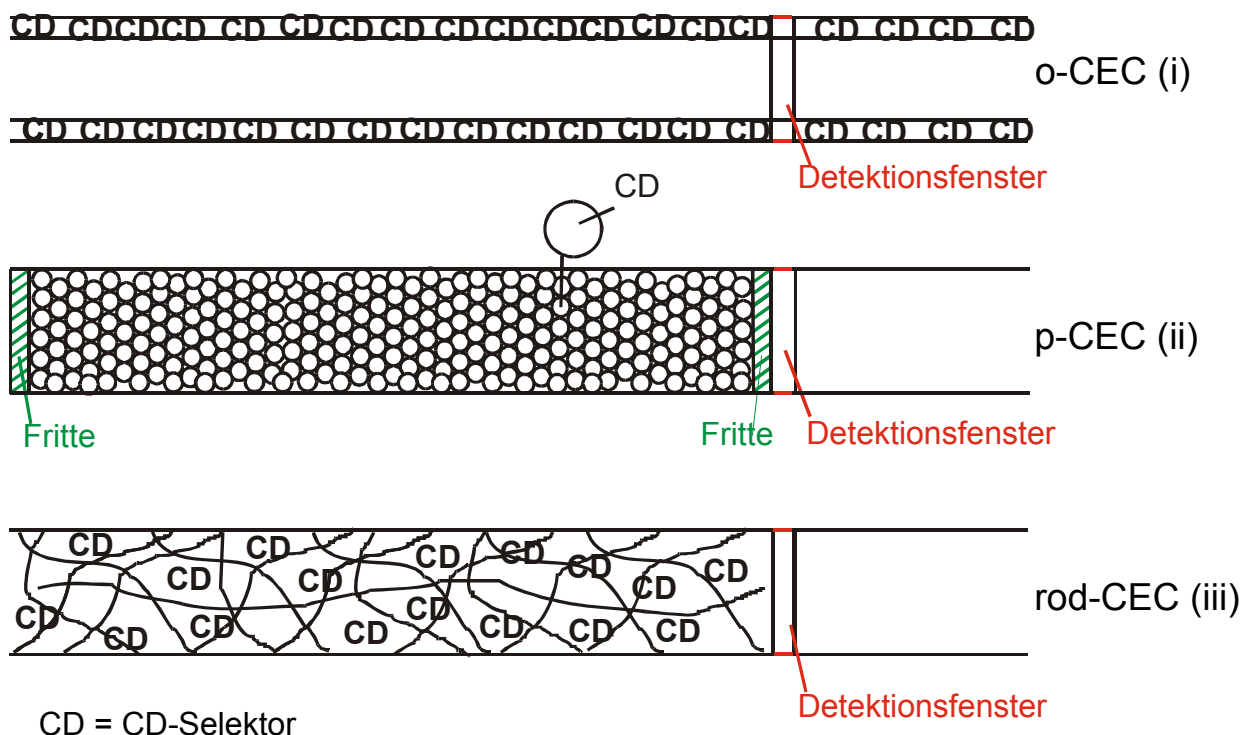


Abb. 5-2: Schematische Darstellung der drei verwendeten CEC-Modi [129]

o-CEC

Für die „open tubular“ Kapillarelektrochromatographie (o-CEC) wurde eine Kapillare verwendet, bei der die Oberfläche der Kapillarinnenwand mit einem 0,2 μm dicken Chirasil- β -Dex Film belegt wurde (Chirasil- β -Dex-Kapillare) [130].

In Abb. 5-3-(I) ist eine REM-Aufnahme einer o-CEC Kapillare zu sehen. Das REM dient hier dazu, die Topographie der Oberflächen (als Sekundärelektronenbild) abzubilden. Die Verwendung von Sekundärelektronen liefert einen hohen Relief-

kontrast. Die Bildgebung durch Rückstreuелеktronen würde hingegen einen Elementkontrast (oder Materialkontrast) liefern. Der Chirasil- β -Dex-Film ist in dieser REM-Aufnahme nicht sichtbar. Der helle Rand, der aufgrund seiner Größe (ca. 200 nm, s. Abb. 5-3-(I)-B) fälschlicherweise dafür gehalten werden könnte, ist auf einen Randartefakt zurückzuführen, d. h. die Sekundärelektronen, die vom Rand stammen, werden in höherer Intensität vom Detektor erkannt als die der restlichen Kapillare. Dies wurde anhand von REM-Aufnahmen leerer Vergleichskapillaren, die genau denselben hellen Rand zeigten, deutlich.

Die o-CEC-Kapillaren wurden wie die GC-Kapillaren statisch belegt und mittels GC mit 1-Phenylethanol als Testsubstanz charakterisiert. Die Qualität der Kapillaren kann anhand des chiralen Trennfaktors α , des Retentionsfaktors k und der Anzahl der Böden N beurteilt werden. Jedoch wurde aufgrund der geringen Ladungskapazitäten der o-CEC-Kapillaren eine ausgeprägte Abhängigkeit von N und k zur eingespritzten Menge beobachtet (s. Tab. 5-1).

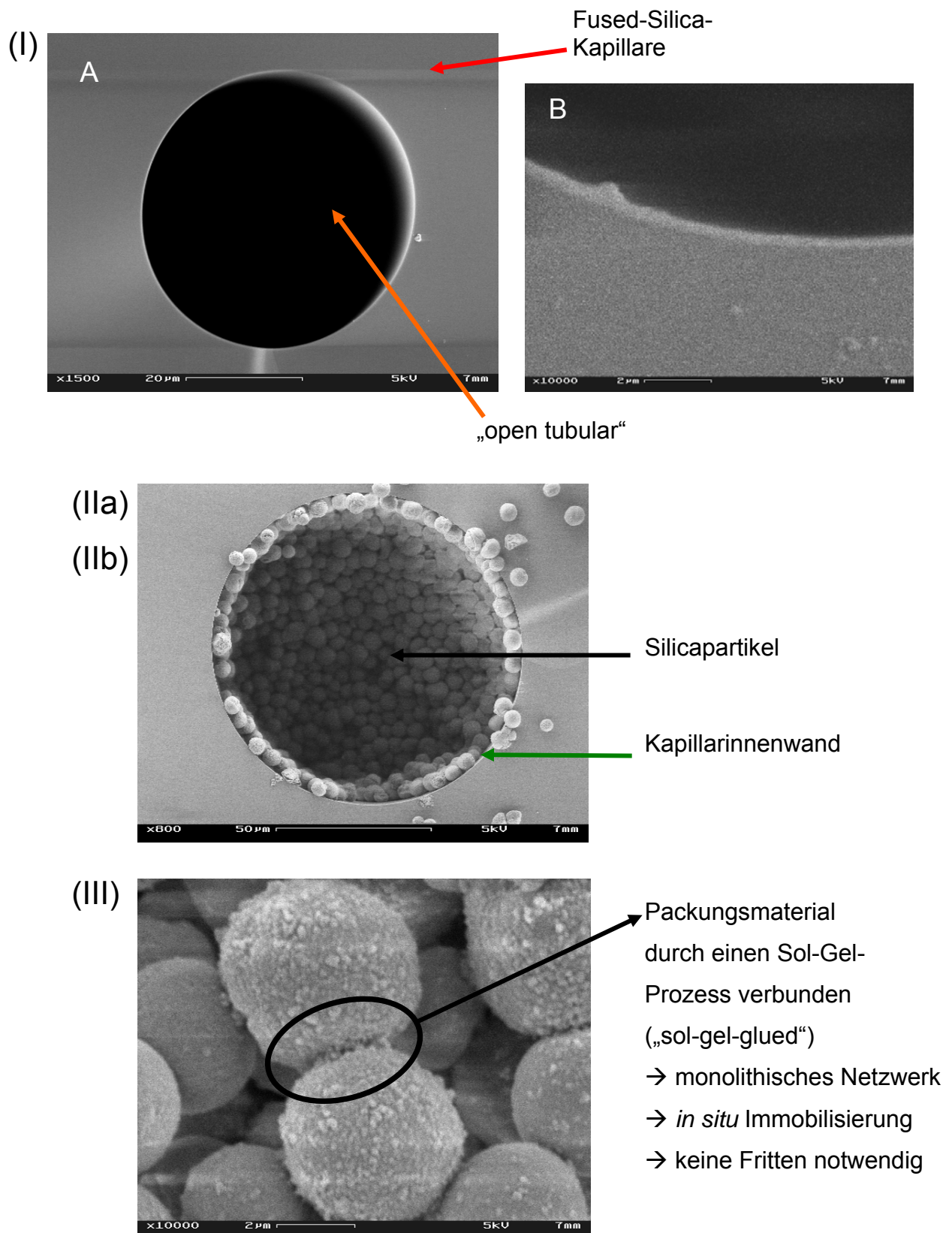


Abb. 5-3: REM-Aufnahmen der drei verschiedenen Säulentypen [128]:

(I) offene Kapillare (o-CEC), B Ausschnitt von A,

(IIa,b) gepackte Kapillare (p-CEC), (III) monolithische Kapillare (rod-CEC)

injizierte Menge	t_0	t_1	t_2	α	k_1	k_2	R_s	N_1	N_2
0,7 μL^1	0,10	1,98	2,31	1,18	18,8	22,1	0,85	730	360
0,2 μL^1	0,10	2,17	2,49	1,16	20,7	23,9	1,78	3080	2430
0,1 μL^1	0,10	2,25	2,58	1,15	21,5	24,8	2,42	4970	5340
0,05 μL^1	0,10	2,34	2,67	1,15	22,4	25,7	2,63	6130	6980
0,7 μL^2	0,08	1,53	1,69	1,11	18,2	20,2	0,99	340	160
0,3 μL^2	0,08	1,75	2,05	1,18	20,9	24,6	1,00	900	500
0,1 μL^2	0,08	2,03	2,33	1,15	24,4	28,1	2,31	4830	4700
0,05 μL^2	0,08	2,04	2,33	1,15	24,5	28,2	2,81	5100	4070

¹ vor Immobilisierung,

² nach Immobilisierung und Spülen

Tab. 5-1: Abhängigkeit von α , k , R_s und N (pro m) und der injizierten Probenmenge, Test der mit Chirasil- β -Dex belegten o-CEC-Kapillare mittels GC mit 1-Phenylethanol, Bedingungen: 1,0 bar H_2 , 100 °C, Split 50 mL/min, Kapillare: 1 m x 50 mm (i. d.), Film: 0,2 μm

Eine Überladung beim Säulentest sollte durch die Injektion möglichst geringer Probemengen ausgeschlossen werden. Eine Erhöhung der Filmdicke, die eine höhere Beladbarkeit der Kapillare ermöglicht, ist nicht sinnvoll, da dies einen drastischen Verlust an Effizienz bewirkt. Das kann entweder durch den erhöhten Beitrag des niedrigen Massentransfers oder durch einen erhöhten Retentionsfaktor, der sich in der o-CEC ungünstig auswirkt, erklärt werden [82].

p-CEC

In der Kapillarelektrochromatographie mit gepackten Kapillaren (p-CEC) wurde sowohl eine Kapillare mit Chirasil- β -Dex belegten und immobilisierten Silicapartikeln (gepackte Chirasil- β -Dex-Kapillare, IIa) [58] als auch eine Kapillare mit kovalent an Silica gebundenem, permethyliertem β -CD (gepackte Chira-Dex-Silica Kapillare, IIb) [59,82] eingesetzt (s. Abb. 5-3-(II)).

rod-CEC

Monolithe auf Silica-Basis können entweder *in situ* mittels eines Sol-Gel-Prozesses oder durch Sintern bei hoher Temperatur gebildet werden. Eine weitere Möglichkeit ist, Silicapartikel in einer Silica-Matrix mittels der Sol-Gel-Technik zu immobilisieren

[131]. Je nach Dichte der Silicapartikel werden Monolithe verschiedener Strukturen erhalten. Wenn nur verhältnismäßig wenige Partikel eingebunden werden, erhält man sogenannte eingebettete („embedded“) Silicapartikel in einem monolithischen Silica-Netzwerk [132]. Bei einer hohen Teilchendichte spricht man hingegen von Partikel beladenen Monolithen („particle loaded monolith“) [116]. Die Silicapartikel sind durch den Sol-Gel-Prozess miteinander und mit der Kapillarwand verbunden, daher spricht man auch von Sol-Gel „verklebtem“ („sol-gel-glued“) Packungsmaterial. Werden Silicapartikel, die chirale Selektoren tragen, eingebunden, kann dieses System zu Enantiomerentrennungen eingesetzt werden. Kato *et al.* beschreiben erstmals diesen „particle loaded monolith“ mit chiralem Packungsmaterial [133]. Hier wurde in der rod-CEC ein „particle-glued monolith“ (Abb. 5-3-(III)) verwendet. Das eingebundene Packungsmaterial war Chira-Dex-Silica [117]. Der Vorteil dieser monolithischen Vernetzung ist, dass im Gegensatz zu den gepackten Kapillaren keine Fritten benötigt werden. Diese verursachen häufig die Bildung von Luftblasen in der mobilen Phase, die zu Schwankungen oder gar zum Erliegen des Stroms führen können. Die Nachteile reiner Sol-Gel-Monolithe sind ihre schlechte Reproduzierbarkeit von Säule zu Säule und das Schrumpfen und Brechen beim Trocknungsprozess. Durch die Silicapartikel wurde die Phase stabilisiert und ein widerstandsfähiges Silica-Bett erhalten.

In der p-CEC wurde mit Druckunterstützung gearbeitet, da dies die Bildung von Luftblasen unterdrückt. In der rod-CEC führte sie zu einer besseren Basislinie [58,117]. In der o-CEC hingegen wurde der Druck ausschließlich zur Verkürzung der Analysezeiten angewandt. Der Druck kann entweder an einem Ende oder an beiden Kapillarenden angelegt werden. Da er hier stets an der Injektionsseite angelegt wurde, kann von einer Mischform von CEC und LC gesprochen werden, weil sich die beiden Flussprofile überlagern. Der Vorteil dieser Methode ist neben der Verhinderung von Luftblasen das leichte Umschalten zwischen dem LC- und CEC-Modus in der gleichen apparativen Anordnung. Zudem kann die Kapillare gespült und schnell mit einem anderem Puffersystem konditioniert werden. Weiterhin können mit der Druckunterstützung Analysezeiten, z. B. bei niedrigen pH-Werten, verkürzt werden.

5.1.5 Diskussion der Trennergebnisse

Es erwies sich als notwendig, für jede der drei CEC-Methoden optimierte Bedingungen zu wählen (Spannung, Druck, Puffer, Modifier). Um jedoch eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde in der p-CEC und der rod-CEC nur die Druckunterstützung variiert, während in der o-CEC eine andere mobile Phase gewählt werden musste, um praktikable Analyseparameter zu erhalten.

In der p-CEC (IIa) und o-CEC (I) war der EOF im Vergleich zu einer leeren Kapillare drastisch reduziert. In Tab. 5-2 sind die Durchflusszeiten des EOF-Markers für eine mit Chirasil- β -Dex belegte o-CEC-Kapillare (I) und einer unmodifizierten Vergleichskapillare gezeigt. Der schnellste EOF wurde erwartungsgemäß mit einer unbelegten Vergleichskapillare in einem rein wässrigen Puffersystem erreicht. Wurde diesem 50% des organischen Modifiers Acetonitril (entsprechend der Zusammensetzung des optimierten Puffersystems in der o-CEC) beigesetzt, erhöhten sich die Retentionszeiten um ca. 40%. Bei einer mit Chirasil- β -Dex belegten Kapillare war der EOF im selben Puffersystem nochmals um mehr als das vierfache erhöht. Mit 20 mbar Druckunterstützung wurde die Durchflusszeit etwas mehr als verdreifacht. In erster Linie war also der Chirasil- β -Dex-Film für die Reduktion des EOF verantwortlich, da die Silanolgruppen durch das Polymer abgeschirmt wurden.

	1, P/B	1, P/B:ACN	2, P/B:ACN
30kV, 0 mbar	6,8 min	9,5 min	39,7 min
30kV, 20 mbar	5,9 min	8,1 min	26,3 min

Tab. 5-2: EOF unter verschiedenen Bedingungen, Kapillare: 78 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.); **1:** nicht modifizierte Kapillare; **2:** mit 0,2 μ m Chirasil- β -Dex belegt; **P/B:** Phosphat/Borat-Puffer 20 mM, pH 7,0; **P/B:ACN:** Phosphat/Borat-Puffer 20 mM, pH 7,0:Acetonitril, 1:1

In der p-CEC mit Chirasil- β -Dex modifiziertem Packungsmaterial (IIa) wurde daher 20% unmodifiziertes Silica zur Unterstützung des EOF beigemischt. Dies erhöhte den EOF in einem wässrigen Puffersystem um 26% [58]. Da in der o-CEC eine Erhöhung des Silanolgehaltes auf diesem einfachen Wege nicht möglich war, wurden selbst bei Druckunterstützung lange Elutionszeiten von 70 bis 80 Minuten beobachtet.

Die Enantiomere des PCB 132 wurden mit den beschriebenen drei CEC-Modi getrennt oder angetrennt. Aus Abb. 5-4 und den Daten aus Tab. 5-3 ist ersichtlich, dass die gepackte Chirasil- β -Dex-Kapillare (IIa) die Atropisomere des PCB 132 mit der besten Auflösung trennte. Mit der gepackten Chira-Dex-Silica Kapillare (IIb) konnte hingegen keine Basislinien-Trennung erreicht werden, da die Peaks ein starkes Tailing im Chromatogramm zeigten. Für einige weitere PCB wurden mit den p-CEC-Kapillaren IIa und IIb ähnliche Trennfaktoren erhalten (s. Tab. 5-4), jedoch war die Auflösung mit der gepackten Chirasil- β -Dex-Kapillare (IIa) immer wesentlich geringer. In Abb. 5-5 sind die Elektrochromatogramme für die atropisomeren PCB 84, 135, 136 und 176 auf der gepackten Chirasil- β -Dex-Silica Kapillare gezeigt. Die Elutionszeiten der untersuchten PCB waren bei der Analyse mit der Kapillare IIa bei gleicher Durchflusszeit t_0 länger als mit der Chira-Dex-Kapillare (IIb). Dies ist mit einer besseren Löslichkeit der lipophilen PCB im Polymer und einem unterschiedlichen Selektorgehalt erklärbar.

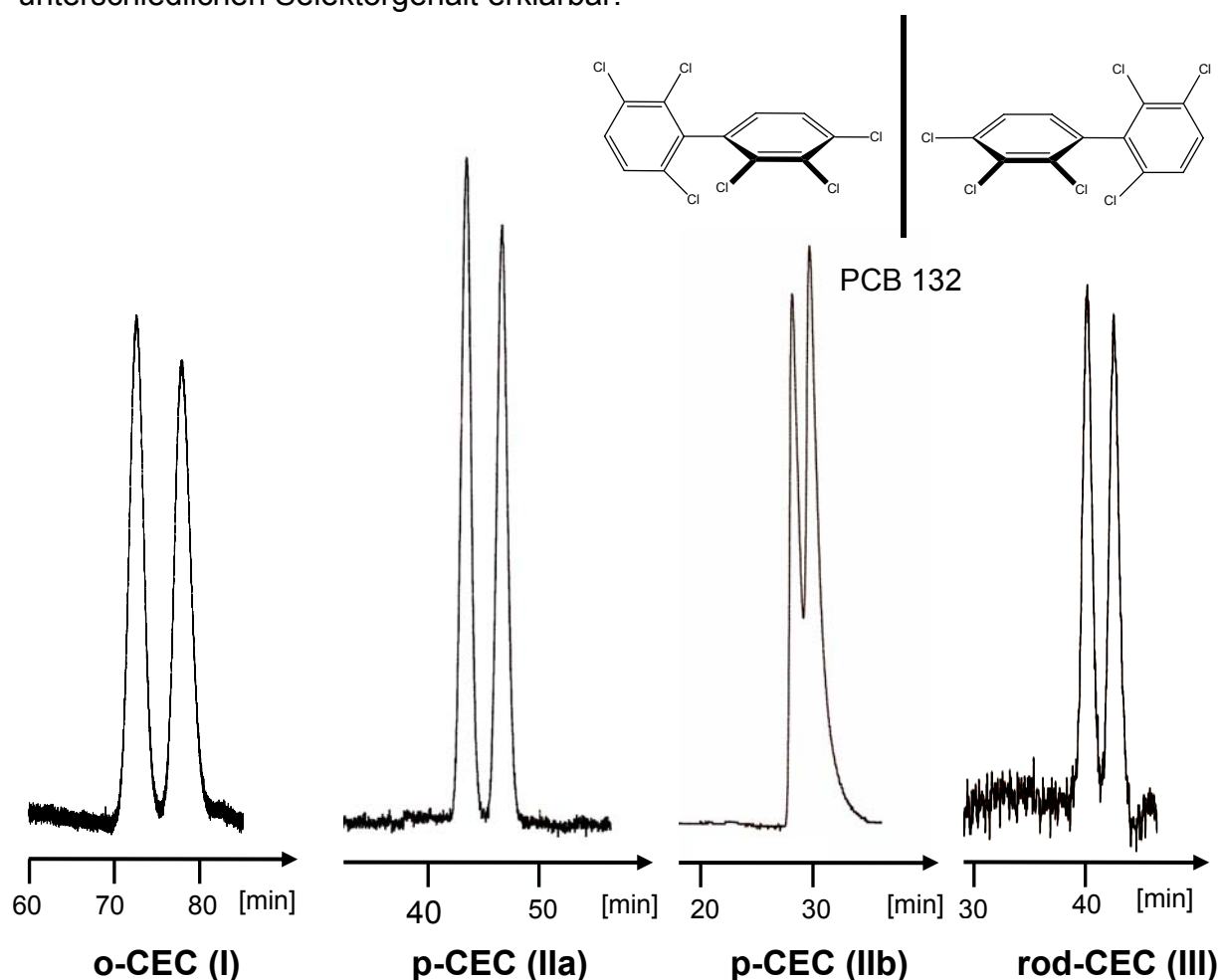


Abb. 5-4: Elektrochromatographische Trennung der Atropisomere des PCB 132 auf vier verschiedenen Trennkapillaren [128], Bedingungen: UV-Detektion bei $\lambda = 230$ nm

(I) o-CEC: Kapillare: 78 cm (eff. Länge) x 50 μm (i. d.), Film: Chirasil- β -Dex 0,2 μm ; Puffer: Phosphat/Borat (pH 7,0, 20 mM) : Acetonitril, 1:1, 30 kV, 20 mbar (splitless)

(IIa) p-CEC: Kapillare: 25 cm (eff. Länge) x 100 μm (i. d.), gepackt mit 80% Chirasil- β -Dex-Silica und 20% underivatisiertem Silica, Partikelgröße 5 μm , Porengröße 300 Å; Puffer: MES (pH 6,0, 20 mM) : Methanol, 30:70, 20 kV, Druckunterstützung: 0,15 mL/min (55 bar), Splitkapillare: 50 cm x 75 μm (i. d.)

(IIb) p-CEC: Kapillare: 22 cm (eff. Länge) x 100 μm (i. d.), gepackt mit Chira-Dex-Silica, Partikelgröße 5 μm , Porengröße 300 Å; Puffer: MES (pH 6,0, 20 mM) : Methanol, 30:70, 20 kV, Druckunterstützung 0,10 mL/min (25 bar), Splitkapillare: 50 cm x 75 μm (i. d.)

(III) rod-CEC: Kapillare: 24 cm (eff. Länge) x 100 μm (i. d.), gepackt mit Chira-Dex-Silica, vernetzt mittels Sol-Gel-Prozess, Partikelgröße 3 μm , Porengröße 100 Å; Puffer: MES (pH 6,0, 20 mM) : Methanol, 30:70, 20 kV, Druckunterstützung: 0,15 mL/min (60 bar), Splitkapillare: 50 cm x 75 μm (i. d.)

PCB 132	t_0	t_1	t_2	α	R_S	N_1	N_2
(I)	26,3	72,5	77,9	1,11	1,5	7 500	6 500
(IIa)	9,6	43,4	46,6	1,10	1,7	36 900	33 800
(IIb)	9,9	28,3	29,9	1,09	0,7	20 300	11 300
(III)	7,1	40,2	42,6	1,07	1,2	34 000	31 900

Tab. 5-3: Enantiomertrennung des PCB 132 auf vier verschiedenen Trennkapillaren [128], Bodenzahl N pro m, Bedingungen s. Abb. 5-4

(IIa)	t_0	t_1	t_2	α
PCB 84	10,2	31,4	32,6	1,06
PCB 135	9,8	46,6	48,4	1,05
PCB 136	10,2	37,2	38,9	1,06
PCB 176	9,8	50,2	52,0	1,04

(IIb)	t_0	t_1	t_2	α
PCB 84	9,4	20,3	20,9	1,05
PCB 135	9,5	25,7	26,8	1,07
PCB 136	10,2	21,4	22,2	1,07
PCB 176	9,0	25,1	25,9	1,05

Tab. 5-4: Trennung einiger atropisomerer PCB mittels p-CEC [128], Packungsmaterial: (IIa) Chirasil- β -Dex-Silica, (IIb) Chira-Dex-Silica, s. Abb. 5-5

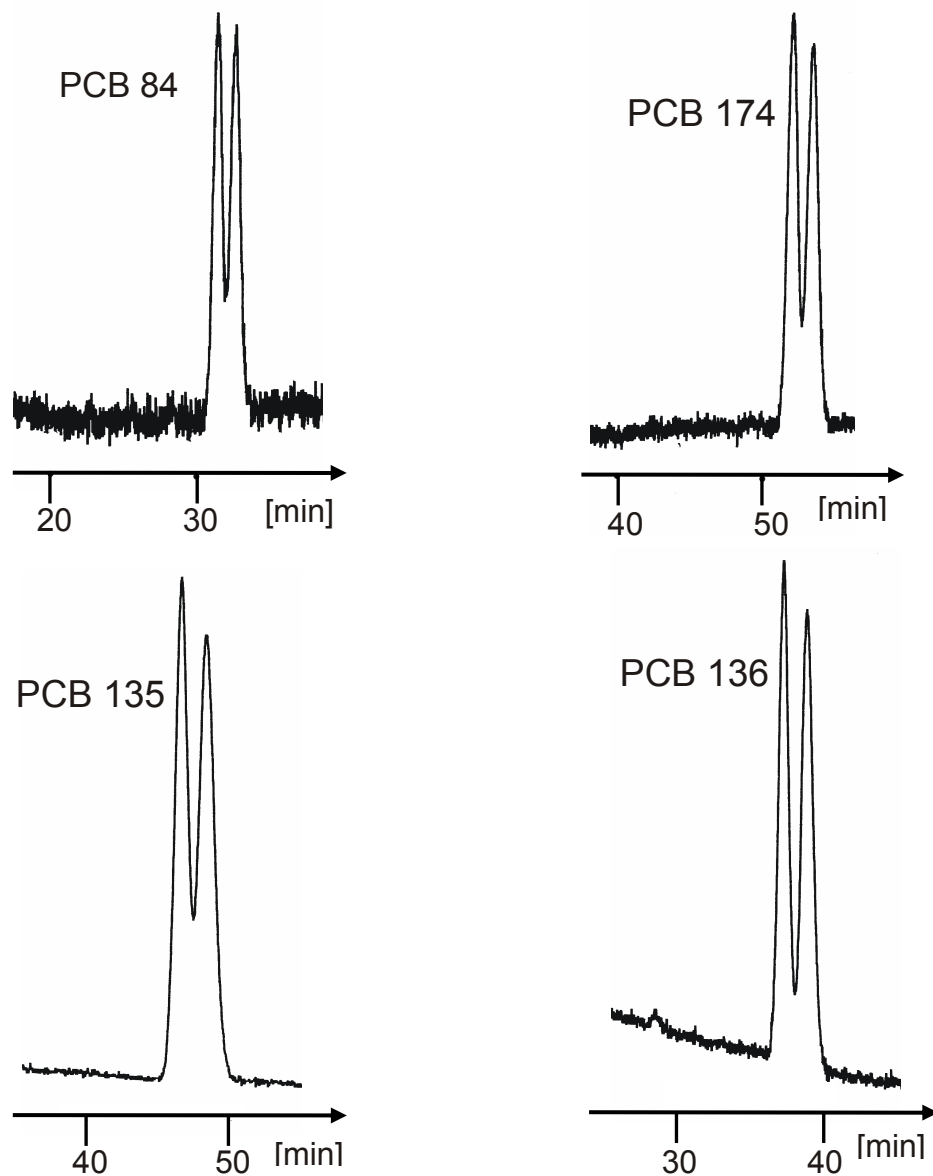


Abb. 5-5: Trennung atropisomerer PCB mittels p-CEC, Packungsmaterial: Chirasil- β -Dex-Silica (IIa), Bedingungen s. Abb. 5-4

In der rod-CEC wurde eine etwas kürzere Durchflusszeit t_0 aufgrund eines höheren EOF bei vergleichbaren Bedingungen erreicht. Das deutet darauf hin, dass durch den Sol-Gel-Prozess *de novo* Silanolgruppen gebildet wurden. Die Elutionszeiten waren hier hingegen viel höher als mit der Chira-Dex-Silica gepackten Kapillare. Die Auflösung und die Bodenzahlen lagen für beide Kapillaren im gleichen Bereich. In der o-CEC wurden die mit Abstand geringsten Bodenzahlen erzielt.

5.1.5.1 Einfluss des organischen Modifiers und des Puffers

Die mobile Phase musste wegen der Lipophilie der PCB einen hohen organischen Modifier-Anteil enthalten. Deshalb war ein Methanol-Anteil von mindestens 70% oder ein Acetonitril-Anteil von mindestens 40% nötig, um eine Elution der PCB zu erreichen. Mit der Erhöhung des Anteils an organischem Modifier verringerten sich die Elutionszeiten und die Auflösung. In der p-CEC (IIa) ergab sich beispielsweise bereits mit der mobilen Phase 3-Morpholinoethansulfonsäure (MES):Methanol 2:7 anstatt 3:7 für das PCB 132 bei einer Elutionszeit von 13,2 Minuten keine Antrennung mehr. Somit stand nur ein kleines Fenster zur Verfügung, in dem der Anteil des organischen Modifiers gewählt werden konnte. In der o-CEC wurde Acetonitril als organischer Modifier eingesetzt, da der EOF bei 70% Methanolgehalt zu gering war. Bei den verwendeten p-CEC-Kapillaren war dagegen der EOF hoch genug, um auch mit Methanol praktikable Elutionszeiten zu erreichen, welches zu höheren Trennfaktoren und Auflösungen als mit Acetonitril führte.

Zur Optimierung der Trennungen wurden verschiedene Puffersysteme, wie z. B. MES, Phosphat/Borat, Phosphat und TEAA getestet, wobei sich MES für die p-CEC und rod-CEC und Phosphat/Borat für die o-CEC als am besten geeignet erwiesen. Die anderen Puffer konnten die Trennung entweder nicht verbessern oder erwiesen sich als völlig ungeeignet. Beispielsweise wurde mit dem Phosphat-Puffer unter sonst identischen Bedingungen eine schnellere Elution des Analyten mit einer sehr schlechten Antrennung beobachtet. Durch Verringerung des Methanolgehaltes konnte keine Verbesserung erzielt werden, da sonst keine Elution des Analyten erfolgte.

5.1.5.2 CEC und LC

Eine Antrennung des PCB 132 konnte auch im LC-Modus mit der monolithischen Trennkapillare erreicht werden (s. Chromatogramm in Abb. 5-6). Der chirale Trennfaktor α war im rod-LC- und im rod-CEC-Modus derselbe. Die Daten der Trennungen sind in Tabelle in Abb. 5-6 zusammengestellt.

PCB 132	rod-LC	rod-CEC
t_1	63,6	40,2
t_2	67,4	42,6
t_0	9,6	7,1
α	1,07	1,07
N_1	4 600	34 000
N_2	3 900	31 900
R_s	0,9	1,2

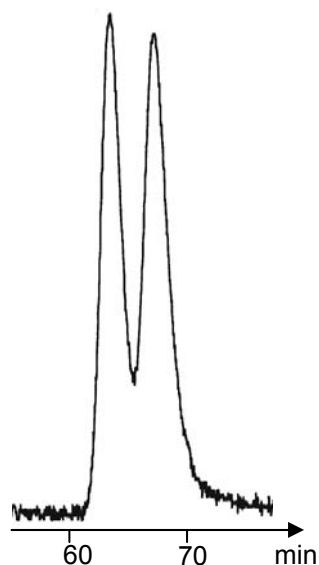


Abb. 5-6: Trennung von PCB 132 mittels rod-LC und rod-CEC, rechts: Chromatogramm der Trennung mittels rod-LC, Bedingungen: rod-CEC s. Abb. 5-4, rod-LC: Fluss: 0,2 mL/min

In der p-CEC mit Chira-Dex-Silica wird von Wistuba *et al.* [59] berichtet, das ebenfalls ein Effizienzunterschied gegenüber der p-LC erreicht wird. Die Bodenzahlen sind dort bei der druckunterstützten p-CEC etwa dreimal höher.

In der druckunterstützten p-CEC mit Chirasil- β -Dex belegten Silicapartikeln sind die Bodenzahlen nach [58] fast doppelt so hoch wie im entsprechenden p-LC-Modus und es werden dementsprechend höhere Auflösungen erhalten, wobei sich der Trennfaktor α erwartungsgemäß nicht wesentlich verändert.

Im Vergleich der o-CEC und o-LC wurden folgende Ergebnisse erzielt: Auch hier veränderte sich der chirale Trennfaktor α kaum. In Abb. 5-7 A-D (Tab. 5-5) wird der Einfluss der Druckunterstützung bis hin zum rein druckbetriebenen System deutlich. Das stempelförmige Flussprofil des EOF wird bei stärker werdender Druckunterstützung immer mehr vom parabolischen Flussprofil des hydrodynamischen Systems dominiert. Daher nahmen die Bodenzahlen signifikant mit höher werdendem Druck ab, obwohl bei kürzer werdenden Retentionszeiten ohne Änderung des Flussprofils das Gegenteil zu erwarten wäre.

Die geringe Druckunterstützung von 20 mbar (B), wie sie auch bei der optimierten Methode gewählt wurde, verringerte die Auflösung bei erheblicher Verkürzung der Elutionszeiten im Vergleich zu dem rein spannungsbetriebenen System (A) kaum.

Bei höherem Druck (200 mbar, D) verbesserte das Anlegen der Spannung (E) die Bodenzahlen jedoch nicht, sondern sie blieben im gleichen Bereich. Somit scheint hier das parabolische Druckprofil sehr ausgeprägt zu sein. Zudem ist der kleine Beitrag des EOF und damit die Dominanz des hydrodynamischen Antriebs (daher auch des parabolischen Profils) bei D und E in den kurzen und ähnlichen Elutionszeiten erkennbar. Außerdem ist es möglich, dass bei höheren Geschwindigkeiten das van-Deemter-Optimum verlassen wird. Da die van-Deemter-Kurve bei zunehmender Geschwindigkeit der mobilen Phase nur langsam ansteigt, ändern sich die Bodenzahlen nur wenig. So ist dies keine vollständige Erklärung für die drastische Abnahme der Bodenzahlen von A-D. Daher scheint die Art des Strömungsprofils einen größeren Einfluss auf die Bodenzahlen zu haben.

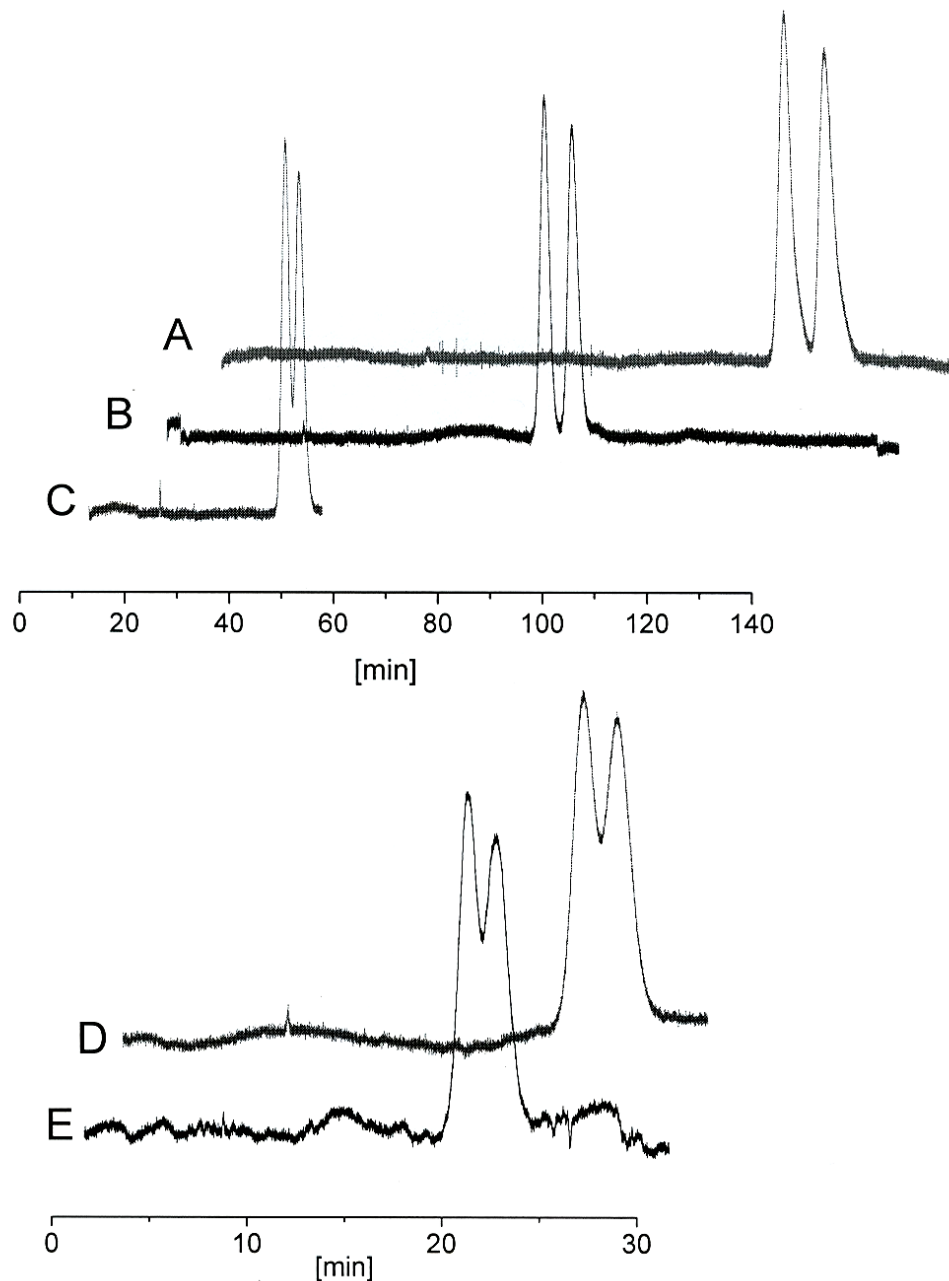


Abb. 5-7: Trennung des PCB 132 mittels o-CEC bzw. o-LC, Film: 0,2 μm Chirasil- β -Dex, 78 cm (eff. Länge) x 50 μm (i. d.), Phosphat/Borat Puffer 20 mM, pH 7,0, UV-Detektion bei $\lambda = 230$ nm
 A: 30 kV, 0 mbar, B: 30 kV, 20 mbar, C: 30 kV, 50 mbar, D: 0 kV, 200 mbar, E: 30 kV, 200 mbar

PCB 132	t_0	t_1	t_2	α	R_s	N_1	N_2
A	36,7	107,7	115,5	1,11	1,5	7 800	7 000
B	26,3	72,5	77,9	1,11	1,4	7 000	6 500
C	11,7	32,4	34,6	1,11	0,8	2 800	2 500
D	8,5	23,7	25,4	1,11	0,7	1 800	1 700
E	7,2	19,7	21,2	1,12	0,7	1 600	1 500

Tab. 5-5: Daten zu Abb. 5-7

5.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurde gezeigt, dass mit allen drei kapillarelektrochromatographischen Methoden atropisomeres PCB 132 in die Enantiomere getrennt werden kann. Die Lipophilie des PCB erschwerte die Trennbedingungen, da hohe organische Modifier-Anteile eingesetzt werden mussten. Dies führte zur Reduktion des EOF und damit zu langen Elutionszeiten. Hauptsächlich wird die Erniedrigung des EOF jedoch auf die Abschirmung der Silanolgruppen durch das Polymer Chirasil- β -Dex zurückgeführt. Insbesondere in der o-CEC traten lange Elutionszeiten für lipophile, neutrale Analyten auf. In der p-CEC war es möglich durch Beimischung von nativem Silica die Elutionszeiten zu verkürzen. Mittels Chira-Dex-Silica wurde ein ausreichend hoher EOF erreicht, jedoch war hier die Auflösung durch Peaktailing verringert.

Mit der rod-CEC-Kapillare („glued“ Chira-Dex-Silica) konnte eine Basislinientrennung erreicht werden, wobei eine unerwartet lange Elutionszeit trotz eines hohen EOF beobachtet wurde. Dies kann mit der Vergrößerung der Oberfläche, die aus der Verwendung von 3 μm Partikeln statt der in der p-CEC eingesetzten 5 μm Partikel resultiert, und/oder einem höheren Selektorgehalt erklärt werden. Dieser „particle-glued“ Monolith war eine stabile und robuste Stationärphase und zeigte gute Trenneigenschaften für Enantiomerentrennungen sowohl in der rod-CEC als auch in der rod-LC.

Die CEC-Methoden erwiesen sich erwartungsgemäß als effektiver als die entsprechende LC-Methode. Die Druckunterstützung war auch in der o-CEC von Vorteil, wobei bei zu hohen Drücken die Effizienzen drastisch zurückgingen.

5.2 Weiterentwicklung der o-CEC

5.2.1 Direkte Anbindung des Selektors an die Kapillarwand

Der Vergleich der Trennungen der atropisomeren PCB mittels der verschiedenen CEC-Kapillaren verdeutlichte, dass die gewählte o-CEC-Kapillare für das Trennproblem nicht ideal war. Obwohl die Trennbedingungen für die jeweiligen Kapillaren optimiert wurden, konnten die sehr langen Analysezeiten nicht sinnvoll verkürzt werden. Dies lag in erster Linie an der Abschirmung der Silanolgruppen durch das Polymer und dem daraus resultierend reduzierten EOF (s. Tab. 5-2).

Eine Weiterentwicklung von o-CEC-Kapillaren ist wegen ihrer Vorteile, die sie gegenüber gepackten Kapillaren haben, interessant. Beispielsweise fällt das Packen der Säulen, die Frittenherstellung und die schlechte Reproduzierbarkeit dieser Arbeitsschritte, weg. Die Luftblasenbildung, die durch Fritten verursacht wird, ist hier auch nicht relevant. Prinzipiell gibt es in der o-CEC sechs verschiedene Ansätze, um eine stabile Belegungsschicht und einen reproduzierbaren EOF zu erreichen, nämlich durch Adsorption, kovalente Bindung/Quervernetzung, poröse Schichten aus Silica, chemische Bindung nach Anätzung, den Sol-Gel-Prozess und „molecular imprinting“ [138].

Eine Möglichkeit, um die Abschirmung der Silanolgruppen durch das Chirasil- β -Dex Polymer zu vermeiden, war die direkte Anbindung des Selektors an die Kapillarwand. Die Herstellung einer Chira-Dex-Trennkapillare für den o-CEC-Modus erfolgte nach modifizierten Versuchsvorschriften aus [134]. 3-(Mercaptopropyl)-trimethoxysilan wurde an die Kapillarwand gebunden, wobei die Methoxygruppen mit den freien Silanolgruppen der Kapillarwand reagierten. Danach folgte die Anbindung des O-2-Mono(oct-7-enyl)-permethyl- β -CD an die Mercaptogruppe (s. Abb. 5-8). Die Reaktionen wurden direkt in der Kapillare durchgeführt. Daher waren Reaktionsbedingungen nicht so einfach zu überprüfen wie bei der Derivatisierung von Silicapartikeln in einem Reaktionskolben. Auch die Analytik, um Informationen über die chemische Zusammensetzung der Oberfläche zu erhalten, war erschwert. Dies stellt ein prinzipielles Problem bei der *in situ* Herstellung von Stationärphasen (z. B. bei Monolithen) in der Kapillare dar. Da sich die Reaktionsbedingungen im Gegensatz zu einem Reaktionsgefäß immer unterscheiden (zumindest durch Fluss

und Volumen) und dies Einfluss auf die Reaktionsprodukte haben kann, können die beiden Ansätze nicht direkt miteinander verglichen werden.

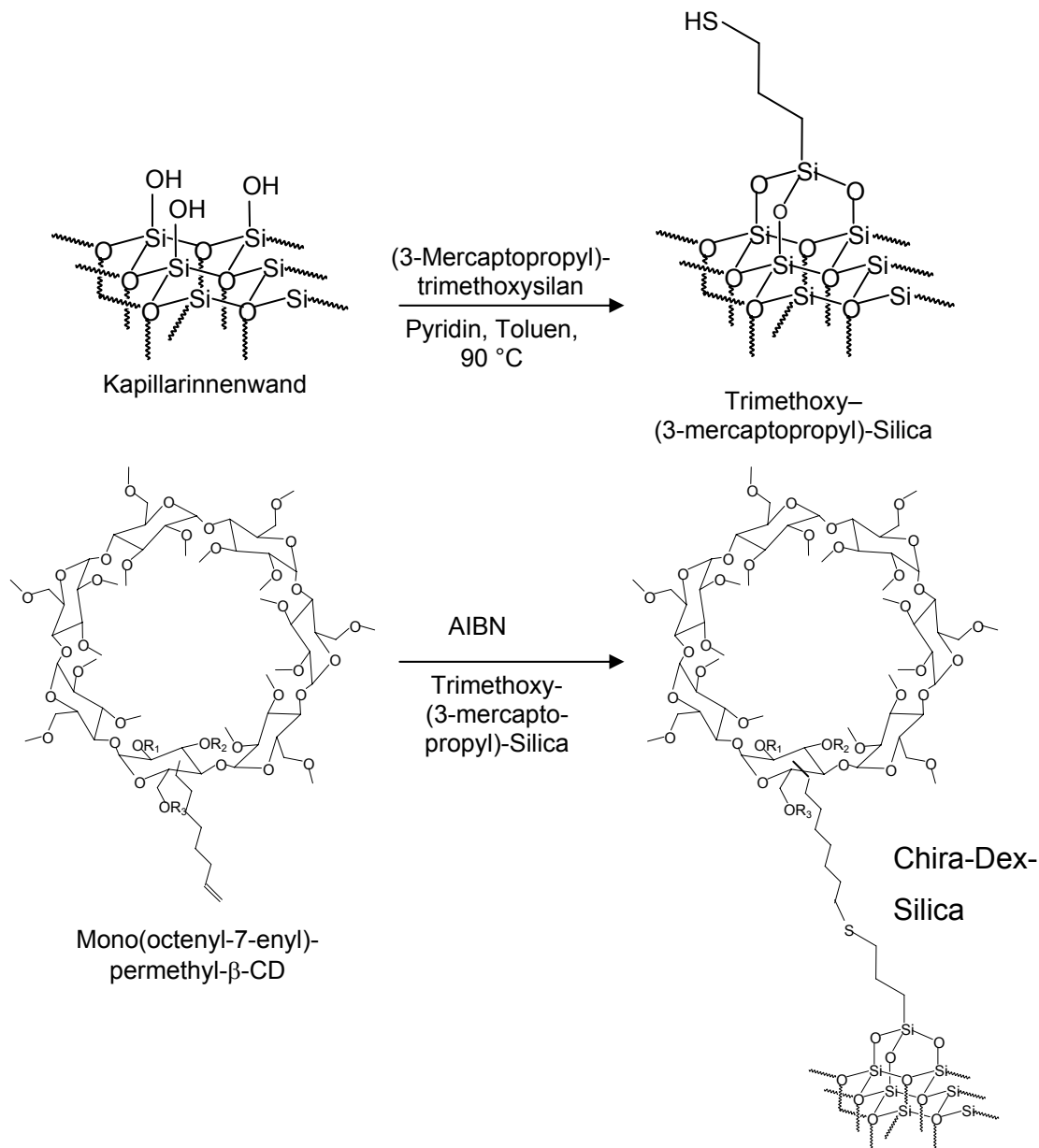


Abb. 5-8: Reaktionsschema zur Herstellung einer Chira-Dex o-CEC-Kapillare

Als mögliche Analysemethode zur Überprüfung der chemisch modifizierten Kapillaren wurde die Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) herangezogen [51]. Zur Untersuchungen mittels FT-IR musste der Polyimidfilm der Kapillare zunächst entfernt werden. Dann wurde die Kapillare mit KBr zerrieben. Der daraus hergestellte Pressling zeigte keine spezifischen Banden für die modifizierte Kapillare im Vergleich zu einer unbehandelten Kapillare. Demnach waren die Merkmale des

Cyclodextrins wie die C-H, C-O, C=O oder -OH Banden entweder zu schwach oder durch die übrigen Signale aus der Silica-Matrix oder durch adsorbiertes Wasser verdeckt. Auch für eine angeätzte und mit Selektor modifizierte Kapillare gab es keine zusätzlichen Signale. Selbst bei einer mit Chirasil- β -Dex belegten Kapillare, bei der der Cyclodextringehalt am höchsten ist, konnten keine Unterschiede zur Vergleichskapillare detektiert werden. Demzufolge eignete sich diese Methode nicht zur Überprüfung der Modifikationen. So stand zur Beobachtung der chemischen Modifikation der Kapillaroberfläche lediglich die Veränderung der Trenneigenschaften und die Änderung des EOF zur Verfügung.

Die Chira-Dex-Trennkapillare wurde auf ihre Trenneigenschaften hin im o-CEC-Modus untersucht. Eine Enantiomerentrennung konnte trotz Veränderung verschiedener Reaktionsparameter nicht erreicht werden, jedoch konnte eine Retention von Hexobarbital von ca. 1 Minute (bei 30 kV) gegenüber dem EOF-Marker DMF beobachten werden, die an einer nicht modifizierten Kapillare nicht auftritt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine chemische Veränderung der Kapillarwand stattgefunden hat. Dafür spricht auch die drastische Veränderung des EOF im Vergleich zu einer unmodifizierten Kapillare (s. Tab. 5-6).

DMF	30 kV	1000 mbar
Chira-Dex-Kapillare	29,1 min	3,9 min
Vergleichskapillare	19,6 min	3,9 min

Tab. 5-6: Durchflusszeiten auf einer Chira-Dex-Kapillare bzw. einer Vergleichskapillare, eff. Länge jeweils 120 cm x 50 μ m (i. d.), Phosphat/Borat 20 mM pH 7,0

Die Veränderung der Oberfläche fand nicht in gewünschter Weise bzw. in gewünschtem Maße statt, da für eine Enantiomerentrennung ein ausreichender Selektorgehalt vorhanden sein muss, damit genügend Möglichkeiten für den Selektanden bestehen, mit dem Selektor in Wechselwirkung zu treten.

Der Hauptnachteil der o-CEC ist das niedrige Stationärphasenverhältnis. Daher gibt es verschiedene Ansätze, um den geringen Selektorgehalt zu erhöhen. Neben der Polymerbelegungen (wie Chirasil- β -Dex) kann das Anätzen der Kapillarinnenwand das Problem lösen, wenn eine Erhöhung der Silanolgruppenzahl erreicht wird. So werden mehr Anbindungsstellen für den Selektor und ein höherer EOF erzeugt. Als

erstes wurde das Konzept der Anätzung der Oberfläche und deren Vergrößerung um den Faktor 1000 von Onuska *et al.* [135] für die GC eingeführt. Dies ermöglichte eine drastische Verkürzung der Kapillaren. Später wurde von Pesek *et al.* das Konzept der verwendeten 400 µm GC-Kapillaren für die o-CEC-Kapillaren mit einem Durchmesser von 20 und 50 µm modifiziert [136,137].

Eine weitere Möglichkeit die Oberfläche und damit die Selektorkonzentration und Ladungskapazität der Kapillare zu vergrößern, besteht in der Anwendung des Sol-Gel-Prozesses zur Generierung einer o-CEC-Kapillare mit einer porösen Struktur an der Kapillarinnenwand [52,138,139].

Im Folgenden wird die Anätzung als Möglichkeit zur Verbesserung des Stationärphasenverhältnisses in der o-CEC untersucht.

5.2.2 Anätzung der Kapillaren und weitere chemische Modifikation

5.2.2.1 Anätzung

Die Anätzung wurde optimiert, wobei mit einer modifizierten Literaturvorschrift [136] gearbeitet wurde. Als Ätzreagenz wurde methanolische Ammoniumhydrogenfluoridlösung verwendet, da die Handhabung einfacher und weniger problematisch als der direkte Gebrauch von HF ist. Je nach Wahl der Versuchsparameter wie Befüllungsdauer mit Ätzlösung, Temperatur, Ätzdauer, Anzahl der Ätzungen, Durchführung der Spülschritte, Kapillarcharge usw. wurden sehr unterschiedliche Ätzstrukturen erhalten. In der Literatur ist nur ein einmaliger Ätzschritt (3-4 h, 300-400 °C) angegeben. Die erhaltenen Strukturen sind dort selbst unter gleichen Bedingungen sehr unterschiedlich (vgl. abgebildete REM-Aufnahmen in Lit. [136] mit [140]).

Auch Abb. 5-9 zeigt REM-Aufnahmen einer Kapillare, die einmalig angeätzt wurde. Bei diesen Ätzversuchen konnten größtenteils nur vereinzelte Ablagerungen erhalten werden, wobei es sich um aufgelagertes Material und nicht eingätzte Strukturen handelte.

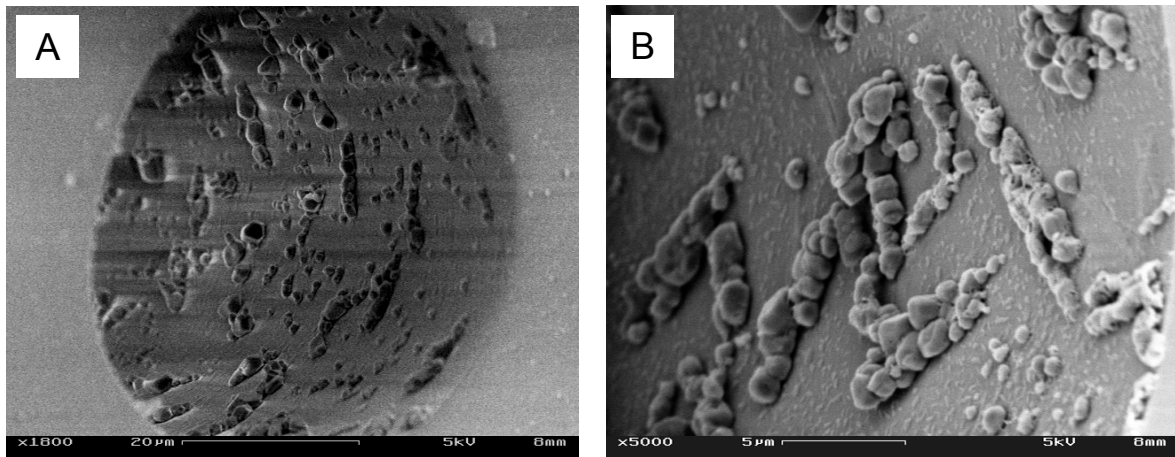


Abb. 5-9: Einfache Anätzung (300 °C, 4 h), Gesamtansicht (A) bei 1800facher Vergrößerung, Ansicht (B) bei 5000facher Vergrößerung

Bei einem einmaligen Anätzungsprozess unterschieden sich zudem die beiden Kapillarenden erheblich in ihrer Struktur, da durch die dynamische Belegung der Ätzlösung ein unterschiedlich dicker Film auf der Kapillarwand verblieb und daher beim Erhitzen eine andere Ätzwirkung zeigte. Mit der Veränderung der Ätzbedingungen ergaben sich bessere Ergebnisse. Dabei wurde die dynamischen Belegung mit Ätzreagenz, die Ätzdauer und die Anwendung einer mehrfachen Anätzung, wie im es folgenden dargestellt wird, optimiert.

Abb. 5-10 zeigt den optimierten Verlauf einer Anätzung. Bei einer zweifachen Anätzung wurde die Kapillare in den beiden Ätzschritten von verschiedenen Seiten mit Ätzreagenz belegt. Dadurch wurde eine gleichmäßigere Struktur in der Kapillare erreicht. Im ersten Ätzschritt waren prinzipiell Unterschiede von Kapillaranfang und -ende zu sehen (Abb. 5-10 (A-B)), die sich meistens bereits in einem weiteren Schritt angleichen (Abb. 5-10 (C) und (D)).

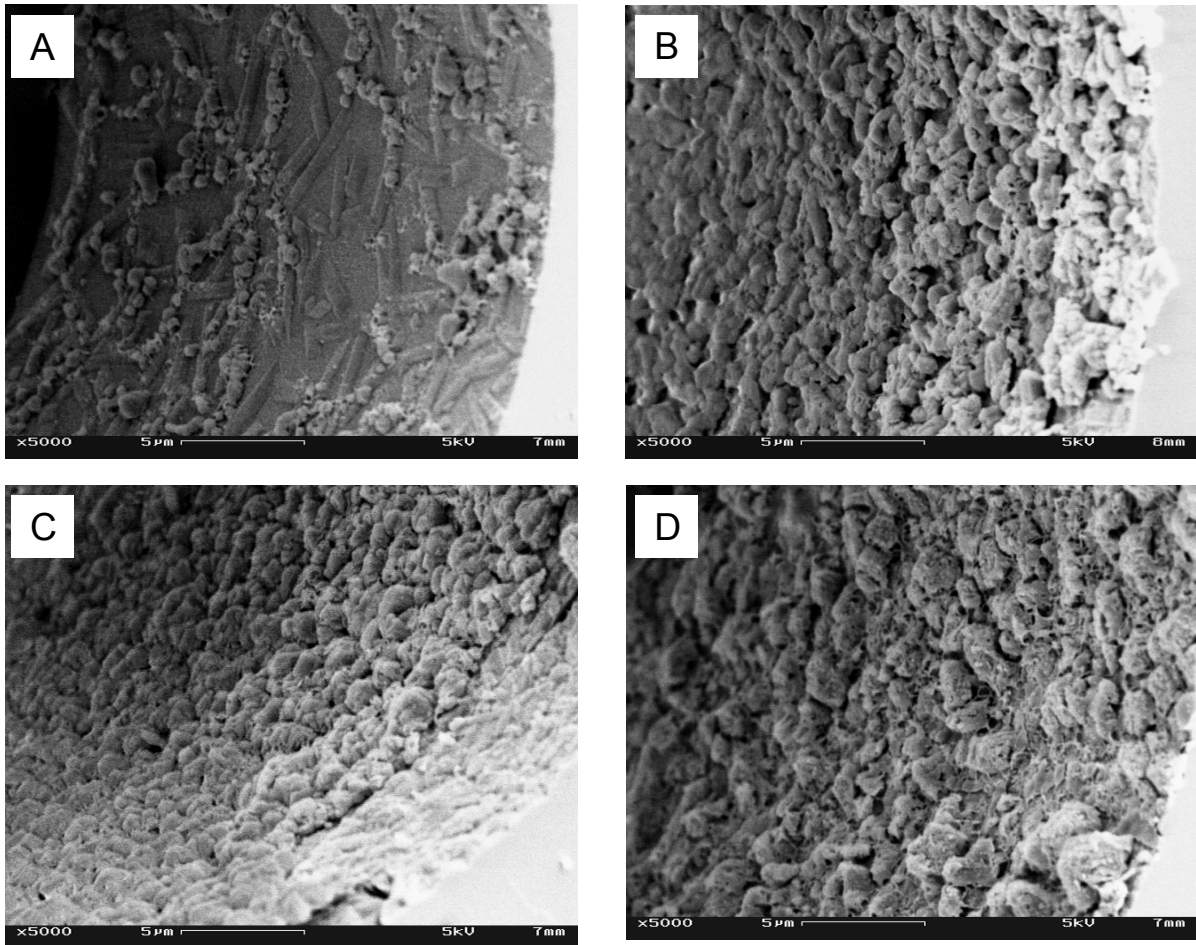


Abb. 5-10: Verlauf einer Anätzung: Kapillaranfang (A) und -ende (B) nach 1. Anätzungsschritt bei 300 °C, 3 h; Kapillaranfang (C) und -ende (D) nach 2. Anätzungsschritt bei 350 °C, 3 h, alle Vergrößerungen 5000fach

Anfangs schien sich ein Teil der ursprünglichen Oberfläche durch das Ätzreagenz zu lösen und wieder in größeren Stücken an der Kapillarwand auszufallen. Daher sind größere Schuppen und Ablagerungen bei den ersten Ätzschritten zu sehen. Bei häufiger und längerer Anätzung und höherer Temperatur (400 °C), wurde die neugebildete Oberfläche gleichmäßiger und definierter. In Abb. 5-11 sind aufeinanderfolgende Ätzschritte gezeigt, an denen sich die Wirkung verschiedener Ätzschritte gut nachvollziehen lassen. Erst nach mehrmaligem Anätzen zeigt die Topographie der Kapillare ein eingetztes, feines, definiertes und uniformeres Muster (s. Abb. 5-11 (D)). Anfangs hingegen fällt gelöstes Material an der Kapillarwand wieder aus (s. Abb. 5-9 und Abb. 5-11 (B)). Bei gleicher Vorgehensweise, Zeit und Temperatur konnten diese Strukturen gut reproduziert werden.

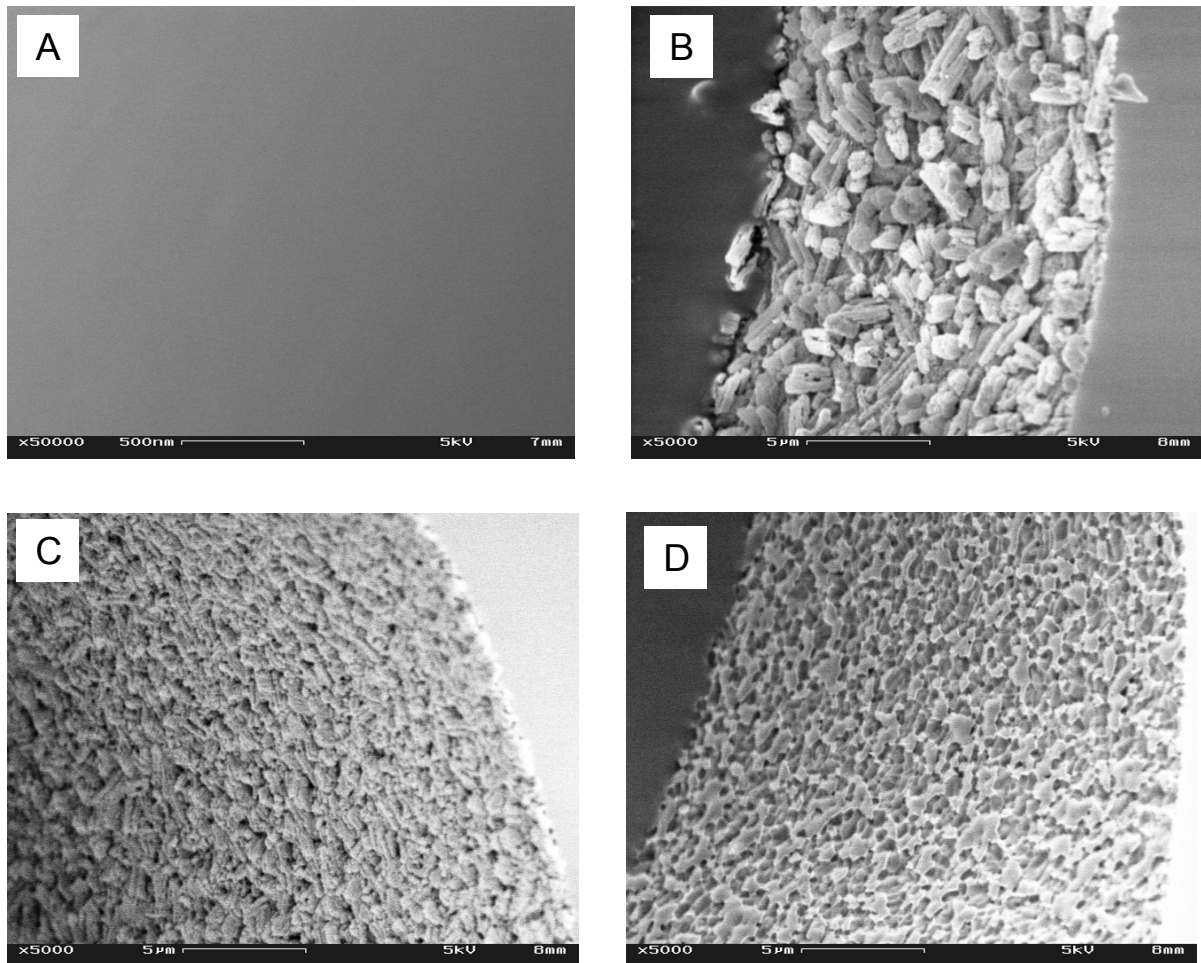


Abb. 5-11: Wirkung mehrerer, aufeinanderfolgender Ätzschritte, A: unangeätzte Kapillare, B-C: 1-2fach angeätzt Kapillare (4 h 300 °C), D: 4fach angeätzt: 2fach bei 300 °C 4 h und 2fach bei 350 °C 2,5 h, alle Vergrößerungen 5000fach

Neben den Vorteilen, die durch das mehrfache Anätzen erhalten wurden, gab es auch einige Probleme. Einerseits verstopfte die Kapillare oftmals nach dem Anätzschritt (s. Abb. 5-12 (A) und (B)) durch die Kristalle des Ätzreagenzes bzw. durch die gelösten und wieder ausgefallenen Teile der Kapillare. Andererseits musste darauf geachtet werden, dass der Polyimid-Film nicht durch das Ätzreagenz angegriffen (s. Abb. 5-12 (C)) und damit äußerst brüchig wurde.

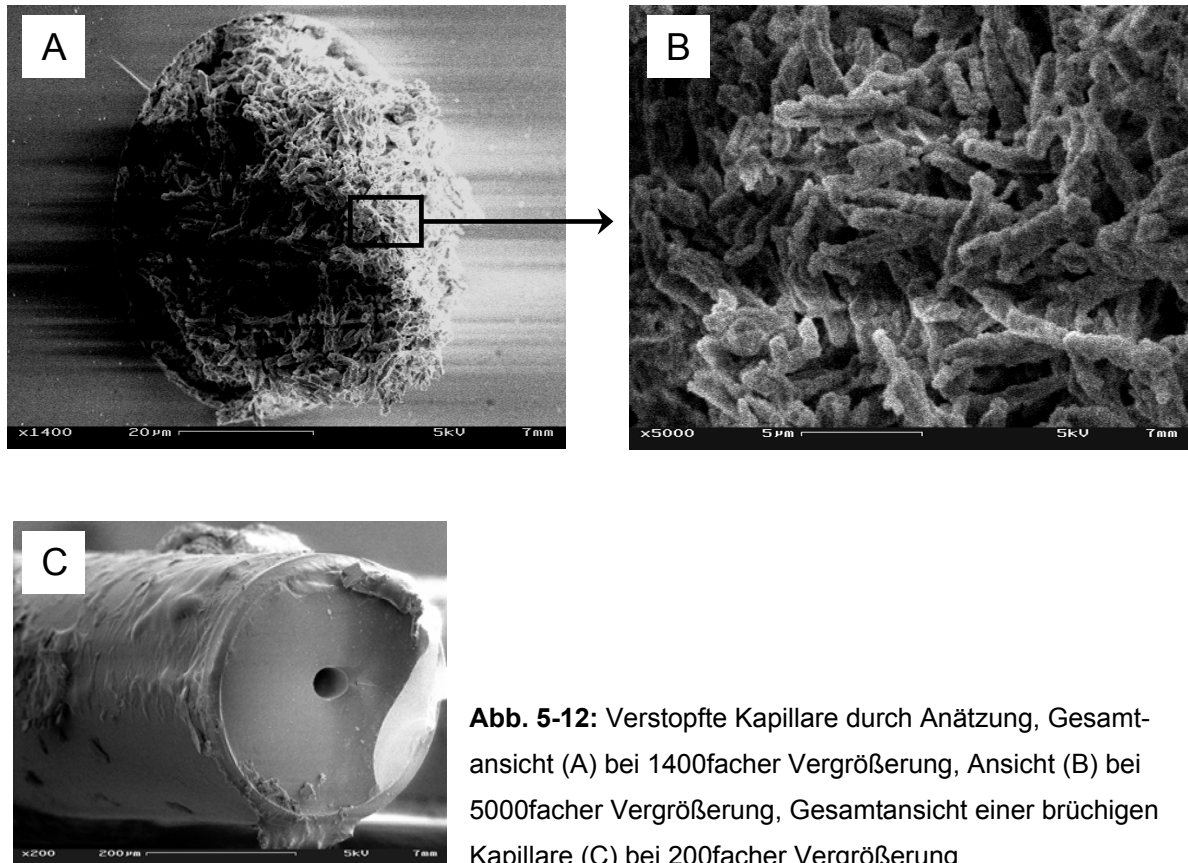


Abb. 5-12: Verstopfte Kapillare durch Anätzung, Gesamtansicht (A) bei 1400facher Vergrößerung, Ansicht (B) bei 5000facher Vergrößerung, Gesamtansicht einer brüchigen Kapillare (C) bei 200facher Vergrößerung

5.2.2.2 Anbindung des Selektors an die angeätzte Kapillarwand

Nachdem die entscheidenden Arbeitsschritte untersucht wurden, um über die ganze Kapillarlänge hinweg eine gleichmäßige, definierte und reproduzierbare Anätzung der Trennsäulenwand zu erhalten, wurde die angeätzte Oberfläche für den Bindungsschritt aktiviert. Dabei sollte durch geeignete Spülschritte (mit NaOH und Wasser) eine möglichst hohe Silanolgruppendichte bereitgestellt werden. Dann wurde das 3-(Mercaptopropyl)-trimethoxysilan angebunden, wobei die Anbindungshäufigkeit durch die Anzahl der freien Silanolgruppen der Kapillarwand limitiert war, da die Methoxygruppen mit ihnen reagierten (s. Abb. 5-8). Die Anbindung des O-2-Mono(oct-7-enyl)-permethyl- β -CD erfolgte über die Mercaptogruppe.

Mit diesen derivatisierten Kapillaren konnten jedoch keine Enantiomerentrennungen erreicht werden. Dies kann mehrere Ursachen haben. Eventuell lief einer der Reaktionsschritte nicht oder nur in geringem Maße ab. Das Hauptproblem bestand aber sicherlich darin, dass trotz angeätzter und damit vergrößerter Oberfläche der Kapillarwand nicht genügend freie Silanolgruppen zur Verfügung standen und für die Enantiomerentrennung nur unzureichende Mengen des Selektors angebunden werden konnten. Da die Geschwindigkeit des EOF von der Anzahl der Ladungen an

der Kapillarwand abhängig ist (ζ -Potential), kann der Gehalt an freien Silanolgruppen indirekt darüber bestimmt werden. Daher sprechen die Messungen, in denen die Geschwindigkeiten des EOF in angeätzten und nicht behandelten Kapillaren bestimmt wurden, für eine geringe Menge an vorhandenen freien Silanolgruppen, da der EOF in den angeätzten Kapillaren prinzipiell wesentlich langsamer war (s. Abb. 5-13).

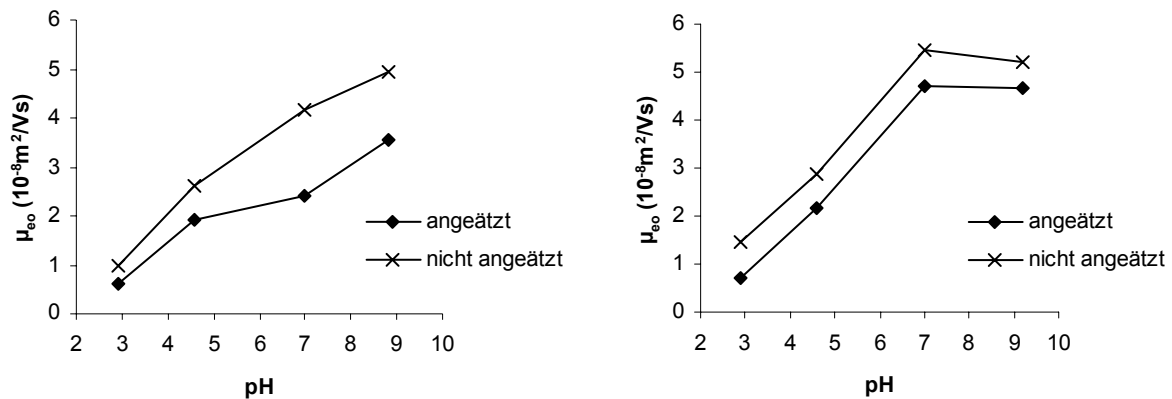


Abb. 5-13: EOF-Geschwindigkeiten (μ_{eof}) zweier angeätzter Kapillaren und deren Vergleichskapillaren, eff. Länge: links 1,30 m, rechts 1,135 m (Kapillare aus Abb. 5-11(D)), Puffer: pH 7,0: Phosphat/Borat 20 mM, pH 9,1: Phosphat/Borat 20 mM, pH 4,6: Phosphat 20 mM, pH 2,9: Phosphat 20 mM, 30 kV

Somit konnten trotz immenser Oberflächenvergrößerung keine weiteren freien Silanolgruppen, die für die Anbindung von Selektor notwendig sind, gebildet werden.

5.2.2.3 Diskussion der Ergebnisse

Pesek, Matyska *et al.* [51,136,137,140,141,142] berichten, dass in den meisten Fällen eine Umkehr des EOF bei niedrigen pH-Werten ($< 4,5$) in den angeätzten und chemisch modifizierten Kapillaren beobachtet wurde und führen dies auf positiv geladene Gruppen an der Oberfläche der Kapillare zurück, die aus dem Ätzreagenz stammen. Demnach handelt es sich um eine Ammoniumspezies, die bei einem niedrigen pH-Wert positiv geladen ist. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie bei keiner der Kapillaren gemacht werden. Daher schienen sich die Oberflächenbeschaffenheit der Kapillaren zu unterscheiden. Jedoch verhielt sich der Einfluss der Temperatur und der Ätzdauer, wenn hier auch Mehrfachanätzungen nötig waren, auf die resultierende Struktur ähnlich.

Wenn sehr viel des Ätzreagenzes, und damit positiv geladene Spezies in die neue Struktur der Kapillaroberfläche eingebaut oder angelagert wird, ist ein kathodisch

gerichteter EOF bei niedrigen pH-Werten vorstellbar, vor allem, wenn nach der Anbindung des Selektors die Silanolanzahl noch weiter reduziert ist. Jedoch sprechen Pesek *et al.* bei hohen pH-Werten von einem, im Vergleich zu unangeätzten Kapillaren, verminderten anodischen EOF. Es ist zwar vorstellbar, dass die Verringerung des EOF von der partiellen Kompensation der negativ geladenen Silanolgruppen durch die positiv geladenen Ammoniumverbindungen bewirkt werden kann. Aber bei hohen pH-Werten ist davon auszugehen, dass die aus dem Ätzreagenz in die Matrix inkorporierten Ammoniumspezies deprotoniert sind und als neutrale Gruppen keinen Einfluss auf den EOF haben. Demnach ist bei hohen pH-Werten nur die Anzahl der Silanolgruppen für den EOF verantwortlich. Daraus folgt, dass bei Pesek *et al.* ebenso eine Verminderung der freien Silanolgruppen bei dem Ätzprozess auftrat, wie es auch in den hier untersuchten Anätzungen der Fall war.

Da in der Literatur die Anbindung des Selektors über eine Silylierung/Hydro-silylierungsreaktion erfolgt, ist auch hier die Anzahl der Silanolgruppen für die resultierende Selektordichte entscheidend. So trägt die Oberflächenvergrößerung entgegen der Behauptungen in [138,141] nicht zu einer höheren Kapazität der Stationärphase bei. Selbst Pesek und Matyska berichten in [136], dass der reduzierte EOF mit der durch den Ätzprozess verringerten Anzahl an freien Silanolgruppen erklärt werden kann.

Daneben gibt es nach [141] weitere wichtige strukturelle Änderungen in einer angeätzten Kapillare, die zu einem besseren Stationärphasenträger in der o-CEC führen. Durch strahlenförmige Vergrößerungen und Poren müssen Analyte kleinere Entfernungen zurücklegen, um mit der Stationärphase in Wechselwirkung zu treten. Wenn jedoch durch die Anätzung ein verminderter Selektorgehalt vorhanden ist, wird trotzdem eine geringere Wechselwirkungshäufigkeit zwischen Selektor und Analyt als an einer unangeätzten Kapillare auftreten.

Vielmehr wirkt sich der in der Literatur beschriebene Einbau des Ätzreagenzes in die Kapillarwand auf den EOF und die Adsorption vor allem basischer Moleküle aus. Dabei wird die Polarität der Kapillare verändert und durch eine andere Geschwindigkeit der mobilen Phase, liegen andere Trennbedingungen vor. So können die besseren Trennungen einiger Amine, von denen in der Literatur [142] berichtet wird, an den angeätzten Kapillaren im Gegensatz zu den nicht angeätzten Kapillaren erklärt werden. Auch einige Aminosäuren und Proteine konnten Pesek *et al.* [137] in der o-CEC an angeätzten und mit C₁₈ modifizierten Kapillaren besser als an aus-

schließlich mit C₁₈ modifizierten Kapillaren trennen. Diese basischen Moleküle werden von der Kapillarwand weniger stark adsorbiert als bei der silanolgruppenreichen Vergleichskapillare und auch der veränderte EOF könnte von Vorteil sein. Jedoch ist dazu nicht unbedingt die Anätzung einer Kapillarwand notwendig, da zu erwarten ist, dass ein simples Belegen der Kapillare mit einem Polymer, an das eventuell der entsprechende Selektor gebunden ist, ähnliche Eigenschaften aufweisen kann. Eine Polymerbeschichtung kann die Polarität der Kapillare verändern und die Silanolgruppen abdecken, damit auch basische Analyte eluieren und gute Peakformen ergeben.

Weder die unternommenen Untersuchungen noch die Ergebnisse in der Literatur unterstützen die These, dass das extrem niedrige Stationärphasenverhältnis in der o-CEC durch die Anätzung und die damit erhöhte Oberfläche verbessert werden kann. Die Methode kann analytabhängig zwar bessere Trennungen erzielen, aber für die Enantiomertrennungen mit o-CEC-Kapillaren, bei denen der Selektor direkt an die Kapillarwand gebunden wird, kann keine Verbesserung erwartet werden.

Fazit:

Der Ätzprozess ist ein sehr aufwendiges und zeitintensives Verfahren, wobei die Vergrößerung der Kapillarwand hier keine Vorteile im Hinblick auf Verbesserung des Stationärphasenverhältnisses bieten konnte. Die Veränderung der Säulenpolarität und/oder der herabgesetzte EOF, der für die in der Literatur beschriebenen Trennungen einiger Analyte vorteilhaft ist, sollte sich auch mit einer Polymerbelegung in ähnlichem Maße herbeiführen lassen.

Die für Enantiomertrennungen wichtige Erhöhung an Selektorgehalt kann mit dieser Methode nicht erreicht werden. Demnach scheinen diese Ergebnisse im Widerspruch zu Veröffentlichungen, wie beispielsweise [16,138,139,141,143,144,145], die im Zusammenhang mit dem Anätzen erschienen sind, zu stehen. Dort wird von einer Vergrößerung des Stationärphasenverhältnisses ausgegangen. Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen werden durch die Messungen von Liu *et al.* [146] ergänzt. Das Phasenverhältnis war hier nur um den Faktor 1,64 verbessert, obwohl eine über 1000fach vergrößerte Oberfläche zur Verfügung stand, an die die Stationärphase aus Avidin adsorbiert werden konnte. Eine geringe Dichte von freien Silanolgruppen an frei zugänglicher Oberfläche der Kapillarwand und die Anwesenheit von positiv geladenen Gruppen wirken sich auch hier negativ aus.

6 Optimierung und Validierung einer CE-Methode zur Untersuchung der Enantiomerenreinheit von MDA, MDE und MDMA

6.1 Wirkung und Toxizität von MDA, MDE und MDMA

Amphetaminderivate wie 3,4-Methylendioxyamphetamin (MDA), *N*-Ethyl-3,4-methylendioxyamphetamin (MDE) und *N*-Methyl-3,4-methylendioxyamphetamin (MDMA, „Ecstasy“) sind die am häufigsten illegal synthetisierten und konsumierten Drogen in Europa und in den USA. Eine kontinuierliche Zunahme von Amphetaminderivaten ist über die letzten Jahre hinweg zu verzeichnen [147]. Die Droge wird meist in Form einer Ecstasy-Pille (s. Abb. 6-1) eingenommen. Dabei nimmt der Konsument eine Stoffmischung zu sich, wobei die wichtigsten Wirkstoffkomponenten MDA, MDE und MDMA sind. Je nach Pille kann die Zusammensetzung und Konzentration der Inhaltstoffe stark variieren.



Abb. 6-1: Ecstasy-Pillen: „Boxhandschuh“, „Smiley 2“ und „Totenkopf, KILLERS“
(Quelle: BKA-Homepage Wiesbaden)

Amphetamin und -derivate (s. Abb. 6-2) lassen sich von Phenethylamin ableiten und tragen somit dasselbe Pharmakophor wie Neurotransmitter, wie z. B. Adrenalin, Dopamin und Serotonin. Je nach Wirkung werden Amphetamin und dessen Derivate in verschiedene Gruppen eingeteilt, in Stimulantien (z. B. Amphetamin), Halluzinogene (z. B. 2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamin) oder Entactogene⁶. Zu letzteren Gruppe werden die untersuchten Derivate MDA, MDE und MDMA zugeordnet. Entactogene haben eine einzigartige pharmakologische Wirkung auf den Menschen, denn sie erhöhen die Fähigkeit und Bereitschaft persönliche Probleme zu erkennen

⁶ Entactogen: von „en“ (griech.): innen, „tactus“ (lat.): Berührung, „gen“ (griech.): hervorbringen, d. h. eine innere Berührung hervorbringend [148].

und sie zu bewältigen. Daher wurde MDMA in der Psychotherapie bis 1986 eingesetzt.

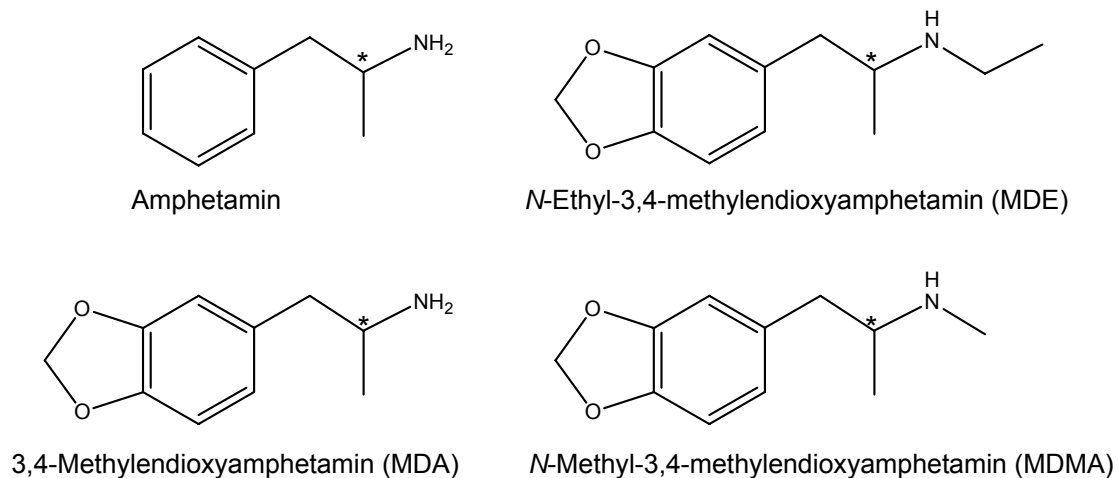


Abb. 6-2: Strukturformeln von Amphetamin und einigen Amphetaminderivaten

MDA, MDMA und MDE wirken stark dosisabhängig. Bei niedriger Dosis stehen anregende bis stimulierende Wirkungen im Vordergrund, bei höheren Dosen ist auch eine halluzinogene Wirkung möglich. In Tab. 6-1 sind die unterschiedlichen Wirkungsweisen und einige Daten von MDA, MDE und MDMA aufgeführt.

Name	MDA	MDE	MDMA
Geschichte	1910 als Hustenmittel und Medikament gegen den grauen Star entwickelt	1980 entdeckt	1912 als Appetitzügler von der Firma Merck entwickelt, Mitte der 70iger Jahre Einsatz in der Psychotherapie bis 1986, jetzt v.a. Partydroge auf Raves
BtmG unterstellt	seit 1.9.1984	seit 15.4.1991	seit 1.8.1986
unterschiedliche Wirkungsweise	intensive Verzerrung des Raum- und Zeit-erlebnisses, Sinnes-täuschungen, starkes Nervengift	insgesamt schwächere Wirkung, akustische, taktile und visuelle Sinneswahr-nehmungen verstärkt, wenig halluzinogen, macht ‚breiter‘	stundenlange milde Euphorie, spannungslösend und stark antriebssteigernd, wenig halluzinogen
Wirkungsdauer	8-12 Stunden	3-5 Stunden	4-6 Stunden
Dosis	80-160 mg	100-200 mg	80-150 mg

Tab. 6-1: Informationen zu den entactogenen Substanzen MDA, MDE und MDMA
[149,150,151]

Die Wirkung der 2,3-Methylenedioxyamphetamine ist zudem stark von der absoluten Konfiguration des stereogenen Kohlenstoffs und der Länge des Alkylsubstituenten am Stickstoffatom (vgl. Tab. 6-1 und Abb. 6-2) abhängig [152].

Diese Ecstasy-Derivate werden zwar als Racemate eingenommen, jedoch weisen die einzelnen Enantiomere unterschiedliche Wirkungen auf. Die (*S*)-Enantiomere sind Eutomere, d. h. die pharmakologisch wirksamen Enantiomere, während die (*R*)-Enantiomere nur schwache halluzinogene Wirkung haben [149,153,154]. Auch der Metabolismus der jeweiligen Enantiomere unterscheidet sich stark: Die (*S*)-Enantiomere zeigen einen niedrigeren Plasmaspiegel, da MDMA und MDE enantioselektiv metabolisiert werden, während MDA einer erhöhten renalen (über die Niere) Ausscheidung unterliegt [155,156].

Die entactogene Wirkung kommt durch eine rasche Serotoninfreisetzung und Blockierung der Wiederaufnahme („Reuptake“) durch Anbindung an Serotonin-Transporter zustande [157], wobei ein Anstieg der Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt zu verzeichnen ist. Die halluzinogene Wirkung durch die (*R*)-Enantiomere wird hingegen durch die agonistische Wirkung am 5-HT_{2a} Rezeptor verursacht und ist insbesondere beim (*R*)-MDA ausgeprägt [158].

Zusätzlich zur akuten Intoxikation mit Symptomen wie z. B. Pulsbeschleunigung, Panik, Fieber und Bewusstlosigkeit konnten im Tierversuch mit Menschenaffen auch die Zerstörung serotoninogener Neuronen festgestellt werden. Diese Hirnschädigungen konnten auch bei Ecstasy-Konsumenten nachgewiesen werden [159]. So können bei Daueranwendungen Nervenschädigungen auftreten, die Depressionen, Gefäßschädigungen und eine Abnahme der Lernfähigkeit zur Folge haben [160].

Neben der neurotoxischen Wirkung des MDMA, gibt es einen Bericht über einen Parkinson-Patienten, bei dem durch die Einnahme von Ecstasy-Tabletten die Symptome der Krankheit verschwanden [161]. Auch in Tierexperimenten mit Ratten zeigten MDA, MDE und MDMA antiparkinsonale Wirkung, jedoch wird die Ursache bislang nicht verstanden [162].

6.2 Gründe für den Bedarf einer zuverlässigen Reinheitskontrolle

Um die Wirkmechanismen und die Metabolisierung zu untersuchen und die Wirksamkeit der Amphetaminderivate gegen die Symptome der Parkinson Krankheit zu ergründen, werden Tier- und später auch Humanstudien durchgeführt. Lebsanft *et al.* [163] berichteten über den Einsatz einzelner Enantiomere und des Racemates von MDMA, wobei die Substanzen mit der hier entwickelten Methode auf ihre Reinheit hin untersucht wurden. In diesen Tierstudien mit Ratten, bei denen Parkinsonsymptome ausgelöst wurden, wurde festgestellt, dass das (S)-Enantiomer eine effektivere Wirkung als das (R)-Enantiomer hatte. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass das (R)-Enantiomer die Wirkung des (S)-MDMA verstärken kann, da das Racemat einen stärkeren Effekt als die reinen Enantiomere hatte. Daher werden unterschiedliche neurochemische Reaktionen der Enantiomere, d. h. unterschiedliche Wirkungsmechanismen, vermutet.

Für diese Experimente muss die Enantiomerenverunreinigung unter 1% liegen, um eine Überlagerung der unterschiedlichen Wirkungen der Enantiomere zu verhindern, damit eindeutige und nachvollziehbare Ergebnisse erzielt werden können. So könnte das potentere (S)-Enantiomer selbst in kleineren Mengen die Wirkung des (R)-Enantiomers beeinflussen. Dabei sollte auch ausgeschlossen werden können, dass relevante Mengen an Edukt, beispielsweise das unter den untersuchten Amphetaminderivaten stärkste Nervengift MDA im Produkt MDE oder MDMA enthalten ist. Folglich muss eine Analysemethode entwickelt und validiert werden, die eindeutige Daten über den Reinheitsgrad der Enantiomere der verschiedenen Amphetaminderivate möglichst innerhalb einer Methode liefert.

Neben der pharmakologischen Fragestellungen ergeben sich durch die weite Verbreitung des Ecstasykonsums und dessen illegaler Herstellung weitere wichtige analytische Aufgaben. Für diese Untersuchungen werden reine Enantiomere als Standards benötigt.

6.3 Status quo und Vorteile der CE

Bislang wurden HPLC-Methoden zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von MDA, MDE und MDMA verwendet. Jedoch sind für die Bestimmung drei verschiedene Stationärphasen erforderlich [164]. Dies birgt Nachteile aufgrund der

langen Analysedauer und möglicher Koelutionen. Um eine schnellere und exaktere Bestimmung der Enantiomerenreinheit dieser Amphetamin-Derivate zu bewerkstelligen, sollte eine einzige CE-Methode entwickelt, optimiert und validiert werden. Ein Vorteil der CE für die Bestimmung ist, dass keine Derivatisierung der Proben, wie beispielsweise in der GC nötig ist. Gegenüber der HPLC bietet die CE noch folgende Vorteile:

- hohe Peakauflösung
- leicht variierbares Trennsystem durch schnellen Puffer- und Selektorwechsel
- viel schnellere Konditionierung der Kapillare für den nächsten Lauf
- polare ionisierte und ungeladene Analyten sind sehr einfach unter gleichen Bedingungen trennbar

Im Hinblick auf die Validierung ist ein kommerzielles und reproduzierbares System wichtig. Daher scheidet die CEC als zu validierende Methode aus.

6.4 Methodenentwicklung

Für Reinheitsbestimmungen sollte eine selektive Trennung mit ausreichend großer Auflösung in möglichst kurzer Analysezeit entwickelt werden. Hierzu wurden folgende Parameter ausgewählt und optimiert:

- Auswahl eines Selektors für eine effiziente Auslösung
- Auswahl eines geeigneten „Hintergrundelektrolyten“ (BGE)
- Optimierung der Konzentration des BGE und des Selektors
- Optimierung der Kapillarlänge
- Auswahl der optimalen Spannung

Einige Parameter waren dabei limitiert. Einerseits musste eine Methode ohne EOF gewählt werden, da ansonsten die Validierung nicht möglich wäre. Die unterschiedlichen Kapillaren verschiedener Hersteller würden eine zu große Streuung der Messergebnisse aufgrund der differierenden EOF liefern. Daher wurde ein Puffer mit dem pH-Wert von 2,5 gewählt. Andererseits musste aufgrund des Absorptionsmaximums der untersuchten Amphetaminderivate von 200 nm ein geeigneter Puffer ausgewählt werden, der selbst ein entsprechend niedriges Absorptionsmaximum in diesem Wellenlängenbereich hat, um eine möglichst

niedrige Nachweisempfindlichkeit zu gewährleisten. Hier erwies sich ein Phosphatpuffer als geeignet. Ein eventueller organischer Modifizierzusatz ist aus dem selben Grund auf Acetonitril beschränkt [165].

6.4.1 Auswahl eines geeigneten Selektors

6.4.1.1 Theorie zu chiralen Trennungen mittels CE

Da Enantiomere identische Masse/Ladungs-Verhältnisse haben, muss eine chirale Umgebung in der Pufferlösung erzeugt werden, um sie mittels CE trennen zu können. Dies geschieht mithilfe chiraler Additive zum BGE, den sogenannten Selektoren. Die am häufigsten verwendeten Selektoren sind Cyclodextrine und deren Derivate [104]. Weitere verwendete chirale Selektoren sind beispielsweise derivatisierte Polysaccharide [166], chirale Kronenether [167], chirale Calixaren-derivate [168], chirale Metallkomplexe [92], Glycopeptide (z. B. Vancomycin [169]) und Proteine (z. B. BSA [170]). Ein großer Vorteil der Cyclodextrine und ihrer verwendeten Derivate ist die geringe Eigenabsorption im UV-Bereich, da beispielsweise bei Calixarenen, die hohe Eigenabsorption zeigen, die Detektion erschwert ist. Die Trennung in die Enantiomere erfolgt durch Komplexbildung mit dem chiralen Selektor zu diastereomeren Komplexen („Wirt-Gast-Komplexen“) mit unterschiedlichen Komplexbildungskonstanten [86]. Die chirale Erkennung erfolgt meist über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, über sterische Effekte und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Neben der höheren Affinität eines Enantiomers zum Selektor (höhere Komplexbildungskonstante) ist es auch denkbar, dass die zwei gebildeten diastereomeren Komplexe aus Enantiomer und Cyclodextrin unterschiedliche Mobilitäten aufweisen [171]. Wenn dies der Fall ist, werden die beiden Diastereomere nur aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld getrennt.

Die einfache Erzeugung der chiralen Umgebung durch Zusatz des chiralen Selektors zum Trennpuffer stellt einen großen Vorteil der CE gegenüber klassischen chromatographischen Methoden dar. Sonst sind aufwendige Synthesen nötig, um die Selektoren an das Trägermaterial zu binden. Daher ist der Test neuer Selektoren mittels CE ein sehr schnelles und bequemes Verfahren. Da beispielsweise die Komplexbildungskonstante von Enantiomer und Selektor für die CE berechnet werden kann, können anhand dieser Untersuchungen neue stationäre Phasen für die

HPLC und CEC entwickelt werden. Natürlich können sich die Selektor-Selektand-Wechselwirkungen durch Immobilisierung des Selektors bei der Synthese der Stationärphase verändern, aber diese Untersuchungen liefern wichtige Informationen über die Wechselwirkungsmechanismen und damit der Trenneigenschaften eines Selektors. Trotz vieler Computer-Modellierungsrechnungen werden die chiralen Erkennungsmechanismen noch nicht für viele chirale Selektoren und Analytklassen verstanden. Daher beruht die Wahl des richtigen Selektors und der optimalen Bedingungen im Allgemeinen auf dem „Trial and Error“ Prinzip [93,104].

In Abb. 6-3 sind mögliche Trennsysteme in der CE aufgezeigt. Hierbei handelt es sich um ein vereinfachtes System, da durch den gewählten pH-Wert der EOF keinen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeiten der Analyte hat. Somit sind nur die elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten der Analyten, Selektoren und der diastereomeren Komplexe aus Enantiomer und Selektor relevant. Aus diesem Grund muss mindestens das zu trennende Enantiomerenpaar oder der chirale Selektor unter den gegebenen Bedingungen geladen sein, damit eine Trennung in die Enantiomere stattfinden kann, da hier keine zusätzliche (u. U. nur achirale) Stationärphase vorhanden ist.

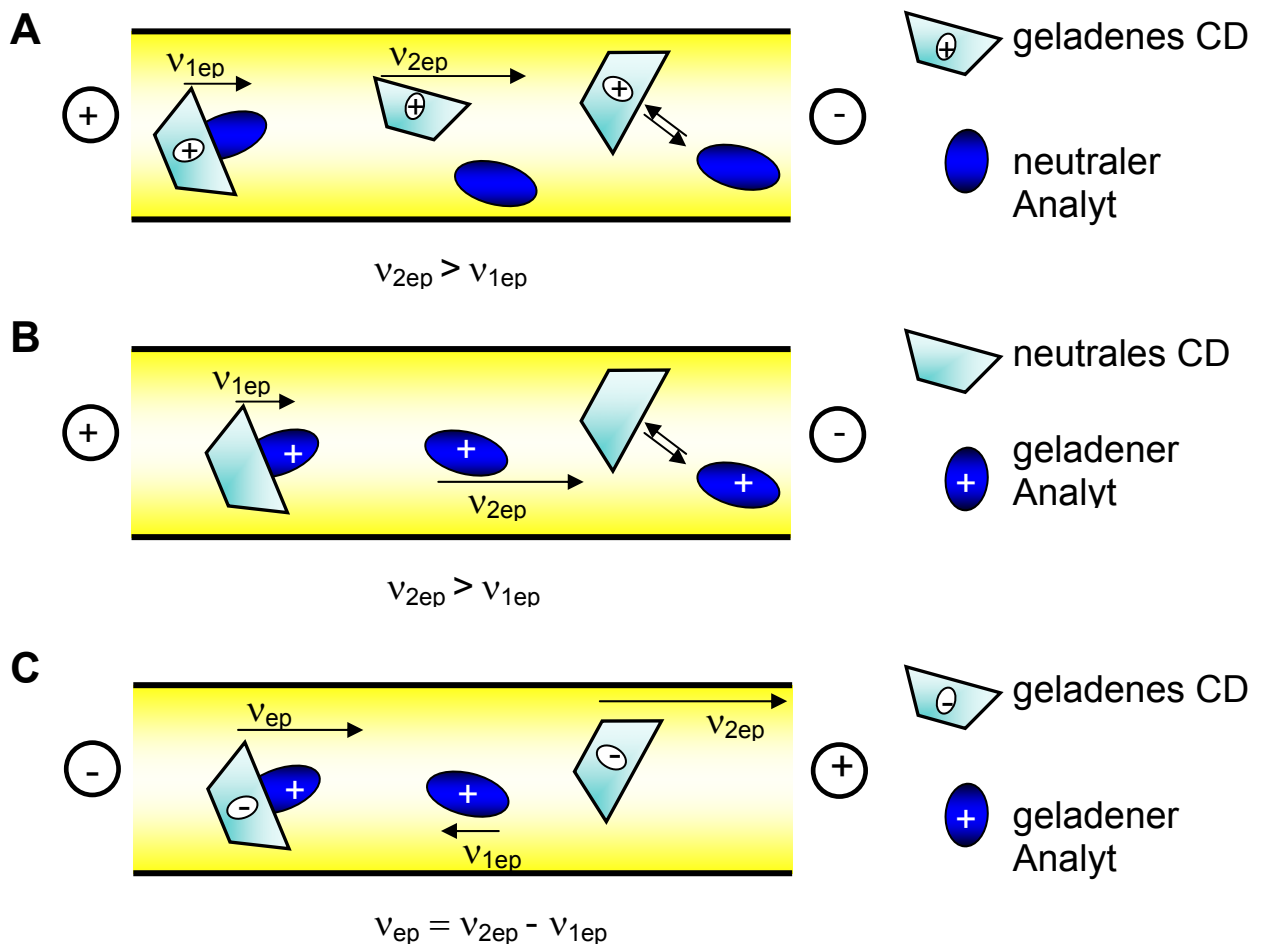


Abb. 6-3: Schematische Darstellung möglicher CE-Trennsysteme mit CD-Selektoren bei $\text{pH} < 2,5$, $\text{EOF} = 0$

Um Enantiomerenreinheiten zu ermitteln, muss eine genaue Bestimmung kleiner Verunreinigungen in Gegenwart der Hauptkomponente erfolgen. Dazu ist eine Auflösung von $R_S > 2$ nötig, bzw. von $R_S > 5$ empfehlenswert [172]. Nach Möglichkeit sollte die Verunreinigung stets vor der Hauptkomponente eluieren, da ansonsten eine (teilweise) Überdeckung des kleinen Peaks durch ein Tailing der Hauptpeaks möglich ist [173]. Eine dafür notwendige Umkehr der Elutionsreihenfolge ist durch Verwendung unterschiedlicher CD-Derivate, die sich in ihrer chiralen Erkennung unterscheiden, möglich. Ferner kann eventuell auch durch Änderung der elektro-phoretischen Bedingungen (pH-Wert, Ladung des Selektors, Konzentration des Selektors, usw.) eine Umkehr der Migrationsreihenfolge erreicht werden.

6.4.1.2 Untersuchungen der Selektoren mittels ESI-MS

Für die chiralen Trennungen von MDMA, MDA und MDE wurde eine Reihe von Selektoren getestet. Zunächst wurden diese mittels ESI-MS charakterisiert, damit ein Vergleich der Trenneigenschaften bei equimolaren Konzentrationen möglich wird. In Abb. 6-4 bis Abb. 6-6 sind die ESI-MS-Spektren dreier sulfatierter Cyclodextrine aufgezeigt.

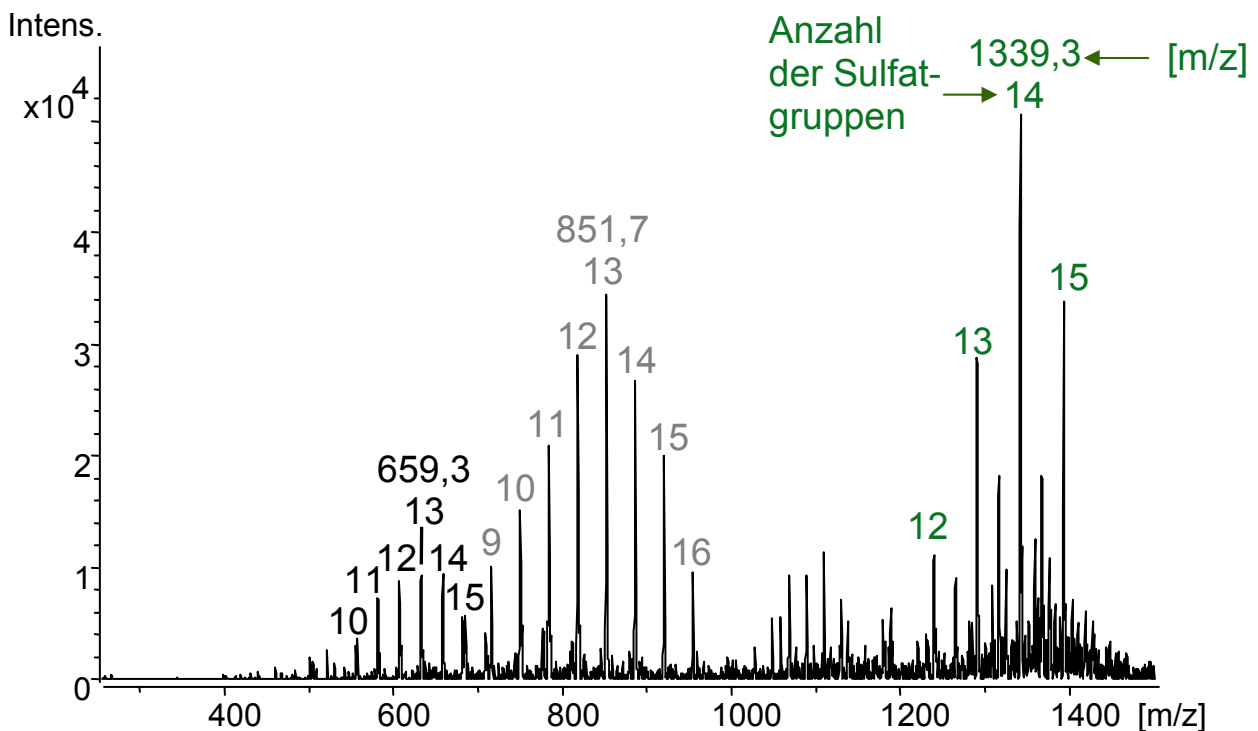


Abb. 6-4: ESI-MS-Spektrum von hochsulfatiertem γ -CD (hs- γ -CD) mit durchschnittlich 13-14 Sulfatgruppen, zweifach negativ geladene Spezies bei $m/z = 1339,3$; dreifach bei $m/z = 851,7$; vierfach bei $m/z = 659,3$

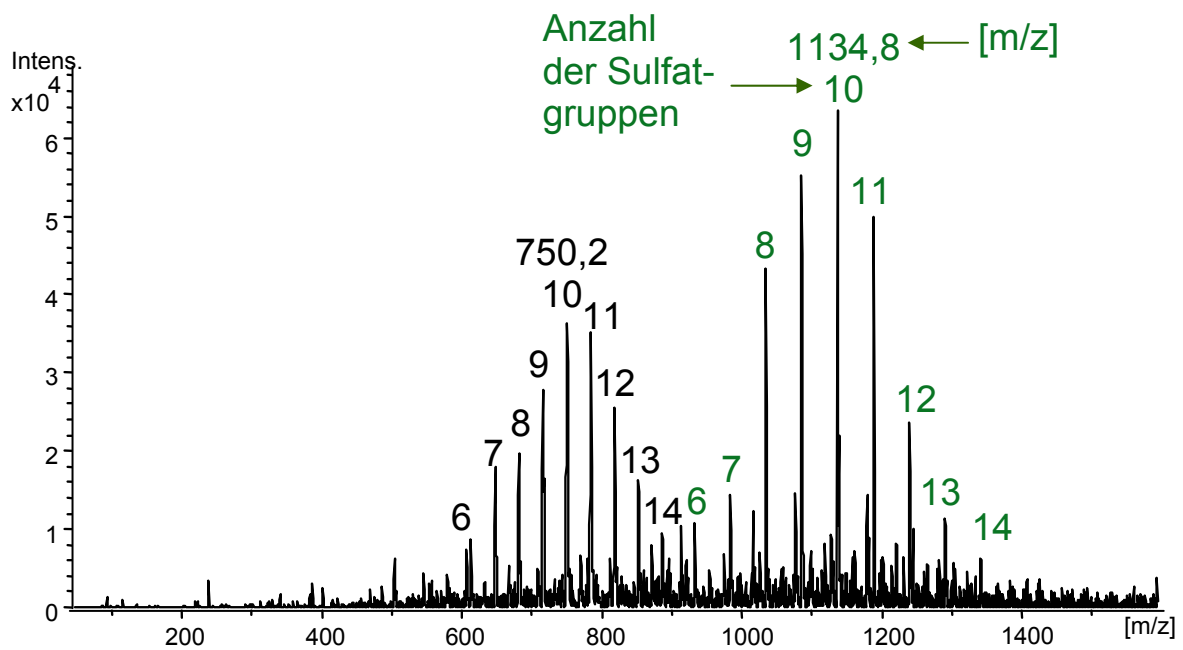


Abb. 6-5: ESI-MS-Spektrum von hs(X)- γ -CD der Firma Beckman, zweifach negativ geladene Spezies bei $m/z = 1134,8$; dreifach bei $m/z = 750,2$

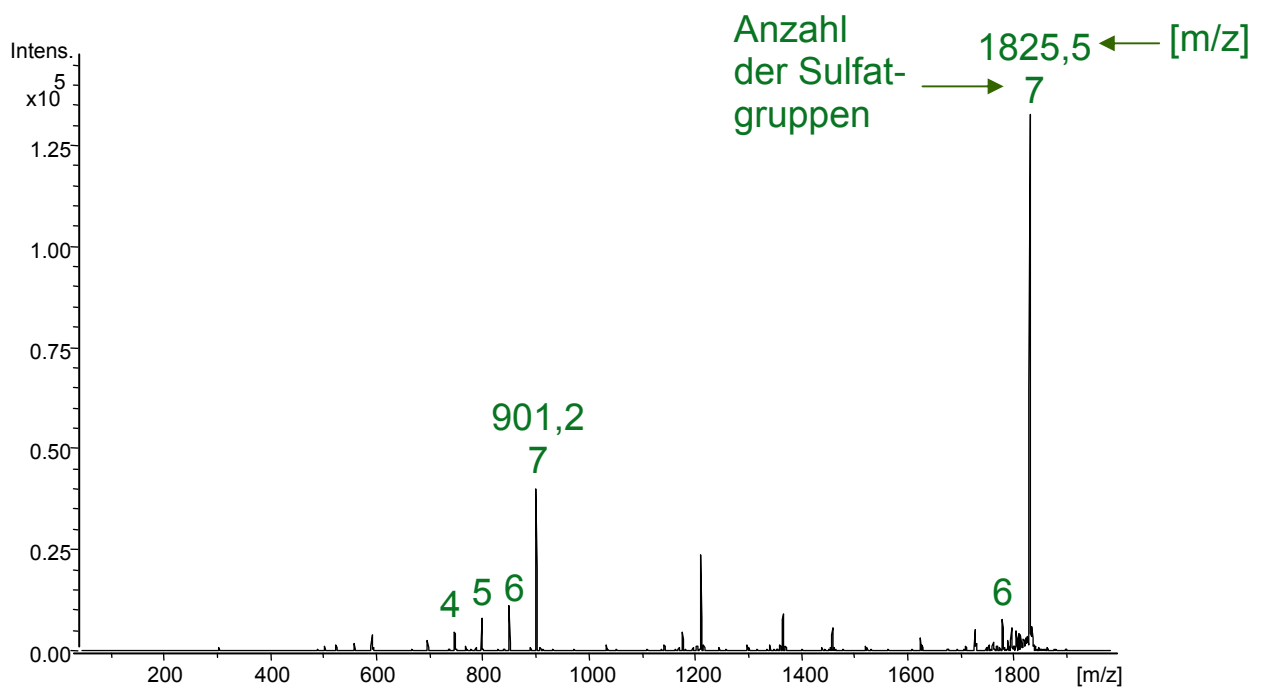


Abb. 6-6: ESI-MS-Spektrum von 2,3-Dihydroxy-6-sulfato- β -CD („single isomer“), einfach negativ geladene Spezies bei $m/z = 1825,5$; zweifach bei $m/z = 901,2$

Die neutralen Selektoren wurden als Natriumaddukte detektiert, die ein- bzw. mehrfach geladen waren, die sulfatierten Selektoren hingegen als negativ geladene Na-Salze. Die gemessenen Molmassen in Tab. 6-2 sind durchschnittliche Werte mehrfach substituierter CD-Derivate und stellen somit das Maximum der Verteilung dar. Es wurde also angenommen, dass sich Selektoren mit unterschiedlichem Substitutionsgrad in gleichem Maße ionisieren lassen. Für diesen Fall kann eine semiquantitative Aussage über das Massenspektrum gemacht werden. Da für alle statistisch substituierten CD-Derivate eine Verteilung, die ungefähr einer Gaußfunktion entspricht, erhalten wurde, scheint die Anzahl der funktionellen Gruppen die Ionisierungswahrscheinlichkeit in vernachlässigbarem Maße zu beeinflussen. Ansonsten müsste besonders bei geladenen Selektoren eine Verschiebung des Maximums zu den theoretisch leichter ionisierbaren, höher substituierten Derivaten erfolgen.

Das sulfatierte γ -CD, das die Firma Beckman als „ungefähr durchschnittlich 13fach substituiert“ anbietet, wurde lediglich als durchschnittlich 10fach sulfatiertes γ -CD detektiert, obwohl eine sorgfältige Qualitätskontrolle anhand eines Standards einen gleichbleibende Verteilung des Substitutionsgrades und damit reproduzierbare CE-Ergebnisse bei Einsatz dieses Selektors gewährleisten soll⁷. Eine Änderung des Substitutionsgrades des Selektors kann erhebliche Auswirkungen auf die Enantiomerentrennungen haben. Dies wurde insbesondere von Vigh *et al.* in zahlreichen Publikationen, u. a. in [174,175,176,177], berichtet, wobei unter anderem auch Enantiomerentrennungen mithilfe hochselektiv modifizierter Einzel-Isomere („single isomers“) untersucht wurden. In der Praxis werden meist jedoch statistisch substituierte Cyclodextrine verwendet, da ihre Herstellung weniger aufwendig ist.

Im Folgenden wird der durchschnittlich 10fach sulfatierte Selektor als hs(X)- γ -CD und das durchschnittlich 13 bis 14fach sulfatierte γ -CD als hs(XIV)- γ -CD bezeichnet.

Das hier untersuchte sulfatierte „single isomer“ ist bis auf kleine Verunreinigungen 7fach substituiert. Bei den 1.8-methylierten Cyclodextrinen handelt es sich laut dieser ESI-MS-Bestimmung um durchschnittlich 1.9-methylierte Derivate. Die Hydroxypropyl-Cyclodextrine (HP-CD) tragen durchschnittlich sechs bis sieben Substituenten. Diese und weitere Bestimmungen (s. Tab. 6-2) zeigen, dass die

⁷ laut Homepage von Beckman,

http://www.beckman.com/products/specifications/analytical/ce/pacemdq_chiralanalysis2_app_stat.asp

erhaltenen Messwerte für die CD-Derivate teilweise erheblich von den Packungs- bzw. Herstellerangaben abweichen.

Cyclodextrin (-derivat)	M [g/mol] ¹	M [g/mol] gemessen ²	Anzahl der Substituenten (Maximum)	Summenformel
natives α -CD	972.84	973	0	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀
natives β -CD	1134.98	1135	0	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅
natives γ -CD	1297.12	1297	0	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
2-HP- α -CD	1180	1379	1-14 (7)	C ₅₇ H ₁₀₂ O ₃₇
2-HP- β -CD	1380	1482-1540	1-10 (6-7)	C ₆₀ H ₁₀₆ O ₄₁ bzw. C ₆₃ H ₁₁₂ O ₄₂
2-HP- γ -CD	1580	1645-1703	1-10 (6-7)	C ₆₆ H ₁₁₆ O ₄₆ bzw. C ₆₉ H ₁₂₂ O ₄₇
1.8-Me- α -CD ³	1123.2	1126-1140	10-13 (11-12) → 1.9 methyliert	6 C ₆ H ₇ O ₅ + 6 x (1.9 CH ₃ +1.1 H)
1.8-Me- β -CD ³	1310.4	1316-1330	10-17 (13-14) → 1.9 methyliert	7 C ₆ H ₇ O ₅ + 7 x (1.9 CH ₃ +1.1 H)
1.8-Me- γ -CD ³	1497.6	1509	12-19 (15) → 1.9 methyliert	8 C ₆ H ₇ O ₅ + 8 x (1.9 CH ₃ +1.1 H)
2,3-dihydroxy-6-sulfato- β -CD ⁴	1848	1848	7, sehr wenig 3-6	C ₄₂ H ₆₃ O ₅₆ S ₇ Na ₇ (Na-Salz)
CM- β -CD	1420	1388	1-6 (4), teils Na-Salz bzw. freie Säure	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ + 4 (C ₂ HO ₂ Na bzw. C ₂ H ₂ O ₂)
Hs- γ -CD ⁵	2622	2314	6-14 (10)	C ₄₈ H ₇₀ O ₇₀ S ₁₀ Na ₁₀
Hs- γ -CD ⁶	-	2621-2724	9-16 (13-14)	C ₄₈ H ₆₇ O ₇₉ S ₁₃ Na ₁₃ bzw. C ₄₈ H ₆₆ O ₈₂ S ₁₄ Na ₁₄

¹ laut Hersteller: Angabe auf Verpackung oder erfragt

² durchschnittliche Werte

³ durchschnittlicher Methylierungsgrad pro Glucoseeinheit laut Packungsangabe: 1.8

⁴ „single isomer“

⁵ als 20%ig (w/v) wässrige Lösung der Firma Beckman, berechnet als Natriumsalz

⁶ als Natriumsalz bei der Firma Michigan Diagnostics erhältlich

Tab. 6-2: Molare Massen der eingesetzten Selektoren, ermittelt mit ESI-MS

6.4.1.3 Untersuchung der CD-Selektoren in der CE

Bislang wurden in der Literatur Enantiomerentrennungen der betreffenden Amphetaminderivate u. a. mittels nativem β -CD, Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -CD,

permethyliertem β -CD, HP- β -CD, CM- β -CD und sulfatierten CD [178,179,180,181,182] beschrieben. Um diese Ergebnisse vergleichbar zu machen und den am besten geeigneten Selektor zu finden, wurde ein Screening der oben aufgeführten Cyclodextrine und CD-Derivate durchgeführt.

Mit β -CD und allen eingesetzten β -CD-Derivaten konnte eine Trennung der Amphetaminderivate in ihre Enantiomere erreicht werden (Abb. 6-7 und Tab. 6-3). Die größten Auflösungen konnten mit den sulfatierten Cyclodextrinderivaten erzielt werden, wobei das hs(X)- γ -CD bei vergleichbarer Molarität effizienter war als das sulfatierte β -CD. Einen Beitrag zu dem guten Trennverhalten der sulfatierten CD-Selektoren könnte damit begründet werden, dass bei einem pH-Wert von 2,5 die basischen Analyte positiv geladen sind. Daher ist eine stärkere Wechselwirkung mit einem negativ geladenem Selektor als mit einem neutralen zu erwarten, da noch elektrostatische Wechselwirkungen hinzukommen [93].

Das Carboxymethyl- β -CD (CM- β -CD) lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Migrationszeiten verlängerten sich bei Erhöhung der Selektorkonzentration stark, daher wurde ein Selektorgehalt von 0,7 mM eingesetzt. Jedoch lagen die Migrationszeiten über 40 Minuten und es wurden extrem breite Peaks detektiert. Somit ist der Selektor nicht für dieses Trennproblem geeignet.

Bei allen unter diesen Bedingungen weitgehend neutralen Selektoren wurde eine Spannung von +20 kV angelegt (s. Abb. 6-3, Fall B und Abb. 6-7, A, D-F). Dabei war die Migrationsreihenfolge (*S*) nach (*R*). Der Fall C in Abb. 6-3 entspricht der Trennung der Amphetaminderivate mit sulfatierten Cyclodextrinen (s. Abb. 6-7, B und C). Der chirale Selektor ist unter diesen Bedingungen mehrfach negativ geladen, während das MDA, MDE bzw. MDMA positiv geladen ist und vom Selektor in Richtung Anode transportiert wird. Daher musste im Vergleich zu den neutralen Selektoren umgepolt werden (-15 kV). Die Elutionsreihenfolge ist hier umgekehrt, d. h. (*R*) nach (*S*). Somit scheint das (*S*)-Enantiomer eine höhere Affinität zum β -CD bzw. zu den CD-Derivaten, mit denen eine erfolgreiche Enantiomerentrennung durchgeführt werden konnte, zu besitzen. Ansonsten müsste der negativ geladene Komplex aus Cyclodextrin(-derivat) und (*S*)-Enantiomer eine höhere Mobilität besitzen als der dazu diastereomere Komplex aus Cyclodextrin(-derivat) und (*R*)-Enantiomer bzw. bei positiv geladenen Komplexen (neutraler Selektor und positiv geladenes Amphetaminderivat) müssten sich die Mobilitäten entsprechend entgegengesetzt verhalten.

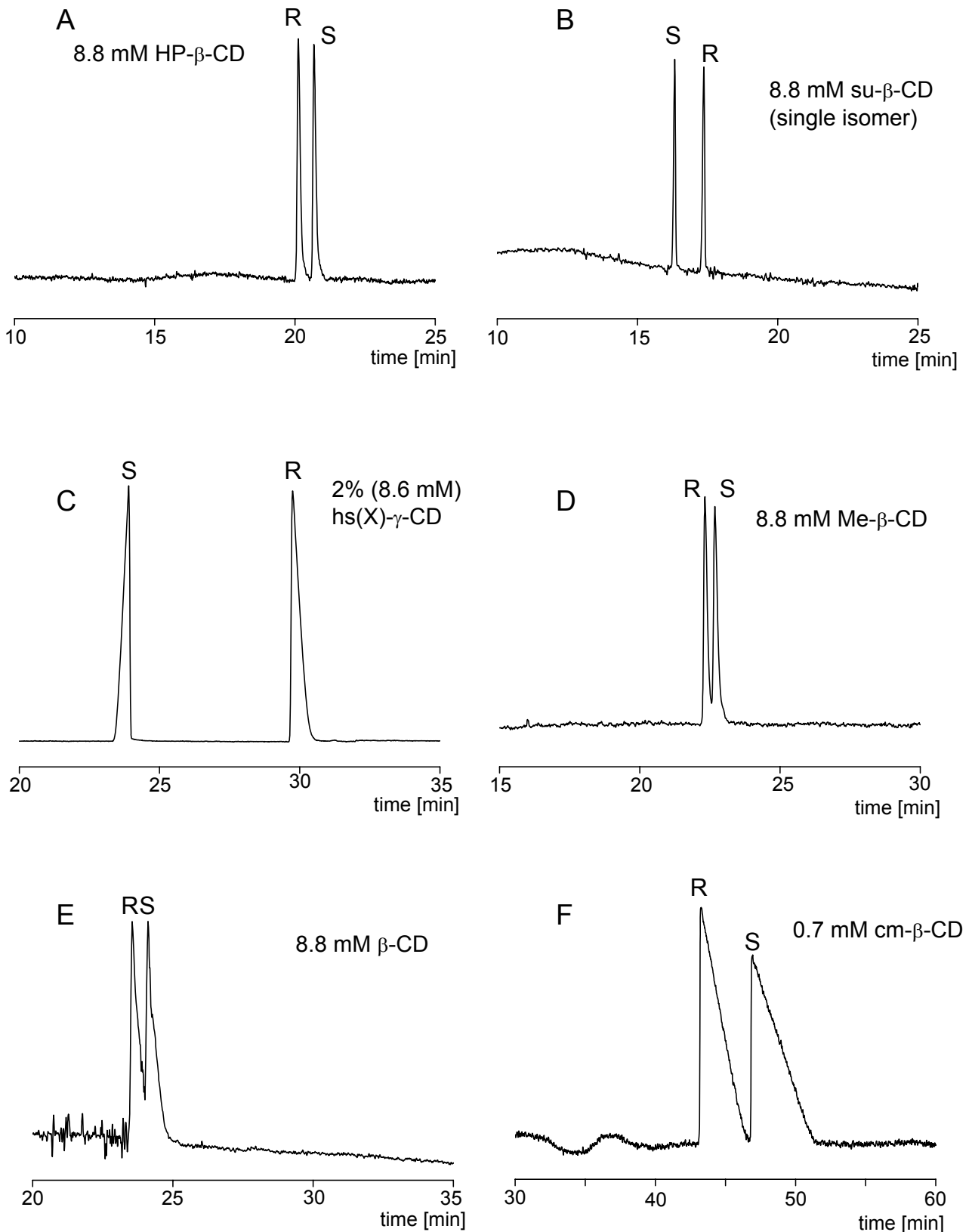


Abb. 6-7: Enantiomertrennung von MDMA mittels verschiedener CD-Selektoren, Bedingungen: 50 mM Phosphat-Puffer, pH 2,5, Kapillare: 50 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.), A, D, E, F: + 20 kV, B und C: -15 kV

Cyclodextrin/- derivat	MDMA		MDA		MDE	
	t ₁ /t ₂	R _s	t ₁ /t ₂	R _s	t ₁ /t ₂	R _s
natives α -CD	15,2/-	0	15,0/-	0	16,6/-	0
natives β -CD	23,5/24,1	1,56	22,9/23,4	1,86	26,2/26,7	1,66
natives γ -CD	12,5/-	0	12,4/-	0	14,0/-	0
2-Hydroxypropyl- α -CD	14,4/-	0	13,9/-	0	15,7/-	0
2-Hydroxypropyl- β -CD	20,2/20,7	2,86	19,8/20,3	2,34	23,4/24,1	2,70
2-Hydroxypropyl- γ -CD	12,7/-	0	12,4/-	0	13,9/-	0
Carboxymethyl- β -CD		+		+		+
1.8-Methyl- α -CD	17,7/-	0	16,9/-	0	19,6/-	0
1.8-Methyl- β -CD	22,3/22,7	1,45	21,6/21,8	0,73	25,5/25,9	1,25
1.8-Methyl- γ -CD	13,1/-	0	12,8/-	0	14,5/-	0
2,3-Dihydroxy-6-sulfato- β -CD	16,3/17,4	7,70	16,1/17,0	7,29	15,5/16,6	9,14
hs(X)- γ -CD	22,5/27,9	16,24	20,7/30,1	26,84	21,4/25,7	14,44
hs(XIV)- γ -CD	20,6/27,1	27,10	18,5/28,8	40,75	20,1/25,8	25,53

Tab. 6-3: Trennung der Enantiomerenpaare von MDMA, MDA und MDE mit unterschiedlichen CD-Selektoren, Kapillare: 50 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.), Puffer: Phosphat 50 mM, pH 2,5, alle Selektorkonzentrationen 8.8 mM, außer CM- β -CD: 0,7 mM, Spannung: +20 kV; hs(XIV)- γ -CD: 3% (11 mM), hs(X)- γ -CD: 3% (13 mM), Spannung jeweils -15 kV, +: Trennung, aber keine reproduzierbaren Elutionszeiten

In Tab. 6-3 und Abb. 6-8 C und D kann der Einfluss des unterschiedlichen Substitutionsgrades der sulfatierten γ -CD auf das chirale Auflösungsvermögen gezeigt werden. Mit dem höherer substituierten Derivat kann man in kürzerer Zeit, trotz geringer Selektorkonzentration (3% entspricht 11 mM hs(XIV)- γ -CD bzw. 13 mM hs(X)- γ -CD) eine größere Auflösung erzielen. Neben der höheren Auflösung der Enantiomerenpaare ist auch eine deutlich bessere Trennung von (S)-MDA von (S)-MDE bzw. (S)-MDMA zu sehen. Da die synthetisierten Enantiomere von MDE und MDMA hauptsächlich aus dem entsprechenden MDA-Enantiomer hergestellt wurden, ist die höhere Auflösung wichtig, da so auch eine mögliche Verunreinigung mit Edukt detektiert werden kann.

Mit HP- β -CD (s. Abb. 6-8) konnten alle drei Enantiomerenpaare in einem Lauf unter optimierten Bedingungen getrennt werden. Für das sulfatierte β -CD war dies auch nicht durch Optimierung des Selektorgehaltes möglich.

Da das hs(XIV)- γ -CD die mit Abstand besten Auflösungen ergab, wurde dieser Selektor für die weitere Optimierung ausgewählt.

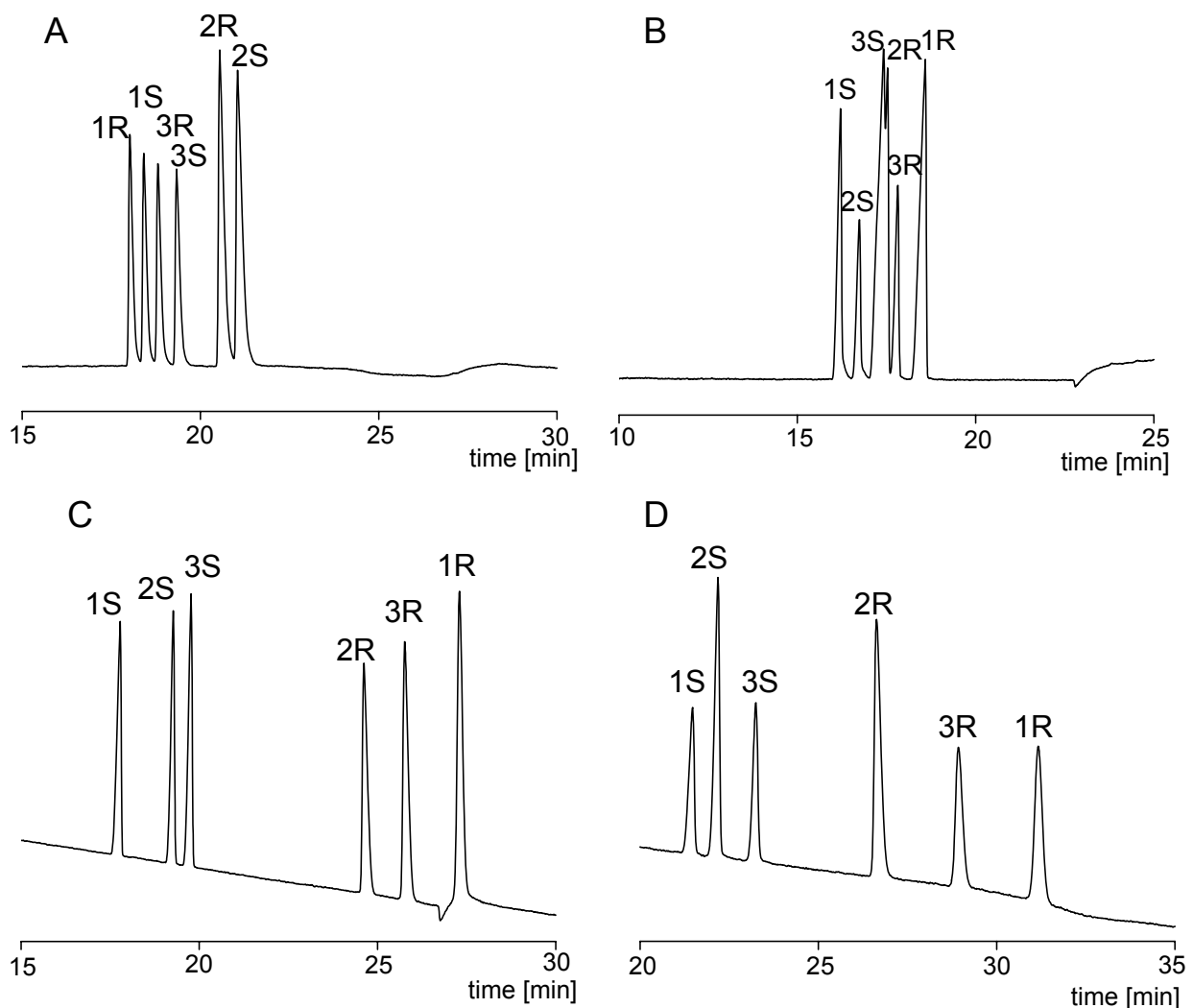


Abb. 6-8: Trennung der drei Enantiomerenpaare in einem Lauf: (S)-MDA (1S), (R)-MDA (1R), (S)/(R)-MDE(2S/R), (S)/(R)-MDMA(3S/R), Kapillare: 50 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.),

A: 100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, 15 mM HP- β -CD, +20 kV

B: 50 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, 3% 2,3-Dihydroxy-6-sulfato- β -CD, -15 kV

C: 50 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, 3% (11 mM) hs(XIV)- γ -CD, -15 kV

D: 50 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, 3% (13 mM) hs(X)- γ -CD, -15 kV

6.4.2 Einfluss der Selektor- und Pufferkonzentration

Im Folgenden wurde der Einfluss der Selektor- und BGE-Konzentration untersucht und optimiert.

6.4.2.1 Einfluss der Selektorkonzentration

Der Einfluss des Gehaltes an hs(XIV)- γ -CD wurde im einem Bereich von 1-4% untersucht. Unter 1% stiegen die Migrationszeiten zu sehr an. Über 4% ergaben sich kurze Analysezeiten, jedoch waren bei zu schnellen Migrationen keine Basislinientrennungen der drei Enantiomerenpaare mehr möglich. Zudem sollte aus Kostengründen der Selektorgehalt nicht zu hoch gewählt werden.

Die Erhöhung der Selektorkonzentration von 1-4% bei einem 25 mM Phosphatpuffer (s. Abb. 6-9) verringerte die Migrationszeiten, wobei sich die Auflösungen minimal erhöhten. Bei Verwendung eines 50 mM Phosphatpuffers trat eine noch drastischere Verkürzung der Migrationszeiten und ebenfalls meist eine geringe Erhöhung der Auflösungen auf, wenn der Selektorgehalt angehoben wurde (s. Abb. 6-10).

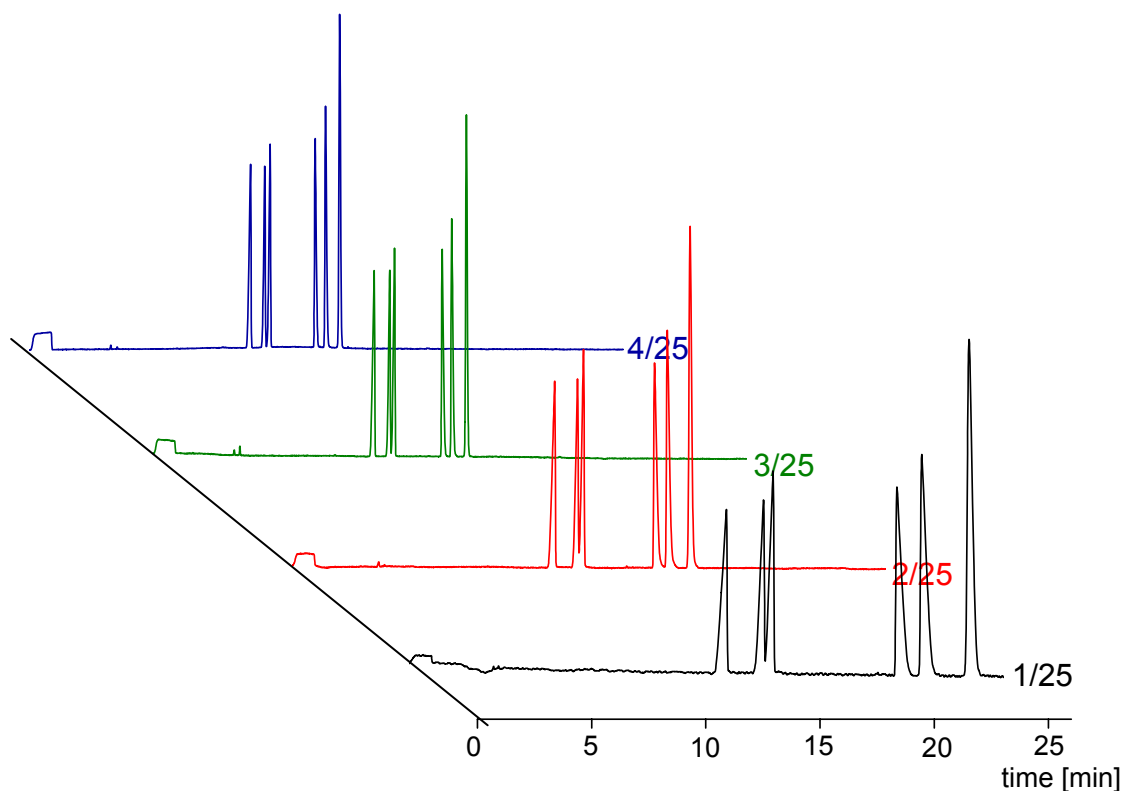


Abb. 6-9: Einfluss der Selektorkonzentration, 1-4% hs(XIV)- γ -CD bei 25 mM Phosphatpuffer, pH 2,5; 1/25: 1% hs(XIV)- γ -CD, 25 mM BGE; 2/25: 2% hs(XIV)- γ -CD, 25 mM BGE; 3/25: 3% hs(XIV)- γ -CD, 25 mM BGE; 4/25: 4% hs(XIV)- γ -CD, 25 mM BGE; Kapillare: 40 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.), -15 kV

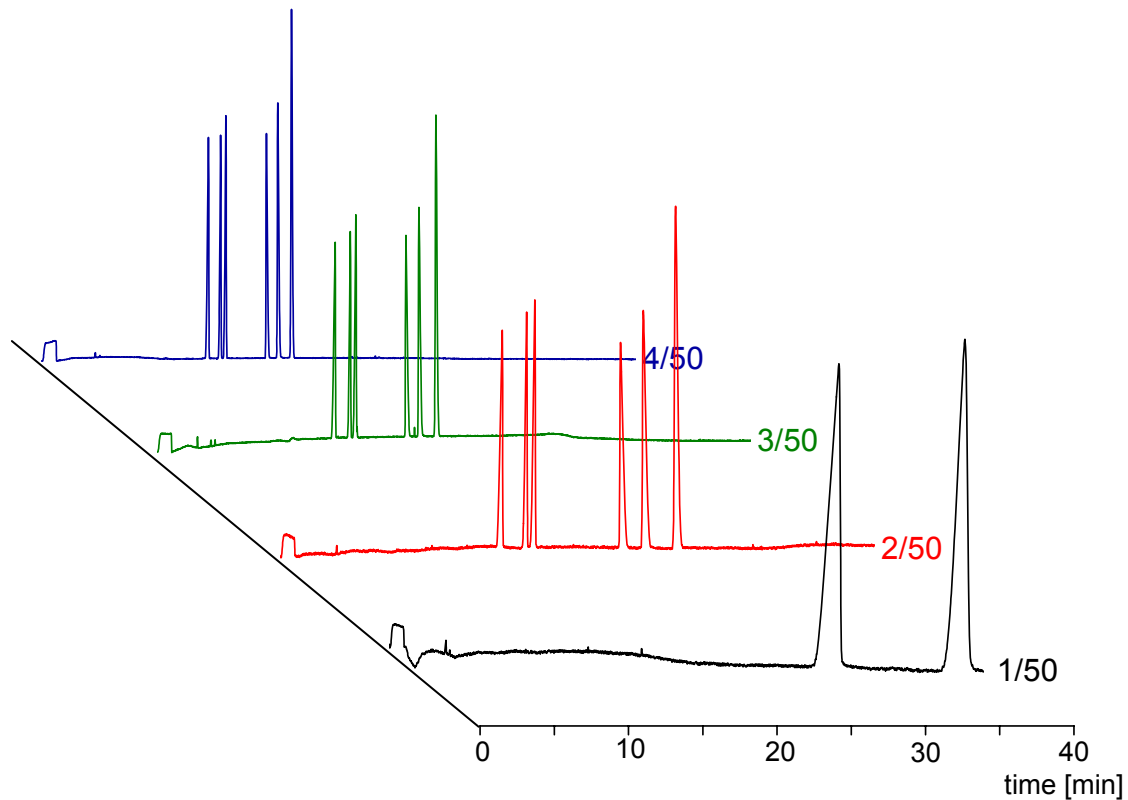


Abb. 6-10: Einfluss der Selektorkonzentration, 1-4% hs(XIV)- γ -CD bei 50 mM Phosphatpuffer, pH 2,5; 1/50: 1% hs(XIV)- γ -CD, 50 mM BGE; 2/50: 2% hs(XIV)- γ -CD, 50 mM BGE; 3/50: 3% hs(XIV)- γ -CD, 50 mM BGE; 4/50: 4% hs(XIV)- γ -CD, 50 mM BGE; Kapillare: 40 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.), -15 kV

6.4.2.2 Einfluss der Pufferkonzentration

Wenn bei einem bestimmten hs(XIV)- γ -CD-Gehalt die Phosphatpuffer-Konzentration von 25 auf 100 mM erhöht wurde, stiegen sowohl die Migrationszeiten als auch die Auflösung an (s. Abb. 6-11 und Abb. 6-12). Da eine ausreichende Trennung in angemessener Zeit gesucht wurde, erwiesen sich die höher konzentrierten Phosphatpuffer bei 3% Selektorgehalt als ungeeignet. Eine Erhöhung der Selektorkonzentration würde zwar eine Verkürzung der Migrationszeiten bewirken, aber in der CE kommt die optimale Spannung als weiterer Optimierungsparameter hinzu.

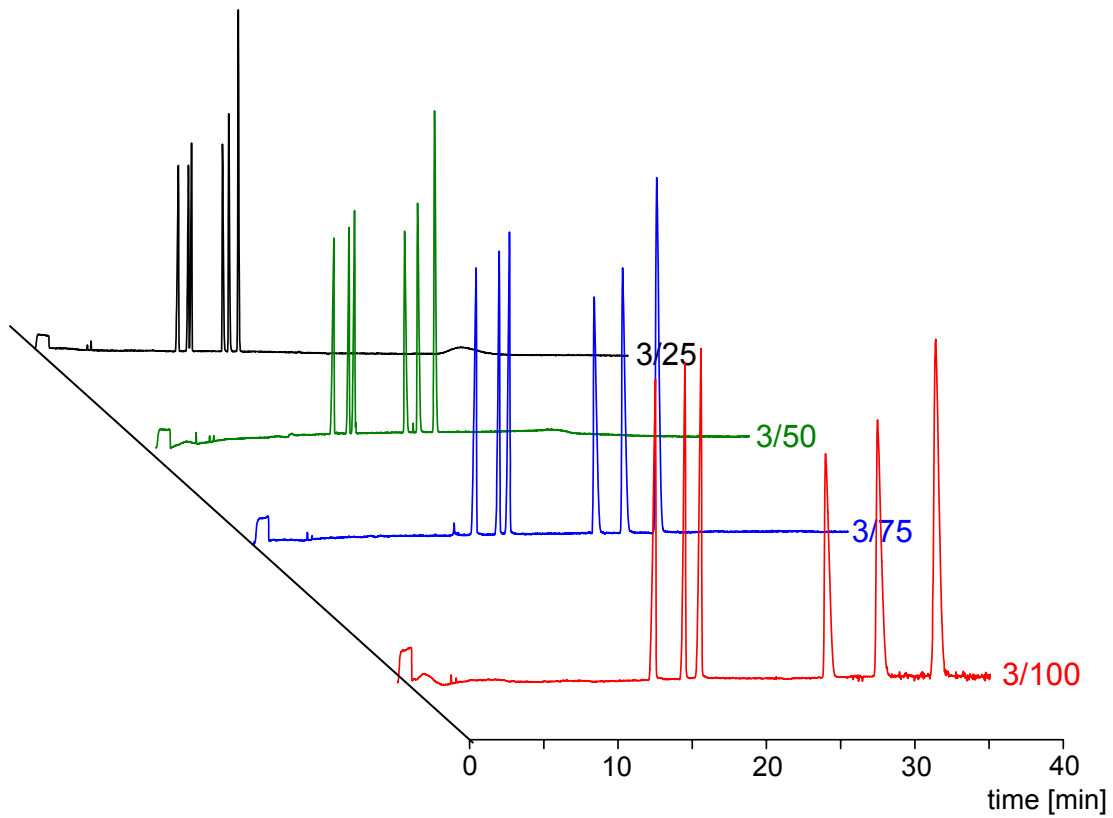
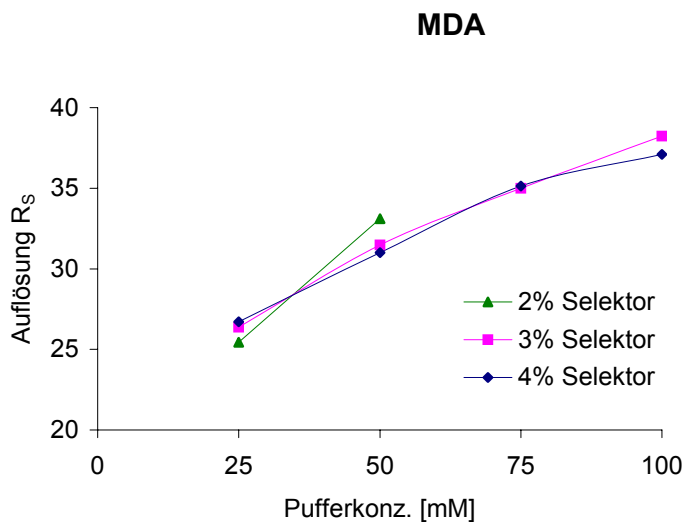
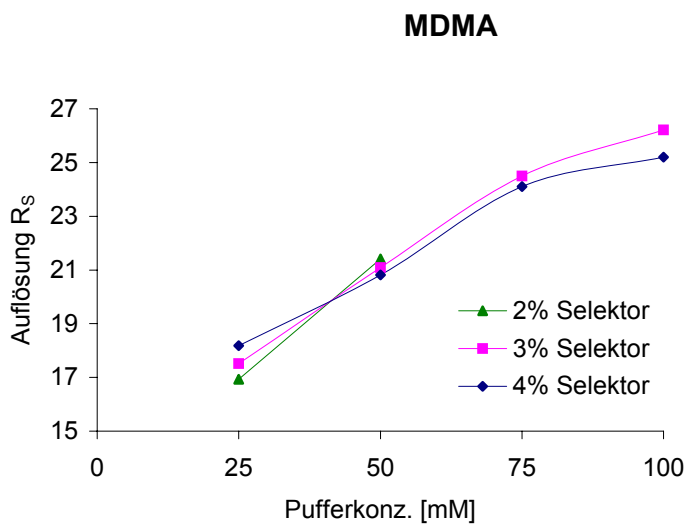


Abb. 6-11: Einfluss der Pufferkonzentration, 25-100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, bei 3% hs(XIV)- γ -CD, 3/100: 3% hs(XIV)- γ -CD, 100 mM BGE; 3/75: 3% hs(XIV)- γ -CD, 75 mM BGE; 3/50: 3% hs(XIV)- γ -CD, 50 mM BGE; 3/25: 3% hs(XIV)- γ -CD, 25 mM BGE; Kapillare: 40 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.), -15 kV



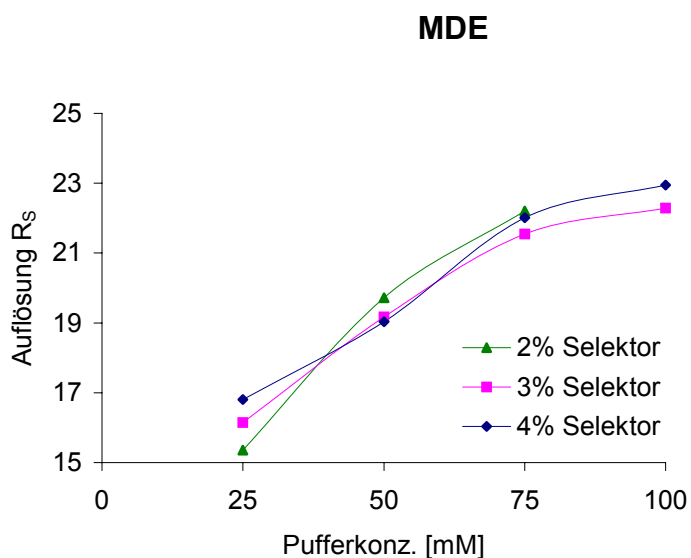
BGE [mM]	hs(XIV)- γ -CD [%]			
	4	3	2	1
25	26,72	26,37	25,45	25,21
50	31,00	31,48	33,10	-
75	35,13	35,00	-	-
100	37,10	38,24	-	-

- Elutionszeit > 40 min



BGE [mM]	hs(XIV)- γ -CD [%]			
	4	3	2	1
25	18,18	17,51	16,93	16,16
50	20,82	21,09	21,41	-
75	24,11	24,50	-	-
100	25,20	26,21	-	-

- Elutionszeit > 40 min



BGE [mM]	hs(XIV)- γ -CD [%]			
	4	3	2	1
25	16,81	16,15	15,36	14,39
50	19,03	19,17	19,72	-
75	22,01	21,54	22,20	-
100	22,95	22,29	-	-

- Elutionszeit > 40 min

Abb. 6-12: Auflösung in Abhängigkeit der Selektor- und BGE-Konzentration

6.4.3 Die optimale Spannung

6.4.3.1 Joule'sche Wärme und Ohm'scher Plot

Die Wärmentwicklung (Joule'sche Wärme), die bei der elektrophoretischen Trennung entsteht, ist durch den geringen Kapillardurchmesser in der Kapillarelektrophorese wesentlich kleiner als bei anderen elektrophoretischen Methoden. Jedoch kann die Joule'sche Wärmeentwicklung die Trennung immens beeinflussen. Die Veränderung der Temperatur in der Kapillare hat Auswirkungen auf die Bodenzahl und kann somit die Trennleistung des Systems stark verringern. Neben dem parabolischen Temperaturprofil in der Kapillare, welches eine parabolische Veränderung des Flussprofils durch Veränderung der Viskosität des Puffers und damit der Migrationsgeschwindigkeiten zur Folge hat, verringert eine konvektive Mischung die Effizienz einer Trennung. Somit muss darauf geachtet werden, dass die Wärmeentwicklung nicht unkontrolliert stattfindet. Diese ist von folgenden Parametern abhängig: Kapillardurchmesser und -länge, Pufferkonzentration, Ionenmobilität, Analysetemperatur und Kühlsystem [86,104,183].

Da eine Verringerung der Ionenstärke, eine niedrigere Spannung und eine kürzere Kapillare sich in einer schlechteren Auflösung auswirken, ist eine effiziente Kühlung von Vorteil. Das verwendete Beckman-Gerät verfügt über eine Flüssigkeitskühlung, die einer Luftkühlung überlegen ist.

Für ein gegebenes Trennsystem kann die optimale Spannung, d. h. die maximale Spannung bei der noch nicht die nachteiligen Effekte der Wärmeentwicklung auftreten, mittels Ohm'schen Plot ermittelt werden. Dazu wird die Stromstärke I in Abhängigkeit von der Spannung U aufgetragen und der Punkt bestimmt, an dem eine 5%ige positive Abweichung der Linearität eintritt. Hier liegt die optimale Spannung für das gewählte System.

6.4.3.2 Ermittlung der optimalen Spannung

Vor Aufnahme der Ohm'schen Plots wurde die Kapillare gekürzt, da durch die sehr hohen Auflösungen eine kürzere Kapillare zur Trennung ausreicht. Somit verringerten sich die Analysezeiten und es konnte eine höhere optimale Spannung angelegt werden.

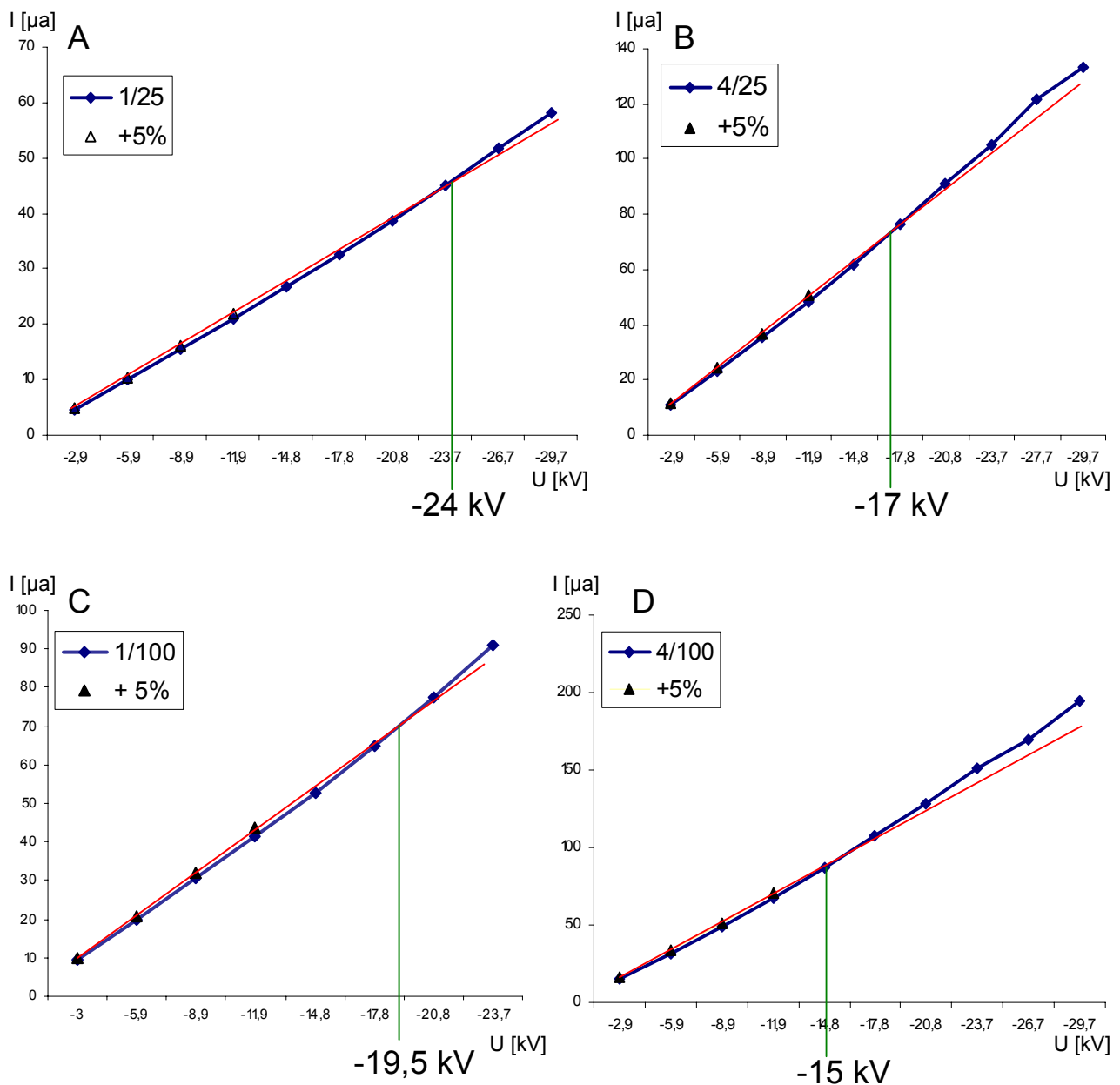


Abb. 6-13: Ohm'sche Plots für verschiedene Puffersysteme,

Kapillare: 40 cm (eff. Länge) x 50 μm (i. d.),

A: 1% hs(XIV)- γ -CD, 25 mM Phosphatpuffer, pH 2,5,

B: 4% hs(XIV)- γ -CD, 25 mM Phosphatpuffer, pH 2,5,

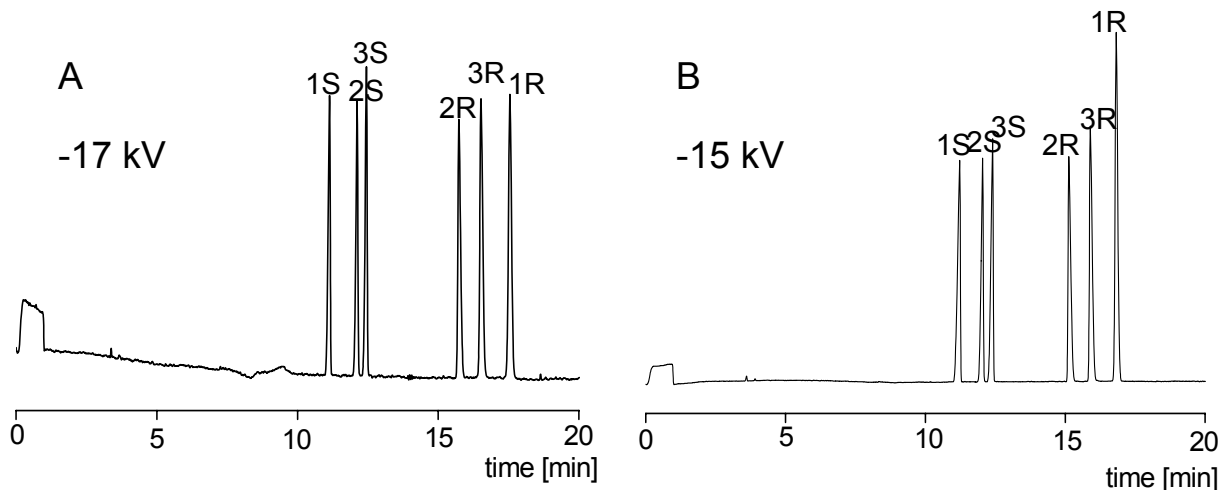
C: 1% hs(XIV)- γ -CD 100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5,

D: 4% hs(XIV)- γ -CD, 100 mM Phosphatpuffer, pH 2,5

+ 5%: Gerade mit 5% höheren Werten als die des U/I-Plots in seinem linearen Bereich

In Abb. 6-13 sind die Ohm'schen Plots der Eckpuffer, d. h. der Puffersysteme mit den extremsten Konzentrationen, zu sehen. Der Einfluss der Selektorkonzentration auf die optimale Spannung ist wesentlich größer als der des BGE, da das CD-Derivat unter den gegebenen Bedingungen mehrfach negativ geladen ist. Bei hohen BGE-

Konzentrationen, die wiederum hohe Selektorkonzentrationen zur Einhaltung einer praktikablen Analysezeit erfordern, liegt die optimale Spannung bei -15 kV. Aus den Optimierungsarbeiten ging hervor, dass die am besten geeigneten Puffersysteme 50 mM Phosphatpuffer mit einem Selektorgehalt von 3% bzw. 4% CD-Selektor enthalten. Die ermittelten optimalen Spannungen liegen für diese Puffer bei -17 kV bzw. -15 kV. Der Vergleich der beiden Elektropherogramme (Abb. 6-14) zeigt, dass sich bei gleicher Analysezeit höhere Auflösungen durch die höheren Bodenzahlen für das System A ergeben. Wie bereits in Kap. 6.4.2.1 gezeigt wurde, verkürzt die Erhöhung des Selektorgehaltes bei gleicher Auflösung die Analysezeit. Dies wird durch das Anlegen einer höheren Spannung kompensiert.



	Substanz	R_s (3/50)	R_s (4/50)
1S/1R	(S)/(R)-MDA	41,1	30,7
2S/2R	(S)/(R)-MDE	25,7	19,1
3S/3R	(S)/(R)-MDMA	27,3	20,9

Abb. 6-14: Vergleich zweier Trennungen mit unterschiedlicher optimaler Spannung, 50 mM Phosphatpuffer, pH 2,5, Kapillare: 40 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.), A: 3% hs(XIV)- γ -CD, -17 kV, B: 4% hs(XIV)- γ -CD, -15 kV

Da dieses optimierte System (Abb. 6-14 A) sehr hohe Trennfaktoren und Auflösungen (s. Tab. 6-4) aufweist, ist keine Umkehrung der Elutionsreihenfolge notwendig, um eine Koelution der enantiomeren Verunreinigung mit dem Hauptenantiomer bei höheren Probenmengen zu vermeiden. Zudem können auch Verun-

reinigungen mit MDA aus der Synthese nachgewiesen werden, da die Reinheiten aller sechs Enantiomere der drei Enantiomerenpaare mit einer einzigen Methode bestimmt werden können.

Die Peaks sind in dem gewählten System nicht symmetrisch, jedoch erwies sich die Asymmetrie als vorteilig, da alle (*S*)-Enantiomere der untersuchten Amphetamin-derivate ein Peakfronting zeigten, während die zweit eluierenden (*R*)-Enantiomere ein Peaktailing aufwiesen.

Asymmetrische Peakformen sind in der CE als normal anzusehen, während sie in anderen chromatographischen Methoden beseitigt werden können. Sie werden durch unterschiedliche Leitfähigkeiten und damit unterschiedlichen Mobilitäten zwischen Probe und Trennpuffer verursacht. Ein Fronting kommt zustande, wenn die Probenzone eine höhere Mobilität als der Trennpuffer besitzt, da die Frontzone diffus und die Endzone scharf wird. Im umgekehrten Fall erhält man entsprechend ein Tailing. Bei identischen Leitfähigkeiten sind symmetrische Peaks zu erwarten [184].

Im vorliegenden Fall stimmt die Asymmetrie der Peaks durch die elektrodisperse Verteilung der Probenzone mit der Migrationsreihenfolge überein. Der diastereomere Komplex mit der niedrigeren Mobilität bzw. Leitfähigkeit (CD mit zweit eluierendem (*R*)-Enantiomer) weist das Tailing auf. Der Komplex aus (*S*)-Enantiomer und Selektor scheint bei Betrachtung der Peakform unerwarteter Weise mit einer höheren Mobilität zu wandern als der reine Selektor selbst.

	(S)-MDA	(S)-MDE	(S)-MDMA	(R)-MDE	(R)-MDMA	(R)-MDA
N	128 000	175 000	164 000	142 000	139 000	138 000
$R_{2/1}$	8,19		22,79		5,65	
$R_{2/1}$	-	2,77		4,57		-
$R_{(R)/(S)\text{-MDA}}$	41,08					
$R_{(R)/(S)\text{-MDE}}$	-	25,68			-	
$R_{(R)/(S)\text{-MDMA}}$	-		27,27			-
$\alpha_{2/1}$	1,09		1,27		1,06	
$\alpha_{2/1}$	-	1,03		1,05		-
$\alpha_{(R)/(S)\text{-MDA}}$	1,58					
$\alpha_{(R)/(S)\text{-MDE}}$	-	1,30			-	
$\alpha_{(R)/(S)\text{-MDMA}}$	-		1,33			-
HEPT	$3,13 \cdot 10^{-3}$	$2,29 \cdot 10^{-3}$	$2,43 \cdot 10^{-3}$	$2,82 \cdot 10^{-3}$	$2,88 \cdot 10^{-3}$	$2,90 \cdot 10^{-3}$

- N: Trennstufenzahl
 $\alpha_{2/1}$: Trennfaktor aufeinander folgender Peaks
 $\alpha_{(R)/(S)}$: Trennfaktor der Enantiomere
 $R_{2/1}$: Auflösung aufeinander folgender Peaks
 $R_{(R)/(S)}$: Auflösung der Enantiomere
HEPT: Bodenhöhe in cm

Tab. 6-4: Kapillarelektrophoretische Kenngrößen der optimierten Methode

6.4.4 Auswahl des internen Standards

Um die Präzision der Methode zu steigern und eventuelle Abweichungen, die bei der hydrodynamischen Injektion durch das CE-Gerät verursacht werden, zu eliminieren, wurde ein interner Standard eingesetzt. Hierbei wurden die sechs achiralen Substanzen aus Abb. 6-15 getestet. Sie besitzen ähnliche chromophore Eigenschaften wie die zu untersuchenden Amphetaminderivate.

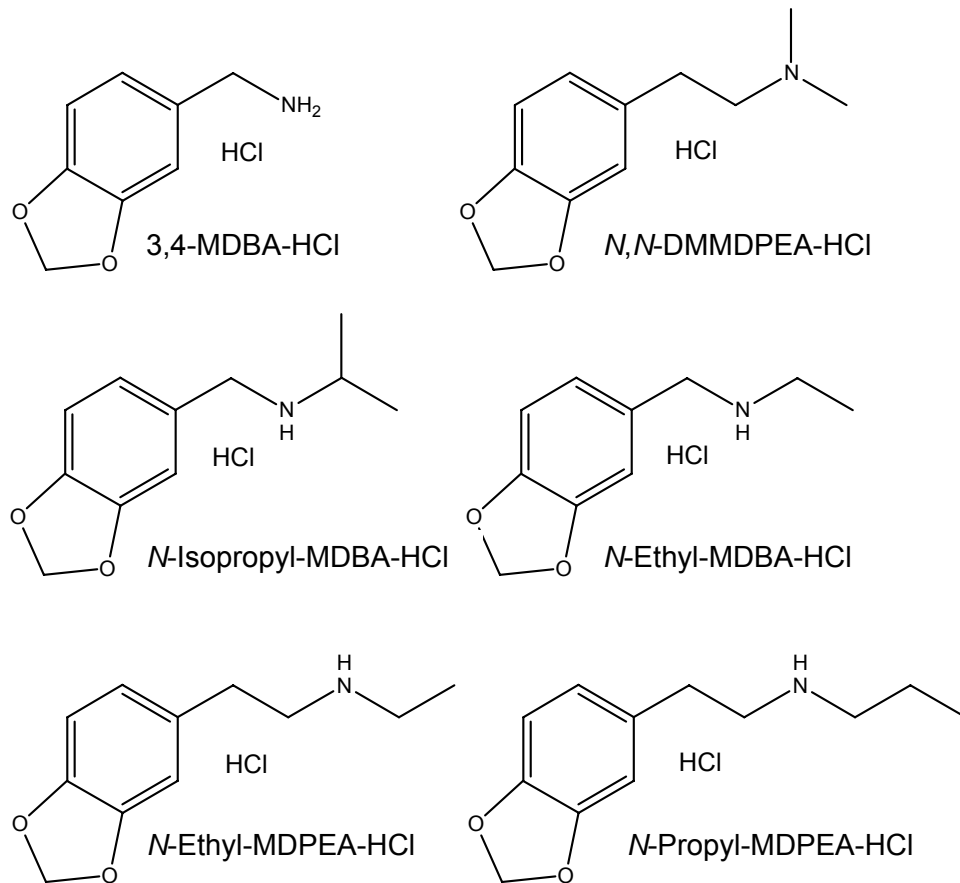


Abb. 6-15: Mögliche, achirale interne Standards

Das 3,4-MDBA (3,4-Methylenedioxybenzylamin als Hydrochlorid) zeigte das am besten geeignete Migrationsverhalten (s. Abb. 6-16). Bei den anderen Analyten wurden entweder die Analysezeiten durch hohe Migrationszeiten des ISTD stark verlängert oder es fand Koelution statt.

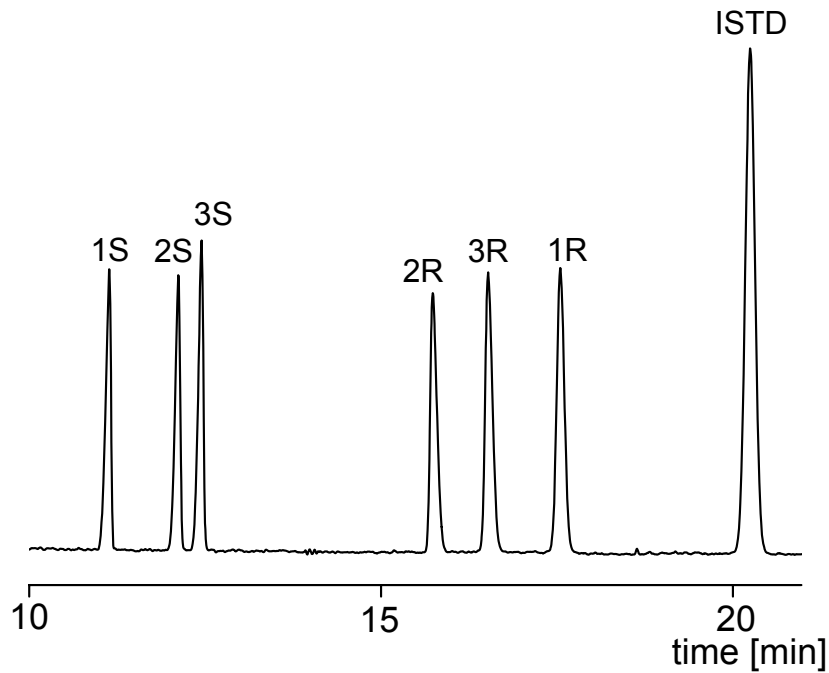


Abb. 6-16: Lauf mit internem Standard, 3% hs(XIV)- γ -CD, 50 mM Phosphatpuffer, -17 kV, 40 cm (eff. Länge) x 50 μ m (i. d.), Racemate von MDA (1), MDE (2) und MDMA (3); 3,4-MDBA als interner Standard (ISTD)

6.5 Validierung des Systems

Die Validierung analytischer Methoden ist eine Grundvoraussetzung für die Qualität und die Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen [185]. Validierung bedeutet, auf die Frage zu antworten, ob ein Prüfverfahren, eine analytische Methode oder eine Mess-/Prüfeinrichtung für die Erfüllung einer ganz bestimmten Aufgabe geeignet ist [186]. Nach der FDA ist Validierung in Hinblick auf Produktion „der dokumentierte Nachweis, dass ein bestimmter Prozess mit einem hohen Grad an Sicherheit kontinuierlich ein Produkt erzeugt, das vorher definierte Spezifikationen und Qualitätsmerkmale erfüllt“ [187].

Die Validierung analytischer Methoden wird heute in den GMP-Regelwerken oder der PharmBetrV (Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer) verlangt. Details und Umfang einer Validierung sind beispielsweise im Zulassungsverfahren eines Pharmazeutikums von speziellem Interesse. Deshalb hat die „International Conference on Harmonisation - ICH“ dieses Thema aufgegriffen und zwei Richtlinien verabschiedet. Der „Text on Validation of Analytical Procedures“ [186] definiert die

einzelnen Validierungsparameter, während die zweite ICH-Richtlinie „Methodology“ [188] detaillierte Vorschläge zur Durchführung der analytischen Validierung macht. Demnach sollte bei der Validierung der optimierten CE-Methode zur Feststellung der Enantiomerenreinheit von MDA, MDE und MDMA geprüft werden, ob die Methode die festgelegten Anforderungen erfüllen kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Methode dafür geeignet ist, im gewünschten Bereich von 0,5-1,5% Enantiomerenverunreinigung mit ausreichender Zuverlässigkeit zu quantifizieren (s. Tab. 6-5 und experimenteller Teil).

	(R)-MDMA	(S)-MDMA	(R)-MDA	(S)-MDA	(R)-MDE	(S)-MDE
Arbeitsbereich	5-15 µg/ml (0,5-1,5%), 5-Punkt-Kalibrierung					
Linearität:						
Steigung	0,09579	0,09758	0,10157	0,10261	0,09242	0,09217
y-Achsenabschnitt	-0,01279	0,00100	0,01022	0,02490	-0,00832	-0,00855
Korrelationskoeffizient	0,99989	0,99999	0,99995	0,99998	0,99989	0,99973
relative Standardabweichung (RSD) [%]	0,68	0,22	0,45	0,26	0,65	1,05
Nachweisgrenze (LOD) [µg/ml]	0,71	0,23	0,47	0,27	0,68	1,09
Bestimmungsgrenze (LOQ) [µg/ml]	1,06	0,35	0,71	0,41	1,02	1,61
Präzision bei:						
15 µg/ml (RSD) [%]	1,31	1,46	0,88	1,46	0,72	0,92
5 µg/ml (RSD) [%]	1,62	1,92	1,57	2,11	0,93	2,05
Richtigkeit:						
15 µg/ml [%]	0,08	0,03	0,10	0,02	0,45	0,69
5 µg/ml [%]	0,07	0,36	0,69	0,45	0,95	0,23

Tab. 6-5: Zusammenstellung wichtiger Validierungsparameter

6.6 Darstellung der Enantiomere von MDA, MDE und MDMA

Die einzelnen Enantiomere wurden entweder durch asymmetrische Synthese oder mittels Racemattrennung durch fraktionierte Kristallisation erhalten⁸. Im Folgenden wird eine Übersicht der Synthesen gegeben, zur ausführlicheren Beschreibung s. [191].

I) Synthese von (*R*)- bzw. (*S*)-MDA

- la) (*S*)- bzw. (*R*)-MDA wurde durch fraktionierte Kristallisation des racemischen MDA (Darstellung nach Shulgin [149]) in Methanol mittels (2*S*,3*S*)-(+)-Di-*O*-benzoylweinsäure bzw. (2*R*,3*R*)-(-)-Di-*O*-benzoylweinsäure ((+)- bzw. (-)-DBTA) nach der modifizierten Vorschrift von Büchler *et al.* [189] dargestellt.
- lb) (*R*)-MDA wurde durch asymmetrische Synthese aus Piperonylacetone (3,4-Methylenedioxy-propan-2-on) und (*R*)- α -Methylbenzylamin, bzw. das (*S*)-MDA entsprechend mit (*S*)- α -Methylbenzylamin, nach einer modifizierten Vorschrift von Nichols *et al.* [190,191] dargestellt. Diese reduktive Aminierung des Ketons mittels (*R*)- bzw. (*S*)- α -Methylbenzylamin an W-2 Raney Nickel führte über eine *N*-(α -Phenylethyl)-Zwischenstufe und anschließender katalytischer Debenzylierung zum gewünschten Produkt.

II) Synthese von (*R*)- bzw. (*S*)-MDMA

- Ila) (*R*)- bzw. (*S*)-MDMA wurde aus (*R*)- bzw. (*S*)-MDA (aus Racemattrennung Ia) über (*R*)- bzw. (*S*)-*N*-Formyl-MDA mit anschließender LiAlH₄-Reduktion dargestellt [149,190].
- Ilb) (*R*)- bzw. (*S*)-MDMA wurde aus fraktionierter Kristallisation des racemischen MDMA (aus Piperonylacetone und Methylamin [192]) in Methanol mittels (+) bzw. (-)-DBTA erhalten.

⁸ Die Synthesen wurden von Timo Kohles (AK Kovar) durchgeführt.

III) Synthese von (*R*)- bzw. (*S*)-MDE

- IIIa) (*R*)- bzw. (*S*)-MDE wurde aus (*R*)- bzw. (*S*)-MDA (aus Racemattrennung Ia) über *N*-Acetyl-MDA mit anschließender LiAlH₄-Reduktion nach [149] und [192] dargestellt.
- IIIb) (*R*)- bzw. (*S*)-MDE wurde aus fraktionierter Kristallisation des racemischen MDE (aus Piperonylacetone und Ethylamin [192]) in 2-Propanol:Wasser (6:4) oder EtOH mittels (+) bzw. (-)-DBTA nach der modifizierten Vorschrift von Büchler *et al.* [189] erhalten.

6.7 Reinheitsbestimmung der synthetisierten Enantiomere

Die drei synthetisierten Enantiomerenpaare von MDA, MDE und MDMA wurden mittels der validierten CE-Methode hinsichtlich ihrer Reinheit überprüft. Abb. 6-17, Abb. 6-18 und Abb. 6-19 zeigen Elektropherogramme der Enantiomere mit der größten Reinheit. Mit den Elektropherogrammen der Abb. 6-19 A und B konnten jeweils noch das entsprechende Enantiomer MDA, das Edukt dieses Syntheseweges, nachgewiesen werden.

Hier konnte erstmals in der CE eine Methode für drei verschiedene Enantiomerenpaare validiert werden, da in der Regel nur die Enantiomerenreinheit eines Enantiomerenpaares validiert wird.

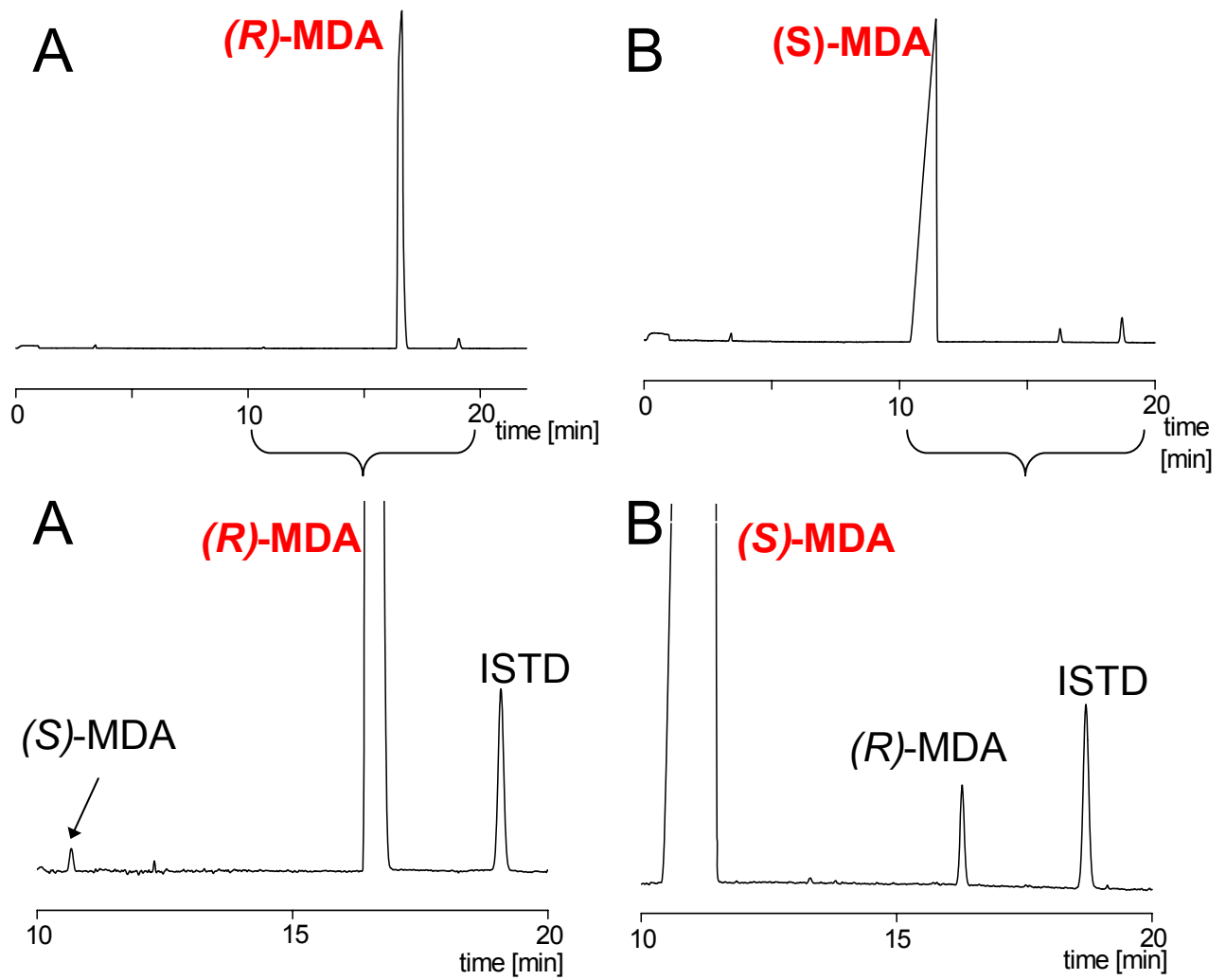


Abb. 6-17: Elektropherogramme von MDA aus fraktionierter Kristallisation, Verunreinigung mit A: (S)-MDA, B: (R)-MDA, oben: gesamtes Elektropherogramm, unten: Vergrößerung

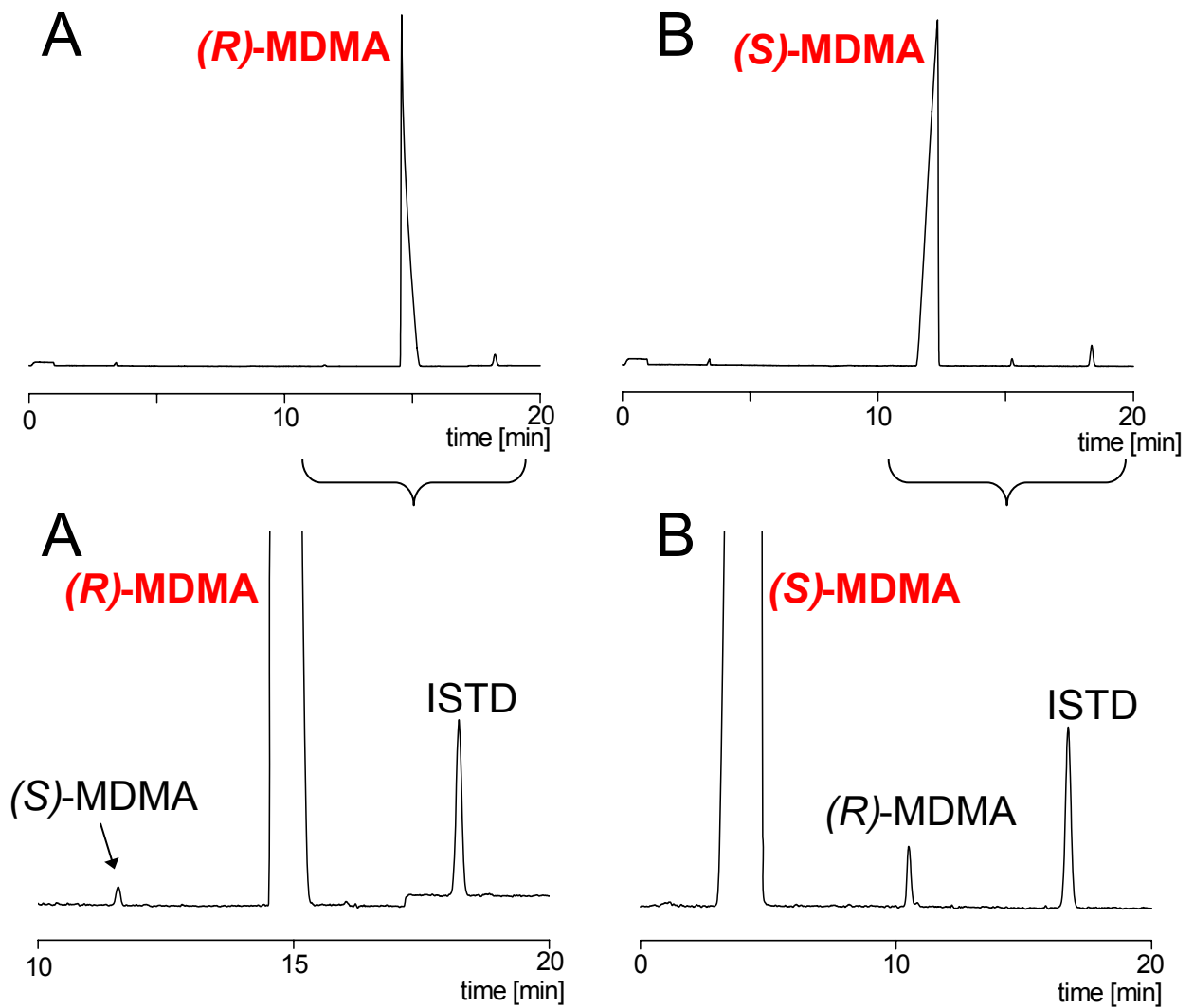


Abb. 6-18: Elektropherogramme von MDMA, Synthese aus MDA über (*R*)- oder (*S*)-*N*-Formyl-MDA mit anschließender LiAlH_4 -Reduktion, Verunreinigung mit A: (*S*)-MDMA und B: (*R*)-MDMA, oben: gesamtes Elektropherogramm, unten: Vergrößerung

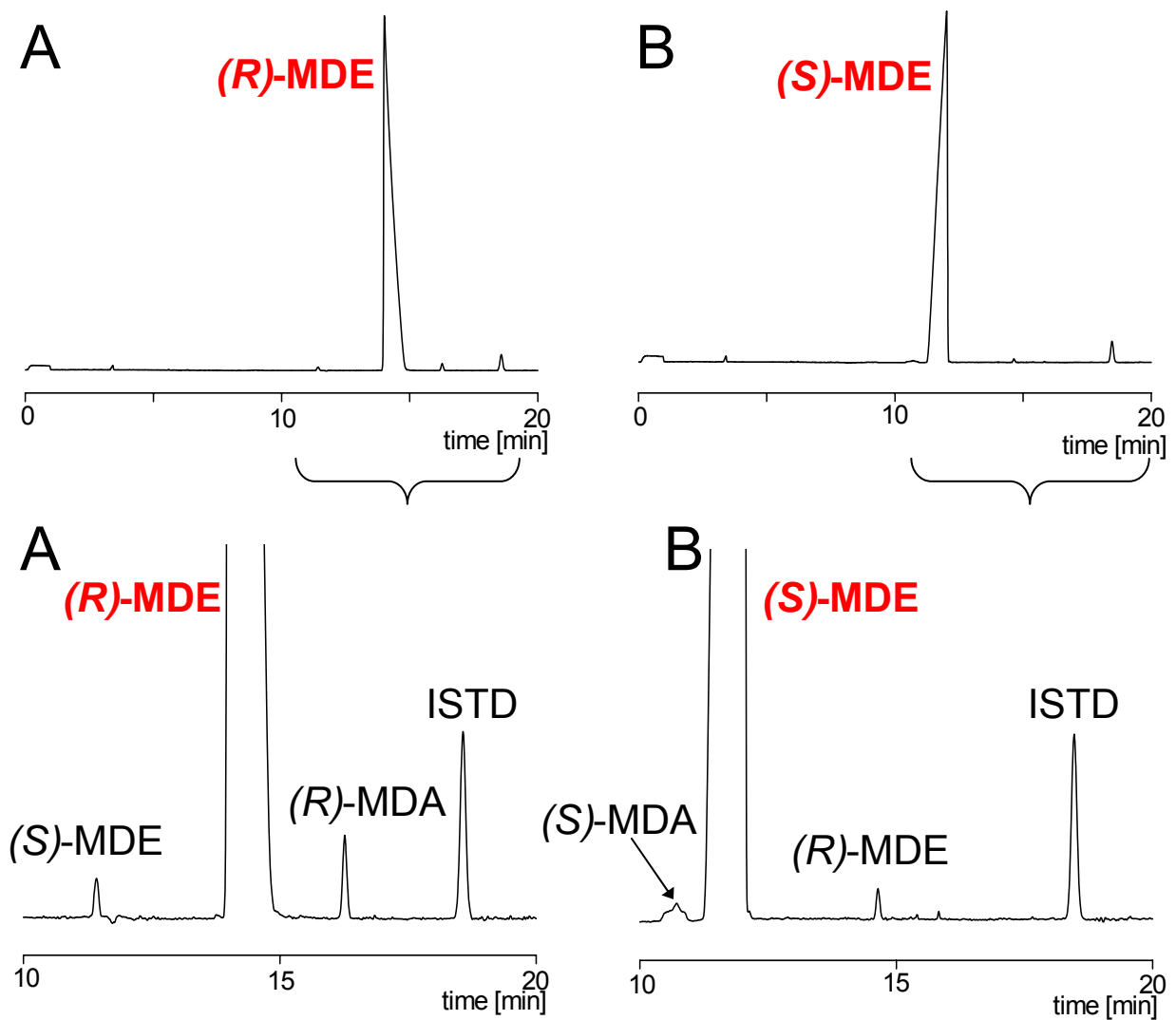


Abb. 6-19: Elektropherogramme der synthetisierten Enantiomere von MDMA, Synthese aus MDA über (R)- oder (S)-N-Acetyl-MDA mit anschließender LiAlH_4 -Reduktion, Verunreinigung mit A: (S)-MDE und (R)-MDA, B: (R)-MDE und (S)-MDA, oben: gesamtes Elektropherogramm, unten: Vergrößerung

In Tab. 6-6 sind die erhaltenen Daten aufgeführt.

Substanz	Einwaage [mg/10 ml]	Gehalt der e.i.	Anteil der e.i.*	s. Abb.
(R)-MDA-HCl ¹	10,06 mg	< 5 µg/mL	< 0,5%	Abb. 6-17 A
(S)-MDA-HCl ¹	10,01 mg	6,13 µg/mL	0,61%	Abb. 6-17 B
(S)-MDA-HCl ²	10,03 mg	12,86 µg/mL	1,28%	-
(R)-MDA-HCl ²	5,33 mg	10,81 µg/mL	2,03%**	-
(R)-MDMA-HCl ³	10,03 mg	< 5 µg/mL	< 0,5%	Abb. 6-18 A
(S)-MDMA-HCl ³	10,07 mg	< 5 µg/mL	< 0,5%	Abb. 6-18 B
(S)-MDMA-HCl ⁴	10,07 mg	< 5 µg/mL	< 0,5%	-
(R)-MDMA-HCl ⁵	9,98 mg	9,61 µg/mL	0,96%	-
(S)-MDMA-HCl ⁵	10,02 mg	8,56 µg/mL	0,86%	-
(R)-MDE-HCl ⁶	10,09 mg	< 5 µg/mL	< 0,5%	Abb. 6-19 A
(S)-MDE-HCl ⁶	10,16 mg	< 0,5 µg/mL	< 0,5%	Abb. 6-19 B
(R)-MDE-HCl ⁷	10,46 mg	12,76 µg/mL	1,28%	-
(S)-MDE-HCl ⁷	10,30 mg	> 15 µg/mL	> 1,5%	-
(R)-MDE-HCl ⁸	5,40 mg	> 15 µg/mL	> 1,5%	-
(S)-MDE-HCl ⁸	6,49 mg	> 15 µg/mL	> 1,5%	-
(S)-MDMA-HCl ⁹	10,16 mg	9,65 µg/mL	0,97 %	-
(S)-MDA-HCl ²	10,40 mg	> 15 µg/mL	> 1,5%	-
(S)-MDA-HCl ²	10,00 mg	14,00 µg/mL	1,40%	-

e.i.: enantiomeric impurity (enantiomere Verunreinigung)

* auf die Einwaage bezogen

** durch geringere Einwaage im Arbeitsbereich

¹ aus fraktionierter Kristallisation mit (+)- bzw. (-)-DBTA in Methanol

² aus asymmetrischer Synthese, mehrere Ansätze

³ aus ¹ über (R)- oder (S)-N-Formyl-MDA mit anschließender LiAlH₄-Reduktion

⁴ Referenzsubstanz

⁵ aus fraktionierter Kristallisation mit (+)- bzw. (-)-DBTA in Methanol

⁶ aus ¹ über (R)- oder (S)-N-Acetyl-MDA mit anschließender LiAlH₄-Reduktion

⁷ aus fraktionierter Kristallisation mit (+)- bzw. (-)-DBTA in Isopropanol/Wasser

⁸ aus fraktionierter Kristallisation mit (+)- bzw. (-)-DBTA in Ethanol

⁹ aus Mutterlaugen

Tab. 6-6: Ergebnisse der Reinheitsbestimmung der Syntheseproben

Die Ergebnisse aus der Quantifizierung zeigen, dass die höchsten Enantiomerenreinheiten durch die fraktionierte Kristallisation von MDA erhalten wurden. Die Enantiomerenverunreinigung bei (*R*)-MDA lag unterhalb des Arbeitsbereichs, während das (*S*)-MDA 0,61% (*R*)-MDA enthielt. Wurden diese Enantiomere als Edukte für die Synthese von enantiomerenreinem MDE und MDMA eingesetzt, wurden höhere Enantiomerenreinheiten (Verunreinigung < 0,5%) als für die jeweilige fraktionierte Kristallisation von racemischen MDE bzw. MDMA festgestellt.

Die erforderte Enantiomerenreinheit für die Tierversuche wurde auf Verunreinigung an Enantiomer auf < 1% festgelegt. Die Racematspaltung von MDMA in Methanol lieferte Reinheiten mit knapp unter 1% enantiomerer Verunreinigung. Die Racematspaltung von MDE in Isopropanol/Wasser (6:4) lieferte für MDE Werte über 1%. In Ethanol konnten ebenfalls keine Enantiomere mit ausreichender Reinheit getrennt werden, da die Werte über der oberen Grenze des Arbeitsbereiches von 1,5% lagen. Die asymmetrische Synthese von MDA aus Piperonylacetone und (*S*)- oder (*R*)- α -Methylbenzylamin ergab aus verschiedenen Ansätzen Verunreinigungen zwischen 1,3 bis 2,0%.

Demnach wurde für alle Enantiomere mindestens ein Syntheseweg gefunden, der eine ausreichende Reinheit für die Tierexperimente liefert.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien

Nicht aufgeführte Chemikalien stammen aus der Chemikalienausgabe des chemischen Institutes der Universität Tübingen.

Bei folgende Firmen wurden die nachstehenden Chemikalien käuflich erworben:

- Aldrich (Steinheim): 8-Bromooct-1-en, Polymethylhydrosiloxan (PMHS), Ammoniumhydrogendifluorid, wasserfreies Toluol und DMSO
- Fluka (Buchs, Schweiz): trockenes DMF, *n*-Heptan, Methanol, Methyljodid, NaOH, Tetraethoxysilan (TEOS), Tetramethoxysilan (TMOS), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), Dimethoxy-(3-mercaptoethyl)methylsilan, 3-(Mercaptoethyl)trimethoxysilan, 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan (9-BBN) (0,5 m in THF), α,α' -Azoisobutyronitril (AIBN), 2-HP- α -CD, 2-HP- β -CD, 2-HP- γ -CD
- Merck (Darmstadt): HPLC-grade Methanol und Acetonitril
- Degussa (Hanau): Hexachloroplatin(IV)säure
- ABCR-Petrarch (Karlsruhe): Octamethylcyclotetrasilan (D₄), Hexamethyldisiloxan (HMDSO)
- Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg): atropisomere PCB
- Michigan Diagnostics LLC (Michigan, USA): 14fach sulfatiertes γ -CD (hs(XIV)- γ -CD)
- Beckman Coulter GmbH (Krefeld): HS- γ -CD (hs(X)- γ -CD) (5 mL), 20% (w/v)
- Wacker (Burghausen): natives α -, β - und γ -CD, 1.8-Me- α -CD, 1.8-Me- β -CD, 1.8-Me- γ -CD, CM- β -CD

Die GC- und CEC-Testsubstanzen und das 2,3-Dihydroxy-6-sulfato- β -CD waren in den Beständen des AK Schurig vorhanden.

Das O-2-, O-3- und O-6-Chirasil- β -Dex wurde von Dr. Oliver Trapp zur Verfügung gestellt, wobei das O-3-Mono(octen-7-enyl)- β -CD von Dr. Hervé Cousin dargestellt wurde. Das selektiv synthetisierte O-2- und O-6-Mono(octen-7-enyl)- β -CD und die Ansätze mit DMF als Lösemittel („one pot reaction“) und NaOH bzw. NaH als Base erhielt ich ebenfalls von Dr. Oliver Trapp.

Die Kapillaren für die p-CEC und die monolithischen Kapillaren für die rod-CEC („particle-glued monolith“) wurden von Dr. Dorothee Wistuba zur Verfügung gestellt. Sie wurden nach [59] (Chira-Dex-Silica-Kapillare), nach [58] (gepackte Chirasil- β -Dex-Kapillare) und nach [117] (monolithische, „particle-glued“ Kapillare) hergestellt.

Die Amphetaminderivate wurden im pharmazeutischen Institut (AK Kovar) der Universität Tübingen von Timo Kohles synthetisiert. Auch die untersuchten internen Standards 2,4-MDBA-HCl, *N*-Isopropyl-MDBA-HCl, *N,N*-DMMDPEA-HCl, *N*-Ethyl-MDPEA-HCl, *N*-Propyl-MDPEA-HCl und *N*-Ethyl-MDBA-HCl stammten aus den Beständen des AK Kovar.

Lösemittel:

THF und Diethylether wurden über basischem Aluminiumoxid gesäult und mit einer Natrium/Paraffin-Suspension unter Schutzgas (N_2) destilliert, wobei Benzophenon als Indikator zugesetzt wurde. Pyridin wurde auf Molsieb (4 Å) destilliert. Wasserfreies Toluol, DMSO und DMF wurden aus unter Schutzgas stehenden Septumflaschen entnommen.

Gase:

Die Gase Stickstoff (Reinheit 4.6 und 5.0), Helium (5.0) und Wasserstoff (5.0) wurden von der Firma Messer-Griesheim bezogen.

Puffer:

Die Puffer wurden mit „HPLC Gradient grade“ Wasser (Fisher Scientific, Leicestershire, UK) hergestellt und gefiltert (0,45 μ m Porengröße, Macherey-Nagel, Düren). Die mittels pH-Meter eingestellten Pufferlösungen wurden maximal 1 Woche im Kühlschrank aufbewahrt, pH-neutrale Puffer wurden frisch angesetzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte vor Zugabe von organischem Modifier oder chiralen Additiven.

Phosphat/Borat-Puffer:

Aus $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$ und $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ wurden jeweils die entsprechend konzentrierten Lösungen hergestellt und der pH-Wert über die Mischungen der beiden Lösungen eingestellt.

Phosphat-Puffer: Aus $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und H_3PO_4 wurden die entsprechend konzentrierten Lösungen hergestellt und der pH-Wert über die Mischungen der beiden Lösungen eingestellt.

MES: Aus 3-Morpholinoethansulfonsäure wurde die entsprechend konzentrierte Lösung hergestellt und der pH-Wert mit äquimolarer NaOH bzw. HCl eingestellt.

TEAA: Aus Triethylammoniumacetat wurde die entsprechend konzentrierte Lösung hergestellt und der pH-Wert mit äquimolarer NH_3 bzw. HCl eingestellt.

Kapillarsäulen:

Fused-Silica-Kapillarsäulen: 50 μm und 100 μm (i. d.) von den Firmen MicroQuartz (München), Grom (Herrenberg) und Ziemer (Mannheim).

Fused-Silica-Kapillarsäulen: 250 μm (i. d.) von den Firmen MicroQuartz (München) und Varian-Chrompack (Middelburg, Niederlande).

Silica-Packungsmaterial:

Silicapartikel (Nucleosil, 5 μm oder 3 μm , 300 Å) wurden von Grom (Herrenberg) bezogen.

DC:

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte auf DC-Fertigplatten Polygram Sil G/UV 254 (Größe 75 x 40 mm) (Macherey-Nagel, Düren), die Detektion mit 10%iger H_2SO_4 in Ethanol als Sprühreagenz.

Flash-Säulenchromatographie:

Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mit Kieselgel (63-200 mesh, Normasil von Merck).

7.2 Geräte

NMR-Spektroskopie:

Bruker Avance WM 400, Messfrequenzen: ^1H -NMR-Spektren: 400,13 MHz, ^{13}C -NMR-Spektren: 100,75 MHz. Bei allen Experimenten wurde CDCl_3 als Lösemittel verwendet.

HPLC/RI:

Die HPLC/RI-Messungen wurde mit einer 305 Pump Abimed Pumpe der Firma Gilson und einem RI 2000 RI-Detektor durchgeführt.

HPLC/MS:

Die HPLC/MS-Messungen wurden auf einem ESI-Ion Trap MS (Esquire 3000plus) Gerät der Firma Bruker Daltonics (Bremen) gekoppelt mit einer HPLC-Anlage HP 1100 Plus von Agilent Technologies (Waldbronn) durchgeführt. Die Software-Programme für die Steuerung des Gerätes und Auswertung der Messungen waren esquireControl, Version 5.0 und Bruker Daltonics esquire 5.0.

LC-Bedingungen:

Säule: Nucleosil- C_6H_5 , EC 100-5, 4,6 mm x 250 mm, Macherey-Nagel (Düren), mobile Phase: Wasser:Acetonitril 1:1, Flussrate: 0,5 mL/min, Temperatur: 25 °C, Probenkonzentration: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in Laufmittel gelöst

ESI-MS-Bedingungen:

Die „target mass“ wurde je nach Analyt eingestellt [m/z]:

Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD: 1547,7, Dioctenylpermethyl- β -CD: 1643,6, Mono(octen-7-enyl)- β -CD: 1268, Dioctenyl- β -CD: 1378, permethyliertes β -CD: 1451,7, natives β -CD: 1158

Bei den Messungen wurde ein Massenbereich [m/z] von 50-2000 aufgezeichnet. Der Nebulizer wurde auf einen Druck von 30 psi eingestellt. Die Menge des Trockengases („dry gas“) Stickstoff betrug 10 L/min mit einer Temperatur von 350 °C. Die Polarität war bei den sulfatierten CD-Derivaten negativ, bei den neutralen positiv (Detektion der Na-Addukte) eingestellt.

pH-Meter:

Der pH-Wert der Pufferlösungen wurden mit einem pH-Meter (Hanna instruments pH 211 Microprozessor) eingestellt. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit Standardlösungen des gewünschten pH-Bereiches.

Analysenwaage:

Die Analysenwaage BP 110 S war von der Firma Sartorius AG (Göttingen).

FT-IR:

Die FT-IR-Messungen wurden mit dem Gerät Spectrum 1000 von Perkin Elmer durchgeführt. Der Wellenzahlbereich der Messungen lag hierbei zwischen 4000 und 200 cm^{-1} . Zunächst musste der Polyimidfilm der Kapillaren für diese Messungen entfernt werden. Dazu wurden sie kurz in HNO_3 getaucht, mit Wasser abgewaschen und dann der Film mit einem Skalpell vollständig abgelöst. Nach dem Zerreiben der Kapillare mit KBr wurde ein Pressling zur Messung hergestellt.

GC/FID:

Die gaschromatographischen Untersuchungen erfolgten mit einem Carlo-Erba HRGC Mega 5300 Series Instrument und einem Shimadzu C-R3A oder Shimadzu C-R6A Integrator. Die Durchflusszeit t_M wurde mit Methan bestimmt.

GC-Bedingungen:

Kapillare: Fused-Silica, 25 m x 0,25 mm (i. d.)

Film: 0,25 μm Chirasil- β -Dex (O-6-, O-3- oder O-2-Chirasil- β -Dex)

Trägergas: H_2 , der Trägergasdruck wurde so eingestellt, dass die inerten Standards gleiche Retentionszeiten ergaben.

Split: 50 mL/min

Injektor: 250 °C

Detektor: 250 °C

Brenngase: je 0,5 bar

CE/UV und CEC/UV:

Für die CE und CEC Messungen wurden folgende Geräte verwendet:

Das CE-Gerät Typ PrinCE Unicam Crystal 300/31 der Firma Lauerlab wurde für o-CEC Messungen eingesetzt. Die dabei verwendeten „on column“ UV-Detektoren waren von den Firmen Chrompack Typ UV var und Bischoff Typ Lambda 1000. Die Datenaufzeichnung und Integration erfolgte über die Software 3D-CE ChemStation (Agilent Technologies).

Das sowohl zur Validierung (CE) und für o-CEC-Messungen eingesetzte Gerät war von der Firma Beckman-Coulter GmbH vom Typ P/ACE™ System MDQ Capillary Electrophoresis. Die Datenauswertung erfolgte über die Software P/ACE System MDQ Version 1.5.

Mit dem Agilent CE-Gerät (Agilent Technologies) wurden sowohl CE als auch o-CEC Messungen durchgeführt. Zudem wurden UV-Spektren verschiedener Analyte mithilfe des integrierten DAD-Dektors aufgenommen. Die Datenaufzeichnung und Auswertung erfolgte über die 3D-CE ChemStation Software.

Die p- und rod-CEC-Experimente erfolgten mit dem CE-Gerät und dem UV-Detektor Grom System 100. Zur Druckunterstützung und für μ -LC-Messungen wurde eine HPLC-Pumpe S1121 der Firma Sykam (Gilching) eingesetzt.

Elementaranalyse:

Die Elementaranalyse erfolgte mit dem Gerät Vario EL der Firma Elementar.

REM-Rasterelektronenmikroskopie:

Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss DSM 962 (max. 30kV)

REM-Bedingungen:

Auflösungsgrenze 4,5 nm, Wolfram-Haarnadelkathode,

Elektronenquelle: bis zu 30 keV für die niedrigste Auflösung

Vergrößerung: 4-300 000fach

RE-Detektor: Szintillatorscheibe, YAP-Einkristall (Cer dotierter Yttrium Aluminium Perowskit Kristall) für das Sekundärelektronenbild mit automatischer oder manueller Optimierung von Helligkeit und Kontrast

Beschleunigungsspannung: 5-15 kV

UHV-System: Probenkammer mit einer Turbomolekularpumpe, Probentransfer innerhalb 2 min.

Die Proben für das Rasterelektronenmikroskop müssen, um elektrisch leitend zu sein, mit einer Metallschicht überzogen werden. Daher wurde mit der Sputteranlage der Firma Balzers SCD 050 eine Platinschicht aufgesputtert.

Die Kapillaren wurden in einem Winkel von ca. 45° auf den Probenteller befestigt, um die Topographie der Kapillarinnenwand als Sekundärelektronenbild zu erhalten.

Die gewählten Vergrößerungen waren 200 bis 5000fach.

7.3 Synthesen

Die Darstellung von Chirasil- β -Dex erfolgte nach der Literatur [68,69].

7.3.1 Darstellung von Mono(octen-7-enyl)- β -CD

10 g (8,9 mmol) β -CD wurde unter starkem Rühren in einen 1 L Dreihalskolben mit Stickstoffeinlaß und Tropftrichter in einer Stickstoffatmosphäre zu 200 mL absolutem DMSO hinzugeben. Zu der Lösung wurden dann 1,05 g (26,1 mmol) fein zermahlene Natriumhydroxid hinzugefügt und die gelbe Lösung 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach tropfte man 4,21 g (22,2 mmol) 8-Bromoct-1-en in 25 mL absolutem DMSO über 8 h langsam zu und rührte noch 48 h bei Raumtemperatur. Durch Filtration wurde aus der Reaktionsmischung das Natriumbromid und das unreaktierte Natriumhydroxid entfernt und die Lösung auf 15 mL im Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mit 15 mL Methanol verdünnt und zu dieser klaren Lösung 200 mL Diethylether zugegeben, um das Produkt auszufällen. Das kristalline, leicht bräunliche Produkt wurde dann abgesaugt. Um das reine mono-octenylierte β -CD zu erhalten, wurde mittels Flash-Chromatographie (Laufmittel: Ethanol/Toluol 2:1) das unreaktierte β -CD und die zwei- und mehrfach octenylierten Produkte abgetrennt. Der Säulenkopf wurde mit belegtem Kieselgel gepackt. Dies wurde erhalten, indem man das Produkt in 40 mL DMF löste, 20 g Kieselgel hinzufügte und über Nacht am Rotationsverdampfer bei 60 °C und 0,1 Torr trocknete. Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels DC.

Ausbeute: 3,06 g (28%) monoocetyliertes Produkt

$^1\text{H-NMR}$ (ppm, CDCl_3 , 400 MHz): 4,90-4,99 (2 schwache Multipletts, olefinische CH_2 -Gruppe), 5,46-5,58 (Multiplett OH, genaue Zuordnung nicht möglich), 5,71-5,73 (schwaches Multiplett, olefinische CH-Gruppe)

R_f -Werte: mit Ethanol:Toluen, 2:1, β -CD 0,17; Mono(octen-7-enyl)- β -CD 0,33, Di(octen-7-enyl)- β -CD 0,45

ESI-MS: Mono(octen-7-enyl)- β -CD: $m/z = 1268$, Di(octen-7-enyl)- β -CD: $m/z = 1378$, natives β -CD: $m/z = 1158$

7.3.2 Darstellung von Mono(octen-7-enyl)-permethyl- β -CD

In einer Stickstoffatmosphäre wurden 3,0 g (120 mmol) 95%iges Natriumhydrid in einen 500 mL Vierhalskolben geben, der einen Stickstoffeinlass, ein Innenthermometer, zwei Tropftrichter und einen Rückflusskühler hatte. 3,06 g (2,45 mmol) Mono(octen-7-enyl)- β -CD wurden in 100 mL wasserfreien DMF gelöst. Die Hälfte dieser Lösung tropfte man durch einen Tropftrichter zu. Dabei fand eine heftige Reaktion statt, bei der Wasserstoff entstand. Nach deren Beendigung wurde die Hälfte von 11,8 mL (189 mmol) Methyljodid (cancerogen!) durch den zweiten Tropftrichter bei einer Wasserbad-Temperatur von 20 °C langsam zugetropft, so dass die Temperatur nicht über 25 °C anstieg. Nachdem man 30 min gerührt hatte, tropfte man die andere Hälfte der Cyclodextrinlösung dazu, danach die andere Hälfte des Methyljodids. Anschließend wurde noch 1 h weitergerührt. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung vorsichtig in 500 mL Eiswasser gegossen und dreimal mit je 300 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden dreimal mit je 40 mL Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nachdem das Lösemittel entfernt und das Produkt bei 0,01 Torr und 60 °C getrocknet wurde, erhielt man einen weißen Feststoff, bei dem keine weitere Aufreinigung nötig war.

Ausbeute: 3,5 g (80%).

Schmelzpunkt: 98 °C

$^1\text{H-NMR}$ (ppm, CDCl_3 , 400 MHz): 4,92, 4,97 (zwei schwache Multipletts, olefinische CH_2 -Gruppe), 5,78 (schwaches Multiplett, olefinische CH-Gruppe)

$^{13}\text{C-NMR}$ (ppm, CDCl_3 , 100 MHz): 25,8, 28,8, 30,0, 33,7 (Octenylgruppe), 114,1 (C8 der Octenylgruppe), 139,0 (C7 der Octenylgruppe)

R_f-Werte: mit Toluol:Ethanol, 4:1, permethyliertes β-CD 0,54; Mono(octen-7-enyl)-permethyl-β-CD: 0,58, Di-(octen-7-enyl)-permethyl-β-CD: 0,61

ESI-MS: Mono(octen-7-enyl)-permethyl-β-CD: m/z = 1547,7, Di-(octen-7-enyl)-permethyl-β-CD: m/z = 1643,6, permethyliertes β-CD: m/z = 1451,7.

7.3.3 Darstellung von (10% Hydromethyl) (90% Dimethyl)polysiloxan

(MW ≈ 3000)

Eine Mischung aus 7,83 g (106 mol Monomereinheiten) Octamethylcyclotetrasiloxan (D₄), 0,7 g (11,5 mmol Monomereinheiten) Polymethylhydrosiloxan (PMHS), 0,48 g (2,9 mmol) Hexamethyldisiloxan (HMDSO) und ca. 0,05 mL konzentrierte H₂SO₄ wurde im Rundkolben mit Rückflusskühler und Trockenrohr auf 100 °C erhitzt. Danach gab man ca. 1-2 g Kaolin zu und rührte 5 Tage bei 100 °C, wobei während dieser Zeit das Reaktionsgemisch immer viskoser wurde. Nach dem Abkühlen wurden zu dem Gemisch 200 mL Diethylether hinzugegeben und das Kaolin durch Absaugen entfernt. Nach dem Waschen mit Wasser, trocknete man über Magnesiumsulfat und entfernte das Lösemittel. Nach Trocknung bei 0,01 Torr und 120 °C über Nacht erhielt man das klare, mittelviskose Produkt.

Ausbeute: 7,65 g (85%)

¹H-NMR (ppm, 400 MHz, CDCl₃): -0.02 - 0.25 (Multipllett, 97,8, Si(CH₃), 4,61 (Singulett, 2,2, Si-H). Die Integration ergab 14,1: 100, also 12,3% Si(O)CH₃-H.

7.3.4 Darstellung von Chirasil-β-Dex

0,56 g (0,37 mmol) Mono(octen-7-enyl)-permethyl-β-CD und 1,02 g (ca. 0,33 mmol) Dimethylpolysiloxan mit ca. 12% Si-H-Gruppen und 40 mL absolutem Toluol wurden unter Stickstoff in einen Dreihalskolben mit Stickstoffeinlass und Rückflusskühler eingebracht. Zu der unter Rückfluss kochenden Lösung wurden über 24 h in mehreren Portionen einer Lösung des Katalysators Hexachloroplatinsäure (0,5 mg) in 1 mL frisch destilliertem, absolutem THF zugegeben. Danach wurde das Lösemittel entfernt. Unreagiertes Cyclodextrin wurde durch Absaugen einer Lösung des Produkts in n-Pentan entfernt. Das Produkt wurde dreimal mit ca. 5 mL Methanol gewaschen. Das leicht gelbliche Produkt wurde in Methylenchlorid gelöst und durch

einen 0,5 µm Filter von Partikeln befreit. Nach Entfernen des Lösemittels wurde es bei 60 °C und 0,05 Torr über Nacht getrocknet.

Ausbeute: 0,8 g (53%)

$^1\text{H-NMR}$ (ppm, 400 MHz, CDCl_3): zusätzlich zu den oben beschriebenen Cyclo-dextrin-Signalen: -0.15 bis +0.25 (SiMe-Gruppen). Durch Integration der Signale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums wurde das Verhältnis $\text{Si(O)CH}_3\text{-H}:\text{Si(O)(CH}_3)_2$ als ungefähr 9,3:100, d. h. Restgehalt der $\text{Si(O)CH}_3\text{-H}$ ca. 8,5%, bestimmt. Der Selektorgehalt ergab somit ca. 44%.

7.4 Herstellung der Trennkapillaren

7.4.1 Herstellung der Chirasil- β -Dex-Kapillaren für die GC

Die 25 m x 0,25 mm (i. d.) Fused-Silica-Kapillaren wurden in einem schwachen H_2 -Strom bei 250 °C 24 h dehydratisiert. Danach erfolgte keine weitere Desaktivierung. Die Kapillare wurde mit einer 0,4%igen (w/v) Lösung in Diethylether, die zuvor filtriert wurde, statisch belegt [193]. Um Temperaturschwankungen zu vermeiden und die Verdunstungskälte schnell abzuführen, wurde die Kapillaren dazu in ein Wasserbad gelegt. Die Belegung erfolgte bei Raumtemperatur und bei ca. 0,1 Torr. Die resultierende Filmdicke betrug 0,25 µm. Zur Aufnahme von Testchromatogrammen (Analyte: 1-Phenylethanol, n-Dodecan und n-Tridecan) wurde die Kapillare bei einem Druck von 1 bar H_2 mit einer Heizrate von 1 °C/min auf die Mess-temperatur gebracht und über Nacht konditioniert.

Zur thermischen Immobilisierung wurden die Kapillaren bei einem schwachen H_2 -Strom (ca. 60 Blasen pro Minute) mit einer Heizrate von 1 °C/min auf 220 °C erhitzt und bei 220 °C 48 h immobilisiert. Danach erfolgte eine weitere Aufnahme von Testchromatogrammen.

7.4.2 Herstellung der Chirasil- β -Dex-Kapillaren für die o-CEC

Die Kapillaren wurden in einem schwachen H_2 -Strom (ca. 60 Blasen pro Minute) bei 250 °C 2 h dehydratisiert. Danach erfolgte keine weitere Desaktivierung. Die Kapillaren wurden mit einer 1,6% (w/v) Lösung in Diethylether, die zuvor filtriert wurde analog der GC-Kapillaren statisch belegt [193]. Die resultierende Filmdicke

betrug 0,2 μm . Auch hier wurden zur Aufnahme von Testchromatogrammen (1-Phenylethanol, n-Dodecan und n-Tridecan) die Kapillaren bei einem Druck von 1,0 bar H_2 mit einer Heizrate von 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$ auf die Messtemperatur gebracht und einige Stunden konditioniert.

Die thermischen Immobilisierung erfolgte wie in Kap. 7.4.1 bei den GC-Kapillaren. Nach der Aufnahme von Testchromatogrammen wurde nicht immobilisiertes Polymer ausgewaschen. Hierzu wurden verschiedene Lösemittel bzw. Mischungen daraus (MeOH, MeOH:DCM 9:1, 2:1, 1:1,1:2, Diethylether) mit fallender Polarität verwendet, um ein Verstopfen der Kapillare mit gelöstem Polymer zu vermeiden. Durch Aufnahme weiterer Testchromatogramme konnte der Immobilisierungsgrad, der sich aus dem Verhältnis der Retentionsfaktoren k vor und nach dem Auswaschen ergab, berechnet werden. Auch die Trennfaktoren α und die Bodenzahlen N wurden verfolgt. N ist allerdings sehr stark von der aufgegebenen Probenmenge abhängig (s. Kap. 5.1.4, Tab. 5-1). Zur Herstellung des Detektionsfensters wurde der Polyimid-Film mit einem Glühdraht in einem kleinen Bereich (ca. 2-4 mm) entfernt, wobei die Glührückstände mit Aceton sorgfältig abgewischt wurden.

7.4.3 Herstellung einer Chira-Dex-Trennkapillare für die o-CEC

7.4.3.1 Direkte Anbindung des Selektors an die Kapillarwand

Die Herstellung erfolgte nach den Versuchsvorschriften [59] und [134], wobei die hier beschriebenen Verfahren für die Derivatisierung von Silicapartikeln angegeben sind und dementsprechend für Kapillaren modifiziert werden mussten.

Zunächst wurde eine 50 μm (i. d.) Kapillare (1,5 m) 15 min mit 0,1 M NaOH und 10 min mit Methanol gespült und unter einem Stickstoffstrom 30 min getrocknet. 2,0 mL 3-(Mercaptopropyl)-trimethoxysilan wurden in 0,75 mL trockenem Pyridin und 0,75 mL trockenem Toluol gelöst und bei 98 $^\circ\text{C}$ in einem GC-Ofen bei einem sehr kleinen Fluss 40 h lang durch die Kapillare gedrückt. Danach wurde die Kapillare mit Toluol, Aceton, Diethylether und Pentan je 15 min gespült und das restliche Lösemittel mindestens 30 min mittels eines Stickstoffstroms entfernt.

Zur Anbindung des Selektors an die 3-Mercaptopropyl-Silica-Kapillare wurde eine Lösung von 4 mg AIBN (α, α' -Azoisobutyronitril) und 33 mg O-2-Mono(oct-7-enyl)-permethyl- β -CD in 3 mL Chloroform bei 58 $^\circ\text{C}$ weitere 40 h durch die Säule gedrückt.

Danach wurde die Chira-Dex-Kapillare mit Methanol 30 min lang gespült, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und anschließend mit dem Trennpuffer konditioniert.

7.4.3.2 Anätzung der Kapillaren und Anbindung des Selektors

Die Anätzung erfolgte nach der modifizierten und optimierten Versuchsvorschrift nach [136] und [140]. Zunächst wurde eine 50 μm (i. d.) Kapillare (je nach Anätzhäufigkeit ca. 1,5-2,0 m) zur Entfernung von Unreinheiten, die den Ätzvorgang negativ beeinflussen könnten, mit 12 M HCl befüllt, mit Septen verschlossen und bei 80 °C über Nacht in einem GC-Ofen erhitzt. Danach wurde sie mit Wasser, Aceton und Diethylether je 10 min gespült und in einem Stickstoffstrom 30 min getrocknet.

Es wurde darauf geachtet, dass immer dieselbe Charge an Kapillaren verwendet wurde, um Einflüsse eines anderen Materials ausschließen zu können. Damit konnte der Einfluss der Ätzparameter wie Befüllungsdauer, Temperatur, Ätzdauer, Spülschritte usw. eindeutiger untersucht werden.

Eine frisch angesetzte, methanolische Ammoniumhydrogendifluoridlösung (50 mg/mL) wurde in die Kapillare gefüllt, die dann mit Septen verschlossen und 1 h 15 min stehen gelassen wurde. Anschließend wurde die Lösung mit einem sehr schwachen Stickstoffstrom entfernt. Dieser Vorgang wurde sofort abgebrochen, sobald keine Lösung mehr aus der Kapillare kam. Somit sollte eine möglichst große Menge an Ätzreagenz durch den dynamischen Belegungsvorgang an der Kapillaroberfläche verbleiben. Die Kapillare wurde dann an beiden Enden zugeschmolzen und in einen GC-Ofen bei 300-400 °C einige Stunden (3-4 h) angeätzt. Es musste darauf geachtet werden, dass die Kapillaren dicht verschlossen waren (anfänglich benutzte GC-Septen wurden bei 400 °C schnell porös), um eine erfolgreiche Anätzung zu erreichen. Danach wurde die Kapillare bei Raumtemperatur 2 h mit Methanol gespült und 30 min in einem Stickstoffstrom getrocknet.

Für die EOF-Messungen wurden die angeätzten Kapillaren mit 0,1 M NaOH, Wasser und dem entsprechenden Trennpuffer jeweils 10 min gespült.

Bevor eine weitere Modifizierung der Kapillaroberfläche erfolgte, wurde diese in einigen Spülschritten zur Aktivierung wie folgt vorbehandelt: 20 h mit 6 mM NH_3 -Lösung (pH 10), 1 h mit Wasser, 4 h mit 0,1 N HCl, 2 h mit Wasser. Dann wurde die Kapillare 20 h in einem GC-Ofen bei 100 °C getrocknet.

Anbindung des Selektors an eine angeätzte Kapillare:

Die trockene, angeätzte Kapillare wurde wie in Kap. 7.4.3.1 mit 3-(Mercaptopropyl)-trimethoxysilan modifiziert.

Die Anbindung des Selektors erfolgte unter drastischeren Bedingungen als oben beschrieben: Eine Lösung von 60 mg O-2-Mono(oct-7-enyl)-permethyl- β -CD in Toluol (trocken) und 12 mg AIBN wurde bei 100 °C in einem GC-Ofen bei einem langsamen Fluss durch die Kapillare gespült, wobei einige Male der Druck völlig entfernt wurde, um eine optimale Erwärmung der Lösung und damit genügend Möglichkeit zur Reaktion zu gewährleisten. Dieser Prozess wurde 74 h lang durchgeführt. Danach wurde die modifizierte Kapillare mit Methanol 30 min gespült, unter einem Stickstoffstrom getrocknet und mit dem Trennpuffer konditioniert.

7.5 Validierung

Die Synthesen, die Optimierung der Trennungen und die Reinheitsbestimmungen der Amphetaminderivate wurde im Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen im AK Kovar durchgeführt. Für die CE-Untersuchungen wurde das Beckman P/ACE MDQ Gerät in einen vollklimatisierten Raum des AK Kovar gebracht.

7.5.1 Ohm'scher Plot

Die optimale Spannung wurde mit einem Stromstärke/Spannungs-Plot ermittelt. Die Kapillare wurde hierzu mit dem betreffenden Puffer gespült und die Spannung in Inkrementen von 3 kV von 3-30 kV erhöht. Die Stromstärke wurde während dessen gemessen und notiert, sobald sie einen konstanten Wert annahm. Bei Veränderung eines Parameters wurde der gesamte Plot neu aufgezeichnet.

7.5.2 Bedingungen der CE/UV-Bestimmungen

Trennbedingungen für die Prüfung auf Enantiomerenreinheit von MDA, MDMA und MDE mittels CE:

Kapillare:	Fused-Silica, (eff. Länge) 40 cm x 50 µm (i. d.)
Kapillartemperatur:	20 °C
Probentemperatur:	8 °C
Spannung:	-17 kV
Puffer:	3% hs(XIV)- γ -CD, 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat/Phosphorsäure, pH 2,5
Injektionsdauer:	10 s
Injektionsdruck:	50 mbar
UV-Detektion:	200 nm
Konditionierung:	5 min spülen mit 0,1 M NaOH, 5 min spülen mit Puffer

7.5.3 Herstellung der Standardlösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen wurden zunächst die Reinheiten von MDA, MDMA, MDE und 3,4-MDBA geprüft. Die abgewogenen Substanzen wurden dann in 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 2,5) gelöst und zur Herstellung der Standardlösungen auf entsprechende Konzentrationen verdünnt. Die Methodenentwicklung, Kalibrierung und Validierung erfolgte mit den racemischen Standardlösungen der jeweiligen Substanzen.

Stammlösungen für MDA, MDMA, MDE und 3,4-MDBA:

11,11 mg racemisches MDA Hydrochlorid,

11,11 mg racemisches MDMA Hydrochlorid,

11,11 mg racemisches MDE Hydrochlorid und

9,08 mg 3,4-MDBA (interner Standard, ISTD)

wurden jeweils gelöst und auf 100,0 mL mit Phosphatpuffer aufgefüllt.

Die Standardlösungen (mit Konzentrationen von jeweils 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10,0 µg/mL, 12,5 µg/mL bzw. 15,0 µg/mL Enantiomer als Hydrochlorid) wurden aus Aliquoten der Stammlösungen und aus 900 µL Stammlösung des internen Standards hergestellt und auf 10,0 mL verdünnt.

7.5.4 Validierung der CE-Methode

Die Kalibrierung und Validierung der CE-Methode erfolgte unter Beachtung der ICH-Richtlinien zur Validierung von Analyseverfahren [188], nach der Anlage zu den Richtlinien der GTFCh (Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie) [185] und nach Kromidas [187].

7.5.4.1 Festlegung der Arbeitsbereiche

Verunreinigungen von 1%, gemäß der festgelegten Anforderung für die Tierexperimente, entsprechen 10 µg/mg an Enantiomer (auf das Hydrochlorid bezogen). Daher wurde für alle sechs Enantiomere Arbeitsbereiche von 5 bis 15 µg/mL festgelegt, so dass die Spezifikationsgrenzen von 1% genau in der Mitte der Kalibriergeraden liegen.

7.5.4.2 Rohdaten

Die mittels CE-Messungen ermittelten Rohdaten der Racemate sind in Tab. 7-1 und Tab. 7-2 zusammengefasst.

	(S)-MDMA	(R)-MDMA	ISTD	(S)-MDA	(R)-MDA	ISTD	(S)-MDE	(R)-MDE	ISTD
1a	1167,11	1126,92	786,86	1380,06	1337,78	863,29	989,06	993,05	718,11
1b	1422,61	1384,37	985,56	1295,30	1271,64	835,96	1096,14	1097,73	802,61
1c	1456,26	1417,85	993,66	1276,79	1246,77	805,43	1215,05	1206,51	867,85
1d	1392,72	1347,87	941,42	1247,44	1228,84	808,43	1173,29	1172,75	850,15
1e	1266,32	1239,48	853,27	1243,88	1218,17	799,32	1124,07	1130,52	813,40
1f	1293,97	1265,65	901,90	1215,20	1199,12	785,09	1099,79	1099,15	787,65
2a	1062,59	1022,21	878,91	1025,36	1020,66	800,74	824,72	838,42	726,05
2b	1038,95	1010,54	851,78	1075,25	1036,67	813,49	783,84	787,07	683,12
2c	1052,21	1012,62	854,32	1114,99	1083,26	843,22	751,23	756,35	678,78
3a	839,59	816,13	858,46	851,03	826,16	789,05	623,50	621,33	681,04
3b	818,39	807,20	853,12	827,53	819,93	801,18	671,54	674,79	744,21
3c	814,84	788,96	834,29	835,56	826,18	799,89	660,69	660,23	725,27
3d	810,24	780,01	813,63	840,46	829,06	799,25	663,89	666,27	737,77
3e	802,90	784,66	837,21	853,09	839,67	814,66	691,94	693,75	742,47
3f	825,59	801,48	825,43	829,15	813,74	795,06	666,43	666,25	723,83
4a	633,64	613,18	853,41	739,30	703,65	906,91	514,75	510,41	749,56
4b	639,09	619,86	891,47	660,88	643,43	838,43	513,65	516,08	754,20
4c	634,81	602,66	869,26	671,76	657,87	849,13	520,43	516,94	758,64
5a	424,60	403,63	843,74	457,13	434,25	831,60	362,71	363,88	806,31
5b	413,23	391,86	856,39	440,19	425,02	810,58	336,11	335,57	729,05
5c	443,03	415,97	885,23	448,36	432,55	850,35	353,52	367,55	808,97
5d	455,00	426,99	928,36	448,32	428,27	824,33	353,24	353,03	767,78
5e	467,18	444,24	959,55	469,06	448,16	885,87	349,37	351,52	761,93
5f	466,94	453,22	972,41	439,81	428,46	844,03	353,17	355,59	770,62

Tab. 7-1: Korrigierte Peakflächen von 3,4-MDBA (ISTD) und der Enantiomere von MDMA, MDA und MDE, 1a-f: 15,0 µg/mL Analyt (als Hydrochlorid), 2a-c: 12,5 µg/mL, 3a-f: 10,0 µg/mL, 4a-c: 7,5 µg/mL, 5a-f: 5,0 µg/mL

	(S)-MDMA	(R)-MDMA	(S)-MDA	(R)-MDA	(S)-MDE	(R)-MDE
1a	1,48326	1,43178	1,59860	1,54963	1,37731	1,38286
1b	1,44346	1,41122	1,54947	1,52117	1,36571	1,36769
1c	1,46555	1,41992	1,58522	1,54795	1,40007	1,39023
1d	1,47938	1,41908	1,54303	1,52002	1,38011	1,37947
1e	1,48408	1,44809	1,55617	1,52400	1,38194	1,38986
1f	1,43471	1,42158	1,54785	1,52737	1,39629	1,39549
2a	1,20899	1,12801	1,28052	1,27465	1,13590	1,15478
2b	1,21975	1,22082	1,32178	1,27435	1,14745	1,15217
2c	1,23164	1,18213	1,32230	1,28467	1,10672	1,11427
3a	0,97802	0,94934	1,07855	1,04704	0,91551	0,91232
3b	0,95928	0,93251	1,03288	1,02340	0,90234	0,90672
3c	0,97668	0,95104	1,04460	1,03287	0,91096	0,91032
3d	0,99583	0,92785	1,05156	1,03729	0,89987	0,90309
3e	0,95903	0,96789	1,04717	1,03070	0,93194	0,93438
3f	1,00019	0,94190	1,04287	1,02350	0,92069	0,92044
4a	0,74249	0,71392	0,81518	0,77587	0,68674	0,68095
4b	0,71689	0,68174	0,78824	0,76742	0,68106	0,68427
4c	0,73029	0,69312	0,79111	0,77476	0,68601	0,68140
5a	0,50323	0,46678	0,54970	0,52219	0,44984	0,45129
5b	0,48252	0,46061	0,54306	0,52434	0,46103	0,46028
5c	0,50047	0,44446	0,52727	0,50868	0,43699	0,45434
5d	0,48971	0,45549	0,54387	0,51954	0,46007	0,45981
5e	0,48687	0,47134	0,52949	0,50589	0,45853	0,46136
5f	0,48019	0,46430	0,52108	0,50764	0,45829	0,46143

Tab. 7-2: Mittels internen Standard (ISTD) korrigierte Peakflächen, 1a-5f s. Tab. 7-1

Aus den Elektropherogrammen wurde direkt die korrigierten Peakflächen [194] (Quotient aus Peakfläche durch Migrationszeit) erhalten (Tab. 7-1). Dies ist in der CE nötig, da die Wanderungsgeschwindigkeit durch das Detektionsfenster unterschiedlich ist. Langsam wandernde Proben sind länger im Detektionsfenster und liefern daher größere Peaks. Zur Steigerung der Präzision der Methode wurden die korrigierten Peakflächen durch die des ISTD dividiert (s. Tab. 7-2) und daraus die nachfolgenden Validierungsparameter berechnet.

7.5.4.3 Prüfung auf Normalverteilung

Die Voraussetzung für eine Reihe von statistischen Prüfungen ist eine Normalverteilung der Messwerte. Dies ist eine Wahrscheinlichkeitsverteilung von Messwerten, bei der nur zufällige Werte auftauchen. So hängen die Messwerte nur von der Standardabweichung und vom Mittelwert ab. Die Prüfung auf Normalverteilung wird hier durch den Schnelltest nach David vorgenommen. Die Werte sind mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von $P = 99\%$ normalverteilt, wenn sich der Quotient aus Spannweite R und Standardabweichung s , innerhalb der vorgegebenen Grenzen (aus der Tabelle nach David [187]) befindet.

$$PG = \frac{\text{größter Wert} - \text{kleinster Wert}}{s} = \frac{R}{s} \quad (15)$$

PG: Prüfgröße nach David

Wahrscheinlichkeit: $P = 99\%$,

Freiheitsgrad: $f = 1$

untere Grenze: $g_u = 2,15$

obere Grenze: $g_o = 3,16$

Die Prüfung der obersten und untersten Messwerte der Arbeitsbereiche ergab, dass alle Werte innerhalb der vorgegebenen Grenzen g_u und g_o lagen (s. Tab. 7-3). So kann von einer Normalverteilung der Messwerte ausgegangen werden.

Enantiomer	PG untere Grenze	PG obere Grenze
(S)-MDA	2,43	2,53
(R)-MDA	2,19	2,25
(S)-MDMA	2,44	2,31
(R)-MDMA	2,76	2,64
(S)-MDE	2,70	2,48
(R)-MDE	2,80	2,39

Tab. 7-3: David-Test, ermittelte Prüfgrößen

7.5.4.4 Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode ist die Fähigkeit innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches Testergebnisse zu liefern, die zur Konzentration bzw. zur Menge des Analyten direkt proportional sind [185]. Die Prüfung der Linearität kann visuell oder gemäß der ICH-Richtlinie durch die Korrelationskoeffizienten r überprüft werden. Die visuelle Prüfung lässt allerdings nur grobe Abweichungen erkennen, während der Korrelationskoeffizient nur einen Hinweis auf die Anpassung gibt.

Mit dem Mandel-Test kann hingegen rechnerisch entschieden werden, ob Linearität vorliegt. Hierzu werden aus den zwei Reststandardabweichungen der linearen und quadratischen Kalibrierfunktion die Differenz der Abweichungsvarianzen DS berechnet. Der ermittelte Prüfwert PW wird mit dem tabellierten F -Wert verglichen. Ist PW niedriger, kann Linearität für den untersuchten Konzentrationsbereich angenommen werden. Ist der berechnete Wert größer als der tabellierte Wert, so muss mit gewichteter Regression gerechnet werden.

$$DS^2 = (N - 2) \cdot sy_1^2 - (N - 3) \cdot sy_2^2 \quad (16)$$

DS^2 : Differenz der Abweichungsvarianzen

sy_1 : Reststandardabweichung der linearen Funktion

sy_2 : Reststandardabweichung der quadratischen Funktion

N : Anzahl der Messungen, d. h. Anzahl der Konzentrationen, bei Mehrfachbestimmungen Anzahl der Mittelwerte

$$PW = \frac{DS^2}{sy_2^2} \quad (17)$$

Die sechs Kalibrierfunktionen sind über den gesamten Kalibrierbereich linear, da alle Prüfwerte kleiner als der Tabellenwert von 98,5 sind (aus der F -Tabelle [187] mit $f_1 = 1$; $f_2 = 2$; $P = 99\%$) (s. Tab. 7-4). Die lineare Regression war für alle drei Enantiomerenpaare signifikant besser.

Substanz	Mandel-Prüfwert	Korrelationskoeffizient
(S)-MDA	2,81	0,99998
(R)-MDA	0,43	0,99995
(S)-MDMA	0,26	0,99999
(R)-MDMA	0,04	0,99989
(S)-MDE	0,80	0,99973
(R)-MDE	4,90	0,99989

Tab. 7-4: Kennzahlen zur Prüfung auf Linearität

7.5.4.5 Varianzenhomogenität

Um zu prüfen, ob die Standardabweichungen verschiedener Messpunkte vergleichbar sind, also ob Varianzenhomogenität über den Arbeitsbereich herrscht und die Werte aus einer Grundgesamtheit stammen, wird der sogenannte F-Test durchgeführt. Dies ist nötig, wenn mittels einer Kalibrierfunktion Gehaltsbestimmungen vorgenommen werden. Für die Bestimmung wurden an den oberen und unteren Arbeitsbereichsgrenzen die Varianzen mit jeweils sechs Proben bestimmt. Die Prüfgröße PG ergibt sich aus dem Quotienten der Varianzen. PG wird dann mit einem tabellierten F-Wert bei vorgegebener Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 99\%$ verglichen. Wenn PG kleiner oder gleich dem Tabellenwert ist, gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied der Varianzen, daher gilt Varianzenhomogenität.

$$PG = \frac{s_a^2}{s_b^2} \quad (18)$$

s_a^2 : Standardabweichung der Messwerte bei höchster Konzentration

s_b^2 : Standardabweichung der Messwerte bei niedrigster Konzentration

Die Prüfung nach dem F-Test zeigt (s. Tab. 7-5), dass bei allen Kalibrierfunktionen Varianzenhomogenität herrscht (hier gegebener F-Wert = 10,97):

Substanz	PG
(S)-MDA	4,09
(R)-MDA	2,71
(S)-MDMA	5,14
(R)-MDMA	6,13
(S)-MDE	1,87
(R)-MDE	5,47

Tab. 7-5: Prüfgrößen des Tests auf Varianzenhomogenität

7.5.4.6 Präzision

Die Präzision ist ein Maß der Streuung der einzelnen Analysenergebnisse um den Mittelwert, die durch zufällige (nicht systematische) Fehler verursacht werden. Als Maß der Präzision (streng genommen der „Impräzision“) wird die Standardabweichung s oder der Variationskoeffizient V_K , der mit der relativen Standardabweichung (RSD) s_{rel} identisch ist, verwendet. Zur Berechnung wurden wieder die Daten des oberen und unteren Arbeitsbereichs herangezogen.

$$V_K = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (19)$$

s : Standardabweichung

\bar{x} : Mittelwert

An den unteren Arbeitsbereichsgrenzen lag die relative Standardabweichung bei 0,93%-2,11%, an den oberen Arbeitsbereichsgrenzen bei 0,72%-1,46% (s. Tab. 7-6).

Substanz	Präzision bei 15 µg/mL [%]	Präzision bei 5 µg/mL [%]
(S)-MDA	1,46	2,11
(R)-MDA	0,88	1,57
(S)-MDMA	1,46	1,92
(R)-MDMA	1,31	1,62
(S)-MDE	0,92	2,05
(R)-MDE	0,72	0,93

Tab. 7-6: Präzision der Arbeitsbereiche bei 5 und 15 µg/mL

7.5.4.7 Richtigkeit (relative systematische Abweichung)

Die Richtigkeit ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem Mittelwert und einem als richtig angesehenen Wert (Sollwert), wobei die Abweichung für den systematischen Fehler (Bias) steht. Da keine definierten Standards zur Verfügung standen, wurde das allgemein übliche Verfahren angewandt, bei dem der entsprechende Wert auf der Regressionsgeraden x_{soll} entspricht, während \bar{x} der Mittelwert aus sechs Messungen ist. Die Überprüfung erfolgte an der oberen und unteren Arbeitsbereichsgrenze. Die Berechnung der Richtigkeit erfolgte nach nachstehender Gleichung:

$$d_{\text{rel}} = \frac{|x_{\text{soll}} - \bar{x}|}{x_{\text{soll}}} \cdot 100 \quad (20)$$

d_{rel} : relative systematische Abweichung in %, Richtigkeit

x_{soll} : Sollwert

\bar{x} : Mittelwert der Einzelmessungen an den Arbeitsbereichsgrenzen

In Tab. 7-7 sind die relativen systematische Abweichung für die jeweiligen Analyten angegeben.

Substanz	Richtigkeit bei 15 µg/mL [%]	Richtigkeit bei 5 µg/mL [%]
(S)-MDA	0,02	0,45
(R)-MDA	0,10	0,69
(S)-MDMA	0,03	0,36
(R)-MDMA	0,08	0,07
(S)-MDE	0,69	0,23
(R)-MDE	0,45	0,95

Tab. 7-7: Richtigkeit der Analysenergebnisse

7.5.4.8 Selektivität

Die Selektivität einer Methode ist die Fähigkeit, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störung oder Beeinflussung durch Verunreinigungen zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. Dies ist bei dieser Methode gewährleistet, da verschiedene Proben mit verschiedenen Reinheiten vermessen wurden und die vorhandenen Verunreinigungen, beispielsweise MDA, deutlich von den zu bestimmenden Verbindungen abgetrennt werden konnten.

7.5.4.9 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze eines Analyseverfahrens beschreibt die kleinste qualitativ bestimmbare Menge des Analyten, während die Bestimmungsgrenze die kleinste quantifizierbare Menge darstellt.

Die theoretische Nachweisgrenze ist als die Analytkonzentration definiert, deren 95%iger Prognosebereich P sich nicht mit dem Blindwert überschneidet, d. h. mit einem Fehlerrisiko von 5% quantitativ nachgewiesen werden kann. Zur Beschreibung eines validierten Verfahrens wird die theoretische Nachweisgrenze X_N aus der Kalibrierfunktion mittels untenstehender Gleichung (21) ermittelt.

Die Bestimmungsgrenze eines validierten Analyseverfahrens ist die Konzentration des untersten Punktes der Kalibrierfunktion. Die theoretisch erreichbare Bestimmungsgrenze X_B stellt die kleinste Menge (Konzentration) eines Stoffes dar, die mit der geforderten statistischen Sicherheit (Prognosebereich $P = 95\%$) bei ein-

maliger Analyse mit einem Fehlerrisiko von kleiner oder gleich 5%, quantitativ bestimmt werden kann [195] (s. Gleichung (22)).

$$XN = 2 \cdot \frac{S_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (21)$$

$$XB = \frac{y_h \cdot a_0}{a_1} + \frac{S_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (22)$$

XN: theoretische Nachweisgrenze

XB: theoretische Bestimmungsgrenze

S_y : Reststandardabweichung

a_0 : y-Achsenabschnitt

a_1 : Steigung der Kalibriergeraden

t: t-Wert (5%)

N: Anzahl der Messpunkte

y_c : Schnittpunkt der oberen Vertrauensbereichsgrenzen mit der y-Achse

\bar{y} : Mittelwert der Peakflächen der gemessenen Proben

y_h : Schnittpunkt der oberen vertikalen Vertrauensbereichsgrenze für $x = x_0$ mit der Y-Achse

x_i : Einzelwerte der Konzentrationen der vermessenen, „gespikten“ Proben

\bar{x} : Mittelwerte der Konzentrationen der „gespikten“ Proben

In Tab. 7-8 sind die theoretischen Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen der CE-Methode angegeben.

Substanz	theoretische Nachweisgrenze ($\mu\text{g/mL}$)	theoretische Bestimmungsgrenze ($\mu\text{g/mL}$)
(S)-MDA	0,27	0,41
(R)-MDA	0,47	0,71
(S)-MDMA	0,23	0,35
(R)-MDMA	0,71	1,06
(S)-MDE	1,09	1,61
(R)-MDE	0,68	1,02

Tab. 7-8: Theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenze

7.5.4.10 Robustheit

Unter der Robustheit einer Methode versteht man das Maß für die Unabhängigkeit der Messergebnisse, wenn Parameter verändert werden. Daher gehört sie zur Methodenentwicklung und nicht zur Validierung. Trotzdem wird ein wichtiger Faktor im Folgenden überprüft.

Vor allem durch Chargenwechsel des Selektors kann es aufgrund einer veränderten Verteilung des Substitutionsgrades zu starken Unterschieden hinsichtlich der Selektivität und Auflösung kommen. Daher wurden verschiedene Chargen mittels ESI-MS geprüft (Spektrum s. Kap. 6.4.1.2) und hinsichtlich ihres Trennverhaltens mittels einer Lösung der drei Enantiomerenpaare beurteilt (s. Tab. 7-9). Sowohl die massenspektrometrischen als auch die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen der verschiedenen Chargen zeigten nur geringfügige, vernachlässigbare Unterschiede.

hs(XIV)- γ -CD	(S)-MDA	(S)-MDE	(S)-MDMA	(R)-MDE	(R)-MDMA	(R)-MDA
Charge 1	10,75	11,66	12,07	15,22	16,15	17,28
Charge 2	10,98	11,96	12,28	15,57	16,33	17,40
Charge 3	11,29	12,43	12,71	16,14	17,14	18,29

Tab. 7-9: Migrationszeiten bei Verwendung unterschiedlicher Chargen an hs(XIV)- γ -CD

7.5.4.11 Weitere Kalibrierkenndaten

Bei der Validierung der CE-Methode wurden weitere Kenndaten wie Empfindlichkeit der Methode (Steigung der Kalibrierfunktion), y-Achsenabschnitt und Verfahrensstandardabweichung bestimmt (s. Tab. 7-10). Die Verfahrensstandardabweichung s_{x_0} ist der Quotient der Reststandardabweichung und der Steigung der Regressionsgeraden in der Arbeitsbereichsmitte. Die relative Verfahrensstandardabweichung V_k ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit einer Methode und wird für den Vergleich verschiedener Verfahren herangezogen.

$$V_k = \frac{s_{x_0}}{X} \cdot 100 \quad \text{mit} \quad s_{x_0} = \frac{s_{dy}}{a} \quad (23)$$

- V_k : relative Verfahrensstandardabweichung
 s_{x_0} : Verfahrensstandardabweichung
 x : Konzentration in der Mitte des Kalibrierbereiches
 s_{dy} : Reststandardabweichung
 a : Steigung

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Reststandardabweichung	Verfahrensstandardabweichung	relative Verfahrensstandardabweichung [%]
(S)-MDA	0,10261	0,02490	0,00267	0,02602	0,26
(R)-MDA	0,10157	0,01022	0,00457	0,04503	0,45
(S)-MDMA	0,09758	0,00100	0,00214	0,02192	0,22
(R)-MDMA	0,09579	-0,01279	0,00652	0,06812	0,68
(S)-MDE	0,09217	-0,00855	0,09699	0,10523	1,05
(R)-MDE	0,09242	-0,00832	0,00604	0,06530	0,65

Tab. 7-10: Weitere Kalibrierkenndaten

8 Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der Spacer-Position des Chirasil- β -Dex-Polymers wurde zunächst eine LC/MS-Methode entwickelt, um eine Reinheitskontrolle der regioselektiv synthetisierten Mono(octen-7-enyl)- β -CD durchzuführen. Da diese nur in geringem Maße verunreinigt waren, wurde die Zuordnung der Peaks der regioisomeren Produkte aus der herkömmlichen Synthese möglich. Darüber hinaus wurden mit der Methode eine Reihe weiterer Reaktionsansätze untersucht, um den Einfluss der Reaktionsbedingungen zu klären. Es konnte gezeigt werden, dass bei der herkömmlichen Synthese fast ausschließlich das O-2-Mono(octen-7-enyl)- β -CD gebildet wurde. Dies widerlegte die bisherige Annahme, dass das Chirasil- β -Dex nach der herkömmlichen Synthese als O-6-Regioisomer oder auch als Mischung aus O-6- und eventuell O-2-Regioisomer vorliegt. Ein säulenchromatographischer Aufreinigungsschritt, der Wechsel der Base und des Lösemittels hatten teilweise einen starken Einfluss auf die regioisomere Zusammensetzung der CD-Selektoren.

Um zu testen, ob unterschiedliche Spacer-Positionen die Selektor-Selektand-Wechselwirkungen in der Gaschromatographie beeinflussen, wurden Kapillaren mit den drei regioisomeren Polymeren, dem O-2-, O-3- und O-6-Chirasil- β -Dex mit möglichst identischen Säulenparametern belegt und verschiedene chirale Komponenten getrennt. Die Retentionszuwächse hatten bei allen Trennungen die gleichen Größenordnungen. Prinzipiell wurden keine extremen Unterschiede in den chiralen Trennleistungen für alle Chirasil- β -Dex-Polymere festgestellt, jedoch zeigte das O-2- und O-3-Chirasil- β -Dex in den meisten untersuchten Applikationen etwas höhere Trennfaktoren im Vergleich zu dem O-6-Chirasil- β -Dex. Dies implizierte eine wichtige Schlussfolgerung: Die Enantioselektivität schien etwas verringert zu sein, wenn der Spacer an die O-6-Position, d. h. an die schmalere Seite der Cyclodextrin-Öffnung gebunden war. Zwischen den O-2- und O-3-Chirasil- β -Dex-Phasen bestanden nahezu keine Unterschiede.

So wird mit dem O-2-Chirasil- β -Dex aus herkömmlichen Synthesen die bestmögliche Chirasil- β -Dex Stationärphase erhalten und es besteht kein Anlass, die aufwändige Schutzgruppenchemie zur Synthese der regioisomerenreinen Selektoren durchzuführen.

Auch in der Kapillarelektrochromatographie konnte Chirasil- β -Dex erfolgreich als Stationärphase zur Trennung atropisomerer PCB mittels o-CEC und p-CEC eingesetzt werden. Ebenso wurden für Chira-Dex-Stationärphasen im p-CEC und rod-CEC Modus Methoden zur Trennung einiger Atropisomere der PCB entwickelt. Das PCB 132 konnte mit allen eingesetzten Kapillaren in die Enantiomere getrennt werden. Dabei wurden vor allem in der o-CEC sehr langsame elektroosmotische Flüsse aufgrund der Abschirmung der Silanolgruppen durch das Polymer Chirasil- β -Dex gemessen. Die hohe Lipophilie der PCB erforderte zudem hohe organische Modifier-Anteile, die zusätzlich zur Reduktion des EOF beitrugen. Somit stellte sich die Trennung der Atropisomere als anspruchsvolles Trennproblem, insbesondere für die o-CEC, heraus.

Da bei den mit Chirasil- β -Dex-Silica gepackten Kapillaren das Problem des reduzierten EOF durch Beimischung von nativem Silica gelöst und mit Chira-Dex-Silica als Stationärphase immer ein genügend hoher EOF erzielt werden konnte, wurde versucht, eine Verbesserung der o-CEC Methode durch direkte Anbindung des Selektors zu erzielen. Da jedoch das Stationärphasenverhältnis für eine Enantiomerentrennung nicht ausreichte, wurde durch eine Anätzung die Oberfläche der Kapillarenwand vergrößert, um die Möglichkeit für eine höhere Selektordichte zu schaffen.

Die Anätzung der Kapillare, eine in der Literatur anerkannte Methode zur Erhöhung des Stationärphasenverhältnisses der o-CEC-Kapillaren, könnte prinzipiell nach Weiterentwicklung des Verfahrens eine gleichmäßig vergrößerte Oberfläche liefern. Jedoch wurde gezeigt, dass die Anätzung weder hier noch bei den in der Literatur aufgeführten Beispielen zu einer Erhöhung der Selektoranbindung und damit zur Vergrößerung der Kapazität der Stationärphase beitragen konnte, da eine Abnahme der zur Anbindung notwendigen Silanolgruppen auftrat. Die Methode kann zwar laut Literatur analytabhängig bessere Trennungen erzielen, dies ist aber auf eine veränderte Polarität und eine damit verbundene Änderung des EOF zurückzuführen. Für die Enantiomerentrennungen mit o-CEC-Kapillaren, bei denen der Selektor über freie Silanolgruppen direkt an die Kapillarwand gebunden wurde, konnten somit keine Verbesserungen erzielt werden.

Zur Reinheitskontrolle und zur Feststellung der enantiomeren Verunreinigungen der chiralen Amphetaminderivate MDA, MDE und MDMA konnte eine kapillar-

elektrophoretische Methode entwickelt werden. Hierzu wurde eine Reihe mittels ESI-MS charakterisierter Cyclodextrine und CD-Derivate getestet. β -CD und einige seiner Derivate konnten alle drei Enantiomerenpaare trennen, jedoch erwiesen sich sulfatierte γ -Cyclodextrine, insbesondere das 14fach sulfatierte hs(XIV)- γ -CD, als der effizienteste Selektor. Nach einer ausführlichen Optimierung der Methode konnten die drei Enantiomerenpaare und der interne Standard 3,4-Methylenedioxybenzylamin (3,4-MDBA) innerhalb von 20 Minuten simultan getrennt werden. Durch die extrem hohe Auflösung aller Peaks und die vorteilhaften Peakformen, da die ersteluierten (S)-Enantiomere Fronting und die (R)-Enantiomere Tailing aufwiesen, konnte diese Methode zur Bestimmung der Enantiomerenreinheiten von MDA, MDE und MDMA, demnach sechs potentieller enantiomerer Verunreinigungen, eingesetzt werden. Bisher waren für diese Bestimmungen drei verschiedene HPLC-Methoden mit drei unterschiedlichen chiralen Stationärphasen nötig. Außerdem lieferte die neue Methode durch die erhöhte Selektivität, da auch Edukte der Synthese wie z. B. MDA abgetrennt werden konnten, aussagekräftigere Ergebnisse.

Die Methode wurde mittels eines umfangreichen Validerungsverfahrens nach den Standards der ICH („International Conference on Harmonisation“) geprüft. Dabei konnte eine sehr gute Eignung der Methode zum vorgesehenen Zweck festgestellt werden. Erstmals konnte in der CE eine Methode zur Quantifizierung sechs enantiomerer Verunreinigungen validiert werden.

Mithilfe der validierten Methode wurden die Produkte unterschiedlicher Synthesansätze auf ihre Reinheit und Eignung für biologische Tests untersucht. Demnach ließen sich die Enantiomere von MDA durch die fraktionierte Kristallisation mit höherer Enantiomerenreinheit als durch asymmetrische Synthese darstellen. Durch Einsatz der Enantiomere des MDA als Edukte für die Synthese von enantiomerenreinem MDE und MDMA wurden höhere Enantiomerenreinheiten als für die jeweilige fraktionierte Kristallisation von racemischen MDE bzw. MDMA erhalten.

9 Literaturverzeichnis

- [1] T. Takaha, M. Yanase, S. Takata, S. Okada, S.M. Smith, J. Biol. Chem., **1996**, 271, 2902.
- [2] J. Szejtli, Chem. Rev., **1998**, 98, 1743.
- [3] A. Villers, Compt. Rend., **1891**, 112, 536.
- [4] F. Schardinger, Z. Unters. Nahr. u. Genussm., **1903**, 6, 865.
- [5] H. Pringsheim, Chemistry of the Saccharides, McGraw-Hill, New York, **1932**, 280.
- [6] H. Pringsheim, A Comprehensive Survey of Starch Chemistry, Walton, R.P., (Ed.), Chemical Catalogue Co., Inc.: New York, NY, **1928**, 35.
- [7] K. Freudenberg, G. Blomquist, L. Ewald, K. Soff, Ber. Dtsch. Chem. Ges., **1936**, 69, 1258.
- [8] K. Freudenberg, F. Cramer, H. Plieninger, Ger. Patent, **1953**, 895.
- [9] J. Szejtli, Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, **1988**, 405.
- [10] anonym, Chromatographia, **2001**, 54 (Suppl.), S59.
- [11] Wacker-Chemie GmbH, Feature Dienst, **2003**, 1.
- [12] M. Gröger, E.K. Kretzer, A. Woyke, Hintergrundinformationen zum Thema Cyclodextrine, Universität Gießen, **2001**. (www.science-forum.de).
- [13] A.R. Hedges, Chem. Rev., **1998**, 98, 2035.
- [14] Beck'sche Textausgaben, Lebensmittelrecht-Textsammlungen, 97. Ergänzungslieferung, Stand: 10/2004, 5. Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoffzulassungsverordnung - ZZuIV) vom 29. Januar **1998** (BGBl. I S. 230).
- [15] Gesetzliche Grundlagen und GVO-Nachweisverfahren, Genius Biotechnologie GmbH, **2003**, Band 3, 5. Aufl., 15.
- [16] S. Fanali, P. Catarcini, G. Blaschke, B. Chankvetadze, Electrophoresis, **2001**, 22, 3131.
- [17] E. Schneiderman, A.M. Stalcup, J. Chromatogr. B, **2000**, 745, 83.
- [18] V. Schurig, J. Chromatogr. A, **2001**, 906, 275.
- [19] V. Schurig, H.-P. Nowotny, M. Schleimer D. Schmalzing, J. High Resolut. Chromatogr., **1989**, 12, 549.

- [20] G. Sicoli, Z. Jiang, L. Jicsinsky, V. Schurig, *Angew. Chem. Int. Ed.*, im Druck.
- [21] T. Kościelski, D. Sybilska, J. Jurczak, *J. Chromatogr.*, **1983**, 280, 131.
- [22] Z. Juvancz, P. Peterson, *J. Microcolumn Separations*, **1996**, 8, 99.
- [23] V. Schurig, *TRAC-Trend Anal. Chem.*, **2002**, 21, 647.
- [24] Z. Juvancz, G. Alexander, J. Szejtli, *High. Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun.*, **1987**, 10, 105.
- [25] J. Szejtli, *Starch/Stärke*, **1987**, 39, 357.
- [26] V. Schurig, *A Century of Separation Science*, H.J. Issaq (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, Basel, **2001**, 327.
- [27] V. Schurig, H.-P. Nowotny, *J. Chromatogr.*, **1988**, 441, 155.
- [28] Z. Juvancz, J. Szejtli, *TRAC-Trend Anal. Chem.*, **2002**, 32, 379.
- [29] W.A. König, *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*, Hüthig Verlag, Heidelberg, **1987**.
- [30] W.A. König, S. Lutz, G. Wenz, E. van der Bey, *High Resolut. Chromatogr. Commun.*, **1988**, 11, 506.
- [31] D.W. Armstrong, W.Y. Li, J. Pitha, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 214.
- [32] W. Blum, R. Aichholz, *J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun.*, **1990**, 13, 515.
- [33] A. Dietrich, B. Maas, V. Karl, P. Kreis, D. Lehmann, B. Weber, A. Mosandl, J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., **1992**, 15, 176.
- [34] A. Dietrich, B. Maas, W. Messer, G. Bruche, V. Karl, A. Kauzinger, A. Mosandl, J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., **1992**, 15, 590.
- [35] V. Schurig, H. Grosenick, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 666, 617.
- [36] P. Schreier, *Progress in Flavour Precursor Studies*, P. Schreier, P. Winterhalter (Eds.), Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA, **1993**.
- [37] V. Schurig, H.-P. Nowotny, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1990**, 29, 939.
- [38] H. Grosenick, V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **1997**, 761, 181.
- [39] T.J. Ward, D.-M. Hamburg, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 4635.
- [40] A. Mosandl, D. Juchelka, *J. Essent. Oil Res.*, **1997**, 9, 5.
- [41] C. Bicchi, A. D'Amato, P. Rubiolo, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 843, 99.
- [42] R. Shellie, P. Marriott, C. Cornwell, *J. Sep. Sci.*, **2001**, 24, 823.
- [43] A. Rizzi, *Electrophoresis*, **2001**, 22, 3079.
- [44] U. Holzgrabe, T. Christians, *J. Cap. Elec. Microchip Tech.*, **2003**, 7, 23.

- [45] O.A. Shipgun, I.A. Ananieva, N. Yu Budanova, E.N. Shapovalova, *Russ. Chem. Rev.*, **2003**, 72, 1035.
- [46] D. Wistuba, V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 875, 255.
- [47] S. Mayer, V. Schurig, *J. High Res. Chromatogr.*, **1992**, 15, 129.
- [48] D.W. Armstrong, Y. Tang, T. Ward, M. Nichols, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 1114.
- [49] S. Mayer, V. Schurig, *J. Liq. Chromatogr.*, **1993**, 16, 915.
- [50] J. Sezemán, K. Ganzler, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 668, 509.
- [51] J. Pesek, M. Matyska, S. Menezes, *J. Chromatogr. A*, **1999**, 853, 151.
- [52] Y. Wang, Z. Zeng, N. Guan, J. Cheng, *Electrophoresis*, **2001**, 22, 2167.
- [53] J. Kang, D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 1116.
- [54] D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 3152.
- [55] Z. Chen, H. Ozawa, K. Uchiyama, T. Hobo, *Electrophoresis*, **2003**, 24, 2550.
- [56] S. Li, D.K. Lloyd, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 666, 312.
- [57] F. Lelièvre, C. Yang, R.N. Zare, P. Gareil, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 723, 145.
- [58] D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, **1999**, 20, 2779.
- [59] D. Wistuba, H. Czesla, M. Roeder, V. Schurig, *J. Chrom. A*, **1998**, 815, 183.
- [60] J. Kang, D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 4005.
- [61] M. Zhang, Z. El Rassi, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 3135.
- [62] Y. Gong, G. Xue, J.S. Bradshaw, M.L. Lee, H.K. Lee, *J. Heterocyclic Chem.*, **2001**, 38, 1317.
- [63] Y. Gong, G. Xue, Y. Xiang, J.S. Bradshaw, M.L. Lee, H.K. Lee, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43, 2463.
- [64] V. Schurig, M. Jung, S. Mayer, S. Negura, M. Fluck, H. Jakubetz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1994**, 33, 2222.
- [65] V. Schurig, M. Jung, S. Mayer, M. Fluck, S. Negura, H. Jakubetz, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 694, 119.
- [66] V. Schurig, S. Negura, S. Mayer, S. Reich, *J. Chromatogr. A*, **1996**, 755, 299.
- [67] V. Schurig, D. Schmalzing, U. Mühleck, M. Jung, M. Schleimer, P. Mussche, C. Duvekot, J.C. Buyten, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1990**, 13, 713.
- [68] M. Jung, Dissertation, Universität Tübingen, **1993**.
- [69] D. Schmalzing, Dissertation, Universität Tübingen, **1991**.
- [70] J.W. Metzger, M. Jung, D. Schmalzing, E. Bayer, V. Schurig, *Carbohydr. Res.*, **1991**, 222, 23.
- [71] H.-J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1755.

- [72] A. Hybl, R.E. Rundle, D.E. William, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 2779.
- [73] W. Saenger, M. Noltemeyer, P.C. Manor, B. Hingerty, B. Klar, *Bioorg. Chem.*, **1976**, *5*, 187.
- [74] H. Cousin, O. Trapp, V. Peulon-Agasse, X. Pannecoucke, L. Banspach, G. Trapp, Z. Jiang, J.C. Combret, V. Schurig, *Eur. J. Chem.*, **2003**, *17*, 3273.
- [75] S. Tian, H. Zhu, P. Forgo, V.T. D'Souza, *J. Org. Chem.*, **2000**, *65*, 2624.
- [76] D. Icheln, B. Gehrcke, Y. Piprek, P. Mischnick, W.A. König, M.A. Dessoy, A.F. Morel, *Carbohydr. Res.*, **1996**, *280*, 237.
- [77] H. Cousin, P. Cardinael, H. Oulyadi, X. Pannecoucke, J.C. Combret, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 81.
- [78] E. Leibnitz, H.G. Struppe, *Handbuch der Gaschromatographie*, Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G., Leipzig, 3. Aufl., **1984**.
- [79] K. Grob, *J. Chromatogr.*, **1978**, *156*, 1.
- [80] K. Grob, G. Grob, *J. Chromatogr.*, **1981**, *219*, 13.
- [81] S. Mayer, D. Schmalzing, M. Jung, M. Schleimer, *LC-GC Int.*, **1992**, *5*, 58.
- [82] V. Schurig, D. Wistuba, *Electrophoresis*, **1999**, *20*, 2313.
- [83] F.W.G. Kohlrausch, *Ann. Phys. Chem.*, **1897**, *62*, 209.
- [84] A. Tiselius, *Trans Faraday Soc.*, **1937**, *33*, 524.
- [85] A. Tiselius, *Discussions of the Faraday Soc.*, **1953**, *13*, 29.
- [86] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1993**.
- [87] S. Hjertén, *Chromatogr. Rev.*, **1967**, *122*.
- [88] R. Virtanen, *Acta Polytechnica Scand.*, **1974**, *123*, 1.
- [89] F.E.P. Mikkers, F. M. Everaerts, T.P.E.M. Verhegen, *J. Chromatogr.*, **1979**, *169*, 11.
- [90] J.W. Jørgenson, D.K. Lukacs, *J. Chromatogr. A*, **1981**, *218*, 209.
- [91] J.W. Jørgenson, D.K. Lukacs, *Anal. Chem.*, **1981**, *53*, 1298.
- [92] E. Gassman, J.E. Kuo, R.N. Zare, *Science*, **1985**, *230*, 813.
- [93] M.G. Khaledi, *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques and Applications*, John Wiley Sons Inc., **1998**.
- [94] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, **1984**, *56*, 111.
- [95] P. Glukhovskiy, G. Vigh, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 3814.
- [96] A. Rizzi, L. Kremser, *Electrophoresis*, **1999**, *20*, 3410.

- [97] J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, *Anal. Chem.*, **1987**, *59*, 1230.
- [98] M.S. Tswett, *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **1906**, *24*, 316.
- [99] M.S. Tswett, *Ber. Deut. Bot. Ges.*, **1906**, *24*, 384.
- [100] G. Choudhary, C. Horvath, *J. Chromatogr. A*, **1997**, *781*, 161.
- [101] H.H. Strain, *J. Am. Chem. Soc.*, **1939**, *61*, 1292.
- [102] V. Pretorius, B.J. Hopkins, J.D. Schieke, *J. Chromatogr.*, **1974**, *99*, 23.
- [103] A. Guttman, A. Paulus, A. Cohen, N. Grinberg, B. Karger, *J. Chromatogr.*, **1988**, *448*, 41.
- [104] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese – Methoden und Möglichkeiten*, Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1. Aufl., **1994**.
- [105] J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia*, **1987**, *24*, 135.
- [106] J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia*, **1991**, *32*, 317.
- [107] N.W. Smith, M.B. Evans, *Chromatographia*, **1994**, *38*, 649.
- [108] C. Wolf, P.L. Spence, W.H. Pirkle, E.M. Derrico, D.M. Cavender, G.P. Rozing, *J. Chromatogr. A*, **1997**, *782*, 175.
- [109] I. Gusev, X. Huang, C. Horváth, *J. Chromatogr. A*, **1999**, *855*, 298.
- [110] F. Sveč, E. C. Peters, D. Sýkora, C. Yu, J.M. J. Fréchet, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **2000**, *23*, 3.
- [111] F. Sveč, E. C. Peters, D. Sýkora, J.M.J. Fréchet, *J. Chromatogr. A*, **2000**, *887*, 3.
- [112] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 3498.
- [113] S.M. Fields, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 2709.
- [114] J.-T. Wu, P. Huang, M.X. Li, M.G. Qian, D.M. Lubman, *Anal. Chem.*, **1997**, *69*, 320.
- [115] R. Asiaie, X. Huang, D. Farman, C. Horváth, *J. Chromatogr. A*, **1998**, *806*, 251.
- [116] G. Chirca, V.T. Remcho, *Electrophoresis*, **1999**, *20*, 50.
- [117] D. Wistuba, L. Banspach, V. Schurig, *Electrophoresis*, **2005**, *26*, 2019.
- [118] T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, **1982**, *248*, 241.
- [119] R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, Academic Press, New York, second edition, **2000**.

- [120] Römpf online, Lexikon der Chemie, 10. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [121] Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg.), Polychlorierte Biphenyle, VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1988**.
- [122] K. Ballschmiter, Polychlorbiphenyle: Chemie Analytik und Umwelt, Analytiker-Taschenbuch, Springer-Verlag, **1987**.
- [123] K. Ballschmiter, M. Zell, Fresenius J. Anal. Chem., **1980**, 302, 20.
- [124] K.L.E. Kaiser, Environ. Poll., **1974**, 7, 93.
- [125] G.P. Blanch, A. Glausch, A., V. Schurig, R. Serrano, M. Gonzales, J. High Resolut. Chromatogr., **1996**, 19, 392.
- [126] C. Wong, A. Garrison, W. Foreman, Environ. Sci. Technol., **2001**, 35, 33.
- [127] A. Glausch, J. Hahn, V. Schurig, Chemosphere, **1995**, 30, 2079.
- [128] L. Banspach, D. Wistuba, V. Schurig, GIT Spezial - Separation, **2004**, 22, 30.
- [129] D. Wistuba, J. Kang, V. Schurig, Chiral Separations, G. Gübitz, M. G. Schmid (Eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, **2004**, 402.
- [130] V. Schurig, S. Mayer, J. Biochem. Biophys. Methods, **2001**, 48, 117.
- [131] L. Tang, M.L. Lee, Monolithic materials: Preparations, properties and applications, F. Svec, T.B. Tennikova, Z. Deyl, (Eds.), J. Chromatogr. Library, Elsevier, 67, **2003**.
- [132] M. Dulay, R.P. Kulkarni, R.N. Zare, Anal.Chem., **1998**, 70, 5103.
- [133] M. Kato, M.T. Dulay, B. Bennett, J. Chen, R.N. Zare, Electrophoresis, **2000**, 21, 3145.
- [134] C. Rosini, C. Bertucci, D. Pini, P. Altemura, P. Salvadori, Tetrahedr. Letters, **1985**, 26, 3361.
- [135] F.I. Onuska, M.E. Comba, T. Bistricki, R.J. Wilkinson, J. Chromatogr., **1977**, 142, 177.
- [136] J. Pesek, M. Matyska, J. Chromatogr. A, **1996**, 736, 255.
- [137] J. Pesek, M. Matyska, J. Chromatogr. A, **1999**, 845, 237.
- [138] C.P. Kapnissi-Christodoulou, X. Zhu, I.M. Warner, Electrophoresis, **2003**, 24, 3917.
- [139] Q. Tang, M.L. Lee, TRAC-Trend Anal. Chem., **2000**, 19, 648.
- [140] J. Pesek, M. Matyska, J. Chromatogr. A, **2000**, 887, 31.
- [141] M. Matyska, J. Pesek, I. Boysen, T.W. Hearn, Electrophoresis, **2001**, 22, 2620.

- [142] J. Pesek, M. Matyska, S. Sentellas, M.T. Galceran, M. Chiari, G. Pirri, *Electrophoresis*, **2002**, 23, 2982.
- [143] D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, **2000**, 21, 4136.
- [144] K. Jinno, H. Sawada, *TRAC-Trend Anal. Chem.*, **2000**, 19, 664.
- [145] E. Guihen, J. D. Glennon, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1044, 67.
- [146] Z. Liu, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 961, 285.
- [147] Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht, Stand der Drogenproblematik in der EU, Bundeskriminalamt, Bundeslagebild Rauschgift, **2003**.
- [148] D.E. Nichols, *J. Psychoactive Drugs*, **1986**, 18, 305.
- [149] A. Shulgin, A. Shulgin, *PIHKAL: A Chemical Love Story*, 1. Aufl., 2. Druck, Transform Press, **1991**.
- [150] www.m-ww.de/pharmakologie/drogen/ecstasy.html
- [151] E. Gouzoulis-Mayfrank, *Psycho*, **1998**, 24, 400.
- [152] G. Rudnick, S.C. Wall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 1817.
- [153] G.M. Anderson, G. Braun, U. Braun, D.E. Nichols, A.T. Shulgin, *NIDA Res. Monogr.*, **1978**, 22, 8.
- [154] H.D. Abraham, A.M. Aldridge, M. Andrew, P. Gogia, *Neuropsychopharmacology*, **1996**, 14, 285.
- [155] J. Buechler, M. Schwab, G. Mikus, B. Fischer, L. Hermle, C. Marx, G. Gron, M. Spitzer, K.-A. Kovar, *J. Chromatogr. B*, **2003**, 793, 207.
- [156] M. Brunnenberg, K.-A. Kovar, *J. Chromatogr. B*, **2001**, 751, 9.
- [157] D.E. Nichols, D.H. Lloyd, A. J. Hoffman, M.B. Nichols, G.K.W. Yim, *J. Med. Chem.*, **1982**, 25, 530.
- [158] K.M. Hegadoren, G.B. Baker, M. Bourin, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **1999**, 23, 539.
- [159] U.D. McCann, G.A. Ricaurte, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **2004**, 27, 821.
- [160] H. Kalant, *CMAJ*, **2001**, 165, 917.
- [161] J. Margolis, *Time Magazine*, **2001**, 19, 58.
- [162] H.B. Lebsanft, A. Mayerhofer, K.-A. Kovar, W.J. Schmidt, *J. Neural. Transm.*, **2003**, 110, 707.
- [163] H.B. Lebsanft, T. Kohles, K.-A. Kovar, W.J. Schmidt, *Synapse*, **2005**, 55, 148.
- [164] M. Brunnenberg, *Dissertation*, Tübingen, **1998**.

- [165] V.R. Meyer, Praxis der Hochleistungschromatographie, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 9. Aufl., **2004**.
- [166] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, Anal. Chem., **1995**, 67, 2334.
- [167] R. Kuhn, F. Stoecklin, F. Erni, Chromatographia, **1992**, 33, 32.
- [168] T. Grady, T. Joyce, M.R. Smyth, D.J. Harris, D. Diamond, Anal. Comm., **1998**, 53, 123.
- [169] D.W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, J.-R. Chen, Anal. Chem., **1994**, 66, 1473.
- [170] Y. Tanaka, S. Terabe, J. Chromatogr. A, **1995**, 694, 277.
- [171] B. Chankvetadze, W. Lindner, G. Scriba, Anal. Chem., **2004**, 76, 4256.
- [172] U. Schmitt, S.K. Branch, U. Holzgrabe, J. Sep. Sci., **2002**, 25, 959.
- [173] B. Chankvetadze, G. Schulte, G. Blaschke, Enantiomer, **1997**, 2, 157.
- [174] J.B. Vincent, D.M. Kirby, T.H. Nuyen, G. Vigh, Anal. Chem, **1997**, 69, 4419.
- [175] J.B. Vincent, G. Vigh, J. Chromatogr. A, **1998**, 816, 233.
- [176] P. Glukhovsky, G. Vigh, Electrophoresis, **2000**, 21, 2010.
- [177] S. Li, G. Vigh, Electrophoresis, **2004**, 25, 2657.
- [178] S. Cladrowa-Runge, R. Hirz, E. Kenndler, A. Rizzi, J. Chromatogr. A, **1995**, 710, 339.
- [179] G. Boatto, M.V. Faedda, A. Pau, B. Asproni, S. Menconi, R. Cerri, J. Pharm. Biomed. Anal., **2002**, 29, 1073.
- [180] M. Lanz, R. Brenneisen, W. Thormann, Electrophoresis, **1997**, 18, 1035.
- [181] N. Pizarro, J. Ortuno, M. Farre, C. Hernandez-Lopez, M. Pujadas, A. Llebaria, J. Joglar, P.N. Roset, M. Mas, J. Segura, J. Cami, R. de la Torre, J. Anal. Toxicol., **2002**, 26, 157.
- [182] F. Tagliaro, G. Manetto, S. Bellini, D. Scarcella, F.P. Smith, M. Marigo, Electrophoresis, **1998**, 19, 42.
- [183] Ohm's Law Plot to Optimize your Separation,
<http://www.microsolvtech.com/ceoh.asp>
- [184] J. Böcker, Chromatographie, Instrumentelle Analytik und Chromatographie und Kapillarelektrophorese, Vögel Buchverlag, Würzburg, 1. Aufl., **1997**, 357.
- [185] F.T. Peters, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, F. Mußhoff, Toxichem. Krimtech., **2004**, 71, 146.

- [186] Step 4: Text on Validation of Analytical Procedures Q2A, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **1994**.
- [187] S. Kromidas, Validierung in der Analytik, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2. korrigierter Nachdruck, **2003**.
- [188] Step 4: Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **1996**.
- [189] J. Büchler, C. Maichle-Mössmer, K.-A. Kovar, *Z. Naturforsch.*, **2000**, 55b, 1124.
- [190] D. Nichols, A.J. Hoffman, R.A. Oberlender, P. Jacob, III, A. T. Shulgin, *J. Med. Chem.*, **1986**, 29, 2009.
- [191] T. Kohles, Dissertation, Universität Tübingen, in Vorbereitung.
- [192] U. Braun, A.T. Shulgin, G. Braun, *J. Pharm. Sci.*, **1980**, 69, 192.
- [193] K. Grob, Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography, Hüthig, Heidelberg, **1986**.
- [194] K.D. Altria, *Chromatographia*, **1993**, 35, 177.
- [195] W. Funk, V. Dammann, C. Vonderheid, G. Oehlmann, Statistische Methoden in der Wasseranalytik, Begriffe, Strategien, Anwendungen, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1985**.

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, W. Aßmus, A. Becht, H. Bertagnolli, B. Brutschy, W. Brüggemann, H.-J. Egelhaaf, J. Engels, H. Fasold, S. Georgii, C. Griesinger, G. Jung, G. Kauert, B. Kohlbesen, C. Kohlmaier, E. Lindner, B. Lüthi, H.A. Mayer, K. Müller, C. Ochsenfeld, W. Rosenstiel, A. Mosandl, U. Nagel, D. Oelkrug, H. Pauschmann, E. Plies, H. Schaub, R.H.W. Schubert, F. Schüth, V. Schurig, B. Speiser, S. Vieths, G. Winkelmann, W. Wohlleben.

CURRICULUM VITAE

Meri Leena Banspach

05.10.1975	geboren in Backnang Eltern: Rainer Banspach Anna-Kaarina Banspach, geb. Eskelinen
1983-1986	Grundschule: Schillerschule in Backnang
1986-1995	Gymnasium: Max-Born-Gymnasium in Backnang
Juni 1995	Abitur
Oktober 1995 - April 2000	Studium der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main
April 1998	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
April 2000	1. Staatsexamen der Lebensmittelchemie
Mai 2000 - Oktober 2000	Halbjähriges Praktikum am Paul-Ehrlich-Institut (Bundesanstalt für Impfstoffe und Sera) in Langen
November 2000 - April 2001	Halbjähriges Praktikum im Lebensmitteluntersuchungsamt in Wiesbaden
Mai 2001	2. Staatsexamen zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin
November 2001 - Dezember 2004	Experimenteller Teil der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. Schurig mit dem Titel „Enantiomeranalytik mittels Cyclodextrin-Selektoren in der GC, CEC und CE“ am Institut für organische Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
April 2002 - März 2005	Stipendiatin des Graduiertenkollegs „Chemie in Interphasen“