

**Mathematische und statistische Verfahren
in der chiralen Kapillarelektrophorese:
Modellierung des Migrationsverhaltens und
Anwendung in der Validierung von Analyseverfahren**



seit 1548

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena von

Diplom-Pharmazeutin Manuela Hammitzsch-Wiedemann

geboren am 02. August 1979 in Wippra

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gerhard K. E. Scriba, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Jochen Lehmann, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Bezhan Chankvetadze, School of Exact and Natural Sciences, Tbilisi State University

Tag der öffentlichen Verteidigung:

13. November 2009

Meiner Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2003 bis August 2009 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Scriba angefertigt. Bei meinem Doktorvater bedanke ich mich für die interessante Aufgabenstellung, seine stetige Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine wertvollen Anregungen. All das hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann und Herrn Prof. Dr. Bezhan Chankvetadze danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich für das sehr angenehme und entspannte Arbeitsklima sowie die Unterstützung bedanken.

Bei Frau Dr. Irina Terekhova sowie Herrn Dr. Ramiseti Nageswara Rao bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Thomas Dahse danke ich für die sehr aufmerksame Durchsicht meiner Arbeit und seine hilfreichen Anmerkungen.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Ehemann Marc für seine moralische und auch anderweitig vielseitige Unterstützung, besonders in den letzten Wochen. Meinem Sohn Niklas danke ich für die schönen Momente, die mir viel Kraft für meine Arbeit gegeben haben.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | vi |
| Symbolverzeichnis | vii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 DAS ANALYTISCHE TRENNVERFAHREN KAPILLARELEKTROPHORESE | 1 |
| 1.1.1 Überblick | 1 |
| 1.1.2 Das Prinzip | 1 |
| 1.1.3 Die Apparatur | 3 |
| 1.1.4 Anwendung..... | 4 |
| 1.2 ENANTIOMERENTRENNUNGEN IN DER KAPILLARELEKTROPHORESE | 5 |
| 1.2.1 Hintergrund..... | 5 |
| 1.2.2 Enantioselektive Trennmethoden | 5 |
| 1.2.3 Cyclodextrine als chirale Selektoren | 6 |
| 1.3 TRENNMECHANISMEN IN DER ENANTIOSELEKTIVEN KAPILLARELEKTROPHORESE | 8 |
| 1.3.1 Der Einfluss der Komplexierung auf die Enantiomerentrennung..... | 8 |
| 1.3.2 Das Gleichgewichtsmodell für die Enantiomerentrennung einer schwachen Base | 10 |
| 1.4 DIE UMKEHR DER MIGRATIONSREIHENFOLGE VON ENANTIOMEREN | 14 |
| 1.5 HARNSTOFF ALS ADDITIV | 17 |
| 1.6 KALORIMETRIE ZUR CHARAKTERISIERUNG DES KOMPLEXIERUNGSVERHALTENS | 18 |
| 1.7 VALIDIERUNG VON REINHEITSBESTIMMUNGEN | 19 |
| 1.7.1 Überblick | 19 |
| 1.7.2 Prüfung auf Robustheit mittels statistischer Versuchsplanung..... | 20 |
| 2 Zielsetzung | 24 |
| 3 Übersicht zu den Manuskripten | 25 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | Manuskripte | 29 |
| 4.1 | MANUSKRIFT 1 | 29 |
| 4.2 | MANUSKRIFT 2 | 46 |
| 4.3 | MANUSKRIFT 3 | 63 |
| 4.4 | MANUSKRIFT 4 | 74 |
| 4.5 | MANUSKRIFT 5 | 83 |
| 5 | Gesamtdiskussion | 95 |
| 5.1 | MIGRATIONSPHÄNOMENE BEI DIPEPTIDEN IN DER CHIRALEN KAPILLARELEKTROPHORESE | 95 |
| 5.1.1 | Theoretische Betrachtungen zur Umkehr der Migrationsreihenfolge | 95 |
| 5.1.1.1 | Systematische Klassifizierung der Analyte entsprechend dem Trennverhalten | 95 |
| 5.1.1.2 | Mechanismen zur Umkehr der Migrationsreihenfolge | 100 |
| 5.1.1.3 | Praktische Relevanz der theoretischen Ausführungen | 104 |
| 5.1.2 | Die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge von Dipeptiden in Gegenwart neutraler Cyclodextrine | 105 |
| 5.1.2.1 | Die Abhängigkeit der Enantiomerentrennung von pH-Wert und Cyclodextrin- Konzentration | 106 |
| 5.1.2.2 | Mechanismen | 108 |
| 5.1.3 | Der Einfluss von Harnstoff auf die Enantiomerentrennung von Dipeptiden | 112 |
| 5.1.3.1 | β -Cyclodextrin als chiraler Selektor | 113 |
| 5.1.3.2 | Heptakis-(2,6-dimethyl)- β -cyclodextrin als chiraler Selektor | 116 |
| 5.1.3.3 | Schlussfolgerungen zum Additiv Harnstoff | 119 |
| 5.2 | KAPILLARELEKTROPHORETISCHE METHODE ZUR PRÜFUNG AUF REINHEIT VON ETOMIDAT MIT EINBEZUG DER CHIRALEN VERUNREINIGUNG | 120 |
| 5.2.1 | Entwicklung und Optimierung der Methode | 121 |
| 5.2.2 | Validierung der Methode | 122 |
| 5.2.2.1 | Richtigkeit, Präzision, Spezifität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität und Arbeitsbereich | 122 |
| 5.2.2.2 | Robustheit | 124 |
| 6 | Zusammenfassung | 127 |
| 7 | Summary | 130 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 132 |
| 9 | Formelverzeichnis | 136 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| ANOVA | Varianzanalyse, engl. Analysis of Variances |
| Boc-Phe | N-tertiär-Butoxycarbonyl-phenylalanin |
| CD | Cyclodextrin |
| CE | Kapillarelektrophorese, engl. Capillary Electrophoresis |
| CM- β -CD | Carboxymethyl- β -cyclodextrin (randomisiert) |
| CZE | Kapillarzonenelektrophorese, engl. Capillary Zone Electrophoresis |
| DM- β -CD | Heptakis-(2,6-dimethyl)- β -cyclodextrin |
| DoE | statistische Versuchsplanung, engl. Design of Experiments |
| EC | Elektrochromatographie |
| EOF | elektroosmotischer Fluss |
| EuAB | Europäisches Arzneibuch |
| GITC | 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-glucopyranosylisothiocyanat |
| HP- β -CD | (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin (randomisiert) |
| HS | Harnstoff |
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| IS | interner Standard |
| ITC | Isotherme Titrationskalorimetrie, engl. Isothermal Titration Calorimetry |
| MEKC | mizellare elektrokinetische Chromatographie |
| PLS | Partial Least Squares |
| S- β -CD | sulfatiertes β -Cyclodextrin (randomisiert) |
| SST | Systemeignungstest, engl. system suitability test |
| Su- β -CD | Succinyl- β -cyclodextrin (randomisiert) |
| TM- β -CD | Heptakis-(2,3,6-trimethyl)- β -cyclodextrin |
| USP | United States Pharmacopeia |

Symbolverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| α | Stoffmengenanteil |
| α_f | Stoffmengenanteil der ungebundenen Form |
| α_c | Stoffmengenanteil des Komplexes |
| μ_c | Komplexmobilität |
| $\mu_{+/CD}$ | elektrophoretische Mobilität der vollständig protonierten Spezies bei konstanter Cyclodextrin-Konzentration |
| μ_{eo} | elektroosmotische Mobilität |
| μ_{ep} | elektrophoretische Mobilität |
| $\mu_{ep/CD}$ | elektrophoretische Mobilität bei konstanter Cyclodextrin-Konzentration |
| μ_f | Mobilität der ungebundenen Form |
| μ_{tot} | Gesamtmobilität |
| ν | Viskosität |
| a_i | Faktoreinfluss |
| B | Analyt |
| CD | Cyclodextrin |
| E | elektrische Feldstärke |
| K | pH-abhängige Komplexbildungskonstante für die Cyclodextrin-Komplexierung |
| K_+ | Komplexbildungskonstante für die Cyclodextrin-Komplexierung von HB^+ |
| K_a | Dissoziationskonstante für das Gleichgewicht zwischen B und HB^+ |
| $K_{a/c}$ | Dissoziationskonstante für das Gleichgewicht zwischen $B \cdot CD$ und $HB \cdot CD^+$ |
| K_n | Komplexbildungskonstante für die Cyclodextrin-Komplexierung von B |
| l_{eff} | effektive Länge der Kapillare = Länge vom Kapillar-Inlet zum Detektorfenster |
| l_{tot} | Gesamtlänge der Kapillare |
| n | Anzahl der Faktoren |
| $OS_{Residual}$ | nicht durch die Regression erklärbare Abweichung der Zielgröße vom Gesamtmittelwert |

| | |
|----------------------|--|
| pK_a | pK_a -Wert für das Dissoziationsgleichgewicht zwischen B und HB^+ |
| $pK_{a/c}$ | pK_a -Wert für das Dissoziationsgleichgewicht zwischen $B \cdot CD$ und $HB \cdot CD^+$ |
| $pK_{a/CD}$ | pK_a -Wert bei konstanter Cyclodextrin-Konzentration |
| q | elektrische Ladung |
| Q | Wärmemenge |
| Q_{max} | maximale Wärmemenge bei vollständiger Komplexierung |
| $QS_{Modellfehler}$ | Modellfehler = nicht durch die Regression und nicht über den Zufallsfehler erklärbare Abweichung der Zielgröße vom Gesamtmittelwert |
| $QS_{Regression}$ | Summe aller quadrierten Abweichungen der durch Regression erhaltenen Schätzwerte der Zielgröße vom Gesamtmittelwert |
| QS_{Total} | Summe aller quadrierten Abweichungen der Messwerte der Zielgröße vom Gesamtmittelwert |
| $QS_{Zufallsfehler}$ | Zufallsfehler = Summe aller quadrierten Abweichungen der Messwerte der Zielgröße vom Mittelwert für nur die „Mittelpunkts-Experimente“ |
| r | Stokes'scher Radius |
| S | Selektivität |
| t_{eo} | Zeit des elektroosmotischen Flusses |
| t_{tot} | Migrationszeit einer Substanz |
| U | elektrische Spannung |
| v_{ep} | elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit |
| x_i | Faktor |
| y | Zielgröße |

1 Einleitung

1.1 DAS ANALYTISCHE TRENNVORFAHREN KAPILLARELEKTROPHORESE

1.1.1 Überblick

Die Kapillarelektrophorese (engl. Capillary Electrophoresis, CE) ist ein analytisches Trennverfahren, welches auf dem unterschiedlichen Wanderungsverhalten von elektrisch geladenen, in einer Elektrolytlösung gelösten Substanzen beruht. Dabei befinden sich die Substanzen in einer Kapillare unter dem Einfluss eines elektrischen Gleichstromfeldes. Der Stromfluss ist mit der Bildung von Joule'scher Wärme verbunden. Dies führt dazu, dass innerhalb des Trennmediums Temperaturdifferenzen auftreten, die zu einer relativ starken Konvektion führen. Durch die Verwendung von Kapillaren mit einem sehr kleinen inneren Durchmesser von 25 bis 100 μm werden die Konvektion und die damit verbundene Bandenverbreiterung maßgeblich reduziert. Die „Elektrophorese in offenen Kapillaren“ wurde 1981 von Jorgenson und Lukacs eingeführt [1].

Die CE umfasst ein Spektrum verschiedenartiger Trennmethode, welche auf unterschiedlichen Trennmechanismen basieren. Zumeist wird CE aber als Synonym für Kapillarzonenelektrophorese (engl. Capillary Zone Electrophoresis, CZE) verwendet. Bei der CZE wird nur eine einzige Elektrolytlösung (zumeist ein Puffer) mit einem definierten pH-Wert und gleichbleibender Zusammensetzung als Trennmedium verwendet, sodass innerhalb der Kapillare nach Anlegen der elektrischen Spannung ein konstantes elektrisches Feld entsteht. Weitere wichtige Trennmethode, vor allem für die Enantiomerentrennung, sind die Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) und die Elektrochromatographie (EC).

1.1.2 Das Prinzip

In der CZE (im Folgenden allgemein mit CE umschrieben) sowie bei allen anderen elektrokinetischen Trenntechniken, bei denen sich innerhalb der Kapillare ein konstantes elektrisches Feld ausbildet, ist die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens während des gesamten Trennprozesses gleichbleibend. Die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten bilden die Basis für die Trennung in der CE. Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} einer Substanz kann mit der elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} , einer von der elektrischen Feldstärke E unabhängigen Größe, charakterisiert werden.

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad (1)$$

Die elektrophoretische Mobilität ist proportional dem Quotienten aus elektrischer Ladung q und dem Stokes'schen Radius r des Analyten. Der Stokes'sche Radius ist nur definiert für sphärische Teilchen und beinhaltet auch die Solvathülle des Ions. Die Molekülform spielt eine zusätzliche Rolle. Weiterhin beeinflusst die Viskosität ν des verwendeten Trennpuffers die Mobilität.

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi \cdot \nu \cdot r} \quad (2)$$

Die elektrische Ladung des Analyten kann über die Modifikation von Puffereigenschaften wie pH-Wert sowie der Art und der Ionenstärke des Elektrolyten beeinflusst werden. Folglich kann über eine Veränderung dieser Parameter entscheidend Einfluss auf die Trennung zweier Substanzen genommen werden. Weiterhin ist die elektrophoretische Mobilität eine stark temperaturabhängige Größe, da die Puffereigenschaften, insbesondere die Viskosität, sehr von diesem Parameter abhängen.

Die bei der CE verwendeten Trennkapillaren aus amorphem Kieselglas (engl. fused silica) besitzen Silanolgruppen, die oberhalb eines pH-Wertes von 3,0 dissoziieren, sodass die Kapillaroberfläche negativ geladen ist. Im Inneren der Kapillare befindet sich demzufolge ein Überschuss an Kationen. Diese können frei diffundieren, werden aber auch durch elektrostatische Kräfte von der Kapillaroberfläche angezogen. Beim Anlegen einer Spannung wandert ein Teil dieser Kationen zur Kathode und nimmt die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. Dieser Lösungsmittelfluss ist der elektroosmotische Fluss (EOF). Da der EOF durch an der Kapillaroberfläche wirkende Kräfte erzeugt wird und deshalb auch an dieser im Vergleich zum Kapillarinneren die stärksten Reibungskräfte wirken, bildet sich in der Kapillare ein extrem flaches, stempelförmiges Strömungsprofil aus. Dies ist neben der geringen Konvektion der wesentliche Grund für die hohe Trennleistung in der CE. Der EOF beeinflusst die Gesamtwanderungsgeschwindigkeit aller Teilchen gleichermaßen. Da typischerweise der EOF zur Kathode hingerrichtet ist, lassen sich an dieser nicht nur Kationen, sondern auch Neutralteilchen und Anionen detektieren. Dabei werden die Neutralteilchen nicht getrennt.

Der EOF basiert auf der Dissoziation der Silanolgruppen und zeigt dadurch eine starke pH-Abhängigkeit. Der EOF unterliegt dabei einer typischen Hysterese. So stellt sich beim Wechsel der Spülprozedur bzw. des Trennpuffers erst nach einer gewissen Zeit wieder ein konstanter EOF ein. Zusätzlich zum pH-Wert beeinflussen andere Puffereigenschaften wie Ionenstärke und Viskosität den EOF. Des Weiteren besteht die Möglichkeit durch chemische Modifikation der Kapillaroberfläche den EOF zu verkleinern, vollständig zu unterdrücken oder auch in seiner Richtung umzukehren. Zumeist werden dazu Polymere verwendet, die entweder kovalent nach chemischer Vorbehandlung der Kapillaroberfläche über eine Zwischenschicht an diese gebunden werden oder die sich direkt adsorptiv an die Kapillaroberfläche anlagern [2,3]. Beispielsweise wird durch den Zusatz des kationischen

Polymers Hexadimetribromid (Polybrene), welches stark an der Kapillaroberfläche adsorbiert, die Richtung des EOFs umgekehrt. Demzufolge erfolgt die Detektion aller Teilchen dann im Umkehrmodus an der Anode [4].

Die Gesamtmobilität μ_{tot} einer Substanz ergibt sich aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Mobilität μ_{ep} und der elektroosmotischen Mobilität μ_{eo} , die die Größe des EOFs charakterisiert.

$$\mu_{\text{tot}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}} \quad (3)$$

Demnach lässt sich die elektrophoretische Mobilität einer Verbindung aus der Differenz der Gesamtmobilität und der elektroosmotischen Mobilität berechnen. Die Bestimmung der Mobilitäten erfolgt über die jeweiligen Migrationszeiten, der Migrationszeit der Substanz t_{tot} und der Zeit des EOFs t_{eo} . Der EOF kann durch Zusatz von neutralen EOF-Markersubstanzen, wie z.B. Dimethylsulfoxid, sichtbar gemacht werden. Unter Einbezug der angelegten elektrischen Spannung U , der effektiven Länge l_{eff} (Länge vom Kapillar-Inlet zum Detektorfenster) und der Gesamtlänge l_{tot} der Kapillare lässt sich dann die elektrophoretische Mobilität einer Substanz ermitteln.

$$\mu_{\text{ep}} = \frac{l_{\text{eff}} \cdot l_{\text{tot}}}{U} \cdot \left(\frac{1}{t_{\text{tot}}} - \frac{1}{t_{\text{eo}}} \right) \quad (4)$$

1.1.3 Die Apparatur

Der prinzipielle Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abb. 1 dargestellt. Die Trennkapillare besteht typischerweise aus amorphem Kieselglas und ist mit einer Polyimid-Schicht überzogen, welche an der Stelle des Detektionsfensters entfernt ist. Es werden Kapillaren mit einem inneren Durchmesser im Bereich zwischen 25 und 100 μm und mit Kapillarlängen von etwa 10 bis 100 cm verwendet. Die Trennkapillare lässt sich durch Luft- oder Flüssigkeitskühlung thermostatisieren. Die beiden Kapillarenden sowie die Elektroden tauchen jeweils in ein Vorratsgefäß (Vial) ein, in denen sich entweder der Trennpuffer oder Spüllösungen befinden. Die Elektroden sind mit einer Hochspannungsgleichstromversorgungsquelle verbunden. Für die Detektion stehen in der CE verschiedene Detektorarten zur Verfügung, wie der UV-Vis- und der Fluoreszenz-Detektor. Für spezielle Anwendungen können auch elektrochemische Detektionsarten, wie die Leitfähigkeitsdetektion, oder auch die Kopplung mit der Massenspektrometrie eingesetzt werden.

Bei einer typischen CE-Trennung wird die Kapillare mehrere Minuten mit Lauge und/oder Säure und dem entsprechenden Trennpuffer konditioniert. Nach dem vollständigen Befüllen der Kapillare mit Trennpuffer wird die Probe eingespritzt. Die Injektion kann hydrodynamisch durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß und Kapillarende, hydrostatisch über das Ausnutzen einer Höhendifferenz zwischen Probengefäß am Kapillar-Inlet und dem Puffergefäß am Kapillar-Outlet sowie elektrokinetisch durch Anlegen eines kurzen Spannungsimpulses erfolgen. Die Probenzone in der

Kapillare ist üblicherweise nur wenige Millimeter lang. Bereits eine Probenkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ erlaubt in den meisten Fällen eine vernünftige Quantifizierung. Nach dem Aufgeben der Probe wird das Probengefäß am Kapillar-Inlet durch ein Puffergefäß ausgetauscht und eine Hochspannung von bis zu 30 kV angelegt, wobei sich aufgrund der Richtung des EOFs die Kathode im Normalmodus am Kapillar-Outlet befindet. In der CE sind Stromstärken bis 200 μA und elektrische Leistungen bis 7 W üblich.

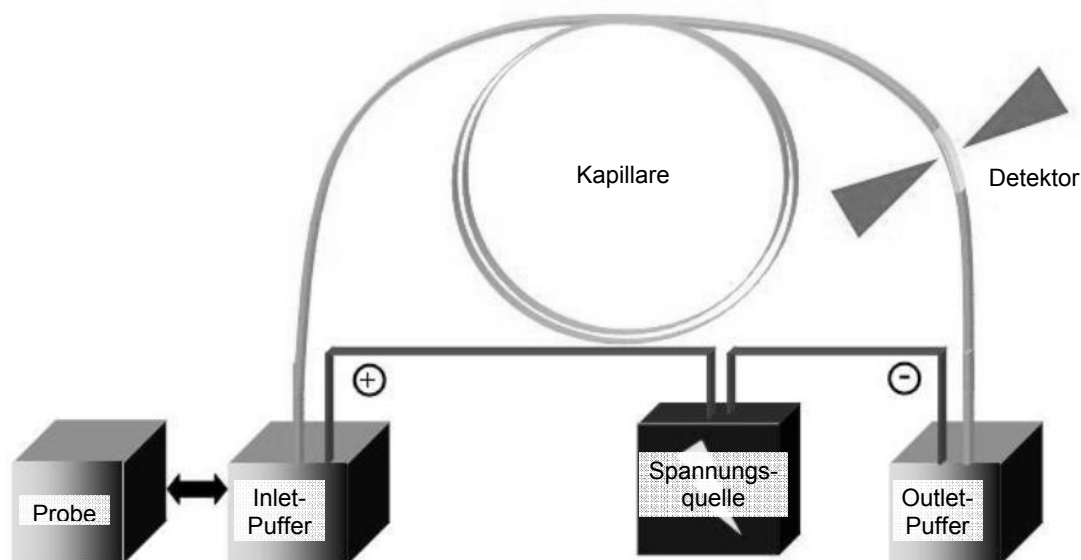


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer CE-Apparatur [5].

1.1.4 Anwendung

Die CE findet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle, der Klinischen Chemie, der Lebensmittelchemie sowie der Umweltanalytik für Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht als auch für höhermolekulare Peptide und Proteine. Vorteile sind dabei die hohe Trennleistung und die sehr gute Präzision der Methode sowie die einfache Bedienung der Instrumente verbunden mit der Automatisierbarkeit des gesamten Analysenprozesses. Die CE ist eine preiswerte Methode mit einem geringen Verbrauch an Chemikalien und Lösungsmitteln. Von Nachteil ist die relativ geringe Detektionsempfindlichkeit bei Verwendung der herkömmlichen UV/Vis-Detektoren. Außerdem weisen viele Substanzen eine schlechte Wasserlöslichkeit auf. Aufgrund der Gegensätzlichkeit der Trennmechanismen bietet die CE eine gute Alternative zur Flüssigchromatographie.

Die Aufnahme der CE als Methode in das Europäische Arzneibuch (EuAB 6, Kapitel 2.2.47) [6] sowie in die United States Pharmacopeia. (USP) [7] beweist deren Wichtigkeit als Analysemethode. Die Arzneibücher lassen die CE zur Identitäts- und Reinheitsprüfung von proteinogenen wie auch

niedermolekularen Arzneistoffen verwenden. Bei letzteren findet die CE vorwiegend Anwendung als Methode zur Prüfung auf chirale Verunreinigungen. Das EuAB lässt mittels Cyclodextrin(CD)-modifizierter MEKC für Levocabastinhydrochlorid auf „verwandte Substanzen“ unter Einbezug der diastereomeren trans-Verbindung prüfen. Die Enantiomerenreinheit von Ropivacainhydrochlorid Monohydrat wird ebenfalls unter Anwendung der chiralen CE untersucht [6].

Des Weiteren ermöglicht die CE die Bestimmung wichtiger physiko-chemischer Parameter, wie die von pK_a -Werten schwacher Elektrolyte [8] und von Bindungskonstanten [9, 10]. Ebenfalls ist die Bestimmung der Viskosität Newton'scher Flüssigkeiten bei Anwendung des Gesetzes von Hagen-Poiseuille mittels der CE-Apparatur möglich. Eine Flüssigkeit kann bei konstantem Druck und Temperatur durch die Kapillare gepumpt werden, wobei mit Hilfe eines Markers deren Geschwindigkeit ermittelt wird [11].

1.2 ENANTIOMERENTRENNUNGEN IN DER KAPILLARELEKTROPHORESE

1.2.1 Hintergrund

Etwa 40 % aller Arzneistoffe sind chiral. Aufgrund der Homochiralität pharmakologischer Zielstrukturen, wie Rezeptoren, Enzyme und Ionenkanäle, ist die gewünschte pharmakologische Wirkung zumeist auf ein Enantiomer beschränkt. Beispielsweise sind (-)-Adrenalin und (-)-Terbutalin 10- bzw. 4-fach potenter als ihre rechtsdrehenden Enantiomere [12]. In vielen Fällen gehen vom zweiten Enantiomer unerwünschte oder sogar toxische Nebenwirkungen aus. Während D-Penicillamin zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, Morbus Wilson und Schwermetall-Intoxikationen eingesetzt wird, ist das L-Enantiomer stark toxisch [13, 14]. Selbst wenn das zweite Enantiomer keine unerwünschten Nebenwirkungen zeigt, ist dessen Einnahme mit einer zusätzlichen Substanzbelastung für den Körper verbunden. Aus diesem Grund ist der Einsatz enantioselektiver Analysemethoden für pharmakokinetische, pharmakodynamische und toxikologische Studien sowie in der Qualitätskontrolle bei der Arzneimittelherstellung unerlässlich. Dabei gewinnt die CE neben chromatographischen Methoden an Beliebtheit. Durch das Vorhandensein einer Vielzahl verschiedener chiraler Selektoren ergeben sich Anwendungsmöglichkeiten für die Mehrzahl der chiralen Verbindungen.

1.2.2 Enantioselektive Trennmethoden

In achiraler Umgebung haben Enantiomere die gleichen physikochemischen Eigenschaften. Erst in einem chiralen Milieu nach Umsatz zu einem Diastereomerenpaar kann eine Trennung der Enantiomere

erfolgen. In der CE sind indirekte und direkte Methoden zur Enantiomerentrennung zu unterscheiden [15-17].

Die indirekte Methode basiert auf der Umsetzung der Enantiomere mit Derivatisierungsreagenzien zu stabilen Diastereomeren vor der eigentlichen CE-Trennung. Das entstandene Diastereomerenpaar kann dann in einem achiralen Trennmedium getrennt werden. Diese Methode wird nur in Ausnahmefällen angewendet. Nachteilig ist der hohe Zeitaufwand, der mit der Derivatisierung verbunden ist. Außerdem kann während des Derivatisierungsprozesses eine Racemisierung eintreten, und zudem werden sehr reine chirale Derivatisierungsreagenzien benötigt. Auch ist die Anwendbarkeit der Methode auf Verbindungen beschränkt, die bestimmte zur Umsetzung benötigte, funktionelle Gruppen wie Carboxyl- oder Aminofunktionen besitzen. Beispiele für Derivatisierungsreagenzien sind 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-gluco-pyranosylisothiocyanat (GITC) sowie 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid (Marfey's Reagenz). Deren Umsetzung mit racemischen Gemischen von diversen Aminosäuren führte zu Diastereomerenpaaren, die mittels CE getrennt werden konnten [18, 19].

Bei der direkten Methode wird dem Puffer ein chiraler Selektor zugesetzt. Es besteht aber auch die Möglichkeit den chiralen Selektor an die Kapillarwand oder in die Gelmatrix einer stationären Phase einzubinden. Dabei kommt es zur Bildung kurzlebiger diastereomerer Komplexe bestehend aus Analyt und chiralem Selektor. Die Trennung der Enantiomere beruht auf dem chromatographischen Prinzip mit dem Unterschied, dass auch der Selektor eine elektrophoretische Mobilität aufweisen kann. Als chirale Selektoren werden native CDs und ihre Derivate [20-23], chirale Kronenether [24], macrocyclische Antibiotika [25], Proteine [26, 27], lineare Polysaccharide [28] sowie chirale Mizellbildner [29, 30] verwendet. Ebenso kann eine Enantiomerentrennung durch Ligandenaustausch mit chiralen Metall-Ligand-Komplexen erfolgen [31].

1.2.3 Cyclodextrine als chirale Selektoren

Die am meisten verwendeten chiralen Selektoren sind native CDs und ihre neutralen bzw. geladenen Derivate. Struktur und Eigenschaften sowie Anwendung in der CE sind in zahlreichen Übersichtsartikeln beschrieben [20-23, 32]. CDs sind ringförmige Oligosaccharide bestehend aus α -1,4-glykosidisch verknüpfter D-Glucose, welche durch enzymatischen Abbau von Stärke mittels Cyclodextrin-Glycosyltransferasen gewonnen werden. In der analytischen Chemie werden α -, β - und γ -CDs verwendet, welche aus 6, 7 bzw. 8 Glucoseeinheiten aufgebaut sind. Die nativen, unsubstituierten CDs sind kegelstumpfförmig geformt mit einer hydrophoben Kavität und einer polaren Außenfläche. Die sekundären Hydroxylgruppen an den C2- und C3-Positionen der Glucoseeinheiten befinden sich an der breiten Außenseite des Konus, die primären an den C6-Positionen an der schmalen. Die Breite der Kavität korreliert mit der Anzahl der Glucose-Bausteine, die Tiefe hingegen ist bei allen Formen gleich.

Die nativen CDs unterscheiden sich stark in ihrer Löslichkeit. Während β -CD mit 18,5 mg/ml (16 mmol/l) wenig löslich ist, weisen α -CD und γ -CD eine 8- bzw. 12-fach höhere Löslichkeit auf [22].

Breite Anwendung in der chiralen CE finden CD-Derivate, welche durch chemische Modifikation der Hydroxylgruppen erhalten werden. Durch die Derivatisierung können neutrale wie auch ionische Substituenten in das Molekül eingebracht werden. Beispielsweise entstehen neutrale CD-Derivate durch Methylierung und Hydroxypropylierung, anionische durch Sulfatierung, Phosphatierung sowie Carboxymethylierung. Kationische CDs werden durch Einführung von Aminogruppen tragenden Substituenten erhalten. Zudem besteht die Möglichkeit CD-Derivate mit verschiedenartigen Substituenten zu synthetisieren.

Der Einsatz der CDs als chirale Selektoren beruht auf ihrem Vermögen mit einer Vielzahl von verschiedenen Substanzen Wirt-Gast-Beziehungen einzugehen. Zumeist bilden sich Einschlussverbindungen, bei denen das CD als Wirt den hydrophoben Teil des Gastmoleküls oder auch das gesamte Molekül in die hydrophobe Tasche aufnimmt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Gastmolekül nur an der Außenseite adsorbiert wird. Die Komplexbildung wird im Wesentlichen durch hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte und oftmals Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt.

CDs sind vielseitige chirale Selektoren. Sie zeigen chirale Erkennung für aromatische Verbindungen, aber auch für aliphatische Enantiomere. Ihre Struktur kann sich dem Analyten entsprechend der „Induced Fit“-Theorie anpassen. Generell ist die bei Verwendung neutraler CDs erreichbare Selektivität eher gering. Häufig gelingt eine bessere Trennung beim Einsatz geladener CDs, deren Enantiomer-Komplexe eine entgegengesetzte Ladung zur freien Verbindung aufweisen.

Durch Verwendung von CD-Derivaten wird das Spektrum der Einsatzmöglichkeiten erheblich erweitert. So ist mit ionischen CD-Derivaten auch eine Enantiomerentrennung neutraler Verbindungen möglich. Durch Einführung neuer funktioneller Gruppen kann die Struktur des CDs so modifiziert werden, dass sich eine bessere Passform für manche Substanzen ergibt, aber auch, dass sich die Stereoselektivität verändert. Besonders β -CD-Derivate weisen eine erheblich höhere Löslichkeit als die native Form auf, da die Tendenz zur Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen verringert wird. Allerdings hat die Derivatisierung den Nachteil, dass durch die fehlende Spezifität der meisten Derivatisierungsreaktionen ein Gemisch statistisch zufällig substituierter CDs entsteht, die sich in Grad und Position der Substitution unterscheiden. Da jedes Homologe bzw. Isomer ein eigenes chirales Erkennungsmuster aufweist, können bei Chargenwechsel beträchtliche Probleme mit der Reproduzierbarkeit auftreten. Durch Einsatz isomerenreiner, aber sehr teurer CD-Derivate können diese Probleme umgangen werden.

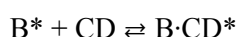
Die Anwendung dualer CD-Systeme, also der Zusatz zwei verschiedener CDs zum Trennpuffer, wird in der chiralen CE häufig praktiziert [33, 34]. Eines der CDs kann für die chirale Erkennung

verantwortlich sein und das andere als Carrier fungieren. Beispielsweise kann so überhaupt erst die Enantiomerentrennung einer neutralen Verbindung erreicht werden, wenn zusätzlich zu einem neutralen, chirale Erkennung zeigenden CD, ein geladenes CD zugesetzt wird. Weiterhin kann auf diese Art und Weise Einfluss auf die Analysenzeit genommen werden. Ein duales CD-System bietet zudem eine gute Alternative, wenn gleichzeitig mehrere chirale Verbindungen oder auch zusätzliche achirale Substanzen zu trennen sind.

1.3 TRENNECHANISMEN IN DER ENANTIOSELEKTIVEN KAPILLARELEKTROPHORESE

1.3.1 Der Einfluss der Komplexbildung auf die Enantiomerentrennung

Die Grundlage für die direkte Enantiomerentrennung in der CE bildet die Interaktion des chiralen Selektors mit beiden Enantiomeren. Stellvertretend für beide Enantiomere B^* (* für Unabhängigkeit vom Ladungszustand) kann die Komplexbildung mit einem CD



über die entsprechende Bindungskonstante K

$$K = \frac{[B \cdot CD^*]}{[B^*] \cdot [CD]} \quad (5)$$

beschrieben werden. Dabei ist die Ladung von Analyt und chiralem Selektor nicht festgelegt. Die elektrophoretische Mobilität jedes Stereoisomers ergibt sich aus der Summe der Mobilitäten aller beteiligten Spezies μ_i gewichtet entsprechend ihrem Stoffmengenanteil α_i .

$$\mu_{ep} = \sum_i \mu_i \cdot \alpha_i \quad (6)$$

Da durch Interaktion des Enantiomers mit dem CD dieses in der freien und gebundenen Form (bezeichnet mit den Indices f und c) vorliegt, gilt:

$$\mu_{ep} = \mu_f \cdot \alpha_f + \mu_c \cdot \alpha_c \quad (7)$$

Durch Ersetzen des Stoffmengenanteils mit den entsprechenden Konzentrationen ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität:

$$\mu_{ep} = \mu_f \cdot \frac{[B^*]}{[B^*] + [B \cdot CD^*]} + \mu_c \cdot \frac{[B \cdot CD^*]}{[B^*] + [B \cdot CD^*]} \quad (8)$$

Durch Kombination mit Gl. (5) kann die elektrophoretische Mobilität in Abhängigkeit von der CD-Konzentration dargestellt werden.

$$\mu_{ep} = \frac{\mu_f + \mu_c \cdot K \cdot [CD]}{1 + K \cdot [CD]} \quad (9)$$

Dabei sind die elektrophoretische Mobilität der ungebundenen Spezies μ_f und des Komplexes μ_c sowie die Bindungskonstante K pH-abhängige Größen. Damit Gl. (9) gilt, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein. Die Stöchiometrie der Komplexbildung mit dem chiralen Selektor weist das Verhältnis 1:1 auf und ist unabhängig von dessen Konzentration. Weiterhin zeigen die Bindungskonstanten keine Abhängigkeit von der Konzentration des chiralen Selektors. Die Pufferbestandteile interagieren nicht mit dem chiralen Selektor. Darüber hinaus ist es möglich, die Ionenstärke konstant zu halten. Des Weiteren kann die Konzentration des ungebundenen Selektors annähernd mit dessen Gesamtkonzentration gleichgesetzt werden. Letzteres ist der Fall, wenn die Bindungskonstanten relativ klein sind und die Konzentration des chiralen Selektors die Konzentration des Analyten um ein Vielfaches übersteigt. Diese Bedingungen werden weitgehend für die Interaktion von CDs mit den meisten Verbindungen erfüllt, sodass Gl.(9) das Verhalten der Enantiomere gut darstellt.

Um die Trennung zweier Enantiomere zu charakterisieren, sind beide Mobilitäten miteinander zu vergleichen. Ein Mobilitätsdifferenz-Modell ist von Wren und Rowe [35-37] beschrieben wurden. Alternativ kann das im Folgenden dargestellte Selektivitätsmodell verwendet werden. Die Selektivität S ist definiert als der Quotient der elektrophoretischen Mobilitäten der Enantiomere 1 und 2:

$$S = \frac{\mu_{ep1}}{\mu_{ep2}} \quad (10)$$

Es gilt $S > 1$, wenn 1 vor 2 wandert bzw. $S < 1$, wenn 1 nach 2 migriert. Im Fall einer Komigration beider Enantiomere ist $S = 1$. Die Selektivität in Abhängigkeit von der Konzentration ergibt sich nach Substitution der entsprechenden Ausdrücke von Gl. (9) für jedes Enantiomer, wobei μ_f für jedes Enantiomer gleich ist.

$$S = \frac{\mu_f + \mu_{c1} \cdot K_1 \cdot [CD]}{1 + K_1 \cdot [CD]} \cdot \frac{1 + K_2 \cdot [CD]}{\mu_f + \mu_{c2} \cdot K_2 \cdot [CD]} \quad (11)$$

Voraussetzung für eine Enantiomerentrennung ist, dass sich die Mobilitäten der ungebundenen Form und des Komplexes unterscheiden ($\mu_f \neq \mu_c$). Weiterhin ist an Gl. (11) zu erkennen, dass eine Enantiomerentrennung sich aus der unterschiedlichen Lage der Bindungsgleichgewichte beider Stereoisomere, ($K_1 \neq K_2$) und/oder differierenden Komplexmobilitäten ($\mu_{c1} \neq \mu_{c2}$) ergeben kann. Die chirale Erkennung eines CDs spiegelt sich in den Komplexbildungskonstanten wider. Im unteren Konzentrationsbereich des CDs, also bei einer teilweisen Komplexbildung der Enantiomere, hat der Einfluss der Bindungskonstanten auf die Trennung zumeist die größere Rolle. Bei einer relativ hohen

CD-Konzentration hingegen, also bei einer nahezu vollständigen Bindung der Analyte an das CD, beeinflussen nur die Komplexmobilitäten das Trennverhalten. Die Verschiedenheit der Komplexmobilitäten kann zwei Ursachen haben. Einerseits kann sich die Größe und Form der Komplexe aufgrund der unterschiedlich guten Einpassung der beiden Enantiomere in die Kavität des CDs unterscheiden. Andererseits können die diastereomeren CD-Komplexe unterschiedliche pK_a -Werte aufweisen, was zu unterschiedlichen Komplexmobilitäten bei einem pH-Wert nahe dem pK_a -Wert führt. So wurden beispielsweise für die Enantiomere dansylierter Aminosäuren in Gegenwart von (2-Hydroxypropyl)- β -CD (HP- β -CD) unterschiedliche pK_a -Werte und auch Mobilitäten für die entsprechenden HP- β -CD-Komplexe gefunden [38]. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, das Dissoziationsgleichgewicht des Analyten in die theoretische Erörterung des Trennverhaltens mit einzubeziehen.

1.3.2 Das Gleichgewichtsmodell für die Enantiomerentrennung einer schwachen Base

Das folgende Gleichgewichtsmodell Vigh et al. [39] gibt eine Erläuterung für das Trennverhalten der Enantiomere schwacher Basen in Anwesenheit eines neutralen CDs unter Einbezug des pH-Wertes. Schwache Basen sind in dem Fall alle Substanzen, deren protonierte Form einfach positiv geladen und deren deprotonierte neutral ist. Außerdem muss die Bedingung erfüllt sein, dass das betrachtete Protolysegleichgewicht unabhängig von weiteren ist, das heißt, dass ein genügend großer Abstand zwischen den entsprechenden pK_a -Werten liegt. Ein analoges Modell wurde für schwache Säuren beschrieben [40]. Die Eignung dieser Modelle zur Beschreibung des Migrationsverhaltens wurde für diverse Substanzen demonstriert [39-45]. Zusätzlich wurde dieses Modell auf die Beschreibung der Auflösung zweier Peaks übertragen [45]. Eine Erweiterung des hier vorgestellten Modells ist das CHARM (charged resolving agent migration)-Modell ebenfalls von Vigh et al. [46] zur Beschreibung der Enantiomerentrennung schwacher Säuren und Basen in Gegenwart permanent geladener CDs.

Gemäß der Überlegungen von Vigh et al. sind für die Charakterisierung des Migrationsverhaltens schwacher Basen die vier in Abb. 2 dargestellten Gleichgewichtsbeziehungen zu beachten [39]. Die miteinander konkurrierenden Gleichgewichte sind das Dissoziationsgleichgewicht der schwachen Base B mit der korrespondierenden Säure HB^+ (dargestellt über K_a) sowie die CD-Komplexierung beschreibenden Gleichgewichte beider Formen (dargestellt über K_n für B und K_+ für HB^+). Als viertes resultierendes Gleichgewicht kann das Dissoziationsgleichgewicht zwischen den komplexierten Formen $B \cdot CD$ und $HB \cdot CD^+$ angegeben werden (dargestellt über $K_{a/c}$).

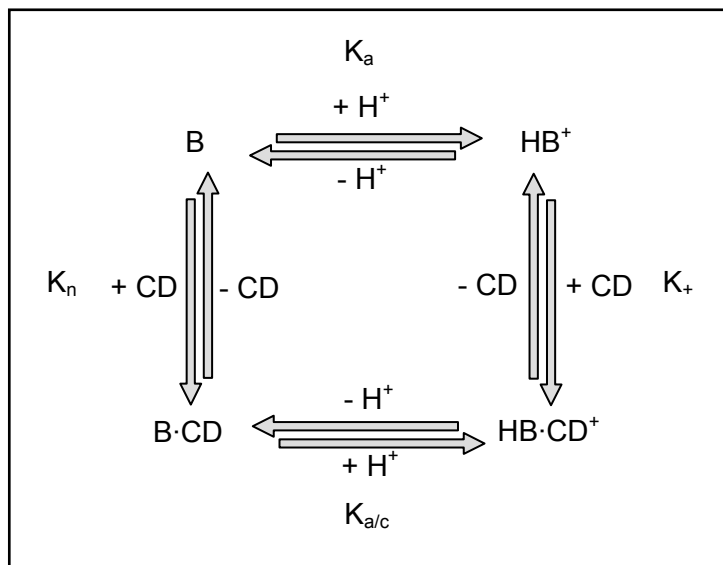


Abbildung 2: Dissoziations- und Bindungsgleichgewichte für eine schwache Base mit einem neutralen CD.

Die Gl. (12)-(15) definieren die Gleichgewichte.

$$K_a = \frac{[B] \cdot [H^+]}{[HB^+]} \quad (12)$$

$$K_+ = \frac{[HB \cdot CD^+]}{[HB^+] \cdot [CD]} \quad (13)$$

$$K_n = \frac{[B \cdot CD]}{[B] \cdot [CD]} \quad (14)$$

$$K_{a/c} = \frac{[B \cdot CD] \cdot [H^+]}{[HB \cdot CD^+]} \quad (15)$$

Entsprechend Gl. (6) tragen zur elektrophoretischen Mobilität alle miteinander im Gleichgewicht vorliegenden Spezies bei. Da die Base B und ihre komplexierte Form B·CD neutral sind, ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität:

$$\mu_{ep} = \mu_{HB^+} \cdot \alpha_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot \alpha_{HB \cdot CD^+} \quad (16)$$

Durch Substitution der Stoffmengenanteile mit den Konzentrationen und nach anschließendem Ersetzen dieser durch die entsprechenden Ausdrücke der Gl. (12)-(14) wird die elektrophoretische Mobilität dargestellt als:

$$\mu_{ep} = \frac{\mu_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot K_+ \cdot [CD]}{1 + K_+ \cdot [CD] + \frac{K_a}{[H^+]} \cdot (1 + K_n [CD])} \quad (17)$$

Nach logarithmischer Transformation von $[H^+]$ und K_a ergibt sich:

$$\mu_{ep} = \frac{\mu_{HB^+} + \mu_{HB\cdot CD^+} \cdot K_+ \cdot [CD]}{1 + K_+ \cdot [CD]} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \left(\text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+ \cdot [CD]}{1 + K_n \cdot [CD]} \right)}} \quad (18)$$

Gl. (18) beschreibt die elektrophoretische Mobilität in Abhängigkeit von der CD-Konzentration und dem pH-Wert unter Verwendung der pH-unabhängigen Parameter, der Mobilität der vollständig protonierten Form μ_{HB^+} , der entsprechenden Komplexmobilität $\mu_{HB\cdot CD^+}$, den Komplexbildungskonstanten K_+ und K_n sowie des $\text{p}K_a$ -Wertes der freien Base. Diese können durch nichtlineare Regression unter Zuhilfenahme von Gl. (18) geschätzt werden.

Die Selektivität für das vorgestellte Gleichgewichtsmodell wird durch Einsetzen der entsprechenden Formen von Gl. (18) für die Enantiomere 1 und 2 in Gl. (10) erhalten. Dabei ist zu bemerken, dass μ_{HB^+} und der $\text{p}K_a$ -Wert keine enantiospezifischen Größen sind.

$$S = \frac{(\mu_{HB^+} + \mu_{HB\cdot CD^+1} \cdot K_{+1} \cdot [CD]) \cdot (10^{\text{p}K_a} \cdot (1 + K_{+2} \cdot [CD]) + 10^{\text{pH}} \cdot (1 + K_{n2} \cdot [CD]))}{(\mu_{HB^+} + \mu_{HB\cdot CD^+2} \cdot K_{+2} \cdot [CD]) \cdot (10^{\text{p}K_a} \cdot (1 + K_{+1} \cdot [CD]) + 10^{\text{pH}} \cdot (1 + K_{n1} \cdot [CD]))} \quad (19)$$

Gl. (19) verdeutlicht, dass die Enantiomerentrennung einer schwachen Base in Anwesenheit eines neutralen CDs auf differierenden Komplexmobilitäten ($\mu_{HB\cdot CD^+/1} \neq \mu_{HB\cdot CD^+/2}$) und/oder einer unterschiedlichen Affinität der protonierten sowie der neutralen Formen des Analyten ($K_{+1} \neq K_{+2}$ und $K_{n1} \neq K_{n2}$) beruhen kann. Vigh et al. [39, 42] haben die Analyte entsprechend den Gleichgewichts- und Mobilitätsparametern in drei verschiedene Typen unterteilt. Bei desionoselektiven Typ I-Enantiomeren unterscheiden sich nur die Komplexbildungskonstanten der neutralen Form ($K_{n1} \neq K_{n2}$). Bei ionoselektiven Typ II-Enantiomeren interagieren die geladenen Enantiomere unterschiedlich ($K_{+1} \neq K_{+2}$). Zusätzlich können diese auch verschiedene Komplexmobilitäten besitzen ($\mu_{HB\cdot CD^+/1} \neq \mu_{HB\cdot CD^+/2}$). Bei duoselektiven Typ III-Enantiomeren zeigen neutrale wie auch dissoziierte Spezies ein enantioselektives Verhalten ($K_{n1} \neq K_{n2}$ und $K_{+1} \neq K_{+2}$).

Durch Vereinfachung von Gl. (18) kann nur die pH-Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität für eine konstante CD-Konzentration angegeben werden mit:

$$\mu_{ep/CD} = \frac{\mu_{+/CD}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a/CD}} \quad (20)$$

Die Mobilität der vollständig protonierten Spezies $\mu_{+/CD}$ ist dabei definiert als:

$$\mu_{+/CD} = \frac{\mu_{HB^+} + \mu_{HB\cdot CD^+} \cdot K_+ \cdot [CD]}{1 + K_+ \cdot [CD]} \quad (21)$$

Der pK_a -Wert für eine bestimmte CD-Konzentration $pK_{a/CD}$ ist:

$$pK_{a/CD} = pK_a + \log \frac{1 + K_+ \cdot [CD]}{1 + K_n \cdot [CD]} \quad (22)$$

In Abwesenheit eines chiralen Selektors ist $\mu_{ep/CD} = \mu_f$ mit:

$$\mu_f = \frac{\mu_{HB^+}}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (23)$$

Für eine unendlich hohe Konzentration des Selektors bei einer vollständigen CD-Komplexierung des Analyten gilt $\mu_{ep/CD} = \mu_c$ mit:

$$\mu_c = \frac{\mu_{HB \cdot CD^+}}{1 + 10^{pH-pK_{a/c}}} \quad (24)$$

Der pK_a -Wert des diastereomeren Komplexes $pK_{a/c}$ ist definiert als $\lim_{[CD] \rightarrow \infty} pK_{a/CD}$ mit $pK_{a/CD}$ gemäß

Gl. (22), sodass folgt:

$$pK_{a/c} = pK_a + \log \frac{K_+}{K_n} \quad (25)$$

Aus Gl. (25) ist ersichtlich, dass die pK_a -Werte der diastereomeren Komplexe sich für die Enantiomere 1 und 2 unterscheiden können, wenn die jeweiligen Quotienten beider Bindungskonstanten ungleich sind ($\frac{K_{+1}}{K_{n1}} \neq \frac{K_{+2}}{K_{n2}}$). Diese Enantioselektivität ist also durch die CD-Komplexierung bedingt [38, 47].

Gilt für die Komplexmobilitäten der vollständig protonierten Formen $\mu_{HB \cdot CD^+ / 1} = \mu_{HB \cdot CD^+ / 2}$, dann hat entsprechend Gl. (24) bei einem pH-Wert nahe dem pK_a -Wert das Enantiomer mit dem größeren $pK_{a/c}$ -Wert die höhere Komplexmobilität μ_c . Für dieses Enantiomer ist der Anteil der protonierten Form am Komplex im Vergleich zur neutralen Spezies relativ größer.

Die für einen konstanten pH-Wert gültige Gl. (9), die nur die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität von der CD-Konzentration beschreibt, kann ebenfalls durch Vereinfachung von Gl. (18) hergeleitet werden. Es gelten dabei die Definitionen für μ_f und μ_c analog der Gl. (23) und (24). Die entsprechende pH-abhängige Bindungskonstante K ist definiert als [48]:

$$K = \frac{[HB \cdot CD^+] + [B \cdot CD]}{([HB^+] + [B]) \cdot [CD]} \quad (26)$$

Nach Einsetzen der entsprechenden Ausdrücke der Gl. (12)-(14) und logarithmischer Umformung von $[H^+]$ und K_a ergibt sich:

$$K = \frac{K_+ + K_n \cdot 10^{pH-pK_a}}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (27)$$

Es ist zu erkennen, dass die pH-abhängige Komplexbildungskonstante von allen miteinander konkurrierenden Gleichgewichtsbeziehungen beeinflusst wird.

1.4 DIE UMKEHR DER MIGRATIONSREIHENFOLGE VON ENANTIOMEREN

In der chiralen CE ist die Migrationsreihenfolge von Enantiomeren von großer Bedeutung. Durch Anwendung moderner Syntheseverfahren können Substanzen von hoher optischer Reinheit erhalten werden. Zudem fordern die Aufsichtsbehörden für die Reinheitsprüfungen neuer Arzneistoffe eine Bestimmungsgrenze von $\leq 0,05\%$, wobei dies auch für chirale Substanzen und deren Verunreinigungen gilt [49]. In der chiralen CE ist bei der Injektion sehr hoch konzentrierter Proben aufgrund eines Missverhältnisses von Analyt und chiralem Selektor oft ein Peak-Tailing oder -Fronting zu beobachten [50]. Dementsprechend kann eine ungünstige Migrationsreihenfolge dazu führen, dass bei der Reinheitsprüfung für einen chiralen Arzneistoff dieser das in weitaus geringerer Konzentration vorliegende, die Verunreinigung darstellende, korrespondierende Enantiomer überdeckt. Selbst bei einer Trennung beider Enantiomere kann aufgrund einer Peakasymmetrie eine bestimmte Migrationsreihenfolge mit Hinblick auf Richtigkeit, Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze bevorzugt sein [51-53]. Die meisten der verwendeten chiralen Selektoren wie auch CDs sind Naturstoffe, die nur in einer stereochemischen Konfiguration erhältlich sind, weshalb eine Umkehr der Migrationsreihenfolge durch Verwendung des korrespondierenden Enantiomers des chiralen Selektors nicht möglich ist. Ein umfassender Überblick zu diesem Thema ist in [54-55] dargestellt.

Entgegengesetzte Selektivitäten analog $S < 1$ und $S > 1$ kennzeichnen eine Änderung der Migrationsreihenfolge. Mit Bezug auf Gl. (11), die allgemeingültig die Abhängigkeit der Selektivität von der Konzentration des chiralen Selektors darstellt, ist zu erkennen, dass bei einer hohen Konzentration das Verhältnis der Komplexmobilitäten μ_{c1}/μ_{c2} die Migrationsreihenfolge bestimmt. Im Gegensatz dazu ist bei einer niedrigen Konzentration die Situation wesentlich komplizierter. Die Migrationsreihenfolge wird beeinflusst von den Verhältnissen der Bindungskonstanten K_1/K_2 , der Komplexmobilitäten μ_{c1}/μ_{c2} und der Mobilitäten der freien und komplexierten Formen μ_f/μ_c zueinander.

Trivialerweise kann eine Änderung der Migrationsreihenfolge durch den Austausch des chiralen Selektors erreicht werden. Eine entgegengesetzte Migrationsreihenfolge wurde für verschiedene CDs

gefunden, wenn diese sich in der Größe der Kavität [56, 57], im Substitutionsmuster [58, 59], im Substitutionsgrad [60-62] oder in der Art der Substituenten [59, 63] unterscheiden. Chirale Mizellbildner sind teilweise in beiden Konfigurationen erhältlich. Dementsprechend kann das korrespondierende Enantiomer zur Änderung der Migrationsreihenfolge verwendet werden [64, 65]. Möglich ist auch eine Modifikation des EOFs, sodass ohne Beeinflussung der Enantioselektivität die Detektion der Enantiomere an der Anode in umgekehrter Reihenfolge erfolgen kann [66, 67]. Des Weiteren können neben dem chiralen Selektor „Carrier“-Moleküle wie achirale Mizellbildner zugesetzt werden, sodass Einfluss auf die Mobilitäts- und Bindungsverhältnisse genommen wird [68].

Entsprechend Gl. (11) ist auch durch eine Änderung der CD-Konzentration eine Umkehr der Migrationsreihenfolge denkbar und zwar dann, wenn der Einfluss von Mobilitäts- und Bindungsparameter auf diese entgegengesetzt ist. So wurde z. B. für die Enantiomere verschiedener Phenothiazine bei Verwendung eines Citratpuffers pH 3,0 mit Zusatz von γ -CD beobachtet, dass bei einer niedrigen Konzentration des CDs jeweils das (-)-Enantiomer zuerst wandert, bei einer höheren dagegen das (+)-Stereoisomer [69]. Es konnte gezeigt werden, dass das stärker gebundene (+)-Enantiomer auch jeweils die höhere Komplexmobilität besitzt und sich somit ein konträrer Einfluss von Bindungskonstanten und Komplexmobilitäten auf die Migrationsreihenfolge ergibt. Ein analoger Sachverhalt wurde von Rizzi und Kremser [38] für die D- und L-Enantiomere von dansyliertem Phe bzw. Trp in Gegenwart von HP- β -CD bei pH 2,5 dargestellt. Der Unterschied in den Komplexmobilitäten wurde über eine auf der CD-Komplexierung beruhenden, enantioselektiven pK_a -Wertverschiebung erklärt.

Für geladene CDs kann ein weiterer Mechanismus zur Umkehr der Migrationsreihenfolge in Abhängigkeit von der CD-Konzentration angegeben werden. Deren Konzentration kann so verändert werden, dass einerseits die Detektion im Normalmodus an der Kathode möglich ist und andererseits im Umkehrmodus an der Anode. Bei gleichbleibender Enantioselektivität resultiert daraus eine Änderung der Migrationsreihenfolge [70].

Durch eine Veränderung des pH-Wertes kann der Dissoziationsgrad des Analyten sowie des chiralen Selektors beeinflusst werden, sodass aufgrund unterschiedlicher Bindungs- und Mobilitätsverhältnisse eine Umkehr der Migrationsreihenfolge resultieren kann. Auch wenn von den Autoren nicht speziell erörtert, wird bei Verwendung von HP- β -CD die Reihenfolge der Enantiomere dansylierter Aminosäuren bei einer Änderung des pH-Wertes vertauscht [38]. Die Änderung des Vorzeichens der Ladung der Analyte scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen.

Für verschiedene Dipeptide wurde in dem engen pH-Bereich 2,5 - 3,5 eine Umkehr der Migrationsreihenfolge in Gegenwart der neutralen CDs, β -CD, Heptakis-(2,6-dimethyl)- β -CD (DM- β -CD) und Heptakis-(2,3,6-trimethyl)- β -CD (TM- β -CD) [60], sowie der in diesem pH-Bereich teilweise negativ geladenen CDs, Carboxymethyl- β -CD (CM- β -CD) und Succinyl- β -CD (Su- β -CD) [71],

gefunden. Hingegen wurde bei Verwendung der komplett negativ geladenen CDs, sulfatiertes β -CD (S- β -CD) und des mit Sulfonatgruppen substituierten β -CDs, keine veränderte Migrationsreihenfolge beobachtet [63]. Hervorzuheben ist, dass der pH-Bereich 2,5 - 3,5 den pK_a -Wert der Carboxylgruppe der Peptide umfasst.

Beispielsweise wurde für die DD- und LL-Isomere von Ala-Tyr und Ala-Phe eine Änderung der Migrationsreihenfolge in Gegenwart von β -CD und DM- β -CD gefunden, für Asp-PheOMe jedoch nur bei Zusatz von β -CD. Bei Glu-PheNH₂ bleibt die Migrationsreihenfolge erhalten [60]. Der Mechanismus der Umkehr wurde für Ala-Tyr und Asp-PheOMe in Gegenwart von β -CD und DM- β -CD von Sabbah et al. [72] untersucht. Bei beiden Peptiden bleibt die chirale Erkennung bei Erhöhung des pH-Wertes von 2,5 auf 3,5 erhalten, wobei das DD-Stereoisomer jeweils stärker komplexiert ist. Jedoch sind generell kleine Komplexbildungskonstanten bei pH 3,5 feststellbar. Minimal größere Komplexmobilitäten wurden für das DD-Enantiomer im Vergleich zum LL-Stereoisomer gefunden, bis auf pH 3,5 mit β -CD als chiralem Selektor, wo der Unterschied zwischen beiden Komplexmobilitäten erheblich ist. Die Ergebnisse wurden in Bezug zum Trennverhalten interpretiert. Für pH 2,5 wurde der Unterschied in den Bindungskonstanten als der die Migrationsreihenfolge determinierende Faktor diskutiert. Das jeweils schwächer gebundene LL-Enantiomer wandert zuerst bei Verwendung einer niedrigen CD-Konzentration. Bei hohen CD-Konzentrationen hingegen ist eine Komigration beider Stereoisomere zu beobachten, was durch die nur leicht differierenden Komplexmobilitäten zu erklären ist. Bei pH 3,5 für Ala-Tyr mit β -CD und DM- β -CD sowie für Asp-PheOMe mit β -CD migriert das DD-Enantiomer zuerst, obwohl dieses stärker komplexiert ist. Die Trennung verbessert sich mit zunehmender CD-Konzentration. Die Umkehr der Migrationsreihenfolge wurde darauf zurückgeführt, dass das DD-Enantiomer eine höhere Komplexmobilität zeigt und somit der Unterschied in den Komplexmobilitäten für die Migrationsreihenfolge verantwortlich ist. Die für die Enantiomere von Asp-PheOMe gleichbleibende Migrationsreihenfolge wurde damit begründet, dass auch bei pH 3,5 die Komplexbildungskonstanten das Trennverhalten bestimmen.

Eine ähnliche Studie mit Bestimmung der pH-unabhängigen Bindungskonstanten wurde für die DD- und LL-Enantiomere von Ala-Phe bei Verwendung von β -CD von Li und Waldron [48] durchgeführt. Wie schon dargestellt wurde, ist auch für dieses Dipeptid eine Änderung der Migrationsreihenfolge beobachtet worden, wobei bei pH 2,7 ebenfalls das LL-Enantiomer zuerst wandert und bei pH 3,5 dagegen das DD-Enantiomer. Für die veränderte Migrationsreihenfolge wurde eine entgegengesetzte chirale Erkennung der kationischen und zwitterionischen Spezies verantwortlich gemacht. Für D-Ala-D-Phe im Vergleich zum LL-Stereoisomer wurde eine stärkere CD-Komplexierung für die kationische Spezies festgestellt und eine schwächere für die neutrale Form. Die für die Zwitterionen ermittelten Komplexbildungskonstanten waren mit 2 und 4 l/mol sehr klein.

Sehr interessant ist auch die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge der DD- und LL-Isomere von Ala-Tyr und Phe-Phe ebenfalls im pH-Bereich 2,5 - 3,5. Allerdings wandert in Gegenwart dieses CDs bei pH 2,5 das DD-Enantiomer zuerst und bei pH 3,5 das LL-Stereoisomer [60]. In einer Studie zur Aufklärung der Mechanismen wurden jeweils leicht höhere Komplexbildungskonstanten für das DD-Enantiomer im Vergleich zum LL-Isomer bei pH 2,5 und leicht kleinere bei pH 3,5 gefunden [72]. Analoges gilt für die Komplexmobilitäten, sodass jeweils das stärker komplexierte Enantiomer die höhere Komplexmobilität zeigt. Im Vergleich zu pH 2,5 ist die Affinität zu TM- β -CD bei pH 3,5 bedeutend geringer. Bei beiden pH-Werten beeinflussen Bindungs- und Mobilitätsparameter die Migrationsreihenfolge konträr. Da aber jeweils das Enantiomer mit der höheren Komplexmobilität zuerst wandert, scheint der Unterschied in den Komplexmobilitäten das Migrationsverhalten zu determinieren. Dafür spricht, dass eine Zunahme der Auflösung mit steigender CD-Konzentration beobachtet wurde.

1.5 HARNSTOFF ALS ADDITIV

β -CD ist ein universell einsetzbarer und zudem preiswerter chiraler Selektor. Nachteil der Verbindung ist deren sehr geringe Wasserlöslichkeit von nur 16 mmol/l (18,5 mg/ml) bei Raumtemperatur [22]. Durch Zusatz von Harnstoff (HS) als Lösungsvermittler kann das Anwendungsspektrum als chiraler Selektor beträchtlich erweitert werden. Typischerweise wird HS in einer Konzentration von 1 bis 2 M zugesetzt, aber auch höhere Konzentration bis zu 7 M [73] wurden verwendet. Bei Verwendung von 2 M HS kann die Löslichkeit von β -CD auf etwa 48 mmol/l (55 mg/ml) erhöht werden. HS kann auch eingesetzt werden, um die Löslichkeit von γ -CD [74] zu verbessern bzw. um lipophile Analyte wie polychlorierte Biphenyle [75] in Lösung zu bringen. Der Zusatz von HS zu wässrigen Lösungen führt zur Bildung gemischter Cluster sowie zu einer Erhöhung der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen. HS wirkt als Lösungsvermittler für apolare Substanzen, da die Bildung von Zwischenräumen, welche hydrophobe Molekülteile aufnehmen können, im Vergleich zu reinem Wasser erleichtert ist [76].

Für HS als Additiv in der chiralen CE sind verschiedene Effekte beschrieben worden. Der Zusatz von 7 M HS führte zu einer Verbesserung der Trennung dansylierter Aminosäuren in Gegenwart von β -CD, wohingegen ein negativer Effekt bei Verwendung von γ -CD und methylierten α -, β - und γ -CD-Derivaten zu beobachten war [73]. Bei Verwendung eines dualen CD-Systems von β -CD und Heptakis-(6-monodesoxy-6-monoamino)- β -CD konnten verschiedene polychlorinierte Biphenyle erst bei Zusatz von 2 M HS getrennt werden [75].

Mit Bezug auf Gl. (11) wird die Enantiomerentrennung durch die CD-Komplexierung der beiden Enantiomere, die Komplexmobilitäten als auch die Mobilität des ungebundenen Analyten beeinflusst. Bei einem pH-Wert nahe dem pK_a -Wert spielt zusätzlich das Dissoziationsverhalten des Analyten eine Rolle (Gl. (19)) für schwache Basen in Gegenwart eines neutralen CDs). Aus diesem Grund ist der Einfluss von HS auf die Bindungs-, Dissoziations- sowie Mobilitätsparameter von großer Bedeutung. In der Mehrzahl der Fälle wurde bei Zusatz von HS eine Abnahme der Affinität zu β -CD beobachtet [77-82]. Eine Ausnahme bildet 2-Naphthalincarbonsäure in Gegenwart von 8 M HS [80]. Der Einfluss von HS auf die Mobilitätsparameter ist bis dato kaum untersucht worden. Für die Enantiomere von Thioridazin in Gegenwart von β -CD wurde eine Abnahme der Mobilität für die ungebundene Form und die Komplexe beobachtet [82]. Eine Verringerung der sich auf den thermodynamischen Standardzustand beziehenden pK_a -Werte bei Zugabe von HS wurde für schwache Säuren und Basen beschrieben [83-85].

Nur in wenigen Studien wurde der Zusammenhang zwischen CD-Komplexierung und Trennverhalten vergleichend in Ab- und Anwesenheit von HS beschrieben. Chankvetadze et al. [77] haben in Gegenwart von 5 M HS eine Abnahme der Affinität der Enantiomere von Dimethinden zu β -CD auf 1/5 gefunden. Eine Verschlechterung der Trennung wurde bei einer β -CD-Konzentration von 13,2 mmol/l (15 mg/ml) beobachtet. Wang und Khaledi [82] haben Komplexbildung und Migrationsverhalten der Enantiomere von Thioridazin in Gegenwart von β -CD und 6 M HS analysiert. Die Verringerung der Komplexbildungskonstanten auf 1/10 ging mit einer ausgeprägten Verschiebung des Optimums der Trennung zu einer höheren CD-Konzentration einher. Dabei blieb die Mobilitätsdifferenz für beide Enantiomere im Optimum ohne und mit Zusatz von HS konstant.

1.6 KALORIMETRIE ZUR CHARAKTERISIERUNG DES KOMPLEXIERUNGSVERHALTENS

Die isotherme Titrationskalorimetrie (engl. Isothermal Titration Calorimetry, ITC) bietet die Möglichkeit die Bindung zweier Substanzen mit Hilfe der thermodynamischen Parameter zu beschreiben [86, 87]. Unter anderem ist eine Charakterisierung über die Reaktionsenthalpie und -entropie sowie die freie Reaktionsenthalpie und die Komplexbildungskonstanten möglich. Zur Aufnahme der Bindungsisothermen werden beide Bindungspartner in einer kalorimetrischen Zelle zur Reaktion gebracht. Die Lösung einer Substanz wird in kleinen Volumina schrittweise und in festgelegten Zeitintervallen aus einer Mikrospritze in die kalorimetrische Zelle injiziert. Diese enthält die Lösung des zweiten Bindungspartners. Die bei der Komplexbildung der beiden Substanzen umgesetzte Wärmemenge wird bei jedem Injektionsschritt registriert. Zumeist ist eine Korrektur von

Verdünnungseffekten notwendig. Die Bindungsisothermen können ebenso über eine Vielzahl von Einzelexperimenten erhalten werden, wobei jeweils die Konzentration des in die kalorimetrische Zelle injizierten Bindungspartners variiert.

Zur Bestimmung der Bindungskonstante für die Komplexbildung eines Enantiomers B* mit dem CD analog



wird die dabei entstehende Reaktionswärme in einer Ligand-Bindungsstudie erfasst. Für die beiden Enantiomere eines Enantiomerenpaares ist jeweils eine getrennte Untersuchung durchzuführen. Dazu wird das Enantiomer B* aus einer Mikrospritze in die kalorimetrische Zelle injiziert, wobei diese die CD-Lösung enthält. Die dabei umgesetzte Wärmemenge Q ist abhängig vom Stoffmengenanteil des entstandenen Komplexes $\alpha_{B \cdot CD^*}$ und nimmt einen Maximalwert Q_{\max} an, wenn der Analyt B* vollständig komplexiert ist.

$$Q = \alpha_{B \cdot CD^*} \cdot Q_{\max} \quad (28)$$

Durch Einsetzen der Konzentrationen ergibt sich:

$$Q = \frac{[B \cdot CD^*]}{[B^*] + [CD]} \cdot Q_{\max} \quad (29)$$

Nach Ersetzen der Konzentrationen mit dem entsprechenden Ausdruck von Gl. (5) kann die Abhängigkeit der Reaktionswärme von der CD-Konzentration beschrieben werden mit:

$$Q = \frac{K \cdot [CD]}{1 + K \cdot [CD]} \cdot Q_{\max} \quad (30)$$

Aus den Bindungsisothermen kann durch nichtlineare Regression die Komplexbildungskonstante ermittelt werden.

1.7 VALIDIERUNG VON REINHEITSBESTIMMUNGEN

1.7.1 Überblick

Reinheitsprüfungen von Arzneistoffen bedürfen einer Validierung. Dies ist ein Prozess zur Sicherstellung, dass eine Analysemethode die Anforderungen für eine spezifische, beabsichtigte Anwendung erfüllt. Die „International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“ (ICH) hat Richtlinien zur Validierung analytischer Verfahren herausgegeben, auf welche sich die meisten Aufsichtsbehörden bei der Zulassung neuer

Pharmazeutika beziehen. Entsprechend der ICH-Richtlinie Q2 ist eine Reinheitsbestimmung zur quantitativen Erfassung von Verunreinigungen in Bezug auf Richtigkeit, Präzision, Spezifität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität sowie Arbeitsbereich zu validieren. Eine Prüfung auf Robustheit als zusätzliches Validierungskriterium wird empfohlen. Weiterhin wird in dieser ICH-Richtlinie auf Methoden zum Einbezug dieser Validierungscharakteristika in den Validierungsprozess verwiesen [88]. Bei der Zulassung neuer Arzneistoffe gilt für organische Verunreinigungen ein Berichtsgrenzwert von 0,05 % bei einer Tagesgesamtdosis ≤ 2 g und von 0,03 % bei einer höheren Dosis (ICH-Richtlinie Q3A) [49]. Dieser Grenzwert sollte zumindest der Bestimmungsgrenze der Reinheitsprüfung entsprechen.

1.7.2 Prüfung auf Robustheit mittels statistischer Versuchsplanung

Gemäß der Definition der ICH ist die Robustheit einer Analysemethode ein Maß für ihre Eigenschaft durch kleine, aber vorsätzliche Änderungen der Methodenparameter unverändert zu bleiben und ein Merkzeichen ihrer Zuverlässigkeit während des bestimmungsgemäßen Gebrauchs [88]. Ein detaillierter Überblick zur Robustheitsprüfung ist gegeben in [89-91].

Die Methodenparameter können auf zwei verschiedene Arten variiert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, den Einfluss eines Parameters zu untersuchen, indem dieser verändert wird, währenddessen die anderen konstant gehalten werden („one factor at a time“). Als Vergleich dient das Analysenergebnis des Versuches, bei dem alle Parameter ihren Nominalwerten entsprechen. Dagegen wird bei der statistischen Versuchsplanung (engl. design of experiments, DoE) [92, 93] der Einfluss eines Parameters für verschiedene Kombinationen der anderen Parameter untersucht. Dies hat den Vorteil, dass ein umfassenderes Bild über das Verhalten der Parameter im Bereich um den jeweiligen Nominalwert erhalten wird.

Für einen Robustheitstest werden unter einer Vielzahl der möglichen Einflussgrößen diejenigen ausgewählt, von denen erwartet wird, dass diese den größten Einfluss auf das Analysenergebnis beim Wechsel von Laboratorium, Instrument oder Analytiker haben. Die für den Versuch ausgewählten Einflussgrößen werden in der statistischen Versuchsplanung Faktoren genannt. Nach Auswahl der Faktoren werden die Werte festgelegt, die die Faktoren im Versuch annehmen. Diese Werte sind die Faktorstufen. Die Parameter, die das Ergebnis des Versuchs beschreiben sind die Zielgrößen. Faktoren sowie Zielgrößen können quantitative oder auch qualitative Größen sein.

Die für einen Robustheitstest mittels statistischer Versuchsplanung zu durchlaufenden Schritte sind:

- (1) Wahl der Faktoren und Faktorstufen,
- (2) Wahl des Versuchsplans,
- (3) Wahl der Zielgrößen,

- (4) Planung des Versuchsablaufes und Durchführung der Experimente,
- (5) Bestimmung des Einflusses der Faktoren,
- (6) graphische und statistische Interpretation der Faktoreinflüsse,
- (7) Ziehen relevanter Schlussfolgerungen und wenn notwendig Treffen von Vorkehrungen zur Verbesserung der Methode.

(1) Typische Faktoren für einen Robustheitstest in der CE sind Puffereigenschaften wie pH-Wert, die Konzentrationen der Puffersubstanzen und der Additive. Auch Faktoren, welche die Kapillarparameter beschreiben, sowie Spannung, Temperatur und Wellenlänge werden oft untersucht [90]. Gewöhnlicherweise sind für einen Robustheitstest zwei Faktorstufen -1 und +1 ausreichend, welche symmetrisch um den Nominalwert 0 liegen. Das zwischen ihnen liegende Intervall sollte der Variabilität entsprechen, die bei Wechsel von Laboratorium, Instrument oder Analytiker auftreten kann.

(2) Der Versuchsplan dient der Bestimmung des Einflusses der Faktoren auf die Zielgrößen. Er ist eine Anleitung zur gleichzeitigen Untersuchung einer gewissen Anzahl an Faktoren mit einer vorgegebenen Anzahl an Experimenten. Für einen Robustheitstest werden 2-Faktorstufen-Screening-Versuchspläne wie das Plackett-Burman-Design und der fraktionelle 2-Faktorstufen-Screening-Versuchsplan verwendet. Mit beiden Versuchsplänen können n Faktoren in $n + 1$ Experimenten untersucht werden. Bei einem fraktionellen 2-Faktorstufen-Screening-Versuchsplan ist die Anzahl der Versuche eine Potenz von 2, bei einem Plackett-Burman-Versuchsplan dagegen ein Vielfaches von 4. Daher erlaubt letzterer eine flexiblere Versuchsplanung. Beide Versuchspläne können jeweils um die „Mittelpunkt-Experimente“ mit allen Faktoren am Nominalwert 0 erweitert werden.

(3) Zielgrößen sind Parameter, welche die Ergebnisse der Methode darstellen, z.B. Konzentrationen oder Wiederfindungsraten von Verunreinigungen bei der Validierung von Reinheitsbestimmungen. Eine Methode ist robust, wenn der Einfluss der Faktoren auf diese Zielgrößen nicht signifikant ist. Des Weiteren kann der Einfluss von Zielgrößen untersucht werden, die wichtige quantitative Informationen über die Methode liefern und für welche Grenzen zu einem Systemeignungstest (engl. system suitability test, SST) festgelegt werden können. SST-Zielgrößen sind z.B. die Auflösung zweier Peaks, die Migrationszeit einer Substanz sowie der Peak-Symmetriefaktor.

(4) In einem Versuchsplan werden die Faktorstufen mit den Werten -1, 0 und +1 definiert. Für die Ausführung der Versuchsreihe werden diese in die reellen Faktorstufen transformiert. Die Experimente werden in zufälliger Reihenfolge durchgeführt.

(5) Die Bestimmung der Einflüsse aller n Faktoren x_i (in skaliert und zentrierter Form mit den Faktorstufen -1, 0 und +1) erfolgt mittels mehrfacher linearer Regression durch Anpassung der Zielgrößen y gemäß

$$y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i \quad (31)$$

Die erhaltenen Regressionskoeffizienten a_i (i von 1 bis n) geben die Faktoreinflüsse wieder. Die Konstante a_0 gibt den Wert der Zielgröße an, wenn alle Faktoren ihren Nominalwert besitzen. Ein alternatives Verfahren zur Schätzung der Regressionskoeffizienten ist die „Partial Least Squares“ (PLS)-Pfadanalyse [94]. Mit dieser Methode können alle Zielgrößen gleichzeitig in den Regressionsprozess einbezogen und deren Abhängigkeiten beachtet werden.

(6) Die mittels der Regressionskoeffizienten bestimmten Faktoreinflüsse können graphisch und statistisch interpretiert werden. Durch Darstellung der Regressionskoeffizienten und der zugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle in einem Säulendiagramm lässt sich die Signifikanz der geschätzten Faktoreinflüsse ermitteln. Umfasst das 95%-Konfidenzintervall den Wert 0, kann der Einfluss des Faktors auf die entsprechende Zielgröße als nicht signifikant angesehen werden.

Die Varianzanalyse (engl. Analysis of Variances, ANOVA) ermöglicht die Bestimmung der Signifikanz des gesamten Regressionsmodells sowie die Schwäche der Anpassung in einem „Lack of Fit“-Test [95]. Für den Signifikanztest wird die Gesamtquadratsumme als Summe aller quadrierten Abweichungen der Messwerte der Zielgröße vom Gesamtmittelwert QS_{Total} in zwei Quadratsummen zerlegt. Die eine davon kann durch die Regression erklärt werden und ist die Summe aller quadrierten Abweichungen der durch Regression erhaltenen Schätzwerte der Zielgröße vom Gesamtmittelwert ($QS_{\text{Regression}}$). Die andere gibt die nicht über die Regression erklärbare Abweichung vom Gesamtmittelwert an (QS_{Residual}).

$$QS_{\text{Total}} = QS_{\text{Regression}} + QS_{\text{Residual}} \quad (32)$$

Die dazugehörigen Varianzen $s^2_{\text{Regression}}$ und s^2_{Residual} werden in einem F-Test miteinander verglichen. Entsprechen beide Varianzen einer Grundgesamtheit, so ist das Regressionsmodell nicht signifikant und die Zielgröße in Bezug auf die untersuchten Faktoren robust. Die Quadratsumme QS_{Residual} kann weiter in die Quadratsummen $QS_{\text{Modellfehler}}$ und $QS_{\text{Zufallsfehler}}$ zerlegt werden.

$$QS_{\text{Residual}} = QS_{\text{Modellfehler}} + QS_{\text{Zufallsfehler}} \quad (33)$$

Dabei steht $QS_{\text{Modellfehler}}$ für die unzureichende Anpassung durch das Modell. $QS_{\text{Zufallsfehler}}$ gibt die zufällige Streuung bei der Wiederholung von Experimenten an. Letztere wird bestimmt, indem der Versuchsplan um die „Mittelpunkts-Experimente“ mit allen Faktoren an ihren Nominalwert 0 erweitert wird. Der „Lack of Fit“-Test gibt das Resultat des F-Tests für beide Varianzen $s^2_{\text{Modellfehler}}$ und $s^2_{\text{Zufallsfehler}}$ an. Im Idealfall entsprechen beide Varianzen einer Grundgesamtheit, und das zugrunde liegende Modell kann als passende Beschreibung der Abhängigkeit der Zielgrößen von den Faktoren angesehen werden.

(7) Falls sich die Zielgrößen, welche die Prüferergebnisse der zu validierenden Methode darstellen, als nicht robust erweisen, besteht die Möglichkeit die Methode erneut zu optimieren bzw. einen Systemeignungstest zu entwickeln. Sind nur die SST-Zielgrößen nicht robust, hat das keinen Einfluss auf die Robustheit des Analyseverfahrens.

Für die statistische Versuchsplanung stehen verschiedene kommerzielle Software-Pakete zur Verfügung, u.a. Modde (Umetrics), Nemrod (LPRAI), Statgraphics (Manugistics) und Design Expert (Statcon).

2 Zielsetzung

Zwei verschiedene Themenschwerpunkte sollten bearbeitet werden.

(1) Ein sehr interessantes Phänomen in der chiralen CE ist die Umkehr der Migrationsreihenfolge der DD- und LL-Enantiomere verschiedener Dipeptide in dem engen pH-Bereich 2,5 - 3,5 bei Verwendung neutraler CDs. Der pH-Bereich schließt den pK_a -Wert der Carboxylgruppe der Peptide ein. Die Mechanismen des Migrationsverhaltens sind nur teilweise verstanden. Daher sollte eine theoretische Studie zur systematischen Aufklärung dieser durchgeführt werden. Als Basis sollte das Gleichgewichtsmodell von Vigh et al. [39] zur Beschreibung der Enantiomerentrennung schwacher Basen dienen, da mit diesem die Ladungsverhältnisse der Peptide im relevanten pH-Bereich erfasst werden. Des Weiteren sollte eine systematische Klassifizierung der Analyte entsprechend der Migrationsreihenfolge in den einzelnen pH- und CD-Konzentrationsbereichen erfolgen.

Auf Grundlage der theoretischen Betrachtungen sollte die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge der Enantiomere von Ala-Tyr, Ala-Phe und Asp-PheOMe in Gegenwart von β -CD und DM- β -CD aufgeklärt werden. Vergleichend sollten auch Peptide untersucht werden, die diese Umkehr der Migrationsreihenfolge nicht zeigen. Dazu sollten die Parameter des Gleichgewichtsmodells bestimmt werden.

Alle bisherigen Studien zum Migrationsverhalten der Dipeptide mit β -CD als chiralem Selektor sind in Gegenwart von 2 M HS erfolgt. Dieser wurde als Löslichkeitsvermittler für β -CD zugesetzt. Eine Untersuchung zum Einfluss dieses Additivs auf die Trenneffizienz, besonders im Hinblick auf die Migrationsreihenfolge, sollte erfolgen. Ohne HS-Zusatz ist aufgrund der geringen Löslichkeit von β -CD eine Bestimmung der Modellparameter nicht möglich, sodass der Zusammenhang zwischen Enantiomerentrennung und CD-Komplexierung nicht hergestellt werden kann. Anhand der Enantiomerentrennung von N-tertiär-Butoxycarbonyl-phenylalanin (Boc-Phe) in Gegenwart von β -CD bzw. von verschiedenen Dipeptiden in Kombination mit DM- β -CD sollte geklärt werden, ob ein allgemeingültiger Trend für den Einfluss des HS auf das Trennverhalten besteht.

(2) Für das Injektionsnarkotikum Etomidat, welches ausschließlich als (R)-Enantiomer verwendet wird, sollte eine CE-Methode zur Prüfung auf „verwandte Substanzen“ entwickelt und validiert werden, mit der auch die chirale Verunreinigung erfasst werden kann. Dabei sollte die Prüfung auf Robustheit unter Anwendung der statistischen Versuchsplanung erfolgen.

3 Übersicht zu den Manuskripten

Die folgenden Manuskripte beinhalten die Ergebnisse zu den Bearbeitungen zwei verschiedener Themenschwerpunkte.

(1) Migrationsphänomene bei Dipeptiden in der chiralen Kapillarelektrophorese

(1.1) Theoretische Betrachtungen zur Umkehr der Migrationsreihenfolge

Die Umkehr der Migrationsreihenfolge der Enantiomere schwacher Basen in Anwesenheit eines neutralen CDs wurde in Abhängigkeit von pH-Wert und CD-Konzentration auf der Basis eines mathematischen Gleichgewichtsmodells betrachtet. Des Weiteren erfolgte eine Klassifizierung der Basen entsprechend dem Trennmuster (Manuskript 1).

(1.2) Die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge von Dipeptiden in Gegenwart neutraler Cyclodextrine

Die Enantiomerentrennung verschiedener Dipeptide mit β -CD (Manuskripte 2 + 3) und DM- β -CD (Manuskripte 1 + 4) als chirale Selektoren wurde auf der Grundlage der theoretischen Studie untersucht (Manuskripte 1 + 2). Dafür wurden die Parameter des Gleichgewichtsmodells mit Hilfe der CE (Manuskripte 1 - 4) und der Kalorimetrie (Manuskript 2) bestimmt.

(1.3) Der Einfluss von Harnstoff auf die Enantiomerentrennung von Dipeptiden

Der Einfluss von HS auf die Enantiomerentrennung der Dipeptide und von Boc-Phe in Kombination mit β -CD (Manuskript 3) und DM- β -CD (Manuskript 4) wurde analysiert. Dazu wurde das Komplexierungs- und Dissoziationsverhalten charakterisiert.

(2) Kapillarelektrophoretische Methode zur Prüfung auf Reinheit von Etomidat mit Einbezug der chiralen Verunreinigung

Eine CE-Methode zur Prüfung auf Reinheit von Etomidat wurde entwickelt und validiert. Die Validierung schließt den Test auf Robustheit mittels statistischer Versuchsplanung ein (Manuskript 5).

Folgende Tätigkeiten habe ich dabei selbst durchgeführt:

zu den Manuskripten 1, 3, 4 und 5 mit Erstautorenschaft

- mathematische Berechnungen und Überlegungen zur Aufklärung der Mechanismen, die zur Umkehr der Migrationsreihenfolge führen (Manuskript 1),
- Vorbereitung, Ausführung und Auswertung der CE-Messungen mit anschließender Modellierung,
- Durchführung der gesamten statistischen Versuchsplanung (Manuskript 5)
- Erstellen der Manuskripte,

zum Manuskript 2 mit Koautorenschaft

- Unterstützung der Vorbereitung, Ausführung und Auswertung der CE-Messungen;
- Modellierung der Ergebnisse der CE-Messungen,
- Unterstützung beim Erstellen des Manuskripts.

Folgende Tätigkeiten wurden weiterhin zum Manuskript 2 durchgeführt:

- Vorbereitung, Ausführung und Auswertung der CE-Messungen und der kalorimetrischen Bindungsstudie sowie das Erstellen des Manuskripts von Frau Dr. Irina V. Therekova (Institut der Physikalischen Chemie der Staatlichen Chemisch-technologischen Universität Iwanowo, Iwanowo, Russland),
- Vorbereitung, Ausführung und Auswertung der CE-Messungen von Herrn Bunleu Sungthong (Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der Friedrich Schiller Universität Jena, Jena).

Folgende Tätigkeiten wurden weiterhin zum Manuskript 5 durchgeführt:

- Vorbereitung, Ausführung und Auswertung der CE-Messungen zu einem Screening verschiedener CDs auf ihr Trennpotential für Etomidat und dessen Verunreinigungen von Herrn Ramiseti N. Rao (Indisches Institut der Chemischen Technologie, Abteilung für Analytische Chemie, Arbeitskreis HPLC, Hyderabad, Indien)

Manuskript 1

Mathematical approach by a selectivity model for rationalization of pH- and selector concentration-dependent reversal of the enantiomer migration order in capillary electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Analytical Chemistry* 2009, 81, 8765-8773.

Ein Gleichgewichtsmodell zur Beschreibung der Enantiomerentrennung schwacher Basen in Gegenwart neutraler CDs wurde als Basis für eine theoretische Studie verwendet. Diese umfasst die Aufklärung der Mechanismen, die zur pH- und konzentrationsabhängigen Umkehr der Migrationsreihenfolge der Enantiomere schwacher Basen führen. Des Weiteren ist eine Klassifizierung für diese Analyte entsprechend dem Trennmuster dargestellt, welches sich bei Änderung von pH-Wert und CD-Konzentration ergibt. Ein praktisches Beispiel ist anhand der Trennung der DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr und Asp-PheOMe mit DM- β -CD gegeben.

Manuskript 2

Investigation of the pH-dependent complex formation between β -cyclodextrin and dipeptide enantiomers by capillary electrophoresis and calorimetry

Irina V. Terekhova, Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Bunleu Sungthong, Gerhard K. E. Scriba, in Vorbereitung.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Komplexbildung und die Dissoziation der DD- und LL-Isomere von Ala-Tyr, Ala-Phe und Asp-PheOMe mit β -CD als chiralem Selektor wurde mittels CE und Kalorimetrie untersucht. Auf Grundlage dieser Studie konnten die Mechanismen zur pH-abhängigen Umkehr dieser Peptide erklärt werden. Die Ursache dafür ist eine auf der CD-Komplexierung basierende, enantioselektive pK_a -Wert-Verschiebung.

Manuskript 3

Influence of buffer substances and urea on the β -cyclodextrin-mediated chiral separation of dipeptides in CE

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2007, 28, 2619-2628.

Der Einfluss eines Zusatzes von 2 M HS auf die Trennung der DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe mit β -CD als chiralem Selektor wurde analysiert. Es erwies sich, dass HS als Additiv Veränderungen in der Trenneffizienz bewirkt. Ein Zusammenhang besteht zu einer Erhöhung des pK_a -Wertes der Peptide bedingt durch die HS-Zugabe. Weiterhin wurde das Komplexierungs- und Dissoziationsverhalten der Enantiomere von Boc-Phe mit β -CD vergleichend ohne und mit

Verwendung von 2 M HS betrachtet. Der HS-Zusatz verursachte ebenfalls eine pK_a-Wert Erhöhung sowie eine nicht-enantioselektive Abnahme der Affinität zu β-CD.

Manuskript 4

Effect of urea on analyte complexation by 2,6-dimethyl-β-cyclodextrin in peptide enantioseparations by capillary electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2009, 30, 3764-3771.

Die Enantiomerentrennung mit DM-β-CD wurde für die DD- und LL-Enantiomere verschiedener Dipeptide ohne und mit Zusatz von 2 M HS analysiert. Unterschiede waren in der Trenneffizienz zu beobachten. Zusätzlich wurde das Bindungs- und Dissoziationsverhalten charakterisiert, wobei ein nicht-enantioselektiver Einfluss des HS festzustellen war. Die Zugabe von HS führt zu einer Abnahme der Affinität zu DM-β-CD sowie einer Erhöhung des pK_a-Wertes der Dipeptide. Auch waren Effekte auf die Mobilitätsparameter festzustellen. Diese Veränderungen stehen im Zusammenhang mit der Enantiomerentrennung.

Manuskript 5

Development and validation of a robust capillary electrophoresis method for impurity profiling of etomidate including the determination of chiral purity using a dual cyclodextrin system

Manuela Hammitzsch, Ramiseti N. Rao, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2006, 27, 4334-4344.

Für das Injektionsnarkotikum Etomidat wurde eine CE-Methode zur Prüfung auf „verwandte Substanzen“ entwickelt, mit welcher auch die gleichzeitige Erfassung des (S)-Enantiomers als chirale Verunreinigung möglich ist. Die Validierung der Methode wurde entsprechend den Empfehlungen der ICH durchgeführt. Der Robustheitstest erfolgte unter Anwendung der statistischen Versuchsplanung basierend auf einem „erweiterten“ Plackett-Burman-Design.

4 Manuskripte

4.1 MANUSKRIFT 1

Mathematical approach by a selectivity model for rationalization of pH- and selector concentration-dependent reversal of the enantiomer migration order in capillary electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Analytical Chemistry* 2009, 81, 8765-8773.

Mathematical Approach by a Selectivity Model for Rationalization of pH- and Selector Concentration-Dependent Reversal of the Enantiomer Migration Order in Capillary Electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann and Gerhard K. E. Scriba*

Friedrich Schiller University Jena, Department of Pharmaceutical Chemistry, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany

A separation selectivity model for capillary electrophoresis enantioseparations of weak bases in the presence of uncharged chiral selectors was described as a function of buffer pH and chiral selector concentration. On the basis of the selectivity at the extreme pH and selector concentration values, 15 principal cases could be distinguished describing the migration behavior of the analytes when increasing either pH or selector concentration. A pH-dependent reversal of the enantiomer migration order can be observed (1) when the complex mobility ratio is reversed due to an enantioselective complexation-induced pK_a -shift, (2) in the case of an inversion of the ratio of the mobilities of the analyte-selector complex and the free analyte due to significantly weaker complexation of the neutral species, and (3) in the case of opposite chiral recognition of the protonated and uncharged species by the chiral selector. Reversal of enantiomer migration order as a function of the selector concentration at a fixed buffer pH is caused by the opposing effects of complexation constants and complex mobilities at the respective pH value. The model was applied to rationalize the enantioseparations of dipeptides, especially the pH-dependent reversal of the migration order of the LL- and DD-enantiomers of Ala-Tyr in the presence of heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin as the chiral selector based on the complexation constants of the protonated and zwitterionic forms of the analytes.

Reversal of the enantiomer migration order (EMO) can be achieved under various experimental conditions in capillary electrophoresis (CE).^{1,2} Especially interesting phenomena are the pH-dependent and the selector concentration-dependent reversal of EMO. pH-dependent reversal has been observed for various small peptides using neutral^{3–7} and charged cyclodextrins (CDs)^{8,9}

as chiral selectors. Although not addressed in the publication, reversal of the EMO of dansylated amino acids also occurred when increasing the pH of the background electrolyte.¹⁰ The change of the EMO was observed in the pH range close to the pK_a values of the peptides and dansylated amino acids. EMO reversal as a function of the concentration of the chiral selector has been observed for various analytes.^{10–14}

Several mathematical models have been developed for a description of analyte mobility in enantioselective CE based on 1:1 complexes formed between analytes and selectors. Wren and Rowe^{15,16} were the first to introduce mobility difference models. However, these models did not consider the dissociation equilibria of the analytes as a function of the pH of the background electrolyte. This was subsequently introduced by Vigh and co-workers^{17,18} including the effects of competing binding equilibria of the dissociated and nondissociated forms of analytes. The same group also developed the charged resolving agent migration model (CHARM)^{19,20} and derived a peak resolution model.²¹

In the present study, the selectivity model developed by Vigh and co-workers¹⁷ was used to systematically group the migration behavior of weakly basic analytes in CE in the presence of a neutral chiral selector as a function of the constellation of the

- (4) Sabbah, S.; Scriba, G. K. E. *J. Chromatogr., A* **2000**, *894*, 267–272.
- (5) Sabbah, S.; Süß, F.; Scriba, G. K. E. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3163–3170.
- (6) Süß, F.; Poppitz, W.; Scriba, G. K. E. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 1147–1154.
- (7) Sidamonidze, N.; Süß, F.; Poppitz, W.; Scriba, G. K. E. *J. Sep. Sci.* **2001**, *24*, 777–783.
- (8) Sabbah, S.; Scriba, G. K. E. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1385–1393.
- (9) Süß, F.; Sanger-van de Griend, C. E.; Scriba, G. K. E. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1069–1076.
- (10) Rizzi, A. M.; Kremser, L. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2715–2722.
- (11) Schmitt, T.; Engelhardt, H. *J. High Resol. Chromatogr.* **1993**, *16*, 525–529.
- (12) Mofaddel, N.; Krajian, H.; Villemin, D.; Desbène, P. L. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1211*, 142–150.
- (13) Mofaddel, N.; Krajian, H.; Villemin, D.; Desbène, P. L. *Talanta* **2009**, *78*, 631–637.
- (14) Lin, C.-E.; Liao, W.-S.; Chen, K.-H. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3139–3146.
- (15) Wren, S. A. C. *J. Chromatogr.* **1993**, *636*, 57–62.
- (16) Wren, S. A. C. *Electrophoresis* **1995**, *16*, 2127–2131.
- (17) Rawjee, Y. Y.; Williams, R. L.; Vigh, G. *J. Chromatogr., A* **1993**, *652*, 233–245.
- (18) Biggin, M. E.; Williams, R. L.; Vigh, G. *J. Chromatogr., A* **1995**, *692*, 319–325.
- (19) Williams, B. A.; Vigh, G. *J. Chromatogr., A* **1997**, *777*, 295–309.
- (20) Zhu, L.; Vigh, G. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2016–2024.
- (21) Rawjee, Y. Y.; Vigh, G. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 619–627.

* Corresponding author. Phone: +49-3641-949830. Fax: +49-3641-949802. E-mail: gerhard.scriba@uni-jena.de.

- (1) Chankvetadze, B.; Schulte, G.; Blaschke, G. *Enantiomer* **1997**, *2*, 157–179.
- (2) Chankvetadze, B. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4022–4035.
- (3) Li, J.; Waldron, K. C. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 171–179.

complexation constants of the charged and uncharged forms of the analyte as well as the ionic mobilities of the free and complexed analyte. The model enables a mathematical rationalization of pH- and selector concentration-dependent reversal of EMO. Experimental proof of the model was provided by the migration behavior of the enantiomers of Ala-Tyr and Asp-PheOMe in the presence of heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (DM- β -CD) as chiral selector in the pH range 2–4. Ala-Tyr displayed pH-dependent reversal of EMO under these experimental conditions while Asp-PheOMe did not.^{4,5} CDs are by far the most frequently applied chiral selectors in CE.²² Their application in separation sciences originated in thin-layer chromatography²³ and liquid chromatography^{24,25} in the 1980s.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. DM- β -CD with an average degree of substitution of 14 was obtained from Cyclolab (Budapest, Hungary). L-Ala-L-Tyr and L-Asp-L-PheOMe were from Bachem (Heidelberg, Germany). D-Ala-D-Tyr and D-Asp-D-PheOMe were synthesized as described.⁴ Riboflavin-5'-phosphate sodium salt hydrate was purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Hexadimethrine bromide (HDB) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All other chemicals were of analytical grade. Buffers and sample solutions were prepared in double-distilled, deionized water, filtered (0.2 μ m), and degassed by sonication.

Capillary Electrophoresis. CE experiments were performed on a Beckman P/ACE MDQ instrument (Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Germany) equipped with a diode array detector and controlled by the 32 Karat software, version 7.0. Separations were carried out in 50 μ m i.d., 360 μ m o.d. fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) with an effective length of 40 cm and a total length of 50.2 at 20 °C. The detection wavelength was set at 214 nm. Sample solutions containing 0.6% DMSO as the electroosmotic flow (EOF) marker were injected at a pressure of 0.2 psi (1.38 kPa) for 3 s. Complexation parameters were obtained using single enantiomers (200 μ g/mL) while enantiomeric selectivity was investigated using a nonracemic mixture (300 μ g/mL).

Complexation parameters were determined in the pH range 1.9–4.8 at DM- β -CD concentrations between 0 and 0.135 M in phosphate, tartrate, aspartate, and malate buffers containing 0.01% HDB. Buffers were prepared by dissolving 20–30 mM of the acid in water and adding the calculated amount of 1 M sodium hydroxide solution to achieve the desired pH. The ionic strength was adjusted to 40 mM by addition of the calculated amount of sodium chloride. Following measurement of the pH, DM- β -CD was added and the buffers were used as such. Analyses were performed at –20 kV (detection at the anodic end). Between runs, the capillary was rinsed for 2 min with 0.1 M HCl, 2 min with 0.2% HDB, and for 4 min with the background electrolyte. Correction of the viscosity of buffers containing DM- β -CD was performed according to Bello et al.²⁶ using the CE instrument as a viscosimeter and 0.01% riboflavin-5'-phosphate as the boundary-

marker. Electrophoretic mobilities were measured in duplicate, and viscosity corrections were performed in quadruplicate.

Enantiomeric selectivity was measured at DM- β -CD concentrations between 0.005 and 0.113 M using 60 mM sodium phosphate buffer pH 2.2, 40 mM sodium phosphate buffer pH 3.0, and 30 mM sodium aspartate buffer pH 3.8 with an ionic strength of 40 mM. The buffers were prepared by dissolution of calculated amounts of the buffer acid and sodium chloride in water and titration to the desired pH using 1 M NaOH. The separation voltage was +25 kV (detection at the cathodic end). Between the analyses, the capillary was flushed 1 min with 0.1 M NaOH, 1 min with 0.1 M HCl, and 1 min with water followed by 5 min with the running buffer. All enantiomeric selectivity experiments were performed in triplicate.

Data Analysis and Mathematical Modeling. Mathematical modeling and data analysis were performed using Mathematica 6.0 (Wolfram Research, Inc., Champaign, IL) and Microcal Origin 6.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA), respectively.

THEORY

Equilibrium Model. The present model describes the migration behavior of a weak base that is protonated at low pH and a neutral CD. Analogous equations may be derived for acidic analytes or charged CD derivatives. Assuming 1:1 complexation between an analyte and a CD, the effective electrophoretic mobility of the analyte, μ_{eff} , depends on the dissociation equilibria of the free analyte (described by K_a) and its CD complex (described by $K_{a/c}$) as well as on the complexation equilibria between the CD and the protonated analyte BH^+ (described by K_+) and the neutral form B (described by K_n) according to eqs 1–4:^{17,27,28}

$$K_a = \frac{[\text{B}][\text{H}^+]}{[\text{HB}^+]} \quad (1)$$

$$K_+ = \frac{[\text{HB}^+\text{CD}]}{[\text{HB}^+][\text{CD}]} \quad (2)$$

$$K_n = \frac{[\text{BCD}]}{[\text{B}][\text{CD}]} \quad (3)$$

$$K_{a/c} = \frac{[\text{BCD}][\text{H}^+]}{[\text{HB}^+\text{CD}]} \quad (4)$$

Only the charged species contribute with their molar fractions to μ_{eff} according to

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha_{\text{HB}^+}\mu_{\text{HB}^+} + \alpha_{\text{HB}^+\text{CD}}\mu_{\text{HB}^+\text{CD}} \quad (5)$$

where α_{HB^+} and $\alpha_{\text{HB}^+\text{CD}}$ are the respective molar fractions and μ_{HB^+} and $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$ are the mobilities of the free protonated analyte and its CD complex. With expression of the molar fractions as a function of the concentration of the respective species and total analyte concentration, subsequent substitution using the

(22) Fanali, S. *Electrophoresis* **2009**, *30*, S203–S210.

(23) Hinze, W. L.; Armstrong, D. W. *Anal. Lett.* **1980**, *13*, 1093–1104.

(24) Armstrong, D. W.; DeMond, W. J. *Chromatogr. Sci.* **1984**, *22*, 411–415.

(25) Armstrong, D. W.; Ward, T. J.; Armstrong, R. D.; Beesley, T. E. *Science* **1986**, *232*, 1132–1135.

(26) Bello, M. S.; Rezzonico, R.; Righetti, P. G. *J. Chromatogr., A* **1994**, *659*, 199–204.

(27) Hammitzsch-Wiedemann, M.; Scriba, G. K. E. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 2619–2628.

(28) Rizzi, A. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3079–3106.

equilibria expressions of eqs 1–4 followed by logarithmic transformation of $[H^+]$ and K_a yields eq 6:²⁷

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{HB}^+} + \mu_{\text{HB}^+\text{CD}}K_+[\text{CD}]}{1 + K_+[\text{CD}]} \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \left(\text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+[\text{CD}]}{1 + K_n[\text{CD}]}\right)}} \quad (6)$$

which expresses μ_{eff} as a function the CD concentration, $[\text{CD}]$, the pH of the background electrolyte, the $\text{p}K_a$ value of the analyte, the binding constants of the protonated and neutral species, K_+ and K_n , as well as the mobilities of the protonated free species and the corresponding complex, μ_{HB^+} and $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$.

The enantioselectivity, S , is the ratio of the effective mobilities of the enantiomers 1 and 2, $\mu_{\text{eff}1}$ and $\mu_{\text{eff}2}$:

$$S = \frac{\mu_{\text{eff}1}}{\mu_{\text{eff}2}} \quad (7)$$

Substitution of the expressions $\mu_{\text{eff}1}$ and $\mu_{\text{eff}2}$ according to eq 6 for each enantiomer results in

$$S = \frac{\{\mu_{\text{HB}^+} + \mu_{\text{HB}^+\text{CD}1}K_{+1}[\text{CD}]\}\{10^{\text{p}K_{a1}}(1 + K_{+2}[\text{CD}]) + 10^{\text{pH}}(1 + K_{n2}[\text{CD}])\}}{\{\mu_{\text{HB}^+} + \mu_{\text{HB}^+\text{CD}2}K_{+2}[\text{CD}]\}\{10^{\text{p}K_{a2}}(1 + K_{+1}[\text{CD}]) + 10^{\text{pH}}(1 + K_{n1}[\text{CD}])\}} \quad (8)$$

An enantioselectivity can only be observed for $\mu_{\text{eff}1} \neq \mu_{\text{eff}2}$. According to eq 8, this can be achieved when the enantiomers differ in the binding constants of the protonated form ($K_{+1} \neq K_{+2}$), the neutral form ($K_{n1} \neq K_{n2}$), and/or the mobilities of the enantiomer–CD complexes ($\mu_{\text{HB}^+\text{CD}1} \neq \mu_{\text{HB}^+\text{CD}2}$). Analogous equations have been derived by Vigh et al.^{17,19} and reviewed by Rizzi.²⁸

Buffer pH and CD concentration are experimental variables. In a typical experiment one of them is set at a constant value so that eq 6 can be simplified, which will subsequently result in a simplified version of eq 8. At a constant CD concentration, μ_{eff} transforms to $\mu_{\text{eff}/\text{CD}}$:

$$\mu_{\text{eff}/\text{CD}} = \frac{\mu_{+/\text{CD}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a/\text{CD}}}} \quad (9)$$

where $\mu_{+/\text{CD}}$ is the effective mobility of the fully protonated analyte and $\text{p}K_{a/\text{CD}}$ is the $\text{p}K_a$ value, both at the fixed CD concentration. $\mu_{+/\text{CD}}$ is described by

$$\mu_{+/\text{CD}} = \frac{\mu_{\text{HB}^+} + \mu_{\text{HB}^+\text{CD}}K_+[\text{CD}]}{1 + K_+[\text{CD}]} \quad (10)$$

and $\text{p}K_{a/\text{CD}}$ by

$$\text{p}K_{a/\text{CD}} = \text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+[\text{CD}]}{1 + K_n[\text{CD}]} \quad (11)$$

In the absence of a selector, $\mu_{\text{eff}/\text{CD}}$ becomes μ_f which is expressed by

$$\mu_f = \frac{\mu_{\text{HB}^+}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad (12)$$

while at an infinite high CD concentration, the complex mobility is described by

$$\mu_c = \frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a/c}}} \quad (13)$$

$\text{p}K_{a/c}$ is the $\text{p}K_a$ value of the diastereomeric analyte–CD complex and a function of the $\text{p}K_a$ of the free analyte and the complexation constants K_+ and K_n according to

$$\text{p}K_{a/c} = \text{p}K_a + \log \frac{K_+}{K_n} \quad (14)$$

$\text{p}K_{a/c}$ is the limiting value of $\text{p}K_{a/\text{CD}}$ for $[\text{CD}] \rightarrow \infty$ according to eq 11 and is referred to as the complexation-induced $\text{p}K_a$ shift. At constant pH, eq 6 can be simplified to the well-known equation:¹⁵

$$\mu_{\text{eff}/\text{pH}} = \frac{\mu_f + \mu_c K[\text{CD}]}{1 + K[\text{CD}]} \quad (15)$$

K is the apparent complexation constant expressed by

$$K = \frac{K_+ + K_n 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} \quad (16)$$

K_+ , K_n , μ_{HB^+} , and $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$ are pH-independent parameters, while K , μ_f , and μ_c are pH-dependent parameters.

Separation Selectivity Plot. For a systematic classification with regard to EMO, the constellation of the operator dependent parameters, chiral selector concentration, $[\text{CD}]$, and buffer pH specifically in relation to the $\text{p}K_a$ of the analyte have to be considered. Thus, a 3D plot of the selectivity S as a function of $[\text{CD}]$ and pH has four corner points with low/high $[\text{CD}]$ and low/high pH. In the following mathematical treatment, “low” and “high” pH with regard to analyte $\text{p}K_a$ are defined as $\text{pH} \rightarrow -\infty$ and $\text{pH} \rightarrow +\infty$, respectively, meaning that the analyte is essentially fully protonated at “low” pH while it is basically completely deprotonated, i.e., neutral, at “high” pH. $[\text{CD}]$ is defined between 0 and $+\infty$. At infinite $[\text{CD}]$ essentially only the analyte–CD complexes exist. At $[\text{CD}] = 0$ enantioselectivity is not possible, so that for mathematical treatment an infinitesimal CD concentration is assumed. Thus, at this concentration, S can be derived from the first derivative $\delta S / \delta [\text{CD}]$ at $[\text{CD}] = 0$. For $\delta S / \delta [\text{CD}] < 0$ follows $S < 1$, for $\delta S / \delta [\text{CD}] = 0$ follows $S = 1$, and for $\delta S / \delta [\text{CD}] > 0$ follows $S > 1$. For practical reasons, the infinitesimal and infinite CD concentrations are also referred to as “low” and “high” $[\text{CD}]$, respectively.

At the corner point 1 at $\text{pH} \rightarrow -\infty$ and $[\text{CD}] \rightarrow +\infty$, essentially only the fully protonated analyte–CD complex exists, so that S is solely a function of the complex mobilities:

$$S = \frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD}1}}{\mu_{\text{HB}^+\text{CD}2}} \quad (17)$$

Table 1. Systematic Classification of the Separation Selectivity with Regard to EMO as Derived from Equations 17–20 in the Area around the Four Corner Points Defined by the Extremes of pH and [CD]^a

| case | selectivity | | | | EMO reversal | | | |
|------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | low pH | | high pH | | pH-dependent | | [CD]-dependent | |
| | high [CD] eq 17 | low [CD] eq 18 | high [CD] eq 19 | low [CD] eq 20 | high [CD] eq 17 → eq 19 | low [CD] eq 18 → eq 20 | low pH eq 18 → eq 17 | high pH eq 20 → eq 19 |
| I | S = 1 | S = 1 | S < 1 | S < 1 | – | – | – | – |
| II | | S < 1 | S = 1 | S ≤ 1 | – | – | – | – |
| III | | | | S > 1 | – | – | – | – |
| IV | | | S < 1 | S ≤ 1 | – | – | – | – |
| V | | | | S > 1 | – | + | – | + |
| VI | | | S > 1 | S ≤ 1 | – | – | – | + |
| VII | | | | S > 1 | – | + | – | – |
| VIII | S < 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | – | – | – | – |
| IX | | | | S > 1 | – | + | – | + |
| X | | | S > 1 | S ≤ 1 | + | – | – | + |
| XI | | | | S > 1 | + | + | – | – |
| XII | | S > 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | – | + | + | – |
| XIII | | | | S > 1 | – | – | + | + |
| XIV | | | S > 1 | S ≤ 1 | + | + | + | + |
| XV | | | | S > 1 | + | – | + | – |

^a A pH-dependent and [CD]-dependent reversal of EMO under the appropriate conditions is indicated by a “+”. For example, in case IX, selectivities at low pH/low [CD] and low pH/high [CD] show the same ratio compared to 1 so that no [CD]-dependent EMO reversal is observed as indicated by “–” in the eq 18 → eq 17 transition column on the right hand side of the table. In contrast, selectivities at low [CD]/low pH and low [CD]/high pH have opposite ratios which results in a pH-dependent EMO reversal indicated by “+” in the eq 18 → eq 20 transition column.

At the vertex 2 at pH → –∞ and infinitesimal [CD], basically only the noncomplexed fully protonated analyte is present so that

$$\frac{\partial S}{\partial [CD]} = \frac{\mu_{\text{HB}^+}(-K_{+1} + K_{+2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1}K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}K_{+2}}{\mu_{\text{HB}^+}} \quad (18)$$

At the corner point 3 at pH → +∞ and [CD] → +∞, the neutral, fully complexed species predominate resulting in

$$S = \frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1}K_{+1}K_{n2}}{\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}K_{+2}K_{n1}} \quad (19)$$

Finally, at the vertex 4 at pH → +∞ and infinitesimal [CD], the analyte exists mainly in the neutral free form so that

$$\frac{\partial S}{\partial [CD]} = \frac{\mu_{\text{HB}^+}(-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1}K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}K_{+2}}{\mu_{\text{HB}^+}} \quad (20)$$

With pH or [CD] constant, a selectivity curve parallel to the edges of the surface plot defined by the four corner points is obtained which gives information if the selectivity (and with it the EMO) changes between the extreme values. The effective electrophoretic mobilities for each enantiomer are calculated according to eq 9 (constant [CD]) or eq 15 (constant pH). It can be shown that the respective mobility curves of each pair of enantiomers can intersect only once between the extremes so that reversal of the EMO, i.e., $S < 1$ versus $S > 1$, can occur only once along the profiles parallel to the edges of the plot. Examples of plots with intersecting curves depending on the pH of the background electrolyte as well on [CD] will be discussed below. Knowing S in the corner points, one can conclude if a selectivity change occurs along the plot upon changing either pH or [CD]. As a consequence, selectivity S derived for the corner points according

to eqs 17–20 will not only be valid at the vertices themselves but also in their vicinity where protonation and complexation equilibria are similar.

Thus, four selectivity regions can be defined. In a CE experiment of weakly basic analytes with neutral CDs, “low” pH refers to the pH region at least 1–2 units below the pK_a of the base. Because the uncharged compounds and complexes do not possess an effective mobility, “high pH” is limited to a pH around the pK_a of the analytes to about 1 pH unit above the pK_a where protonated and neutral forms of the analyte coexist. The situation in the four regions is as follows: vertex 1 (low pH, high [CD]), the analytes are positively charged and fully complexed. Thus, S depends essentially on the ratio of the complex mobilities according to eq 17. Vertex 2 (low pH, low [CD]), the free and complexed protonated species coexist so that the binding constants of the protonated analytes additionally affect S (eq 18). Vertex 3 (high pH, high [CD]), the protonated and neutral forms of the analytes coexist and are essentially complexed. Consequently, S is a function of the complex mobilities as well as the binding constants of the protonated and neutral species according to eq 19. Vertex 4 (high pH, low [CD]), S depends on the ratio of the affinity constants of the protonated analyte, K_{+1}/K_{+2} , relative to the ratio of the binding constants of the neutral species, K_{n1}/K_{n2} , as well as on the dimensions of the affinity constants K_+ relative to K_n (eq 20).

With dependence on the complexation constants of the charged and neutral analyte enantiomers by a CD as well as the mobilities of the free analytes and diastereomeric enantiomer–CD complexes, different scenarios can result. With respect to the possibilities of the selectivity in the areas around the four corner points of the selectivity surface plot, 15 different cases can be classified mathematically as summarized in Table 1. See also Supporting Information for more detailed Tables S-1A and S-1B, which include the mathematical treatment deriving S for the respective regions. Selectivity surface plots illustrating the 15 cases

listed in Table 1 are shown in the Supporting Information in Figure S-1 using model parameters summarized in Table S-2.

In order to assign a separation to one of the cases in Table 1, the pH-independent parameters, μ_{HB^+} , $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1}$, $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}$, K_{+1} , K_{+2} , $K_{\text{n}1}$, $K_{\text{n}2}$, and $\text{p}K_{\text{a}}$, must be known. Subsequently, the selectivity values S and $\delta S/\delta[\text{CD}]$ in the corner points are calculated according to eqs 17–20 and the case can be identified based on these values. For example, for an enantiomeric pair with the parameters $\mu_{\text{HB}^+} = 18.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1} = 8.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2} = 8.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $K_{+1} = 160 \text{ L/mol}$, $K_{+2} = 190 \text{ L/mol}$, $K_{\text{n}1} = 14 \text{ L/mol}$, $K_{\text{n}2} = 21 \text{ L/mol}$, and $\text{p}K_{\text{a}} = 4.0$, the following values are obtained: vertex 1, $S = 0.94$ ($S < 1$); vertex 2, $\delta S/\delta[\text{CD}] = 11.4$ ($\delta S/\delta[\text{CD}] > 0 \rightarrow S > 1$); vertex 3, $S = 1.19$ ($S > 1$); and vertex 4, $\delta S/\delta[\text{CD}] = -11.6$ ($\delta S/\delta[\text{CD}] \leq 0 \rightarrow S \leq 1$). With this combination, the separation can be assigned to case XIV. One has to keep in mind that enantiomers 1 and 2 are not defined a priori in all cases. In cases VIII to XV, the assignment is based on the complex mobilities in such a manner that $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1} < \mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}$. In contrast, the pH-independent complex mobilities are equal in cases I to VII. In this situation, the assignment must be performed based on eq 18. A more pragmatic approach is the calculation of the S values without previously defining enantiomer 1 and 2 and comparing the obtained S and $\delta S/\delta[\text{CD}]$ values with Table 1. If an opposite pattern of S values to one of the cases is obtained, the assignment can be performed by switching the enantiomers.

As the determination of the mobility and equilibria parameters is tedious and time-consuming, these data are typically not known for a given enantioseparation. However, with careful analysis, the separation selectivity at the combination of low/high pH and low/high [CD] one will most likely be able to assign the separation to one of the cases in Table 1 based on these four measurements of the selectivity only.

Effects Leading to Inversion of Enantiomer Migration Order. The following discussion of the reversal of EMO is based on theoretical considerations with regard to the limiting values that can be mathematically described at the corner points of the selectivity plot. In practice, separations may not be observed because the limiting values will not be reached and, moreover, due to the fact that small effects are superimposed by peak broadening diffusion processes.

Generally, four different phenomena result in an inversion of EMO of a weak base in the presence of neutral selectors, three in a pH-dependent manner and one in a selector concentration-dependent manner. A pH-dependent inversion of EMO can be due to (1) inversion of the complex mobility ratio caused by enantioselective complexation-induced $\text{p}K_{\text{a}}$ -shifts, (2) an inversion of the ratio of the mobilities of the analyte-selector complex and the free analyte due to a significant complexation-induced $\text{p}K_{\text{a}}$ -shift to a higher value, and (3) opposite chiral recognition of the protonated and uncharged species by the chiral selector. Further mechanisms for the reversal of EMO such as the use of CDs with opposite chiral recognition ability or an alteration of EMO based on a reversal of the polarity of the applied voltage will not be considered here as these are based on different mechanisms. Further ways of the inversion of EMO as well as the intuitive explanation of the pH and [CD]-dependent reversal of EMO are summarized in reviews by Chankvetadze.^{1,2}

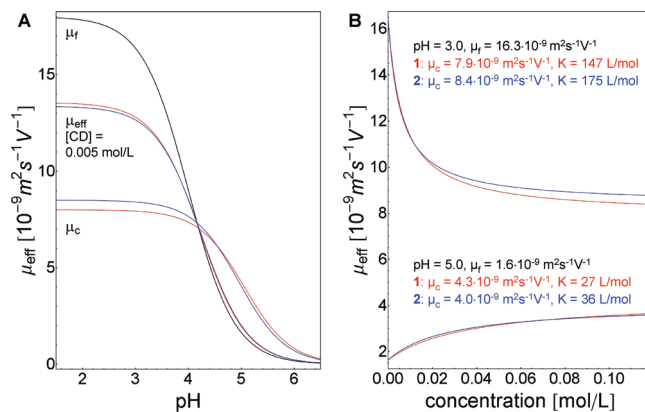


Figure 1. Effective electrophoretic mobilities as a function of (A) buffer pH and (B) chiral selector concentration for enantiomers 1 (red) and 2 (blue). Constants used for calculation: $\mu_{\text{HB}^+} = 18.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1} = 8.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2} = 8.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $K_{+1} = 160 \text{ L/mol}$, $K_{+2} = 190 \text{ L/mol}$, $K_{\text{n}1} = 14 \text{ L/mol}$, $K_{\text{n}2} = 21 \text{ L/mol}$, $\text{p}K_{\text{a}/\text{c}1} = 5.06$, $\text{p}K_{\text{a}/\text{c}2} = 4.96$.

In Table 1 (and Tables S-1A and S-1B in the Supporting Information) it has been indicated if reversal occurs and under which conditions, i.e., pH-dependent reversal at low [CD], high [CD], etc. Below, scenarios leading to EMO reversal based on the pH of the background electrolyte and selector concentration will be discussed on a mathematical basis and illustrated for case XIV as an example using the parameters listed in Table S-2 in the Supporting Information. The curves of the effective mobilities of the enantiomers as a function of pH and [CD] for this example are shown in Figure 1.

pH-Dependent Reversal of Enantiomer Migration Order. pH-dependent reversal of EMO based on an enantioselective $\text{p}K_{\text{a}}$ shift (mechanism 1) at high [CD] refers to the situation between the first and third corner point of the selectivity plot. For EMO reversal, the curves describing μ_{eff} of the enantiomers must intersect as shown in Figure 1A for μ_{c} . Such a behavior can be rationalized comparing the limiting values of S at low and high pH as defined by eqs 17 and 19. In these regions, complex mobilities dominate. Thus, EMO reversal depends on the ratio of the complexation constants $K_{+1}K_{\text{n}2}/K_{\text{n}1}K_{+2}$. Because the ratio K_{+}/K_{n} affects the protonation equilibrium of the complex (eq 14), this relationship can be expressed as the difference of the $\text{p}K_{\text{a}}$ values of the diastereomeric analyte enantiomer-CD complexes by $10^{\text{p}K_{\text{a}/\text{c}1} - \text{p}K_{\text{a}/\text{c}2}}$. In the case of differing pH-independent complex mobilities, i.e., $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1} < \mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}$, inversion of EMO is observed when $10^{\text{p}K_{\text{a}/\text{c}1} - \text{p}K_{\text{a}/\text{c}2}} = K_{+1}K_{\text{n}2}/K_{\text{n}1}K_{+2}$ exceeds the reciprocal value of the ratio of the complex mobilities which is $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}/\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1}$, with the mobility ratio being larger than 1 (in the example: $10^{\text{p}K_{\text{a}/\text{c}1} - \text{p}K_{\text{a}/\text{c}2}} = K_{+1}K_{\text{n}2}/K_{\text{n}1}K_{+2} = 1.26$ and $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_2}/\mu_{\text{HB}^+\text{CD}_1} = 1.06$). Thus, EMO can change when the enantiomer exhibiting the lower value of $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$ possesses a higher $\text{p}K_{\text{a}/\text{c}}$ value.

According to eq 14, the complexation-induced $\text{p}K_{\text{a}}$ shift is a function of K_{+}/K_{n} . The higher the ratio K_{+}/K_{n} , i.e., the more preferred the protonated species is complexed compared to the neutral form, the higher is the resulting $\text{p}K_{\text{a}}$ shift (in the present example, $K_{+1}/K_{\text{n}1} = 11.4$ and $\text{p}K_{\text{a}/\text{c}1} = 5.06$ versus $K_{+2}/K_{\text{n}2} = 9.0$ and $\text{p}K_{\text{a}/\text{c}2} = 4.96$). Enantioselective $\text{p}K_{\text{a}}$ -shifts have been described for the carboxylic acid and amino groups of

dansylated amino acids.¹⁰ As only the cationic species contribute to the effective complex mobilities, the enantiomer with the higher complexation-induced pK_a shift exhibits the higher pH-dependent effective complex mobility μ_c in the pH range close to the pK_a value of the analyte even in the case of identical pH-dependent mobilities of the protonated complexes μ_{HB^+CD} (eq 13).

An enantioselective pK_a shift can also result in a reversal of EMO at low [CD]. This is observed when the difference between the affinity constants is rather small compared to the complex mobilities. As outlined above, a pH-dependent change in the ratio K_+/K_n is always associated with an enantioselective pK_a shift. Thus, at low pH, the affinity constants may dominate EMO, while at high pH, complex mobilities will determine EMO. The opposite scenario may apply as well, i.e., complex mobilities define EMO at low pH and complexation constants determine EMO at high pH.

pH-dependent reversal of EMO based on inversion of the mobilities due to a significant pK_a shift (mechanism 2) is observed at low [CD] only. The pK_a shift can be nonenantioselective. The situation is described between the second (eq 18) and fourth corner point (eq 20). For inversion of EMO, the curves describing μ_{eff} of the enantiomers must intersect as shown in Figure 1A for μ_{eff} at [CD] = 0.005 mol/L. In this scenario, the complexation constants dominate EMO. The conditions have to be fulfilled by both enantiomers simultaneously. The ratio of the electrophoretic mobilities of the free species, μ_f , and the complex, μ_c , can be reversed. At low pH, all species are essentially fully charged so that the pH-dependent mobilities μ_f and μ_c can be approximately described by the pH-independent parameters μ_{HB^+} and μ_{HB^+CD} , with $\mu_{HB^+} > \mu_{HB^+CD}$ due to the larger hydrodynamic radius of the complex. Upon an increase in the buffer pH, μ_f and μ_c described by eqs 12 and 13 are also affected by the respective protonation equilibria pK_a and $pK_{a/c}$. The conditions for the crossing of the pH-dependent mobility curves can be derived from the ratio μ_c/μ_f at the limiting values. At $pH \rightarrow -\infty$ (low pH), essentially only the protonated species are present so that

$$\frac{\mu_c}{\mu_f} = \frac{\mu_{HB^+CD}}{\mu_{HB^+}} \quad (21)$$

At $pH \rightarrow +\infty$ (high pH), the affinity constants K_+ and K_n also contribute according to

$$\frac{\mu_c}{\mu_f} = \frac{\mu_{HB^+CD}}{\mu_{HB^+}} 10^{pK_{a/c} - pK_a} = \frac{\mu_{HB^+CD} K_+}{\mu_{HB^+} K_n} \quad (22)$$

Thus, crossing of the pH-dependent mobility curves can be observed when $10^{pK_{a/c} - pK_a} = K_+/K_n$ exceeds μ_{HB^+}/μ_{HB^+CD} (In the example, $10^{pK_{a/c} - pK_a} = K_+/K_n = 11.4$ and $\mu_{HB^+}/\mu_{HB^+CD} = 2.3$ for enantiomer 1 and $10^{pK_{a/c} - pK_a} = K_+/K_n = 9.0$ and $\mu_{HB^+}/\mu_{HB^+CD} = 2.1$ for enantiomer 2). At low pH when μ_f is higher compared to μ_c , the enantiomer exhibiting the higher complexation constant migrates last while at a sufficiently high pH the stronger complexed enantiomer migrates first when μ_c exceeds μ_f . This mechanism leading to a pH-dependent inversion of EMO has not been recognized previously.

Probably the most obvious mechanism leading to a pH-dependent reversal of EMO is based on opposite chiral recognition of a selector toward the analyte enantiomers as protonated and neutral species (mechanism 3). This will lead to an inversion of EMO at low [CD]. Moreover, opposite chiral recognition will also result in differences of the K_+/K_n ratios of the enantiomers which will translate into enantioselective complexation-induced pK_a shifts (mechanism 1). Thus, a pH-dependent reversal of EMO will most likely be also observed at high [CD] as a function of both mechanisms. Opposite chiral recognition of the protonated and zwitterionic forms of the LL- and DD-enantiomers of Ala-Phe and Leu-Phe by β -CD has been described.³

With regard to the pH-dependent reversal of EMO as indicated in Table 1, the mechanism behind the reversal at high [CD] listed in the eq 17 \rightarrow eq 19 transition column is always an enantioselective pK_a shift a function of K_+/K_n (mechanism 1). Opposite chiral recognition of the enantiomers in their charged and uncharged forms by the selector (mechanism 3) may be one reason for an enantioselective pK_a shift, but other scenarios may apply as well. The pH-dependent reversal of EMO at low [CD] (eq 18 \rightarrow eq 20 transition column) may be caused by all three mechanisms in cases VII, IX, XI, and XII, while only mechanism 2 causes reversal of EMO in cases III, V, and XIV.

CD Concentration-Dependent Reversal of the Enantiomer Migration Order. Reversal of EMO as a function of [CD] at a fixed buffer pH is described by parallels to the edges between corner points 1 and 2 (low pH) and 3 and 4 (high pH), respectively, as depicted by eqs 17 and 18 for low pH and eqs 19 and 20 for high pH. Reversal of EMO is caused by the opposing effects of complexation constants and complex mobilities at the respective pH. Inversion of EMO is observed, when the mobility curves of the enantiomers cross as outlined for the present example of case XIV in Figure 1B at pH 3 and 5. The values of the pH-dependent mobilities were calculated from eqs 12, 13, and 15, the pH-dependent complexation constants K were calculated according to eq 16 using the pH-independent data listed in Table S-2 in the Supporting Information for case XIV.

In order to observe a [CD]-dependent reversal of EMO, the selectivities at the limiting values at the respective corner points of maximized and minimized [CD] have to be diametrical and one has to exceed a value of 1 while the other has to be below 1. At (infinite) high [CD], essentially only the complexes exist so that

$$S = \frac{\mu_{c1}}{\mu_{c2}} \quad (23)$$

while at low [CD], the expression $\delta S/\delta[CD]$ is used for characterization of S at the infinitesimal chiral selector concentration:

$$\frac{\partial S}{\partial[CD]} = \frac{\mu_f(-K_1 + K_2) + \mu_{c1}K_1 - \mu_{c2}K_2}{\mu_f} \quad (24)$$

Equation 24 can be rearranged to yield a S^* value which defines EMO analogous to the selectivity S . Different expressions are obtained depending on the fact if the mobility of the free species,

Table 2. Apparent Mobilities and Equilibrium Constants Describing the Complexation of the Enantiomers of Ala-Tyr and Asp-PheOMe Using DM- β -CD as Chiral Selector As Well As Selectivity, S , or $\delta S/\delta[CD]$ in the Corner Points of the pH-[CD] Plot^a

| parameter | Ala-Tyr | | Asp-PheOMe | |
|---|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | DD | LL | DD | LL |
| μ_{HB^+} [10^{-9} m ² s ⁻¹ V ⁻¹] | | 15.88 \pm 0.07 | | 15.66 \pm 0.08 |
| μ_{HB^+CD} [10^{-9} m ² s ⁻¹ V ⁻¹] | 6.68 \pm 0.06 | 6.55 \pm 0.06 | 5.89 \pm 0.09 | 5.84 \pm 0.10 |
| K_+ [L/mol] | 165 \pm 7 | 139 \pm 6 | 141 \pm 6 | 116 \pm 5 |
| K_n [L/mol] | 18.5 \pm 1.5 | 15.0 \pm 1.5 | 114 \pm 7 | 94 \pm 6 |
| pK_a | | 3.12 \pm 0.01 | | 2.99 \pm 0.01 |
| $pK_{a/c}$ | 4.07 \pm 0.03 | 4.08 \pm 0.03 | 3.08 \pm 0.02 | 3.08 \pm 0.02 |
| K_+/K_n | 9.0 \pm 0.6 | 9.2 \pm 0.6 | 1.23 \pm 0.06 | 1.23 \pm 0.06 |
| S according eq 17 | | 1.019 \pm 0.014 | | 1.009 \pm 0.023 |
| $\delta S/\delta[CD]$ according eq 18 | | -14 \pm 5 | | -15 \pm 4 |
| S according eq 19 | | 1.00 \pm 0.08 | | 1.01 \pm 0.05 |
| $\delta S/\delta[CD]$ according eq 20 | | 9 \pm 3 | | -10 \pm 6 |

^a The standard deviations were either obtained from the regression data calculated by the Origin Software or calculated from the regression data according the law of error propagation.

μ_f , exceeds the mobility of the complexes of the enantiomers, μ_{c1} and μ_{c2} , or not, resulting in

$$S^* = \frac{(\mu_f - \mu_{c2})K_2}{(\mu_f - \mu_{c1})K_1} \quad (25)$$

when μ_{c1} and μ_{c2} are smaller than μ_f and in

$$S^* = \frac{(\mu_{c1} - \mu_f)K_1}{(\mu_{c2} - \mu_f)K_2} \quad (26)$$

when μ_{c1} and μ_{c2} exceed μ_f .

EMO reversal as a function of [CD] can be observed at low and high pH. Typically μ_c is smaller than μ_f in the entire pH range due to the larger hydrodynamic radius of the complex except in the case of a significantly high complexation-induced pK_a shift (pH-Dependent Reversal of Enantiomer Migration Order, mechanism 2). In this scenario μ_c exceeds μ_f at high pH.

For the typical case of $\mu_c < \mu_f$ and $\mu_{c1} < \mu_{c2}$, EMO is reversed when the affinity constant ratio K_2/K_1 exceeds $(\mu_f - \mu_{c1})/(\mu_f - \mu_{c2})$; the latter is greater than 1 (in the present example at pH 3 in Figure 1B, $K_2/K_1 = 1.19$ and $(\mu_f - \mu_{c1})/(\mu_f - \mu_{c2}) = 1.06$). Thus, an inversion can be achieved when the stronger complexed enantiomer also exhibits the higher complex mobility. The respective enantiomer will migrate last at low [CD] when complexation constants dominate EMO and first at high [CD] when complex mobilities dominate the migration behavior. This mechanism can result in EMO reversal at low and high pH. If the difference between the complexation constants is rather small compared to the ratio of the mobilities, i.e., $1 < K_2/K_1 < (\mu_f - \mu_{c1})/(\mu_f - \mu_{c2})$, complex mobilities determine migration order even at infinitesimal [CD] and no inversion of EMO is observed.

For the situation $\mu_c > \mu_f$ and $\mu_{c1} < \mu_{c2}$, which can occur only at high pH, EMO changes when the complexation constant ratio K_1/K_2 exceeds $(\mu_{c2} - \mu_f)/(\mu_{c1} - \mu_f)$. The mobility ratio is greater than 1. In the example at pH 5 in Figure 1B, enantiomer 1 possesses a higher complex mobility μ_c than enantiomer 2 due to the enantioselective pK_a shift so that the conditions derived above in a systematic way have to be inverted. Thus, for $\mu_{c1} >$

μ_{c2} , the expression becomes $K_2/K_1 > (\mu_{c1} - \mu_f)/(\mu_{c2} - \mu_f)$ with $K_2/K_1 = 1.33$ and $(\mu_{c1} - \mu_f)/(\mu_{c2} - \mu_f) = 1.10$. In case of intersecting pH-dependent mobility curves for the free and complexed species, a [CD]-dependent reversal of EMO can be observed at high pH when the stronger complexed enantiomer exhibits the lower complex mobility. As stated above, if the difference between the complexation constants is rather small, i.e., $1 < K_1/K_2 < (\mu_{c2} - \mu_f)/(\mu_{c1} - \mu_f)$, complex mobilities dominate EMO also at infinitesimal [CD] and no reversal of EMO will be observed over the entire [CD] range.

The mechanism described above for $\mu_c < \mu_f$ applies to all cases of [CD]-dependent EMO reversal at low pH as indicated in the eq 18 \rightarrow eq 17 transition column in Table 1 and at high pH (eq 20 \rightarrow eq 19 column) in cases VI, X, and XIII. The situation described for $\mu_c > \mu_f$ causes inversed EMO at high pH for cases V and XIV. With respect to case IX, both mechanisms can apply.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental proof of the theoretical model was provided by determination of the complexation and mobility parameters of the LL- and DD-enantiomers of Ala-Tyr and Asp-PheOMe. While Ala-Tyr displayed a pH-dependent reversal of EMO between pH 2.5 and 3.5 using DM- β -CD as the chiral selector, Asp-PheOMe did not.^{4,5} The peptides were treated as weak bases with the protonated, positively charged form as the conjugated acid and the zwitterionic form as the neutral base.

The pH-independent parameters, μ_{HB^+} , μ_{HB^+CD} , K_+ , and K_n as well as pK_a and $pK_{a/c}$ were determined in the pH range 1.9–4.8 and DM- β -CD concentrations between 0 and 0.135 mol/L. Measurements were performed under reversal of the EOF by addition of HDB and reversal of the polarity of the applied voltage in order to allow the determination of EOF-corrected μ_{eff} in low pH buffers at high CD concentrations. The individual enantiomers were applied so that the enantiomer mobilities could also be determined in the case of low separation efficiency. The electrophoretic mobilities were corrected for the EOF and viscosity of the buffer. The data obtained by a three-dimensional, nonlinear curve fitting according to eq 6 are summarized in Table 2. As neither activities nor molalities of the buffer solutions were considered, the data are not thermodynamic constants but rather apparent constants. The limiting values

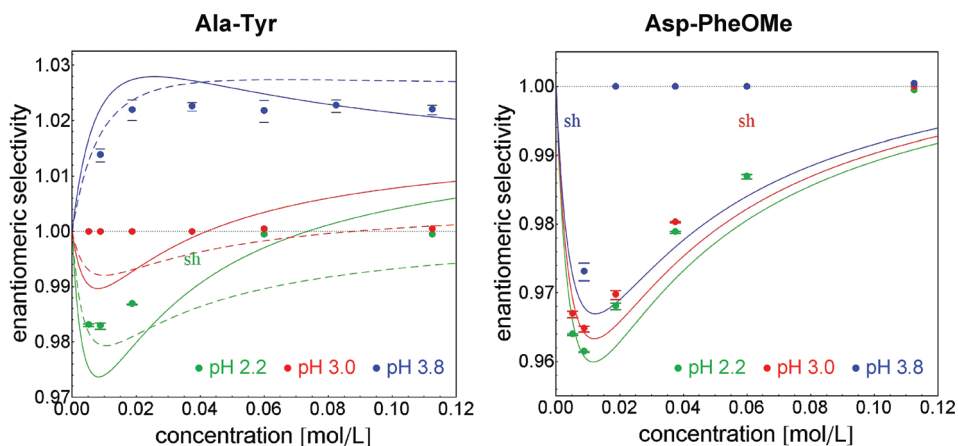


Figure 2. Selectivities of the enantioseparation of Ala-Tyr and Asp-PheOMe a function of DM- β -CD concentration at pH 2.2 (green), 3.0 (red), and 3.8 (blue). The symbols represent experimentally determined values (mean \pm SD, $n = 3$). Peaks with a shoulder are indicated by sh; if no separation was observed at all, S was set at 1. The lines were calculated according to eq 8 using the parameters listed in Table 2 (—) or assuming identical complex mobilities $\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} = \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}$ (- -). For further details, see the discussion.

obtained for the corner points according to eqs 17–20 were also calculated with the DD- and LL-enantiomers being enantiomer 1 and 2, respectively. In addition, the separation selectivity expressed as $S = \mu_{\text{eff}/\text{DD}}/\mu_{\text{eff}/\text{LL}}$ was determined using a nonracemic mixture of the peptide enantiomers at six concentrations of DM- β -CD between 0.005 and 0.113 mol/L at pH 2.2, 3.0, and 3.8. The results are shown as dots in Figure 2. Representative electropherograms are shown in Figure S-2 in the Supporting Information.

At pH 2.2, the LL-enantiomer of Ala-Tyr migrated first with the enantioseparations deteriorating at higher concentrations. At pH 3.0, no separations were observed over the entire concentration range; while at pH 3.8, selectivity initially increased with increasing CD concentrations quickly reaching a plateau. At pH 3.8, D-Ala-D-Tyr migrated before L-Ala-L-Tyr. Subsequently, selectivity curves shown as solid lines in Figure 2 were calculated using the respective data listed in Table 2. At pH 2.2 and 3.0, the curves predict a CD concentration-dependent reversal of EMO that could not be observed in the experiments. In fact, at pH 3.0 no separation could be seen at all. This may be explained by the fact that a reversal can only be observed at very high concentrations of DM- β -CD that were not applied in the present study. However, a more likely explanation refers to the fact that the resolution is quite low under the experimental conditions due to diffusion phenomena so that no separation can be observed within this “blind” range. It should be noted that for pH 2.2 in the DM- β -CD concentration range between 0.05 and 0.18 mol/L, a selectivity value of 1 (i.e., no separation) is within the standard error range of the regression data. Finally, μ_c and consequently $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$ values of the enantiomers may not really differ. Thus, assuming equal complex mobilities, $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$, of the enantiomers mobility curve fitting led to the dashed lines shown in Figure 2, which exhibit improved fits with the experimental data especially at pH 2.2 and 3.8. Furthermore, the mobility and complexation data as well as the calculated selectivities of this curve fit lie within the error range of the respective values of the first curve fit. A CD concentration-dependent reversal of EMO is not predicted by the second fit at pH 2.2. The improved fit at pH 3.8 is due to the fact that a slightly higher pK_a shift is obtained for the DD-enantiomer compared to the LL-isomer resulting in an additional increase of the

complex mobility at pH 3.8 and subsequently a flat plateau above about 0.05 mol/L DM- β -CD. On the basis of the experimental data listed in Table 2, specifically the differing mobilities of the enantiomer–CD complexes, the enantioseparations of Ala-Tyr can be assigned to case XII, assuming equal complex mobilities case VII would apply. The latter provides a better correlation to the selectivities observed in the actual experiments.

The data can be used to rationalize the separation behavior of Ala-Tyr reported earlier.⁵ D-Ala-D-Tyr is complexed stronger compared to the LL-enantiomer over the entire pH range studied. K_+ values are about 9-fold higher than the K_n values resulting in a pK_a shift of almost one unit (Table 2). Thus, a reversal of the mobility ratio of the peptide–CD complex and the free analyte results when increasing the buffer pH in the vicinity of the pK_a of the peptide. At low CD concentrations, the stronger complexed DD-enantiomer migrates slower than L-Ala-L-Tyr at pH 2.2 when the protonated form dominates and first when the pH is raised to pH 3.8. The deteriorating effect of increased CD concentrations at pH 2.2 is due to the increasing influence of $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$ which differs only slightly (or maybe not at all) for the enantiomers. At pH 3.8, the ratio between the pH-dependent complex mobilities μ_c of the enantiomers is slightly increased probably due to a concomitant enantioselective pK_a shift. A separation in the presence of higher CD concentrations is therefore observed. At pH 3.0, no separation is observed as the mobilities of the free form and the analyte–CD complexes differ only slightly.

A pH-dependent reversal of EMO was not observed for Asp-PheOMe^{4,5} and can be easily rationalized from the pH-independent complexation constants and mobilities listed in Table 2. Only a minor nonenantioselective pK_a shift, a K_+/K_n ratio of close to 1 as well as essentially identical $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$ values were found for the enantiomers. In addition, the selectivity values determined at pH 2.2, 3.0, and 3.8 at increasing DM- β -CD concentrations matched the calculated selectivity curves well (Figure 2). At all three pH values, enantioseparations could be observed at low DM- β -CD concentrations that deteriorated upon increasing the concentrations of the chiral selector. As stated above, peak resolution may not be observed in the experiments

due to diffusion phenomena especially at pH 3.8. As no inversion of EMO occurs at low CD concentrations and comigration at high CD concentrations, the enantioseparation of Asp-PheOMe can be clearly assigned to case II. In addition, the migration behavior of the peptide enantiomers can be rationalized using the complexation and mobility data. D-Asp-D-PheOMe is complexed stronger than the LL-enantiomer as both protonated and zwitterionic species. As $\mu_{\text{HB}^+\text{CD}}$ and $\text{p}K_{\text{a}}$ values of both enantiomers are identical, the pH-dependent complex mobilities, μ_{c} , of both enantiomers should be also essentially equal in the pH range close to the $\text{p}K_{\text{a}}$ of the analyte. Moreover, the mobility of the free analyte always exceeds μ_{c} due to the minor $\text{p}K_{\text{a}}$ shift. Thus, the LL-enantiomer always migrates in front of the DD-isomer. Because of slightly weaker interaction of the zwitterionic forms with the CD, the ratio of the mobilities of free and complexed analytes decreases upon increasing the buffer pH, resulting in a decreased separation selectivity at higher pH values.

CONCLUSIONS

A selectivity model of CE enantioseparations as a function of buffer pH and chiral selector concentration in a comprehensive manner has been described. Despite the fact that the present model was developed for weak bases and uncharged chiral selectors, it can certainly be modified to fit enantioseparations of weak acids or enantioseparations utilizing charged selectors which possess electrophoretic self-mobility. With the use of the selectivity at the corner points of a pH-selector concentration plot, 15 theoretical cases can be distinguished which describe the migration behavior including a possible reversal of EMO when increasing either the pH of the background electrolyte or the selector concentration. Overall, four phenomena can lead to an inversion of EMO. (1) pH-dependent reversal of EMO results from an inversion of the complex mobility ratio due to an enantioselective complexation-induced $\text{p}K_{\text{a}}$ shift. While this is the sole mechanism for EMO reversal at high selector concentrations, an enantioselective $\text{p}K_{\text{a}}$ shift may also cause EMO inversion at low [CD]. (2) At low selector concentrations, EMO can be reversed based on an inversed ratio of the mobilities of the analyte-selector complexes and the free analyte when the protonated analyte forms significantly stronger complexes with the selector compared to the neutral analyte species. This mechanism has not been recognized previously. (3) Opposite

chiral recognition of the charged and neutral species of the analyte by the selector will also result in EMO reversal at low [CD]. Reversal of the chiral recognition is always accompanied by an enantioselective $\text{p}K_{\text{a}}$ shift. (4) A selector concentration-dependent reversal of EMO is caused by a single effect, the diametrical influence of complexation constants and analyte complex mobilities.

As experimental verification of the model, the separation of the DD- and LL-enantiomers of Ala-Tyr and Asp-PheOMe in the presence of DM- β -CD was investigated. The previously observed pH-dependent reversal of EMO in the case of Ala-Tyr⁵ could be explained as the result of a much stronger complexation of the protonated species compared to the zwitterionic form leading to a significant complexation-induced $\text{p}K_{\text{a}}$ shift.

Because of experimental error in the determination of the complexation and dissociation constants of analytes, an unequivocal assignment to a certain case of migration behavior may not always be possible. Moreover, a separation that is theoretically predicted from the constants may not be observed in practice due to diffusion processes. Nevertheless, the systematic classification of enantioseparations based on the selectivity in the corner points of the selectivity plots as a function of pH and selector concentration allows one to rationalize the origin of the migration behavior of analytes, especially when phenomena such as a reversal of EMO based on either pH or selector concentration is observed. The systematic cases also enable one to conclude the migration behavior of a pair of enantiomers based on measurement of *S* at the combination of low and high pH and low and high [CD]. Furthermore, although not specifically addressed in the present study, the model can be used for the optimization of enantioseparations. Knowing the migration behavior of analytes in the vicinity of the vertices of a pH-selector concentration plot of the selectivity, optimized separation conditions can be concluded.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review May 28, 2009. Accepted September 20, 2009.

AC901160P

Mathematical approach by a selectivity model for the understanding of pH- and selector concentration-dependent reversal of the enantiomer migration order in capillary electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba

Friedrich Schiller University Jena, Department of Pharmaceutical Chemistry,
Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany

The Supporting Information contains the following additional Tables and Figures:

1. Table S-1A summarizing the systematic classification of the separation selectivity with regard to EMO in the area around the four corner points of pH and [CD] extremes for cases with equal mobilities of the diastereomeric analyte-selector complexes.
2. Table S-1B summarizing the systematic classification of the separation selectivity with regard to EMO in the area around the four corner points of pH and [CD] extremes for cases with different mobilities of the diastereomeric analyte-selector complexes.
3. Table S-2 summarizing mobilities and complexation constants used to construct the selectivity-pH-selector concentration plots shown in Figure S-1.
4. Figure S-1 showing the contour plots of the separation selectivity and peak resolution as a function of buffer pH and selector concentration for the 15 cases based on the complexation and mobility parameters listed in Table S-2.
5. Figure S-2 showing representative electropherograms of enantioseparations of Ala-Tyr at pH 2.2 and 3.8 as well as Asp-PheOMe at pH 2.2 and 3.0 at low and high concentrations of DM- β -CD.

The tables summarize a systematic classification with regard to EMO in the area around the four corner points defined by the extremes of pH and [CD]. Separation selectivity is derived from equations (17) to (20) as indicated by the respective mathematical expressions. While S is directly obtained from equations (17) and (19), equations (18) and (20) describe the first derivative $\delta S/\delta[CD]$ at $[CD] = 0$. $\delta S/\delta[CD] = 0$ refers to $S = 1$, $\delta S/\delta[CD] < 0$ refers to $S < 1$, and $\delta S/\delta[CD] > 0$ refers to $S > 1$. As sufficient for definition only the numerator of the terms derived from equations (18) and (20) is shown. A pH-dependent and [CD]-dependent reversal of EMO is indicated by a plus.

Table S-1A. Cases with equal mobilities of the diastereomeric analyte-selector complexes ($\mu_{HB^+CD1} = \mu_{HB^+CD2}$).

| Case | Constellation of mobility and complexation parameters as well as resulting separation selectivity | | | | | | EMO reversal | | | | | | | |
|------|---|---------------------|--|----------------------|---|------------|--|-------------------------------|---|------------------------------|---|---|---|---|
| | Low pH | | | High pH | | | pH-dependent | | [CD]-dependent | | | | | |
| | High [CD] eq (17) | Low [CD] eq (18) | | High [CD] eq (19) | Low [CD] eq (20) | | High [CD] eq (17) → (19) | Low [CD] eq (18) → (20) | Low pH eq (18) → (17) | High pH eq (20) → (19) | | | | |
| I | $\frac{\mu_{HB^+CD1}}{\mu_{HB^+CD2}} = 1$ | $S = 1$ | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{+1} + K_{+2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} = 0$ | $S = 1$ | $\frac{\mu_{HB^+CD1}}{\mu_{HB^+CD2}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} < 1$ | $S < 1$ | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} < 0$ | $S < 1$ | - | - | - | - | | |
| II | | | $\frac{\mu_{HB^+CD1}}{\mu_{HB^+CD2}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} = 1$ | $S = 1$ | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | - | - | - | - | | | | |
| III | | | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} > 0$ | $S > 1$ | - | + | - | - | | | | | | |
| IV | | | $\frac{\mu_{HB^+CD1}}{\mu_{HB^+CD2}} = 1$ | $S = 1$ | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{+1} + K_{+2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} < 0$ | $S < 1$ | $\frac{\mu_{HB^+CD1}}{\mu_{HB^+CD2}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} < 1$ | $S < 1$ | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | - | - | - | - |
| V | | | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} > 0$ | $S > 1$ | - | + | - | + | | | | | | |
| VI | | | $\frac{\mu_{HB^+CD1}}{\mu_{HB^+CD2}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} > 1$ | $S > 1$ | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | - | - | - | + | | | | |
| VII | | | $\mu_{HB^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) +$ $\mu_{HB^+CD1} \cdot K_{+1} - \mu_{HB^+CD2} \cdot K_{+2} > 0$ | $S > 1$ | - | + | - | - | | | | | | |

Table S-1B. Cases with different mobilities of the diastereomeric analyte-selector complexes ($\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \neq \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}$).

| Case | Constellation of mobility and complexation parameters as well as resulting separation selectivity | | | | | | EMO reversal | | | | | | |
|------|---|---------------------|---|----------------------|---|--|---|---|-----------------------------|------------------------------|---|---|---|
| | Low pH | | | High pH | | | pH-dependent | | [CD]-dependent | | | | |
| | High [CD] eq (17) | Low [CD] eq (18) | | High [CD] eq (19) | Low [CD] eq (20) | | High [CD] eq (17) → (19) | Low [CD] eq (18) → (20) | Low pH eq (18) → (17) | High pH eq (20) → (19) | | | |
| VIII | $\frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}}}{\mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}} < 1$ | $S < 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{+1} + K_{+2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | $\frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}}}{\mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} \leq 1$ | $S \leq 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | - | - | - | - | |
| IX | | | | | $S > 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} > 0$ | $S > 1$ | - | + | - | + | | |
| X | | | | $S \leq 1$ | $\frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}}}{\mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} > 1$ | $S \leq 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | + | - | - | + | |
| XI | | | | $S > 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} > 0$ | $S > 1$ | + | + | - | - | | | |
| XII | | | $S > 1$ | $S \leq 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{+1} + K_{+2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $\frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}}}{\mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} \leq 1$ | $S \leq 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | - | + | + | - |
| XIII | | | | | | $S > 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} > 0$ | $S > 1$ | - | - | + | + | |
| XIV | | | | $S \leq 1$ | $\frac{\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}}}{\mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} > 1$ | $S \leq 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} \leq 0$ | $S \leq 1$ | + | + | + | + | |
| XV | | | | $S > 1$ | $\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}^+\text{CD1}} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}^+\text{CD2}} \cdot K_{+2} > 0$ | $S > 1$ | + | - | + | - | | | |

Table S-2. Model parameters used for the construction of the contour plots shown in Figure S-1. Further parameters used for the calculations: $\mu_{\text{HB}^+} = 18.0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ and $\text{pK}_a = 4.0$. The pK_a values of the complexes, $\text{pK}_{a/c1}$ and $\text{pK}_{a/c2}$, were calculated from the respective parameters. All values were chosen in such a way to allow a clear illustration of the cases.

| Case | $\mu_{\text{HB}^+\text{CD1}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$] | $\mu_{\text{HB}^+\text{CD2}}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$] | K_{+1} [L/mol] | K_{+2} [L/mol] | K_{n1} [L/mol] | K_{n2} [L/mol] | $\text{pK}_{a/c1}$ | $\text{pK}_{a/c2}$ |
|------|--|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| I | 8.0 | 8.0 | 175 | 175 | 190 | 160 | 3.96 | 4.04 |
| II | 8.0 | 8.0 | 190 | 160 | 171 | 144 | 4.05 | 4.05 |
| III | 8.0 | 8.0 | 190 | 160 | 19 | 16 | 5.00 | 5.00 |
| IV | 8.0 | 8.0 | 190 | 160 | 210 | 140 | 3.96 | 4.06 |
| V | 8.0 | 8.0 | 190 | 160 | 10.5 | 7 | 5.26 | 5.36 |
| VI | 8.0 | 8.0 | 190 | 160 | 1850 | 1650 | 3.01 | 2.99 |
| VII | 8.0 | 8.0 | 190 | 160 | 18 | 17 | 5.02 | 4.97 |
| VIII | 8.0 | 8.5 | 190 | 160 | 171 | 144 | 4.05 | 4.05 |
| IX | 8.0 | 8.5 | 190 | 195 | 1900 | 2025 | 3.00 | 2.98 |
| X | 8.0 | 8.5 | 190 | 160 | 1900 | 1800 | 3.00 | 2.95 |
| XI | 8.0 | 8.5 | 190 | 160 | 80 | 100 | 4.38 | 4.20 |
| XII | 8.0 | 8.5 | 160 | 190 | 16 | 19 | 5.00 | 5.00 |
| XIII | 8.0 | 8.5 | 160 | 190 | 144 | 171 | 4.05 | 4.05 |
| XIV | 8.0 | 8.5 | 160 | 190 | 14 | 21 | 5.06 | 4.96 |
| XV | 8.0 | 8.5 | 160 | 190 | 150 | 200 | 4.03 | 3.98 |

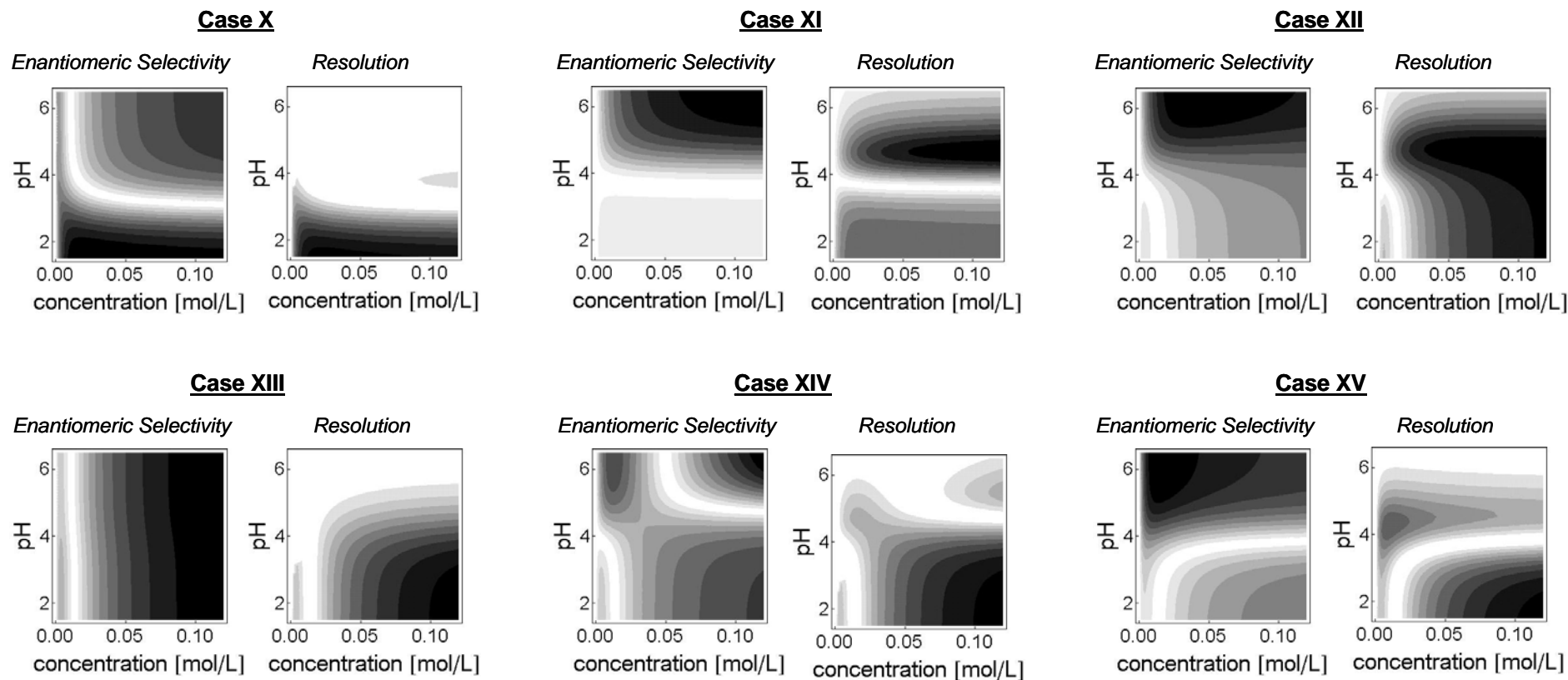
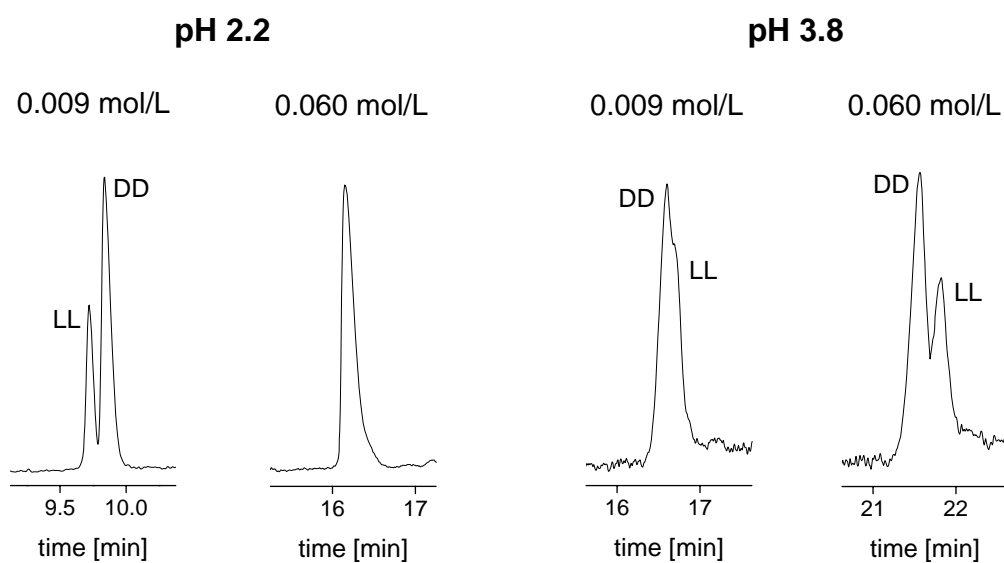


Figure S-1. Contour plots of the enantiomeric selectivity, S , and the peak resolution, R_S , as a function of pH and selector concentration in the absence of an EOF using the mobility and complexation parameters listed in Table S-2. S was calculated according to equation (8), R_S was calculated according to Rawjee and Vigh (*Anal. Chem.* **1994**, 66, 619-627) using the operator dependent parameters: voltage $U = 20$ kV, effective and total length of the capillary $l_{\text{eff}} = 40$ cm and $l_{\text{tot}} = 50$ cm, temperature $T = 293.15$ K. White zones $S = 1$ and $R_S = 0$, dark zones $S \neq 1$ and $R_S \neq 0$, respectively, the darker the color, the higher S or R_S .

Ala-Tyr



Asp-PheOMe

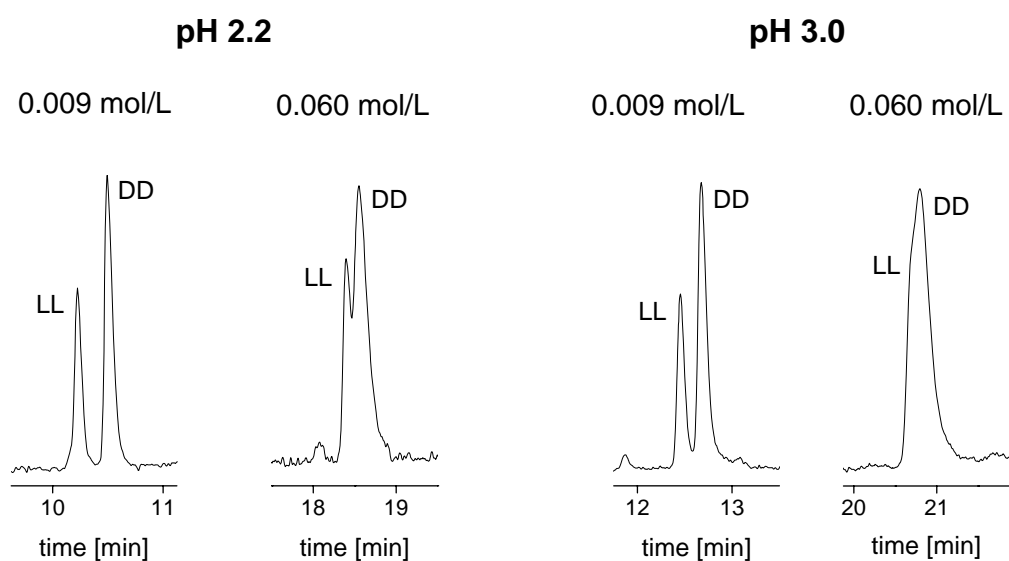


Figure S-2. Representative electropherograms of separations of the DD- and LL-enantiomers of Ala-Tyr and Asp-PheOMe using DM- β -CD as chiral selector. Experimental conditions: 40/50.2 cm fused-silica capillary, 50 μ m ID; electrolyte solutions: pH 2.2: 60 mM sodium phosphate buffer; pH 3.0: 40 mM sodium phosphate buffer; pH 3.8; 30 mM sodium aspartate buffer; 20°C, 25 kV.

4.2 MANUSKRIFT 2

Investigation of the pH-dependent complex formation between β -cyclodextrin and dipeptide enantiomers by capillary electrophoresis and calorimetry

Irina V. Terekhova, Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Bunleu Sungthong, Gerhard K. E. Scriba, in Vorbereitung.

Investigation of the pH-dependent complex formation between β -cyclodextrin and dipeptide enantiomers by capillary electrophoresis and calorimetry

Irina V. Terekhova^{1,2}, Manuela Hammitzsch-Wiedemann¹, Bunleu Sungthong¹, Gerhard K. E. Scriba¹

¹ Friedrich Schiller University Jena, Department of Pharmaceutical Chemistry, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany

² Institute of Solution Chemistry of Russian Academy of Sciences, 1 Akademicheskaya Street, 153045 Ivanovo, Russia

Correspondence to:

Prof. Gerhard K. E. Scriba

Friedrich Schiller University Jena

Department of Pharmaceutical Chemistry

Philosophenweg 14

07743 Jena, Germany

Tel.: +49-3641-949830

Fax: +49-3641-949802

E-mail: gerhard.scriba@uni-jena.de

Abstract

The effect of pH on complex formation between β -cyclodextrin (β -CD) and the enantiomers of the dipeptides Ala-Phe, Ala-Tyr and Asp-PheOMe was investigated at 298.15 K by capillary electrophoresis and calorimetry. β -CD displayed a higher enantioselectivity towards the protonated peptides compared to their zwitterionic forms. While stronger binding of the DD-enantiomers than the LL-stereoisomers were found by calorimetry regardless of the ionization state of the peptides essentially equal complexation constants of the enantiomers were determined by capillary electrophoresis for the zwitterionic species of the peptides. The reversal of the enantiomer migration order observed in capillary electrophoresis was attributed primarily to a stereoselective complexation-induced pK_a shift. In calorimetry, complexation of the protonated DD-enantiomers by β -CD was accompanied by higher enthalpy and entropy changes resulting in more stable complexes compared to the LL-peptides. The enthalpy and entropy of complexation was affected by pH and peptide structure.

Keywords: β -Cyclodextrin; Dipeptide; Inclusion complex formation; Thermodynamics; pK_a shift; Capillary electrophoresis

1. Introduction

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligonucleotides consisting of $\alpha(1\rightarrow4)$ linked D-glucose units. The compounds are shaped like a torus with a lipophilic cavity and a hydrophilic outer surface. The secondary 2- and 3-hydroxy groups of glucose occupy the wider rim while the primary 6-hydroxy groups are found at the narrower rim. The most abundant CDs, α -CD, β -CD and γ -CD differ in the number of glucose units, i.e. 6 (α -CD), 7 (β -CD) and 8 (γ -CD). CDs are able to form inclusion complexes with a variety of compounds via non-covalent interactions such as van der Waals, hydrophobic, electrostatic interactions and hydrogen bonding [1-3]. This has led to the widespread application of CDs, for example, in the pharmaceutical industry [4, 5], food chemistry [6, 7], environmental chemistry [6, 8], cosmetic industry [2], chemical industry [9] and analytical chemistry [8] especially in capillary electrophoresis [10-16].

In CE, enantioseparations can be observed when the enantiomers differ in their effective mobilities, i.e. $\mu_{\text{eff}1} \neq \mu_{\text{eff}2}$. This may be due to differences in the affinities of the analyte enantiomers towards the chiral selector expressed as complexation equilibrium constants of the resulting diastereomeric associates [12, 17]. Moreover, enantioseparations are also achieved when differences in the mobilities of the diastereomeric complexes exist [12, 17]. While in most cases enantioseparations can be explained by either stereoselective complexation alone or a combination of differences in complexation constants and complex mobilities it has also been derived from theoretical considerations that a separation of enantiomers by CE is in principle also possible solely based on differences in the mobilities of the complexes [18].

Studying the enantioseparation of di- and tripeptides using CDs as chiral selectors a pH-dependent reversal of the enantiomer migration order was observed for several peptides using native β -CD [19-21] as well as neutral [20, 21] and charged [22-24] β -CD derivatives. The reversal of the enantiomer migration order could be attributed to the reversal of the chiral recognition ability of the CD towards the analyte. Thus, the enantiomer which is complexed stronger at low pH when the peptide is positively charged is bound weaker at higher pH when the peptide exists primarily as zwitterionic, neutral species [19, 21, 22, 24]. On the other hand, pH-dependent reversal of the enantiomer migration order can be observed when the complex of the stronger bound enantiomer exhibits the higher complex mobility [21, 22]. In this case the complex possesses a higher charge-density ratio due to a complexation-induced pK_a shift [25, 26]. In order to provide a more detailed understanding of the migration behavior of small peptides using β -CD as chiral selector the complexation and mobility parameters as well as the pK_a values of Ala-Tyr, Ala-Phe and Asp-PheOMe were determined by CE. In addition, complexation constants as well as other thermodynamic parameters of complex formation ($\Delta_c G$, $\Delta_c H$ and $\Delta_c S$) of the β -CD-enantiomer complexes were determined by calorimetry in aqueous solution at 298.15 K. pH-dependent reversal of the enantiomer migration order has been described for all three peptides [19-21].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

L-Ala-L-Phe, D-Ala-D-Phe, L-Ala-L-Tyr and L-Asp-L-PheOMe were obtained from Bachem AG (Heidelberg, Germany). D-Ala-D-Tyr and D-Asp-D-PheOMe were synthesized according to standard peptide chemistry procedures reported elsewhere [20, 21]. β -CD was from Wacker Chemie (Munich, Germany). Hexadimethrine bromide was from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and riboflavin-5'-phosphate sodium salt hydrate was from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). All other chemicals were of analytical grade and used as obtained. All solutions were prepared using double-distilled, deionized water, filtered (0.2 μm) and degassed by sonication.

2.2. Capillary electrophoresis

All measurements were performed on a Beckman P/ACE 5510 instrument (Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Germany) equipped with a UV-detector set at 214 nm. Analyses were performed using a 57/50 cm fused-silica capillary, 50 μm ID (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). A new capillary was conditioned by rinsing with 1 M NaOH for 10 min, with water for 1 min, with 1 M HCl for 20 min and again with water for 10 min. The capillary was conditioned on a daily basis by washing for 10 min with 0.1 M NaOH and 10 min with 0.2 % hexadimethrine bromide. Between runs, the capillary was flushed with 0.1 M HCl for 2 min, with 0.2 % aqueous hexadimethrinium bromide for 2 min and finally with the background electrolyte for 4 min. Sample solutions of the peptides in water (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) containing 0.5 % dimethyl sulfoxide as EOF marker were injected at a pressure of 0.5 p.s.i. for 3 s. Separations were performed at 25°C using a voltage of -25 kV. Sodium phosphate, aspartate and citrate buffers containing 2 M urea and 0.01 % hexadimethrine bromide were used as background electrolytes. Buffers were prepared by dissolving 30 to 60 mM of the respective acid in water and adding urea and hexadimethrine bromide and the calculated amount of 1 M sodium hydroxide solution to achieve the desired pH. The ionic strength was adjusted to 40 mM by addition of the calculated amount of sodium chloride. Following measurement of the pH, β -CD was added and the buffers were used as such. β -CD concentrations ranged between 0 and 0.048 M^{-1} . Correction of the viscosity of buffers containing β -CD was performed according to Bello et al. using the CE instrument as viscosimeter and 0.01 % riboflavin-5'-phosphate as boundary-marker [27]. Electrophoretic mobilities were measured in duplicate, viscosity corrections were performed sixfold.

2.3. Calorimetry

All calorimetric measurements were carried out in a home-made solution calorimeter described earlier [28]. During each experiment a glass ampoule with peptide solution of constant mass was dropped into

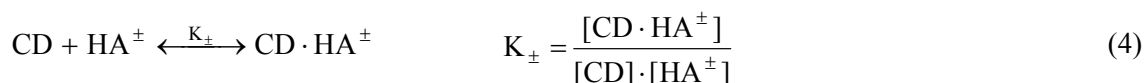
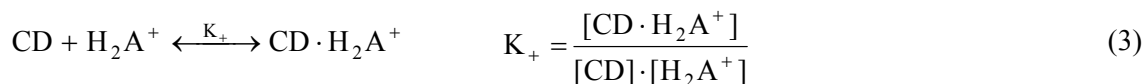
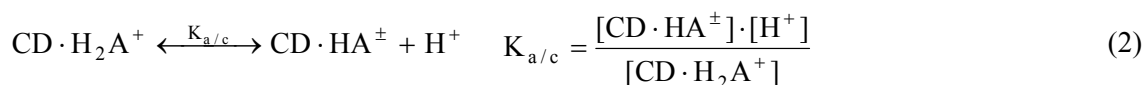
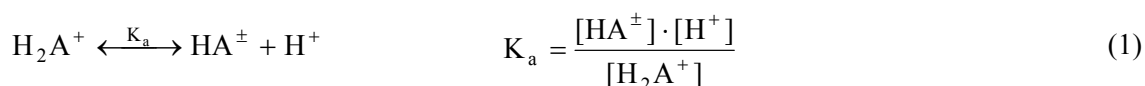
calorimetric cell of 17 mL volume filled with β -CD solutions of variable concentrations (from 0 to 0.05 mol kg⁻¹). The final concentration of peptide solution was 1·10⁻³ mol kg⁻¹. The measured enthalpies of mixing were corrected for peptide dilution in pure buffers. Enthalpies of complex formation and binding constants were calculated simultaneously by use of the minimization computer program "HEAT" [29]. The program allows to remove contributions from the competitive processes such as analyte protonation. Sodium phosphate (pH 2.2) and acetate buffers (pH 5.5) containing 2 M urea were used as background electrolytes. The phosphate buffer was prepared in the same way as described for the CE experiments with the exception that hexadimethrine bromide was not added. The acetate buffer, pH 5.5, was obtained by mixing the corresponding amounts of 2 M acetic acid and 1 M NaOH.

3. Results and discussion

3.1. Capillary electrophoresis

The CE separation of the LL- and DD-enantiomers of Ala-Phe, Ala-Tyr and Asp-PheOMe using native β -CD and derivatized β -CDs has been investigated. Reversal of the enantiomer migration order was observed for all three peptides using β -CD as chiral selector when the pH of the background electrolyte increased from pH 2.5 to 3.5 [19-21] or 3.8 [26]. Generally, the LL-enantiomers migrated before the DD-isomers at pH 2.5 when the peptides are primarily positively charged. At pH 3.5 or 3.8 when the proportion of the deprotonated peptide species is substantially increased the DD-enantiomers migrated faster than the LL-epimers. At pH 3.0 no enantioseparation occurred.

The dipeptides possess two protonation equilibria, the carboxylic acid group (pK_{a1}) and the amino group (pK_{a2}). The dissociation constants $pK_{a1} = 3.08$ and $pK_{a2} = 7.91$ were determined by potentiometry for Ala-Phe [30], $pK_{a1} = 3.12$ was found by CE [26]. For Asp-PheOMe, $pK_{a1} = 3.19$ and $pK_{a2} = 7.87$ were obtained by potentiometry [31] while $pK_{a1} = 3.00$ and $pK_{a2} = 7.76$ were found by CE [32]. A value of 3.15 ± 0.01 has been determined by CE for pK_{a1} of Ala-Tyr [26]. Literature values of pK_{a1} of XXX-Tyr dipeptides are in the range between 3.02 and 3.32, pK_{a2} between 7.14 and 7.78 [30, 33]. Thus, in the pH range 2 - 4 the dipeptides can be treated as a weak acid-base pair with the protonated species, H_2A^+ , as the acid and the zwitterionic, neutral form, HA^\pm , as the corresponding base. Subsequently, two complexation and protonation equilibria have to be considered, i.e. complexation between the CD and the protonated form (K_+) and the neutral species (K_\pm) as well as the protonation equilibria of the free analytes (K_a) and the peptide-CD complex ($K_{a/c}$). Assuming 1:1 complexation between β -CD and the analytes the equilibria are described by equations (1) to (4)



Using neutral selectors in CE, only the charged species contribute with their molar fractions to the effective mobility of the analyte, μ_{eff} , according to:

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha_{H_2A^+} \cdot \mu_{H_2A^+} + \alpha_{CD \cdot H_2A^+} \cdot \mu_{CD \cdot H_2A^+} \quad (5)$$

where $\alpha_{\text{H}_2\text{A}^+}$ and $\alpha_{\text{CD}\cdot\text{H}_2\text{A}^+}$ are the respective molar fractions and $\mu_{\text{H}_2\text{A}^+}$ and $\mu_{\text{CD}\cdot\text{H}_2\text{A}^+}$ are the mobilities of the free protonated analyte and its CD complex. Expressing the molar fractions as a function of the concentration of the respective species and total analyte concentration and subsequent substitution using the equilibria expressions of equations (1) to (4) as described in detail in [26] yields:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{[\text{H}^+] \cdot (\mu_{\text{H}_2\text{A}^+} + \mu_{\text{CD}\cdot\text{H}_2\text{A}^+} \cdot K_+ \cdot [\text{CD}])}{[\text{H}^+] \cdot (1 + K_+ \cdot [\text{CD}]) + K_a \cdot (1 + K_{\pm} \cdot [\text{CD}])} \quad (6)$$

Logarithmic of $[\text{H}^+]$ and K_a yields equation (7):

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{H}_2\text{A}^+} + \mu_{\text{CD}\cdot\text{H}_2\text{A}^+} \cdot K_+ \cdot [\text{CD}]}{1 + K_+ \cdot [\text{CD}]} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \left(\text{pK}_a + \log \frac{1 + K_+ \cdot [\text{CD}]}{1 + K_{\pm} \cdot [\text{CD}]} \right)}} \quad (7)$$

which expresses μ_{eff} as a function the CD concentration, $[\text{CD}]$, the pH of the background electrolyte, the pK_a value of the analyte, the binding constants of the protonated and neutral species, K_+ and K_{\pm} , as well as the mobilities of the protonated free species and the corresponding complex, $\mu_{\text{H}_2\text{A}^+}$ and $\mu_{\text{CD}\cdot\text{H}_2\text{A}^+}$.

The pH-independent parameters, $\mu_{\text{H}_2\text{A}^+}$, $\mu_{\text{CD}\cdot\text{H}_2\text{A}^+}$, K_+ and K_{\pm} as well as pK_a and $\text{pK}_{a/c}$ were determined by monitoring the electrophoretic mobility of the peptide enantiomers in the pH range 2.2 to 3.9 at β -CD concentrations between 0 and 0.048 M^{-1} . The individual enantiomers were applied so that the enantiomer mobilities could also be determined in the case of low separation efficiency. The electrophoretic mobilities were corrected for the EOF and viscosity of the buffer. The parameters obtained by a 3-dimensional, non-linear curve fitting according to equation (7) are summarized in Table 1. As neither activities nor molalities of the buffer solutions were considered, the data are not thermodynamic constants but rather apparent constants.

For all peptides exhibit the same general trend. The DD enantiomer is bound stronger by β -CD than the LL-enantiomer in the protonated state. The respective constants of Ala-Phe and Ala-Tyr are within the error of the other constant but a positive correlation could be found. In the case of Ala-Phe and Ala-Tyr the zwitterionic enantiomers are complexed weaker compared to the protonated species, while in the case of Asp-PheOMe the constants remained unchanged or increased. Complexation of the enantiomers as zwitterions is essentially identical as differences in the K_{\pm} constants are not statistically different with regard to the error limits. Nevertheless, a reversal of the chiral recognition ability of β -CD towards the Ala-Tyr enantiomers cannot be excluded. The relatively high error of the current data can be explained by the fact that despite the addition of urea the solubility of β -CD is still limited so that extremely high CD concentrations leading to the saturation conditions could not be achieved. Moreover, different buffer substances had to be used which may also affect analyte binding [26, 34]. Li and Waldron also reported apparent pH-independent complexation constants for Ala-Phe and β -CD [19]. K_+ values of 42

M^{-1} and $44 M^{-1}$ were found for L-Ala-L-Phe and D-Ala-D-Phe, respectively, while K_{\pm} constants were $4 M^{-1}$ and $2 M^{-1}$ for the LL- and DD-enantiomer. While the K_{+} data are in reasonable agreement with the present data, the previously published constants for the zwitterionic forms including the reversal of the chiral recognition of β -CD towards the peptide enantiomers when they exist as cationic or zwitterionic species could not be confirmed. This may be due to the fact that different experimental conditions with regard to temperature, buffer preparation, etc. were applied in both studies leading to differences in the apparent constants. Moreover, Li and Waldron did not report the error of their numbers so that the constants may in fact not be statistically significantly different.

Compared to the published pK_a values of the peptides mentioned above which were recorded in the absence of urea, a shift of about 0.1 to 0.2 units is found in the presence of 2 M urea. This is in accordance with an earlier study [26]. However, decreased thermodynamic pK_a values of weak acids and bases were reported in the presence of urea compared to pure aqueous solutions [35-37]. Complexation by β -CD also led to pK_a shifts. The protonation constant of the complex, $pK_{a/c}$ is related to the pK_a of the free analyte [26]:

$$pK_{a/c} = pK_a + \log \frac{K_{+}}{K_{\pm}} \quad (8)$$

so that the protonation constant of the complex is shifted to higher values when the zwitterionic species are complexed weaker than the protonated forms while lower constants result in the case of weaker complexed protonated forms. While higher $pK_{a/c}$ values were found for Ala-Phe and Ala-Tyr compared to the free analytes no pK_a shift or a lower $pK_{a/c}$ value were observed in the case of Asp-PheOMe. Moreover, the complexation-induced pK_a shifts appeared to be stereoselective. The β -CD-DD-peptide complexes always exhibited a higher pK_a compared to the respective β -CD-LL-enantiomer complexes. Stereoselective complexation induced pK_a shifts have been reported for dansylated amino acids using hydroxypropyl- β -CD as chiral selector [25]. Mobilities of the CD-analyte complexes, $\mu_{CD-H_2A^+}$, were essentially equal, minor differences are not statistically different.

3.2. Enantiomer migration order

The migration behavior of the peptides including the pH-dependent reversal of the enantiomer migration order can be rationalized based on the complexation constants and complex mobilities listed in Table 1. At a given pH of the background electrolyte the effective mobility of an enantiomer is described by:

$$\mu_{\text{eff}/\text{pH}} = \frac{\mu_f + \mu_c \cdot K \cdot [\text{CD}]}{1 + K \cdot [\text{CD}]} \quad (9)$$

The pH-dependent mobilities of the free analyte, μ_f , and the analyte-CD complex, μ_c , as well as the "mixed" complexation constant, K , are related to the pH-independent parameters by:

$$\mu_f = \frac{\mu_{H_2A^+}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad (10)$$

$$\mu_c = \frac{\mu_{CD \cdot H_2A^+}}{1 + 10^{(pH-pK_{a/c})}} \quad (11)$$

$$K = \frac{K_+ + K_{\pm} \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad (12)$$

The migration behavior is described in earlier publications [21]. At low pH (about one unit or more below the pK_a of the peptides) the compounds are essentially positively charged and the complexation constants K_+ dominate the migration behavior. Thus, the stronger complexed DD-enantiomers migrate slower than the weaker bound LL-stereoisomers. At high CD concentrations the separation deteriorates due to the increasing influence of the complex mobilities μ_c which are essentially equal at this pH because of identical mobilities $\mu_{CD \cdot H_2A^+}$. All peptides displayed an enantioselective complexation-induced pK_a shift, with the $pK_{a/c}$ of the complexes of the DD-enantiomers shifted to higher values compared to the $pK_{a/c}$ values of the LL-peptide-CD complexes. This results in a shift of the equilibrium in favor of the protonated form of the complex at buffer pH values around the pK_a of the analytes so that the mobility of the complex μ_c becomes greater than the mobility of the free form μ_f . Because K_{\pm} values of the peptide enantiomers are basically equal, the difference between the complexation constants at pH values above the pK_a of the peptides becomes smaller so that the migration order is dominated by complex mobility. As a consequence, the peptide enantiomer exhibiting the higher complex mobility migrates first. In the present cases, this applies to the DD-enantiomers so that the migration order is reversed at pH 3.5 compared to pH 2.5.

Li and Waldron attributed the pH-dependent reversal of the enantiomer migration order of Ala-Phe in β -CD-mediated separations to altered chiral recognition of the peptide enantiomers by β -CD depending on their charge [19]. In the case of the protonated peptides D-Ala-D-Phe was complexed stronger, while L-Ala-L-Phe was bound stronger in the zwitterionic form. Neither complex mobilities nor pK_a shifts were determined in this study. Moreover, the reported complexation constants of the zwitterionic species were very small and no error was reported for the values so that they may, in fact, not be significantly different. Thus, the earlier report by Li and Waldron does not contradict the present results that the reversal of the enantiomer migration order is primarily caused by the enantioselective pK_a shift and is, therefore, "mobility driven". The reversal of the enantiomer migration order observed with dansylated amino acids has also been attributed to an enantioselective pK_a shift [25]. Moreover, mobility phenomena also appeared to cause the altered migration order of the Ala-Tyr enantiomers in

the presence of β -CD upon increasing the pH [21]. However, the complexation constants determined for the zwitterionic form of Ala-Tyr also imply altered chiral recognition of the enantiomers by β -CD compared to the protonated analytes (Table 1), although the data do not differ statistically. Due to the limited aqueous solubility of β -CD even in the presence of 2 M urea extremely high CD concentrations cannot be applied so that the limiting conditions of the enantioseparations could not be reached in either study. Therefore, the data are somewhat error prone so that it cannot be ruled out that a change of the chiral recognition of the enantiomers by the CD also contributes to the observed effect.

3.3. Calorimetry

In order to obtain additional information of the complexation constants and to estimate the enthalpy and entropy of the complexation between β -CD and the dipeptide enantiomers in their different ionization states calorimetric measurements were conducted. As can be concluded from the dissociation constants cited above, the peptides exist essentially in the zwitterionic form at pH values between 5 and 6 while they are primarily protonated around pH 2. Therefore, calorimetric experiments were performed in acetate buffer, pH 5.5, to obtain the data for the zwitterionic form of the peptides. The parameters of the protonated species were derived from experiments performed in phosphate buffer, pH 2.2. At this pH, three equilibria were considered: (i) the dissociation equilibrium between the zwitterionic (approx. 15 %) and the protonated (approx. 85 %) forms of the peptides, (ii) complex formation between β -CD and the zwitterions, and (iii) complex formation between β -CD and the cationic species. All processes contribute to the measured thermal effect. Thus, the thermodynamic parameters of the complex formation of β -CD with the protonated analytes were derived taking the protonation constants of the peptides [30-33] as well as enthalpy changes due to peptide protonation [38, 39] into account. Values of K and $\Delta_c H$ were directly obtained from the binding isotherms (Figure 1). $\Delta_c G$ and $\Delta_c S$ were estimated from the thermodynamic relationship:

$$\Delta_c G = -RT \ln K = \Delta_c H - T\Delta_c S \quad (8)$$

The thermodynamic parameters of complex formation are summarized in Table 2. Generally, stronger complex formation between β -CD and the DD-enantiomers compared to the LL-stereoisomers was observed and complexation constants of the protonated species exceeded complexation constants of the neutral analytes. Moreover, smaller differences between the K_{\pm} values of the LL- and DD-enantiomers were found compared to the K_{+} values. With the exception of Asp-PheOMe where similar complexation constants were determined for the protonated and the zwitterionic species by CE the calorimetry data correlate with the constants obtained by CE although generally higher constants were found by calorimetry. The differences between the two methods are due to the fact that apparent constants result from CE while thermodynamic values were obtained by calorimetry. Moreover, differences in the

buffer substances used for the preparation of the electrolyte solutions exist. It is known that buffer substances can affect the binding of analytes by CDs [26, 34].

The thermodynamic parameters listed in Table 2 show that the decrease of Gibbs energy ($\Delta_c G$) that accompanies the complexation of β -CD with the dipeptides is due to relatively high enthalpy changes. Low negative or positive values were found for entropy changes $T\Delta_c S$. Therefore, the complexes appear to be mainly enthalpy stabilized.

Processes such as solute dehydration, release of "high energy" water from the CD cavity, binding of the guest molecule via non-covalent interactions, and hydration of the complex contribute to complex formation. These are reflected in the $\Delta_c G$, $\Delta_c H$ and $\Delta_c S$ values. According to NMR measurements in aqueous solutions the phenyl ring of the three peptides appear to penetrate into the cavity of β -CD from the wider secondary rim [40, 41]. Complex formation between β -CD and the DD-enantiomers of the peptides is accompanied by less negative enthalpy and higher entropy changes (Table 2). This applies to both, the protonated and the zwitterionic forms of the peptides. It may be speculated that the DD-enantiomers penetrate deeper into the CD cavity compared to the LL-stereoisomers resulting in a higher dehydration of the solutes. A deeper penetration of the DD-enantiomer is in accordance with NMR and molecular dynamics simulations of Ala-Tyr- β -CD complexes in the presence of urea [40]. Dehydration being an endothermic process is accompanied by the release of water molecules from the solvation shells of compounds into the bulk solvent. Thus, the disorder of the system is increased which results in a positive contribution to $\Delta_c S$. Moreover, hydrophobic interactions between the aromatic rings of peptides and the apolar cavity of β -CD also increase enthalpy and entropy of the complexation process. Hydrophobic interactions may be stronger in the case of the DD-peptides compared to the LL-peptides. Thus, dehydration and hydrophobic interactions should contribute as the main processes that cause the decrease of exothermicity and increase of the entropy during the binding of β -CD with DD-enantiomers compared to the LL-stereoisomers.

The ionization state of the dipeptides also influenced the thermodynamic complexation parameters. $\Delta_c H$ and $\Delta_c S$ were more negative in the case of the protonated forms of both enantiomers of Ala-Phe and Ala-Tyr while $\Delta_c H$ and $\Delta_c S$ exhibited lower negative numbers for the zwitterionic species of Asp-PheOMe. In Ala-Phe and Ala-Tyr the carboxyl group is relatively close to the aromatic ring. In acidic media the carboxylic acid group is protonated and less hydrated which could promote inclusion complex formation due to the reduced positive contribution from dehydration. In the zwitterionic state, the negatively charged carboxylate group may make inclusion less enthalpy favorable. Less negative $\Delta_c H$ and $\Delta_c S$ values of the zwitterionic forms compared to the protonated state of Ala-Phe and Ala-Tyr may be, in part, due to the increased contribution of dehydration. In the case of Asp-PheOMe, the carboxyl group is located further away from the aromatic ring. It may be speculated that the ionized carboxylate group participates in complex formation by interaction with hydroxyl groups of β -CD

resulting in a negative contribution to enthalpy and entropy changes. These interactions would result in a restriction of the degrees of freedom of the reactands and, as a consequence, a decrease of $\Delta_c S$.

4. Conclusions

Complex formation between β -CD and the enantiomers of dipeptides as protonated and zwitterionic species was studied by CE and calorimetry at 298.15 K. Due to differences in the experimental conditions such as the buffer substances the absolute numbers of the complexation constants depended on the method applied. Generally smaller complexation constants of the zwitterionic peptides compared to the protonated forms and stronger binding of the DD-enantiomers than the LL-stereoisomers were determined by calorimetry. In CE the picture was more diverse. In the case of Ala-Phe and Ala-Tyr the protonated forms are complexed stronger compared to the zwitterionic peptides. In the protonated state the DD-peptides are bound stronger than the LL-stereoisomers while there is no statistically significant difference between the enantiomers in their neutral form. In the case of Asp-PheOMe complexation of the protonated and zwitterionic enantiomers by β -CD is comparable with the DD-enantiomer bound stronger than L-Asp-L-PheOMe. Nevertheless, as a general trend for both methods the differences between the complexation constants of the protonated forms were larger compared to the zwitterionic species. The enantioselective complexation-induced pK_a shift affecting complex mobilities in the pH range close to the pK_a value of the peptides primarily caused the reversal of the enantiomer migration order when increasing the pH of the background electrolyte as observed for dansylated amino acids using hydroxypropyl- β -CD as chiral selector [25]. The thermodynamic parameters of complexation ($\Delta_c G$, $\Delta_c H$ and $\Delta_c S$) are affected by both, the configuration of stereoisomers and pH. Compared to β -CD complexes of the LL-enantiomers, inclusion complexes of the DD-isomers are more entropy stabilized exhibiting less negative enthalpy values. This is probably due to stronger dehydration and hydrophobic interactions occurring upon deeper penetration of the enantiomers into the β -CD cavity.

Acknowledgements

The financial support of Dr. I.V. Terekhova by the German Academic Exchange Service (DAAD) is gratefully acknowledged.

References

- [1] J. Szejtli, Cyclodextrins and their Inclusion Complexes, Akademiai Kiado, Budapest 1982.
- [2] H.-J. Buschmann, E. Schollmeyer, *J. Cosmet. Sci.* 53 (2002) 185.
- [3] L. Liu, Q.-X. Guo, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 42 (2002) 1.
- [4] R.L. Carrier, L.A. Miller, I. Ahmed, *J. Control. Release* 123 (2007) 78.
- [5] T. Loftsson, D. Duchene, *Int. J. Pharm.* 329 (2007) 1.
- [6] E.M.M. Del Valle, *Process Biochem.* 39 (2004) 1033.
- [7] G. Cravotto, A. Binello, E. Baranelli, P. Carraro, F. Trotta, *Curr. Nutr. Food Sci.* 2 (2006) 343.
- [8] S.O. Fakayode, M. Lowry, K.A. Fletcher, X. Huang, A.M. Powe, I.M. Warner, *Curr. Anal. Chem.* 3 (2007) 171.
- [9] K.R. Rao, Y.V.D. Nageswar, N.S. Krishnaveni, K. Surendra, *Adv. Org. Synt.* 1 (2005) 301.
- [10] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 89.
- [11] B. Chankvetadze, *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Chichester 1997.
- [12] B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 45.
- [13] U. Schmitt, S.K. Branch, U. Holzgrabe, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 959.
- [14] G.K.E. Scriba, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1991.
- [15] S. Fanali, *Electrophoresis* 30 (2009) S203.
- [16] B. Chankvetadze, *Electrophoresis* 30 (2009) S211.
- [17] G.K.E. Scriba, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 373.
- [18] B. Chankvetadze, W. Lindner, G.K.E. Scriba, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4256.
- [19] J. Li, K.C. Waldron, *Electrophoresis* 20 (1999) 171.
- [20] S. Sabah, G.K.E. Scriba, *J. Chromatogr. A* 894 (2000) 267.
- [21] S. Sabbah, F. Süß, G.K.E. Scriba, *Electrophoresis* 22 (2001) 3163.
- [22] F. Süß, C.E. Sängler-van de Griend, G.K.E. Scriba *Electrophoresis* 24 (2003) 1069.
- [23] S. Sabbah, G.K.E. Scriba, *Electrophoresis* 22 (2001) 1385.
- [24] S. Sabah, G.K.E. Scriba, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 261.
- [25] A.M. Rizzi, L. Kremser, *Electrophoresis* 20 (1999) 2715.
- [26] M. Hammitzsch-Wiedemann, G.K.E. Scriba, *Electrophoresis* 28 (2007) 2619.
- [27] M.C. Bello, R. Rezzonico, P.G. Righetti, *J. Chromatogr. A* 659 (1994) 199.
- [28] I.V. Terekhova, O.V. Kulikov, E.S. Titova, *Thermochim. Acta* 412 (2004) 121.
- [29] V.A. Borodin, E.V. Kozlovsky, V.P. Vasilev, *Russ. J. Inorg. Chem.* 27 (1982) 2169.
- [30] P. Vallat, P. Gailard, P.-A. Carrupt, R.-S. Tsai, B. Testa, *Helv. Chim. Acta* 78 (1995) 471.
- [31] R.D. Skwierczynski, K.A. Connors, *Pharm. Res.* 10 (1993) 1174.

-
- [32] S. Sabah, Ph.D. Thesis, University of Münster (1998).
- [33] B. Radomska, I. Sovago, T. Kiss, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1 (1990) 289.
- [34] C.-E. Lin, W.-S. Liao, K.-H. Chen, *Electrophoresis* 24 (2003) 3139.
- [35] A.L. De, A. K. Atta, *Can. J. Chem.* 64 (1986) 1521.
- [36] Y. Pointud, H. Gillet, J. Juillard, *Talanta* 23 (1976) 741.
- [37] H. Talukdar, S. Rudra, K.K. Kundu, *Can. J. Chem.* 67 (1989) 315.
- [38] F. Rodante, F. Fantauzzi, V. Mucciante, *Thermochim. Acta* 279 (1996) 35.
- [39] F. Rodante, F. Fantauzzi, G. Catalani, *Thermochim. Acta* 296 (1997) 15.
- [40] B. Waibel, J. Scheiber, C. Meier, M. Hammitzsch, K. Baumann, G.K.E. Scriba, U. Holzgrabe, *Eur. J. Org. Chem.* (2007) 2921.
- [41] S. Takahashi, E. Suzuki, N. Nagashima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 59 (1986) 1129.

Table 1. Apparent pH-independent mobilities of the free analytes and peptide enantiomer- β -CD complexes and apparent complexation constants of β -CD with the protonated and zwitterionic dipeptide enantiomers determined by CE

| Peptide | $\mu_{\text{H}_2\text{A}^+}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$] | $\mu_{\text{CD}\cdot\text{H}_2\text{A}^+}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$] | K_+ [M^{-1}] | K_{\pm} [M^{-1}] | pK_a | $\text{pK}_{a/c}$ | K_+/K_{\pm} |
|----------------|---|---|------------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| L-Ala-L-Phe | 17.9 ± 0.1 | 7.6 ± 0.6 | 34 ± 4 | 22 ± 4 | 3.26 ± 0.01 | 3.45 ± 0.04 | 1.56 ± 0.16 |
| D-Ala-D-Phe | | 7.5 ± 0.5 | 42 ± 5 | 23 ± 4 | | 3.53 ± 0.04 | 1.85 ± 0.19 |
| L-Ala-L-Tyr | 17.3 ± 0.1 | 8.8 ± 0.3 | 64 ± 7 | 41 ± 6 | 3.28 ± 0.01 | 3.47 ± 0.03 | 1.55 ± 0.12 |
| D-Ala-D-Tyr | | 8.6 ± 0.3 | 72 ± 7 | 37 ± 5 | | 3.56 ± 0.03 | 1.94 ± 0.16 |
| L-Asp-L-PheOMe | 17.0 ± 0.1 | 8.5 ± 0.3 | 63 ± 6 | 78 ± 8 | 3.16 ± 0.01 | 3.07 ± 0.02 | 0.81 ± 0.06 |
| D-Asp-D-PheOMe | | 8.5 ± 0.3 | 79 ± 7 | 81 ± 8 | | 3.15 ± 0.02 | 0.98 ± 0.06 |

Table 2. Thermodynamic parameters of the complex formation of the protonated and zwitterionic forms of the dipeptide enantiomers with β -CD in the presence of 2 M urea determined by calorimetry

| Peptide | K_+ [kg mol^{-1}] | $\Delta_c G_+$ [kJ mol^{-1}] | $\Delta_c H_+$ [kJ mol^{-1}] | $T\Delta_c S_+$ [kJ mol^{-1}] | K_{\pm} [kg mol^{-1}] | $\Delta_c G_{\pm}$ [kJ mol^{-1}] | $\Delta_c H_{\pm}$ [kJ mol^{-1}] | $T\Delta_c S_{\pm}$ [kJ mol^{-1}] |
|----------------|-----------------------------------|--|--|---|---------------------------------------|--|--|---|
| L-Ala-L-Phe | 48 | -9.6 | -11.2 | -1.6 | 19 | -7.3 | -8.4 | -1.1 |
| D-Ala-D-Phe | 80 | -10.6 | -10.6 | 0.0 | 24 | -7.9 | -6.6 | 1.3 |
| L-Ala-L-Tyr | 48 | -9.6 | -15.4 | -5.8 | 39 | -9.1 | -13.1 | -4.0 |
| D-Ala-D-Tyr | 76 | -10.7 | -14.1 | -3.4 | 52 | -9.8 | -11.1 | -1.3 |
| L-Asp-L-PheOMe | 76 | -10.7 | -12.9 | -2.2 | 41 | -9.2 | -14.0 | -4.8 |
| D-Asp-D-PheOMe | 131 | -12.1 | -9.6 | 2.5 | 62 | -10.2 | -11.7 | -1.5 |

Figure legends

Figure 1 Binding isotherms of β -CD with peptide enantiomers at 298.15 K and pH 2.2 (A) and pH 5.5 (B).

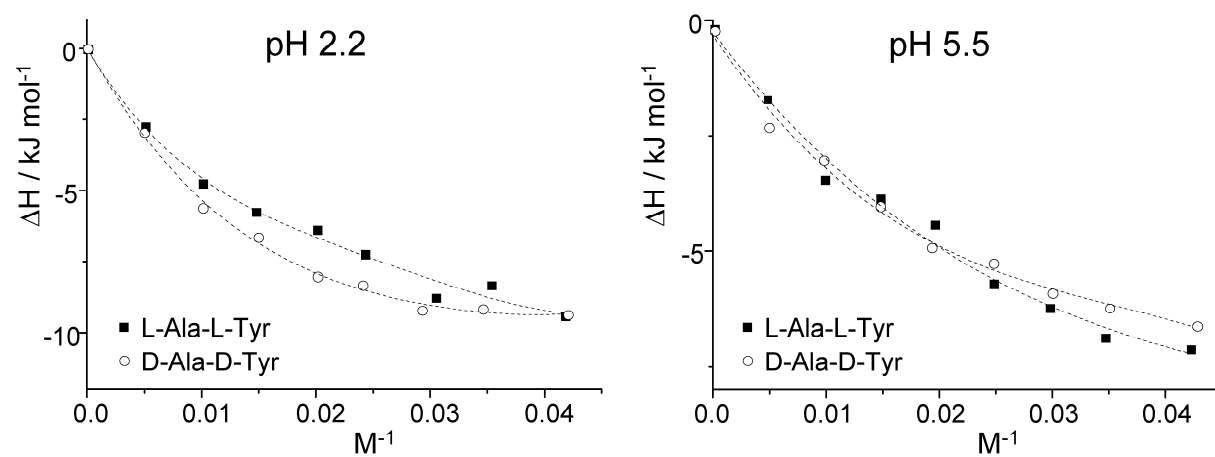


Figure 1

4.3 MANUSKRIFT 3

Influence of buffer substances and urea on the β -cyclodextrin-mediated chiral separation of dipeptides in CE

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2007, 28, 2619-2628.

Manuela
Hammitzsch-Wiedemann
Gerhard K. E. Scriba

Department of Pharmaceutical
Chemistry,
School of Pharmacy,
University of Jena,
Jena, Germany

Received November 9, 2006
Revised December 7, 2006
Accepted December 13, 2006

Research Article

Influence of buffer substances and urea on the β -cyclodextrin-mediated chiral separation of dipeptides in CE*

The influence of buffering substances and urea on the β -CD-mediated chiral separations of the dipeptides Ala–Phe and Ala–Tyr was studied in the pH range of 2.5–3.8. Only minor effects of the buffer substances on the chiral separation selectivity α were observed at a β -CD concentration of 15 mg/mL. In contrast, the selectivity improved at pH 2.5 but decreased at pH 3.8 upon the addition of 2 M urea. Complexation by β -CD resulted in a shift of the pK_a values toward higher values which was more pronounced for the *DD*-enantiomers of both dipeptides than for the *LL*-enantiomers. Addition of urea further increased the pK_a shift. The consequence of this pK_a shift is an increase of the fraction of the protonated, positively charged form of the peptides which explained the improved chiral separation at pH 2.5 and the reduced selectivity at pH 3.8. A pK_a shift by the addition of urea was also observed for *N*-*tert*-butyloxycarbonyl phenylalanine (BOC-Phe) as a model compound that is strongly complexed by β -CD. This effect was not stereospecific. Addition of urea resulted in a decrease of the apparent complexation constants between β -CD and the BOC-Phe enantiomers to the same extent but this did not affect the separation selectivity α . For chiral separations that display strong pH dependence such as peptide enantioseparations close to the pK_a values of the compounds, urea may not solely be regarded as a solubility enhancer for β -CD but may also influence the separation.

Keywords:

Chiral separation / Complexation constant / β -Cyclodextrin / Dissociation equilibrium / Peptides
DOI 10.1002/elps.200600728

1 Introduction

The influence of BGE on achiral separations by CE has been intensively investigated [1]. The pH, the type, and concentration of the buffering substances are typically optimized to improve CE separations in addition to EOF modifying or reversing substances, organic solvents, *etc.* For direct enantioseparations, a chiral agent forming transient diastereomeric complexes with the analyte enantiomers is added to the BGE [2]. The type and concentration of the chiral selector influence primarily the quality of separations. CDs are by far the most utilized chiral selectors in CE [3]. The great application potential of CE to enantioseparations of small peptides has been highlighted [4–7].

Only few studies noted a significant influence of the buffer substance in chiral CE. Studying enantioseparations of phenothiazines with γ -CD, Lin *et al.* [8] observed the reversal of the enantiomer migration order when changing from phosphate to citrate buffer with identical pH values of 3.0. Thus, the buffer substance apparently influenced the complexation behavior of γ -CD and the phenothiazine enantiomers.

β -CD is another native CD often applied in chiral separations due to its low price. Moreover, no reproducibility problems in enantioseparations will occur as sometimes observed for CD derivatives especially randomly substituted CDs. However, due to the low aqueous solubility of β -CD urea, typically at a concentration of 2 M, is often added as a solubilizing agent. It may not be excluded that urea also affects the complexation behavior of β -CD. For example, NMR studies revealed a five-fold decrease of the binding constants between dimethindene and β -CD in the presence of 5 M urea which was further confirmed by CE [9]. Urea affects the structure of water [10] and has been termed an

Correspondence: Professor Gerhard K. E. Scriba, Department of Pharmaceutical Chemistry, School of Pharmacy, University of Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany
E-mail: gerhard.scriba@uni-jena.de
Fax: +49-3641-949802

Abbreviations: BOC-Phe, *N*-*tert*-butyloxycarbonyl phenylalanine; HDB, hexadimethrinium bromide

* Dedicated to Professor Gottfried Blaschke on the occasion of his 70th birthday.

“antihydrophobic agent” [11]. With regard to the formation of β -CD analyte complexes, a decrease in the complexation constants upon addition of urea has been observed in most of the cases [9, 11–13] although the increase of the binding constant between β -CD and naphthalene carboxylic acid has also been reported [12]. However, the actual effect of urea on chiral separations has not yet been studied in more detail.

In the course of our ongoing interest in chiral peptide separations, the present study was conducted to investigate the influence of buffer substances and urea on the β -CD-mediated enantioseparations of Ala–Phe and Ala–Tyr. The peptides are known to be separated by β -CD [14–16]. The specific interest in these compounds arises from the fact that the peptides display the phenomenon of a pH-dependent reversal of the enantiomer migration order between pH 2.5 and 3.5 [14–16]. This pH range is within ± 1 of the pK_a values of the carboxylic acid group of the peptides. Changes in the composition of the BGE in this pH range may affect the chiral separation of the analytes. Two compounds, ephedrine and the amino acid derivative *N*-*tert*-butyloxycarbonyl phenylalanine (BOC-Phe), which are not amphoteric compounds like the peptides, were also included in the study for comparison.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

β -CD was from Wacker Chemie (Munich, Germany). D-Ala–D-Phe, L-Ala–L-Phe, L-Ala–L-Tyr, and Boc-L-Phe were obtained from Bachem (Heidelberg, Germany). Boc-D-Phe, (–)-(1*R*,2*S*)-ephedrine hydrochloride (*l*-ephedrine hydrochloride), (+)-(1*S*,2*R*)-ephedrine hydrochloride (*d*-ephedrine hydrochloride), and riboflavin-5'-phosphate sodium salt hydrate were purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). D-Ala–D-Tyr was prepared according to standard peptide chemistry procedures by the reaction of *N*-benzyloxycarbonyl-alanine-*N*-hydroxysuccinimide with D-Tyr in dimethylformamide [17] followed by hydrogenolytic deprotection. Hexadimethrinium bromide (HDB) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All other chemicals were of analytical grade. Buffers and sample solutions were prepared in double-distilled, deionized water, filtered (0.2 μ m), and degassed by sonication.

2.2 CE

All experiments were performed on a Beckman P/ACE MDQ instrument (Beckman Coulter, Unterschleißheim, Germany) equipped with a DAD and controlled by the 32 Karat Software Version 7.0. All experiments were performed using 50 μ m id, 360 μ m od fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) at 25°C. The detection wavelength was set at 200 nm.

Sample solutions were prepared in water at concentrations of 150 μ g/mL for enantiomers and 300 μ g/mL for racemic mixtures. The samples were introduced at a pressure of 0.5 psi (3.45 kPa) for 3 s. DMSO was used as an EOF marker. Between the runs, the capillary was flushed for 1 min with 0.1 M HCl and for 5 min with the BGE.

The determination of enantiomeric selectivities was accomplished in 50 mM buffer solutions containing 20 mM sodium chloride. The buffers were prepared by dissolving the appropriate amount of phosphoric acid, citric acid, *S,S*-tartaric acid, *R,R*-tartaric acid, chloroacetic acid, or glycine in water and titrating the solution to the respective pH by the addition of 1 M NaOH or 1 M HCl. HDB (0.003% m/v) was added to the buffers at pH 2.5. The pH was adjusted after the addition of β -CD and urea. Separations at pH 2.5 were performed in capillaries with an effective length of 105.8 cm and a total length of 116.2 cm at –30 kV (detection at the anodic end) while separations at pH 3.8 and 6.5 were performed in capillaries of 40 cm effective length and 50.2 cm total length at 25 kV (detection at the cathodic end).

Dissociation and complexation constants were determined using 50 mM phosphate, chloroacetate, and acetate buffers containing 0.003% m/v HDB. The buffers were prepared by dissolving 50 mM of the respective acid in water and adding the calculated amount of 0.5 M sodium hydroxide solution to achieve a certain pH. Upon the addition of an appropriate amount of sodium chloride to yield an ionic strength of the buffers of 60 mM and urea in the case of buffers containing urea, the pH was measured and used as such for the experiments. Analyses were performed in capillaries of 50 cm effective length and 60.2 cm total length at –25 kV. Correction of the viscosity in the case of buffers containing β -CD and/or urea was performed using the CE instrument as viscosimeter according to Bello *et al.* [18] by measuring the time of the moving boundary between the respective buffer containing β -CD and/or urea and a buffer containing 0.01% m/v riboflavin-5'-phosphate. Generally, all analyses were measured in triplicate. The regression analysis was performed using Origin 6.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

3 Results and discussion

3.1 Effect of buffer substance and urea on separation selectivity

The effect of buffer substances and urea on the enantioseparation of the LL- and DD-stereoisomers of Ala–Phe and Ala–Tyr using β -CD as a chiral selector was investigated at pH 2.5 and 3.8. Within this pH range, reversal of the enantiomer migration order has been observed for both peptides [14–16]. At pH 2.5, the peptides are preferentially protonated while they exist primarily as deprotonated, zwitterionic species at pH values of 3.5–3.8. As the analyte charge will also affect the complexation between CDs and the peptides [14, 16, 19] or

dansylated amino acids [20], ephedrine was also included in the study as a compound that is fully protonated in the investigated pH range and separated by β -CD [21]. A concentration of β -CD of 15 mg/mL was chosen because this concentration is slightly below the limiting aqueous solubility of β -CD of 18 mg/mL, so that the separations could be investigated in the absence and presence of urea. The enantiomeric selectivity, α , as the ratio of the effective mobility, μ_{eff} , of the enantiomers according to

$$\alpha = \frac{\mu_{\text{effD}}}{\mu_{\text{effL}}} \quad (1)$$

was used to determine the “quality” of the enantioseparations because selectivity is only affected by differences in the complexation behavior between a chiral selector and analyte enantiomers and not by the magnitude of the EOF, mobility of the buffer ions or dispersion phenomena as, for example, resolution. μ_{effD} is the effective mobility of the DD dipeptide enantiomers or of the D-enantiomer of ephedrine, while μ_{effL} is the effective mobility of the L-peptide stereoisomers and L-ephedrine, respectively.

At pH 2.5, the EOF is very low compared to pH 3.8. In order to avoid long analysis times because the determination of the EOF is necessary for the calculation of the effective mobilities, HDB was added to the buffers at pH 2.5 and a reversed polarity of the voltage was applied in order to reverse the EOF. At pH 3.8, the magnitude of the EOF was sufficient and a reversal of the applied voltage was not necessary. Representative electropherograms of separations of the dipeptides and ephedrine in phosphate buffer (pH 2.5 and 3.8) and chloroacetate buffer (pH 2.5) in the presence and absence of urea are shown in Fig. 1; the separation selectivity α for all systems is summarized in Fig. 2. In cases where only a shoulder was observed for the second enantiomer, these α values were set at 1.0 although a low selectivity certainly exists. Experiments at pH 2.5 were performed in the presence of HDB with a reversed EOF and under reversed polarity of the applied voltage. Thus, the reversed enantiomer migration order is obtained under these conditions compared to the analysis in the normal polarity mode and the absence of HDB in the BGE. This has to be considered when considering the reversal of the enantiomer migration order.

At pH 2.5, phosphate-, glycine-, citrate-, chloroacetate- as well as R,R-tartrate- and S,S-tartrate-based buffers were evaluated while at pH 3.8 both tartrate buffers were not investigated (Fig. 2). As expected, an effect of the buffer substance on the separation selectivity α was observed at both pH values as well as in the absence and presence of urea, although the effect was not very pronounced in most of the cases. There was no effect of the stereochemistry of the buffer substance tartaric acid. Identical selectivities were observed for R,R- and S,S-tartrate buffers. The reversal of the enantiomer migration order of both dipeptides was also not affected by the experimental conditions as the LL-enantiomers migrated before the DD-stereoisomers at pH 2.5 (nor-

mal polarity of the applied voltage) as can be seen from α values <1 whereas the DD-enantiomers migrated faster than the LL-enantiomers at pH 3.8 ($\alpha >1$). No change of the enantiomer migration order was noted for ephedrine. Lin *et al.* [8] observed opposite enantiomer migration order of phenothiazine drugs at pH 3.0 using γ -CD as a chiral selector when changing the BGE from 40 mM phosphate buffer to 100 mM citrate buffer. An influence of the buffer substance on the complexation of the analytes by the CD was assumed as lower binding constants were determined in citrate buffer compared to phosphate buffer [8]. In combination with the higher mobility of the complex between γ -CD and the stronger bound phenothiazine enantiomer this led to the reversal of the enantiomer migration order. Effects such as competitive complexation of analyte and buffer substance with β -CD as well as cooperative binding may also be considered to explain the observed (minor) differences in the separation selectivities α of the peptides in the presence of β -CD as a chiral selector.

Upon addition of 2 M urea to the BGE, effects on the enantioseparation selectivity α of the peptides were observed at both pH values and for all buffers although the effect is quite small in the case of Ala-Phe at pH 2.5. Essentially, no effect was observed for ephedrine (Figs. 1 and 2). The chiral separation improved for Ala-Phe and Ala-Tyr at pH 2.5 when urea is added to the buffer, while the separation deteriorated at pH 3.8 upon addition of 2 M urea. The effect of urea on analyte complexation was further characterized as described below.

3.2 Influence of urea on analyte pK_a and complexation

3.2.1 Dipeptides Ala-Phe and Ala-Tyr

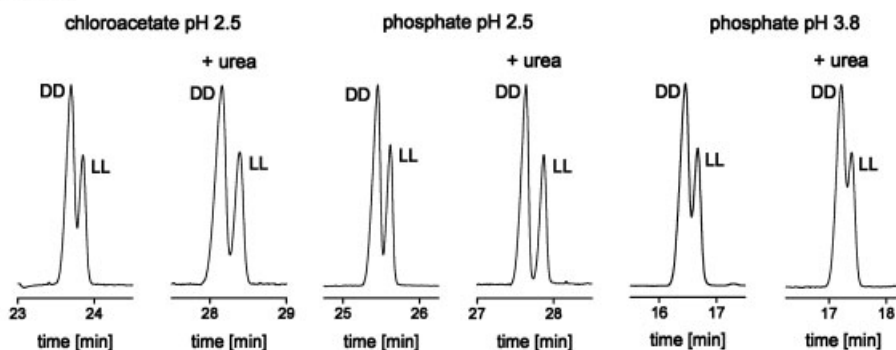
In order to obtain some insight into the effect of urea in CE enantioseparations of peptides in the pH range of 2.5–3.8, the dissociation equilibria of the compounds and the complexation were investigated in the absence and presence of urea. The theoretical model accounting for the influence of buffer pH and β -CD concentration on the electrophoretic mobility can be derived according to refs. [14, 22, 23]. The dissociation equilibrium between the protonated peptide, HA^+ , and the neutral, zwitterionic form, A, is described by



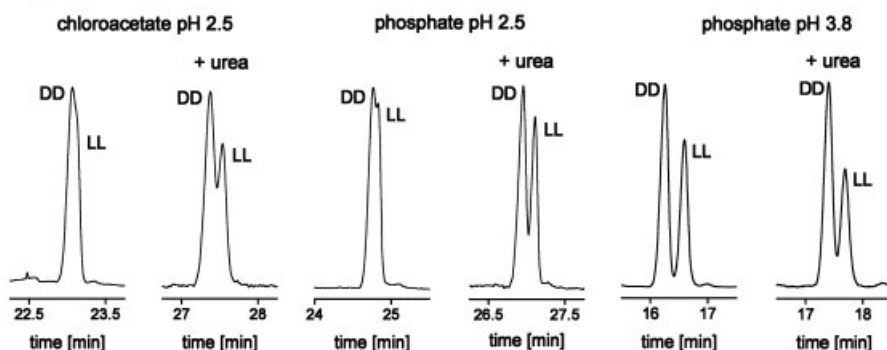
The complexation between both forms and β -CD can be described by



Ala-Phe



Ala-Tyr



ephedrine

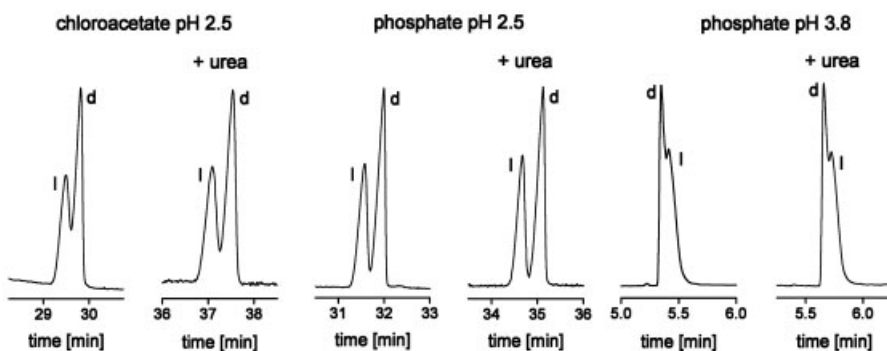


Figure 1. Representative electropherograms of chiral separations of the enantiomers of Ala-Phe, Ala-Tyr, and ephedrine using β -CD in chloroacetate buffer pH 2.5, in phosphate buffer pH 2.5 and 3.8, in the absence and presence of 2 M urea. Experimental conditions: pH 2.5: 105.8/116.2 cm fused-silica capillary, 50 mM buffer containing 20 mM sodium chloride, 0.003% m/v HDB, 15 mg/mL β -CD, -30 kV, 25°C; pH 3.8: 40.0/50.2 cm fused-silica capillary, 50 mM buffer containing 20 mM sodium chloride, 15 mg/mL β -CD, 25 kV; 25°C.

assuming a 1:1 complex between β -CD and the analyte species. The respective mass balance equilibria described by Eqs. (2)–(4) can be written as

$$K_a = \frac{[A][H^+]}{[HA^+]} \quad (5)$$

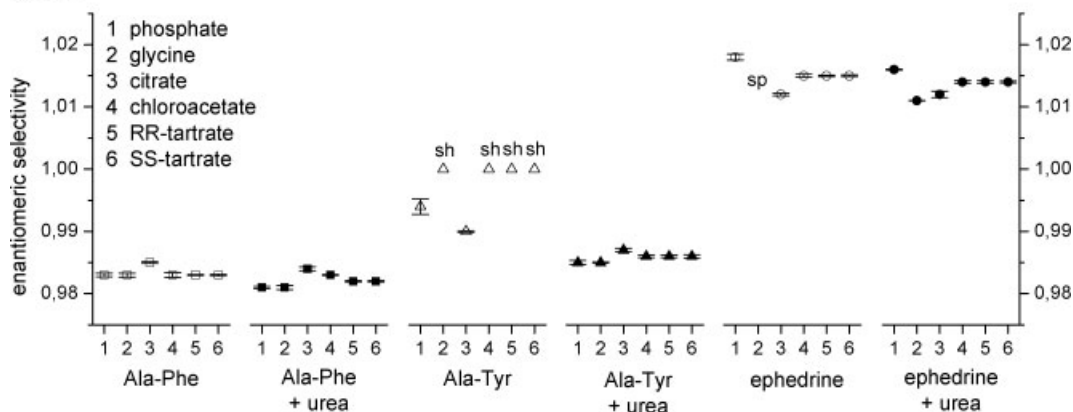
$$K_+ = \frac{[CD \cdot HA^+]}{[HA^+][CD]} \quad (6)$$

$$K_n = \frac{[CD \cdot A]}{[A][CD]} \quad (7)$$

where K_a is the dissociation constant, K_+ the complexation constant between β -CD and the protonated peptide, and K_n the complexation constant between β -CD and the zwitterionic (neutral) form of the peptide. In ACE, pH-dependent dissociation equilibria and complexation equilibria are rapid. Therefore, all species contribute with their respective molar fractions to the migration velocity. As the effective mobilities of the zwitterionic species A as well as the mobility of the complex of A with β -CD are 0, the electrophoretic mobility, μ_{eff} , can be expressed as

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha_{HA^+} \cdot \mu_{HA^+} + \alpha_{CD \cdot HA^+} \cdot \mu_{CD \cdot HA^+} \quad (8)$$

pH 2.5



pH 3.8

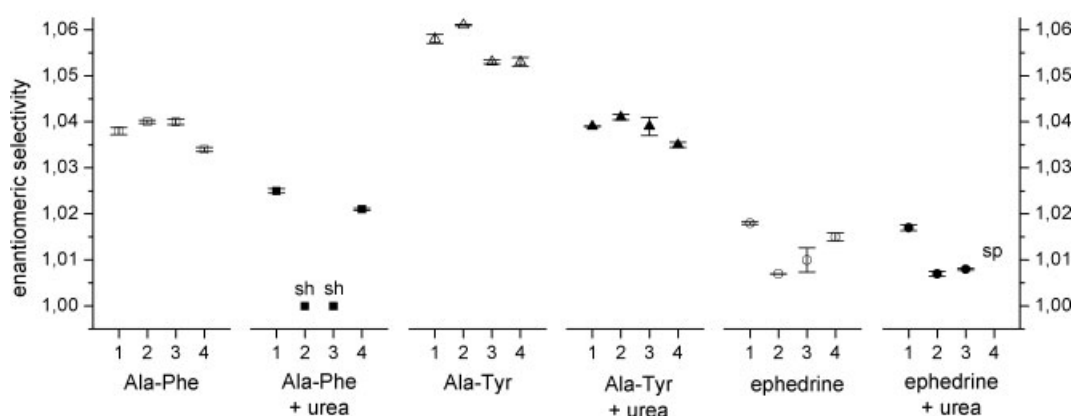


Figure 2. Enantiomeric selectivities, α , of β -CD-mediated separations as a function of buffer substance and 2 M urea at pH 2.5 (top) and pH 3.8 (bottom). The values are the mean of three experiments \pm SD. sh, peak with shoulder; sp, analyte peaks overlapped by system peak.

where α_{HA^+} and $\alpha_{\text{CD}\cdot\text{HA}^+}$ are the respective molar fractions and μ_{HA^+} and $\mu_{\text{CD}\cdot\text{HA}^+}$ are the mobilities of the free peptide and the peptide-CD complex, respectively. The molar fractions can be described as a function of the total peptide concentration, c_t , and the concentrations of the protonated peptide, $[\text{HA}^+]$, and the concentration of the peptide- β -CD complex $[\text{CD}\cdot\text{HA}^+]$ by

$$\alpha_{\text{HA}^+} = \frac{[\text{HA}^+]}{c_t} \quad (9)$$

$$\alpha_{\text{CD}\cdot\text{HA}^+} = \frac{[\text{CD}\cdot\text{HA}^+]}{c_t} \quad (10)$$

c_t is the sum of the concentrations of all species in solution, *i.e.*,

$$c_t = [\text{HA}^+] + [\text{CD}\cdot\text{HA}^+] + [\text{A}] + [\text{CD}\cdot\text{A}] \quad (11)$$

Substitution of the concentrations of the respective species in Eqs. (9) and (10) with the equilibria expressions of Eqs. (5)–(7) yields

$$\alpha_{\text{HA}^+} = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+](1 + K_+[\text{CD}]) + K_a(1 + K_n[\text{CD}])} \quad (12)$$

$$\alpha_{\text{CD}\cdot\text{HA}^+} = \frac{[K_+][\text{CD}][\text{H}^+]}{[\text{H}^+](1 + K_+[\text{CD}]) + K_a(1 + K_n[\text{CD}])} \quad (13)$$

The electrophoretic mobility of a peptide enantiomer can be obtained from Eqs. (8), (12), and (13)

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{[\text{H}^+](\mu_{\text{HA}^+} + \mu_{\text{CD}\cdot\text{HA}^+}K_+[\text{CD}])}{[\text{H}^+](1 + K_+[\text{CD}]) + K_a(1 + K_n[\text{CD}])} \quad (14)$$

Logarithmic transformation yields an equation which expresses the electrophoretic mobility as a function of pH, β -CD concentration, $\text{p}K_a$ value of the analytes as well as complexation constants of the cationic species K_+ and of the zwitterionic form K_n

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{HA}^+} + \mu_{\text{CD}\cdot\text{HA}^+}K_+[\text{CD}]}{1 + K_+[\text{CD}]} \cdot \frac{10^{\text{pH} - (\text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+[\text{CD}]}{1 + K_n[\text{CD}]})}}{1 + 10^{\text{pH} - (\text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+[\text{CD}]}{1 + K_n[\text{CD}]})}} \quad (15)$$

At a defined β -CD concentration, $[CDx]$, Eq. (15) can be simplified to

$$\mu_{\text{eff}/CDx} = \frac{\mu_{\text{HA}^+/CDx}}{1 + 10^{(pH - pK_{a/CDx})}} \quad (16)$$

$pK_{a/CDx}$ describes the dissociation equilibrium of the carboxylic acid groups in the presence of a certain concentration of β -CD which itself is a function of the pK_a value of the dipeptide and the complexation equilibria of the cationic and the zwitterionic species. $\mu_{\text{HA}^+/CDx}$ is the effective mobility of the fully protonated dipeptide at the defined concentration of β -CD to which contribute the mobilities of the free peptide, HA^+ , and the peptide- β -CD complex, $\text{CD} \cdot \text{HA}^+$, at the respective molar fractions depending on the complexation equilibrium between β -CD and the protonated analyte. In the absence of β -CD, Eq. (16) describes the dissociation behavior of the dipeptide with the pK_a value and the actual ionic mobility of the fully protonated dipeptide μ_{HA^+} [24]. The parameters $pK_{a/CDx}$ and $\mu_{\text{HA}^+/CDx}$ can be used to characterize the complexation behavior of the dipeptides in the dissociation equilibrium without further increasing the concentration of β -CD which is not possible without the addition of urea due to the limited aqueous solubility of β -CD.

Using nonlinear curve fitting procedures on the basis of Eq. (16) with the effective mobilities corrected for viscosity, $pK_{a/CDx}$ and $\mu_{\text{HA}^+/CDx}$ were determined for Ala-Phe and Ala-Tyr in the absence of β -CD and at a β -CD concentration of 15 mg/mL (x in $CDx = 15$) as well as in the absence and presence of urea as shown in Fig. 3 for Ala-Phe. Analogous plots were obtained for Ala-Tyr. Good regressions with R^2 values of 0.999 were obtained in all cases. The respective data, pK_a , μ_{HA^+} , $pK_{a/CD15}$, and $\mu_{\text{HA}^+/CD15}$ obtained from the effective mobility *versus* pH profiles are summarized in Fig. 4. The pK_a of 3.12 determined for Ala-Phe by CE is in good agreement with the reported value of 3.08 [25]. One has to keep in mind that all constants determined in the present study are apparent constants because neither activity coefficients nor molalities of the solutions were considered for the calculations of the data.

Addition of 15 mg/mL β -CD to the BGE resulted in a shift of the pK_a values to higher values, *i.e.*, a decrease in acidity, which is more pronounced for the DD-enantiomers compared to the LL-enantiomers. A stereoselective pK_a shift has previously been reported for dansylated amino acids upon complexation with (2-hydroxy)propyl- β -CD [20]. The presence of urea alone also led to an increase of the apparent pK_a values of the dipeptides by about 0.12 units (Fig. 4). Addition of 15 mg/mL β -CD to the urea containing solutions resulted in a further increase of the pK_a values although the relative increase of the pK_a values upon the addition of β -CD in the presence of urea is somewhat lower compared to buffers without urea. The DD-enantiomer is affected stronger compared to the LL-enantiomer in the presence of urea as well.

According to Eq. (15), a difference between $pK_{a/CD15}$ and pK_a is the consequence of differences in the peptide enantiomer-CD complexation constants of the cationic form and

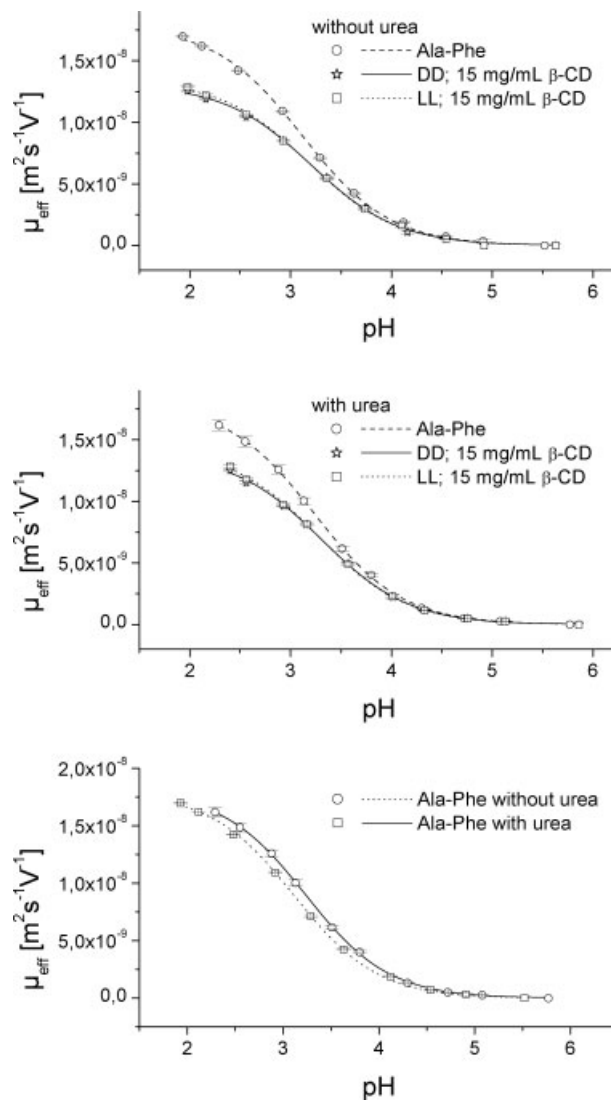


Figure 3. Regression curves of Ala-Phe showing the effective electrophoretic mobilities in dependence of pH in the absence of β -CD and at β -CD concentration of 15 mg/mL and in the absence and presence of urea. ($n = 3 \pm \text{SD}$).

the zwitterionic species of the peptides. A positive shift of the $pK_{a/CD15}$ value is the result of the stronger complexation of the cationic species compared to the zwitterionic form. Thus, the fraction of the cationic species expressed as the sum of the free as well as the complexed peptide is increased in the presence of β -CD compared to the absence of β -CD. The presence of urea does not change the general situation, *i.e.*, the relative $pK_{a/CD15}$ shift is comparable whether urea is present or not. The stronger shift observed for the DD-enantiomers is the effect of the stronger complexation of the protonated peptide enantiomers and/or a weaker complex of the zwitterions compared to the LL-enantiomers. This results in a change of the ratio of the bound enantiomers in favor of the stronger complexed stereoisomer. The observation is in

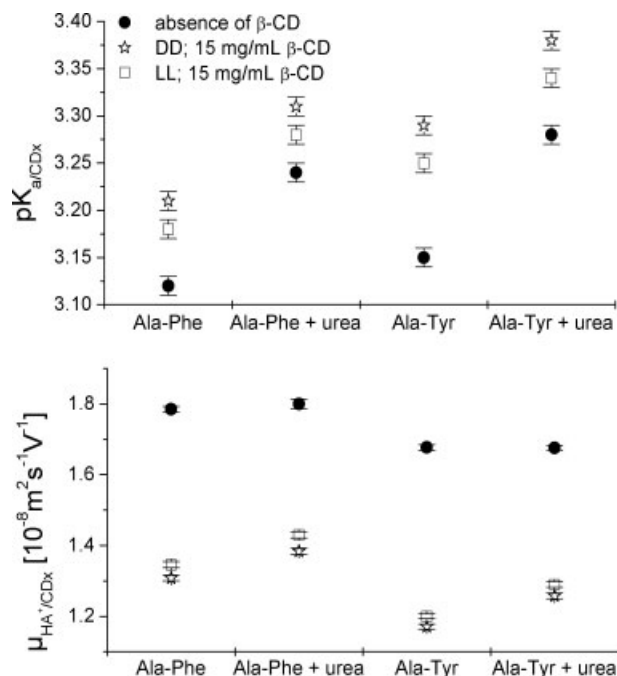


Figure 4. Apparent pK_a and effective mobility of the fully protonated peptide at a defined β -CD concentration μ_{HA^+}/CDx estimated on the basis of Eq. (16) for the enantiomers of Ala-Phe and Ala-Tyr without β -CD and at β -CD concentrations of 15 mg/mL in the absence and presence of urea. The error bars represent the SD obtained from the regression data calculated by the Origin software.

accordance with the study by Li and Waldron [14] who determined pH-independent binding constants for Ala-Phe stereoisomers and β -CD in the presence of 2 M urea. Under these conditions, the cationic forms of the Ala-Phe stereoisomers were bound stronger compared to the zwitterionic species and the cationic DD-enantiomer was complexed stronger compared to the protonated LL-stereoisomer. Moreover, the chiral recognition of β -CD toward the zwitterionic form was opposite compared to the chiral interaction with protonated Ala-Phe resulting in the reversal of the enantiomer migration order [14]. Stronger complexation of D-Ala-D-Tyr than L-Ala-L-Tyr by β -CD has also been reported at pH 2.5 where the peptide enantiomers exist predominantly as protonated species [16].

As expected, reduced effective mobilities, $\mu_{HA^+}/CD15$, compared to the mobilities of the free analytes were observed in the presence of 15 mg/mL β -CD due to complex formation (Fig. 4). The stronger bound DD-enantiomers displayed lower mobilities than the weaker complexed LL-stereoisomers. The effect was somewhat weaker in the presence of urea. Interestingly, no significant effect of 2 M urea on the effective mobility of the free analytes, *i.e.*, in the absence of β -CD was observed. Thus, the smaller differences between the effective mobilities of the peptide enantiomers in the presence of β -CD upon addition of urea

compared and the situation in the absence of urea result according to Eq. 16 from a reduction of the complexation constants in the presence of urea.

Generally, a chiral separation can be achieved by differences between the enantiomers in the binding constants or in the limiting complex mobilities or both [26]. Studying the chiral separation of Ala-Tyr by several CDs, Sabbah *et al.* [16] found comparable mobilities of complexes between β -CD and the enantiomers of Ala-Tyr at pH 2.5 while the complex between the stronger bound D-Ala-D-Tyr and β -CD displayed a higher mobility than the complex between the weaker bound L-Ala-L-Tyr and β -CD at pH 3.5. This resulted in the reversal of the enantiomer migration order when changing the pH of the BGE from pH 2.5 to 3.5. The lower complex mobility of D-Ala-D-Tyr- β -CD at a concentration of 15 mg/mL β -CD seems to contradict this observation. However, the mobilities have to be considered taking the complexation-induced pK_a shifts into account, which decreases the acidity of the peptide carboxylic acid groups. Thus, at pH 2.5 the cationic form of the Ala-Tyr enantiomers predominates so that the enantiomer migration order is primarily the result of the differing complexation constants and the complex mobility is similar. At pH 3.5, the cationic and zwitterionic species coexist. However, a larger fraction of the stronger complexed enantiomer will exist as cationic species due to the larger pK_a shift compared to the weaker complexed enantiomer. As the zwitterionic form as well as the corresponding β -CD complex has no mobility, the stronger bound enantiomer will display a higher observed limiting complex mobility than the weaker bound enantiomer which exists to a lower extent in the protonated form. Subsequently, the enantiomer migration order (and also a chiral separation) will be determined by the complex mobility. This effect can be observed if the complexation constants of the enantiomers in their uncharged, zwitterionic form are significantly smaller compared to the complexation constants of the charged species for a given chiral selector so that the complexation-induced pK_a shift will translate into an increase of the significantly stronger bound form. The exact difference between the binding constants of the charged and uncharged species of Ala-Tyr is not known. However, it has been demonstrated for the closely related dipeptide Ala-Phe that the complexation constants of the charged and uncharged enantiomers differ by an order of magnitude (in addition to the reversed chiral recognition observed for this dipeptide and β -CD) [14]. Thus, a similar effect on the binding constants depending on the charge can also be expected in the case of Ala-Tyr.

The altered enantiomeric selectivities of the peptides upon the addition of urea described above in Section 3.1 can also be explained by the altered dissociation and/or complexation of the peptide enantiomers by β -CD upon addition of urea to the BGE. It has been described that the enantiomers of both peptides, Ala-Phe and Ala-Tyr comigrate in the pH range of 3.0–3.2 due to the reversal of the chiral recogni-

tion of β -CD toward the peptides [14] or to the counteracting effects of enantioselective complexation by β -CD and the complex mobility [16]. Regardless of the cause, in both scenarios a shift of the pK_a value resulting in an apparent weaker acid increases the fraction of the positively charged analyte species. Assuming opposite chiral recognition of the peptide enantiomers as charged analytes and as zwitterionic species the urea-mediated pK_a shift will increase the fraction of positively charged species resulting in an improved chiral separation at pH 2.5 while a deterioration of the separation is found at pH 3.8. An increased fraction of the positively charged peptide will also result in an improved chiral separation in the case of higher mobility of the complex of the stronger bound enantiomer with a CD at pH 2.5 while this will decrease the separation selectivity at pH values above pH 3.0–3.2.

3.2.2 Amino acid derivative BOC-Phe

In order to further investigate the effect of urea on the dissociation and complexation equilibria of chiral analytes, the amino acid derivative BOC-Phe was studied which forms strong complexes with β -CD, thus, allowing the determination of complexation constants at low concentrations of β -CD in the absence of urea which was not possible for the dipeptides. As the amino group of BOC-Phe is no longer basic due to derivatization with the *N*-*tert*-butoxycarbonyl group the compound exists as neutral, uncharged compound, HB, and as anionic species B^- . Thus, the above-developed model has to be modified. Analyte dissociation and complexation with β -CD is described by the equilibria



The respective mass balance equilibria expressions are

$$K_a = \frac{[B^-][H^+]}{[HB]} \quad (20)$$

$$K_n = \frac{[CD \cdot HB]}{[HB][CD]} \quad (21)$$

$$K_- = \frac{[CD \cdot B^-]}{[B^-][CD]} \quad (22)$$

Thus, the electrophoretic mobility as a function of pH and β -CD concentration can be expressed in accordance to Eq. (15) for BOC-Phe as

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{B^-} + \mu_{CD \cdot B^-} K_- [CD]}{1 + K_- [CD]} \quad (23)$$

$$1 + 10^{-\text{pH} + \left(pK_a + \log \frac{1 + K_n [CD]}{1 + K_- [CD]} \right)}$$

K_n and K_- are the complexation constants between β -CD and the uncharged analyte and anionic analyte, while μ_{B^-} and $\mu_{CD \cdot B^-}$ are the actual ionic mobilities of the free and complexed BOC-Phe anions, respectively. Using data at β -CD concentrations between 0 and 15 mg/mL (0–13.2 mmol/L) and at pH values ranging from 2.2 to 6.0 a 3-D, nonlinear curve fitting procedure was applied to estimate binding constants on the basis of Eq. (23). The respective constants were determined for both enantiomers in the absence and presence of urea. Figure 5 shows the 3-D plot of BOC-D-Phe in the absence of urea as an example. The data are summarized in Table 1. As neither activity coefficients nor molalities of the solutions were considered for the calculations the data in Table 1 have to be regarded as averaged apparent values. Uncharged BOC-Phe forms stronger complexes with β -CD compared to the dissociated, anionic amino acid derivative. Zia *et al.* have also observed higher complexation constants for hydroxypropyl- β -CD and the neutral forms of the drugs naproxen and warfarin compared to the anionic forms of the drugs [27]. In contrast, stronger complexes of Ala-Phe and Ala-Tyr were observed at pH 9.5 where the peptides are predominantly negatively charged [19] than at pH 3.5 when a considerable fraction of the compounds exists as zwitterionic species [14, 16]. Moreover, as also outlined above, the uncharged forms of the dipeptides were complexed weaker compared to the positively charged species [14, 16].

BOC-D-Phe displayed a higher affinity towards β -CD than the L-enantiomer in buffers with and without urea. A reduction of the complexation constants upon addition of urea is observed whereas the ratios of the binding constants of the charged or uncharged species did not change. The pK_a values are shifted to higher values, *i.e.*, a decrease in acidity of the compounds, as found for the dipeptides Ala-Phe and

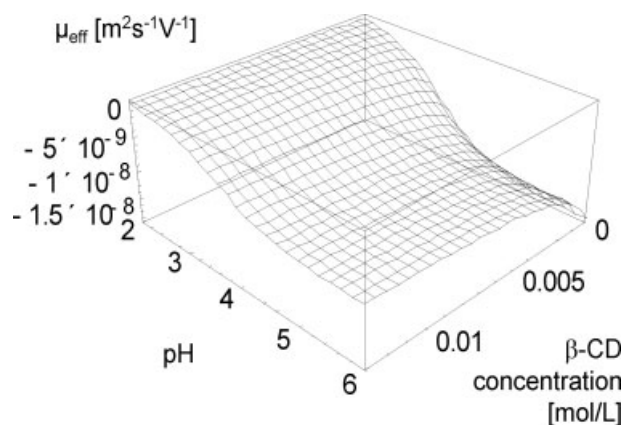


Figure 5. 3-D effective mobility surface plot for BOC-D-Phe in the absence of urea. Effective electrophoretic mobilities were calculated according to Eq. (23).

Table 1. Actual ionic mobilities and apparent equilibrium constant data describing the complexation of the enantiomers of BOC-Phe and β -CD in the absence and presence of urea

| Parameter | BOC-D-Phe | BOC-L-Phe | BOC-D-Phe + urea | BOC-L-Phe + urea |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|
| μ_{B^-} ($10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) | -1.71 ± 0.01 | -1.71 ± 0.01 | -1.71 ± 0.01 | -1.72 ± 0.01 |
| $\mu_{B^- \text{-CD}^-}$ ($10^{-8} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$) | -0.75 ± 0.01 | -0.75 ± 0.01 | -0.75 ± 0.01 | -0.76 ± 0.01 |
| K_n (L/mol) | 794 ± 32 | 714 ± 28 | 649 ± 26 | 587 ± 24 |
| K_- (L/mol) | 563 ± 20 | 504 ± 17 | 439 ± 16 | 399 ± 15 |
| $\text{p}K_a$ | 3.53 ± 0.01 | 3.54 ± 0.01 | 3.65 ± 0.01 | 3.65 ± 0.01 |
| $K_{n/D}/K_{n/L}$ | 1.11 ± 0.07 | | 1.11 ± 0.06 | |
| $K_{-/D}/K_{-/L}$ | 1.12 ± 0.06 | | 1.10 ± 0.06 | |

The SDs were obtained from the regression data calculated by the Origin Software.

Ala–Tyr. The actual ionic mobilities of free anionic BOC-Phe, μ_{B^-} , and of the anionic β -CD–BOC-Phe complex, $\mu_{\text{CD} \cdot \text{B}^-}$, are not affected by the presence of urea.

Reduced hydrophobic interactions between CDs and various analytes have also been reported in the literature [9, 11–13]. Thus, it may be hypothesized that urea also reduces the interactions between the dipeptides and β -CD resulting in increased observed effective mobilities although this could not be demonstrated experimentally due to the low aqueous solubility of β -CD. Complexation of both the charged and zwitterionic species of the peptides may be affected in a similar way. However, one has to keep in mind that the peptides are amphoteric compounds in contrast to BOC-Phe and the other analytes studied in [9, 11–13]. Phenomena such as the pH-dependent reversal of the enantiomer migration order have so far only been described for amphoteric compounds indicating a specific behavior of amphoteric compounds in chiral CE. Moreover, in contrast to our study, a decrease in the $\text{p}K_a$ values has been described for the dissociation equilibria of the amino acid glycine [28] and for the second dissociation equilibrium of carbonic acid [29]. It has to be pointed out that during the above discussion of the effect of urea on dissociation equilibria and complexation affinity only apparent constants have been determined reflecting the experimental conditions typically for CE experiments. Thus, all data are apparent constants describing the migration behavior under the applied experimental conditions and cannot be interpreted with regard to structural changes upon the addition of urea.

Furthermore, the effect of urea on the β -CD-mediated enantioseparation of BOC-Phe was examined at pH 6.5. This pH value is well above the $\text{p}K_a$ value of the compound so that separations were not influenced by the $\text{p}K_a$ shift. The analysis was performed in phosphate and in citrate buffer at a concentration of β -CD of 2 mg/mL. The selectivities α calculated from the ratio of the effective mobilities of BOC-D-Phe and BOC-L-Phe are 0.968 and 0.969 in phosphate buffer and 0.969 and 0.968 in citrate buffer in the absence and presence of urea, respectively. Moreover, the ratios of the complexation constants of the neutral species, $K_{n/D}/K_{n/L}$, and of the anionic forms, $K_{-/D}/K_{-/L}$, respectively, were not affected by the pres-

ence of urea (Table 1). Thus, despite the fact that urea reduced the complexation constants for β -CD and the BOC-Phe enantiomers, the separation selectivity α calculated as ratio of the effective mobilities or the ratio of the binding constants was not significantly affected. The improved resolution of the compounds observed in buffers containing urea as shown for citrate buffer in Fig. 6 may be more likely due to a reduction of the EOF and a higher viscosity of the buffer solution allowing more time for the separation of the enantiomers.

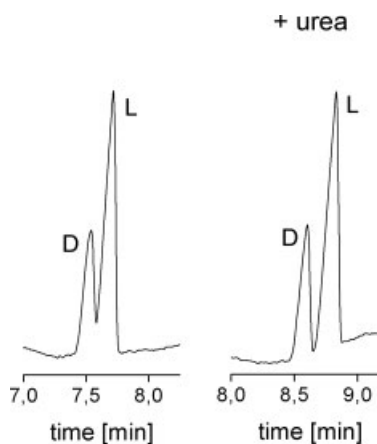


Figure 6. Representative electropherograms of the chiral separations of the enantiomers of BOC-Phe using β -CD in citrate buffer pH 6.5, in the absence and presence of urea. Experimental conditions: 40.0/50.2 cm fused-silica capillary; 50 mM citrate buffer containing 20 mM sodium chloride, 2 mg/mL β -CD (and 2 M urea), 25 kV; 25°C.

4 Concluding remarks

The influence of the buffer substance and urea on β -CD-mediated enantioseparations of Ala–Phe, Ala–Tyr, ephedrine, and Boc-Phe was investigated. While only minor effects were observed for the buffer substances in all cases, chiral separations of the dipeptides at pH 2.5 were improved

in the presence of urea while the separation selectivity α decreased at pH 3.8 when urea was added to the BGE. Addition of β -CD resulted in a complexation-induced pK_a shift which was different for the peptide enantiomers. Urea alone also resulted in a pK_a shift which further increased the CD-mediated pK_a shift. This behavior can be used to explain the improved separation at pH 2.5 and deteriorated separation at pH 3.8 due to an increase of the fraction of the protonated, positively charged species of the peptide enantiomers. This is further supported by the fact that no effect was observed for the chiral separation of ephedrine, which exists only in the protonated form in the pH range of 2.5–3.8. The results can also be used to explain the reversal of the enantiomer migration order observed for Ala–Phe [14] and Ala–Tyr [16] when increasing the pH of the run buffer from 2.5 to 3.5. As pointed out above these effects will be observed in the case when the uncharged, zwitterionic form is complexed much weaker than the protonated, charged form of an analyte and/or opposite chiral recognition between a chiral selector and analyte enantiomers occurs depending on the charge of the analyte.

Using BOC-Phe as a model compound that strongly interacts with β -CD allowing the determination of the complexation constants even at low β -CD concentrations below the limiting aqueous solubility of the CD, reduced binding affinities, *i.e.*, lower complexation constants, were observed upon addition of urea. This is in accordance with observations described in the literature [9, 11–13]. The effect of urea in the case of BOC-Phe was nonstereospecific as both enantiomers were affected in the same way. However, it may be speculated that urea may affect chiral separations especially in the case of enantioseparations that show a strong dependence on the pH, *i.e.*, close to the pK_a value especially in the case of amphoteric compounds such as peptides. Thus, urea should not be regarded solely as a solubility enhancer for β -CD.

5 References

- [1] Beckers, J. L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, 24, 518–535.
- [2] Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 89–122.
- [3] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Chichester 1997.
- [4] Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 4063–4077.
- [5] Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2006, 27, 222–230.
- [6] Kašička, V., *Electrophoresis* 2006, 27, 142–175.
- [7] Czerwenka, C., Lindner, W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 599–638.
- [8] Lin, C. E., Liao, W. S., Chen, K. H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3139–3146.
- [9] Chankvetadze, B., Schulte, G., Bergenthal, D., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1998, 798, 315–323.
- [10] Abu-Hamdiyyah, M., *J. Phys. Chem.* 1965, 69, 2720–2725.
- [11] Breslow, R., Alfon, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, 6916–6918.
- [12] Godinez, L. A., Schwartz, L., Criss, C. M., Kaifer, A. E., *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 3376–3380.
- [13] Shen, X., Belletete, M., Durocher, G., *Langmuir* 1997, 13, 5830–5836.
- [14] Li, J., Waldron, K. C., *Electrophoresis* 1999, 20, 171–179.
- [15] Sabah, S., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 2000, 894, 267–272.
- [16] Sabbah, S., Süß, F., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2001, 22, 3163–3170.
- [17] Bodanszky, M., Bodanszky, A., *The Practice of Peptide Synthesis*, 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin 1994, p. 110.
- [18] Bello, M. S., Rezzonico, R., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 1994, 659, 199–204.
- [19] Süß, F., Poppitz, W., Scriba, G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1147–1154.
- [20] Rizzi, A. M., Kremser, L., *Electrophoresis* 1999, 20, 2715–2722.
- [21] Branch, S. K., Holzgrabe, U., Jefferies, T. M., Mallwitz, H., Oxley, F. J. R., *J. Chromatogr. A* 1997, 758, 277–292.
- [22] Rawjee, Y. Y., Staerk, D. U., Vigh, G., *J. Chromatogr.* 1993, 635, 291–306.
- [23] Rawjee, Y. Y., Staerk, D. U., Vigh, G., *J. Chromatogr.* 1993, 652, 233–245.
- [24] Včeláková, K., Zusková, I., Kenndler, E., Gaš, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 309–317.
- [25] Vallat, P., Gaillard, P., Carrupt, P.-A., Tsai, R.-S., Testa, B., *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 471–485.
- [26] Chankvetadze, B., Lindner, W., Scriba, G. K. E., *Anal. Chem.* 2004, 76, 4256–4260.
- [27] Zia, V., Rajewski, R. A., Stella, V. J., *Pharm. Res.* 2001, 18, 667–673.
- [28] Talukdar, H., Rudra, S., Kundu, K. K., *Can. J. Chem.* 1989, 67, 315–320.
- [29] Yang, J. Z., Lu, D. Z., Deng, M., Lui, J. *et al.*, *Z. Phys. Chem.* 1998, 205, 199–209.

4.4 MANUSKRIFT 4

Effect of urea on analyte complexation by 2,6-dimethyl- β -cyclodextrin in peptide enantioseparations by capillary electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2009, 30, 3764-3771.

Manuela Hammitzsch-
Wiedemann
Gerhard K. E. Scriba

University of Jena, Department
of Pharmaceutical Chemistry,
Philosophenweg, Jena, Germany

Received June 17, 2009
Revised August 5, 2009
Accepted August 6, 2009

Research Article

Effect of urea on analyte complexation by 2,6-dimethyl- β -CD in peptide enantioseparations by CE

The aim of the present study was the investigation of the effect of urea on analyte complexation in CD-mediated separations of peptide enantiomers by CE in the pH range of about 2–5. pH-independent complexation and mobility parameters in the absence and presence of 2 M urea were obtained by three-dimensional, non-linear curve fitting of the effective analyte mobility as a function of pH and heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -CD concentration. Urea led to decreased binding strength of the CD towards the protonated and neutral analyte enantiomers as well as to decreased mobilities of the free analytes. In contrast, mobilities of the fully protonated enantiomer-CD complexes as well as the pK_a values of the free and complexed analytes increased. The effect of urea on separation efficiency varied with pH and CD concentration. In the case of Ala-Tyr and Ala-Phe, separations improved in the presence of urea at pH 2.2. In contrast, separations were impaired by urea at pH 3.8 and low concentrations of the CD. Decreased separation efficiency was noted for Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂ at low CD concentrations when urea was added but separations improved at higher CD concentrations over the entire pH range studied. The effect of urea on analyte complexation appeared to be primarily non-stereoselective. Furthermore, the pH-dependent reversal of the enantiomer migration order observed for Ala-Tyr and Ala-Phe can be rationalized by the complexation and mobility parameters.

Keywords:

Complexation constant / Complex mobility / Enantioseparation / Peptide / pK_a shift
DOI 10.1002/elps.200900384

1 Introduction

Urea is used often as a solubility enhancer in β -CD-mediated enantioseparations in CE due to the low aqueous solubility of the CD. Typically, 1–2 M concentrations of urea are applied but concentrations up to 6 M [1] or 7 M [2] have also been reported. Urea has also been utilized to further increase the solubility of γ -CD [3] or the solubility of hydrophobic compounds such as polychlorinated biphenyls [4, 5]. The role of urea as a solubilizer for hydrophobic compounds has been explained by the formation of “mixed” clusters increasing the number of possible interstices that can accommodate non-polar molecules [6].

Different effects of urea on β -CD-mediated enantioseparations have been described in the literature. For example, a significantly enhanced selectivity was observed in the case of enantioseparations of dansylated amino acids upon addition of 7 M urea [2]. In CD-modified MEKC the enantioseparation of miconazol improved in the presence of 1 M urea [7]. Using a dual CD system consisting of 5–20 mM β -CD and 20 mM 6-monodeoxy-6-monoamino- β -CD several polychlorinated biphenyl compounds could only be resolved when 2 M urea was added [5]. Furthermore, pH-dependent effects were observed. Although improved β -CD-mediated separations of the enantiomers of the dipeptides Ala-Phe and Ala-Tyr were observed at pH 2.5 in the presence of 2 M urea, addition of the compound resulted in a deterioration of the enantioseparations when the pH was raised to 3.5 [8] or 3.8 [9].

Complex formation between the analyte enantiomers and the chiral selector as well as the mobilities of the transient diastereomeric analyte-selector complexes determine the separation behavior of analytes in CE enantioseparations [10]. For separations close to the pK_a values of the compounds the separation efficiency is also affected by the protonation equilibria. Therefore, the effect of urea on

Correspondence: Professor Gerhard K. E. Scriba, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany
E-mail: gerhard.scriba@uni-jena.de
Fax: +49-3641-949802

Abbreviations: DM- β -CD, heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin; HDB, hexadimethrine bromide

analyte complexation, mobility and protonation is of great interest. With regard to complex formation, weaker complexes in the presence of urea as expressed by reduced complexation constants between the analytes and the selector have been frequently observed [9, 11–16]. However, increased complexation constants have also been reported, for example, for 2-naphthoic acid in the presence of 8 M urea [14]. Only few reports have been published on the effect of urea on the mobilities of the free analytes and the diastereomeric complexes. Although unchanged mobilities were found in the case of BOC-Phe and β -CD as chiral selector [9] decreased values were reported for the enantio-separation of thioridazine by β -CD [16]. Lower thermodynamic pK_a values were reported in the presence of urea compared with pure aqueous solutions for weak acids and bases [17–19].

CE has been proven as a high-resolution technique for peptide enantioseparations [20, 21]. In a previous study, the effect of 2 M urea on the separation of the enantiomers of Ala-Tyr and Ala-Phe using β -CD as chiral selector has been investigated [9]. Both peptides displayed a pH-dependent reversal of the enantiomer migration order between pH 2 and 4 [22–24]. Due to the limited aqueous solubility of β -CD in the absence of urea only a concentration of β -CD of 15 mg/mL was investigated but improved separations at pH 2.5 were noted in the presence of urea while separations deteriorated at pH 3.8 when urea was added. It was hypothesized that this effect was due to a pK_a shift but the limited aqueous solubility of β -CD prevented a detailed investigation. Thus, the present study was conducted using the highly water soluble heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -CD (DM- β -CD) as chiral selector in order to analyze the effect of urea on the complexation of peptide enantiomers by a CD. Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂ were included for comparison because these peptides retained the enantiomer migration order in the presence of DM- β -CD when changing the pH of the background electrolyte [22, 23].

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

DM- β -CD with an isomeric purity of 50% was obtained from Cyclolab (Budapest, Hungary). L-Ala-L-Phe, D-Ala-D-Phe, L-Ala-L-Tyr and L-Asp-L-PheOMe were from Bachem AG (Heidelberg, Germany). D-Ala-D-Tyr, D-Asp-D-PheOMe, L-Glu-L-PheNH₂ and D-Glu-D-PheNH₂ were synthesized as described previously [22, 23]. Riboflavin-5'-phosphate sodium salt hydrate was purchased from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Hexadimethrine bromide (HDB) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All other chemicals were of analytical grade. Buffers and sample solutions were prepared in double-distilled, deionized water, filtered (0.2 μ m) and degassed by sonication.

2.2 CE

Experiments were performed on a Beckman P/ACE MDQ instrument (Beckman Coulter, Unterschleißheim, Germany) equipped with a diode array detector and controlled by the 32 Karat Software Version 7.0. Separations were carried out at 20°C in 50 μ m id, 360 μ m od fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with an effective length of 40 cm and a total length of 50.2 cm. The detection wavelength was set at 214 nm.

Complexation and mobility parameters were determined at concentrations of DM- β -CD between 0 and 0.135 mol/L in the pH range of 1.9 to 4.8 in the absence of urea and at pH values between 2.4 and 5.0 in the presence of urea using phosphate, tartrate, aspartate and malate buffers containing 0.01% m/v HDB. Buffers were prepared by dissolving 20–30 mM of the acid in water and adding the calculated amount of 1 M sodium hydroxide solution to achieve the desired pH. An aliquot of 2 M urea was added in the case of urea-containing buffers. The ionic strength was adjusted to 40 mM by addition of the calculated amount of sodium chloride. Following measurement of the pH, DM- β -CD was added and the buffers were used as such. Sample solutions containing the individual enantiomers at a concentration of 200 μ g/mL and 0.6% v/v DMSO as EOF marker were introduced at a pressure of 0.2 psi (1.38 kPa) for 3 s. Analyses were performed at –20 kV (detection at the anodic end). Between the runs the capillary was rinsed for 2 min with 0.1 M HCl, 2 min with 0.2% m/v HDB and for 4 min with the background electrolyte. Correction of the viscosity in the case of buffers containing urea and/or DM- β -CD was accomplished using the CE instrument as viscosimeter according to Bello *et al.* [25] by measuring the time of the moving boundary between the respective buffer containing urea and/or DM- β -CD and a buffer containing 0.01% m/v riboflavin-5'-phosphate. Electrophoretic mobilities were measured in duplicate; viscosity corrections were performed in quadruplicate. Regression analysis was performed using Microcal Origin 6.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Selectivity was determined at concentrations of DM- β -CD between 0.005 and 0.113 mol/L using 60 mM phosphate buffer, pH 2.2, 40 mM phosphate buffer, pH 3.0, and 30 mM aspartate buffer, pH 3.8 with an ionic strength of 40 mM. The buffers were prepared by dissolving 2 M urea in the case of urea-containing buffers and the appropriate amounts of the buffer acid and sodium chloride in water and titrating the solution to the respective pH by the addition of 1 M NaOH. Sample solutions containing a non-racemic mixture of the dipeptide in a concentration of 300 μ g/mL and 0.6 % v/v DMSO were injected at a pressure of 0.2 psi (1.38 kPa) for 3 s and separated using a voltage of +25 kV (detection at the cathodic end). Between the analyses, the capillary was flushed for 1 min with 0.1 M NaOH, for 1 min with 0.1 M HCl and for 1 min with water followed by 5 min with background electrolyte. All selectivity experiments were performed in triplicate.

3 Results and discussion

3.1 Effect of urea on complexation and mobility parameters

In the pH range 2–5, the dipeptides can be treated as a weak base with the protonated species as the corresponding acid and the zwitterionic, neutral form as the base. Subsequently, two complexation and protonation equilibria exist, *i.e.* complexation between the CD and the protonated form (K_+) and the neutral species (K_n) as well as the protonation equilibria of the free analytes (K_a) and the peptide–CD complex ($K_{a/c}$). These are described by the following equations:

$$K_+ = \frac{[\text{HB} \cdot \text{CD}^+]}{[\text{HB}^+] \cdot [\text{CD}]} \quad (1)$$

$$K_n = \frac{[\text{B} \cdot \text{CD}]}{[\text{B}] \cdot [\text{CD}]} \quad (2)$$

$$K_a = \frac{[\text{B}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HB}^+]} \quad (3)$$

$$K_{a/c} = \frac{[\text{B} \cdot \text{CD}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{HB} \cdot \text{CD}^+]} \quad (4)$$

In CE, only the charged species contribute with their molar fractions to the effective mobility of an analyte, μ_{eff} , according to:

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha_{\text{HB}^+} \cdot \mu_{\text{HB}^+} + \alpha_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+} \cdot \mu_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+} \quad (5)$$

where α_{HB^+} and $\alpha_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+}$ are the respective molar fractions and μ_{HB^+} and $\mu_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+}$ are the mobilities of the free protonated analyte and its CD complex. Expressing the molar fractions as a function of the concentration of the respective

species and total analyte concentration, subsequent substitution using the equilibria expressions of Eqs. (1) to (3) followed by logarithmic transformation of $[\text{H}^+]$ and K_a yields Eq. (6) [9]:

$$\mu_{\text{eff}} = \frac{\mu_{\text{HB}^+} + \mu_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+} \cdot K_+ \cdot [\text{CD}]}{1 + K_+ \cdot [\text{CD}]} \times \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \left(\text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+ \cdot [\text{CD}]}{K_+ + [\text{CD}]} \right)}} \quad (6)$$

which expresses μ_{eff} as a function of the CD concentration, $[\text{CD}]$, the pH of the background electrolyte, the $\text{p}K_a$ value of the analyte, the binding constants of the protonated and neutral species, K_+ and K_n , as well as the mobilities of the protonated free species and the corresponding complex, μ_{HB^+} and $\mu_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+}$.

The pH-independent parameters, μ_{HB^+} , $\mu_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+}$, K_+ and K_n as well as $\text{p}K_a$ can be obtained from Eq. (6) by non-linear regression analysis from three-dimensional plots of μ_{eff} as a function of pH and CD concentration. In the present study this was achieved in the pH range 1.9–4.8 in the absence of urea and between pH 2.4 and 5.0 in the presence of 2 M urea. DM- β -CD concentrations ranged between 0 and 0.135 mol/L. The individual enantiomers of the dipeptides were used in these experiments so that the enantiomer mobilities could also be determined in the case of low separation efficiency. The electrophoretic mobilities were corrected for the EOF and viscosity of the buffer. Analyses were performed under reversal of the EOF by addition of HDB and reversal of the polarity of the applied voltage in order to allow the determination of EOF-corrected μ_{eff} in low pH buffers at high CD concentrations. The data obtained by three-dimensional, non-linear curve fitting according to Eq. (6) are summarized in Table 1. As neither activities nor molalities of the buffer solutions were

Table 1. pH-independent mobility and complexation parameters in the absence and presence of 2 M urea obtained by curve fitting according to Eq. (6)^{a)}

| Peptide | | $\mu_{\text{HB}^+} [10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}]$ | $\mu_{\text{HB} \cdot \text{CD}^+} [10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}]$ | $K_+ [\text{L/mol}]$ | $K_n [\text{L/mol}]$ | $\text{p}K_a$ | $\text{p}K_{a/c}$ | K_+/K_n |
|------------|---------|---|---|----------------------|----------------------|---------------|-------------------|-------------|
| Ala-Tyr | DD | 15.88 ± 0.07 | 6.68 ± 0.06 | 165 ± 7 | 18.5 ± 1.5 | 3.12 ± 0.01 | 4.07 ± 0.03 | 9.0 ± 0.6 |
| | LL | | 6.55 ± 0.06 | 139 ± 6 | 15.0 ± 1.5 | | 4.08 ± 0.03 | 9.2 ± 0.6 |
| | DD Urea | 15.38 ± 0.10 | 6.94 ± 0.09 | 121 ± 8 | 15.5 ± 2.0 | 3.25 ± 0.01 | 4.15 ± 0.03 | 7.8 ± 0.6 |
| | LL Urea | | 6.85 ± 0.10 | 102 ± 7 | 12.5 ± 1.5 | | 4.16 ± 0.04 | 8.1 ± 0.7 |
| Ala-Phe | DD | 16.91 ± 0.07 | 5.89 ± 0.08 | 99 ± 4 | 9.0 ± 1.0 | 3.08 ± 0.01 | 4.11 ± 0.04 | 10.8 ± 1.0 |
| | LL | | 5.85 ± 0.08 | 93 ± 4 | 9.0 ± 1.0 | | 4.09 ± 0.04 | 10.2 ± 0.9 |
| | DD Urea | 16.43 ± 0.10 | 6.23 ± 0.10 | 79 ± 4 | 9.0 ± 1.0 | 3.22 ± 0.01 | 4.16 ± 0.04 | 8.7 ± 0.9 |
| | LL Urea | | 6.08 ± 0.11 | 69 ± 4 | 8.0 ± 1.0 | | 4.15 ± 0.04 | 8.4 ± 0.9 |
| Asp-PheOMe | DD | 15.66 ± 0.08 | 5.89 ± 0.09 | 141 ± 6 | 114 ± 7 | 2.99 ± 0.01 | 3.08 ± 0.02 | 1.23 ± 0.06 |
| | LL | | 5.84 ± 0.10 | 116 ± 5 | 94 ± 6 | | 3.08 ± 0.02 | 1.23 ± 0.06 |
| | DD Urea | 15.17 ± 0.12 | 6.20 ± 0.13 | 110 ± 6 | 89 ± 7 | 3.16 ± 0.01 | 3.25 ± 0.02 | 1.24 ± 0.07 |
| | LL Urea | | 6.07 ± 0.14 | 91 ± 5 | 71 ± 5 | | 3.26 ± 0.02 | 1.27 ± 0.07 |
| Glu-PheNH2 | DD | 14.98 ± 0.06 | 5.91 ± 0.11 | 54 ± 3 | 39 ± 3 | 3.81 ± 0.01 | 3.95 ± 0.02 | 1.38 ± 0.08 |
| | LL | | 5.88 ± 0.13 | 44 ± 2 | 34 ± 3 | | 3.92 ± 0.02 | 1.30 ± 0.08 |
| | DD Urea | 14.45 ± 0.05 | 6.28 ± 0.11 | 41 ± 2 | 32 ± 2 | 4.01 ± 0.01 | 4.12 ± 0.02 | 1.26 ± 0.06 |
| | LL Urea | | 6.24 ± 0.12 | 33 ± 2 | 27 ± 2 | | 4.10 ± 0.02 | 1.23 ± 0.06 |

a) The standard deviations were either obtained from the regression data calculated by the Origin Software or calculated from the regression data according to the law of error propagation.

considered, the data are not thermodynamic constants but rather apparent values.

The data of all analytes exhibited the same general trend. Regardless of the presence or absence of 2 M urea the *DD*-enantiomers of all peptides are complexed stronger by DM- β -CD compared with the *LL*-stereoisomers and the protonated species are bound stronger than the uncharged forms of the analytes. As $pK_{a/c}$ is related to pK_a by

$$pK_{a/c} = pK_a + \log \frac{K_+}{K_n} \quad (7)$$

the dissociation constant of the complex is generally shifted to a higher value when the neutral form is complexed weaker compared with the protonated species. The effect is more pronounced in the case of Ala-Tyr and Ala-Phe than for Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂. This may be due to the different structures of the peptides. The carboxyl group is located in the side chain of Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂ so that the protonation equilibrium is not affected by the complexation to a great extent. As there is no statistically significant difference between the enantiomers with regard to the K_+/K_n ratio and subsequently the $pK_{a/c}$ values, the effect appears to be primarily non-stereoselective although a small stereoselective effect cannot be generally ruled out. A stereoselective pK_a shift has been reported for dansylated amino acids upon complexation with (2-hydroxy)propyl- β -CD [26, 27]. The mobilities of the complexes of the *DD*-enantiomers slightly exceeded the mobilities of the *LL*-isomer-CD complexes but except for Ala-Tyr the differences are not statistically different.

Addition of 2 M urea led to decreased mobilities of the free analytes, μ_{HB^+} , but increased mobilities of the diastereomeric complexes, μ_{HB-CD^+} . Complexation constants of the protonated and neutral species decreased. A reduction of the complexation constants upon addition of urea has been observed for other analytes as well [9, 11–16]. The dissociation constants pK_a and $pK_{a/c}$ were shifted to higher values. Increased apparent pK_a values were also found for BOC-Phe in the presence of 2 M urea [9]. In contrast, decreased thermodynamic pK_a values of weak acids and bases upon addition of urea have been reported [17–19]. This may be due to the fact that apparent constants were determined in the present study but thermodynamic values in the above cited publications. However, it may not be ruled out that a pK_a shift in the presence of urea may go in either direction depending on the analyte.

3.2 Analyte migration and enantiomer migration order

The enantiomer migration order can be described by the enantiomeric selectivity, S , defined by the ratio of the effective mobilities of the *DD*- and *LL*-isomers of the dipeptides:

$$S = \frac{\mu_{\text{eff}/DD}}{\mu_{\text{eff}/LL}} \quad (8)$$

A value above 1 denotes that the *DD*-enantiomer migrates first while it migrates last when S is below 1. At a certain buffer pH

the effective analyte mobility, $\mu_{\text{eff}/pH}$, is described by:

$$\mu_{\text{eff}/pH} = \frac{\mu_f + \mu_c \cdot K \cdot [CD]}{1 + K \cdot [CD]} \quad (9)$$

The pH-dependent mobilities of the free analyte, μ_f , and the analyte-CD complex, μ_c , as well as the “mixed” complexation constant, K , are related to the pH-independent parameters by:

$$\mu_f = \frac{\mu_{HB^+}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad (10)$$

$$\mu_c = \frac{\mu_{HB-CD^+}}{1 + 10^{(pH-pK_{a/c})}} \quad (11)$$

$$K = \frac{K_+ + K_n \cdot 10^{(pH-pK_a)}}{1 + 10^{(pH-pK_a)}} \quad (12)$$

Selectivity was determined using non-racemic mixtures of the peptide enantiomers at pH 2.2, 3.0 and 3.8 at six concentrations of DM- β -CD between 0.005 and 0.113 mol/L in the case of Ala-Tyr and Asp-PheOMe and at concentrations of 0.019 and 0.113 mol/L in the case of Ala-Phe and Glu-PheNH₂. Results are summarized in Fig. 1; representative electropherograms of separations of Ala-Tyr and Asp-PheOMe are shown in Fig. 2. It has to be noted that relatively high selectivity values may be calculated even if low resolution is observed in the electropherograms due to analyte diffusion. Diffusion processes increase when the analytes are only slightly positively charged at elevated pH values.

Reversal of the enantiomer migration order as a function of the pH of the background electrolyte was observed for Ala-Tyr and Ala-Phe while the migration order of the enantiomers of Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂ did not change upon increasing the pH (Figs. 1 and 2 and refs. [22, 23]). The general migration behavior of the analytes is not affected by urea; specific effects on separation selectivity will be discussed in Section 3.3.

The *DD*-enantiomer of Ala-Tyr is complexed stronger over the entire pH range studied. K_+ values are eight- to ninefold higher than the K_n values. Therefore, a significant complexation-induced pK_a shift of about 1 unit is observed. It can be easily concluded from Eqs. (10) and (11) that the mobility of the free analyte, μ_f , decreases stronger than the mobilities of the enantiomer-CD complexes, μ_c , when increasing the buffer pH due to the higher pK_a of the complexes compared with the free forms. This results in a reversal of the mobility ratio of the peptide-CD complexes and the free analytes and subsequently in a reversal of the enantiomer migration order. At pH 2.2 when the protonated species of the analytes predominate, the stronger complexed *DD*-enantiomers migrate slower than the *LL*-isomers. The deteriorating effect of increasing concentrations of DM- β -CD at this pH can be attributed to the increasing influence of the complex mobilities of the fully protonated species, μ_{HB-CD^+} , which differ only slightly for the enantiomers. At pH 3.0 no separation is observed (data not shown). At pH

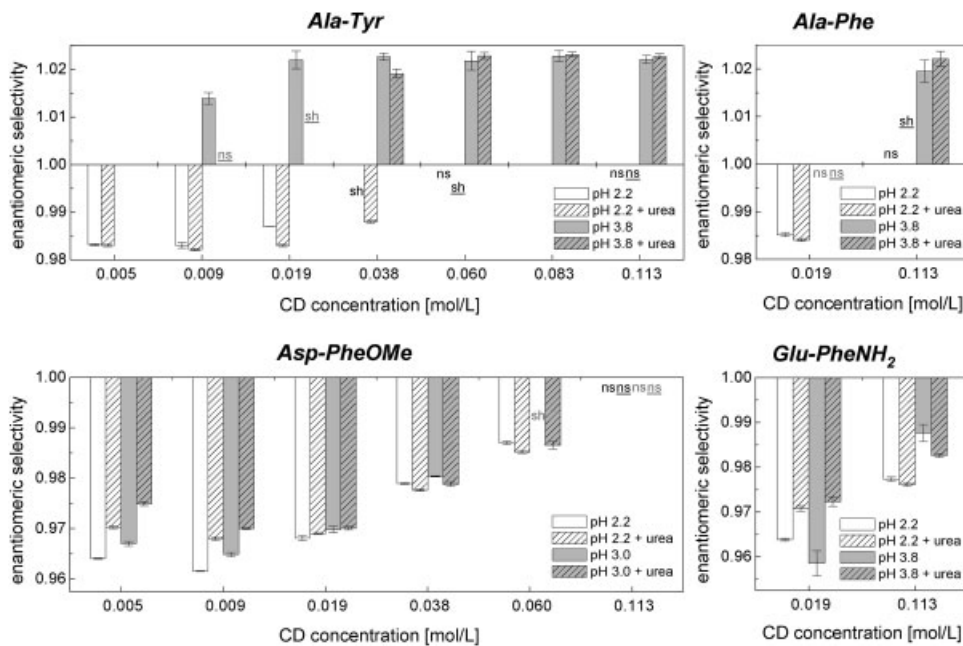


Figure 1. Enantiomeric selectivities as a function of DM- β -CD concentration in the absence and presence of 2 M urea at pH 2.2 and 3.8 for Ala-Tyr, Ala-Phe and Glu-PheNH₂ and at pH 2.2 and 3.0 for Asp-PheOMe. The values are the mean \pm SD ($n = 3$); sh, peak with shoulder; ns, no separation.

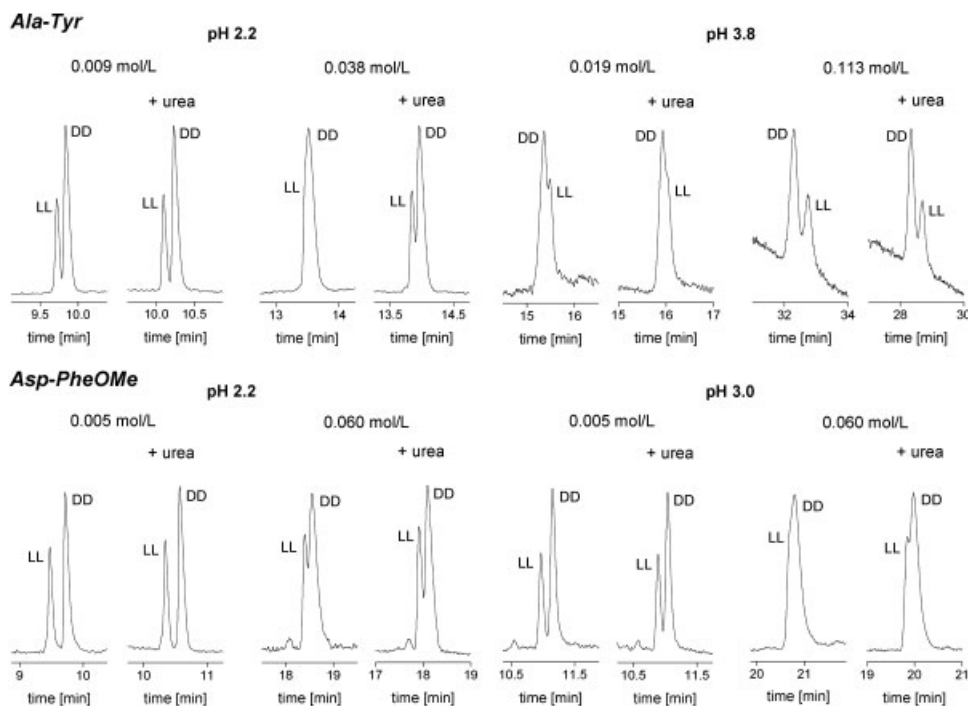


Figure 2. Representative electropherograms of separations of the DD- and LL-enantiomers of Ala-Tyr and Asp-PheOMe using DM- β -CD as chiral selector in the absence and presence of 2 M urea. Experimental conditions: 40/50.2 cm fused-silica capillary, 50 μ m id; electrolyte solutions: pH 2.2, 60 mM sodium phosphate buffer; pH 3.0, 40 mM phosphate buffer; pH 3.8, 30 mM sodium aspartate buffer; 20 °C, 25 kV.

3.8, a pH between the pK_a values of the free form and the analyte-CD complexes, separation efficiency increases with increasing DM- β -CD concentrations and reaches a plateau. This can be explained by the weaker complexation at pH 3.8 as the protonation equilibrium is shifted to the zwitterionic (neutral) form. Moreover, it appears that mobilities of the Ala-Tyr-CD complexes differ to a larger extent at this pH compared with pH 2.2 due to a slightly enantioselective pK_a shift. It can be concluded from Eq. (11) that a higher pK_a

value of the complex of the DD-enantiomer leads to a higher complex mobility and consequently to an increased selectivity value.

Ala-Phe was studied in less detail as selectivity was determined only at two DM- β -CD concentrations. However, due to the similarity of the results at these CD concentrations and the fact that comparable complexation, mobility and dissociation parameters were determined (Table 1) it seems plausible that Ala-Phe exhibits similar migration

behavior as Ala-Tyr. The pH-dependent reversal of the enantiomer migration order of Ala-Phe can also be explained by the strong pK_a shift due to the large K_+/K_n ratio.

A pH-dependent reversal of the enantiomer migration order was not observed for Asp-PheOMe. Only a minor pK_a shift, a K_+/K_n ratio close to 1 and essentially identical μ_{HB-CD^+} values were found (Table 1). Thus, the stronger complexed DD-enantiomers migrate slower than the LL-enantiomers over the entire pH range studied. The impaired separation with increasing buffer pH (at pH 3.8 partial separation is only observed at a DM- β -CD concentration of 0.009 mol/L in the presence and absence of urea) can be attributed to the fact the difference between the mobilities μ_c and μ_f is smaller at a pH close to the pK_a values due to the higher pK_a of the analyte-CD complex. Moreover, the dissociation equilibrium is shifted towards the neutral forms of the analytes resulting in increased diffusion processes caused by the longer migration times. The general deteriorating effect of increasing CD concentrations on the separation regardless of the pH may also be explained by the essentially identical μ_{HB-CD^+} and $pK_{a/c}$ values for both enantiomers leading to virtually identical complex mobilities μ_c according to Eq. (11). As complexation, mobility and dissociation parameters comparable to Asp-PheOMe were determined for Glu-PheNH₂ (Table 1) it may be speculated that both peptides exhibit similar migration behavior although Glu-PheNH₂ was studied in less detail.

3.3 Effect of urea on separation efficiency

The effect of urea on enantioseparations of Ala-Tyr and Ala-Phe depended on the buffer pH and DM- β -CD concentration (Figs. 1 and 2). Urea improved selectivity at pH 2.2 while a deteriorating effect was noted at pH 3.8 at low CD concentrations. At high CD concentrations identical selectivities were observed. Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂ separations were impaired in the presence of urea at low CD concentrations while they improved at high CD concentrations and 2 M urea. This was observed over the entire pH range studied.

The effect of urea on the separation selectivity of Asp-PheOMe can be illustrated using mobility and complexation parameters. In order to obtain a clear picture, additional simplified assumptions were made because differences between the experimentally determined selectivities in Fig. 1 and those calculated from the parameters listed in Table 1 can be found. Small variations of the data, which still lie within their experimental error, will result in relatively large differences in selectivity values. One reason for these deviations is the fact that electrophoretic mobilities of singly analyzed enantiomers were used as the dependent parameter for curve fitting while selectivities were calculated from the ratio of the mobilities of the enantiomers analyzed simultaneously. Moreover, the parameters were derived using different buffer substances for pH adjustment. It has

been shown that buffer substances can affect analyte complexation by CDs [9, 28]. For example, Lin *et al.* observed considerably higher binding constants between γ -CD and phenothiazines in phosphate buffer, pH 3.0, compared with citrate buffer, pH 3.0 [28]. However, in order to cover the pH range of about 2–5 the use of different buffer substances cannot be avoided and the effect of buffer substances on analyte complexation cannot be implemented in the regression analysis for the determination of the complexation and mobility parameters. As discussed above, K_+/K_n ratios and subsequently the pK_a shift are not statistically different and can be set as equal. If one assumes that urea does not affect the stereoselectivity of complexation and mobility, the ratios of K_+ , K_n and μ_{HB-CD^+} of the enantiomers, *i.e.* $K_+(DD)/K_+(LL)$, $K_n(DD)/K_n(LL)$ and $\mu_{HB-CD^+}(DD)/\mu_{HB-CD^+}(LL)$, can be set as equal in the presence and absence of urea. Applying these side conditions a curve fitting was performed for both enantiomers in the presence and absence of urea. Slightly different complexation and mobility parameters are obtained, which lie within the experimental error of the experimental data listed in Table 1. The resulting selectivity-CD concentration plots at pH 2.2 and 3.0 calculated with these parameters according to Eq. (6) are shown in Fig. 3. The curves are in good agreement with the experimentally observed selectivities (Fig. 1). It should be noted that calculated selectivity values different from 1 may be obtained although no separation can be observed in the experiments so that $\mu_{eff/pH}$ values of the enantiomers appear to be identical. This is caused by diffusion processes resulting in peak broadening especially at elevated pH values and high CD concentrations when analytes migrate slowly.

Generally, the migration behavior of the Asp-PheOMe enantiomers at pH 2.2 and 3.0 is comparable. Addition of

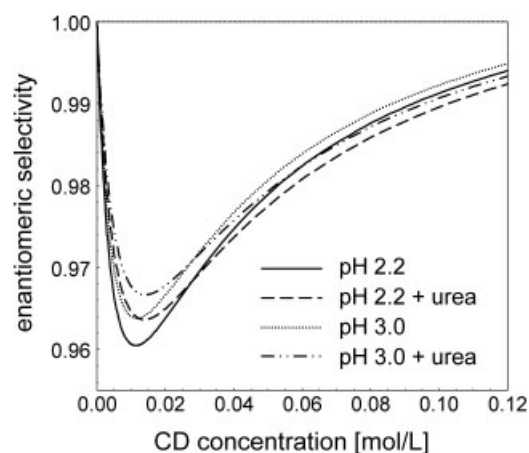


Figure 3. Modeling of the selectivities for Asp-PheOMe enantioseparations at pH 2.2 and 3.0 as a function of DM- β -CD concentration in the absence and presence of 2 M urea. For details see text. Continuous line, pH 2.2 in the absence of urea; dashed line, pH 2.2 in the presence of urea; dotted line, pH 3.0 in the absence of urea; dotted-dashed line, pH 3.0 in the presence of urea.

urea leads to a decreased mobility of the free analyte while complex mobilities increased. This results in a smaller difference between the mobilities of the species and subsequently in lower separation efficiency. The effect could only be observed at low CD concentrations due to the fact that urea also reduced the binding strength between DM- β -CD and the dipeptide enantiomers. As a result, the curvature of the selectivity-CD concentration function became flatter in the presence of urea compared with the absence of urea so that the respective curves intersect. Thus, below a certain CD concentration the separation is impaired in the presence of urea while it is improved at higher concentrations of DM- β -CD when urea is added. In general, urea appears to affect both enantiomers of Asp-PheOMe in the same way so that an unspecific effect on analyte complexation by DM- β -CD can be assumed.

In the case of Ala-Tyr, the effect of urea on separation selectivity is difficult to interpret due to the fact that the migration of the enantiomers is very sensitive to pH changes in contrast to Asp-PheOMe. This is due to the large complexation-induced pK_a shift found for Ala-Tyr so that small experimental errors in the adjustment of the buffer pH may translate into relatively large changes in selectivity. This makes a rationalization of the selectivity values shown in Fig. 1 based on the complexation and mobility data listed in Table 1 very speculative. It may be assumed that the pK_a shift caused by urea also affects the selectivity. Furthermore, urea appears to influence analyte complexation primarily in an unspecific manner as in the case of Asp-PheOMe although a stereoselective effect cannot be generally ruled out either.

4 Concluding remarks

The influence of urea on DM- β -CD-mediated separations of the D- and L-enantiomers of the dipeptides Ala-Tyr, Ala-Phe, Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂ was examined as a function of buffer pH and CD concentration. Generally, a concentration of 2 M urea in the background electrolyte led to a decrease in the affinity of DM- β -CD towards the analyte enantiomers as expressed by the complexation constants. In contrast, pK_a values of the free analytes and enantiomer-CD complexes shifted to higher values. Mobilities of the fully protonated free analytes μ_{HB^+} decreased while mobilities of the fully protonated complexes, μ_{HB,CD^+} , increased. These phenomena affected separation selectivity. Whether improved or impaired selectivity was observed depended on the pH of the background electrolyte and on the concentration of DM- β -CD. Urea appeared to affect analyte binding primarily in a non-stereoselective manner although such a stereospecific effect may not be generally ruled out depending on the analyte.

Urea did not affect the pH-dependent reversal of the enantiomer migration order observed earlier for Ala-Tyr and Ala-Phe [22, 23]. The reversal can be explained by a

complexation-induced pK_a shift resulting in higher mobilities of the analyte-CD complexes compared with the free analyte at increased pH values.

From the present data the effect of urea on CD-mediated enantioseparations cannot be predicted. Separation efficiency is determined by a combination of the complexation and mobility parameters of the analyte-selector pair. In the proximity of the pK_a value of analytes the protonation equilibrium of the free analyte as well as the analyte-selector complex has to be considered. As urea can affect all of these parameters and the direction of the effect cannot be predicted urea should not be considered an "indifferent" buffer additive. Thus, separation systems containing urea may possess different optimal conditions than systems without urea.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Wang, Z., Sun, Y., Sun, Z., *J. Chromatogr. A* 1996, **735**, 295–301.
- [2] Yoshinaga, M., Tanaka, M., *J. Chromatogr. A* 1995, **710**, 331–337.
- [3] Shibukawa, A., Lloyd, D. K., Wainer, I. W., *Chromatographia* 1993, **35**, 419–429.
- [4] Garcia-Ruiz, C., Martin-Biosca, Y., Crego, A. L., Marina, M. L., *J. Chromatogr. A* 2001, **910**, 157–164.
- [5] Garcia-Ruiz, C., Crego, A. L., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2003, **24**, 2657–2664.
- [6] Abu-Hamdiyyah, M., *J. Phys. Chem.* 1965, **69**, 2720–2725.
- [7] Lin, X., Hou, W., Zhu, C., *Anal. Sci.* 2003, **19**, 1509–1512.
- [8] Waibel, B., Schreiber, J., Meier, C., Hammitzsch, M., Baumann, K., Scriba, G. K. E., Holzgrabe, U., *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 2921–2930.
- [9] Hammitzsch-Wiedemann, M., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2007, **28**, 2619–2628.
- [10] Chankvetadze, B., Lindner, W., Scriba, G. K. E., *Anal. Chem.* 2004, **76**, 4256–4260.
- [11] Chankvetadze, B., Schulte, G., Bergenthal, D., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1998, **798**, 315–323.
- [12] Castronuovo, G., Elia, V., Niccoli, M., Velleca, F., *J. Incl. Phenom. Macromol.* 2003, **45**, 91–97.
- [13] Godínez, L. A., Patel, S., Criss, C. M., Kaifer, A. E., *J. Phys. Chem.* 1995, **99**, 17449–17455.
- [14] Godínez, L. A., Schwartz, L., Criss, C. M., Kaifer, A. E., *J. Phys. Chem. B* 1997, **101**, 3376–3380.
- [15] Shen, X., Belletête, M., Durocher, G., *Langmuir* 1997, **13**, 5830–5836.
- [16] Wang, F., Khaledi, M. G., *Anal. Chem.* 1996, **68**, 3460–3467.
- [17] De, A. L., Atta, A. K., *Can. J. Chem.* 1986, **64**, 1521–1526.
- [18] Pointud, Y., Gillet, H., Juillard, J., *Talanta* 1976, **23**, 741–742.

- [19] Talukdar, H., Rudra, S., Kundu, K. K., *Can. J. Chem.* 1989, 67, 315–320.
- [20] Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2006, 27, 222–230.
- [21] Kasicka, V., *Electrophoresis* 2008, 29, 179–206.
- [22] Sabah, S., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 2000, 894, 267–272.
- [23] Sabbah, S., Süß, F., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2001, 22, 3163–3170.
- [24] Li, J., Waldron, K. C., *Electrophoresis* 1999, 20, 171–179.
- [25] Bello, M. S., Rezzonico, R., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 1994, 659, 199–204.
- [26] Rizzi, A. M., Kremser, L., *Electrophoresis* 1999, 20, 2715–2722.
- [27] Rizzi, A.M., *Electrophoresis* 2001, 22, 3079–3106.
- [28] Lin, C.-E., Liao, W.-S., Chen, K.-H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3139–3146.

4.5 MANUSKRIFT 5

Development and validation of a robust capillary electrophoresis method for impurity profiling of etomidate including the determination of chiral purity using a dual cyclodextrin system

Manuela Hammitzsch, Ramiseti N. Rao, Gerhard K. E. Scriba, Electrophoresis 2006, 27, 4334-4344.

Manuela Hammitzsch¹
 Ramiseti N. Rao²
 Gerhard K. E. Scriba¹

¹University of Jena,
 School of Pharmacy,
 Department of Pharmaceutical
 and Medicinal Chemistry,
 Jena, Germany

²Indian Institute of Chemical
 Technology,
 Division of Analytical Chemistry,
 HPLC Group,
 Hyderabad, India

Received April 26, 2006

Revised June 16, 2006

Accepted June 16, 2006

Research Article

Development and validation of a robust capillary electrophoresis method for impurity profiling of etomidate including the determination of chiral purity using a dual cyclodextrin system

An enantioselective CE assay for the simultaneous determination of the enantiomeric purity and of related substances of etomidate has been developed and validated using a binary chiral selector system employing 30 mg/mL α -CD and 4.6 mg/mL sulfated- β -CD in a 150 mM potassium phosphate buffer, pH 2.1. The method was validated with respect to specificity, range, linearity, LOQ and LOD, precision and accuracy. The assay allowed the detection and determination of related substances including (S)-etomidate at the 0.05% w/w level, the reporting threshold as defined by the International Conference on Harmonisation guidelines as well as the European Pharmacopoeia. Robustness testing was carried out by an “Augmented Plackett–Burman” design. Quantitation of the compounds was performed by calibration graphs with respect to lidocaine hydrochloride as internal standard and by peak area normalization, the procedure usually applied by pharmacopoeias. Although data obtained from the calibration graphs constructed with the aid of the internal standard were more accurate based on compound recovery, peak area normalization may also be used without significant loss of accuracy and precision.

Keywords: Capillary electrophoresis / Cyclodextrin / Enantiomer separation / Etomidate / Impurity profiling
 DOI 10.1002/elps.200600257

1 Introduction

Etomidate (ethyl 1-[(1*R*)-1-phenylethyl]-1*H*-imidazole-5-carboxylate, Fig. 1) is used as an ultrashort acting hypnotic agent. The (S)-(-)-enantiomer lacks significant hypnotic activity [1]. Moreover, (R)-(+)-etomidate exhibited an about ten-fold higher potency in producing loss of the righting reflex in mice and tadpoles as well as a stronger interaction with the γ -aminobutyric acid_A (GABA_A) receptor compared to the (S)-enantiomer [2, 3].

The monograph “Etomidate” of the European Pharmacopoeia describes the (R)-(+)-enantiomer. As for many other chiral compounds, the optical purity is determined by

optical rotation which is known to be hampered by low sensitivity. In addition, enantiomeric impurities may contribute to the measured rotation values. Alternative methods for assaying stereochemical purity include enantioselective chromatography and CE. Especially, the latter technique has been shown to be quite powerful for enantioselective drug analysis with low consumption of substance and chiral selectors [4, 5]. In addition to many enantioseparations reported in the literature as reviewed, for example, in [6–12], stereoselective CE methods have been recently implemented into the pharmacopoeias. The United States Pharmacopoeia [13] determines the enantiomeric purity of ropivacaine hydrochloride by CE using heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -CD as chiral selector, while the European Pharmacopoeia [14] limits a diastereomer of levocabastine hydrochloride by CD-modified MEKC.

In addition to the determination of the stereochemical purity, CE also allows the simultaneous analysis of closely related compounds [6–9]. The test for related substances in the monograph Etomidate is performed by HPLC. Thus, the present study was conducted in order to

Correspondence: Professor Gerhard K. E. Scriba, School of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

E-mail: gerhard.scriba@uni-jena.de

Fax: +49-3641-949802

Abbreviations: HP- β -CD, hydroxypropyl- β -CD; S- β -CD, sulfated- β -CD

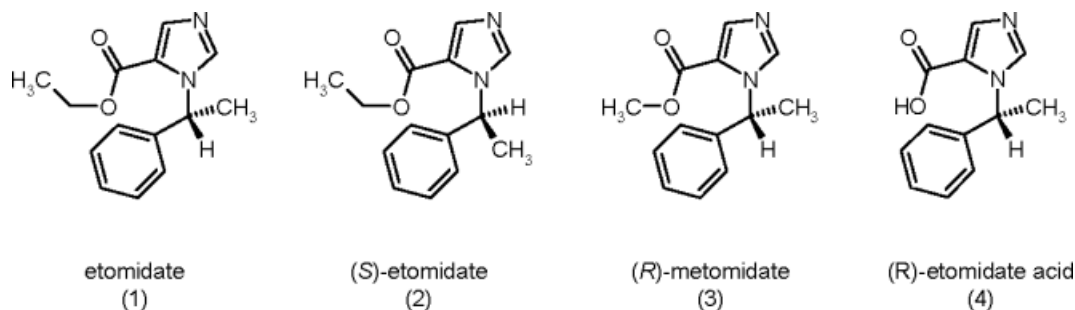


Figure 1. Structures of etomidate, (S)-etomidate, (R)-metomidate, and (R)-etomidate acid.

develop an assay which allows the simultaneous determination of the chiral purity of etomidate, as well as related compounds as specified in the monograph. The separation of the enantiomers of etomidate by CE has not been reported to date. However, the enantiomers of a closely related analog, metomidate, have been successfully resolved using native CDs as well as neutral and charged CD derivatives as chiral selectors in CE [15–17].

2 Materials and methods

2.1 Materials

Etomidate, the (S)-enantiomer and the racemic mixture of etomidate as well as metomidate hydrochloride were from Johnson & Johnson (Beerse, Belgium). Racemic etomidate acid was prepared by alkaline hydrolysis of metomidate hydrochloride. Lidocaine hydrochloride was from Caesar & Loretz (Hilden, Germany). α -CD was from CycloLab (Budapest, Hungary), β -CD was from Wacker-Chemie (Burghausen, Germany). Hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD) and sulfated- β -CD (S- β -CD) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and from Fluka (Buchs, Switzerland). All chemicals were of analytical grade. Buffers and sample solutions were prepared in double-distilled, deionized water, filtered (0.2 μ m), and degassed by sonication. Sample solutions were stored at -32°C .

2.2 CE

All experiments were performed on a Beckman P/ACE MDQ instrument (Beckman Coulter, Unterschleißheim, Germany) equipped with a diode array detector (DAD). The system was controlled by a 32 Karat Software Version 7.0 from Beckman. Measurements were performed using 50 μ m id, 360 μ m od fused-silica capillaries (Poly-

micro Technologies, Phoenix, AZ, USA) with an effective length of 40.0 cm and a total length of 50.2 cm. The detection wavelength was set at 200 nm with a bandwidth of 20 nm.

The optimized BGE consisted of a 150 mM potassium phosphate buffer, pH 2.1, containing 30 mg/mL α -CD and 4.6 mg/mL S- β -CD. The pH of the buffer was adjusted with 1 M potassium hydroxide before the addition of the CDs. Sample solutions of etomidate were prepared in 150 mM potassium phosphate buffer, pH 2.8, containing 20% ethanol. All solutions were injected with a pressure of 3.45 kPa (0.5 psi) for 3 s. Water was injected with 2.07 kPa (0.3 psi) for 2 s prior to sample injection. Lidocaine hydrochloride was used as internal standard at a concentration of 108 μ g/mL. Separations were performed with a voltage of 20 kV at 25°C .

New capillaries were flushed for 10 min with 1 M sodium hydroxide, for 1 min with water, for 20 min with 1 M hydrochloric acid, and for 10 min with water. As a daily initial rinsing procedure the capillary was rinsed for 5 min with ethanol, for 2 min with 0.1 M potassium hydroxide, and for 10 min with 0.1 M phosphoric acid before starting batch runs. Between the individual runs, the capillary was rinsed for 1 min with 0.1 M phosphoric acid and for 3 min with the BGE. When shutting the instrument down, the capillary was flushed for 10 min with water and for 10 min with air. Buffer vials were replaced after three runs. The peaks were manually integrated. Peak resolution was calculated according to the European Pharmacopoeia [14].

2.3 Modeling

Experimental design was performed using MODDE 7.0 from Umetrics (Umeå, Sweden). The matrix of the “Augmented Plackett–Burman” design was suggested by the software. After inspection of the respective histograms of the responses some were logarithmically transformed.

The data were fitted with the partial least squares (PLS) regression method. The selected design allows the description of the responses with a linear function [18]

$$y = a_0 + \sum_1^{p-1} a_i x_i \quad (1)$$

where y are the responses, a_0 is a constant, x_i are the factor levels, and a_i are the estimated coefficients of the factors i studied. The scaled and centered coefficients of the factors for each response were investigated. The 95% confidence intervals of significant coefficients exclude zero. The models were further evaluated by regression model significance tests and lack of fit tests based on ANOVA. The regression model significance test compares the variation of the responses which can be explained by the model with the variation which cannot be described by the model. The variances of significant models do not originate from the same distribution. The lack of fit test compares the model error with the replicate error. The respective variances should have the same distribution for an appropriate model. Robust responses have nonsignificant coefficients, fail the model significance test, and pass the lack of fit test.

3 Results and discussion

The European Pharmacopoeia lists as potential impurities of etomidate the corresponding methyl ester (metomidate), the isopropyl ester, the carboxylic acid (etomidate acid), and the (S)-enantiomer of etomidate [14]. Interestingly, except for (S)-etomidate all other impurities are listed as racemates although the published synthetic procedures involve either pathways starting from chiral precursors, or include a resolution step *via* diastereomer crystallization at the stage of the etomidate acid [19–21]. The isopropyl ester could not be included in the current study as the compound is not commercially available. The structures of etomidate and the impurities are shown in Fig. 1. For the sake of clarity, the following terminology will be used throughout the discussion: the term etomidate always refers to the (R)-enantiomer because the term is also used by the European Pharmacopoeia exclusively for the (R)-enantiomer. The enantiomer will be called "(S)-etomidate". In the case of metomidate and etomidate acid the absolute configuration of the compounds will be mentioned with the name.

The individual enantiomers of metomidate and etomidate acid were not available. Thus, identical migration order of the enantiomers of metomidate and etomidate was assumed, *i.e.*, (R)-metomidate migrated faster than (S)-metomidate. (R)-Etomidate acid was identified by alkaline hydrolysis of a sample of etomidate.

3.1 Method development

Etomidate and metomidate are weak bases, a pK_a value of 4.2 has been reported for etomidate [20]. Etomidate acid on the other hand is an amphoteric compound with an estimated pK_a of the carboxylic acid function of 2.3 [22]. Thus, a starting pH of 2.1 of the BGE was selected so that the etomidate acid still bears an overall positive charge and migrates toward the cathode. At this pH, the chemoselectivity of the system under achiral conditions was sufficient to achieve the separation of the compounds (Fig. 2A). Based on the published CE enantioseparations of metomidate [15–17], α -CD, β -CD and HP- β -CD were evaluated as chiral selectors. The native CDs and HP- β -CD were able to resolve the enantiomers of etomidate (Figs. 2B–D). The enantiomers of metomidate could not be resolved by α -CD as also reported for pH 3.0 BGEs [15, 16]. Interestingly, none of the CDs was able to resolve the enantiomers of etomidate acid. Variation of the CD concentrations did not significantly improve the separations.

Metomidate has been successfully resolved using negatively charged CDs [15, 16]. Subsequently, S- β -CD was employed as chiral selector. A concentration of 3 mg/mL S- β -CD in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 2.1, resulted in good resolution of the enantiomers, however, with strongly tailing peaks of the second migrating enantiomer of each compound which is stronger complexed as compared to the respective faster migrating (R)-configured enantiomer (Fig. 2E). The peak shape may be explained by a mismatch between analyte and selector concentration, the mobility of the free analyte, the selector and the analyte-selector complex in the sample zone, as well as other factors [23, 24]. Upon using high concentrations of S- β -CD (20 mg/mL) and reversing the polarity of the applied voltage, excellent enantioresolutions and separation of all individual compounds was achieved (Fig. 2F). However, when overloading the system by injecting concentrations of etomidate around 5 mg/mL, splitting of the peak of (R)-metomidate was observed. Moreover, at such high concentrations a non-linear absorbance-concentration relationship was observed for etomidate which does not allow the application of the normalization procedure to estimate the content of the impurities, a method usually applied by pharmacopoeias. This refers to the calculation of the concentration of a compound by determining the corrected peak area of a given peak as a percentage of the total corrected peak areas of all peaks. Thus, combinations of CDs were considered [25, 26]. As shown in Fig. 2, application of α -CD increased the resolution between metomidate and etomidate, while addition of S- β -CD to the run buffer resulted in high resolution of the individual

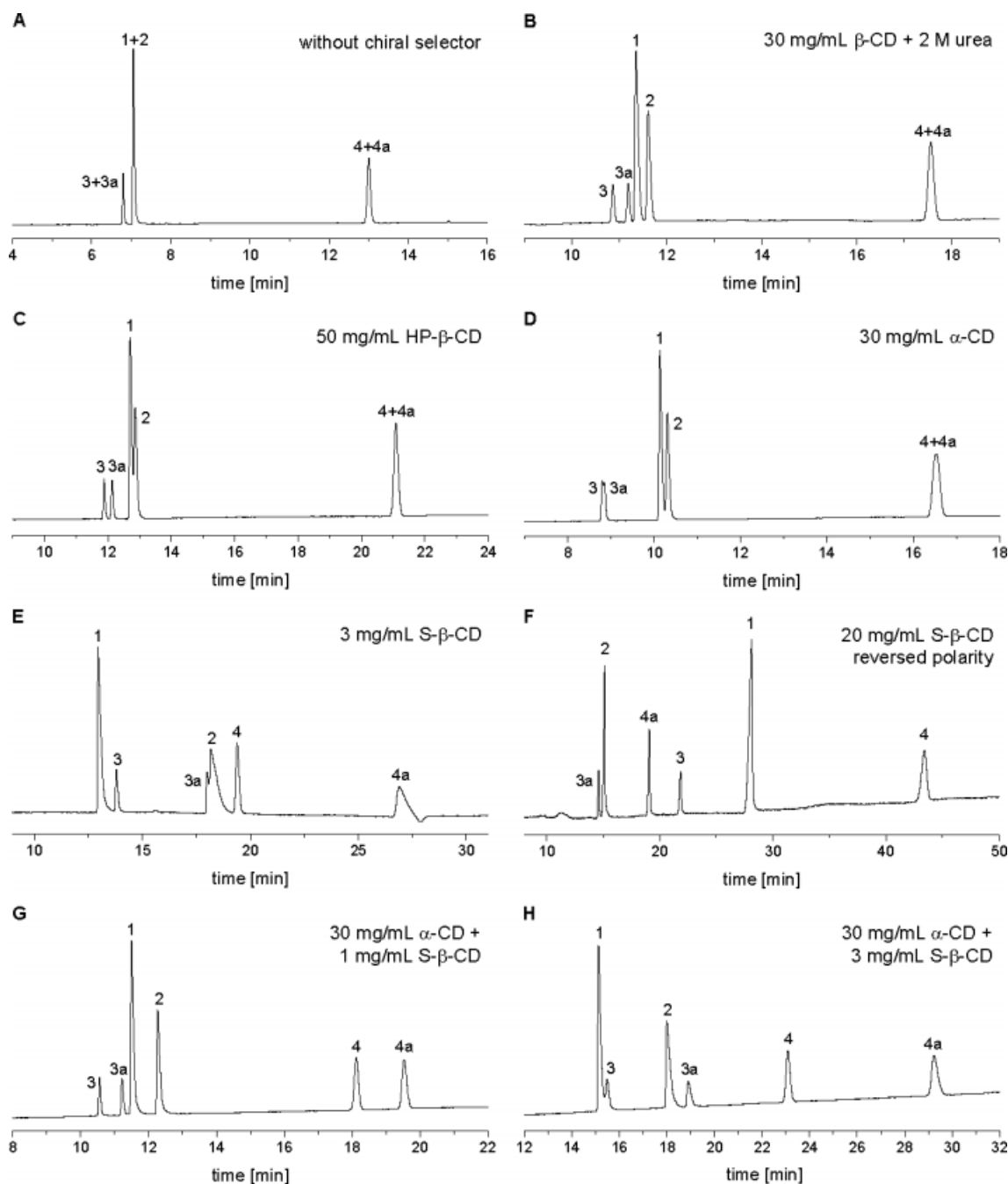


Figure 2. Representative electropherograms of CE analysis using CDs as chiral selectors. Experimental conditions: 50.2/40 cm fused-silica capillary, 100 mM sodium phosphate buffer, pH 2.1, 20°C, 20 kV, (A) without chiral selector, containing (B) 30 mg/mL β -CD and 2 M urea, (C) 50 mg/mL HP- β -CD, (D) 30 mg/mL α -CD, (E) 3 mg/mL S- β -CD, (F) 20 mg/mL S- β -CD (reversed polarity), (G) 30 mg/mL α -CD and 1 mg/mL S- β -CD, (H) 30 mg/mL α -CD and 3 mg/mL S- β -CD. Peak assignment: (1) etomidate; (2) (S)-etomidate; (3) (R)-metomidate; (3a) (S)-metomidate; (4) (R)-etomidate acid; (4a) (S)-etomidate acid.

enantiomers. The combination of α -CD and S- β -CD resulted in a complete separation of all analytes with reasonable peak symmetry (Fig. 2G). This CD combination

has to be optimized carefully, as the separation strongly depends on the concentration of the CDs as illustrated in Fig. 2H.

3.2 Method optimization

Method optimization was performed with a sample solution containing 5.4 mg/mL etomidate and 0.2% w/w of the impurities based on the etomidate concentration. Lidocaine hydrochloride was used as the internal standard at a relative concentration of 2.0% w/w. Etomidate displays low aqueous solubility and, due to the ester group, the compound is susceptible to hydrolysis. In order to obtain highly concentrated etomidate solutions, different mixtures of water with ACN, DMSO, and ethanol were studied. However, all solutions resulted either in the precipitation of etomidate in the capillary or in high background noise. Subsequently, buffer solutions were tested. A potassium phosphate buffer, pH 2.8, containing 20% v/v ethanol yielded good solubility and stability of etomidate, and was used for the preparation of the sample solutions.

For method optimization, the concentration of α -CD was set at 30 mg/mL as increasing or decreasing of the concentration did not result in significant improvement of the resolution. In contrast, at the fixed concentration of α -CD, the concentration of S- β -CD has to be carefully optimized because it influences the resolution between the main peaks of etomidate, (*R*)-metomidate, and (*S*)-etomidate. A concentration of 4.2 mg/mL S- β -CD resulted in good separation of (*R*)-metomidate and etomidate (Fig. 3A) but the peak of (*S*)-etomidate occasionally appeared on top of the tailing peak of etomidate. In addition, the peak of (*S*)-etomidate was relatively broad. Increasing the concentration of S- β -CD to 5.0 mg/mL improved peak shape of (*S*)-etomidate and resolution between the etomidate enantiomers, but at the cost of decreased resolution between etomidate and (*R*)-metomidate (Fig. 3B). A 150 mM potassium phosphate buffer, pH 2.1, as BGE resulted in stable currents and low background noise. Studying the influence of the voltage and separation temperature in the range of 15–25 kV and 15–25°C, respectively, revealed a slight decline in resolution and a reduction of analysis time with increasing temperature or voltage. As the impact of the two parameters did not significantly improve, the separation voltage was set to 20 kV and temperature to 25°C which resulted in a current of 87 μ A. The optimized separation system is shown in Fig. 3C. Although this system is generally able to separate etomidate from metomidate as well as the enantiomers of both compounds (Fig. 3D), injecting high concentrations of etomidate resulted in comigration of (*S*)-metomidate and etomidate. However, as (*S*)-metomidate is a very unlikely impurity based on the reported synthetic procedures [19–21], the comigration does not represent a significant drawback of the method.

Further overloading of the system by injecting higher concentrations of etomidate or increasing the injection time will also affect the separation. As illustrated in

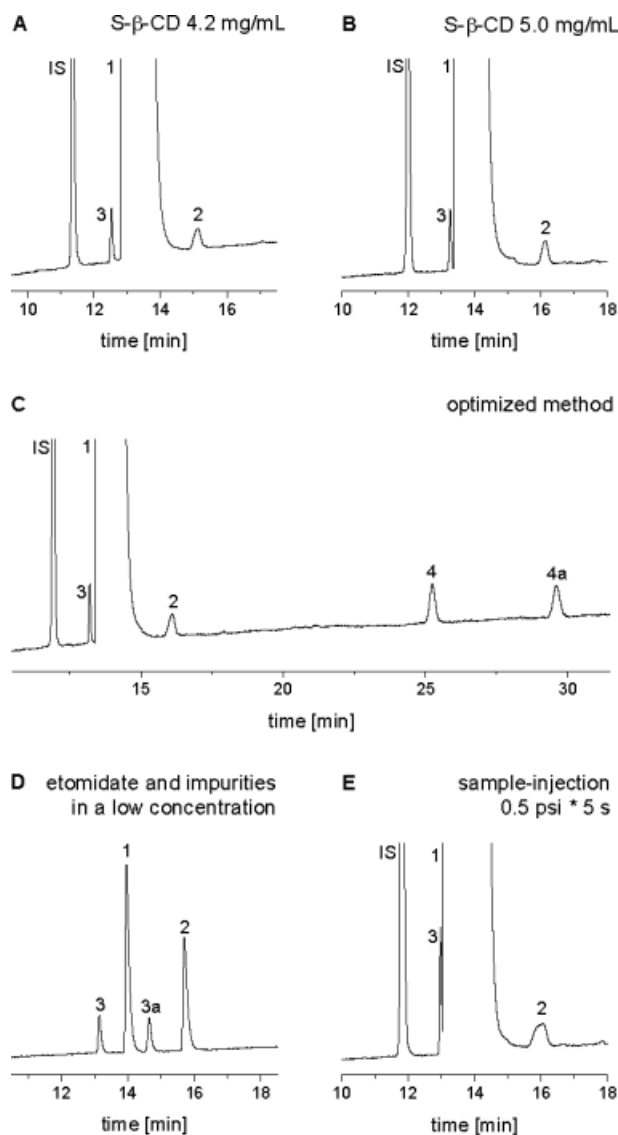


Figure 3. Influence of the composition of the CD mixture and injection time of the CE analysis of etomidate and related compounds. Experimental conditions: 50.2/40 cm fused-silica capillary, 150 mM potassium phosphate buffer, pH 2.1, containing 30 mg/mL α -CD and (A) 4.2 mg/mL S- β -CD, (B) 5.0 mg/mL S- β -CD, (C)–(E) 4.6 mg/mL S- β -CD. Sample concentration: (A)–(C), (E) 5.4 mg/mL etomidate spiked with 0.2% w/w of the impurities and 2.0% w/w lidocaine hydrochloride as internal standard; (D) etomidate and impurities at a concentration of 15–80 μ g/mL dissolved in water. Sample injection: 0.5 psi for (A)–(D) 3 s; (E) 5 s, before sample introduction injection of water 0.3 psi for 2 s. For peak assignment see Fig. 1.

Fig. 3E, increasing the injection time from 3 to 5 s resulted in a decrease in the resolution between (*R*)-metomidate and etomidate. Moreover, an extremely broad peak was observed for (*S*)-etomidate which leads to poor precision and LOD. Overall, the optimized method consisted of a

150 mM potassium phosphate buffer, pH 2.1, containing 30 mg/mL α -CD and 4.6 mg/mL S- β -CD as BGE. Separations were carried out at 25°C at an applied voltage of 20 kV.

3.3 Method validation

The optimized method was validated according to ICH guideline Q2B [27] with respect to specificity, linearity, range, LOD, LOQ, as well as precision, accuracy, and robustness for etomidate, (S)-etomidate, (R)-metomidate, and (R)-etomidate acid. Lidocaine hydrochloride was used as internal standard in order to compensate for injection errors and fluctuations of the migration time.

3.3.1 Specificity, range, linearity, LOD, and LOQ

With respect to specificity, all compounds are well separated except for (S)-metomidate which comigrates with etomidate under the experimental conditions applied (Fig. 3C). The impurities were calibrated in the presence of 5.4 mg/mL etomidate, using the corrected peak area ratio method. The range of the impurities was set at 3.24–12.96 μ g/mL corresponding to a relative content of 0.06–0.24% based on the concentration of etomidate of 5.4 mg/mL in the sample solutions. The European Pharmacopoeia limits each individual impurity at the 0.2% w/w level and the sum of impurities at 0.3% w/w [14]. The concentration of the internal standard lidocaine hydrochloride was 108 μ g/mL, which corresponds to a relative concentration of 2% w/w. Calibration curves were constructed from seven different concentrations, injecting each concentration three times. The calibration data are summarized in Table 1. Linearity of the graphs was further verified by inspecting the respective plots of residuals. The 95% confidence intervals of the y -intercept for all impurities include zero. Thus, the y -intercept is statistically insignificant and a single-point calibration is justifi-

fied. Moreover, it can be concluded that the hydrolytic degradation of etomidate to (R)-etomidate acid during the analysis is statistically not significant. Although the sample solutions were stored at -32°C , degradation might occur during the processes of sample preparation and measuring. The stability of the sample solutions is discussed in further detail below. Linearity of etomidate in the range of 1.08–6.48 mg/mL was verified by constructing a calibration curve from six concentrations injecting each three times (Table 1). Consequently, the prerequisite for peak area normalization according to the European Pharmacopoeia is fulfilled, and the presence of an internal standard is not necessarily required by pharmacopoeial standards. Response factors for all compounds were calculated by constructing regression lines with a y -intercept of zero from the corrected peak area ratios of the impurities referred to the corrected peak area of etomidate (Table 1).

The LODs and the LOQs of the impurities were determined using linear regression parameters based on the SD of the y -intercept. The data are summarized in Table 1. The LODs as well as the LOQs for all impurities fulfill the requirements of the ICH guideline Q3A, as they are below or at the reporting threshold of 0.05% w/w for compounds with a maximum daily dose of 2 grams *per day* [28]. 0.05% w/w also represents the disregard limit of the monograph Etomidate of the European Pharmacopoeia [14]. Figure 4 shows representative electropherograms of etomidate alone and of a sample of etomidate spiked with the impurities at the 0.05% w/w level.

3.3.2 Precision and accuracy

System precision, repeatability, and accuracy were investigated at the reporting threshold of 0.05% w/w, as well as at the specification limit of the monograph of 0.2% w/w. The respective concentrations based on the etomidate content are 2.7 and 10.8 μ g/mL. All solutions

Table 1. Calibration data: range, linearity, LOD, and LOQ

| Compound | Range % (μ g/mL) | Slope | y -Intercept | 95% confidence interval of the intercept | Correlation coefficient R | Relative residual SD (%) | Peak area normalization response factor (%) | LOD/LOQ (%) ^{a)} |
|----------|------------------------|-------|----------------|--|-----------------------------|--------------------------|---|---------------------------|
| 2 | 0.06–0.24 (3.24–12.96) | 0.452 | 0.001 | –0.004–0.006 | 0.9897 | 6.1 | 101.6 | 0.02/0.05 |
| 3 | 0.06–0.24 (3.24–12.96) | 0.484 | 0.001 | –0.002–0.004 | 0.9966 | 3.5 | 95.1 | 0.01/0.03 |
| 4 | 0.06–0.24 (3.24–12.96) | 0.474 | 0.005 | 0.000–0.010 | 0.9905 | 5.8 | 92.6 | 0.02/0.05 |
| 1 | 20.0–120.0 (1080–6480) | 0.451 | 1.313 | –0.076–2.702 | 0.9972 | 3.9 | – | – |

a) Based on the SD of the y -intercept.

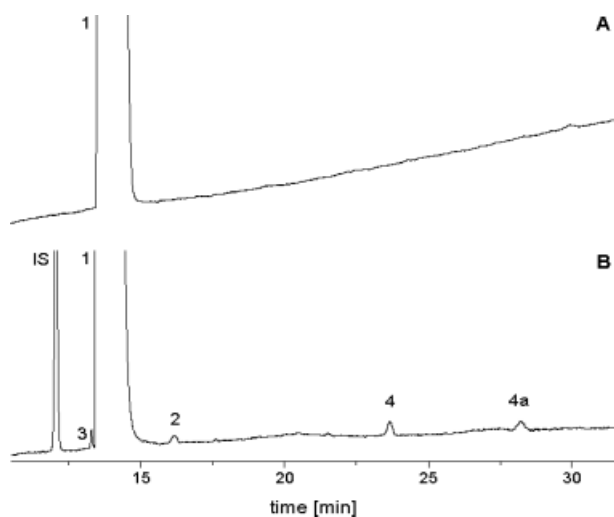


Figure 4. Representative electropherograms of 5.4 mg/mL etomidate (A) and a sample of 5.4 mg/mL etomidate spiked with 0.05% w/w of the impurities and 2.0% lidocaine hydrochloride (B). Experimental conditions: 50.2/40 cm fused-silica capillary, 150 mM sodium phosphate buffer, pH 2.1, containing 30 mg/mL α -CD and 4.6 mg/mL S- β -CD, 25°C, 20 kV. For peak assignment see Fig. 1.

were injected six times in a one day for three consecutive days. Fresh run buffer was prepared each day. Intraday precision is also referred to as system precision, as only

the impact of the instrument on the measurements is determined. Interday precision relates to repeatability as additionally the daily rinsing procedure and the preparation of the BGE influence the precision. Precision parameters are summarized in Table 2. The concentrations of the compounds were determined from the regression lines as well as by peak area normalization.

The RSDs for the total precision at the 0.05% w/w impurity level vary between 5.2 and 10.4%. This is still acceptable at the reporting threshold which corresponds to the LOQ for (S)-etomidate and (R)-metomidate. Because of the relatively high integration error, system precision mainly contributes to total precision at the 0.05% w/w impurity level. Precision improves at higher concentrations. At 0.2% w/w of the impurities the RSDs for the total precision range between 2.9 and 4.1%. There was no significant difference between the values when applying either regression lines or peak area normalization to calculate the concentration of the impurities.

Concentrations obtained by peak area normalization are slightly overestimated as compared to calculation from calibration graphs but are still acceptable (Table 2). The generally higher recovery at the 0.05% w/w level for (R)-etomidate acid of 108.4% (obtained by calibration graph) and 128.5% (peak area normalization), respectively, can be explained by partial hydrolysis of etomidate during

Table 2. Accuracy, system precision, and repeatability

| Impurity | Parameter | Mean value (%) | Recovery (%) | 95% confidence interval (%) | Total precision RSD (%) | System precision (intraday) RSD (%) | Repeatability (interday) RSD (%) |
|-------------|---|----------------|--------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 0.05% level | | | | | | | |
| 2 | Concentration – regression line | 0.050 | 99.9 | 0.046–0.054 | 10.1 | 9.2 | 4.2 |
| 3 | | 0.050 | 99.8 | 0.048–0.052 | 5.3 | 5.3 | 0.0 |
| 4 | | 0.054 | 108.4 | 0.050–0.059 | 9.8 | 9.0 | 3.9 |
| 2 | Concentration – peak area normalization | 0.055 | 108.9 | 0.050–0.059 | 10.4 | 9.9 | 3.4 |
| 3 | | 0.054 | 108.3 | 0.052–0.057 | 5.2 | 5.2 | 0.0 |
| 4 | | 0.064 | 128.5 | 0.060–0.069 | 8.2 | 7.8 | 2.8 |
| 0.20% level | | | | | | | |
| 2 | Concentration – regression line | 0.207 | 103.5 | 0.201–0.213 | 3.2 | 3.2 | 0.0 |
| 3 | | 0.199 | 99.2 | 0.194–0.203 | 2.9 | 2.6 | 1.2 |
| 4 | | 0.201 | 100.6 | 0.194–0.208 | 4.1 | 3.1 | 2.7 |
| 2 | Concentration – peak area normalization | 0.213 | 106.5 | 0.208–0.218 | 2.9 | 2.6 | 1.2 |
| 3 | | 0.205 | 102.2 | 0.198–0.211 | 3.7 | 3.1 | 1.9 |
| 4 | | 0.206 | 102.9 | 0.199–0.212 | 3.6 | 3.0 | 2.1 |

sample preparation and the period of time in the CE instrument before injection. Linear regression graphs of (*R*)-etomidate acid displayed a *y*-intercept which is not statistically significantly different from zero, but has a tendency to be higher compared with the *y*-intercepts obtained for the other impurities (Table 1). Thus, somewhat higher concentrations can be expected when applying peak area normalization especially at low concentrations of (*R*)-etomidate acid. The value is still acceptable as the absolute error is 0.014% and, thus, relatively small. Furthermore, the recovery of 102.9% found at the specification limit of 0.2% w/w meets all acceptance criteria. At the 0.2% w/w level, the hydrolysis does not affect the concentrations of the acid.

Migration time precision was investigated for (*R*)-etomidate acid, as migration times fluctuate the most for compounds with longer migration times. Moreover, small differences in the pH of the BGE will influence the dissociation of the acid. The mean value for the migration time of (*R*)-etomidate acid was 27.1 min with an RSD of the total precision of 6.0%. The RSDs for system precision and repeatability were 4.1 and 4.4%, respectively.

3.3.4 Robustness

According to the ICH guideline Q2A, “robustness of an analytical procedure is a measure of its capacity to remain unaffected by small, but deliberate variations in method

parameters and provides an indication of its reliability during normal usage” [29]. Three different types of method parameters exist: basic, internal, and external parameters. The present robustness study is limited to investigate the influence of basic and internal parameters. External parameters, such as different laboratories, analysts, and instruments were not included in the study. The influence of different days was examined in the precision studies. The RSDs of the concentrations for interday precision do not exceed the acceptable value of 4.2%.

An experimental design, the Augmented Plackett–Burman was applied to study the influence of the internal parameters voltage, temperature, detection wavelength, concentration and pH of the buffer, concentrations of the chiral selectors, and the supplier of the S- β -CD. A “Plackett–Burman” design is an orthogonal two-level experimental design which can be used to fit linear models. It has the advantage of a low number of runs combined with a high precision, but in the case of curvature of the resulting graph it does not reveal the responsible factor [18]. “Augmented” refers to the fact that three central points were added in order to estimate the method repeatability. The design matrix with the factor settings is shown in Table 3. The experiments were run randomly with a sample solution of etomidate with a concentration of 5.4 mg/mL spiked with 0.2% w/w of the impurities. The selected responses were the concentrations of the impurities as determined by peak area normalization, the criti-

Table 3. Robustness testing using Augmented Plackett–Burman design

| Experiment | Run order | Voltage (kV) | Temperature (°C) | Detection wavelength (nm) | Buffer concentration (mmol/L) | Buffer pH | α -CD concentration | S- β -CD concentration | S- β -CD supplier ^{a)} |
|---------------|-----------|--------------|------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Factor levels | | 19–21 | 24–26 | 197–203 | 140–160 | 2.0–2.2 | 29–31 | 4.4–4.8 | 1; 2 |
| N1 | 13 | 21 | 24 | 203 | 140 | 2.0 | 29 | 4.8 | 2 |
| N2 | 2 | 21 | 26 | 197 | 160 | 2.0 | 29 | 4.4 | 2 |
| N3 | 7 | 19 | 26 | 203 | 140 | 2.2 | 29 | 4.4 | 1 |
| N4 | 12 | 21 | 24 | 203 | 160 | 2.0 | 31 | 4.4 | 1 |
| N5 | 6 | 21 | 26 | 197 | 160 | 2.2 | 29 | 4.8 | 1 |
| N6 | 14 | 21 | 26 | 203 | 140 | 2.2 | 31 | 4.4 | 2 |
| N7 | 3 | 19 | 26 | 203 | 160 | 2.0 | 31 | 4.8 | 1 |
| N8 | 4 | 19 | 24 | 203 | 160 | 2.2 | 29 | 4.8 | 2 |
| N9 | 10 | 19 | 24 | 197 | 160 | 2.2 | 31 | 4.4 | 2 |
| N10 | 5 | 21 | 24 | 197 | 140 | 2.2 | 31 | 4.8 | 1 |
| N11 | 9 | 19 | 26 | 197 | 140 | 2.0 | 31 | 4.8 | 2 |
| N12 | 11 | 19 | 24 | 197 | 140 | 2.0 | 29 | 4.4 | 1 |
| N13 | 1 | 20 | 25 | 200 | 150 | 2.1 | 30 | 4.6 | 1 |
| N14 | 15 | 20 | 25 | 200 | 150 | 2.1 | 30 | 4.6 | 1 |
| N15 | 8 | 20 | 25 | 200 | 150 | 2.1 | 30 | 4.6 | 1 |

a) 1: Aldrich Chemical, 2: Fluka.

cal resolutions between (*R*)-metomidate and etomidate and between the enantiomers of etomidate, as well the migration time of (*R*)-etomidate acid as a measure of analysis time. The results are summarized as replicate plots in Fig. 5. The resolutions between (*R*)-metomidate and etomidate ranged between 0 and 1.1. These numbers are somewhat misleading as baseline separations can be clearly observed in the electropherograms at values greater than 0.4 which is well below the generally accepted value of 1.5 for baseline separations. This is due to the fact that the integration software lists the migration time of a tailing peak at the maximum and not at the “middle” of the peak, and that the values were calculated between peaks with large concentration differences.

No resolution was observed when using 140 mM potassium phosphate buffer, pH 2.0, independent of the settings of the other parameters. In all other cases the peaks are sufficiently separated. All parameter settings led to an enantioseparation of the etomidate enantiomers with R_S values between 3.8 and 5.5. The migration time of (*R*)-etomidate acid showed strong fluctuations ranging from 21.5 to 32.0 min. The concentrations for the impurities differed slightly, the highest variations were observed for (*S*)-etomidate with relative concentrations between 0.20% w/w and 0.25% w/w. In the

cases when no separation between (*R*)-metomidate and etomidate was observed, (*R*)-metomidate concentrations were set to the average value of the other experiments so that all experimental settings could be included in the study.

Plotting the respective histograms of the data distribution of the responses revealed that logarithmic transformations were necessary for the resolutions between (*R*)-metomidate and etomidate as well as between the enantiomers of etomidate in order to enable regression analysis. Regression analysis was carried out with the PLS regression method. The scaled and centered coefficients of the factors for all responses were investigated. Figure 6 shows the plots of the coefficients of the response resolution between (*R*)-metomidate and etomidate as well as migration time of (*R*)-etomidate acid. Furthermore, ANOVA-based regression model significance tests and lack of fit tests were performed. Significant models were obtained for the resolution between (*R*)-metomidate and etomidate and for the migration time of (*R*)-etomidate acid. The regression models for all other responses were not significant because they did not pass the regression model significance tests and passed the lack of fit test. Therefore, it can be concluded that the responses for the concentrations of the impurities and for the resolutions

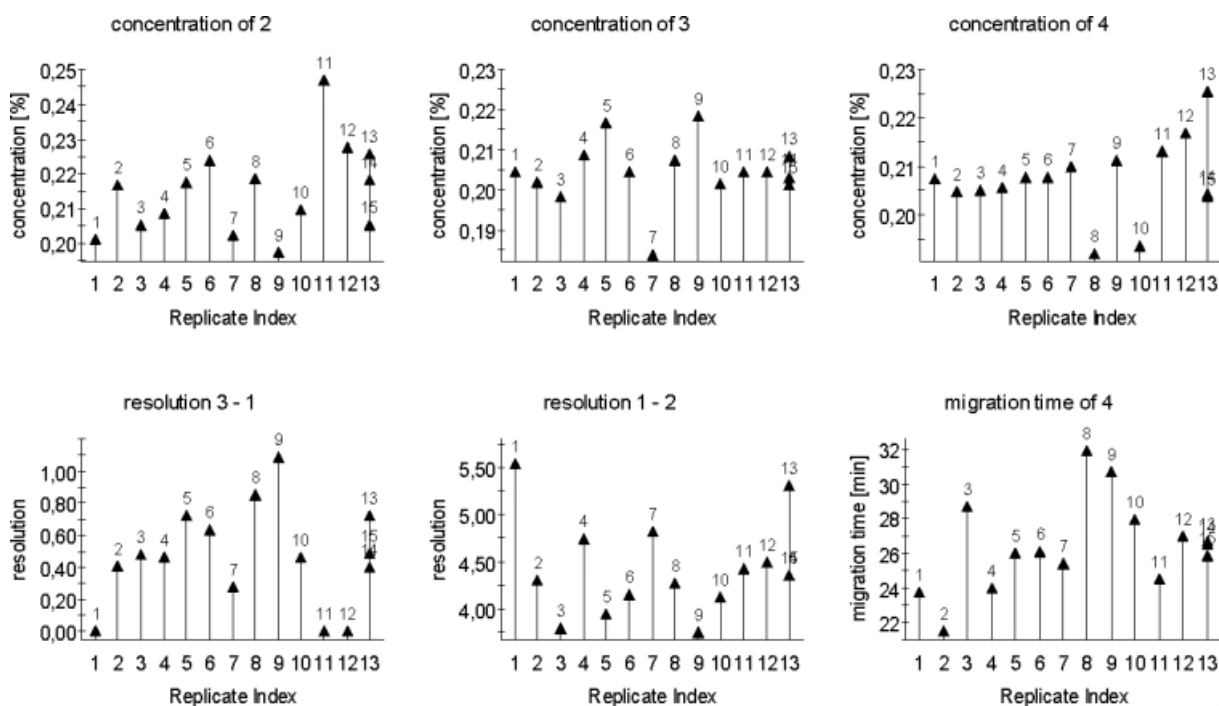


Figure 5. Replicate plots of the concentrations of (*S*)-etomidate, (*R*)-metomidate, and (*R*)-etomidate acid, for resolutions between (*R*)-metomidate and etomidate, as well as between etomidate and (*S*)-etomidate, and of the migration time of (*R*)-etomidate acid.

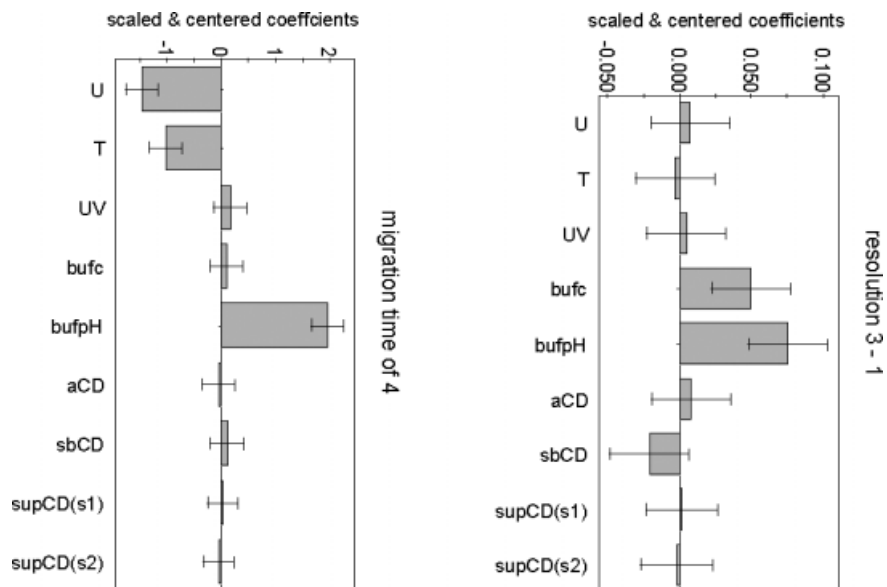


Figure 6. Scaled and centered coefficients of the logarithms of the resolution between (*R*)-metomidate and etomidate (top) and of the migration time of (*R*)-etomidate acid (bottom). The respective 95% confidence intervals are shown as error bars. Coefficients with 95% confidence intervals including zero are statistically insignificant. U, voltage; T, temperature; UV, detection wavelength; bufc, buffer concentration; bufpH, buffer pH; aCD, concentration of α -CD; sbCD, concentration of S- β -CD; supCD(s1), supCD(s2), supplier of S- β -CD: Aldrich, Fluka.

between etomidate and the (*S*)-enantiomer are robust within the selected range. The resolution between (*R*)-metomidate and etomidate increased with the concentration and the pH of the run buffer. All other factors did not significantly influence the response. Because of the sensitivity of the resolution between (*R*)-metomidate and etomidate, the BGE should be prepared carefully. The analysis time expressed as the migration time of (*R*)-etomidate acid strongly depended on the applied voltage, the temperature and the pH of the run buffer. The latter affects the dissociation and, therefore, the overall charge of the compound.

Another basic parameter which may influence especially the relative concentration of (*R*)-etomidate acid is the hydrolysis of etomidate in aqueous solutions. Thus, the effect of storage of a freshly prepared solution of etomidate with a concentration of 5.4 mg/mL spiked with 0.2% w/w of the related substances at room temperature was investigated. The relative concentrations of the impurities over a time period of 48 h are summarized in Fig. 7. As expected, only the concentration of (*R*)-etomidate acid increased with time. After 48 h an absolute increase of 0.07% was noted. This corresponds to a relative increase in the (*R*)-etomidate acid concentration of about 35%. Consequently, fresh sample solutions of etomidate should be analyzed.

4 Concluding remarks

A CE method has been developed and validated for the determination of related substances of etomidate including the (*S*)-enantiomer. The assay is specific, allowing the

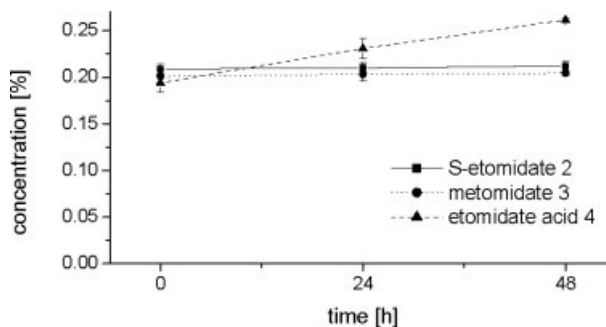


Figure 7. Concentration of impurities at the 0.2% w/w level in a sample solution of 5.4 mg/mL etomidate stored at room temperature. The results are the mean of six injections, the error bars represent the 95% confidence intervals.

quantitation of the impurities at least at the 0.05% w/w level relative to etomidate at a concentration of the test solution of 5.4 mg/mL. This is equivalent to the reporting threshold for related substances of the ICH guideline Q3A [28] as well as the European Pharmacopoeia [14]. The identification threshold of 0.1% w/w is also covered by the present method. Robustness testing by Augmented Plackett–Burman design revealed a specific sensitivity of the separation between etomidate and (*R*)-metomidate on the concentration and pH of the BGE. Moreover, as the content of (*R*)-etomidate acid increased due to ester hydrolysis of etomidate upon long standing times of the test solutions, analysis should be performed directly after preparation of the sample solution. With regard to impurity quantitation, the calculation of the concentrations from

calibration graphs was compared to peak area normalization. Although the values are more accurate when using the regression line parameters, peak area normalization still led to correct values. Peak area normalization is the usual procedure applied by pharmacopeias.

The monograph Etomidate of the European Pharmacopoeia limits related substances to 0.2% w/w. These concentrations can be easily determined by the CE method. The content of the (S)-enantiomer of etomidate is indirectly limited by optical rotation measurement which is not a very accurate method and requires relatively high amounts of sample. In contrast, CE allows the determination of the impurities including (S)-etomidate in a single analysis with low sample consumption. Overall, the assay demonstrates the general applicability of CE to determine the purity of compounds with respect to related substances including stereoisomers. Thus, CE should be considered more often when developing pharmacopoeial monographs.

The gift of etomidate, (S)-etomidate, and racemic etomidate by Dr. Jan Hoflack (Johnson & Johnson, Beerse, Belgium) and the gift of α -CD by Dr. Julianna Szemán (CycloLab, Budapest, Hungary) is gratefully acknowledged. The authors thank the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) for a Visiting Scientist stipend to Dr. R. Nageswara Rao.

5 References

- [1] Heykants, J. J. P., Meuldermans, W. E. G., Michiels, L. J. M., Lewi, P. J., Janssen, P. A. J., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1975, 216, 113–129.
- [2] Tomlin, S. L., Jenkins, A., Lieb, W. R., Franks, N. P., *Anesthesiology* 1998, 88, 708–717.
- [3] Belelli, D., Muntoni, A.-L., Merrywest, S. D., Gentet, L. J. et al., *Neuropharmacology* 2003, 45, 57–71.
- [4] Blomberg, L. G., Wan, H., *Electrophoresis* 2000, 21, 1940–1952.
- [5] Schmitt, U., Branch, S. K., Holzgrabe, U., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 959–974.
- [6] Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 2409–2421.
- [7] Scriba, G. K. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 373–399.
- [8] Altria, K. D., *Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis*, Vieweg, Braunschweig 1998.
- [9] Altria, K. D., Chen, A. B., Clohs, L., *LC-GC Eur.* 2001, 14, 736–744.
- [10] Altria, K. D., Elder, D., *J. Chromatogr. A* 2004, 1023, 1–14.
- [11] Ha, P. T. T., Hoogmartens, J., Van Schepdael, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1–11.
- [12] Gübitz, G., Schmid, M. G., *Electrophoresis* 2004, 25, 3981–3996.
- [13] *United States Pharmacopoeia 29*, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 2006.
- [14] *European Pharmacopoeia*, 5th Edn., Council of Europe, Strasbourg 2005.
- [15] Endresz, G., Chankvetadze, B., Bergenthal, D., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1996, 732, 133–142.
- [16] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 700, 43–49.
- [17] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *J. Capil. Electrophor.* 1995, 2, 235–240.
- [18] Goupy, J., *Anal. Chim. Acta* 2005, 544, 184–190.
- [19] Roevens, L. F. C., Heykants, J. J. P., Helsen, W. A. M., *Patent DE 2609573* 1976.
- [20] Chang, Z. L., Martin, J. B., in: Florey, K. (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, New York 1983, pp. 191–214, Vol. 12.
- [21] Knoll, G., Kazmirowski, H. G., Menzer, M., *Patent DD 215780* 1984.
- [22] Advanced Chemistry Development Inc./Chemsketch, Version 5.11, Canada 2002.
- [23] Fang, N., Ting, E., Chen, D. D. Y., *Anal. Chem.* 2004, 76, 1708–1714.
- [24] Fang, N., Chen, D. D. Y., *Anal. Chem.* 2006, 78, 1832–1840.
- [25] Fillet, M., Hubert, Ph., Crommen, J., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 123–134.
- [26] Matthijs, N., Van Hemelryck, S., Maftouh, M., Massart, D. L., Vander Heyden, Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, 525, 247–263.
- [27] Guideline Q2B, *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Conference on Harmonisation 1996, <http://www.ich.org>.
- [28] Guideline Q3A(R), *Impurities in New Drug Substances*, Conference on Harmonisation 2002, <http://www.ich.org>.
- [29] Guideline Q2A, *Text on Validation of Analytical Procedures*, International Conference on Harmonisation 1994, <http://www.ich.org>.

5 Gesamtdiskussion

5.1 MIGRATIONSPHÄNOMENE BEI DIPEPTIDEN IN DER CHIRALEN KAPILLARELEKTROPHORESE

5.1.1 Theoretische Betrachtungen zur Umkehr der Migrationsreihenfolge

Manuskript 1

5.1.1.1 Systematische Klassifizierung der Analyte entsprechend dem Trennverhalten

Die folgende systematische Klassifizierung zur Enantiomerentrennung schwacher Basen in Gegenwart eines neutralen CDs soll die Einordnung jeder Kombination aus Analyt und CD ermöglichen. Die sich dabei ergebenden Fälle charakterisieren jeweils das Trennverhalten über ein bestimmtes Trennmuster. Die Trennmuster unterscheiden sich in der Migrationsreihenfolge der Enantiomere in Abhängigkeit vom pH-Wert und/oder der Konzentration des chiralen Selektors. Zu jedem dieser Trennmuster können Werte mit einer definierten Konstellation von Gleichgewichtskonstanten und Mobilitätsparametern angegeben werden.

Mit Hilfe des Gleichgewichtsmodells von Vigh et al. [39] (Kap. 1.3.2) zur Beschreibung der Enantiomerentrennung schwacher Basen kann die Selektivität S entsprechend Gl. (19) in Abhängigkeit von pH-Wert und CD-Konzentration beschrieben werden. Beispiele zu den sich ergebenden dreidimensionalen Selektivitätsoberflächen sind in Abb. 3 dargestellt. Mathematisch können für Selektivitätsoberflächen Eckpunkte definiert werden, welche sich mit einer Kombination der Grenzwerte von $\text{pH} \rightarrow -\infty$ und $\text{pH} \rightarrow +\infty$ sowie $[\text{CD}] = 0$ und $[\text{CD}] \rightarrow +\infty$ darstellen lassen. Die diesen Eckpunkten entsprechende Selektivität kann ausschließlich über Mobilitäts- und Gleichgewichtsparameter beschrieben werden. Für eine bestimmte Migrationsreihenfolge mit $S < 1$, $S = 0$ bzw. $S > 1$ kann eine bestimmte Konstellation der Werte dieser Parameter definiert werden. In Abwesenheit eines CDs ($[\text{CD}] = 0$) kann keine Enantiomerentrennung erfolgen. Von Interesse ist aber die Migrationsreihenfolge bei einer minimal höheren Konzentration. Mit Hilfe von $\partial S / [\text{CD}]$ in $[\text{CD}] = 0$ kann eine Aussage dazu getroffen werden. Für $\partial S / [\text{CD}] < 0$ gilt $S < 1$, für $\partial S / [\text{CD}] = 0$ ist $S = 1$ und für $\partial S / [\text{CD}] > 0$ ergibt sich $S > 1$. In den Eckpunkten der Selektivitätsoberfläche ist die Selektivität bzw. $\partial S / [\text{CD}]$ definiert gemäß:

- bei $\text{pH} \rightarrow -\infty$ und $[\text{CD}] \rightarrow +\infty$

$$S = \frac{\mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+1}}{\mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+2}} \quad (34)$$

- bei $\text{pH} \rightarrow -\infty$ und $[\text{CD}] = 0$

$$\frac{\partial S}{\partial [\text{CD}]} = \frac{\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{+1} + K_{+2}) + \mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+1} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+2} \cdot K_{+2}}{\mu_{\text{HB}^+}} \quad (35)$$

- bei $\text{pH} \rightarrow +\infty$ und $[\text{CD}] \rightarrow +\infty$

$$S = \frac{\mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+1}}{\mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+2}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}} \quad (36)$$

- bei $\text{pH} \rightarrow +\infty$ und $[\text{CD}] = 0$

$$\frac{\partial S}{\partial [\text{CD}]} = \frac{\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+1} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+2} \cdot K_{+2}}{\mu_{\text{HB}^+}} \quad (37)$$

Bei einem konstanten pH-Wert bzw. einer gleichbleibenden CD-Konzentration kann sich die Migrationsreihenfolge eines Enantiomerenpaares jeweils nur einmal umkehren. Die entsprechenden Mobilitätskurven der beiden Enantiomere für einen definierten pH-Wert (Gl. (9)) und eine konstante CD-Konzentration (Gl.(20)) haben maximal einen Schnittpunkt (für die Mobilitätskurven bei einem definierten pH-Wert gilt dies für $[\text{CD}] \neq 0$). Demzufolge umgeben die Eckpunkte vier Bereiche, in denen die Migrationsreihenfolge eines Enantiomerenpaares unverändert bleibt. Der Dissoziations- und Komplexierungsgrad entspricht in den Eckpunkten jeweils einem Grenzwert. Da das Migrationsverhalten mit diesen beiden Parametern zusammenhängt, kann die Selektivitätsoberfläche dementsprechend eingeteilt werden. Bei einem pH-Wert deutlich unterhalb des pK_a -Wertes (mindestens 1 pH-Einheit) existiert der Analyt hauptsächlich in der protonierten Form. Dagegen liegen im pH-Bereich nahe dem pK_a -Wert die kationische sowie die neutrale Spezies nebeneinander vor. Praktisch nicht relevant ist der pH-Bereich weit oberhalb des pK_a -Wertes, da bei diesen pH-Werten fast ausschließlich Neutralteilchen existieren. Diese können mit einem neutralen Selektor nicht mehr getrennt werden. Zusätzlich kann für die protonierte sowie für die neutrale Form je nach CD-Konzentration ein unterschiedlicher Komplexierungsgrad beschrieben werden. Bei einer ausreichend hohen CD-Konzentration liegen beide Spezies hauptsächlich im Komplex gebunden, bei einer niedrigen hingegen existieren ungebundene Form sowie CD-Komplex nebeneinander. Zusammengefasst ergeben sich die folgenden vier Bereiche:

- pH-Wert deutlich unterhalb des pK_a -Wertes und hohe CD-Konzentration: vorwiegendes Vorkommen von $\text{HB}\cdot\text{CD}^+$ ($\text{pH} \ll \text{pK}_a$, $[\text{CD}] \uparrow$),

- pH-Wert deutlich unterhalb des pK_a -Wertes und niedrige CD-Konzentration: Vorkommen von HB^+ neben $HB \cdot CD^+$ ($pH \ll pK_a$, $[CD] \downarrow$),
- pH-Wert nahe dem pK_a -Wert und hohe CD-Konzentration: Vorkommen von $B \cdot CD$ neben $HB \cdot CD^+$ ($pH \approx pK_a$, $[CD] \uparrow$),
- pH-Wert nahe dem pK_a -Wert und niedrige CD-Konzentration: Vorkommen von B neben HB^+ sowie $B \cdot CD$ und $HB \cdot CD^+$ ($pH \approx pK_a$, $[CD] \downarrow$).

Die Grenzen dieser vier Bereiche sind fließend. Es gilt jeweils die Migrationsreihenfolge, die für den nahegelegenen Eckpunkt entsprechend der Gl. (34) - (37) definiert ist.

Tabelle 1: Systematische Klassifizierung für die Kombination von schwacher Base mit einem neutralen CD als chiralem Selektor. Systematik in Bezug auf die Migrationsreihenfolge in Abhängigkeit von pH-Wert und CD-Konzentration. Die Selektivität ist jeweils für die Eckpunkte der Selektivitätsoberfläche angegeben und wird mit Hilfe der Gl. (34)-(37) berechnet. Eine Umkehr der Migrationsreihenfolge ist mit + gekennzeichnet.

| Fall | Selektivität | | | | Umkehr der Migrationsreihenfolge | | | | |
|------|---|--|---|--|--|--|---|---|---|
| | $pH \ll pK_a$ $[CD] \uparrow$ S gemäß Gl. (34) | $pH \ll pK_a$ $[CD] \downarrow$ $\delta S/[CD]$ gemäß Gl. (35) | $pH \approx pK_a$ $[CD] \uparrow$ S gemäß Gl. (36) | $pH \approx pK_a$ $[CD] \downarrow$ $\delta S/[CD]$ gemäß Gl. (37) | pH- abhängig bei $[CD] \uparrow$ | pH- abhängig bei $[CD] \downarrow$ | [CD]- abhängig bei $pH \ll pK_a$ | [CD]- abhängig bei $pH \approx pK_a$ | |
| I | S = 1 | S = 1 | S < 1 | S < 1 | - | - | - | - | |
| II | | S < 1 | S < 1 | S = 1 | S ≤ 1 | - | - | - | - |
| III | | | | | S > 1 | - | + | - | - |
| IV | | | | S ≤ 1 | - | - | - | - | |
| V | | | | S > 1 | - | + | - | + | |
| VI | | | | S ≤ 1 | - | - | - | + | |
| VII | | | | S > 1 | - | + | - | - | |
| VIII | S < 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | - | - | - | - | |
| IX | | | | S > 1 | - | + | - | + | |
| X | | | S > 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | + | - | - | + |
| XI | | | | | S > 1 | + | + | - | - |
| XII | | S > 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | S ≤ 1 | - | + | + | - |
| XIII | | | | | S > 1 | - | - | + | + |
| XIV | | | S > 1 | S > 1 | S ≤ 1 | + | + | + | + |
| XV | | | | | S > 1 | + | - | + | - |

Systematisch kann eine Klassifizierung der Analyte in 15 Fälle erfolgen, wie in Tab. 1 dargestellt. Zu den vier pH-CD-Konzentrationsbereichen ist jeweils nur die Migrationsreihenfolge mit Hilfe der Selektivität angegeben. Die Beziehung der Bindungs- und Mobilitätsparameter, die dieser Selektivität entsprechen, ist jeweils den Gl. (34) - (37) zu entnehmen. Beispiele zu Werten der Modellparameter, die jeweils den Fällen I - XV zu zuordnen sind, sind in Tab. 2 zusammengefasst. In Abb. 3 sind zu diesen Beispielen die Selektivitätsoberflächen als Konturendiagramme dargestellt.

Jede Kombination aus Analyt und neutralem CD kann in diese Systematik eingeordnet werden. Dazu ist allerdings eine Untersuchung zum Trennverhalten im gesamten Konzentrations- und pH-Bereich notwendig. Ein Vorschlag zur Vorgehensweise ist im Kap. 5.1.1.3 dargestellt.

Wenn die Gleichgewichts- und Mobilitätsparameter bekannt sind, kann die gesamte Selektivitätsfläche berechnet werden. Jedoch korreliert die Selektivität nicht direkt mit der Auflösung, da u. a. auch Diffusionsprozesse eine Rolle spielen. Deshalb ist die Enantiomerentrennung separat zu betrachten.

Tabelle 2: Beispiele für die Modellparameter zu den Fällen I - XV. Weitere Parameter sind: $\mu_{\text{HB}^+} = 18,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ and $\text{pK}_a = 4,0$. Die pK_a -Werte der diastereomeren Komplexe $\text{pK}_{a/c}$ sind entsprechend Gl. (25) berechnet worden.

| Fall | $\mu_{\text{HB-CD}+1}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$] | $\mu_{\text{HB-CD}+2}$ [$10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$] | K_{+1} [l/mol] | K_{+2} [l/mol] | K_{n1} [l/mol] | K_{n2} [l/mol] | $\text{pK}_{a/c1}$ | $\text{pK}_{a/c2}$ |
|------|---|---|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| I | 8,0 | 8,0 | 175 | 175 | 190 | 160 | 3,96 | 4,04 |
| II | 8,0 | 8,0 | 190 | 160 | 171 | 144 | 4,05 | 4,05 |
| III | 8,0 | 8,0 | 190 | 160 | 19 | 16 | 5,00 | 5,00 |
| IV | 8,0 | 8,0 | 190 | 160 | 210 | 140 | 3,96 | 4,06 |
| V | 8,0 | 8,0 | 190 | 160 | 10,5 | 7 | 5,26 | 5,36 |
| VI | 8,0 | 8,0 | 190 | 160 | 1850 | 1650 | 3,01 | 2,99 |
| VII | 8,0 | 8,0 | 190 | 160 | 18 | 17 | 5,02 | 4,97 |
| VIII | 8,0 | 8,5 | 190 | 160 | 171 | 144 | 4,05 | 4,05 |
| IX | 8,0 | 8,5 | 190 | 195 | 1900 | 2025 | 3,00 | 2,98 |
| X | 8,0 | 8,5 | 190 | 160 | 1900 | 1800 | 3,00 | 2,95 |
| XI | 8,0 | 8,5 | 190 | 160 | 80 | 100 | 4,38 | 4,20 |
| XII | 8,0 | 8,5 | 160 | 190 | 16 | 19 | 5,00 | 5,00 |
| XIII | 8,0 | 8,5 | 160 | 190 | 144 | 171 | 4,05 | 4,05 |
| XIV | 8,0 | 8,5 | 160 | 190 | 14 | 21 | 5,06 | 4,96 |
| XV | 8,0 | 8,5 | 160 | 190 | 150 | 200 | 4,03 | 3,98 |

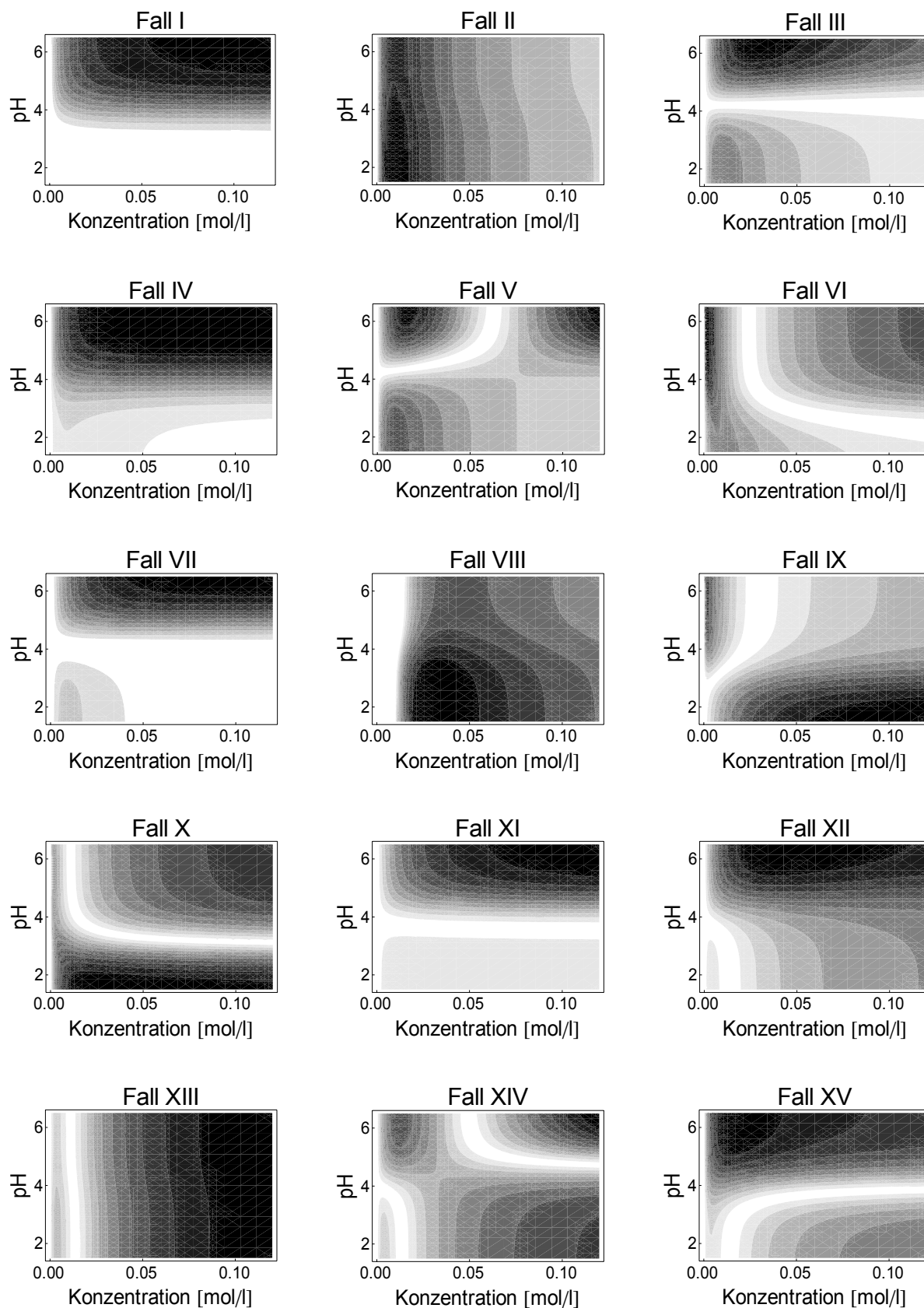


Abbildung 3: Konturendiagramme zu den Selektivitätsoberflächen in Abhängigkeit von pH-Wert und CD-Konzentration für die Fälle I - XV. Die Selektivität ist gemäß Gl. (19) mit Hilfe der Werte für die Modellparameter in Tab. 2 berechnet.

5.1.1.2 Mechanismen zur Umkehr der Migrationsreihenfolge

Anhand der Systematik kann gezeigt werden, dass das Verhältnis aller Gleichgewichts- und Mobilitätsparameter die Enantiomertrennung beeinflusst und zum Studium der Mechanismen betrachtet werden sollte. Die Herleitung der Mechanismen erfolgt mit Bezug auf die Eckpunkte und die umgebenden pH-CD-Konzentrationsbereiche. Im Manuskript 1 ist die mathematische Herleitung dargestellt. Im Folgenden werden die Mechanismen nur erklärt.

Es können drei verschiedene Mechanismen abgeleitet werden, die zu einer pH-abhängigen Umkehr der Migrationsreihenfolge führen. Eine Änderung der Migrationsreihenfolge kann basieren auf:

- (1) einer Veränderung des Verhältnisses der pH-abhängigen Komplexmobilitäten (μ_{c1}/μ_{c2}) aufgrund einer auf der CD-Komplexierung basierenden, enantioselektiven pK_a -Wert-Verschiebung,
- (2) einer entgegengesetzten chiralen Erkennung für die protonierte sowie für die neutrale Form (K_{+1}/K_{+2} versus K_{n1}/K_{n2}),
- (3) einer deutlichen durch die CD-Komplexierung verursachten pK_a -Wert-Verschiebung in Richtung eines höheren pK_a -Wertes, welche auch nicht enantioselektiv sein kann, sodass daraus eine Umkehr des Vorzeichens der Differenz der Mobilitäten $\mu_f - \mu_c$ resultiert.

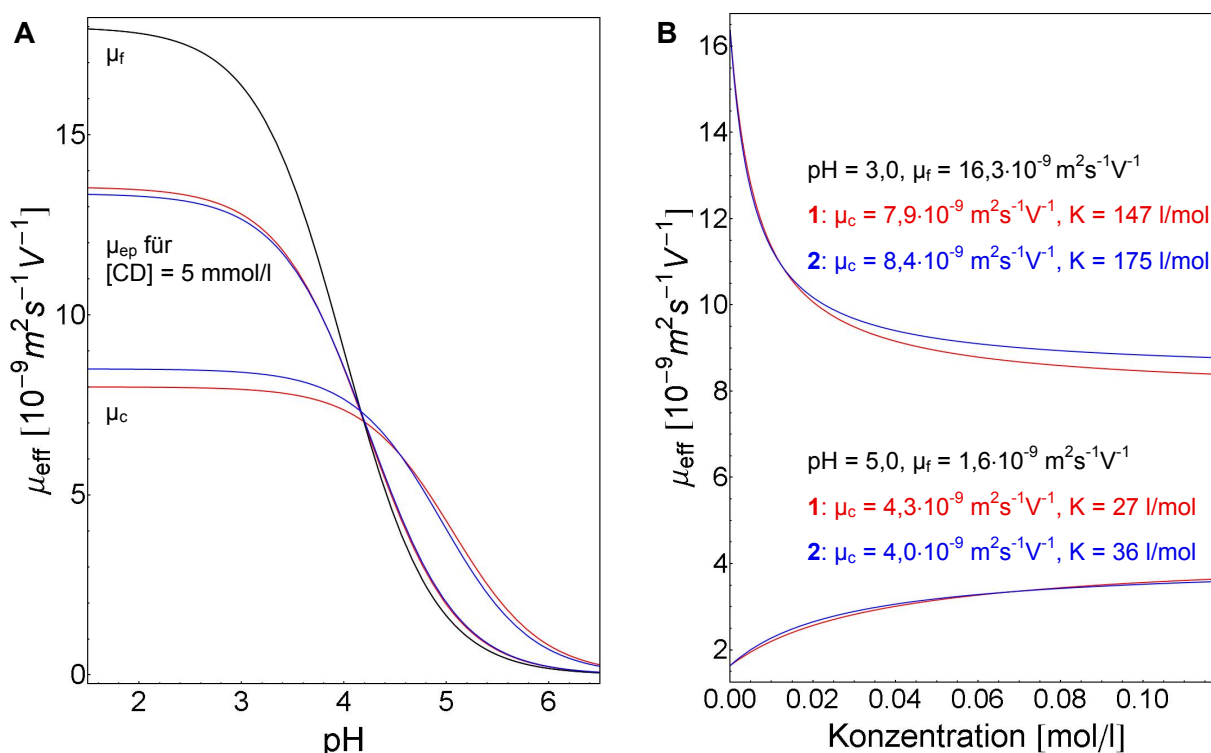


Abbildung 4: Elektrophoretische Mobilitäten als Funktion (A) des pH-Wertes und (B) der CD-Konzentration für die Enantiomere 1 (rot) and 2 (blau) zum Fall XIV. Die Werte der Parameter sind: $\mu_{HB^+} = 18,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $\mu_{HB \cdot CD^+1} = 8,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $\mu_{HB \cdot CD^+2} = 8,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, $K_{+1} = 160 \text{ l/mol}$, $K_{+2} = 190 \text{ l/mol}$, $K_{n1} = 14 \text{ l/mol}$, $K_{n2} = 21 \text{ l/mol}$, $pK_{a/c1} = 5,06$, $pK_{a/c2} = 4,96$.

Eine Umkehr in Abhängigkeit von der CD-Konzentration kann dabei als zusätzliches Phänomen beobachtet werden, ist aber immer im Zusammenhang mit der pH-Abhängigkeit der Migrationsreihenfolge zu sehen.

- (4) Diese konzentrationsabhängige Änderung der Migrationsreihenfolge resultiert aus dem entgegengesetzten Einfluss von Bindungskonstanten und Komplexmobilitäten auf diese.

Am Beispiel von Fall XIV sollen die Mechanismen zur Umkehr der Migrationsreihenfolge erläutert werden. Die elektrophoretische Mobilität als Funktion des pH-Wertes sowie der CD-Konzentration ist in Abb. 4 dargestellt.

(1) Deutlich unterhalb des pK_a -Wertes in Gegenwart einer hohen CD-Konzentration liegen beide Enantiomere nahezu vollständig als protonierte Komplexe vor. Die Migrationsreihenfolge wird in diesem Bereich durch die Komplexmobilitäten μ_{HB-CD^+} der beiden Enantiomere bestimmt (Gl. (24)).

Bei einem höheren pH-Wert nahe dem pK_a -Wert der Base wird die Komplexmobilität zusätzlich durch das Dissoziationsverhältnis des Komplexes beeinflusst (Gl. (24)). Der pK_a -Wert des diastereomeren CD-Komplexes $pK_{a/c}$ kann sich für beide Enantiomere unterscheiden (Gl. (25)). Dieser ist vom Quotienten der Bindungskonstanten der protonierten und neutralen Form des Komplexes abhängig. Ist für ein Enantiomer die kationische Spezies vergleichsweise stärker komplexiert, so ist das Dissoziationsgleichgewicht des Komplexes für dieses Stereoisomer stärker zur protonierten Form verschoben, was heißt, dass dieses Enantiomer einen relativ höheren $pK_{a/c}$ -Wert hat. Enantioselektive $pK_{a/c}$ -Werte ergeben sich also aus einem unterschiedlichen Verhältnis der jeweiligen Bindungskonstanten K_+/K_n . Da nur die protonierte Form eine eigene elektrophoretische Mobilität aufweist, hat demnach das Enantiomer mit dem höheren $pK_{a/c}$ -Wert auch die höhere Komplexmobilität μ_c . Dabei wird vorausgesetzt, dass die Komplexmobilitäten der vollständig protonierten Spezies μ_{HB-CD^+} für beide Stereoisomere gleich groß sind. Eine pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge ergibt sich dann, wenn sich die Komplexmobilitäten der kationischen Formen μ_{HB-CD^+} unterscheiden und sich bei Erhöhung des pH-Wertes deren Verhältnis umkehrt. Dies ist möglich, wenn das Enantiomer mit der kleineren Mobilität μ_{HB-CD^+} einen signifikant höheren $pK_{a/c}$ -Wert aufweist.

Im Beispiel zu Fall XIV hat das Enantiomer 2 die höhere Komplexmobilität μ_{HB-CD^+} . Bei pH 3,0, einem pH-Wert 1 pH-Einheit unterhalb des pK_a -Wertes der Base bzw. 2 Einheiten unterhalb des pK_a -Wertes des Komplexes, bestimmen die Komplexmobilitäten μ_{HB-CD^+} die Migrationsreihenfolge und das Enantiomer 2 migriert bei einer hohen CD-Konzentration zuerst. Da der Quotient von K_+/K_n und somit der $pK_{a/c}$ -Wert für das Enantiomer 1 größer ist ($K_{+1}/K_{n1} = 11,4$ und $pK_{a/c1} = 5,06$ versus $K_{+2}/K_{n2} = 9,0$ and $pK_{a/c2} = 4,96$), hat dieses bei pH 5,0, einem pH-Wert nahe dem pK_a -Wert, die höhere Komplexmobilität und migriert im oberen Konzentrationsbereich vor dem Isomer 2.

Weiterhin kann aufgrund der mit der enantioselektiven pK_a -Wert-Verschiebung verbundenen pH-abhängigen Änderung des Verhältnisses der Bindungskonstanten sowie der Komplexmobilitäten die Migrations-reihenfolge bei verschiedenen pH-Werten gegensätzlich zum einen durch die Komplexbildungs-konstanten und zum anderen durch die Komplexmobilitäten determiniert werden. Enantioselektive pK_a -Werte und Komplexmobilitäten sind von Rizzi und Kremser [38] für dansylierte Aminosäuren in Gegenwart von HP- β -CD beschrieben worden. Ebenso wurde die Ursache dieser Enantioselektivität erklärt [47].

(2) Bei einer niedrigen CD-Konzentration ergibt sich zumeist die Migrationsreihenfolge aus dem Verhältnis der Bindungsgleichgewichte der beiden Enantiomere. Voraussetzung ist dabei, dass der Unterschied der Bindungskonstanten gegenüber der Differenz der Komplexmobilitäten ausreichend größer ist. Die Lage des Bindungsgleichgewichtes bestimmt, ob die resultierende Gesamtmobilität mehr der Mobilität der ungebundenen oder der komplexierten Form ähnelt (Gl. (9)). Für kationische Analyte in Gegenwart neutraler CDs ist normalerweise die Mobilität der ungebundenen Spezies größer als die Komplexmobilität, da der Komplex bei einer ähnlichen effektiven Ladung erheblich größer ist. Folglich wandert das schwächer gebundene Enantiomer vor dem stärker komplexierten. Vertauscht sich die relative Lage der Bindungsgleichgewichte beider Enantiomere mit dem pH-Wert, also kehrt sich die chirale Erkennung für die protonierte und neutrale Form um, so ändert sich die Migrationsreihenfolge. Dieser Mechanismus ist bekannt und wurde von Li und Waldron für die DD- und LL-Isomere von Ala-Phe und Leu-Phe bei Verwendung von β -CD beschrieben [48].

Die Umkehr der chiralen Erkennung ist mit einer ausgeprägten Enantioselektivität der für die Komplexe resultierenden pK_a -Werte verbunden, sodass die Änderung der Migrationsreihenfolge in den meisten Fällen auch bei Verwendung hoher CD-Konzentrationen bestehen bleibt. Jedoch ist es möglich, dass trotz der pH-abhängigen Umkehr der chiralen Erkennung die Migrationsreihenfolge erhalten bleibt. Wenn der Unterschied in den Bindungskonstanten relativ klein ist, wird auch im unteren Konzentrationsbereich des CDs die Migrationsreihenfolge durch die Komplexmobilitäten bestimmt.

(3) Ein weiterer Mechanismus, der zu einer pH-abhängigen Änderung der Migrationsreihenfolge bei Verwendung einer niedrigen CD-Konzentration führt, kann diskutiert werden. Das Vorzeichen der Differenz der Mobilitäten der ungebundenen und der komplexierten Form $\mu_f - \mu_c$ kann sich mit dem pH-Wert verändern. Wie bereits erwähnt wurde, ist normalerweise die Mobilität des Komplexes kleiner als die der ungebundenen Form. Ist aber der pK_a -Wert des CD-Komplexes im Vergleich zum pK_a -Wert der ungebundenen Base ausreichend weit zu einem höheren Wert verschoben, das heißt, dass die kationische Form der Base wesentlich affiner als die neutrale Spezies ist (Gl. (25)), so schneiden sich die beiden pH-abhängigen Kurven der Mobilitäten μ_f (Gl. (23)) und μ_c (Gl. (24)). Demzufolge ist bei einem pH-Wert oberhalb des Schnittpunktes die Komplexmobilität größer als die Mobilität der freien Form. Das schwächer gebundene Enantiomer wandert dann bei einem pH-Wert unterhalb des

Schnittpunktes zuerst, oberhalb des Schnittpunktes dagegen nach dem stärker komplexierten. Eine pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge kann also trotz einer gleichbleibenden chiralen Erkennung und nicht-enantioselektiver Komplexmobilitäten auftreten. Dieser Mechanismus wird erstmalig beschrieben.

Im Beispiel zu Fall XIV ist unterhalb des pK_a -Wertes, also beispielsweise bei pH 3,0, die Mobilität der ungebundenen Form größer als die des Komplexes. Das geringer affine Enantiomer 1 wandert bei einer geringen CD-Konzentration zuerst. Für beide Enantiomere ist die kationische Form wesentlich affiner als die neutrale und demzufolge ist der pK_a -Wert des Komplexes auch jeweils größer als der pK_a -Wert der ungebundenen Base ($K_+/K_n = 11,4$ und $pK_{a/c} = 5,06$ für Enantiomer 1 sowie $K_+/K_n = 9,0$ und $pK_{a/c} = 4,96$ versus $pK_a = 4,0$). Daher ergibt sich bei pH 5,0, dass die Komplexmobilität jeweils größer als die Mobilität der ungebundenen Spezies ist. Das stärker gebundene Enantiomer 2 migriert vor dem Isomer 1.

(4) Eine Umkehr der Migrationsreihenfolge in Abhängigkeit von der CD-Konzentration resultiert immer aus dem entgegengesetzten Einfluss von Bindungskonstanten und Komplexmobilitäten auf das Migrationsverhalten [38, 69]. Voraussetzung ist, dass der Unterschied zwischen den Bindungskonstanten hinreichend groß ist, sodass die Lage der Bindungsgleichgewichte und nicht das Verhältnis der Komplexmobilitäten die Migrationsreihenfolge bei einer geringen CD-Konzentration vorgeben (Gl. (9)).

Bei einem niedrigen pH-Wert, wenn ungebundene sowie komplexierte Form nahezu komplett als Kationen vorliegen, gilt immer $\mu_f > \mu_c$. Eine Änderung der Migrationsreihenfolge kann also dann zustande kommen, wenn das stärker gebundene Isomer die höhere Komplexmobilität aufweist. Bei einer hohen CD-Konzentration migriert dieses folglich zuerst, bei einer niedrigen hingegen als letztes.

Im Beispiel ist bei pH 3,0 die Komplexmobilität kleiner als die der ungebundenen Form. Im unteren Konzentrationsbereich des CDs migriert das geringer affine Stereoisomer 1 zuerst, im Gegensatz dazu wandert bei einer hohen CD-Konzentration das Enantiomer 2 mit der größeren Komplexmobilität vor dem Isomer 1.

Bei einem höheren pH-Wert kann aufgrund einer auf der CD-Komplexierung basierenden pK_a -Wert-Verschiebung das Verhältnis der Mobilitäten mit $\mu_f < \mu_c$ vertauscht sein. In diesem Fall ist eine konzentrationsabhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge dann möglich, wenn das schwächer komplexierte Isomer die größere Komplexmobilität aufweist. Dieses ist dann im oberen Konzentrationsbereich des CDs das schneller migrierende Enantiomer und bei einer niedrigen CD-Konzentration das langsamere.

Basierend auf der pK_a -Wert-Verschiebung ist im angegebenen Beispiel bei pH 5,0 die Komplexmobilität größer als die der freien Spezies. Im unteren Konzentrationsbereich wandert das

stärker gebundene Enantiomer 2 zuerst. Im Gegensatz dazu migriert dieses bei einer hohen CD-Konzentration aufgrund der niedrigeren Komplexmobilität nach dem Stereoisomer 1.

5.1.1.3 Praktische Relevanz der theoretischen Ausführungen

Um das Trennpotential eines CDs für die Enantiomere eines dissoziierbaren Analyten abschätzen zu können, ist entsprechend der theoretischen Ausführungen zur Umkehr der Migrationsreihenfolge eine Untersuchung im gesamten pH- und Konzentrationsbereich erforderlich. Das bedeutet, dass die Trennung im pH-Bereich um den pK_a -Wert genau betrachtet werden sollte, was auch von Vigh et al. [39, 40] betont wurde. Außerdem sollte das CD in einer Konzentration verwendet werden, die zu einer vollständigen Komplexbildung des Analyten ausreichend ist. Aus diesem Grund sollte ein Screening so durchgeführt werden, dass gleichzeitig immer das Trennverhalten in Bezug auf die Selektivität bzw. die Auflösung sowie die Wanderungsgeschwindigkeit über die elektrophoretischen Mobilität charakterisiert werden. Die Bestimmung der elektrophoretischen Mobilitäten erfordert eine Korrektur des EOFs. Ein Vorschlag für ein systematisches Screening zur Charakterisierung der Enantiomerentrennung einer schwachen Base in Gegenwart eines neutralen CDs ist im Folgenden dargestellt.

(1) Der pK_a -Wert der Base wird mit Hilfe eines Computerprogrammes [96] bzw. durch Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität bei verschiedenen pH-Werten entsprechend Gl. (23) abgeschätzt.

(2) Die Abhängigkeit der Trennung von der CD-Konzentration wird bei einem pH-Wert mindestens 1 - 2 pH-Einheiten unterhalb des pK_a -Wertes untersucht. Dabei sollte die maximale CD-Konzentration zur nahezu vollständigen Komplexbildung des Analyten ausreichend sein. Dies ist daran zu erkennen, dass bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration die Mobilität kaum beeinflusst wird. Die elektrophoretischen Mobilitäten μ_f und μ_c können jeweils anhand der elektrophoretischen Mobilitäten ohne Zusatz eines chiralen Selektors bzw. bei Verwendung der maximalen Konzentration abgeschätzt werden. Der Einfluss der Viskosität kann dabei außer Acht gelassen werden. Es existieren vier verschiedene Möglichkeiten für das Trennverhalten:

- keine Trennung im gesamten Konzentrationsbereich,
- konstante Migrationsreihenfolge mit Optimum der Trennung im unteren Konzentrationsbereich (auf enantioselektiven Bindungsgleichgewichten basierende Trennung),
- konstante Migrationsreihenfolge mit Optimum der Trennung bei einer maximalen CD-Konzentration (auf unterschiedlichen Komplexmobilitäten basierende Trennung),
- Umkehr der Migrationsreihenfolge mit zwei verschiedenen Maxima der Trennung im unteren Konzentrationsbereich (auf enantioselektiven Bindungsgleichgewichten basierende Trennung) bzw. bei einer maximalen CD-Konzentration (auf unterschiedlichen Komplexmobilitäten basierende Trennung).

(3) Für eine niedrige CD-Konzentration wird die pH-Abhängigkeit der Enantiomerentrennung im gesamten pH-Bereich um den pK_a -Wert analysiert. Es wird entweder diejenige CD-Konzentration gewählt, bei der das Maximum der Trennung bei dem bisher untersuchten pH-Wert zu beobachten war. Falls die Enantiomere im unteren Konzentrationsbereich komigrieren, wird die Konzentration betrachtet, bei welcher der Komplexierungsgrad des Analyten etwa 1/2 beträgt [47]. Bei dieser CD-Konzentration entspricht die elektrophoretische Mobilität dem Mittelwert von μ_f und μ_c .

(4) Für die maximale CD-Konzentration wird ebenfalls die Abhängigkeit des Trennverhaltens vom pH-Wert untersucht.

(5) Im Fall einer pH-abhängigen Umkehr der Migrationsreihenfolge oder bei einer Verbesserung der Trennung mit steigender CD-Konzentration, empfiehlt es sich zusätzlich die Konzentrationsabhängigkeit der Enantiomerentrennung bei einem pH-Wert im Bereich des pK_a -Wertes der Base zu charakterisieren. Wiederum sollte die maximale Konzentration so gewählt werden, dass der Analyt fast vollständig komplexiert ist.

Die Ergebnisse des Screening-Verfahrens können zur anschließenden Optimierung der Trennung verwendet werden. Ist die gewünschte Migrationsreihenfolge oder überhaupt erst eine Trennung bei einem höheren pH-Wert beobachtbar, dann ist aufgrund der langen Migrationszeit verbunden mit dem zunehmenden Einfluss von Diffusionsprozessen die Auflösung zumeist schlecht. In diesen Fällen besteht die Möglichkeit durch Modifikation des EOFs oder durch den Zusatz von geladenen CDs oder Tensiden, die als Carrier fungieren, eine Verbesserung der Trennung zu erreichen.

5.1.2 Die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge von Dipeptiden in Gegenwart neutraler Cyclodextrine

Manuskripte 1 - 4

Die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge bei der Enantiomerentrennung von Dipeptiden in Gegenwart neutraler CDs ist ein sehr interessantes Phänomen. Die Migrationsreihenfolge der DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr, Ala-Phe und Asp-PheOMe verändert sich in dem pH-Bereich 2,5 - 3,5 bei Verwendung von β -CD sowie DM- β -CD als chiralen Selektoren [60]. Verschiedene Studien wurden zur Aufklärung der Mechanismen durchgeführt [48, 72]. Jedoch wurde keine Beziehung zum Gleichgewichtsmodell von Vigh et al. [39] hergestellt, anhand dessen das Dissoziations- und Komplexierungsverhalten parallel betrachtet werden kann [72]. Eine Ausnahme davon bildet Ala-Phe zusammen mit β -CD [48]. Für dieses Dipeptid wurden zwar die pH-unabhängigen Komplexbildungskonstanten bestimmt, jedoch wurde keine Angabe zu den Mobilitätsparametern gemacht, die auch eine wichtige Rolle spielen.

Auf der Basis der theoretischen Studie (Kap. 5.1.1) sollte das Wissen zum Hintergrund der pH-abhängigen Änderung der Migrationsreihenfolge dieser Peptide bei Verwendung von β -CD sowie DM- β -CD erweitert werden. Zusätzlich zu den Dipeptiden, die eine Veränderung der Migrationsreihenfolge zeigen, wurden auch Peptide in die Studie integriert, bei denen diese konstant ist. Die Enantiomeren-trennung wurde über die Selektivität charakterisiert. Außerdem wurden die Parameter des Gleichgewichtsmodells bestimmt. Da im weiteren Verlauf (Kap. 5.1.3) der Einfluss von HS auf die Peptidtrennungen erörtert wird, ist jeweils eine Charakterisierung dieser ohne und mit Zusatz von 2 M HS vorgenommen worden. Diese Ergebnisse werden in Bezug auf die Migrationsreihenfolge diskutiert.

5.1.2.1 Die Abhängigkeit der Enantiomertrennung von pH-Wert und Cyclodextrin-Konzentration

Die Selektivität der Enantiomertrennung der Dipeptide ist im Folgenden als das Verhältnis der elektrophoretischen Mobilitäten μ_{epDD} / μ_{epLL} definiert. Die Werte sind in den Abb. 5 und 6 für den Zusatz von DM- β -CD bzw. β -CD zusammengefasst.

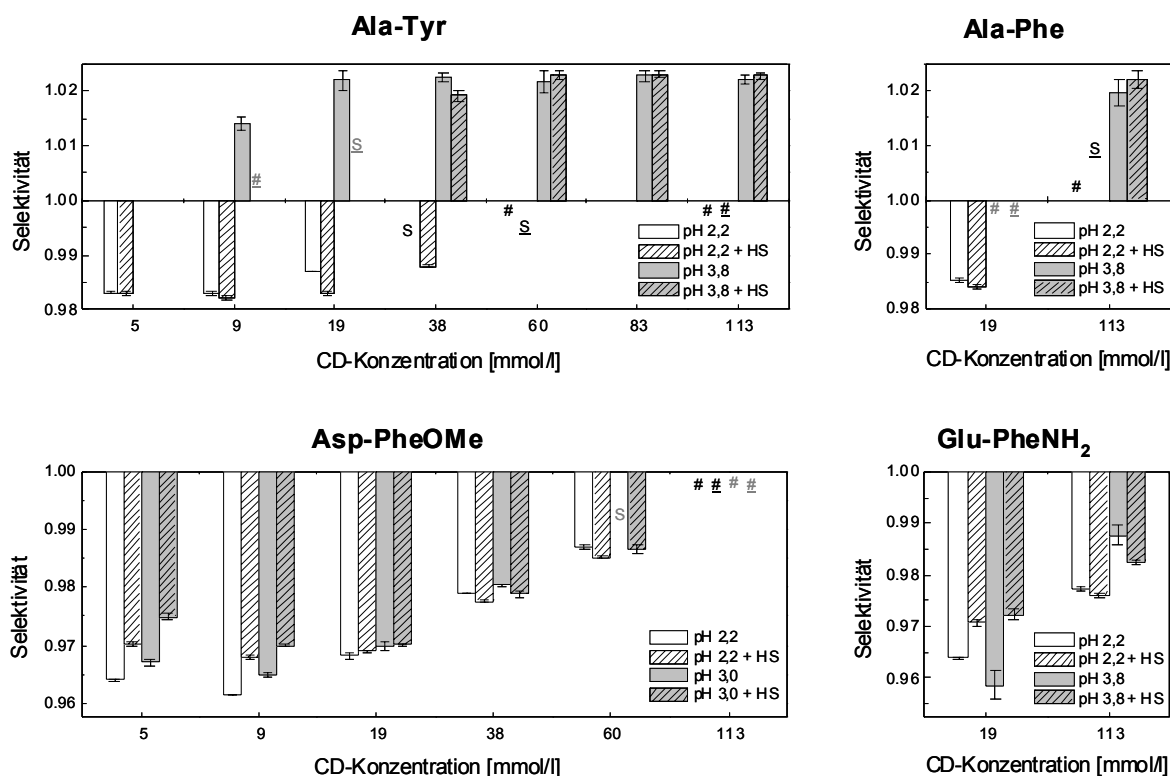


Abbildung 5: Selektivität der Enantiomertrennung der DD- und LL-Isomere von Ala-Tyr, Ala-Phe, Asp-PheOMe und GluPheNH₂ mit DM- β -CD als chiraalem Selektor, als Funktion der CD-Konzentration, ohne und mit Zusatz von 2 M HS, für pH 2,2 bzw. pH 3,0 in Phosphat-Puffer, für pH 3,8 in Aspartat-Puffer. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung für jeweils drei Messungen. S für Peak mit Schulter, # bei fehlender Trennung. (Die experimentellen Bedingungen sind im Manuskript 4 dargestellt.)

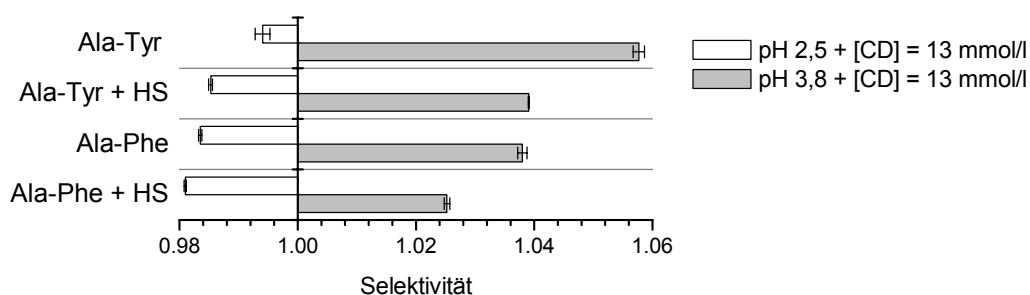


Abbildung 6: Selektivität der Enantiomerentrennung der DD- und LL-Isomere von Ala-Tyr und Ala-Phe mit β -CD als chiraalem Selektor, ohne und mit Zusatz von 2 M HS, für pH 2,5 bzw. pH 3,8 in Phosphat-Puffer. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung für jeweils drei Messungen. (Die experimentellen Bedingungen sind im Manuskript 3 beschrieben.)

Wie anhand der Selektivitätswerte zu erkennen ist, verändert sich die Migrationsreihenfolge der Enantiomere von Ala-Tyr sowie von Ala-Phe bei Erhöhung des pH-Wertes von 2,2 bzw. 2,5 auf 3,8 bei Verwendung von β -CD und DM- β -CD. Dies gilt für die Ab- und Anwesenheit von HS gleichermaßen. Dabei wandert bei pH 2,2 bzw. pH 2,5 das LL-Enantiomer zuerst, bei pH 3,8 dagegen das DD-Isomer.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Enantiomerentrennung wurde für DM- β -CD als chiralen Selektor untersucht. Bei pH 2,2 liegt für Ala-Tyr und Ala-Phe das Optimum der Trennung im unteren Konzentrationsbereich, eine Verschlechterung bzw. sogar eine Komigration ist bei relativ hohen DM- β -CD-Konzentrationen zu beobachten. Bei pH 3,8 dagegen verbessert sich die Selektivität mit zunehmender Konzentration. Für Ala-Tyr wurde gezeigt, dass oberhalb einer bestimmten Konzentration die Selektivität unverändert bleibt.

β -CD hat eine geringe Wasserlöslichkeit, sodass nur für hochaffine Analyte eine nahezu vollständige Komplexierung erreicht werden kann. Die bisherigen Studien zur Enantiomerentrennung der Dipeptide mit β -CD von Sabbah et al. [60, 72] sowie von Li und Waldron [48] wurden unter Verwendung von 2 M HS als Lösungsvermittler durchgeführt. Gemäß Sabbah et al. [72] ist das Trennverhalten von Ala-Tyr in Gegenwart von β -CD und HS analog dem von Ala-Tyr und Ala-Phe bei Verwendung von DM- β -CD zu beschreiben.

Bei der Trennung der DD- und LL-Isomere von Asp-PheOMe und Glu-PheNH₂ mit DM- β -CD bleibt die Migrationsreihenfolge im pH-Bereich 2,2 - 3,8 unverändert. Das LL-Isomer wandert stets vor dem DD-Enantiomer. Für beide Dipeptide ist eine geringere Trenneffizienz bei Erhöhung des pH-Wertes sowie der CD-Konzentration zu beobachten.

5.1.2.2 Mechanismen

Auf der Grundlage des Gleichgewichtsmodells von Vigh et al. [39] wurde die CD-Komplexierung der Dipeptide mit Hilfe der CE für β -CD wie auch DM- β -CD charakterisiert. Des Weiteren wurde für β -CD als chiralen Selektor eine kalorimetrische Bindungsstudie durchgeführt. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten zu β -CD war ein Zusatz von 2 M HS als Lösungsvermittler notwendig, da nur so eine ausreichend hohe CD-Konzentration vermessen werden konnte. Alle ermittelten Parameter beziehen sich auf die jeweiligen experimentellen Bedingungen und nicht auf den thermodynamischen Standardzustand.

Tabelle 3: pH-unabhängige Mobilitäts- und Gleichgewichtsparameter ermittelt durch nichtlineare Regression mit Hilfe von Gl. (18) zur Charakterisierung der Komplexbildung der Dipeptide mit DM- β -CD, ohne und mit einem Zusatz von 2 M HS. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Parameter. (Die experimentellen Bedingungen sind im Manuskript 4 dargestellt.)

| Analyt | 2 M HS | μ_{HB^+} [$10^{-9}\text{m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$] | $\mu_{\text{HB-CD}^+}$ [$10^{-9}\text{m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$] | K_+ [l/mol] | K_n [l/mol] | pK_a | $\text{pK}_{a/c}$ | $\frac{K_+}{K_n}$ | |
|------------------------|--------|--|---|------------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Ala-Tyr | DD | - | $15,88 \pm 0,07$ | $6,68 \pm 0,06$ | 165 ± 7 | $18,5 \pm 1,5$ | $3,12 \pm 0,01$ | $4,07 \pm 0,03$ | $9,0 \pm 0,6$ |
| | LL | - | | $6,55 \pm 0,06$ | 139 ± 6 | $15,0 \pm 1,5$ | | $4,08 \pm 0,03$ | $9,2 \pm 0,6$ |
| | DD | + | $15,38 \pm 0,10$ | $6,94 \pm 0,09$ | 121 ± 8 | $15,5 \pm 2,0$ | $3,25 \pm 0,01$ | $4,15 \pm 0,03$ | $7,8 \pm 0,6$ |
| | LL | + | | $6,85 \pm 0,10$ | 102 ± 7 | $12,5 \pm 1,5$ | | $4,16 \pm 0,04$ | $8,1 \pm 0,7$ |
| Ala-Phe | DD | - | $16,91 \pm 0,07$ | $5,89 \pm 0,08$ | 99 ± 4 | $9,0 \pm 1,0$ | $3,08 \pm 0,01$ | $4,11 \pm 0,04$ | $10,8 \pm 1,0$ |
| | LL | - | | $5,85 \pm 0,08$ | 93 ± 4 | $9,0 \pm 1,0$ | | $4,09 \pm 0,04$ | $10,2 \pm 0,9$ |
| | DD | + | $16,43 \pm 0,10$ | $6,23 \pm 0,10$ | 79 ± 4 | $9,0 \pm 1,0$ | $3,22 \pm 0,01$ | $4,16 \pm 0,04$ | $8,7 \pm 0,9$ |
| | LL | + | | $6,08 \pm 0,11$ | 69 ± 4 | $8,0 \pm 1,0$ | | $4,15 \pm 0,04$ | $8,4 \pm 0,9$ |
| Asp-PheOMe | DD | - | $15,66 \pm 0,08$ | $5,89 \pm 0,09$ | 141 ± 6 | 114 ± 7 | $2,99 \pm 0,01$ | $3,08 \pm 0,02$ | $1,23 \pm 0,06$ |
| | LL | - | | $5,84 \pm 0,10$ | 116 ± 5 | 94 ± 6 | | $3,08 \pm 0,02$ | $1,23 \pm 0,06$ |
| | DD | + | $15,17 \pm 0,12$ | $6,20 \pm 0,13$ | 110 ± 6 | 89 ± 7 | $3,16 \pm 0,01$ | $3,25 \pm 0,02$ | $1,24 \pm 0,07$ |
| | LL | + | | $6,07 \pm 0,14$ | 91 ± 5 | 71 ± 5 | | $3,26 \pm 0,02$ | $1,27 \pm 0,07$ |
| Glu-PheNH ₂ | DD | - | $14,98 \pm 0,06$ | $5,91 \pm 0,11$ | 54 ± 3 | 39 ± 3 | $3,81 \pm 0,01$ | $3,95 \pm 0,02$ | $1,38 \pm 0,08$ |
| | LL | - | | $5,88 \pm 0,13$ | 44 ± 2 | 34 ± 3 | | $3,92 \pm 0,02$ | $1,30 \pm 0,08$ |
| | DD | + | $14,45 \pm 0,05$ | $6,28 \pm 0,11$ | 41 ± 2 | 32 ± 2 | $4,01 \pm 0,01$ | $4,12 \pm 0,02$ | $1,26 \pm 0,06$ |
| | LL | + | | $6,24 \pm 0,12$ | 33 ± 2 | 27 ± 2 | | $4,10 \pm 0,02$ | $1,23 \pm 0,06$ |

Die Bestimmung der in den Tab. 3 und 4 dargestellten Mobilitätsparameter μ_{HB^+} , $\mu_{\text{HB-CD}^+}$, Komplexbildungskonstanten K_+ und K_n sowie der pK_a -Werte erfolgte über nichtlineare Regression unter Verwendung von Gl. (18). Dafür wurden die elektrophoretischen Mobilitäten beider Enantiomere separat bei verschiedenen CD-Konzentrationen (0 - 48 mmol/l β -CD bzw. 0 - 135 mmol/l DM- β -CD) und verschiedenen pH-Werten (pH 2,2 - 3,9 bei Zusatz von β -CD und 2 M HS bzw. pH 1,9 - 4,8 bei

Zusatz von DM- β -CD ohne HS, pH 2,2 - 5,0 bei Zusatz von DM- β -CD und 2 M HS) ohne und mit Zusatz von 2 M HS ermittelt.

Bei Verwendung von DM- β -CD als chiralem Selektor können Analogien im Bindungsverhalten für Ala-Tyr und Ala-Phe festgestellt werden. Ebenso verhalten sich Asp-PheOMe und Glu-PheNH₂ zueinander ähnlich. Auch der Zusatz von 2 M HS bewirkt keine Veränderung in dem Verhältnis der Parameter zueinander.

Bei allen vier Dipeptiden sind die Komplexmobilitäten der geladenen Spezies $\mu_{\text{HB-CD}^+}$ jeweils für die DD- und LL-Enantiomere gleich. Somit kann für pH 2,2, bei welchem die Dipeptide fast ausschließlich als Kationen vorliegen, die schlechter werdende Trennung bzw. die Komigration beider Isomere bei einer hohen CD-Konzentration erklärt werden. Die protonierte Form des DD-Enantiomers ist im Vergleich zum LL-Isomer bei allen vier Dipeptiden stärker komplexiert. Aus diesem Grund wandert bei pH 2,2 das DD-Isomer nach dem LL-Enantiomer. Analog weist die zwitterionische Form des DD-Enantiomers jeweils die höhere Komplexbildungskonstante auf. Insgesamt sind die neutralen Spezies jedoch schwächer als die protonierten Formen gebunden, wobei der Unterschied für die Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe erheblich größer ist. Daraus resultiert für alle Dipeptide eine durch die CD-Komplexierung verursachte pK_a-Wert-Verschiebung, welche nicht bzw. nur gering enantioselektiv ist.

Der pK_a-Wert des CD-Komplexes ist für die Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe soweit zu einem höheren Wert verschoben, dass sich das Verhältnis der Mobilitäten der freien Form und des Komplexes bei Erhöhung des pH-Wertes umkehrt. Damit kann dann die beobachtete Änderung der Migrationsreihenfolge bei pH 3,8 erklärt werden (Kap. 5.1.1.2, Mechanismus (3)). Wäre die pK_a-Wert-Verschiebung für beide Enantiomere nicht enantioselektiv, so sollten diese bei pH 3,8 und einer ausreichend hohen CD-Konzentration komigrieren. Jedoch ist im oberen Konzentrationsbereich für Ala-Tyr und Ala-Phe noch eine Trennung zu beobachten. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass das Dissoziationsgleichgewicht bei diesem pH-Wert zur neutralen Form verschoben ist, welche nur sehr schwach affin ist. Für Ala-Tyr beschreibt die Selektivität bei einer bestimmten Konzentration ein Plateau. Deshalb wird vermutet, dass eine geringe Enantioselektivität für die pK_a-Wert-Verschiebung mit einem leicht höheren pK_a-Wert für den Komplex des DD-Enantiomers besteht. Das Trennmuster der DD- und LL-Isomere von Ala-Tyr in Kombination mit β -CD kann jeweils in Ab- und Anwesenheit von 2 M HS dem Fall III zugeordnet werden. Aufgrund der möglicherweise geringen Enantioselektivität des pK_a-Wertes besteht eine Tendenz zu Fall VII. Ähnliches wird für Ala-Phe ohne und mit Zusatz von HS vermutet.

Für Asp-PheOMe und Glu-PheNH₂ ist der Unterschied zwischen den Komplexbildungskonstanten K₊ und K_n relativ gering, sodass bei einer Erhöhung des pH-Wertes nur eine leichte Abnahme der Differenz zwischen der Mobilität der ungebundenen Form und der des Komplexes zu verzeichnen ist. Daraus resultiert eine geringere Trenneffizienz mit steigendem pH-Wert, aber keine Umkehr der

Migrationsreihenfolge. Die Trennmuster von Asp-PheOMe und Glu-PheNH₂ lassen sich dem Fall II der Systematik zuordnen (Kap. 5.1.1.1).

Auch von Sabbah et al. [72] wurde über eine Bestimmung der pH-abhängigen Parameter für die Enantiomere von Ala-Tyr und Asp-PheOMe eine gleichbleibende chirale Erkennung bei Veränderung des pH-Wertes im Bereich 2,5 - 3,5 festgestellt. Die pH-abhängige Umkehr der Migrationsreihenfolge bei Ala-Tyr wurde auf einen entgegengesetzten Einfluss der Affinitätskonstanten bei pH 2,5 und der Komplexmobilitäten bei pH 3,5 zurückgeführt. Vor dem Hintergrund der systematischen Betrachtungen ist der Mechanismus neu zu interpretieren. Die von Sabbah et al. gefundene starke Abnahme der Bindungskonstanten mit Veränderung des pH-Wertes von 2,5 zu 3,5 kann dagegen bestätigt werden und ist als Ursache der Umkehr der Migrationsreihenfolge zu betrachten.

Tabelle 4: pH-unabhängige Mobilitäts- und Gleichgewichtsparameter bestimmt durch nichtlineare Regression mit Hilfe von Gl. (18) zur Charakterisierung der Komplexbildung der Dipeptide mit β -CD in Gegenwart von 2 M HS. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Parameter. (Die experimentellen Bedingungen sind im Manuskript 2 beschrieben.)

| Analyt | | μ_{HB^+} [$10^{-9}\text{m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$] | $\mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+}$ [$10^{-9}\text{m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$] | K_+ [l/mol] | K_n [l/mol] | pK_a | $\text{pK}_{a/c}$ | $\frac{K_+}{K_n}$ |
|------------|----|--|--|------------------|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
| Ala-Tyr | DD | $17,32 \pm 0,12$ | $8,62 \pm 0,30$ | 72 ± 7 | 37 ± 5 | $3,28 \pm 0,01$ | $3,56 \pm 0,03$ | $1,94 \pm 0,16$ |
| | LL | | $8,76 \pm 0,32$ | 64 ± 7 | 41 ± 6 | | $3,47 \pm 0,03$ | $1,55 \pm 0,12$ |
| Ala-Phe | DD | $17,93 \pm 0,13$ | $7,89 \pm 0,49$ | 42 ± 5 | 23 ± 4 | $3,26 \pm 0,01$ | $3,53 \pm 0,04$ | $1,85 \pm 0,19$ |
| | LL | | $7,56 \pm 0,60$ | 34 ± 4 | 22 ± 4 | | $3,45 \pm 0,04$ | $1,56 \pm 0,16$ |
| Asp-PheOMe | DD | $17,01 \pm 0,14$ | $8,46 \pm 0,28$ | 79 ± 7 | 81 ± 8 | $3,16 \pm 0,01$ | $3,15 \pm 0,02$ | $0,98 \pm 0,06$ |
| | LL | | $8,46 \pm 0,32$ | 63 ± 6 | 78 ± 8 | | $3,07 \pm 0,02$ | $0,81 \pm 0,06$ |

Das Komplexierungsverhalten in Gegenwart von β -CD wurde für die DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr, Ala-Phe sowie Asp-PheOMe in Gegenwart von 2 M HS analysiert. Analog Ala-Tyr und Ala-Phe ist auch für Asp-PheOMe entsprechend der Untersuchungen von Sabbah et al. [60, 72] eine Umkehr der Migrationsreihenfolge bei Veränderung des pH-Wertes im Bereich 2,5 - 3,5 zu beobachten. Bei pH 2,5 migriert L-Asp-L-PheOMe zuerst und bei pH 3,5 das DD-Enantiomer.

Die Komplexmobilitäten $\mu_{\text{HB}\cdot\text{CD}^+}$ der DD- und LL-Isomere sind unter Einbezug des Fehlers als gleich anzusehen. Dies ist in Einklang mit der von Sabbah et al. [72] beschriebenen Konzentrationsabhängigkeit der Enantiomerentrennung von Ala-Tyr und Asp-PheOMe. Es wurde jeweils bei pH 2,5, bei welchem der überwiegende Teil des Dipeptids protoniert vorliegt, eine Abnahme der Trenneffizienz mit steigender β -CD-Konzentration beobachtet. Für Ala-Tyr und Ala-Phe sind die protonierten Formen jeweils stärker als die neutralen Spezies gebunden. Im Gegensatz dazu sind bei Asp-PheOMe die Komplexbildungskonstanten für die kationische Form gleich bzw. höher. Die protonierte Form des DD-

Enantiomers aller drei Peptide ist jeweils affiner als die des LL-Isomers. Über den Unterschied in der chiralen Erkennung lässt sich die Migrationsreihenfolge bei pH 2,5 mit dem LL-Isomer vor dem DD-Enantiomer erklären. Die Komplexbildungskonstanten für die neutrale Spezies sind annähernd gleich groß. Eine Umkehr der chiralen Erkennung kann allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden.

Da für das DD-Enantiomer im Vergleich zum LL-Stereoisomer das Verhältnis von K_+/K_n jeweils größer ist, ergibt sich für den diastereomeren Komplex dieses Enantiomers auch ein relativ höherer pK_a -Wert. Diese auf der CD-Komplexierung basierende, enantioselektive pK_a -Wert-Verschiebung ist die Ursache der pH-abhängigen Änderung der Migrationsreihenfolge in Gegenwart von β -CD (Kap. 5.1.1.2, Mechanismus (1)). Aus der Enantioselektivität der $pK_{a/c}$ -Werte resultieren unterschiedliche Komplexmobilitäten in dem pH-Bereich um den pK_a -Wert. Da mit zunehmendem pH-Wert gleichzeitig die Bindungskonstanten ähnlicher werden, wird die Migrationsreihenfolge bei pH 3,8 auch bei einer niedrigen CD-Konzentration durch die Komplexmobilitäten determiniert. Das DD-Enantiomer mit der höheren Komplexmobilität wandert im gesamten Konzentrationsbereich zuerst. Es ist möglich, dass gleichzeitig mit der enantioselektiven pK_a -Wert-Verschiebung auch eine Umkehr der chiralen Erkennung einhergeht. Daraus würde sich ein analoges Migrationsverhalten ergeben. Die Enantiomerentrennung der DD- und LL-Isomere von Ala-Tyr, Ala-Phe wie auch Asp-PheOMe in Gegenwart von β -CD und 2 M HS kann dem Fall VII der Systematik zugeordnet werden (Kap. 5.1.1.1).

Analog wurde das Migrationsverhalten der DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr und Asp-PheOMe von Sabbah et al. [72] erklärt, wobei die pH-abhängigen Parameter bei pH 2,5 und 3,5 bestimmt worden sind. Li und Waldron [48] führten die Umkehr der Migrationsreihenfolge bei Ala-Phe dagegen auf eine entgegengesetzte chirale Erkennung für die kationische und neutrale Spezies zurück (Kap. 5.1.1.2., Mechanismus (2)).

Des Weiteren wurde für β -CD als chiralen Selektor die Komplexbildung der Enantiomere von Ala-Tyr, Ala-Phe sowie Asp-PheOMe in einer kalorimetrischen Bindungsstudie analysiert. Dafür erfolgten Messungen zu den Bindungsisothermen (Gl. (30)) bei pH 2,2 und pH 5,5. Bei pH 5,5 liegen die Peptide weitgehend in der zwitterionischen Form vor. Bei pH 2,2 überwiegen die kationischen Spezies, es existieren aber auch neutrale Formen. Die Bindungskonstanten wurden mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode aus beiden Bindungsisothermen ermittelt, wobei in die Berechnung zusätzlich der Einfluss der Dissoziation einbezogen wurde. Die Werte für die Dissoziationskonstanten [97-100] und die Enthalpieänderungen zum Dissoziationsgleichgewicht [101, 102] wurden der Literatur entnommen. Eine Übersicht zu den Komplexbildungskonstanten ist in Tab. 5 gegeben.

Für die geladenen sowie für die zwitterionischen Spezies aller drei Dipeptide wurde jeweils eine stärkere Komplexbildung des DD-Enantiomer im Vergleich zum LL-Isomer gefunden. Generell ist der Unterschied in den Bindungskonstanten für diese beiden Enantiomere größer als bei den über die CE-Messungen erhaltenen Werten. Jedoch lässt sich auch mit Hilfe der kalorimetrischen Messungen

zeigen, dass die Bindungskonstanten der neutralen Formen im Vergleich zu denen der kationischen Dipeptide einander ähnlicher sind. Demzufolge ergibt sich auch hier eine Enantioselektivität für das Verhältnis von K_+/K_n . Da dieser Quotient für das DD-Enantiomer größer ist, hat dieses auch den höheren $pK_{a/c}$ -Wert. Damit lassen sich die Ergebnisse der CE-Untersuchungen bestätigen.

Tabelle 5: pH-unabhängige Komplexbildungskonstanten zur Charakterisierung der Komplexbildung der Dipeptide mit β -CD bei Zusatz von 2 M HS. (Die experimentellen Bedingungen sind im Manuskript 2 dargestellt.)

| Analyt | | K_+ [kg/mol] | K_n [kg/mol] | $\frac{K_+}{K_n}$ |
|------------|----|-------------------|-------------------|-------------------|
| Ala-Tyr | DD | 76 | 52 | 1,5 |
| | LL | 48 | 39 | 1,2 |
| Ala-Phe | DD | 80 | 24 | 3,4 |
| | LL | 48 | 19 | 2,6 |
| Asp-PheOMe | DD | 131 | 62 | 2,1 |
| | LL | 76 | 41 | 1,8 |

5.1.3 Der Einfluss von Harnstoff auf die Enantiomerentrennung von Dipeptiden

Manuskripte 3 und 4

In der chiralen CE wird HS typischerweise in einer Konzentration von 2 M als Lösungsvermittler für β -CD verwendet, so auch für die Peptidtrennungen mit β -CD, bei denen eine Umkehr der Migrationsreihenfolge zu beobachten war [60, 72]. Die Untersuchungen zum Einfluss von HS auf die Trennungen von Ala-Tyr und Ala-Phe wurden durchgeführt, weil es hauptsächlich von Interesse war, ob diese Änderung im Migrationsverhalten auch ohne Zusatz von HS zu beobachten ist. Wie schon diskutiert, bleibt die pH-abhängige Änderung der Migrationsreihenfolge auch bei Abwesenheit von HS erhalten. Allerdings sind Unterschiede in der Trenneffizienz zu beobachten. Deren Ursache soll im Folgenden geklärt werden. Als Problem erwies sich jedoch dabei die geringe Löslichkeit von β -CD ohne Zusatz von HS. Die Peptide sind relativ schwach affin zu β -CD, sodass die Komplexbildungskonstanten in Abwesenheit von HS nicht bestimmt werden konnten. Eine teilweise Charakterisierung des Bindungsverhaltens gelang mit Hilfe „gemischter“ Parameter des Gleichgewichtsmodells. Dabei bezieht sich „gemischt“ darauf, dass diese parallel Informationen zu den Bindungs-, Dissoziations- und Mobilitätsparametern enthalten. Für das wesentlich stärker affine Boc-Phe konnte die CD-Komplexierung auch ohne Zusatz von HS analysiert werden. Darüber hinaus wurde eine weitere Studie mit dem bedeutend besser löslichen DM- β -CD als chiraalem Selektor für die Dipeptide durchgeführt. Für dieses CD konnte der Zusammenhang zwischen Komplexierungsverhalten und Enantiomerentrennung dargestellt werden.

5.1.3.1 β -Cyclodextrin als chiraler Selektor

Für β -CD in einer Konzentration von 13 mmol/l (15 mg/ml) wurde der Einfluss eines Zusatzes von 2 M HS auf die Trennung der DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr sowie Ala-Phe bei den pH-Werten 2,5 sowie 3,8 analysiert. Die Selektivitätswerte der Dipeptide sind in Abb. 6 (Kap. 5.1.2.1) und die entsprechenden Elektropherogramme in Abb. 7 dargestellt. Bei Zusatz von HS ist für beide Peptide bei pH 2,5 eine Verbesserung, bei pH 3,8 dagegen eine Verschlechterung der Trennung festzustellen, wobei die pH-abhängige Änderung der Migrationsreihenfolge bestehen bleibt. Bei pH 2,5 wurde im Umkehrmodus und bei pH 3,8 im Normalmodus detektiert, sodass die vordergründig gleiche Migrationsreihenfolge in den Elektropherogrammen in Wirklichkeit einer pH-abhängigen Umkehr entspricht.

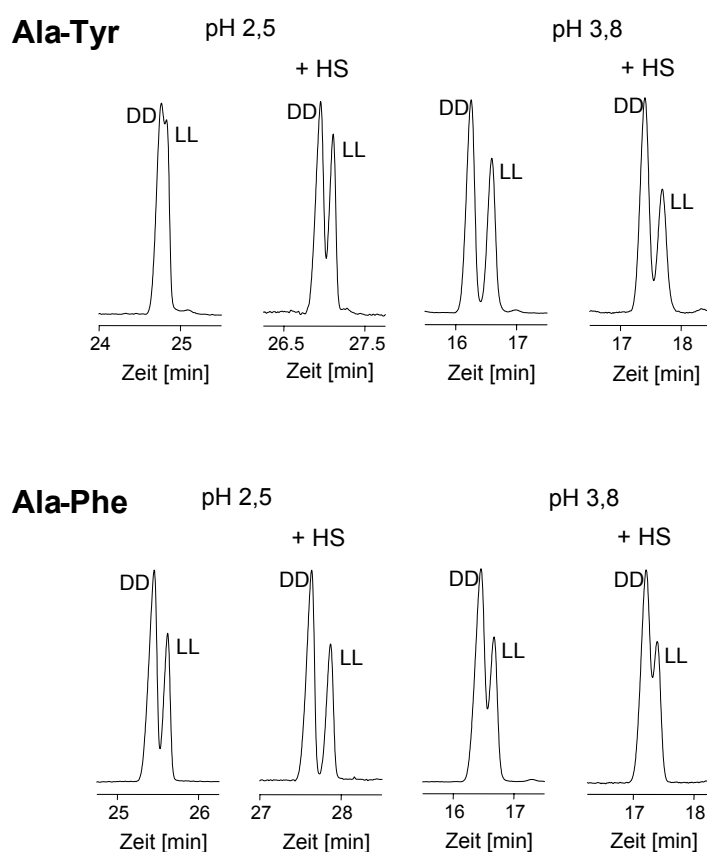


Abbildung 7: Elektropherogramme zur Enantiomerentrennung der DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe mit β -CD bei einer Konzentration von 13 mmol/l (15 mg/ml), ohne und mit Zusatz von 2 M HS, für pH 2,5 bzw. pH 3,8 in Phosphat-Puffer. Bei pH 2,5: Detektion an der Anode bei -30 kV; bei pH 3,8: Detektion an der Kathode bei 25 kV (Weitere experimentelle Bedingungen sind im Manuskript 3 angegeben.)

Darüber hinaus wurde der Einfluss von 2 M HS auf die Enantiomerentrennung von Ephedrin und Boc-Phe mit β -CD untersucht. Die Trenneffizienz blieb jeweils für Ephedrin bei den pH-Werten 2,5 sowie 3,8 und eine CD-Konzentration von 13 mmol/l (15 mg/ml) und für Boc-Phe bei pH 6,5 und eine CD-

Konzentration von 1,8 mmol/l (2 mg/ml) unverändert. Im Gegensatz zu den Peptiden sind Ephedrin wie auch Boc-Phe bei den entsprechenden pH-Werten vollständig geladen.

Um die durch den HS-Zusatz bedingten Unterschiede im Migrationsverhalten der Dipeptide erklären zu können, wurde vergleichend in Ab- und Anwesenheit von HS die Mobilität der vollständig protonierten Form und der pK_a -Wert ohne Zusatz von β -CD sowie bei einer Konzentration von 13 mmol/l (15 mg/ml) ($\mu_{+/CD/13}$ und $pK_{a/CD/13}$) bestimmt. $\mu_{+/CD/13}$ und $pK_{a/CD/13}$ sind gemäß der Gl. (21) und (22) „gemischte“ Parameter. Zusammen mit den Gleichgewichts- und Mobilitätsparametern, die bei Zusatz von 2 M HS mit Hilfe der CE (Tab. 4 im Kap. 5.1.2.2) und Kalorimetrie (Tab. 5 im Kap. 5.1.2.2) ermittelt worden sind, kann der Einfluss von HS auf die Enantiomertrennung der Dipeptide interpretiert werden.

Über eine nichtlineare Regression entsprechend Gl. (20) wurden die Mobilitäten und die pK_a -Werte erhalten, dafür wurde die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilitäten vom pH-Wert im pH-Bereich 1,9 - 5,6 ohne Zusatz von HS bzw. 2,4 - 5,9 in Gegenwart von HS untersucht. Die Werte sind in Tab. 6 dargestellt.

Tabelle 6: Elektrophoretische Mobilitäten der kationischen Peptide und pK_a -Werte ohne Zusatz eines chiralen Selektors und bei einer β -CD-Konzentration von 13 mmol/l ermittelt durch nichtlineare Regression gemäß Gl. (20) zur Charakterisierung der Komplexbildung der Dipeptide mit β -CD ohne und mit Zusatz von 2 M HS. (Die experimentellen Bedingungen sind im Manuskript 3 dargestellt.)

| Analyt | 2 M HS | μ_{HB^+} [$10^{-9}m^2s^{-1}V^{-1}$] | $\mu_{+/CD/13}$ [$10^{-9}m^2s^{-1}V^{-1}$] | pK_a | $pK_{a/CD/13}$ | |
|---------|--------|--|---|--------------|----------------|-------------|
| Ala-Tyr | DD | - | 16,77 ± 0,08 | 11,71 ± 0,07 | 3,15 ± 0,01 | 3,29 ± 0,01 |
| | LL | - | | 12,00 ± 0,07 | | 3,25 ± 0,01 |
| | DD | + | 16,76 ± 0,06 | 12,58 ± 0,08 | 3,28 ± 0,01 | 3,38 ± 0,01 |
| | LL | + | | 12,90 ± 0,08 | | 3,34 ± 0,01 |
| Ala-Phe | DD | - | 17,85 ± 0,08 | 13,08 ± 0,08 | 3,12 ± 0,01 | 3,21 ± 0,01 |
| | LL | - | | 13,46 ± 0,09 | | 3,18 ± 0,01 |
| | DD | + | 18,00 ± 0,14 | 13,84 ± 0,09 | 3,24 ± 0,01 | 3,31 ± 0,01 |
| | LL | + | | 14,30 ± 0,09 | | 3,28 ± 0,01 |

Die Zugabe von HS führt bei beiden Dipeptiden zu keinen grundsätzlichen Veränderungen an den Relationen der Parameter zueinander. Die Mobilität $\mu_{+/CD/13}$ des DD-Enantiomers ist jeweils niedriger als die des LL-Stereoisomers. Gemäß Gl. (21) kann dafür eine stärkere Bindung oder eine kleinere Komplexmobilität μ_{HB-CD^+} des DD-Enantiomers verantwortlich sein, wobei ersteres für die CD-Komplexierung der Dipeptide mit Zusatz von HS gezeigt wurde.

Weiterhin wurde jeweils für beide Enantiomere eine Zunahme der pK_a -Werte bei Zusatz von 13 mmol/l β -CD gefunden. Dies kann mit Bezug auf Gl. (22) nur damit begründet sein, dass die protonierte Form im Vergleich zur neutralen Spezies stärker gebunden ist. In Gegenwart von 2 M HS wurde dies nachgewiesen. Darüber hinaus ist eine Enantioselektivität für den Wert $pK_{a/CD/13}$ bei beiden Dipeptiden festzustellen, wobei das DD-Isomer in Ab- und Anwesenheit von HS den höheren Wert $pK_{a/CD/13}$ hat. Ursache dafür kann entsprechend Gl. (22) ein höheres Verhältnis der Bindungskonstanten K_+/K_n und somit ein höherer pK_a -Wert für den Komplex dieses Enantiomers sein. Möglich ist aber auch eine generell stärkere Komplexierung des DD-Enantiomers bei vergleichbaren pK_a -Werten für die diastereomeren Komplexe. Ersteres trifft bei Gegenwart von HS zu. Mit der CE und der Kalorimetrie wurde jeweils ein größerer Quotient K_+/K_n für das DD-Isomer gefunden.

Sehr wahrscheinlich kann der Zusammenhang zwischen Komplexbildung und Enantiomerentrennung ohne Zusatz des Additivs analog dem in Gegenwart von HS beschrieben werden (Kap. 5.1.2.2). Vermutlich ist HS ein nicht-enantioselektives Additiv für die Enantiomerentrennung der Peptide in Gegenwart von β -CD ist.

Der HS-Zusatz verändert die Größe der Mobilitätsparameter und der pK_a -Werte, wobei die Effekte für Ala-Tyr wie auch für Ala-Phe ähnlich sind. Die Mobilitäten der ungebundenen Dipeptide μ_{HB^+} werden durch die Zugabe von HS nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu sind aber die Mobilitäten $\mu_{+/CD/13}$ in Gegenwart von HS größer. Dabei kann mit Bezug auf Gl. (21) abgeleitet werden, dass bei Verwendung von HS entweder die Affinität der Peptide zu β -CD abnimmt oder dass die Komplexmobilitäten größer werden.

Des Weiteren bewirkt die Anwesenheit des HS eine Zunahme der pK_a -Werte der ungebundenen Peptide sowie auch bei Zusatz von 13 mmol/l β -CD, wobei die pK_a -Wert-Verschiebung in Gegenwart des CDs schwächer ist. In der Erhöhung des Wertes $pK_{a/CD/13}$ reflektiert sich die Zunahme des pK_a -Wertes. Allerdings ist diese geringer, sodass entsprechend Gl. (22) durch den HS-Zusatz entweder das Verhältnis der Komplexbildungskonstanten K_+/K_n verkleinert wird oder bei gleichbleibendem Verhältnis die Affinität der Peptide zu β -CD generell abnimmt. Letzteres scheint am wahrscheinlichsten zu sein, da auch die Zunahme der Mobilitäten $\mu_{+/CD/13}$ u.a. mit einer Erniedrigung der Komplexbildungskonstanten begründet werden kann. Außerdem wurde für die Mehrzahl der Substanzen eine Abnahme der Affinität zu β -CD beschrieben [77-82].

Da die Enantiomerentrennung nur im unteren Konzentrationsbereich des CDs charakterisiert werden konnte, ist nur eine vage Interpretation hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen den pK_a -Werten und Mobilitätsparametern auf der einen Seite und dem Migrationsverhalten auf der anderen Seite möglich. Die Enantiomerentrennung der Dipeptide ist stark pH-abhängig. Bei einem niedrigen pH-Wert wandert das LL-Stereoisomer zuerst. Mit Erhöhung des pH-Wertes dreht sich die Migrationsreihenfolge um. Die durch den HS-Zusatz bedingte pK_a -Wert-Verschiebung ist gleichbedeutend mit einer Verschiebung des

Dissoziationsgleichgewichts zugunsten der protonierten Form für einen definierten pH-Wert. Gesetzt den Fall, die Trennung wäre nur vom Verhältnis der kationischen und neutralen Spezies abhängig, würde die Zugabe von HS zu einer verbesserten Trennung bei pH 2,5 und einer geringeren Trenneffizienz bei pH 3,8 führen. Jedoch ist in die Überlegung mit einzubeziehen, dass keine genauen Informationen vorliegen, wie sich die Komplexbildungskonstanten bzw. das Verhältnis von $\mu_{\text{HB}^+} / \mu_{\text{HB-CD}^+}$ in Gegenwart von HS verändern. Es ist festzuhalten, dass die durch HS bedingte pK_a -Wert-Verschiebung sehr wahrscheinlich zu dem veränderten Trennverhalten der Dipeptide bei Verwendung von β -CD beiträgt.

Auf Basis des Gleichgewichtsmodells von Vigh et al. [40] für schwache Säuren, welches analog dem für schwache Basen die Enantiomerentrennung beschreibt, wurde die β -CD-Komplexierung und die Dissoziation der Enantiomere von Boc-Phe in Ab- und Anwesenheit von 2 M HS analysiert. Die Mobilitäten der geladenen, ungebundenen sowie komplexierten Spezies bleiben durch HS-Zusatz unverändert. Eine Abnahme der Bindungskonstanten für die anionischen und neutralen Formen beider Enantiomere um etwa 20 % ist in Gegenwart von HS zu beobachten. Analog zu den Dipeptiden führt der HS-Zusatz zu einer Zunahme des pK_a -Wertes um ca. 0,1 Einheiten. Alle beobachteten Effekte sind nicht-enantioselektiv.

Wie bereits erwähnt, war für Boc-Phe keine Veränderung in der Selektivität bei einer CD-Konzentration von 1,8 mmol/l (2 mg/ml) und einem pH-Wert von 6,5 durch den HS-Zusatz festzustellen. Allerdings wäre ein geringer Effekt zu erwarten gewesen, da die Trennung auf enantioselektiven Bindungsgleichgewichten beruht und durch den HS-Zusatz der Komplexierungsgrad verändert wird.

5.1.3.2 Heptakis-(2,6-dimethyl)- β -cyclodextrin als chiraler Selektor

Für DM- β -CD als chiralen Selektor wurde die Enantiomerentrennung von Ala-Tyr, Ala-Phe, Asp-PheOMe und Glu-PheNH₂ im pH-Bereich 2,2 - 3,8 ohne und mit Zusatz von 2 M HS analysiert. Die Selektivität in Abhängigkeit von der CD-Konzentration ist für alle Dipeptide in Abb. 5 (Kap. 5.1.2.1) dargestellt. Elektropherogramme für Ala-Tyr und Asp-PheOMe werden in Abb. 8 gezeigt.

Die pH-abhängige Änderung der Migrationsreihenfolge bleibt für die Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe auch in Gegenwart von HS erhalten. Allerdings sind Unterschiede in der Trenneffizienz zu bemerken, wobei bei beiden Peptiden ähnliche Effekte auftreten. Bei pH 2,2 ist im unteren Konzentrationsbereich von DM- β -CD keine Auswirkung auf die Enantiomerentrennung zu beobachten. Bei einer hohen CD-Konzentration dagegen wurde eine Verbesserung der Trennung festgestellt. Bei pH 3,8 verschlechtert sich die Trennung im unteren Konzentrationsbereich. Bei hohen CD-Konzentrationen hat der Zusatz von HS keinen Einfluss auf die Trennung.

Bei Asp-PheOMe und Glu-PheNH₂ bleibt auch mit einem Zusatz von 2 M HS die Migrationsreihenfolge mit dem LL-Stereoisomer vor dem DD-Enantiomer erhalten. Allerdings ergeben sich auch kleine, für beide Peptide ähnliche Änderungen im Trennverhalten. Im gesamten pH-Bereich 2,2 - 3,8 ist bei einer niedrigen CD-Konzentration eine Verschlechterung der Trennung, bei Verwendung hoher DM-β-CD-Konzentrationen dagegen eine Verbesserung durch den HS-Zusatz zu beobachten.

Wie bereits diskutiert worden ist, hat der Zusatz von HS keinen grundlegenden Einfluss auf die Selektivität und die CD-Komplexierung bei allen untersuchten Dipeptiden und der Zusammenhang zum Trennverhalten kann gleichermaßen in Ab- und Anwesenheit von HS dargestellt werden (Kap. 5.1.2.2). HS wirkt als nicht-enantioselektives Additiv für die Enantiomertrennung der Dipeptide mit DM-β-CD.

Der HS-Zusatz führt zu für alle Peptide ähnlichen Veränderungen an den Mobilitäts- und Gleichgewichtsparametern. Die Zugabe von HS bewirkt eine Erhöhung der Mobilität der unkomplexierten Dipeptide μ_{HB^+} . Für Ala-Tyr und Ala-Phe sind in den Untersuchungen zu β-CD gleichbleibende Werte gefunden worden, was aus den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen resultieren kann. Weiterhin wird durch die HS-Zugabe die Komplexmobilität $\mu_{\text{HB-CD}^+}$ verringert. Die kationischen wie auch die zwitterionischen Spezies zeigen eine Abnahme der Affinität zu DM-β-CD, welche ebenfalls für die Komplexierung der Dipeptide zu β-CD angenommen und für die meisten anderen Substanzen gefunden wurde [77-82]. Wie auch für die Dipeptide und Boc-Phe in Kombination mit β-CD festgestellt wurde, bewirkt der HS-Zusatz eine Zunahme der pK_a-Werte des ungebundenen wie auch des komplexierten Dipeptids. Im Gegensatz dazu ist in der Literatur für schwache Basen und Säuren eine pK_a-Wert-Verschiebung jeweils zu einem kleineren Wert beschrieben worden, wobei aber der thermodynamische Standardzustand betrachtet wurde [83-85].

Für Asp-PheOMe wird der Zusammenhang zwischen Komplexbildung und Trennverhalten illustriert. Dazu wurde eine erneute Anpassung der Mobilitäten basierend auf dem Gleichgewichtsmodell entsprechend Gl. (18) durchgeführt. Dabei wurde angenommen, dass durch den HS-Zusatz das Verhältnis der Bindungskonstanten K_{+1}/K_{+2} und K_{n1}/K_{n2} sowie der Komplexmobilitäten $\mu_{\text{HB-CD}^+1}/\mu_{\text{HB-CD}^+2}$ unverändert bleibt. Die Selektivität in Abhängigkeit von der CD-Konzentration jeweils ohne und mit Zusatz von HS ist in Abb. 9 dargestellt.

Die Enantiomertrennung von Asp-PheOMe zeigt nur eine geringe pH-Abhängigkeit, sodass der Einfluss der durch den HS-Zusatz verursachten pK_a-Wert-Verschiebung eher gering ist. Der HS bewirkt eine Zunahme der Mobilität der ungebundenen Form sowie eine Abnahme der Komplexmobilität für beide Enantiomere. Aus der kleineren Differenz der beiden Mobilitäten in Gegenwart von HS resultiert eine schlechtere Trennung. Dieser Effekt ist aber nur im unteren Konzentrationsbereich zu beobachten. Die Enantiomertrennung von Asp-PheOMe basiert auf enantioselektiven Bindungsgleichgewichten.

Aufgrund der geringeren Affinität der Dipeptide in Gegenwart von HS ist das Optimum der Trennung zu einer höheren CD-Konzentration verschoben. Dieser Effekt führt zu einer verbesserten Trennung im oberen Konzentrationsbereich des CDs.

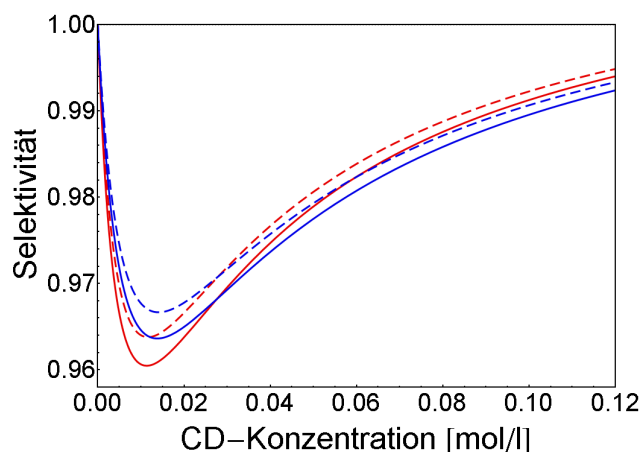


Abbildung 9: Selektivität für die Enantiomertrennung der DD- und LL-Isomere von Asp-PheOMe bei pH 2,2 und pH 3,0 als Funktion der Konzentration von DM- β -CD ohne und mit Zusatz von 2 M HS. Die Selektivität wurde aus den über die Regression erhaltenen Parametern berechnet, Details dazu sind im Text. Rot: ohne HS; blau: mit HS; durchgängige Linie: pH 2,2; gestrichelte Linie: pH 3,0.

5.1.3.3 Schlussfolgerungen zum Additiv Harnstoff

Generell ist es nicht möglich, die Richtung und Größe der durch den HS-Zusatz verursachten Effekte auf Bindungskonstanten [77-82], pK_a -Werte [83-85] und Mobilitätsparameter [82] vorherzusagen, wie anhand dieser Studie und einigen Beispielen aus der Literatur gezeigt wurde. Allerdings scheint ein Trend zu einer schwächeren CD-Komplexierung in Gegenwart von HS zu bestehen. In Bezug auf die Enantiomertrennungen der Dipeptide und Boc-Phe mit DM- β -CD und β -CD als chirale Selektoren wirkt HS als nicht-enantioselektives Additiv. Da die Enantiomertrennung auf der Bildung diastereomerer Komplexe basiert, kann aber nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass HS auch als enantioselektiver Hilfsstoff fungiert. In jedem Fall ist eine erneute Untersuchung des Trennverhaltens bei Zusatz von HS empfehlenswert. Die Pufferzubereitung hinsichtlich der pH-Wert-Einstellung und der verwendeten Gehaltsgröße spielt eine wichtige Rolle.

5.2 KAPILLARELEKTROPHORETISCHE METHODE ZUR PRÜFUNG AUF REINHEIT VON ETOMIDAT MIT EINBEZUG DER CHIRALEN VERUNREINIGUNG

Manuskript 5

Etomidat (Ethyl[1-[-(1R)-1-phenylethyl]-1H-imidazol-5-carboxylat]) ist ein Injektionsnarkotikum, wobei nur das therapeutisch verwendete (R)-Enantiomer narkotisch wirksam ist [103-105]. Die Monographie „Etomidat“ des EuABs beschreibt das (R)-(+)-Enantiomer und lässt durch Bestimmung der „Spezifischen Drehung“ auf Enantiomerenreinheit prüfen. Dieses Verfahren ist sehr unempfindlich. Ein alternatives empfindlicheres Analyseverfahren ist die CE, mit welcher zusätzlich zum korrespondierenden Enantiomer auch andere Verunreinigungen erfasst werden können. Für Etomidat erfolgt die Prüfung auf „verwandte Substanzen“ nach den Vorschriften des EuABs mit Hilfe der Flüssigchromatographie [6]. Zielsetzung war die Entwicklung eines CE-Verfahrens zur Reinheitsprüfung von Etomidat mit Einbezug der chiralen Verunreinigung.

Im EuAB sind als mögliche Verunreinigungen von Etomidat das korrespondierende (S)-Enantiomer, der Methylester (Metomidat), der Isopropylester und die entsprechende Carbonsäure (Bezeichnung als Etomidat-Säure) gelistet. Die beiden Ester und die Säure sind als Racemate angegeben, obwohl entsprechend der veröffentlichten Synthesevorschriften entweder enantiomerenreine Ausgangsstoffe verwendet werden oder eine Racemattrennung während der Synthese erfolgt [106-108]. Da der Isopropylester kommerziell nicht erhältlich ist, wurde dieser bei der Methodenentwicklung nicht berücksichtigt. Metomidat und Etomidat-Säure wurden als Racemate verwendet, da die einzelnen Enantiomere nicht verfügbar waren. Im Fall einer Enantiomertrennung wurde angenommen, dass die Migrationsreihenfolge der Enantiomere von Metomidat und Etomidat-Säure analog der von Etomidat und dessen (S)-Enantiomer ist. In der optimierten Methode konnte die (R)-Etomidat-Säure durch alkalische Hydrolyse von Etomidat identifiziert werden. Strukturformeln und die Nummerierung der Substanzen, wie im Weiteren verwendet, sind in Abb. 10 dargestellt.

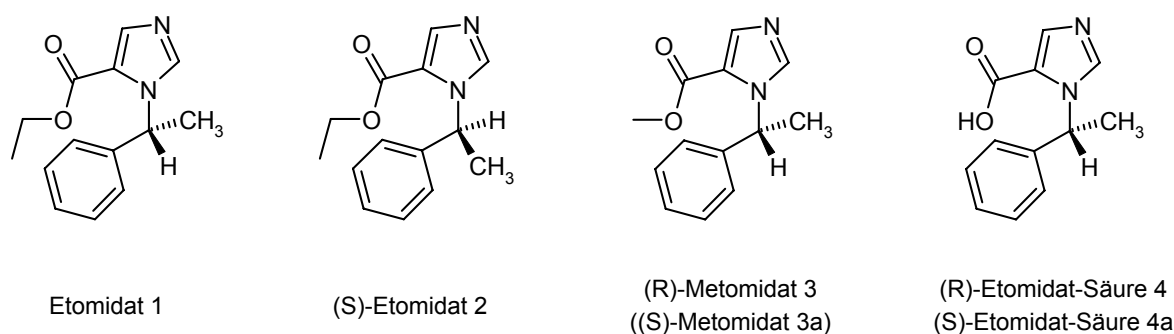


Abbildung 10: Strukturformeln von Etomidat und „verwandten Substanzen“

5.2.1 Entwicklung und Optimierung der Methode

Etomidat und Metomidat sind schwache Basen, wobei für Etomidat ein pK_a -Wert von 4,2 angegeben ist [107]. Etomidat-Säure hingegen ist eine amphotere Verbindung mit einem für die Carboxylfunktion geschätzten pK_a -Wert von 2,3 [96]. Damit die Migrationszeit der Etomidat-Säure und demzufolge die Analysenzeit möglichst kurz ist, wurde als „Start“-pH-Wert für die Methodenentwicklung pH 2,1 gewählt. Auf der Grundlage mehrerer Veröffentlichungen zur Enantiomerentrennung von Metomidat wurden α -CD, β -CD und HP- β -CD hinsichtlich ihres Trennvermögens untersucht [109-111]. All diese CDs zeigten eine chirale Erkennung für Etomidat und das entsprechende (S)-Enantiomer, jedoch war die Auflösung für eine Reinheitsprüfung, bei welcher hochkonzentrierte Proben von Etomidat verwendet werden, unzureichend. Bei Verwendung von α -CD konnte eine sehr hohe Auflösung zwischen Metomidat (beide Enantiomere in einem Peak) und Etomidat erzielt werden.

Da für die Enantiomere von Metomidat eine sehr gute Auflösung bei Verwendung anionischer CDs erreicht wurde, wurden verschiedene Konzentrationen von S- β -CD getestet [109, 110]. Ein sehr hohes Trennvermögen für die Enantiomere von Etomidat wurde mit einer Konzentration von 3 mg/ml S- β -CD erreicht, allerdings mit stark zu Tailing neigenden Peaks und einer unzureichenden Auflösung von Etomidat und (R)-Metomidat. Bei Verwendung einer Konzentration von 30 mg/ml S- β -CD konnten alle Substanzen sehr gut getrennt werden. Jedoch wurde bei Überladung des Systems mit einer Konzentration von 5 mg/ml Etomidat eine Aufspaltung des Peaks von (R)-Metomidat beobachtet. Zudem bestand keine direkte Proportionalität zwischen Konzentration und UV-Absorption (gemessen anhand der Peakfläche) für Etomidat, sodass das üblicherweise von den Arzneibüchern angewendete Verfahren der Normalisierung nicht verwendet werden kann. Normalisierung ist gleichzusetzen mit der prozentualen Angabe der korrigierten Peakfläche einer Substanz relativ zur Summe aller korrigierten Peakflächen. Da α -CD ein ausreichendes Trennpotential für Metomidat und Etomidat und S- β -CD für die Enantiomere von Etomidat zeigt, konnte mit einer Kombination beider CDs eine hinreichende Trennung aller Substanzen mit annehmbarer Peaksymmetrie erzielt werden.

Zur Methodenentwicklung wurde eine Probenlösung von 5,4 mg Etomidat mit jeweils 0,2 % (m/m) aller Verunreinigungen bezogen auf die Konzentration von Etomidat (10,8 μ g/ml) verwendet. Lidocainhydrochlorid wurde als interner Standard (IS) in einer relativen Konzentration von 2,0 % (m/m) (108 μ g/ml) zugesetzt. Da Etomidat eine geringe Löslichkeit in Wasser zeigt und aufgrund der Neigung der Esterfunktion zur Hydrolyse, wurde dem Probenpuffer 20 % (V/V) Ethanol zugesetzt und ein etwas höherer pH-Wert von 2,8 im Vergleich zum pH-Wert des Trennpuffers von 2,1 gewählt. Die Konzentration von α -CD wurde mit 30 mg/ml festgesetzt, da Veränderungen dieser, nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Trennung führten. Der Einfluss der Konzentration von S- β -CD auf die Trennung wurde sorgfältig untersucht, da die Auflösung zwischen (R)-Metomidat, Etomidat und (S)-Etomidat von dieser stark abhängig ist. Eine gute Trennung konnte mit einer Konzentration von 4,6

mg/ml S- β -CD erreicht werden. Des Weiteren wurde die Methode hinsichtlich der verwendeten Puffersubstanzen, der Molarität des Puffers, der elektrischen Spannung sowie der Temperatur optimiert. Ebenso wurde der Einfluss der Injektionszeit auf die Trennung bei einem konstanten Druck von 0,5 psi (3,45 kPa) analysiert und dabei festgestellt, dass bei Erhöhung dieser von 3 s auf 5 s sich die Auflösung zwischen (R)-Metomidat und Etomidat sowie die Peakform von (S)-Etomidat verschlechtern. Das Elektropherogramm zur optimierten Methode inklusive der Methodenparameter ist in Abb. 11 dargestellt. Zu erwähnen ist, dass die Peaks von (S)-Metomidat mit Etomidat komigrieren. Dieses stellt allerdings keinen Nachteil dar, weil, wie bereits diskutiert wurde, das Auftreten von (S)-Metomidat als Verunreinigung sehr unwahrscheinlich ist.

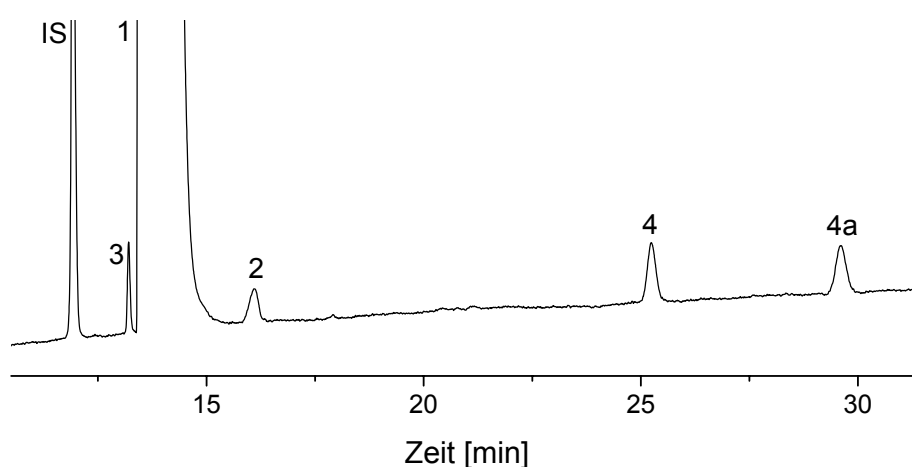


Abbildung 11: Elektropherogramm zur optimierten Methode der Reinheitsprüfung von Etomidat. Probenlösung: 5,4 mg/ml Etomidat und jeweils 0,2 % (m/m) der Verunreinigungen mit 2,0 % (m/m) Lidocainhydrochlorid als internem Standard (IS) in 150 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 2,8 mit 20 % Ethanol. Experimentelle Bedingungen: 50,2 / 40 cm Kieselglas-Kapillare, 150 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 2,1 mit 30 mg/ml α -CD und 4,6 mg/ml S- β -CD, 20 kV, 25 °C, Probeninjektion mit 0,5 psi für 3 s, vor dem Einbringen der Probe Injektion von Wasser mit 0,3 psi für 2s.

5.2.2 Validierung der Methode

5.2.2.1 Richtigkeit, Präzision, Spezifität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität und Arbeitsbereich

Die Methode wurde entsprechend der ICH-Richtlinie Q2 hinsichtlich Richtigkeit, Präzision, Spezifität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität und Arbeitsbereich validiert [88] Mit Bezug auf die Spezifität der Methode ist zu bemerken, dass alle Substanzen bis auf das mit Etomidat komigrierende (S)-Metomidat gut voneinander getrennt sind. Der Arbeitsbereich einer Methode für eine Reinheitsprüfung sollte für die jeweiligen Verunreinigungen Berücksichtigungsgrenze wie auch Spezifikationsgrenze annähernd umfassen. In der Monographie des EuABs gemäß der Prüfung auf

„verwandte Substanzen“ für Etomidat ist für jede Verunreinigung als Berücksichtigungsgrenze 0,5 % und als Spezifikationsgrenze 0,2 % angegeben [6]. Die Verunreinigungen (S)-Etomidat, (R)-Metomidat und (R)-Etomidat-Säure wurden in Gegenwart von 5,4 mg/ml Etomidat in einem Bereich von 0,06 - 0,24 % (m/m) relativ zu Etomidat (3,24 - 12,96 µg/ml) kalibriert. Zusätzlich wurde auf Linearität von Etomidat in einem Bereich von 1,08 - 6,48 mg/ml geprüft. Die Quantifizierung erfolgte jeweils über den Quotienten der korrigierten Peakfläche (Peakfläche bezogen auf Migrationszeit) der Substanz bezogen auf die korrigierte Peakfläche des internen Standards. Der interne Standard Lidocainhydrochlorid wurde in einer Konzentration von 2,0 % (m/m) relativ zu Etomidat (108 µg/ml) der Probenlösung zugesetzt. Durch Erstellen der Kalibriergerade gemäß $y = a \cdot x + b$ konnte die Linearität für Etomidat sowie für alle Verunreinigungen nachgewiesen werden. Der Korrelationskoeffizient war in allen Fällen 0,99. Die Residuen, also die Abweichungen der Messwerte von der Kalibriergerade, unterlagen keinem Trend. Das 95 %-Intervall für den Schnittpunkt mit der y-Achse beinhaltete stets den Wert 0. Demzufolge ist die Voraussetzung für die Anwendung des Normalisierungsverfahrens gegeben. Die entsprechenden Normalisierungsfaktoren (Anstieg a für Verunreinigung / Anstieg a für Etomidat bei Regression entsprechend $y = a \cdot x$) zum Einbezug der unterschiedlichen UV-Absorption von Verunreinigungen und Etomidat wurden berechnet. Darüber hinaus wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze anhand der Kalibriergerade mit Hilfe der Standardabweichung des Schnittpunktes mit der y-Achse bestimmt. Die Bestimmungsgrenze aller Verunreinigungen liegt bei $\leq 0,05$ %. Dieser Wert entspricht der Berücksichtigungsgrenze der Prüfung auf „verwandte Substanzen“ für Etomidat [6]. Der Berichtsgrenzwert für neue Arzneistoffe mit einer Tagesgesamtdosis ≤ 2 g liegt gemäß der Empfehlungen der ICH ebenfalls bei 0,05 % [49].

Die Methode wurde hinsichtlich Präzision (Systempräzision und Wiederholpräzision) sowie Richtigkeit für die potentiellen Verunreinigungen (S)-Etomidat, (R)-Metomidat und (R)-Etomidat-Säure an der Berücksichtigungsgrenze von 0,05 % (m/m) (2,7 µg/ml) sowie an der Spezifikationsgrenze von 0,2 % (m/m) (10,8 µg/ml) der Monographie des EuABs validiert. Die Probenlösungen wurden sechsmal je Tag an drei aufeinander folgenden Tagen injiziert. Die Konzentration bzw. die entsprechende Wiederfindungsrate wurde mit Hilfe der Regressionsparameter der Kalibriergeraden sowie des Normalisierungsverfahrens unter Einbezug der entsprechenden Normalisierungsfaktoren ermittelt. Die Gesamtpräzision ausgedrückt als relative Standardabweichung lag für beide Bestimmungsmethoden im akzeptablen Bereich bei maximal 10,4 % an der Berücksichtigungsgrenze und bei maximal 4,1 % an der Spezifikationsgrenze. Die mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens bestimmten Wiederfindungsraten werden im Vergleich zu den über die Regressionsparameter ermittelten Werten leicht überschätzt (bis maximal das 1,18-fache für (R)-Etomidat-Säure bei einer Konzentration von 0,05 %), sind aber noch akzeptabel. Für (R)-Etomidat-Säure an der Berücksichtigungsgrenze wurden generell höhere Wiederfindungsraten gefunden. Diese lagen bei 108,4 %, ermittelt über die Regressionsparameter, bzw.

bei 128,5 %, bestimmt mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens. Dies kann über eine partielle Hydrolyse von Etomidat während der Probenvorbereitung erklärt werden.

5.2.2.2 Robustheit

Die Prüfung auf Robustheit wurde mit Hilfe der statistischen Versuchsplanung durchgeführt. Die in die Prüfung integrierten Parameter waren Spannung, Temperatur, Detektionswellenlänge, Konzentration sowie pH-Wert des Puffers, Konzentrationen von α -CD wie auch S- β -CD wie auch der Lieferant von S- β -CD, wobei die entsprechenden Faktorstufen in Tab. 7 angegeben sind. Zielgrößen waren die über das Normalisierungsverfahren ermittelten Konzentrationen von (S)-Etomidat, (R)-Metomidat sowie (R)-Etomidat-Säure. Zusätzlich wurden SST-Zielgrößen, wie die Auflösungen zwischen (R)-Metomidat und (R)-Etomidat sowie zwischen (R)-Etomidat und (S)-Etomidat und die Migrationszeit von (R)-Etomidat-Säure, in die Prüfung integriert. Da die Mindestzahl der durchzuführenden Experimente $8 \text{ (Faktoren)} + 1$ beträgt, wurde ein Plackett-Burman-Design mit 12 Experimenten sowie 3 zusätzlichen „Mittelpunkts-Experimenten“ gewählt. Erst dieser „erweiterte“ Plackett-Burman-Versuchsplan ermöglicht die Varianzanalyse in Bezug auf Signifikanz des Regressionsmodells und Güte der Anpassung. Die Messungen wurden in zufälliger Reihenfolge unter Verwendung einer Lösung von 5,4 mg/ml Etomidat mit jeweils 0,2 % (m/m) der Verunreinigungen bezogen auf Etomidat (10,8 $\mu\text{g/ml}$) durchgeführt.

Tabelle 7: Faktoren mit Faktorstufen für Robustheitsprüfung

| Faktor | Faktorstufen |
|------------------------------|-------------------------|
| Spannung | 19 - 21 kV |
| Temperatur | 24 - 26 kV |
| Detektionswellenlänge | 197 - 203 nm |
| Konzentration des Puffers | 140 - 160 mmol/l |
| pH-Wert des Puffers | 2,0 - 2,2 |
| α -CD-Konzentration | 29 - 31 mg/ml |
| S- β -CD-Konzentration | 4,4 - 4,8 mg/ml |
| Lieferant von S- β -CD | Aldrich Chemical, Fluka |

Die gemessenen Konzentrationen aller Verunreinigungen schwankten leicht: für (S)-Etomidat im Bereich 0,20 - 0,25 %, für (R)-Metomidat zwischen 0,18 und 0,22 % und für (R)-Etomidat-Säure von 0,19 bis 0,22 %. Die Konzentration von (R)-Metomidat konnte bei Verwendung von 140 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 2,0 in keinem der entsprechenden Experimente bestimmt werden, da die Peaks von (R)-Metomidat und Etomidat nicht getrennt wurden. Zur weiteren Auswertung wurde für die

Konzentration von (R)-Metomidat der Mittelwert der Konzentrationen aller anderen Experimente verwendet.

Voraussetzung für die statistische Auswertung ist das Vorliegen aller Werte in einer Normalverteilung. Deshalb war eine logarithmische Umwandlung der Auflösungen zwischen (R)-Metomidat und (R)-Etomidat sowie zwischen (R)-Etomidat und (S)-Etomidat notwendig. Die Anpassung der Zielgrößen an die Faktoren (nach Umwandlung in die skalierte und zentrierte Form) folgte jeweils über PLS gemäß Gl. (31). Die für die Faktoreinflüsse erhaltenen Regressionskoeffizienten mit den dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervallen wurden für die einzelnen Zielgrößen in Säulendiagrammen dargestellt. Abb. 12 zeigt die jeweiligen Regressionskoeffizienten für die Auflösung von (R)-Metomidat und Etomidat sowie die Migrationszeit von (R)-Etomidat-Säure

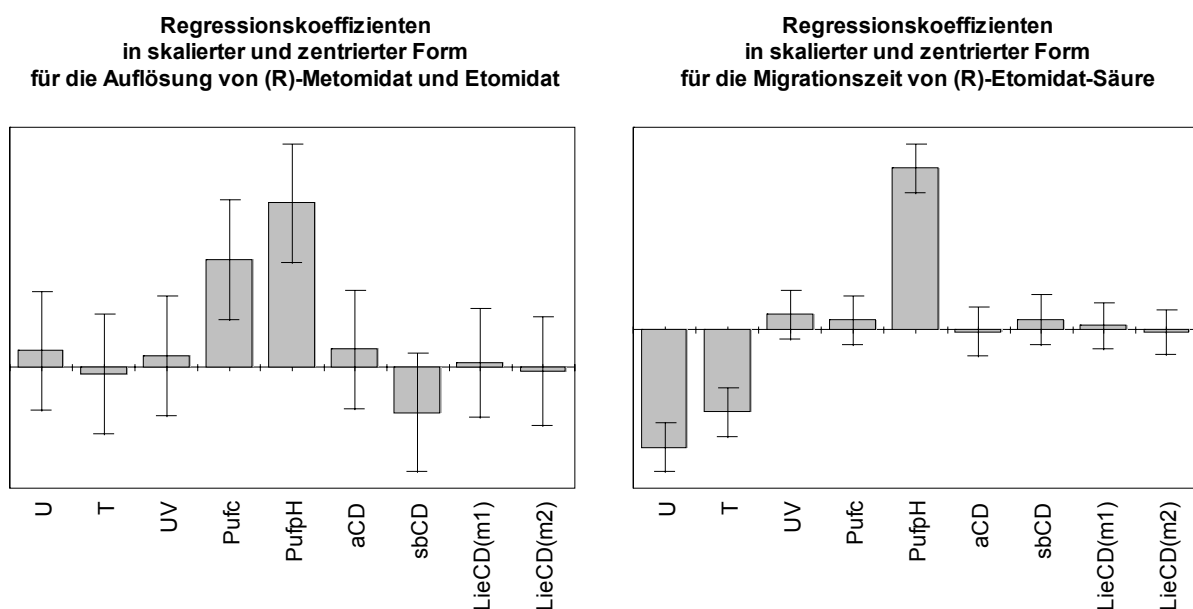


Abbildung 12: Regressionskoeffizienten in skaliert und zentrierter Form nach logarithmischer Umformung gemäß $\log(\text{Zielgröße} + 1)$ für die Auflösung von (R)-Metomidat und Etomidat sowie für die Migrationszeit von (R)-Etomidat-Säure. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle. U, Spannung; T, Temperatur; UV, Detektionswellenlänge; Pufc, Konzentration des Puffers; PufpH, pH-Wert des Puffers; aCD, α -CD-Konzentration; sbCD, S- β -CD-Konzentration; LieCD(m1), Lieferant von S- β -CD: Aldrich Chemical; LieCD(m2), Lieferant von S- β -CD: Fluka.

Erwartungsgemäß ergab sich ein signifikanter Einfluss der Konzentration sowie des pH-Wertes des Trennpuffers auf die Auflösung zwischen (R)-Metomidat und Etomidat. Auch die Migrationszeit von (R)-Etomidat-Säure unterliegt signifikanten Schwankungen durch die Veränderungen von Spannung, Temperatur und pH-Wert des Puffers. Ebenso wurde durch Varianzanalyse gezeigt, dass für diese beiden Zielgrößen das entsprechende Regressionsmodell signifikant ist. Nicht-signifikante

Anpassungen wurden für die Konzentrationen aller drei Verunreinigungen sowie für die Auflösung zwischen Etomidat und (S)-Etomidat gefunden. Jeweils mittels eines „Lack of Fit“-Tests wurde gezeigt, dass das gewählte Modell sich als passend für alle Zielgrößen erwies. Die Empfindlichkeit der Migrationszeit von (R)-Etomidat-Säure auf Veränderungen der Methodenparameter ergibt keine Beeinträchtigung für die Durchführung der Reinheitsprüfung. Allerdings ist die Nicht-Robustheit der Auflösung zwischen (R)-Metomidat und Etomidat als problematisch anzusehen, da bei den gewählten Extremwerten von Konzentration und pH-Wert des Trennpuffers die Verunreinigung von (R)-Metomidat nicht mehr erfasst werden kann. Aus diesem Grund sollte die Herstellung des Trennpuffers sehr sorgfältig durchgeführt werden. Es ist zu bemerken, dass auch andere nicht in die Prüfung auf Robustheit einbezogene Parameter die Ergebnisse der Methode beeinflussen können. Bei der Methodenoptimierung wurde festgestellt, dass die Injektionszeit bzw. indirekt auch der -druck Auflösung und Peakform beeinträchtigen. Bei der Methodenübertragung auf ein anderes Instrument bzw. Labor ist besonders auf diese beiden Parameter zu achten. Generell sind signifikante Veränderungen in den Auflösungen benachbarter Peaks möglich, wenn Charge oder Hersteller substituiertes CDs gewechselt werden, auch wenn dies hier nicht beobachtet wurde.

Da auffällig hohe Wiederfindungsraten für (R)-Etomidat-Säure gefunden wurden, wurde die Stabilität einer Lösung von 5,4 mg/ml Etomidat mit jeweils 0,2 % (m/m) der Verunreinigungen über eine Zeitspanne von 48 h untersucht. Dabei nahm nur die Konzentration von Etomidat-Säure um einen Absolutbetrag von 0,7 % zu. Für die Anwendung der Methode zur Reinheitsbestimmung folgt, dass nur frisch hergestellte Probenlösungen verwendet werden sollten.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die Ergebnisse zu zwei verschiedenen Themenschwerpunkten. Zum einen wurden Migrationsphänomene, die bei Dipeptiden in Gegenwart neutraler CDs beobachtet werden, auf der Basis eines mathematischen Gleichgewichtsmodells aufgeklärt. Zum anderen wurde ein Beispiel für die Anwendbarkeit der statistischen Versuchsplanung zur Prüfung auf Robustheit im Zuge der Validierung gegeben.

(1) Die Enantiomerentrennung schwacher Basen mit einem neutralen CD als chiralem Selektor kann mit Hilfe eines mathematischen Gleichgewichtsmodells beschrieben werden, wobei die Abhängigkeit der Selektivität von pH-Wert und CD-Konzentration dargestellt wird. Aufbauend auf diesem Modell erfolgte eine systematische Klassifizierung der schwachen Basen hinsichtlich des Trennmusters in 15 verschiedene Fälle. Diese Trennmuster unterscheiden sich bezüglich der Migrationsreihenfolge in den vier Eckpunkten der Selektivitätsoberfläche. Für diese Eckpunkte wurde der Zusammenhang zwischen der Migrationsreihenfolge und den Komplexbildungs-, Dissoziations- und Mobilitätsparametern definiert. Grundsätzlich kann jede Kombination aus schwacher Base und neutralem CD einem der Fälle zugeordnet werden.

Auf der Grundlage des Gleichgewichtsmodells erfolgte eine systematische Aufklärung der Mechanismen, die zu einer pH-abhängigen Umkehr der Migrationsreihenfolge der Enantiomere schwacher Basen in Gegenwart eines neutralen CDs führen. Diese kann resultieren aus:

- einer auf der CD-Komplexierung basierenden, enantioselektiven pK_a -Wert-Verschiebung, die zu einem veränderten Verhältnis der Komplexmobilitäten im pH-Bereich des pK_a -Wertes der Base führt
- einer entgegengesetzten chiralen Erkennung für die protonierte und die neutrale Form der Base.
- einer ausgeprägten, durch die CD-Komplexierung verursachten pK_a -Wert-Erhöhung, sodass sich daraus ein verändertes Vorzeichen der Differenz der Mobilitäten von ungebundener und komplexierter Spezies ergibt. Diese pK_a -Wert-Verschiebung kann nicht-enantioselektiv sein. Der Mechanismus wurde erstmalig diskutiert.

Es konnte dargestellt werden, dass die Migrationsreihenfolge immer im Zusammenhang mit pH-Wert und CD-Konzentration betrachtet werden sollte.

Außerdem wurde ein Vorschlag für ein Screening-Verfahren zur Beurteilung der Eignung eines neutralen CDs zur Enantiomerentrennung einer schwachen Base erarbeitet.

Basierend auf dem Gleichgewichtsmodell wurden die Mechanismen zum Migrationsverhalten der DD- und LL-Enantiomere verschiedener Dipeptide in Gegenwart von β -CD und DM- β -CD untersucht.

Bei Verwendung von β -CD kann die pH-abhängige Änderung der Migrationsreihenfolge für Ala-Tyr, Ala-Phe und Asp-PheOMe auf eine durch die CD-Komplexierung verursachte, enantioselektive pK_a -Wert-Verschiebung zurückgeführt werden.

Mit DM- β -CD als chiralem Selektor wurde für Ala-Tyr und Ala-Phe eine signifikante, auf der CD-Komplexierung beruhende pK_a -Wert-Verschiebung zu einem höheren Wert festgestellt, worüber die pH-abhängige Änderung der Migrationsreihenfolge erklärt werden kann.

In Gegenwart von DM- β -CD blieb die Migrationsreihenfolge für Asp-PheOMe und Glu-PheNH₂ unverändert, was sich auch in den ermittelten Modellparametern widerspiegelt.

Über eine kalorimetrische Bindungsstudie wurden die Ergebnisse der CE-Messungen zum Komplexierungsverhalten der Enantiomere von Ala-Tyr, Ala-Phe und Asp-PheOMe mit β -CD bestätigt.

Bei einer Untersuchung zum Einfluss von 2 M HS auf die Trennung der DD- und LL-Enantiomere von Ala-Tyr und Ala-Phe mit β -CD wurde kein Effekt hinsichtlich der Migrationsreihenfolge gefunden. Allerdings wurde ein pH-abhängiger Effekt auf die Trenneffizienz beobachtet. Eine durch den HS-Zusatz bedingte Erhöhung des pK_a -Wertes spielt dabei eine Rolle.

Des Weiteren wurde das Komplexierungs- und Dissoziationsverhalten der Enantiomere von Boc-Phe in Kombination mit β -CD in Ab- und Anwesenheit von 2 M HS analysiert. Der HS-Zusatz führt zu einer nicht-enantioselektiven Abnahme der Affinität zu β -CD und zu einer Verschiebung des pK_a -Wertes zu einem höheren Wert. Für die untersuchte CD-Konzentration und den pH-Wert wurde kein Einfluss auf die Enantiomerentrennung nachgewiesen.

Ebenso wurde der Einfluss von HS auf die CD-Komplexierung und das Trennverhalten für die DD- und LL-Isomere verschiedener Dipeptide mit DM- β -CD als chiralem Selektor untersucht, wobei alle beobachteten Effekte nicht-enantioselektiv sind. Es wurde eine Erhöhung des pK_a -Wertes für alle Peptide sowie eine Abnahme der Affinität zu DM- β -CD in Gegenwart von 2 M HS gefunden. Auch wurde ein Einfluss auf die Mobilitätsparameter beobachtet. Durch den Zusatz von HS wird die Migrationsreihenfolge der Dipeptide nicht beeinflusst. Jedoch wurden pH- und konzentrationsabhängige Veränderungen in der Trenneffizienz beobachtet. Diese Unterschiede wurden mit Hilfe der Dissoziations-, Bindungs- und Mobilitätsparameter interpretiert.

(2) Für das Injektionsnarkotikum Etomidat wurde eine CE-Methode zur Prüfung auf „verwandte Substanzen“ entwickelt. Diese erlaubt simultan die Bestimmung des (S)-Enantiomers als chirale

Verunreinigung. Die Validierung der Methode wurde entsprechend den Empfehlungen der ICH durchgeführt. Der Robustheitstest erfolgte unter Anwendung der statistischen Versuchsplanung basierend auf einem „erweiterten“ Plackett-Burman-Design. Es zeigte sich, dass die Auflösung zwischen der Verunreinigung (R)-Metomidat und Etomidat als kritischer Parameter empfindlich gegenüber Veränderungen im pH-Wert und der Konzentration des Trennpuffers ist. Insgesamt erlaubt die Methode eine Quantifizierung der Verunreinigungen oberhalb der Berücksichtigungsgrenze von 0,05 %, die entsprechend der Monographie des EuABs für Etomidat gilt.

7 Summary

The thesis had two major topics. On one hand, migration phenomena observed for dipeptides in the presence of neutral CDs have been investigated on the base of a mathematical equilibrium model. On the other hand the applicability of experimental design for robustness testing within the validation procedure has been demonstrated using etomidate as an example.

(1) In the presence of a neutral CD as chiral selector, enantioseparations of weak bases can be characterized on the basis of an equilibrium model describing the separation selectivity as a function of the pH value and the CD concentration. Weak bases have been systematically classified with regard to the separation pattern. 15 different cases are distinguished. The separation patterns differ in the enantiomer migration order in the four corner points of the selectivity surface. For these corner points, the migration order expressed as separation selectivity has been defined as a function of affinity, dissociation and mobility parameters. In principle, every combination of a weak base and a neutral CD can be assigned to one of the cases.

With regard to the equilibrium model, mechanisms resulting in a pH-dependent reversal of enantiomer migration order have been interpreted. A change of migration order can be based on:

- a complexation-induced enantioselective pK_a shift leading to an inversed ratio of the complex mobilities in the pH range close to the pK_a value of the analyte.
- an opposite chiral recognition of the selector towards the protonated and neutral species of the analyte.
- a significant complexation-induced pK_a shift to a higher value resulting in a inversed algebraic sign of the difference of the mobilities for the uncomplexed and complexed species. The pK_a shift can be non-enantioselective. This mechanism has been discussed for the first time.

It could be shown that the pH-dependent enantiomer migration order has to be always considered with regard to buffer pH and CD concentration.

In addition, a screening method for the evaluation of a neutral chiral selector for enantioseparations of weak bases has been suggested.

Based on the equilibrium model, the mechanisms underlying the migration behavior of the DD- and LL-enantiomers of various dipeptides in the presence of β -CD and DM- β -CD as chiral selectors were studied.

In the presence of β -CD, the pH-dependent reversal of the enantiomer migration order of Ala-Tyr, Ala-Phe and Asp-PheOMe is the result of a complexation-induced enantioselective pK_a -shift.

The combination with DM- β -CD results in a significant complexation-induced pK_a shift for Ala-Tyr and Ala-Phe. The enantiomer migration order can be rationalized on the basis of this shift.

The enantiomer migration order remained unchanged for Asp-PheOMe and Glu-PheNH₂ using DM- β -CD as chiral selector, which is also reflected in the model parameters.

The results of the CE-experiments with respect to the complexation data for the combination of the dipeptides and β -CD have been verified in a calorimetric ligand binding study.

Addition of 2 M urea did not affect the migration order of the DD- and LL-isomers of Ala-Tyr and Ala-Phe using β -CD as chiral selector. In contrast, an effect on the separation efficiency was observed. The increased pK_a value in the presence of urea proved to be an important factor.

Furthermore, the complexation and dissociation behavior of the enantiomers of Boc-Phe in combination with β -CD was examined in the absence and presence of 2 M urea. Addition of urea results in a non-enantioselective decrease of the affinity constants and an increase of the pK_a value. No effect has been observed on the enantioseparation at the investigated pH value and CD concentration.

Likewise, the influence of urea on CD complexation and migration behavior has been analyzed for the DD- and LL-isomers of various dipeptides in the presence of DM- β -CD. Urea is a non-enantioselective additive. A pK_a shift and lower complexation constants have been found in the presence of 2 M urea. Moreover, mobility parameters were affected. While addition of urea did not have an effect on the migration order, pH and CD concentration dependent changes of the separation efficiency were observed. The differences have been explained on the basis of the dissociation, complexation and mobility parameters.

(2) A CE-method has been developed for the test on “related substances” of the short acting intravenous anaesthetic agent etomidate. The method allows the simultaneous determination of the (S)-enantiomer as a chiral impurity as well as other “related substances”. Validation of the method was carried out according to the ICH-guidelines. Robustness testing was performed using experimental design on the basis on an “augmented” Plackett-Burman design. The test revealed that resolution between (R)-metomidate and etomidate as critical pair was especially sensitive with respect to changes in buffer pH and CD concentration. Overall, the method allows the quantification of the impurities at the 0.05 %-level which is the disregard limit of the European Pharmacopoeia.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, 53, 1298-1302.
- [2] Horvath, J., Dolnik, V., *Electrophoresis* 2001, 22, 644-655.
- [3] Righetti, P. G., Gelfi, C., Vergola, B., Castelletti, L., *Electrophoresis* 2001, 22, 603-611.
- [4] Kang, J., Bischoff, D., Jiang, Z., Bister, B., Süßmuth, R. D., Schurig, V., *Anal. Chem.* 2004, 76, 2387-2392.
- [5] <http://www.kapillarelektrophorese.de>
- [6] *European Pharmacopoeia*, 6th Ed., Council of Europe, Strasbourg 2008.
- [7] *United States Pharmacopeia 32*, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD 2009.
- [8] Poole, S. K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C. F., *J. Chrom. A* 2004, 1037, 445-454.
- [9] Rundlett, K. L., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 2001, 22, 1419-1427.
- [10] Zavaleta, J., Chinchilla, D., Brown, A., Ramirez, A., Calderon, V., Sogomonyan, T., Gomez, F. A., *Curr. Anal. Chem.* 2006, 2, 35-42.
- [11] Bello, M. S., Rezzonico, R., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 1994, 659, 199-204.
- [12] Innes, I. R., Nickersen, M., Goodman, L. S., Gilman A. (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, MacMillan, New York 1970, pp. 477-513.
- [13] Reynolds, E. F. (Ed.), Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, 31st Ed., Pharmaceutical Press, London 1996.
- [14] Kean, W. F., Lock, C. J. L., Howard-Lock, H. E., *Lancet* 1991, 338, 1565-1568.
- [15] Scriba, G. K. E., Enantiomer Separation by Capillary Electrophoresis, in: Subramanian, G. (Ed.), *Chiral Separation Techniques*, 3rd Ed., Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2007, pp. 333-368.
- [16] Gübitz, G., Schmid, M. G., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 179-225.
- [17] Chankvetadze, B., *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*, John Wiley & Sons, West Sussex 1997.
- [18] Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M., *J. Microcol. Sep.* 1990, 2, 234-240.
- [19] Tran, A. D., Blanc, T., Leopold, E. J., *J. Chromatogr.* 1990, 516, 241-249.
- [20] Juvancz, Z., Kendrovics, R. B., Iványi, R., Szente, L., *Electrophoresis* 2008, 29, 1701-1712.
- [21] Scriba, G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1991-2011.
- [22] Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 89-122.
- [23] de Boer, T., de Zeeuw, R. A., de Jong, G. J., Ensing, K., *Electrophoresis* 2000, 21, 3220-3239.
- [24] Eeckhaut, A. V., Michotte, Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2880-2895.
- [25] Ward, T. J., Oswald, T. M., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 309-325.
- [26] Haginaka, J., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 235-254.

- [27] Tanaka, Y., Terabe, S., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001, 48, 103-116.
- [28] Nishi, H., Kuwahara, Y., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001, 48, 89-102.
- [29] Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 163-178.
- [30] El Rassi, Z., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 207-233.
- [31] Schmid, M. G., Grobuschek, N., Lecnik, O., Gübitz, G., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001, 48, 143-154.
- [32] Loftsson, T., Duchêne, D., *Int. J. Pharm.* 2007, 329, 1-11.
- [33] Lurie, I. S., *J. Chromatogr. A* 1997, 792, 297-307.
- [34] Fillet, M., Hubert, Ph., Crommen, J., *J. Chromatogr. A* 2000, 875, 123-134.
- [35] Wren, S. A. C., Rowe, R. C., *J. Chromatogr.* 1992, 603, 235-241.
- [36] Wren, S. A. C., *J. Chromatogr.* 1993, 636, 57-62.
- [37] Wren, S. A. C., *Electrophoresis* 1995, 16, 2127-2131.
- [38] Rizzi, A. M., Kremser, L., *Electrophoresis* 1999, 20, 2715-2722.
- [39] Rawjee, Y. Y., Williams, R. L., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1993, 652, 233-245.
- [40] Rawjee, Y. Y., Staerk, D. U., Vigh, G., *J. Chromatogr.* 1993, 635, 291-306.
- [41] Rawjee, Y. Y., Williams, R. L., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 599-607.
- [42] Rawjee, Y. Y., Williams, R. L., Buckingham, L. A., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1994, 273-282.
- [43] Biggin, M. E., Williams, R. L., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 692, 319-325.
- [44] Williams, R. L., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 197-205.
- [45] Rawjee, Y. Y., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1994, 66, 619-627.
- [46] Williams, B. A., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1997, 777, 295-309.
- [47] Rizzi, A., *Electrophoresis* 2001, 22, 3079-3106.
- [48] Li, J., Waldron, K. C., *Electrophoresis* 1999, 20, 171-179.
- [49] *Guideline Q3A(R2), Impurities in New Drug Substances*, Conference on Harmonisation 2006, <http://www.ich.org>.
- [50] Fang, N., Chen, D. D. Y., *Anal. Chem.* 2006, 78, 1832-1840.
- [51] Fillet, M., Bechet, I., Chiap, P., Hubert, P., Crommen, J., *J. Chromatogr. A* 1995, 717, 203-209.
- [52] Swartz, M. E., Mazzeo, J. R., Grover, E. R., Brown, P. R., *J. Chromatogr. A* 1995, 735, 303-310.
- [53] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Santi, M., Massolini, G., Blaschke, G., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 733-740.
- [54] Chankvetadze, B., Schulte, G., Blaschke, G., *Enantiomer* 1997, 2, 157-179.
- [55] Chankvetadze, B., *Electrophoresis* 2002, 23, 4022-4035.
- [56] Sidamonidze, N., Süß, F., Poppitz, W., Scriba, G. K. E., *J. Sep. Sci.* 2001, 24, 777-783.
- [57] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Breikreuz, J., Bergander, K., Bergenthal, D., Kataeva, O., Fröhlich, R., Luftmann, H., Blaschke, G., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1155-1166.
- [58] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Blaschke, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 27, 153-159.

- [59] Süß, F., Sängler-van De Griend, C. E., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 1069-1076.
- [60] Sabbah, S., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 2000, 267-272.
- [61] Chankvetadze, B., Fillet, M., Burjanadze, N., Bergenthal, D., Bergander, K., Luftmann, H., Crommen, J., Blaschke, G., *Enantiomer* 2000, 5, 313-322.
- [62] Chankvetadze, B., Burjanadze, N., Santi, M., Massolini, G., Blaschke, G., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 733-740.
- [63] Süß, F., Poppitz, W., Sängler-van de Griend, C. E., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2001, 22, 2416-2423.
- [64] Gassman, E., Kuo, J. E., Zare, R. N., *Science* 1985, 230, 813-815.
- [65] Mazzeo, J. R., Grover, E. R., Swartz, M. E., Petersen, J. S., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 125-135.
- [66] Schmitt, T., Engelhardt, H., *J. Chromatogr. A* 1995, 697, 561-570.
- [67] Chankvetadze, B., Schulte, G., Blaschke, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 15, 1577-1584.
- [68] Amini, A., Beijersten, I., Pettersson, C., Westerlund, D., *J. Chromatogr. A* 1996, 737, 301-313.
- [69] Lin, C.-E., Liao, W.-S., Chen, K.-H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3139-3146.
- [70] Sabah, S., Scriba, G. K. E., *J. Chromatogr. A* 1998, 822, 137-145.
- [71] Sabbah, S., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2001, 22, 1385-1393.
- [72] Sabbah, S., Süß, F., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* 2001, 22, 3163-3170.
- [73] Yoshinaga, M., Tanaka, M., *J. Chromatogr. A* 1995, 710, 331-337.
- [74] Shibukawa, A., Lloyd, D. K., Wainer, I. W., *Chromatographia* 1993, 35, 419-429.
- [75] García-Ruiz, C., Crego, A. L., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 2657-2664.
- [76] Abu-Hamdiyyah, M., *J. Phys. Chem.* 1965, 69, 2720-2725.
- [77] Chankvetadze, B., Schulte, G., Bergenthal, D., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1998, 798, 315-323.
- [78] Castronuovo, G., Elia, V., Niccoli, M., Velleca, F., *J. Incl. Phenom. Macro.* 2003, 45, 91-97.
- [79] Godínez, L. A., Patel, S., Criss, C. M., Kaifer, A. E., *J. Phys. Chem.* 1995, 99, 17449-17455.
- [80] Godínez, L. A., Schwartz, L., Criss, C. M., Kaifer, A. E., *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 3376-3380.
- [81] Shen, X., Belletête, M., Durocher, G., *Langmuir* 1997, 13, 5830-5836.
- [82] Wang, F., Khaledi, M. G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 3460-3467.
- [83] De, A. L., Atta, A. K., *Can J. Chem.* 1986, 64, 1521-1526.
- [84] Pointud, Y., Gillet, H., Juillard, J., *Talanta* 1976, 23, 741-742.
- [85] Talukdar, H., Rudra, S., Kundu, K. K., *Can. J. Chem.* 1989, 315-320.
- [86] Saboury, A. A., *J. Iran. Chem. Soc.* 2006, 3, 1-21.
- [87] Gaisford, S., O'Neill, M. A. A., *Pharmaceutical Isothermal Calorimetry*, 1st Ed., Informa Healthcare, New York 2007.
- [88] *Guideline Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, Conference on Harmonisation 2005, <http://www.ich.org>.

- [89] Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B. G. M., Massart, D. L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 24, 723-753.
- [90] Dejaegher, B., Vander Heyden, Y., *J. Chromatogr. A* 2007, 1158, 138-157.
- [91] Ermer, J., Miller, J. H. McB (Eds.), *Method Validation in Pharmaceutical Analysis - A Guide to Best Practice*, Wiley VCH Verlag, Weinheim 2005.
- [92] Cox, D. R., Reid, N., *The Theory of the Design of Experiments*, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton 2000.
- [93] Kleppmann, W., *Taschenbuch Versuchsplanung: Produkte und Prozesse optimieren*, 5. Aufl, Carl Hanser Verlag, München 2008.
- [94] Vogt, F., Booksh, K., Chemometrics, in: Seidel, A. (Ed.), *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol. 6, 5th Ed., Wiley, Hoboken 2004, pp. 25-72.
- [95] Morgan, E., *Chemometrics: experimental design (Analytical Chemistry by Open Learning)*, Wiley, Chichester 1991.
- [96] *Advanced Chemistry Development Inc./Chemskech*, Version 5.11, Canada 2002.
- [97] Vallat, P., Gailard, P., Carrupt, P.-A., Tsai, R.-S., Testa, B., *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 471.
- [98] Skwierczynski, R. D., Connors, K. A., *Pharm. Res.* 1993, 10, 1174.
- [99] Sabah, S., Ph.D. Thesis, University of Münster (1998).
- [100] Radomska, B., Sovago, I., Kiss, T., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1990, 1, 289.
- [101] Rodante, F., Fantauzzi, F., Mucciante, V., *Thermochim. Acta* 1996, 279, 35.
- [102] Rodante, F., Fantauzzi, F., Catalani, G., *Thermochim. Acta* 1997, 296, 15.
- [103] Heykants, J. J. P., Meuldermans, W. E. G., Michiels, L. J. M., Lewi, P. J., Janssen, P. A. J., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1975, 216, 113-129.
- [104] Tomlin, S. L., Jenkins, A., Lieb, W. R., Franks, N. P., *Anesthesiology* 1998, 88, 708-717.
- [105] Bellelli, D., Muntoni, A.-L., Merrywest, S. D., Gentet, L. J., Casula, A., Callachan, H., Madau, P., Gemmell, D. K., Hamilton, N. M., Lambert, J. L., Sillar, K. T., Peters, J. A., *Neuropharmacology* 2003, 45, 57-71.
- [106] Roevens, L. F. C., Heykants, J. J. P., Helsen, W. A. M., Patent DE 2609573 1976.
- [107] Chang, Z. L., Martin, J. B., in: Florey, K. (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol. 12, Academic Press, New York 1983, pp. 191-214.
- [108] Knoll, G., Kazmirowski, H. G., Menzer, M., Patent DD 215780 1984.
- [109] Endresz, G., Chankvetadze, B., Bergenthal, D., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1996, 732, 133-142.
- [110] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* 1995, 700, 43-49.
- [111] Chankvetadze, B., Endresz, G., Blaschke, G., *J. Capil. Electrophor.* 1995, 2, 235-240.

9 Formelverzeichnis

$$(1) \quad \mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E}$$

$$(2) \quad \mu_{ep} = \frac{q}{6\pi \cdot v \cdot r}$$

$$(3) \quad \mu_{tot} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$$

$$(4) \quad \mu_{ep} = \frac{l_{eff} \cdot l_{tot}}{U} \cdot \left(\frac{1}{t_{tot}} - \frac{1}{t_{eo}} \right)$$

$$(5) \quad K = \frac{[B \cdot CD^*]}{[B^*] \cdot [CD]}$$

$$(6) \quad \mu_{ep} = \sum_i \mu_i \cdot \alpha_i$$

$$(7) \quad \mu_{ep} = \mu_f \cdot \alpha_f + \mu_c \cdot \alpha_c$$

$$(8) \quad \mu_{ep} = \mu_f \cdot \frac{[B^*]}{[B^*] + [B \cdot CD^*]} + \mu_c \cdot \frac{[B \cdot CD^*]}{[B^*] + [B \cdot CD^*]}$$

$$(9) \quad \mu_{ep} = \frac{\mu_f + \mu_c \cdot K \cdot [CD]}{1 + K \cdot [CD]}$$

$$(10) \quad S = \frac{\mu_{ep1}}{\mu_{ep2}}$$

$$(11) \quad S = \frac{\mu_f + \mu_{c1} \cdot K_1 \cdot [CD]}{1 + K_1 \cdot [CD]} \cdot \frac{1 + K_2 \cdot [CD]}{\mu_f + \mu_{c2} \cdot K_2 \cdot [CD]}$$

$$(12) \quad K_a = \frac{[B] \cdot [H^+]}{[HB^+]}$$

$$(13) \quad K_+ = \frac{[HB \cdot CD^+]}{[HB^+] \cdot [CD]}$$

$$(14) \quad K_n = \frac{[B \cdot CD]}{[B] \cdot [CD]}$$

- (15)
$$K_{a/c} = \frac{[B \cdot CD] \cdot [H^+]}{[HB \cdot CD^+]}$$
- (16)
$$\mu_{ep} = \mu_{HB^+} \cdot \alpha_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot \alpha_{HB \cdot CD^+}$$
- (17)
$$\mu_{ep} = \frac{\mu_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot K_+ \cdot [CD]}{1 + K_+ \cdot [CD] + \frac{K_a}{[H^+]} \cdot (1 + K_n [CD])}$$
- (18)
$$\mu_{ep} = \frac{\mu_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot K_+ \cdot [CD]}{1 + K_+ \cdot [CD]} \cdot \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \left(\text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+ [CD]}{1 + K_n [CD]} \right)}}$$
- (19)
$$S = \frac{(\mu_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot K_{+1} \cdot [CD]) \cdot (10^{\text{p}K_a} \cdot (1 + K_{+2} \cdot [CD]) + 10^{\text{pH}} \cdot (1 + K_{n2} \cdot [CD]))}{(\mu_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot K_{+2} \cdot [CD]) \cdot (10^{\text{p}K_a} \cdot (1 + K_{+1} \cdot [CD]) + 10^{\text{pH}} \cdot (1 + K_{n1} \cdot [CD]))}$$
- (20)
$$\mu_{ep/CD} = \frac{\mu_{+/CD}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a/CD}}}$$
- (21)
$$\mu_{+/CD} = \frac{\mu_{HB^+} + \mu_{HB \cdot CD^+} \cdot K_+ \cdot [CD]}{1 + K_+ \cdot [CD]}$$
- (22)
$$\text{p}K_{a/CD} = \text{p}K_a + \log \frac{1 + K_+ \cdot [CD]}{1 + K_n \cdot [CD]}$$
- (23)
$$\mu_f = \frac{\mu_{HB^+}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}$$
- (24)
$$\mu_c = \frac{\mu_{HB \cdot CD^+}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_{a/c}}}$$
- (25)
$$\text{p}K_{a/c} = \text{p}K_a + \log \frac{K_+}{K_n}$$
- (26)
$$K = \frac{[HB \cdot CD^+] + [B \cdot CD]}{([HB^+] + [B]) \cdot [CD]}$$
- (27)
$$K = \frac{K_+ + K_n \cdot 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}$$
- (28)
$$Q = \alpha_{B \cdot CD^*} \cdot Q_{\max}$$
- (29)
$$Q = \frac{[B \cdot CD^*]}{[B^*] + [CD]} \cdot Q_{\max}$$

$$(30) \quad Q = \frac{K \cdot [CD]}{1 + K \cdot [CD]} \cdot Q_{\max}$$

$$(31) \quad y = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i$$

$$(32) \quad QS_{\text{Total}} = QS_{\text{Regression}} + QS_{\text{Residual}}$$

$$(33) \quad QS_{\text{Residual}} = QS_{\text{Modellfehler}} + QS_{\text{Zufallsfehler}}$$

$$(34) \quad S = \frac{\mu_{\text{HB-CD}+1}}{\mu_{\text{HB-CD}+2}}$$

$$(35) \quad \frac{\partial S}{\partial [CD]} = \frac{\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{+1} + K_{+2}) + \mu_{\text{HB-CD}+1} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB-CD}+2} \cdot K_{+2}}{\mu_{\text{HB}^+}}$$

$$(36) \quad S = \frac{\mu_{\text{HB-CD}+1}}{\mu_{\text{HB-CD}+2}} \cdot \frac{K_{+1} \cdot K_{n2}}{K_{+2} \cdot K_{n1}}$$

$$(37) \quad \frac{\partial S}{\partial [CD]} = \frac{\mu_{\text{HB}^+} \cdot (-K_{n1} + K_{n2}) + \mu_{\text{HB-CD}+1} \cdot K_{+1} - \mu_{\text{HB-CD}+2} \cdot K_{+2}}{\mu_{\text{HB}^+}}$$

CURRICULUM VITAE

Manuela Hammitzsch-Wiedemann,
geb. Hammitzsch,
Ziegenhainer Str. 34a, 07749 Jena,
geb. am 02.08. 1979 in Wippra,
verheiratet, 1 Kind,
Staatsbürgerschaft: deutsch

Schulbildung

09/1986 - 08/1991 POS Bruno-Leuschner Altenburg
09/1991 - 06/1998 Lerchenberggymnasium Altenburg (Abitur)

Studium

10/1998 - 09/2002 Pharmazie - Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2002 - 03/2003 Diplom - Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/Lehrstuhl für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie,
Thema: Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Lidocain und
Hyaluronsäure
04/2003 - 09/2003 Pharmaziepraktikantin in der „Apotheke am Treff“ in Halle
11/2003 Approbation als Apothekerin

Promotion

seit 12/2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische
Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Scriba
Thema: Mathematische und statistische Verfahren in der chiralen
Kapillarelektrophorese: Modellierung des Migrationsverhaltens und Anwendung
in der Validierung von Analyseverfahren
09/2007 - 09/2008 Mutterschutz und Elternzeit

PUBLIKATIONSLISTE

Development and validation of a robust capillary electrophoresis method for impurity profiling of etomidate including the determination of chiral purity using a dual cyclodextrin system

Manuela Hammitzsch, Ramiseti N. Rao, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2006, 27, 4334-4344.

Comparison of cyclodextrin-dipeptide inclusion complexes in the absence and presence of urea by means of capillary electrophoresis, nuclear magnetic resonance and molecular modeling

Benjamin Waibel, Josef Scheiber, Claudia Meier, Manuela Hammitzsch, Knut Baumann, Gerhard K. E. Scriba, Ulrike Holzgrabe, *European Journal of Organic Chemistry* 2007, 18, 2921-2930.

Influence of buffer substances and urea on the β -cyclodextrin-mediated chiral separation of dipeptides in CE

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2007, 28, 2619-2628.

Effect of urea on analyte complexation by 2,6-dimethyl- β -cyclodextrin in peptide enantioseparations by capillary electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Electrophoresis* 2009, 30, 3764-3771.

Determination of related substances of levodopa including the R-enantiomer by capillary electrophoresis

Sudaporn Wongwang, Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, zur Publikation angenommen bei *Electrophoresis*.

Profiling of levoamphetamine and related substances in dexamfetamine sulfate by capillary electrophoresis

Nino G. Kokiashvili, Sudaporn Wongwan, Carina Landgraf, Kristin Michaelis, Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009, 50, 1050-1053.

Mathematical approach by a selectivity model for rationalization of pH- and selector concentration-dependent reversal of the enantiomer migration order in capillary electrophoresis

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, *Analytical Chemistry* 2009, 81, 8765-8773.

Investigation of the pH-dependent complex formation between β -cyclodextrin and dipeptide enantiomers by capillary electrophoresis and calorimetry

Irina V. Terekhova, Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Bunleu Sungthong, Gerhard K. E. Scriba, in Vorbereitung.

TAGUNGSBEITRÄGE

Influence of buffer substances and urea on enantioseparations using β -cyclodextrin

Manuela Hammitzsch, Gerhard K. E. Scriba, DPhG Jahrestagung, 05. - 08. Oktober, Mainz.

Capillary electrophoresis method for testing of chiral purity and related substances of etomidate

Manuela Hammitzsch, Ramiseti N. Rao, Gerhard K. E. Scriba, 20th International Symposium on MicroScale Bioseparations, 22. - 26. Januar 2006, Amsterdam.

A theoretical look at separation efficiency of basic compounds using an equilibrium model

Manuela Hammitzsch-Wiedemann, Gerhard K. E. Scriba, 22th International Symposium on MicroScale Bioseparations & Methods for Systems Biology, 09. - 13. März 2008, Berlin.

Development and validation of capillary electrophoresis assay for the determination of the stereochemical purity of dexamphetamine

Nino G. Kokiashvili, Manuela Hammitzsch, Sudaporn Wongwang, Gerhard K. E. Scriba, 27th International Symposium on Chromatography, 21. - 25. September 2008, Münster.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit habe ich selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen in Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht.

Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller Universität Jena als Prüfungsarbeit eingereicht.

Manuela Hammitzsch-Wiedemann

Jena, den 26. August 2009