

GRENZEN DER QUANTITATIVEN ENANTIOMERANALYTIK VON α -AMINOSÄUREN

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von

CLARISSA DOROTHEE MARZINI

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2007

Dekan: Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Volker Schurig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Albert

Mikel und meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2003 bis Dezember 2007 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. V. Schurig durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schurig für das interessante Thema, seine großzügige Unterstützung und den mir eingeräumten Freiraum bei der Durchführung dieser Arbeit.

ICH DANKE...

... Herrn Graeme Nicholson für seine Freundschaft, Unterstützung und unendliche Geduld bei den gaschromatographischen Messungen und den Experimenten zur Homochiralität.

... Frau Dr. Dorothee Wistuba für die hervorragende Zusammenarbeit auf dem Gebiet der chiralen Selektoren und für wertvolle Diskussionen und Anregungen.

... allen derzeitigen und ehemaligen Doktoranden und Mitarbeitern des Arbeitskreises, Dr. Leena Banspach, Dr. Anja Bogdanski, Harri Czesla, Dr. Zhengjin Jiang, Dr. Melanie Junge, Dr. Jingwu Kang, Diana Kreidler, Dr. Pavel Levkin, Anna Levkina, Sanja Locher, Dr. Alexander Ruderisch und Dr. Guiseppa Sicoli, für die gute Arbeitsatmosphäre.

... Herrn Prof. Lahav und seinen Mitarbeitern für die Kooperation im Zusammenhang mit der Kristallisation von Tyrosin und Herrn Prof. Nagel und seinen Mitarbeitern für die Synthese von *DL*-Tyrosin.

... Herrn Prof. Wiesmüller und seinen Mitarbeitern sowie Herrn Prof. Jung für die Kooperation bei der Synthese der Cyclohexapeptide und Homopolypeptide; insbesondere Frau Luise Schindler für die Synthese von Poly-*L*-Lysin₂₄.

... allen Mitarbeitern des chemischen Instituts für die Durchführung der Routinemessungen und für Lösungen kleinerer (Schlüssel, Schraubenschlüssel,...) und größerer Probleme (Kleinteile beim Säulenpacken, Computer am LC-MS,...).

... der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung durch ein Promotionsstipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs „Analytische Chemie“.

... meinen Eltern für ihre stete Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben.

... Mikel für die Ermutigungen, Diskussionen und kompetente Unterstützung.

Und Gott segnete den siebten Tag und erklärte ihn für heilig; denn an ihm ruhte Gott, nachdem er das ganze Werk der Schöpfung vollendet hatte.

Genesis 2,3

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 2 | DER URSPRUNG DES LEBENS..... | 2 |
| 2.1 | URATMOSPHERE UND URSUPPE..... | 3 |
| 2.2 | RNA-WELT-HYPOTHESE | 4 |
| 2.3 | MINERALIEN..... | 6 |
| 2.4 | HYDROTHERMALE SYSTEME | 7 |
| 2.5 | EISEN-SCHWEFEL-WELT | 8 |
| 2.6 | IMPFGUNG DURCH KOMETEN, METEORITEN ODER INTERSTELLARE MATERIE | 9 |
| 3 | HOMOCHIRALE PRÄFERENZ VON AMINOSÄUREN.. | 10 |
| 3.1 | DETERMINISTISCHER ANSATZ | 11 |
| | <i>Paritätsverletzung.....</i> | <i>11</i> |
| | <i>Thermodynamik</i> | <i>16</i> |
| | <i>Symmetriebruch durch Kristallisation.....</i> | <i>17</i> |
| 3.2 | KONVENTIONELLER ANSATZ..... | 18 |
| | <i>Adsorption an Mineralien.....</i> | <i>18</i> |
| | <i>Autokatalytische Reaktionen.....</i> | <i>19</i> |
| 3.3 | EXTRATERRESTRISCHER URSPRUNG..... | 19 |
| 3.4 | PROBLEMSTELLUNG | 20 |
| 4 | QUANTITATIVE ENANTIOMERANALYTIK..... | 22 |
| 4.1 | METHODEN ZUR ENANTIOMERENTRENNUNG..... | 22 |
| 4.2 | THEORIE DER VALIDIERUNG | 23 |
| | <i>Präzision (precision)</i> | <i>23</i> |
| | <i>Linearität</i> | <i>25</i> |
| | <i>Richtigkeit (accuracy).....</i> | <i>25</i> |
| | <i>Selektivität (selectivity).....</i> | <i>26</i> |
| | <i>Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i> | <i>26</i> |
| | <i>Angabe der Ergebnisse und verwendete Formeln.....</i> | <i>26</i> |
| 4.3 | VALIDIERUNG UNTER VERWENDUNG VON α -AMINOSÄUREN | 28 |
| | <i>Stationäre Phasen und Derivate in der Gaschromatographie</i> | <i>30</i> |
| | <i>Ofentemperatur und Detektor in der Gaschromatographie</i> | <i>33</i> |
| | <i>Optimierung der Integrationsparameter in der Gaschromatographie</i> | <i>34</i> |
| | <i>Arbeitsweise.....</i> | <i>38</i> |
| | <i>Kapillarelektrophorese.....</i> | <i>38</i> |
| | <i>UV-Detektion in der Kapillarelektrophorese</i> | <i>39</i> |
| | <i>Vergleich von verschiedenen Methoden und Selektoren</i> | <i>39</i> |
| | <i>Vergleich von repräsentativen DL-α-Aminosäuren.....</i> | <i>41</i> |
| | <i>Herstellung eines racemischen Tyrosin-Standards</i> | <i>45</i> |
| | <i>Einfluss der Injektionsmenge.....</i> | <i>47</i> |

| | |
|--|------------|
| <i>Linearität und Wiederfindung für angereichertes racemisches DL-Tyrosin</i> | 49 |
| <i>Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von D- und L-Tyrosin-Enantiomeren</i> | 50 |
| <i>Mischungen von D- und L-Tyrosin-Enantiomeren</i> | 52 |
| <i>Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Alanin</i> | 54 |
| 5 EXPERIMENTE ZUR HOMOCHIRALITÄT | 56 |
| 5.1 KRISTALLISATION VON TYROSIN | 56 |
| <i>Durchführung der Kristallisationen</i> | 58 |
| <i>Reinheit der verwendeten Tyrosin-Proben</i> | 60 |
| <i>Kristallisationsverlauf von Tyrosin in H₂O</i> | 62 |
| <i>Kristallisationsverlauf von Tyrosin in D₂O</i> | 70 |
| <i>Veränderung der Enantiomerenverhältnisse in Tyrosin-Racematen während der Kristallisation</i> | 75 |
| 5.2 RACEMISIERUNG VON ALANIN | 82 |
| <i>Thermische Beeinflussung der Enantiomerenanteile von Alanin-Racematen und – Enantiomeren in Gegenwart von Edelstahl</i> | 84 |
| <i>Simulation der hydrothermalen Bedingungen für racemisches Alanin im Fluss</i> | 86 |
| 5.3 DEUTEROLYSE VON POLYPEPTIDEN | 89 |
| <i>Optische Reinheit der Ausgangsverbindungen</i> | 91 |
| <i>Deuterium labelling-Methode</i> | 92 |
| <i>Racemisierungsstudie als Vorbereitung für die Peptiddeuterolyse</i> | 99 |
| <i>Enantiomerenzusammensetzung der D- und L-Polypeptide</i> | 101 |
| <i>Enantiomerenzusammensetzung von DL-Polypeptiden</i> | 103 |
| 6 CHIRALE SELEKTOREN..... | 106 |
| 6.1 POLYPEPTIDE ALS CHIRALE SELEKTOREN IN DER ELEKTROMIGRATION | 106 |
| <i>Poly-L-Lys und Poly-L-Glu als chirale Pufferadditive?</i> | 106 |
| 6.2 CYCLOHEXAPEPTIDE ALS CHIRALE SELEKTOREN | 107 |
| <i>Das reziproke chirale Erkennungsprinzip (RCEP)</i> | 108 |
| <i>Anbindung von DNP-D- und DNP-L-Alanin an Silica</i> | 109 |
| <i>Micro-HPLC</i> | 113 |
| <i>Micro-HPLC/ESI-MS-Kopplung</i> | 115 |
| 7 ANHANG..... | 118 |
| 7.1 MESSERGEBNISSE ZUR QUANTITATIVEN ENANTIOMERANALYTIK | 118 |
| 7.2 MESSERGEBNISSE ZUR KRISTALLISATION VON TYROSIN | 121 |
| <i>Bestimmung des Kristallisationsverlaufs mittels enantiomer labelling</i> | 121 |
| 8 EXPERIMENTELLER TEIL | 132 |
| 8.1 CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN | 132 |
| <i>Chemikalien</i> | 132 |
| <i>Umkristallisation von Tyrosin</i> | 134 |
| <i>Materialien</i> | 135 |
| 8.2 GERÄTE..... | 135 |
| <i>Gaschromatographie</i> | 136 |
| <i>Kapillarelektrophorese</i> | 136 |
| <i>Hochleistungsflüssigchromatographie</i> | 137 |
| 8.3 DERIVATISIERUNG VON α -AMINOSÄUREN..... | 138 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| | <i>N(O,S)-TFA/O-Et-Derivat, N(O,S)-TFA/O-Me-Derivat und N(O,S)-TFA/O-iProp-Derivat</i> | 138 |
| | <i>N(O)-EOC/O-Et-Derivat</i> | 139 |
| 8.4 | VALIDIERUNG..... | 139 |
| | <i>Einfluss der Injektionsmenge</i> | 139 |
| | <i>Angereichertes DL-Tyrosin</i> | 140 |
| | <i>Mischungen von D- und L-Tyrosin</i> | 140 |
| 8.5 | KRISTALLISATION VON TYROSIN..... | 141 |
| | <i>Untersuchung der Tyrosin-Proben auf Aminosäureverunreinigungen</i> | 141 |
| | <i>Verwendetes Wasser</i> | 142 |
| | <i>Bestimmung des Kristallisationsverlaufs in H₂O – enantiomer labelling</i> | 143 |
| | <i>Bestimmung des Kristallisationsverlaufs in D₂O – enantiomer labelling</i> | 144 |
| | <i>Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse in Tyrosin-Racematen während der Kristallisation</i> | 145 |
| 8.6 | BESTIMMUNG DER RACEMISIERUNG VON ALANIN..... | 149 |
| | <i>Erhitzung in einer Glasampulle</i> | 149 |
| | <i>Simulation der hydrothermalen Bedingungen</i> | 150 |
| 8.7 | DEUTEROLYSE VON POLYPEPTIDEN..... | 151 |
| | <i>Ausgangssubstanzen</i> | 151 |
| | <i>Abspaltung der Fmoc-Gruppe</i> | 151 |
| | <i>Deuterolyse</i> | 151 |
| | <i>Derivatisierung mit deuterierten Reagenzien als N(O,S)-TFA/O-Et-Derivat</i> | 152 |
| 8.8 | CHIRALE SELEKTOREN..... | 153 |
| | <i>Anbindung von DNP-D- und DNP-L-Alanin an Silica</i> | 153 |
| | <i>Packen von Kapillarsäulen</i> | 154 |
| 9 | ZUSAMMENFASSUNG | 157 |
| 10 | LITERATUR | 160 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------------------------|---|
| α | Trennfaktor |
| μ | idealer Mittelwert |
| σ | Standardabweichung |
| $\sigma_{rel.}$ | relative Standardabweichung |
| 1'' | Zoll (Inch) (2,54 cm) |
| % _G | Massenprozent (g in 100 g) ¹ |
| % _V | Volumenprozent (mL in 100 mL) ¹ |
| v/v | Volumenverhältnis (mL / mL) ¹ |
| AD | Außendurchmesser |
| Ac | Acetat |
| ACN | Acetonitril |
| amu | Atomare Masseneinheit (atomic mass units) ($1,66 \cdot 10^{-27}$ kg) |
| APS | Aminopropylsilica |
| BOC | <i>tert.</i> -Butoxycarbonyl |
| CE | Kapillarelektrophorese |
| Chirasil- <i>D</i> -Val | an Polysiloxan gebundenes <i>N</i> -Isobutanoyl- <i>D</i> -valin- <i>tert</i> -butylamid |
| Chirasil- <i>L</i> -Val | an Polysiloxan gebundenes <i>N</i> -Isobutanoyl- <i>L</i> -valin- <i>tert</i> -butylamid |
| CSP | Chirale Stationärphase |
| DAD | Diodenarray-Detektor |
| demin. | demineralisiert |
| DFDNB | 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol |
| DNP | 2,4-Dinitrophenyl |
| ee | Enantiomerenüberschuss von α -Aminosäuren |
| <i>EF</i> | Enantiomerenanteil (enantiomeric fraction) von α -Aminosäuren, bezogen auf das <i>D</i> -Enantiomer |
| EI | Elektronenstoßionisation |
| EOC | Ethoxycarbonyl |
| EOF | Elektroosmotischer Fluss |
| ESI-MS | Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer |
| FDNP | 5-Fluor-2,4-dinitrophenyl |

| | |
|------------------|---|
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| FMOC | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl |
| GC | Gaschromatographie |
| h | Stunden |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| HP- α -CD | Hydroxypropyl- α -cyclodextrin |
| HS- γ -CD | hochsulfatiertes γ -Cyclodextrin |
| ID | Innendurchmesser |
| k | Retentionsfaktor |
| Konz. | Konzentrationen werden entweder als Massenkonzentrationen [g / L] oder Stoffkonzentrationen [mol / L] angegeben (bzw. dezimale Vielfache davon). Die jeweilige Bedeutung ergibt sich aus dem Sinnzusammenhang. ¹ |
| Lipodex E | Octakis-(3- <i>O</i> -butanoyl-2,6-di- <i>O</i> - <i>n</i> -pentyl)- γ -cyclodextrin |
| LOD | Nachweisgrenze (limit of detection) |
| LOQ | Bestimmungsgrenze (limit of quantitation) |
| n | Anzahl der Messungen |
| min | Minuten |
| MOC | Methoxycarbonyl |
| MS | Massenspektrometer |
| MSD | Massenselektiver Detektor |
| m/z | Masse/Ladung-Verhältnis |
| NMR | Kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance) (s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; m: Multipllett) |
| NP | Normalphase |
| PEEK | Polyetheretherketon |
| PFP | Pentafluorpropionsäure |
| PFPA | Pentafluorpropionsäureanhydrid |
| r | Korrelationskoeffizient |
| r ² | Bestimmtheitsmaß |
| RP | Umkehrphase (reversed phase) |
| R _s | Auflösungsfaktor (Resolution) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | ideale Standardabweichung |

| | |
|-------------|--|
| SIM | Selected Ion Monitoring |
| <i>t</i> Bu | <i>tert.</i> -Butyl-Gruppe |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TFAA | Trifluoressigsäureanhydrid |
| TIC | Totalionenstrom-Chromatogramm (Total Ion Chromatogram) |
| UV | Ultraviolett |
| w_h | Peakhalbwertsbreite (Peak Width at Half Height) |
| x | Messwert |

1 EINLEITUNG

Seit bekannt ist, dass die Erde nicht den Mittelpunkt des Universums bildet, haben sich Menschen mit der Frage beschäftigt, ob es an anderen Orten im Weltall Leben gibt.² Die Existenz intelligenten außerirdischen Lebens konnte bisher noch nicht bewiesen werden. Umso mehr rückt die Frage in den Vordergrund, wie sich auf unserer Erde Leben gebildet hat und worin der Ursprung der Homochiralität von biogenen α -Aminosäuren liegt.^{3, 4, 5}

Im Altertum fand man in Schöpfungsmythen (beispielsweise in der Genesis) Antwort auf die Frage nach der Entstehung der Welt. Himmelsphänomene und die Furcht vor Naturgewalten beeinflussten das Leben unserer Vorfahren.^{6, 7} In der Antike standen Philosophen wie Thales (ca. 625 - 547 v. Chr.), Demokrit (ca. 460 - 375 v. Chr.) und Empedokles (ca. 482 - 425 v. Chr.) am Anfang der Naturphilosophie und äußerten Spekulationen über den Ursprung des Lebens.⁸ Aristoteles (384 - 322 v. Chr.), Schüler von Platon und einer der bedeutendsten griechischen Philosophen, deutete die Entstehung von Leben als Urzeugung (Lebewesen bilden sich spontan aus toter Materie unter Wärmeentwicklung) oder durch Fortpflanzung.^{6, 8} Die fast ausschließlich hypothetischen Überlegungen der griechischen Denker wurden erst viele Jahrhunderte später durch Experimente abgelöst. Eine der berühmtesten Beschreibungen, eine Art Anleitung zur Urzeugung im Kochtopf, findet man bei Johannes Baptista von Helmont (1579 – 1644). Im 18. Jahrhundert begann eine öffentliche wissenschaftliche Auseinandersetzung um die Urzeugungslehre zwischen dem britischen Priester John de Turbeville Needham (1713 - 1781), dem italienischen Gelehrten Lazzaro Spallanzani (1729 - 1799) sowie dem französischen Naturforscher Georges Louis Leclerc de Buffon (1707 - 1788). Louis Pasteur (1822 - 1895) gewann 1859 einen von der französischen Akademie ausgelobten Preis zur Frage der „spontanen Lebensentstehung“, nachdem er ähnliche Experimente wie Spallanzani hundert Jahre zuvor gemacht hatte.⁶ Charles Darwin (1809 - 1882) entwickelte zur selben Zeit wie Pasteur eine grundlegend veränderte Theorie des Weltbilds, aufbauend auf den Arbeiten des Zoologen Jean de Lamarck und den Ideen seines Großvaters, Erasmus Darwin, und veröffentlichte sie in seinem Buch „Entstehung der Arten“ 1859.^{3, 6, 9} Über den eigentlichen Ursprung des Lebens spekulierte Darwin lediglich in einem Brief von 1871, nicht in seiner Veröffentlichung. In einem „kleinen warmen Teich“ könnten unter dem Einfluss von Licht, Wärme und Elektrizität Ammonium- und Phosphorsalze die Bausteine erster Proteinverbindungen gewesen sein.^{3, 6}

2 DER URSPRUNG DES LEBENS

Leben, wie wir es kennen, gründet auf chemischen Verbindungen wie Aminosäuren oder Zuckern, die von Chiralität und damit durch stereogene Zentren, geprägt sind. Die Bezeichnung „Chiralität“ stammt vom griechischen „χείρ“, die Hand, und verweist auf die Spiegelbildlichkeit („Händigkeit“) von nicht-deckungsgleichen Molekülen. Die Enantiomere einer chiralen Verbindung verhalten sich zueinander wie linke und rechte Hand und sind damit inkongruent. Dabei stellt die homochirale Präferenz der Biomoleküle (*D*-Zucker und *L*-Aminosäuren), also das mengenmäßige Ungleichgewicht zwischen den Enantiomeren dieser Verbindungen, bis heute ein großes Rätsel dar. Die für die irdische Biochemie wichtigen molekularen Bausteine bestehen nahezu ausschließlich aus *D*-Zuckern (*D*-Ribose und 2-Desoxy-*D*-Ribose in Nucleinsäuren) und *L*-Aminosäuren (in Peptiden und Proteinen), wobei letztere Gegenstand dieser Arbeit sind.¹⁰ Die ausgeprägte homochirale Präferenz in lebenden Systemen ist eng verknüpft mit der Frage nach der Entstehung des Lebens auf der Erde. Es wurden verschiedene Theorien entwickelt, wie das Universum mit Raum und Zeit, fundamentalen Teilchen (Neutrinos, Quarks etc.) und den Naturkonstanten entstanden ist (Urknall etc). Die Entdeckung, dass Sterne durch Kernfusion aus Wasserstoff und Helium chemische Elemente höherer Ordnungszahl bilden können, führte zu einer Erklärung der Entstehung unseres Sonnensystems aus der interstellaren Materie.^{11, 12} Das Alter der Erde wird in der Literatur auf 4,6 Milliarden Jahre datiert. Bis vor ca. 4 Milliarden Jahren schlugen häufig Meteoriten auf unserem Planet ein. Im Lauf der Zeit ließen die vulkanischen Aktivitäten nach und die Erdkruste verfestigte sich. Vor ca. 3,5 Millionen Jahren begann die biologische Evolution. Die ältesten Einzeller-Fossilien sind ca. 3 Milliarden Jahre alt. Nach ungefähr einer weiteren Milliarde Jahre begann die erste Sauerstoffproduktion durch Photosynthese von algenartigen Einzellern, Bakterien und Pflanzen. Die Atmosphäre entwickelte sich dadurch zu einem Gasgemisch mit einer für höheres Leben geeigneten Zusammensetzung.^{13, 14, 15, 16, 17}

Für die Entstehung von einfachen Biomolekülen wie Aminosäuren, Nucleobasen und Zuckern existieren verschiedene Theorien. In **Abbildung 2-1** sind einige wichtige dargestellt, die im Weiteren kurz erläutert werden.

2 Der Ursprung des Lebens

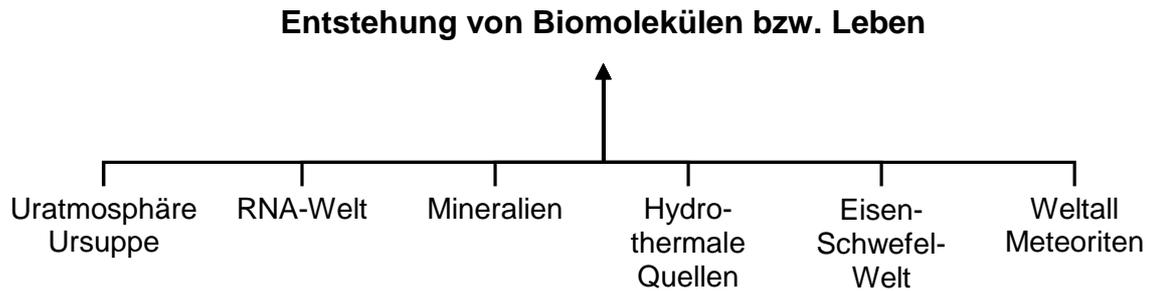


Abbildung 2-1: Verschiedene Theorien zur Entstehung von Biomolekülen beziehungsweise Leben auf der Erde.

2.1 URATMOSPHERE UND URSUPPE

Aleksander Ivanovich Oparin aus Moskau veröffentlichte 1924 das Buch „Der Ursprung des Lebens auf der Erde“ in russischer Sprache.¹⁸ Er ging davon aus, dass während des Abkühlens die Erde in eine reduzierende Uratmosphäre aus Wasserstoff und Ammoniak (ohne freien Sauerstoff) eingehüllt war. Kohlenstoff reagierte dabei mit Wasserstoff zu Methan und dieses dann mit Ammoniak zu den ersten Proteinbausteinen. Als Energiequelle dienten elektrische Entladung, solare Strahlung und Vulkanhitze. Die Proteine reagierten in einer „verdünnten Suppe“ miteinander zu immer komplexeren Verbindungen, und es entstand schließlich Leben. Durch Photosynthese produzierten diese ersten Organismen Sauerstoff.^{3, 6} 1929 publizierte John Burdon Sanderson Haldane unabhängig von den Ergebnissen von Oparin ähnliche Ideen. Jahre später schlossen sich Oparin und Haldane zusammen, und es entstand die *Oparin-Haldane-Hypothese*.^{3, 6, 19}

Die ersten grundlegenden Experimente wurden Mitte des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Der wohl bekannteste Versuch ist das *Urey-Miller-Experiment* (1953).^{20, 21} Miller entwickelte eine Apparatur, in die er ein Gasgemisch aus CH_4 , NH_3 , H_2O und H_2 einschloss. Neben Oparins Vorstellung von einer Uratmosphäre verwendete Miller dabei Ideen von Bernal und Urey. Durch elektrische Entladungen führte er dem System über mehrere Tage Energie zu und konnte anschließend Glycin, α -Alanin, β -Alanin sowie geringe Mengen an Asparaginsäure und α -Amino-*n*-buttersäure dünn-schichtchromatographisch nachweisen. Bemerkenswert daran ist, dass zwei sehr einfache proteinogene Aminosäuren sowie in

2 Der Ursprung des Lebens

geringer Menge eine C₅-Aminosäure entstanden war. Dieses Experiment schien die postulierte Ursuppe von Darwin, Oparin und Haldane zu beweisen.^{3, 6, 7} Allerdings hatte Rubey²² bereits 1951 darauf hingewiesen, dass die Uratmosphäre einen sehr hohen CO₂-Anteil enthielt. Mehrere Wissenschaftler reproduzierten, modifizierten oder widerlegten das Experiment in den darauf folgenden Jahren.^{3, 23, 24, 25}

Biomoleküle wie Di-, Oligo- oder Polypeptide und Proteine werden aus Aminosäuren unter Wasserabspaltung und Energiezufuhr gebildet (**Abbildung 2-2**). Die Aminosäuren müssen zur Peptid- bzw. Proteinbildung in einem aktivierten Zustand vorliegen (z. B. als Halogenid, Azid oder Ester der Aminosäuren oder durch aminosäureaktivierende Enzyme, beispielsweise Aminoacyl-tRNA-Synthetasen). In einer wässrigen Aminosäurelösung liegt das Gleichgewicht auf der Seite der freien Aminosäuren und nicht auf der Seite der Peptide. Die Halbwertszeit einer Peptidbindung beträgt bei Zimmertemperatur in reinem Wasser etwa sieben Jahre.³

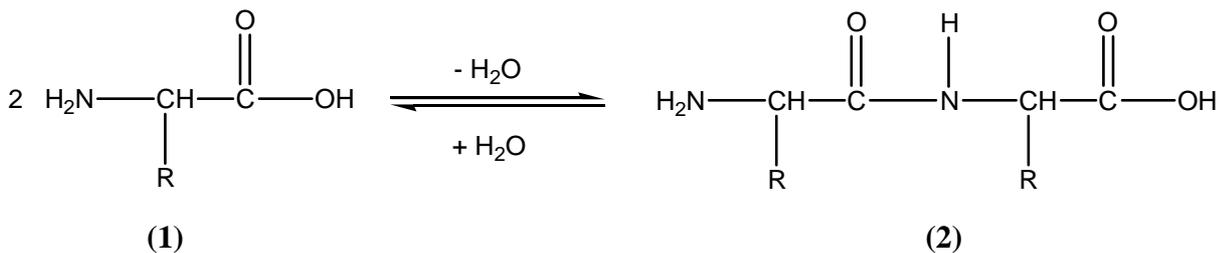


Abbildung 2-2: Reversible Bildung eines Dipeptids über eine Säureamidbindung aus zwei Aminosäuren unter Wasserabspaltung. Hydrolyse des Dipeptids führt wieder zu den Aminosäuren.

Sollten also Biomoleküle wie Peptide und Proteine in wässrigem Milieu entstanden sein, müssen zuerst die Probleme der Gleichgewichtseinstellung und Energiezufuhr zu Gunsten der Peptid- bzw. Proteinbildung überwunden werden.

2.2 RNA-WELT-HYPOTHESE

Neben den Proteinen sind für das heutige Leben auch die Nucleinsäuren (Ribonucleinsäure RNA und Desoxyribonucleinsäure DNA) von elementarer Bedeutung. Die Nucleobasen Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil und Thymin sind *N*-glycosidisch mit den Zuckerbausteinen

2 Der Ursprung des Lebens

D-Ribose bzw. 2-Desoxy-*D*-Ribose zu Nucleosiden verknüpft, welche mit Phosphorsäure zu Nucleotiden (Nucleosidmonophosphat) verestert werden. Dabei besitzt die RNA ein Poly-*D*-Ribonucleotid-, die DNA ein Poly-2-Desoxy-*D*-Ribonucleotid-Gerüst. In allen Zellen, vom Bakterium bis zum Säugetier, wird die genetische Information in der DNA ^{26, 27} gespeichert. Bei der Zellteilung wird diese von der DNA auf die messenger-RNA („Boten-RNA“, mRNA) überschrieben (Transkription), die dann bei der Proteinbiosynthese (Translation) die Abfolge der Aminosäuren steuert. ²⁸ Dabei wirken die DNA und die mRNA ausschließlich als Informationsträger, während Enzyme (aus Proteinen) und Ribozyme (aus RNA) für die Funktionsausführungen bzw. Katalyse verantwortlich sind. Die reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, kann die Synthese der DNA aus Einzelstrang-RNA katalysieren. ³

Als wesentliches Element der RNA-Welt wird ein RNA-ähnliches, selbstreplizierendes System postuliert, das der heutigen Proteinbiosynthese mit DNA etc. vorausging (**Abbildung 2-3**). ⁶ Die mehrfache Funktionalität der RNA, insbesondere ihre Fähigkeit zur Informationsspeicherung, katalytischen Aktivität und das Ausbilden von komplementären Matrizen für die Synthese von Polynucleotiden, legt die Frage nahe, wie sich ein dermaßen komplexes chemisches Systems entwickelt hat. Jedoch gelang bisher im Labor noch keine realistische Nucleotidsynthese unter den vereinfachten Bedingungen einer primitiven Erde. ³

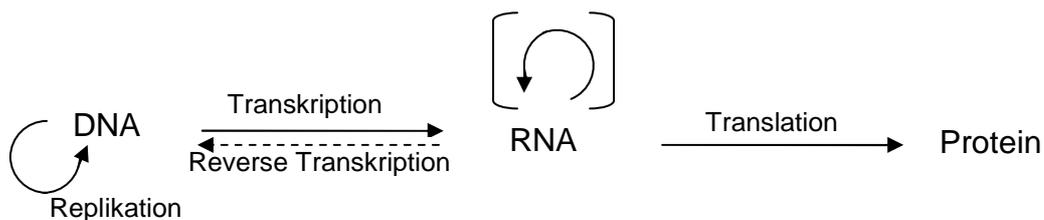


Abbildung 2-3: Die Theorie einer evolutionären Entstehung aus selbstreplizierender RNA. DNA entsteht hier durch reverse Transkription.

In der Literatur wird die Frage kontrovers diskutiert, ob Proteine, RNA bzw. selbstreplizierende RNA-Analoga oder eine sehr vereinfachte Prä-RNA-Welt chronologisch in der Evolution Vorrang hatten. ^{3, 6, 29}

2.3 MINERALIEN

Während in der Ursuppentheorie der Schwerpunkt auf der Bildung von organischen Molekülen in einer reduzierenden Atmosphäre und darauf aufbauender Evolution liegt, gibt es einen Ansatz, der Kristallagglomeraten von Tonmineralien die Fähigkeit zur Weiterentwicklung zuschreibt. Diese könnten als anorganische Vorläufer für die Entwicklung des Nucleinsäure-Protein-Systems auf der Urerde existiert haben.

U. Hoffmann deutete 1968 auf die katalytische Aktivität bei Prozessen an Tonmineralien und ihrer möglichen Bedeutung für die Lebensentstehung hin.³⁰ Fünf Jahre zuvor erwähnte bereits Armin Weiss die Einlagerung von Aminosäuren und Proteinen in glimmerartige Schichtsilikate.³¹ 1981 veröffentlichte er den Artikel „Replikation und Evolution in anorganischen Systemen“,³² in dem er Tonmineralien (Montmorillonit) als erste primitive Lebensformen (Protoleben) diskutierte. In dieser Publikation wird der experimentelle Nachweis zur Replikation von Tonmineralien beschrieben. Es handelt sich dabei um eine sehr vereinfachte Replikation, jedoch ähnlich der von DNA. In einer anderen Publikation vertritt Graham Cairns-Smith die Meinung, dass das erste Material mit der Fähigkeit, sich zu vervielfältigen und Informationen zu übertragen, aus sehr einfachen Stoffen bestanden hat, die auf der Urerde überall vorhanden waren. Dieses erste primitive „Gen“-Material könnten Tonmineralien („Ton-Gene“) oder eventuell auch andere Mineralien gewesen sein.³³

Tabelle 2-1: Die wichtigsten Tonmineralien und ihre Summenformeln.³⁴

| | |
|--------------------------|---|
| Kaolinit | $\text{Al}_2(\text{OH})_4[\text{Si}_2\text{O}_5]$ |
| Illit (bspw. dioktaedr.) | $(\text{K}, \text{H}_3\text{O})_y\{\text{Mg}_3(\text{OH})_2[\text{Si}_{4-y}\text{Al}_y\text{O}_{10}]\}$ ($y = 0.7 - 0.9$) |
| Montmorillonit | $\text{Na}_{0.33}\{(\text{Al}_{1.67}\text{Mg}_{0.33})(\text{OH})_2[\text{Si}_4\text{O}_{10}]\}$ |
| Vermiculit | $(\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O})_{0.33}\{(\text{Mg}, \text{Fe}^{\text{III}}, \text{Al})_3(\text{OH})_2[\text{Al}_{1.25}\text{Si}_{2.75}\text{O}_{10}]\}$ |
| Glimmer | $\text{K}\{(\text{Mg}, \text{Fe}, \text{Mn})_3(\text{OH}, \text{F})_2[\text{AlSi}_3\text{O}_{10}]\}$ |
| Serpentin (Antigorit) | $\text{Mg}_3(\text{OH})_4[\text{Si}_2\text{O}_5]$ |
| Talk | $\text{Mg}_3(\text{OH})_2[\text{Si}_2\text{O}_5]_2$ |
| Pyrophyllit | $\text{Al}_2(\text{OH})_2[\text{Si}_2\text{O}_5]_2$ |

2.4 HYDROTHERMALE SYSTEME

Bis 1977 sind viele Wissenschaftler davon ausgegangen, dass Leben direkt an oder knapp unter der Meeresoberfläche entstanden ist und Sonnenlicht die wesentliche Energiequelle für chemische Prozesse war.^{3,6}

Dann entdeckten Tiefseeforscher in ca. 2500 m Tiefe bei den Galapagos-Inseln die ersten hydrothermalen Quellen, vulkanähnliche Schloten am Meeresboden (**Abbildung 2-4**). Magma mit einer Temperatur von bis zu 1200 °C steigt aus dem Erdmantel auf und schiebt die Meeresplatten auseinander. Der Ozeanboden spreizt sich auf (see floor spreading), kaltes Meerwasser dringt ein, wird auf einige hundert Grad Celsius unter Drücken von mehreren hundert bar erhitzt und strömt anschließend wieder ins Meer. Dabei löst das aufsteigende Wasser Mineralien, unter anderem Metallsulfide, die das Wasser schwarz färben („schwarzer Rauch“), und Gase aus dem Basaltgestein und durchläuft einen Temperaturgradienten von 350 - 2 °C.^{3,4,6}

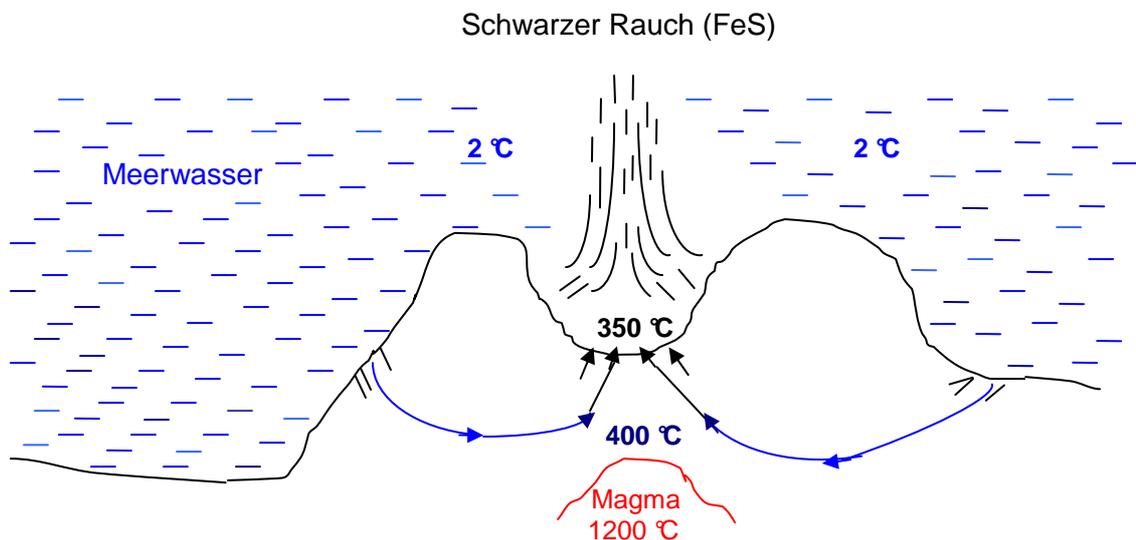


Abbildung 2-4: Schematische Skizze einer hydrothermalen Tiefseequelle am Meeresboden (Black Smoker).

Erstaunlicherweise existieren verschiedene Lebewesen in diesen hydrothermalen Regionen, die ohne Sonnenlicht und Photosynthese auskommen. Die „ältesten“ Mikroorganismen, die Archaea, dienen dabei wirbellosen Tieren (Muscheln, langen Röhrenwürmern und weißen

2 Der Ursprung des Lebens

Krebsen) als Nahrungsquelle. ^{35,36,37} Standorte mit extremen Bedingungen wie hohe Temperaturen (Thermophilie), konzentrierte Salzlösungen (Halophilie), Säuren (Acidophilie) oder extreme Drücke (Barophilie) sind für die Archaeobakterien lebensnotwendig. ³⁸

Geologen nehmen an, dass solche hydrothermalen Aktivitäten auch für die Uerde und die Entstehung des Lebens eine wichtige Rolle spielten. ^{3, 39} Holm *et al.* ⁴⁰ führten unter Simulation dieser Bedingungen Versuche zur abiotischen Synthese⁴¹ und Stabilität⁴² von Aminosäuren durch. Brandes *et al.* ⁴ stellten bei ähnlichen Versuchen fest, dass Leucin in Wasser bei 200 °C und unter Druck durch Zugabe von Eisensulfid-Mineralien über mehrere Tage hinweg vor thermischer Zersetzung geschützt werden konnte.

2.5 EISEN-SCHWEFEL-WELT

Nachdem anorganische Mineralien bereits als Protoleben diskutiert wurden, stellte Günter Wächtershäuser 1988 ⁴³ eine neue umfassende Theorie zur Evolution vor (Chemoautotropher Lebensursprung). Leben soll demnach auf der positiv geladenen Oberfläche von Eisen-Schwefel-Verbindungen entstanden sein. Verbindungen mit negativer Partialladung bzw. negativ geladene Moleküle (RCOO^- , RS^- , RO-PO_3^{2-}) binden leicht an diese Oberfläche, was unter anderem zur Fixierung von CO_2 führt. In dem dabei entstehenden Redox-System dient die aus der Oxidation von FeS zu Pyrit („Katzengold“, FeS_2) frei werdende Energie der reduktiven Synthese wichtiger Biomoleküle. So entstehen z.B. aus dem oberflächen-gebundenen CO oder CO_2 Kohlenwasserstoffe. ^{44,45}



Wächtershäuser versucht zusätzlich, den gesamten Stoffwechsel auf Reaktionen der *Eisen-Schwefel-Welt* zurückzuführen. Es gibt Vorschläge für mögliche Nucleinsäure-Vorläufer, ⁴⁶ den reduktiven Zitronensäurezyklus, und es wurden beispielsweise Synthesen von Pyruvat ⁴⁷ unter Bedingungen der *Eisen-Schwefel-Welt* erfolgreich durchgeführt. Für diese Theorie gibt es sowohl biologische als auch kinetische und thermodynamische Argumente. Zum Einen ist für den Transport zu oder von der Oberfläche kein limitierender Transfer durch eine Membran erforderlich. Zum Anderen laufen chemische Reaktionen an Oberflächen meistens schnell

2 Der Ursprung des Lebens

(Kinetik) und mit großer Wahrscheinlichkeit (Entropie) ab, wobei eine Wand als Stoßpartner aus thermodynamischen Gründen von Vorteil ist (Enthalpieübertragung). In diesem Zusammenhang sei auf Mechanismen der heterogenen Katalyse verwiesen. Die Eisen-Schwefel-Theorie ist kompatibel mit der Hypothese der hydrothermalen Quellen („Das Leben entstand in einer Art Hölle und versucht seither, ins Paradies zu kommen“).⁷

2.6 IMPFUNG DURCH KOMETEN, METEORITEN ODER INTERSTELLARE MATERIE

Bereits 1961 vermutete John Orò, dass Biomoleküle oder deren Vorstufen über Kometen auf die Erde gelangten.⁴⁸ Es wird mittlerweile angenommen, dass trotz der hohen Temperaturen, die bei einer Kollision eines Kometen mit der Erde entstehen, 0,1 % der relevanten Moleküle intakt bleiben.³ Im Murchison-Meteorit, der 1961 auf dem australischen Kontinent einschlug, konnten Aminosäuren,⁴⁹ Hydroxy-,⁵⁰ Phosphon- und Sulfonsäuren⁵¹ sowie weitere organische Verbindungen nachgewiesen werden, was auf deren Existenz im Weltall schließen läßt. Sydney Leach stellte fest, dass selbst große organische Moleküle sowie chemische Verbindungen, die für die Entstehung des Lebens bedeutsam sind, im Weltall auftreten und folglich auch unter lebensfeindlichen Bedingungen (sehr hohe und tiefe Temperaturen, ionisierende Strahlung) stabil sein können.^{52, 53} Anhand von molekularen Absorptionslinien wurden mittlerweile viele organische Moleküle im interstellaren Raum nachgewiesen. Inwieweit der Einfluss von (zirkular) polarisierter Strahlung eine Rolle spielt, wird derzeit noch diskutiert.^{11 c) – e), 12}

3 HOMOCHIRALE PRÄFERENZ VON AMINOSÄUREN

Auf die Verknüpfung von irdischem Leben und der Tatsache, dass viele für das Leben essentielle biochemische Verbindungen sich durch stereogene Zentren auszeichnen, wurde bereits hingewiesen. Es existieren verschiedene Ansätze, die Entstehung der Homochiralität von α -Aminosäuren auf der Erde zu erklären. In **Tabelle 3-1** werden davon einige wichtige genannt. Ausführliche Übersichtsartikel zu diesem Thema wurden von Bonner⁵⁴ und Quack⁵⁵ verfaßt.

Tabelle 3-1: Verschiedene Hypothesen zur Entstehung der homochiralen Präferenz von α -Aminosäuren auf der Erde.

| Erklärungsansatz | Ursache | Mechanismus |
|------------------|------------------------------|--|
| deterministisch | Paritätsverletzung | - Thermodynamik - Symmetriebruch durch Kristallisation |
| konventionell | Zufall | - Adsorption an Mineralien - Autokatalytische Reaktionen |
| alternativ | Extraterrestrischer Ursprung | - Zirkular polarisierte Strahlung - Stofftransport durch Meteoriten |

Die Hypothesen in **Tabelle 3-1** lassen sich in deterministische und konventionelle Ursachen unterteilen. Die deterministischen Hypothesen gehen davon aus, dass fundamentale Naturgesetze für die Bevorzugung eines der beiden Enantiomere verantwortlich sind (energetischer Unterschied in den physikochemischen Wechselwirkungen). Dagegen liegt den konventionellen Hypothesen die Annahme zugrunde, dass es durch Zufälle zum Symmetriebruch in der statistischen Gleichverteilung von *D*- und *L*-Enantiomeren kam. Eine zeitliche oder räumliche Störung des Gleichgewichtes führte damit zur homochiralen Biosynthese von aus den reinen Enantiomeren zusammengesetzten Molekülen. In der Literatur scheinen die konventionellen Hypothesen jedoch derzeit eine untergeordnete Rolle zu spielen.³

3.1 DETERMINISTISCHER ANSATZ

Paritätsverletzung

Für eine deterministische Erklärung der Homochiralität von biogenen α -Aminosäuren kommt dem Begriff der Symmetrie selbst eine zentrale Stellung zu. Es wird dahingehend argumentiert, dass sich die Enantiomere eines Moleküls nicht nur in der räumlichen Anordnung ihrer Atome unterscheiden, sondern auch in ihren Energien bzw. Wechselwirkungen mit der Umgebung. Dies widerspricht offensichtlich der in der Chemie üblichen Annahme, dass Enantiomere mit Ausnahme ihres sterischen Aufbaus bzw. ihres chiroptischen Verhaltens in allen physikochemischen Größen übereinstimmen. Damit stellt sich die Frage, welche physikalischen Parameter eines Moleküls durch räumliche Inversion beeinflussbar sind. Wegen der hierarchischen Gliederung von Molekülen, dem sterischen Aufbau aus Atomen, die wiederum aus Elementarteilchen bestehen, liegt es nahe, bei den physikalischen Elementarteilchen und ihren Wechselwirkungen nach asymmetrischen Eigenschaften zu suchen. Darauf aufbauende Strukturen, nämlich chemische und biologische, wären damit durch Gesetze der Elementarteilchenphysik mitbestimmt.⁵⁶ Auf diesem Weg kommt man zum Phänomen der Paritäts- oder Symmetrieverletzung im Atomkern. Zunächst soll näher erläutert werden, welche Rolle der Begriff der Parität in der Quantenmechanik spielt. Danach folgen die Verknüpfung mit kernphysikalischen Wechselwirkungen und die mögliche Bedeutung für Moleküle.

In den Eigenwertgleichungen der Quantenmechanik wirkt ein Operator, der eine physikalisch beobachtbare Größe wie zum Beispiel Energie, Drehimpuls oder Spin formuliert, auf eine Wellenfunktion φ . Wegen verschiedener Randbedingungen (φ sei stetig, normierbar und eindeutig) erhält man Lösungen für die Wellenfunktionen, die damit zu Eigenfunktionen werden, und diskrete Eigenwerte, die physikalisch messbar sein können. In der Schrödingergleichung formuliert man den Hamiltonoperator \mathbf{H} , der sich aus dem Operator \mathbf{T} der kinetischen Energie und dem Operator \mathbf{V} der potentiellen Energie additiv zusammensetzt, in Anlehnung an die Hamiltonfunktion, die in der klassischen Physik einer Summe aus kinetischer (T) und potentieller Energie (V) entspricht (Bewegung in einem Feld). Die Schrödingergleichung mit dem Eigenwert E lautet:

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

$$\mathbf{H}\varphi = E\varphi$$

Bei Mehrteilchenproblemen ergibt sich für φ eine Abhängigkeit von mehreren Variablen, die die Ortsvektoren der Teilchen darstellen: ⁵⁷

$$\varphi(x_1, y_1, z_1; x_2, y_2, z_2; \dots) = \varphi(\mathbf{x}).$$

Führt man eine räumliche Spiegelung \mathbf{P} im invarianten Feld durch, d. h. $V(\mathbf{x}) = V(-\mathbf{x})$, gilt: ⁵⁷,
58

$$\varphi(x_1, y_1, z_1; x_2, y_2, z_2; \dots) \rightarrow \varphi(-x_1, -y_1, -z_1; -x_2, -y_2, -z_2; \dots),$$

$$\mathbf{P}\varphi(\mathbf{x}) = \varphi(-\mathbf{x}) \quad \text{per definitionem.}$$

Da in der kinetischen Energie wegen des Quadrats des Impulses das Vorzeichen der Ortskoordinate keine Rolle spielt, erhält man $T(\mathbf{x}) = T(-\mathbf{x})$, und wegen $V(\mathbf{x}) = V(-\mathbf{x})$ bzw. $\mathbf{H}(\mathbf{x}) = \mathbf{H}(-\mathbf{x})$ gilt:

$$\mathbf{H}\varphi(-\mathbf{x}) = E\varphi(-\mathbf{x}).$$

Da $\varphi(\mathbf{x})$ Eigenfunktion der Schrödingergleichung zum Eigenwert E ist, muss im Falle von Nichtentartung (d. h. es existiert nur eine Eigenfunktionen zu einem Eigenwert) gelten: ⁵⁷

$$\varphi(-\mathbf{x}) = \lambda\varphi(\mathbf{x}), \lambda = \text{konst.}$$

Die Eigenwertgleichung des Paritätsoperators mit dem Eigenwert λ lautet ⁵⁸

$$\mathbf{P}\varphi(\mathbf{x}) = \lambda\varphi(\mathbf{x}).$$

Damit erhält man $\mathbf{P}\mathbf{P}\varphi(\mathbf{x}) = \mathbf{P}(\lambda\varphi(\mathbf{x})) = \lambda\lambda\varphi(\mathbf{x}) = \lambda^2\varphi(\mathbf{x}) = \varphi(\mathbf{x})$ mit $\lambda = \pm 1$.

Die Wellenfunktionen φ besitzen in diesem Fall analog zu geraden bzw. ungeraden Funktionen in der Mathematik Symmetrieeigenschaften: ⁵⁹

$$f(-x) = f(x) \text{ für gerade Funktionen (z. B. Cosinus)}$$

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

$f(-x) = -f(x)$ für ungerade Funktionen (z. B. Sinus).

Im Operator der potentiellen Energie hat eine Inversion dann keinen Einfluss, wenn es sich um ein spiegelungsinvariantes Potential handelt (idealerweise ein kugelsymmetrisches Feld). In diesem Fall kommutiert der Paritätsoperator mit dem Hamiltonoperator, d. h. $[\mathbf{P}, \mathbf{H}] = 0$. Den Eigenwerten λ werden dann folgende Eigenfunktionen zugeordnet:⁵⁸

$$\lambda = +1: \varphi_+(x) = \varphi_+(-x),$$

$$\lambda = -1: \varphi_-(x) = -\varphi_-(-x).$$

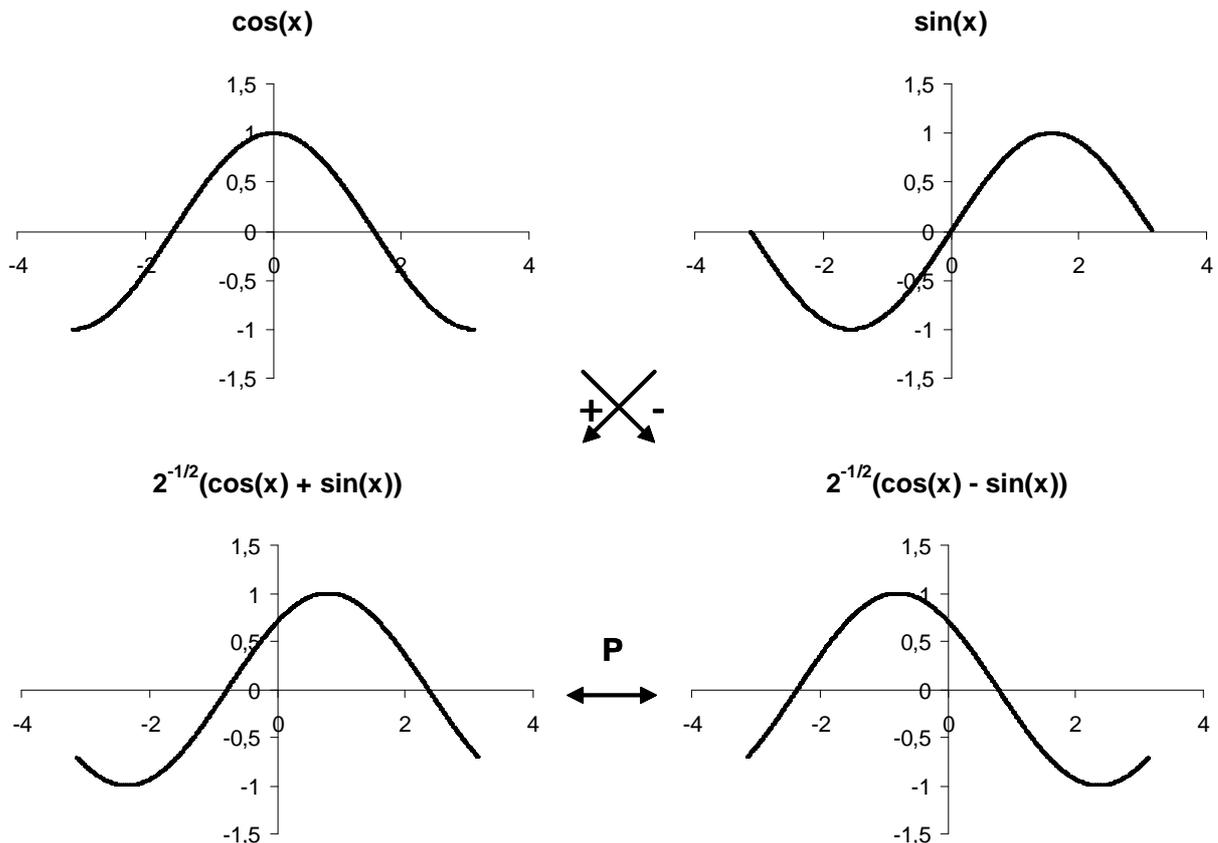
Dabei steht +1 (unitär) für eine gerade Funktion und -1 (antiunitär) für eine ungerade Funktion. Die geraden Funktionen haben gerade Parität, die ungeraden Funktionen dagegen ungerade Parität. Während für die Eigenfunktionen φ_+ und φ_- die jeweilige Parität eindeutig definiert ist, gilt dies nicht für die daraus zusammengesetzten Funktionen φ_1 und φ_2 :⁶⁰

$$\varphi_1 = 2^{-1/2}(\varphi_+ + \varphi_-) \text{ bzw.}$$

$$\varphi_2 = 2^{-1/2}(\varphi_+ - \varphi_-),$$

$$\text{mit } \mathbf{P}\varphi_1 = \varphi_2$$

$$\text{und } \mathbf{P}\varphi_2 = \varphi_1.$$



3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

Am Beispiel von $\varphi_+ = \cos(x)$ und $\varphi_- = \sin(x)$ erhält man die neuen Funktionen

$$\varphi_1 = 2^{-1/2} (\cos(x) + \sin(x)) \text{ und } \varphi_2 = 2^{-1/2} (\cos(x) - \sin(x)) \text{ mit}$$

$$\mathbf{P}(\cos(x) + \sin(x)) = \cos(-x) + \sin(-x) = \cos(-x) - \sin(x) = \cos(x) - \sin(x) \text{ bzw.}$$

$$\mathbf{P}(\cos(x) - \sin(x)) = \cos(-x) - \sin(-x) = \cos(-x) + \sin(x) = \cos(x) + \sin(x).$$

Man erkennt sofort, dass \mathbf{P} und \mathbf{H} weiterhin kommutieren, aber dass es zu φ_1 und φ_2 keine Eigenwerte für \mathbf{P} gibt. Bei Enantiomeren gilt, dass wegen der Paritätserhaltung des Hamiltonoperators sich die Energieeigenwerte für \mathbf{H} nicht unterscheiden, wenn die gemischt paritätischen Zustände sich nicht überlagern. Diese Voraussetzung wird aber nicht erfüllt, wenn der Tunneleffekt eine Rolle spielt. In diesem Fall kommt es zu einer Energiedifferenz, die im Hamiltonoperator durch einen paritätsverletzenden Term \mathbf{V}_{eN}^{PV} Ausdruck findet.^{61, 62, 63, 64, 65, 66} Paritätsnichterhaltung (parity nonconservation, PNC) oder Paritätsverletzung (parity violation, PV) wurde erstmals 1956 von Tsung Dao Lee und Chen Ning Yang im Zusammenhang mit der schwachen Wechselwirkung vorhergesagt.⁶⁷ Chien-Shiung Wu *et al.* erbrachten 1957 den experimentellen Beweis. Ein instabiler ^{60}Co -Kern emittiert beim β^- -Zerfall Elektronen und Elektron-Antineutrinos, die überwiegend linkshändig sind⁶⁸ und infolgedessen dem Gesetz der Paritätserhaltung nicht gehorchen. Damit lässt sich den Begriffen „rechts“ und „links“ eindeutig eine definierte Richtung zuordnen.⁶⁹ Die schwache Wechselwirkung kann durch Kombination mit der elektromagnetischen zur elektroschwachen Wechselwirkung zusammengefasst werden (einheitliche Theorie der schwachen und elektromagnetischen Wechselwirkung, Nobelpreis für Physik 1979 für S. Glashow, S. Weinberg und A. Salam).⁷⁰ Dabei zeigt sich, dass die Paritätserhaltung zwar für die elektromagnetische Wechselwirkung gilt, für die schwache und damit auch für die elektroschwache Wechselwirkung jedoch nicht. In diesem Zusammenhang wurde eine weitere Variante der schwachen Wechselwirkung vorhergesagt, die nicht mit Elektronenemission verbunden ist, sich jedoch ebenfalls durch Paritätsverletzung auszeichnet; dies wurde ebenfalls experimentell bestätigt.^{61, 71} Ein wichtiges Merkmal dieser Wechselwirkung ist ihre Bedeutung für stabile Atome und Moleküle, da es zu einer Beeinflussung der elektromagnetischen Felder und zur Überlagerung von energetischen Zuständen unterschiedlicher Parität kommen kann. Man erhält damit eine Verknüpfung der

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

Paritätsnichterhaltung im Atomkern mit den elektronischen Eigenschaften von Atomen bzw. Molekülen: ^{61, 62, 72, 73}

$$\mathbf{V}_{eN}^{PV} = 2^{-5/2} G \alpha Q_W \{ \boldsymbol{\sigma}_e \cdot \mathbf{p}_e, \rho_N(r_e) \}_+$$

und

$$Q_W = Z(1 - \sin^2\theta_w) - N .$$

| | |
|-----------------------------|---|
| \mathbf{V}_{eN}^{PV} ... | additiver Term, der die Paritätsverletzung berücksichtigt |
| G ... | Fermi-Kopplungskonstante für die neutrale schwache Wechselwirkung |
| α ... | Feinstrukturkonstante |
| Q_W ... | effektive schwache Ladung |
| $\boldsymbol{\sigma}_e$... | Pauli-Spinoperator |
| \mathbf{p}_e ... | Impulsoperator des Elektrons |
| $\rho_N(r_e)$... | normalisierte Dichtefunktion des Kerns |
| Z ... | Zahl der Protonen |
| N ... | Zahl der Neutronen |
| θ_w ... | Weinberg-Winkel mit $\sin^2\theta_w = 0,2319$ |
| $\{ \}_+$... | Antikommutator |

In der Literatur wird gegenwärtig kontrovers diskutiert, ob und in welchem Umfang die Paritätsverletzung Einfluss auf chirale Verbindungen hat und in wieweit man damit einen Erklärungsansatz für die Homochiralität erhält. ^{55, 74, 75, 76, 77} Durch die Paritätsverletzung haben Enantiomere im Grundzustand unterschiedliche Energien E_D bzw. E_L und lassen sich deshalb nicht allein durch räumliche Inversion bzw. Spiegelung ineinander überführen. Für den Energieunterschied $\Delta E_{pv} = |E_D - E_L|$ (Paritätsverletzungsenergiedifferenz, parity violation energy difference, PVED) ergab sich aus theoretischen Betrachtungen am Beispiel von Aminosäuren, dass die *L*-Form um 10^{-13} bis 10^{-14} J/mol ⁷⁸ stabiler als die entsprechende *D*-Form ist. Während für Atome die Existenz der PVED experimentell bestätigt wurde, ⁷⁹ konnte dieser geringe Unterschied jedoch noch nicht für Moleküle zweifelsfrei nachgewiesen werden. ⁸⁰ Verschiedene Autoren stellen eine Rolle der PVED bei der Entstehung der irdischen homochiralen Präferenz in Frage. ^{76, 81, 82, 83} Gábor Lente ⁸¹ führt in seiner Veröffentlichung für die Paritätsverletzung zwischen Enantiomeren eine stochastische Analyse durch. Während ohne PVED die Bildung von *D*- und *L*-Enantiomer mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 0,5 stattfinden sollte, erhält man bei Berücksichtigung der PVED eine Wahrscheinlichkeit von $(0,5 + \varepsilon)$ für das nachweislich häufigere *L*-Enantiomer und $(0,5 - \varepsilon)$ für das *D*-Enantiomer.

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

Nach der Formel

$$\varepsilon = \frac{\Delta E_{pv}}{4RT}$$

| | |
|-----------------------|---|
| $\varepsilon \dots$ | Differenz vom Mittel |
| $\Delta E_{pv} \dots$ | Paritätsverletzungsenergie­differenz [J/mol] |
| $R \dots$ | allgemeine Gaskonstante (8,314 J/K·mol) |
| $T \dots$ | Temperatur [K] |

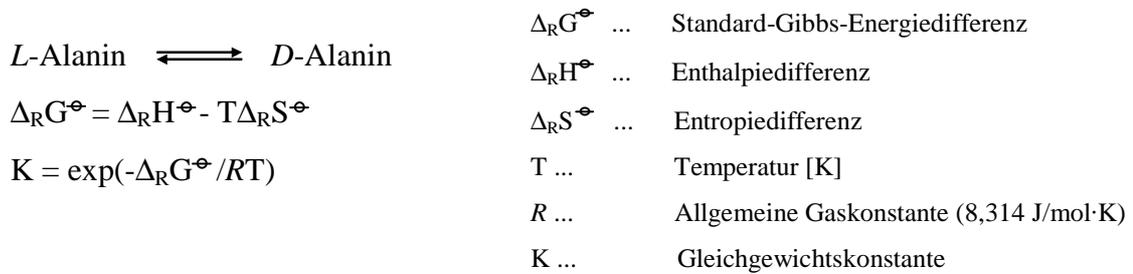
und unter Verwendung von 10^{-13} J/mol als Paritätsverletzungsenergie­differenz erhält man $\varepsilon = 10^{-17}$ bei Raumtemperatur. Ausgehend von einer Binomialverteilung berechnet Lente die Wahrscheinlichkeiten, dass das bevorzugte Molekül im Überschuss gebildet wird, in Abhängigkeit von der Anzahl der Moleküle, die ein nahezu racemisches Ensemble bilden. Dieser Effekt wirkt sich bei kleinen Mengen weniger stark aus als bei großen. Lente kommt daher zu dem Ergebnis, dass für 1 Mmol bzw. $8,9 \times 10^4$ kg racemisches Alanin die Wahrscheinlichkeit 0,506 beträgt, das thermodynamisch stabilere Enantiomer im Überschuss zu finden. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit, dass bei dieser Menge mehr *L*-Alanin als *D*-Alanin vorhanden ist, beträgt 50,6 %.

Thermodynamik

Mehrfach wurden Experimente durchgeführt, die den Nachweis von Einflüssen der PVED bei Anhäufungen von Molekülen zum Ziel hatten. So untersuchten Wang *et al.* enantiomerenabhängige Unterschiede in den Phasenübergängen von α -Aminosäure-Einkristallen.⁸⁴ Dabei verwendeten sie die Differenz-Scanning-Kalorimetrie (DSC) zur Bestimmung der spezifischen Wärme in Kristallen von *D*- und *L*-Alanin beziehungsweise Valin und stellten Unterschiede in den Phasenübergängen 2. Ordnung zwischen den jeweiligen Enantiomeren fest. Außerdem untersuchten sie die Temperaturabhängigkeit der Massensuszeptibilität und der Schwingungsmoden in Laser-Raman-Spektren. Diese Experimente wurden von Sullivan *et al.*⁸⁵ wiederholt und durch Röntgendiffraktometrie und NMR-Spektroskopie ergänzt. Mit Ausnahme der DSC ergaben sich keine Hinweise auf thermodynamische Unterschiede in den Kristallen. Durch Umkristallisation der Proben konnte die Differenz, welche mit DSC festgestellt wurde, verringert werden. Unter Bezug auf die unterschiedlichen Wärmekapazitäten von *L*- und *D*-Enantiomeren, wie sie von Sullivan *et al.* bzw. Wang *et al.* dokumentiert wurden, versuchten Nemoto und Matsuno *et al.*^{86, 87}, die Umgebung von Heißwasserquellen in Ozeanen und die dabei auftretenden Temperaturgradienten zu

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

simulieren (siehe auch 2.4 Hydrothermale Systeme) und untersuchten unter diesen Bedingungen das Verhalten von wässrigen *D*-, *L*- und *DL*-Alanin-Lösungen hinsichtlich der Veränderungen in den Enantiomerenverhältnissen. *D*- und *L*-Alanin befinden sich in der Isomerisierungsreaktion zunächst in einem thermodynamischen Gleichgewicht: ⁷⁵



Dabei sind $\Delta_R G = \Delta_R H = \Delta_R S = 0$ (bei allen Temperaturen) und $K = 1$, solange die Paritätsverletzungsenergiedifferenz nicht in Betracht gezogen wird oder keine Rolle spielt. K ist der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- bzw. Rückreaktion. Ist $K = 1$, sind diese Geschwindigkeiten gleich groß. Bei höheren Temperaturen wird die Racemisierung beschleunigt, da die Geschwindigkeitskonstanten von der Temperatur abhängen, jedoch bleibt $K = 1$, wenn sich die Enantiomere energetisch nicht unterscheiden. Eine Abweichung von 1 erhält man, wenn tatsächlich enantiomerenabhängige Eigenschaften, wie zum Beispiel unterschiedliche spezifische Wärme, auftreten. Durch schnelles und starkes Abkühlen im Temperaturgradienten kommt es zu Prozessen der Nichtgleichgewichtsthermodynamik. Dabei werden die entstandenen Produkte thermodynamisch stabilisiert, wobei das Enantiomer mit der geringeren Wärmekapazität bevorzugt gebildet wird, falls ein Unterschied existiert. Die Experimente von Nemoto und Matsuno *et al.* zeigten, dass wässrige Lösungen von *D*-Alanin stärker racemisieren als die von *L*-Alanin, abhängig von der jeweiligen Konzentration. *DL*-Alanin-Lösungen veränderten sich nicht.

Symmetriebruch durch Kristallisation

Ein weiterer Erklärungsversuch für abiotisch bedingte Homochiralität der Biomoleküle ist der Symmetriebruch durch Kristallisation. Shinitzky *et al.* ⁸⁸ stellten in einer kontrovers diskutierten Veröffentlichung fest, dass *D*- und *L*-Tyrosin in wässrigen Lösungen unterschied-

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

liche Kristallisationsgeschwindigkeiten und Löslichkeiten aufweisen. Dabei ergab sich, dass *D*-Tyrosin schneller als *L*-Tyrosin kristallisiert und *L*-Tyrosin in Wasser besser löslich ist als *D*-Tyrosin. Das Racemat wird deshalb in gesättigter wässriger Lösung spontan in *D*- und *L*-Tyrosin aufgetrennt. In D₂O ist dieser Effekt dagegen deutlich reduziert.⁸⁹ In einer weiteren Veröffentlichung berichten Shinitzky *et al.*⁹⁰, dass die Circular dichroismus (CD)-Spektren der *D*- und *L*-enantiomeren Form von Poly-Lysin₂₄ und Poly-Glutaminsäure₂₄ bei pH 2,5 (Lys) bzw. pH 10,5 (Glu) geringfügig voneinander abweichen (in H₂O bestimmt). Werden die Proben in D₂O gemessen, wird dieser Unterschied weitestgehend aufgehoben. Diese enantiomerenabhängigen Abweichungen erklären Shinitzky *et al.* mit der Paritätsverletzung. Im Gegensatz zu dieser Erklärung zeigen Avalos *et al.*⁹¹, dass die spontane Aufspaltung chiraler Substanzen während der Kristallisation sowie die Bildung von Konglomeraten von mehreren Faktoren (Thermodynamik, Stabilisierung durch das Lösungsmittel, Kinetik, Rühren, Impfung) abhängen. Unter Verweis auf Tranter⁹² wird erwähnt, dass aus der Paritätsverletzungsenergie­differenz ein Bindungslängen­unterschied in der Größenordnung von 10⁻¹⁸ pm zwischen den Enantiomeren resultiert und damit Enantiomere hinsichtlich Schmelzpunkt und Löslichkeit identisch sind. Darüber hinaus zeigen sich selbst für strukturell sehr ähnliche Verbindungen deutliche Unterschiede auf supramolekularer Ebene, was zu nichtvorhersagbaren Ergebnissen bei der Kristallisation führt. Die Ergebnisse von Shinitzky *et al.* werden auch von Lahav *et al.*^{93, 94} kontrovers diskutiert.

3.2 KONVENTIONELLER ANSATZ

Adsorption an Mineralien

Einen konventionellen Erklärungsansatz für die Homochiralität auf der Erde bietet die Theorie der enantioselektiven Adsorption von α -Aminosäuren an Mineralien (Ton,⁹⁵ Gips,⁹⁶ Calcit, Quarz, etc.).⁹⁷

Calcit ist zwar nicht chiral, besitzt aber spiegelbildliche (enantiotope) Flächenpaare und war vermutlich eines der häufigsten Mineralien auf der Urerde. Hazen *et al.* stellten fest, dass an einem Calcit-Kristall beim Eintauchen in eine racemische Asparaginsäure-Lösung an der linkshändigen Fläche die *L*- und an der rechtshändigen Fläche die *D*-Form adsorbierten. Auch

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

Alanin wurde enantioselektiv getrennt, jedoch Valin und Leucin nicht. Die links- und rechtshändigen Kristallflächen von Calcit treten auf der Erde mit ungefähr gleicher Häufigkeit auf. Daraus folgt, dass die Präferenz der *L*-Aminosäuren zufallsbedingt ist.^{4, 98}

Dagegen existiert Quarz jeweils in chiralen, spiegelbildlichen Kristallformen und könnte ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung optischer Aktivität auf der Erde gespielt haben.⁹⁹ Bonner *et al.*^{100, 101, 102} untersuchten die enantioselektive Adsorption von Alanin auf optisch aktivem Quarz. Auch bei Quarz sind beide Enantiomorphe nahezu gleich oft vorhanden,^{99, 103} es ist also keine eindeutige Bevorzugung einer der beiden Quarzformen in der Natur zu beobachten.⁹⁹

Autokatalytische Reaktionen

Für die homochirale Präferenz von α -Aminosäuren kann auch die asymmetrische Autokatalyse als Erklärungsversuch herangezogen werden. Bei einer asymmetrischen autokatalytischen Reaktion sind der chirale Ligand eines Katalysators und das chirale Produkt identisch.¹⁰⁴ In der Soai-Reaktion^{105, 106} führt ein leichtes Enantiomerenungleichgewicht, welches als Initiator eingesetzt wird, zu einem großen Enantiomerenüberschuss. Dabei genügt die Anwesenheit weniger Moleküle eines Enantiomers, um das Enantiomerenverhältnis in einem stochastischen Prozess zu steuern und einen großen Überschuss des Produktenantiomers zu erhalten.¹⁰⁷ Experimentell wurde bestätigt, dass die Anwesenheit auch fremder chiraler Verbindungen in nicht exakt racemischer Verteilung das Enantiomerenverhältnis des Produkts beeinflussen kann. Zu den möglichen Ursachen für den initiierenden Enantiomerenüberschuss zählt die Wechselwirkung einer chiralen Verbindung mit zirkular polarisiertem Licht.¹⁰⁶

3.3 EXTRATERRESTRISCHER URSPRUNG

Es ist weiterhin denkbar, dass extraterrestrische Quellen für die Homochiralität auf der Erde verantwortlich sind. Von Rubenstein *et al.*¹⁰⁸ wurde erstmals eine Hypothese für den nichtirdischen Ursprung der Homochiralität diskutiert. Wenn chirale Moleküle, die sich beispielsweise in Molekülwolken im interstellaren Raum befinden, zirkular polarisiertem

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

Licht ausgesetzt werden, kann durch diese Bestrahlung eine enantiomere Form, je nach Drehrichtung, stärker wechselwirken als die andere. Wegen der Intensität wird dieses Enantiomer häufiger als das andere zerstört. Eine mögliche Strahlungsquelle für zirkular polarisiertes Licht sind Supernovae (Sternexplosionen) oder junge Sterne, wie sie im Sternentstehungsgebiet des Orionnebels häufig auftreten.^{11c} Der jeweilige Enantiomerenüberschuss könnte dann durch Kometen oder Meteoriten auch auf der Erde den Grundstein für homochirale Präferenz gebildet haben.^{109, 110} Im Murchison-Meteoriten wurden die vier Stereoisomere von 2-Amino-2,3-dimethylpentansäure (*DL*- α -Methylisoleucin und *DL*- α -Methylalloisoleucin) nachgewiesen. Die *L*-Enantiomere zeigen dabei jeweils einen Überschuss von 7,0 % und 9,1 %.¹¹¹ Synthesen von Aminosäuren unter simulierten Weltallbedingungen wurden von Bernstein *et al.*¹¹² und Muñoz Caro *et al.*¹¹³ erfolgreich durchgeführt. Die relativen Mengen der synthetisierten Monoaminosäuren zeigen erstaunlicherweise Ähnlichkeiten mit den Analyseergebnissen des Murchison-Meteoriten.³ Das lässt darauf schließen, dass sich im interstellaren Raum nicht-racemische Aminosäurestrukturen ausbilden können. Die Rosetta-Mission könnte den Nachweis einer homochiralen Präferenz von Biomolekülen unter Weltraumbedingungen liefern.¹¹⁴

3.4 PROBLEMSTELLUNG

Experimente zu den Homochiralitätstheorien von biogenen terrestrischen α -Aminosäuren (und anderen Biomolekülen) erfordern eine exakte Enantiomeranalytik sowie eine sichere Beurteilung der Ergebnisse. Um Enantiomerenanteile (*EF*, enantiomer fraction; für das *D*-Enantiomer ist $EF = 100 \% \cdot D / (D + L)$ mit *D* bzw. *L* als Konzentration, Peakfläche etc.) von α -Aminosäuren präzise bestimmen zu können, ist eine verlässliche enantioselektive Analysenmethode von großer Bedeutung. Die Gaschromatographie bietet hier einen vielversprechenden Ansatz. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit die Anwendung von enantioselektiver Gaschromatographie zur quantitativen Bestimmung von α -Aminosäuren in den Grenzbereichen $EF = 0 \%$ bzw. $EF = 100 \%$ und $EF = 50 \%$ untersucht. Dazu müssen α -Aminosäuren zuvor derivatisiert werden. Die Derivatisierung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird eine durch Acetylchlorid in Ethanol katalysierte Veresterung der Carboxylgruppe zum Ethylester durchgeführt. Anschließend erhält man nach Reaktion der Aminogruppe mit Trifluoressigsäureanhydrid das *N*-TFA/*O*-Et-Derivat. Durch vergleichende

3 Homochirale Präferenz von Aminosäuren

Messungen von verschiedenen α -Aminosäure-Enantiomeren und -Racematen auf den stationären Phasen Chirasil-*L*-Val, Chirasil-*D*-Val und Lipodex E wird das System validiert. Zur Verifizierung der Ergebnisse wird als zweite, unabhängige Methode die enantioselektive Kapillarelektrophorese herangezogen. Das validierte gaschromatographische System wird anschließend für die Überprüfung einiger kontrovers diskutierter Ergebnisse aus Experimenten zur Homochiralität verwendet, welche der Literatur entnommen wurden. Dabei werden Konzentrationsverläufe und zeitabhängige Enantiomerenverhältnisse aus Kristallisationslösungen von Tyrosin untersucht sowie Experimente mit Alanin durchgeführt, die eine hydrothermale Umgebung und deren Einfluss auf die Enantiomere und das Racemat simulieren. Desweiteren werden die Polypeptide Poly-Lysin₂₄ und Poly-Glutaminsäure₂₄ deuterolysiert (deuterium labelling) und die Enantiomerenanteile der dabei freigesetzten α -Aminosäuren durch eine gekoppelte Methode, bestehend aus enantioselektiver Gaschromatographie und Massenspektrometrie, bestimmt.

Da sich enantiomerenreine Polypeptide potentiell auch als chirale Selektoren eignen, wird darüberhinaus versucht, kommerziell erhältliche Peptid-Enantiomere von Poly-*L*-Lysin und Poly-*L*-Glutaminsäure als chirale Pufferadditive in der enantioselektiven Kapillarelektrophorese (CE) einzusetzen und die Trögersche Base sowie 1,1'-Binaphthyl-2,2'-diylhydrogenphosphat (BNP) in die Enantiomere zu trennen. Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich im Zusammenhang mit chiralen Selektoren auch mit einer Anwendung des reziproken chiralen Erkennungsprinzips (RCEP). Der wesentliche Gedanke in dieser Methode ist die Vertauschung der Funktionen von Selektor und Selektand, was beispielsweise durch Immobilisierung des Selektanden und anschließende vergleichende Trennung einer Auswahl an Selektoren umgesetzt wird. Cyclische Hexapeptide zeigen als chirale Selektoren in der CE enantioselektive Wechselwirkung mit Aminosäuren, die als *N*-Fluordinitrophenyl-Derivate (DNP-Aminosäuren) vorliegen. In dieser Arbeit wurden durch Anbindung von enantiomerenreinem DNP-*D*- bzw. DNP-*L*-Alanin an Silica enantiomerenreine Stationärphasen hergestellt. Durch Verwendung einer der Stationärphasen und eines ausgewählten cyclischen Hexapeptids werden für die Kapillar-Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (Micro-HPLC/MS) zunächst die Bedingungen (Split, Länge der Transferkapillaren, Fluss, Fließmittel etc.) optimiert, um später auf diese Weise das cyclische Hexapeptid mit der größten relativen Retentionszeitdifferenz an den Stationärphasen DNP-*D*- und -*L*-Alanin identifizieren zu können.

4 QUANTITATIVE ENANTIOMERANALYTIK

4.1 METHODEN ZUR ENANTIOMERENTRENNUNG

Für die analytische oder präparative Trennung von Enantiomeren werden stereochemische Wechselwirkungen genutzt. Unter Verwendung von chiralen Selektoren oder chiralen Derivatisierungsreagentien entstehen diastereomere Assoziate, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften unterscheiden. Dabei kann ein chiraler Selektor A(+) in Lösung (mobil) oder nach Fixierung auf der Stationärphase (immobilisiert) mit den enantiomeren Selektanden B(+) und B(-) wechselwirken. Besonders bewährt haben sich chromatographische und elektrophoretische Trennmethoden. Als chirale nicht-racemische Selektoren werden beispielsweise Cyclodextrine bzw. deren Derivate,¹¹⁵ α -Aminosäurederivate,¹¹⁶ Cyclopeptide,¹¹⁷ Proteine,¹¹⁸ Calixarenderivate¹¹⁹ und Polysaccharide¹²⁰ eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorrangig die Gaschromatographie (GC) und die Kapillarelektrophorese (CE) zur Enantiomerentrennung von α -Aminosäuren verwendet.

In der Gaschromatographie kann die Trennung von Enantiomeren auf zwei verschiedene Arten erreicht werden. Die indirekte Methode besteht darin, die Enantiomere von α -Aminosäuren mit einem enantiomerenreinen Reagenz zu Diastereomeren zu derivatisieren und diese anschließend auf einer achiralen stationären Phase zu trennen. Bei der Derivatisierung der *DL*- α -Aminosäuren zu Diastereomeren können jedoch Schwierigkeiten auftreten (Enantiomerenreinheit der Derivatisierungsreagentien, Gefahr der Racemisierung sowie eventuell unterschiedliche Reaktionskinetiken der Reaktionspartner während der Derivatisierung). Deshalb erfolgt in dieser Arbeit die Derivatisierung nach der direkten Methode mit einem achiralen Reagenz und die anschließende Trennung auf einer chiralen stationären Phase.¹²¹ Eine Derivatisierung der *DL*- α -Aminosäuren ist notwendig, weil die Substanzen für die GC unzersetzt flüchtig sein müssen sowie günstige chromatographische Eigenschaften (Retentionszeit, Auflösungsfaktor bzw. Trennfaktor, Peakform) aufweisen sollen. Die Vorteile der Hochauflösungsgaschromatographie liegen in der hohen Empfindlichkeit des Flammenionisationsdetektors (FID), der über einen großen linearen Bereich verfügt, und der hohen Trennstufenzahl von Kapillarsäulen.

4 Quantitative Enantiomeranalytik

In der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und der Kapillarelektrophorese kann ein alternatives enantiomerentrennendes System erhalten werden, wenn der mobilen Phase ein chirales Mobilphasenadditiv zugesetzt wird und die Trennung auf einer achiralen stationären Phase (HPLC) bzw. unbeschichteten Fused-Silica-Kapillarsäule (CE) erfolgt. Meist wird in der HPLC und der CE ein UV-Detektor verwendet, vorausgesetzt, eine UV-Absorption der zu trennenden Substanzen ist gewährleistet.

4.2 THEORIE DER VALIDIERUNG

Für die Validierung gibt es in der Literatur viele Definitionen. Das Inspectorate for Health Protection, Food Inspection Service, The Netherlands, definiert folgendermaßen: *„Validierung ist die Prozedur, die sicherstellt, dass eine Testmethode so zuverlässig ist wie möglich. Dieser Prozess besteht aus einem (Test)Programm, das zur Beantwortung folgender Fragen führt: ‚Wie richtig ist es?‘ und ‚Wie präzise ist diese Methode in den Händen des Routineanalytikers?‘“*¹²² Chapman definiert dagegen kurz und prägnant: *„Validierung heißt nichts anderes als gesunder Menschenverstand – gut organisiert und gut dokumentiert.“*¹²² Beide Definitionen beinhalten im Grunde „die Überprüfung einer Methode auf Brauchbarkeit“.¹²²

Nachfolgend werden die einzelnen Validierungsparameter näher erläutert.^{122, 123, 124}

Präzision (precision)

Die Präzision ist eine Bezeichnung für die Streuung von Analyseergebnissen um den Mittelwert. Als Streuungsmaß beziehungsweise Präzisionsmaß werden die (absolute) Standardabweichung (standard deviation, σ) und die relative Standardabweichung (relative standard deviation, $\sigma_{\text{rel.}}$) verwendet. Dabei ist zu beachten, dass die absolute Standardabweichung dieselbe Einheit wie die Messwerte besitzt, während die relative Standardabweichung entweder prozentual (0 % bis 100 %) oder dezimal (0 bis 1,0) angegeben wird. Die relative Standardabweichung enthält Informationen über die Streuung der unter Wiederholbedingungen ermittelten Werte.

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Die Streuung ist das Ergebnis von zufälligen Fehlern und wird anhand der Messpräzision (Gerätepräzision, Systempräzision), Methodenpräzision (Schwankung der Ergebnisse durch Probenvorbereitung) und der Wiederholpräzision (repeatability, voneinander unabhängige Ergebnisse unter Wiederholbedingungen in kurzen Zeitabständen) bestimmt. Die Messpräzision ist ein Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden. Sie wird durch mehrmalige Probenaufgabe in ein chromatographisches System bestimmt. Die Methodenpräzision wird überprüft, indem zwei Proben voneinander unabhängig an verschiedenen Tagen derivatisiert und mehrmals in das chromatographische System injiziert werden.

Vorraussetzungen für die Mittelwertbildung von Messreihen sind eine Normalverteilung der Messwerte x_n sowie ausreißerfreie Messreihen. Eine Normalverteilung wird durch eine symmetrisch glockenförmige Verteilung der Messwerte charakterisiert, die auch als Gaußverteilung bezeichnet wird. Die Standardabweichung hängt von den Fehlerquadraten um den Mittelwert ab. Beide, Mittelwert und Standardabweichung, sind jedoch fehlerbehaftete Werte und stimmen nicht zwangsläufig mit dem idealen Mittelwert μ , d. h. dem Maximum der Gaußverteilung über dem Definitionsbereich, und der idealen Standardabweichung s , d. h. dem Abstand zwischen den Wendepunkten der Gaußverteilung, überein. Die im Folgenden aufgeführten Messreihen (in Kapitel 4 und 5) wurden auf eine Normalverteilung nach dem Schnelltest von David geprüft (Formel und Tabelle siehe Literatur ¹²²). Mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % sind die Messwerte, bis auf wenige Ausnahmen, normalverteilt. Außerdem wurden Ausreißer nach Grubbs aus den Messreihen vor der Mittelwertbildung eliminiert (Formel und Tabelle siehe Literatur ¹²²). ^{122, 123}

Der Streubereich von Mittelwerten lässt sich nicht über die Standardabweichung angeben, da diese nur einen Bereich von 68,3 % der Messwerte umfaßt. Deshalb ist zur Bestimmung der Unsicherheit von Messergebnissen ein Vertrauensbereich notwendig. Messwerte, die einer Gaußverteilung folgen, können prinzipiell im ganzen Definitionsbereich $-\infty < x < +\infty$ auftreten. Dabei sind sehr große oder kleine Abweichungen vom idealen Mittelwert μ nur sehr gering wahrscheinlich, die Kurve nähert sich asymptotisch der Achse für unendlich kleine oder große Werte. Die in **Abbildung 4-1** angegebenen Integralbereiche entsprechen der jeweiligen statistischen Sicherheit (P), mit der ein Messwert in diesem Bereich auftritt (nach ¹²³).

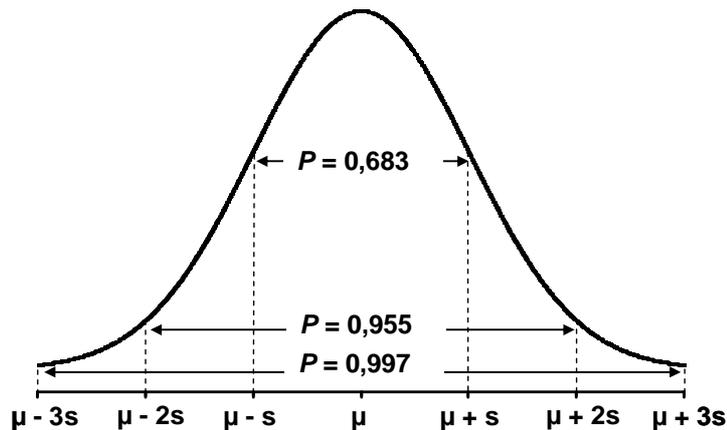


Abbildung 4-1: Statistische Sicherheit P innerhalb der Gauß-Verteilung. ¹²³

Der in dieser Arbeit gewählte Vertrauensbereich (Kapitel 4 und 5) ist der Wertebereich, innerhalb dessen der Bezugswert mit einer 99 %igen Wahrscheinlichkeit liegt.

Linearität

Die Linearität wird über das mathematische Modell der Kalibrierfunktion dargestellt und beschreibt die Korrelation zwischen dem gemessenen Signal der Probe und der dazugehörigen Konzentration. Die Linearität kann durch den Korrelationskoeffizienten $r > 0,999$ bzw. das Bestimmtheitsmaß r^2 und visuell überprüft werden. ¹²²

Richtigkeit (accuracy)

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem ermittelten und einem als richtig angesehenen Wert (z. B. fehlerfreier Standard, zertifiziertes Referenzmaterial) und gibt Auskunft über systematische Fehler. Sind keine Referenzsubstanzen vorhanden, so kann zumindest der Probengehalt auch durch mehrere voneinander unabhängige Methoden bestimmt werden. Dann liegt der Schwerpunkt auf der Überprüfung der Selektivität und der Wiederfindung (Wiederfindungsexperimente). ¹²²

Selektivität (selectivity)

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen. Dabei ist der Auflösungsfaktor ein Maß für die Güte der Trennung zweier Peaks unter Berücksichtigung der Peakbreite. In der Praxis bedeutet ein Auflösungsfaktor (resolution, R_s) von 1,75 die vollständige Trennung zweier Peaks bzw. Basislinientrennung.¹²⁵

Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze (LOQ, limit of quantitation) ist die kleinste quantifizierbare Menge. Das ist die Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann. Die Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) ist die kleinste nachweisbare Menge (Analyt vorhanden ja/nein?). Zur Ermittlung der Nachweisgrenze wird ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 und für die Bestimmungsgrenze von 9:1 empfohlen.

Angabe der Ergebnisse und verwendete Formeln

Enantiomerenanteil (EF):

In dieser Arbeit wird der ermittelte Enantiomerenanteil (enantiomeric fraction, EF) als prozentualer D -Anteil (meist Mittelwert aus Wiederholmessungen) angegeben:

| | | |
|---|--------------------|---|
| $EF_i[\%] = \frac{D_{PeakArea}}{D_{PeakArea} + L_{PeakArea}} \cdot 100\%$ | EF_i [%]... | Enantiomerenanteil aus einer Einzelbestimmung |
| | $D_{PeakArea}$... | Signalfläche des D -Enantiomers |
| | $L_{PeakArea}$... | Signalfläche des L -Enantiomers |
| $EF[\%] = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n EF_i$ | EF [%]... | Mittelwert des Enantiomerenanteils |
| | n ... | Anzahl der Messungen |
| | EF_i ... | Enantiomerenanteile aus Einzelbestimmungen |

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Enantiomerenüberschuss: ¹²⁶

$$ee_i = \frac{D_{PeakArea} - L_{PeakArea}}{D_{PeakArea} + L_{PeakArea}}$$

| | |
|-------------------|---|
| $ee_i...$ | Enantiomerenüberschuss aus einer Einzelbestimmung |
| $D_{PeakArea}...$ | Signalfläche des <i>D</i> -Enantiomers |
| $L_{PeakArea}...$ | Signalfläche des <i>L</i> -Enantiomers |

Standardabweichung: ¹²²

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x)^2}{n - 1}}$$

| | |
|-------------|------------------------------|
| $\sigma...$ | Standardabweichung [\pm] |
| $x_i...$ | Einzelwert |
| $x...$ | Mittelwert |
| $n...$ | Anzahl der Messungen |

relative Standardabweichung: ¹²²

$$\sigma_{rel.} [\%] = \frac{\sigma}{x} \cdot 100\%$$

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| $\sigma_{rel.} [\%]...$ | relative Standardabweichung |
| $\sigma...$ | Standardabweichung |
| $x...$ | Mittelwert |

Wiederfindung: ¹²²

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100\%$$

| | |
|--------------|-----------------------|
| $W...$ | Wiederfindung |
| $\bar{x}...$ | gemessener Mittelwert |
| $x_R...$ | richtiger Wert |

Auflösungsfaktor: ¹²⁷

$$R_s = 1,177 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}}$$

| | |
|-------------|--|
| $R_s...$ | Auflösungsfaktor (ein Zahlenwert von $\geq 1,75$ bedeutet Grundlinientrennung) |
| $t_{R1}...$ | Retentionszeit der Komponente 1 |
| $t_{R2}...$ | Retentionszeit der Komponente 2 |
| $w_{h1}...$ | Peakhalbwertsbreite der Komponente 1 |
| $w_{h2}...$ | Peakhalbwertsbreite der Komponente 2 |

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Retentionsfaktor:

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

| | |
|------------|---------------------------------|
| $k...$ | Retentionsfaktor der Komponente |
| $t_{R}...$ | Retentionszeit |
| $t_0...$ | Durchflusszeit |

Trennfaktor:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| $\alpha...$ | Trennfaktor |
| k_1 | Retentionsfaktor der Komponente 1 |
| k_2 | Retentionsfaktor der Komponente 1 |
| $t_{R1}...$ | Retentionszeit der Komponente 1 |
| $t_{R2}...$ | Retentionszeit der Komponente 2 |
| $t_0...$ | Durchflusszeit |

Enantiomer labelling: ¹²⁸

Die Konzentrationen der Aminosäuren wurden durch enantiomer labelling bestimmt:

| | |
|---|--|
| $X_{a_L}...$ | Menge des Enantiomers (hier <i>L</i>) |
| $m_D...$ | Zugegebene Menge des Labels (Gegenenantiomer, hier <i>D</i> -Aminosäure) mit definierter Konzentration |
| $X_{a_L} = m_D \cdot \frac{(A_L - A_D C_D)(1 + C_L)}{(A_D - A_L C_L)(1 + C_D)}$ | |
| $A_L...$ | Peakfläche des <i>L</i> -Enantiomers |
| $C_L...$ | Verhältnis von <i>D</i> - zu <i>L</i> -Enantiomer |
| $A_D...$ | Peakfläche des <i>D</i> -Enantiomers |
| $C_D...$ | Verhältnis von <i>L</i> - zu <i>D</i> -Enantiomer |

4.3 VALIDIERUNG UNTER VERWENDUNG VON α -AMINOSÄUREN

Die Validierung wurde anhand der enantioselektiven gaschromatographischen Bestimmung von ausgewählten α -Aminosäuren durchgeführt. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde zusätzlich die enantioselektive Kapillarelektrophorese als zweite Methode eingesetzt. Die Racemate von Leucin, Ornithin, Lysin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Serin, Cystein und Prolin standen als Einzelproben zur Verfügung. Für die Enantiomere und Racemate von

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Alanin und Tyrosin wurden mehrere Proben unterschiedlicher Herkunft verwendet. In **Tabelle 4-1** sind die Bezeichnungen dieser Proben zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Bezeichnung der eingesetzten Alanin- und Tyrosin-Proben

| Bezeichnung | Beschreibung |
|-------------------------------------|--|
| D-Ala(FI0) ^{a)} | <i>D</i> -Alanin, <i>Fluka Chemie GmbH Schweiz</i> |
| D-Ala(Si0) ^{b)} | <i>D</i> -Alanin, <i>Sigma Chemical Company USA</i> |
| L-Ala(De0) ^{b)} | <i>L</i> -Alanin, <i>Degussa Hanau Deutschland</i> |
| L-Ala(Si0) ^{b)} | <i>L</i> -Alanin, <i>Sigma Chemical Company USA</i> |
| DL-Ala(Me0) ^{b)} | <i>DL</i> -Alanin, <i>Merck Darmstadt Deutschland</i> |
| DL-Ala(Se0) ^{b)} | <i>DL</i> -Alanin, <i>Serva Feinbiochemica Heidelberg Deutschland</i> |
| D-Tyr(Se0) ^{b)} | <i>D</i> -Tyrosin, <i>Serva Feinbiochemica Heidelberg Deutschland</i> , 1 g, reinst |
| D-Tyr(FI0) ^{a)} | <i>D</i> -Tyrosin, <i>Fluka Chemie GmbH Schweiz</i> , 1 g, puriss., $\geq 99.0\%$ ^{d)} Lot&Filling code: 404076/1 54902170 |
| D-Tyr(FI1) ^{a) c)} | <i>D</i> -Tyr(FI0) umkristallisiert in dest. Wasser |
| L-Tyr(Si0) ^{b)} | <i>L</i> -Tyrosin, <i>Sigma Chemical Company USA</i> , No.T-3754, Obtained Thru (pfs) |
| L-Tyr(Si1) ^{b) c)} | <i>L</i> -Tyr(Si0) umkristallisiert in dest. Wasser |
| L-Tyr(FI0) ^{a)} | <i>L</i> -Tyrosin, <i>Fluka Chemie GmbH Schweiz</i> , 25 g, BioChemika, $\geq 99.0\%$ ^{d)} Fremdaminosäuren $\leq 0,5\%$, Lot&Filling code: 409303/1 65103030 |
| L-Tyr(Se0) ^{a)} | <i>L</i> -Tyrosin, <i>Serva Electrophoresis GmbH Deutschland</i> , 25 g, p.a., 99,0 – 101,0 % ^{e)} Lot 15039 |
| L-Tyr(Sa0) ^{a)} | <i>L</i> -Tyrosin, <i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deutschland</i> , 25 g, Biotechnology Performance Certified, Non-animal source, T-8566, Lot 092K0376 |
| DL-Tyr(Se0) ^{b)} | <i>DL</i> -Tyrosin, <i>Serva Feinbiochemica Heidelberg Deutschland</i> , 5 g, (Hemihydrat) p.a. |
| DL-Tyr(Se1) ^{b) c)} | <i>DL</i> -Tyr(Se0) umkristallisiert in dest. Wasser |
| DL-Tyr(FI0) ^{a)} | <i>DL</i> -Tyrosin, <i>Fluka Chemie GmbH Schweiz</i> , 10 g, puriss., $\geq 99.0\%$ ^{d)} Lot&Filling code: 446475/1 14603166 |
| DL-Tyr(FI1) ^{a) c)} | <i>DL</i> -Tyr(FI0) einmal umkristallisiert in dest. Wasser |
| DL-Tyr(FI4) ^{a) c)} | <i>DL</i> -Tyr(FI0) viermal umkristallisiert in dest. Wasser |
| DL-Tyr(syn) | <i>DL</i> -Tyrosin wurde synthetisiert |

a) Neu gekaufte Proben ab Januar 2004, b) Proben aus Lagerbeständen des Instituts, c) Proben wurden umkristallisiert, d) Nichtwässrige Titration, e) Titration (Angabe laut Serva)

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Nachfolgend werden zuerst die Wahl der Stationärphase, der Derivatisierungsmethode sowie technische, apparative und praktische Aspekte diskutiert.

Stationäre Phasen und Derivate in der Gaschromatographie

Als stationäre Phasen wurden Chirasil-Val (an Polysiloxan gebundenes *N*-Isobutanoyl-valin-*tert.*-butylamid) und Lipodex E (Octakis(3-*O*-butanoyl-2,6-di-*O-n*-pentyl)- γ -cyclodextrin in Polysiloxan) verwendet, da sich diese besonders für die Enantiomerentrennung von Aminosäuren bewährt haben.¹²⁹ Alle verwendeten Säulen und Belegungsmaterialien wurden im Haus hergestellt (**Tabelle 4-2**).^{130, 131}

Tabelle 4-2: Verwendete Kapillarsäulen.

| Symbol | Säulentyp | Länge × Innendurchmesser | Filmdicke | Material |
|--------|-------------------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------|
| A | Chirasil- <i>D</i> -Val | 20 m × 0,25 mm | 0,13 μ m | Fused-Silica (desaktiviert) |
| B | Chirasil- <i>D</i> -Val | 25 m × 0,25 mm | 0,13 μ m | Fused-Silica (desaktiviert) |
| C | Chirasil- <i>L</i> -Val | 20 m × 0,30 mm | 0,15 μ m | Glas (desaktiviert) |
| D | Chirasil- <i>L</i> -Val | 20 m × 0,25 mm | 0,13 μ m | Fused-Silica (desaktiviert) |
| E | Lipodex E | 20 m × 0,25 mm | 0,13 μ m | Fused-Silica (desaktiviert) |
| F | Lipodex E | 22 m × 0,25 mm | 0,13 μ m | Fused-Silica (desaktiviert) |
| G | Lipodex E | 20 m × 0,25 mm | 0,13 μ m | Fused-Silica (desaktiviert) |
| H | Lipodex E | 25 m × 0,25 mm | 0,13 μ m | Fused-Silica (desaktiviert) |

Chirasil-*D*-Val: an Polysiloxan gebundenes *N*-Isobutanoyl-*D*-valin-*tert.*-butylamid

Chirasil-*L*-Val: an Polysiloxan gebundenes *N*-Isobutanoyl-*L*-valin-*tert.*-butylamid

Lipodex E: 30 % Octakis-(3-*O*-butanoyl-2,6-di-*O-n*-pentyl)- γ -cyclodextrin in PS 255

Als weitere chirale stationäre Phasen wurden Heptakis-(6-*O-tert.*-butyl-dimethylsilyl-2,3-di-*O*-diacetyl)- β -cyclodextrin in Polysiloxan, Chirasil-Calix-Dex¹³² und die lineare Dextrinphase Heptakis[(2,3-di-*O,4''-O*)-acetyl-(1'-*O,6-O*)-*tert.*-butyldimethylsilyl]-maltoheptose¹³³ mit *DL*-Tyr(SeO) als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat geprüft. Auf diesen drei stationären Phasen konnte aber keine ausreichende Peaktrennung erzielt werden.

Für die Bestimmung von α -Aminosäuren mittels Gaschromatographie wird, wie bereits erwähnt, eine Derivatisierung benötigt, da diese in flüchtige Verbindungen überführt werden

4 Quantitative Enantiomeranalytik

In **Tabelle 4-3** wurden die verschiedenen Alkohole (Methanol, Ethanol oder 2-Propanol) zur Veresterung der Säuregruppe von *DL*-Tyrosin verglichen. Die Acetylierung der Aminogruppe wurde jeweils mit TFAA durchgeführt. Der angegebene prozentuale Enantiomerenanteil *EF* bezieht sich dabei auf das *D*-Enantiomer.

Tabelle 4-3: Vergleich der Derivate *N,O*-TFA/*O*-Me, *N,O*-TFA/*O*-Et und *N,O*-TFA/*O*-2-Prop von *DL*-Tyr(Se0) auf Chirasil-*D*-Val (A), $n = 10$ (*D*-Enantiomerenanteil *EF* [%], absolute Standardabweichung σ [%] und Auflösungsfaktor R_s).

| <i>N,O</i> -TFA/ <i>O</i> -Me | | | <i>N,O</i> -TFA/ <i>O</i> -Et | | | <i>N,O</i> -TFA/ <i>O</i> -iProp | | |
|-------------------------------|----------|-------|-------------------------------|----------|-------|----------------------------------|----------|-------|
| <i>EF</i> | σ | R_s | <i>EF</i> | σ | R_s | <i>EF</i> | σ | R_s |
| 49,80 | 0,09 | 4,52 | 49,72 | 0,10 | 6,39 | 49,80 | 0,07 | 5,57 |

Jedes der drei Derivate hatte auf Chirasil-*D*-Val einen guten Auflösungsfaktor (R_s), verbunden mit einer geringen Standardabweichung zum Mittelwert.

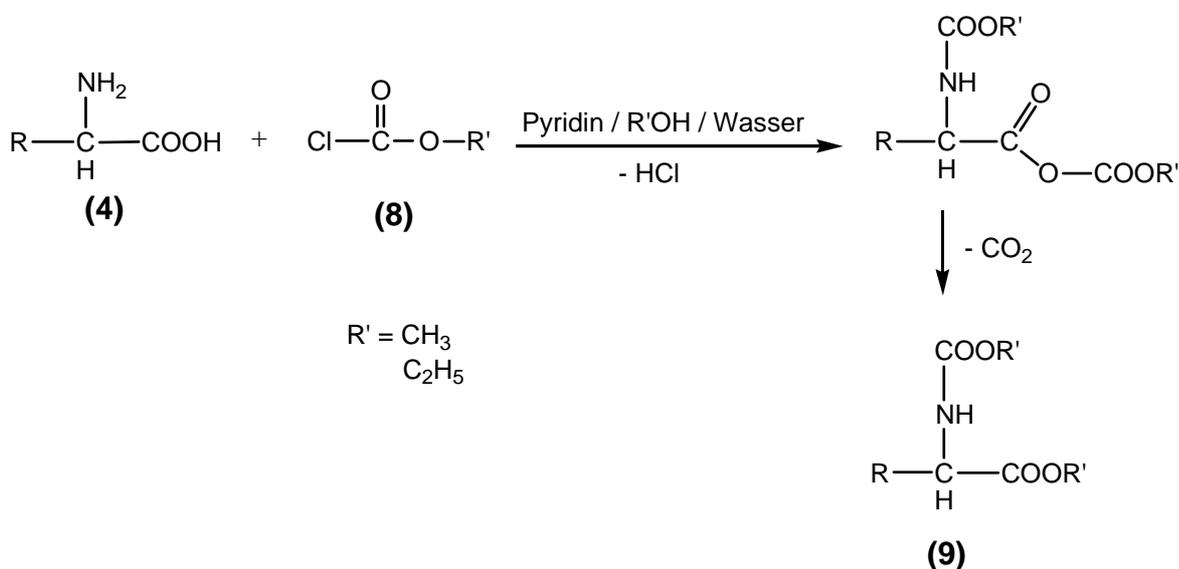


Abbildung 4-3: Reaktionsschema zur Derivatisierung von α -Aminosäuren (4) zum *N(O,S)*-EOC/*O*-R'- bzw. *N(O,S)*-MOC/*O*-R'-Derivat (9).

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Die TFA/Alkohol-Derivatisierung von α -Aminosäuren erfordert mehrere Arbeitsschritte, die insgesamt etwa 1 bis 2 Stunden dauern. Husek *et al.*^{134, 135} haben eine schnelle Derivatisierungsmethode von α -Aminosäuren (**4**) mit Chlorameisensäureethyl- oder -methylestern (**8**) zu den entsprechenden Ethoxycarbonyl- (EOC) bzw. Methoxycarbonylderivaten (MOC) (**9**) entwickelt, welche in wenigen Minuten durchführbar ist (**Abbildung 4-3**). Die *N(O,S)*-EOC/*O*-Et-Derivate sind besser für Chirasil-*L*-Val, die *N(O,S)*-EOC/*O*-Me-Derivate dagegen besser für Lipodex E geeignet.¹³⁶ Die Derivatisierung von *DL*-Tyr(Se0) als *N,O*-EOC/*O*-Et-Derivat^{134, 135, 136, 137} brachte jedoch auf der stationären Phase Chirasil-*L*-Val (Säule C) keine ausreichende Basislinientrennung (R_s 0,934).

In dieser Arbeit wurden *N(O,S)*-TFA/*O*-Et-Derivate der α -Aminosäuren für die gaschromatographischen Enantiomerenbestimmungen verwendet. Der erste Derivatisierungsschritt, die Veresterung der Säuregruppe unter Verwendung von Acetylchlorid in wasserfreiem Ethanol, ist dabei besonders für eine Racemisierung anfällig. Koppenhöfer hat den Einfluss der Reaktionstemperatur während der Derivatisierung von α -Aminosäuren mit wasserfreiem HCl in Methanol experimentell untersucht.¹³⁸ Dabei stellte er fest, dass eine deutliche Racemisierung erst ab einer Temperatur von 160 °C stattfindet. Da die α -Aminosäureester bereits nach 30 Minuten bei einer Derivatisierungstemperatur von 110 °C vorliegen, kann die Gefahr einer Racemisierung vernachlässigt werden.

Ofentemperatur und Detektor in der Gaschromatographie

Um die Bestimmungen mit einer hohen Präzision durchführen zu können, ist es erforderlich, die optimale isotherme Ofentemperatur für jede der α -Aminosäuren in Verbindung mit einer entsprechenden chiralen stationären Phase einzustellen. Günstige Trennfaktoren α erhält man für niedrige Temperaturen, dagegen wird die Peakschärfe bei höherer Temperatur besser. Da im Fall von Chirasil-*L*- und -*D*-Val die Auflösungsfaktoren R_s der Signale ausreichend groß waren, konnte zur Optimierung der Integrationsgrenzen die Temperatur erhöht werden. Für einen hohen Durchsatz an Messungen ist außerdem eine möglichst kurze Analysenzeit je Messlauf erstrebenswert.

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Damit keine Störpeaks auftreten und die durch Rauschen verursachte Modulation der Basislinie eingeschränkt wird, ist es notwendig, gefilterte oder synthetische Luft für den FID zu verwenden. Als Trägergas wird Wasserstoff mit einer Reinheit von 5.0 verwendet.

Optimierung der Integrationsparameter in der Gaschromatographie

Die Messwerte aus den gaschromatographischen Messungen wurden mit dem Programm Clarity ausgewertet. Für eine exakte Bestimmung müssen die Parameter für die Linienbreite (Peak Width) und den Schwellenwert (Threshold) optimal eingestellt werden. Im Benutzerhandbuch¹³⁹ werden Peak Width und Threshold folgendermaßen beschrieben:

Die Peak Width definiert die kleinste Peakbreite, die erkannt werden soll. Signale, deren Breite kleiner als der angegebene Wert ist, werden auch erkannt, jedoch können der Anfangs- und Endpunkt eventuell nicht genau bestimmt werden. Die Basislinie wird dann falsch eingefügt. Eine zu große Peakbreiteneinstellung kann aufgrund einer ungenügenden Anzahl von Werten, mit denen ein Peak beschrieben wird (mindestens 20 bis 30), zu schwerwiegenden Integrationsfehlern führen. Der Schwellenwert bestimmt die Empfindlichkeit des Integrationsalgorithmus gegenüber dem Rauschen. Die von der Basislinie bis zur Spitze gemessene Höhe aller Signale, die man detektieren möchte, sollte mindestens doppelt so groß wie der eingegebene Wert sein.

Der vom Programm vorgegebene Wert für die Peak Width ist 0,1 min und für den Threshold 1 mV. In **Abbildung 4-4** und **Abbildung 4-5** sind die Chromatogramme von *DL*-Tyr(F14) abgebildet, welches mit Chirasil-*D*-Val (Säule A) und Lipodex E (Säule E) aufgetrennt wurde. Die Integration erfolgte mit unterschiedlichen Peak Width- und Threshold-Einstellungen. Für Chirasil-*D*-Val (**Abbildung 4-4**) ist die optimale Einstellung der Peak Width 0,12 min und die des Threshold 1,0 mV. Da auf Chirasil-*D*-Val für *DL*-Tyrosin eine gute Basislinientrennung mit einem großen Auflösungsfaktor (R_s 6,48) vorliegt, kann auch die vom Programm vorgegebene Einstellung problemlos verwendet werden. Für Lipodex E (**Abbildung 4-5**) wurde keine Basislinientrennung erreicht, obwohl der Auflösungsfaktor mit 2,35 größer als 1,75 ist (entsprechend einer vollständigen Trennung der Signale). Im Chromatogramm ist ein Signal zwischen dem ersten (*D*-) und zweiten (*L*-) Peak angedeutet. Die Trennung von *DL*-Tyrosin auf Lipodex E wurde daraufhin mit einem

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Temperaturprogramm untersucht. Dabei wurde ein unscharfes Signal detektiert, das als Hinweis auf die Existenz einer freien OH-Gruppe in para-Stellung des Tyrosin-Rings interpretiert wurde. Es liegt die Vermutung nahe, dass die *O*-TFA-Gruppe des derivatisierten *DL*-Tyrosins an der OH-Gruppe auf der Säule Lipodex E teilweise abgespalten wurde.

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Chirasil-D-Val (Säule A)

| | Peak Width [min] | Threshold [mV] | EF [%] |
|---|---------------------|-------------------|-----------|
| A | 0,10 | 1,0 | 49,775 |
| B | 0,12 | 0,1 | 49,705 |
| C | 0,12 | 1,0 | 49,775 |
| D | 0,12 | 7,0 | 49,783 |
| E | 0,06 | 0,1 | 50,114 |
| F | 0,06 | 1,0 | 49,782 |
| G | 0,06 | 2,0 | 49,743 |

W_h : 0,06 min
R_s : 6,48

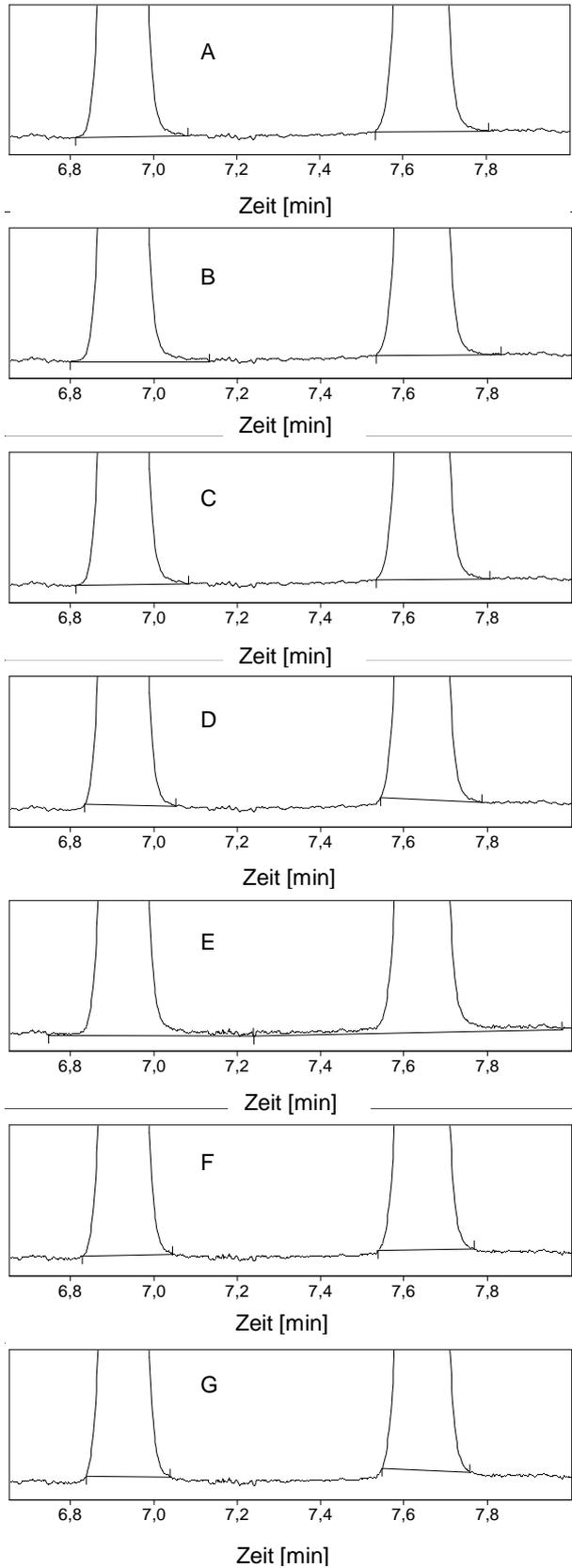


Abbildung 4-4: Einfluss der Integrationsparameter Peak Width und Threshold auf die Ergebnisse der Integration: DL-Tyr(FI4), als N,O-TFA/O-Et-Derivat auf Chirasil-D-Val (Säule A).

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Lipodex E (Säule E)

| | Peak Width [min] | Threshold [mV] | EF [%] |
|---|---------------------|-------------------|-----------|
| A | 0,1 | 0,5 | 53,781 |
| B | 0,1 | 1,0 | 53,598 |
| C | 0,1 | 2,0 | 53,071 |
| D | 0,3 | 1,0 | 53,758 |
| E | 0,5 | 0,1 | 53,508 |
| F | 0,5 | 1,0 | 53,600 |
| G | 0,5 | 7,0 | 53,589 |

w_h : 0,25 min

R_s : 2,35

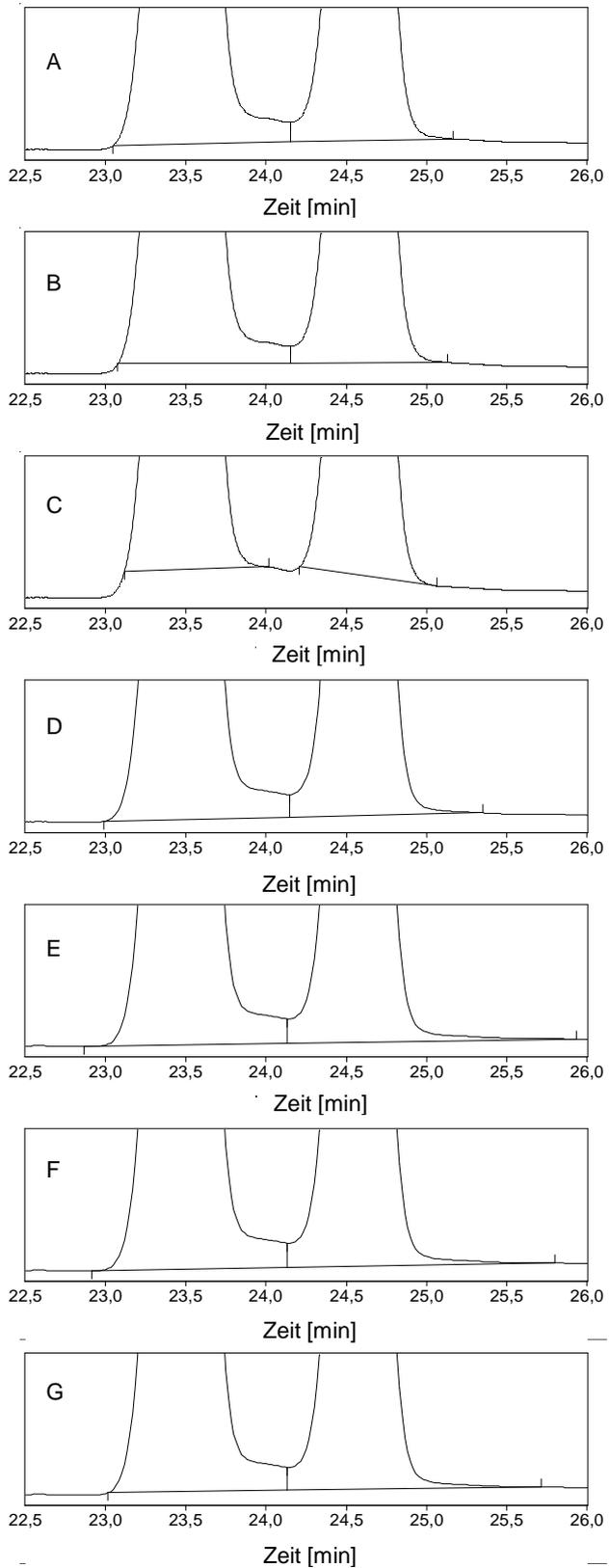


Abbildung 4-5: Einfluß der Integrationsparameter Peak Width und Threshold auf die Ergebnisse der Integration: *DL*-Tyr(F14), als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Lipodex E (Säule E).

Arbeitsweise

Um präzise und reproduzierbare Ergebnisse sowie geringste Abweichungen nahe der Nachweisgrenze erzielen zu können, ist eine äußerst saubere Arbeitsweise notwendig. Kleinste Verunreinigungen, vor allem von α -Aminosäuren in den verwendeten Reagenzien, Glasgeräten und Verbrauchsmaterialien können das Ergebnis verfälschen. Auch können über anorganische und organische Aerosole und Staub Verunreinigungen in die Probengläschen gelangen (Mineral- oder Zellulosefasern, Salze, proteinogene oder mikrobielle Partikel).¹⁴⁰ Proteinogene Bestandteile stammen vorwiegend von der Haut, Haaren, Fasern, Mikroorganismen etc. und können als globale Anreicherung von *L*-Aminosäuren auf der Erde nicht vermieden werden. Armstrong *et al.*¹⁴⁰ gelang es, in Labor-Aerosol/Staub unter anderem 7,3 mg Phenylalanin je Gramm Staub nachzuweisen. Um die Menge proteinogener Verunreinigungen so weit wie möglich zu reduzieren, wurden die Probengläschen vor Benutzung ausgeglüht und sofort mit einem sauberen und erhitzten (50 °C, mind. 24 h) Deckel verschlossen. Die Proben und Reagenzien wurden möglichst schnell in die Gläschen eingewogen bzw. pipettiert. Durch Verwendung einer Pinzette wurde darauf geachtet, dass so wenig wie möglich mit der Haut bzw. den Haaren in Berührung kam. Außerdem wurden regelmäßig Blindreaktionen mit den verwendeten Reagenzien durchgeführt und die Produkte anschließend unter den gleichen Bedingungen wie die Proben gaschromatographisch untersucht.

Kapillarelektrophorese

Die kapillarelektrophoretischen Bestimmungen der *D*-Enantiomerenanteile wurden mit nativem *DL*-Tyrosin durchgeführt. Da *DL*-Tyrosin eine maximale UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 200 nm besitzt, kann bei Verwendung eines UV-Detektors auf eine Derivatisierung verzichtet werden. Als chirale Selektorzusätze zum Puffer wurden 2-Hydroxypropyl- α -cyclodextrin (2-HP- α -CD) und hochsulfatiertes γ -Cyclodextrin (HS- γ -CD) eingesetzt.¹⁴¹

UV-Detektion in der Kapillarelektrophorese

Die UV-Detektion findet in der enantioselektiven CE on-column statt. Das bedeutet, dass die Detektion der Enantiomere während der chiralen Trennung erfolgt. Deshalb muss bei der Auswertung der Elektropherogramme die Signalfäche mit den Retentionszeiten korreliert werden, da das ersteluierte Enantiomer im Elektropherogramm wegen der geringeren Verweilzeit vermindert detektiert wird als das entsprechende zweiteluierte Enantiomer.¹⁴²

Vergleich von verschiedenen Methoden und Selektoren

Die genaue Bestimmung des *D*-Enantiomerenanteils im Racemat von *DL*-Tyr(Se0) wurde mit zwei verschiedenen enantioselektiven Methoden (Gaschromatographie und Kapillarelektrophorese) und jeweils verschiedenen chiralen Selektoren durchgeführt und verglichen. Dabei wurden in der Gaschromatographie zwei chirale (Chirasil-Val und Lipodex E) und zwei entgegengesetzt konfigurierte stationäre Phasen (Chirasil-*D*-Val und Chirasil-*L*-Val) sowie in der Kapillarelektrophorese zwei chirale Selektoren (2-HP- α -CD und HS- γ -CD) verwendet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-4** und **Abbildung 4-6** gegenübergestellt.

Tabelle 4-4: Bestimmung der *D*-Enantiomerenanteile EF [%], der absoluten Standardabweichung σ [%], relativen Standardabweichung $\sigma_{rel.}$ [%] und Auflösungs-faktor R_s für n Messungen von *DL*-Tyr(Se0) in der GC (FID; als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat) und in der CE (UV, underivatisiert) mit chiralen Selektoren.

| | | <i>DL</i> -Tyr(Se0) | | | | | |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------|-------|----------|---------------------|-----|-------|
| | | Säule | EF | σ | $\sigma_{rel.}$ [%] | n | R_s |
| GC | Chirasil- <i>D</i> -Val | A | 49,72 | 0,10 | 0,20 | 10 | 6,39 |
| | Chirasil- <i>L</i> -Val | C | 49,84 | 0,07 | 0,14 | 10 | 4,34 |
| | Lipodex E | F | 50,90 | 1,08 | 2,12 | 6 | 2,35 |
| CE | 2-HP- α -CD | | 49,67 | 0,36 | 0,73 | 4 | 3,39 |
| | HS- γ -CD | | 49,57 | 0,15 | 0,30 | 10 | 7,21 |
| ----- | | | | | | | |
| Mittelwert | | | 49,94 | 0,55 | | | |
| Mittelwert (ohne Lipodex E) | | | 49,70 | 0,11 | | | |

4 Quantitative Enantiomeranalytik

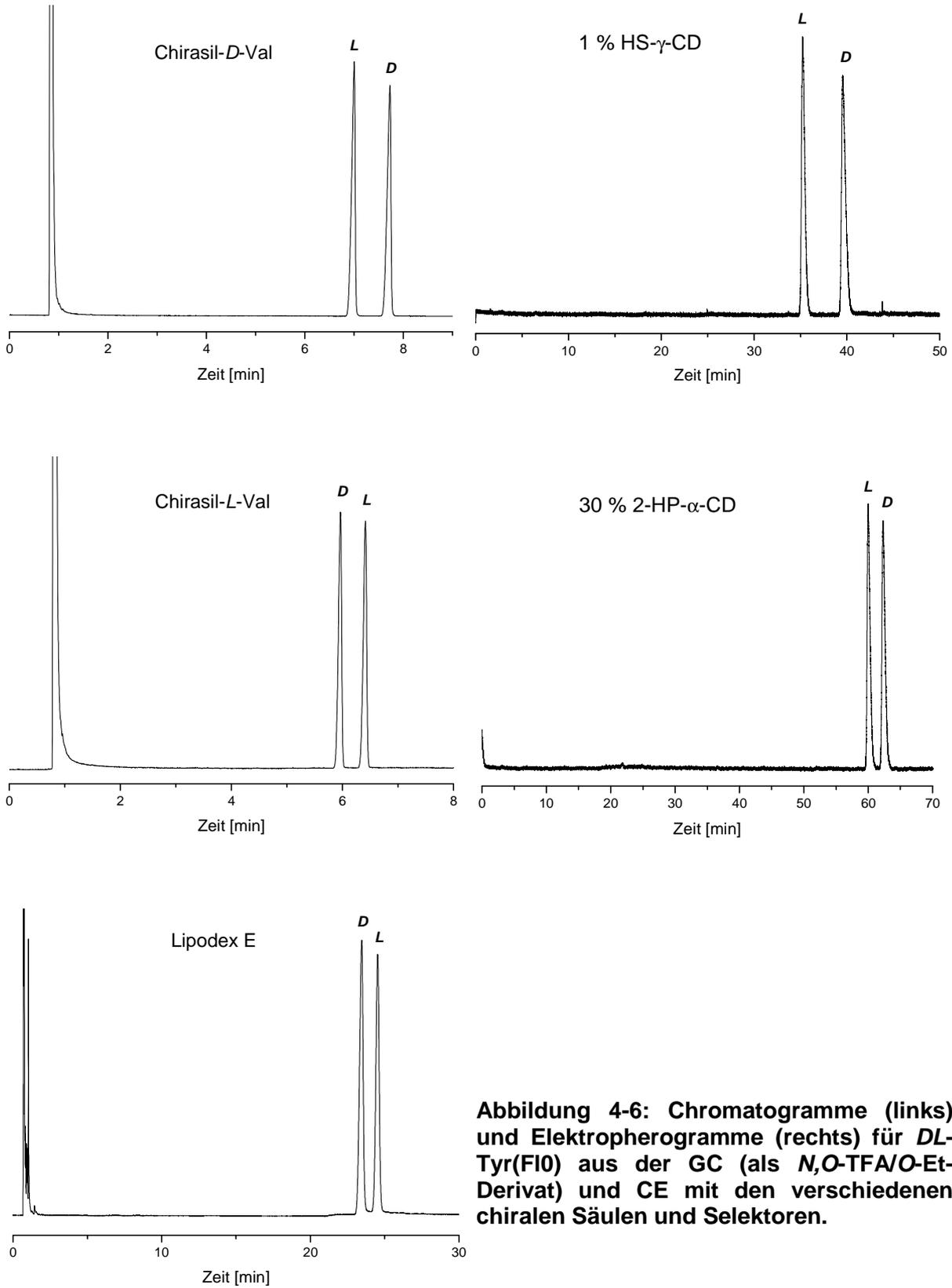


Abbildung 4-6: Chromatogramme (links) und Elektropherogramme (rechts) für DL-Tyr(F10) aus der GC (als N,O-TFA/O-Et-Derivat) und CE mit den verschiedenen chiralen Säulen und Selektoren.

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Die Ergebnisse aus den gaschromatographischen Messungen nach der Derivatisierung stimmen mit Ausnahme der Werte für die Trennungen auf Lipodex E sehr gut mit den Ergebnissen aus der Kapillarelektrophorese für underivatisierte Proben überein (**Tabelle 4-4**). Im Vergleich der stationären GC-Phasen entgegengesetzter Händigkeit (Chirasil-*L*-Val und Chirasil-*D*-Val) konnten geringfügig unterschiedliche *EF*-Werte mit einer sehr guten relativen Standardabweichung bestimmt werden. Die mittels CE ermittelten *EF*-Werte unterscheiden sich von den Ergebnissen der GC nicht signifikant. Die relativen Standardabweichungen sind jedoch geringfügig schlechter als bei Chirasil-Val. Dies liegt am stärkeren Rauschen der Grundlinie (**Abbildung 4-6**). Die Präzision dieser vier Methoden (ohne Lipodex E) ist mit einer geringen Standardabweichung sehr hoch ($49,70 \pm 0,11$ %). Bei Lipodex E beträgt der R_s -Wert 2,35 und liegt damit deutlich über dem Minimumkriterium für eine vollständige Trennung (1,75), die Auflösung ist aber schlechter als für die anderen Systeme. Deshalb wurde hier eine vergleichsmäßig hohe relative Standardabweichung erhalten. Bei der Integration der Chromatogramme in einem vorhergehenden Abschnitt wurde bereits auf die mögliche Anwesenheit eines zusätzlichen Signals zwischen dem *D*- und *L*-Peak hingewiesen (freie OH-Gruppe des Tyrosins), das sich hier in der Standardabweichung und relativen Standardabweichung bemerkbar machen könnte. Vermutlich wäre es vorteilhafter, wenn für die genaue Bestimmung von α -Aminosäure-Racematen der Auflösungsfaktor über 2,35 läge.

Vergleich von repräsentativen DL- α -Aminosäuren

Die prozentualen *D*-Anteile von verschiedenen kommerziell erhältlichen *DL- α -Amino-säuren* wurde auf Chirasil-*D*- und -*L*-Val und Lipodex E geprüft. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-5** wiedergegeben. Dabei werden Alanin, Leucin und Prolin für aliphatische oder alicyclische, Ornithin und Lysin für basische, Asparaginsäure für saure und Phenylalanin und Tyrosin für aromatische Aminosäuren als repräsentativ betrachtet. Serin, Tyrosin und Cystein stehen außerdem für Aminosäuren, deren TFA-Ester hydrolytisch labil sind.

Tabelle 4-5: Bestimmung des D-Enantiomerenanteils EF [%] und der absoluten Standardabweichung [%] von repräsentativen DL- α -Aminosäuren mit GC als N(O,S)-TFA/O-Et-Derivat (n = 10).

| | Chirasil-D-Val | | | Chirasil-L-Val | | | Lipodex E | | | | | |
|-------------------|----------------|-------|----------|----------------|-------|-------|-----------|----------------|-------|-------|----------|----------------|
| | Säule | EF | σ | R _s | Säule | EF | σ | R _s | Säule | EF | σ | R _s |
| DL-Alanin (Se0) | A | 49,91 | 0,04 | 13,56 | D | 49,99 | 0,04 | 7,43 | E | 49,89 | 0,01 | 2,75 |
| DL-Leucin | B | 50,01 | 0,09 | 20,35 | D | 50,02 | 0,09 | 12,56 | F | 49,93 | 0,04 | 7,51 |
| DL-Ornithin | A | 49,99 | 0,06 | 8,53 | D | 49,98 | 0,03 | 2,84 | G | 49,90 | 0,04 | 3,48 |
| DL-Lysin | A | 49,90 | 0,08 | 4,45 | D | 49,90 | 0,02 | 3,51 | G | 49,66 | 0,08 | 6,43 |
| DL-Asparaginsäure | B | 50,03 | 0,03 | 2,87 | D | 49,95 | 0,05 | 2,41 | G | 49,98 | 0,04 | 3,15 |
| DL-Phenylalanin | A | 50,01 | 0,04 | 7,43 | D | 49,98 | 0,02 | 3,48 | F | 49,82 | 0,11 | 1,74 |
| DL-Tyrosin (F14) | B | 49,77 | 0,08 | 5,52 | D | 49,92 | 0,06 | 4,13 | E | 53,27 | 0,63 | 2,32 |
| DL-Tyrosin (sym) | B | 50,10 | 0,07 | 5,65 | D | 50,03 | 0,06 | 3,92 | E | 54,09 | 0,42 | 2,77 |
| DL-Serin | B | 50,10 | 0,04 | 4,08 | D | 49,97 | 0,04 | 4,01 | G | 49,54 | 0,32 | 2,93 |
| DL-Cystein | A | 48,58 | 0,17 | 6,65 | D | 47,77 | 0,10 | 3,28 | - | - | - | - |
| DL-Prolin | B | 50,50 | 0,08 | 1,31 | D | 49,67 | 0,44 | 1,11 | G | 49,99 | 0,09 | 11,02 |

4 Quantitative Enantiomernanalytik

Die α -Aminosäuren besaßen mit Ausnahme von Cystein ein nahezu racemisches Enantiomerenverhältnis. Auf Lipodex E zeigte Cystein keine ausreichend gute Peaktrennung, für Prolin war dagegen Lipodex E besser geeignet als Chirasil-Val. Auf den Säulen entgegengesetzter Händigkeit Chirasil-*D*-Val und Chirasil-*L*-Val wurde für Leucin, Ornithin, Lysin und Phenylalanin eine sehr gute Übereinstimmung der *D*-Enantiomerenanteile erhalten. Jedoch lagen in den Ergebnissen von Alanin, Asparaginsäure, Tyrosin, Serin, Cystein und Prolin deutliche Differenzen ΔEF vor. Es ist nicht möglich, ausschließlich anhand des Experiments zwischen einem systematischen Fehler und einem Überschuss eines Enantiomers im vermeintlichen Racemat zu unterscheiden. Die Händigkeit der beiden Säulen sollte keinen Einfluss auf das Ergebnis der Racematzusammensetzung haben. Außerdem wird angenommen, dass die Deaktivierung beider Säulen identisch erfolgte. In der Literatur¹⁴³ werden mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung der Enantiomerenreinheit aufgeführt. Beispielsweise kann das Ergebnis durch eine Verunreinigung verfälscht werden, die mit einem der beiden Enantiomere von der Säule coeluiert wird. Eine Coelution wurde hier aber nach visueller Überprüfung der Chromatogramme und wegen der mehrmaligen Durchführung der Messungen bei verschiedenen Säulentemperaturen ausgeschlossen. Andererseits kann der Effekt auftreten, dass die Probe während der Trennung zum Fragmentieren neigt. Davon ist das Enantiomer, welches länger auf der Säule verweilt und somit später eluiert wird, stärker betroffen. Dies könnte für die Derivate von Tyrosin und Serin (*O*-TFA-Gruppe) sowie Cystein (*S*-TFA-Gruppe) von Bedeutung sein, da diese hydrolytisch instabil sind und sich dadurch stärker thermisch zersetzen. Säulenmaterialien, bei denen dieser Effekt deutlich zu beobachten ist, werden als „Serinfresser-Phasen“ bezeichnet. Da bei Trennungen auf Chirasil-*D*-Val das *D*-Enantiomer später eluiert als das *L*-Enantiomer, wird ein geringerer *D*-Enantiomerenanteil als für Chirasil-*L*-Val erwartet; die Angabe von *EF* in dieser Arbeit erfolgt bezogen auf das *D*-Enantiomer. Daraus kann geschlossen werden, dass der Mittelwert aus den Ergebnissen von Chirasil-*D*- und -*L*-Val jeweils als „richtiger Wert“ angenommen werden kann.

In **Tabelle 4-6** wurden die Ergebnisse der *DL*- α -Aminosäuren auf Chirasil-*D*- bzw. -*L*-Val gegenübergestellt und jeweils die Differenz ΔEF sowie die Mittelwerte aus den Ergebnissen beider Säulen gebildet. Aus letzteren lässt sich ableiten, dass dies ein möglicher Weg zur Verbesserung der Richtigkeit des *EF*-Wertes für *DL*- α -Aminosäuren ist. Die Stationärphasen Chirasil-*D*- und -*L*-Val wurden außerdem mit der Testmischung von Grob¹⁴⁴ überprüft. Mit dem Grob-Test kann die Aktivität der Kapillaroberfläche (Inertheit) geprüft werden. Dabei

4 Quantitative Enantiomeranalytik

wurde festgestellt, dass die Säulen naturgemäß nicht völlig identisch sind, sondern lediglich ähnliche Eigenschaften besitzen. Die Kapillaroberfläche der verwendeten Chirasil-*D*-Val-Säule ist weniger inert als die der Chirasil-*L*-Val-Säule. Die bestimmten *D*-Enantiomerenanteile von Tyrosin, Serin und Cystein konnten dadurch beeinflusst werden. Die wahren Werte für *EF* sollten folglich näher an den bestimmten Ergebnissen von Chirasil-*L*-Val liegen. Im Fall von Prolin sollte dagegen das Ergebnis von Chirasil-*D*-Val die bessere Näherung darstellen, da die Chirasil-*D*-Val-Säule eine etwas höhere Enantioselektivität aufweist.

Mittels eines t-Tests können die Ergebnisse der stationären Phasen Chirasil-*L*-Val und Chirasil-*D*-Val verglichen werden. Dabei wird angenommen, dass beide Messreihen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % den gleichen Mittelwert besitzen, wenn kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte besteht. Die t-Test-Werte in **Tabelle 4-6** wurden mit Excel (© Microsoft) ermittelt. Dabei gilt, dass kein deutlicher Unterschied zwischen den berechneten Mittelwerten von Chirasil-*D*-Val und Chirasil-*L*-Val besteht, wenn der resultierende Wert über 0,05 liegt. Für die *DL*- α -Aminosäuren Leucin, Ornithin, Lysin und Phenylalanin konnte dies bei einem Vertrauensbereich von 95 % festgestellt werden, der t-Test-Wert liegt über 0,05. Für Alanin (Se0) und Tyrosin (syn) liegt der Wert im Grenzbereich, für alle anderen *DL*- α -Aminosäuren besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten.

Tabelle 4-6: Unterschiede ΔEF der auf Chirasil-*D*- und -*L*-Val bestimmten *D*-Enantiomerenanteile *EF* [%] der *DL*- α -Aminosäuren aus Tabelle 4-5, Mittelwert des *EF* [%] beider Stationärphasen und der berechnete Wert des t-Tests.

| | Chirasil- <i>D</i> -Val | Chirasil- <i>L</i> -Val | ΔEF | Mittelwert | t-Test |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|------------|-----------------------|
| | <i>EF</i> | <i>EF</i> | [%] | <i>EF</i> | |
| <i>DL</i> -Alanin (Se0) | 49,91 | 49,99 | - 0,08 | 49,95 | 0,001 |
| <i>DL</i> -Leucin | 50,01 | 50,02 | - 0,01 | 50,02 | 0,81 |
| <i>DL</i> -Ornithin | 49,99 | 49,98 | 0,01 | 49,99 | 0,88 |
| <i>DL</i> -Lysin | 49,90 | 49,90 | 0,00 | 49,90 | 0,92 |
| <i>DL</i> -Asparaginsäure | 50,03 | 49,95 | 0,08 | 49,99 | $7,0 \times 10^{-4}$ |
| <i>DL</i> -Phenylalanin | 50,01 | 49,98 | 0,03 | 50,00 | 0,058 |
| <i>DL</i> -Tyrosin (F14) | 49,77 | 49,92 | - 0,15 | 49,85 | $1,9 \times 10^{-4}$ |
| <i>DL</i> -Tyrosin (syn) | 50,10 | 50,03 | 0,07 | 50,07 | 0,012 |
| <i>DL</i> -Serin | 50,10 | 49,97 | 0,13 | 50,04 | $1,3 \times 10^{-6}$ |
| <i>DL</i> -Cystein | 48,58 | 47,77 | 0,81 | 48,18 | $2,3 \times 10^{-10}$ |
| <i>DL</i> -Prolin | 50,50 | 49,67 | 0,83 | 50,09 | $1,8 \times 10^{-4}$ |

Herstellung eines racemischen Tyrosin-Standards

Das kommerziell erhältliche *DL*-Tyr(Se0) konnte mit einer hohen Präzision bestimmt werden (**Tabelle 4-4**). Die Ergebnisse entsprachen jedoch nicht exakt einem *EF*-Wert von 50,0 %, wie für ein Racemat zu erwarten wäre. Sie unterlagen Schwankungen im *D*-Enantiomerenanteil von bis zu 0,9 % (bei Lipodex E). Aus diesem Grund wurde zunächst racemisches *DL*-Tyrosin der Firma Fluka, *DL*-Tyr(F10), durch Umkristallisation gereinigt. Es wurden zwei verschiedene Umkristallisationen durchgeführt. Eine *DL*-Tyrosin-Lösung der Konzentration 17 mmol/L wurde viermal in Wasser umkristallisiert zu *DL*-Tyr(F14). Ebenso wurde *DL*-Tyr(F11) durch einmaliges Umkristallisieren aus einer Lösung der Konzentration 5,56 mmol/L erhalten (**Abbildung 4-7**). Die geringe Konzentration wurde gewählt, um in verdünnter Lösung durch langsames Kristallwachstum ein möglichst ideales Racemat zu erzeugen. Die *D*-Enantiomerenanteile wurden anschließend jeweils auf Chirasil-*D*- und -*L*-Val bestimmt (**Tabelle 4-7**).

Tabelle 4-7: Bestimmung des *D*-Enantiomerenanteils *EF* [%], der absoluten Standardabweichung σ [%] und Anzahl der Messungen *n* von *DL*-Tyrosin (Fluka) vor, nach einmaligem und nach viermaligem Umkristallisieren und von synthetisch hergestelltem *DL*-Tyrosin. Die Bestimmungen erfolgten als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat mit GC auf Chirasil-*D*- und -*L*-Val.

| Säule | | <i>DL</i> -Tyr(F10) | | | <i>DL</i> -Tyr(F11) | | | <i>DL</i> -Tyr(F14) | | | <i>DL</i> -Tyr(syn) | | |
|-------------------------|-------------|---------------------|----------|----------|---------------------|----------|----------|---------------------|----------|----------|---------------------|----------|----------|
| | | <i>EF</i> | σ | <i>n</i> |
| Chir.- <i>D</i> -Val | A B | 49,50 | 0,05 | 1 x 6 | 49,74 | 0,03 | 3 x 5 | 49,83 | 0,05 | 1 x 6 | 49,90 | 0,03 | 3 x 4 |
| Chir.- <i>L</i> -Val | D D C | 49,56 | 0,05 | 1 x 12 | 49,86 | 0,07 | 3 x 5 | 49,91 | 0,05 | 1 x 12 | 49,92 | 0,06 | 1 x 10 |
| | | | | | | | | 49,76 | 0,05 | 1 x 10 | 50,03 | 0,06 | 1 x 10 |
| | | | | | | | | | | | 50,00 | 0,06 | 6 x 3 |
| | Mittelwert | 49,53 | | | 49,80 | | | 49,83 | | | 50,01 | | |

Die Ergebnisse stimmen für die jeweilige stationäre Phase sowie im Vergleich mit denen der entgegengesetzt konfigurierten stationären Phase sehr gut überein. Wie aus **Tabelle 4-7** zu entnehmen ist, liegt zwischen den Ergebnissen der jeweiligen Probe auf Chirasil-*D*-Val und Chirasil-*L*-Val eine Differenz ΔEF von etwa 0,1 % vor (systematischer Fehler). Damit kann der Mittelwert der Ergebnisse von Chirasil-*D*- und -*L*-Val jeweils als der „richtige Wert“ angenommen werden.

4 Quantitative Enantiomeranalytik

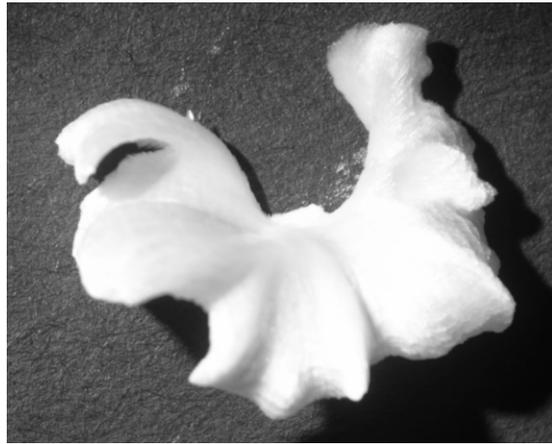


Abbildung 4-7: Kristallzusammenschluss, entstanden nach einmaligem, langsamen Umkristallisieren von *DL*-Tyr(FI0) zu *DL*-Tyr(FI1).

Selbst nach viermaligem Umkristallisieren wurde grundsätzlich ein geringer Überschuss an *L*-Enantiomer in den umkristallisierten *DL*-Tyrosin-Proben festgestellt. Das bedeutet, dass entweder die Erzeugung eines reinen Racemats nicht gelang oder es sich um einen systematischen Fehler in den Messungen handelt.

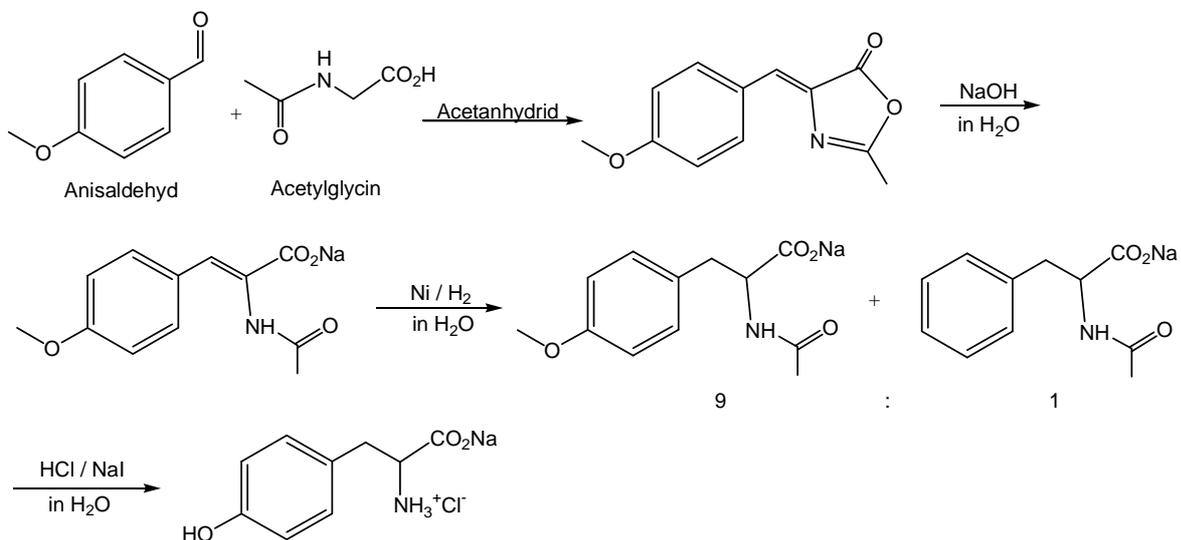


Abbildung 4-8: Syntheseweg von racemischem Tyrosin *DL*-Tyr(syn).

Bei der Durchführung einer Validierung wird zur Bestimmung der Richtigkeit ein erhaltener Wert mit dem für einen fehlerfreien Standard oder ein zertifiziertes Referenzmaterial verglichen. Ein zertifizierter, rein racemischer Standard für *DL*- α -Aminosäuren ist jedoch

4 Quantitative Enantiomeranalytik

kommerziell nicht erhältlich. Deshalb wurde racemisches *DL*-Tyrosin von der Arbeitsgruppe Nagel (Universität Tübingen) synthetisiert und uns zur Verfügung gestellt (**Abbildung 4-8**).

Das synthetisierte *DL*-Tyrosin konnte mittels enantioselektiver Gaschromatographie als nahezu racemisch bestimmt werden (**Tabelle 4-7**). Die Probe war allerdings ockerfarben und nicht rein weiß und enthielt ungefähr 5 % Phenylalanin (**Abbildung 4-9**).

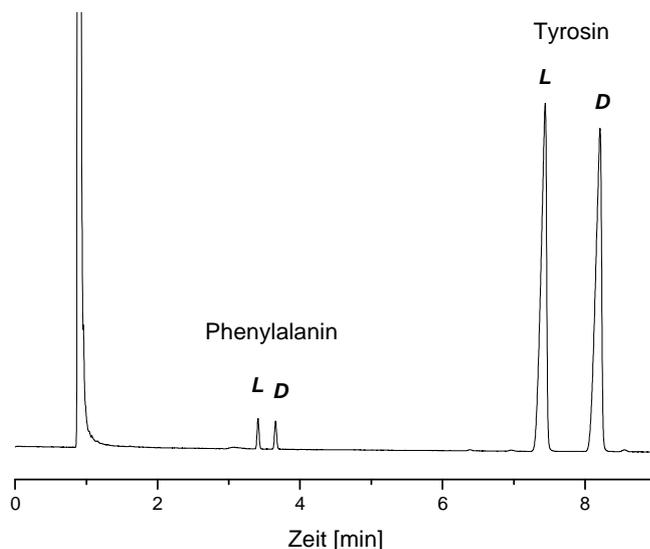


Abbildung 4-9: Chromatogramm von *DL*-Tyr(syn) als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*D*-Val (Säule B).

Einfluss der Injektionsmenge

Die Streuung der Analysenergebnisse und damit die Präzision ist von der Menge an Analyt abhängig, welche den Detektor erreicht. Als Streuungs- bzw. Präzisionsmaß wird die absolute (σ) oder die relative Standardabweichung ($\sigma_{\text{rel.}}$) verwendet. Um den Einfluss der Injektionsmenge auf die Präzision besser beurteilen zu können, wurden verschieden konzentrierte Lösungen von *DL*-Tyr(F14) in 0,1 mol/L HCL hergestellt, derivatisiert und anschließend der *D*-Enantiomerenanteil *EF* [%] sowie die absolute Standardabweichung σ [%] bestimmt (**Tabelle 4-8**). Die Bestimmung erfolgte unter Berücksichtigung der Messpräzision, Methodenpräzision und der Wiederholpräzision. Wie in **Tabelle 4-8** zu sehen,

4 Quantitative Enantiomeranalytik

wurden sowohl für die GC als auch für GC/MS gute Ergebnisse mit einer ausreichenden Präzision über den gesamten Konzentrationsbereich erhalten. Die mit GC ermittelten Standardabweichungen wurden schlechter, je geringer die Konzentration der injizierten Probe war. Im Vergleich dazu konnten mittels GC/MS bessere Standardabweichungen erreicht werden, da selbst Mengen von 20 pg mit einer Standardabweichung von $\pm 0,61$ % detektiert werden konnten.

Tabelle 4-8: Bestimmung des *D*-Enantiomerenanteils *EF* [%] und der absoluten Standardabweichung σ [%] von *DL*-Tyr(FI4) als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat für verschiedene Konzentrationen mit GC (Injektionsmenge jeweils 1 μ L, $n = 4$, Splitfaktor $f = 55$, Chirasil-*L*-Val, Säule D) und GC/MS (Injektionsmenge jeweils 1 μ L, $n = 5$, Chirasil-*L*-Val, Säule D; splitlos, außer *).

| Probenkonzentration | | GC | | | GC/MS | | |
|---------------------|-------------|--|-----------|----------|--------------------------|-----------|----------|
| mmol/L | ng/ μ L | Menge auf der Säule [ng] (split, $f = 55$) | <i>EF</i> | σ | Menge auf der Säule [ng] | <i>EF</i> | σ |
| 10 | 1812 | 32,95 | 49,88 | 0,06 | * | 49,09 | 0,18 |
| 1 | 181,2 | 3,29 | 50,04 | 0,56 | 181,2 | 49,95 | 0,15 |
| 0,5 | 91,60 | 1,65 | 50,80 | 1,41 | 91,60 | 49,57 | 0,04 |
| 0,1 | 18,12 | 0,33 | 49,98 | 1,89 | 18,12 | 48,96 | 0,22 |
| 0,05 | 9,06 | 0,16 | 51,81 | 2,37 | 9,06 | 49,36 | 0,07 |
| 0,01 | 1,81 | | | | 1,81 | 49,30 | 0,12 |
| 0,005 | 0,91 | | | | 0,91 | 48,83 | 0,68 |
| 0,001 | 0,18 | | | | 0,18 | 49,38 | 1,14 |
| 0,0005 | 0,09 | | | | 0,09 | 48,40 | 0,68 |
| 0,0001 | 0,02 | | | | 0,02 | 44,00 | 0,61 |

Für die mit GC erhaltenen Ergebnisse aus **Tabelle 4-8** wurde die kleinste nachweisbare Menge (Nachweisgrenze) unter Berücksichtigung eines Signal/Rausch-Verhältnisses von 3:1 zu 0,16 ng und die kleinste quantifizierbare Menge (Bestimmungsgrenze) unter Berücksichtigung eines Signal/Rausch-Verhältnisses von 9:1 zu 0,33 ng bestimmt.

**Linearität und Wiederfindung für angereichertes racemisches
DL-Tyrosin**

Durch das gezielte Anreichern des Racemats mit *D*- bzw. *L*-Tyrosin kann auch indirekt der *D*-Enantiomerenanteil der Probe bestimmt werden. *DL*-Tyr(F14) wurde dazu jeweils mit bis zu 1 % *D*- bzw. *L*-Tyrosin ($EF = 49,5 - 50,5$ %) angereichert. Der *D*-Enantiomerenanteil der angereicherten Proben wurde mittels GC (Chirasil-*L*-Val) gemessen (Tabelle 4-9). Für die Berechnung der Wiederfindung wurde angenommen, dass rein racemisches Tyrosin (EF 50 %) vorlag und die Anreicherung mit reinen Enantiomeren (EF 100 % bzw. 0 %) erfolgte.

Tabelle 4-9: Angereichertes *DL*-Tyr(F14) mit *D*-Tyr(F10) bzw. *L*-Tyr(F10) wurde mittels GC als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D), $n = 4$, bestimmt (*D*-Enantiomerenanteil EF [%], absolute Standardabweichung σ [%]).

| Mischungsverhältnisse | | | berechnet ^{*)} | gemessen | | Wiederfindung |
|-----------------------|--------------|--------------|-------------------------|----------|----------|---------------|
| <i>DL</i> [%] | <i>D</i> [%] | <i>L</i> [%] | EF | EF | σ | [%] |
| 99,0 | | 1,0 | 49,50 | 49,49 | 0,05 | 99,98 |
| 99,5 | | 0,5 | 49,75 | 49,74 | 0,03 | 99,98 |
| 99,8 | | 0,2 | 49,90 | 49,89 | 0,02 | 99,98 |
| 99,8 | 0,2 | | 50,10 | 50,07 | 0,04 | 99,94 |
| 99,5 | 0,5 | | 50,25 | 50,23 | 0,02 | 99,96 |
| 99,0 | 1,0 | | 50,50 | 50,48 | 0,03 | 99,96 |

*) *DL*-Tyr(F14): Konzentration 10,0 mmol/L, $EF = 50,0$ %
D-Tyr(F10): Konzentration 10,0 mmol/L, $EF = 100,0$ %
L-Tyr(F10): Konzentration 10,0 mmol/L, $EF = 0,0$ %

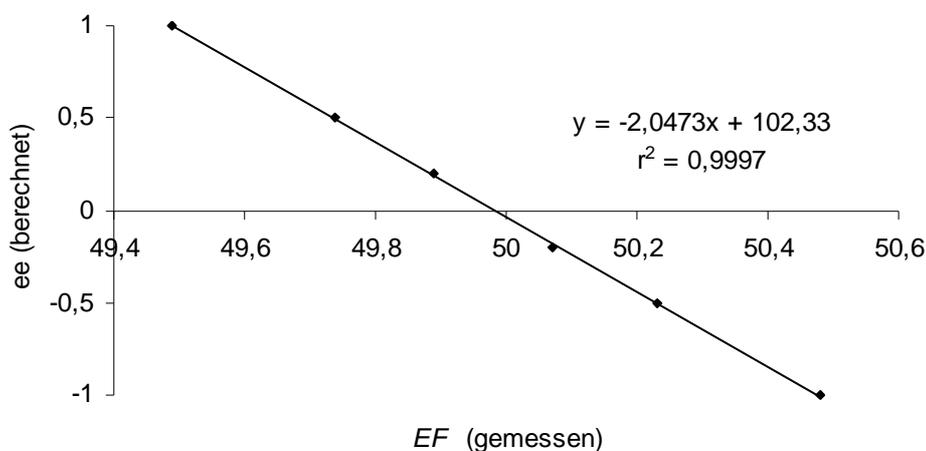


Abbildung 4-10: Kalibrierdiagramm von *DL*-Tyr(F14), angereichert mit bis zu 1 % *D*-Tyrosin (positiver Enantiomerenüberschuss ee) oder *L*-Tyrosin (negativer ee) aus den Ergebnissen der Tabelle 4-9.

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Aus den gemessenen Ergebnissen der **Tabelle 4-9** wurde das Racemat zu *EF* 49,98 % *D*-Tyrosin berechnet. Im Vergleich zu den vorher bestimmten Ergebnissen von *DL*-Tyr(FI4), (vgl. **Tabelle 4-7**: *EF* 49,92 ± 0,06 %, **Tabelle 4-8**: *EF* 49,88 ± 0,06 %) liegt dieser Wert näher am Racemat (50 %). Bei der analytischen Bestimmung sehr geringer Abweichungen sind solche Schwankungen immer problematisch, da die Proben an unterschiedlichen Tagen derivatisiert und gemessen wurden. Diese Schwankungen können als Fehler in der Präzision von Serie zu Serie bzw. in der Wiederholpräzision gesehen werden. Mit den Ergebnissen der **Tabelle 4-9** kann außerdem gezeigt werden, dass sich sehr geringe *D*- bzw. *L*-Tyrosin-Verunreinigungen in racemischem Tyrosin bestimmen lassen. Die Wiederfindung unter Berücksichtigung der bestimmten und berechneten Ergebnisse ist mit 99,94 – 99,98 % jeweils sehr gut. Auch die Kalibriergerade (**Abbildung 4-10**) aus den Ergebnissen der **Tabelle 4-9** zeigt eine sehr gute Linearität ($r^2 = 0,9997$).

Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von *D*- und *L*-Tyrosin-Enantiomeren

Kommerziell erhältliche *D*- und *L*-Tyrosin-Enantiomere (Fluka) wurden auf ihren *D*- bzw. *L*-Anteil mit Chirasil-*D*- und -*L*-Val untersucht.

Tabelle 4-10: Bestimmung des *D*- und *L*-Tyrosin-Anteils [%] von kommerziell erhältlichen Enantiomeren mittels GC als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat (n = 4, absolute Standardabweichung σ und relative Standardabweichung $\sigma_{rel.}$).

| | Säule | <i>D</i> -Tyr(FI0) | | | <i>L</i> -Tyr(FI0) | | |
|------------------------------|----------|--------------------|--------------|---------------------|--------------------|--------------|---------------------|
| | | <i>L</i> [%] | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] | <i>D</i> [%] | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] |
| Chirasil-<i>D</i>-Val | A | 0,074 | 0,005 | 6,40 | 0,081 | 0,017 | 20,40 |
| Chirasil-<i>L</i>-Val | C | 0,034 | 0,023 | 68,44 | 0,130 | 0,016 | 12,73 |

Wie in **Tabelle 4-10** zu sehen ist, konnten sowohl in *D*-Tyrosin als auch in *L*-Tyrosin jeweils eine Verunreinigung durch das entgegengesetzte Enantiomer festgestellt werden. Dabei fällt auf, dass die relative Standardabweichung $\sigma_{rel.}$ für den Anteil des jeweiligen Gegenenantomers von der Elutionsreihenfolge abhängt. Beispielsweise besitzt auf Chirasil-*D*-Val *L*-Tyrosin eine kürzere Retentionszeit als *D*-Tyrosin (**Abbildung 4-11**). Auf dieser

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Säule zeigen die Peaks von *D*-Tyrosin als Hauptkomponente und *L*-Tyrosin als Verunreinigung eine bessere Auflösung als im Fall einer Verunreinigung von *D*-Tyrosin in *L*-Tyrosin.

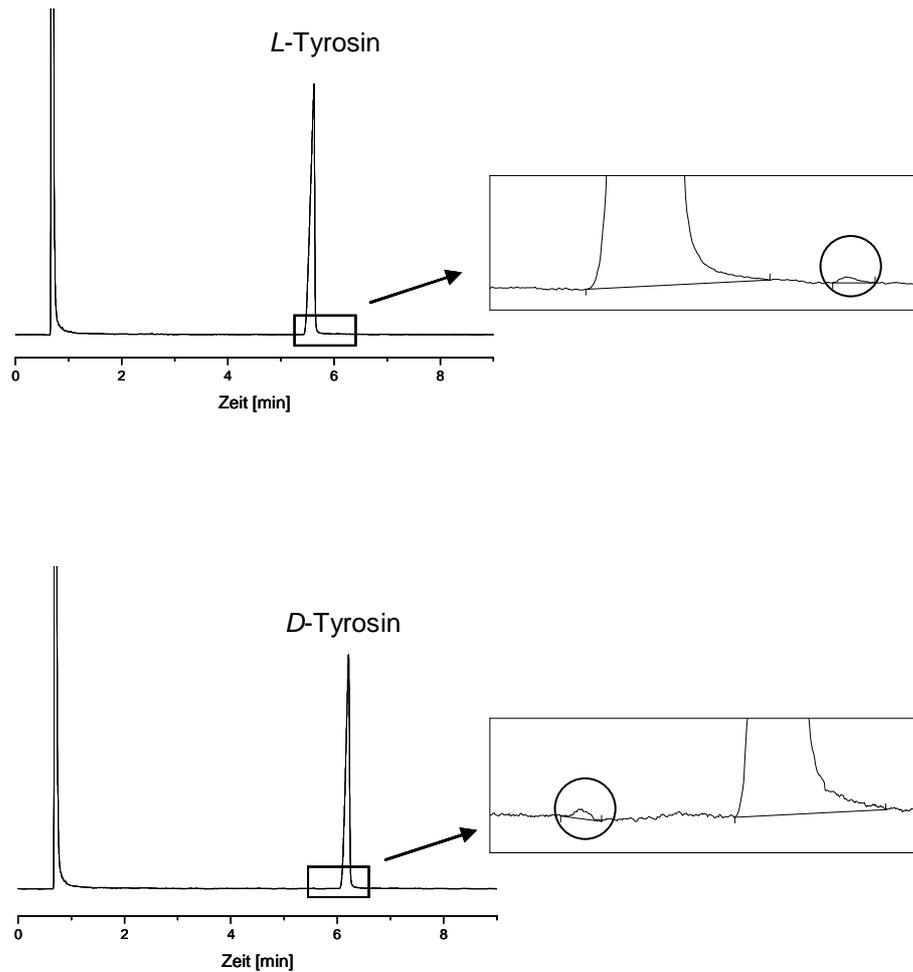


Abbildung 4-11: Chromatogramme von *L*-Tyr(F10) (oben) und *D*-Tyr(F10) (unten) auf Chirasil-*D*-Val (Säule A, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat bestimmt), mit Vergrößerung der jeweiligen Verunreinigung des entgegengesetzten Enantiomers.

Kleine Verunreinigungen von *L*-Tyrosin in *D*-Tyrosin sowie von *D*-Tyrosin in *L*-Tyrosin lassen sich folglich auf die beschriebene Weise bestimmen. Dabei sind Enantiomerenverunreinigungen bis 0,1 % mit einer akzeptablen relativen Standardabweichung quantifizierbar (**Tabelle 4-10**).

Mischungen von *D*- und *L*-Tyrosin-Enantiomeren

Um den gesamten Konzentrationsbereich von 100 - 0 % *D*-Tyrosin bzw. 0 – 100 % *L*-Tyrosin abzudecken, wurden definierte Mengen von kommerziell erhältlichen Enantiomeren gemischt und der *D*-Enantiomerenanteil jeweils gaschromatographisch bestimmt. Dazu wurden Lösungen von *D*-Tyr(Se0) und *L*-Tyr(Si0) mit einer Konzentration von je 10 mmol/L in 0,1 mol/L HCl hergestellt, daraus eine Konzentrationsreihe gebildet, derivatisiert und auf Chirasil-*D*- und -*L*-Val gemessen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-11** dargestellt.

Von jeder Probe der untersuchten Konzentrationsreihe wurde die relative Standardabweichung für die geringere Probenkomponente berechnet (**Tabelle 4-11**). Als Vergleich für die ermittelten Ergebnisse wurden Angaben aus der Literatur verwendet.¹²² Dabei wurde festgestellt, dass die Ergebnisse sowohl für Chirasil-*D*-Val als auch für Chirasil-*L*-Val für die Standardmischungen 100 % *D*-Tyrosin – 5 % *D*-Tyrosin unterhalb der in der Literatur geforderten Standardabweichung für den Pharmabereich liegen.

Die Kalibriergeraden zeigen für Chirasil-*D*-Val ($r^2 = 1,0000$) und für Chirasil-*L*-Val ($r^2 = 0,9999$) eine sehr gute Linearität über den gesamten Konzentrationsbereich, verbunden mit sehr geringen Abweichungen von der für Chirasil-*D*-Val ermittelten Trendgeraden (**Abbildung 4-12**).

4 Quantitative Enantiomeranalytik

Tabelle 4-11: Verschiedene Mischungsverhältnisse von *D*-Tyr(S_e0) und *L*-Tyr(S_i0) wurden mittels GC auf Chirasil-*D*-Val (Säule A) und Chirasil-*L*-Val (Säule C) als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat bestimmt (n = 5, *D*-Enantiomerenanteile *EF* [%], absolute Standardabweichung σ und relative Standardabweichung $\sigma_{rel.}$).

| Mischungsverhältnisse | | Chirasil- <i>D</i> -Val | | | Chirasil- <i>L</i> -Val | | |
|-----------------------|--------------|-------------------------|--------------|------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|
| <i>D</i> [%] | <i>L</i> [%] | <i>EF</i> | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] *) | <i>EF</i> | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] *) |
| 100 | 0 | 98,85 | 0,03 | 2,13 | 98,65 | 0,03 | 2,54 |
| 99 | 1 | 98,04 | 0,05 | 2,29 | 97,97 | 0,04 | 1,89 |
| 95 | 5 | 94,13 | 0,08 | 1,40 | 94,21 | 0,07 | 1,12 |
| 90 | 10 | 89,22 | 0,02 | 0,22 | 89,37 | 0,04 | 0,39 |
| 80 | 20 | 79,61 | 0,02 | 0,09 | 79,84 | 0,08 | 0,41 |
| 70 | 30 | 69,56 | 0,28 | 0,92 | 69,80 | 0,13 | 0,43 |
| 60 | 40 | 59,57 | 0,10 | 0,25 | 59,71 | 0,08 | 0,20 |
| 50 | 50 | 49,63 | 0,06 | 0,12 | 49,79 | 0,05 | 0,10 |
| 40 | 60 | 39,68 | 0,05 | 0,13 | 39,77 | 0,08 | 0,21 |
| 30 | 70 | 29,61 | 0,06 | 0,22 | 29,60 | 0,18 | 0,60 |
| 20 | 80 | 19,66 | 0,09 | 0,47 | 19,62 | 0,07 | 0,37 |
| 10 | 90 | 10,21 | 0,10 | 0,96 | 10,15 | 0,12 | 1,22 |
| 5 | 95 | 5,52 | 0,04 | 0,67 | 5,47 | 0,07 | 1,32 |
| 0 | 100 | 0,00 | - | - | 0,23 | 0,03 | 13,44 |

*) $\sigma_{rel.}$ wurde bei den Mischungen 100 % *D*-Tyrosin – 60 % *D*-Tyrosin auf den prozentualen *L*-Tyrosin-Anteil und bei den Mischungen 50 % *L*-Tyrosin – 100 % *L*-Tyrosin auf den prozentualen *D*-Tyrosin-Anteil bezogen.

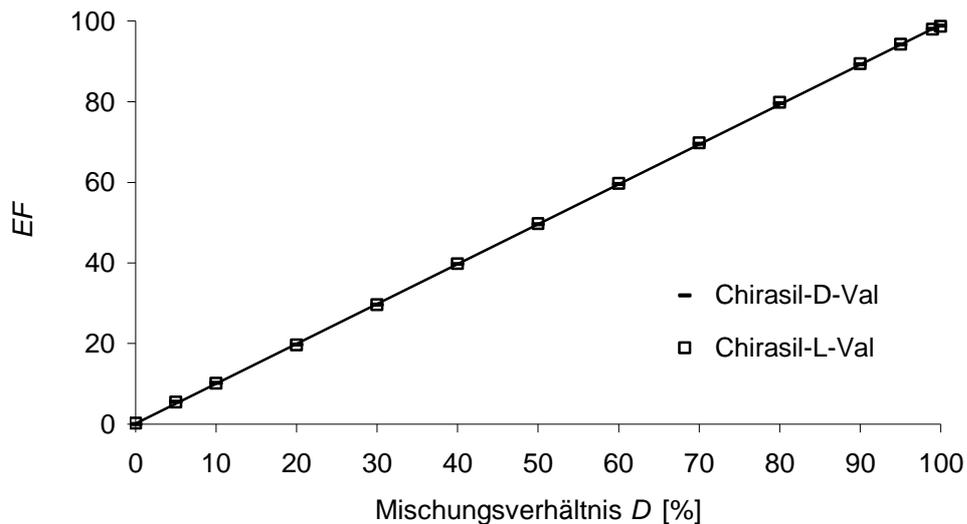


Abbildung 4-12: Linearitätsprofil der stationären Phasen Chirasil-*D*-Val ($r^2 = 1,0000$) und Chirasil-*L*-Val ($r^2 = 0,9999$) aus den Ergebnissen der Tabelle 4-11.

Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Alanin

Der *D*-Enantiomerenanteil von zwei kommerziell erhältlichen racemischen *DL*-Alanin Proben wurde mittels GC und GC/MS überprüft. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-12** dargestellt.

Tabelle 4-12: Vergleich der *D*-Enantiomerenanteile *EF* [%] und absoluten Standardabweichungen [%] aus *n* Messungen von *DL*-Ala(Me0) und *DL*-Ala(Se0). Die Bestimmungen wurden mittels GC und GC/MS als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat durchgeführt.

| | | <i>DL</i> -Ala(Me0) | | | <i>DL</i> -Ala(Se0) | | | |
|--------------|------------------------------|---------------------|-----------|----------|---------------------|-----------|----------|----------|
| | | Säule | <i>EF</i> | σ | <i>n</i> | <i>EF</i> | σ | <i>n</i> |
| GC | Chirasil-<i>D</i>-Val | A | 49,93 | 0,04 | 2 x 4 | 49,91 | 0,03 | 2 x 4 |
| | Chirasil-<i>L</i>-Val | D | 50,00 | 0,03 | 2 x 4 | 49,99 | 0,04 | 2 x 4 |
| | Lipodex E | E | 49,88 | 0,02 | 2 x 4 | 49,89 | 0,01 | 1x10 |
| GC/MS | Chirasil-<i>L</i>-Val | D | 50,03 | 0,05 | 2 x 5 | 50,04 | 0,08 | 2 x 5 |

Der *EF*-Wert wurde bei beiden Racemat-Proben auf Chirasil-*L*-Val als eindeutig racemisch bestimmt. Auf der stationären Phase Chirasil-*D*-Val war das Ergebnis wieder etwa um 0,1 % geringer als auf Chirasil-*L*-Val.

Der prozentuale *D*- bzw. *L*-Anteil von kommerziell erhältlichen Alanin-Enantiomeren wurde mittels GC bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-13** wiedergegeben.

Tabelle 4-13: Bestimmung des *D*- und *L*-Alanin-Anteils von kommerziell erhältlichen Enantiomeren mittels GC als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat (*n* = 2 x 3, absolute Standardabweichung σ und relative Standardabweichung $\sigma_{rel.}$).

| | | <i>D</i> -Ala(Si0) | | | <i>L</i> -Ala(Si0) | | | |
|------------------------------|----------|--------------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|---------------------|
| | | Säule | <i>L</i> [%] | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] | <i>D</i> [%] | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] |
| Chirasil-<i>D</i>-Val | A | 1,966 | 0,173 | 8,80 | 0,000 | 0,000 | 0,00 | |
| Chirasil-<i>L</i>-Val | D | 1,958 | 0,187 | 9,57 | 0,000 | 0,000 | 0,00 | |
| | | <i>D</i> -Ala(FI0) | | | <i>L</i> -Ala(De0) | | | |
| | | Säule | <i>L</i> [%] | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] | <i>D</i> [%] | σ [%] | $\sigma_{rel.}$ [%] |
| Chirasil-<i>D</i>-Val | A | 0,000 | 0,000 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 | |
| Chirasil-<i>L</i>-Val | D | 0,000 | 0,000 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 | |

4 Quantitative Enantiomeranalytik

In der Probe *D*-Ala(Si0) konnte eine Verunreinigung durch das Gegenenantomer festgestellt werden. Bei *L*-Ala(Si0), *D*-Ala(F10) sowie *L*-Ala(De0) war dies nicht der Fall, da in den Chromatogrammen dieser Proben kein eindeutiger Peak, der die Anwesenheit des entgegengesetzten Enantiomers anzeigt, identifiziert werden konnte. Das Signal/Rausch-Verhältnis war zu klein.

5 EXPERIMENTE ZUR HOMOCHIRALITÄT

5.1 KRISTALLISATION VON TYROSIN

Die meisten der biogenen α -Aminosäuren zeichnen sich durch Homochiralität aus. Dennoch unterliegen auch natürliche *L*- α -Aminosäuren einer Racemisierung, die beispielsweise zur Altersbestimmung in der Geologie genutzt wird.¹⁴⁵ Bei racemischen Proben wird grundsätzlich davon ausgegangen, dass beide Enantiomere die gleiche Löslichkeit aufweisen und fast immer als Racemat auskristallisieren, das heißt, die Kristalle enthalten die gleiche Anzahl an *D*- und *L*-Spezies und damit heterochirale Moleküle in einer räumlichen Verteilung. Nur in Ausnahmefällen und in einem bestimmten Temperaturbereich erhält man Konglomerate. Konglomerate sind ein Gemenge von Kristallen der reinen *D*- und der reinen *L*-Form, die als homochirale Aggregate nebeneinander vorliegen und sich unter Umständen mechanisch trennen lassen. Pasteur beobachtete, dass das Natriumammoniumsalz der racemischen Weinsäure (Traubensäure) unterhalb 28 °C als Konglomerate auskristallisiert. Diese enantiomerenreine Kristalle besitzen oft entgegengesetzt hemiedrische Flächen.¹⁴⁶

Wie in Kapitel 3 bereits beschrieben, werden Enantiomeren wegen der Paritätsverletzung geringfügig unterschiedliche Energien zugeordnet. Während es bei einzelnen Moleküle schwierig ist, diesen marginalen Energieunterschied zwischen den Enantiomeren nachzuweisen, sollte für größere Aggregate wie beispielsweise Kristalle durch Verstärkungseffekte der Nachweis einfacher sein. Shinitzky *et al.* untersuchten in diesem Zusammenhang das Kristallisationsverhalten von Tyrosin in wässriger Lösung.⁸⁸ Zu diesem Zweck stellten sie zunächst getrennte Lösungen von *D*- bzw. *L*-Tyrosin der Konzentration 10 mmol/L her und ließen diese bei 4 °C und 20 °C auskristallisieren. Die Konzentrationen der überstehenden Kristallisationslösungen wurden zu definierten Zeiten mittels UV-Absorption in 1 mm-Küvetten bei 274,5 nm bestimmt. In einem weiteren Experiment stellten sie 10 mmol/L wässrige Racemat-Lösungen von kommerziell erhältlichem *DL*-Tyrosin und aus den Einzelantimomeren zusammengesetztem *D+L*-Tyrosin (50 % *D*-Tyrosin + 50 % *L*-Tyrosin) her, welche bei 20 °C auskristallisierten. Die quantitative Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse der überstehenden Kristallisationslösungen von *DL*- und *D+L*-Tyrosin erfolgte ebenfalls durch UV-Absorption bei 274,5 nm. Jede Probe wurde zusätzlich vor

5 Experimente zur Homochiralität

Kristallisationsbeginn mit 1 $\mu\text{mol/L}$ [^3H]-*L*-Tyrosin angereichert. So konnten der entsprechende *L*-Tyrosin-Anteil über die Radioaktivität bestimmt und anschließend der *D*-Tyrosin-Anteil von der Gesamtmenge abgezogen werden.

Shinitzky *et al.* fanden dabei Differenzen in den Kristallisationsgeschwindigkeiten und den Löslichkeiten zwischen *D*- und *L*-Tyrosin. *D*-Tyrosin kristallisierte schneller aus als *L*-Tyrosin. Die überstehende Kristallisationslösung von *L*-Tyrosin hatte nach ungefähr 300 Stunden bei 20 °C eine Konzentration von 4,5 mmol/L, die des *D*-Tyrosins betrug dagegen nur 2,8 mmol/L. Die Untersuchung der Racematlösungen ergab eine Anreicherung von *L*-Tyrosin in den überstehenden Lösungen. Bei der *DL*-Tyrosin-Probe stellte sich in der überstehenden Kristallisationslösung nach 120 h ein Enantiomerenverhältnis von 60 % *L*-Tyrosin zu 40 % *D*-Tyrosin ein. Bei der aus den Enantiomeren hergestellten *D+L*-Tyrosin-Probe lag das Verhältnis nach 180 Stunden bei 62,5 % *L*-Tyrosin zu 37,5 % *D*-Tyrosin in der überstehenden Lösung. Beide racemischen Tyrosin-Proben hatten sich während der Kristallisation spontan in vorwiegend kristallisiertes *D*- und gelöstes *L*-Tyrosin aufgetrennt. In einer weiteren Veröffentlichung zeigten Shinitzky *et al.*,⁸⁹ dass die Kristallisations- und Löslichkeitsunterschiede nahezu aufgehoben werden, wenn die Tyrosin-Kristallisationen nicht in Wasser sondern in Deuteriumoxid durchgeführt werden. Aus diesen Ergebnissen entwickelten Shinitzky *et al.* eine Theorie über den Einfluss von ortho/para-Wasser¹⁴⁷ bei Kristallisationen und führten die Ergebnisse auf die PVED zurück.

In der Literatur findet man für *DL*-Tyrosin und für das *D*- bzw. *L*-Enantiomer folgende temperaturabhängigen Löslichkeiten (je 100 mL Wasser):¹⁴⁸

| | <i>DL</i> -Tyrosin | <i>D</i> -Tyrosin | <i>L</i> -Tyrosin |
|--------|--------------------|-------------------|-------------------|
| 20 °C: | 1,47 g | 1,96 g | 1,96 g |
| 25 °C: | 3,51 g | 4,53 g | 4,53 g |
| 50 °C: | 8,36 g | 10,52 g | 10,52 g |

Der Wert für die Löslichkeit des Racemats liegt tiefer als für die Enantiomere. Daher sollten racemische Tyrosin-Proben racemisch und nicht als enantiomerenreine Konglomerate auskristallisieren.

Um den Widerspruch der Tyrosin-Kristallisation zu klären, wurde in dieser Arbeit das Kristallisations- und Löslichkeitsverhalten von Tyrosin-Enantiomeren mittels enantio-selektiver Gaschromatographie überprüft. Die Kristallisationsexperimente zur Bestimmung

5 Experimente zur Homochiralität

der Kristallisationsgeschwindigkeit wurden sowohl in H₂O als auch in D₂O durchgeführt. Die Quantifizierung des Tyrosingehalts während der Kristallisation erfolgte mit der validierten Methode des enantiomer labelling (Kapitel 4.3: Mischungen von *D*- und *L*-Tyrosin-Enantiomeren). Das Löslichkeitsverhalten der Tyrosin-Enantiomere wurde nur in H₂O untersucht. Dazu wurde der *D*-Enantiomerenanteil *EF* der überstehenden Kristallisationslösung während und nach der Kristallisation sowie der *D*-Enantiomerenanteil der Kristalle bestimmt. Auch diese Methode wurde zuvor in Kapitel 4.3 validiert.⁹³

Durchführung der Kristallisationen

Die Kristallisationsexperimente wurden mit verschiedenen Tyrosin-Proben durchgeführt. Es werden die Bezeichnungen wie in **Tabelle 4-1** angegeben verwendet.

Die Kristallisationsexperimente wurden wie in **Abbildung 5-1** skizziert durchgeführt. Zuerst wurden 10 mmol/L übersättigte wässrige Lösungen durch Erhitzen (100 °C) hergestellt. Anschließend kristallisierten die Lösungen bei 6 °C oder 20 ± 1 °C aus. In den überstehenden Kristallisationslösungen wurde dann zu definierten Zeiten die Konzentration (durch enantiomer labelling) oder der *D*-Enantiomerenanteil *EF* bestimmt.

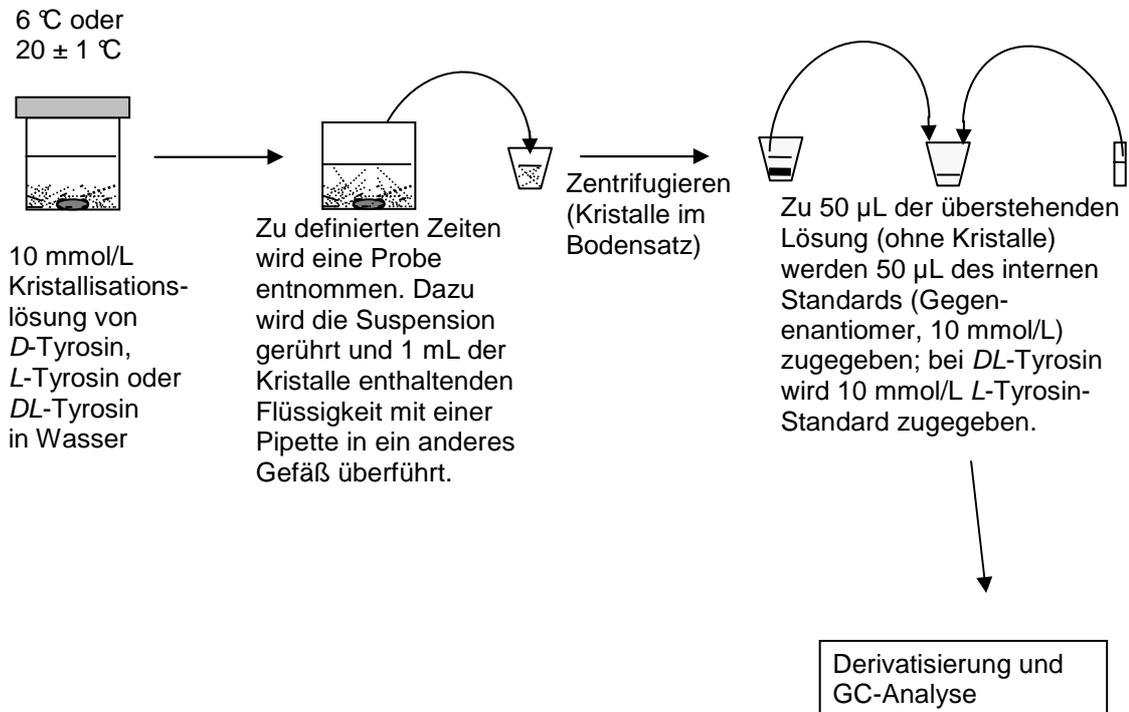
Bei der Methode des enantiomer labelling¹²⁸ wird zuerst das Enantiomerenverhältnis der entsprechenden Tyrosin-Probe bestimmt. Dann wird zur Probe eine bestimmte Menge des jeweiligen Enantiomer-Standards zugegeben und nochmals gaschromatographisch bestimmt. Anhand der in Kapitel 4.2 angegebenen Formel wird die Konzentration des entsprechenden Aminosäureenantiomers berechnet. Die Standardsubstanzen müssen dabei nicht enantiomerenrein sein, das Enantiomerenverhältnis wird bei der Rechnung berücksichtigt. Da der Standard vor der Derivatisierung zugegeben wird und Enantiomere identische physikalische (außer chiroptischen) und chemische Eigenschaften besitzen sollten, liegt der Vorteil dieser Methode darin, dass fehlerhafte Derivatisierung (nicht vollständiger Umsatz) und ungleiche Detektorresponsefaktoren kompensiert werden.

Für die quantitative Bestimmung der Kristallisationslösungen (Konzentration in mmol/L durch enantiomer labelling oder *EF*-Wert) bzw. der Kristalle (*EF*-Wert) von Tyrosin wurde vorwiegend die stationäre Phase Chirasil-*L*-Val (Säulen C und D) verwendet. Für

5 Experimente zur Homochiralität

Bestimmungen von geringen Mengen *L*-Tyrosin in *D*-Tyrosin wurde zur Absicherung Chirasil-*D*-Val (Säule A) herangezogen. Die Detektion erfolgte mit einem FID.

1. Kristallisationsverlauf mittels enantiomer labelling (Konzentration der überstehenden Kristallisationslösung in mmol/L)



2. *D*-Enantiomerenanteil in der überstehenden Kristallisationslösung (*EF* in %)

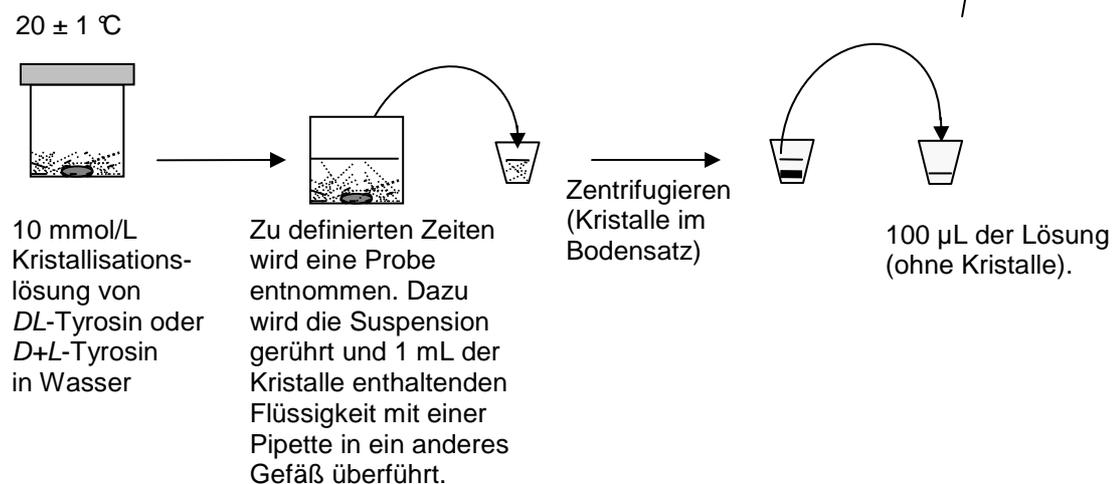


Abbildung 5-1: Schematischer Ablauf zur Kontrolle der Kristallisationen. 1. Bestimmung der Konzentration (in mmol/L) der überstehenden Kristallisationslösung mittels enantiomer labelling (oben), 2. Bestimmung des *D*-Enantiomerenanteils (*EF* in %) der überstehenden Kristallisationslösung im jeweiligen Racemat (unten).

Reinheit der verwendeten Tyrosin-Proben

Verschiedene Verunreinigungen und Fremdaminosäuren in den verwendeten Tyrosin-Proben können die Kristallisation bzw. die Löslichkeit beeinflussen. Laut Herstellerangaben enthalten die Tyrosin-Proben verschiedene Salze als Verunreinigung, weiterhin könnten eventuell Reste von Enzymen enthalten sein.

Bei den Kristallisationsversuchen wurden *D*-, *L*- und racemisches *DL*-Tyrosin von verschiedenen Firmen verwendet, da angenommen wurde, dass Art und Menge der Verunreinigungen davon abhängen, ob es sich um einzelne Enantiomere oder ein Racemat handelt und wo bzw. wie diese hergestellt wurden. *L*-Tyrosin kann durch Extraktion aus Proteinhydrolysaten (z. B. Kreatin, Collagen oder Pflanzenproteine)^{149, 150} oder durch Synthesen mit Enzymen (*Corynebacterium glutamicum*) oder immobilisierten Zellen¹⁵⁰ hergestellt werden. Racemische α -Aminosäuren werden durch chemische Synthese hergestellt.^{151, 152} Durch enzymatische Racematspaltung oder Stereoisomerentrennung (Kristallisationsmethode bzw. Trennung über diastereomere Salze) lassen sich anschließend die Enantiomere isolieren.¹⁴⁹ *DL*- α -Aminosäuren können auch durch Racemisierung der *L*- α -Aminosäuren aus natürlichen Vorkommen hergestellt werden.¹³¹

Die verwendeten Tyrosin-Proben wurden mittels GC/MS auf den Gehalt an Fremdaminosäuren untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-1** wiedergegeben. In allen Tyrosin-Proben wurde dabei ein irrelevanter Anteil an Fremdaminosäuren detektiert.

5 Experimente zur Homochiralität

Tabelle 5-1: Gehalt [mmol/g] und *D*- oder *L*-Enantiomerenanteil (*D* [%] oder *L* [%], für Racemate ist der *D*-Enantiomerenanteil *EF* [%] angegeben) der Fremdaminosäuren in den verschiedenen Tyrosin-Proben. Die Bestimmung wurde mittels GC/MS als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Lipodex E (Säule H) durchgeführt und erfolgte für den Gehalt nach der Methode des enantiomer labelling.

| | <i>L</i> -Tyr(Si0) | | <i>L</i> -Tyr(Si1) | | <i>L</i> -Tyr(FI0) | | <i>L</i> -Tyr(Se0) | | <i>L</i> -Tyr(Sa0) | |
|---------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
| | mmol/g | <i>D</i> [%] |
| Ala | 4,3E-4 | 36,6 | 2,4E-4 | 49,3 | 2,1E-4 | 49,7 | 1,3E-4 | 35,9 | 1,2E-4 | 35,9 |
| Val | 4,9E-5 | - | | | | | | | | |
| Thr | 3,1E-5 | - | | | | | 5,3E-6 | - | | |
| Leu | 1,1E-4 | - | | | 1,1E-4 | 11,7 | 5,5E-5 | - | | |
| Ser | 8,6E-5 | - | 4,3E-5 | - | 2,6E-5 | 6,2 | 2,5E-5 | - | | |
| Pro | 1,1E-6 | - | | | | | | | | |
| Asp | | | | | 3,3E-5 | 59,9 | | | 1,5E-5 | 51,5 |
| Cys | 9,3E-3 | - | 1,1E-2 | 7,1 | 7,4E-3 | - | | | | |
| Phe | 7,2E-2 | 0 | 2,5E-2 | 0 | 6,3E-3 | 0 | 3,1E-3 | 0 | 5,6E-5 | 0 |
| Glu | 1,0E-4 | 9,9 | 1,1E-4 | 63,6 | 1,4E-4 | 20,5 | 3,6E-5 | 16,2 | | |
| Lys | 9,4E-5 | - | 7,4E-5 | 12,1 | 8,8E-5 | 32,7 | 9,7E-5 | 51,9 | | |
| Gly | 2,9E-4 | - | 1,4E-4 | - | 1,1E-4 | - | 1,5E-4 | - | 1,5E-4 | - |
| Reinheit [%] | 98,68 | | 99,45 | | 99,80 | | 99,94 | | 99,997 | |

| | <i>D</i> -Tyr(Se0) | | <i>D</i> -Tyr(FI0) | | <i>D</i> -Tyr(FI1) | | <i>DL</i> -Tyr(Se0) | | <i>DL</i> -Tyr(Se1) | | <i>DL</i> -Tyr(FI0) | |
|---------------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
| | mmol/g | <i>L</i> [%] | mmol/g | <i>L</i> [%] | mmol/g | <i>L</i> [%] | mmol/g | <i>EF</i> | mmol/g | <i>EF</i> | mmol/g | <i>EF</i> |
| Ala | 4,1E-5 | 59,4 | | | | | 2,3E-4 | 58,5 | 1,8E-4 | 37,7 | 1,6E-4 | 58,1 |
| Val | | | | | | | 2,5E-5 | 53,0 | | | | |
| Thr | | | | | | | | | | | 6,0E-6 | - |
| Leu | | | | | | | | | 4,2E-5 | - | 3,0E-5 | - |
| Ser | 1,0E-3 | 90,6 | | | 6,1E-4 | 84,9 | 7,4E-5 | 45,3 | 4,6E-5 | 4,5 | 3,7E-5 | - |
| Pro | 2,0E-4 | 77,1 | | | | | | | | | | |
| Asp | 4,8E-7 | 58,3 | | | | | 8,1E-5 | 54,3 | 1,2E-5 | - | | |
| Cys | | | | | | | | | | | | |
| Phe | 5,7E-5 | 6,9 | 3,0E-4 | 1,0 | 5,2E-5 | 2,9 | 2,1E-3 | 50,5 | 5,1E-4 | 50,5 | 3,8E-4 | 61,6 |
| Glu | 3,2E-3 | 78,6 | 6,3E-4 | 75,4 | 7,0E-4 | 78,9 | 1,1E-3 | 45,4 | | | 4,4E-5 | 20,9 |
| Lys | | | | | | | 2,6E-5 | 70,5 | 1,5E-5 | - | 1,7E-5 | 51,8 |
| Gly | | | | | | | 1,6E-4 | - | 1,7E-4 | - | 8,2E-5 | - |
| Reinheit [%] | 99,94 | | 99,99 | | 99,98 | | | | | | | |

Kristallisationsverlauf von Tyrosin in H₂O

Die Bestimmung der zeitabhängigen Kristallisationsverläufe von Tyrosin-Enantiomeren und -Racematen erfolgte nach **Abbildung 5-1**, Schema 1. Die Kristallisation von Tyrosin aus einer übersättigten wässrigen Lösung wird unter anderem durch Staubpartikel, Keime und kleine Verschmutzungen aus der Umgebung initiiert. Das bedeutet, je mehr Kristallisationskeime in der übersättigten Lösung vorhanden sind, desto schneller beginnt die Kristallisation. Aus **Tabelle 5-2** und **Abbildung 5-2** wird dies ersichtlich, jedoch weichen die Ausgangskonzentrationen der verschiedenen Proben geringfügig voneinander ab ($10 \pm 0,5$ mmol/L). Dies hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Kristallisationsgeschwindigkeiten und die Kristallisationsendpunkte (Löslichkeit nach Einstellung des Gleichgewichts). Der Kristallisationsverlauf der jeweiligen Tyrosin-Enantiomere wird in den nachfolgenden Diagrammen durch die zeitliche Abnahme der Konzentration in der überstehenden Kristallisationslösung dargestellt.

Die Kristallisationsgeschwindigkeiten der Proben *D*-Tyr(FI0), *L*-Tyr(Si1) und *DL*-Tyr(Se1) wurden bei einer Kristallisationstemperatur von 6 °C bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-2** sowie **Abbildung 5-2** aufgeführt.

Tabelle 5-2: Kristallisation von *D*-, *L*- und *DL*-Tyrosin bei 6 °C. Bestimmung der zeitabhängigen Tyrosin-Konzentration *c* in der Lösung durch enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

| Zeit [h] | <i>D</i> -Tyr(FI0) | | <i>L</i> -Tyr(Si1) | | <i>DL</i> -Tyr(Se1) | |
|----------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] |
| 0 | 10,42 | 0,02 | 9,94 | 0,02 | 10,48 | 0,32 |
| 3 | 4,10 | 0,03 | 10,05 | 0,02 | 9,28 | 0,03 |
| 6 | 2,72 | 0,02 | 3,66 | 0,05 | 2,65 | 0,08 |
| 19 | 2,55 | 0,03 | 2,97 | 0,03 | 2,54 | 0,11 |
| 43 | 2,52 | 0,00 | 2,70 | 0,06 | 1,97 | 0,11 |
| 67 | 2,53 | 0,02 | 2,84 | 0,09 | 1,94 | 0,02 |
| 139 | 2,68 | 0,02 | 2,69 | 0,02 | 1,81 | 0,03 |
| 211 | 2,66 | 0,02 | 2,80 | 0,04 | 1,89 | 0,05 |
| 380 | 2,41 | 0,03 | 2,74 | 0,04 | 1,82 | 0,04 |
| 548 | 2,78 | 0,11 | 2,94 | 0,06 | 2,04 | 0,20 |

Kristallisationsendpunkt nach über 139 Stunden von *D*-Tyrosin: $2,63 \pm 0,16$ mmol/L und von *L*-Tyrosin: $2,79 \pm 0,11$ mmol/L.

5 Experimente zur Homochiralität

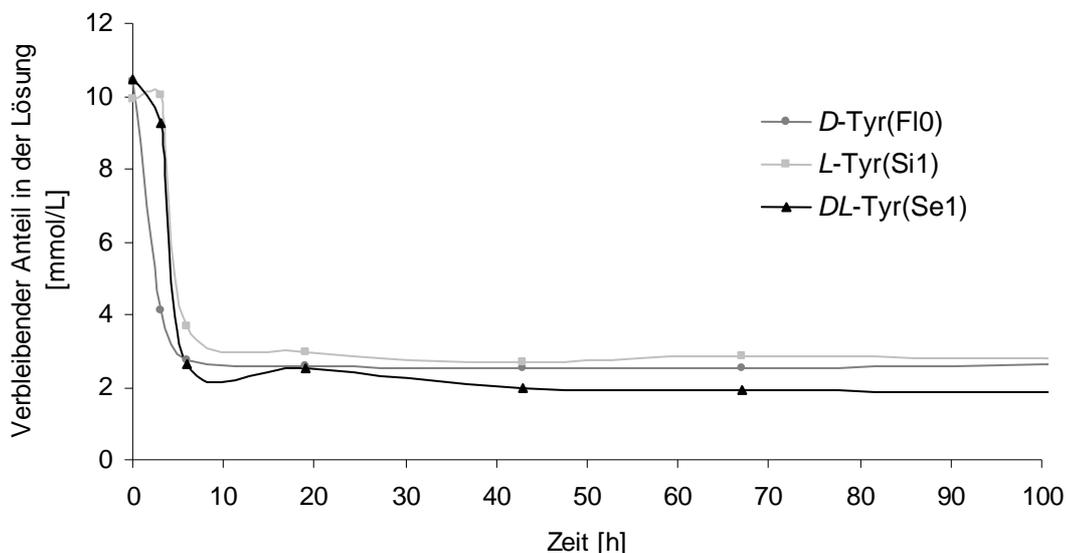


Abbildung 5-2: Kristallisation von *D*-, *L*- und *DL*-Tyrosin bei 6 °C aus übersättigten 10 mmol/L wässrigen Lösungen. Die Bestimmungen erfolgten mit enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

Die Kristallisationsgeschwindigkeiten von *D*-, *L*- und *DL*-Tyrosin bei 6 °C sind in **Tabelle 5-2** und **Abbildung 5-2** zu sehen. Das Kristallisationsgleichgewicht (Kristallisationsendpunkt) war jeweils nach über 100 Stunden erreicht. Aus diesem Grund erfolgte jeweils eine Mittelwertbildung über die Konzentrationen für die Zeit 139 - 548 Stunden (**Tabelle 5-2**). In dieser Zeitspanne schwankten die Ergebnisse um eine Konzentration von $2,63 \pm 0,16$ mmol/L für *D*-Tyr(FI0), welche im Vergleich zu $2,79 \pm 0,11$ mmol/L für *L*-Tyr(Si1) etwas geringer war. Bei der racemischen Probe *DL*-Tyr(Si1) konnte beobachtet werden, dass die Konzentration der überstehenden Kristallisationslösung nach 139 - 548 Stunden mit $1,89 \pm 0,11$ mmol/L wesentlich geringer war als unter vergleichbaren Bedingungen bei den einzelnen Enantiomeren.

Bei 6 °C kristallisiert Tyrosin sehr schnell aus (**Abbildung 5-2**). Da die Kristallisation von Tyrosin bei 20 ± 1 °C etwas langsamer abläuft und somit der Verlauf der Kristallisation besser zu beobachten ist, wurde in den weiteren Versuchen eine Kristallisationstemperatur von 20 ± 1 °C verwendet.

5 Experimente zur Homochiralität

In **Tabelle 5-3** ist die zeitabhängige Abnahme der Konzentrationen in den überstehenden Lösungen (Kristallisationsgeschwindigkeit) von *D*-Tyrosin bei 20 ± 1 °C zu sehen. Für die verschiedenen *D*-Tyrosin-Proben konnte kein signifikanter Unterschied in der Kristallisationsgeschwindigkeit festgestellt werden. Eine Umkristallisierung und damit Aufreinigung der Probe *D*-Tyr(FI0) zu *D*-Tyr(FI1) brachte keine anderen Ergebnisse, die Kristallisationsgeschwindigkeit blieb ungefähr gleich. Die Kristallisationsendpunkte waren jeweils nach über 170 Stunden erreicht und lagen bei allen drei *D*-Tyrosin-Proben mit einer geringen Abweichung bei $2,70 \pm 0,10$ mmol/L.

Tabelle 5-3: Kristallisation von *D*-Tyrosin bei 20 ± 1 °C. Bestimmung der zeitabhängigen Tyrosin-Konzentration *c* in der Lösung durch enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

| <i>D</i> -Tyr(Se0) | | | <i>D</i> -Tyr(FI0) | | | <i>D</i> -Tyr(FI1) | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] |
| 0 | 10,22 | 0,03 | 0 | 10,03 | 0,03 | 0 | 10,07 | 0,03 |
| 3 | 9,78 | 0,04 | 3 | 3,65 | 0,01 | 3 | 4,46 | 0,02 |
| 6 | 4,45 | 0,01 | 6 | 2,88 | 0,01 | 6 | 2,96 | 0,01 |
| 22 | 3,00 | 0,02 | 19 | 2,59 | 0,01 | 22 | 2,97 | 0,03 |
| 47 | 2,82 | 0,01 | 43 | 2,54 | 0,01 | 47 | 2,54 | 0,04 |
| 75 | 2,81 | 0,00 | 67 | 2,56 | 0,00 | 75 | 2,61 | 0,02 |
| 95 | 2,77 | 0,02 | 139 | 2,46 | 0,01 | 95 | 2,65 | 0,00 |
| 170 | 2,80 | 0,01 | 211 | 2,62 | 0,02 | 170 | 2,60 | 0,01 |
| | | | 380 | 2,70 | 0,05 | | | |
| | | | 548 | 2,83 | 0,02 | | | |
| | | | 692 | 2,69 | 0,02 | | | |

Kristallisationsendpunkt der drei *D*-Tyrosin-Proben nach über 170 Stunden: $2,70 \pm 0,10$ mmol/L

Dagegen konnten für die *L*-Tyrosin-Proben (**Tabelle 5-4**) Unterschiede in der Kristallisationsgeschwindigkeit festgestellt werden. *L*-Tyr(Si0) und das daraus erhaltene *L*-Tyr(Si1) kristallisierten in den ersten 60 Stunden wesentlich langsamer als *L*-Tyr(FI0), *L*-Tyr(Se0) und *L*-Tyr(Sa0). Die Kristallisationsgeschwindigkeit setzt sich allgemein aus zwei zeitabhängigen Schritten zusammen, nämlich der Bildung von Kristallisationskeimen und dem Wachstum durch Abscheiden von Substanz an diesen Keimen (Kristallwachstum). Ein Erklärungsansatz für die beobachteten Geschwindigkeitsunterschiede ergibt sich aus der Annahme, dass in den Kristallisationslösungen von *L*-Tyr(Si0) und *L*-Tyr(Si1) weniger Keime enthalten sind. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Löslichkeit z. B. durch fremdionische Zusätze erhöht und dadurch die Kristallisation gehindert ist. Durch GC/MS wurden die Tyrosin-Proben auf Fremdaminosäuren untersucht (**Tabelle 5-1**). Dabei wurde festgestellt, dass die Reinheit der Probe *L*-Tyr(Si0) am geringsten ist. *L*-Tyr(Si1) ist durch die Umkristallisation etwas sauberer. Mit NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse wurden die Proben auf

5 Experimente zur Homochiralität

weitere Verunreinigungen untersucht, die Suche wurde aber mangels Evidenz abgebrochen. Die Kristallisationsendpunkte lagen bei allen *L*-Tyrosin-Proben nach über 170 Stunden bei $3,09 \pm 0,05$ mmol/L.

Tabelle 5-4: Kristallisation von *L*-Tyrosin bei 20 ± 1 °C. Bestimmung der zeitabhängigen Tyrosin-Konzentration *c* in der Lösung durch enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule A).

| <i>L</i> -Tyr(Si0) | | | <i>L</i> -Tyr(Si1) | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] |
| 0 | 9,12 | 0,02 | 0 | 9,96 | 0,01 |
| 3 | 9,52 | 0,01 | 3 | 9,85 | 0,05 |
| 6 | 9,41 | 0,03 | 6 | 9,80 | 0,08 |
| 22 | 6,60 | 0,03 | 19 | 9,91 | 0,07 |
| 47 | 4,03 | 0,02 | 43 | 8,72 | 0,07 |
| 75 | 3,62 | 0,01 | 67 | 5,84 | 0,05 |
| 95 | 3,45 | 0,04 | 139 | 3,62 | 0,08 |
| 170 | 3,14 | 0,02 | 211 | 3,34 | 0,03 |
| | | | 380 | 3,15 | 0,03 |
| | | | 548 | 3,09 | 0,04 |
| | | | 692 | 2,97 | 0,05 |

| Zeit [h] | <i>L</i> -Tyr(FI0) | | <i>L</i> -Tyr(Se0) | | <i>L</i> -Tyr(Sa0) | |
|----------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] |
| 0 | 9,70 | 0,02 | 9,85 | 0,01 | 9,78 | 0,03 |
| 3 | 6,23 | 0,04 | 6,32 | 0,01 | 3,39 | 0,01 |
| 6 | 4,63 | 0,05 | 3,92 | 0,01 | 3,07 | 0,03 |
| 22 | 3,33 | 0,04 | 2,93 | 0,01 | 2,78 | 0,01 |
| 46 | 2,97 | 0,02 | 2,79 | 0,02 | 2,79 | 0,01 |
| 72 | 2,93 | 0,01 | 2,86 | 0,02 | 3,08 | 0,15 |
| 94 | 3,09 | 0,01 | 2,92 | 0,03 | 3,01 | 0,02 |
| 167 | 3,05 | 0,02 | 3,04 | 0,04 | 3,06 | 0,02 |

Kristallisationsendpunkt der fünf *L*-Tyrosin-Proben nach über 167 Stunden:
 $3,09 \pm 0,05$ mmol/L.

Abbildung 5-3 zeigt die Zeitabhängigkeit der Konzentrationen in den überstehenden Kristallisationslösungen von *D*- und *L*-Tyrosin. Es konnten für die Kristallisationsendpunkte von *D*-Tyrosin nach 170 - 692 Stunden Konzentrationen von $2,70 \pm 0,10$ mmol/L in der überstehenden Kristallisationslösung bestimmt werden. Im Vergleich dazu betragen nach 167 - 692 Stunden die Konzentrationen der *L*-Enantiomere $3,09 \pm 0,05$ mmol/L. Bei *D*-Tyrosin konnte eine etwas geringere Konzentration als bei *L*-Tyrosin festgestellt werden. (**Tabelle 5-3, Tabelle 5-4, Abbildung 5-3**).

5 Experimente zur Homochiralität

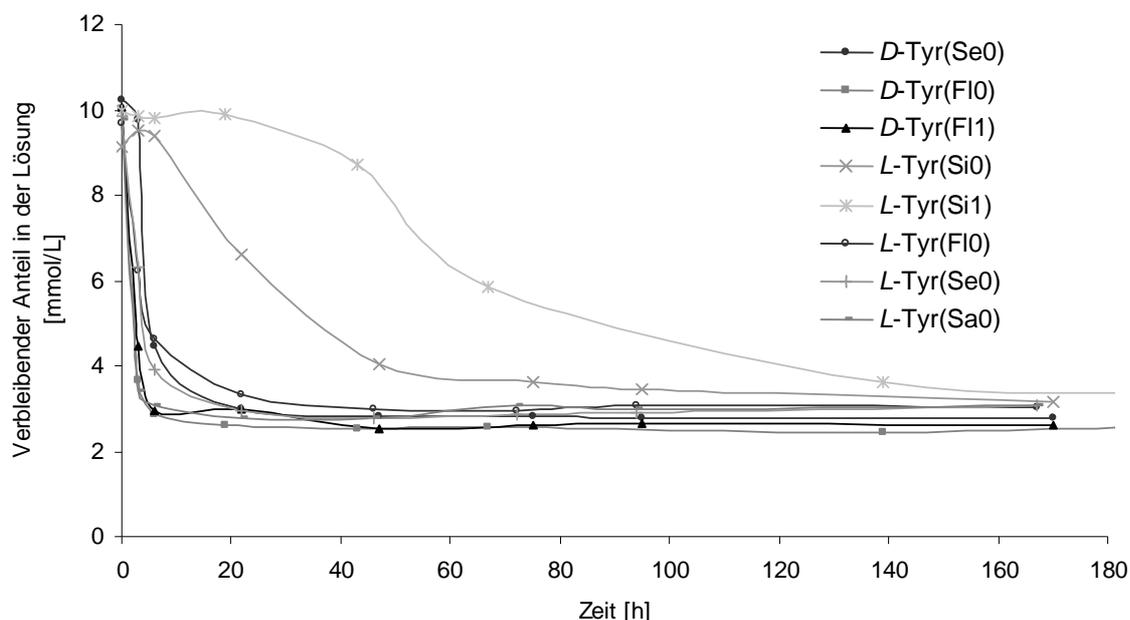


Abbildung 5-3: Kristallisation von *D*- und *L*-Tyrosin bei 20 ± 1 °C aus übersättigten 10 mmol/L wässrigen Lösungen. Die Bestimmungen erfolgten mit enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule A).

Die racemischen Tyrosin-Proben *DL*-Tyr(Se1) und *DL*-Tyr(FI0) (Tabelle 5-5, Abbildung 5-4) zeigen in der Kristallisationsgeschwindigkeit keinen Unterschied. Sie haben jedoch nach ungefähr 200 Stunden eine geringere Konzentration in der überstehenden Kristallisationslösung als die Enantiomere *D*- oder *L*-Tyrosin.

Im Weiteren wurde ein „künstliches“ Racemat aus den Enantiomeren *L*-Tyr(Si0), welches einen langsamen Kristallisationsverlauf aufweist, und *D*-Tyr(FI0), welches einen normalen Kristallisationsverlauf zeigt, durch genaues Einwiegen hergestellt. Dieses künstliche Racemat *D*-Tyr(FI0)+*L*-Tyr(Si0) zeigte einen langsameren Kristallisationsverlauf als die echten racemischen Proben *DL*-Tyr(Se1) und *DL*-Tyr(FI0). Der Kristallisationsendpunkt scheint bei der Probe *D*-Tyr(FI0)+*L*-Tyr(Si0) selbst nach 710 Stunden noch nicht erreicht zu sein. (Tabelle 5-5, Abbildung 5-4). Daraus folgt, dass die Probe *L*-Tyr(Si0) tatsächlich mit einer Substanz verunreinigt sein könnte, welche die Löslichkeit in Wasser erhöht und dadurch die Kristallisation des künstlichen Racemats verlangsamt. Wie auch aus Tabelle 5-1 folgt, ist die Probe *L*-Tyr(Si0) mit einer größeren Menge an Fremdaminosäuren verunreinigt als alle anderen *D*- und *L*-Tyrosin-Proben.

5 Experimente zur Homochiralität

Tabelle 5-5: Kristallisation von *DL*-Tyrosin und *D+L*-Tyrosin bei 20 ± 1 °C, Bestimmung der zeitabhängigen Tyrosin-Konzentration *c* in der Lösung durch enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

| <i>DL</i> -Tyr(Se1) | | | <i>DL</i> -Tyr(FI0) | | | <i>D</i> -Tyr(FI0) + <i>L</i> -Tyr(Si0) | | |
|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---|-------------------|-------------------|
| Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] |
| 0 | 10,38 | 0,05 | 0 | 9,60 | 0,06 | 0 | 9,60 | 0,01 |
| 3 | 9,74 | 0,03 | 3 | 9,32 | 0,06 | 3 | 9,79 | 0,06 |
| 6 | 5,89 | 0,03 | 6 | 6,71 | 0,03 | 6 | 9,73 | 0,09 |
| 19 | 2,52 | 0,02 | 22 | 3,49 | 0,02 | 22 | 8,44 | 0,08 |
| 43 | 2,22 | 0,04 | 46 | 2,88 | 0,04 | 46 | 6,26 | 0,01 |
| 67 | 2,06 | 0,05 | 72 | 2,72 | 0,03 | 72 | 5,17 | 0,01 |
| 139 | 1,91 | 0,01 | 94 | 2,41 | 0,01 | 94 | 4,70 | 0,02 |
| 211 | 1,94 | 0,04 | 167 | 2,02 | 0,20 | 167 | 3,78 | 0,05 |
| 380 | 1,87 | 0,01 | 719 | 2,07 | 0,02 | 263 | 3,25 | 0,01 |
| 548 | 1,97 | 0,03 | | | | 719 | 2,48 | 0,02 |

Kristallisationsendpunkt der zwei *DL*-Tyrosin-Proben nach über 167 Stunden: $1,99 \pm 0,08$ mmol/L.

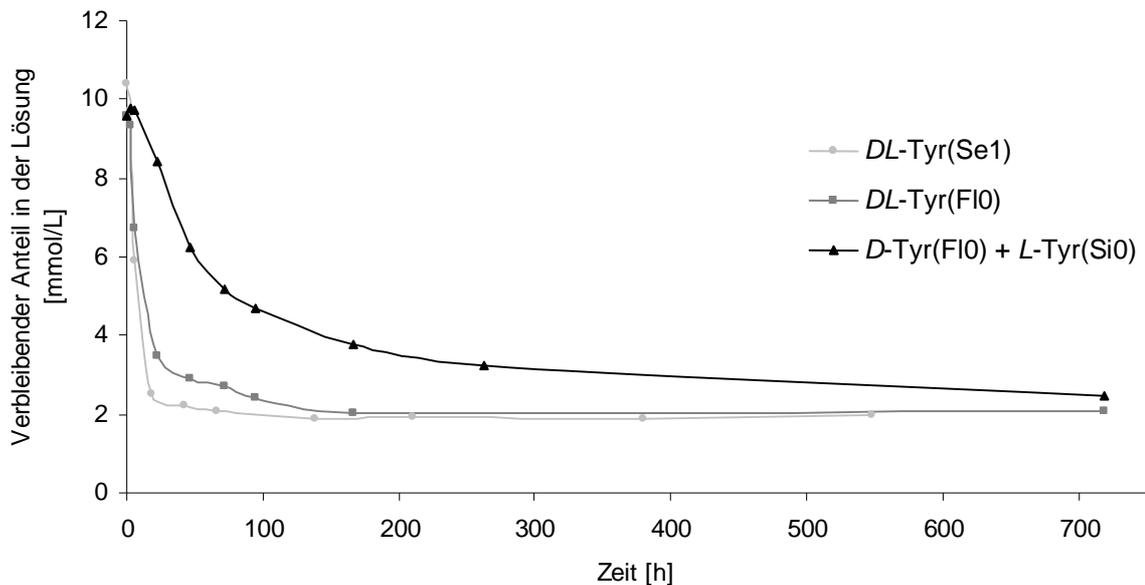


Abbildung 5-4: Kristallisation von *DL*-Tyrosin und *D+L*-Tyrosin bei 20 ± 1 °C aus übersättigten 10 mmol/L wässrigen Lösungen. Die Bestimmungen erfolgten mit enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

5 Experimente zur Homochiralität

Abbildung 5-5 zeigt eine Zusammenfassung aller gemessenen Kristallisationsverläufe und Kristallisationsendpunkte von *D*-, *L*- und *DL*-Tyrosin-Proben für eine Kristallisationstemperatur von 20 ± 1 °C. Mit Ausnahme der Proben *L*-Tyr(Si0), *L*-Tyr(Si1) und *D*-Tyr(Fl0)+*L*-Tyr(Si0) sind die Geschwindigkeiten nahezu gleich. Bei genauer Betrachtung fällt jedoch auf, dass für *D*-Tyrosin jeweils eine etwas geringere Konzentration in den überstehenden Kristallisationslösungen (Kristallisationsendpunkt) als für *L*-Tyrosin festgestellt wurde. Bei einer Kristallisationstemperatur von 20 °C betragen die Konzentrationen von Shinitzky *et al.* 2,8 mmol/L *D*-Tyrosin und 4,5 mmol/L *L*-Tyrosin (nach 350 Stunden). Im Vergleich dazu lagen die hier bestimmten Konzentrationen (bei 20 ± 1 °C) für drei *D*-Tyrosin-Proben nach 170 - 692 Stunden bei $2,70 \pm 0,10$ mmol/L bzw. für fünf *L*-Tyrosin-Proben nach 167 - 692 Stunden bei $3,09 \pm 0,05$ mmol/L. Damit lässt sich festhalten, dass zwar auch hier Unterschiede beobachtet wurden, diese jedoch geringer ausfielen als die von Shinitzky *et al.* beobachteten Differenzen. Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die Kristallisationen bei kleinerer Temperatur. Während Shinitzky *et al.* bei einer Kristallisationstemperatur von 4 °C Konzentrationen von 1,9 mmol/L *D*-Tyrosin und 2,5 mmol/L *L*-Tyrosin (nach 100 Stunden) bestimmt hatten, lagen sie hier (6 °C) bei $2,63 \pm 0,16$ mmol/L *D*-Tyrosin und $2,79 \pm 0,11$ mmol/L *L*-Tyrosin (139 - 548 Stunden).

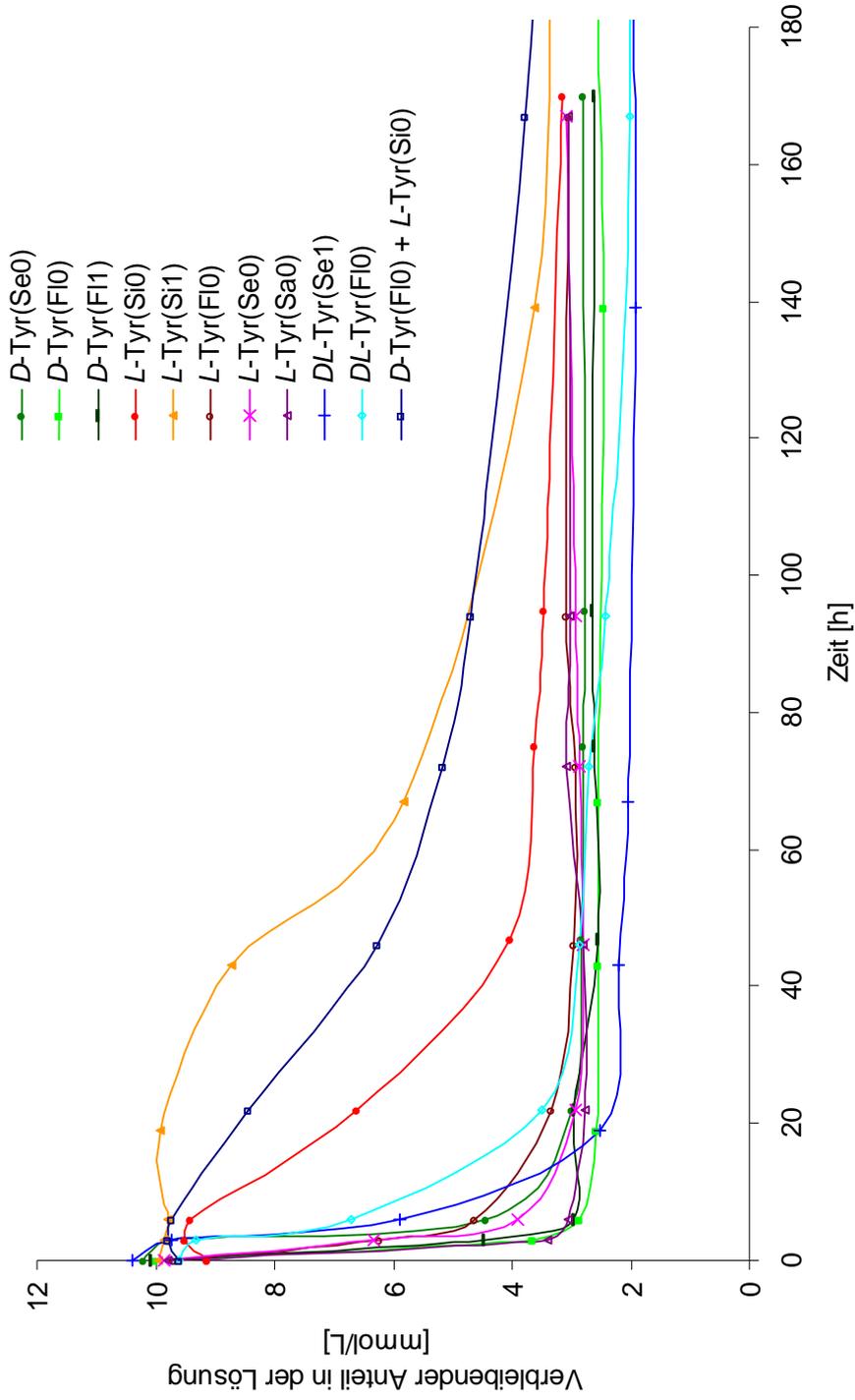


Abbildung 5-5: Zusammenfassung der Abb. 5-3 und 5-4. Kristallisation von *D*-, *L*-, *DL*- und *D+L*-Tyrosin bei $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ aus übersättigten 10 mmol/L wässrigen Lösungen. Die Bestimmungen erfolgten mit enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

Kristallisationsverlauf von Tyrosin in D₂O

Die Kristallisationsgeschwindigkeiten von verschiedenen Tyrosin-Proben wurden auch in Deuteriumoxid (D₂O) bestimmt und mit den Ergebnissen aus Wasser (H₂O) verglichen. Die Kristallisationen wurden mit den Tyrosin-Enantiomeren *D*-Tyr(F10) und *L*-Tyr(F10) (beide Fluka) und der langsamer auskristallisierenden Tyrosin-Probe *L*-Tyr(Si0) in D₂O durchgeführt. Analog zu den Kristallisationen in H₂O wurden wiederum 10 mmol/L Lösungen eingesetzt und eine Kristallisationstemperatur von 20 ± 1 °C gewählt (siehe auch **Abbildung 5-1**, Schema 1). Shinitzky *et al.* berichten von einem Unterschied zwischen der Kristallisationsgeschwindigkeit bzw. der Löslichkeit von Tyrosin in H₂O und der in D₂O.⁸⁹ Falls dies zutrifft, sollte diese Phänomen vor allem bei der Probe *L*-Tyr(Si0) zu beobachten sein, da sich hier die Zeitabhängigkeit des Kristallisationsverlaufs von der der anderen Proben am deutlichsten unterscheidet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-6** sowie **Abbildung 5-6** bis **Abbildung 5-8** aufgeführt.

Tabelle 5-6: Kristallisation von *D*- und *L*-Tyrosin in D₂O bei 20 ± 1 °C. Bestimmung der zeitabhängigen Tyrosin-Konzentration *c* in der Lösung durch enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

| Zeit [h] | <i>D</i> -Tyr(F10) | | <i>L</i> -Tyr(F10) | | <i>L</i> -Tyr(Si0) | |
|----------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] |
| 0 | 9,70 | 0,05 | 9,73 | 0,06 | 9,72 | 0,08 |
| 3 | 3,12 | 0,09 | 4,57 | 0,04 | 9,66 | 0,04 |
| 6 | 2,67 | 0,04 | 3,32 | 0,05 | 5,66 | 0,02 |
| 24 | 2,08 | 0,07 | 2,86 | 0,02 | 3,21 | 0,02 |
| 48 | 2,19 | 0,03 | 2,55 | 0,09 | 2,81 | 0,01 |
| 72 | 2,13 | 0,01 | 2,39 | 0,01 | 2,68 | 0,03 |
| 96 | 2,26 | 0,03 | 2,20 | 0,05 | 2,56 | 0,00 |
| 176 | 1,97 | 0,03 | 2,36 | 0,01 | 2,40 | 0,01 |
| 672 | 2,01 | 0,03 | 2,05 | 0,02 | 2,25 | 0,04 |

Wie in **Abbildung 5-6** bis **Abbildung 5-8** zu sehen ist, liegen die Löslichkeitsendpunkte der drei Tyrosin-Proben in D₂O tiefer als in H₂O. Das heißt, Tyrosin ist in D₂O weniger löslich als in H₂O. Auch konnte beobachtet werden, dass die Kristallisationen in D₂O schneller als in H₂O ablaufen. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass D₂O im Vergleich zu H₂O eine geringere Reaktivität, verminderte Diffusion und eine kleinere Autoprotolysekonstante von $3 \cdot 10^{-15} \text{ mol}^2 / \text{L}^2$ besitzt ($\text{pK}_a = 14,8$).¹

5 Experimente zur Homochiralität

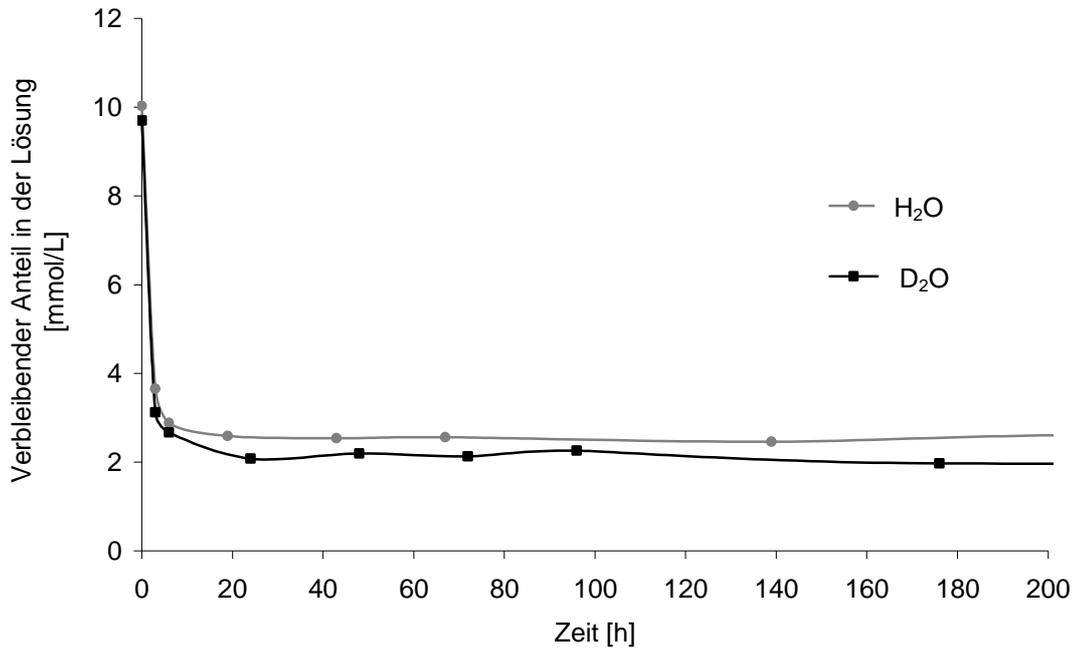


Abbildung 5-6: Gegenüberstellung des Kristallisationsverlaufs von *D*-Tyr(F10) bei 20 ± 1 °C aus übersättigten 10 mmol/L Lösungen in H₂O und D₂O.

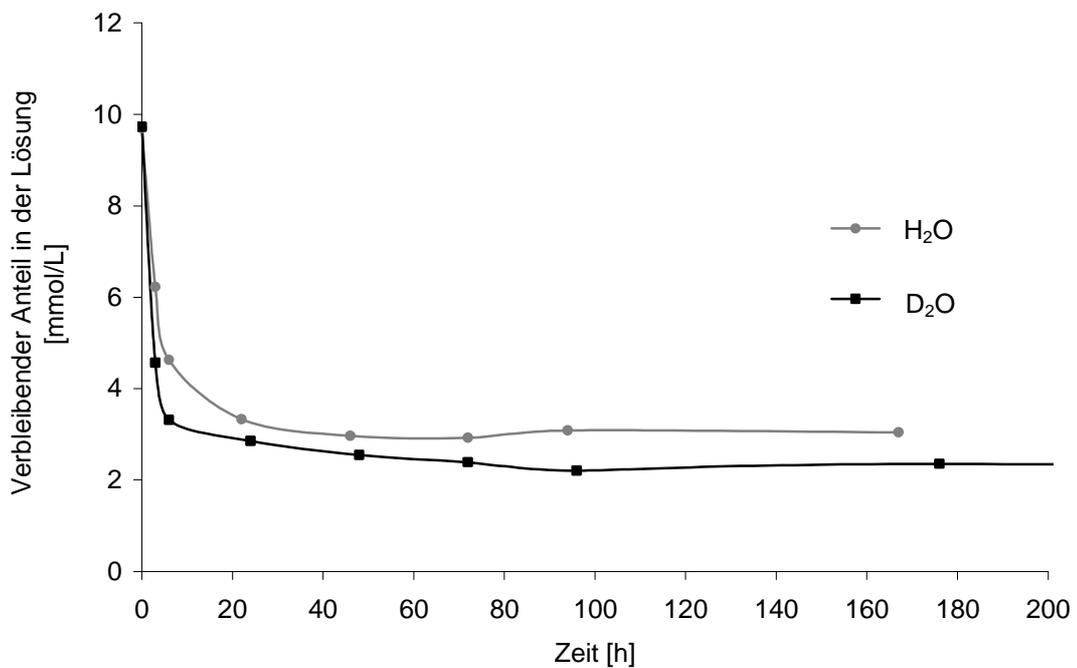


Abbildung 5-7: Gegenüberstellung des Kristallisationsverlaufs von *L*-Tyr(F10) bei 20 ± 1 °C aus übersättigten 10 mmol/L Lösungen in H₂O und D₂O.

5 Experimente zur Homochiralität

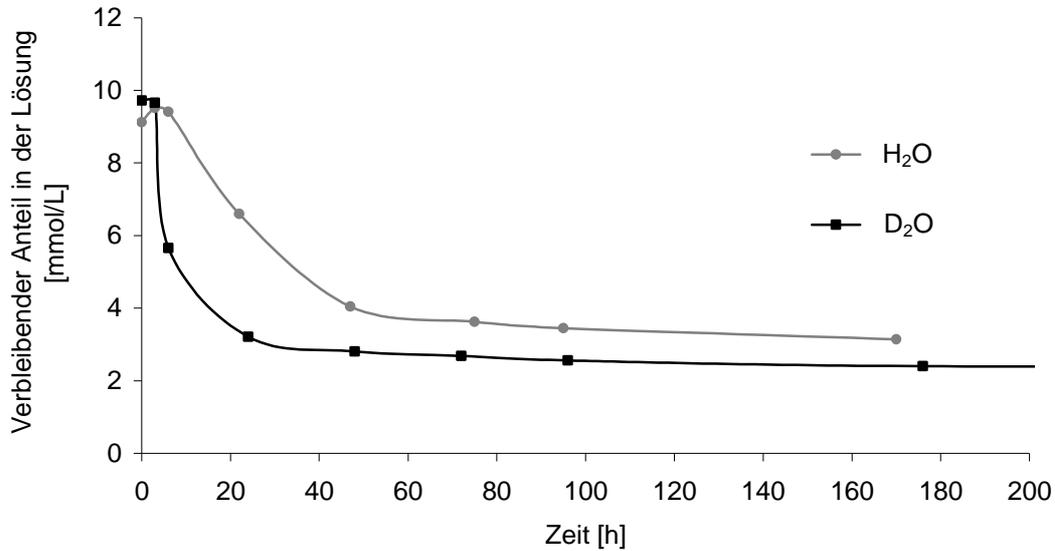


Abbildung 5-8: Gegenüberstellung des Kristallisationsverlaufs von *L*-Tyr(SiO) bei 20 ± 1 °C aus übersättigten 10 mmol/L Lösungen in H₂O und D₂O.

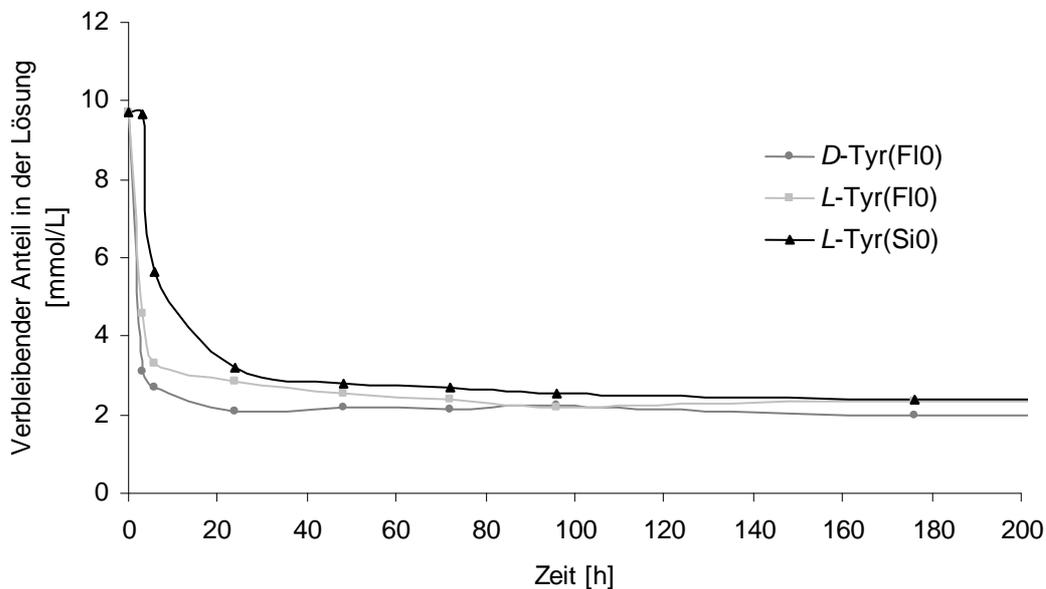


Abbildung 5-9: Zusammenfassung der Abbildungen 5-6, 5-7 und 5-8 für D₂O. Kristallisation von *D*- und *L*-Tyrosin bei 20 ± 1 °C aus übersättigten 10 mmol/L Lösungen in D₂O. Die Bestimmungen erfolgten mit enantiomer labelling und gaschromatographisch als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

5 Experimente zur Homochiralität

In **Tabelle 5-7** sind die Kristallisationsendpunkte der Experimente in H₂O (aus **Tabelle 5-3** und **Tabelle 5-4**) und D₂O (aus **Tabelle 5-6**) gegenübergestellt. Die Differenzen der Kristallisationsraten von *L*-Tyr(F10) und *L*-Tyr(Si0) sind ähnlich und liegen mit Δ 0,85 mmol/L und Δ 0,81 mmol/L im Fehlerbereich der Messungen. Dagegen ist die Differenz der Messungen in H₂O und D₂O von *D*-Tyr(F10) etwas geringer.

Tabelle 5-7: Konzentrationen *c* von *D*- und *L*-Tyrosin in H₂O und D₂O nach einer Kristallisationszeit von jeweils über 167 Stunden bei 20 ± 1 °C.

| | <i>D</i> -Tyr(F10) | | | <i>L</i> -Tyr(F10) | | | <i>L</i> -Tyr(Si0) | | |
|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] | Zeit [h] | <i>c</i> [mmol/L] | σ [mmol/L] |
| H ₂ O | 211-692 | 2,71 | 0,085 | 167 | 3,05 | 0,017 | 170 | 3,14 | 0,016 |
| D ₂ O | 176-672 | 1,99 | 0,036 | 176-672 | 2,21 | 0,169 | 176-672 | 2,33 | 0,089 |
| Δ | | 0,72 | | | 0,85 | | | 0,81 | |

Auch in D₂O konnte während der gesamten Kristallisationsdauer für *D*-Tyrosin eine etwas geringere Konzentration in der überstehenden Kristallisationslösung als für *L*-Tyrosin festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen wurde kein deutlicher Unterschied in den Konzentrationsdifferenzen von *D*-Tyr(F10) bzw. *L*-Tyr(F10) im jeweiligen Lösungsmittel gefunden (H₂O: Δ 0,34 mmol/L, D₂O: Δ 0,22 mmol/L, $\Delta\Delta$ 0,12 mmol/L). Das Ergebnis von Shinitzky *et al.*, wonach die asymptotischen Konzentrationen von *D*- und *L*-Tyrosin im Lösungsmittel D₂O nahezu gleich seien, während sie sich in H₂O deutlich unterschieden, ließ sich damit nicht reproduzieren.

In **Abbildung 5-10** sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Kristalle von *D*-Tyr(F10), *L*-Tyr(F10) und *L*-Tyr(Si0) nach einer Kristallisationsdauer von ca. 700 Stunden abgebildet. Die Kristalle der *L*-Tyrosin-Proben *L*-Tyr(F10) und *L*-Tyr(Si0) in D₂O sind offensichtlich nicht identisch. Die *L*-Tyr(F10)-Kristalle sind wesentlich länger als die *L*-Tyr(Si0)-Kristalle. Dagegen sind die Kristalle von *D*-Tyr(F10) und *L*-Tyr(F10) ungefähr gleich lang.

5 Experimente zur Homochiralität

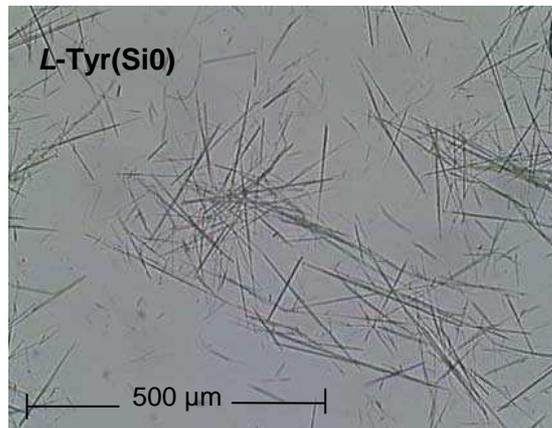
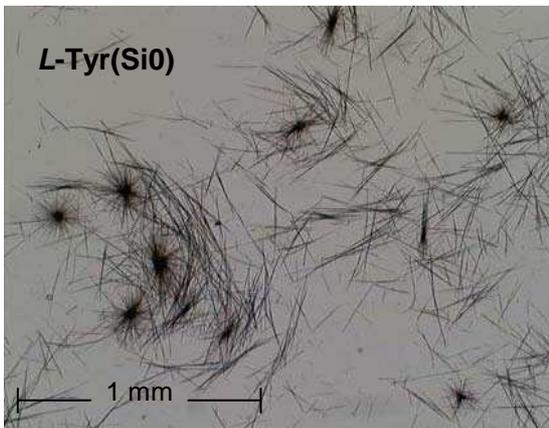
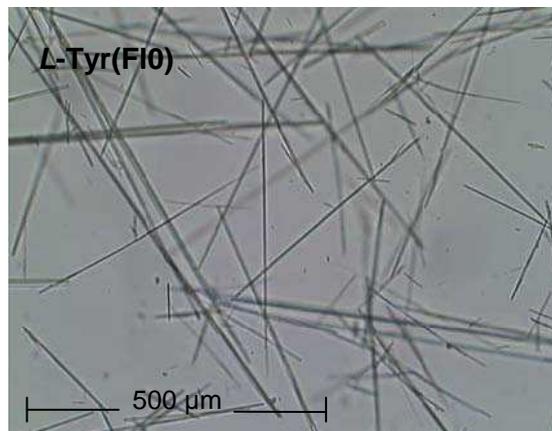
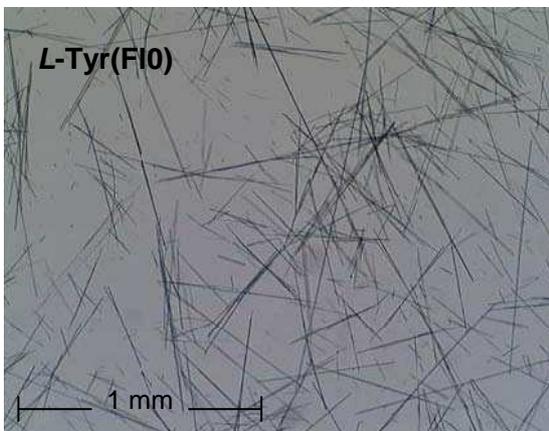
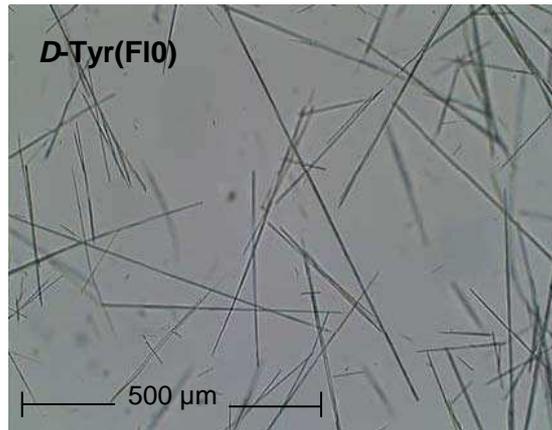
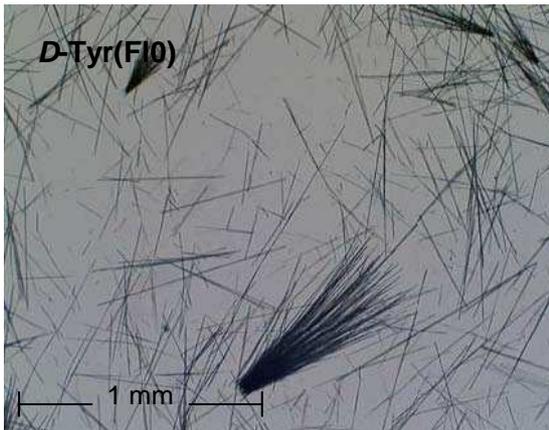


Abbildung 5-10: Kristalle von *D*-Tyr(FI0) (oben), *L*-Tyr(FI0) (Mitte) und *L*-Tyr(Si0) (unten). Die Bilder wurden unter einem Lichtmikroskop (Mikroskop: Olympus BH-2, Kamera: FUJIX Digital Camera HC-300 Z) in 4-facher (links) und 10-facher (rechts) Vergrößerung aufgenommen. Die Kristallisation erfolgte jeweils in einer 10 mmol/L Deuteriumoxid-Lösung.

Veränderung der Enantiomerenverhältnisse in Tyrosin-Racematen während der Kristallisation

In den vorangehenden Abschnitten wurden die Zeitabhängigkeiten der Kristallisationsverläufe und die Löslichkeiten (Kristallisationsendpunkte) von *D*- und *L*-Tyrosin nach **Abbildung 5-1**, Schema 1 untersucht. Dabei konnten Unterschiede zwischen den Enantiomeren festgestellt werden. Um diese Unterschiede zu verifizieren, wurden Kristallisationen von kommerziell erhältlichem racemischem Tyrosin und durch Einwiegen der Einzelenantiomere hergestelltem *D+L*-Tyrosin (nahezu 50 % *D*-Tyrosin und 50 % *L*-Tyrosin) in übersättigten, wässrigen Lösungen der Konzentration 10 mmol/L nach **Abbildung 5-1**, Schema 2 durchgeführt. Die *D*-Enantiomerenanteile wurden vor, während (nicht bei allen Proben) und nach beendeter Kristallisation in den Lösungen (**Tabelle 5-8**) bzw. den Kristallen (**Tabelle 5-9**) bestimmt. Die Kristallisationen fanden bei 20 ± 1 °C statt. Dabei lagen die kommerziell erhältlichen racemischen Tyrosin-Proben vor der Kristallisation, wie in Kapitel 4.3 festgestellt, nicht rein racemisch (*EF* 50 %) vor.

Chargenabhängige Verunreinigungen einzelner Enantiomere können die Löslichkeit beeinflussen, wie bei den Proben *L*-Tyr(Si0) und *L*-Tyr(F10) in einem der vorhergehenden Abschnitte gezeigt wurde. Bei racemischen Proben sollten sich solche Fremdstoffe gleichermassen auf beide Enantiomere auswirken, allerdings nur, wenn es sich dabei nicht um chirale Verunreinigungen in nicht-racemischem Verhältnis handelt.

Zwei kommerziell erhältliche racemische *DL*-Tyrosin-Proben, *DL*-Tyr(Se1) und *DL*-Tyr(F10), wurden nach Einwiegen, Zugabe von 50 mL H₂O und Verschließen des Reaktionsgefäßes im siedenden Wasserbad vollständig gelöst. Die Lösungen der Konzentration 10 mmol/L kristallisierten als *DL*-Tyr(Se1)(I) und *DL*-Tyr(F10)(I) im jeweiligen Reaktionsgefäß bei 20 ± 1 °C aus. Dabei wurden die *D*-Enantiomerenanteile in der überstehenden Kristallisationslösung vor Beginn der Kristallisation, zu definierten Zeiten während des Kristallisationsverlaufs und nach beendeter Kristallisation bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-8**, **Abbildung 5-11** (oben) und **Abbildung 5-12** (oben) aufgeführt.

Tabelle 5-8: Kristallisation von Tyrosin bei 20 °C. Bestimmung des D-Enantiomerenanteils EF [%] und der absoluten Standardabweichung [%] in der überstehenden Kristallisationslösung während der Kristallisation mittels GC als N,O-TFA/O-Et-Derivat auf Chirasil-L-Val (Säule C).

| DL-Tyr(Se1) (I) | | DL-Tyr(Se1) (II) | | DL-Tyr(Fi0) (I) | | DL-Tyr(Fi0) (II) | | DL-Tyr(Fi0) +L-Tyr(Fi0) | | DL-Tyr(Fi0) ^{a)} | | D-Tyr(Fi0)+L-Tyr(Si0) | |
|-----------------------------|-------------|------------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|-------------------------|--------------|---------------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| Zeit [h] | σ | Zeit [h] | EF | Zeit [h] | σ | Zeit [h] | σ | Zeit [h] | σ | Zeit [h] | σ | Zeit [h] | σ |
| n = 1K, 1 x 4 ¹⁾ | | n = 9K, 1 x 3 | | n = 1K, 1 x 7 | | n = 20K, 1 x 3 | | n = 6K, 1 x 3 | | n = 1K, 4 x 3 | | n = 1K, 1 x 7 | |
| 0 | 49,96 | 0 | 49,96 | 0 | 49,55 | 0 | 49,57 | 0 | 48,36 | 0 | 49,59 | 0 | 50,33 |
| 67 | 49,69 | 408 | 49,83 | 3 | 49,53 | 0,10 | 48,87 | 0,16 | 46,10 | 0,17 | 49,13 | 0,07 | 50,41 |
| 139 | 49,58 | | | 6 | 49,40 | 0,17 | | | | | | | 50,31 |
| 211 | 49,70 | | | 22 | 49,01 | 0,16 | | | | | | | 50,18 |
| 380 | 49,68 | | | 46 | 48,84 | 0,19 | | | | | | | 49,83 |
| 548 | 49,65 | | | 72 | 48,89 | 0,14 | | | | | | | 49,64 |
| | | | | 94 | 48,61 | 0,16 | | | | | | | 49,61 |
| | | | | 167 | 48,56 | 0,13 | | | | | | | 49,51 |
| | | | | 719 | 48,45 | 0,23 | | | | | | | 49,35 |
| | | | | 935 | 48,37 | 0,08 | | | | | | | 49,14 |
| Δ EF²⁾ | 0,31 | | 0,13 | | 1,18 | | 0,70 | | -1,63 | | 2,26 | | 1,25 |

a) Eine Kristallisations suspension (50 mmol/L in demin. Wasser) wurde hergestellt und ohne Erhitzen während 648 h geführt.

Tabelle 5-9: Kristallisation von Tyrosin bei 20 °C, Bestimmung des D-Enantiomerenanteils EF [%] und der absoluten Standardabweichung [%] in den Kristallen nach der Kristallisation mittels GC als N,O-TFA/O-Et-Derivat auf Chirasil-L-Val (Säule C).

| DL-Tyr(Se1) (I) | | DL-Tyr(Se1) (II) | | DL-Tyr(Fi0) (I) | | DL-Tyr(Fi0) (II) | | DL-Tyr(Fi0) +L-Tyr(Fi0) | | DL-Tyr(Fi0)+L-Tyr(Si0) | | | |
|-----------------|---------------------|------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|------|---------------------|
| Zeit [h] | σ | Zeit [h] | EF | Zeit [h] | σ | Zeit [h] | σ | Zeit [h] | σ | Zeit [h] | σ | | |
| n = 1K, 1 x 3 | | n = 6K, 1 x 3 | | n = 3A, 1 x 4 ³⁾ | | n = 6K, 1 x 3 | | n = 6K, 1 x 3 | | n = 2A, 1 x 5 | | | |
| 836 | 50,06 ^{c)} | 408 | 50,05 ^{d)} | 1343 | 49,72 ^{b)} | 0,10 | 49,81 ^{d)} | 0,04 | 50,11 ^{d)} | 0,24 | 49,17 ^{d)} | 0,05 | 1343 |
| | | | | | 49,68 ^{b)} | 0,06 | | | | | | | 50,38 ^{b)} |
| | | | | | 49,90 ^{c)} | 0,08 | | | | | | | 50,72 ^{c)} |

b) Kristalle wurden über Membranfilter von der Kristallisationslösung getrennt.

c) Kristalle wurden mittels Filter-Eppendorf-Caps von der Kristallisationslösung getrennt.

d) Kristalle wurden mittels Zentrifuge von der Kristallisationslösung getrennt.

¹⁾ 1K, 1 x 4 bedeutet, es wurde eine Kristallisation durchgeführt (1K), davon wurde eine Probe (1 x) zu der bestimmten Zeit von der überstehenden Kristallisationslösung oder von den Kristallen entnommen, es wurde einmal derivatisiert und dann viermal gaschromatographisch bestimmt (x 4).

²⁾ Δ EF ist die Differenz zwischen dem EF-Wert zur Zeit 0h und dem letzten gemessenen EF-Wert.

³⁾ 3A, 1 x 4 bedeutet, die Kristalle wurden dreimal unabhängig voneinander aufgearbeitet (3A), es wurde je einmal derivatisiert (1 x) und dann je viermal gaschromatographisch bestimmt (x 4).

5 Experimente zur Homochiralität

In einer weiteren Versuchsreihe wurden *DL*-Tyr(Se1)(II) und *DL*-Tyr(Fl0)(II) nach Einwiegen, Zugabe von 50 mL H₂O und Verschließen des Reaktionsgefäßes im siedenden Wasserbad vollständig gelöst. Die Lösungen der Konzentration 10 mmol/L wurden jeweils in 9 Einzelproben von *DL*-Tyr(Se1)(II) und 20 Einzelproben von *DL*-Tyr(Fl0)(II) zu je 800 µL in 1 mL-Glasvials überführt, getrennt und bei 20 ± 1 °C auskristallisiert. Die *D*-Enantiomerenanteile wurden in der überstehenden Kristallisationslösung vor Beginn und nach beendeter Kristallisation bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-8**, **Abbildung 5-11** (unten) und **Abbildung 5-12** (unten) aufgeführt.

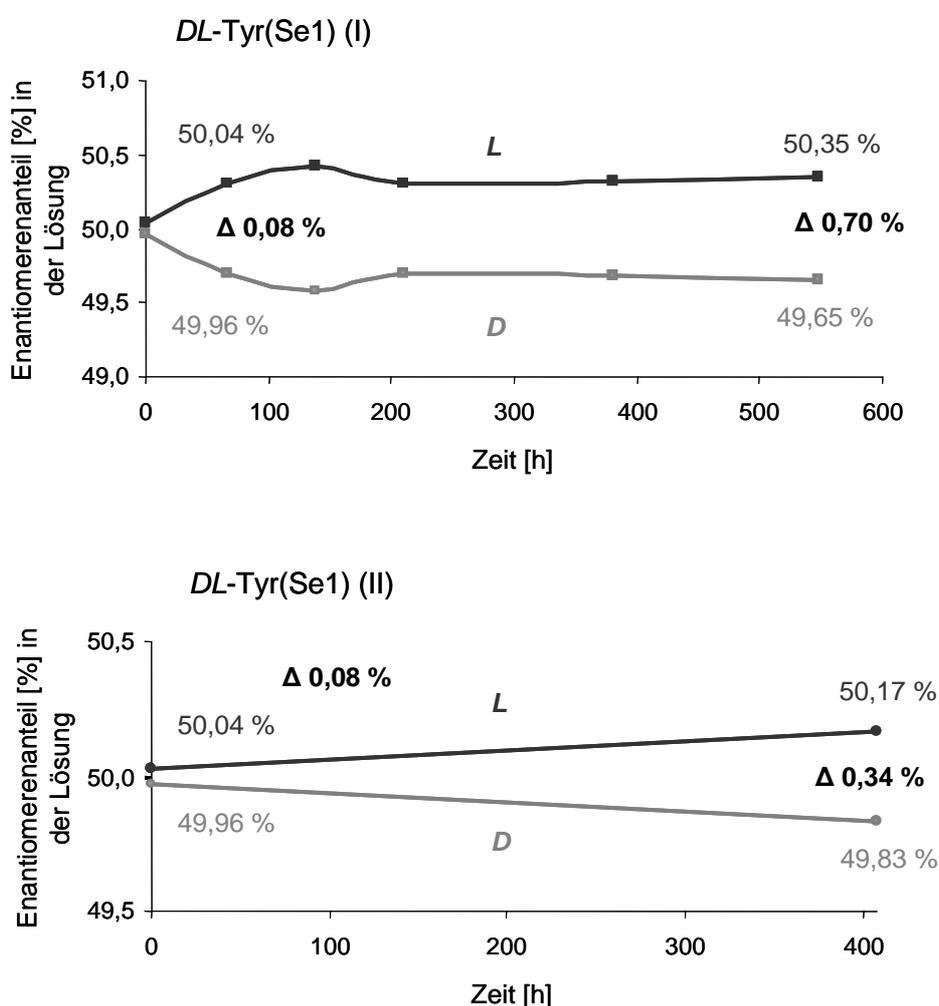


Abbildung 5-11: Bestimmung der Enantiomerenanteile in den überstehenden Kristallisationslösungen von racemischem Tyrosin. Oben: *DL*-Tyr(Se1)(I), Messwerte aus einer Kristallisation; unten: *DL*-Tyr(Se1)(II), Mittelwert aus 20 unabhängigen Kristallisationen. Die Bestimmungen erfolgten mit GC als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

5 Experimente zur Homochiralität

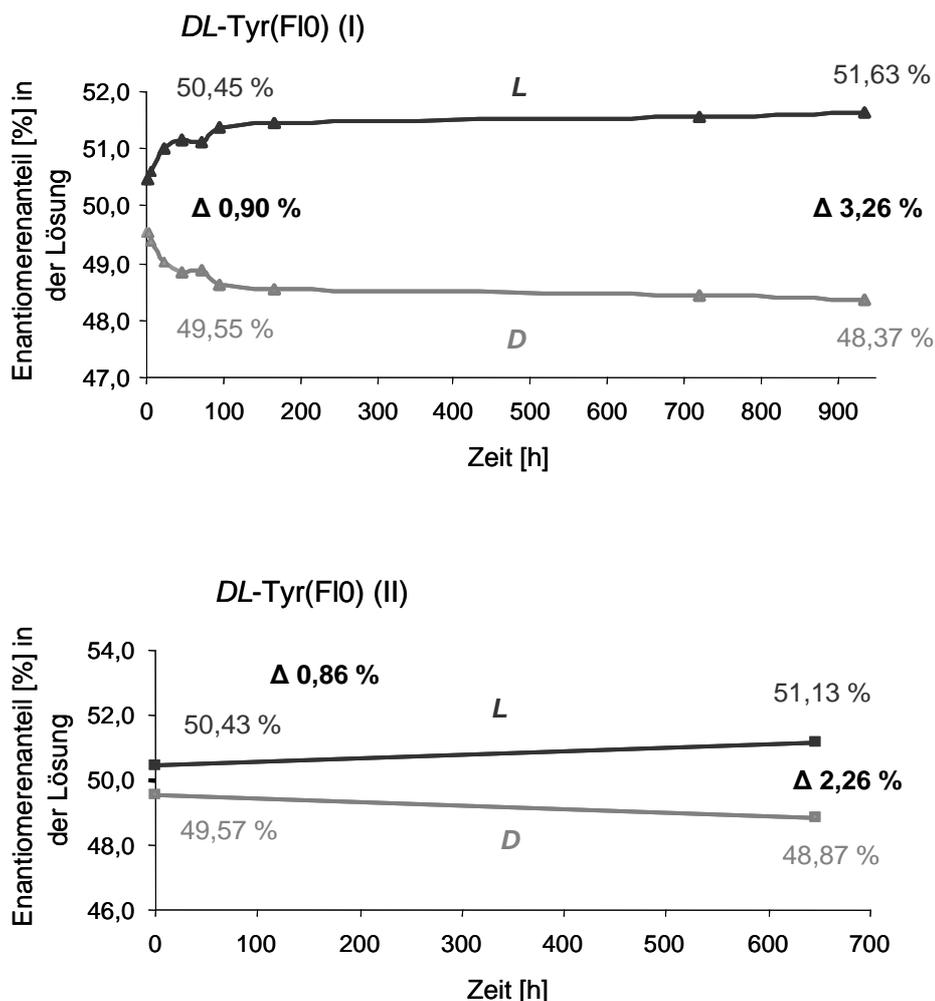


Abbildung 5-12: Bestimmung der Enantiomerenanteile in den überstehenden Kristallisationslösungen von racemischem Tyrosin. Oben: *DL*-Tyr(F10)(I) aus einer Kristallisation; unten: *DL*-Tyr(F10)(II) aus 20 unabhängigen Kristallisationen. Die Bestimmungen erfolgten mit GC als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

DL-Tyr(Se1)(I) und *DL*-Tyr(F10)(I) zeigen im Verlauf der Kristallisation einen deutlichen Anstieg von *L*-Tyrosin in den überstehenden Lösungen. Für *DL*-Tyr(F10)(I) betrug die Zunahme 1,18 %, für *DL*-Tyr(Se1)(I) 0,31 %. Dagegen zeigt sich im Vergleich der Werte für die Zeit 0 Stunden mit den Werten der Kristalle eine relative Abnahme des *L*-Tyrosin-Gehaltes in den Kristallen und folglich eine Anreicherung von *D*-Tyrosin (Tabelle 5-8, Tabelle 5-9). Die *D*-Enantiomerenanteile für die Zunahme in den Kristallen fallen geringer aus als erwartet, was unter Umständen damit zusammenhängt, dass es nicht möglich war, die Kristalle vollständig von der Kristallisationslösung zu befreien. Auch für *DL*-Tyr(Se1)(II) und *DL*-Tyr(F10)(II) ergab sich eine Anreicherung von *L*-Tyrosin; diese war jedoch jeweils etwas weniger ausgeprägt (in *DL*-Tyr(Se1)(II) 0,13 %, in *DL*-Tyr(F10)(II) 0,70 %). Bei jeder Kristallisation wurde dabei beobachtet, dass je höher der *L*-Anteil in der *DL*-Tyrosin Probe

5 Experimente zur Homochiralität

zur Zeit 0 Stunden bestimmt wurde, desto größer war auch die Zunahme von *L*-Tyrosin in der überstehenden Kristallisationslösung während der Kristallisation. Das bedeutet, dass die ausgefallenen Kristalle „reiner“ und damit näher am eigentlichen Racemat sind. Deshalb zeigten auch die umkristallisierten und damit „saubereren“ Proben *DL*-Tyr(Se1) jeweils einen geringeren *L*-Tyrosin-Anstieg in der überstehenden Kristallisationslösung.

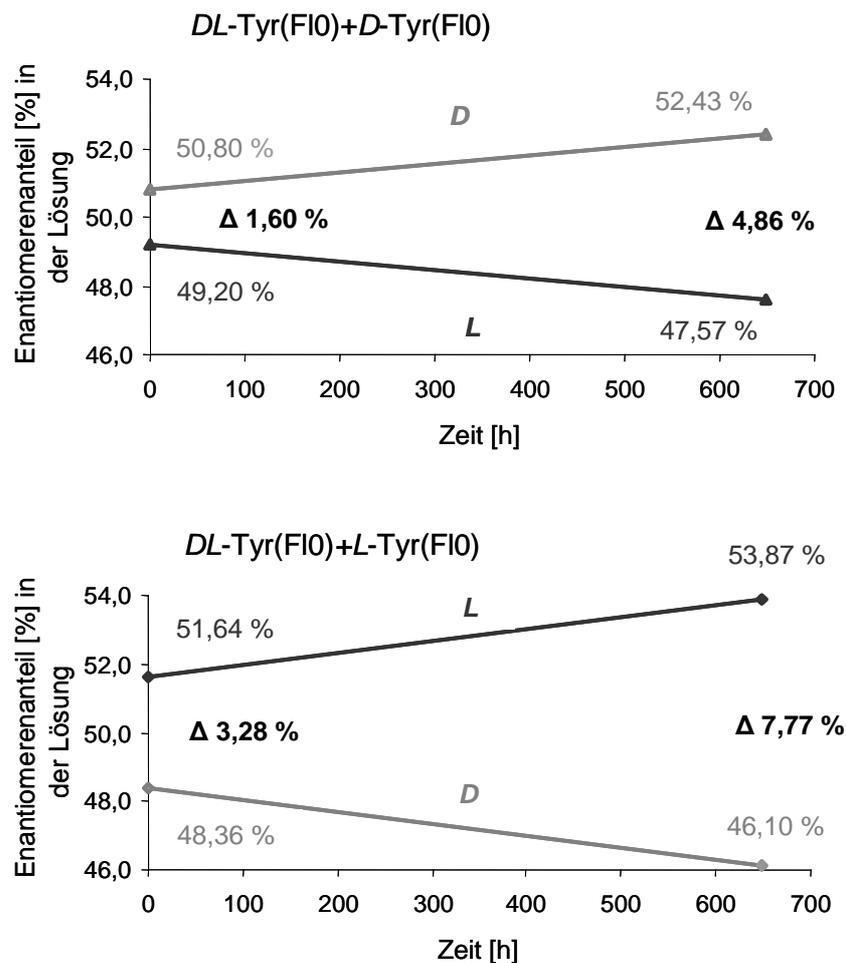


Abbildung 5-13: Bestimmung der Enantiomerenanteile in den überstehenden Kristallisationslösungen von angereichertem *DL*-Tyr(F10) mit *D*- bzw. *L*-Tyrosin. Oben: *DL*-Tyr(F10)+*D*-Tyr(F10), Mittelwert aus 6 unabhängigen Kristallisationen; unten: *DL*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(F10), Mittelwert aus 8 unabhängigen Kristallisationen. Die Bestimmungen erfolgten mit GC als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

5 Experimente zur Homochiralität

Um den Zusammenhang zwischen dem *L*-Anteil in der *DL*-Tyrosin-Probe zur Zeit 0 Stunden und der Zunahme von *L*-Tyrosin in der überstehenden Lösung während der Kristallisation zu verifizieren, wurde *DL*-Tyr(F10) mit *D*-Tyrosin zu *DL*-Tyr(F10)+*D*-Tyr(F10) und *L*-Tyrosin zu *DL*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(F10) angereichert. Es wurden wiederum die Mittelwerte aus sechs Einzelkristallisationen mit *DL*-Tyr(F10)+*D*-Tyr(F10) und acht Einzelkristallisationen mit *DL*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(F10) gebildet (**Tabelle 5-8** und **Abbildung 5-13**), um die Signifikanz der Ergebnisse zu erhöhen. Die Experimente mit den angereicherten *DL*-Tyr(F10)+*D*-Tyr(F10)- und *DL*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(F10)-Proben bestätigen die oben formulierte Korrelation: *DL*-Tyr(F10)+*D*-Tyr(F10) hat in der Lösung zur Zeit 0 Stunden einen *D*-Enantiomerenanteil *EF* von 50,80 % (**Tabelle 5-8**) und in den Kristallen nach 648 Stunden einen *EF*-Wert von 50,11 % (**Tabelle 5-9**).

In einem weiteren Experiment wurde nach dem Einwiegen in das Reaktionsgefäß und Zugabe von Wasser das suspendierte Tyrosin *DL*-Tyr(F10) nicht durch Erhitzen gelöst. Es entstand eine 10 mmol/L Suspension von Kristalliten. Der *D*-Enantiomerenanteil wurde zu Beginn (0 Stunden) anhand der Kristalle bestimmt. Nach 648 Stunden wurden die Kristalle abzentrifugiert und der *D*-Enantiomerenanteil aus der überstehenden Flüssigkeit ermittelt (**Tabelle 5-8** und **Abbildung 5-14**). Auch hier konnte eine relative *L*-Tyrosin-Anreicherung in der Lösung gefunden werden, deren Differenz zum Anteil in den Kristalliten 0,46 % betrug.

Ein unerwarteter und ungewöhnlicher Anstieg des Enantiomerenanteils von *L*-Tyrosin (um 1,25 %, **Tabelle 5-8**) ließ sich bei dem durch Einwiegen hergestellten *D*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(Si0) beobachten (**Abbildung 5-14**). Für das „künstliche“ Racemat wurde wiederum die durch ihr ungewöhnliches Kristallisationsverhalten auffällige Probe *L*-Tyr(Si0) verwendet. Der Kristallisationsverlauf des Racemats ist jedoch nicht erklärbar.

Die Ergebnisse in **Tabelle 5-8** und **Abbildung 5-11** bis **Abbildung 5-14** zeigen, dass bei den untersuchten *DL*-Tyrosin-Proben eine Erhöhung des *L*-Tyrosin-Anteils in der überstehenden Kristallisationslösung stattfand. Die Differenz lag im Bereich von ca. 0,1 bis 2,3 %, je nach Reinheit der verwendeten Tyrosin-Proben, während bei Shinitzky *et al.* eine Anreicherung von 10 % (*DL*-Tyrosin) und 12,5 % (*L*+*D*-Tyrosin) dokumentiert ist.

5 Experimente zur Homochiralität

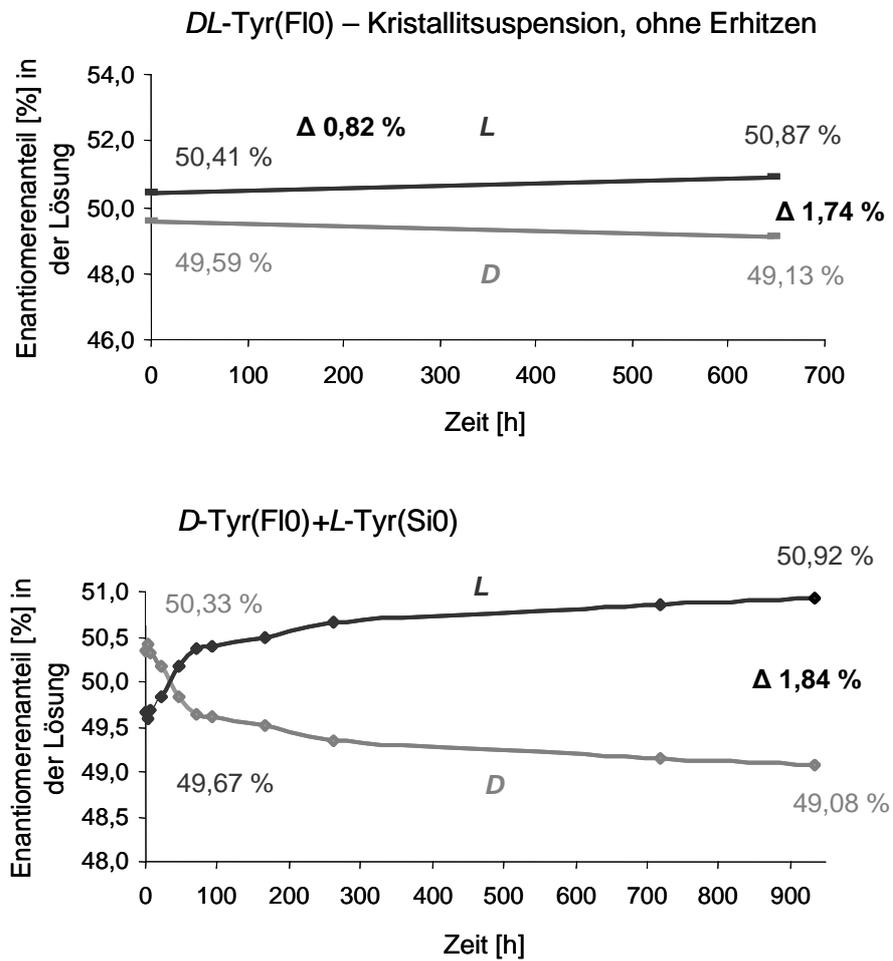
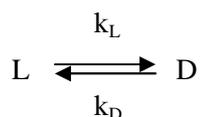


Abbildung 5-14: Bestimmung der Enantiomerenanteile von racemischem Tyrosin *DL*-Tyr(F10) (liegt als Kristallitsuspension vor und wurde nicht durch Erhitzen gelöst) und im Verhältnis 1:1 selbst hergestelltem *D*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(Si0) in der Lösung. Die Bestimmungen erfolgten mit GC als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C).

5.2 RACEMISIERUNG VON ALANIN

Nemoto und Matsuno *et al.*^{86, 87, 153} haben festgestellt, dass enantiomerenreine *D*- und *L*-Alanin-Lösungen unter Nachbildung von hydrothermalen Umgebungsbedingungen (Druck 240 bar und hohe Temperatur von 230 °C) konzentrationsabhängig unterschiedlich racemisieren. Bei einer Konzentration von 100 mmol/L erhielten sie für *D*-Alanin einen Enantiomerenüberschuss von $ee \sim 0$ (EF von $\sim 50\%$), für *L*-Alanin dagegen ein $ee \sim 0,2$ (EF von $\sim 40\%$).⁸⁶ Diese Verhältnisse kehrten sich bei einer Konzentration von 50 mmol/L um (*L*-Alanin $ee \sim 0$, *D*-Alanin $ee \sim 0,2$).⁸⁷ Racemisches *DL*-Alanin veränderte sich nicht. Die Zugabe von verschiedenen Metallionen (Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}) hatte Einfluss auf den Enantiomerenüberschuss, jedoch ohne erkennbare Korrelation mit der Ladung oder der Ionengröße. Dagegen zeigte die Veränderung des pH-Werts keine Auswirkung auf die Racemisierung. Die Enantiomerenüberschüsse wurden von Nemoto und Matsuno *et al.* bestimmt, indem die zu definierten Zeiten genommenen Proben mit einem chiralen Reagenz (OPA-NAC) zu Diastereomeren derivatisiert und auf einer achiralen HPLC-Säule aufgetrennt wurden.¹⁵⁴

Bei der Racemisierung von Alanin handelt es sich um eine reversible Reaktion erster Ordnung:¹⁵⁵



Dabei steht L für *L*-Alanin, D für *D*-Alanin und k_L bzw. k_D für die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten. Unter Verwendung der Arrhenius-Gleichung

$$k = A \exp(-E_a/RT),$$

| | |
|----------|---|
| $k...$ | Geschwindigkeitskonstante |
| $A...$ | präexponentieller Faktor |
| $E_a...$ | Aktivierungsenergie |
| $R...$ | Allgemeine Gaskonstante (8,314 J/mol·K) |
| $T...$ | Temperatur |

5 Experimente zur Homochiralität

lässt sich aus experimentell zugänglichen Daten die jeweilige Geschwindigkeitskonstante für eine bestimmte Temperatur extrapolieren. Für E_a sind Werte um 124 kJ/mol in der Literatur angegeben, k liegt für Temperaturen um 225 °C bei ungefähr $1,37 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.¹⁵⁶ Aus den Ergebnissen von Nemoto und Matsuno *et al.* folgt, dass sich konzentrationsabhängig unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten k_L bzw. k_D ergaben. Der Reaktionsverlauf der Racemisierungen von α -Aminosäuren wurde in Abhängigkeit vom pH-Wert,^{157, 158, 159} von der Pufferkonzentration¹⁵⁹ und der Temperatur^{156, 160} untersucht. Unter Verwendung von Daten aus unterschiedlichen Publikationen, welche unter nichteinheitlichen Bedingungen bezüglich Temperatur, Ionenstärke, Pufferkonzentration und pH-Wert gesammelt wurden, haben Cohen und Chyba¹⁶⁰ Gleichungen für verschiedene Aminosäuren entwickelt, mit deren Hilfe die Racemisierungsgeschwindigkeiten und resultierenden Enantiomerenverhältnisse auch für Alanin berechnet werden können. Mit $k_L = k_D = k$ und T in Kelvin erhält man

$$k = \exp(24,91 - 15853/T) \text{ s}^{-1}.$$

Für das Enantiomerenverhältnis $(D/L)_t$ zur Zeit t [s] und $R_0 = [(1 + D/L) / (1 - D/L)]_{t=0}$ ergibt sich

$$(D/L)_t = (\exp(2kt) R_0 - 1) / (\exp(2kt) R_0 + 1).$$

Dabei stehen D und L für die Konzentrationen des jeweiligen Alanin-Enantiomers.

Nach Smith *et al.*¹⁵⁹ können nichtgepufferte Lösungen von α -Aminosäuren während der Racemisierung eine Veränderung im pH-Wert aufweisen. Es wird aber für den pH-Bereich 5 bis 8 in nichtgepufferten Lösungen keine Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit vom pH-Wert erwartet. Kawamura und Yukioka¹⁵⁶ untersuchten bereits drei Jahre vor Nemoto und Matsuno *et al.* das Racemisierungsverhalten von D - und L -Alanin in wässriger Lösung unter hydrothermalen Bedingungen bei 225 °C, 250 °C und 275 °C (200 mmol/L Alanin-Lösung bei pH 7). Dabei stellten sie für 275 °C fest, dass sich ausgehend von reinem D - bzw. L -Alanin in wässriger Lösung kein Unterschied in der Gleichgewichtseinstellung ergab. Sie nahmen ebenfalls gleiche Geschwindigkeitskonstanten für D - und L -Alanin an, berücksichtigten jedoch Nebenreaktionen. Bei dieser Reaktionstemperatur konnten sie Alaninanhydrid nachweisen sowie eine Cyclisierung zu L -Alanyl- L -alanin. Dabei verlief die Bildung von Alaninanhydrid schneller als die Racemisierung. Bei einer geringeren Temperatur trat dieser Effekt jedoch nicht auf. Khatib und Engel¹⁶¹ sowie Smith *et al.*¹⁶²

5 Experimente zur Homochiralität

untersuchten den katalytischen Effekt von Ni^{2+} bzw. Cu^{2+} , Cr^{3+} , Co^{3+} , Pd^{2+} und Pt^{2+} auf die Racemisierung von *L*-Alanin. Je nach pH-Wert werden Aminosäure-Metallion-Komplexe gebildet, für die die Racemisierung deutlich beschleunigt oder, wie im Fall von Ni^{2+} , auch verlangsamt ablaufen kann.

Da Nemoto und Matsuno *et al.* keine näheren Angaben zu möglichen Verunreinigungen durch Metalle und die verwendeten Materialien machen, lässt sich nicht nachvollziehen, weshalb sie unterschiedliche Racemisierungsgeschwindigkeiten für die Enantiomere feststellen konnten. Für das Racemat wurde dagegen keine Deracemisierung festgestellt. Wenn unterschiedliche Racemisierungen bei den einzelnen Enantiomeren auftreten, sollte als logische Konsequenz eine Verlagerung des Enantiomerengleichgewichts beim Racemat zu beobachten sein. Um diesen Widerspruch zu klären, wurde versucht, die Ergebnisse von Nemoto, Matsuno und ihren Mitarbeitern mit der sehr genauen und validierten GC-Methode zu reproduzieren. Die *D*-Enantiomerenanteile von Alanin-Proben wurden vor und nach dem Experiment als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat mittels enantioselektiver GC auf Chirasil-*D*- und -*L*-Val bestimmt. Die Proben wurden außerdem für die in Kapitel 4.3 (Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von Alanin) beschriebene Validierung verwendet, um eventuelle Derivatisierungs- und gaschromatographische Unterschiede zu Tyrosin feststellen zu können.

Thermische Beeinflussung der Enantiomerenanteile von Alanin-Racematen und –Enantiomeren in Gegenwart von Edelstahl

Das Racemisierungsverhalten von *D*- bzw. *L*-Alanin und das Deracemisierungsverhalten von *DL*-Alanin wurden durch thermische Behandlung der jeweiligen wässrigen Lösung (100 mmol/L) in einem Temperaturgradienten untersucht. Da für den Versuchsaufbau Edelstahlkapillaren verwendet wurden, konnte *a priori* nicht ausgeschlossen werden, dass die Komponenten des Edelstahls unter hydrothermalen Bedingungen Auswirkungen auf die Racemisierung von Alanin haben. Bereits geringste Spuren von Metallionen können eine katalytische Wirkung zeigen.¹⁶³ Um dies zu prüfen, wurden jeweils 500 μL einer wässrigen *D*-, *L*- bzw. *DL*-Alanin-Lösung der Konzentration 100 mmol/L unter Vakuum in einer Glasampulle versiegelt und anschließend für 10 Minuten bei 150 °C, 5 Minuten bei 230 °C, 5 Minuten bei 20 °C und 20 Minuten bei 0 °C erhitzt bzw. gekühlt. Dieser Gradient (230 °C, 0

5 Experimente zur Homochiralität

°C) soll in erster Näherung die thermische Umgebung von hydrothermalen Quellen simulieren. Dann wurden nochmals jeweils 500 µL der Alanin-Lösungen nach Zugabe eines kleinen Stückes Edelstahl in Glasampullen versiegelt. Das Erhitzen und Kühlen verlief analog.

Der pH-Wert der Proben wurde vor und nach den Reaktionen mit Indikatorstäbchen für pH 0 bis 6 bzw. pH 0 bis 14 bestimmt. Die Enantiomerenanteile wurden nach Umsetzung zum jeweiligen *N*-TFA/*O*-Et-Derivat für *D*-Alanin mit der stationären Phase Chirasil-*D*-Val und für *L*- und *DL*-Alanin mit Chirasil-*L*-Val gaschromatographisch bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-10** dargestellt.

Tabelle 5-10: Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse ee und des *D*- bzw. *L*-Anteils einer 100 mmol/L wässrigen Lösung von *D*-, *L*- bzw. *DL*-Alanin nach Erhitzen (230 °C, 5 min) in einer Glasampulle bzw. nach Zugabe eines Stückes Edelstahl und anschließendem Erhitzen (230 °C, 5 min). Die Bestimmung des *D*- bzw. *L*-Anteils wurde mittels GC als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*D*-Val (Säule A, *D*-Alanin) und Chirasil-*L*-Val (Säule D, *L*- und *DL*-Alanin) durchgeführt.

| | <i>D</i> -Ala(Si0) | | | | <i>L</i> -Ala(Si0) | | | | <i>DL</i> -Ala(Me0) | | | |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----|--------------------|-----------------|-----------------|-----|---------------------|------------------|-----------------|-----|
| | ee | <i>L</i> [%] | σ [%] | pH | ee | <i>D</i> [%] | σ [%] | pH | ee | <i>EF</i> [%] | σ [%] | pH |
| vor dem Erhitzen | 0,97 | 1,44 | 0,08 | 5,5 | 1,00 | 0,00 | 0,00 | 5,5 | 0,00 | 49,98 | 0,06 | 5,5 |
| Erhitzen 230 °C/5 min | 0,86 | 6,88 | 0,08 | 6 | 0,84 | 8,09 | 0,07 | 6 | 0,00 | 49,97 | 0,05 | 6 |
| Erhitzen mit Edelstahl 230 °C/5 min | 0,82 | 8,85 | 0,03 | 6 | 0,83 | 8,65 | 0,02 | 6 | 0,00 | 49,98 | 0,01 | 6 |

Die Enantiomere weisen beim Erhitzen ohne Zugabe von Edelstahl ein geringfügig unterschiedliches Racemisierungsverhalten auf. Dies liegt eventuell an der unterschiedlichen Herstellungsweise der Enantiomere. *D*-Alanin enthält bereits vor dem Erhitzen einen höheren Anteil des Gegenenantiomers (**Tabelle 5-10**). Nach Zugabe von Edelstahl erhöhte sich der Anteil an Gegenenantiomere sowohl für *D*- als auch für *L*-Alanin.

Während Nemoto und Matsuno *et al.* bei racemisierenden Lösungen der Konzentration 100 mmol/L keinen Enantiomerenüberschuss für *D*-Alanin (ee ~ 0) und nur einen geringen Überschuss von ee ~ 0,2 für *L*-Alanin feststellten, ergaben sich hier als Werte nach dem Erhitzen ee = 0,86 für *D*-Ala(Si0) und ee = 0,84 für *L*-Ala(Si0), jeweils ohne Edelstahl, bzw.

5 Experimente zur Homochiralität

$ee = 0,82$ für *D*-Ala(SiO) und $ee = 0,83$ für *L*-Ala(SiO), jeweils mit Edelstahl. Eine Racemisierung der Enantiomere fand statt, das experimentell bestimmte Racemisierungsverhalten war aber weniger ausgeprägt und der Unterschied zwischen den Enantiomerenüberschüssen in den Lösungen von *D*- und *L*-Alanin weit geringer als bei Nemoto und Matsuno *et al.* dokumentiert wurde. Beim Racemat wurden auch hier keine Unterschiede zwischen den Enantiomeren vor und nach dem Erhitzen (Deracemisierung) festgestellt.

Simulation der hydrothermalen Bedingungen für racemisches Alanin im Fluss

Nachdem beim Erhitzen von racemischem Alanin keine Deracemisierung mit oder ohne Edelstahl beobachtet werden konnte, wurde die Simulation der hydrothermalen Bedingungen mit racemischem Alanin durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 5-15** zu sehen. Dieser Versuch wurde nicht mit den Enantiomeren von *D*- und *L*-Alanin durchgeführt, da die Sauberkeit der Apparatur von großer Bedeutung ist und eine mögliche enantiomerenspezifische Verunreinigung zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte. Die Temperatur entsprach hier der des bereits oben skizzierten Versuchsaufbaus (230 °C). Daher wurde davon ausgegangen, dass auch bei diesem Aufbau eine Racemisierung (wie oben bestimmt) bei den reinen Enantiomeren auftritt.

Der Racemisierungsgrad im oben skizzierten Vorversuch betrug nach einer Kontaktzeit von 5 min bei 230 °C ungefähr 17 %, entsprechend einem ee von 0,83. Es wird davon ausgegangen, dass bei einer Kontaktzeit von 10 min bei 230 °C, wie sie zur Simulation der hydrothermalen Bedingungen verwendet wird, eine größere Racemisierung der Enantiomere als im Vorversuch stattfinden sollte, jedoch mindestens die im Vorversuch bestimmte. Im Vergleich dazu wurde aus den Versuchsbedingungen von Nemoto und Matsuno *et al.* eine Kontaktzeit von 3,6 min bei 230 °C berechnet und es fand eine Racemisierung von 100 % bei *D*-Alanin und von 80 % bei *L*-Alanin statt.

5 Experimente zur Homochiralität

In Anlehnung an das von Nemoto und Matsuno *et al.* bestimmte Racemisierungsverhalten wäre eine Deracemisierung auf deutlich mehr als 52 % *L*-Anteil zu erwarten. Wie bereits in Kapitel 4.3 gezeigt wurde, ist die Messgenauigkeit dieser Methode sehr groß, so dass eine solche Abweichung vom Racemat, falls sie auftritt, bestimmt werden kann.

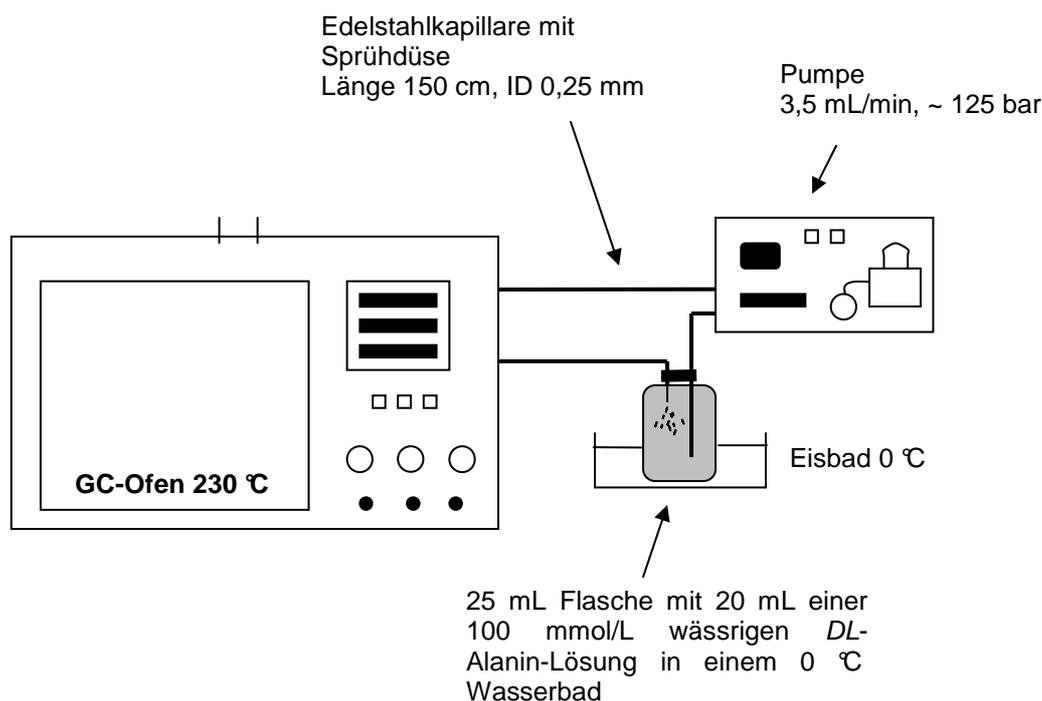


Abbildung 5-15: Reaktionsaufbau.

In einer 25 mL Flasche befinden sich 20 mL einer 100 mmol/L wässrigen *DL*-Alanin-Lösung. Diese steht in einem 0 °C Wasserbad. Über eine HPLC-Pumpe wird die *DL*-Alanin-Lösung in einer Edelstahlkapillare durch den 230 °C heißen Ofen gepumpt und durch eine Sprühdüse wieder in die 25 mL Flasche zurück (0 °C). *DL*-Alanin wird über eine Stunde im Kreislauf (3,5 mL/min, ~ 125 bar) gepumpt, dabei folgt einer Erhitzung auf 230 °C anschließend immer eine Abkühlung auf 0 °C. Die gesamte 100 mmol/L *DL*-Alanin-Lösung wurde während des Kreislaufs ca. 10 Minuten auf 230 °C erhitzt. Die gemessenen *D*-Enantiomerenanteile vor und nach dem Erhitzen sind in **Tabelle 5-11** angegeben.

5 Experimente zur Homochiralität

Tabelle 5-11: Bestimmung des Enantiomerenüberschusses ee und *D*-Enantiomerenanteils *EF* von *DL*-Ala(MeO) vor und nach der Reaktion nach Nemoto *et al.* mit GC als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

| | <i>DL</i> -Ala(MeO) | | | |
|-------------------|---------------------|---------------|--------------|-----|
| | ee | <i>EF</i> [%] | σ [%] | pH |
| vor der Reaktion | 0,00 | 49,94 | 0,01 | 5,0 |
| nach der Reaktion | 0,00 | 49,95 | 0,02 | 5,5 |

Für *DL*-Alanin wurde unter Berücksichtigung der Messgenauigkeit keine Veränderung des *D*-Enantiomerenanteils beobachtet. Es fand keine Deracemisierung statt.

5.3 DEUTEROLYSE VON POLYPEPTIDEN

Um einen möglicherweise durch PVED hervorgerufenen Effekt bei Enantiomeren zu verstärken und ohne Einfluss von eventuellen Verunreinigungen bestimmen zu können, wurden von Shinitzky *et al.*⁹⁰ Versuche mit Polypeptiden in Wasser und in Deuteriumoxid durchgeführt. Dazu wurden vier Polypeptide, Poly-*D*- und *L*-Glutaminsäure₂₄ sowie Poly-*D*- und *L*-Lysin₂₄, von Shinitzky *et al.* synthetisch auf Harz hergestellt. Die Herstellung der Polypeptide erfolgte ausgehend von geschützten enantiomerenreinen Aminosäuren, deren chemische Reinheit laut Literatur bei > 98 % liegen sollte, wobei die Menge an jeweiligem Gegenenantomer als nicht nachweisbar angegeben wurde. Nach Reinigung mittels semipräparativer RP-HPLC und Kontrolle der Molekulargewichte durch Massenspektrometrie wurde der Reinheitsgrad der Enantiomere innerhalb der jeweiligen Polypeptidkette von Shinitzky *et al.* auf Grund der durchgeführten Analysen (HPLC, MS) auf > 99 % geschätzt. Poly-*D*- und *L*-Glutaminsäure₂₄ sowie Poly-*D*- und *L*-Lysin₂₄ wurden anschließend mittels Circular dichroismus (CD) und Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) bei verschiedenen pH-Werten untersucht. In den mit Wasser durchgeführten Versuchen wiesen die CD-Spektren der jeweils enantiomeren Polypeptide Unterschiede in der random coil-Konformation auf. Die ITC-Spektren zeigten ebenfalls Enthalpieunterschiede (Poly-*L*-Glutaminsäure₂₄: $\Delta H = 1,31$ kcal/mol und Poly-*D*-Glutaminsäure₂₄: $\Delta H = 1,48$ kcal/mol). Wurden die Spektren der Proben dagegen jeweils in D₂O statt in H₂O gemessen, waren die Unterschiede weitestgehend aufgehoben.

Shinitzky *et al.* interpretierten die Beobachtungen unter Verweis auf Ergebnisse von Tikhonov *et al.* zur Trennung von ortho- und para-Wasser durch Adsorption an porösen Festkörpern.¹⁴⁷ Wasser existiert analog zu diatomarem Wasserstoff mit unterschiedlichen Kernspins der Wasserstoffatome und lässt sich in Singulett- und Triplett-Zustände im Verhältnis 1:3 einteilen. Unter der Annahme, dass das Magnetfeld von ortho-Wasser mit einem durch PVED beeinflussten magnetischen Moment der *L*-Enantiomere bevorzugt wechselwirkt, kommen Shinitzky *et al.* zu dem Schluss, dass die Messergebnisse durch einen enantiomerenspezifischen magnetochemischen Mechanismus zu erklären seien. Im Gegensatz dazu beschreibt Fließbach,⁵⁸ dass die magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung im Wasserstoffmolekül, welches auch von Tikhonov *et al.* zum Vergleich herangezogen wurde,

5 Experimente zur Homochiralität

in der Größenordnung von 10^{-29} J liegt und damit keinen nennenswerten Beitrag zu der Gesamtenergie des Moleküls liefert (zum Vergleich: elektronische Anregungen des Wasserstoffmoleküls liegen im Bereich um 10^{-19} J, Vibrationen um 10^{-20} J und Rotationen um 10^{-21} J). Das äußert sich auch darin, dass die Gleichgewichtseinstellung von ortho- und para-Wasserstoff (3:1) sehr langsam vonstatten geht, so dass die Symmetrie- bzw. Auswahlregeln für Spin- und Drehimpuls des Moleküls der limitierende Faktor sind.⁵⁸ Vor diesem Hintergrund scheint eine bevorzugte Wechselwirkung zwischen ortho-Wasser und *L*-Enantiomer aus energetischen Gründen nicht wahrscheinlich zu sein.

Da laut Literatur die Mengen an Gegenenantiomeren in den jeweiligen geschützten α -Aminosäuren vom Händler als nicht nachweisbar angegeben wurden, haben Shinitzky *et al.* die Enantiomerenreinheit der Ausgangsmonomere von Poly-*D*- und *L*-Glutaminsäure₂₄ sowie Poly-*D*- und *L*-Lysin₂₄ nicht experimentell überprüft. Es können daher Unterschiede im enantiomeren Reinheitsgrad der Ausgangsverbindungen nicht ausgeschlossen werden. Bei den synthetisierten Polypeptiden würde dann auch der enantiomere Reinheitsgrad zwischen Poly-*D*- und *L*-Glutaminsäure₂₄ sowie zwischen Poly-*D*- und *L*-Lysin₂₄ abweichen, was zu nicht identischen CD-Spektren führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb versucht, die enantiomere Reinheit von monomeren α -Aminosäuren sowie von daraus synthetisierten Polypeptiden zu bestimmen. Dazu wurden die *D*- und *L*-Enantiomerenanteile in den für die Peptidsynthese eingesetzten Ausgangsverbindungen Fmoc-*D*-Glu-(OtBu)-OH, Fmoc-*L*-Glu-(OtBu)-OH und Fmoc-*D*-Lys-(BOC)-OH und Fmoc-*L*-Lys-(BOC)-OH sowie eines von der Firma EMC microcollections GmbH (Prof. Karl-Heinz Wiesmüller) synthetisierten enantiomerenreinen Polypeptids₂₄ mit GC/MS überprüft. Die Monomere wurden vom selben Hersteller wie die bei Shinitzky *et al.* verwendeten Aminosäurederivate bezogen. Weiterhin wurden die *D*-Enantiomerenanteile der α -Aminosäuren in kommerziell erhältlichem Poly-*DL*-Alanin (Molmasse 1000 - 5000 g/mol) und Poly-*DL*-Lysin Hydrobromid (Molmasse 1000 - 4000 g/mol) bestimmt.

Optische Reinheit der Ausgangsverbindungen

Für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit der verwendeten Aminosäuren wurden zuerst die Schutzgruppen entfernt und anschließend die Proben mit deuterierten Reagenzien derivatisiert.

Tabelle 5-12: Bestimmung des *D*- und *L*-Anteils der zur Synthese eingesetzten Ausgangsverbindungen nach Abspaltung der Schutzgruppen von Fmoc-*D*-Glu(*O*-*t*Bu)-OH, Fmoc-*L*-Glu(*O*-*t*Bu)-OH, Fmoc-*D*-Lys-(BOC)-OH und Fmoc-*L*-Lys-(BOC)-OH Die Bestimmung erfolgte mittels GC/MS als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

| | m/z | Chirasil- <i>L</i> -Val (GC/MS) | | | n |
|--|-----|---------------------------------|--------------|--------------|---|
| | | <i>D</i> [%] | <i>L</i> [%] | σ [%] | |
| Fmoc- <i>D</i> -Glu-(<i>O</i> - <i>t</i> Bu)-OH | 226 | 99,98 | 0,02 | 0,00 | 2 |
| Fmoc- <i>L</i> -Glu-(<i>O</i> - <i>t</i> Bu)-OH | 226 | 0,03 | 99,97 | 0,01 | 2 |
| Fmoc- <i>D</i> -Lys-(BOC)-OH | 180 | 99,96 | 0,04 | 0,02 | 3 |
| Fmoc- <i>L</i> -Lys-(BOC)-OH | 180 | 0,08 | 99,92 | 0,06 | 3 |

Die Ausgangsverbindungen wiesen alle einen geringen Anteil an Gegenenantiomere zwischen 0,02 und 0,08 % auf.

Deuterium labelling-Methode

Für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Polypeptiden ist eine sauer katalysierte Spaltung in die entsprechenden α -Aminosäuren notwendig, um anschließend die Aminosäuren enantioselektiv gaschromatographisch zu trennen. Allgemein können während einer Hydrolyse von Peptiden Racemisierungsreaktionen der Aminosäuren stattfinden, deren Ausmaß von den Hydrolysebedingungen, der jeweiligen Aminosäure sowie deren Umgebung in der Peptidkette abhängt.¹⁶⁵ Diese Racemisierung täuscht eine Enantiomerenverunreinigung in der Probe vor. Die Methode des deuterium labelling^{164, 165} ermöglicht eine genaue Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse von α -Aminosäuren in Peptiden und Proteinen trotz Racemisierung während der Hydrolyse mittels GC/MS. Eine im Fall des deuterium labelling notwendige Deuterolyse von Peptiden oder Proteinen zu den entsprechenden α -Aminosäuren wird mit deuterierter Salzsäure (DCl, 6 mol/L) durchgeführt. Für die Derivatisierung wird im Fall der Veresterung ein monodeuterierter Alkohol, hier Ethanol- d_1 , verwendet. Nach anschließender Umsetzung mit Trifluoressigsäureanhydrid erhält man wiederum ein *N*-TFA/*O*-Et-Derivat. Im Verlauf der durch die Deuterolyse induzierten Racemisierung kommt es zu einem Austausch des Wasserstoffs am α -C-Atom durch Deuterium (**Abbildung 5-16**). Dabei liegen die mit Deuterium markierten Aminosäuren als *D*- und als *L*-Enantiomere vor. Da Deuterium um eine Masseneinheit schwerer als Wasserstoff ist, wird eine Massenverschiebung um 1 amu im GC/MS beobachtet. Zur Bestimmung der *D*-Enantiomerenanteile werden deshalb nur diejenigen *m/z*-Werte für die Auswertung verwendet, denen kein H/D-Austausch entspricht. Während im Full Scan-Massenspektrum die Zahl aller Ionenfragmente berücksichtigt und damit über einen großen Bereich der *m/z*-Werte gescannt wird, ermöglicht die Verwendung des SIM-Modus (selected ion monitoring) eine empfindliche Detektion eines durch einen *m/z*-Wert festgelegten Ionenfragments. Analog zu der im GC mit FID und Integrator berechneten Peakfläche erhält man im SIM-GC/MS ein Massenfragmentogramm des entsprechenden *m/z*-Wertes als Integral über die Zeit. Für die Anwendung im Fall der bei der Deuterolyse markierten Aminosäuren ergibt sich, dass bei der Auswertung lediglich die Häufigkeiten der nicht deuterierten Spezies des jeweiligen Enantiomers anhand dieses definierten *m/z*-Wertes bestimmt werden. Die Racemisierungsprodukte der Deuterolyse werden ausgeblendet, da die nicht markierten Enantiomere ungefähr in dem Verhältnis detektiert werden, in welchem sie im ursprünglichen Peptidverband vorliegen.

5 Experimente zur Homochiralität

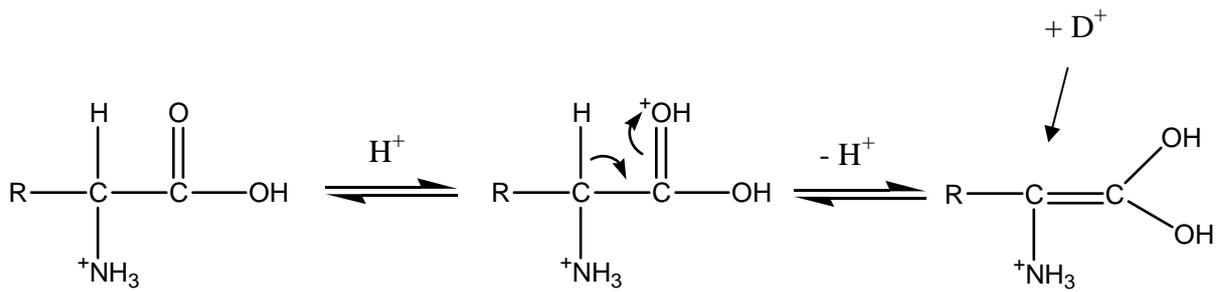


Abbildung 5-16: Racemisierung während der Hydrolyse von Peptiden und Proteinen mit Deuteriumchlorid.

Bei der Verwendung von Elektronenstoßionisation (EI) ist die Auswahl des Fragmentions, welches zur Auswertung herangezogen wird, von Bedeutung. Das Fragmention muss zwei Voraussetzungen erfüllen:

1. Das Fragmention $[M]^+$ muss das α -C-Atom mit Proton enthalten, und
2. das Fragmention $[M-H]^+$ sollte eine möglichst geringe Intensität relativ zu $[M]^+$ aufweisen.

Dies soll am Beispiel des *N*-TFA/*O*-Et-Derivats von Alanin, der einfachsten racemischen α -Aminosäure, erläutert werden. Im Full Scan-Massenspektrum findet man das charakteristische Fragment $[M]^+$ m/z 140 als Basispeak. Dieses Fragment entsteht durch eine Spaltung der C-C-Bindung zwischen der terminalen Carboxylatgruppe und dem α -C-Atom. Das Proton am α -C-Atom bzw. das ausgetauschte Deuteron bleibt dabei erhalten (in **Abbildung 5-17** ist das α -Proton markiert). Das $[M-H]^+$ -Ion, im Falle von Alanin das Ion m/z 139, zeigt kein Signal. Der Wert m/z 141, welcher dem Ion mit einem H/D-Austausch entspricht, wird bei der Auswertung nicht berücksichtigt.¹⁶⁶

5 Experimente zur Homochiralität

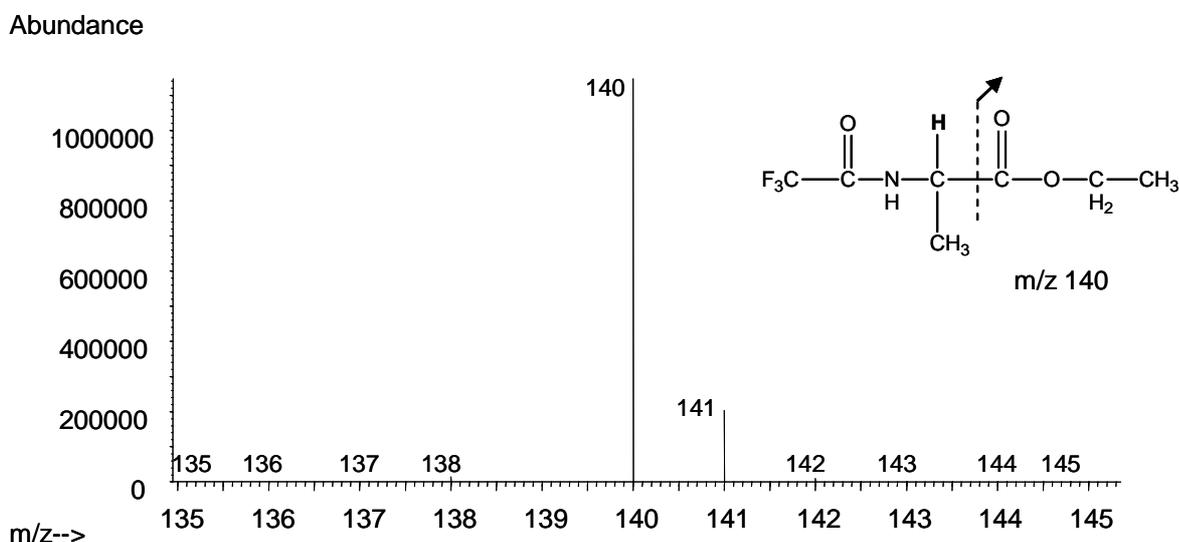


Abbildung 5-17: Ausschnitt aus einem Full Scan-Massenspektrum von Alanin (*N*-TFA/*O*-Et-Derivat) mit der Strukturformel des Fragmentions $[M]^+$ m/z 140. Die Bestimmung erfolgte mittels GC/MS auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

Für das *N,N*-TFA/*O*-Et-Derivat von Lysin beobachtet man im Full Scan-Massenspektrum dagegen das charakteristische Fragment $[M]^+$ m/z 180 als Basispeak. Dieses Fragment entsteht wieder durch eine Spaltung der C-C-Bindung zwischen der terminalen Carboxylatgruppe und dem α -C-Atom. Zusätzlich findet vermutlich eine McLafferty-Umlagerung statt.¹⁶⁷ Bei Lysin kann diese Umlagerungsreaktion an zwei möglichen Stellen erfolgen (siehe **Abbildung 5-19**). Um zu überprüfen, ob das Proton bzw. das ausgetauschte Deuteron am α -C-Atom bei der McLafferty-Umlagerung erhalten bleibt (in **Abbildung 5-18** ist das α -Proton wiederum markiert), wurde von dem als *N,N*-TFA/*O*-Et-Derivat vorliegenden Lysin der *D*-Enantiomerenanteil mittels GC/MS bestimmt. Anschließend wurde eine Blinddeuterolyse von Lysin durchgeführt, das Produkt derivatisiert und wieder mittels GC/MS bestimmt. Die *D*-Enantiomerenanteile vor und nach der Deuterolyse lieferten anhand des Fragmentions m/z 180 das gleiche Ergebnis. Beim H/D-Austausch am α -Proton besteht die Möglichkeit, dass die Intensität der deuterierten Variante des Ions $[M-H]^+$ zur Intensität von $[M]^+$ addiert wird, weil m/z von $([M-H]^+-H+D)^+$ (m/z 179 - 1 + 2) dem Ion $[M]^+$ m/z 180 entspricht. Das Signal des $[M-H]^+$ -Ions m/z 179 ist im Massenspektrum jedoch mit einer

5 Experimente zur Homochiralität

relativen Intensität von 2,5 % so gering, dass das Fragment m/z 180 zur Auswertung herangezogen werden kann (Abbildung 5-18).¹⁶⁶

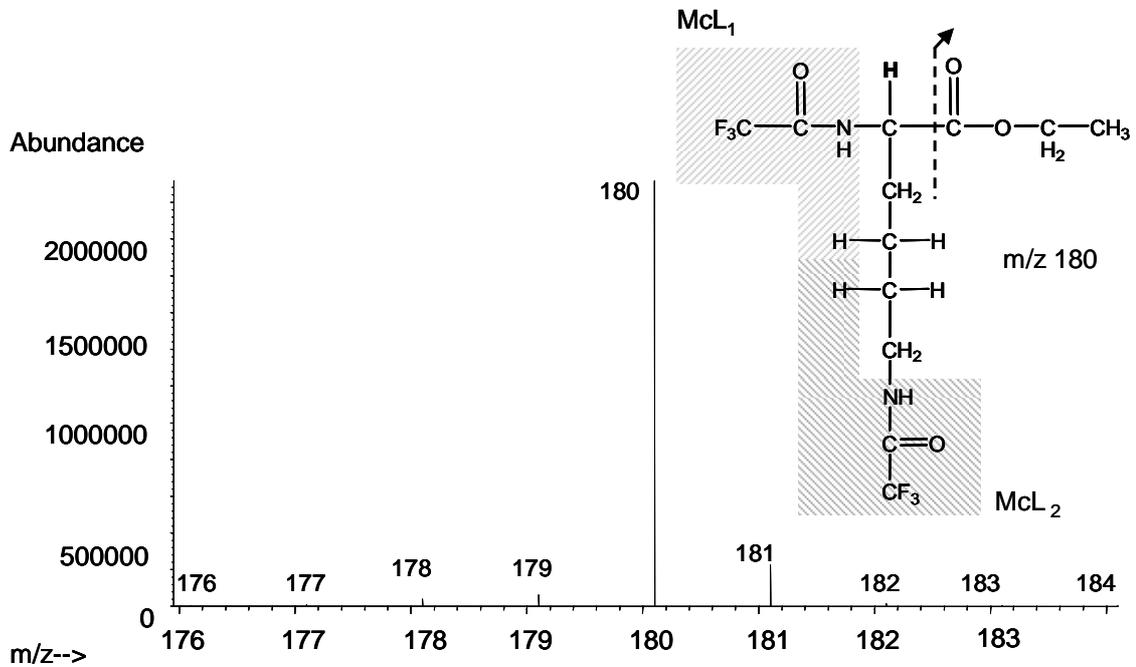


Abbildung 5-18: Ausschnitt aus einem Full Scan-Massenspektrum von *L*-Lysin (*N,N*-TFA/*O*-Et-Derivat) mit der Strukturformel des Fragmentions $[M]^+$ m/z 180. Die Bestimmung erfolgte mittels GC/MS auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

5 Experimente zur Homochiralität

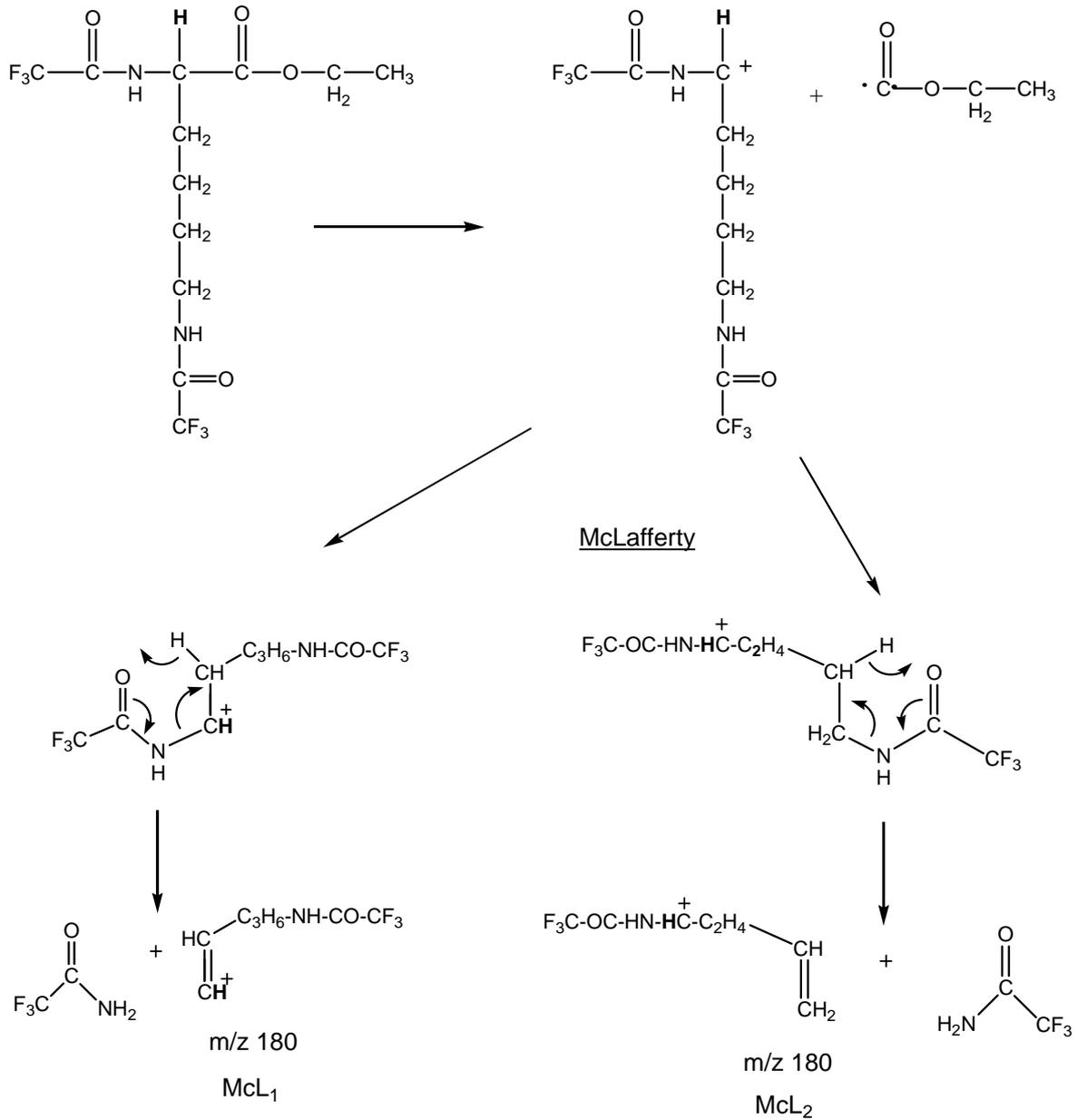


Abbildung 5-19: Zerfallsreaktion und McLafferty-Umlagerung des *N,N*-TFA/OEt-Lysin-Derivats zum charakteristischen Fragment m/z 180.

5 Experimente zur Homochiralität

Das *N*-TFA/*O*-Et-Derivat von Glutaminsäure zeigte im Full Scan-Massenspektrum das charakteristische Fragment $[M]^+$ m/z 226 mit einer relativen Intensität von 75 % des Basispeaks (m/z 152). Dieses Fragment entsteht wieder durch eine Spaltung der C-C-Bindung zwischen der terminalen Carboxylatgruppe und dem α -C-Atom, das Proton am α -C-Atom bzw. das ausgetauschte Deuteron bleibt dabei erhalten. Bei Glutaminsäure findet jedoch zusätzlich während der Deuterolyse ein H/D-Austausch am C-4-Atom unabhängig von der Racemisierung statt (in **Abbildung 5-20** sind die entsprechenden Protonen an 4C und das Proton am α -C-Atom markiert). Aus diesem Grund wurden bei der Auswertung der Massenspektren drei Fragmentionen berücksichtigt, nämlich das Fragmention $[M]^+$ m/z 226 (ohne Austausch), m/z 227 (ein H/D-Austausch) und m/z 228 (zweimaliger H/D-Austausch). Dabei kann die Masse jedes dieser Ionen durch einen racemisierungsbedingten H/D-Austausch am α -C-Atom um eine Einheit erhöht werden.

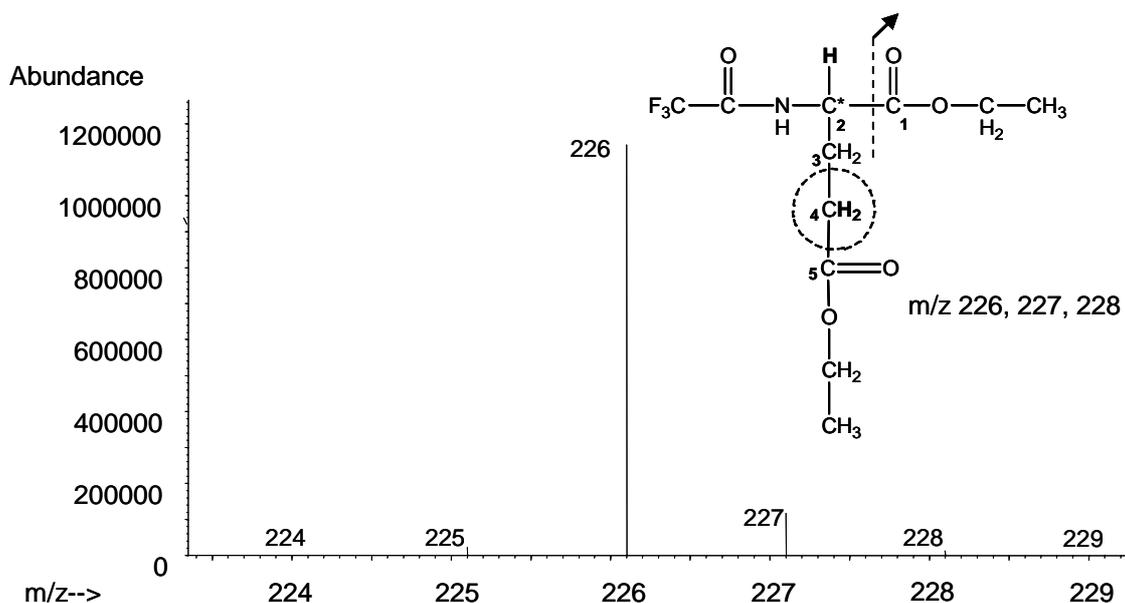


Abbildung 5-20: Ausschnitt aus einem Full Scan-Massenspektrum von *L*-Glutaminsäure (*N*-TFA/*O*-Et-Derivat) mit der Strukturformel des Fragmentions $[M]^+$ m/z 226 und der weiteren H/D-Austauschmöglichkeiten $[M+D]^+$ m/z 227 und $[M+2D]^+$ m/z 228. Die Bestimmung erfolgte mittels GC/MS auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

5 Experimente zur Homochiralität

Bezogen auf die Intensität des Fragments bei m/z 226 weist das $[M-H]^+$ -Ion m/z 225 des Glutaminsäure-*N*-TFA/*O*-Et-Derivats im Massenspektrum ohne Deuterolyse bzw. nach einer Hydrolyse eine geringe relative Intensität von 1,5 % auf, so dass das Fragment m/z 226 zur Auswertung nach einer kurzen Deuterolysezeit herangezogen werden kann (**Abbildung 5-20**).

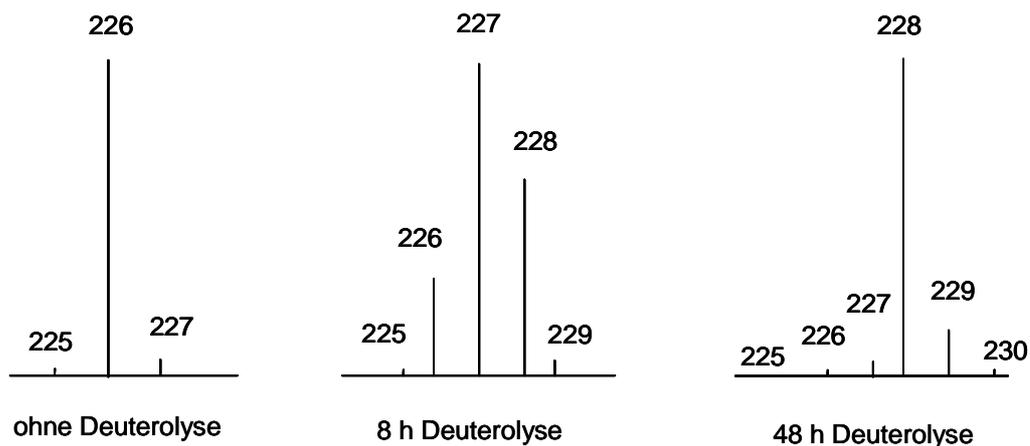


Abbildung 5-21: Mögliche Intensitäten der Fragmentationen von Glutaminsäure (*N*-TFA/*O*-Et-Derivat) je nach Dauer der Deuterolyse.

Je nach Deuterolysezeit verschieben sich die Intensitäten der entsprechenden Fragmentationen (**Abbildung 5-21**). Nach ca. 8 Stunden Deuterolyse geht die Intensität des Ions m/z 226 zurück, dafür nimmt sie bei m/z 227 und m/z 228 zu (Verhältnis der Intensitäten m/z 226 : m/z 228 = 45,4 % : 100 %). Da sich die Intensität des m/z 226-Ions verringert, jedoch bei m/z 225 gleich bleibt, eignet sich das Signal bei m/z 226 nicht mehr zur Auswertung. Nach einer Deuterolysezeit von 48 Stunden findet ein fast kompletter H/D-Austausch statt. Die Intensität von m/z 226 geht weiter zurück, dafür nimmt die Intensität von m/z 228 deutlich zu (Verhältnis der Intensitäten m/z 226 : m/z 228 = 0,5 % : 100 %). Damit eignet sich das Fragmentation m/z 228 zur Auswertung. Das Signal des Ions m/z 227 weist dabei eine Intensität von 3 % relativ zu dem des Ions m/z 228 auf. Der bei der Deuterolyse auftretende Fehler [%] berechnet sich aus dem Produkt der relativen Signalintensität des $[M-H]^+$ -Ions [%] und dem Racemisierungsgrad [%] nach der Deuterolyse. Im konkreten Fall erhält man für die relative Intensität 3 % (Fragmentation m/z 227) bei einem Racemisierungsgrad von 5 % einen Fehler von 0,15 %; um diesen Faktor wird der bestimmte Anteil der enantiomeren Verunreinigung bei Auswertung des Signal m/z 228 zu hoch sein. ¹⁶⁶

Racemisierungsstudie als Vorbereitung für die Peptiddeuterolyse

Mit den zur Peptidsynthese eingesetzten Ausgangsverbindungen Fmoc-*D*-Glu-(OtBu)-OH, Fmoc-*L*-Glu-(OtBu)-OH, Fmoc-*D*-Lys-(BOC)-OH und Fmoc-*L*-Lys-(BOC)-OH wurden nach dem Entfernen der Schutzgruppen Blinddeuterolysen (8, 24 und 48 Stunden) durchgeführt. Die gemessenen *D*- bzw. *L*-Anteile (Angabe in prozentualem *L*- bzw. *D*-Anteil) sind zum Vergleich in **Tabelle 5-13** und **Tabelle 5-14** wiedergegeben.

Tabelle 5-13: Bestimmung des *D*- bzw. *L*-Anteils von Fmoc-*D*-Glu(*O*-*t*Bu)-OH und Fmoc-*L*-Glu(*O*-*t*Bu)-OH ohne und unter Deuterolysebedingungen. Die Deuterolyse erfolgte jeweils in 6 mol/L DCI/D₂O, die Bestimmung mittels GC/MS als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

| Deuterolyse | m/z | Fmoc- <i>D</i> -Glu(<i>O</i> - <i>t</i> Bu)-OH | | Fmoc- <i>L</i> -Glu(<i>O</i> - <i>t</i> Bu)-OH | |
|-------------|-----|---|--------------|---|--------------|
| | | <i>L</i> [%] | σ [%] | <i>D</i> [%] | σ [%] |
| Ohne | 226 | 0,02 | 0,00 | 0,03 | 0,01 |
| | 227 | 0,40 | 0,08 | 0,38 | 0,03 |
| | 228 | 0,67 | 0,09 | 0,91 | 0,27 |
| 8 h | 226 | 0,21 | | 0,27 | |
| | 227 | 0,36 | | 0,29 | |
| | 228 | 0,88 | | 0,62 | |
| 24 h | 226 | 7,04 | 0,12 | 2,66 | 0,28 |
| | 227 | 0,35 | 0,00 | 0,21 | 0,01 |
| | 228 | 0,38 | 0,01 | 0,32 | 0,01 |
| 48 h | 226 | 2,86 | | 0,99 | |
| | 227 | 1,84 | | 1,00 | |
| | 228 | 0,32 | | 0,16 | |

Ein Vergleich der Ergebnisse in **Tabelle 5-13** zeigt, dass sich die Enantiomerenreinheit für die Glutaminsäurederivate ohne Deuterolyse aus dem prozentualen Anteil des Peaks bei der Masse m/z 226 (ohne H/D-Austausch) ergibt. Die Verunreinigung durch das entgegengesetzte Enantiomer beträgt jeweils 0,02 – 0,03 %, dieser Wert entspricht dabei der maximalen Verunreinigung in der jeweiligen Probe. Für die Auswertung des Ions m/z 226 (ohne Austausch) trat bei einer Deuterolysedauer von 8 Stunden der geringste Fehler auf. Die gemessene Verunreinigung an entgegengesetztem Enantiomer betrug 0,21 % (*D*-Glu) bzw. 0,27 % (*L*-Glu). Der deuterolysebedingte Fehler stieg um weitere 10 - 30 % für eine Deuterolysedauer von 24 Stunden, sank jedoch wieder für eine Deuterolysedauer von 48 Stunden (vgl. 2,86 % bei *D*-Glu bzw. 0,99 % bei *L*-Glu). Dagegen verringerte sich der Fehler

5 Experimente zur Homochiralität

kontinuierlich für die Auswertung des Ions m/z 228 (zweimaliger Austausch) mit zunehmender Deuterolysezeit. Nach 48 Stunden Deuterolyse betrug die gemessene Verunreinigung an entgegengesetztem Enantiomer 0,32 % (*D*-Glu) bzw. 0,16 % (*L*-Glu).

Zur Bestimmung der enantiomeren Verunreinigung von glutaminsäurehaltigen Peptiden können so zwei Strategien verfolgt werden. Entweder wird zur Auswertung die Fragmention m/z 226 herangezogen. Dann sollte eine sehr kurze Deuterolysezeit mit maximal 8 Stunden verwendet werden. Um die aus der Racemisierung resultierende Verfälschung in Bezug auf den Anteil an Gegenenantiomer weiter zu verringern, sollte eventuell sogar eine Deuterolysezeit von 4 Stunden angestrebt werden. Oder es wird zur Auswertung die Fragmention m/z 228 herangezogen. Dann sollte die Deuterolysezeit mindestens 48 Stunden betragen. Dennoch ist ein Fehler nicht zu vermeiden, die bestimmte enantiomere Verunreinigung wird um 0,1 - 0,3 % zu hoch sein.

In **Tabelle 5-14** sind die gemessenen Ergebnisse der Lysin-Ausgangsverbindungen angegeben. Die eigentlichen Verunreinigungen der Lysin-Proben an Gegenenantiomer betragen 0,04 bzw. 0,08 %. Nach der Simulation einer Deuterolyse konnte auch hier wieder ein Fehler von ungefähr 0,2 % beobachtet werden. Der Messwert nach 24 h Deuterolyse bei Fmoc-*L*-Lys-(BOC)-OH mit einem *D*-Enantiomerenanteil von 10,01 % wurde als Ausreisser beurteilt.

Tabelle 5-14: Bestimmung des *D*- bzw. *L*-Anteils von Fmoc-*L*-Lys-(BOC)-OH und Fmoc-*D*-Lys-(BOC)-OH ohne und unter Deuterolysebedingungen. Die Deuterolyse erfolgte in 6 mol/L DCI/D₂O, die Bestimmung mittels GC/MS als *N,N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

| Deuterolyse | m/z | Fmoc- <i>D</i> -Lys-(BOC)-OH | | Fmoc- <i>L</i> -Lys-(BOC)-OH | |
|-------------|-------|------------------------------|--------------|------------------------------|--------------|
| | | <i>L</i> [%] | σ [%] | <i>D</i> [%] | σ [%] |
| ohne | 180 | 0,04 | 0,02 | 0,08 | 0,06 |
| 24 h | 180 | 0,21 | 0,01 | 10,01 | 0,84 |
| 48 h | 180 | 0,28 | | 0,14 | |

5 Experimente zur Homochiralität

Um den bei der deuterium labelling-Methode verbleibenden Messfehler quantifizieren zu können, führten Gerhardt *et al.* eine Validierung durch. Dabei wurde festgestellt, dass dieser Fehler je nach Aminosäure bei ungefähr 0,1 % - 0,3 % liegt (*L*-Glutaminsäure 0,37 %, *L*-Lysin 0,09 %, *L*-Alanin 0,16 %).¹⁶⁸ Im Vergleich dazu wurde in dieser Arbeit ein verbleibender Messfehler von ungefähr 0,2 % bei Lysin und ungefähr 0,35 % bei Glutaminsäure festgestellt.

Enantiomerenzusammensetzung der D- und L-Polypeptide

1 mg Poly-*L*-Lys₂₄-NH₂ und 10 mg Poly-*L*-Lys₂₄-NH₂-TFA-Salz wurden bei der Firma EMC microcollections GmbH synthetisch hergestellt. Poly-*D*-Lys₂₄ sowie Poly-*D*-Glu₂₄ und Poly-*L*-Glu₂₄ waren bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht verfügbar. Es wurde versucht, den *D*-Enantiomerenanteil in Poly-*L*-Lys₂₄-NH₂ und Poly-*L*-Lys₂₄-NH₂-TFA-Salz mit der Methode des deuterium labelling zu bestimmen. Die Deuterolyse war bei diesen Proben jedoch vermutlich durch Schwermetallsalze stark beeinträchtigt. Möglicherweise war DCl mit Eisenionen oder die Proben mit Syntheserückständen oder ähnlichem verunreinigt. Üblicherweise reicht eine Konzentration von 25 nmol für ein optimales Peak/Rausch-Verhältnis bei Messungen mit GC/MS. Durch Hydrolyse der zehnfachen Probenkonzentration mit 6 mol/L HCl und Derivatisierung unter Verzicht auf deuterierte Lösungsmittel konnten die Ergebnisse mit einer ausreichenden Signalintensität mittels GC/MS bestimmt werden (**Abbildung 5-22**). Die Daten sind in **Tabelle 5-15** dokumentiert.

Tabelle 5-15: Bestimmung des *D*-Enantiomerenanteils der α -Aminosäuren in synthetisch hergestelltem Poly-*L*-Lys₂₄-NH₂ und (Poly-*L*-Lys₂₄-NH₂)-TFA-Salz. Die Hydrolyse erfolgte 24 Stunden in 6 mol/L HCl/H₂O, die anschließende Bestimmung mittels GC/MS als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D).

| | m/z | <i>D</i> [%] | σ [%] | n |
|--|-----|--------------|--------------|---|
| Poly- <i>L</i> -Lys ₂₄ -NH ₂ | 180 | 0,46 | | 1 |
| (Poly- <i>L</i> -Lys ₂₄ -NH ₂)-TFA-Salz | 180 | 0,61 | 0,08 | 2 |

5 Experimente zur Homochiralität

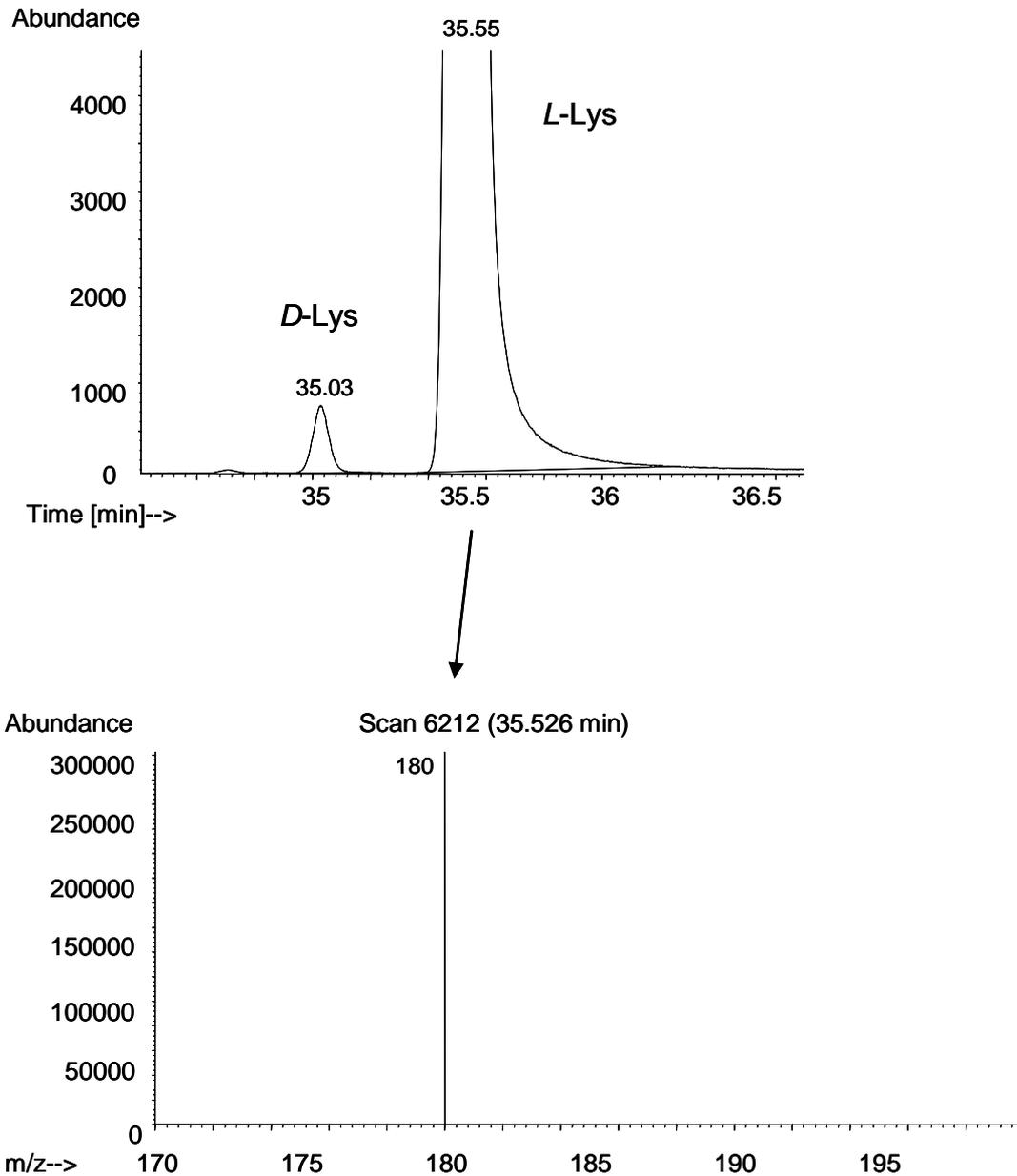


Abbildung 5-22: Oben: Massenfragmentogramm von deuterolysiertem Poly-*L*-Lys₂₄-NH₂ als *N,N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D) im SIM-Modus *m/z* 180. Unten: Massenspektrum des SIM-Modus *m/z* 180.

5 Experimente zur Homochiralität

Unter Berücksichtigung des bei dieser Methode grundsätzlich auftretenden Fehlers von ungefähr 0,2 % und des zusätzlichen hydrolysebedingten Fehlers (ohne deuterium labelling) wurde festgestellt, dass der ermittelte *D*-Anteil in den synthetisch hergestellten Polypeptiden in **Tabelle 5-15** im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen in **Tabelle 5-14** deutlich zugenommen hatte. Zudem konnte eine Differenz (Δ 0,15 %), die größer als die Standardabweichung war, zwischen dem neutralisierten Poly-*L*-Lys₂₃-NH₂ und dem TFA-Salz von Poly-*L*-Lys₂₃-NH₂ festgestellt werden.

Der Grad der Racemisierung während der Peptidsynthese kann aus den oben genannten Gründen hier nicht endgültig beurteilt werden. Dafür sind weitere Deuterolyseexperimente zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit in diesen Peptiden notwendig.

Enantiomerenzusammensetzung von DL-Polypeptiden

Nachdem Shinitzky *et al.* Unterschiede in den CD-Spektren der in der random coil-Konformation vorliegenden enantiomeren Polypeptide festgestellt hatten, erwarteten sie für racemische *DL*-Polypeptide ein CD-Signal ungleich null. Dabei gingen sie davon aus, dass in der Polypeptidsequenz Regionen auftreten, die sich aus mehreren Monomeren desselben Enantiomers zusammensetzen. Shinitzky *et al.* haben dazu Experimente mit kommerziell erhältlicher Poly-*DL*-Glutaminsäure, Poly-*DL*-Lysin und Poly-*DL*-Alanin durchgeführt (alle von Sigma). Für alle drei racemischen Polypeptide wurde ein reproduzierbares CD-Signal von 0,5-0,8 mdeg bei 221 nm beobachtet. Die Messung des Circular dichroismus ist eine sehr empfindliche Methode, bei der geringe Veränderungen in den elektrischen bzw. magnetischen Dipolmomenten von Chromophoren detektiert werden können. Diese Veränderungen können sowohl aus räumlichen Verzerrungen durch intramolekulare Wechselwirkungen (zum Beispiel Unterschiede innerhalb der Peptidsequenz, Helix, Knäuel) oder durch von außen beeinflusste Konformationsstörungen (zum Beispiel Verunreinigungen, asymmetrische lokale Umgebung) resultieren.

Unterschiede in den CD-Signalen lassen sich eventuell auch dadurch erklären, dass in den Poly-*DL*-Peptiden nicht exakt racemische Verhältnisse vorliegen. Da Shinitzky *et al.* keine Bestimmung der Enantiomerenzusammensetzung für Poly-*DL*-Glutaminsäure, Poly-*DL*-Lysin

5 Experimente zur Homochiralität

und Poly-*DL*-Alanin durchgeführt haben, lässt sich dies nicht *a priori* ausschließen. Aus diesem Grund wurden in zwei kommerziell erhältlichen *DL*-Polypeptiden von Sigma Poly-*DL*-Lysin Hydrobromid (Molmasse 1000 - 4000 g/mol) und Poly-*DL*-Alanin (Molmasse 1000 - 5000 g/mol) die *D*-Enantiomerenanteile mit der deuterium labelling-Methode bestimmt. Die Proben wurden dazu deuterolysiert, derivatisiert und anschließend mittels GC/MS untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 5-16** dargestellt, das zur Auswertung verwendete Massenfragmentogramm sowie das dazugehörige Massenspektrum von deuterolysiertem Poly-*DL*-Alanin (*N*-TFA/*O*-Et) sind in **Abbildung 5-23** wiedergegeben.

Tabelle 5-16: Bestimmung des *D*-Enantiomerenanteils *EF* der α -Aminosäuren in kommerziell erhältlichem Poly-*DL*-Alanin und Poly-*DL*-Lysin. Die Deuterolyse erfolgte 24 Stunden in 6 mol/L DCI/D₂O, die anschließende Bestimmung mittels GC/MS als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D), n = 3.

| | <i>EF</i> [%] | σ [%] |
|------------------------------|---------------|--------------|
| Poly-<i>DL</i>-Alanin | 51,22 | 0,25 |
| Poly-<i>DL</i>-Lysin | 45,78 | 0,25 |

Sowohl in Poly-*DL*-Alanin als auch Poly-*DL*-Lysin lagen die entsprechenden α -Aminosäuren nicht racemisch vor, die *D*-Enantiomerenanteile waren ungleich 50 %. In Poly-*DL*-Alanin konnte ein signifikant höherer *D*- und in Poly-*DL*-Lysin ein signifikant höherer *L*- Anteil bestimmt werden.

Wie von Shinitzky *et al.* in der Literatur angegeben und vom Hersteller bestätigt, werden die *DL*-Polypeptide aus racemischen Aminosäuren in statistischer Verteilung hergestellt, so dass exakt racemische *DL*-Polypeptide zu erwarten wären. Die Anwendung der *DL*-Polypeptide zielt jedoch laut Hersteller auf Beschichtungen, die tatsächliche Sequenz wird nach der Synthese nicht analysiert. Damit besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die eingesetzten racemischen Monomer-Mischungen bereits nicht exakt racemische Verhältnisse aufweisen.

5 Experimente zur Homochiralität

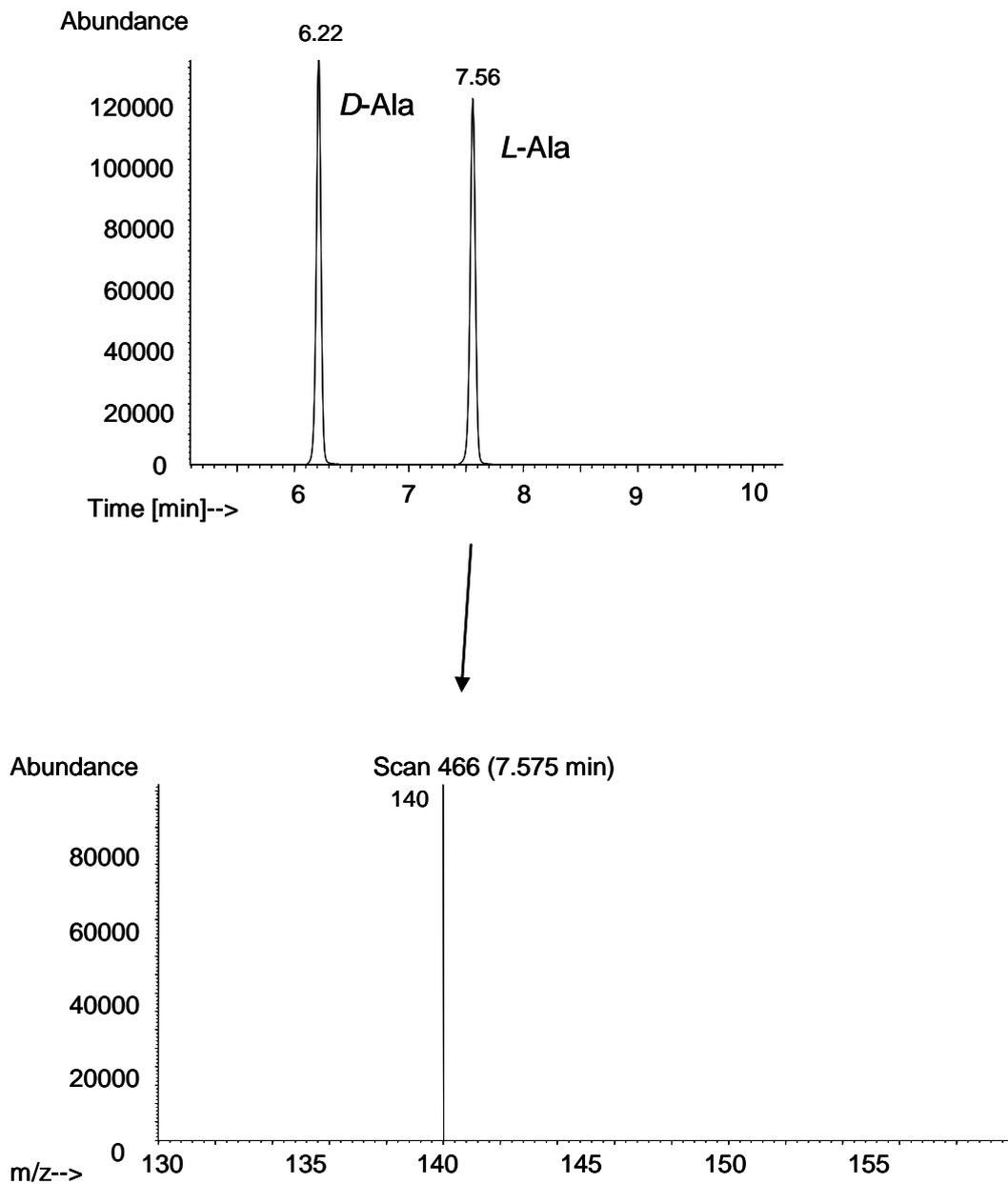


Abbildung 5-23: Oben: Massenfragmentogramm von deuterolysiertem Poly-*DL*-Alanin als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule D) im SIM-Modus *m/z* 140. Unten: Massenspektrum des SIM-Modus *m/z* 140.

6 CHIRALE SELEKTOREN

6.1 POLYPEPTIDE ALS CHIRALE SELEKTOREN IN DER ELEKTROMIGRATION

Peptide und Proteine sowie deren Derivate werden unter anderem als chirale Selektoren in der Elektromigration eingesetzt. Die Elektromigrationsmethoden lassen sich in kapillarelektrochromatographische (z. B. Elektrokinetische Chromatographie EKC, Mizellare Elektrokinetische Chromatographie MEKC, Elektrochromatographie CEC) und kapillarelektrophoretische (z. B. Kapillarelektrophorese CE, Kapillaronenelektrophorese CZE, Gelelektrophorese CGE, Isotachophorese CITP, Affinitätselektrophorese ACE) Methoden einteilen.^{169, 170} Als enantioselektive Selektoren werden in der Literatur unter anderem Glycopeptidantibiotika (Vancomycin, Teicoplanin, Avoparcin, Ristocetin A und Balhimycin),¹⁷¹ Proteine wie Albumin¹⁷² oder tensidische Aminosäurederivate¹⁷³ beschrieben. Polypeptide wie Poly-*L*-Lysin und Poly-Glutaminsäure wurden bisher in der OT-CEC (Open Tubular Elektrochromatographie) eingesetzt.¹⁷⁴

In Kapitel 5.3 wurden die *D*-Enantiomerenanteile in den Homo-Polypeptiden von Glutaminsäure bzw. Lysin genau bestimmt. Hier wurde nun versucht, kommerziell erhältliche Proben von Poly-*L*-Glutaminsäure und Poly-*L*-Lysin als chirale Pufferadditive in der Kapillarelektrophorese (CE) einzusetzen.

Poly-L-Lys und Poly-L-Glu als chirale Pufferadditive?

Zum Test, ob Poly-*L*-Glutaminsäure (Molmasse 750 – 500 g/mol) als chirales Pufferadditiv geeignet ist, wurden verschiedene Konzentrationen (10 bzw. 20 mg/mL) in jeweils einem 20 mmol/L Phosphatpuffer pH 7 oder pH 2,5 gelöst. Es wurde versucht, racemisches BNP (1,1'-Binaphthyl-2,2'-diylhydrogenphosphat) und die Trögersche Base in die Enantiomere zu trennen. Dabei repräsentiert BNP (pK_a 1,14) eine bei pH 7 und 2,5 negativ geladene, die Trögersche Base (pK_a 4,68) eine bei pH 2,5 positiv und bei pH 7 neutrale Substanz. Außerdem wurde sowohl eine unbehandelte als auch eine desaktivierte Kapillarsäule verwendet. Es konnte jedoch unter diesen Bedingungen keine Enantioselektivität von Poly-*L*-

6 Chirale Selektoren

Glutaminsäure beobachtet werden. Auch Poly-*L*-Lysin (Molmasse 500 – 2000 g/mol) wurde zu 10 mg/mL in Phosphatpuffer pH 2,5 gelöst und mit Hilfe einer desaktivierten Kapillarsäule zur Enantiomerentrennung von BNP, der Trögerschen Base und DNP-*DL*-Alanin eingesetzt. Es wurde festgestellt, dass Poly-*L*-Lysin unter diesen Bedingungen die Proben ebenfalls nicht in die Enantiomere trennt.

6.2 CYCLOHEXAPEPTIDE ALS CHIRALE SELEKTOREN

In einer Veröffentlichung von Jung *et al.* wurde die Verwendung von Cyclohexapeptidbibliotheken für die Enantiomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese beschrieben. Dabei kamen drei Teilbibliotheken mit jeweils drei fixierten (O) und drei variablen Positionen (X) der allgemeinen Formel c(OO'XXXO'') als Mobilphasenadditive zum Einsatz. Die variablen Positionen wurden mit 18 natürlichen Aminosäuren permutiert, was eine Gesamtzahl von $18^3 = 5832$ einzelnen Cyclohexapeptiden je Teilbibliothek ergab. Nach Zugabe von c(Asp-Phe-XXX-*D*-Ala) als chirales Pufferadditiv ließen sich die Trögersche Base und DNP-*DL*-Glutaminsäure in die Enantiomere trennen. Darüber hinaus eignete sich c(Arg-Lys-XXX-*D*-Ala) ebenfalls zur Trennung von DNP-*DL*-Glutaminsäure. In der Veröffentlichung wurde skizziert, dass aus der Bandbreite synthetischer Peptidbibliotheken durch Screening und systematische Variation der Cyclopeptide der Selektor ermittelt werden kann, welcher für ein konkretes Problem der Enantiomerentrennung am besten geeignet ist.¹¹⁷

Chiari *et al.* haben ausgehend von c(Arg-Lys-XXX-*D*-Ala) weitere Untersuchungen durchgeführt. *D*-Ala in der sechsten Position wurde durch β -Ala ersetzt, da dies die Trennung im Fall von DNP-Glutaminsäure verbesserte. Um weiterhin die Cyclisierung zu unterstützen, wurde Prolin in jeweils eine der drei variablen Positionen eingeführt. Die beste Enantiomerentrennung (R_s 2,06) von DNP-*DL*-Glutaminsäure wurde erreicht, wenn Prolin in Position 4 zu c(Arg-Lys-X-Pro-X- β -Ala) fixiert wurde. Damit verblieben noch zwei variable Positionen ($18^2 = 324$ Möglichkeiten für die Teilbibliothek). Durch präparative RP-HPLC wurden die Bibliotheken in drei Fraktionen mit unterschiedlicher Hydrophobie aufgetrennt. Die Fraktion mit den aliphatischen und aromatischen Aminosäuren (Val, Met, Ile, Leu, Tyr

6 Chirale Selektoren

und Phe) zeigte dabei die höchste Enantioselektivität. Durch weitere Eingrenzung konnte schließlich c(Arg-Lys-Tyr-Pro-Tyr- β -Ala) als bester Selektor identifiziert werden.¹⁷⁵

Das reziproke chirale Erkennungsprinzip (RCEP)

Ein vielversprechender Ansatz, in der Chromatographie die Suche nach dem optimalen Selektor zu vereinfachen, besteht darin, Selektor und Selektand zu tauschen. Wenn sich die Enantiomere eines Selektanden, A(+) und A(-), an einem chiralen nicht-racemischen Selektor B(+) trennen lassen, können prinzipiell auch umgekehrt B(+) und B(-) an A(+) oder A(-) getrennt werden. Dies ist der zentrale Gedanke des reziproken chiralen Erkennungsprinzips (RCEP), demzufolge der zu trennende Selektand (A(+) und A(-)) in beiden enantiomeren Formen selbst als Selektor eingesetzt wird.¹⁷⁶ Das heißt, es werden zwei enantiomere stationäre Phasen mit A(+) und A(-) hergestellt. Anschließend werden Unterschiede in der Retentionszeit von B(+) als Selektand auf beiden spiegelbildlichen Stationärphasen in Bezug auf eine achirale Standardsubstanz, die nicht mit dem chiralen Selektor wechselwirkt, erwartet (**Abbildung 6-1**).

Unter Bezugnahme auf die Ergebnisse von Jung *et al.* bzw. Chiari *et al.* wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, das RCEP anzuwenden. Aus¹⁷⁵ lässt sich entnehmen, dass für die Enantiomerentrennung von DNP-Alanin mittels CE das Cyclohexapeptid c(Arg-Lys-Tyr-Pro-Tyr- β -Ala) als chiraler Selektor sehr gut geeignet ist. Daher wurden zunächst zwei chirale stationäre Phasen (CSP) mit DNP-D-Alanin (CSP D) und DNP-L-Alanin (CSP L) hergestellt.

6 Chirale Selektoren

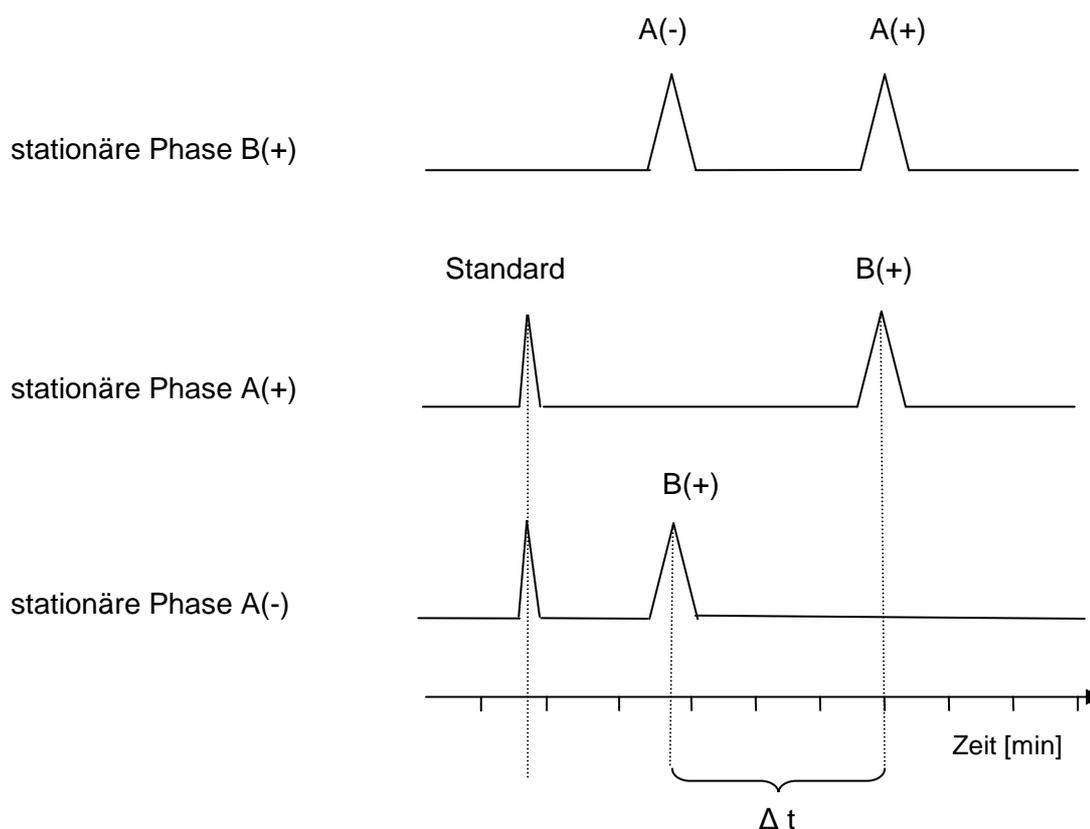


Abbildung 6-1: Das reziproke chirale Erkennungsprinzip (RCEP). Oben werden die Enantiomere A(+) und A(-) auf der chiralen stationären Phase B(+) aufgetrennt, in der Mitte ist das zu erwartende Chromatogramm der chiralen Stationärphase A(+) und unten von A(-) abgebildet. Δt ist die Retentionszeitdifferenz des Selektanden B(+) an der Stationärphase A(+) und A(-).

Anbindung von DNP-D- und DNP-L-Alanin an Silica

DNP-*D*- und DNP-*L*-Alanin wurden unter nahezu gleichen Synthesebedingungen an Silicapartikel gebunden, um möglichst dieselbe Selektorendichte für beide Säulen zu erhalten. Wie in Kapitel 4.3 bestimmt, sind die verwendeten Enantiomere *D*-Ala(F10) und *L*-Ala(De0) enantiomerenrein. *D*- und *L*-Alanin (**2**) wurden im ersten Syntheseschritt jeweils monofunktionell an 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol (DFDNB) (**1**) gebunden (**Abbildung 6-2**).¹⁷⁷ Parallel wurde Silica (300 Å, 5 µm) (**4**) mit 3-Aminopropyltrimethoxysilan (**5**) zu Aminopropylsilica (APS) (**6**) umgesetzt, um durch die freie terminale Aminogruppe eine Anbindungsstelle für den Selektor zu schaffen.¹⁷⁸ Anschließend erfolgte die kovalente

6 Chirale Selektoren

Verknüpfung des 5-Fluor-2,4-dinitrophenyl-1-alanins (FDNP-Ala) **(3)** mit dem modifizierten Kieselgel zu Aminopropylsilica-DNP-Alanin (APS-DNP-Alanin) **(7)** (**Abbildung 6-3**).^{179, 180}

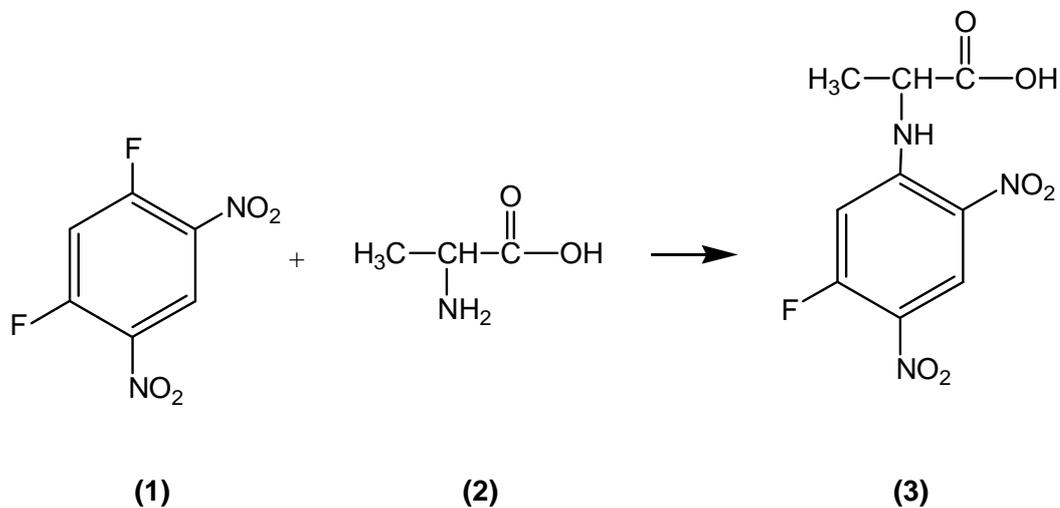


Abbildung 6-2: Anbindung von Alanin an 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol (DFDNB).

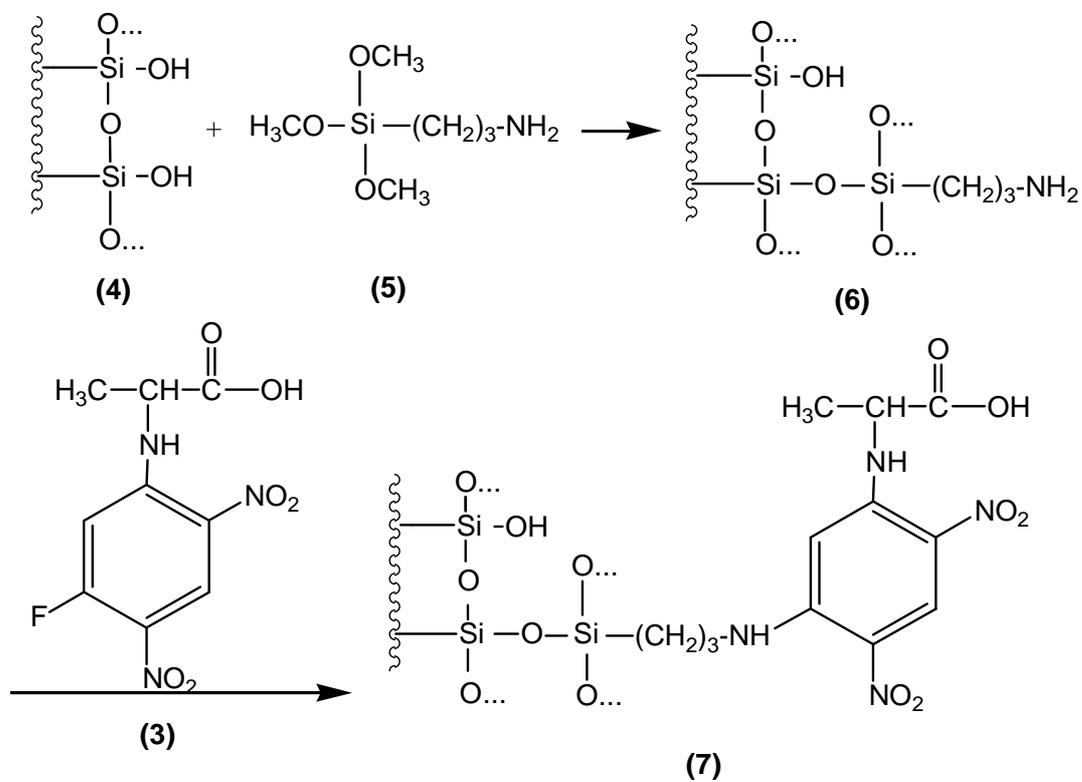


Abbildung 6-3: Anbindung von DNP-Alanin an die Silica-Matrix.

6 Chirale Selektoren

Aus dem stöchiometrischen Umsatz wäre zu erwarten, dass je Gramm Silica 11,5 mmol Aminopropylgruppen gebunden sind. Die tatsächlich stattgefundenen Umsetzung wurde mittels Elementaranalyse überprüft; Festkörper-NMR-Messungen waren aus Gründen der mangelnden Empfindlichkeit nicht aussagekräftig. Neben der Untersuchung des aminopropylmodifizierten Kieselgels wurden auch die im zweiten Schritt mit Selektor umgesetzten Kieselgele elementaranalytisch charakterisiert. Für die ermittelten Werte wurde der elementspezifische Mittelwert M aus zwei Einzelbestimmungen, die Differenz $\Delta_{\text{abs.}}$ der zwei Einzelbestimmungen sowie eine relative Differenz $\Delta_{\text{rel.}} = (\Delta_{\text{abs.}}/M) \cdot 100 \%$ berechnet (**Tabelle 6-1**): Dabei zeigte sich insbesondere für den Kohlenstoffgehalt von APS-DNP-*L*-Alanin eine deutlich größere Abweichung als für die anderen Werte.

Tabelle 6-1: Elementgehalt laut Elementaranalyse. Es wurde jeweils der Mittelwert M [%] und die Differenz $\Delta_{\text{abs.}}$ [%] und $\Delta_{\text{rel.}}$ [%] aus 2 Einzelbestimmungen berechnet.

| | Stickstoff (N) | | | Kohlenstoff (C) | | | Wasserstoff (H) | | |
|--------------------------------|----------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| | M | $\Delta_{\text{abs.}}$ | $\Delta_{\text{rel.}}$ | M | $\Delta_{\text{abs.}}$ | $\Delta_{\text{rel.}}$ | M | $\Delta_{\text{abs.}}$ | $\Delta_{\text{rel.}}$ |
| APS | 0,43 | 0,015 | 3,49 | 1,27 | 0,017 | 1,34 | 0,26 | 0,005 | 1,92 |
| APS-DNP-<i>D</i>-Alanin | 0,64 | 0,053 | 8,28 | 1,84 | 0,201 | 10,92 | 0,39 | 0,159 | 40,77 |
| APS-DNP-<i>L</i>-Alanin | 0,60 | 0,019 | 3,17 | 1,83 | 0,532 | 29,07 | 0,32 | 0,061 | 19,06 |

Tabelle 6-2: Berechneter molarer Stickstoff- bzw. Kohlenstoffgehalt aus den Ergebnissen der Elementaranalyse.

| | mmol N / g Silica | mmol C / g Silica |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| APS | 0,31 | 1,06 |
| APS-DNP-<i>D</i>-Alanin | 0,46 | 1,53 |
| APS-DNP-<i>L</i>-Alanin | 0,43 | 1,53 |

Für die Abschätzung des Belegungsgrades (Zahl der Selektormoleküle dividiert durch die Zahl an vorhandenen Aminopropylresten) wurde der prozentuale Masseanteil an Silicium und Sauerstoff vor und nach der Selektoranbindung als konstant betrachtet (die tatsächliche Änderung beträgt ungefähr 1 % relativ bzw. 0,9 % absolut). Dies erlaubt ein subtraktives Vorgehen zur Bestimmung der Selektormassendichte aus der Elementaranalyse, wobei der Fehler als vernachlässigbar angesehen wird. Im Beispiel von Stickstoff muss berücksichtigt werden, dass ein mol Selektor drei mol Stickstoff entspricht; für Kohlenstoff gilt entsprechend

6 Chirale Selektoren

9 mol Kohlenstoff je mol Selektor. Damit erhält man für die elementspezifischen Berechnungen unterschiedliche Belegungsgrade (**Tabelle 6-3**).

Tabelle 6-3: Belegungsgrad [%] Selektor/Aminopropylrest und Konzentration (Molalität) [μmol] an Selektor je 1 g Kieselgel in Abhängigkeit des betrachteten Elements.

| | Stickstoff (N) | | Kohlenstoff (C) | |
|------------------|----------------|-----------------------------|-----------------|-----------------------------|
| | [%] | [$\mu\text{mol/g}$ Silica] | [%] | [$\mu\text{mol/g}$ Silica] |
| APS-DNP-D-Alanin | 16,3 | 50,0 | 15,0 | 52,8 |
| APS-DNP-L-Alanin | 13,2 | 40,5 | 14,7 | 51,9 |

Unger *et al.*¹⁸¹ berechneten die Oberflächenkonzentration α_{exp} an gebundenem Selektor in Abhängigkeit von der spezifischen Oberfläche des Basiskieselgels nach folgender Formel:

$$\alpha_{\text{exp}} = \frac{m}{M \cdot S_{\text{BET}}}$$

| | |
|---------------------------|---|
| α_{exp} ... | Oberflächenkonzentration [mol/m^2] |
| m... | Masse der funktionellen Gruppe [g/g Kieselgel] |
| M... | Molmasse der funktionellen Gruppe [g/mol] |
| S_{BET} ... | massenkorrigierte spezifische Oberfläche des Basiskieselgels [m^2/g] |

Bei der Massenkorrektur der spezifischen Oberfläche handelt es sich um einen Faktor, der dem Massenanteil an Kieselgel nach der Modifizierung entspricht. Die spezifische Oberfläche des hier verwendeten Kieselgels (Nucleosil 300-5 von Macherey-Nagel) wird mit 100 m^2 je Gramm reinem, unmodifizierten Kieselgel angegeben. Nach Einbindung des Aminopropylrestes bzw. des Selektors sinkt der Massenanteil an Kieselgel auf 98 % bzw. 97 %. Damit muss die spezifische Oberfläche auf 98 bzw. $97 \text{ m}^2/\text{g}$ korrigiert werden. Eine sinnvolle Berechnung erhält man jedoch nur für die Beladung mit Aminopropylgruppen, da die kovalente Verknüpfung des Selektors die Anwesenheit von freien Aminogruppen voraussetzt und es dabei zu einer Mischung aus freien und gebundenen Aminopropylresten kommt. Für die Division durch die Molmasse ergibt sich im letzteren Fall die Schwierigkeit, dass keine einheitliche Molmasse angenommen werden kann; die Abschätzung aus **Tabelle 6-3** zeigt, dass weniger als 20 % der Aminogruppen mit Selektoren belegt sind. Damit ist nur eine Berechnung für die erste Reaktionsstufe mit Aminopropyltrimethoxysilan möglich. Der Wasserstoffgehalt aus der Elementaranalyse lässt keine Unterscheidung zwischen Wasserstoff

6 Chirale Selektoren

aus dem Kieselgel (Hydroxylgruppen, physisorbiertes Wasser) und dem Wasserstoff der Aminopropylreste zu. Das bedeutet, dass ausschließlich die jeweiligen Masseanteile von Stickstoff (0,43 %) oder Kohlenstoff (1,27 %) für die Rechnung verwendet werden können und sich die funktionelle Gruppe auf einen Stickstoff (Molmasse 14 g/mol) bzw. eine C₃- (Molmasse 36 g/mol), C₄- (Molmasse 48 g/mol) oder C₅-Einheit (Molmasse 60 g/mol) reduziert. Letzteres folgt aus dem Informationsdefizit, ob der angebundene Aminopropylsilylrest vollständig (C₃ und 2 OH), teilweise (C₃, CH₃O und OH) oder nicht hydrolysiert (C₃ und 2 CH₃O) vorliegt. Daraus und aus einer massekorrigierten spezifischen Oberfläche von 98 m²/g ergibt sich eine Oberflächenkonzentration α_{exp} von 3,1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (ausgehend von Stickstoff) bzw. 3,6 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (C₃), 2,7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (C₄) oder 2,2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ (C₅) (ausgehend von Kohlenstoff). Unter der Annahme, dass der Wert für Stickstoff im Rahmen der Messgenauigkeit verlässlich ist, erhält man eine gewisse Wahrscheinlichkeit für eine partielle oder sogar vollständige Hydrolyse der Aminopropylsilylgruppe.

Micro-HPLC

Um die Eignung der APS-DNP-Alanin-Kapillaren für Trennungen zu prüfen, wurden chromatographische Experimente mit Micro-HPLC durchgeführt. Deren Vorteil besteht darin, dass für Kapillarsäulen (ID 150 μm) im Gegensatz zu konventionellen HPLC-Säulen (ID 4 mm) der gleichen Länge deutlich geringere Mengen vom verhältnismäßig teuren Säulenpackungsmaterial benötigt werden (konventionelle Säule ca. 2-3 g Silica, Kapillarsäulen ca. 10 mg). Aus diesem Grund wurden Kapillarsäulen für die Micro-HPLC mit einer gebrannten Fritte nach **Abbildung 8-1** gepackt.

Da nur eine geringe Substanzmenge von c(ArgLysTyrProTyr(β)Ala) zur Verfügung stand, wurden die ersten Optimierungsversuche alle mit einem sehr einfachen cyclischen Dipeptid c(Ala-His) durchgeführt. Ein Vorteil von c(Ala-His) besteht darin, dass das UV- Maximum bei 220 nm liegt, im Gegensatz zum UV-Maximum bei 200 nm von c(ArgLysTyrProTyr(β)Ala). Unter 220 nm ist die Fließmittelauswahl aufgrund der UV-Grenze sehr gering. Die UV-Grenze ist die Wellenlänge, bei der die Extinktion des reinen Lösungsmittels mit 1 cm Schichtdicke gegen Luft gemessen 1,0 ist (10 % Transmission). Lediglich die UV-Grenzen von Wasser, Acetonitril, n-Hexan und n-Pentan liegen unter 200

6 Chirale Selektoren

nm.¹⁸² Weiterhin war der Mechanismus für die Retention und Trennung von c(Ala-His) und c(ArgLysTyrProTyr(β)Ala) sowie achiraler Standardsubstanzen auf den neuen Stationärphasen APS-DNP-*D*- und -*L*-Ala unbekannt, weshalb verschiedene Fließmittelzusammensetzungen (RP, NP, polar-organisch) getestet wurden, um die bestmögliche Retention und Trennung zu erhalten. Für c(Ala-His) war ein Fließmittel der Zusammensetzung 50 mmol/L (NH₄Ac/HAc) pH 4,5 und 2 % ACN gut geeignet. Unter diesen Bedingungen wurden auch mögliche achirale Standardsubstanzen getestet (**Tabelle 6-4**). Als mögliche Standardsubstanzen mit dieser Fließmittelzusammensetzung können Uracil oder Anilin verwendet werden. m-Toluidin eluiert zur gleichen Zeit wie c(Ala-His) und Thioharnstoff mit dem Einspritzpeak.

In **Abbildung 6-4** wurden jeweils eine Mischung aus 1 mg/mL c(Ala-His) und 0,5 mg/mL Uracil in Wasser auf die Stationärphasen APS-DNP-*D*- und -*L*-Ala injiziert. Die Ergebnisse dieser Chromatogramme wurden mehrmals reproduziert. Es wurde jedoch beobachtet, dass Druckschwankungen signifikante Auswirkungen auf die Retentionszeiten und somit auf das Verhältnis Standard/Dipeptid hatten, womit letztendlich das RCEP berechnet wird. Ein konstanter Druck über mehrere Injektionen sollte also bei der Anwendung des RCEP gewährleistet sein. In den Chromatogrammen ist jeweils ein negativer Peak vor Uracil zu sehen, was auf den Einspritzpeak beziehungsweise das Lösungsmittel der Probe (Wasser) deutet. Jedoch hatte Thioharnstoff (in Wasser gelöst, gleiche HPLC-Bedingungen wie Uracil) eine geringere Retentionszeit als Uracil.

Tabelle 6-4: Test von möglichen achiralen Standardsubstanzen auf der Kapillarsäule: APS-DNP-*L*-Ala (20 cm x 100 μ m ID), Fließmittel: 50 mmol/L (NH₄Ac/HAc) pH 4,5 + 2 % ACN, Fluss vor Split: 0,75 mL/min, Detektor: 220 nm. c(Ala-His) eluiert unter diesen Bedingungen bei 11,3 min.

| Standardsubstanzen | Retentionszeit [min] |
|--------------------|----------------------|
| Thioharnstoff | 3,0 |
| Uracil | 3,9 |
| Anilin | 6,4 |
| m-Toluidin | 10,2 |

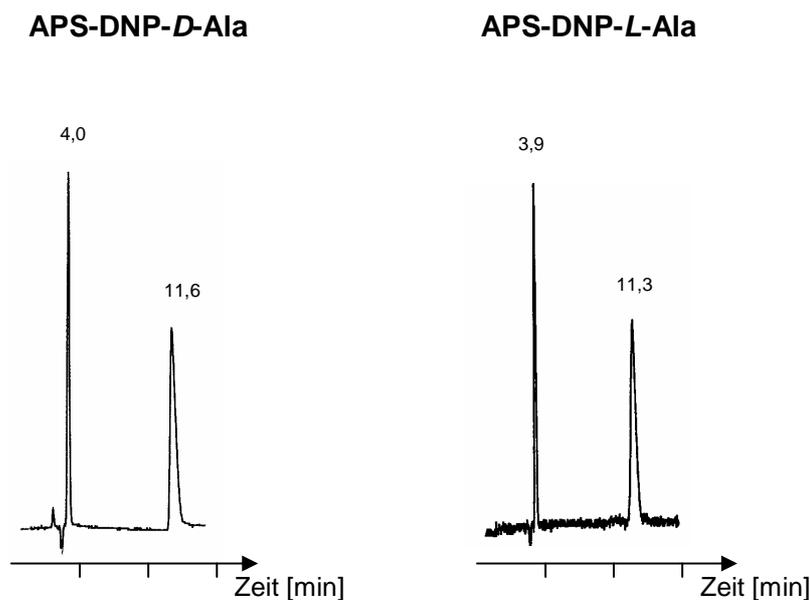


Abbildung 6-4: Vergleich der enantiomeren Stationärphasen APS-DNP-*D*- und -*L*-Alanin (Kapillarsäulen je 20 cm x 100 µm ID). Analyt: Mischung von c(Ala-His) 1 mg/mL und Uracil 0,5 mg/mL in Wasser, Fließmittel: 50 mmol/L (NH₄Ac/HAc) pH 4,5 + 2 % ACN, Fluss vor Split: 0,75 mL/min, Detektor: 220 nm. Bei 4,0 bzw. 3,0 min eluiert Uracil und bei 11,6 bzw. 11,3 min c(Ala-His).

Micro-HPLC/ESI-MS-Kopplung

Für das Cyclohexapeptid c(ArgLysTyrProTyr(β)Ala) wurde als Detektionsmethode die Massenspektrometrie herangezogen. Ziel war es, dazu ein konventionelles HPLC/ESI-MS-System für Kapillarsäulen umzubauen und zu optimieren (**Abbildung 6-5**).

Der Fluss (0,75 mL/min) einer konventionellen Pumpe wurde mit Hilfe eines T-Stücks vor dem Injektorblock gesplittet. Der Innendurchmesser (ID) der Splitkapillare betrug 50 µm, das injizierte Probenvolumen jeweils 0,1 µL. Über eine leere, unbehandelte Fused-Silica-Transferkapillare (ID 50 µm, Länge 30 cm) strömte das Fließmittel mit der Probe durch eine PEEK-Filter-Kopplung in die Säule (ID 150 µm, Länge 20 cm). Nach einer weiteren PEEK-Filter-Kopplung folgte eine zweite leere, unbehandelte Transferkapillare (ID 50 µm, Länge 40 cm) und schließlich die Schnittstelle des Massenspektrometers. Für die Optimierung des Systems wurden die Längen der Transferkapillaren variiert, was jedoch zu keiner wesentlichen Verbesserung der Resultate führte. Ebenso zeigte sich, dass der Einsatz einer

6 Chirale Selektoren

Mikro-Nebulizer-Nadel eher nachteilig war, da trotz Einbau von Edelstahlsieben zur Fluidfilterung Ablagerungen in der Nadel einen erhöhten Rückdruck verursachten. Im Weiteren wurde eine Nebulizer-Nadel mit einem Innendurchmesser von 134 μm verwendet.

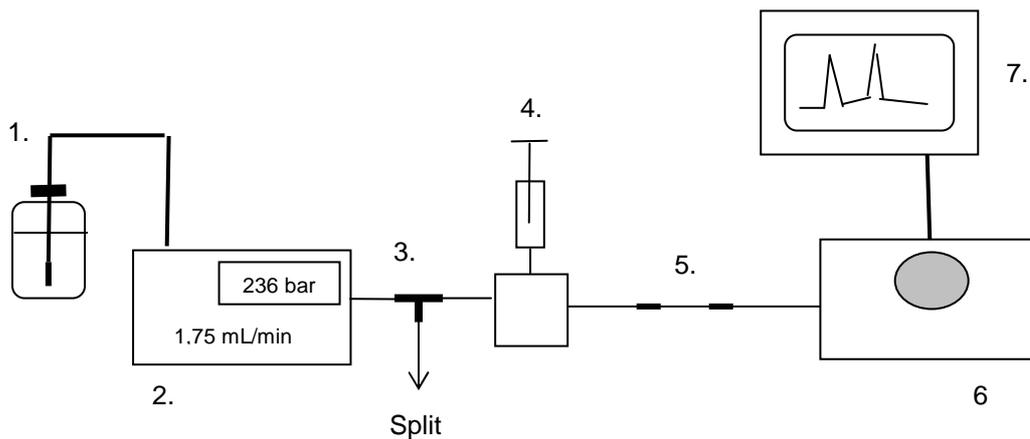


Abbildung 6-5: Schema der Micro-HPLC/ESI-MS-Kopplung.

1. Lösungsmittelvorrat, 2. Pumpe, 3. T-Stück zum Splitten des Flusses, 4. Probeninjektor, 5. Säule verbunden mit zwei Transferkapillaren (die Kupplungen enthalten Filter), 6. Massenspektrometer, 7. Datenerfassung und -verarbeitung.

Nach der Optimierung mit einer RP-Kapillarsäule und Coffein als Testsubstanz wurde das System mit dem von Chiari *et al.* favorisierten $c(\text{ArgLysTyrProTyr}(\beta)\text{Ala})$ weiter optimiert. Mit der Fließmittelzusammensetzung 50 mmol/L ($\text{NH}_4\text{Ac}/\text{HAc}$) pH 4,5 + 2 % ACN, bei welcher $c(\text{Ala-His})$ eine Retentionszeit von ungefähr 11,3 min hatte, eluierte $c(\text{ArgLysTyrProTyr}(\beta)\text{Ala})$ sofort mit dem Einspritzpeak. Als besser geeignet erwies sich ein weniger polares Fließmittel mit der Zusammensetzung 90 % (Aceton + 0,1 % TFA) und 10 % n-Hexan (**Abbildung 6-6**). Das Signal bei m/z 779,6 im ESI-MS-Spektrum entspricht dem $[\text{M}+\text{H}]^+$ von $c(\text{ArgLysTyrProTyr}(\beta)\text{Ala})$.

6 Chirale Selektoren

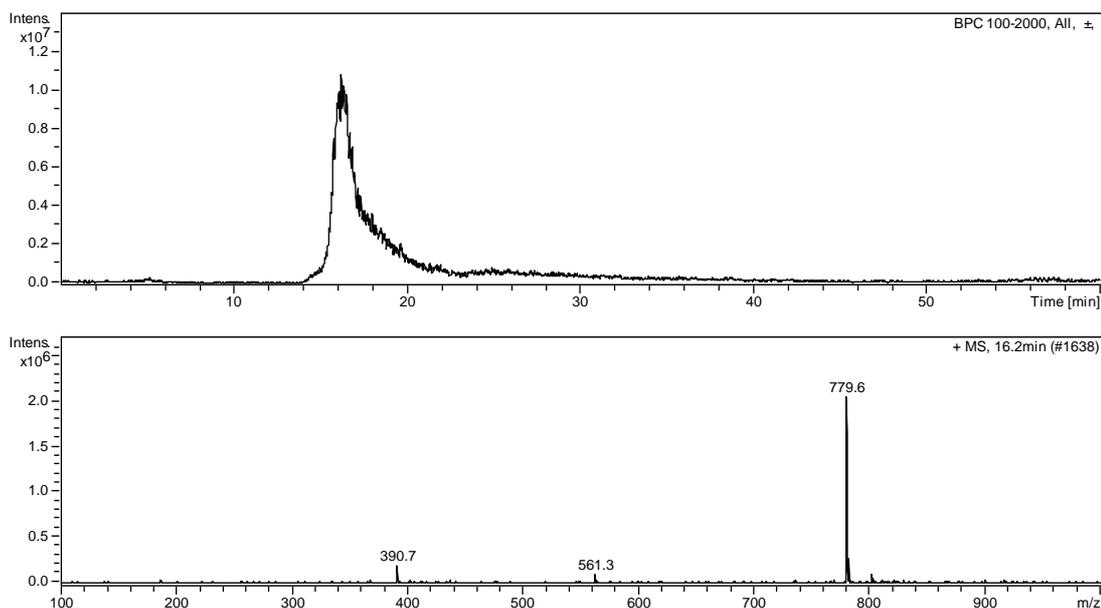


Abbildung 6-6: Massenfragmentogramm (oben) und ESI-MS-Spektrum (unten) von c(Lys-Tyr-Pro-Tyr-β-Ala-Arg) auf der stationären Phase APS-DNP-L-Alanin (Kapillarsäule 20 cm x 150 μm ID). Fließmittel: 90 % (Aceton + 0,1 % TFA) + 10 % n-Hexan.

Die Peakbreite der Probe c(ArgLysTyrProTyr(β)Ala) konnte jedoch mit diesem System bisher noch nicht weiter reduziert werden, die Anwendung des RCEP bei Cyclohexapeptid-Bibliotheken war somit bisher noch nicht möglich. Eventuell müssten die Längen der Transferkapillaren weiter verringert werden, um auf diese Weise Totvolumina, die die Trennung und Peakform beeinträchtigen, zu reduzieren.

Auch könnte ein zusätzliches end-capping der APS-DNP-D- und -L- Alanin-Stationärphasen an den nicht umgesetzten Aminopropylgruppen¹⁸³ und/oder den noch freien -Si-OH Gruppen^{182, 184} (vom Normalphasencharakter hin zur Umkehrphase) zur Peakverschmälerung führen, sowie eine Überprüfung der Packungsdichte der Kapillarsäulen.

7 ANHANG

7.1 MESSERGEBNISSE ZUR QUANTITATIVEN ENANTIOMERANALYTIK

Tabelle 7-1: *D*-Enantiomerenanteile aus den Einzelbestimmungen EF_i [%], Mittelwerte der *D*-Enantiomerenanteile EF [%] und absolute Standardabweichung σ [%] von *DL*-Lysin. Der Mittelwert wurde jeweils aus zehn Injektionen 1 – 10 mittels GC auf den Stationärphasen Chirasil-*D*-Val (Säule A), Chirasil-*L*-Val (Säule D) und Lipodex E (Säule G) als *N,N*-TFA/*O*-Et-Derivat bestimmt.

| Lauf | Chirasil- <i>D</i> -Val (A) | | | Chirasil- <i>L</i> -Val (D) | | | Lipodex E (G) | | |
|------|-----------------------------|-------|----------|-----------------------------|-------|----------|---------------|-------|----------|
| | EF_i | EF | σ | EF_i | EF | σ | EF_i | EF | σ |
| 1 | 49,93 | 49,90 | 0,08 | 49,88 | 49,90 | 0,02 | 49,66 | 49,66 | 0,07 |
| 2 | 49,94 | | | 49,90 | | | 49,60 | | |
| 3 | 49,88 | | | 49,88 | | | 49,67 | | |
| 4 | 49,70 | | | 49,90 | | | 49,62 | | |
| 5 | 49,88 | | | 49,88 | | | 49,64 | | |
| 6 | 49,86 | | | 49,91 | | | 49,61 | | |
| 7 | 49,97 | | | 49,93 | | | 49,76 | | |
| 8 | 49,98 | | | 49,91 | | | 49,72 | | |
| 9 | 49,95 | | | 49,88 | | | 49,54 | | |
| 10 | 49,89 | | | 49,93 | | | 49,79 | | |

Tabelle 7-2: *D*-Enantiomerenanteile aus den Einzelbestimmungen EF_i [%], Mittelwerte der *D*-Enantiomerenanteile EF [%] und absolute Standardabweichung σ [%] von *DL*-Asparaginsäure. Der Mittelwert wurde jeweils aus zehn Injektionen 1 – 10 mittels GC auf den Stationärphasen Chirasil-*D*-Val (Säule B), Chirasil-*L*-Val (Säule D) und Lipodex E (Säule G) als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat bestimmt.

| Lauf | Chirasil- <i>D</i> -Val (B) | | | Chirasil- <i>L</i> -Val (D) | | | Lipodex E (G) | | |
|------|-----------------------------|-------|----------|-----------------------------|-------|----------|---------------|-------|----------|
| | EF_i | EF | σ | EF_i | EF | σ | EF_i | EF | σ |
| 1 | 50,00 | 50,03 | 0,03 | 49,93 | 49,95 | 0,05 | 49,97 | 49,98 | 0,04 |
| 2 | 50,11 | | | 49,94 | | | 49,95 | | |
| 3 | 50,06 | | | 49,88 | | | 49,90 | | |
| 4 | 50,01 | | | 50,09 | | | 49,99 | | |
| 5 | 50,03 | | | 49,92 | | | 50,03 | | |
| 6 | 50,02 | | | 49,97 | | | 49,96 | | |
| 7 | 50,02 | | | 49,96 | | | 49,99 | | |
| 8 | 50,01 | | | 49,92 | | | 49,99 | | |
| 9 | 50,02 | | | 49,95 | | | 49,98 | | |
| 10 | 50,02 | | | 49,94 | | | 50,01 | | |

7 Anhang

Tabelle 7-3: D-Enantiomerenanteile aus den Einzelbestimmungen EF_i [%], Mittelwerte der D-Enantiomerenanteile EF [%] und absolute Standardabweichung σ [%] von DL-Tyr(FI0), DL-Tyr(FI1) und DL-Tyr(FI4). Der Mittelwert wurde jeweils aus bis zu drei verschiedenen Derivatisierungsansätzen DA (a) – (c) mittels GC auf den Stationärphasen Chirasil-D-Val (Säule A und B) und Chirasil-L-Val (Säule D) als N,O-TFA/O-Et-Derivat bestimmt.

| | Chirasil-D-Val (A/B) | | | | | Chirasil-L-Val (D) | | | | |
|--------------------|----------------------|------|--------|-------|----------|--------------------|-------|--------|-------|----------|
| | DA | Lauf | EF_i | EF | σ | DA | Lauf | EF_i | EF | σ |
| DL-Tyr(FI0) | a | 1 | 49,56 | 49,50 | 0,05 | a | 1 | 49,64 | 49,56 | 0,05 |
| | | 2 | 49,50 | | | | 2 | 49,57 | | |
| | | 3 | 49,50 | | | | 3 | 49,55 | | |
| | | 4 | 49,52 | | | | 4 | 49,56 | | |
| | | 5 | 49,44 | | | | 5 | 49,53 | | |
| | | 6 | 49,45 | | | | 6 | 49,53 | | |
| | | | | | | | 7 | 49,62 | | |
| | | | | | | | 8 | 49,56 | | |
| | | | | | | | 9 | 49,44 | | |
| | | | | | | | 10 | 49,51 | | |
| | | | | | | | 11 | 49,60 | | |
| | | | | | | | 12 | 49,56 | | |
| DL-Tyr(FI1) | a | 1 | 49,81 | 49,74 | 0,03 | a | 1 | 49,93 | 49,86 | 0,07 |
| | | 2 | 49,74 | | | | 2 | 49,93 | | |
| | | 3 | 49,74 | | | | 3 | 49,95 | | |
| | | 4 | 49,73 | | | | 4 | 49,93 | | |
| | | 5 | 49,81 | | | | 5 | 49,93 | | |
| | b | 1 | 49,79 | | | 1 | 49,83 | | | |
| | | 2 | 49,74 | | | 2 | 49,87 | | | |
| | | 3 | 49,70 | | | 3 | 49,90 | | | |
| | | 4 | 49,72 | | | 4 | 49,85 | | | |
| | | 5 | 49,74 | | | 5 | 49,88 | | | |
| | c | 1 | 49,66 | | | 1 | 49,71 | | | |
| | | 2 | 49,71 | | | 2 | 49,84 | | | |
| | | 3 | 49,75 | | | 3 | 49,78 | | | |
| | | 4 | 49,73 | | | 4 | 49,81 | | | |
| | | 5 | 49,73 | | | 5 | 49,82 | | | |
| DL-Tyr(FI4) | a | 1 | 49,85 | 49,83 | 0,05 | a | 1 | 49,97 | 49,91 | 0,05 |
| | | 2 | 49,78 | | | | 2 | 49,94 | | |
| | | 3 | 49,88 | | | | 3 | 49,93 | | |
| | | 4 | 49,88 | | | | 4 | 49,92 | | |
| | | 5 | 49,79 | | | | 5 | 49,85 | | |
| | | 6 | 49,79 | | | | 6 | 49,93 | | |
| | b | 1 | 49,83 | 49,77 | 0,08 | | 7 | 49,89 | | |
| | | 2 | 49,78 | | | | 8 | 49,95 | | |
| | | 3 | 49,69 | | | | 9 | 49,80 | | |
| | | 4 | 49,69 | | | | 10 | 49,90 | | |
| | | 5 | 49,72 | | | | 11 | 49,89 | | |
| | | 6 | 49,89 | | | | 12 | 49,90 | | |
| | | 7 | 49,92 | | | | | | | |
| | | 8 | 49,70 | | | | | | | |
| | | 9 | 49,72 | | | | | | | |
| | | 10 | 49,75 | | | | | | | |

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

7 Anhang

Fortsetzung der Tabelle 7-3

| | Chirasil- <i>D</i> -Val (A/B) | | | | | Chirasil- <i>L</i> -Val (D) | | | | |
|---------------------------|-------------------------------|------|--------|------|----------|-----------------------------|------|--------|---------|----------|
| | DA | Lauf | EF_i | EF | σ | DA | Lauf | EF_i | EF | σ |
| <i>DL</i>-Tyr(FI4) | | | | | | b | 1 | 49,84 | } 49,92 | 0,05 |
| | | | | | | | 2 | 49,94 | | |
| | | | | | | | 3 | 49,95 | | |
| | | | | | | | 4 | 49,82 | | |
| | | | | | | | 5 | 49,96 | | |
| | | | | | | | 6 | 49,91 | | |
| | | | | | | | 7 | 49,98 | | |
| | | | | | | | 8 | 49,94 | | |
| | | | | | | | 9 | 49,90 | | |
| | | | | | | | 10 | 49,99 | | |
| | | | | | | c | 1 | 49,73 | } 49,76 | 0,05 |
| | | | | | | | 2 | 49,73 | | |
| | | | | | | | 3 | 49,71 | | |
| | | | | | | | 4 | 49,84 | | |
| | | | | | | | 5 | 49,82 | | |
| | | | | | | | 6 | 49,78 | | |
| | | | | | | | 7 | 49,79 | | |
| | | | | | | | 8 | 49,73 | | |
| | | | | | | | 9 | 49,72 | | |
| | | | | | | | 10 | 49,74 | | |

Die Einzelbestimmungen EF_i , Mittelwerte der *D*-Enantiomerenanteile EF und Standardabweichung σ von *DL*-Tyrosin (synth.) und *DL*-Ornithin siehe Tabelle 4 und Tabelle 7 in Literatur¹³¹.

Tabelle 7-4: *D*- bzw. *L*-Enantiomerenanteile aus den Einzelbestimmungen D_i [%] bzw. L_i [%], Mittelwerte der *D*- bzw. *L*-Anteile und absolute Standardabweichung σ [%] von *D*-Tyr(FI0) und *L*-Tyr(FI0). Der Mittelwert wurde jeweils aus vier Injektionen 1 – 4 (bzw. fünf Injektionen 1 - 5) mittels GC auf den Stationärphasen Chirasil-*D*-Val (Säule A) und Chirasil-*L*-Val (Säule C) als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat bestimmt.

| | Lauf | <i>D</i>-Tyr(FI0) | | | | <i>L</i>-Tyr(FI0) | | | |
|----------------------------------|------|--------------------------|---------|----------|---------------------|--------------------------|---------|----------|---------------------|
| | | D_i [%] | D [%] | σ | $\sigma_{rel.}$ [%] | L_i [%] | L [%] | σ | $\sigma_{rel.}$ [%] |
| Chirasil-<i>D</i>-Val (A) | 1 | 99,92 | } 99,93 | 0,01 | 6,40 | 99,93 | } 99,92 | 0,02 | 20,40 |
| | 2 | 99,93 | | | | 99,92 | | | |
| | 3 | 99,93 | | | | 99,92 | | | |
| | 4 | 99,92 | | | | 99,93 | | | |
| | 5 | | | | | 99,89 | | | |
| Chirasil-<i>L</i>-Val (C) | 1 | 99,95 | } 99,97 | 0,02 | 68,44 | 99,85 | } 99,87 | 0,02 | 12,73 |
| | 2 | 100,0 | | | | 99,87 | | | |
| | 3 | 99,95 | | | | 99,89 | | | |
| | 4 | 99,96 | | | | 99,88 | | | |

7.2 MESSERGEBNISSE ZUR KRISTALLISATION VON TYROSIN

Bestimmung des Kristallisationsverlaufs mittels enantiomer labelling

Nachfolgend sind die Tabellen mit den Messergebnissen und die Berechnungen der Probenkonzentrationen durch enantiomer labelling angegeben. Folgende Begriffe und Formeln wurden zur Berechnung in den Tabellen verwendet:

- Probenname:** Name der Tyrosinprobe und Kristallisationsbedingungen
- Einwaage Probe:** Genaue Tyrosin-Probeneinwaage, die für die Kristallisation verwendet wurde.
- Gelöst in:** Die Wassermenge [μL], in der die Kristallisation durchgeführt wurde (die Konzentration der Tyrosin-Lösung betrug 10 mmol/L).
- Davon:** Die überstehende Kristallisationslösung wurde von den Kristallen abgetrennt, davon wurden 50 μL entnommen.
- Standardzugabe:** 50 μL der überstehenden Kristallisationslösungen wurden nach Zugabe von 50 μL des entsprechenden Standards derivatisiert und mittels GC bestimmt.
- Konzentration Probe:** Konzentration der angesetzten 10 mmol/L Tyrosin-Lösung zur Kristallisation, berechnet aus der „Einwaage Probe“ und „Gelöst in“.
- Zeit:** Zu dieser Zeit, nach Ansetzen der Kristallisation, wurde eine Probe aus der überstehenden Kristallisationslösung entnommen.
- Messungen:** 1, 2... Injektionen nach einer Derivatisierung; bei mehreren Derivatisierungen ist bei der jeweiligen Zeit ein Strich durchgezogen und die Nummerierung beginnt wieder bei 1.
- Mol.Gew.:** Molekulargewicht von Tyrosin in g/mol.
- Std. [mg/L]:** Konzentration des zugesetzten Standards in mg/L.

7 Anhang

C_L: Bei *D*-Tyrosin und *DL*-Tyrosin-Proben ist hier das Enantiomerenverhältnis des zugegebenen *L*-Standards angegeben (Signalfläche *D* / Signalfläche *L*), aus einer separaten Messung des Enantiomerenverhältnisses des Standards.

C_D: Bei *L*-Tyrosin-Proben ist hier das Enantiomerenverhältnis des zugegebenen *D*-Standards angegeben (Signalfläche *L* / Signalfläche *D*), aus einer separaten Messung des Enantiomerenverhältnisses des Standards.

L ungespikt: Das Enantiomerenverhältnis der Probe wurde zur Zeit 0 Stunden (ohne Standard) bestimmt. Die Signalfläche für das *L*-Enantiomer ist hier angegeben.

D ungespikt: Die Signalfläche für das *D*-Enantiomer ist hier angegeben.

L gespikt: Die Signalfläche für das *L*-Enantiomer nach Standardzugabe ist hier angegeben.

D gespikt: Die Signalfläche für das *D*-Enantiomer nach Standardzugabe ist hier angegeben.

C_D: Für *D*-Tyrosin und *DL*-Tyrosin ist hier das Enantiomerenverhältnis der Probe angegeben (*L* ungespikt / *D* ungespikt).

C_L: Für *L*-Tyrosin ist hier das Enantiomerenverhältnis der Probe angegeben (*D* ungespikt / *L* ungespikt).

% *L*-Enant.: prozentualer *L*-Anteil in *D*- oder *DL*-Tyrosin-Proben.

% *D*-Enant.: prozentualer *D*-Anteil in *L*-Tyrosin-Proben.

X_a [mg]: Berechnung der Konzentration in der jeweiligen Tyrosin-Probe nach der Formel von Frank *et al.*¹²⁸

Für D-Tyrosin und DL-Tyrosin:

$$X_{a_D} [mg] = Std.[mg/L] \cdot L - Standardzugabe \cdot \frac{(D_{gespikt} - L_{gespikt} \cdot C_{-L})(1 + C_{-D})}{1000000 \cdot (L_{gespikt} - D_{gespikt} \cdot C_{-D})(1 + C_{-L})}$$

Für L-Tyrosin:

$$X_{a_L} [mg] = Std.[mg/L] \cdot D - Standardzugabe \cdot \frac{(L_{gespikt} - D_{gespikt} \cdot C_{-D})(1 + C_{-L})}{1000000 \cdot (D_{gespikt} - L_{gespikt} \cdot C_{-L})(1 + C_{-D})}$$

mg/mL: $mg / mL = \frac{1000 \cdot X_{a}[mg]}{\text{Davon } 50\mu L}$

mmol/L: $mmol / L = \frac{mg / L}{1000 \cdot Mol.Gew.}$

7 Anhang

Tabelle 7-5: Bestimmung des Kristallisationsverlaufs von *D*-Tyr(F10) als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat auf Chirasil-*L*-Val (Säule C). Berechnung

Probenname ***D*-Tyr(F10), Kristallisation bei 20 ± 1 °C in demin. Wasser**
 Einwaage Probe 90,59 mg
 Gelöst in 50000 µL
 Davon 50 µL
 L-Standardzugabe 50 µL *L*-Tyr I, *L*-Tyr II ab 43 h
 Konzentration Probe 1,8098 mg/mL

| Zeit | Messungen | Mol.Gew. | Std. [mg/L] | C_L | L ungespikt | D ungespikt | L gespikt | D gespikt |
|-------|-----------|----------|-------------|--------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0h | 1 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 279700 | 278097 |
| | 2 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 321428 | 321696 |
| | 3 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 179764 | 179231 |
| | 4 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 163155 | 162241 |
| 3 h | 1 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 475012 | 172406 |
| | 2 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 582606 | 212811 |
| | 3 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 408890 | 149132 |
| 6 h | 1 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 425306 | 122540 |
| | 2 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 439475 | 126992 |
| | 3 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 432479 | 124365 |
| 19 h | 1 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 2233395 | 579037 |
| | 2 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 387118 | 100433 |
| | 3 | 181,20 | 1828,57 | 0,0023 | 836 | 859499 | 346820 | 89470 |
| 43 h | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 382452 | 98303 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 456615 | 118317 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 314455 | 81433 |
| 67 h | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 418539 | 109196 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 387299 | 100885 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 628406 | 163621 |
| 139 h | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 456121 | 114508 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 445605 | 111528 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 425214 | 106802 |
| | 4 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 462495 | 116355 |
| 211 h | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 200354 | 53939 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 168678 | 45196 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 245350 | 64733 |
| | 4 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 235497 | 62738 |
| 380 h | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 191673 | 54004 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 161681 | 44662 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 230970 | 62663 |
| | 4 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 166816 | 45182 |
| | 5 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 244476 | 66669 |
| 548 h | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 271989 | 78461 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 248614 | 71676 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 237237 | 67869 |
| | 4 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 207000 | 59936 |
| | 5 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 220602 | 62942 |
| 692 h | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 552692 | 149511 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 333043 | 90351 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 471536 | 128027 |
| | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 383551 | 104660 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 433088 | 118854 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 466431 | 129055 |
| | 4 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 331374 | 90803 |
| | 1 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 355907 | 97899 |
| | 2 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 292941 | 80091 |
| | 3 | 181,20 | 1785,71 | 0,0010 | 836 | 859499 | 273248 | 75402 |

7 Anhang

**bei 20 ± 1 °C durch enantiomer labelling mit GC
der verbleibenden Tyrosin-Konzentration in der Lösung.**

| C D | % L-Enant. | X_a [mg] | mg/mL | # mg/mL | mmol/L | # mmol/L | σ |
|------------|-------------------|---------------------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|----------|
| 0,00097 | 0,10% | 0,09067 | 1,81 | 1,82 | 10,01 | 10,03 | 0,031 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,09127 | 1,83 | | 10,07 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,09092 | 1,82 | | 10,04 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,09068 | 1,81 | | 10,01 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,03295 | 0,66 | 0,66 | 3,64 | 3,65 | 0,012 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,03316 | 0,66 | | 3,66 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,03311 | 0,66 | | 3,65 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02611 | 0,52 | 0,52 | 2,88 | 2,88 | 0,007 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02619 | 0,52 | | 2,89 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02606 | 0,52 | | 2,88 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02347 | 0,47 | 0,47 | 2,59 | 2,59 | 0,008 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02349 | 0,47 | | 2,59 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02335 | 0,47 | | 2,58 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02287 | 0,46 | 0,46 | 2,52 | 2,54 | 0,011 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02306 | 0,46 | | 2,54 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02304 | 0,46 | | 2,54 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02321 | 0,46 | 0,46 | 2,56 | 2,56 | 0,003 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02318 | 0,46 | | 2,56 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02317 | 0,46 | | 2,56 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02233 | 0,45 | 0,45 | 2,47 | 2,46 | 0,005 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02227 | 0,45 | | 2,46 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02235 | 0,45 | | 2,47 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02238 | 0,45 | | 2,47 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02396 | 0,48 | 0,47 | 2,64 | 2,62 | 0,023 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02384 | 0,48 | | 2,63 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02348 | 0,47 | | 2,59 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02371 | 0,47 | | 2,62 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02508 | 0,50 | 0,49 | 2,77 | 2,70 | 0,045 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02458 | 0,49 | | 2,71 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02414 | 0,48 | | 2,66 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02410 | 0,48 | | 2,66 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02427 | 0,49 | | 2,68 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02568 | 0,51 | 0,51 | 2,83 | 2,83 | 0,017 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02566 | 0,51 | | 2,83 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02546 | 0,51 | | 2,81 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02577 | 0,52 | | 2,84 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02540 | 0,51 | | 2,80 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02407 | 0,48 | 0,49 | 2,66 | 2,69 | 0,020 |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02414 | 0,48 | | 2,66 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02416 | 0,48 | | 2,67 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02428 | 0,49 | | 2,68 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02442 | 0,49 | | 2,70 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02463 | 0,49 | | 2,72 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02439 | 0,49 | | 2,69 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02448 | 0,49 | | 2,70 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02433 | 0,49 | | 2,69 | | |
| 0,00097 | 0,10% | 0,02456 | 0,49 | | 2,71 | | |

7 Anhang

Tabelle 7-6: Bestimmung des Kristallisationsverlaufs von L-Tyr(Si0) als N,O-TFA/O-Et-Derivat auf Chirasil-L-Val (Säule C). Berechnung

Probenname **L-Tyr(Si0), Kristallisation bei 20 ± 1 °C in demin. Wasser**
 Einwaage Probe 90,59 mg
 Gelöst in 50000 µL
 Davon 50 µL
 D-Standardzugabe 50 µL D-Tyr II
 Konzentration Probe 1,8098 mg/mL

| Zeit | Messung | Mol.Gew. | Std. [mg/L] | C_D | D ungespikt | L ungespikt | D gespikt | L gespikt |
|-------|---------|----------|-------------|--------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 147511 | 139036 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 196100 | 184628 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 193212 | 182496 |
| 3 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 184210 | 180956 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 192746 | 189770 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 227503 | 223764 |
| 6 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 199911 | 194610 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 230748 | 224909 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 289971 | 280926 |
| | 4 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 263381 | 256732 |
| 22 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 230014 | 158873 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 304476 | 208664 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 291979 | 199384 |
| | 4 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 271921 | 186619 |
| 47 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 399591 | 168144 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 287421 | 121819 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 316535 | 134888 |
| | 4 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 262564 | 111453 |
| | 5 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 305049 | 129001 |
| 75 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 284398 | 108663 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 299739 | 114860 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 283981 | 107958 |
| | 4 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 306214 | 116838 |
| 95 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 330965 | 122824 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 267151 | 96928 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 320260 | 116373 |
| | 4 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 283554 | 102976 |
| 170 h | 1 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 328093 | 109743 |
| | 2 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 263271 | 88085 |
| | 3 | 181,20 | 1794,29 | 0,0127 | 652 | 502117 | 338348 | 112252 |

7 Anhang

**bei 20 ± 1 °C durch enantiomer labelling mit GC
der verbleibenden Tyrosin-Konzentration in der Lösung.**

| C_L | % D-Enant. | X_a [mg] | mg/mL | # mg/mL | mmol/L | # mmol/L | σ |
|------------|-------------------|-----------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|----------------------------|
| 0,00130 | 0,13% | 0,08259 | 1,65 | 1,65 | 9,12 | 9,12 | 0,015 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08250 | 1,65 | | 9,11 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08277 | 1,66 | | 9,14 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08613 | 1,72 | 1,72 | 9,51 | 9,52 | 0,011 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08633 | 1,73 | | 9,53 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08624 | 1,72 | | 9,52 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08534 | 1,71 | 1,71 | 9,42 | 9,41 | 0,028 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08545 | 1,71 | | 9,43 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08492 | 1,70 | | 9,37 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,08545 | 1,71 | | 9,43 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,06020 | 1,20 | 1,20 | 6,64 | 6,60 | 0,032 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,05972 | 1,19 | | 6,59 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,05951 | 1,19 | | 6,57 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,05981 | 1,20 | | 6,60 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03622 | 0,72 | 0,73 | 4,00 | 4,03 | 0,019 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03649 | 0,73 | | 4,03 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03670 | 0,73 | | 4,05 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03655 | 0,73 | | 4,03 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03641 | 0,73 | | 4,02 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03279 | 0,66 | 0,66 | 3,62 | 3,62 | 0,012 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03289 | 0,66 | | 3,63 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03262 | 0,65 | | 3,60 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03274 | 0,65 | | 3,61 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03181 | 0,64 | 0,63 | 3,51 | 3,45 | 0,039 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03108 | 0,62 | | 3,43 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03113 | 0,62 | | 3,44 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,03111 | 0,62 | | 3,43 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,02856 | 0,57 | 0,57 | 3,15 | 3,14 | 0,016 |
| 0,00130 | 0,13% | 0,02857 | 0,57 | | 3,15 | | |
| 0,00130 | 0,13% | 0,02832 | 0,57 | | 3,13 | | |

7 Anhang

Tabelle 7-7: Bestimmung des Kristallisationsverlaufs von L-Tyr(F10) als N,O-TFA/O-Et-Derivat auf Chirasil-L-Val (Säule C). Berechnung

Probenname **L-Tyr(F10), Kristallisation bei 20 ± 1 °C in HPLC grade Wasser**
 Einwaage Probe 90,59 mg
 Gelöst in 50000 µL
 Davon 50 µL
 D-Standardzugabe 50 µL D-Tyr III
 Konzentration Probe 1,8098 mg/mL

| Zeit | Messungen | Mol.Gew. | Std. [mg/L] | C_D | D ungespikt | L ungespikt | D gespikt | L gespikt |
|-------|-----------|----------|-------------|--------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 292800 | 285618 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 289368 | 283019 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 278513 | 271757 |
| | 4 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 310046 | 301733 |
| 3 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 265059 | 167322 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 292745 | 184205 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 328075 | 204831 |
| | 4 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 342767 | 213924 |
| 6 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 420579 | 198698 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 367892 | 172460 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 380443 | 175992 |
| | 4 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 363718 | 168278 |
| 22 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 239735 | 81923 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 267575 | 88965 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 279646 | 93386 |
| | 4 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 266939 | 89087 |
| 46 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 373134 | 111195 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 272506 | 82061 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 260664 | 78116 |
| 72 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 307592 | 90748 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 286123 | 84577 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 287844 | 85135 |
| | 4 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 300732 | 88528 |
| 94 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 315742 | 98713 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 300257 | 93311 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 266839 | 82871 |
| | 4 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 336799 | 105312 |
| | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 414775 | 129008 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 389794 | 121845 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 395411 | 122994 |
| 167 h | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 384924 | 117770 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 383912 | 118385 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 349507 | 106790 |
| | 1 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 350249 | 108615 |
| | 2 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 367066 | 112275 |
| | 3 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 381119 | 116733 |
| | 4 | 181,20 | 1797,14 | 0,0003 | 911 | 709405 | 362417 | 111646 |

7 Anhang

**bei 20 ± 1 °C durch enantiomer labelling mit GC
der verbleibenden Tyrosin-Konzentration in der Lösung.**

| C_L | % D-Enant. | X_a [mg] | mg/mL | # mg/mL | mmol/L | # mmol/L | σ |
|------------|-------------------|-----------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|----------------------------|
| 0,00128 | 0,13% | 0,08783 | 1,76 | 1,76 | 9,69 | 9,70 | 0,020 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,08806 | 1,76 | | 9,72 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,08785 | 1,76 | | 9,70 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,08762 | 1,75 | | 9,67 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,05680 | 1,14 | 1,13 | 6,27 | 6,23 | 0,036 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,05662 | 1,13 | | 6,25 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,05618 | 1,12 | | 6,20 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,05616 | 1,12 | | 6,20 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,04250 | 0,85 | 0,84 | 4,69 | 4,63 | 0,048 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,04217 | 0,84 | | 4,65 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,04161 | 0,83 | | 4,59 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,04161 | 0,83 | | 4,59 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,03073 | 0,61 | 0,60 | 3,39 | 3,33 | 0,042 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02989 | 0,60 | | 3,30 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,03002 | 0,60 | | 3,31 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,03001 | 0,60 | | 3,31 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02679 | 0,54 | 0,54 | 2,96 | 2,97 | 0,016 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02707 | 0,54 | | 2,99 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02694 | 0,54 | | 2,97 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02652 | 0,53 | 0,53 | 2,93 | 2,93 | 0,006 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02657 | 0,53 | | 2,93 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02659 | 0,53 | | 2,93 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02646 | 0,53 | | 2,92 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02811 | 0,56 | 0,56 | 3,10 | 3,09 | 0,010 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02794 | 0,56 | | 3,08 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02792 | 0,56 | | 3,08 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02811 | 0,56 | | 3,10 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02796 | 0,56 | | 3,09 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02810 | 0,56 | | 3,10 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02796 | 0,56 | | 3,09 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02751 | 0,55 | 0,55 | 3,04 | 3,05 | 0,017 |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02772 | 0,55 | | 3,06 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02747 | 0,55 | | 3,03 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02788 | 0,56 | | 3,08 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02750 | 0,55 | | 3,04 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02754 | 0,55 | | 3,04 | | |
| 0,00128 | 0,13% | 0,02769 | 0,55 | | 3,06 | | |

7 Anhang

Tabelle 7-8: Bestimmung des Kristallisationsverlaufs von DL-Tyr(FI0) als N,O-TFA/O-Et-Derivat auf Chirasil-L-Val (Säule C). Berechnung

Probenname **DL-Tyr(FI0), Kristallisation bei 20 ± 1 °C in HPLC grade Wasser**
 Einwaage Probe 90,59 mg
 Gelöst in 50000 µL
 Davon 50 µL
 L-Standardzugabe 50 µL L-Tyr III
 Konzentration Probe 1,8098 mg/mL

| Zeit | Messungen | Mol.Gew. | Std. [mg/L] | C_L | L ungespikt | D ungespikt | L gespikt | D gespikt |
|-------|-----------|----------|-------------|--------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| 0 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 399561 | 128427 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 421069 | 134762 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 372042 | 118755 |
| | 4 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 461258 | 148621 |
| 3 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 549698 | 173276 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 452319 | 142459 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 340693 | 106928 |
| | 4 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 452729 | 143157 |
| | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 516709 | 162434 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 557905 | 174294 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 627328 | 196067 |
| | 4 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 594458 | 187193 |
| 6 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 347054 | 86417 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 362107 | 89651 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 314829 | 78445 |
| | 4 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 341805 | 85099 |
| 22 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 253325 | 37460 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 288288 | 42344 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 314885 | 46645 |
| 46 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 290152 | 36454 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 314196 | 39252 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 268894 | 33299 |
| | 4 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 439847 | 54168 |
| | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 430163 | 54661 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 440184 | 55744 |
| 72 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 514973 | 65207 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 333802 | 40379 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 263972 | 31592 |
| 94 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 337279 | 40328 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 470061 | 55981 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 427998 | 50984 |
| | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 559543 | 65895 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 159455 | 17123 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 264886 | 28404 |
| 167 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 270314 | 28866 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 265016 | 21338 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 244526 | 21439 |
| | 4 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 178124 | 16154 |
| | 5 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 440160 | 43592 |
| 719 h | 1 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 424914 | 42587 |
| | 2 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 522440 | 49411 |
| | 3 | 181,20 | 1820,00 | 0,0013 | 257313 | 252804 | 485306 | 45250 |
| | | | | | | 578378 | 54131 | |

7 Anhang

**bei 20 ± 1 °C durch enantiomer labelling mit GC
der verbleibenden Tyrosin-Konzentration in der Lösung.**

| C_D | % L-Enant. | X_a [mg] | mg/mL | # mg/mL | mmol/L | # mmol/L | σ |
|------------|-------------------|-----------------|--------------|----------------|---------------|-----------------|----------------------------|
| 1,01784 | 50,44% | 0,08726 | 1,75 | 1,74 | 9,63 | 9,60 | 0,060 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08671 | 1,73 | | 9,57 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08636 | 1,73 | | 9,53 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08758 | 1,75 | | 9,67 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08477 | 1,70 | 1,69 | 9,36 | 9,32 | 0,058 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08467 | 1,69 | | 9,35 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08423 | 1,68 | | 9,30 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08517 | 1,70 | | 9,40 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08443 | 1,69 | | 9,32 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08366 | 1,67 | | 9,23 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08372 | 1,67 | | 9,24 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,08465 | 1,69 | | 9,34 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,06085 | 1,22 | 1,21 | 6,72 | 6,71 | 0,027 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,06039 | 1,21 | | 6,67 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,06091 | 1,22 | | 6,72 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,06084 | 1,22 | | 6,72 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,03165 | 0,63 | 0,63 | 3,49 | 3,49 | 0,018 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,03140 | 0,63 | | 3,47 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,03172 | 0,63 | | 3,50 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02615 | 0,52 | 0,52 | 2,89 | 2,88 | 0,040 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02598 | 0,52 | | 2,87 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02572 | 0,51 | | 2,84 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02556 | 0,51 | | 2,82 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02650 | 0,53 | | 2,92 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02639 | 0,53 | | 2,91 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02639 | 0,53 | | 2,91 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02503 | 0,50 | 0,49 | 2,76 | 2,72 | 0,027 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02473 | 0,49 | | 2,73 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02470 | 0,49 | | 2,73 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02459 | 0,49 | | 2,71 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02459 | 0,49 | | 2,71 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02427 | 0,49 | | 2,68 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02185 | 0,44 | 0,44 | 2,41 | 2,41 | 0,008 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02181 | 0,44 | | 2,41 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02171 | 0,43 | | 2,40 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,01583 | 0,32 | 0,37 | 1,75 | 2,02 | 0,201 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,01740 | 0,35 | | 1,92 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,01807 | 0,36 | | 1,99 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,01994 | 0,40 | | 2,20 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,02021 | 0,40 | | 2,23 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,01893 | 0,38 | 0,38 | 2,09 | 2,07 | 0,017 |
| 1,01784 | 50,44% | 0,01863 | 0,37 | | 2,06 | | |
| 1,01784 | 50,44% | 0,01871 | 0,37 | | 2,07 | | |

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

Chemikalien

Die verwendeten Tyrosin- und Alanin-Proben sind in **Tabelle 4-1** aufgeführt.

Bachem (Bubendorf, Schweiz): Cyclo(Ala-His)

Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland): Deuteriumchlorid

Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland): HPLC-gradientenreines Aceton, HPLC-gradientenreines Wasser

Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz): Acetylchlorid (puriss. p.a.; > 99 %, argentometrisch titriert), 3-Aminopropyl-trimethoxysilan, Anilin, Dichlormethan (puriss.; absolut; über Molekularsieb, H₂O ≤ 0.005 %), 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol (DFDNB), *DL*-Lysin, *DL*-Ornithin, *m*-Toluidin, Toluol (puriss.; absolut; über Molekularsieb, H₂O < 0.005 %), Uracil

Macherey-Nagel (Düren, Deutschland): Nucleosil-300 (Partikelgröße 5 µm, Porengröße 300 Å)

Merk (Darmstadt, Deutschland): HPLC-gradientenreines Acetonitril, Deuteriumoxid, Salzsäure 32 % p.a.

Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz): Fmoc-*D*-Glu-(OtBu)-OH (Lot A33100), Fmoc-*L*-Glu-(OtBu)-OH (Lot A33829) und Fmoc-*D*-Lys-(BOC)-OH (Lot A33341) und Fmoc-*L*-Lys-(BOC)-OH (Lot A34616)

8 Experimenteller Teil

Riedel-de-Haën (Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Taufkirchen, Deutschland): Ethanol absolut (puriss. p.a.)

Sigma-Aldrich Laborchemikalien (Taufkirchen, Deutschland): Aminosäurestandardlösung in 0,1 N HCl, *DL*-Asparaginsäure, Coffein (99 %), *DL*-Cystein, Poly-*DL*-Alanin (Molmasse 1000 – 5000 g/mol), Poly-*L*-Glutaminsäure Natriumsalz (Molmasse 750 – 500 g/mol), Poly-*DL*-Lysin Hydrobromid (Molmasse 1000 – 4000 g/mol), Poly-*L*-Lysin Hydrobromid (Molmasse 500 – 2000 g/mol), *DL*-Prolin, *DL*-Serin, Thioharnstoff (99 %), Toluol (wasserfrei, 99,8 %), Trifluoressigsäure (approx. 99 %), Trifluoressigsäureanhydrid (approx. 99 %)

Schuchardt (München, Deutschland): *DL*-Leucin

Ohne Herstellerangabe (aus Institutsbeständen): *DL*-Phenylalanin, R(-)-1,1'-Binaphthyl-2,2'-diylhydrogenphosphat (R(-)-BNP), S-(+)-1,1'-Binaphthyl-2,2'-diylhydrogenphosphat (S-(+)-BNP), Trögersche Base

Nicht aufgeführte Chemikalien stammen aus der Chemikalienausgabe des Chemischen Instituts der Universität Tübingen.

Tabelle 8-1: Summenformeln, Molmassen und Dichten verschiedener Chemikalien.

| | Summenformel | Mol.Gew. [g/mol] | Dichte [g/mL] |
|-------------------------------|--|-------------------------|----------------------|
| Acetylchlorid | C ₂ H ₃ OCl | 78,50 | 1,104 |
| Alanin | C ₃ H ₇ NO ₂ | 89,09 | - |
| 3-Aminopropyltrimethoxysilan | C ₆ H ₁₇ NO ₃ Si | 179,29 | 1,027 |
| Chlorameisensäureethylester | C ₃ H ₅ O ₂ Cl | 108,52 | 1,135 |
| Dichlormethan | CH ₂ Cl ₂ | 84,93 | 1,325 |
| 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol | C ₆ H ₂ N ₂ O ₄ F ₂ | 204,09 | - |
| Ethanol | C ₂ H ₆ O | 46,07 | 0,791 |
| Methanol | CH ₄ O | 32,04 | 0,792 |
| 2-Propanol | C ₃ H ₈ O | 60,10 | 0,785 |
| Trifluoressigsäureanhydrid | C ₄ O ₃ F ₆ | 210,03 | 1,511 |
| Tyrosin | C ₉ H ₁₁ NO ₃ | 181,19 | - |

8 Experimenteller Teil

Synthese von *DL*-Tyrosin (syn) siehe Literatur¹³¹.

Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Umkristallisation von Tyrosin sowie für die APS-DNP-Alanin-Synthesen HPLC-gradientenreines Wasser verwendet.

Umkristallisation von Tyrosin

DL-Tyr(FI1): 201,5 mg *DL*-Tyrosin (Fluka, 1,1 mmol) wurden in 200 mL Wasser (11,1 mol) 30 min lang unter Rückfluss erhitzt (Ölbadtemperatur 120 °C), über Membranfilter filtriert, 10 Tage bei Raumtemperatur und weitere 17 Tage bei 4 °C auskristallisiert. Anschließend wurde ein Kristall mit einer Pinzette vorsichtig entnommen, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

DL-Tyr(FI4): 618,2 mg *DL*-Tyrosin (Fluka, 3,4 mmol) wurden in 200 mL Wasser (11,1 mol) 60 min lang unter Rückfluss erhitzt (Ölbadtemperatur 120 °C), bei Raumtemperatur 12 Stunden und weitere 4 Tage bei 4 °C auskristallisiert. Anschließend wurden die Tyrosin-Kristalle filtriert und mit Wasser gewaschen. Dieser Vorgang wurde insgesamt vier Mal durchgeführt. Nach der vierten Umkristallisierung wurden die Kristalle lyophilisiert (Ausbeute: 355,2 mg, 57 %).

D-Tyr(FI1): 449,0 mg *D*-Tyrosin (Fluka, 2,5 mmol) wurden in 140 mL Wasser (7,8 mol) 60 min lang unter Rückfluss erhitzt (Ölbadtemperatur 120 °C), bei Raumtemperatur 12 Stunden und weitere 10 Tage bei 4 °C auskristallisiert. Anschließend wurden die Tyrosin-Kristalle filtriert, mit Wasser gewaschen und lyophilisiert (Ausbeute: 321,2 mg, 72 %).

L-Tyr(Si1): 446,0 mg *L*-Tyrosin (Sigma, 2,5 mmol) wurden in 140 mL Wasser (7,8 mol) 60 min lang unter Rückfluss erhitzt (Ölbadtemperatur 120 °C), bei Raumtemperatur 12 Stunden und weitere 10 Tage bei 4 °C auskristallisiert. Anschließend wurden die Tyrosin-Kristalle filtriert, mit Wasser gewaschen und lyophilisiert (Ausbeute: 335,3 mg, 75 %).

DL-Tyr(Se1): 499,7 mg *DL*-Tyrosin (Serva, 2,8 mmol) wurden in 275 mL Wasser (15,3 mol) 60 min lang unter Rückfluss erhitzt (Ölbadtemperatur 120 °C). Die trübe, braun-gelbe Lösung

8 Experimenteller Teil

wurde durch einen Faltenfilter filtriert. Bei Raumtemperatur kristallisierte die Lösung 12 Stunden und bei 4 °C weitere 10 Tage aus. Anschließend wurden die Tyrosin-Kristalle filtriert, mit Wasser gewaschen und lyophilisiert (Ausbeute: 260,6 mg, 52 %).

Materialien

Kapillarsäulen: Alle unbehandelten Fused-Silica-Kapillarsäulen wurden von Grom (Rottenburg-Hailfingen, Deutschland) und von Ziemer (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die desaktivierte Fused-Silica-Kapillarsäule (FS-CW) mit einer Länge von 100 cm und 50 µm ID wurde bei Ziemer (Mannheim, Deutschland) gekauft.

pH-Indikatorstäbchen: Merck (Darmstadt, Deutschland)

Säulen packen: Alle Materialien (PEEK Kupplung 1/32'', Edelstahlsiebe mit dem Durchmesser 0,8 mm, Sleeves 1/32'', PEEK Kapillaren, Verschraubungen, etc.) wurden bei Grom (Rottenburg-Hailfingen, Deutschland) gekauft.

8.2 GERÄTE

Analysenwaage: Es wurde eine Analysenwaage BP 110 S der Firma Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) verwendet.

Elementaranalyse: Die Elementaranalyse (C, H, N) wurde mit dem Gerät Vario EL der Firma Elementar durchgeführt.

Gaschromatographie

GC: Es wurde ein Hewlett-Packard 5890 Gaschromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit Split-Injektor (220 °C, Splitfluss 50 mL H₂/min), Flammenionisationsdetektor (FID, 240 °C) und Wasserstoff als Trägergas verwendet. Die Datenerfassung und Integration erfolgte entweder mit einem Shimadzu Integrator C-R 6A (Kyoto, Japan) oder mit einer Clarity Auswertungssoftware (Data Apex, Prag, Tschechische Republik). Wenn nicht anders angegeben, wurden die Messungen isotherm durchgeführt.

GC/MS: Es wurde ein Hewlett-Packard 6890 Gaschromatograph gekoppelt an einen 5973 Massenselektiven Detektor MSD (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektronenstoßionisation EI (70 eV). Der MSD wurde im SIM-Modus (selected ion mode, Alanin m/z 140, Glutaminsäure m/z 226, 227, 228, Lysin m/z 180 und Tyrosin m/z 288) betrieben. Die Trennkapillare wurde mit dem MSD über eine offene Splitkopplung (35 cm x 0,1 µm deaktivierte Fused-Silica-Kapillare) verbunden, als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Datenerfassung und die Integration wurden mit einer Agilent Chemstation (Hard und Software) durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µL ins GC/MS injiziert. Die derivatisierte Lösung sollte dabei eine Konzentration von ~ 25 nmol/L haben.

Kapillarelektrophorese

CE (Prince): Für die quantitativen Bestimmungen von *DL*-Tyrosin wurde ein Lauerlabs Prince Gerät (Kassel, Deutschland) mit einem UV-Detektor (UV var, Wellenlänge 200 nm, Chrompack, Middelburg, Niederlande) und der Auswertungssoftware Agilent CE 3D-CE Chem Station (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Eine unbeschichtete Fused-Silica-Kapillarsäule hatte die Länge von 70,5 cm (effektive Länge 50 cm) und 50 µm ID. Die Probe hatte eine Konzentration von 1 mg/mL und wurde mittels Druckinjektion (2 s, 50 mbar) auf die Kapillarsäule injiziert. Die angelegte Spannung betrug + 25 kV (48 - 52 µA). Als Puffer wurde ein Phosphatpuffer (KH₂PO₄ / H₃PO₄, 50 mmol/L, pH 2,5) verwendet und als chiraler Selektor 1 %_G (4,3 mmol/L) HS-γ-CD oder 30 %_G (254

8 Experimenteller Teil

mmol/L) 2-HP- α -CD (jeweils gelöst in der Pufferlösung). Zwischen den einzelnen Probenläufen wurde die Kapillare jeweils für 5 Minuten mit der Pufferlösung nach Zugabe vom chiralen Selektor (Backgroundelektrolyt) bei 1 bar gespült.¹⁴¹ Die Tyrosin-Proben wurden in der underivatisierten Form mittels CE bestimmt.

CE (Agilent): Es wurde ein Agilent 3D CE System (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit Dioden-Array-Detektor (DAD) und der Auswertungssoftware Agilent CE 3D-CE Chem Station (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Als chirale Pufferadditive wurden Poly-*L*-Glutaminsäure und Poly-*L*-Lysin eingesetzt. Als Puffer wurden ein Phosphatpuffer (KH₂PO₄ / H₃PO₄, 20 mmol/L, pH 7 oder pH 2,5) verwendet und die chiralen Additive in Konzentrationen von 10 - 20 %_G (10 - 20 mmol/L) Poly-*L*-Glutaminsäure oder 10 - 20 %_G (10 - 20 mmol/L) Poly-*L*-Lysin jeweils den Pufferlösungen zugesetzt. Es wurden entweder eine unbeschichtete Fused-Silica-Kapillarsäule mit einer Länge von 70 cm (effektive Länge 61,5 cm) und 50 μ m ID oder eine desaktivierte Fused-Silica-Kapillarsäule (FS-CW) mit einer Länge von 100 cm (effektive Länge 91,5 cm) und 50 μ m ID verwendet. Die Proben (BNP, DNP-*DL*-Alanin oder Trögersche Base) hatten jeweils eine Konzentration von 1 mg/mL und wurden mittels Druckinjektion (3 s, 30 mbar) auf die Kapillarsäule injiziert. Die angelegte Spannung betrug 10 - 30 kV (positiv oder negativ). Vor jedem Probenlauf wurde die Kapillarsäule jeweils für 5 Minuten mit 0,1 mol/L NaOH-Lösung im Fall der unbeschichteten Fused-Silica-Kapillarsäule oder 5 Minuten mit Wasser im Fall der desaktivierten Fused-Silica-Kapillarsäule und anschließend jeweils 2 Minuten mit der Pufferlösung nach Zugabe vom chiralen Selektor (Backgroundelektrolyt) bei 1 bar gespült.

Hochleistungsflüssigchromatographie

Micro-HPLC: Eine Sykam 2-Kolben-Analytik-Pumpe S 1021 (Sykam, Fürstenfeldbruck, Deutschland) mit einer Flussrate von 0,1 bis 9,95 mL/min war an ein Grom Kapillarelektrophorese System 100 (ohne Spannung) (Grom, Rottenburg-Hailfingen, Deutschland) gekoppelt. Über eine Splitkapillare wurde der isokratische Fluss für die Kapillarsäulen entsprechend eingestellt. Die Datenerfassung und Integration erfolgte mit einem Shimadzu Integrator C-R 6A (Kyoto, Japan).

8 Experimenteller Teil

Micro-HPLC/ESI-MS: Die Micro-HPLC/MS-Messungen wurden an einem Agilent 1100 HPLC-Gerät (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt an ein Esquire 3000plus ESI-Ion Trap (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland) mit ESI Interface durchgeführt. Die Steuerung des Geräts und die Datenerfassung erfolgte mit esquireControl, Version 5.0 und Bruker daltonics esquire 5.0, die Integration mit einer Data Analysis 2.0 Software (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland).

HPLC: Injektionsmenge: 0,1 μL , Fluss: 0,6 mL/min, Splitkapillare: 50 μm (ID) und 94 cm lang, Druck: 238 bar

ESI/MS: Nebulizer: 15,0 psi, Dry Gas: 5,0 L/min, Dry Temp.: 300 °C,
Scan: 500 - 1000, Target Mass: 780

8.3 DERIVATISIERUNG VON α -AMINOSÄUREN

N(O,S)-TFA/O-Et-Derivat, N(O,S)-TFA/O-Me-Derivat und N(O,S)-TFA/O-iProp-Derivat

15 % Acetylchlorid in Methanol, Ethanol oder 2-Propanol: 4 mL Methanol (0,09 mol), Ethanol (0,07 mol) oder 2-Propanol (0,05 mol) wurden im Eisbad gekühlt und anschließend langsam 600 μL Acetylchlorid (8,4 mmol) zugegeben.

Veresterung: 200 μL einer Lösung von 15 %_v Acetylchlorid in Ethanol, Methanol oder 2-Propanol wurden zu ca. 5 mg der trockenen α -Aminosäure gegeben und 30 Minuten (60 Minuten bei 2-Propanol) bei 110 °C erhitzt. Das überschüssige Derivatisierungsreagenz wurde anschließend unter einem Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen entfernt.

Acetylierung: Die trockene Probe wurde mit 110 μL Dichlormethan (1,7 mmol) und 10 Tropfen Trifluoressigsäureanhydrid ($\approx 100 \mu\text{L}$; $\approx 0,7 \text{ mmol}$) versetzt und 10 Minuten bei 110 °C erhitzt. Das überschüssige Derivatisierungsreagenz wurde anschließend bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom durch Verdampfen entfernt.

Für die Injektion in den Gaschromatographen wurde die trockene Probe in Toluol (ca. 100 mL) aufgenommen.

8 Experimenteller Teil

N(O)-EOC/O-Et-Derivat

Die zu derivatisierende α -Aminosäure (1 - 2 mg) wurde in 100 μL einer 0,1 mol/L HCl gelöst. Es wurden zuerst 50 μL einer Pyridin-Ethanol-Lösung (1:1, v/v) und 10 μL Chlorameisensäureethylester (0,1 mmol) zugegeben und 5 s homogenisiert. Nach Zugabe von 200 μL Dichlormethan (3,1 mmol) wurde nochmals homogenisiert. Anschließend wurde die organische Phase (Dichlormethan, unten) aufgenommen und davon 0,5 μL in das GC (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert. ¹³⁷ Temperaturprogramm Tyrosin: 150 °C / 3min – 0,5 °C / min – 200 °C / 10 min. Tyrosin eluierte dabei erst bei 200 °C.

8.4 VALIDIERUNG

Einfluss der Injektionsmenge

Es wurden Lösungen unterschiedlicher Konzentration (10 mmol/L, 1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 0,1 mmol/L, 0,05 mmol/L, 0,01 mmol/L, 0,005 mmol/L, 0,001 mmol/L, 0,0005 mmol/L und 0,0001 mmol/L) von *DL*-Tyr(F14) in verdünnter HCL (0,1 mol/L) hergestellt. Je 100 μL dieser Lösungen wurden bei 110 °C im Stickstoffstrom durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert und anschließend in genau 100 μL Toluol aufgenommen. Jeweils 1 μL dieser Lösungen wurden ins GC (Chirasil-*L*-Val, Säule D) und GC/MS (Chirasil-*L*-Val, Säule D) injiziert. Der *D*-Enantiomerenanteil wurde über die Peakflächen berechnet.

8 Experimenteller Teil

Angereichertes DL-Tyrosin

Es wurden Lösungen von *DL*-Tyr(F14), *L*-Tyr(F10) und *D*-Tyr(F10) der Konzentration 10 mmol/L in verdünnter HCl (0,1 mol/L) hergestellt. Die Lösung *DL*-Tyr(F14) wurde mit je 1 %, 0,5 % und 0,2 % *D*-Tyr(F10) oder *L*-Tyr(F10) angereichert. 100 µL dieser Lösungen wurden je in ein sauberes, ausgeglühtes Derivatisierungsgläschen gegeben und bei 110 °C im Stickstoffstrom durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert und anschließend in 100 µL Toluol aufgenommen. 1 µL dieser Lösungen wurden mittels GC (Chirasil-*L*-Val, Säule D) bestimmt. Der *D*-Enantiomerenanteil wurde über die Peakflächen berechnet.

Mischungen von D- und L-Tyrosin

Es wurden Lösungen von *D*-Tyr(Se0) und *L*-Tyr(Si0) der Konzentration 10 mmol/L in verdünnter HCl (0,1 mol/L) hergestellt. Aus den zwei Standardlösungen wurden Mischungen von 100 - 0 %_v *D*-Tyrosin bzw. 0 – 100 %_v *L*-Tyrosin nach **Tabelle 8-2** hergestellt. 100 µL jeder Lösung wurden je in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben, bei 110 °C im Stickstoffstrom durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert und anschließend in 100 µL Toluol aufgenommen. 1 µL dieser Lösungen wurden mittels GC (Chirasil-*D*-Val Säule A und Chirasil-*L*-Val Säule C) bestimmt. Der *D*- bzw. *L*-Enantiomerenanteil wurde jeweils über die Peakflächen berechnet.

Tabelle 8-2: Mischungsverhältnisse, hergestellt aus den Standardlösungen *D*-Tyr(Se0) und *L*-Tyr(Si0).

| Standardlösungen | Mischungsverhältnisse | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|----|-----|----|----|----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|
| | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | XII | IXV |
| <i>D</i> -Tyrosin [%] | 100 | 99 | 95 | 90 | 80 | 70 | 60 | 50 | 40 | 30 | 20 | 10 | 1 | 0 |
| <i>L</i> -Tyrosin [%] | 0 | 1 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 99 | 100 |

8.5 KRISTALLISATION VON TYROSIN

Untersuchung der Tyrosin-Proben auf Aminosäureverunreinigungen

Qualitativ: Ungefähr 5 mg der entsprechenden *D*-, *L*- und *DL*-Tyrosin-Proben wurden jeweils in ein sauberes, ausgeglühtes Derivatisierungsgläschen gegeben und als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert. Die Proben wurden in 50 μL Toluol und 20 μL Dichlormethan aufgenommen und 1 μL in das GC/MS (Lipodex E, Säule H) injiziert. Temperaturprogramm: 70 °C / 8 min - 2,5 °C / min - 95 °C – 3,5 °C / min - 185 °C. Der Lauf dauerte insgesamt 48 min, dabei wurde in der Zeit 35 - 39 min der Ionenstrahl (Massenpeaks von Tyrosin) ausgeblendet.

Quantitativ: 1 mg der entsprechenden *D*-, *L*- und *DL*-Tyrosin-Proben wurden jeweils in ein sauberes, ausgeglühtes Derivatisierungsgläschen gegeben. 25 μL *D*-Aminosäure-Standard (**Tabelle 8-3**) wurde zu den *L*- und *DL*-Tyrosin-Proben sowie 25 μL *L*-Aminosäure-Standard (1:10 verdünnt) zu den *D*-Tyrosin-Proben zugegeben. Die Proben wurden im Stickstoffstrom durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 50 μL Toluol und 20 μL Dichlormethan aufgenommen und anschließend 1 μL ins GC/MS (Lipodex E, Säule H) injiziert. Temperaturprogramm und Massenausblendung wie oben.

8 Experimenteller Teil

Tabelle 8-3: Verwendeter *L*- und *D*-Standard. Der *L*-Standard wurde bei der Firma Sigma-Aldrich käuflich erworben, der Fehlerbereich liegt bei $\pm 4\%$. Der *D*-Standard wurde durch Einwiegen von *D*-Aminosäuren und Rückkalibrieren über den *L*-Standard (1:10 verdünnt) hergestellt.

| Aminosäuren | Mol.Gew. [g/mol] | L-Standard (Sigma-Aldrich) | | D-Standard |
|----------------|------------------|------------------------------|--------------|---------------|
| | | Konz. [$\mu\text{mol/mL}$] | Konz. [mg/L] | Konz. [mg/mL] |
| Alanin | 89,10 | 2,50 | 22,28 | 21,67 |
| Valin | 117,20 | 2,50 | 29,30 | 29,48 |
| Threonin | 119,10 | 2,50 | 29,78 | 29,40 |
| Isoleucin | 131,20 | 2,50 | 32,80 | 36,14 |
| Leucin | 131,20 | 2,50 | 32,80 | 37,92 |
| Serin | 105,10 | 2,50 | 26,28 | 30,16 |
| Prolin | 115,10 | 2,50 | 28,78 | 42,10 |
| Asparaginsäure | 133,10 | 2,50 | 33,28 | 37,58 |
| Cystein | 121,20 | | 30,30 | 29,29 |
| Methionin | 149,20 | 2,50 | 37,30 | 45,77 |
| Phenylalanin | 165,20 | 2,50 | 41,30 | 53,16 |
| Glutaminsäure | 147,10 | 2,50 | 36,78 | 36,02 |
| Tyrosin | 181,20 | 2,50 | 45,30 | 51,95 |
| Ornithin | 132,20 | | 33,05 | 36,91 |
| Lysin | 146,20 | 2,50 | 36,55 | 37,53 |
| Arginin | 174,20 | 2,50 | 43,55 | 37,78 |
| Histidin | 155,20 | 2,50 | 38,80 | 42,75 |
| Glycin | 75,10 | 2,50 | | 8,65 |

Verwendetes Wasser

Für die Kristallisationen wurde demineralisiertes Wasser, HPLC-gradientenreines Wasser (Fisher Scientific) oder Millipor-Wasser (Institut) verwendet. Es konnten dabei aber keine Unterschiede während der Kristallisation festgestellt werden. Das pH-Meter wurde vor der Verwendung mit Eich-Puffern pH 6,88 und 4,01 eingestellt. Die Bestimmung der pH-Werte ergab folgendes:

| | | | | |
|-------------------------------|------|------|------|------|
| Demineralisiertes Wasser: | 6,06 | 6,29 | 6,19 | 6,22 |
| HPLC-gradientenreines Wasser: | 6,30 | 6,15 | | |
| Millipor-Wasser: | 6,11 | 6,13 | 6,03 | |

Bestimmung des Kristallisationsverlaufs in H₂O – enantiomer labelling

Jeweils 10 mmol/L Tyrosin-Lösungen wurden hergestellt. Dazu wurden 90,59 mg (0,5 mmol) der Tyrosin-Proben in druckfeste Gläschen (100 mL) eingewogen, 50 mL Wasser zugegeben, mit einem Teflon-Schraubdeckelverschluss verschlossen und unter Rühren im siedenden Wasserbad genau 10 Minuten erhitzt. Dabei löste sich das Tyrosin vollständig auf. Anschließend wurden die verschlossenen Gläschen mit den Lösungen in einem Wasserbad bei 20 °C innerhalb von 10 Minuten abgekühlt und bei 6 °C (Kühlschrank) bzw. 20 ± 1 °C (klimatisierter Raum, ohne Thermostat) auskristallisiert.

Für den Anfangswert wurde sofort und für den Kristallisationsverlauf nach definierten Zeitabständen jeweils eine repräsentative Probe entnommen. Dazu wurden unter Rühren 250 - 300 µL von der Kristallsuspension mit einer Eppendorfpipette entnommen und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgetrennt und davon 50 µL in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben. 50 µL *D*-Tyrosin-Standard wurde zu den *L*-Tyrosin-Proben und 50 µL *L*-Tyrosin-Standard zu den *D*-Tyrosin- und *DL*-Tyrosin-Proben zugegeben. Die Proben wurden bei 110 °C im Stickstoffstrom durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 µL Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 µL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Die verwendeten Standardsubstanzen sind in **Tabelle 8-4** angegeben. Zur Bestimmung des *D*-Enantiomerenanteils der Tyrosin-Standardsubstanzen wurden jeweils 100 µL im bei 110 °C Stickstoffstrom durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 µL Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 µL in den Gaschromatographen injiziert. Für die *D*-Standards wurde Chirasil-*D*-Val (Säule A) und für die *L*-Standards Chirasil-*L*-Val (Säule C) verwendet. Die genauen Kristallisationsbedingungen sind in **Tabelle 8-5** gegeben.

Tabelle 8-4: *D*- und *L*-Tyrosin-Standard

| Standard | Probe | Einwaage [mg] | 0,1 mol/L HCl [mL] | Konz. [mg/L] | EF |
|-------------------|--------------------|---------------|--------------------|--------------|-------|
| <i>D</i> -Tyr I | <i>D</i> -Tyr(Se0) | 6,65 | 3,5 | 1900,00 | 98,85 |
| <i>D</i> -Tyr II | <i>D</i> -Tyr(FI0) | 6,28 | 3,5 | 1794,29 | 99,92 |
| <i>D</i> -Tyr III | <i>D</i> -Tyr(FI0) | 6,29 | 3,5 | 1797,14 | 99,97 |
| <i>L</i> -Tyr I | <i>L</i> -Tyr(Si0) | 6,40 | 3,5 | 1828,57 | 0,00 |
| <i>L</i> -Tyr II | <i>L</i> -Tyr(Si0) | 6,25 | 3,5 | 1785,71 | 0,10 |
| <i>L</i> -Tyr III | <i>L</i> -Tyr(FI0) | 6,37 | 3,5 | 1820,00 | 0,13 |

8 Experimenteller Teil

Tabelle 8-5: Kristallisationsbedingungen für die Bestimmung des Kristallisationsverlaufs von D-, L-, DL- und D+L-Tyrosin.

| Probe | Wasser | Kristallisations- temperatur [°C] | Standard |
|--|---------------|--------------------------------------|--|
| <i>D</i> -Tyr(FI0) | demin. | 6 | <i>L</i> -Tyr I, <i>L</i> -TyrII ab 48 h |
| <i>L</i> -Tyr(Si1) | demin. | 6 | <i>D</i> -Tyr I, <i>D</i> -TyrII ab 48 h |
| <i>DL</i> -Tyr(Se1) | demin. | 6 | <i>L</i> -Tyr I, <i>L</i> -TyrII ab 48 h |
| <i>D</i> -Tyr(Se0) | demin. | 20 ± 1 | <i>L</i> -TyrII |
| <i>D</i> -Tyr(FI0) | demin. | 20 ± 1 | <i>L</i> -Tyr I, <i>L</i> -TyrII ab 48 h |
| <i>D</i> -Tyr(FI1) | demin. | 20 ± 1 | <i>L</i> -TyrII |
| <i>L</i> -Tyr(Si0) | demin. | 20 ± 1 | <i>D</i> -TyrII |
| <i>L</i> -Tyr(Si1) | demin. | 20 ± 1 | <i>D</i> -Tyr I, <i>D</i> -TyrII ab 48 h |
| <i>L</i> -Tyr(FI0) | HPLC grade | 20 ± 1 | <i>D</i> -TyrIII |
| <i>L</i> -Tyr(Se0) | HPLC grade | 20 ± 1 | <i>D</i> -TyrIII |
| <i>L</i> -Tyr(Sa0) | HPLC grade | 20 ± 1 | <i>D</i> -TyrIII |
| <i>DL</i> -Tyr(Se1) | demin. | 20 ± 1 | <i>L</i> -Tyr I, <i>L</i> -TyrII ab 48 h |
| <i>DL</i> -Tyr(FI0) | HPLC grade | 20 ± 1 | <i>L</i> -TyrIII |
| <i>D</i> -Tyr(FI0)+ <i>L</i> -Tyr(Si0) | HPLC grade | 20 ± 1 | <i>L</i> -TyrIII |
| <i>D</i> -Tyr(FI0) | Deuteriumoxid | 20 ± 1 | <i>L</i> -TyrIII |
| <i>L</i> -Tyr(Si0) | Deuteriumoxid | 20 ± 1 | <i>D</i> -TyrIII |
| <i>L</i> -Tyr(FI0) | Deuteriumoxid | 20 ± 1 | <i>D</i> -TyrIII |

Bestimmung des Kristallisationsverlaufs in D₂O – enantiomer labelling

Jeweils 10 mmol/L Tyrosin-Lösungen wurden hergestellt. Dazu wurden 18,12 mg (0,1 mmol) von *D*-Tyr(FI0), *L*-Tyr(FI0) und *L*-Tyr(Si0) in druckfeste Gläschen (25 mL) eingewogen, 10 mL Deuteriumoxid zugegeben, mit einem Teflon-Schraubdeckel-verschluss verschlossen und unter Rühren im siedenden Wasserbad genau 10 Minuten erhitzt. Dabei löste sich das Tyrosin vollständig auf. Anschließend wurden die Lösungen in den verschlossenen Gläschen in einem Wasserbad bei 20 °C innerhalb von 10 Minuten abgekühlt und bei 20 ± 1 °C (klimatisierter Raum, ohne Thermostat) auskristallisiert.

Für den Anfangswert wurde sofort und für den Kristallisationsverlauf nach definierten Zeitabständen jeweils eine repräsentative Probe entnommen. Dazu wurden unter Rühren 150 µL von der Kristallsuspension mit einer Eppendorfpipette entnommen und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgetrennt und davon 50 µL in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben. 50 µL *D*-Tyrosin-Standard (*D*-Tyr III, **Tabelle 8-4**) wurde zu den *L*-Tyrosin-Proben und 50 µL *L*-Tyrosin-Standard (*L*-Tyr III, **Tabelle 8-4**) zu den *D*-Tyrosin-Proben zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei 110 °C im Stickstoffstrom

8 Experimenteller Teil

durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 μL Toluol aufgenommen und 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Die Bestimmung des Kristallisationsverlaufs erfolgt in D_2O analog dem in H_2O . Die genauen Kristallisationsbedingungen sind in **Tabelle 8-5** angegeben.

Bestimmung der Enantiomerenverhältnisse in Tyrosin-Racematen während der Kristallisation

***DL*-Tyr(Se1) (I) und *DL*-Tyr(F10) (I):** Jeweils 10 mmol/L Tyrosin-Lösungen wurden hergestellt. Dazu wurden je 90,59 mg (0,5 mmol) *DL*-Tyrosin in ein druckfestes Gläschen (100 mL) eingewogen, 50 mL Wasser (*DL*-Tyr(Se1): demin., *DL*-Tyr(F10): HPLC-gradientenrein) zugegeben, mit einem Teflon-Schraubdeckelverschluss verschlossen und unter Rühren im siedenden Wasserbad genau 10 Minuten erhitzt. Dabei lösten sich die Proben vollständig auf. Anschließend wurden die verschlossenen Gläschen mit den Lösungen in einem Wasserbad bei 20 °C innerhalb von 10 Minuten abgekühlt und in einem weiteren Wasserbad bei 20 ± 1 °C (klimatisierter Raum, ohne Thermostat) auskristallisiert.

Für den Anfangswert wurde sofort und für den Kristallisationsverlauf nach definierten Zeitabständen jeweils eine repräsentative Probe entnommen. Dazu wurden unter Rühren 250 - 300 μL von der Kristallsuspension mit einer Eppendorfpipette entnommen und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgetrennt und davon 100 μL in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben. Anschließend wurde die Lösung bei 110 °C im Stickstoffstrom durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 μL Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Ein Teil der Kristallsuspension von *DL*-Tyr(Se1) und *DL*-Tyr(F10) wurde nach beendeter Kristallisation mittels Filter-Eppendorfspitze filtriert, mit eisgekühltem Wasser gewaschen und die Kristalle mit verdünnter Salzsäure (0,1 mol/L) vom Filter gelöst. Bei *DL*-Tyr(F10) wurde ein weiterer Teil der Kristallsuspension nach beendeter Kristallisation mittels Membranfilter filtriert, wiederum mit eisgekühltem Wasser gewaschen und die Kristalle mit verd. Salzsäure (0,1 mol/L) vom Filter gelöst. Die Tyrosin-Lösungen wurde im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat

8 Experimenteller Teil

derivatisiert, in 100 μL Toluol aufgenommen und 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

***DL*-Tyr(Se1) (II) und *DL*-Tyr(F10) (II):** Jeweils 10 mmol/L Tyrosin-Lösungen wurden hergestellt. Dazu wurden 36,24 mg (0,2 mmol) *DL*-Tyr(Se1) in ein druckfestes Gläschen (50 mL) eingewogen und 20 mL HPLC-gradientenreines Wasser zugegeben, weiterhin wurden 90,59 mg (0,5 mmol) *DL*-Tyr(F10) in ein druckfestes Gläschen (100 mL) eingewogen und 50 mL HPLC-gradientenreines Wasser zugegeben. Beide Gläschen wurden jeweils mit einem Teflon-Schraubdeckelverschluss verschlossen und unter Rühren im siedenden Wasserbad genau 70 Minuten erhitzt. Dabei lösten sich die Proben vollständig auf. Von den heißen Lösungen wurden jeweils 800 μL in 1 mL-Glasvials (*DL*-Tyr(Se1): 12 Stück und *DL*-Tyr(F10): 26 Stück) aufgeteilt. Für den Anfangswert wurden sofort 4 der 1 mL-Glasvials verwendet und jeweils 50 μL der Lösungen als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert und gaschromatographisch bestimmt (Chirasil-*L*-Val, Säule C). In einem klimatisierten Raum kristallisierten dann die restlichen Proben t bei 20 ± 1 °C (ohne Thermostat) aus.

Nach 408 Stunden bei *DL*-Tyr(Se1) und 648 Stunden bei *DL*-Tyr(F10) wurden die Kristallisationslösungen von den Kristallen über Membranfiltern abgetrennt (bei *DL*-Tyr(Se1) von 9 Stück und bei *DL*-Tyr(F10) von 20 Stück) und davon jeweils 50 μL in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben. Die Lösungen wurden im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 30 μL Toluol aufgenommen und anschließend jeweils 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Die Kristalle wurden aus den jeweils 6 auskristallisierten und zurückgebliebenen 1 mL-Glasvials bestimmt. Die Kristallsuspension wurde dabei zentrifugiert, die überstehende Kristallisationslösung verworfen, mit eisgekühltem HPLC-gradientenreinem Wasser gewaschen und wiederum die Kristalle von der Lösung mittels Zentrifugieren abgetrennt. Ungefähr 5 mg der Kristalle wurden in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben, im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 μL Toluol aufgenommen und 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

***DL*-Tyr(F10)+*D*-Tyr(F10) und *DL*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(F10):** Jeweils 10 mmol/L Tyrosin-Lösungen wurden hergestellt. Dazu wurden jeweils 18,12 mg (0,1 mmol) *D*-Tyr(F10) und *L*-Tyr(F10) in ein druckfestes Gläschen (25 mL) eingewogen und 10 mL HPLC-gradientenreines

8 Experimenteller Teil

Wasser zugegeben. Beide Gläschen wurden jeweils mit einem Teflon-Schraubdeckelverschluss verschlossen und unter Rühren im siedenden Wasserbad genau 15 Minuten erhitzt, bis sich die Proben vollständig aufgelöst hatten.

88,78 mg (0,49 mmol) *DL*-Tyr(F10) wurden jeweils in zwei druckfeste Gläschen (100 mL) eingewogen, zum ersten wurde 1 mL (2 %_v) der *D*-Tyr(F10)-Lösung und zum zweiten 1 mL (2 %_v) der *L*-Tyr(F10)-Lösung pipettiert und jeweils 49 mL HPLC-gradientenreines Wasser zugegeben. Beide Gläschen wurden jeweils wieder mit einem Teflon-Schraubdeckelverschluss verschlossen und unter Rühren im siedenden Wasserbad genau 70 Minuten erhitzt. Von den heißen Lösungen wurden jeweils 800 µL in 1 mL-Glasvials (jeweils 15 Stück) aufgeteilt. Für den Anfangswert wurden sofort jeweils 4 der 1 mL-Glasvials verwendet und jeweils 50 µL der Lösungen als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert und gaschromatographisch bestimmt (Chirasil-*L*-Val, Säule C). In einem klimatisierten Raum kristallisierten dann die restlichen Proben bei 20 ± 1 °C (ohne Thermostat) aus.

Nach 648 Stunden wurde die Kristallisationslösung von den Kristallen über Membranfiltern abgetrennt (bei *DL*-Tyr(F10)+*D*-Tyr(F10) von 6 Stück und bei *DL*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(F10) von 8 Stück) und davon jeweils 50 µL in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben. Die Lösungen wurden im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 30 µL Toluol aufgenommen und anschließend jeweils 0,5 µL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Die Kristalle wurden aus den jeweils sechs auskristallisierten und zurückgebliebenen 1 mL-Glasvials bestimmt. Die Kristallsuspensionen wurden dabei zentrifugiert, die überstehende Kristallisationslösung verworfen, mit eisgekühltem HPLC-gradientenreinen Wasser gewaschen und wiederum die Kristalle von der Lösung mittels Zentrifugieren abgetrennt. Ungefähr 5 mg der Kristalle wurden in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben, im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 µL Toluol aufgenommen und 0,5 µL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

***DL*-Tyr(F10)-Kristallitsuspension, ohne Erhitzen:** Eine 10 mmol/L Tyrosin-Kristallitsuspension wurde hergestellt. Dazu wurden 90,59 mg (0,5 mmol) *DL*-Tyr(F10) in ein druckfestes Gläschen (100 mL) eingewogen, 50 mL HPLC-gradientenreines Wasser zugegeben und mit einem Teflon-Schraubdeckelverschluss verschlossen. Die Kristallitsuspension wurde in einem Wasserbad bei 20 ± 1 °C temperiert (ohne Thermostat). Durch das Rühren erwärmte sich das Wasserbad nach 648 h auf 25 ± 1 °C.

8 Experimenteller Teil

Nach 648 h wurde die Kristallitlösung von den Kristalliten über Membranfilter abgetrennt und davon jeweils 50 μL in vier saubere Derivatisierungsgläschen gegeben. Im Stickstoffstrom wurden bei 110 °C die Proben durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 30 μL Toluol aufgenommen und anschließend jeweils 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert. Für den Anfangswert wurde hier ungefähr 5 mg von *DL*-Tyr(F10) als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert und gaschromatographisch bestimmt.

***D*-Tyr(F10)+*L*-Tyr(Si0):** Eine 10 mmol/L Tyrosin-Lösung wurde hergestellt. Dazu wurden jeweils 45,30 mg (0,25 mmol) *D*-Tyr(Si0) und 45,30 mg (0,25 mmol) *L*-Tyr(F10) in ein druckfestes Gläschen (100 mL) eingewogen, 50 mL HPLC-gradientenreines Wasser zugegeben, mit einem Teflon-Schraubdeckelverschluss verschlossen und unter Rühren im siedenden Wasserbad genau 10 Minuten erhitzt. Dabei lösten sich die Proben vollständig auf. Anschließend wurde das verschlossene Gläschen mit den Lösungen in einem Wasserbad bei 20 °C innerhalb von 10 Minuten abgekühlt und in einem weiteren Wasserbad bei 20 ± 1 °C (klimatisierter Raum, ohne Thermostat) auskristallisiert.

Für den Anfangswert wurde sofort und für den Kristallisationsverlauf nach definierten Zeitabständen jeweils eine repräsentative Probe entnommen. Dazu wurden unter Rühren 250 - 300 μL von der Kristallsuspension mit einer Eppendorfpipette entnommen und zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgetrennt und davon 100 μL in ein sauberes Derivatisierungsgläschen gegeben. Im Stickstoffstrom wurde bei 110 °C die Probe durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 μL Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Ein Teil der Kristallsuspension wurden nach beendigter Kristallisation mittels Filter-Eppendorfspitzen filtriert, mit eisgekühltem Wasser gewaschen und die Kristalle mit HCl (0,1 mol/L) vom Filter gelöst. Ein zweiter Teil wurde mittels Membranfilter filtriert, wiederum mit eisgekühltem Wasser gewaschen und die Kristalle mit verd. Salzsäure (0,1 mol/L) vom Filter gelöst. Die Tyrosin-Lösungen wurde im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N,O*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 100 μL Toluol aufgenommen und 0,5 μL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

8.6 BESTIMMUNG DER RACEMISIERUNG VON ALANIN

Erhitzung in einer Glasampulle

Jeweils 100 mmol/L Alanin-Lösungen wurden hergestellt. Dazu wurden jeweils 178,18 mg (2 mmol) *D*-Ala(SiO), *L*-Ala(SiO) und *DL*-Ala(MeO) in 20 mL Millipor Wasser gelöst und der pH-Wert mit pH Indikatorstäbchen 0 - 6 und 0 - 14 bestimmt.

Anfangswert : Je 50 μ L der Lösungen wurden im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 150 μ L Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 μ L in den Gaschromatographen (*D*-Alanin: Chirasil-*D*-Val, Säule A; *L*- und *DL*-Alanin: Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Erhitzung: 500 μ L der Lösungen wurden jeweils in einer Glasampulle unter Vakuum versiegelt. Die Lösungen wurden dann nach **Tabelle 8-6** erhitzt und abgekühlt. Anschließend wurde der pH-Wert mit pH Indikatorstäbchen 0 - 6 und 0 - 14 bestimmt. Jeweils 50 μ L der Lösungen wurden in ein Derivatisierungsgläschen gegeben und im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 150 μ L Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 μ L in den Gaschromatographen (*D*-Alanin: Chirasil-*D*-Val, Säule A; *L*- und *DL*-Alanin: Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

Erhitzung mit Edelstahl: Je 500 μ L der Lösungen mit einem Stück Edelstahl (Länge 5 mm, \varnothing 2 mm) wurden in einer Glasampulle unter Vakuum versiegelt. Die Lösungen wurden dann nach **Tabelle 8-6** erhitzt und abgekühlt. Anschließend wurde der pH-Wert mit pH Indikatorstäbchen 0 - 6 und 0 - 14 bestimmt. Jeweils 50 μ L der Lösungen wurden in ein Derivatisierungsgläschen gegeben im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 150 μ L Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 μ L in den Gaschromatographen (*D*-Alanin: Chirasil-*D*-Val, Säule A; *L*- und *DL*-Alanin: Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert.

8 Experimenteller Teil

Tabelle 8-6: Erhitzung und Abkühlung der Glasampullen mit den 100 mmol/L Lösungen von *D*-Ala(SiO), *L*-Ala(SiO) und *DL*-Ala(MeO)

| Zeit [min] | Temperatur [°C] | |
|------------|-----------------|-----------|
| 10 | 150 | Heizblock |
| 5 | 230 | GC-Ofen |
| 5 | 20 | Wasserbad |
| 20 | 0 | Eisbad |

Simulation der hydrothermalen Bedingungen

Eine 100 mmol/L *DL*-Alanin-Lösung wurde hergestellt. Dazu wurden 267,27 mg (3 mmol) *DL*-Ala(MeO) in 30 mL Millipor Wasser gelöst und der pH-Wert mit pH Indikatorstäbchen 0 - 6 und 0 - 14 bestimmt. Für den Anfangswert wurden 50 µL der Lösung im Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen getrocknet, als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert, in 150 µL Toluol aufgenommen und anschließend 0,5 µL in den Gaschromatographen (Chirasil-*L*-Val, Säule C) injiziert. 20 mL der *DL*-Ala(MeO)-Lösung wurden in eine 25 mL-Flasche gegeben, diese stand in einem 0 °C Wasserbad. Die Flüssigkeit wurde mit einer HPLC-Pumpe (3,5 mL/min, ~ 125 bar) durch eine Edelstahlkapillare (ID 0,25 mm, Länge 150 cm) gepumpt, welche durch einen 230 °C heißen GC-Ofen läuft und am Ende eine Verengung (Sprühdüse) hatte. Diese Sprühdüse führt wieder zurück in die 25 mL-Flasche. Der Kreislauf wurde eine Stunde durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in **Abbildung 5-15** dargestellt. Die Versuchsbedingungen sind in **Tabelle 8-7** zusammengefasst.

Tabelle 8-7: Angaben zum Versuchsaufbau und den Versuchsbedingungen. Das Volumen wurde jeweils mit der Formel $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$ berechnet.

| | Bedingungen | Volumen |
|--|-------------------------------|---------|
| <i>DL</i> -Ala(MeO) | 100 mmol/L | 20 mL |
| Durchlauf der <i>DL</i> -Alanin Lösung | 1 Stunde; 3,5 mL/min (→ 10 x) | |
| Edelstahlkapillare insg. | ID 0,25 mm, Länge 160 cm | 78,5 µL |
| Edelstahlkapillare von Pumpe bis Ofen | ID 0,25 mm, Länge 25 cm | |
| Edelstahlkapillare im 230 °C Ofen | ID 0,25 mm, Länge 120 cm | 58,9 µL |
| Edelstahlkapillare von Ofen bis Sprühdüse/Flasche (0 °C) | ID 0,25 mm, Länge 15 cm | |
| Verweilzeit der Lösung insg. bei 230 °C = 10 min | | |

8.7 DEUTEROLYSE VON POLYPEPTIDEN

Ausgangssubstanzen

Die für die Peptidsynthese vorgesehenen Ausgangssubstanzen (Fmoc-*D*-Glu(*O**t*-Bu)-OH, Fmoc-*L*-Glu(*O**t*-Bu)-OH, Fmoc-*D*-Lys(Boc)-OH und Fmoc-*L*-Lys(Boc)-OH) wurden uns vom EMG microcollections GmbH von Prof. Wiesmüller für die quantitative Analyse der Enantiomerenanteile zur Verfügung gestellt. Von allen vier Proben wurde jeweils eine Lösung von 2,5 µg/µL in Dichlormethan hergestellt.

Abspaltung der Fmoc-Gruppe

20 µL der Probe wurde mit 100 µL Dichlormethan und 20 µL Piperidin versetzt, homogenisiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde das überschüssige Reagenz bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom durch Verdampfen entfernt.

Deuterolyse

Zum Vergleich der Deuterolysebedingungen wurden die trockenen Ausgangsproben (ohne Fmoc) mit 200 µL DCl (6 mol/L D₂O) versetzt und 8, 24 oder 48 Stunden bei 110 °C erhitzt. Die Proben wurde anschließend mit deuterierten Reagenzien als *N*-TFA/*O*-Et-Derivat derivatisiert.

Bei Poly-*L*-Lysin (50 µL einer 1 µg/µL wässrigen Lösung) erfolgte die Hydrolyse über 24 Stunden mit 200 µL HCl (6 mol/L H₂O) und die anschließende Derivatisierung als *N,N*-TFA/*O*-Et-Derivat.

Derivatisierung mit deuterierten Reagenzien als N(O,S)-TFA/O-Et-Derivat

15 % Acetylchlorid in Ethanol-d₁: 4 mL Ethanol-d₁ wurden im Eisbad gekühlt und anschließend langsam 600 µL Acetylchlorid zugegeben.

Veresterung: 100 µL einer Lösung von 15 %_v Acetylchlorid in Ethanol-d₁ wurde zur trockenen Probe (ohne Fmoc) gegeben und 30 Minuten bei 110 °C erhitzt. Das überschüssige Derivatisierungsreagenz wurde anschließend unter einem Stickstoffstrom bei 110 °C durch Verdampfen entfernt.

Acetylierung: Die trockene Probe wurde mit 100 µL Dichlormethan und 6 Tropfen Trifluoressigsäureanhydrid (≈ 50 µL) versetzt und 10 Minuten bei 110 °C erhitzt. Das überschüssige Derivatisierungsreagenz wurde anschließend bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom durch Verdampfen entfernt.

Die trockene Probe wurde in 100 mL Toluol aufgenommen und für die GC/MS-Injektion verdünnt. Die Lösung sollte dabei eine Konzentration von ungefähr 25 nmol/L haben, 1 µL wurden jeweils injiziert.

8.8 CHIRALE SELEKTOREN

Anbindung von DNP-D- und DNP-L-Alanin an Silica

Die Synthesen wurden nach Literatur ¹⁸⁰ durchgeführt.

Aminopropylsilica: ¹⁷⁸ Zu 4 g Nucleosil-300 (Partikelgröße 5 μm , Porengröße 300 \AA) wurden 20 mL absolutes Toluol zugegeben und im Vakuum bei 70 °C abrotiert. Dieser Vorgang wurde zum vollständigen Trocknen des Nucleosil-300 drei Mal durchgeführt.

20 mL absolutes Toluol wurden zum trockenen Nucleosil-300 und 8 mL 3-Aminopropyltrimethoxysilan (45,8 mmol) gegeben, als Katalysator wurden 240 μL *tert.*-Butylamin und eine Spatelspitze 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) zugefügt. Die Suspension wurde 48 Stunden bei 90 °C rotiert, dann filtriert, mit Toluol, Methanol und Diethylether gewaschen und anschließend bei 20 °C getrocknet.

Elementaranalyse: siehe **Tabelle 6-1**

FDNP-L-Alanin: ¹⁷⁷ 668 mg *L*-Alanin (7,5 mmol) und 1,5 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) wurden in 37 mL HPLC-gradientenreinem Wasser gelöst und zu 1,5 g von 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol (DFDNB, 7,5 mmol), gelöst in 37 mL Aceton, bei Raumtemperatur in 30 Minuten zugetropft. Anschließend wurde 4 Stunden bei 10 °C gerührt und am Ende der Reaktionszeit kurz auf 50 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch mit 2 mol/L HCl angesäuert (pH 3), das Lösungsmittel abrotiert und die ausgefallene Substanz in Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wurde mit NaHCO_3 auf pH 8 eingestellt und die Lösung zwei Mal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde erhitzt und der pH-Wert der heißen Lösung mit 2 mol/L HCl auf pH 2 - 3 eingestellt. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde nach dem Abkühlen filtriert, mit wenig Diethylether gewaschen und über CaCl_2 getrocknet. Die Etherphase wurde verworfen.

FDNP-*D*-Alanin wurde analog hergestellt.

¹H-NMR von FDNP-*L*-Alanin (CH_3OD): δ 1,50 (d, 3 H, CH_3); 4,3 (m, 1 H, *CH*); 6,9 (d, 1 H, $\text{C}(\text{NO}_2)\text{-CH}$); 9,0 (d, 1 H, CF-CH)

8 Experimenteller Teil

ESI-MS (FDNP-*L*-Alanin): $m/z = 274,0 [M+H]^+$

APS-DNP-*L*-Alanin: ¹⁷⁹ 579 mg FDNP-*L*-Alanin (2 mmol) und 360 mg NaHCO₃ wurden in 35 mL HPLC-gradientenreinem Wasser und 70 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. 1,8 g Aminopropylsilica (0,56 mmol N) wurden zugegeben und 22 Stunden bei 40 °C rotiert. Das modifizierte Silica wurde filtriert, mit HPLC-gradientenreinem Wasser und Aceton gewaschen und anschließend über CaCl₂ getrocknet.

APS-DNP-*D*-Alanin wurde analog hergestellt.

Elementaranalyse: siehe **Tabelle 6-1**

Packen von Kapillarsäulen

Kapillarsäule mit gebrannter Fritte für die Micro-HPLC: Siehe auch **Abbildung 8-1**. 1) Eine unbehandelte Fused-Silica-Kapillarsäule (100 µm ID) wurde an einem Ende ca. 2 cm mit einer Suspension aus nativem Kieselgel (10 µm) und Wasser durch Kapillarkräfte gefüllt. Nach dem Trocknen des Silicas wurden zwei vorläufige Fritten mit einem Frittenbrenner (weiß-orange glühender Metalldraht, 45 s) gebrannt. 2) Eine Suspension aus 10 mg des DNB-*D*-Alanin-Silica oder DNB-*L*-Alanin-Silica und 100 mL Methanol wurde über ein Sechsweg-Ventil in eine Vorratsschleife und unter Druck (Sykam HPLC-Pumpe, 340 bar) in die Kapillarsäule gefüllt (Packungsdauer 120 Minuten). Zur Erhöhung der Partikeldichte befand sich die Säule während des Packvorgangs im Ultraschallbad. 3) Als Fließmittel wurde HPLC-gradientenreines Wasser verwendet, das auch während des endgültigen Frittenbrennens (nicht glühender Metalldraht, 5 x 30 s) die Kapillarsäule durchströmt, um eine Verschließung der Frittenporen zu verhindern. 4) Die vorläufige Fritte wurde abgetrennt und unter Druck das überschüssige Packmaterial entfernt. Mit einem Tropfen rauchender Salpetersäure wurde neben der Fritte die Polyamid-Schicht entfernt um ein Detektionsfenster zu erhalten.

8 Experimenteller Teil

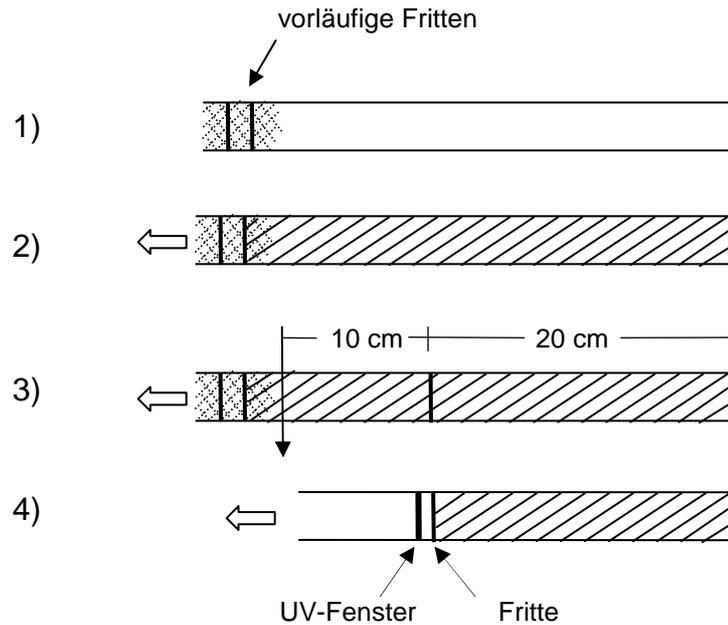


Abbildung 8-1: Packvorgang einer Kapillarsäule mit gebrannter Fritte.

Kapillarsäule mit PEEK-Kopplung für die Micro-HPLC/ESI-MS: Eine Transferkapillare (50 μm ID, variabler Länge) wurde über eine PEEK-Kopplung (mit Edelstahlsieb 1/32'' von Grom) an die zu packende Kapillarsäule (150 μm ID) verschraubt. Die Säule wurde anschließend mit einer Suspension aus 10 mg des DNB-*D*-Alanin-Silica oder DNB-*L*-Alanin-Silica und 100 mL Methanol über ein Sechs-Wege-Ventil und unter Druck (Sykam HPLC-Pumpe, 340 bar) über 120 Minuten gepackt. Zur dichten Packung befand sich die Säule während des Packvorgangs wiederum im Ultraschallbad. Als Fließmittel wurde HPLC-gradientenreines Wasser verwendet. Anschließend wurde die Kapillarsäule mit einer PEEK-Kopplung, an die eine zweite Transferkapillare (50 μm ID, variabler Länge) gekoppelt war, verschlossen.

8 Experimenteller Teil

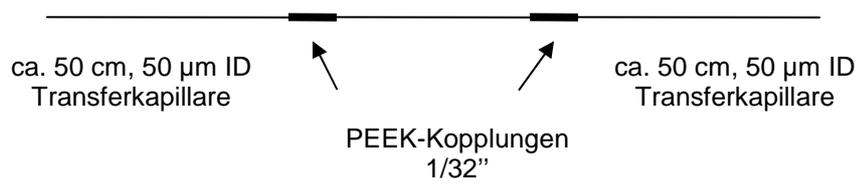


Abbildung 8-2: Gepackte Kapillarsäule mit PEEK-Kopplungen und Transferkapillaren.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die quantitative Enantiomeranalytik von α -Aminosäuren nach Derivatisierung unter Verwendung der enantioselektiven Gaschromatographie. Hierfür wurden zunächst Proben von Tyrosin-Enantiomeren und -Racematen unterschiedlicher Alterung und Herkunft (Institutsbestände, kommerziell erhältliche Racemate verschiedener Hersteller sowie ein an der Universität synthetisiertes Racemat) eingesetzt. Die Derivatisierung der Proben erfolgte mit Acetylchlorid in Ethanol für die Carboxylgruppe und Trifluoressigsäure für die Aminogruppe, um die Flüchtigkeit der Verbindungen zu erhöhen. Für die gaschromatographischen Messungen wurden Chirasil-*D*-Val, Chirasil-*L*-Val und Lipodex E als chirale stationäre Phasen sowie ein Flammenionisationsdetektor verwendet. Um Aussagen über die Präzision der Untersuchungen, ihre Reproduzierbarkeit und eventuelle systematische Fehler machen zu können, wurde die Methode validiert und im Fall von einem Tyrosin-Racemat mit den Ergebnissen aus einer zweiten, unabhängigen Analysemethode ohne vorherige Derivatisierung verglichen. Die Datenkorrelation erfolgte mit Hilfe der enantioselektiven Kapillarelektrophorese und UV-Detektion bei 200 nm unter Verwendung von zwei unterschiedlichen chiralen Selektoren (2-HP- α -CD, HS- γ -CD). Für die Validierung wurden Messungen zur Bestimmung der Enantiomerenanteile mehrmals durchgeführt und daraus Mittelwerte sowie absolute und relative Standardabweichungen berechnet. Dabei wurde festgestellt, dass bei der Bestimmung der racemischen Tyrosin-Probe die Präzision der Messungen mit Chirasil-*D*-Val (GC), Chirasil-*L*-Val (GC) sowie 2-HP- α -CD (CE) und HS- γ -CD (CE) sehr hoch war, da für den *D*-Enantiomerenanteil von 49,70 % die Standardabweichung $\pm 0,11$ % betrug. Ein exaktes Tyrosin-Racemat mit jeweils 50 % Enantiomerenanteil war kommerziell nicht erhältlich. Deshalb wurde von einer Arbeitsgruppe des anorganischen Instituts der Universität Tübingen racemisches Tyrosin synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Dieses konnte als nahezu racemisch bestimmt werden. Desweiteren konnten jeweils in *D*- und *L*-Tyrosin Verunreinigungen des entgegengesetzten Enantiomers von bis zu 0,1 % mit einer akzeptablen Standardabweichung mittels GC (Chirasil-*D*-Val und Chirasil-*L*-Val) nachgewiesen werden. Die Validierung des Systems Aminosäure - Derivatisierung - GC wurde auf die Quantifizierung der Enantiomerenverhältnisse in neun weiteren Racematen (Orn, Ala, Asp, Cys, Leu, Lys, Phe, Pro und Ser) sowie der Menge an Verunreinigung von Alanin-Enantiomeren durch das jeweilige Gegenenantomer erweitert.

9 Zusammenfassung

Die validierte Methode wurde eingesetzt, um den Kristallisationsverlauf bzw. die Löslichkeit von Tyrosin-Enantiomeren und -Racematen in wässriger Lösung zu untersuchen. Die Ergebnisse wurden mit Daten aus einer Publikation verglichen, in der ein Zusammenhang von enantioselektiver Kristallisation und terrestrischer Homochiralität von proteinogenen α -Aminosäuren diskutiert wird. Es wurden geringe Unterschiede in den Kristallisationsendpunkten von drei *D*-Tyrosin Proben ($2,70 \pm 0,10$ mmol/L) und fünf *L*-Tyrosin-Proben ($3,09 \pm 0,05$ mmol/L) festgestellt. Bei den Racemat-Proben wurde eine Erhöhung des *L*-Tyrosin-Anteils in der Kristallisationslösung von 0,1 – 2,3 % bestimmt. Jedoch fielen die Differenzen und der Anstieg von *L*-Tyrosin weit geringer als in der Publikation beschrieben aus. Es zeigte sich, dass unabhängig von der Frage, ob Paritätsverletzungsenergie­differenz und Homochiralität miteinander verknüpft sind, die hier vorgestellte Methode eine genauere Quantifizierung der Enantiomerenverhältnisse als die in der Literatur angegebene Methode zulässt. Eine weitere Publikation, in der der Kristallisationsverlauf in Deuteriumoxid mit dem in Wasser verglichen wird, scheint einen Zusammenhang zwischen den Protonenkernspins in Wasser und der bevorzugten Kristallisation eines Enantiomers nahe­zulegen. Jedoch ließ sich auch für Kristallisationen in Deuteriumoxid unter Verwendung der erwähnten Kombination aus Derivatisierung und enantioselektiver GC an Chirasil-*L*-Val zeigen, dass im Rahmen der Messgenauigkeit kein lösungsmittelabhängiger Unterschied (Deuteriumoxid und Wasser) im Enantiomerenverhältnis existiert. Ein anderes Autorenteam untersuchte die Racemisierung von *D*- und *L*-Alanin, wenn sich das System unter Druck in einem Temperaturgradienten befindet. Dies soll die Bedingungen von hydrothermalen Quellen simulieren. Durch Aufbau eines ähnlichen Systems und anschließender enantioselektiver Gaschromatographie der derivatisierten Proben konnte ein Vergleich zu den in der Literatur veröffentlichten, nach Derivatisierung mittels HPLC gewonnenen Ergebnissen gezogen werden. Dabei stimmen die Ergebnisse der GC mit denen der HPLC darin überein, dass eine Racemisierung stattfindet. Jedoch konnte der Grad der Racemisierung nicht in dem in der Literatur genannten quantitativen Umfang und auch nicht in seiner Enantiomerenabhängigkeit bestätigt werden. Bei Verwendung des Alanin-Racemats ergaben sich keine Unterschiede in den Enantiomerenanteilen, weder durch die hier verwendete noch durch die in der Literatur beschriebene Methode.

In einer weiteren Veröffentlichung wurden Homopolypeptide mit einem durch die Paritätsverletzung induzierten Effekt in Verbindung gebracht. Allerdings wurden die

9 Zusammenfassung

Enantiomerenzusammensetzungen der Polypeptide dabei nicht genau quantifiziert. Während sich für α -Aminosäuren die Enantiomerenverhältnisse in Kristallen bzw. in wässriger Lösung durch Derivatisierung und enantioselektive Gaschromatographie bestimmen ließen, erforderte die Frage der Enantiomerenreinheit in *D*-, *L*- und *DL*-Homopolypeptiden eine andere Vorgehensweise. Es wurde versucht, die Enantiomerenanteile von α -Aminosäuren vor und nach der Synthese von Poly-*D*- und *L*-Glutaminsäure₂₄ und Poly-*D*- und *L*-Lysin₂₄ sowie nach der sauer katalysierten Spaltung von kommerziell erhältlichem Poly-*DL*-Alanin und Poly-*DL*-Lysin zu bestimmen. Für die Peptidsynthese wurden geschützte Aminosäuren verwendet, deren optische Reinheit vor der Synthese nach Abspaltung der Schutzgruppe und Derivatisierung als *N(N)*-TFA/*O*-Et-Derivat mittels GC/MS quantifiziert wurde. Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der α -Aminosäuren in den Peptiden wurde versucht, die Methode des deuterium labelling mit GC/MS-Kopplung anzuwenden. Im Fall der kommerziell erhältlichen Polypeptide Poly-*DL*-Alanin und Poly-*DL*-Lysin war dies möglich. Für Poly-*L*-Lysin₂₄ wurde das Enantiomerenverhältnis nach Hydrolyse ohne deuterium labelling mit GC/MS bestimmt.

Enantiomerenreine Homopolypeptide besitzen auch potentiell Bedeutung als chirale Selektoren in der Kapillarelektrophorese. In dieser Arbeit wurden Trennversuche durchgeführt, jedoch waren diese unter den beschriebenen Bedingungen nicht von Erfolg gekrönt. Auch hier sind Optimierungen denkbar.

Eine weitere Gruppe von chiralen Selektoren umfasst Cyclohexapeptide, die mit 2,4-Dinitrophenyl-Aminosäuren (DNP-Aminosäuren) enantioselektiv wechselwirken können. Während in der Literatur der Einsatz von Cyclohexapeptiden in der CE beschrieben wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, durch Anwendung des reziproken chiralen Erkennungsprinzips (RCEP) mittels Micro-HPLC/MS einen Superselektor zu finden. Dazu wurde DNP-*D*- bzw. DNP-*L*-Alanin auf Silica immobilisiert und erste Experimente unter Variation des Fließmittels und des Aufbaus auf der *L*-Ala-modifizierten Säule durchgeführt. Eine Retention konnte beobachtet werden, allerdings war das resultierende Signal im Chromatogramm von einer großen Halbwertsbreite und starkem Tailing geprägt. Optimierungen sind insbesondere bei der Herstellung der Säulenmaterialien und im Aufbau des Micro-HPLC/MS-Systems möglich.

10 LITERATUR

¹ Fluck, E.; Becke-Goehring, M.: Einführung in die Theorie der quantitativen Analyse. *Steinkopff Verlag Darmstadt* (1990) 7. Auflage.

² Herausgeber Gaede, P.-M.: GEO Themenlexikon Band 4 Astronomie. Planeten, Sterne, Galaxien. *Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG Mannheim*(2007).

³ Rauchfuss, H.: Chemische Evolution und der Ursprung des Lebens. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg* (2005).

⁴ Hazen, R.M.: Der steinige Ursprung des Lebens. *Spektrum der Wissenschaft, Dossier: Grenzen des Wissens* (2002) 2: 28-35.

⁵ Dose, K.: Präbiotische Evolution und der Ursprung des Lebens. *Chemie in unserer Zeit* (1987) 6: 177-185.

⁶ Thoms, S.P.: Ursprung des Lebens. *Fischer Kompakt Frankfurt* (2005).

⁷ Klein, S.: Die Tagebücher der Schöpfung. Vom Urknall zum geklonten Mensch. *Deutscher Taschenbuch Verlag (dtv) München* (2000 / 2004).

⁸ Lexikonredaktion des Verlags; Projektleitung: Hogen, H.: Der Brockhaus Philosophie, Ideen, Denker, Begriffe. F.A. Brockhaus, Mannheim (2004).

⁹ Gaarder, J.; Haefs, G.: Sofies Welt – Roman über die Geschichte der Philosophie.

¹⁰ Hoppe, B.; Martens, J.: Aminosäuren – Bausteine des Lebens. *Chemie in unserer Zeit* (1983) 2: 41-53.

¹¹ a) Börner, G: Schöpfung ohne Schöpfer. *Deutsche Verlags-Anstalt München* (2006). b) Hamel, J.: Meilensteine der Astronomie. *Kosmos* (2006). c) Geiger, H.: Auf der Suche nach

10 Literatur

Leben im Weltall. *Kosmos* (2005). d) H. Karttunen, Kröger, P.; Oja, H.; Poutanen, M.; Donner, K. J.: *Fundamental Astronomy*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1996) 3. Auflage. e) Cowley, C.R.: *An Introduction to Cosmochemistry*. Cambridge University Press (1995). f) Hattrup, D.: *Der Traum von der Weltformel*. Herder Freiburg (2006).

¹² Shaw, A.M.: *Astrochemistry*. Wiley-VCH Weinheim (2006).

¹³ Audretsch, J.: *Physikalische Kosmologie I und II*. In: Audretsch, J.; Mainzer, K. (Hrsg.): *Vom Anfang der Welt*. Beck, München (1989).

¹⁴ Weinberg, S.: *Die ersten drei Minuten*. Piper München (1977).

¹⁵ Peebles, P.J.E.: *Kosmologie - ein Zustandsbericht*. *Spektrum der Wissenschaft* (2001) 3: 40-42.

¹⁶ Ostriker, J.R.; Steinhardt, P.J.: *Die Quintessenz des Universums*. *Spektrum der Wissenschaft* (2001) 3: 32-40.

¹⁷ Börner, G.: *Kosmologie*. Fischer Kompakt Frankfurt (2002).

¹⁸ Miller, S.L.; Schopf, J.W.; Lazcano, A.: *Oparin's „origin of life“: sixty years later*. *J. Mol. Evol.* (1997) 44: 341-353

¹⁹ Fry, I.: *The origins of research into the origins of life*. *Endeavour* (2006) 30(1): 24-28

²⁰ Miller, S.L.: *A production of amino acids under possible primitive earth conditions*. *Science* (1953) 117: 528-529.

²¹ Bada, J.L.; Lazcano, A.: *Prebiotic soup – revisiting the Miller experiment*. *Science* (2003) 300: 745-746.

10 Literatur

- ²² Rubey, W.W.: Geologic history of sea water. An attempt to state the problem. *Geological Society of America Bulletin* (1951) 62: 1111-1148.
- ²³ Abelson, P.H.: Amino acids formed in "primitive atmospheres". *Science* (1956) 124: 935.
- ²⁴ Dose, K.; Rauchfuss, H.: Chemische Evolution und der Ursprung lebender Systeme. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart* (1975).
- ²⁵ Owen, T.; Cess, R.D.; Ramanathan, V.: Enhanced CO₂ greenhouse to compensate for reduced solar luminosity on earth. *Nature* (1979) 277: 640-642.
- ²⁶ Watson, J.D.; Crick, F.H.C: Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* (1953) 171: 737-738.
- ²⁷ Dickerson, R.E.: Die Feinstruktur der DNA-Helix. *Spektrum der Wissenschaft* (1984) 2: 78-95.
- ²⁸ Stryer, L.: Biochemie. *Spektrum der Wissenschaft*, völlig neubearbeitete Auflage, Heidelberg (1990).
- ²⁹ a) Bada, J.L.; Lazcano, A.: Some like it hot, but not the first biomolecules. *Science* (2002) 296: 1982-1983. b) Orgel, L.E.: The origin of life – a review of facts and speculations. *TIBS* (1998) 23: 491-495. c) Joyce, G.F.: RNA evolution and the origins of life. *Nature* (1989) 338: 217-224. d) Joyce, G.F.: The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* (2002) 418: 214-221. e) Joyce, G.F.: Gelenkte Evolution von Biomolekülen. *Spektrum der Wissenschaft* (1993) 2: 52-59. f) Nelson K.E.; Levy, M.; Miller, S.L: Peptide nucleic acids rather than RNA may have been the first genetic molecules. *PNAS* (2000) 97: 3868-3871.
- ³⁰ Hoffmann, U.: Aus der Chemie des Tons. *Angew. Chem.* (1968) 80: 736-747.
- ³¹ Weiss, A.: Organische Derivate der glimmerartigen Schichtsilicate. *Angew. Chem.* (1963) 75: 113-122.

10 Literatur

- ³² Weiss, A.: Replikation und Evolution in anorganischen Systemen. *Angew. Chem.* (1981) 93: 843-854.
- ³³ Cairns-Smith, A.G.: Bestanden die ersten Lebensformen aus Ton? *Spektrum der Wissenschaft* (1985) 8: 82-91.
- ³⁴ Holleman, A.F.; Wiberg, E.: Lehrbuch der Anorganischen Chemie. *Walter de Gruyter* Berlin New York (1995) 101. Auflage.
- ³⁵ Macdonald, K.C.; Luyendyk, B.P.: Tauchexpedition zur Ostpazifischen Schwelle. *Spektrum der Wissenschaft* (1981) 7: 73-87.
- ³⁶ Hékinian, R.: Vulkane am Meeresgrund. *Spektrum der Wissenschaft* (1984) 9: 62-72.
- ³⁷ Edmond, J.M.; Damm, K. von: Heiße Quellen am Grund der Ozeane. *Spektrum der Wissenschaft* (1983) 6: 74-87.
- ³⁸ Schlegel, H.G.; Zaborosch, C.: Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag* Stuttgart (1992), 7. überarbeitete Auflage.
- ³⁹ Russel, M.: Der heiße Ursprung des Lebens. *Spektrum der Wissenschaft* (2007) 1: 75-81.
- ⁴⁰ Holm, N.G.: Further research. Chapter 10. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (1992) 22: 181-190.
- ⁴¹ Hennessey, R.J.-C.; Holm, N.G.; Engel, M.H.: Abiotic synthesis of amino acids under hydrothermal conditions and the origin of life: a perpetual phenomenon? *Naturwiss.* (1992) 79: 361-365.
- ⁴² Holm, N.G.; Andersson, E.: The stability of some selected amino acids under attempted redox constrained hydrothermal conditions. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (2000) 30: 9-23.

10 Literatur

- ⁴³ a) Wächtershäuser, G.: Before enzymes and templates: theory of surface metabolism. *Microbiol. Rev.* (1988) 52: 452-484. b) Wächtershäuser, G.: Pyrite formation, the first energy source for life: a hypothesis *Syst. Appl. Microbiol.* (1988) 10: 207-210.
- ⁴⁴ Wächtershäuser, G.: The case for the chemoautotrophic origin of life in an iron-sulfur world. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (1990) 20: 173-176.
- ⁴⁵ Wächtershäuser, G.: Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* (1992) 58: 85-201.
- ⁴⁶ Wächtershäuser, G.: An all-purine precursor of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* (1988) 85: 1134-1135.
- ⁴⁷ Cody, G.D.; Boctor, N.Z.; Filley, T.R.; Hazen, R.M.; Scott, J.H.; Sharma, A.; Yoder, H.S., Jr.: Primordial carbonylated iron-sulfur compounds and the synthesis of pyruvate. *Science* (2000), 289: 1337-1340.
- ⁴⁸ Oró, J.: Comets and the formation of biochemical compounds on the primitive earth. *Nature* (1961) 190: 389-390
- ⁴⁹ Cronin, J.R.; Pizzarello, S: Amino acids of the Murchison meteorite. III. Seven carbon acyclic primary α -amino alkanolic acids. *Geochim. Cosmochim. Acta* (1986) 50: 2419-2427.
- ⁵⁰ Cronin, J.R.; Pizzarello, S; Epstein, S.; Krishnamurthy, R.V.: Molecular and isotopic analyses of the hydroxyl acids, dicarboxylic acids, and hydroxydicarboxylic acids of the Murchison meteorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* (1993) 57: 4745-4752.
- ⁵¹ Cooper, G.W.; Onwo, W.M.; Cronin, J.R.: Alkyl phosphonic acids and sulfonic acids in the Murchison meteorite. *Geochim. Cosmochim. Acta* (1992) 56: 4109-4115.
- ⁵² Tepfer, D.; Leach, S.: Plant seeds as model vectors for the transfer of life through space. *Astrophysics and Space science* (2006) 306: 69-75.

10 Literatur

- ⁵³ Schwell, M.; Jochims, H.-W.; Baumgaertel, H.; Dulieu, F.; Leach, S.: VUV photochemistry of small biomolecules. *Planetary and Space Science* (2006) 54: 1073-1085.
- ⁵⁴ Bonner, W.A.: The origin and amplification of biomolecular chirality. *Orig. Life Evol. Biosphere*. (1991) 21: 59-111.
- ⁵⁵ Quack, M.: Structure and dynamics of chiral molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* (1989) 28: 571; in Deutsch: *Angew. Chem.* (1989) 101: 588-604.
- ⁵⁶ Ebeling, W.; Freund, J.; Schweitzer, F.: Komplexe Strukturen: Entropie und Information. *B. G. Teubner Stuttgart Leipzig* (1998).
- ⁵⁷ Bohm, D.: Quantum theory. *Dover Publications, Inc., New York* (1951) by Prentice-Hall, New Jersey.
- ⁵⁸ Fließbach, T.: Quantenmechanik. Lehrbuch zur Theoretischen Physik III. *Spektrum Akademischer Verlag* 4. Auflage (2005), Elsevier GmbH, München.
- ⁵⁹ Duden: Rechnen und Mathematik. *Dudenverlag* Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 6. überarbeitete Auflage (2000).
- ⁶⁰ Haken, H.; Wolf, H.C.: Atom- und Quantenphysik. *Springer Verlag* Berlin, Heidelberg, New York 7. Auflage (2000).
- ⁶¹ Barron, L.D.: Symmetry and molecular chirality. *Chem. Soc. Rev.* (1986) 15: 189-223.
- ⁶² Hegstrom, R.A.; Rein, D.W.; Sandars, P.G.H.: Calculations of the parity nonconserving energy difference between mirror-image molecules. *J. Chem. Phys.* (1980) 73: 2329-2341
- ⁶³ Harrys, R.A.; Stodolosky, L.: Quantum beats in optical activity and weak interactions. *Phys. Lett.* (1978) 78B: 313-317.

10 Literatur

- ⁶⁴ Barron, L.D.: True and false chirality and parity violation. *Chem. Phys. Letters* (1986) 123: 423-427.
- ⁶⁵ Barron, L.D.: True und false chirality and absolute asymmetric synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* (1986) 108: 5539-5542.
- ⁶⁶ Hund, F.: Zur Deutung der Molekülspektren III. Bemerkungen über das Schwingungs- und Rotationsspektrum bei Molekülen mit mehr als zwei Kernen. *Z. Phys.* (1927) 43: 805-826.
- ⁶⁷ Lee, T.D.; Yang, C.N.: Questions of parity conservation in weak interactions. *Phys. Rev.* (1956) 104: 254-258.
- ⁶⁸ Wu, C.S.; Ambler, E.; Hayward, R.W.; Hoppes, D.D.; Hudson, R.P.: Experimental test of parity conservation in beta decay. *Physical Review* (1957) 105: 1413-1415.
- ⁶⁹ Feynman, R.P.: Physikalische Fingerübungen für Fortgeschrittene. *Piper Verlag GmbH München, Zürich*, 3. Auflage (2006).
- ⁷⁰ Fritzsche, H.: Quarks. *Piper Verlag GmbH München, Zürich*, (1992).
- ⁷¹ Salam, A.: The role of chirality in the origin of life. *J. Mol. Evol.* (1991) 33: 105-113.
- ⁷² Bouchiat, M.A.; Bouchiat, C.C.: Weak neutral currents in atomic physics. *Phys. Letters* (1974) 48B: 111-114.
- ⁷³ Gottselig, M.; Quack, M.: Steps towards molecular parity violation in axially chiral molecules. I Theory for allene and 1,3-difluoroallene. *J. Chem. Phys.* (2005) 123: 084305.
- ⁷⁴ Bonner, W.A.: Parity violation and the evolution of biomolecular homochirality. *Chirality* (2000) 12: 114-126.

- ⁷⁵ Quack, M.: How important is parity violation for molecular and biomolecular chirality? *Angew. Chem. Int. Ed.* (2002) 41: 4618 – 4630; in Deutsch: *Angew. Chem.* (2002) 114: 4812-4825.
- ⁷⁶ Avalos, M.; Babiano, R.; Cintas, P.; Jiménez, J.L.; Palacios, J.C.: From parity to chirality: chemical implications revisited. *Tetrahedron Asymm.* (2000) 11: 2845-2874.
- ⁷⁷ MacDermott, A.J.: Electroweak enantioselection and the origin of life. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (1995) 25: 191-199.
- ⁷⁸ Tranter, G.E.: The parity violating energy differences between enantiomers of α -amino acids. *Mol. Phys.* (1985) 56: 825-838.
- ⁷⁹ Chauvat, D.; Guéna, J.; Jacquier, P.; Lintz, M.; Bouchiat, M.A.: Amplifications of atomic L-R asymmetries by stimulated emission: experimental demonstration of sensitivity enhancements valuable for parity violation measurements. *Eur. Phys. J. D* (1998) 1: 169-176.
- ⁸⁰ Quack, M.; Stohner, J.: Paritätsverletzung in Molekülen und die physikalisch-chemischen Grundlagen der Chiralität. *Nachrichten aus der Chemie* (März 2006) 54: 282-284.
- ⁸¹ Lente, G.: Stochastic analysis of the parity-violating energy differences between enantiomers and its implications for the origin of biological chirality. *J. Phys. Chem. A* (2006) 110: 12711-12713.
- ⁸² Crassous, J.; Chardonnet, C.; Saue, T.; Schwerdtfeger, P.: Recent experimental and theoretical developments towards the observation of parity violation (PV) effects in molecules by spectroscopy. *Org. Biomol. Chem.* (2005) 3: 2218-2224.
- ⁸³ Morozov, L.L.; Kuz'min, V.V.; Goldanskii, V.I.: Comparative analysis of the role of statistical fluctuations and factor of advantage (parity non-conservation) in the origins of optical activity. *Origins of Life* (1983) 13: 119-138.

10 Literatur

- ⁸⁴ Wang, W.; Yi, F.; Ni, Y.; Zhao, Z.; Jin, X.; Tang, Y.: Parity violation of electroweak force in phase transitions of single crystals of D- and L-alanine and valine. *J. Biol. Phys.* (2000) 26: 51- 65.
- ⁸⁵ Sullivan, R.; Pyda, M.; Pak, J.; Wunderlich, B.; Thompson, J.R.; Pagni, R.; Pan, H.; Barnes, C.; Schwerdtfeger, P.; Compton, R.: Search for electroweak interactions in amino acids crystals. II. The Salam Hypothesis. *J. Phys. Chem.* (2003) 107: 6674-6680.
- ⁸⁶ Nemoto, A.; Horie, M.; Imai, E.-I.; Honda, H.; Hatori, K.; Matsuno, K.: Enantiomeric excess of amino acids in hydrothermal environments. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (2005) 35: 167-174.
- ⁸⁷ Matsuno, K.; Nemoto, A.: Racemization of amino acids in hydrothermal environments: a contribution of temperatur gradient. *Progress in Biological Chirality* ed. by Pályi, G.; Zucchi, C.; Caglioti, L. (2004) Chapter 16: 203-208.
- ⁸⁸ Shinitzky, M.; Nudelman, F.; Barda, Y.; Haimovitz, R.; Chen, E.; Deamer, D.W.: Unexpected differences between D- and L-tyrosine lead to chiral enhancement in racemic mixtures. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (2002) 32: 285-297.
- ⁸⁹ Shinitzky, M.; Elitzur, A.C.; Deamer, D.W.: Deviation from physical identity between D- and L-tyrosine. *Progress in Biological Chirality* (2004) 27: 329-337, ed. by Pályi, G.; Zucchi, C. and Caglioti, L., Elsevier, New York (2004).
- ⁹⁰ Scolnik, Y.; Portnaya, I.; Cogan, U.; Tal, S.; Haimovitz, R.; Fridkin, M.; Elitzur, A.C.; Deamer, D.W.; Shinitzky, M.: Subtle differences in structural transition between poly-L- and poly-D-amino acids of equal length in water. *Physical Chemistry Chemical Physics* (2006) 8: 333-339.
- ⁹¹ Avalos, M.; Babiano, R.; Cintas, P.; Jimenez, J.L.; Palacios, J.C.: Symmetry breaking by spontaneous crystallization – Is it the most plausible source of terrestrial handedness we have long been looking for? – A reappraisal. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (2004) 34: 391-405.

10 Literatur

- ⁹² Tranter, G.E.: The effects of parity violation on molecular structure. *Chem. Phys. Lett.* (1985) 121: 339-342.
- ⁹³ Lahav, M.; Weissbuch, I.; Shavit, E.; Reiner, C.; Nicholson, G.J.; Schurig, V.: Parity violating energetic difference and enantiomorphous crystals – caveats; reinvestigation of tyrosine crystallization. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (2006) 36: 151-170.
- ⁹⁴ Weissbuch, I.; Leiserowitz, L.; Lahav, M.: Stochastic „Mirror-Symmetry Breaking“ via self-assembly, reactivity and amplification of chirality; relevance to abiotic conditions. *Topics in Current Chemistry* (2005) 259 (Prebiotic Chemistry): 123-165.
- ⁹⁵ Bondy, S.; Harrington, R.D.: L-Amino acids and D-glucose bind stereospecifically to a colloidal clay. *Science* (1979) 203: 1243-1244.
- ⁹⁶ Cody, A.M.; Cody, R.D: Chiral habit modifications of gypsum from epitaxial-like adsorption of stereospecific growth inhibitors. *J. Cryst Growth* (1991) 113: 508-519.
- ⁹⁷ Cintas, P.: Chirality of living systems: A helping hand from crystals and oligopeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2002) 41: 1139-1145; in Deutsch: *Angew. Chem.* (2002) 114: 1187-1193.
- ⁹⁸ Hazen, R.M.; Filley, T.R.; Goodfried, G.A.: Selective adsorption of L- and D-amino acids on calcite: Implications for biochemical homochirality. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (2001) 98: 5487-5490.
- ⁹⁹ Klabunovskii, E.; Thiemann, W.: The role of quartz in the origin of optical activity on earth. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (2000) 30: 431-434.
- ¹⁰⁰ Bonner, W.A.; Kavasmaneck, P.R.; Martin, F.S.; Flores, J.J.: Asymmetric adsorption of alanine by quartz. *Science* (1974) 186: 143-144.
- ¹⁰¹ Bonner, W.A.; Kavasmaneck, P.R: Asymmetric adsorption of DL-alanine hydrochloride by quartz. *J. Org. Chem.* (1976) 41: 2225-2226.

10 Literatur

- ¹⁰² Kavasmaneck, P.R; Bonner, W.A.: Adsorption of amino acids derivatives by d- and l-quartz. *J. Am. Chem. Soc.* (1977) 99: 44-50.
- ¹⁰³ Bonner, W.A.: Chirality and life. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (1995) 25: 175-190.
- ¹⁰⁴ Buschmann, H.; Thede, R.; Heller, D.: New developments in the origin of the homochirality of biologically relevant molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2000) 39: 4033-4036; in Deutsch: *Angew. Chem.* (2000) 112: 4197-4199.
- ¹⁰⁵ Soai, K.; Sato, I.; Shibata, T.: Asymmetric autocatalysis and the origin of homochirality of biomolecules. *Methodol. Asym. Catalysis ACS Symp. Ser.* (2004) 880: 85-102.
- ¹⁰⁶ Shibata, T.; Yamamoto, J.; Matsumoto, N.; Yonekubo, S.; Osanai, S.; Soai, K.: Amplification of slight enantiomeric imbalance in molecules based on asymmetric autocatalysis: The first correlation between high enantiomeric enrichment in a chiral molecule and circularly polarized light. *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120: 12157-12158.
- ¹⁰⁷ Singleton, D.A.; Vo, L.K.: A few molecules can control the enantiomeric outcome. Evidence supporting absolute asymmetric synthesis using the Soai asymmetric autocatalysis. *Org. Lett.* (2003) 5: 4337-4339.
- ¹⁰⁸ Rubenstein, E.; Bonner, W.A.; Noyes, H.P.; Brown, G.S: Supernovae and life. *Nature* (1983) 306: 118-118.
- ¹⁰⁹ Bonner, W.A.; Rubenstein, E.: Supernovae, neutron stars and biomolecular chirality. *Biosystems* (1987) 20: 99-111.
- ¹¹⁰ Cline, D.B.: Supernova antineutrino interactions cause chiral symmetry breaking and possibly homochiral biomaterials for life. *Chirality* (2005) 17: S234-S239.
- ¹¹¹ Cronin, J.R.; Pizzarello, S.: Enantiomeric excess in meteoric amino acids. *Science* (1997) 275: 951-955.

- ¹¹² Bernstein, M.P.; Dworkin, J.P.; Stanford, S.A.; Cooper, G.W.; Allamandola, L.J.: Racemic amino acids from the ultraviolet photolysis of interstellar ice analogues. *Nature* (2002) 416: 401-403.
- ¹¹³ Muñoz Caro, G.M.; Meierhenrich, U.J.; Schutte, W.A.; Barbier, B.; Arcones Segovia, A.; Rosenbauer, H.; Thiemann W.H.-P.; Brack, A.; Greenberg, J.M.: Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues. *Nature* (2002) 416: 403-406.
- ¹¹⁴ Meierhenrich, U.J.; Thiemann, W.H.-P.: Photochemical concepts on the origin of biomolecular asymmetry. *Orig. Life Evol. Biosphere.* (2004) 34: 111-121.
- ¹¹⁵ Bogdanski, A.M.: Darstellung und Charakterisierung von großringigen Cyclodextrinen sowie deren Anwendung in der Chromatographie. *Dissertation* der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2007).
- ¹¹⁶ Frank, H.; Nicholson, G.J.; Bayer, E.: Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with a novel chiral stationary phase. *J. Chromatogr. Sci.* (1977) 15: 174-178.
- ¹¹⁷ Jung, G.; Hofstetter, H.; Feiertag, S.; Stoll, D.; Hofstetter, O.; Wiesmüller, K.-H.; Schurig, V.: Cyclopeptidbibliotheken als neue chirale Selektoren für die Kapillarelektrophorese. *Angew. Chem.* (1996) 108: 2261-2263.
- ¹¹⁸ Haginaka, J.: Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations. *J. Chromatogr.* (2001) 906: 253-273.
- ¹¹⁹ Ruderisch, A.: Synthese von Calixaren- und Resorcinarenderivaten und deren Anwendung in Chromatographie und Nanotechnologie. *Dissertation* der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2003).
- ¹²⁰ Yashima, E.: Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr. A* (2001) 906: 105-125.

10 Literatur

¹²¹ Schulte, M.: Chiral derivatization chromatography. *Chiral Separation Techniques* ed. by Subramanian, G. (2001) Chapter 7: 185-202.

¹²² Kromidas, S.: Validierung in der Analytik. *Wiley-VCH Verlag GmbH* (2003) 2. korrigierter Nachdruck, Weinheim, Deutschland.

¹²³ Danzer, K.; Hobert, H.; Fischbacher, C.; Jagemann, K.-U.: Chemometrik. Grundlagen und Anwendungen. *Springer Verlag* (2001) Berlin, Heidelberg, Deutschland.

¹²⁴ a) Kromidas, S.: Handbuch Validierung in der Analytik. *Wiley-VCH Verlag GmbH* (2001) 1. Nachdruck, Weinheim, Deutschland. b) International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Step. 4: Guideline on validation of analytical procedures, Q2A (1994). c) International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Step. 4: Guideline on validation of analytical procedures: Methodology, Q2B (1996). d) Funk, W.; Dammann, V.; Donnevert, G.: Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie. *Wiley-VCH Verlag GmbH* (2005) zweite, vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Weinheim, Deutschland.

¹²⁵ Rood, D.: Troubleshooting in der Kapillar-Gas-Chromatographie, *Chromatographic Methods* (1991) *Hüthig Buch Verlag GmbH*, Heidelberg, Deutschland.

¹²⁶ Schurig, V.: Terms for the quantitation of a mixture of stereoisomers. *Enantiomer* (1996) 1(2): 139-143.

¹²⁷ Leibnitz, E.; Struppe, H. G.: Handbuch der Gaschromatographie. *Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G* (1984) 3. Auflage, Leipzig, Deutschland.

¹²⁸ Frank, H.; Nicholson, G.J.; Bayer, E.: Enantiomer labeling, a method for the quantitative analysis of amino acids, *J. Chromatogr.* (1978) 167: 187-196.

¹²⁹ a) Schurig, V.; Juza, M.; Preschel, M.; Nicholson, G.J.; Bayer, E.: Gas-chromatographic enantiomer separation of proteinogenic amino acid derivatives: comparison of Chirasil-Val and Chirasil- γ -Dex used as chiral stationary phases. *Enantiomer* (1999) 4: 297-303. b)

10 Literatur

Schurig, V.: Separation of enantiomers by gas chromatography. *J. Chromato. A* (2001) 906: 275-299. c) Schurig, V.: Chiral separations using gas chromatography. *Trends in analytical chemistry* (2002) 21 (9+10): 647-661. d) Schurig, V.: Enantiomer separation by gas chromatography on chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* (1994) 666: 111-129.

¹³⁰ Die Kapillarsäulen wurden von Herrn G. J. Nicholson hergestellt.

¹³¹ Reiner, C.; Nicholson, G.J.; Nagel, U.; Schurig, V.: Evaluation of enantioselective gas chromatography of minute deviations from racemic composition of α -amino acids with emphasis on tyrosine: accuracy and precision of the method. *Chirality* (2007) 19: 401-414.

¹³² Levkin, P.A.; Ruderisch, A.; Schurig, V.: Combining the enantioselectivity of a cyclodextrin and a diamide selector in a mixed binary gas-chromatographic chiral stationary phase. *Chirality* (2006) 18: 49-63.

¹³³ Sicoli, G.: Enantiorecognition mechanism of cyclodextrins: an NMR spectroscopic and gas-chromatographic approach to evaluate the role of the cavity in the enantioselective interactions. Applications of "acyclodextrins" in enantiodiscrimination experiments. *Dissertation* der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2006).

¹³⁴ Husek, P.: Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *J. Chromatogr.* (1991) 552: 289-299.

¹³⁵ Husek, P.: Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents. *J. Chromatogr. B* (1998) 717: 57-91.

¹³⁶ Junge, M.: Untersuchung zur Trennbarkeit von Aminosäurederivaten. *PostDoc Bericht* des AK Schurig der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2005).

¹³⁷ Abe, I.; Nakahara, T.: Enantiomer separation of amino acids as their N-alkyloxycarbonyl alkylamide derivatives by chiral phase capillary GC. *J. High Resol. Chromatogr.* (1996) 19: 511-514.

10 Literatur

- ¹³⁸ Koppenhöfer B.: Stereoselektivität in Enzymen und Modellsystemen. *Habilitationsschrift* der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (1989).
- ¹³⁹ Clarity 2.3 Reference guide, www.dataapex.com, © 2003 DataApex Ltd., Podohradská1, 15500 Praha 5, The Czech Republic
- ¹⁴⁰ Armstrong, D.W.; Kullman, J.P.; Chen, X.; Rowe, M.: Composition and chirality of amino acids in aerosol/dust from laboratory and residential enclosures. *Chirality* (2000) 13: 153-158.
- ¹⁴¹ La, S.; Ahn, S.; Kim, J.H.; Goto J.; Choi, O.K.; Kim, K.R.: Enantioseparation of chiral aromatic amino acids by capillary electrophoresis in neutral and charged cyclodextrin selector modes. *Electrophoresis* (2002) 23: 4123-4131.
- ¹⁴² Wätzig, H.; Degenhard, M.; Kunkel, A.: Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications. *Electrophoresis* (1998) 19: 2695-2752.
- ¹⁴³ Schurig, V.: Determination of enantiomeric purity by direct methods. Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry, 4th Edition, Vol. E21a, Stereoselective Synthesis, Part A. Stuttgart, New York: Thieme (1995) 147-192.
- ¹⁴⁴ Grob, K. Jr.; Grob, G.; Grob, K.: Comprehensive, standardized quality test for glass capillary columns. *J. Chromatogr.* (1978) 156: 1-20.
- ¹⁴⁵ a) Falbe, J.; Regitz, M.: Römpp-Lexikon Chemie. *Georg Thieme Verlag* Stuttgart 10. Auflage (1999). b) Wagner, G.A.: Altersbestimmung von jungen Gesteinen und Artefakten: physikalische und chemische Uhren in Quartärgeologie und Archäologie. Enke Stuttgart (1995). c) Bada, J.L.: Amino acids racemization dating of fossil bones. *Ann. Rev. Earth Planet. Sci.* (1985) 13: 241-268.
- ¹⁴⁶ Beyer, H.; Walter, W.: Lehrbuch der Organischen Chemie. S. *Hirzel Verlag, Stuttgart* (1991), 22. Auflage.

10 Literatur

- ¹⁴⁷ Tikhonov, V.I.; Volkov, A.A.: Separation of water into its ortho and para isomers. *Science* (2002) 296: 2363.
- ¹⁴⁸ Weast, R.C.; Tuve, G.L.: Handbook of chemistry and physics. *CRC Press* 53rd Edition 1972-1973.
- ¹⁴⁹ Hoppe, B.; Martens, J.: Aminosäuren – Herstellung und Gewinnung. *Chemie in unserer Zeit* (1984) 3: 73-86.
- ¹⁵⁰ Wartenberg, A.: Einführung in die Biotechnologie. *Gustav Fischer Verlag Stuttgart* (1989).
- ¹⁵¹ Streitwieser, A.; Heathcock, C.H.; Kosower, E.M.: Organische Chemie. *VCH Verlagsgesellschaft Weinheim* (1994), 2. Auflage.
- ¹⁵² Habermehl, G.; Hammann, P.E.; Krebs, H.C.: Naturstoffchemie. *Springer Verlag Berlin, Heidelberg* (2002), 2.Auflage.
- ¹⁵³ Imai, E.-I.; Honda, H.; Hatori, K.; Brack, A.; Matsuno, K: Elongation of oligopeptides in a simulated submarine hydrothermal system. *Science* (1999) 283: 831-833.
- ¹⁵⁴ a) Aswad, D.W.: Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of o-phthaldialdehyde. *Anal. Biochem.* (1984) 137: 405-409. b) Zhao, M.; Bada, J.L.: Determination of alpha-dialkylamino acids and their enantiomers in geological samples by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of o-phthaldialdehyde. *J. Chromatogr. A* (1995) 690: 55-63.
- ¹⁵⁵ Jordan, R.B.: Mechanismen anorganischer und metallorganischer Reaktionen. *Teubner Verlag Stuttgart* (1994).

10 Literatur

- ¹⁵⁶ Kawamura, K.; Yukioka, M.: Kinetics of the racemization of amino acids at 225 – 275 °C using a real-time monitoring method of hydrothermal reactions. *Thermochim. Acta* (2001) 375: 9-16.
- ¹⁵⁷ Bada, J.L.: Kinetics of racemization of amino acids as a function of pH. *J. Am. Chem. Soc.* (1972) 94: 1371-1373.
- ¹⁵⁸ Bada, J.L.; Hoopes, E.; Ho, M-S.: Combined amino acids in pacific ocean waters. *Earth Planet. Sci. Lett.* (1982) 58: 276-284.
- ¹⁵⁹ Smith, G.G.; Williams, K.M.; Wonnacott, D.M.: Factors affecting the rate of racemization of amino acids and their significance to geochronology. *J. Org. Chem.* (1978) 43: 1-5.
- ¹⁶⁰ Cohen, B.A.; Chyba, C.F.: Racemization of meteoritic amino acids. *Icarus* (2000) 145: 272-281.
- ¹⁶¹ Khatib, A.A.; Engel, M.H.: Electronic spectral studies of nickel(II) alanine complexes. *Inorg. Chim. Acta* (1989) 166: 273-277.
- ¹⁶² Smith, G.G.; Khatib, A.; Reddy, G.S.: Effect of nickel(II) and cobalt(III) and other metal ions on the racemization of free and bound L-alanine. *J. Am. Chem. Soc.* (1983) 105: 293-295.
- ¹⁶³ a) Schönheit, P.; Moll, J.; Thauer, R.K.: Nickel, cobalt, and molybdenum requirement for growth of methanobacterium thermoautotrophicum. *Arch. Microbiol.* (1979) 105: 123.
Vgl. auch Nickelproteine und ein neues Porphinoid. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* (1982) 923: 30.
b) Rosenberg, B.; van Camp, L.; Krigas, T.: Inhibition of cell division in E. coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature (London)* (1965) 698: 205. c) Rosenberg, B.; van Camp, L.; Trosko, J.E.; Mansour, V.H.: Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature (London)* (1969) 385: 222. d) Kaim, W.; Schwederski, B.: Bioanorganische Chemie. *Teubner Studienbücher Chemie* (1995) 2. Auflage.

10 Literatur

- ¹⁶⁴ Frank, H.; Woiwode, W.; Nicholson, G.J.; Bayer, E.: Determination of optical purity of amino acids in proteins. *Stable Isot., Proc. Int. Conf., 3rd* (1979) 165-172.
- ¹⁶⁵ Liardon, R.; Ledermann, S.; Ott, U.: Determination of D-amino acids by deuterium labelling and selected ion monitoring. *J. Chromatogr.* (1981) 203: 385-395.
- ¹⁶⁶ Die Massenspektren wurden von Herrn Graeme Nicholson aufgenommen und interpretiert.
- ¹⁶⁷ Budzikiewicz, H.; Schäfer, M.: Massenspektrometrie *Wiley-VCH Verlag GmbH* (2005) 5. Auflage, Weinheim, Deutschland.
- ¹⁶⁸ Gerhardt, J.; Nicholson, G.J.: Validation of a GC-MS method for determination of the optical purity of peptides. *Peptides 2000*, Proceedings of the European Peptide Symposium, 26th, Montpellier, France, Sept. 10-15, 2000 (2001).
- ¹⁶⁹ Riekkola, M.-L.; Jönsson, A.Å.: Preliminary IUPAC recommendation „Terminology for analytical electromigration techniques“, (2001).
- ¹⁷⁰ Scriba, G.K.E.: Enantiomer separation by capillary electrophoresis. *Chiral Separation Techniques* ed. Subramanian, G. (2007) 10: 333-368.
- ¹⁷¹ a) Desiderio, C.; Fanali, S.: Chiral analysis by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selector. *J. Chromatogr. A.* (1998) 807: 37-56. b) Armstrong, D.W.; Nair, U.B.: Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotics as chiral selectors. *Electrophoresis* (1997) 18: 2331-2342. c) Armstrong, D.W.; Rundlett, K.L.; Chen, J.-R.: Evaluation of the macrocyclic antibiotic vancomycin as a chiral selector for capillary electrophoresis. *Chirality* (1994) 6: 496-509. d) Rundlett, K.L.; Gasper, M.P.; Zhou, E.Y.; Armstrong, D.W.: Capillary electrophoretic enantiomeric separations using the glycopeptid antibiotic, teicoplanin. *Chirality* (1996) 8: 88-107. e) Ekborg-Ott, K.H.; Zientara, G.A.; Schneiderheinze, J.M.; Gahm, K.; Armstrong, D.W.: Avoparcin, a new macrocyclic antibiotic chiral run buffer additive for capillary electrophoresis. *Electrophoresis* (1999) 20: 2438-2457. f) Jiang, Z.; Kang, J.; Bischoff, D.; Bister, B.; Süssmuth, R.D.; Schurig, V.: Evaluation of balhimycin as a chiral selector for enantioresolution by capillary electrophoresis.

Electrophoresis (2004) 25: 2687-2692. g) Dermaux, A.; Lynen, F.; Sandra, P: Chiral capillary electrochromatography on a vancomycin stationary phase. *J. High Resolut. Chromatogr.* (1998) 21: 575-576. h) Karlsson, C.; Karlsson L.; Armstrong, D.W.; Owens, P.K.: Evaluation of a vancomycin chiral stationary phase in capillary electrochromatography using polar organic and reversed-phase modes. *Anal. Chem.* (2000) 72: 4394-4401.

¹⁷² a) Vespalec, R.; Sustacek, V.; Bocek, P.: Prospects of dissolved albumin as chiral selector in capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* (1993) 638: 255-261.

b) Zhu, X.; Ding, Y.; Lin, B.; Jakob, A.; Koppenhoefer, B.: Study of enantioselective interactions between chiral drugs and serum albumin by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* (1999) 20: 1869-1877.

¹⁷³ a) Thibodeaux, S.J.; Billiot, E.; Torres, E.; Valle B.C.; Warner, I.M.: Enantiomeric separation using polymeric L-glutamate surfactant derivates: Effect of increasing steric factors. *Electrophoresis* (2003) 24: 1077-1082. b) Otsuka, K.; Kashihara, M.; Kawaguchi, Y.; Koike, R.; Hisamitsu, T.: Micellar electrokinetic chromatography with sodium-N-dodecanoyl-L-glutamate and digitonin. *J. Chromatogr. A* (1993) 652: 253-257.

¹⁷⁴ a) Kamande, M.W.; Zhu, X.; Kapnissi-Christodoulou, C.; Warner, I.M.: Chiral separations using a polypeptide and polymeric dipeptide surfactant polyelectrolyte multilayer coating in open-tubular capillary electrochromatography. *Anal. Chem.* (2004) 76: 6681-6692. b) Rmaile, H.H.; Schlenoff, J.B.: Optically active polyelectrolyte multilayers as membranes for chiral separations. *J. Am. Chem. Soc.* (2003) 125: 6602-6603.

¹⁷⁵ Chiari, M.; Desperati, V.; Manera, E.; Longhi, R.: Combinatorial synthesis of highly selective cyclohexapeptides for separation of amino acid enantiomers by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* (1998) 70: 4967-4973.

¹⁷⁶ a) Welch, C.J.; Protopopova, M.N.; Bhat, G.: Microscale synthesis and screening of chiral stationary phases. *Enantiomer* (1998) 3: 471-476. b) Wu, Y.; Wang, Y.; Yang, A.; Li, T.: Screening of mixture combinatorial libraries for chiral selectors: A reciprocal chromatographic approach using enantiomeric libraries. *Anal. Chem.* (1999) 71: 1688-1691.

c) Bluhm, L.H.; Wang, Y.; Li, T.: An alternative procedure to screen mixture combinatorial libraries for selectors for chiral chromatography. *Anal. Chem.* (2000) 72: 5201-5205.

¹⁷⁷ Zahn, H.; Meienhofer, J.: Reaktionen von 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol mit Insulin. 1. Mitt. Synthese von Modellverbindungen. *Makromol. Chem.* (1958) 26: 126-152.

¹⁷⁸ Yu, L.W.; Floyd, T.R.; Hartwick, R.A.: The synthesis and characterization of chemically bonded silica-based zwitterion-exchangers for HPLC. *J. Chromatogr. Sci.* (1986) 24: 177-182.

¹⁷⁹ Brückner, H.; Leitenberger, M.: LC-separation of derivatized DL-amino acids by aminopropylsilica-bonded Marfey's reagent and analog. *Chromatographia* (1996) 42: 683-689.

¹⁸⁰ Die Synthese wurde von Frau Dr. D. Wistuba entwickelt.

¹⁸¹ Unger, K.K.; Becker, N.; Roumeliotis, P.: Recent developments in the evaluation of chemically bonded silica packings for liquid chromatography. *J. Chromatogr.* (1976) 125: 115-117.

¹⁸² Meyer, V.R.: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. *Wiley-VCH Verlag GmbH* (2004) Aktualisierte, 9. Auflage, Weinheim, Deutschland.

¹⁸³ Markovich, R.J.; Qju, X.; Nichols, D.E.; Pidgeon, C.: Silica subsurface amine effect on the chemical stability and chromatographic properties of end-capped immobilized artificial membrane surfaces. *Anal. Chem.* (1991) 63: 1851- 1860.

¹⁸⁴ a) Buszewski, B.; Jezierska, M.; Welniak, M.; Berek, D.: Survey and trends in the preparation of chemically bonded silica phases for liquid chromatographic analysis. *J. High Resol. Chromatogr.* (1998) 21: 267- 281. b) Berendsen, G.E.; Pikaart, K.A.; Galan, L. de: Preparation of various bonded phases for HPLC using monochlorosilanes. *J. Liquid Chromatogr.* (1980) 3: 1437-1464.

Meine akademischen Lehrer waren:

W. Armbruster, G. Becker, H. Bertagnoli, R. Carle, M. Edelhäuser, F. Effenberger, G. Gauglitz, E. Götz, W. P. Hammes, V. Jäger, W. Kaim, K. W. Klinkhammer, V. Kottke, K.-A. Kovar, U. Kull, S. Laufer, H. Liebich, M. Lederer[†], C. Mailänder, H.-J. Paus, H. Pauschmann[†], E. Roduner, Th. Schleidt, V. Schurig, W. Schwack, R. Winter

LEBENS LAUF

- 26.02.1976 Clarissa Dorothee Marzini (geb. Reiner) geboren in Münsingen
Ehemann Michael Marzini
Eltern Lioba Reiner (geb. Roggenstein) und Gerhard Reiner
Geschwister Lothar Reiner und Margita Reiner
- 1982 - 1986 Grundschule in Pfronstetten, Kreis Reutlingen
- 1986 - 1991 Hauptschule in Zwiefalten und Esslingen
- 1991 - 1993 Hauswirtschaftlich-sozialpädagogische Berufsfachschule in
Esslingen, Abschluss: Fachschulreife
- 1993 - 1996 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium in Esslingen, Abschluss:
Allgemeine Hochschulreife
- 1996 - 2002 Studium der Lebensmittelchemie an den Universitäten Stuttgart und
Hohenheim
- August 2001 – März 2002 Wissenschaftliche Abschlussarbeit:
Nachweis von Roundup ready Soja in Lebensmitteln über
Glyphosat-Metaboliten – Synthese von Standardsubstanzen,
Abschluss: Diplom Lebensmittelchemikerin
- Mai 2002 – April 2003 Praktikantin der Lebensmittelchemie beim Chemischen und
Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart zum Erlangen des Staats-
examens, Abschluss: Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
- August 2003 – März 2004 Mitglied im Graduiertenkolleg „Analytische Chemie“
- August 2003 – Dezember 2007 Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. V. Schurig am Institut für
Organische Chemie der Universität Tübingen über das Thema
„Grenzen der quantitativen Enantiomeranalytik von α -Aminosäuren“