



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Herstellung und Evaluierung von chiralen stationären
Phasen auf Basis von Chinin/Chinidin sowie von 9-
epi-Chinin/Chinidin“

verfasst von

Vebi Mimini, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Chemie

Betreut von:

Univ.-Prof. Dr. Christopher Gerner

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt zunächst Prof. Dr. Wolfgang Lindner und Prof. Dr. Christopher Gerner, die zusammen diese Masterarbeit ermöglicht haben.

Ich danke meinen beiden Professoren aber nicht nur für die wertvollen Impulse und Anregungen, sondern ganz besonders dafür, mir die Gelegenheit eröffnet zu haben, meine Untersuchung an ihrem Institut bzw. in ihrer Arbeitsgruppe zu absolvieren.

Nachdrücklich bedanke ich mich bei Hubert Hettegger MSc für den für mich überaus fachlichen Diskurs und seine wertvolle Unterstützung bei der Gestaltung meiner Arbeit.

Weiteres möchte ich mich bei Dr. Michal Kohout für die gute Kooperation bezüglich *epi*-ZWIX-Säulen bedanken.

Ich bedanke mich ferner bei meiner Familie, die mich auf unterschiedlichste Weise während meines ganzen Studiums unterstützt hat.

Mein ganz spezieller Dank gilt schließlich meiner Frau Sahe, die mir nicht nur in jeglicher Hinsicht eine große Stütze und Hilfe war, sondern darüber hinaus mich stets motivierte und niemals den Glauben an mich verloren hat. Danke!

Inhaltsverzeichnis

I	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	16
II	EINFÜHRUNG UND DEFINITIONEN	10
II.I	ENANTIOMERE	11
II.II	GRUNDLAGEN DER ENANTIOMERENTRENNUNG UND CHIRALEN TRENNTÉCHNIKEN	12
II.II.I	<i>Indirekte Methode</i>	13
II.II.II	<i>Direkte Methode</i>	14
II.II.III	<i>Drei-Punkt-Interaktionsmodell</i>	14
II.III	CHIRALE STATIONÄRE PHASEN (CSP`s)	16
II.III.I	<i>Chirale Ionenaustauscherphasen</i>	18
II.III.I.I	Kationenaustauscher CSP`s (Cation Exchanger, CX-CSP`s)	18
II.III.I.II	Anionenaustauscher CSP`s (Anion Exchanger, AX-CSP`s)	19
II.III.I.III	Zwitterionenaustauscher CSP`s (Zwitterion Exchanger, ZWIX-CSP`s)	20
II.III.II	<i>Stöchiometrisches Verdrängungsmodell für die Ionenaustausch-chromatographie</i>	21
III	EVALUIERUNG DER CHIRALEN STATIONÄREN PHASEN	23
III.I	CHROMATOGRAPHISCHE PARAMETER	23
III.I.I	<i>Retentionsfaktor k</i>	23
III.I.II	<i>Trennfaktor α</i>	24
III.I.III	<i>Chromatographische Auflösung R</i>	24
III.I.IV	<i>Trennstufenzahl N</i>	24
III.II	EVALUIERUNG DER ZWIX-CSP`s	25
III.II.I	<i>Säulenvergleich ZWIX(+) vs. ZWIX(-)</i>	25
III.II.I.I	Saure Verbindungen	26
III.II.I.II	Zwitterionische Verbindungen	31
III.II.II	<i>Umkehr der Elutionsreihenfolge</i>	37
III.III	EVALUIERUNG DER 9- <i>epi</i> -ZWIX-CSP`s	39
III.III.I	<i>epi-ZWIX chirale stationäre Phasen (CSP) basierend auf 9-epi-Chinin</i>	40
III.III.I.I	Optimierung der mobilen Phase für 9- <i>epi</i> -ZWIX chirale stationäre Phasen	41
III.III.I.II	Chirale Analyten (Selektanden) für die 9- <i>epi</i> -ZWIX CSP Evaluierung	41
III.III.I.III	Dipeptide für die 9- <i>epi</i> -ZWIX CSP Evaluierung	44
III.III.I.IV	Vergleich von 9- <i>epi</i> -ZWIX-(<i>R,R</i>)-ACHSA (CSP 864) und 9- <i>epi</i> -ZWIX-(<i>S,S</i>)-ACHSA (CSP 860)	47
IV	RACEMISIERUNGSREAKTIONEN	50
IV.I	RACEMISIERUNG VON AMINOSÄUREN	51
IV.I.I	<i>N-Methyl-Aminosäuren</i>	51
IV.I.II	<i>N-ungeschützte Aminosäuren</i>	55
V	STUDIEN ZUM EINFLUSS DER MOBILEN PHASE IN BEZUG AUF ENANTIOSELEKTIVITÄT, AUFLÖSUNG UND RETENTIONS-VERHALTEN VON ZWITTERIONISCHEN CSP`s, ZWIX(+) UND ZWIX(-)	57
V.I	EINFLUSS VON HÄUFIG EINGESETZTEN ELUTIONSMITTELN (BULK SOLVENTS) – IN ADDITIVFREIER MOBILE PHASE – AUF RETENTION, SELEKTIVITÄT UND AUFLÖSUNG BEI ZWIX(-)	61

V.I.I	<i>Einfluss von Wasser – in additivfreier mobiler Phase bestehend aus Methanol – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)</i>	63
V.I.II	<i>Einfluss von Wasser – in additivfreier mobiler Phase bestehend aus Acetonitril – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)</i>	67
V.I.III	<i>Einfluss von Wasser – in additivfreier mobilen Phase bestehend aus Methanol – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(+)</i>	70
V.II	EINFLUSS DER MOBILEN PHASEN-ZUSAMMENSETZUNG AUF DIE CHROMATOGRAPHISCHE TRENNLEISTUNG DER ZWIX(-)-SÄULE FÜR CYCLISCHE BETA-AMINOSÄUREN	72
V.II.I	<i>Typenvergleich von meist eingesetzten Elutionsmitteln und Additiven in Wasser für cyclische beta-Aminosäuren auf ZWIX(-)</i>	73
VI	MERCAPTOPROPYL-MODIFIZIERTES KIESELGEL	76
VI.I	IMMOBILISIERUNGSSTRATEGIEN	77
VII	EXPERIMENTELLER TEIL	79
VII.I	VERWENDETE GERÄTE	79
VII.II	VERWENDETE HPLC-SÄULEN UND MOBILE PHASE	79
VII.II.I	<i>Mobile Phase</i>	79
VII.III	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFT ZUR VORBEREITUNG VON HPLC PROBEN (AAV)	80
VII.IV	SYNTHESE VON 9-EPI-CHININ-BASIERTEN ZWIX CHIRALEN STATIONÄREN PHASEN	80
VII.IV.I	<i>Synthese von 9-epi-Chinin</i>	80
VII.IV.I.I	<i>9-O-Methansulfonyl-Chinin (1)</i>	80
VII.IV.I.II	<i>9-epi-Chinin (2)</i>	81
VII.IV.II	<i>Synthese des 9-epi-QN-ZWIX Selektors</i>	82
VII.IV.II.I	<i>Herstellung des Aktivesters</i>	82
VII.IV.II.II	<i>Umsetzung von Aktivester 4 mit geschütztem ACHSA</i>	83
VII.IV.II.III	<i>Immobilisierung des zwitterionischen Selektors</i>	84
VII.V	ARBEITSVORSCHRIFTEN ZUM THEMENGEBIET RACEMISIERUNG VON AMINOSÄUREN	84
VII.V.I	<i>Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung von Racemisierungsreaktionen in saurem Milieu (AAV1)</i>	84
VII.V.II	<i>Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung von Racemisierungsreaktionen in basischen Milieu (AAV2)</i>	89
VII.VI	SYNTHESE VON 3-MERCAPTOPROPYL-MODIFIZIERTEM KIESELGEL	90
VII.VI.I	<i>Nachsilanisierung / Endcapping</i>	91
VIII	ZUSAMMENFASSUNG	92
IX	SUMMARY	94
X	ANHANG	96
X.I	CURRICULUM VITAE	106
XI	LITERATUR	107

I Abkürzungsverzeichnis

ACHSA	Aminocyclohexansulfonsäure
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AGP	Alpha-1-saures Glykoprotein
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
Ala	Alanin
AX	Anionenaustauscher (Anion Exchanger)
CAD	Corona Detektor (Charged Aerosol Detector)
CDA	chirales Derivatisierungsreagens
CE	Kapillarelektrophorese
CSP	Chirale Stationäre Phase
Cu	Kupfer
CX	Kationenaustauscher (Cation Exchanger)
Cys	Cystein
DAD	Diodenarray-Detektor
DEA	Diethylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNB	Dinitrobenzoyl
DNBPG	Dinitrobenzoylphenylglycin
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DPDS	Dipyridyl disulfid
EO	Elutionsorder
Epi	Epimerisierung
H	Wasserstoff
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSA	Humanes Serumalbumin
Ile	Isoleucin
IMCI	Intramolekulares Gegenion (intramolecular counter-ion)
k	Retentionsfaktor
Leu	Leucin
Me	Methyl

MeOH	Methanol
Met	Methionin
Mfq	Mefloquin
min	Minuten
MP	Mobile Phase
N	Trennstufenzahl
Phe	Phenylalanin
pI	isoelektrischer Punkt
Pipe	Pipecolinsäure
Pro	Prolin
QD	Chinidin
QN	Chinin
R	Auflösung
RP	Umkehrphase (Reversed Phase)
SA	Selektand (Analyt)
SCX	Starker Kationenaustauscher (Strong Cation Exchanger)
Ser	Serin
SFC	Überkritische Flüssigkeitschromatographie
SO	Selektor
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val	Valin
WCX	Schwacher Kationenaustauscher (Weak Cation Exchanger)
WW	Wechselwirkung
ZWIX	Zwitterionenaustauscher (Zwitterion Exchanger)
ZX	Zwitterionenaustauscher-Modus
α	Trennfaktor

Ziel der Masterarbeit

Im Fokus dieser Masterarbeit stehen funktionalisierte Trennmaterialien für die HPLC Enantiomertrennung auf Basis von Chinin (QN) und Chinidin (QD) bzw. *9-epi* QN / *9-epi* QD.

Die molekularen bzw. enantioselektiven Erkennungsmechanismen, welche die Basis für die chirale Trennung sind, sollen tiefer untersucht und charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel ist eine breitangelegte Evaluierung von ZWIX(+) und ZWIX(-) Säulen sowie deren Vergleich mit den neuen *9-epi*-QN / *9-epi*-QD ZWIX Typ Selektoren und chiralen stationären Phasen (CSPs). Das umfangreiche Testprogramm umschließt ein breites Analyten-Set an racemischen und stereochemisch reinen freien Aminosäuren, Peptiden sowie *N*- und *O*-geschützte Aminosäuren und Peptide.

Bei der vorliegenden Arbeit soll als weiterer wichtiger Aspekt der Einfluss von mobile Phase Komponenten untersucht werden, um deren Auswirkung auf die wichtigen chromatographischen Parameter wie Retention, Selektivität und Effizienz zu studieren. Diese Versuchsserien sollen so angelegt werden, dass die Ergebnisse mit den bereits etablierten ZWIX-Säulen vergleichbar sind und man dieserart vergleichende quantitative Struktur-Trennbeziehungen herausarbeiten kann.

Eine weitere interessante Perspektive ist die Evaluierung des Immobilisierungskonzeptes von Chinin/Chinidin-basierten Carbamat-Selektoren. Es gilt festzustellen, ob es an der Oberfläche von modifiziertem Kieselgel zu einer im Prinzip möglichen doppelten oder doch nur einfachen Anbindung des chiralen Selektors kommt und ob eine dadurch bedingte nicht so dichte Selektoranbindung einen Einfluss auf die Enantioselektivität der chiralen stationären Phasen hat.

II Einführung und Definitionen

Aufgrund der effektiven und unterschiedlichen Wirkung von chiralen pharmazeutischen, agrochemischen oder bioaktiven Verbindungen hat sich die Wichtigkeit der Art der chiralen Natur in den letzten Jahren ständig erhöht¹. Heutzutage sind mehr als die Hälfte der pharmazeutischen Produkte chiral und liegen als Racemate oder als einzelne Enantiomere vor². Wegen ihrer unterschiedlichen pharmakologischen Wirkung auf den menschlichen und tierischen Körper besteht ein großes Interesse, die chiralen Verbindungen in die einzelnen Enantiomere zu trennen. Deshalb ist die Entwicklung neuer geeigneter Methoden (z.B. enantioselektive Chromatographie) zur Trennung und Reinigung von Enantiomeren zwingend erforderlich³.

Chiralität ist eine außergewöhnliche und interessante Eigenschaft von Molekülen, welche sich in Bezug auf ihre Struktur spiegelbildlich zueinander verhalten. Diese Eigenschaft kann z.B. durch ein Paar menschlicher Hände als Modell repräsentiert werden (siehe **Abbildung 1**⁴). Das Wort „Chiralität“ stammt vom griechischen Wort $\chi\epsilon\iota\rho$ ab und bedeutet „Händigkeit“.

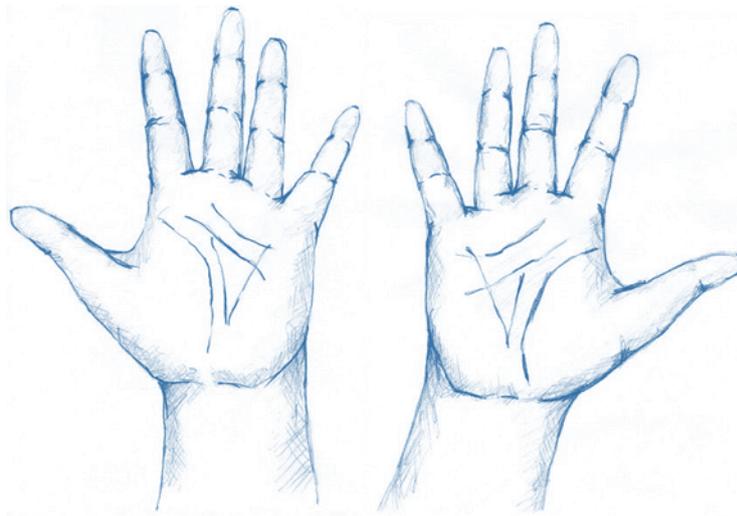


Abbildung 1: Menschliche Hände (linke und rechte Hand) verhalten sich wie Bild und Spiegelbild zueinander. Sie können miteinander nicht zur Deckung gebracht werden

Prinzipiell unterscheidet man folgende Typen der Chiralität⁵:

- Zentrale Chiralität: Voraussetzung ist ein Atom mit drei oder vier unterschiedlichen Substituenten. Das bedeutendste Beispiel dafür ist zentrale Chiralität an unterschiedlich vielfach-substituierten Kohlenstoff-Atomen.
- Planare Chiralität: bei Molekülen (oder Enantiomeren) mit einer Chiralitätsebene, wie etwa monosubstituierte Paracyclophane.
- Axiale Chiralität: tritt bei Molekülen mit einer Chiralitätsachse auf. Ein Beispiel dafür sind unterschiedlich substituierte Allene.
- Topologische Chiralität bezeichnet Chiralität in der Überstruktur.
- Helikale Chiralität: ist ein besonderer Fall der axialen Chiralität und ist vorliegend bei helikalen Molekülen wie beispielsweise DNA-Molekülen.

Eine Vielzahl biologischer und biochemischer Prozesse und auch biogene Bausteine sind von Chiralität dominiert. Enzyme, welche selbst chirale Makromoleküle sind, katalysieren die meisten biochemischen Reaktionen. Peptide, die Bausteine der Proteine sind, bestehen aus chiralen Aminosäuren. Das Rückgrat der DNA ist aus chiralen Monosacchariden aufgebaut und besitzt zusätzlich helikale Chiralität. Fast alle natürlichen chiralen Stoffe kommen nur in einer enantiomeren Form vor. Aminosäuren z.B. besitzen S-Form (auch als *L* bezeichnet), während die meisten Zucker *R*-konfiguriert sind (auch mit *D* bezeichnet).

II.1 Enantiomere

Als Enantiomere, welche chirale Verbindungen darstellen, werden in der Chemie Moleküle bezeichnet, die genau die gleiche Atomanzahl die gleichen Atome besitzen, welche in der gleichen Weise und mit den gleichen Abständen verbunden sind und gleiche physikalische Eigenschaften wie Molekulargewicht, Schmelzpunkt oder innere Energie aufweisen; sie unterscheiden sich aber im Verhalten gegenüber polarisiertem Licht. Enantiomere sind optisch aktiv und drehen die Polarisationsrichtung von linear polarisiertem Licht jeweils in die entgegengesetzte Richtung. Daher werden Enantiomere auch als optische

Antipoden bezeichnet. Diastereomere sind Stereoisomere, die sich nicht wie Bild und Spiegelbild verhalten, d.h. es sind zwei chemisch und physikalisch unterschiedliche Stoffe und besitzen zwei oder mehr Stereozentren, welche nicht homochiral sind. Ein 1:1-Gemisch zweier Enantiomere wird Racemat oder racemisches Gemisch genannt. Racemate drehen die Ebene von linear polarisiertem Licht nicht, da sich die entgegengesetzten Drehwerte aufheben und daher ein Drehwert von $\alpha = 0$ resultiert.

II.II Grundlagen der Enantiomerentrennung und chiralen Trenntechniken

Die Trennung chiraler Stoffe in die entsprechenden Enantiomere ist ein wichtiger Punkt insbesondere in der pharmazeutischen Industrie. Oft unterscheiden sich die pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften zweier Enantiomere sehr stark voneinander und haben somit unterschiedliche Auswirkungen auf den Menschen (sowohl positiver als auch negativer Natur). Wie etwa das Beispiel Contergan (Wirkstoff Thalidomid), dargestellt in **Abbildung 2**, dessen (*R*)-konfigurierte Form ein Schlafmittel ist, während das (*S*)-Enantiomer stark teratogen wirkt. Ähnliches gilt für Dihydroxyphenylalanin (DOPA), ebenfalls dargestellt in **Abbildung 2**, welches als Arzneimittel gegen Parkinson bekannt ist. Das *R*-DOPA ist hochtoxisch, während das *S*-DOPA eine positive Wirkung hat.

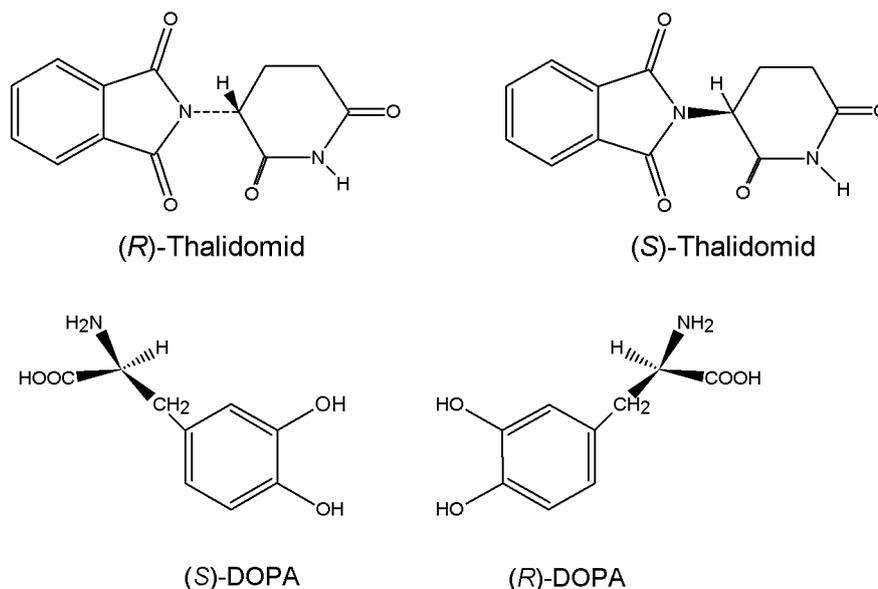


Abbildung 2: oben: Strukturformeln der beiden Enantiomere von Thalidomid; unten: Strukturformeln der beiden Enantiomere von Dihydroxyphenylalanin (DOPA)

Heutzutage gelten strenge regulatorische Gesetze für die Medikamentenhersteller, die von Gesundheits- und Regulierungsbehörden kontrolliert werden. Diese Anforderungen können mithilfe von speziellen Trenntechniken und Detektoren überwacht und erfüllt werden – wie beispielsweise Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (HPLC), überkritische Flüssigkeitschromatographie (SFC), Kapillarelektrophorese (CE) usw.

Enantiomere lassen sich in achiraler Umgebung nicht voneinander trennen/unterscheiden. Sie können aber zum Beispiel durch Verwendung eines optisch aktiven Hilfsstoffes in Diastereomere bzw. diastereomere Assoziate überführt und somit differenziert werden. Grundsätzlich gibt es zwei wesentlichen Strategien zur Trennung von Enantiomeren: die indirekte und direkte Methode (siehe **Abbildung 3**). Beide Methoden arbeiten mit dem Prinzip der Bildung von Diastereomeren. Die erste über kovalente Verknüpfung, letztere über die Bildung von schwächer gebundenen nicht-kovalenten diastereomeren Assoziaten.

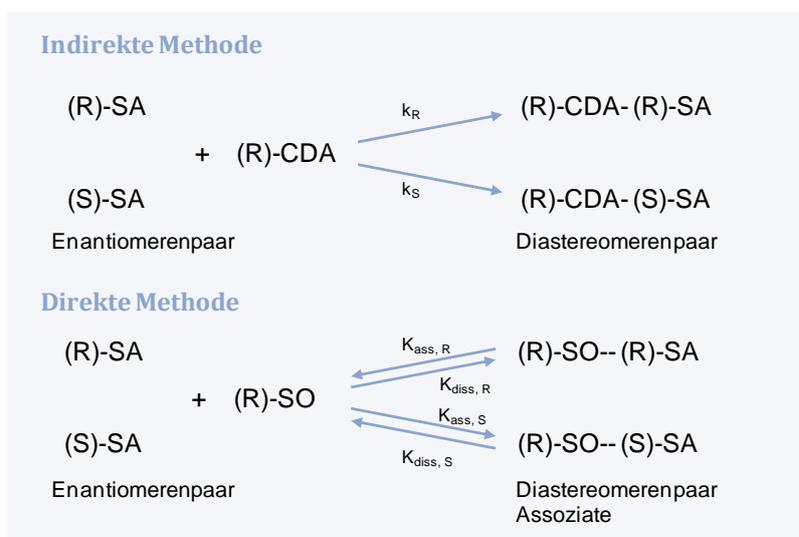


Abbildung 3: Indirekte und direkte Methode der Enantiomerentrennung

II.II.I Indirekte Methode

Bei der indirekten Methode (siehe **Abbildung 3**, oben) werden durch Derivatisierung mit einem optisch reinen chiralen Derivatisierungsreagens (CDA) zwei verknüpfte Diastereomere gebildet. Die so erhaltenen Diastereomere sind durch eine kovalente Bindung zwischen Selektand (SA) und CDA gebunden und somit können diese mit gewöhnlichen, achiralen chromatographischen Methoden wie z.B. RP-HPLC aufgetrennt werden. Allerdings muss das CDA nach der

Aufreinigung wieder präparativ abgespalten werden; dieser Schritt macht diese Methode aufwändig und limitiert ihre Anwendbarkeit. Zusätzlich müssen das CDA und der SA geeignete funktionelle Gruppen besitzen, chemisch und physikalisch stabil sein sowie in beiden enantiomerenreinen Formen vorhanden sein um z.B. die Enantiomerenzuordnung durchführen zu können (beispielsweise über die Elutionsreihenfolge, siehe *III.II.II Umkehr der Elutionsreihenfolge*). Ist das CDA unrein, werden darüber hinaus vier Stereoisomere gebildet, d.h. zwei Paare sind zueinander Enantiomere und daher nicht mehr in achiraler Umgebung trennbar.

II.II.II Direkte Methode

Bei der direkten Methode (siehe **Abbildung 3**, unten) werden zueinander reversible diastereomere Assoziate gebildet. Die resultierenden Komplexe entstehen aus der Wechselwirkung der enantiomeren Selektanden (SA) mit dem enantiomerenreinen chiralen Selektor (SO), welcher z.B. immobilisiert auf Kieselgel vorliegt. Diastereomere Assoziate sind nicht kovalent gebunden und unterscheiden sich in ihren thermodynamischen Komplexbildungskonstanten und ihrer Stabilität, was zu unterschiedlichen Retentionszeiten führt und die Methode prinzipiell enantioselektiv macht.

Um die SA-SO-Wechselwirkungen zu erläutern und enantioselektive Trennmechanismen (chiral recognition) zu verstehen, werden beispielsweise das Drei-Punkt-Interaktionsmodell oder aber auch thermodynamische Überlegungen (van` t Hoff Analyse) eingesetzt.

II.II.III Drei-Punkt-Interaktionsmodell

Easson und Stedman⁶ haben im Jahr 1933 ein Drei-Punkte-Modell postuliert, in dem drei von vier Substituenten eines chiralen Kohlenstoffatoms mit einem Rezeptor wechselwirken müssen, um Enantioselektivität zu erzeugen. 1952 wurde dieses Modell von Dalgliesh^{7, 8} für chromatographische Systeme übertragen.

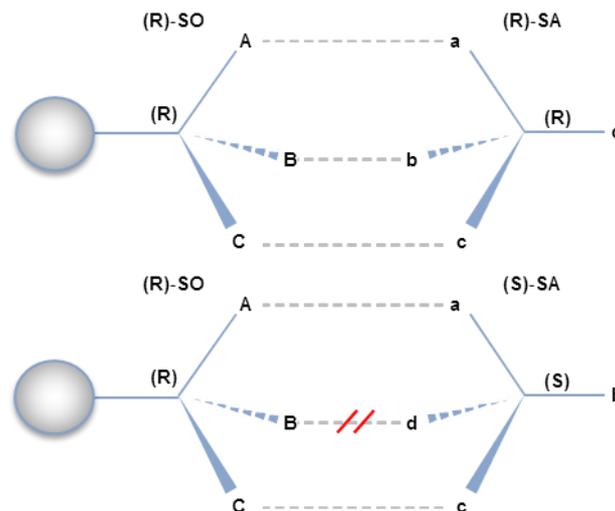


Abbildung 4: Drei-Punkt-Interaktionsmodell, oben starke (ideal fit) und unten schwache Wechselwirkung (non-ideal fit)

Abbildung 4 stellt das Drei-Punkt-Interaktionsmodell anschaulich dar. Es bilden sich diastereomere Assoziate (*RR*) bzw. (*SR*) zwischen Selektor und Selektand. Ein Selektor, welcher beispielsweise auf einer Kieselgeloberfläche immobilisiert ist, hat drei Wechselwirkungsmöglichkeiten (A, B, C), die mit den vom Selektanden bereitgestellten komplementären Wechselwirkungspartnern (a, b, c) interagieren können. Um Enantioselektivität zu erhalten, müssen mindestens drei Wechselwirkungen zeitgleich auftreten. Beim „ideal fit“ (**Abbildung 4**, oben) ist die Wechselwirkung stärker und daher sind die Retentionszeiten bei chiraler HPLC länger. Der (*SR*)-Komplex (**Abbildung 4**, unten) ist aufgrund geringerer Wechselwirkung weniger stabil und der Selektand eluiert daher schneller („non-ideal fit“ Situation). Diese nicht-kovalenten Wechselwirkungen (siehe **Abbildung 5**) besitzen molekulare Erkennungseigenschaften und können H-Brücken, π - π -, hydrophobe-, ionische oder Dipol/Dipol-Wechselwirkungen, sterische Hinderung oder auch Van-der-Waals-Kräfte zwischen Selektor und Selektand sein.

Das Portfolio an chiralen Selektoren und darauf aufbauenden chiralen stationären Phasen (CSP) für die „Liquid Chromatography“ (LC bzw. HPLC) ist groß und soll hier nicht näher diskutiert werden, sondern nur die zwitterionischen Selektoren und CSPs auf Basis von Chinin und Chinidin, welche den Kernteil der gegenständlichen Masterarbeit darstellen (siehe **Abbildung 5**).

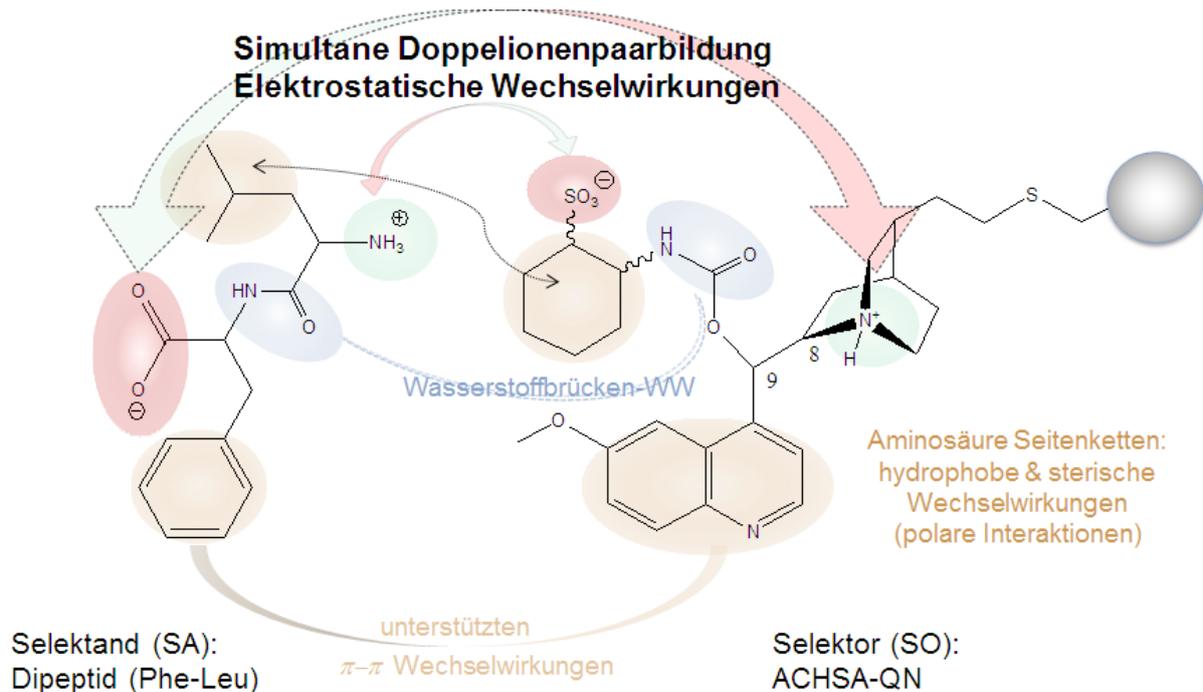


Abbildung 5: Molekulare Erkennung – chirale Wechselwirkungen zwischen einem zwitterionischen Selektor und einem Dipeptid

Die elektrostatischen Wechselwirkungen (ionische oder Dipol/Dipol-WW) können attraktiv und repulsiv sein. Die ersten wechselwirken zwischen positiv und negativ geladenen Gruppen vom Selektor und Selektanden, während die letzte durch Abstoßung zwischen gleichgeladenen Gruppen (positiv-positiv oder negativ-negativ) entsteht. Zusammen bilden sie ein simultanes, kooperatives Doppelionenpaar, das als zusätzlicher und oft auch als primärer Erkennungsmechanismus die chirale molekulare Erkennung signifikant assistiert oder dominiert - etwa bei zwitterionischen Verbindungen.

II.III Chirale Stationäre Phasen (CSP`s)

Um eine bestmögliche Auftrennung von racemischen Proben zu schaffen, ist eine geeignete Auswahl der zwei Haupt-Einflussgrößen **chirale stationäre Phase** (CSP) und **mobile Phase** (MP) sehr wichtig. Aufgrund der Leistungsfähigkeit hat jede Art von chiraler stationärer Phase seine Vor- und Nachteile in Bezug auf die Enantioselektivität bezüglich eines Enantiomerenpaares.

In Hinsicht auf der SO-SA-Wechselwirkung ordnete *Wainer*^{9, 10} die CSP in 5 Arten ein:

- 1. Phasen mit chiralen Kavitäten** sind in einige weitere Kategorien eingeteilt, wie z.B.: makrocyclische Glycopeptid-Antibiotika (Vancomycin, Ristocetin A, Teicoplanine); Cyclodextrine (α -, β -, γ - und chemisch modifizierte Cyclodextrine); synthetische Polymere (Polyacrylamide, Polymethacrylate) und Kronenether (als Binaphthyl-derivate). Diese Phasen haben eine Breitspektrumanwendung und eignen sich zur Trennung von kleinen, hydrophoben Analyten oder Analyten mit aromatischen Ringen wie Phenyl- und Naphthyl-Einheiten oder hetero-Aromaten, aber auch für Peptide und Amine.
- 2. Donor-Akzeptor Phasen – Bürsten-Typ oder Pirkletype-Phasen:** der chirale Selektor, z.B. 3,5-Dinitrobenzoylphenylglycin (DNBPG), ist kovalent auf Kieselgel-Partikel gebunden. Diese CSPs basieren auf relativ kleinen chiralen SOs und sind geeignet für die Trennung von z.B. Naproxen und anderen Pharmaka. Zu diesen niedermolekularen, chiralen stationären Phasen zählen auch jene für die Ionenaustauschchromatographie, wohingegen die klassischen Pirkle-Type Phasen ohne ausgeprägte ionische Wechselwirkungen ihr Auslangen finden.
- 3. Helikale Polymere** sind derivatisierte Polysaccharide wie Cellulose, Amylose und chemisch modifizierte Polysaccharide. Sie finden eine sehr breite Anwendung für die Trennung von neutralen und basischen chiralen Verbindungen. Für Säuren sind diese CSPs oft weniger gut geeignet. Allgemein sind sie jedoch die mit Abstand meistverbreiteten CSPs.
- 4. Proteinphasen** bestehen aus Proteinen wie HSA (Humanes Serumalbumin) oder AGP (alpha-1-saures Glykoprotein), Ovomuroid, Pepsin etc. gebunden auf Kieselgel. Solche Phasen sind geeignet für die Trennung von kleinen Analyten.
- 5. Ligandenaustauschphasen** bestehen aus einem optisch aktiven Liganden, der kovalent auf einen Silikagel-Träger gebunden ist. Der

Ligand kann eine chirale Aminosäure wie z.B. L-Prolin sein, welches in wässriger Lösung mit Cu^{2+} -Ionen ternäre Übergangsmetall-Komplexe bildet. Die Ligandenaustauschphasen dienen beispielsweise zur Trennung von α -Aminosäuren.

Neben dieser Einleitung und Klassifizierung der CSPs können diese auch in Bezug auf ihren chiralen Selektor in drei Gruppen eingeteilt werden: makrocyclische (Cyclodextrine, makrocyclische Antibiotika, Kronenether), makromolekulare (synthetische Polymere, Biopolymere) und niedermolekulare Selektoren (Donor-Akzeptor SO, Liganden-Austauscher und chirale Ionenaustauscher)^{7, 11, 12}.

II.III.I Chirale Ionenaustauscherphasen

Das Prinzip von Ionenaustauscherselektoren beruht auf einer Ionenpaarwechselwirkung zwischen chiralem SO und chiralem SA als primäre und Retentions-dominierende Interaktion. Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen kationischen, anionischen und zwitterionischen CSP-Typen. Diese niedermolekularen Phasen werden auch als Brush-Typ (Bürsten-Typ) bezeichnet.

II.III.I.I Kationenaustauscher CSP`s (Cation Exchanger, CX-CSP`s)

Für eine CX-CSP ist ein chiraler saurer SO notwendig, wobei der SO auf einer Kieselgeloberfläche immobilisiert ist. Für schwache Kationenaustauscher (Weak Cation Exchanger, WCX) werden z.B. Carbonsäuren und für starke Kationenaustauscher (Strong Cation Exchanger, SCX) organische Sulfonsäurederivate verwendet. Im Jahr 2007 entwickelten Hoffmann und Lindner³ SCX-CSPs, welche für die Trennung basischer chiraler Verbindungen wie Clenbuterol, Chinin, Chinidin, Terbutalin etc. geeignet sind.

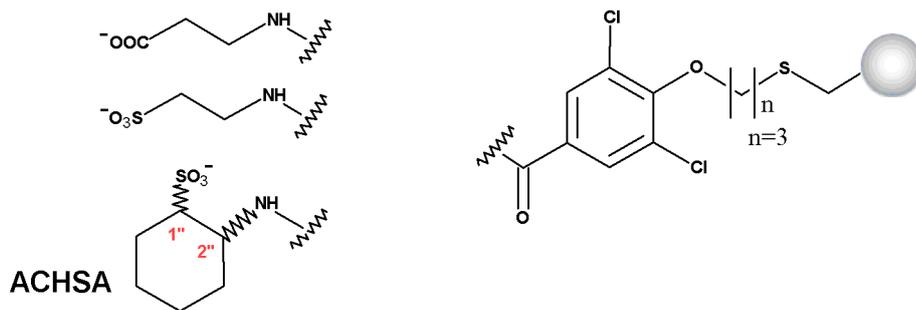


Abbildung 6: Kationenaustauscher, links: Carbonsäure-, Sulfonsäure- und Aminocyclohexan-sulfon-säurerest (ACHSA)

Wie in **Abbildung 6** dargestellt ist der Kationenaustauscher in den zwei ersten Fällen (aliphatischer Carbonsäure- und Sulfonsäure-Rest) an einen achiralen Selektor gebunden. Im Vergleich dazu agiert der untere chirale Selektor (ACHSA), der zwei chirale Zentren in Position 1 und 2 enthält, in zwei Konfigurationsmöglichkeiten: (1''S, 2''S) und (1''R, 2''R). Unter basischen MP Bedingungen wird der Selektor deprotoniert und somit ein Kationenaustausch als primäre retentionsdominierende Wechselwirkung ermöglicht.

II.III.I.II Anionenaustauscher CSP`s (Anion Exchanger, AX-CSP`s)

An unserem Institut wurden zahlreiche neue Selektoren auf der Basis von *Cinchona*-Alkaloiden hergestellt, wobei zwei davon auch kommerzialisiert wurden^{13, 14, 15, 16}, nämlich Chinin und Chinidin O-*tert*-Butyl-Carbamat basierte CSPs, welche unter den Markennamen CHIRALPAK® QN-AX und QD-AX von Chiral Technologies verkauft werden¹⁷. Diese WAX-CSP auf der Basis von *Cinchona*-Alkaloiden, dargestellt in der **Abbildung 7**, werden für die Trennung von chiralen sauren Verbindungen verwendet.

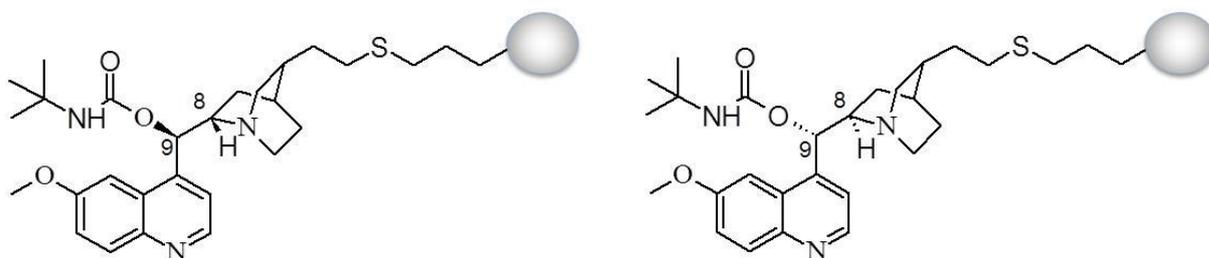


Abbildung 7: Anionenaustauscher, CHIRALPAK® QN-AX (links) und QD-AX CSP (rechts)

Die QN-AX und QD-AX Selektoren sind Diastereomere zueinander: QN-AX (1S, 3R, 4S, 8S, 9R) und QD-AX (1S, 3R, 4S, 8R, 9S). Beide enthalten jeweils fünf

Chiralitätszentren und unterscheiden sich in ihre Konfiguration in den Positionen 8 und 9. Der π -baische Chinolinring ermöglicht π - π -Wechselwirkungen mit aromatischen Einheiten von jeweiligen Analyten, während der Chinuklidinring, der unter sauren MP Bedingungen im protonierten Zustand vorliegt, die primäre Interaktion mit Analytanionen ermöglicht.

II.III.I.III Zwitterionenaustauscher CSP`s (Zwitterion Exchanger, ZWIX-CSP`s)

Wie bereits oben angeführt sind die Kationenaustauscherphasen für die Trennung basischer und die Anionenaustauscherphasen für die Trennung saurer chiraler Verbindungen geeignet. Dieser Einzelionenaustausch ist jedoch nicht ausreichend für die Trennung amphoterer Verbindungen, wie beispielsweise freie Aminosäuren und Peptide, da diese gleichzeitig positiv und negativ geladene Gruppen tragen können und daher die zweite Ladung der Analyten von der jeweiligen stationären Phase abgestoßen werden würde. Diese repulsive Wirkung inhibiert die Bildung von diastereomeren Assoziaten als stabile Komplexe, hemmt die Retention und stört somit die Enantiomerentrennung. Analytische Auswege wie etwa Derivatisierung sind arbeitsaufwändig, schlecht reproduzierbar und erniedrigen die Selektivität und die Auflösung. Um diese Nachteile zu vermeiden und milde Trennbedingungen für chirale zwitterionische Verbindungen zu ermöglichen, wurden von Lindner¹⁵ und Mitarbeitern die zwitterionischen chiralen stationären Phasen (ZWIX-CSP) entwickelt.

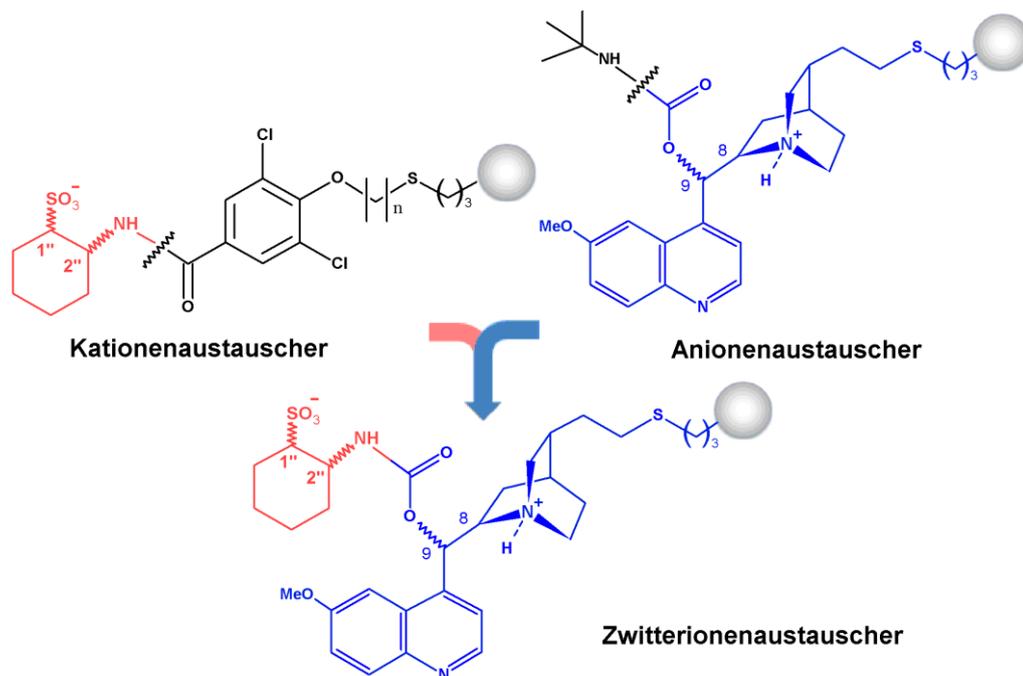


Abbildung 8: Beispiel für eine zwitterionische chirale stationäre Phase. Anionenaustauscher- und Kationenaustauscher-Anteil werden über eine Carbamat-Bindung an C-9 fusioniert; adaptiert aus¹

ZWIX-CSPs sind eine Kombination aus Kationen- und Anionenaustauscher, welche durch Carbamoylierung der *Cinchona*-Alkaloide an C-9 entstehen. Da der Fokus der vorliegenden Masterarbeit ZWIX-Typ CSPs waren, werden diese im Kapitel III.II *Evaluierung der ZWIX-CSP's* noch genauer beschrieben.

II.III.II Stöchiometrisches Verdrängungsmodell für die Ionenaustauschchromatographie

Je nach Strukturgestaltung der chiralen Selektoren ist eine chirale stationäre Phase in der Lage, verschiedenartige racemische Verbindungen in die entsprechenden Enantiomere zu trennen. Ebenso ist die Zusammensetzung der zweiten Einflussgröße, der mobilen Phase, genauso signifikant für die Enantioselektivität, da sie die erforderlichen Additive (sprich Gegenion) für die erfolgreiche Elution zur Verfügung stellt. Diese eng miteinander verbundenen Hauptfaktoren können mittels der Funktionsprinzipien der drei Ionenaustausch-Modi einer ZWIX-CSP (dem Anion-, Kation- und Zwitterionen-Austauscher) erläutert werden (siehe **Abbildung 9**). Als Einzelionenaustauscher funktionieren die beiden ersten Modi (AX und CX) aufgrund von SO-SA Ionenpaar-Bildung als primäre retentionsdominierende Interaktion in Anwesenheit von einem Gegenion in der mobilen Phase, das als kompetitiver Verdränger wirkt. Dieses Additiv ist für

den AX-Modus eine Säure (Anion) und für den CX-Modus eine Base (Kation). Dessen Typ, Art und Konzentrationsmenge in der mobilen Phase ist entscheidend für das Enantiomertrennungs-Ergebnis¹⁸. Die Durchführung einer ZWIX-CSP im Zwitterionenaustauscher-Modus (ZX) ermöglicht für die Trennung von chiralen sauren oder basischen Analyten verkürzte Retentionszeiten verglichen mit den entsprechenden AX- und CX-Austauschern und vergleichsweise geringere Mengen an mobile Phase Additiven¹⁸.

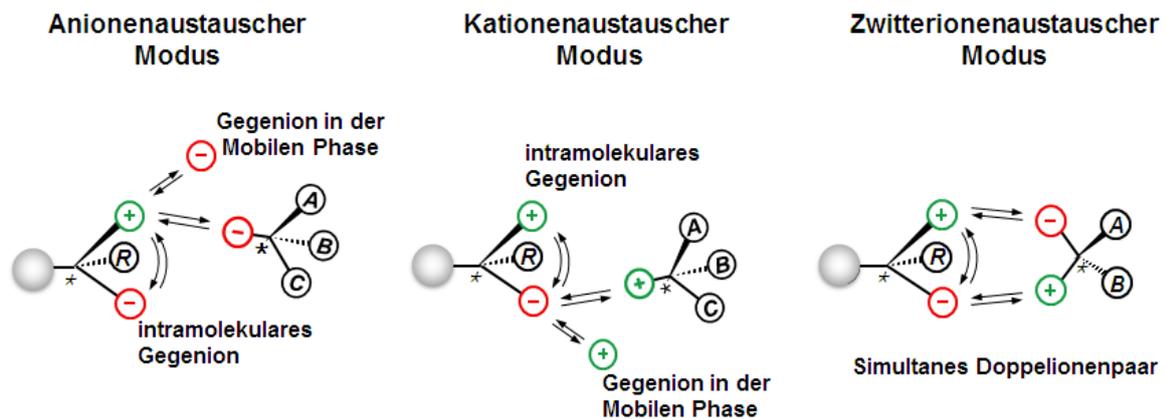


Abbildung 9: Arbeitsprinzip von ZWIX-CSP im Anionen- (für chirale saure Analyten), Kationen- (chirale basische Analyten) und Zwitterionen-Austauschermodus (freie Aminosäuren und Peptide)

Dieses Verhalten wird dem intramolekularen, entgegengeladenen Ion (intramolecular counter-ion, IMCI) zugeschrieben. Als fundamentaler molekularer Erkennungsmechanismus wird die simultane Doppelpionenpaarbildung vorgeschlagen¹⁹.

III Evaluierung der chiralen stationären Phasen

In diesem Abschnitt wird die Evaluierung der auf Chinin und Chinidin basierten Selektoren mit einem Set von chiralen Analyten besprochen.

Ein separater Teil ist der Evaluierung der 9-*epi* ZWIX-Säulen gewidmet.

Weiteres wurde für bestimmte Verbindungen der Einfluss des Wassergehalts in protischer und aprotischer pufferfreier mobiler Phase, der Einfluss des Säuregehalts bei bestimmter mobiler Phase und der Einfluss des Wassergehalts der mobilen Phase bestehend aus protischem oder aprotischem Eluenten und einer Base untersucht.

Die Ergebniswerte sind am Ende der Arbeit tabellarisch dargestellt.

Die chromatographischen Parameter, die bei der Evaluierung besprochen werden, sind der Retentionsfaktor k , der Trennfaktor α , die Auflösung R und die Trennstufenzahl N .

III.I Chromatographische Parameter

III.I.I Retentionsfaktor k

Der Retentionsfaktor k gibt an, wie lange sich ein Analyt (Selektand) im zeitlichen Mittel in der stationären Phase ($t_r - t_0$) und in der mobilen Phase aufhält.

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Er spiegelt die Bindungsstärke zwischen chiralem Selektor und Analyt wider. Je größer der k -Wert ist, desto stärker ist die Wechselwirkung zwischen Selektand und Selektor und desto länger ist folglich die Retentionszeit.

Eine chirale stationäre Phase wechselwirkt in unterschiedlicher Ausprägung mit den jeweiligen Enantiomeren eines Racemats, wobei k_1 und k_2 bei einer erfolgten Enantiomerentrennung die jeweiligen Retentionsfaktoren des ersten und des zweiten eluierten Enantiomers darstellen.

III.I.II Trennfaktor α

Der Trennfaktor α ist ein Maß für das Retentionsverhalten zweier Komponenten (beispielweise zweier Enantiomere). Er ist der Quotient der beiden Retentionsfaktoren (k_1 und k_2). Gebräuchliche Synonyme sind Selektivitätskoeffizient und Selektivität.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Wenn $\alpha = 1$ ist, ist die Retention zweier Analyten gleich groß und die beiden Enantiomere eluieren folglich gleichzeitig, d.h. es gibt keine Trennung. Wenn $\alpha > 1$ ist, expliziert das, dass eines der Enantiomere aufgrund der stärkeren Wechselwirkung mit der stationären Phase länger retardiert ist und es somit zu einer Trennung kommt. Für präparative chromatographische Einsätze sind hohe α -Werte von Bedeutung. Der Trennfaktor α lässt sich durch die Variation der stationären und mobilen Phase beeinflussen.

III.I.III Chromatographische Auflösung R

Die Auflösung R ist ein weiterer sehr relevanter chromatographischer Parameter. Sie ist eine Maß für die Qualität der Trennung.

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right)$$

Die Auflösung ist von der Trennstufenzahl N (Bodenzahl), dem Retentionsfaktor k und dem Trennfaktor α abhängig. Wenn die Auflösung einen Zahlenwert $> 1,5$ hat, expliziert das für gewöhnlich, dass die zwei Enantiomere basisliniengetrennt sind. Auflösungs-werte zwischen 1 und 1,5 deuten auf unvollständige Trennungen hin. Für präparative Anwendungen sind hohe Auflösungs-werte notwendig. Bei dieser Betrachtung geht man davon aus, dass die Peaks symmetrisch sind, also weder „tailing“ noch „fronting“ aufweisen.

III.I.IV Trennstufenzahl N

Die Trennstufenzahl N liefert Informationen über die Trennleistung einer Säule. Sie ist als Anzahl der theoretischen Trennstufen mit der Höhe H in einer Säule der Länge L definiert.

$$N = \frac{L}{H}$$

Für die Trennstufenzahl N sind verschiedene Formeln bekannt. Eine allgemeine Formel ist wie folgt dargestellt:

$$N_R = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_R}\right)^2$$

Die Trennstufenzahl wird berechnet, indem man die Retentionszeit eines Analyten durch die Peakbreite bei halbem Maximum dividiert. Dieser Wert wird quadriert und mit einer Konstante multipliziert. N ist unter anderem abhängig von der Packungsqualität der Säule und der Selektordichte der stationären Phase.

Frühere Studien in der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass die Wechselwirkungen zwischen Selektor und Selektand von der Selektordichte abhängig sind^{20, 21}.

III.II Evaluierung der ZWIX-CSP`s

III.II.I Säulenvergleich ZWIX(+) vs. ZWIX(-)

Bei den vorliegenden Säulenmaterialien handelt es sich um zwitterionische chirale stationäre Phasen (ZWIX-CSP), bestehend aus einem Chinin- oder Chinidin-basierten schwachen Anionenaustauscher (WAX) sowie einem starken Kationenaustauscher-Anteil (SCX). Die kommerziell erhältlichen ZWIX-Säulen enthalten jeweils fünf Chiralitätszentren. Die einzigen Konfigurationsunterschiede sind die chiralen Zentren in den Positionen 8 und 9 am Anionenaustauscherteil sowie 1" und 2" beim Kationenaustauscherteil. Die Selektoren sind pseudoenantiomer zueinander, ZWIX(+) (8S, 9R) (1"S, 2"S) ist Chinin-basiert, während ZWIX(-) (8R, 9S) (1"R, 2"R) vom Chinidin-Typ ist. Der Begriff pseudoenantiomer bezieht sich in diesem Zusammenhang auf das chromatographische Verhalten der CSPs in Bezug auf die Umkehr der Elutionsreihenfolge zweier Enantiomere.

Der stark basische Chinuklidinring ist verantwortlich für Wechselwirkungen mit negativ geladenen Gruppen von Analyten und ermöglicht die Trennung von chiralen sauren Verbindungen, während der Aminocyclohexansulfonsäure-Rest (ACHSA) als Kationenaustauscher fungiert. ZWIX-CSP sind nicht nur für die

Trennung von chiralen Säuren, sondern auch für Basen und für chirale zwitterionische Verbindungen wie Aminosäuren und Peptide geeignet. Die Strukturen der beiden CSP-Typen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

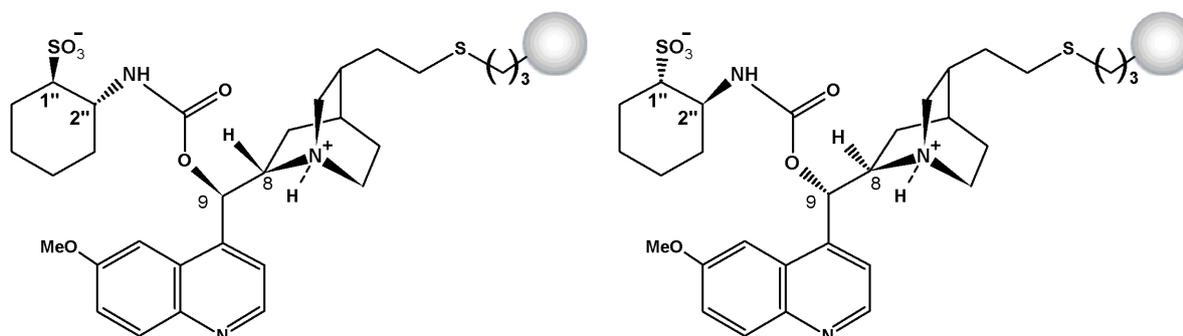


Abbildung 10: links: Chiralpak ZWIX(+) (8*S*, 9*R*) (1''*S*, 2''*S*); rechts: Chiralpak ZWIX(-) (8*R*, 9*S*) (1''*R*, 2''*R*)

Für die Evaluierung der ZWIX(+) und ZWIX(-) CSP wurde ein breites Set von 80 chiralen Analyten herangezogen. Um den Anionen- bzw. Kationenaustauschmechanismus der Säule zu überprüfen, wurden sowohl saure, basische als auch zwitterionische Verbindungen verwendet. Beide CSP wurden unter gleichen Bedingungen separat getestet und die Daten danach miteinander verglichen. Die hydroorganische mobile Phase enthielt 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin, resultierend in einen pH-Wert von 5,4. Die Elution erfolgte unter isokratischen Bedingungen und wurde mit einer Flussrate von 0,5 mL/min bei 25,0°C durchgeführt.

III.II.I Saure Verbindungen

Wie oben erwähnt, ergibt sich die Primärretention von chiralen sauren Verbindungen aufgrund der Wechselwirkung zwischen dem protonierten Stickstoffatom des basischen Chinuklidinring mit negativ geladenen Gruppen der Analyten. Diese primäre Interaktion beruht auf dem Ionenaustauschprinzip.

Im Vergleich zu klassischen Anionen- oder Kationenaustauscherphasen, die nur für saure bzw. basische Verbindungen separat einsetzbar sind, ermöglicht eine ZWIX-Säule zeitgleich eine Enantiomerentrennung nicht nur von sauren und basischen, sondern auch von amphoteren Verbindungen wie z.B. freie Aminosäuren und Peptide¹⁵.

Der größte Teil der sauren Verbindungen des Sets besteht aus *N*-geschützten Aminosäuren mit unterschiedlichen Schutzgruppen als auch chiralen organischen Säuren.

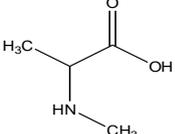
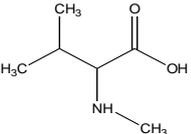
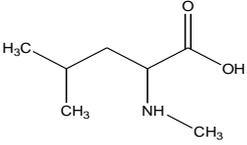
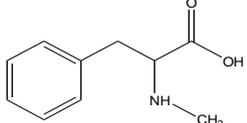
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	<i>N</i> -Me-Ala	<i>N</i> -Methyl- <i>D,L</i> -Alanin
	<i>N</i> -Me-Val	<i>N</i> -Methyl- <i>D,L</i> -Valin
	<i>N</i> -Me-Leu	<i>N</i> -Methyl- <i>D,L</i> -Leucin
	<i>N</i> -Me-Phe	<i>N</i> -Me- <i>D,L</i> -Phenylalanin

Abbildung 11: Saure Verbindungen: *N*-Methyl Aminosäuren

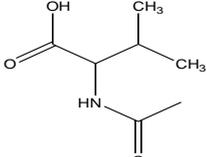
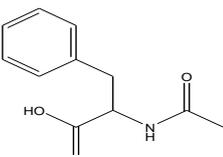
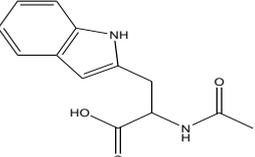
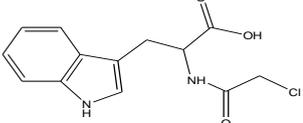
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	<i>N</i> -Ac-Val	<i>D,L</i> - <i>N</i> -Acetyl-Valin
	<i>N</i> -Ac-Phe	<i>D,L</i> - <i>N</i> -Ac-Phenylalanin
	<i>N</i> -Ac-Trp	<i>D,L</i> - <i>N</i> -Ac-Tryptophan
	<i>N</i> -Cl-Ac-Trp	Chloroacetyl- <i>D,L</i> -Tryptophan

Abbildung 12: Saure Verbindungen: *N*-Acetyl geschützte Aminosäuren

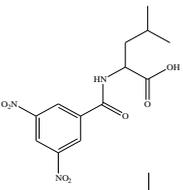
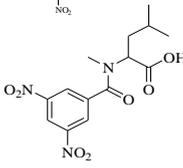
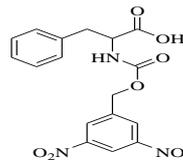
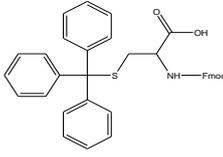
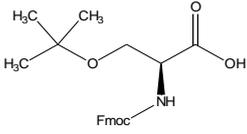
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	DNB-Leu	3,5-Dinitrobenzoyl- <i>D,L</i> -Leucin
	DNB- <i>N</i> -Me-Leu	3,5-Dinitrobenzoyl- <i>N</i> -Methyl- <i>D,L</i> -Leucin
	DNZ-Phe	3,5-Dinitrobenzoylcarbonyl- <i>D,L</i> -Phenylalanin
	Fmoc- <i>D,L</i> -Cys(trt)-OH	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>D,L</i> -trityl-Cystein
	Fmoc- <i>D,L</i> -Ser(tbu)-OH	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)- <i>D,L</i> -tert-butyl-Serin

Abbildung 13: Saure Verbindungen: weitere *N*-geschützte Aminosäuren

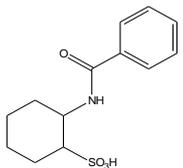
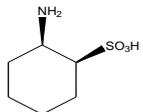
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	Bz-ACHSA	Benzoyl-aminocyclohexan-1-sulfonsäure
	ACHSA	trans-2-aminocyclohexan-1-sulfonsäure

Abbildung 14: Saure Verbindungen: Sulfonsäuren

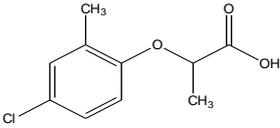
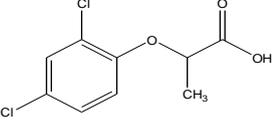
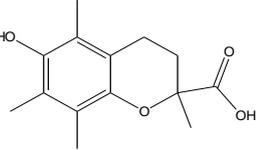
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	Mecoprop	[2-(4-Chlor-2-methyl-phenoxy)-propion-säure]
	Dichlorprop	2-(2,4-DichloroPhenoxy) propionic acid
	Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carbonsäure

Abbildung 15: Saure Verbindungen: Carbonsäuren

Die beiden ZWIX-CSP lassen sich fair vergleichen, da sie eine ähnliche Selektordichte auf der Oberfläche des modifizierten Kieselgels besitzen und die Evaluierung unter identen Bedingungen durchgeführt wurde. Es ist zu bemerken, dass die Racematverbindungen *N*-Me-Phe (siehe *IV.1 Racemisierung von Aminosäuren*) und die zwei Synthone für die Festphasen-Peptidsynthese Fmoc-*D,L*-Cys(trt)-OH und Fmoc-*D,L*-Ser(tbu)-OH nur auf ZWIX(+) getrennt werden konnten (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 8**).

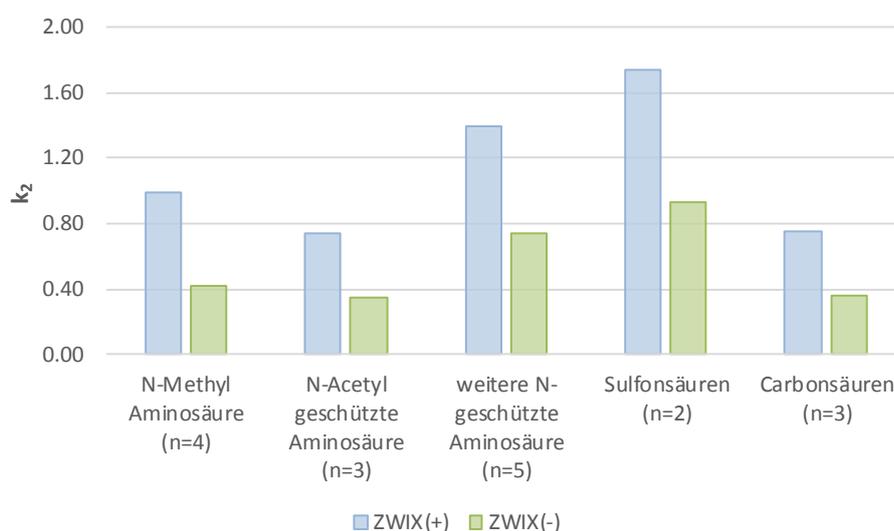


Abbildung 16: Vergleich der Retentionsfaktoren zwischen ZWIX(+) und ZWIX(-) für saure Verbindungen

Aus **Abbildung 16** kann man ablesen, dass die Retentionsfaktoren k für ZWIX(+) etwas höher sind als bei ZWIX(-). Die folgende **Abbildung 17** gibt die mittleren Werte der Selektivitätskoeffizienten α der beiden pseudoenantiomeren CSP für die verschiedenen Gruppen saurer Verbindungen an.

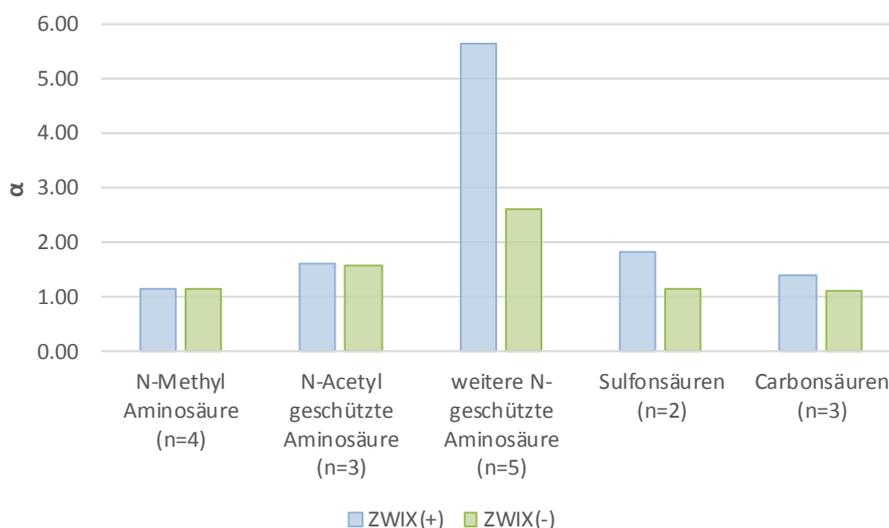


Abbildung 17: Vergleich der Selektivitätswerte zwischen ZWIX(+) und ZWIX(-) für saure Verbindungen

Bei ZWIX(+) weisen alle Gruppen im Durchschnitt eine höhere Selektivität im Vergleich zu ZWIX(-) auf, wie es z.B. bei den *N*-geschützten Leucin-Derivaten DNB-Leu oder DNB-*N*-Me-Leu der Fall ist. DNB-Leucin hat bei den beiden Phasen im Vergleich zu allen anderen Analyten die höchsten Selektivitätswerte. Diese DNB-Derivate werden aufgrund der Kombination von ionischen- und π - π Wechselwirkungen des elektronenarmen und somit π -sauren aromatischen Rings von DNB und des elektronenreichen (π -basischen) Chinolinrings des Selektors so gut getrennt²².

Wie in **Abbildung 18** dargestellt, zeigt ein Vergleich der beiden ZWIX-Säulen in Bezug auf die mittlere Auflösung deutlich höhere Werte für ZWIX(+). Im Durchschnitt ist die Auflösung jeder Gruppe bei ZWIX(+) um einen Faktor 1,5 erhöht.

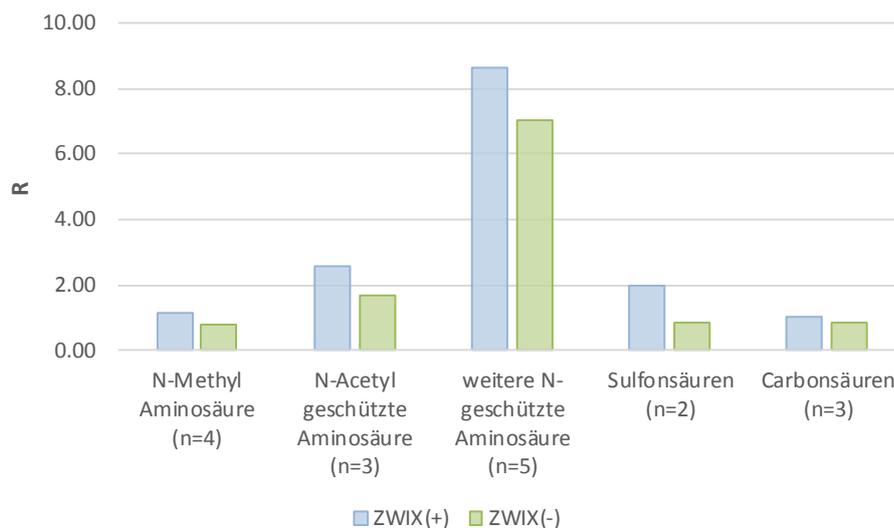


Abbildung 18: Vergleich der Auflösung zwischen ZWIX(+) und ZWIX(-) für saure Verbindungen

III.II.I.II Zwitterionische Verbindungen

Zwitterionische – auch amphotere oder ampholyte Verbindungen genannt – sind diejenigen Verbindungen, die sowohl saure als auch basische funktionelle Gruppen besitzen. Deren jeweilige Ausprägung ist stark pH-Wert abhängig. Bei einem bestimmten pH-Wert besitzen diese Verbindungen eine Nettoladung von Null (als isoelektrischer Punkt bezeichnet pI). Unterhalb und oberhalb dieses pH-Werts kommt es durch intramolekulare Reaktionen zur Bildung einer anionischen (Deprotonierung) oder einer kationischen (Protonierung) funktionellen Gruppe. Dieser amphotere Charakter erlaubt eine Enantiomerentrennung nur auf ZWIX-CSPs, da auf diesen Materialien die zweite Ladung als intramolekulares Gegenion wirkt. Im Folgenden sind anhand der zugehörigen chemischen Strukturen die zwitterionischen Verbindungen dargestellt.

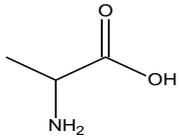
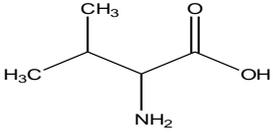
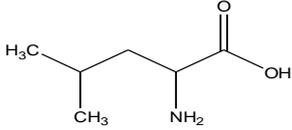
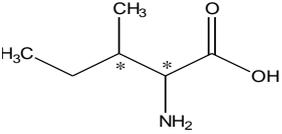
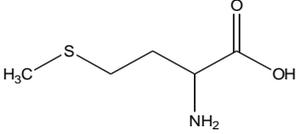
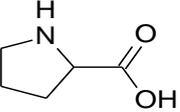
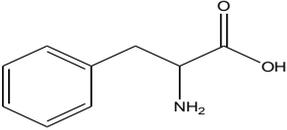
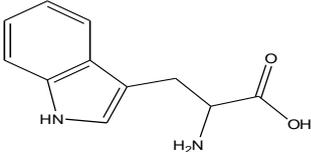
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	Ala	<i>D,L</i> -Alanin
	Val	<i>D,L</i> -Valin
	Leu	<i>D,L</i> -Leucin
	Ile	<i>D,L</i> -allo-Isoleucin (4 Isomere)
	Met	<i>D,L</i> -Methionin
	Pro	<i>D,L</i> -Prolin
	Phe	<i>D,L</i> -Phenylalanin
	Trp	<i>D,L</i> -Tryptophan

Abbildung 19: Zwitterionische Verbindungen: proteinogene Aminosäuren

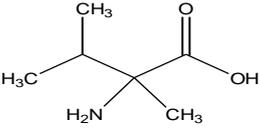
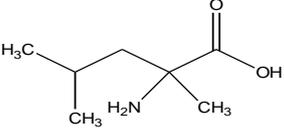
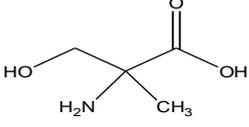
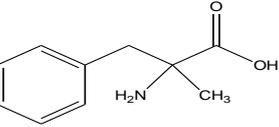
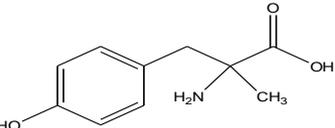
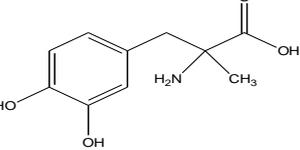
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	α -Me-Val	alpha-Methyl- <i>D,L</i> -Valin
	α -Me-Leu	alpha-Methyl- <i>D,L</i> -Leucin
	α -Me-Ser	alpha-Methyl- <i>D,L</i> -Serin
	α -Me-Phe	alpha-Methyl- <i>D,L</i> -Phenylalanin
	α -Me-p-Tyr	alpha-Methyl- <i>D,L</i> -p-Tyrosin
	α -Me-DOPA	<i>D,L</i> -2-Methyl-3(3,4-Dihydroxy Phenyl)alanin

Abbildung 20: Zwitterionische Verbindungen: α -methylierte Aminosäuren

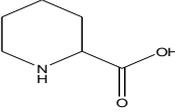
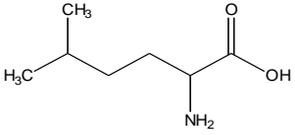
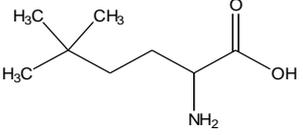
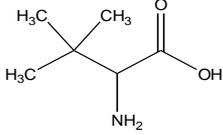
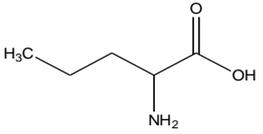
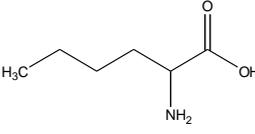
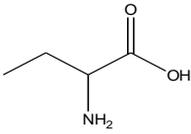
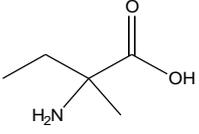
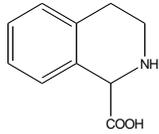
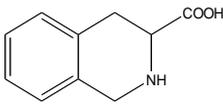
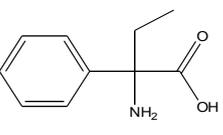
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	Pipe-1	<i>D,L</i> -Pipicolinsäure
	H-Leu	<i>D,L</i> -Homo-Leucin
	H-tert-Leu	<i>D,L</i> -Homo-tert-Leucin
	tert.-Leu	<i>D,L</i> -tert.-Leucin
	Nor-Val	<i>D,L</i> -Norvalin
	Nor-Leu	<i>D,L</i> -Norleucin
		<i>D,L</i> - α -amino-buttersäure
	iso-Val	<i>R,S</i> -iso-Valin
	TIC-1	Sekundäre Aminosäure
	TIC-3	Sekundäre Aminosäure
		2-Amino-2-phenylbuttersäure

Abbildung 21: Zwitterionische Verbindungen: übrige aliphatische Aminosäuren

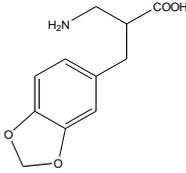
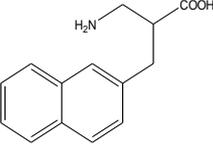
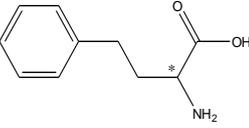
Strukturformel	Symbol	Aminosäure
	M15	β -Aminosäure
	M16	β -Aminosäure
	H-Phe	D,L-Homo-phenylalanin

Abbildung 21 (fortgesetzt): Zwitterionische Verbindungen: weitere aliphatische Aminosäuren

Außer bei α -Me-Val, α -Me-Phe und α -Me-*p*-Tyr auf beiden Säulen, und Trp auf ZWIX(-), wurde für alle anderen zwitterionischen Verbindungen eine vollständige Enantioselektion erreicht (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 9**)

Wie für die sauren Verbindungen sind die Retentionsfaktoren auch für die zwitterionischen Verbindungen bei ZWIX(+) höher als bei ZWIX(-). Jedoch ist das nicht der Fall für andere chromatographische Parameter.

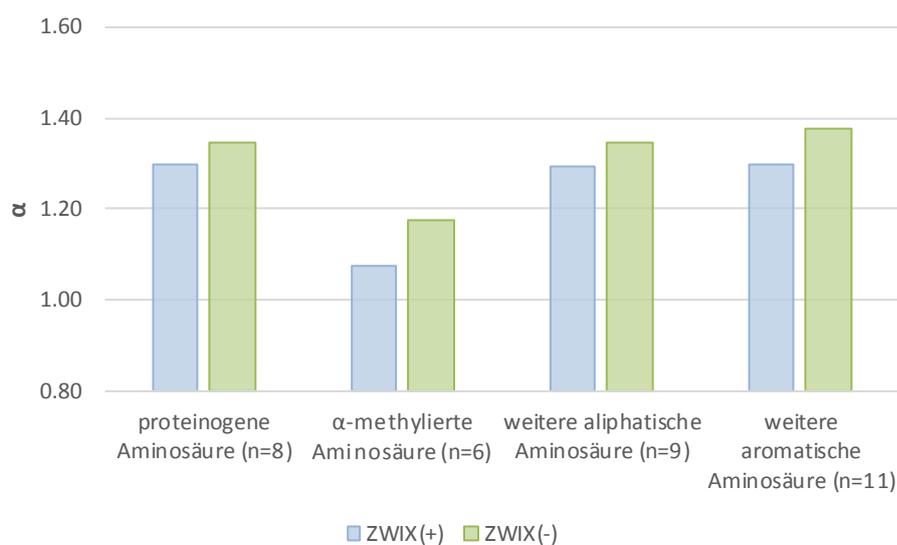


Abbildung 22: Vergleich der Selektivitätswerte von ZWIX(+) und ZWIX(-) für zwitterionische Verbindungen

Bei der obigen **Abbildung 22** sieht man einen gegenteiligen Effekt für die Selektivität der zwitterionischen Verbindungen im Vergleich zu sauren Verbindungen (vergleiche dazu **Abbildung 17**). Die ZWIX(-)-Säule ergibt außer für DOPA und 2-Amino-2-phenylbuttersäure für alle anderen zwitterionischen Verbindungen etwas höher Selektivitätswerte als die ZWIX(+)-Säule.

Dasselbe Verhalten beobachtet man für die Auflösung. Für den Vergleich wurden zehn zwitterionische Verbindungen ausgewählt.

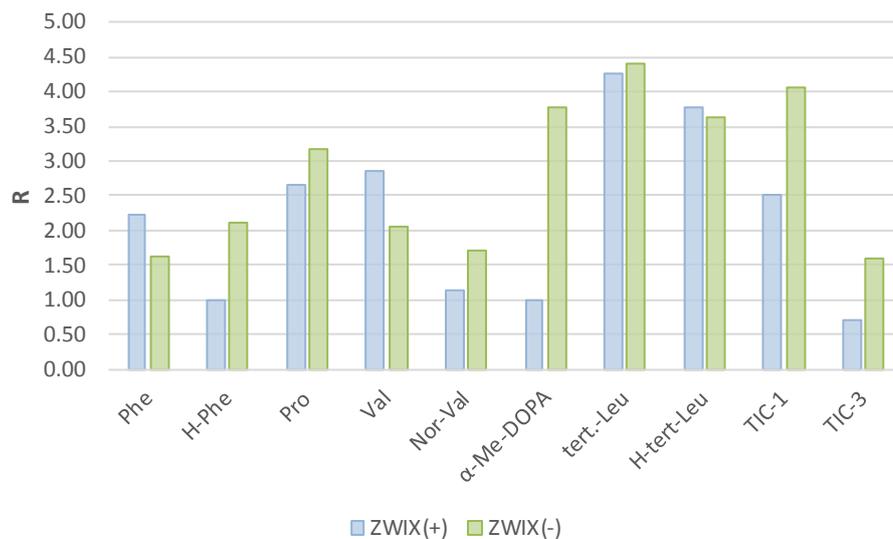


Abbildung 23: Vergleich der Auflösungswerte zwischen ZWIX(+) und ZWIX(-) für zehn ausgewählte zwitterionische Verbindungen

Bei insgesamt 34 zwitterionischen Verbindungen ergeben nur sechs Verbindungen – unter denen z.B. die für den Vergleich ausgewählten zwitterionischen Verbindungen Phe, Val und H-tert-Leu – höhere Auflösungswerte bei der ZWIX(+)-Säule. Generell zeigen die zwitterionischen Verbindungen durchschnittlich höhere Auflösungen im Falle der ZWIX(-)-Säule.

III.II.II Umkehr der Elutionsreihenfolge

In früheren Studien^{17, 23, 24} konnte gezeigt werden, dass Chinin- und Chinidin-basierte CSP sich in Bezug auf ihr chromatographisches Verhalten und die Elutionsreihenfolge wie Enantiomere verhalten. Daher werden diese Alkaloide auch als Pseudo-Enantiomere bezeichnet, obwohl die Selektoren eigentlich diastereomer zueinander sind. Das pseudoenantiomere Verhalten wurde bei den beiden Selektorarten für alle getrennten Verbindungen beobachtet. Ein Beispiel dafür ist in der folgenden Abbildung anhand des Analyten *tert.*-Leu gezeigt.

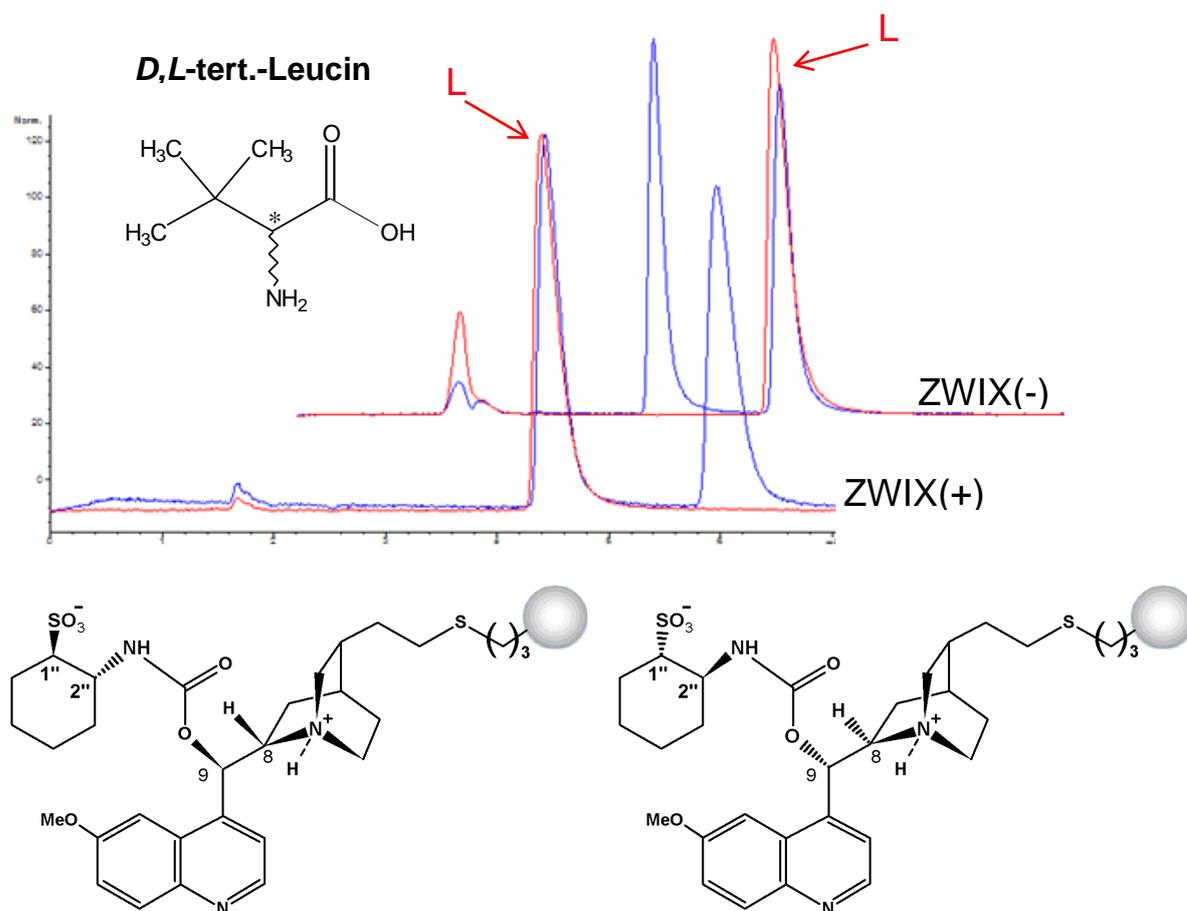


Abbildung 24: Umkehr der Elutionsreihenfolge für ZWIX(+) und ZWIX(-) für *tert.*-Leucin. links: ZWIX(+) (8*S*, 9*R*) (1''*S*, 2''*S*); rechts: ZWIX(-) (8*R*, 9*S*) (1''*R*, 2''*R*)

Beide Säulen liefern eine Basislinientrennung für *tert.*-Leu. Bei ZWIX(+) (QN-Typ) eluiert L vor D und bei ZWIX(-) (QD-Typ) ist es genau umgekehrt. Bei denselben Säulen ist die Elutionsreihenfolge unter gleichen chromatographischen Bedingungen für *N*-methylierte und nicht-*N*-methylierte Aminosäuren umgekehrt (siehe IV.I Racemisierung von Aminosäuren).

Tabelle 1: Elutionsreihenfolge für saure Verbindungen

Analyt	ZWIX(+)	ZWIX(-)
<i>N</i> -Me-Ala	D/L	L/D
<i>N</i> -Me-Val	D/L	L/D
<i>N</i> -Me-Leu	D/L	L/D
<i>N</i> -Me-Phe	D/L	
<i>N</i> -Ac-Val	D/L	L/D
<i>N</i> -Ac-Phe	D/L	L/D
Fmoc- <i>D,L</i> -Cys(trt)-OH	D/L	
Fmoc- <i>D,L</i> -Ser(tbu)-OH	D/L	

Der Grund für die Änderung der Elutionsreihenfolge liegt in der Hierarchie der Bindungs- bzw. Interaktionsstellen zwischen dem SA und dem SO.

Tabelle 2: Elutionsreihenfolge für zwitterionische Verbindungen

Analyt	ZWIX(+)	ZWIX(-)
Ala	L/D	D/L
Val	L/D	D/L
Leu	L/D	D/L
Met	L/D	D/L
Pro	L/D	D/L
Phe	L/D	D/L
Trp	D/L	L/D
α -Me-DOPA	D/L	L/D
Pipe-1	L/D	D/L
H-Leu	L/D	D/L
<i>tert.</i> -Leu	L/D	D/L
Nor-Val	L/D	D/L
Nor-Leu	L/D	D/L
Iso-Val	S/R	R/S
TIC-3	L/D	D/L
DOPA	L/D	D/L
4-Nitro-Phe	L/D	D/L
3-Nitro-Tyr	L/D	D/L

III.III Evaluierung der 9-*epi*-ZWIX-CSP`s

Das Präfix „*epi*“ steht für Epimerisierung. Als Epimerisierung bezeichnet man bei Molekülen die Konfigurationsänderung nur eines chiralen Kohlenstoffatoms in Molekülen mit mehreren chiralen Kohlenstoffatomen. Während der Epimerisierung bleibt die Konfiguration der restlichen chiralen Kohlenstoffatome (oder chiralen Heteroatome) unverändert.

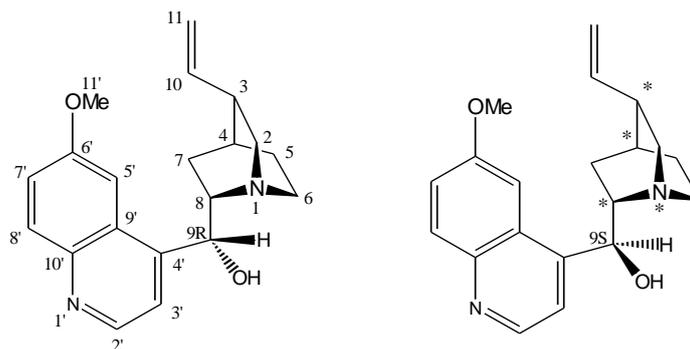


Abbildung 25: links: Strukturformeln des Chinins (9*R*); rechts: Strukturformel des 9-*epi*-Chinins (9*S*)

In **Abbildung 25** ist links der Naturstoff Chinin (bekanntester Vertreter der *Cinchona* Alkaloid-Familie) dargestellt. Die *Cinchona* Alkaloide besitzen vier konformative lokale Energieminima: *anti offen*, *anti geschlossen*, *syn offen* und *syn geschlossen*²⁵. Bei Raumtemperatur liegt Chinin gelöst in CDCl₃ mit mehr als 80% Anteil in der *anti offen* Konformation vor. Die sekundäre Alkoholfunktion am Kohlenstoffatom 9 ist nach dem Chinuklidinstickstoff eine der wichtigsten Stellen im Molekül. C9 ist entscheidend für die Konformation und wird bei der Epimerisierung von (9*R*)- in die (9*S*)-Konfiguration umgekehrt. Die unnatürliche (9*S*)-Konfiguration rechts in **Abbildung 25** wird mit dem Präfix „*epi*“ bezeichnet und liegt mit einem Anteil von über 90% als *syn offen* Konformation vor. Chinin und 9-*epi*-Chinin sind per Definition zueinander Epimere, da sie sich nur in der Konfiguration eines Sterozentrums, dem C-9, unterscheiden.

9-*epi*-Chinin kann aus natürlichen Quellen nur in sehr geringen Mengen isoliert werden, daher ist für etwaige chemische Zwecke dessen Synthese notwendig. Suszko et al.²⁶ beschreiben die Umsetzung des Chinins in geringer Ausbeute (44%) zum Chinintosylat und anschließende Umsetzung zum 9-*epi*-Chinin nach Behandlung mit Weinsäure. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen – wobei

Chininmesylat²⁷ anstelle von Chinintosylat als Zwischenprodukt hergestellt wurde, verbesserte die Gesamtausbeute (86%) zum 9-*epi*-Chinin.

III.III.I *epi*-ZWIX chirale stationäre Phasen (CSP) basierend auf 9-*epi*-Chinin

Chinin-Carbamate als chirale Selektoren bei zwitterionischen Ionenaustauscherphasen, sogenannten ZWIX-Säulen (siehe III.II *Evaluierung der ZWIX-CSP`s*), formen durch die Strukturelemente Chinolin-Ring, Carbamat-Rest und Chinuklidin-Ring eine sogenannte „Bindungstasche“. Bei der Epimerisierung bricht diese „Bindungstasche“ auf, weil der Carbamat-Rest am C9 in die entgegengesetzte Richtung als beim nativen Chinin „schaut“, quasi von Chinolin und Chinuklidin-Ring aus gesehen nach hinten. Auch der Chinolin-Ring wird zum Chinuklidin-Ring hingedreht, jedoch dürfte die „Bindungstasche“ nicht so stark wie bei Chinin ausgebildet sein.

Durch das Aufbrechen – dem sogenannten „Bindungstaschen-Effekt“ – sollten die molekularen bzw. enantioselektiven Erkennungsmechanismen geändert und somit eine neue Basis für die chirale Trennung geschaffen werden. Diese neuen Erkennungsmechanismen sollten insbesondere nicht nur für freie, *N*- und *O*-geschützte Aminosäuren, sondern auch für racemische und stereochemisch reine freie, sowie *N*- und *O*-geschützte Peptide interessant sein, da diese länger sind und somit leichter erkannt werden könnten.

Für die Evaluierung der oben beschriebenen Effekte wurden die folgenden *epi*-ZWIX-CSP in Kooperation mit dem Institut für Organische Chemie der Universität Prag (Dr. Michal Kohout) hergestellt und verwendet:

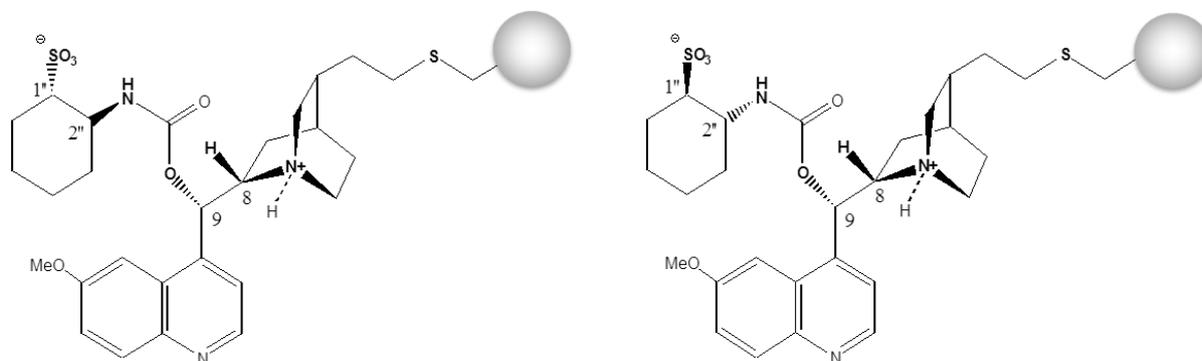


Abbildung 26: *epi*-ZWIX-CSP, links: 8*S*, 9*S*, 1'*R*, 2'*R* 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (CSP 864); rechts: 8*S*, 9*S*, 1'*S*, 2'*S* 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (CSP 860)

Die 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (kurz: CSP 864) und 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (kurz: CSP 860) sind in Säulen gleicher Dimension wie ZWIX(+) (Länge 150 mm und Innendurchmesser 3 mm) gepackt worden. Die Selektoren sind chemisch kovalent auf 3 µm Durchmesser sphärischen Kieselgelpartikeln gebunden und unterscheiden sich strukturell und somit chemisch nur über den *trans*-2-ACHSA-Rest. Bei CSP 864 ist der ACHSA-Rest *R,R*-konfiguriert (der Sulfonsäurerest schaut wie in **Abbildung 26** gezeigt nach hinten) – im Vergleich zu CSP 860, bei welcher der ACHSA-Rest *S,S* konfiguriert ist und dadurch der Sulfonsäurerest nach vorne gerichtet ist.

III.III.I.I Optimierung der mobilen Phase für 9-*epi*-ZWIX chirale stationäre Phasen

Um die allgemeine Trennleistung der 9-*epi*-ZWIX chiralen stationären Phasen nachzuprüfen, wurde ein sogenanntes Screening zur Optimierung der mobilen Phase durchgeführt. Wie in **Tabelle 3** dargestellt, ist die Zusammensetzung der mobilen Phase der ersten fünf Versuchsserien wasserfrei.

Tabelle 3: Optimierung der mobilen Phase für das Screening von 9-*epi*-ZWIX CSP 864

Bedingung	MeOH%	ACN%	H ₂ O%	Ameisensäure mM	Diethylamin mM
a	10	90	0	50	25
b	20	80	0	50	25
c	50	50	0	50	25
d	80	20	0	50	25
e	100	0	0	50	25

III.III.I.II Chirale Analyten (Selektanden) für die 9-*epi*-ZWIX CSP Evaluierung

Für die Optimierung der mobilen Phase der 9-*epi*-ZWIX CSP 864 wurde ein Set von sieben chiralen Analyten herangezogen. Wie in **Abbildung 27** gezeigt, bestand das Set aus fünf Aminosäuren (zwei freie, zwei alpha-methylierte und eine *N*-derivatisierte Aminosäure) sowie aus einem Sulfonsäurederivat und einer Base (Mefloquin). Die mobile Phase enthielt 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin, was in reinem Wasser (Bedingung e) einen pH-Wert von 5,4 ergab. Die Elution erfolgte unter isokratischen Bedingungen und wurde mit einer Flussrate von 0,5 mL/min bei 25,0°C durchgeführt.

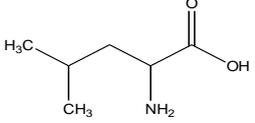
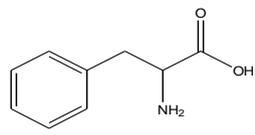
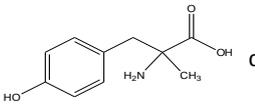
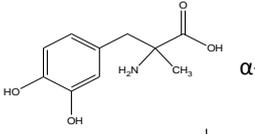
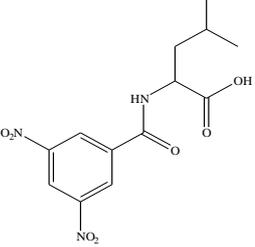
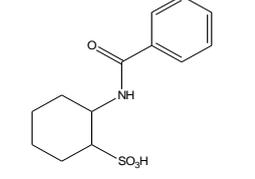
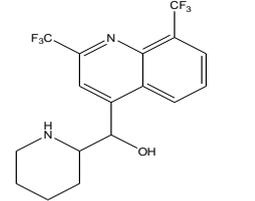
Strukturformel	Symbol	Analyt
	<i>D,L</i> -Leu	<i>D,L</i> -Leucin
	<i>D,L</i> -Phe	<i>D,L</i> -Phenylalanin
	α -Me- <i>D,L</i> -p-Tyr	alpha-Methyl- <i>D,L</i> -p-Tyrosin
	α -Me- <i>D,L</i> -DOPA	<i>D,L</i> -2-Methyl-3(3,4-Dihydroxy Phenyl)alanin
	DNB-Leu	3,5-Dinitro- <i>D,L</i> -Leucin
	Bz-ACHSA	Benzoyl-aminocyclohexan-1-sulfonsäure
	Mfq.	Mefloquine

Abbildung 27: Ausgewählte chirale Analyten für die Optimierung der mobilen Phase für 9-*epi*-ZWIX CSP 864.

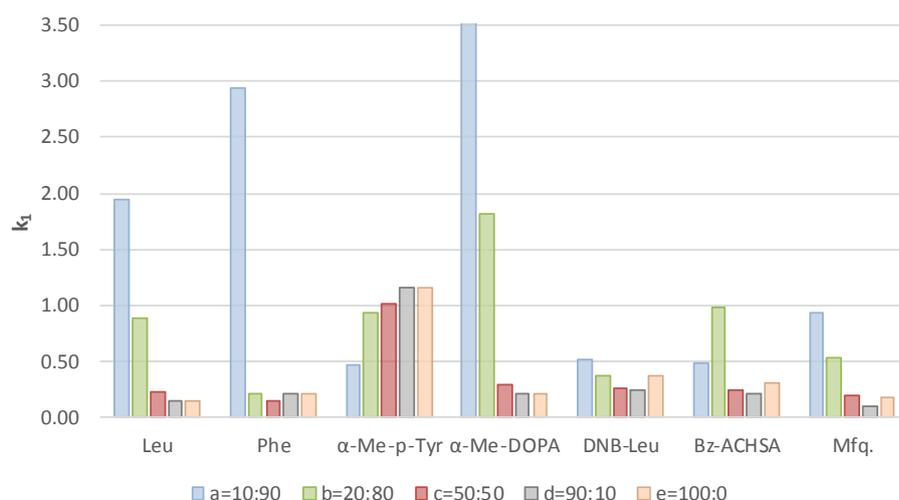


Abbildung 28: Retentionsfaktor k_1 bei 9-*epi*-ZWIX CSP 864

Aus **Abbildung 28** ist ablesbar, dass der Retentionsfaktor k_1 mit der Erhöhung des protischen Anteils der mobilen Phase bei jedem Analyten – außer α -Me-*p*-Tyr – abnimmt (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 10**). Wie in der **Abbildung 29** dargestellt, ist eine Trennung der Racemate in die entsprechenden Enantiomere unter Verwendung der mobilen Phasen a-e (**Tabelle 3**) nicht gelungen. Der basische Analyt Mefloquin wird bis zu einem MeOH-Anteil von 20% etwas angetrennt. Die Selektivitätswerte von DNB-Leu über $\alpha=1$ sind auf die Kombination von ionischen- und π - π Wechselwirkungen des π -sauren aromatischen Rings von DNB und des elektronenreichen (π -basischen) Chinolinrings des Selektors zurückzuführen²².

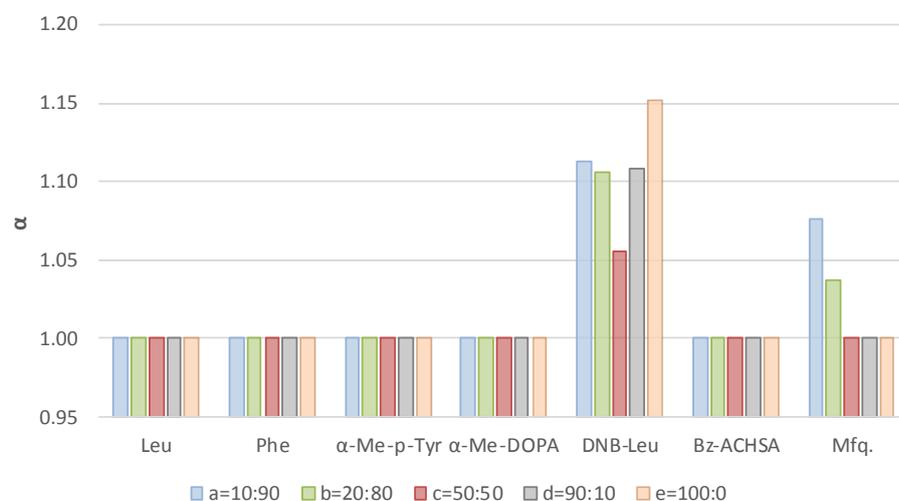


Abbildung 29: Selektivitätswerte bei 9-*epi*-ZWIX CSP 864

Eine weitere Versuchsserie mit analoger mobiler-Phasen-Zusammensetzung wie in **Tabelle 3**, jedoch in Anwesenheit von jeweils zwei Prozent Wasser (**Tabelle 4**), ergab für dieselben Analyten ähnliche Retentionszeiten sowie schlechtere Selektivitätswerte.

Tabelle 4: Wasserhältige mobile Phasen für 9-*epi*-ZWIX CSP 864

Bedingung	MeOH%	ACN%	H ₂ O%	Ameisensäure mM	Diethylamin mM
f	9,8	88,2	2	50	25
g	49	49	2	50	25
h	88,2	9,8	2	50	25

III.III.I.III Dipeptide für die 9-*epi*-ZWIX CSP Evaluierung

Um festzustellen, ob die Epimerisierung des Selektors am C9 eine markante Änderung der Erkennungsmechanismen und somit eine schlechte bzw. keine chirale Trennung bewirkt – oder es grundsätzlich an der Analytstruktur liegt – wurde dieselbe 9-*epi*-ZWIX CSP 864 unter Bedingung **g** mit einem Set von längeren Verbindungen (z.B. Peptiden) getestet.

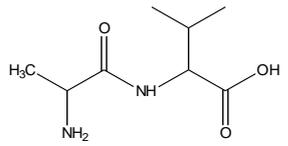
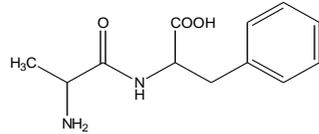
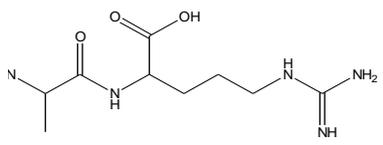
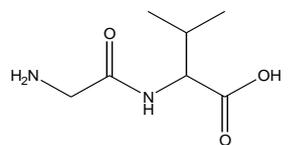
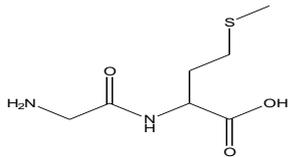
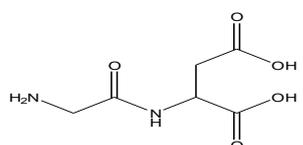
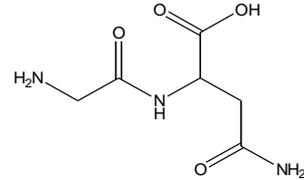
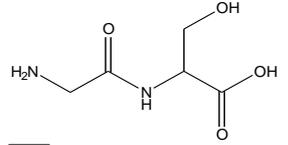
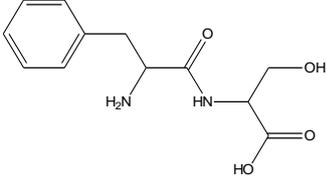
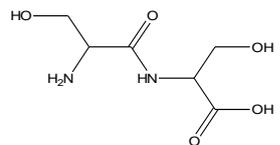
Strukturformel	Symbol	Analyt
	Ala-Val	Alanin-Valin
	Ala-Phe	Alanin-Phenylalanin
	Ala-Arg	Alanin-Arginin
	Gly-Val	Glycin-Valin
	Gly-Met	Glycin-Methionin
	Gly-Asp	Glycin-Asparaginsäure
	Gly-Arg	Glycin-Asparagin
	Gly-Ser	Glycin-Serin
	Phe-Ser	Phenylalanin-Serin
	Ser-Ser	Serin-Serin

Abbildung 30: Ausgewählte Dipeptide zur Optimierung der mobilen Phase für 9-*epi*-ZWIX CSP 864

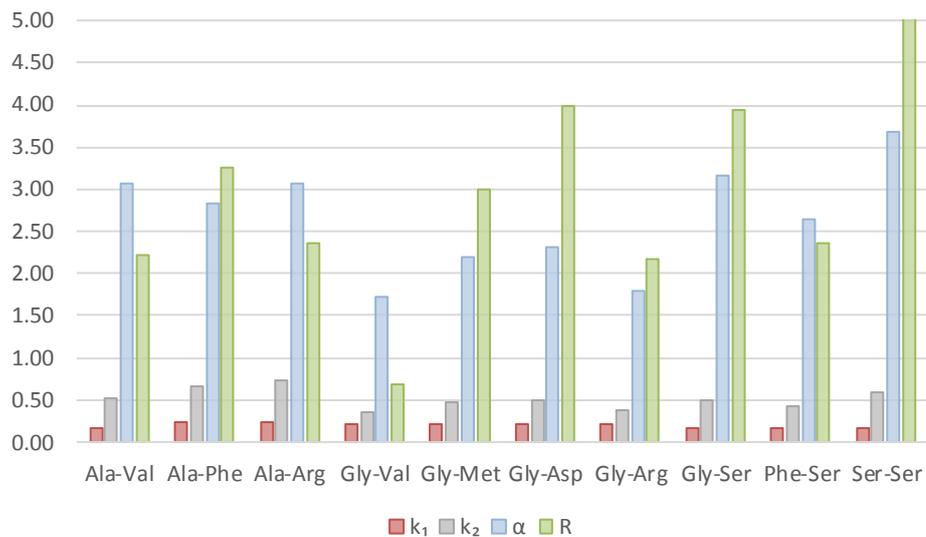


Abbildung 31: Chromatographische Parameter für Dipeptide unter Bedingung g bei 9-*epi*-ZWIX CSP 864

Die in dieser Betrachtung ausgewählten Dipeptide werden – wie in **Abbildung 31** ablesbar – auf 9-*epi*-ZWIX CSP 864 voneinander sehr gut getrennt; jedoch nicht in die entsprechenden Enantiomere (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 11**).

III.III.I.IV Vergleich von 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (CSP 864) und 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (CSP 860)

Die Selektoren von 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (CSP 864) und 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (CSP 860) sind in **Abbildung 26** dargestellt. Wie schon erwähnt, unterscheiden sich die von trans-2-ACHSA abgeleiteten 9-*epi*-ZWIX CSP (Basis Chinin) durch die unterschiedliche Konfiguration der Aminosulfonsäureseite (siehe auch Seite 41 und 42). Die beiden 9-*epi*-ZWIX CSP wurden anhand von folgenden fünf freien Aminosäuren verglichen.

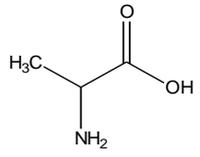
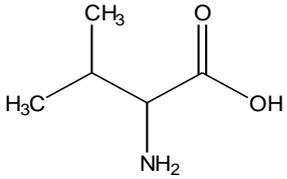
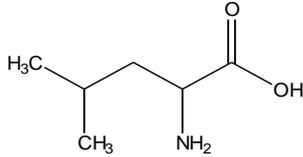
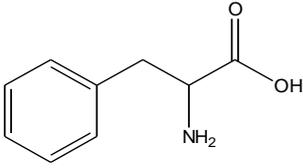
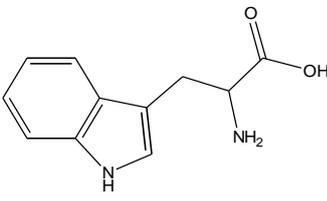
Strukturformel	Symbol	Analyt
	Ala	<i>D,L</i> -Alanin
	Val	<i>D,L</i> -Valin
	Leu	<i>D,L</i> -Leucin
	Phe	<i>D,L</i> -Phenylalanin
	Trp	<i>D,L</i> -Tryptophan

Abbildung 32: Ausgewählte Aminosäuren für den Vergleich von 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (CSP 864) und 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (CSP 860)

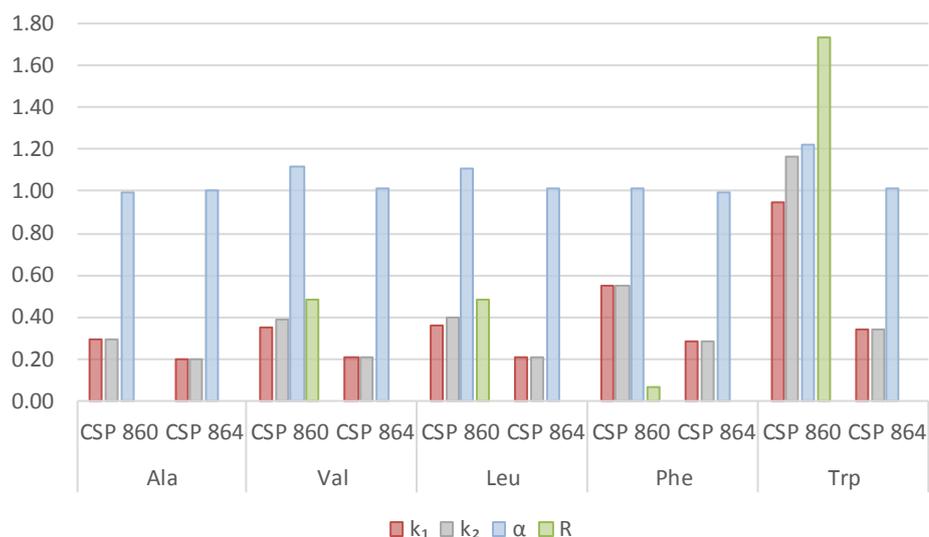


Abbildung 33: Chromatographische Parameter. Vergleich von 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (CSP 864) und 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (CSP 860)

Wie in **Abbildung 33** dargestellt, wurde für Alanin auf beiden 9-*epi*-ZWIX Säulen keine Enantiomerentrennung beobachtet (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 12**). Alle vier anderen Aminosäuren (bzw. deren Enantiomere) wechselwirken zu einem gewissen Grad stereoselektiv mit dem chiralen Selektor von CSP 860, was zumindest zu einer Antrennung der entsprechenden Enantiomere führt. Die größere Flexibilität der Aminosulfonsäureseite der 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA CSP 860 im Vergleich zu 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA CSP 864 ergibt höhere Enantioselektivitäts- und Auflösungswerte – wie in **Abbildung 34** für Tryptophan anhand der jeweiligen Chromatogramme demonstriert.

Der Versuch, *N*-Ac-Trp zu trennen – wobei es zu keiner Molekularerkennung und Wechselwirkung mit der stationären Phase kam – zeigte uns, dass das aromatische Indol-Ringsystem für die Enantioselektivität nicht ausreicht bzw. nicht entscheidend ist. Das Indol-Ringsystem kann jedenfalls nur für eine Wechselwirkung zuständig sein, nicht jedoch ausschließlich für eine enantioselektive Wechselwirkung, da das Indol nicht chiral ist. Die Aminogruppe bei *N*-Ac-Trp ist acetyliert, und kann somit keine ionische Wechselwirkungen mehr eingehen. Eine gerichtete Wasserstoffbrückenbindung der Amidgruppe von Ac-Trp wäre theoretisch denkbar, ist jedoch offensichtlich nicht aktiv, was zu einem Verlust der Enantioselektivität führt. Dies ist ein Gegensatz zur ZWIX(+) Säule.

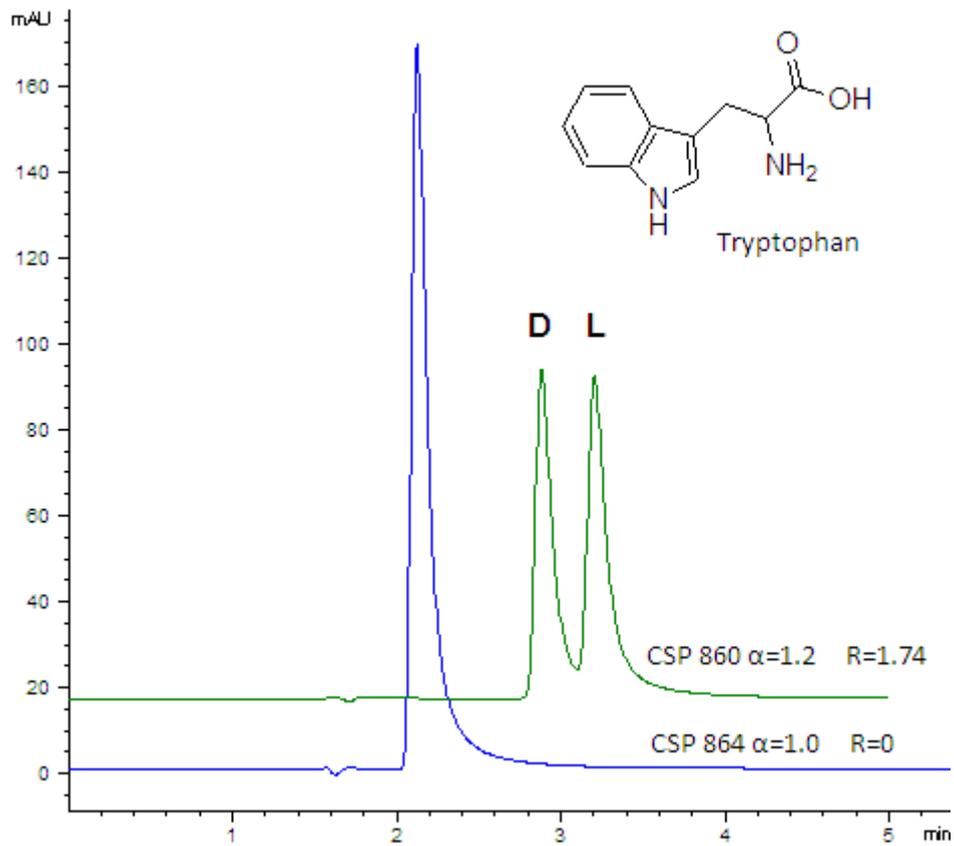


Abbildung 34: Enantiomerentrennung der freien Aminosäure Tryptophan auf 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (grün, CSP 864) und 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (blau, CSP 860)

Die Elutionsreihenfolge von 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA beobachtet für Trp (*D* vor *L*) und Leu (*L* vor *D*) entspricht der ZWIX(+)-Säule, welche von Chinin abgeleitet ist.

IV Racemisierungsreaktionen

Louis Pasteur²⁸ beschrieb die Racemisierung als Übergang optisch aktiver Stoffe zum entsprechenden Racemat, d.h. die Umwandlung von einem Enantiomer in ein racemisches Gemisch, das folglich beide Enantiomere im Verhältnis 1:1 enthält. Die Beobachtung und Erforschung der Racemisierung liefert wichtige Hinweise nicht nur zur Erklärung vieler chemischer Reaktionsmechanismen und der Analyse chiraler Substanzen – wie z.B. Aminosäuren, Peptide oder Nucleinsäuren – sondern auch für das Verständnis von asymmetrischen Synthesewegen und enantioselektiven Prozessen. Darüber hinaus ist die Racemisierung wirtschaftlich von großer Bedeutung, da diverse synthetische Medikamente industriell als Racemate hergestellt werden, wobei nach Isolierung des gewünschten Enantiomers (sogenanntes Eutomer) die unerwünschte Hälfte des Produkts (Distomer) nicht verworfen werden muss, sondern einer Racemisierung unterworfen werden kann.

Die Racemisierungsmethoden unterscheiden sich in Zeit, Temperatur, pH-Wert und Katalysatorzusammensetzung. Von Bedeutung sind auch die Methoden, die über *in situ* fraktionierte Kristallisation funktionieren²⁹. Voraussetzung für eine erfolgreiche Racemisierung ist das Vorhandensein von einem Wasserstoffatom am α -Kohlenstoffatom. Yamada et al.³⁰ publizierten eine nützliche Racemisierungsmethode für α -Aminosäuren, die unter Bildung einer Schiff'schen Base verläuft (siehe **Abbildung 35**):

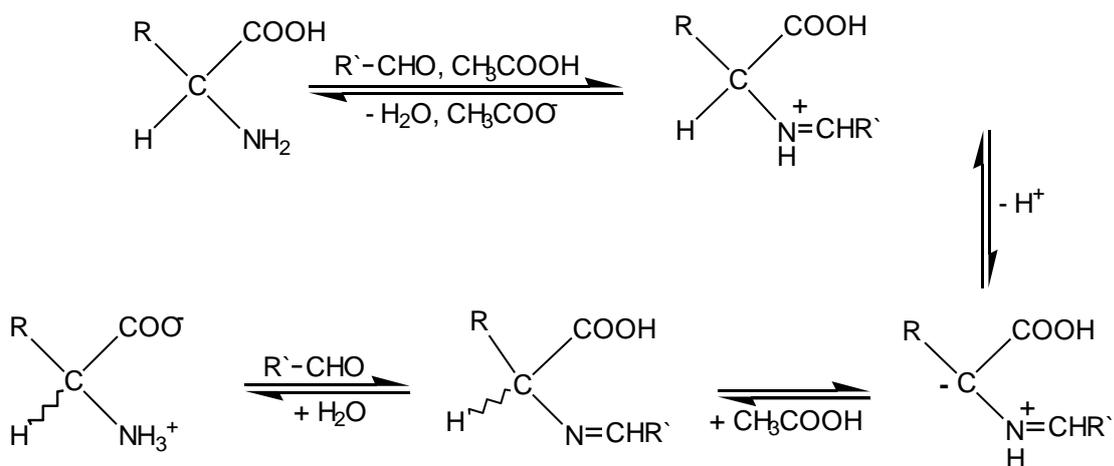


Abbildung 35: Racemisierungsreaktion von α -Aminosäuren nach Yamada et al.³⁰

Die Reaktion ist vergleichsweise einfach, gut zugänglich und wurde zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus auch mit Deuterium-markierten α -Kohlenstoffatomen von α -Aminosäuren durchgeführt³¹. Zunächst kondensieren die Aminogruppe der jeweiligen Aminosäure und ein Aldehyd zur entsprechenden Schiff'schen Base. Danach kommt es unter Berücksichtigung der Keto-Enol-Tautomerisierung zur De- und Reprotonierung der Schiff'schen Base³². Als Katalysator, welcher im letzten Schritt der Reaktion wieder abgespalten wird, stellte sich Salicylaldehyd als sehr geeignet für die Bildung der Schiff'schen Base dar^{30,31}. Die Umsetzung von Aminosäuren mit Aldehyden ist ein weit erforschtes Feld, das im Vergleich zu anderen Racemisierungsmethoden (z.B. thermischer Racemisierung) schneller und milder ist. Auch die geringe Zahl von potentiellen Nebenreaktionen ist von Vorteil (Substanzwiedergewinnung: 70-100%)³³.

IV.I Racemisierung von Aminosäuren

IV.I.I N-Methyl-Aminosäuren

Für die Racemisierung der Aminosäuren wurden zwei unterschiedliche Racemisierungsmethoden (sauer und basisch) mit verschiedenen Parametern verwendet (siehe **Tabelle 5**).

Tabelle 5: Parameter für die Racemisierung diverser Enantiomere von Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten

Startverbindung	[mg]	Salicylaldehyd [μ L]	Essigsäure [mL]	0,1M NaOH [μ L]	Temp. [°C]	Zeit [h]
L-Phe	200	30	9,4	/	100	1
N-Me-L-Phe	200	30	9,4	/	100	24
N-Me-L-Ala	30	4,5	1,41	/	100	1
N-Me-L-Leu	1	5	1	/	100	24
N-Me-L-Val	1	5	1	/	100	24
3-Nitro-L-Tyr	200	30	9,4	/	100	1
3,5-Dinitro-L-Tyr	30	4,5	1,41	/	100	1
L-Phe	10	/	/	100	60	24
N-Me-L-Phe	21	/	/	600	60	24

Unter Bezugnahme auf Yamada³⁰ und Lämmerhofer^{30,31} wurden zunächst L-Phenylalanin, N-Methyl-L-Phenylalanin und 3-Nitro-L-Tyrosin in Essigsäure mit katalytischen Mengen an Salicylaldehyd racemisiert. Der Erfolg der

Racemisierung wurde separat mittels ZWIX Säulen (siehe **Abbildung 36**) überprüft.

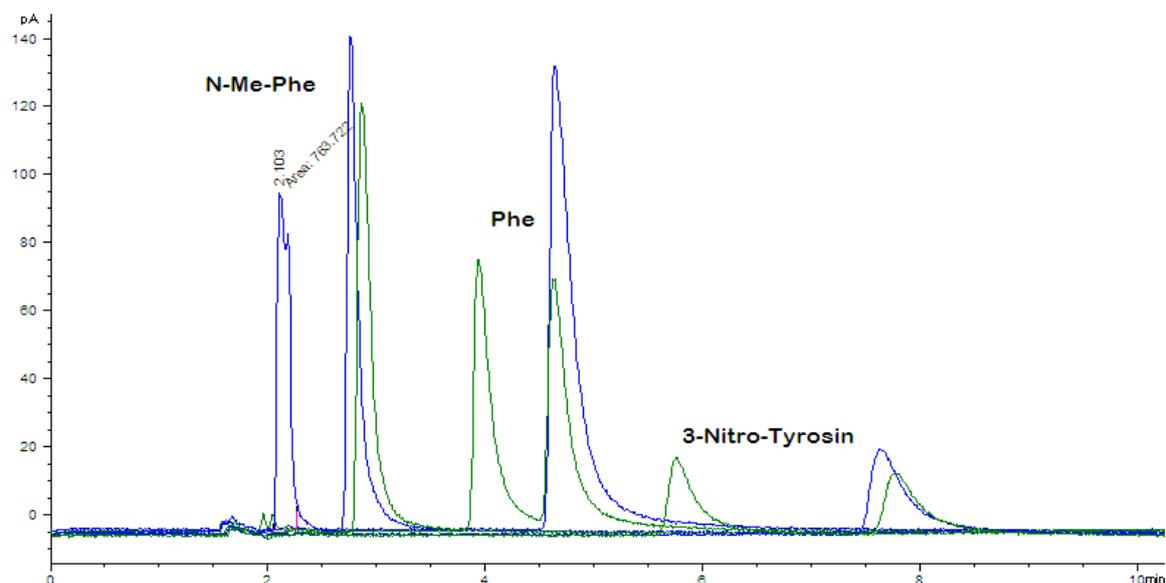


Abbildung 36: Chromatogramm zur Reaktionskontrolle der Racemisierungen. Analyten: *L*-Phenylalanin, *N*-Methyl-*L*-Phenylalanin und 3-Nitro-*L*-Tyrosin, Säule: ZWIX(-), Temperatur 25°C; mobile Phase MeOH/ACN/H₂O 49/49/2 (v/v/v), 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin, Flussgeschwindigkeit 0,5 mL/min.; Detektionswellenlänge 254 nm; blau: Enantiomere (Ausgangssubstanzen); grün: die jeweiligen Racemate

Aus **Abbildung 36** ist eindeutig ablesbar, dass die saure Racemisierung (siehe VII.V.1 *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung von Racemisierungsreaktionen in saurem Milieu (AAV1)*) für *L*-Phenylalanin und 3-Nitro-*D,L*-Tyrosin erfolgreich war, jedoch für *N*-Me-*L*-Phenylalanin war das Ergebnis zunächst unklar ob der unzureichenden Enantiomerentrennung. Da die *L*-Verbindung als Salz vorliegt, wird der Peak bei 2.1 min im Falle von *N*-Me-*L*-Phe dem jeweiligen Hydrochlorid zugeordnet. Während der Racemisierung bzw. nach der Aufarbeitung sollte der Peak jedoch verschwinden.

Bezüglich ihrer Struktur unterscheiden sich *L*-Phenylalanin und *N*-Me-*L*-Phenylalanin nur am Stickstoffatom, wobei bei *N*-Me-*L*-Phe ein Wasserstoffatom der Aminogruppe durch eine Methylgruppe ersetzt ist. Dies ist wahrscheinlich der Grund für die mögliche Aufhebung der Wasserstoffbrücken zwischen dem Analyten und dem Selektor der CSP.

Um die Racemisierbarkeit von *N*-Methyl-Aminosäuren weiter zu studieren und überprüfen zu können, ob es ein fundamentales Problem bei *N*-Methyl-*L*-Phe

gibt, wurden weitere *N*-Me-Aminosäuren wie etwa *N*-Me-*L*-Alanin, *N*-Me-*L*-Valin und *N*-Me-*L*-Leucin unter sauren Bedingungen racemisiert.

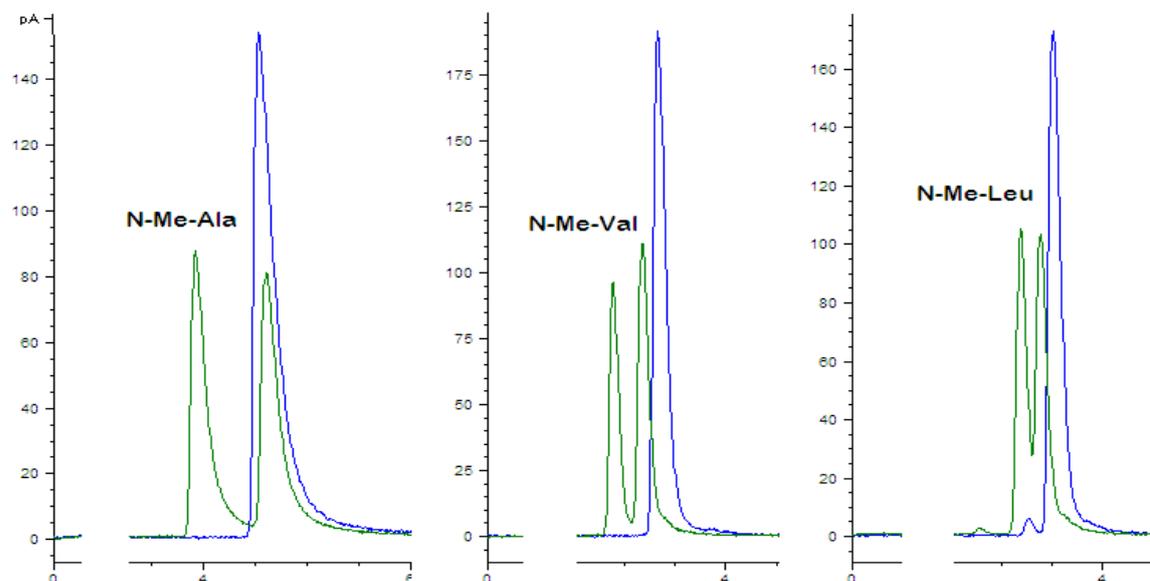


Abbildung 37: Chromatogramme zur Kontrolle der Racemisierungen von *N*-Me-Ala, *N*-Me-Val und *N*-Me-Leu. Säule ZWIX(+), Temperatur 25°C; mobile Phase MeOH/ACN/H₂O 49/49/2 (v/v/v), 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin, Flussgeschwindigkeit 0,5 mL/min.; Detektionswellenlänge 254 nm; blau: jeweiliges Enantiomer; grün: racemische Mischung

Die Chromatogramme in **Abbildung 37** zeigen für alle drei Versuche eine anschauliche Racemisierung. Der prozentuale Enantiomerenanteil für *N*-Me-Ala liegt bei 50:50; für *N*-Me-Val bei 44:56 und für *N*-Me-Leu bei 47:53, wie in **Tabelle 6** dargestellt. Ein Racemisierungsvergleich mit den entsprechenden Referenzverbindungen zeigte ähnliche prozentuale Enantiomerenanteile.

Tabelle 6: Ergebnisse der Racemisierung und Vergleich der Peakflächen

Produkt	ZWIX(+) Elutionsreihenfolge	ZWIX(-) Elutionsreihenfolge	Racemisierung [%] gemessen mit ZWIX(+)
<i>D,L</i> -Ala	<i>L</i> vor <i>D</i>	<i>D</i> vor <i>L</i>	
<i>D,L</i> -Val	<i>L</i> vor <i>D</i>	<i>D</i> vor <i>L</i>	
<i>D,L</i> -Leu	<i>L</i> vor <i>D</i>	<i>D</i> vor <i>L</i>	
<i>D,L</i> -Phe	<i>L</i> vor <i>D</i>	<i>D</i> vor <i>L</i>	51:49
3-Nitro- <i>D,L</i> -Tyr	<i>L</i> vor <i>D</i>	<i>D</i> vor <i>L</i>	51:49
<i>N</i> -Me- <i>D,L</i> -Ala	<i>D</i> vor <i>L</i>	<i>L</i> vor <i>D</i>	50:50
<i>N</i> -Me- <i>D,L</i> -Val	<i>D</i> vor <i>L</i>	<i>L</i> vor <i>D</i>	44:56
<i>N</i> -Me- <i>D,L</i> -Leu	<i>D</i> vor <i>L</i>	<i>L</i> vor <i>D</i>	47:53
<i>N</i> -Me- <i>D,L</i> -Phe	<i>D</i> vor <i>L</i>	/	43:57

Es lässt sich zu diesem Zeitpunkt zusammenfassen, dass sich alle untersuchten Verbindungen gut bis sehr gut racemisieren ließen, wenngleich die Analytik von *N*-Me-*D,L*-Phe zunächst Schwierigkeiten bereitete.

Als Alternative wurde eine basische Racemisierung für *N*-Me-*L*-Phe und *L*-Phe versucht (siehe VII.V.II *Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung von Racemisierungsreaktionen in basischen Milieu (AAV2)*). Unter basischen Bedingungen sollte die Racemisierung für beide Verbindungen funktionieren, jedoch mit dem Nachteil, dass man diese Methode kaum präparativ durchführen kann. Durch die Abstraktion des α -ständigen H-Atoms wird ein Carbanion gebildet, welches mithilfe der benachbarten Carboxyl-Gruppe stabilisiert wird. Anschließende Protonierung unter sauren Bedingungen sollte das Racemat liefern³⁴.

Jedoch zeigten die erhaltenen Chromatogramme keine signifikante Racemisierung für *N*-Me-*L*-Phe und *L*-Phe. Die stark basischen Bedingungen (pH=13) könnten zur Bildung eines Enolat-Anions führen und somit zu einer Doppelbindung zwischen α -Kohlenstoffatom und Carboxyl-Gruppe. Die sp^2 -hybridisierte Doppelbindung ist hierbei jedoch planar und achiral.

Variationen der relativen Einflussparameter wie Verdopplung der Katalysatormenge, Verkürzung oder Verlängerung der Racemisierungs-Reaktionszeit, Steigerung der Reaktionstemperatur, aber auch Variation der Probenaufarbeitung waren für die Racemisierung von *N*-Me-*L*-Phe erfolglos. Eine HPLC-Analyse von *N*-Me-*L*-Phe auf der chiralen stationäre Phase ZWIX(+) machte schlussendlich eine partielle Racemisierung, wie in **Abbildung 38** dargestellt, erkennbar.

N-Me-*D,L*-Phe

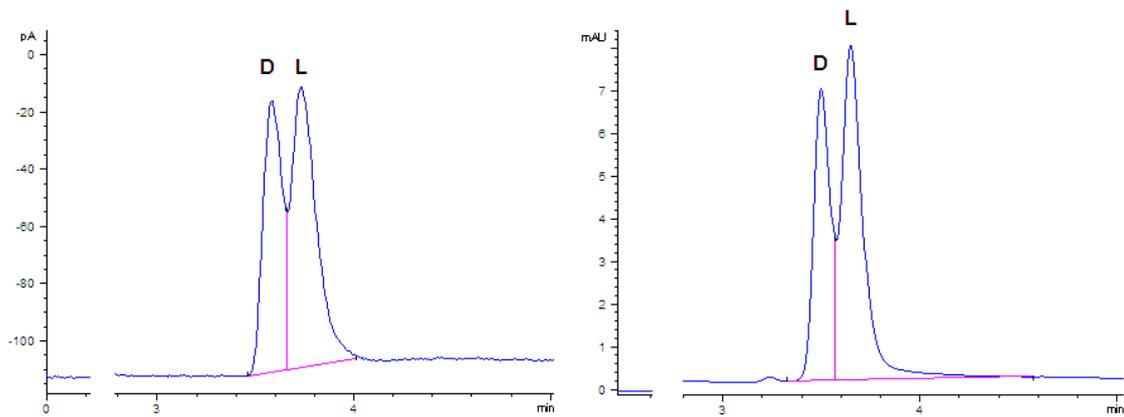


Abbildung 38: Partielle Racemisierung von *N*-Me-*D,L*-Phe. Links Corona-Detektor (CAD), rechts UV-Detektor (DAD, Dioden Array Detector) Säule ZWIX(+), Temperatur 25°C; mobile Phase MeOH/ACN/H₂O 49/49/2 (v/v/v), 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin, Flussgeschwindigkeit 0,5 mL/min.; Detektionswellenlänge für DAD: 254 nm.

IV.I.II *N*-ungeschützte Aminosäuren

Enantiomere von *N*-ungeschützten Aminosäuren lassen sich auf ZWIX(+)- und ZWIX(-)-Säulen aufgrund ihrer Elutionsreihenfolge unterscheiden. Wie in **Abbildung 39** und **Abbildung 40** bemerkbar ist, eluiert auf ZWIX(+) das *L*-Enantiomer vor *D*, während auf ZWIX(-) *D* vor *L* eluiert. Die Umkehr der Elutionsreihenfolge kommt aufgrund des pseudoenantiomeren Verhaltens von Chinin und Chinidin der jeweiligen ZWIX-Selektoren zustande.

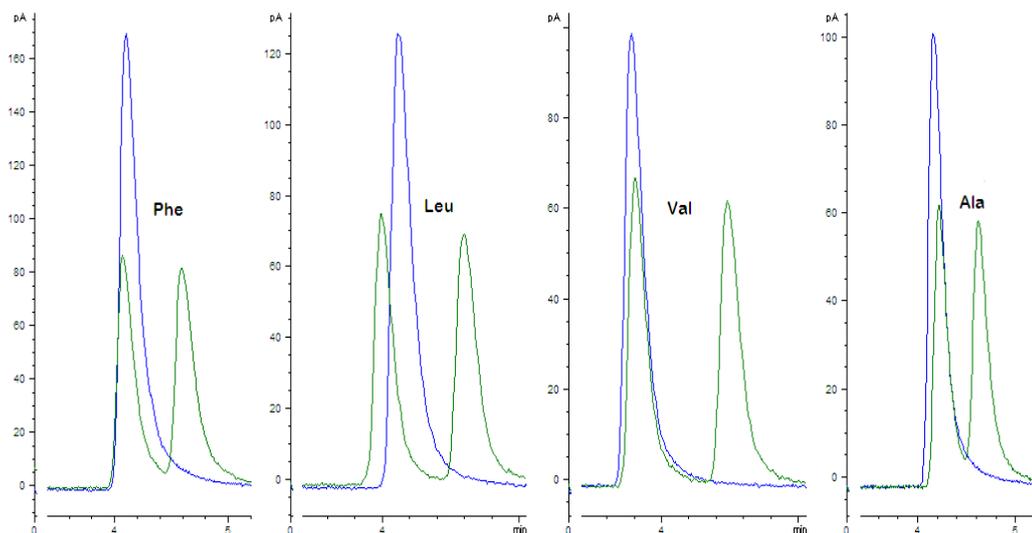


Abbildung 39: Säule ZWIX(+), Temperatur 25°C; mobile Phase MeOH/ACN/H₂O 49/49/2 (v/v/v), 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin, Flussgeschwindigkeit 0,5 mL/min.; Detektionswellenlänge: 254 nm, blau: das jeweilige Enantiomer; grün: das Racemat

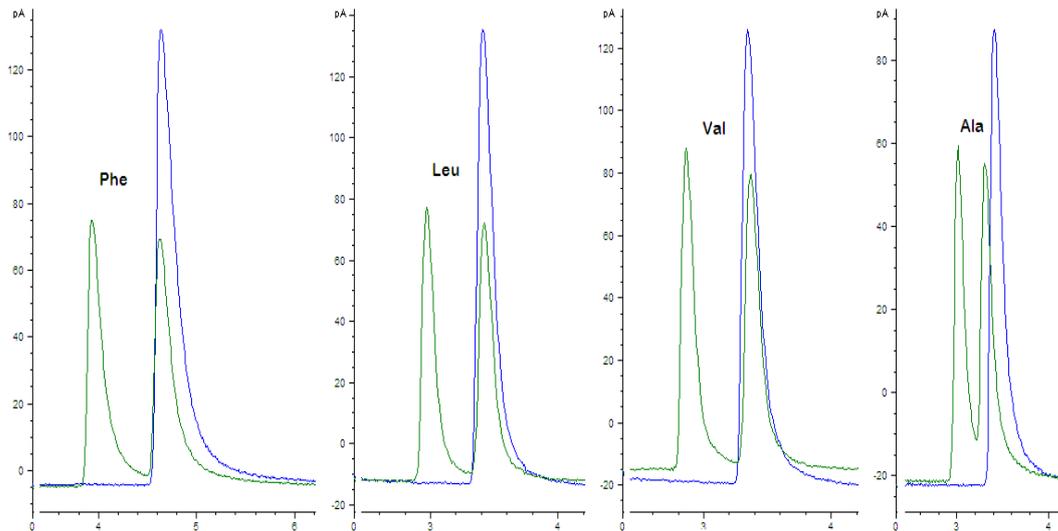


Abbildung 40: Säule ZWIX(-), Temperatur 25°C; mobile Phase MeOH/ACN/H₂O 49/49/2 (v/v/v), 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin, Flussgeschwindigkeit 0,5 mL/min.; Detektionswellenlänge: 254nm, blau: das jeweilige Enantiomer; grün: das Racemat

Vergleicht man **Abbildung 37** und **Abbildung 38** mit **Abbildung 39**, merkt man, dass unter denselben chromatographischen Bedingungen (gleiche mobile und stationäre Phase) die Elutionsreihenfolge von *N*-methylierten und nicht-*N*-methylierten Aminosäuren genau umgekehrt ist, was überraschend ist, da dies ja eine Änderung der SO-SA Bindungschemie bedingt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eindrucksvoll, dass die Racemisierung von aliphatischen Aminosäuren in Essigsäure mit katalytischen Mengen an Salicylaldehyd innerhalb von einer Stunde Reaktionszeit fast vollständig abläuft.

Wie anhand von **Abbildung 36** und **Abbildung 37** erkennbar ist, eluiert das *D*-Enantiomer vor dem *L*-Enantiomer, d.h. die *N*-Methyl Aminosäuren zeigen eine umgekehrte Elutionsreihenfolge gegenüber freien Aminosäuren auf denselben ZWIX-Säulen. Die Erweiterung der Zahl an Analyten mit mehreren *N*-Me-Aminosäuren sicherte das beobachtete Phänomen der Umkehr der Elutionsreihenfolge somit weiter ab und bestätigte dies.

Es sollte noch darauf hingewiesen werden, dass im Vergleich zu ZWIX(+) – wo für alle Verbindungen die Racemisierungsreaktion beobachtbar war – bei ZWIX(-) in allen Fällen außer für *N*-Me-Phe dies ebenfalls der Fall war, d.h. auf ZWIX(-) war es schlichtweg nicht möglich, die Racemisierung für *N*-Me-Phe zu erkennen, da die beiden Enantiomere nicht getrennt wurden.

V Studien zum Einfluss der mobilen Phase in Bezug auf Enantioselektivität, Auflösung und Retentionsverhalten von zwitterionischen CSP`s, ZWIX(+) und ZWIX(-)

Die mobile Phase ist als zweite Haupt-Einflussgröße (neben chiraler stationärer Phase) eine der wichtigsten Faktoren bei enantioselektiver Chromatographie. Eine geeignete mobile Phase-Zusammensetzung ist entscheidend für die Trennung von racemischen Verbindungen und ist von Eluentensystembedingungen (Lösungsmitteltyp) und Zugabe von diversen Additiven abhängig. Mittels Säure-Base-Verhältnis, Typ von Säure/Base-Additiven und Elutionsstärke des Lösungsmittels können die Variabilität und die Anwendbarkeit der zwitterionischen CSPs untersucht und somit Struktur-Trennbeziehungen in Bezug auf Enantioselektivität gemacht werden¹⁸.

Wie schon weiter oben angeführt (siehe **Abbildung 5** *Molekulare Erkennung – chirale Wechselwirkungen zwischen einem zwitterionischen Selektor und einem Dipeptid*), basiert die molekulare Erkennung zwitterionischer CSP`s auf *Cinchona*-Alkaloid-Basis auf der simultanen Doppelionenpaarbildung als primäre und dominierende Wechselwirkung zwischen SO und SA. Dieser auf elektrostatische Wechselwirkungen basierte Erkennungsmechanismus stellt den außergewöhnlichen, sogenannten „intramolekularen Gegenion-Effekt“ (intramolecular counter-ion, IMCI) dar, welcher gesonderten Einfluss sowohl auf Enantioselektivität und Auflösung als auch Retention hat. Darüber hinaus kann der IMCI-Effekt bei zwitterionischen CSP`s Untersuchungen auf verschiedenartige Elutionssysteme mit geringeren Mengen an mobile Phase-Additiven oder gänzlich additivfreie Elutionsbedingungen ermöglichen.

Zusätzlich haben Hoffman et al.¹⁸ gezeigt, dass die zwitterionischen CSP`s auch unter Umkehrphasen-Bedingungen (Reversed Phase, RP) erfolgreich genutzt werden können, jedoch ändert sich der ausgeprägte Retentionsmechanismus unter diesen Bedingungen und ein Misch-Modus wird zur Erklärung der Trennung herangezogen – ein Ionenaustauscher/RP-Retentionsmechanismus wäre möglich. Diesbezüglich sollten die zumeist eingesetzten Elutionsmittel (bulk solvents) – insbesondere protische Elutionsmittel – sehr wichtig sein und hierbei

wäre eine Erweiterung der Untersuchungen für zwitterionische CSP's im Zwitterionenaustauscher-Modus (ZX) unter wässrigen und hydroorganischen Elutionsbedingungen von großem Interesse.

Die folgenden Studien fokussieren sich daher auf den Einfluss der unterschiedlichen mobilen Phase-Zusammensetzungen auf *Cinchona*-Alkaloid-basierte zwitterionische CSP's und wurden alle im ZX-mobile-Phase-Modus durchgeführt. Zielanalyten sind allesamt zwitterionische Aminosäuren, dargestellt in **Abbildung 41**.

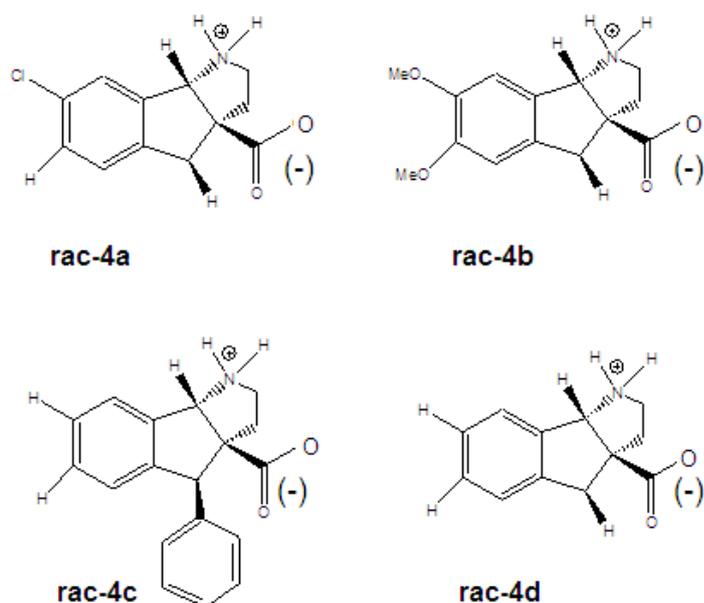


Abbildung 41: Zielanalyten für die Einflussstudien zur mobilen Phase-Zusammensetzung

Wie in **Abbildung 41** gezeigt, sind alle Verbindungen nicht-proteinogene, cyclische β -Aminosäuren. Alle vier Strukturen enthalten einen aromatischen Ring und außer rac-4d sind alle Analyten substituiert: die zwei ersten am Aromat-Ring, während die dritte Verbindung zwei Aromat-Einheiten enthält. Abgesehen von rac-4d sind die drei ersten sehr lipophile (= hydrophobe) Verbindungen. Das chromatographische Verhalten dieser Verbindungen wurde zunächst in vier mobilen Phasen unterschiedlicher Zusammensetzung auf ZWIX(+) und ZWIX(-) (**Tabelle 7**) untersucht.

Tabelle 7: Unterschiedliche mobile Phase-Zusammensetzungen für den Analyten rac-4b

Mobile Phase	Methanol (%)	Acetonitril (%)	Wasser (%)	Additive
a	49	49	2	50 mM FA, 25 mM DEA
b	49	49	2	/
c	45	45	10	/
d	50	50	/	/

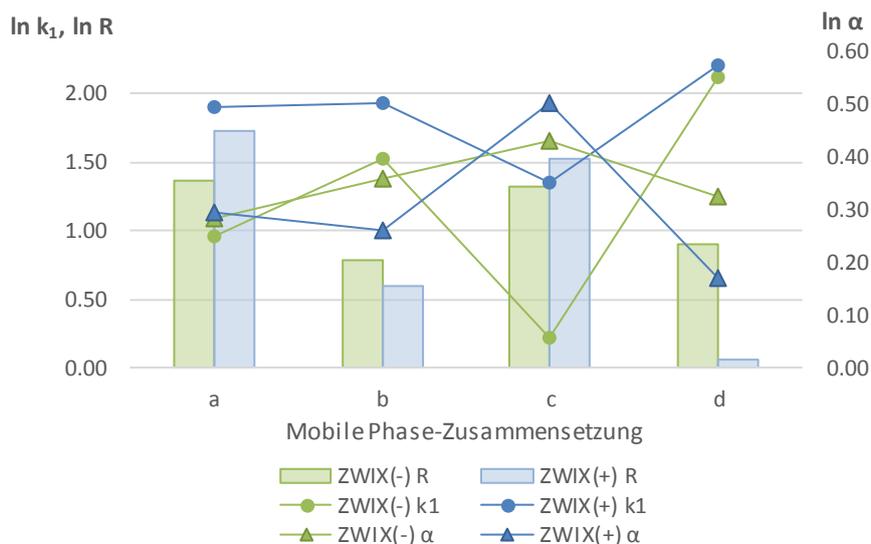


Abbildung 42: Einfluss von unterschiedlichen mobile Phasen-Zusammensetzungen auf das chromatographische Verhalten bei zwitterionischen CPS's ZWIX(+) (blau) und ZWIX(-) (grün) für den Analyten rac-4b

Wie in der **Abbildung 42** für die Verbindung rac-4b bemerkbar ist, ergaben die mobile Phase-Zusammensetzungen a und c auf beiden ZWIX-Säulen höhere Auflösungs- und niedrigere Retentionswerte, während die höchste Selektivität bei MP c (MeOH/ACN/H₂O 45:45:10) erreicht wurde (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 16**). Bei einer MP bestehend aus Methanol und Acetonitril ohne Wasser und ohne Additive (= MP d) retardierte der Analyt am längsten. Beide Säulen lieferten eine Basislinientrennung bei MP a und c im Vergleich zu MP b und d. Die Präsenz von Wasser in der mobilen Phase bewirkte für die Verbindung rac-4b eine deutlich kürzere Retention und überraschenderweise höhere Enantioselektivität.

Die Abwesenheit von Additiven in dem hier untersuchten System hat für den Analyten rac-4b geringere Effekte als der Wasseranteil, der von großer Bedeutung zu sein scheint. Das erste Verhalten kann dem oben definierten IMCI-Effekt zugeschrieben werden, während das zweite eine Besonderheit ist und daher in den folgenden Experimenten genauer betrachtet wurde: MP-Zusammensetzungen Wasser in Methanol/Acetonitril (1:1) und Wasser in Methanol. Der Wasseranteil in beiden additivfreien mobilen Phasen lag in einem Bereich von null bis 20%.

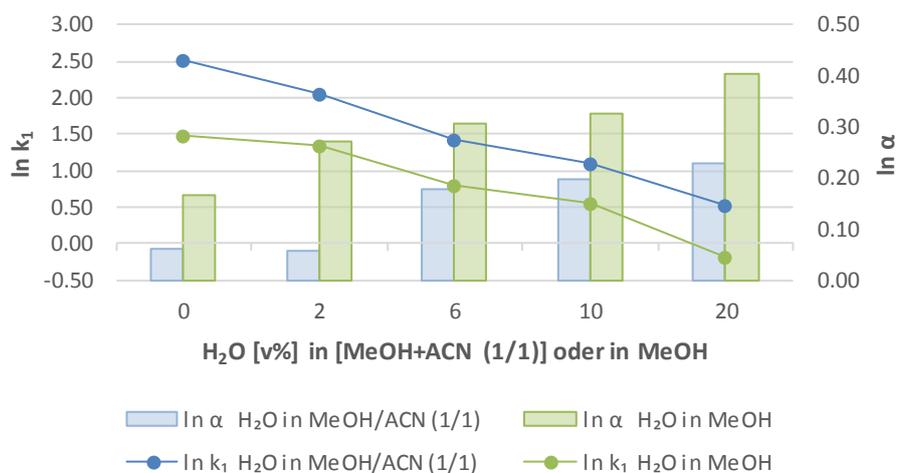


Abbildung 43: Einfluss des Wassergehalts bei additivfreien mobilen Phasen bestehend aus Methanol/Acetonitril (1:1) (blau) und reinem Methanol (grün) in Bezug auf Retention (grüne und blaue Linien) und Selektivität (Balken) für den Analyten rac-4a auf ZWIX(-)

Die Retention von rac-4a auf ZWIX(-) sank signifikant mit der Wasserzunahme in der mobilen Phase (siehe **Abbildung 43**). Der gleiche Effekt trat bei beiden MP-Zusammensetzungen auf, dennoch ist für die mobile Phase ohne Acetonitril die Retention kürzer und Selektivität höher. Dies stimmt mit dem oben vorgewiesenen Verhalten von rac-4b (**Abbildung 42**) überein. Ähnliches wurde für die drei weiteren Analyten (rac-4b, rac-4c und rac-4d) bei beiden MP-Zusammensetzungen beobachtet (Daten sind hier nicht explizit gezeigt, siehe Anhang: **Tabelle 14** und **Tabelle 17**).

Mit der Erhöhung des Wassergehalts in der mobilen Phase wird der zwitterionische Analyt verstärkt solvatisiert¹⁸. Vermutlich verringert eine starke Solvatisierung die ionische Wechselwirkung zwischen SO und SA, was zu kürzeren Retentionszeiten führt. Obwohl eine Retentionsverkürzung nicht immer automatisch einer Selektivitätsverschlechterung proportional ist, ist es in Bezug auf die molekulare Erkennung unklar, wie es zu höheren Selektivitätswerten kommt, da die Solvatisierung eine Desorientierung der zusätzlichen SO-SA-Wechselwirkungen verursachen könnte.

Um bei diesen Untersuchungssystemen den dominierenden Retentionsmechanismus zu verdeutlichen, wäre es interessant zu prüfen, was bei sehr hohem Wassergehalt passiert und ob der gleiche Trend bei MeOH in aprotischem ACN bzw. H₂O in ACN besteht.

V.I Einfluss von häufig eingesetzten Elutionsmitteln (Bulk Solvents) – in additivfreier mobile Phase – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)

Für Anionenaustauscher^{35, 36}, Kationenaustauscher^{3, 37} und Zwitterionenaustauscher^{18, 38} CSP`s auf der Basis von *Cinchona*-Alkaloiden sind in der Literatur zahlreiche Studien über Elutionsmittelgemische (MeOH/ACN) mit Aspekt auf die Enantiomerentrennung zu finden. Im Vergleich zu diesen Studien, welche in Anwesenheit von Additiven (Säure (AX-Modus), Base (CX-Modus), oder Säure/Base (ZX-Modus)) durchgeführt worden waren, wurden die folgenden drei Untersuchungen „MeOH in ACN“, „H₂O in MeOH“ und „H₂O in ACN“ in pufferfreier MP im ZX-Modus in Anwesenheit von H₂O durchgeführt.

ACN und MeOH sind die am häufigsten eingesetzten Elutionsmittel für zwitterionische CSP`s in nicht wässrigen, polar-organischen Systemen. ACN als aprotisches Lösungsmittel ist bekannt für die Fähigkeit zum Brechen von aromatischen π - π Wechselwirkungen und für die Verstärkung von H-Brücken, während hingegen MeOH als protisches Lösungsmittel π - π -Bindungen verstärkt und H-Bindungen bricht. Für die Optimierung der mobilen Phase-Zusammensetzung wurde eine „Titrationskurve“ in Zehnerprozentschritten gemessen, wobei der ACN-Anteil stetig zunahm. Um alle gemessenen Daten darstellen zu können ist die Ordinate für Retention auf 3.5 umgestellt (im Kontrast zu anderen Studien bei denen sie 2.5 ist).

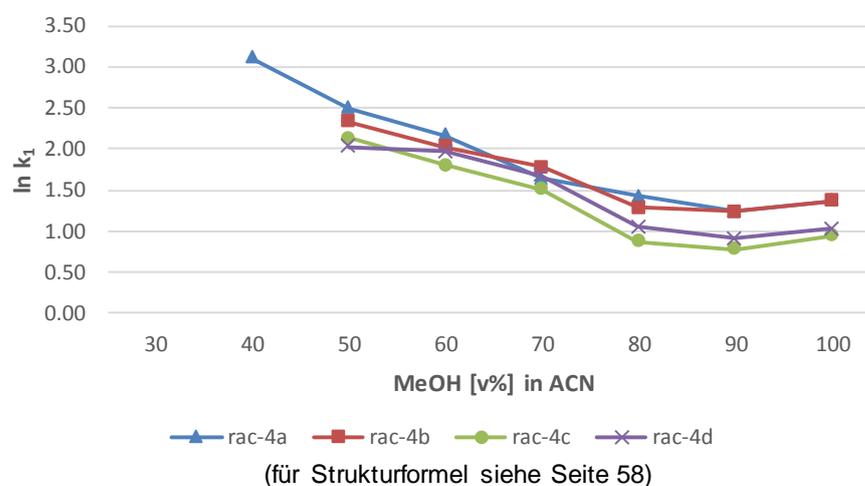


Abbildung 44: Einfluss von MeOH in ACN (ACN-MeOH Mischungen ohne Additive) auf Retention $\ln k_1$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(-)

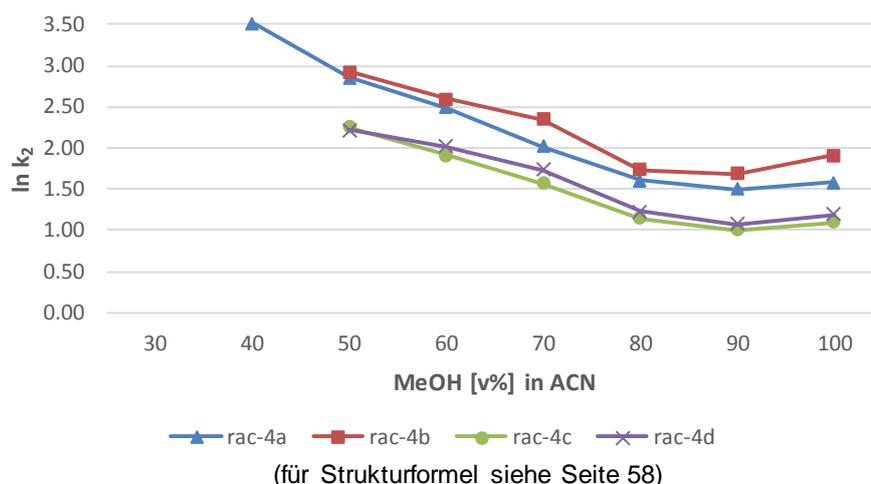


Abbildung 45: Einfluss von MeOH-Anteil (ACN-MeOH Mischungen ohne Additive) auf Retention $\ln k_2$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(-)

Wie in **Abbildung 44** und **Abbildung 45** demonstriert, wurden die Messungen wegen enormer Elutionszeiten nur bis max. 60 min. durchgeführt. Weiters ist aus den beiden obigen Abbildungen ablesbar, dass sich die Retentionsfaktoren k_1 und k_2 mit Zunahme an Methanol verkürzten. Die Selektivität und Auflösung verfolgten keinen definierbaren Trend, jedoch sind sie für alle vier Analyten am höchsten bei 70-80% MeOH (Daten sind nicht dargestellt, siehe Anhang: Tabelle 15 Tabelle 15 und Tabelle 16 Tabelle 16). Generell verursachte der hohe Acetonitril-Gehalt in MeOH kleiner-werdende und breitere nicht-basisliniengetrennte Peaks sowie extrem lange Retentionszeiten der Analyten (z.B. eluierte bei 60% ACN in MeOH das erste Enantiomer der Verbindung rac-4a bei 38.5 min., das zweite erst bei 56.8 min.). Wichtig: aufgrund der hohen Polarität lösen sich die Analyt-Verbindungen bei einer mobilen Phase reich an ACN (z.B. 10% MeOH und 90% ACN) nicht mehr ausreichend und fallen daher möglicherweise am oberen Teil der Säule aus. Generell scheint die Anwesenheit von protischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase essenziell für den ZX-Modus bei zwitterionischen CPS's zu sein.

Vergleicht man **Abbildung 43** und **Abbildung 44** miteinander, erkennt man, dass ca. 2% Wassergehalt in 49% MeOH/49% ACN in etwa einem 70% MeOH-Gehalt in 30% ACN entspricht. Daraus kann abgeleitet werden, dass 2% Wasser ca. 40% MeOH entsprechen. Das hieße, dass Wasser eine 20-fach höhere „Elutionskraft“ als MeOH in den hier untersuchten Ionenaustauschsystemen hat

und somit ein kleiner Wasseranteil in der mobilen Phase bzw. der stagnierenden mobilen Phase in den Poren einen großen Effekt auf die Retention verursachen könnte. Diese Abschätzungen bekräftigt der ähnliche Verlauf von Wasser in MeOH, wobei die Retentionszeiten noch niedriger waren (**Abbildung 43**).

Um diese Einschätzungen zumindest ansatzweise zu bestätigen, sollte geprüft werden, was bei sehr hohem Gehalt an Wasser in MeOH und Wasser in Acetonitril passiert – und danach ganz pragmatisch die ZWIX(-) Versuchsreihen mit der ZWIX(+) Säule zu wiederholen.

V.I.I Einfluss von Wasser – in additivfreier mobiler Phase bestehend aus Methanol – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)

Der Einfluss des Wassergehalts in der mobilen Phase bestehend aus Methanol ohne Puffer wurde in einem Bereich von 0, 2, 4, 6 und in Zehner-Schritten bis zu 100% Wasser untersucht.

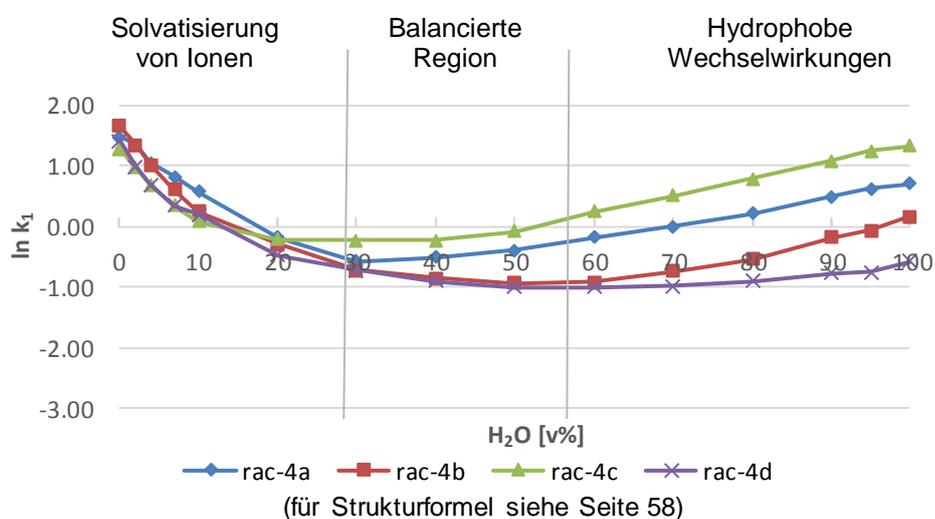


Abbildung 46: Einfluss von Wasser ($H_2O/MeOH$ Mischungen ohne Additive) auf die Retention $\ln k_1$ für alle 4 Analyten bei ZWIX(-)

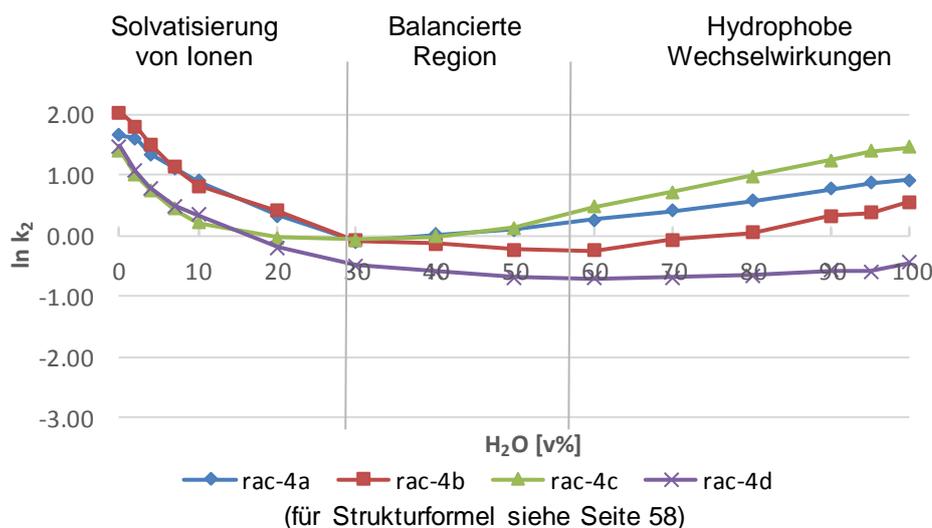


Abbildung 47: Einfluss von Wasser (H₂O/MeOH Mischungen ohne Additive) auf den Retentionsfaktor $\ln k_2$ für alle 4 Analyten bei ZWIX(-)

In **Abbildung 43** (Wasseranteil bis zu 20% in Methanol) als auch in der obigen **Abbildung 46** und **Abbildung 47** ist deutlich ablesbar, dass mit Erhöhung des Wassergehalts bis ca. 30% die Retention für alle Verbindungen stark abfällt. Mit Ausnahme von Verbindung rac-4b, die bei 50% Wasser am längsten retardiert, haben die restlichen Analyten einen minimalen $\ln k_1$ -Wert bei ca. 30% Wasser. Beim Austausch von Wasser mit Methanol kommt es zur Kompensation des stärker polar wirkenden Lösungsmittels Wasser in Bezug auf Wasserstoffbrückenbindungen, was zu Retentionszeit-Verkürzungen führt. Mit der höheren Lipophilie des Methanols gegenüber Wasser kommt es bei einer Wassergehalts-Erhöhung demgegenüber zu einer Retentionszeitverlängerung – wie beispielsweise im Reversed Phase Trennmodus – und zwar fallen unter 60 bzw. 50% Methanol die Retentionszeiten kontinuierlich für alle vier Verbindungen ab. Ein ähnlicher Verlauf ist für die $\ln k_2$ -Werte zu beobachten (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 17** und **Tabelle 18**).

Vergleicht man die $\ln k_1$ - oder $\ln k_2$ -Werte von 10% Methanol in H₂O gegenüber 10% Wasser in MeOH bzw. reinem Methanol gegenüber reinem Wasser, merkt man, dass die Verbindung rac-4c höhere Retentionszeiten bei 10% MeOH in H₂O bzw. reinem Wasser aufweist. Der Grund dafür könnte die Struktur der Verbindung rac-4c sein, die eine Aromat-Einheit enthält, was die Verbindung rac-

4c im Vergleich zu den drei anderen untersuchten Analyten deutlich hydrophober macht.

Die Selektivitätskoeffizienten α , die in der folgenden **Abbildung 48** angegeben sind, werden bei Wassergehalts-Erhöhung immer größer und erreichen ein Maximum bei 40-50% Wasser, um dann wieder kontinuierlich zu sinken. Dieses Verhalten harmoniert am besten mit $\ln k_1$ - und $\ln k_2$ -Werten, die in diesem Bereich sehr niedrig sind.

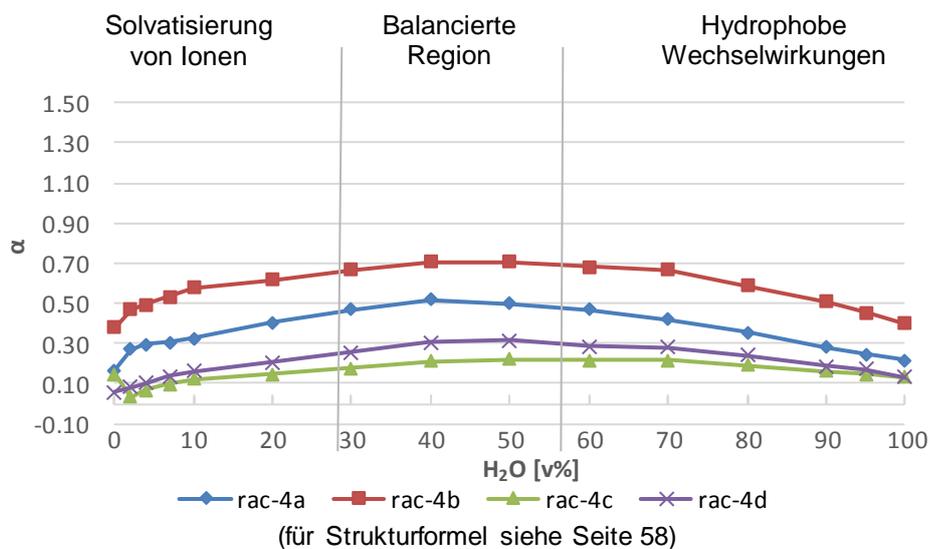


Abbildung 48: Einfluss von Wasser ($H_2O/MeOH$ Mischungen ohne Additive) auf die Selektivität $\ln \alpha$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(-)

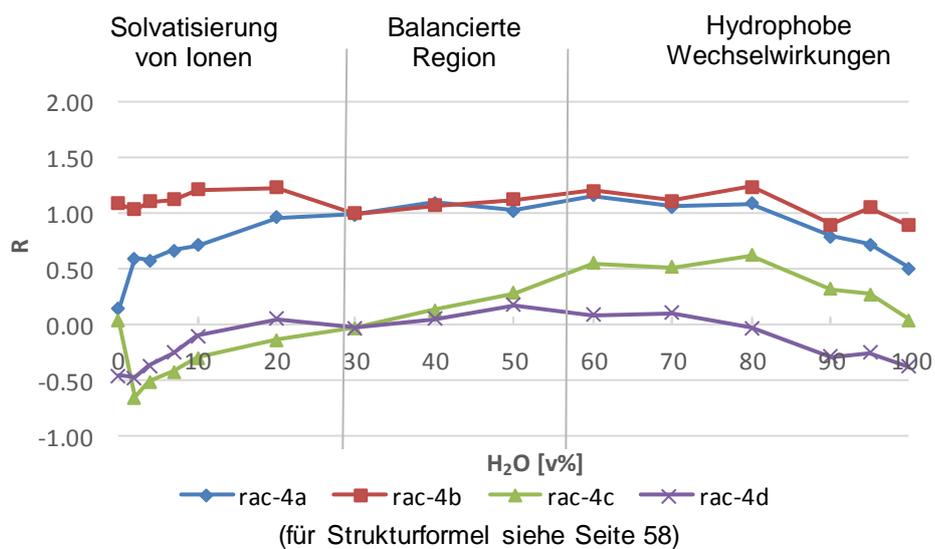


Abbildung 49: Einfluss von Wasser ($H_2O/MeOH$ Mischungen ohne Additive) auf die Auflösung $\ln R$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(-)

Anderes gilt für die Auflösungs-Werte gezeigt in **Abbildung 49**. Sie folgen keinem bestimmten Kurs und sind stark Analyt-abhängig. rac-4b und rac-4c erreichen eine bessere Auflösung bei 80% Wasser, während rac-4a und rac-4d bei 40% bzw. 50% Methanol am besten aufgelöst sind.

Die in der Literatur veröffentlichten Studien von Hoffman et al.¹⁸ über wässrige mobile Phasen-Systeme mit Wasser als meist eingesetztes Elutionsmittel (bulk solvent) für zwitterionische CSP`s ergeben erhebliche Indizien, dass die zwitterionischen CSP`s in einem Misch-Modus aus Ionenaustauscher- und RP-Modus operiert werden können. Dabei wurde festgestellt, dass bei mobilen Phasen bestehend aus Methanol und Puffer eine Wassergehalts-Erhöhung auf bis zu 20% eine Retentionsverkürzung – ähnlich wie in unseren Untersuchungen – und ab 20% Wasser eine Retentionserhöhung verursacht. Dieses Verhalten wurde von einem unerwünschten „Contra-Effekt“ für Selektivität und Auflösung begleitet, wobei diese in beiden Fällen (20% und 80% H₂O) deutlich verringert wurden.

Im Vergleich dazu sind die hier dargelegten Wasser-in-Methanol-Studien in Bezug auf Enantioselektivität und Auflösung anders (**Abbildung 48** und **Abbildung 49**). Besonders die Selektivität wird vom Wasser/Methanol-Verhältnis stark beeinflusst. Sie nimmt mit Wasserzunahme in der mobilen Phase zu und ist am höchsten bei einem 1:1 Wasser/Methanol-Gemisch.

Zusammengefasst ergaben die Wasser-in-Methanol-Untersuchungen ein neues chromatographisches Verhalten für zwitterionische CSP`s. Die Einführung von Wasser im chromatographischen System sollte eine Solvatisierung von zwitterionischer Verbindung (Selektand) und Selektor und somit kürzere Retentionszeiten bewirken, da die SO-SA-Wechselwirkungen geschwächt werden. Dies entspricht dem linken Ast in den obigen **Abbildungen 46, 47, 48** und **Abbildung 49**. Mit der Wassergehalts-Erhöhung (ab ca. 55% Wasser) werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Stellen des Selektors und hydrophoben Reste der zwitterionischen Verbindung stärker, was zu einer Retentionserhöhung führt. Dies ist der rechte Ast in den obigen **Abbildungen 46, 47, 48**, und **Abbildung 49**. Eine stärkere enantioselektive molekulare Erkennung sollte in der sogenannten „balancierten Region“ (ca. 25-55% Wasser) zwischen diesen zwei dominierenden Effekten erreicht werden. Dafür sollten neben dem

simultanen Doppelionenpaar die hydrophoben (unpolaren) Reste entscheidend sein. Beim Ionenaustausch- aber auch Wasserstoffbrückenbindungs-Mechanismus wirkt Wasser als sogenannter „Displacer“. Einerseits ist Wasser polarer als Methanol, andererseits ist es ein Protonen-Rezeptor bzw. -Donator und bricht dadurch SO-SA Wasserstoffbrückenbindungen.

Aus dieser Erkenntnis heraus ergibt sich natürlich die Frage, wie sich Wasser in Acetonitril verhalten würde. Dies wird im folgenden Kapitel erläutert.

V.I.II Einfluss von Wasser – in additivfreier mobiler Phase bestehend aus Acetonitril – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)

Um den Einfluss von Wasser in Acetonitril zu untersuchen, wurde in einer mobilen Phase bestehend aus reinem Wasser Acetonitril in Zehnerprozentsschritten zugegeben. Wegen der sehr langen Eluitionszeiten und Analytunlöslichkeit verursacht durch die relative Acetonitrilanteil-Zunahme wurden die Messungen nur bis 85% Acetonitril durchgeführt. Für einen besseren Vergleich mit anderen Studien sind die Titrationskurven dieser Studien in umgekehrte Reihenfolge dargestellt (die Messung startete mit reinem Wasser).

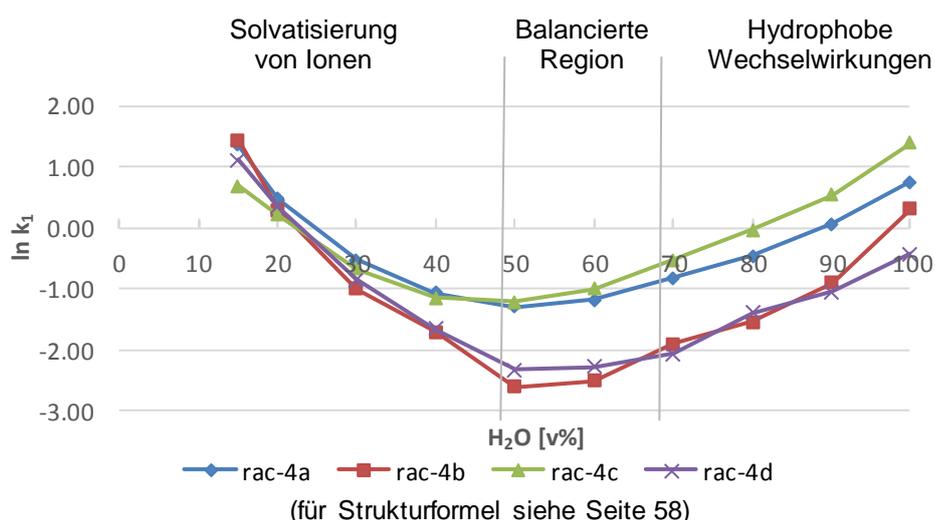


Abbildung 50: Einfluss von Wasser (H₂O/ACN Mischungen ohne Additive) auf den Retentionsfaktor $\ln k_1$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(-)

Abbildung 50 und **Abbildung 51** zeigen deutlich, dass das Wasser-Acetonitril-Verhältnis sehr wichtig für die Retentionsfaktoren bei zwitterionischen CSP's ist.

Diese werden durch Zugabe von Acetonitril bzw. Wasser sehr stark beeinflusst und erreichen ein Minimum bei einem 1:1 Wasser-Acetonitril-Gemisch.

Im Vergleich zur vorherigen Untersuchung (Wasser in MeOH, siehe **Abbildung 46**) ist der Trend für die Retentionzeit ähnlich, jedoch ist diese viel kürzer, z.B. erreicht die Verbindung rac-4b bei 1:1 Wasser/Methanol ein Minimum bei $\ln k_1 = -0.94$ – im Gegensatz zu 1:1 Wasser/Acetonitril, wobei das Minimum bei $\ln k_1 = -2.61$ liegt. Dies entspricht einem Faktor von 2.8.

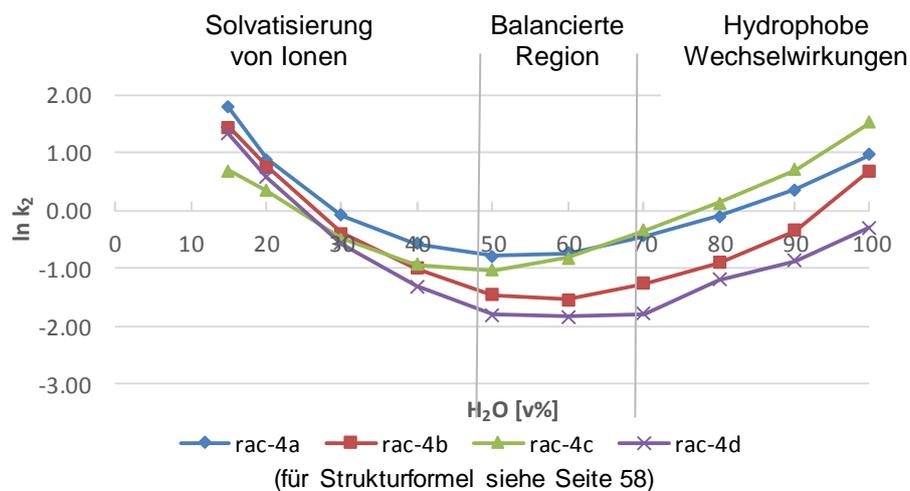


Abbildung 51: Einfluss von Wasser (H₂O/ACN Mischungen ohne Additive) auf den Retentionsfaktor $\ln k_2$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(-)

Die Untersuchung ergaben beim Gebrauch von MeOH als „bulk solvent“ im Vergleich zu ACN deutlich höhere Retentionszeiten, siehe dazu **Abbildung 50** und **Abbildung 51** (für Evaluierungsergebnisse siehe Anhang: **Tabelle 19** und **20**).

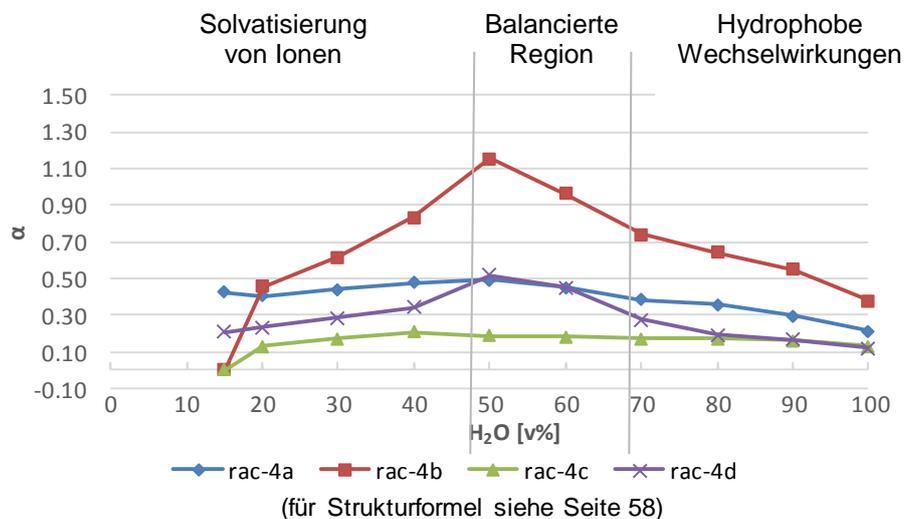


Abbildung 52: Einfluss von Wasser (H₂O/ACN Mischungen ohne Additive) auf Selektivität $\ln \alpha$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(-)

Der Trend für die Selektivitätswerte (**Abbildung 52**) passt mit den Retentionszeiten überein. Sie sind am höchsten in dem Gebiet mit 45-65% Wasser, wo die Retentionszeiten am niedrigsten sind. Die nicht immer Basislinien-getrennten Peaks und nicht idealen Peak-Formen (durch sogenanntes „tailing“) bei 45-55% ACN-Gehalt (wie in der **Abbildung 53** merkbar ist) könnten mit vernünftigen Selektivitätswerten aus der „balancierten Region“ ausgeglichen werden.

Außer Verbindung rac-4d, welche den höchsten Auflösungswert bei 80% ACN hat, erreichen die restlichen drei Verbindungen die beste Auflösung bei 90% Wasser bzw. 80% ACN. Wie bei einem sehr hohen Gehalt an ACN erwartet, eluieren die Verbindungen nicht mehr (Löslichkeitsproblem). Die Grenze für Verbindung rac-4a und rac-4d liegt bei 85% ACN.

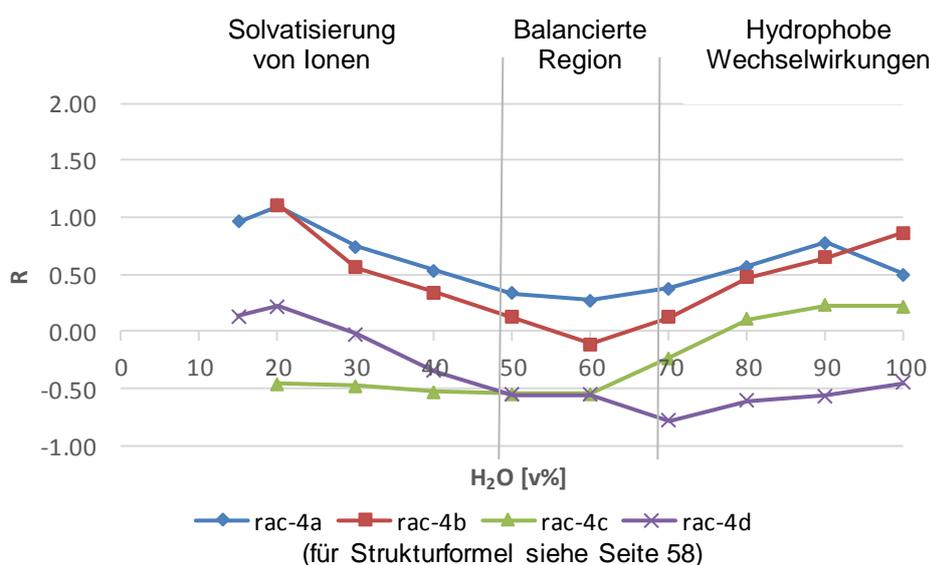


Abbildung 53: Einfluss von Wasser (H₂O/ACN Mischungen ohne Additive) auf die Auflösung In R für alle 4 Analyten bei ZWIX(-)

Zusammengefasst verhält sich Wasser in Acetonitril tendenziell ähnlich wie in Methanol; nur die chromatographischen Parameterwerte haben sich etwas verschoben. Acetonitril ist polarer als Methanol, aber nicht protisch. In Hinsicht auf die Elutionsfähigkeit ist Acetonitril im Vergleich zu Methanol ein schwächeres Elutionsmittel (ACN: $E^0=0.5$; MeOH: $E^0=0.73$; E^0 bezeichnet die Elutionskraft).

V.I.III Einfluss von Wasser – in additivfreier mobilen Phase bestehend aus Methanol – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(+)

In den oben durchgeführten Untersuchungen mit der ZWIX(-)-Säule (Wasser in ACN; Wasser in MeOH und deren Vergleich mit MeOH in ACN) wurde festgestellt, dass die Anwesenheit von Wasser in der mobilen Phase einen großen Einfluss auf die chromatographischen Parameter ausübt. Zusätzlich wurde noch erkannt, dass diese Parameter je nach Wassermenge sowie Typ und Anteil des Co-Elutionsmittels variieren.

Um die auf ZWIX(-) durchgeführten Versuchsreihen und Schlussfolgerungen zu bestätigen, wurde die Wasser-in-Methanol-Untersuchung bei gleichen Bedingungen auch mit der ZWIX(+) Säule wiederholt.

Die k_1 - und k_2 -Werte (Daten sind hier nicht dargestellt, siehe Anhang: **Tabelle 21** und **Tabelle 22**) sind um ca. 10% höher als bei der ZWIX(-)-CSP, weisen aber einen ähnlichen Verlauf auf.

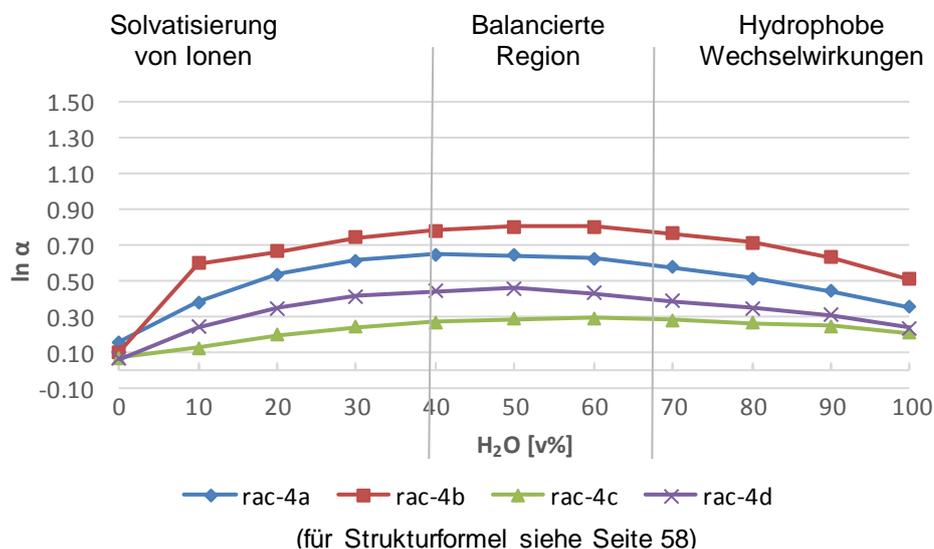


Abbildung 54: Einfluss von Wasser ($H_2O/MeOH$ Mischungen ohne Additive) auf die Selektivität $\ln \alpha$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(+)

Analoges gilt für die Selektivitätskoeffizienten. Diese sind im Vergleich zur ZWIX(-)-Säule um ca. 10% höher und dementsprechend hat sich die „balancierte Region“ auf dem rechten Ast verschoben (siehe **Abbildung 54**).

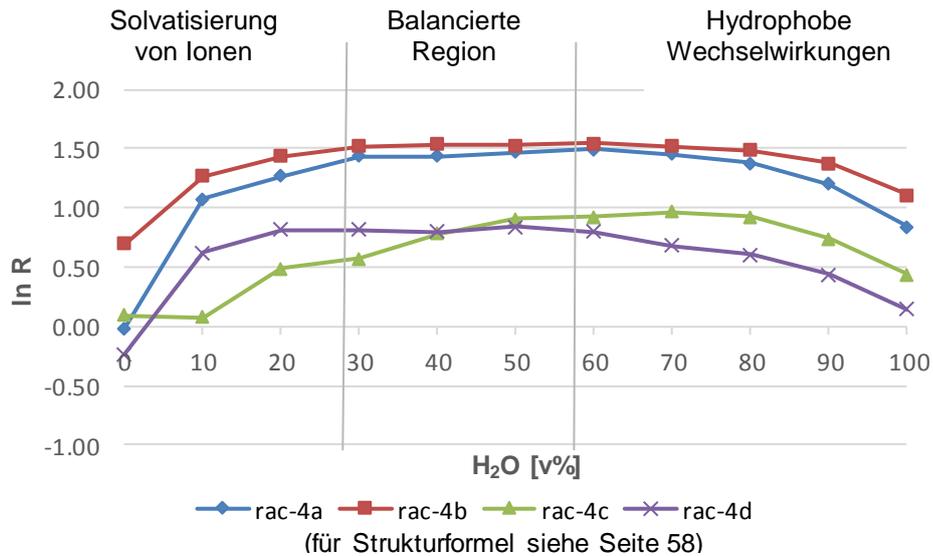


Abbildung 55: Einfluss von Wasser ($H_2O/MeOH$ Mischungen ohne Additive) auf die Auflösung $\ln R$ für alle 4 Analyten auf ZWIX(+)

Vergleicht man die Auflösungswerte von ZWIX(-) und ZWIX(+) miteinander (**Abbildung 49** und **Abbildung 55**), gelangt man zu dem Schluss, dass das Auflösungsverhalten etwas regelmäßiger auf ZWIX(+) ist.

Folglich sind die besprochenen chromatographischen Parameter für die gleichen Analyt-Verbindungen unter identen Bedingungen nicht durch die Konfigurationsunterschiede der ZWIX(+)- und ZWIX(-)-Säule beeinflusst.

V.II Einfluss der mobilen Phasen-Zusammensetzung auf die chromatographische Trennleistung der ZWIX(-)-Säule für cyclische beta-Aminosäuren

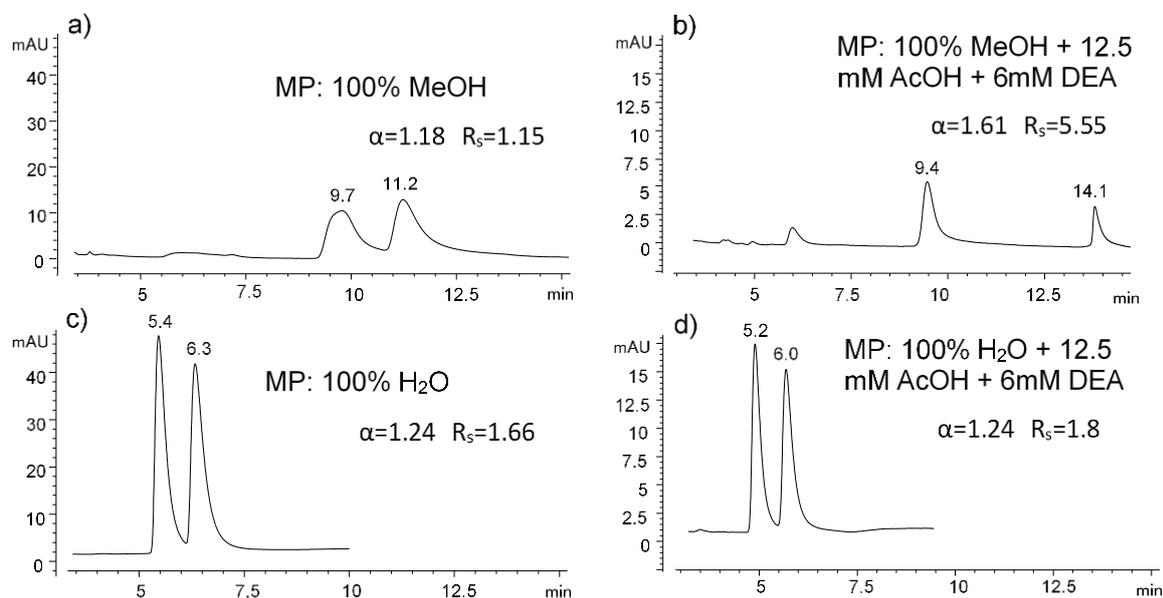


Abbildung 56: Einfluss der mobilen Phase (H₂O/MeOH mit und ohne Puffer) auf die chromatographische Trennleistung der ZWIX(-)-Säule für die Verbindung rac-4a

Die chromatographische Trennleistung der ZWIX(-)-Säule als Funktion der mobilen Phase-Zusammensetzung für eine cyclische β -Aminosäure (Verbindung rac-4a) wurde mit vier verschiedenen mobilen Phasen untersucht. Wie bereits vorher angeführt ist die Elutionsstärke des Methanols niedriger als die des Wassers. Beide Methanol-basierten mobilen Phasen (**Abbildung 56:** Chromatogramme a und b) ergaben längere Retentionszeiten als die mobilen Phasen auf Wasserbasis (**Abbildung 56:** Chromatogramme c und d). Das zweite Enantiomer der Verbindung rac-4a eluierte bei der mobilen Phase bestehend aus Methanol und Puffer (12.5 mM Essigsäure und 6 mM Diethylamin) zwar später (14.1 min.) – im Unterschied zu demselben Enantiomer bei anderen MP-Zusammensetzungen – dafür lieferte aber diese MP eine höhere Selektivität und Auflösung. Bei reinem Wasser und Wasser mit Puffer retardierte die Verbindung rac-4a fast gleich, begleitet mit ähnlichen Selektivitäts- und Auflösungsdaten. Im Unterschied zu reinem Methanol lieferte reines Wasser kürzere Retentionszeiten, fast Basislinientrennung und somit bessere Enantioselektivität und Auflösung für die Verbindung rac-4a.

V.II.1 Typenvergleich von meist eingesetzten Elutionsmitteln und Additiven in Wasser für cyclische beta-Aminosäuren auf ZWIX(-)

Zusammen mit Lösungsmitteltyp und Menge sind die Art und das Verhältnis von Säure und Base die wichtigsten Faktoren der mobilen Phase. Deren Variation macht einen wesentlichen Unterschied auf die chromatographischen Parameter aus und bestimmt somit gemeinsam mit stationärer Phase die Enantiomertrennung.

Zu diesem Zweck wurde das chromatographische Verhalten der amphoteren Verbindung rac-4b bei sechs unterschiedlichen MP-Zusammensetzungen auf der ZWIX(-)-Säule untersucht: in reinem Methanol oder Acetonitril und MP-Mischungen aus MeOH/ACN mit Säure oder Puffer in regelmäßigen Zehnerschritten der Wasserzunahme.

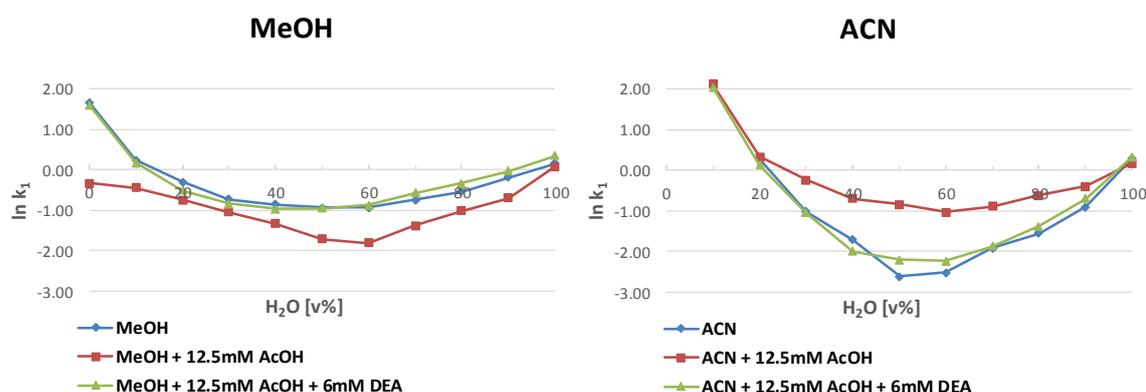


Abbildung 57: Retentionsvergleich ($\ln k_1$) von meist eingesetzten Elutionsmitteln (Methanol und Acetonitril) und Additiven in Wasser auf der ZWIX(-)-Säule für die Verbindung rac-4b

Wie in **Abbildung 57** und bereits früher gezeigt (**Abbildungen 46, 47, 50** und **Abbildung 51**), ergibt reines ACN kürzere Retentionszeiten als MeOH in Gegenwart von Wasser. Die Anwesenheit von Puffer liefert normalerweise in wasserfreien Systemen bzw. mobilen Phasen mit geringerem Wasseranteil (z.B. 2% H_2O) kürzere Retentionszeiten als Systeme ohne Puffer (siehe **Tabelle 7** und **Abbildung 42**). Dies ist hier nicht ersichtlich, weil auf der einen Seite die Präsenz von Wasser in der MP den Retentionsmechanismus ändern sollte (Solvatisierung und somit Schwächung von SO-SA-WW sowie hydrophobe WW) und auf der anderen Seite die Stärke des IMCI-Effekts bei geringeren Puffer-Konzentrationen überwiegen sollte¹⁹. Das heißt, dass das bevorzugte 2:1 Säure/Base-Verhältnis den IMCI-Effekt innerhalb des Selektors nicht ausschalten kann und daher verhalten sich die mobilen Phasen mit Additiven (12.5 mM Essigsäure und 6 mM

Diethylamin) ähnlich wie reines MeOH bzw. reines ACN (**Abbildung 57**) (für Evaluierungsergebnisse, siehe Anhang: **Tabelle 23-26**).

Im Vergleich dazu verhalten sich die chromatographischen Parameter bei mobilen Phasen mit Säure (12.5 mM Essigsäure) anders. Diese MP liefert kürzere Retentionsfaktoren als reines MeOH bzw. Methanol und Puffer und höhere Retentionsfaktoren als reines ACN bzw. Acetonitril und Puffer. Da bis jetzt in allen Untersuchungen H₂O in ACN kürzere Retentionszeiten als H₂O in MeOH ergab, ist das umgekehrte Verhalten – also die Verringerung der Retentionsfaktoren bei Acetonitril und Säure gegenüber Methanol und Säure – unerwartet. In mobilen Phasen mit Säure (hier 12.5 mM Essigsäure) scheint der IMCI-Effekt sensitiver zu sein. Obwohl AcOH eine schwache Säure ist, soll sie im Überschuss den stärkeren Konkurrenten – die Sulfonsäure – dominieren. So wäre die AX-Seite des Selektors „besetzt“ und nicht mehr für die Carboxylat-Gruppe des Analyten zugänglich. Das würde bedeuten, dass die ZWIX-Säule als Einzelionenaustauscher im CX-Modus funktionieren sollte und gleichzeitig eine negative Oberfläche besitzt, die durch elektrostatische Repulsionskräfte eine schnellere Elution ermöglichen könnte. Weil MeOH ein stärkeres Elutionsmittel als ACN ist, ist die Retentions von ACN mit Säure höher als bei MeOH mit Säure. Hat aber die Säurezugabe keinen Einfluss auf den IMCI-Effekt und der letzte bleibt weiter aktiv, ist der Grund für das umgekehrte Verhalten von H₂O in MeOH gegenüber H₂O in ACN auf die Eigenschaften der Elutionsmittel zurückzuführen. Die Wasserstoffbrücken werden durch protisches MeOH geschwächt und dadurch eluieren die Analyten schneller, während ACN als aprotisches Lösungsmittel die H-Brückenbildung verstärkt.

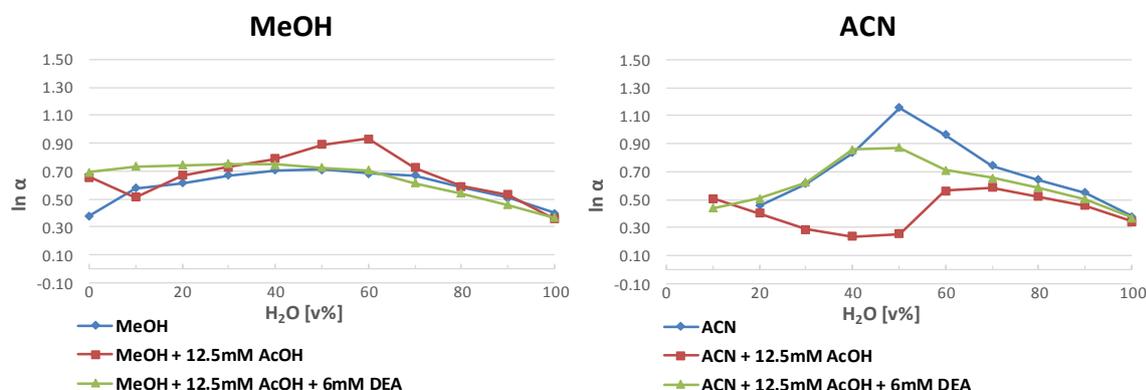


Abbildung 58: Selektivitätsvergleich ($\ln \alpha$) von meist eingesetztem Elutionsmittel (Methanol und Acetonitril) und Additiven in Wasser bei der ZWIX(-)-CSP für die Verbindung rac-4b

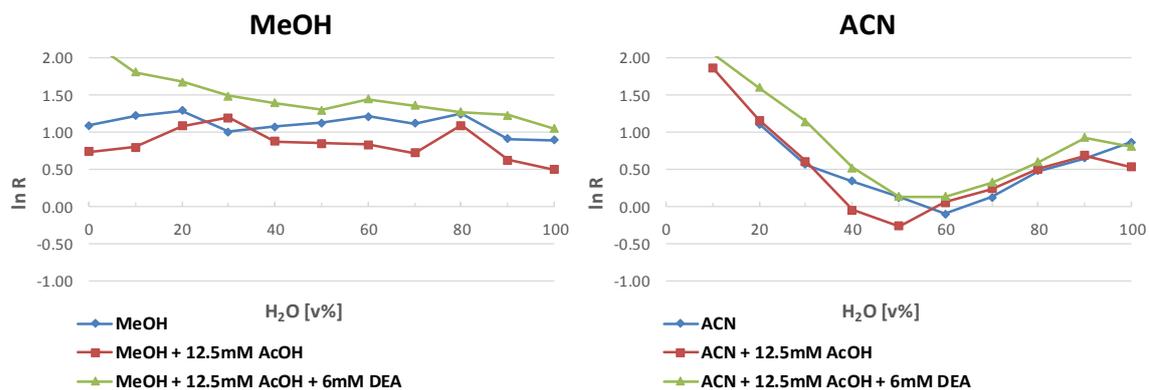


Abbildung 59: Auflösungsvergleich (ln R) von meist eingesetztem Elutionsmittel (Methanol und Acetonitril) und Additiven in Wasser bei der ZWIX(-)-CSP für die Verbindung rac-4b

Wie erwartet folgen die Selektivitäts- und Auflösungswerte der MP-Zusammensetzungen aus reinem MeOH oder ACN und MeOH/ACN mit Puffer bei ständiger Wasseranteilzunahme dem gleichen Trend wie H₂O in MeOH oder H₂O in ACN (siehe oben). Bei Wassergehalts-Erhöhung wird die beste Enantioselektivität bei 40-50% H₂O für reines MeOH oder ACN und MeOH/ACN mit Puffer erreicht.

Die Säure in MeOH bewirkt noch höhere Selektivitätswerte (bei 60% H₂O) als andere MeOH-basierte mobile Phasen. Jedoch ist die Selektivität beim Gebrauch von Säure in ACN unterschiedlich. Diese sinkt zunächst mit Wasserzunahme und erreicht ein Maximum bei 40-30% ACN.

Zusammengefasst ergibt die Beteiligung von Säure in MeOH die kürzesten Retentionszeiten und höhere Selektivitätswerte für MeOH-basierte mobile Phasen. Bei ACN-basierten mobilen Phasen liefert reines ACN bessere k- und α -Werte. Im Allgemeinen bewirken unterschiedliche Typen und Anteile von Elutionsmitteln („bulk eluents“) und Additiven in Abwesenheit von Wasser für die cyclischen β -Aminosäure rac-4b nicht nur unterschiedliche Retentionszeiten, sondern sind auch eng mit der Enantioselektivität und somit Auflösung verbunden.

VI Mercaptopropyl-modifiziertes Kieselgel

In der Literatur findet man verschiedene Einsätze von modifiziertem Kieselgel, wie z.B. zur Analyse von geringen Mengen Germanium in natürlichen Gewässern³⁹, aber auch als effektives Adsorptionsmaterial für toxische Metallionen, wie beispielsweise Hg^{2+} , Pb^{2+} und Cd^{2+} ⁴⁰. Des Weiteren wird das modifizierte Kieselgel bei der Synthese von stationären Phasen für die HPLC angewendet. Für diesen Zweck werden u.a. in unserer Arbeitsgruppe auf der Oberfläche von verschiedenartig aktiviertem Kieselgel – wie z.B. Thiol- oder Azidopropyl-modifiziertem Kieselgel⁴¹, chirale Selektoren unterschiedlichster Art mittels zweierlei Immobilisierungsstrategien kovalent gebunden.

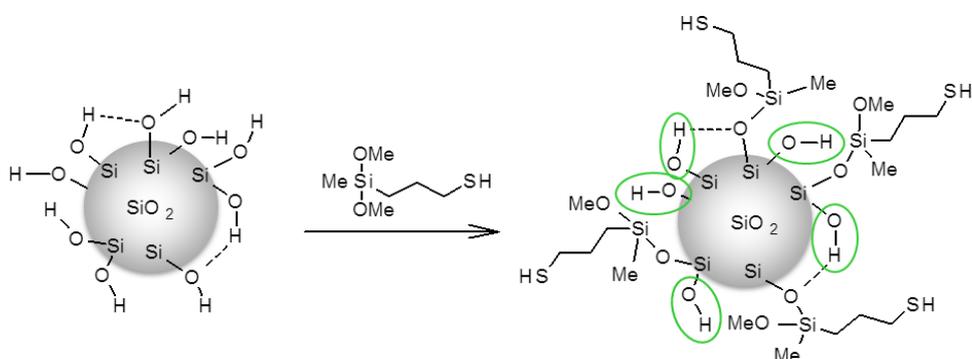


Abbildung 60: Modifizierung von Kieselgel mit (3-mercaptopropyl)methyl-dimethoxysilan zur Immobilisierung von Selektoren mit endständiger Doppelbindung mittels Thiol-Ene Addition

Das Thiol-modifizierte Kieselgel (siehe **Abbildung 60**) wird durch die Umsetzung von Kieselgel unterschiedlicher Porengröße mit z.B. (3-mercaptopropyl)methyl-dimethoxysilan hergestellt (siehe *VII.VI Synthese von 3-Mercaptopropyl-modifiziertem Kieselgel*). Während der Umsetzung werden aus sterischen Gründen nicht alle freien Silanol-Gruppen (H-Brücken-Bildner) kondensiert. Eine weitere Umsetzung, sogenanntes „Endcapping“, kann die noch nicht umgesetzten Si-OH-Gruppen beispielsweise mit etwas kleineren Trimethylsilyl-Gruppen abdecken. Endcapping wird bevorzugt mit Trimethylsilylchlorid oder Hexamethyldisilazan (HMDS) durchgeführt (siehe *VII.VI.1 Nachsilanisierung / Endcapping*). Das dazugehörige Reaktionsschema ist in **Abbildung 61** dargestellt:

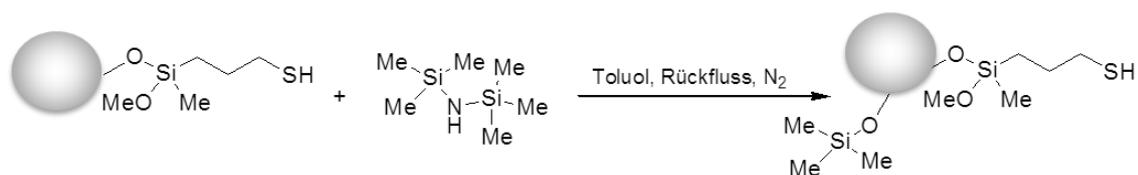


Abbildung 61: „Endcapping“ von bereits modifiziertem Mercaptopropyl-Kieselgel mittels HMDS

VI.1 Immobilisierungsstrategien

Die auf der Basis von *Cinchona*-Alkaloiden gewonnenen chiralen stationären Phasen (siehe II.III.I.III Zwitterionenaustauscher CSP`s (Zwitterion Exchanger, ZWIX-CSP`s)), welche in unserer Gruppe synthetisiert werden, können an zwei Stellen auf der Oberfläche des Kieselgels immobilisiert werden: entweder über den Chinuklidinring oder über einen sogenannten Linker, welcher durch Carbamoylierung der sekundären Alkoholgruppe am Kohlenstoff 9 erhalten wird. Enthält der Chinuklidinring an der Seitenkette eine Doppelbindung (wie etwa im Falle von natürlichem Chinin bzw. Chinidin) und der Linker keinen Immobilisierungsanker in Form einer endständigen Doppel- oder Dreifachbindung, wird der chirale Selektor über die Doppelbindung des Chinuklidinrings auf der Kieselgeloberfläche gebunden. Liegt der Chinuklidinring ohne Doppelbindung vor (so wie bei den reduzierten *Cinchona*-Alkaloiden Dihydrochinin und Dihydrochinidin), wird die kovalente Verknüpfung zum Kieselgel über eine endständige Doppel- oder Dreifachbindung am Linker realisiert. Je nach Selektorart unterscheidet man zwischen:

- Thiol-Klick Immobilisierungsstrategie (radikalische Thiol-ene Addition) und
- Cu(I) katalysierte Huisgen Alkin-Azid Klick-Chemie Immobilisierung

Bei der Thiol-Klick Immobilisierung handelt es sich um radikalisch (z.B. AIBN) aktivierte Thiol-ene oder Thiol-yne-Additionsreaktionen (siehe **Abbildung 62**):

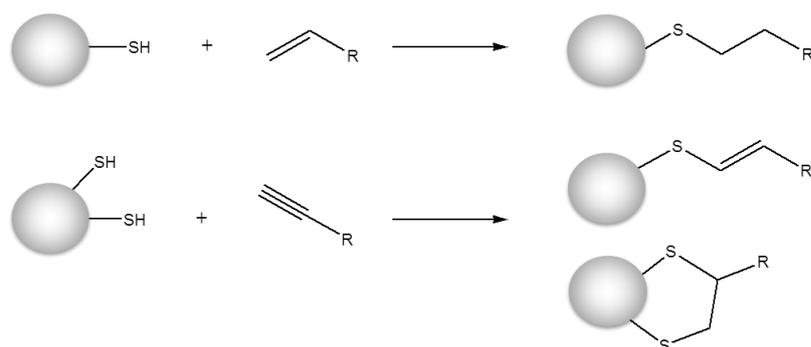


Abbildung 62: Oben: Thiol-ene Additionsreaktion unter Ausbildung eines Thio-Ethers als kovalente Verknüpfung. Unten: Thiol-yne Additionsreaktion, welche zur Bildung von vicinalen Dithio-Ethern führt

Zum Start der Reaktion wird Azobisisobutyronitril (AIBN) als Radikalinitiator verwendet. Diese Additionsreaktionen stellen eine anti-Markownikow radikalische Reaktion mit einem nukleophilen Angriff an der Doppelbindung dar.

Bei der Huisgen Alkin-Azid Klick-Chemie Immobilisierung handelt es sich um eine Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) unter milden Bedingungen (siehe **Abbildung 63**).

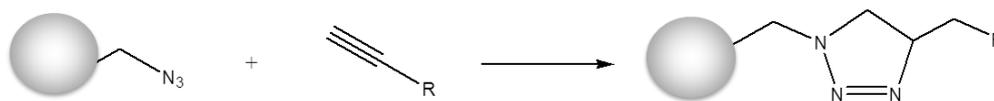


Abbildung 63: Cu(I) katalysierte Huisgen Alkin-Azid Klick-Chemie zur Immobilisierung von Selektoren mit Dreifachbindung

Selektor und Kieselgel werden über Huisgen Azid-Alkin Klick-Chemie^{42, 43} verknüpft, wobei eine heteroaromatische 1,2,3-Triazolgruppe entsteht. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine 1,3-dipolare Cycloaddition nach Huisgen. Die Wahl des Lösungsmittels, die Zugabe von Cu(I) oder Cu(II) in Kombination mit einem *in situ* Reduktionsmittel (z.B. Ascorbinsäure) und vor allem die Zugabe eventueller Additive, spielen bei dieser Reaktion eine wichtige Rolle. In der Arbeitsgruppe wurden ähnliche Additionen unter saurem Milieu durchgeführt, jedoch zeigte die Immobilisierung unter leicht basischen Bedingungen mit Diisopropylethylamin (Hünig-Base) in Acetonitril eine höhere Immobilisierungsrate²¹.

Für unsere Zwecke ist die Evaluierung des Immobilisierungskonzeptes von carbamoylierten Chinin/Chinidin-Selektoren von Bedeutung, welche als chirale Anionenaustauscher fungieren. Hierbei soll vor allem das Thiol-yne Reaktionsschema im Vergleich zum Thiol-ene Schema betrachtet werden.

Durch Bestimmung der reaktiven SH-Gruppen, z.B. mittels der DPDS Methode (2,2-dipyridyl disulfid)⁴⁴, konnten wir feststellen, ob durch den Radikalstarter schon an der Oberfläche von Mercaptopropyl-modifiziertem Kieselgel teilweise Disulfid-Bindungen entstehen, was ja theoretisch möglich ist. Wäre das der Fall, sollte eine weitere Konkurrenzreaktion berücksichtigt werden. Von großem Interesse wäre auch, ob eine dadurch bedingte, nicht so dichte Selektoranbindung, einen Einfluss auf die Enantioselektivität der chiralen stationären Phasen (CSPs) hat und ob die doppelte Anbindung einen positiven Einfluss auf die chemische Stabilität der CSPs hat.

VII EXPERIMENTELLER TEIL

VII.I Verwendete Geräte

Die chromatographischen Experimente (Enantiomerentrennungen) wurden mittels einer Agilent 1200 HPLC-Anlage der Firma Agilent Technologies durchgeführt, ausgestattet mit Autosampler, vier Pumpen, Säulenthermostat und Entgaser.

UV-aktive Analyten wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm. bzw. 230 nm. mittels eines UV-Detektors (Dioden-Array-Detektor, DAD) detektiert. Analyten, welche nicht UV-aktiv sind, wurden mittels Corona Detektor (Charged Aerosol Detection, CAD) detektiert. Die Daten wurden mittels der Software ChemStation und danach mit Microsoft Excel bearbeitet und aufbereitet.

VII.II Verwendete HPLC-Säulen und mobile Phase

Als stationäre Phasen für die Trennung der Racemate und der Referenzverbindungen wurden die kommerziell erhältlichen chiralen HPLC-Säulen dargestellt in **Abbildung 10** verwendet.

Wie schon erwähnt (siehe *II.III.I.III Zwitterionenaustauscher CSP's (Zwitterion Exchanger, ZWIX-CSP's)*), handelt es sich bei diesen Säulen um zwitterionische chirale stationäre Phasen bestehend aus einem Chinin- oder Chinidin-basierten schwachen Anionenaustauscher- (WAX) sowie einem starken Kationenaustauscher-Anteil (SCX).

VII.II.I Mobile Phase

Für die Durchführung der HPLC-Analysen wurden nur HPLC-grade Lösungsmittel wie Methanol Gradient grade HiPerSolv CHROMANORM und Acetonitril HiPerSolv Super Gr. der Firma VWR verwendet. Als mobile Phase wurde eine polar organische Mischung mit einer Zusammensetzung aus MeOH/ACN/H₂O 49/49/2 (v/v/v), 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin verwendet. Die Racemisierungsüberprüfung wurde unter isokratischer Elution mit einer Flussrate von 0,5 mL/min bei 25,0°C durchgeführt. Die mobile Phase wurde vor der Verwendung durch Ultraschallbehandlung für 10 min entgast.

VII.III Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Vorbereitung von HPLC

Proben (AAV)

In den 1,5 mL Proben-Vials werden 1,0 mg Analyt (Enantiomer bzw. Racemat) vorgelegt und in 1 mL sonifiziertem Methanol gelöst. Jeweils 2 μ L dieser Lösung wurden auf die Säule injiziert. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte anhand des von Agilent Technologies entwickelten Softwareprogramms ChemStation für LC 3D systems B.04.03-SP1.

VII.IV Synthese von 9-*epi*-Chinin-basierten ZWIX chiralen stationären Phasen

VII.IV.I Synthese von 9-*epi*-Chinin

Die Synthese von 9-*epi*-Chinin (**Abbildung 64**) wurde gemäß der Literatur⁴⁵ über Mesyl-Chinin als Zwischenprodukt durchgeführt.

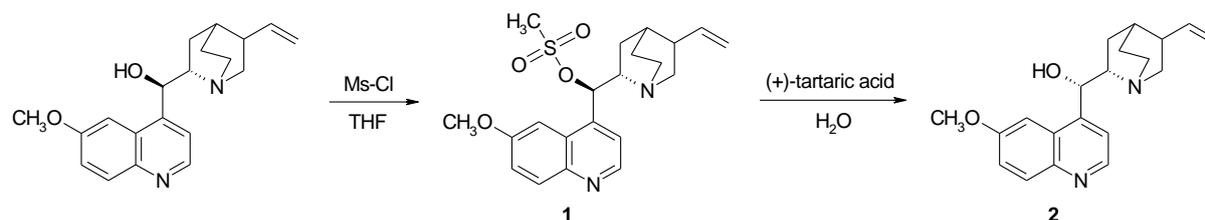


Abbildung 64: Synthese von 9-*epi*-Chinin

VII.IV.I.1 9-O-Methansulfonyl-Chinin (1)

Chinin (14,0 mmol) und Triethylamin (21,8 mmol) wurden in trockenem THF (100 mL) vorgelegt und bei 0°C wurde Methansulfonylchlorid (28,2 mmol) unter Argon-Atmosphäre tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 3 Stunden unter derselben Temperatur und danach noch eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde die Reaktionsmischung mit gesättigter NaHCO₃ Lösung verdünnt und mit Dichlormethan (3x30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃ Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nach der Filtration wurde das Rohprodukt mittels

Säulenchromatographie gereinigt (Elutionsmittel: 10% MeOH in CHCl₃).
Ausbeute: 92%.

VII.IV.1.II 9-*epi*-Chinin (2)

Eine Lösung aus destilliertem Wasser (110 mL), Mesylderivat **1** (12,9 mmol) und (+)-(*R,R*)-Weinsäure (43,0 mmol) wurde unter Rückfluß für 5 Stunden erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung mit NaHCO₃ versetzt und die alkalische Lösung (pH~8) mit Dichlormethan (3x50 mL) extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃ Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Essigsäureethylester/Methanol, 10:1). Ausbeute: 54%.

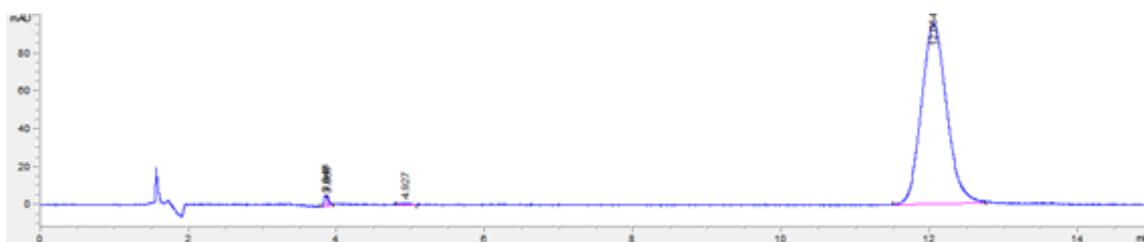


Abbildung 65: Chromatogramm vom hergestellten 9-*epi*-QN. Säule: P-DCL-(*S,S*)-ACHSA 150x4 mm ID, 5 µm; mobile Phase: Methanol/Essigsäure/Ammonium Acetat (98:2:0.5)

Zur Überprüfung der Reinheit wurde das gereinigte Produkt mittels HPLC charakterisiert (siehe **Abbildung 65**). Die Peaks bei 3,8 und 4,9 Minuten (minimale Verunreinigungen) konnten nicht identifiziert werden. Eine weitere säulenchromatographische Reinigung bzw. Kristallisation könnte diese Verunreinigungen höchstwahrscheinlich entfernen. Zur qualitativen Verifizierung wurde zusätzlich ein Vergleich mit Chinin (QN) und Chinidin (QD) sowie einem 9-*epi*-Chinin Standard gemacht (siehe **Abbildung 66**). Eine Verschiebung der Retentionszeit sowie eine idente Elutionszeit mit dem Vergleichsstandard demonstrieren eindeutig die chemische Äquivalenz des neu synthetisierten 9-*epi*-Chinins.

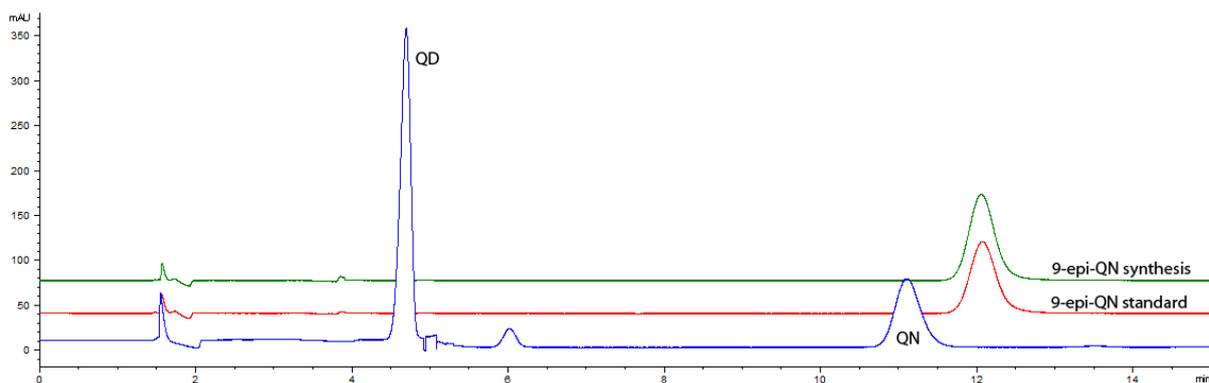


Abbildung 66: Überlappte Chromatogramme von Chinin (QN)/Chinidin (QD) (blau), 9-*epi*-Chinin Standard als Referenz (rot) und neu synthetisiertes 9-*epi*-Chinin (grün)

VII.IV.II Synthese des 9-*epi*-QN-ZWIX Selektors

VII.IV.II.I Herstellung des Aktivesters

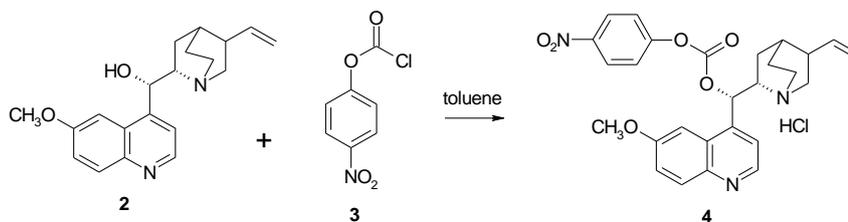


Abbildung 67: Herstellung des Aktivesters

Aus einer Reaktionslösung bestehend aus 9-*epi*-QN **2** (13,5 mmol) und Toluol (150 mL) wurden mit Hilfe eines Wasserabscheiders 30 mL Lösungsmittel zur azeotropen Trocknung der Reaktionsmischung entfernt. Nach der Abkühlung der Reaktionslösung auf Raumtemperatur wurde unter Argongegenstrom 4-Nitrophenylchloroformat (13,9 mmol) zugegeben und über Nacht unter Argon-Atmosphäre gerührt. Der Niederschlag wurde filtriert und mit Hexan gewaschen. Anschließend wurde das Produkt als Hydrochlorid unter Vakuum bis zu Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute: 88%.

VII.IV.II.II Umsetzung von Aktivester 4 mit geschütztem ACHSA

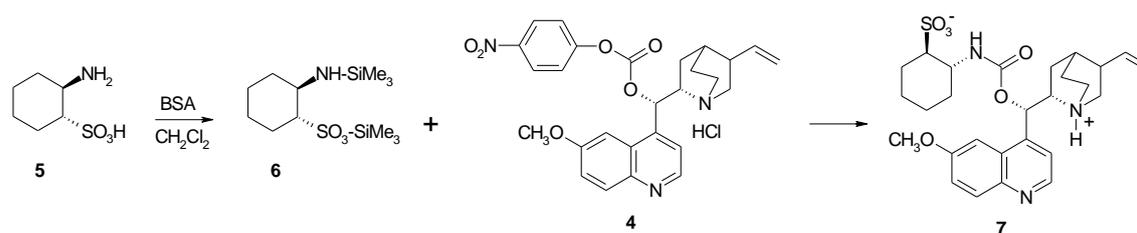


Abbildung 68: Umsetzung von Aktivester mit geschütztem ACHSA

(*R,R*)-ACHSA (6.97 mmol) wurde in getrocknetem CH₂Cl₂ (70 mL) unter Argonstrom suspendiert. Zur Suspension wurde *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) (20.9 mmol) zugegeben und für 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Aktivester 4 (7,03 mmol) unter Argonstrom zugegeben und die Reaktionsmischung für 48 Stunden gerührt. Nach Zugabe von Methanol (10 mL) wurde die nun gelbe Lösung für 30 Minuten gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde in Chloroform gelöst, mit Kieselgel (14 g) versetzt und schließlich eingedampft. Das Rohprodukt (beschichtet auf Kieselgel) wurde nun säulenchromatografisch aufgereinigt (Stufengradienten-Elution mit 3% Methanol in CHCl₃ bis zur Elution von 4-Nitrophenol, dannach wurde die mobile Phase auf 10% Methanol in CHCl₃ geändert). Ausbeute: 77%.

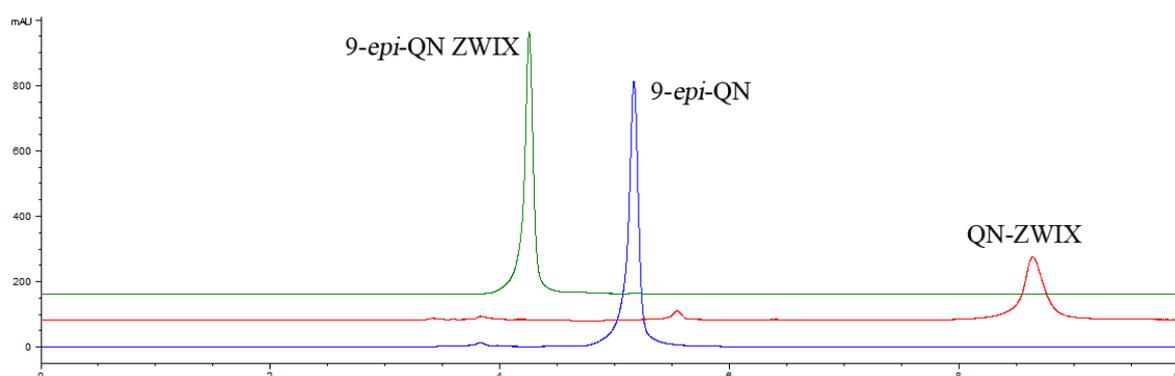


Abbildung 69: Bestimmung der Reinheit des erhaltenen Selektors: grün: 9-*epi*-QN ZWIX, rot: QN-ZWIX Selektor, blau: Referenzstandard 9-*epi*-QN. Säule: ZWIX (+) 250×3 mm, 3 μm. Mobile Phase: ACN/MeOH (1:1), 50 mM Ameisensäure, 25 mM NH₃, Flussrate 0.4 mL/min, 20°C, Detektion bei 256 nm.

VII.IV.II.III Immobilisierung des zwitterionischen Selektors

Für die Immobilisierung des Selektors wurde die Standard-Immobilisierungs-Prozedur mit AIBN als Radikalstarter in methanolischer Suspension verwendet (siehe VII.IV.II.III Immobilisierung des zwitterionischen Selektors).

Zu einer Suspension von Kieselgel (6,0 g) in MeOH (30 mL) wurde eine Lösung von 9-*epi*-QN-(*R,R*)-ACHSA Selektor **7** (3,30 mmol) in MeOH (10 mL) zugegeben. Schließlich wurde AIBN (0,61 mmol) zugefügt und die Reaktionsmischung für acht Stunden unter leichtem Sieden gerührt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde das Kieselgel filtriert, mehrmals sorgfältig und vorsichtig mit MeOH gewaschen und unter Vakuum getrocknet.

Die Selektobeladung wurde mittels Elementaranalyse bestimmt: 300 µmol/g Kieselgel bezogen auf den Stickstoffgehalt und 290 µmol/g Kieselgel bezogen auf den Kohlenstoffgehalt.

VII.V Arbeitsvorschriften zum Themengebiet Racemisierung von Aminosäuren

VII.V.I Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung von Racemisierungsreaktionen in saurem Milieu (AAV1)

Die racemischen Verbindungen wurden nach Literaturvorschrift^[4] hergestellt. Das Enantiomer wurde in einem Dreihalskolben bzw. Eppendorf-Gefäß vorgelegt und unter Stickstoffatmosphäre in Essigsäure gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit Salicylaldehyd als Katalysator versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung unter Rückfluss gerührt bzw. im Thermomixer bei 100°C geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer oder durch Stickstoffstrom entfernt und das Rohprodukt in Acetonitril umkristallisiert.

Vorsicht: es zeigte sich, dass bei einer molaren Katalysatorüberschussmenge (bezogen auf die Aminosäure) von mehr als 20% die Racemisierungsreaktion nicht mehr optimal verläuft. 10% Katalysator scheinen ein guter Kompromiss zu sein.

D,L-Phenylalanin

Die L-Verbindung wurde käuflich erworben, die racemische Mischung gemäß **AAV1** dargestellt.

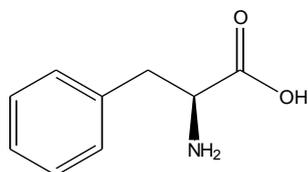


Abbildung 70: L-Phenylalanin

Eingesetzte Menge: 200 mg L-Phenylalanin, 9,4 mL CH₃COOH, 0,03 mL Salicylaldehyd.

Reaktionszeit: 1 h; Reaktionstemperatur: 100°C

Endproduktfarbe: gelblich.

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule: ZWIX(+); ZWIX(-)

Corona Detektor:

D-Enantiomer: 4,59 min 3,929 min

L-Enantiomer: 4,069 min 4,629 min

N-Methyl-D,L-Phenylalanin

Gemäß **AAV1** wurde die racemische Verbindung hergestellt, die L-Verbindung war im Hause verfügbar.

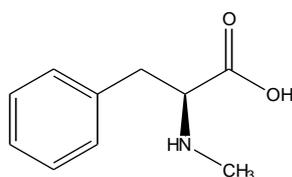


Abbildung 71: N-Me-L-Phenylalanin

Eingesetzte Menge: 200 mg N-Methyl-L-Phenylalanin, 9,4 mL CH₃COOH, 0,03 mL Salicylaldehyd.

Reaktionszeit: über Nacht; Reaktionstemperatur: 100°C

Endproduktfarbe: schneeweiß

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule:	ZWIX(+)	ZWIX(-)
		nur ein Peak: 2,754 min
D-Enantiomer:	3,716 min	
L-Enantiomer:	3,862 min	

N-Methyl-L-Phenylalanin wird auf ZWIX(-) nicht in die entsprechenden Enantiomere getrennt!

3-Nitro-L-Tyrosin

Das Racemat wurde gemäß **AAV1** hergestellt. Das *L*-Enantiomer war im Haus vorhanden.

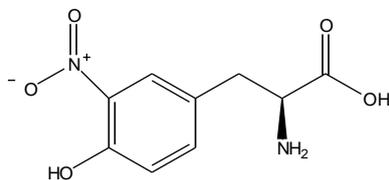


Abbildung 72: 3-Nitro-*L*-Tyrosin

Eingesetzte Menge: 200 mg 3-Nitro-*L*-Tyrosin, 9,4 mL CH₃COOH, 0,03 mL Salicylaldehyd.

Reaktionszeit: über Nacht; Reaktionstemperatur: 100°C

Endproduktfarbe: bräunlich

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule:	ZWIX(+)	ZWIX(-)
D-Enantiomer:	8,376 min	5,753 min
L-Enantiomer:	6,784 min	7,765 min

N-Methyl-*L*-Alanin

Die *L*-Verbindung war im Hause vorrätig, das Racemat wurde gemäß **AAV1** dargestellt.

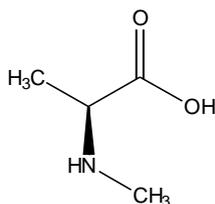


Abbildung 73: *N*-Me-*L*-Alanin

Eingesetzte Menge: 30 mg *N*-Methyl-*L*-Alanin, 1,41 mL CH₃COOH, 4,5 µL Salicylaldehyd.

Reaktionszeit: 1 h; Reaktionstemperatur: 100°C

Endproduktfarbe: weiß

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule:	ZWIX(+)	ZWIX(-)
D-Enantiomer:	3,912 min	2,723 min
L-Enantiomer:	4,601 min	2,627 min

3,5-Dinitro-*L*-Tyrosin

L-Enantiomer war im Hause verfügbar. Es wurde versucht, das Racemat gemäß **AAV1** herzustellen.

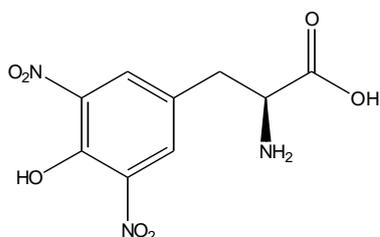


Abbildung 74: 3,5-Dinitro-*L*-Tyrosin

Eingesetzte Menge: 30 mg 3,5-dinitro-*L*-Tyrosin, 1,41 mL CH₃COOH, 4,5 µL Salicylaldehyd.

Reaktionszeit: 1 h; Reaktionstemperatur: 100°C

Endproduktfarbe: bräunlich

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule:	ZWIX(+)	ZWIX(-)
--------------	---------	---------

*3,5-Dinitro-*L*-Tyrosin wurde während der Racemisierung abgebaut.*

N-Methyl-*L*-Leucin

Aus der im Hause vorhandenen *L*-Verbindung wurde laut **AAV1** das Racemat hergestellt.

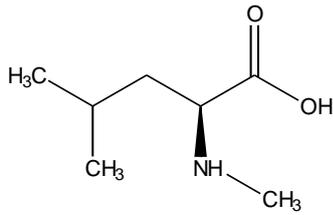


Abbildung 75: *N*-Me-*L*-Leucin

Eingesetzte Menge: 1 mg *N*-Methyl-*L*-Leucin, 1 mL CH₃COOH, 5 µL Salicylaldehyd.

Reaktionszeit: über Nacht; Reaktionstemperatur: 100°C

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule:	ZWIX(+)	ZWIX(-)
<i>D</i> -Enantiomer:	3,183 min	2,381 min
<i>L</i> -Enantiomer:	3,377 min	2,271 min

***N*-Methyl-*L*-Valin**

Das Racemat wurde gemäß **AAV1** hergestellt. Das *L*-Enantiomer war im Haus vorhanden.

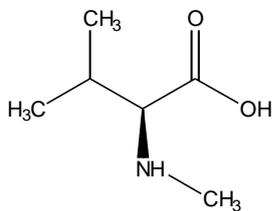


Abbildung 76: *N*-Me-*L*-Valin

Eingesetzte Menge: 1 mg *N*-Methyl-*L*-Valin, 1 mL CH₃COOH, 5 µL Salicylaldehyd.

Reaktionszeit: über Nacht; Reaktionstemperatur: 100°C

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule:	ZWIX(+)	ZWIX(-)
<i>D</i> -Enantiomer:	2,882 min	2,343 min
<i>L</i> -Enantiomer:	3,170 min	2,182 min

VII.V.II Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Durchführung von Racemisierungsreaktionen in basischen Milieu (AAV2)

Zu einer Mischung aus Wasser und Methanol (1:1 v/v), vorgelegt in einem Eppendorf-Gefäß, wurde das entsprechende Enantiomer zugegeben. Um eine basische Reaktionsmischung zu erhalten, wurde 0,1 M wässrige Natronlauge zugetropft, bis pH 13 erreicht wurde. Die basische Reaktionsmischung wurde nun bei 60°C über Nacht in einen Wärmeschrank gestellt. Danach wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gekühlt und durch Zugabe von Essigsäure angesäuert. Nachdem die Reaktionsmischung mit Methanol 1:10 verdünnt wurde, war die Lösung fertig für die HPLC Analyse.

L-Phenylalanin

Die L-Verbindung wurde käuflich erworben, die racemische Verbindung gemäß AAV2 dargestellt.

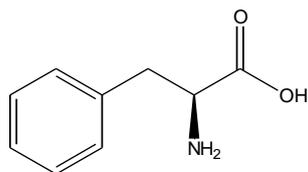


Abbildung 77: L-Phenylalanin

Eingesetzte Menge: 10 mg L-Phenylalanin, 1 mL H₂O:MeOH (1:1), 100 µL 0,1 M Natronlauge,

Reaktionszeit: über Nacht; Reaktionstemperatur: 60°C

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule: ZWIX(+) und ZWIX(-)

Die basisch-katalysierte Racemisierung war nicht erfolgreich.

N-Methyl-L-Phenylalanin

Gemäß AAV2 wurde die racemische Verbindung hergestellt, die L-Verbindung war im Hause verfügbar.

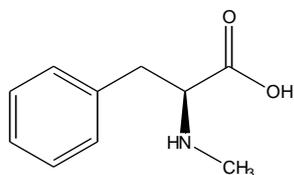


Abbildung 78: N-Me-L-Phenylalanin

Eingesetzte Menge: 10 mg *N*-Me-*L*-Phenylalanin, 1 mL H₂O:MeOH (1:1), 600 µL
0,1 M Natronlauge,

Reaktionszeit: über Nacht; Reaktionstemperatur: 60°C

Enantiomerenanalytik:

HPLC, Säule: ZWIX(+) und ZWIX(-)

Basisch-katalysierte Racemisierung war nicht erfolgreich.

VII.VI Synthese von 3-Mercaptopropyl-modifiziertem Kieselgel

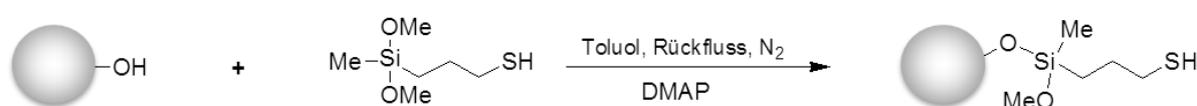


Abbildung 79: Modifizierung von Kieselgel mit (3-mercaptopropyl)methyldimethoxysilan unter katalytischer Einwirkung von DMAP in Toluol

300 mL Toluol wurden in einem 500 mL Dreihalskolben vorgelegt und unter Verwendung eines Wasserabscheiders (Dean-Stark-Falle) die Hauptmenge an Wasser azeotrop abdestilliert. 40 g Daisogel SP-120-3P (Lot No. 080714BOP) wurden im trockenen Toluol suspendiert. Der Wasserabscheider wurde durch eine Destillationsbrücke nach Claisen mit einem Stickstoffeinlass/-ausgang ersetzt und aus der mechanisch gerührten Mischung wurden noch weitere 20 mL Azeotrop abdestilliert. Schließlich wurde die Mischung unter Rühren auf Raumtemperatur abkühlt. Die Apparatur wurde mit einem intensiven Stickstoffstrom für 10 min. gespült. Dann wurden 12,3 mL (3-Mercaptopropyl)methyldimethoxysilan und 77 mg Dimethylaminopyridin (DMAP) zugesetzt. Die erhaltene Suspension wurde unter leichtem mechanischem Rühren für 15 h refluxiert. Die Reaktionsmischung wurde heiß mit einer Glasfritte (Porosität 4) abfiltriert, der Filterkuchen vorsichtig mit Toluol gewaschen und erneut in den Kolben überführt.

Nach Zugabe von 200 mL Toluol wurde die dabei entstandene homogene Suspension 40 Minuten unter Rückfluss mechanisch gerührt. Das suspendierte Kieselgel wurde wiederum heiß filtriert und mit 150 mL Toluol gespült. Dieser heiße Waschvorgang wurde noch 2x mit 230 mL Toluol und 2x mit 200 mL MeOH wiederholt. Zum Trocknen wurde das gewaschene Mercaptopropyl-

Kieselgel in zwei große Glaskristallisationsschalen überführt und mit perforierter Aluminiumfolie abgedeckt. Das modifizierte Kieselgel wurde im Trockenschrank unter Vakuum (60°C, 10 Torr) bis zur Gewichtskonstanz (20 h) getrocknet.

VII.VI.I Nachsilanisierung / Endcapping

Für das Endcapping wurde im Wesentlichen die gleiche Prozedur wie oben beschrieben verwendet. Das getrocknete und modifizierte Kieselgel wurde in 250 mL Toluol suspendiert und das Gemisch über azeotrope Destillation getrocknet. Nachdem die Suspension auf Raumtemperatur gekühlt wurde, wurden 17 mL Hexamethyldisilazan (HMDS) dazugegeben und die Reaktionsmischung für 18 h refluxiert. Das modifizierte Kieselgel wurde heiß abfiltriert und mit 150 mL Toluol gewaschen. Danach wurde noch 2x in ca. 200 mL Toluol resuspendiert, refluxiert, filtriert und heiß mit ca. 150 mL Toluol nachgewaschen. Der gleiche Waschvorgang wurde noch 3x mit MeOH wiederholt. Anschließend wurde das modifizierte Kieselgel für 24 h bei 60°C und danach unter Vakuum bei 60°C für 48 h getrocknet. Mittels Elementaranalyse wurde die Thiol-beladung berechnet. VM_25: 800 µmol/g modifiziertes Kieselgel bezogen auf den Schwefel-Gehalt.

VIII Zusammenfassung

Die unterschiedlichen pharmakologischen Auswirkungen zweier enantiomerer Verbindungen auf Menschen, Tiere oder Pflanzen (sowohl positiver als auch negativer Natur) machen die Erforschung von neuen Enantiomerentrenntechniken notwendig. Analysen zur Enantiomerenreinheit und die gesetzlichen Anforderungen von Gesundheits- und Regulierungsbehörden können nicht mit „klassischen“ Trenntechniken erfüllt werden, sondern verlangen wirkungsvolle und hochselektive enantioselektive Techniken, wie beispielsweise Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie (HPLC). Hierbei sind sowohl chirale stationäre Phase als auch die Zusammensetzung der mobilen Phase entscheidend.

Im Rahmen der vorliegenden Masterarbeit wurden die auf *Cinchona*-Alkaloid-basierten zwitterionischen chiralen stationären Phasen (ZWIX-CSP`s) und die davon abgeleiteten, modifizierten 9-*epi*-ZWIX-CSP`s inklusive deren Evaluierung beschrieben.

Die Konfigurationsunterschiede der ZWIX(+)- und ZWIX(-)-Säulen konnten durch die umgekehrte Elutionsreihenfolge für dasselbe Enantiomer, unter gleichen chromatographischen Bedingungen, bestätigt werden. Das pseudo-enantiomere Verhalten wurde für alle getrennte Analyten bei beiden Selektortypen beobachtet. Die *N*-Methyl Aminosäuren zeigten auf ZWIX-Phasen überraschend eine Umkehr der Stereoselektivität gegenüber den nicht-methylierten Aminosäuren. Diese Umkehr der Elutionsreihenfolge ist nicht nur für die Bestimmung von Enantiomerenverunreinigungen besonders wichtig, sondern auch für die Mechanismen der chiralen Erkennung auf molekularer Ebene.

Die Epimerisierung der entsprechenden zwitterionischen Selektoren zeigte einen markanten Einfluss auf die relevanten chromatographischen Parameter. Die Herabsetzung der Enantioselektivität und Auflösung für die untersuchten Analyten auf 9-*epi*-ZWIX(+)-Typ CSP`s im Vergleich zur ZWIX(+)-Säule resultierte aufgrund der Neuorientierung der Carbamat-Reste am C9 in die nun entgegengesetzte Richtung in einer Änderung der molekularen bzw. enantioselektiven Erkennungsmechanismen. Die räumliche Struktur der

Bindungstasche wurde entschieden verändert, und damit auch die Stellung der intermolekularen Bindungsstellen zueinander.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit verdeutlicht, inwieweit die chirale Trennung durch die Art und Zusammensetzung der mobilen Phase beeinflusst werden kann. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen der verschiedenen Eluenten wie Lösungsmitteltyp und -menge sowie das Säure-Base-Verhältnis zeigten einen entscheidenden Einfluss auf das Retentionsverhalten der Analyten, wohingegen die Enantioselektivität weniger stark beeinflusst wurde. Ein Wasseranteil von 2% in der organischen mobilen Phase bewirkt deutliche kürze Retentionszeiten. Die Einführung von Wasser als meist eingesetztes Eluent (sogenanntes „bulk solvent“) ergab ein neues chromatographische Verhalten für zwitterionische CSP`s. Obwohl die Durchführung der ZWIX-CSP`s bei sehr hohem Wassergehalt und/oder in pufferfreien Elutionsmitteln global nicht empfohlen wird, zeigten die hier untersuchten cyclischen β -Aminosäuren, dass aufgrund des „intramolekularen counter-ion“ IMCI-Effekts und der Ausbalancierung der Solvatisierung und hydrophoben Wechselwirkungen die Retentionszeiten gut eingestellt werden können; unter Beibehaltung bis hin zu Verbesserung der Trenneffizienz der Enantiomere.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten, dass die ZWIX-CSP`s eine hervorragende chromatographische Trennleistungsfähigkeit für AX-, CX- und ZWIX-Modi bieten. Zusätzlich zeigen die neuen Erkenntnisse – im Speziellen die Erzielung von Enantiomerentrennungen mit reinem Wasser als mobile Phase für bestimmte Analyten auf ZWIX-CSP`s – das hohe Potential dieser einzigartigen CSP`s in der präparative Enantiomerenchromatographie unter einfachen Elutionsbedingungen auf.

IX Summary

Due to different pharmacological effects of enantiomeric compounds, both for humans, animals and plants (in a positive as well as negative way), research in the field of enantiomer separation techniques is of high importance *inter alia* in modern medicine. Analyzes of enantiomeric purity (enantiomeric excess, ee) and the legal requirements of health and regulatory authorities are not possible with "classical" separation techniques as e.g. RP systems, but require effective and highly enantioselective separation such as chiral high performance liquid chromatography (HPLC). In this context, both the type of chiral stationary phase as well as the composition of the mobile phase are crucial parameters to be optimized for the given set of chiral analytes.

In the present master thesis, zwitterionic *Cinchona* alkaloid-based chiral stationary phases (so-called ZWIX-CSP's) and related 9-*epi*-ZWIX-CSP's are described, including their chromatographic evaluation. The differences in the configurations of ZWIX(+) on the basis of quinine (QN) and (S,S)-ACHSA and of ZWIX(-) on the basis of quinidine (QD) and (R,R)-ACHSA were highlighted by a reversed elution order of respective enantiomers under the same chromatographic conditions, e.g. mobile phase composition. This pseudo-enantiomeric behavior was observed for all analytes. Using the above-mentioned ZWIX-CSP's, *N*-methyl amino acids surprisingly showed reversed stereoselectivity compared to respective non-methylated compounds. This unexpected reversal of the elution order is not only important for the determination of enantiomeric impurities, but also for fundamental research related to the chiral recognition mechanism. As a result of this behavior, the impact of the absolute configuration of the chiral selector-units on enantioseparation could be derived.

It turned out that the epimerization of the C-9 atom of the corresponding zwitterionic selectors had a significant impact on the chromatographic parameters of interest. A marked reduction of both enantioselectivity and chromatographic resolution for the analytes under examination – in case of 9-*epi*-ZWIX-CSP's compared to commercially available ZWIX-CSP's – was noticeable. It is a result of reorientation of the carbamate moieties at C9, which lead to a significantly

different shape of the stereoselective binding pocket of the chiral selector. Due to the epimerization, the conformation of the binding sites (also called “binding pockets”) got changed, the sites point now towards opposite directions, thus decreasing the strength of potential selector-selectand interactions.

A further important aspect of this work should demonstrate how the chiral separation is influenced by the type of mobile phase. Components variation of the composition of the eluents (differing in solvent type and quantity as well as the acid-base ratio) was shown to have a significant influence on retention and stereoselectivity. A marginal water content (2%) in the polar organic mobile phase caused significantly shorter retention times. The introduction of water as a so-called bulk solvent on the other hand revealed a new chromatographic behavior for zwitterionic CSP's. Although the implementation of ZWIX-CSP's at very high water content and/or buffer-free eluents was not recommended in previous studies, a reduction of retention time as well as baseline separation were achieved for e.g. cyclic β -amino acids due to the intramolecular counter-ion effect (IMCI-effect) as well as balanced effects of solvation and hydrophobic interaction.

In summary, the results of this work showed, that the ZWIX-CSP's provide excellent chromatographic separation performance both for AX-, CX- and ZWIX-modes (anion, cation and zwitterion exchange mode, respectively) by a proper choice of the mobile phase. Additionally, the new findings – in particular the achievement of enantiomer separation using pure water as a mobile phase for ZWIX-CSP's – show the high potential of this unique CSP's even for preparative chiral chromatography under relatively simple elution conditions.

X Anhang

Evaluierungsergebnisse für das Unterkapitel: *III.II.I Säulenvergleich ZWIX(+)*
vs. *ZWIX(-)*

Tabelle 8: Evaluierungsergebnisse von ZWIX(+) und ZWIX(-) für saure Verbindungen

Produkt	ZWIX(+)						ZWIX(-)					
	k_1	k_2	α	R	$N_{1[m-1]}$	$N_{2[m-1]}$	k_1	k_2	α	R	$N_{1[m-1]}$	$N_{2[m-1]}$
N-Me-Ala	0.92	1.02	1.11	0.94	5989	4616	0.55	0.60	1.10	0.67	7130	3842
N-Me-Val	0.69	0.86	1.25	1.72	5385	4743	0.25	0.33	1.32	0.94	3804	3417
N-Me-Leu	0.86	0.97	1.13	1.01	5074	4484	0.34	0.39	1.16	0.71	6641	3374
N-Me-Phe	1.02	1.10	1.08	0.87	9211	6654	0.36	0.36	1.00	0.00	1519	
N-Ac-Val	0.37	0.46	1.27	0.71	1547	1792	0.14	0.19	1.41	0.84	4515	4991
N-Ac-Phe	0.36	0.47	1.30	1.14	3899	3170	0.22	0.27	1.21	0.67	6787	3529
N-Ac-Trp	0.59	1.29	2.21	5.89	3531	4779	0.28	0.57	2.07	3.49	4216	4882
N-Cl-Ac-Trp	1.10	2.10	1.90	8.12	7341	7031	0.52	1.03	1.99	5.82	6179	6784
DNB-Leu	0.21	2.39	11.47	17.77	5219	6006	0.33	1.10	3.35	8.21	5414	5197
DNB-N-Me-Leu	0.23	2.62	11.63	16.60	3489	5528	0.32	1.19	3.67	8.54	4908	4749
DNZ-Phe	0.34	0.89	2.62	6.53	5832	6008	0.15	0.60	3.99	5.80	3766	6188
Fmoc-D,L-Cys(trt)-OH	0.67	0.76	1.13	1.02	6947	5895	0.57	0.57	1.00	0.00	2988	
Fmoc-D,L-Ser(tbu)-OH	0.21	0.30	1.43	1.37	6172	5517	0.24	0.24	1.00	0.00	2072	
Bz-ACHSA	0.12	0.32	2.60	2.77	4929	4711	0.26	0.33	1.25	0.99	6269	6042
ACHSA	2.95	3.17	1.07	1.13	7844	6364	1.44	1.52	1.06	0.66	8490	4831
Mecoprop	0.77	1.52	1.98	1.98	405	606	0.35	0.38	1.10	0.51	7487	4741
Dichlorprop	0.43	0.50	1.16	0.83	6023	3635	0.32	0.41	1.28	1.20	5344	5233
Trolox	0.21	0.24	1.10	0.31	7900	2861	0.27	0.27	1.00	0.00	4110	

Tabelle 9: Evaluierungsergebnisse von ZWIX(+) und ZWIX(-) für zwitterionische Verbindungen

Produkt	ZWIX(+)						ZWIX(-)					
	k ₁	k ₂	α	R	N _{1[m-1]}	N _{2[m-1]}	k ₁	k ₂	α	R	N _{1[m-1]}	N _{2[m-1]}
Ala	1.44	1.67	1.16	1.62	4937	5228	0.74	0.90	1.22	1.24	3678	2721
Val	1.24	1.64	1.32	2.84	4596	5257	0.66	0.93	1.41	2.05	2879	3056
Leu	1.31	1.66	1.27	2.34	4291	4575	0.72	0.96	1.33	1.85	3179	3378
Ile	1.14	1.51	1.32	1.25	1109	888	0.70	0.97	1.38	1.98	2553	3342
Met	1.54	1.79	1.16	0.76	1665	426	0.93	1.13	1.21	1.37	3413	2992
Pro	2.20	3.91	1.78	2.66	495	770	1.77	3.41	1.93	3.18	779	777
Phe	1.26	1.55	1.23	2.23	5547	5343	0.77	0.99	1.30	1.62	3062	2739
Trp	4.03	4.67	1.16	0.80	915	516	2.42	2.42	1.00	0.00	789	
α-Me-Val	0.96	0.96	1.00	0.00	1579		0.57	0.57	1.00	0.00	2085	
α-Me-Leu	0.78	0.89	1.14	0.88	4334	2629	0.44	0.51	1.17	0.85	5305	3777
α-Me-Ser	1.55	1.71	1.10	0.64	3115	528	0.85	1.04	1.23	1.35	3101	2950
α-Me-Phe	1.00	1.00	1.00	0.00	655		0.58	0.58	1.00	0.00	3407	
α-Me-p-Tyr	1.45	1.45	1.00	0.00	535		0.73	0.73	1.00	0.00	3410	
α-Me-DOPA	1.77	2.12	1.20	0.99	1122	1074	0.84	1.40	1.66	3.77	3192	3438
Pipe-1	1.00	1.15	1.14	1.08	4001	3762	0.61	0.74	1.21	1.13	3737	3336
allo-Ile	1.16	1.52	1.30	1.17	1099	846	0.70	0.97	1.38	2.10	3338	3384
H-Leu	1.68	2.29	1.36	2.61	1847	3485	1.20	1.62	1.35	2.63	3073	4279
H-tert.-Leu	1.38	1.95	1.41	3.77	4254	5615	1.38	1.96	1.42	3.63	4403	4524
tert.-Leu	1.67	2.59	1.55	4.25	2849	3810	1.17	1.93	1.65	4.40	3332	3681
Nor-Val	1.18	1.48	1.26	1.14	1393	1077	0.68	0.91	1.34	1.72	2681	2959
Nor-Leu	1.18	1.53	1.30	1.27	1259	1096	0.67	0.93	1.38	2.05	3273	3324
α-amino-n-buttersäure	1.81	2.26	1.25	1.38	1406	1329	0.93	1.24	1.34	1.91	2136	2926
Iso-Val	1.45	1.54	1.07	0.56	4732	2140	0.93	1.00	1.08	0.65	7602	2965
H-2-Nal-OH	2.72	3.36	1.23	1.45	1380	1319	1.59	2.00	1.26	2.16	3458	3445
M-15	8.55	9.12	1.07	1.09	7011	4299	4.61	5.03	1.09	1.33	5812	4701
M-16	10.59	10.90	1.03	0.61	13038	3808	5.74	5.83	1.02	0.33	19501	2557
TIC-1	2.20	4.02	1.83	2.52	300	730	1.38	2.52	1.83	4.07	1295	2238
TIC-3	2.31	3.07	1.33	0.70	182	193	1.40	1.98	1.41	1.59	813	968
H-Phe	1.66	2.00	1.20	0.98	1423	741	0.98	1.26	1.29	2.12	3837	3956
Aminophenylbuttersäure	0.91	1.35	1.48	3.11	3017	4368	0.50	0.71	1.43	2.46	4848	5977
DOPA	2.54	2.89	1.14	0.55	935	149	1.43	1.51	1.06	0.62	8226	2006
n-DOPA	5.33	7.87	1.48	3.51	394	3153	4.52	9.08	2.01	22.92	591	48463
4-Nitro-Phe	2.29	2.69	1.17	0.65	819	214	1.44	1.83	1.27	1.89	2675	2504
3-Nitro-Tyr	3.09	4.12	1.33	1.90	1008	1328	1.83	2.69	1.47	3.73	3022	3404

Tabelle 10: Evaluierungsergebnisse der Optimierungsversuche bezüglich mobiler Phase von 9-*epi*-ZWIX CSP 864 für chirale Analyten

Analyt	Bedingung	k ₁	k ₂	α	R	N _{1[m-1]}	N _{2[m-1]}
Leu	a	1.94	1.94	1.00	0.00		
	b	0.88	0.88	1.00	0.00		
	c	0.23	0.23	1.00	0.00		
	d	0.14	0.14	1.00	0.00		
	e	0.15	0.15	1.00	0.00		
Phe	a	2.95	2.95	1.00	0.00		
	b	0.21	0.21	1.00	0.00		
	c	0.14	0.14	1.00	0.00		
	d	0.21	0.21	1.00	0.00		
	e	0.21	0.21	1.00	0.00		
α-Me- <i>p</i> -Tyr	a	0.47	0.47	1.00	0.00		
	b	0.93	0.93	1.00	0.00		
	c	1.02	1.02	1.00	0.00		
	d	1.16	1.16	1.00	0.00		
	e	1.16	1.16	1.00	0.00		
α-Me-DOPA	a	5.45	5.45	1.00	0.00		
	b	1.81	1.81	1.00	0.00		
	c	0.29	0.29	1.00	0.00		
	d	0.21	0.21	1.00	0.00		
	e	0.21	0.21	1.00	0.00		
DNB-Leu	a	0.52	0.58	1.11	0.73	8378	3598
	b	0.36	0.40	1.11	0.55	9038	3527
	c	0.26	0.28	1.06	0.22	8458	3275
	d	0.25	0.28	1.11	0.42	9321	2841
	e	0.37	0.42	1.15	0.70	6005	3886
Bz-ACHSA	a	0.48	0.48	1.00	0.00		
	b	0.26	0.26	1.00	0.00		
	c	0.24	0.24	1.00	0.00		
	d	0.21	0.21	1.00	0.00		
	e	0.30	0.30	1.00	0.00		
Mfq.	a	0.94	1.01	1.08	0.67	7278	3761
	b	0.53	0.55	1.04	0.25	9343	2643
	c	0.19	0.19	1.00	0.00		
	d	0.10	0.10	1.00	0.00		
	e	0.18	0.18	1.00	0.00		

Tabelle 11: Evaluierungsergebnisse für Dipeptide unter Bedingung g für 9-*epi*-ZWIX CSP 864

Analyt	Bedingung	k_1	k_2	α	R	$N_{1[m-1]}$	$N_{2[m-1]}$
Ala-Val	g	0.17	0.51	3.08	2.22	1487	889
Ala-Phe	g	0.24	0.67	2.84	3.27	1471	2330
Ala-Arg	g	0.24	0.74	3.07	2.36	700	897
Gly-Val	g	0.20	0.35	1.72	0.69	638	524
Gly-Met	g	0.21	0.46	2.19	3.01	7313	853
Gly-Asp	g	0.22	0.50	2.32	3.99	9198	2423
Gly-Arg	g	0.21	0.37	1.80	2.17	7608	1576
Gly-Ser	g	0.16	0.49	3.15	3.95	6840	896
Phe-Ser	g	0.16	0.43	2.65	2.36	2815	1401
Ser-Ser	g	0.16	0.59	3.67	5.38	7465	2046

Tabelle 12: Evaluierungsergebnisse für 9-*epi*-ZWIX-(*R,R*)-ACHSA (CSP 864) und 9-*epi*-ZWIX-(*S,S*)-ACHSA (CSP 860)

Analyt	9- <i>epi</i> -ZWIX	k_1	k_2	α	R	EO
Ala	CSP 860	0.29	0.29	1.0	0.00	
	CSP 864	0.20	0.20	1.0	0.00	
Val	CSP 860	0.35	0.39	1.1	0.48	
	CSP 864	0.21	0.21	1.0	0.00	
Leu	CSP 860	0.36	0.40	1.1	0.48	<i>L</i> vor <i>D</i>
	CSP 864	0.21	0.21	1.0	0.00	
Phe	CSP 860	0.55	0.55	1.0	0.07	
	CSP 864	0.28	0.28	1.0	0.00	
Trp	CSP 860	0.95	1.17	1.2	1.74	<i>D</i> vor <i>L</i>
	CSP 864	0.34	0.34	1.0	0.00	

Evaluierungsergebnisse für das Kapitel: *V Studien zum Einfluss der mobilen Phase in Bezug auf Enantioselektivität, Auflösung und Retentionsverhalten für zwitterionischen CSP's ZWIX(+) und ZWIX(-)*

Tabelle 13: Einfluss von unterschiedlichen mobilen Phasen-Zusammensetzungen auf das chromatographische Verhalten bei zwitterionischen CPS's ZWIX(+) (blau) und ZWIX(-) (grün) für den Analyten rac-4b

MP	ZWIX(-)		ZWIX(+)		ZWIX(-)	ZWIX(+)
	k_1	R	k_1	R	α	α
a	0.96	1.36	1.90	1.73	0.28	0.30
b	1.52	0.79	1.93	0.60	0.36	0.26
c	0.22	1.32	1.35	1.53	0.43	0.50
d	2.12	0.91	2.20	0.06	0.33	0.17

Tabelle 14: Einfluss des Wassergehalts bei additivfreien mobilen Phasen bestehend aus Methanol/Acetonitril (1:1) und reinem Methanol in Bezug auf Retention und Selektivität für den Analyten rac-4a auf ZWIX(-)

H ₂ O %	Wasser in MeOH/ACN		Wasser in MeOH	
	k ₁	α	k ₁	α
0	2.53	0.06	1.48	0.17
2	2.05	0.06	1.34	0.27
6	1.43	0.18	0.81	0.31
10	1.09	0.20	0.57	0.33
20	0.52	0.23	-0.19	0.41

Evaluierungsergebnisse für das Unterkapitel: *V.I Einfluss von häufig eingesetzten Elutionsmitteln (Bulk Solvents) – in additivfreier mobile Phase – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)*

Tabelle 15: Einfluss von MeOH in ACN (ACN-MeOH Mischungen ohne Additive) auf Retention für alle 4 Analyten auf ZWIX(-), links: In k₁-Werte, rechts: In k₂-Werte

MeOH %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	MeOH %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
30					30				
40	3.11				40	3.51			
50	2.49	2.34	2.13	2.03	50	2.85	2.92	2.25	2.21
60	2.17	2.03	1.81	1.96	60	2.49	2.59	1.91	2.02
70	1.64	1.78	1.51	1.67	70	2.01	2.35	1.57	1.74
80	1.43	1.28	0.88	1.05	80	1.60	1.74	1.14	1.23
90	1.23	1.24	0.78	0.91	90	1.50	1.69	1.01	1.07
100	1.36	1.36	0.94	1.03	100	1.59	1.91	1.10	1.19

Tabelle 16: Einfluss von MeOH in ACN (ACN-MeOH Mischungen ohne Additive) auf Selektivität und Auflösung für alle 4 Analyten auf ZWIX(-), links: In α-Werte, rechts: In R-Werte

MeOH %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	MeOH %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
30	0.00				30				
40	0.40				40	0.65			
50	0.36	0.59	0.13	0.18	50	0.15	1.23	0.17	0.13
60	0.32	0.56	0.10	0.06	60	0.88	1.62	-0.24	-0.29
70	0.37	0.57	0.06	0.06	70	1.15	1.59	-0.40	-0.31
80	0.17	0.46	0.27	0.18	80	0.03	0.95	0.43	-0.12
90	0.26	0.46	0.23	0.16	90	0.28	0.72	0.12	-0.13
100	0.22	0.55	0.16	0.16	100	0.26	1.12	-0.11	-0.17

Evaluierungsergebnisse für das Unterkapitel: *V.I.I Einfluss von Wasser – in additivfreier mobiler Phase bestehend aus Methanol – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)*

Tabelle 17: Einfluss von Wasser (H₂O/MeOH Mischungen ohne Additive) auf die Retention für alle 4 Analyten bei ZWIX(-), links: In k_1 -Werte, rechts: In k_2 -Werte

H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
0	1.48	1.64	1.27	1.41	0	1.64	2.02	1.41	1.47
2	1.34	1.33	0.96	0.99	2	1.61	1.80	0.99	1.07
4	1.04	1.01	0.68	0.68	4	1.34	1.50	0.75	0.78
7	0.81	0.60	0.35	0.34	7	1.11	1.13	0.45	0.48
10	0.57	0.23	0.08	0.19	10	0.89	0.81	0.20	0.35
20	-0.19	-0.30	-0.22	-0.47	20	0.33	0.41	-0.04	-0.20
30	-0.58	-0.72	-0.23	-0.72	30	-0.11	-0.09	-0.07	-0.49
40	-0.51	-0.85	-0.23	-0.90	40	0.01	-0.14	-0.02	-0.60
50	-0.40	-0.94	-0.09	-1.00	50	0.10	-0.23	0.13	-0.69
60	-0.18	-0.93	0.25	-1.00	60	0.26	-0.24	0.46	-0.71
70	-0.01	-0.74	0.50	-0.98	70	0.41	-0.07	0.72	-0.70
80	0.21	-0.54	0.79	-0.91	80	0.56	0.05	0.98	-0.67
90	0.49	-0.18	1.08	-0.77	90	0.77	0.32	1.24	-0.58
95	0.61	-0.07	1.23	-0.76	95	0.86	0.38	1.38	-0.59
100	0.69	0.16	1.32	-0.58	100	0.91	0.55	1.45	-0.44

Tabelle 18: Einfluss von Wasser (H₂O/MeOH Mischungen ohne Additive) auf die Selektivität und Auflösung für alle 4 Analyten bei ZWIX(-), links: In α -Werte, rechts: In R-Werte

H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
0	0.17	0.38	0.15	0.06	0	0.14	1.09	0.03	-0.46
2	0.27	0.47	0.03	0.08	2	0.60	1.04	-0.65	-0.47
4	0.30	0.49	0.07	0.10	4	0.58	1.11	-0.51	-0.37
7	0.31	0.53	0.10	0.14	7	0.67	1.13	-0.42	-0.25
10	0.33	0.58	0.12	0.16	10	0.72	1.22	-0.30	-0.10
20	0.41	0.62	0.15	0.21	20	0.97	1.23	-0.13	0.06
30	0.47	0.67	0.17	0.25	30	0.99	1.00	-0.03	-0.02
40	0.52	0.71	0.21	0.31	40	1.09	1.07	0.14	0.06
50	0.50	0.71	0.22	0.31	50	1.03	1.12	0.29	0.18
60	0.47	0.68	0.22	0.29	60	1.16	1.21	0.56	0.09
70	0.42	0.67	0.22	0.28	70	1.06	1.11	0.52	0.11
80	0.35	0.59	0.19	0.24	80	1.09	1.24	0.62	-0.02
90	0.28	0.51	0.16	0.19	90	0.79	0.91	0.32	-0.29
95	0.25	0.45	0.15	0.17	95	0.73	1.05	0.28	-0.25
100	0.21	0.40	0.13	0.13	100	0.51	0.89	0.04	-0.38

Evaluierungsergebnisse für das Unterkapitel: *V.I.II Einfluss von Wasser – in additivfreier mobiler Phase bestehend aus Acetonitril – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(-)*

Tabelle 19: Einfluss von Wasser (H₂O/ACN Mischungen ohne Additive) auf die Retention für alle 4 Analyten bei ZWIX(-), links: ln k₁-Werte; rechts ln k₂-Werte

H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
0					0				
10					10				
15	2.30				15	1.78	1.44	0.69	1.32
20	2.71	1.36	1.44	0.69	20	0.88	0.75	0.34	0.58
30	3.00	0.48	0.29	0.21	30	-0.09	-0.39	-0.50	-0.57
40	3.40	-0.53	-1.01	-0.67	40	-0.58	-1.00	-0.94	-1.31
50	3.69	-1.06	-1.71	-1.14	50	-0.80	-1.46	-1.04	-1.81
60	3.91	-1.29	-2.61	-1.22	60	-0.74	-1.55	-0.83	-1.83
70	4.09	-1.19	-2.51	-1.01	70	-0.44	-1.26	-0.35	-1.79
80	4.25	-0.82	-1.91	-0.52	80	-0.11	-0.90	0.13	-1.20
90	4.38	-0.46	-1.55	-0.04	90	0.35	-0.35	0.70	-0.88
100	4.50	0.06	-0.90	0.53	100	0.97	0.68	1.52	-0.31

Tabelle 20: Einfluss von Wasser (H₂O/ACN Mischungen ohne Additive) auf die Selektivität und Auflösung für alle 4 Analyten bei ZWIX(-), links: ln α-werte, rechts ln R-Werte

H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
0					0				
10					10				
15	0.42	0.00	0.00	0.21	15	0.96			0.13
20	0.40	0.46	0.13	0.23	20	1.10	1.11	-0.46	0.22
30	0.44	0.62	0.17	0.28	30	0.74	0.56	-0.47	-0.02
40	0.48	0.83	0.21	0.34	40	0.53	0.34	-0.53	-0.35
50	0.49	1.16	0.18	0.52	50	0.34	0.13	-0.54	-0.55
60	0.45	0.96	0.18	0.45	60	0.27	-0.11	-0.55	-0.55
70	0.38	0.74	0.17	0.27	70	0.37	0.13	-0.24	-0.78
80	0.35	0.64	0.17	0.19	80	0.57	0.48	0.11	-0.60
90	0.30	0.55	0.16	0.17	90	0.78	0.65	0.23	-0.57
100	0.21	0.38	0.13	0.12	100	0.50	0.87	0.22	-0.45

Evaluierungsergebnisse für das Unterkapitel: *V.I.III Einfluss von Wasser – in additivfreier mobilen Phase bestehend aus Methanol – auf Retention, Selektivität und Auflösung bei ZWIX(+)*

Tabelle 21: Einfluss von Wasser (H₂O/MeOH Mischungen ohne Additive) auf die Retention für alle 4 Analyten auf ZWIX(+), links: ln k₁-Werte; rechts ln k₂-Werte

H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
0	2.32	2.92	2.08	2.16	0	2.48	3.02	2.15	2.23
10	1.03	1.21	0.99	0.86	10	1.41	1.81	1.12	1.11
20	0.34	0.32	0.54	0.18	20	0.87	0.99	0.74	0.53
30	0.03	-0.15	0.36	-0.30	30	0.64	0.59	0.61	0.12
40	-0.07	-0.41	0.38	-0.53	40	0.58	0.37	0.65	-0.08
50	-0.02	-0.50	0.53	-0.65	50	0.62	0.30	0.82	-0.19
60	0.07	-0.50	0.73	-0.67	60	0.70	0.31	1.02	-0.23
70	0.22	-0.37	0.95	-0.59	70	0.79	0.39	1.23	-0.20
80	0.34	-0.21	1.14	-0.55	80	0.86	0.50	1.41	-0.20
90	0.54	0.06	1.36	-0.52	90	0.98	0.69	1.61	-0.20
100	0.86	0.51	1.71	-0.26	100	1.22	1.02	1.92	-0.01

Tabelle 22: Einfluss von Wasser (H₂O/MeOH Mischungen ohne Additive) auf die Selektivität und Auflösung für alle 4 Analyten auf ZWIX(+), links: ln α-Werte; rechts ln R-Werte

H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d	H ₂ O %	rac-4a	rac-4b	rac-4c	rac-4d
0	0.16	0.10	0.07	0.06	0	-0.01	0.70	0.09	-0.23
10	0.38	0.60	0.13	0.25	10	1.08	1.27	0.08	0.62
20	0.54	0.67	0.20	0.35	20	1.27	1.44	0.48	0.82
30	0.62	0.74	0.24	0.42	30	1.43	1.52	0.57	0.82
40	0.65	0.79	0.27	0.44	40	1.43	1.54	0.78	0.80
50	0.65	0.80	0.29	0.46	50	1.47	1.53	0.91	0.84
60	0.63	0.81	0.29	0.44	60	1.49	1.54	0.92	0.80
70	0.58	0.77	0.28	0.39	70	1.46	1.52	0.97	0.68
80	0.52	0.71	0.27	0.35	80	1.38	1.49	0.93	0.60
90	0.44	0.63	0.25	0.31	90	1.20	1.38	0.74	0.44
100	0.35	0.51	0.21	0.24	100	0.84	1.11	0.44	0.15

Evaluierungsergebnisse für das Unterkapitel: *V.II.1 Typenvergleich von meist eingesetzten Elutionsmitteln und Additiven in Wasser für cyclische beta-Aminosäuren auf ZWIX(-)*

Tabelle 23: Retentionsvergleich (In k_1) von meist eingesetzten Elutionsmittel (Methanol und Acetonitril) und Additiven in Wasser auf der ZWIX(-)-Säule für die Verbindung rac-4b

H ₂ O %	MeOH	MeOH + 12.5mM AcOH	MeOH + 12.5mM AcOH + 6mM DEA	H ₂ O %	ACN	ACN + 12.5mM AcOH	ACN + 12.5mM AcOH + 6mM DEA
0	1.64	-0.32	1.59	0			
10	0.23	-0.45	0.18	10		2.12	2.05
20	-0.30	-0.74	-0.50	20	0.29	0.33	0.13
30	-0.72	-1.04	-0.83	30	-1.01	-0.23	-1.05
40	-0.85	-1.32	-0.96	40	-1.71	-0.70	-2.00
50	-0.94	-1.71	-0.95	50	-2.61	-0.84	-2.19
60	-0.93	-1.80	-0.87	60	-2.51	-1.03	-2.22
70	-0.74	-1.37	-0.57	70	-1.91	-0.88	-1.86
80	-0.54	-1.01	-0.34	80	-1.55	-0.62	-1.37
90	-0.18	-0.69	-0.02	90	-0.90	-0.40	-0.70
100	0.16	0.07	0.35	100	0.30	0.18	0.34

Tabelle 24: Retentionsvergleich (In k_2) von meist eingesetzten Elutionsmittel (Methanol und Acetonitril) und Additiven in Wasser auf der ZWIX(-)-Säule für die Verbindung rac-4b

H ₂ O %	MeOH	MeOH + 12.5mM AcOH	MeOH + 12.5mM AcOH + 6mM DEA	H ₂ O %	ACN	ACN + 12.5mM AcOH	ACN + 12.5mM AcOH + 6mM DEA
0	2.02	0.33	2.29	0			
10	0.81	0.06	0.91	10		2.63	2.49
20	0.41	-0.07	0.24	20	0.75	0.73	0.64
30	-0.09	-0.32	-0.08	30	-0.39	0.06	-0.42
40	-0.14	-0.63	-0.22	40	-1.00	-0.46	-1.14
50	-0.23	-0.82	-0.22	50	-1.46	-0.59	-1.32
60	-0.24	-0.86	-0.16	60	-1.55	-0.47	-1.51
70	-0.07	-0.64	0.04	70	-1.26	-0.29	-1.20
80	0.05	-0.42	0.20	80	-0.90	-0.10	-0.78
90	0.32	-0.16	0.43	90	-0.35	0.06	-0.19
100	0.55	0.43	0.72	100	0.68	0.52	0.71

Tabelle 25: Selektivitätsvergleich (In α) von meist eingesetzten Elutionsmittel (Methanol und Acetonitril) und Additiven in Wasser auf der ZWIX(-)-Säule für die Verbindung rac-4b

H ₂ O %	MeOH	MeOH + 12.5mM AcOH	MeOH + 12.5mM AcOH + 6mM DEA	H ₂ O %	ACN	ACN + 12.5mM AcOH	ACN + 12.5mM AcOH + 6mM DEA
0	0.38	0.66	0.69	0			
10	0.58	0.51	0.73	10		0.51	0.44
20	0.62	0.67	0.74	20	0.46	0.40	0.51
30	0.67	0.73	0.75	30	0.62	0.29	0.62
40	0.71	0.79	0.75	40	0.83	0.24	0.86
50	0.71	0.89	0.73	50	1.16	0.26	0.87
60	0.68	0.93	0.71	60	0.96	0.56	0.71
70	0.67	0.73	0.61	70	0.74	0.59	0.66
80	0.59	0.59	0.54	80	0.64	0.52	0.59
90	0.51	0.53	0.46	90	0.55	0.46	0.50
100	0.40	0.36	0.37	100	0.38	0.34	0.37

Tabelle 26: Auflösungsvergleich (In R) von meist eingesetzten Elutionsmittel (Methanol und Acetonitril) und Additiven in Wasser auf der ZWIX(-)-Säule für die Verbindung rac-4b

H ₂ O %	MeOH	MeOH + 12.5mM AcOH	MeOH + 12.5mM AcOH + 6mM DEA	H ₂ O %	ACN	ACN + 12.5mM AcOH	ACN + 12.5mM AcOH + 6mM DEA
0	1.09	0.74	2.23	0			
10	1.22	0.80	1.81	10		1.87	2.06
20	1.29	1.08	1.68	20	1.11	1.16	1.60
30	1.00	1.20	1.48	30	0.56	0.60	1.14
40	1.07	0.87	1.40	40	0.34	-0.05	0.52
50	1.12	0.85	1.30	50	0.13	-0.26	0.13
60	1.21	0.83	1.44	60	-0.11	0.05	0.13
70	1.11	0.72	1.36	70	0.13	0.24	0.32
80	1.24	1.09	1.27	80	0.48	0.51	0.60
90	0.91	0.62	1.22	90	0.65	0.68	0.93
100	0.89	0.50	1.05	100	0.87	0.52	0.80

X.I CURRICULUM VITAE

VEBI MIMINI B.Sc.

A-1030 Wien



AUSBILDUNG

- 10/2012-07/2015** Universität Wien, Wien, Österreich
Masterstudium Chemie
Thema: Herstellung und Evaluierung von CSPs auf Basis von Chinin/Chinidin sowie von 9-epi-Chinin/Chinidin
- 03/2008-07/2012** Universität Wien Wien, Österreich
Bakkalaureatstudium Chemie
Thema der Bachelorarbeit: Herstellung von Propargyloxyphenyl Carbamaten aus Chinchonanen, deren Immobilisierung auf Kieselgel und Evaluierung der zugehörigen chiralen Stationären Phasen (Betreuung: Prof. Wolfgang Lindner)
-

BERUFSERFAHRUNG

- 07/2012-02/2013** Universität Wien, Institut für Analytische Chemie Wien, Österreich
Synthese von chiralen Selektoren, Immobilisierung auf modifiziertem Kieselgel und chromatographische Evaluierung von CSPs
- 06/2008-07/2008** Uniplast Struga, Mazedonien
Praktikum: Erzeugung von Fiberglas Produkten
-

SPRACHKENNTNISSE

- Fließend** Deutsch, Mazedonisch, Serbo-Kroatisch, Albanisch
Gute Kenntnisse Englisch
Grundkenntnisse Bulgarisch
-

BESONDERE FÄHIGKEITEN & EDV-KENNTNISSE

- Analytische Verfahren** HPLC-UV/DAD/Corona, GC-MS, LC-MS, IR
- Office Produkte** Word, Excel, Powerpoint
Weiteres ChemStation, ChemSketch, ChemDraw, SciFinder, MestReC
- Interessen** Schach, Fußball
-

XI Literatur

- 1 *Diastereoselective discrimination of lysine-alanine-alanine peptides by zwitterionic cinchona alkaloid-based chiral selectors using electrospray ionization mass spectrometry* Bobbitt JM, Li L, Carlton DD Jr, Yasin M, Bhawal S, Foss FW Jr, Wernisch S, Pell R, Lindner W, Schug KA. **2012**
- 2 a). *Trends in the development of chiral drugs.* Caner et al., *Drug Discovery Today* **9** **2004**, 105-110
b). *Separation of enantiomers: Needs, challenges, perspectives.* Maier et al., *Journal of Chromatography.* **906** **2001**, 3-33
- 3 *Novel strong cation-exchange type chiral stationary phase for the enantiomer separation of chiral amines by high-performance liquid chromatography.* Hoffmann et al., *Journal of Chromatography A* **1161** **2007**, 242-251
- 4 *Strukturchemische Untersuchungen zu chiraler Erkennung am Beispiel eines immobilisierbaren chiralen Selektors,* Langner Diss., Düsseldorf, **2008**.
- 5 a). *Analytical chiral separation methods.* Davankov, V.A., *Pure & Appl. Chem.*, **1997**. **69** (7): p. 1469-1474.
b). *Stereoselective liquid chromatography.* *Chromedia Community. A web Infotope for the Practicing Chromatography.* Lämmerhofer, M., **2010** 01.21
- 6 E. H. Easson, E. Stedman, *Biochem. J.* **1933**, **27**, 1257.
- 7 *Stereoselective liquid chromatography.* *Chromedia Community. A web Infotope for the Practicing Chromatography.* Lämmerhofer, M., **2010** 01.21
- 8 C. E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.* **1952**, **137**, 3940.
- 9 W. Weiner, *Trends, Anal. Chem.*, **1987**, **6**, 125-134.
- 10 *Chromatogr. Racemattrennung neuer topologisch chiraler Isomere und Cycloenantiomere.* A. H. Yoneva, Diss. **2007**
- 11 *Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases.* Lämmerhofer, M., *J. Chromatogr., A*, **2010**. **1217**(6): p. 814-856.

-
- 12 *Considerations of Chiral Recognition Relevant to the Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers.* Pirkle, W.H., et al., *Chem. Rev.*, **1989**, 89: p. 347-362.
- 13 Lämmerhofer M., Maier N. M., Lindner W.: *Am. Lab.*, **1998**, 30, 71-78.
- 14 Franco P., Lämmerhofer M., Klaus P. M., Lindner W.: *J. Chromatogr. A*, **2000**, 869, 111-127.
- 15 Hoffmann C. V., Pell R., Lämmerhofer M., Lindner W.: *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 8780-8789.
- 16 Lämmerhofer M., Lindner W.: *Advances of Chromatography*, **2008**, 46, 1-107; ed. Eli Grushka, Nelu Grinberg; CRC Press.
- 17 *The Pursuit of Chiral Anion Exchange-Type Selectors: From Concept to Application. Chromatography Today*, Maier, N.M., **2009**. September: p. 3-9.
- 18 C.V. Hoffmann, R. Reischl, N.N. Maier, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* **2008** 1157.
- 19 C.V. Hoffmann, R. Reischl, N.N. Maier, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* **2008** 1147.
- 20 Development and Evaluation of Zwitterionic Chiral Stationary Phases., Pell R., *Diplomarbeit*. **2008**
- 21 *Synthesis and Evaluation of Arylcarbamoylated Cinchona-Based Chiral Anion Exchangers for HPLC* Hettegger, H., *Masterarbeit*, Universität Wien, **2012**,
- 22 *Quinine versus carbamoylated quinine-based chiral anion exchangers. A comparison regarding enantioselectivity for N-protected amino acids and other chiral acids.* Mandl et al., *Journal of Chromatography A* 858 **1999**, 1-11
- 23 Quinine and quinidine derivatives as chiral selectors. I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonan carbamates and their application as chiral anion exchangers. Lämmerhofer, M., et al., *J. Chromatogr., A*, **1996** 741(1): p. 33-48.
- 24 Direct high-performance liquid chromatographic separation of peptide enantiomers: Study on chiral recognition by systematic evaluation of the influence of structural features of the chiral selectors on enantioselectivity. Czerwenka, C., et al., *Anal. Chem.*, **2002**. 74 (21): p. 5658-5666.

-
- 25 a) G. D. H. Dijkstra, R. M. Kellogg, H. Wynberg, J. S. Svendsen, I. Marko, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8069;
b) G. D. H. Dijkstra, R. M. Kellogg, H. Wynberg, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6121;
c) F. I. Carroll, P. Abraham, K. Gaetano, S. W. Mascarella, R. A. Wohl, J. Lind, K. Petzoldt, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1991**, 3017.
- 26 J. Suszko, F. Szelag, *Bull. Int. Acad. Pol. Sci. Lett., Cl. Sci. Math. Nat., Ser. A* **1936**, 403;
b) J. Hiratake, M. Inagaki, Y. Yamamoto, I. Oda, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1987**, 1053.
- 27 *Studien zur Chemie der Cinchona Alkaloide.*, W. M. Braje, **1999** S. 58
- 28 a). L. Pasteur; *C. R. Hebd. Seance Acad. Sci.* **1848**, *26*, 535.
b). L. Pasteur; *C. R. Hebd. Seance Acad. Sci.* **1857**, *45*, 1032.
c). L. Pasteur: *C. R. Hebd. Seance Acad. Sci.* **1858**, *46*, 615.
- 29 J. C. Clark; G. H. Phillips; M. R. Steer *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1976**, 475.
- 30 Yamada, S.; Hongo, C.; Yoshioka, R.; Chibata, I. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 843-84
- 31 *Simple and efficient preparation of (R)- and (S)-enantiomers of alpha-carbon deuterium-labelled alpha-amino acids.* G. Mitulovic, M. Lämmerhofer, W. Lindner *J. Labelled Cpd. Rad.*, **2000** *43* (5), 449-461
- 32 S. K. Yang, Z. Bao, *Chirality* **1994**, *6*, 321.
- 33 *Racemisierung und dynamische kinetische Racematspaltung von Aminosäurederivaten und sekundären Alkoholen.* Daniel A. Schichl., **2001**
- 34 *Tetrahedron* *53*, **1997**, 9417
- 35 M. Lämmerhofer, O. Gyllenhaal, W. Lindner, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004** *35* 259
- 36 E. Tobler, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* **2000** *875* 341
- 37 E Tobler, M. Lämmerhofer, F. Wuggenig, F. Hammerschmidt, W. Lindner, *Electrophoresis* **2002** 462
- 38 R. Pell, S. Sić, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **2012** *1269* 287-296
- 39 G. Göktürk, M. Delzende, M. Volkan, *Spectrochim. Acta B* **2000** *55* 1063

-
- 40 M. Najafia, R. Rostamianb, A.A. Rafatib, *Chemical Engineering J.I* **2011**, 426–432
- 41 *Highly efficient immobilization of Cinchona alkaloid derivatives to silica gel via click chemistry.* Kacprzak, K.M., et al., *Tetrahedron Lett.*, **2006** 47 (49): p. 8721-8726
- 42 V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 **2002** 2596
- 43 K.M. Kacprzak, N.M. Maier, W. Lindner, *J. Chromatogr. A.* 1218 **2011** 1452
- 44 *Spectrophotometric determination of sulfhydryl concentration on the surface of thiol-modified chromatographic silica particles using 2, 2'-dipyridyl disulfide reagent.* R. Nogueira, M. Lämmerhofer, N. M. Maier, W. Lindner, *Anal. Chim. Acta*, **2005** 533 (2), 179-183
- 45 *Synthesis of 9-epi-Quinine and 9-epi-Quinidine.* G. Grethe, J. Gutzwiller, H. L. Lee and M. R. Uskokovic Chemical Research Department, Hoffmann-La Roche Inc; **1972**