

**Analytische Trennungen neuartiger Supramoleküle
mittels HPLC**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sonja Müller

aus

Hannover

Bonn 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2001 bis März 2006 am Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter der Leitung von Herrn. Prof. Dr. Fritz Vögtle angefertigt.

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. F. Vögtle
2. Referent: Prof. Dr. K.-H. Dötz
3. Referent: Prof. Dr. R. Glaum
4. Referent: Prof. Dr. H. Mommsen

Tag der Promotion:

Ich versichere an Eides statt,
die vorliegende Arbeit selbständig verfasst
und die verwendeten Hilfsmittel angegeben zu haben.

Herrn Prof. Dr. Fritz Vögtle danke ich für eine Themenstellung zwischen der Grundlagenforschung (Untersuchung chiraler Materialien in der HPLC) und Anwendungsmöglichkeiten in pharmazeutischen Bereichen (Trennung chiraler Substanzen). Auch möchte ich mich für sein persönliches Interesse an meiner Forschungstätigkeit und der immer gewährten Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Dötz danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Die Spuren von Gestern verwischt der Wind von Heute

(Sprichwort der Tuareg)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Ziel der Arbeit | 3 |
| 3. Theoretischer Teil | 7 |
| 3.1 Selbstorganisation | 7 |
| Schlüssel-Schloss-Prinzip, Wirt-Gast-Chemie oder molekulare Erkennung | 8 |
| 3.2 Chiralität | 11 |
| Gewinnung von Enantiomeren | 14 |
| 3.3 Das Spektroskopische Verfahren der Circular dichroismus-Spektroskopie | 16 |
| Interaktionen zwischen Licht und Materie | 18 |
| Aufbau eines Circular dichrographen | 21 |
| 3.4. Chromatographie | 22 |
| 3.4.1 Allgemeiner Teil | 22 |
| <i>Verfahren</i> | 22 |
| <i>Trennprozess</i> | 25 |
| 3.4.2 Physikalisch-chemischen Grundlagen | 26 |
| <i>Van-Deemter</i> Gleichung | 26 |
| A-Term – Eddy-Diffusion | 26 |
| B-Term – Diffusion | 27 |
| C-Term – Stoffaustausch | 29 |
| 3.4.3 Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) | 29 |
| Prinzip der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) | 30 |
| Eluenten – Mobile Phase | 30 |
| Kontinuierlich arbeitende HPLC-Pumpe und Dosierschleife (Mehr-Wege-Ventil) | 32 |
| HPLC-Säulen - Stationäre Phase | 33 |
| Detektor und Auswerteeinheit | 34 |
| Chromatogramm-Parameter und mathematische Modelle | 35 |
| a) Parameter | 35 |
| b) Mathematische Modellgrößen | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.5. Chirale HPLC | 44 |
| 3.5.1 HPLC-Analytik | 45 |
| 3.5.1.1 Chirale stationäre Phasen (CSP) | 45 |
| Chirale Trennung durch Einschlusskomplexierung (Inclusionsphasen; Typ III) | 46 |
| Chirale Trennung auf Polysaccherid-Phasen (Polymere Helices; Typ II) | 50 |
| Einflussnahme der mobile Phasen auf die chiralen stationären Polysaccherid-Phase | 54 |
| Chirale Trennung auf Bürsten- oder <i>Pirkle</i> -Phasen (Typ I) | 56 |
| Chirale Trennung auf Protein-Phasen (Typ V) | 56 |
| Chirale Trennung auf Ligandenaustausch-Phasen (Typ IV) | 58 |
| Chirale Trennung auf Anionischen-Ligandenaustausch-Phasen | 59 |
| Chirale Selektoren als Zusatz zu achiralen Trennsystemen | 59 |
| Trennungen auf immobilisierte chirale Phasen | 61 |
| 3.5.1.2 Phasenmodi - zur Erweiterung der Möglichkeiten zur chiralen Trennung | 61 |
| Phasenmodi - Einflussnahme der mobile Phasen auf die chiralen stationäre Polysaccherid-Phase | 62 |
| 3.5.1.3 Phasenvergleiche | 63 |
| 3.5.1.4 Studien zu den Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase | 63 |
| 3.5.1.5 Chirale mobile Phasen | 64 |
| Der Einsatz von chiralen Selektoren | 64 |
| Der Zusatz von Elektrolyten | 65 |
| 3.5.1.6 Einfluss der Temperatur auf die Säulen | 66 |
| 4. Spezieller theoretischer Teil | 69 |
| Selbstorganisation | 70 |
| Rotaxane | 76 |
| Dendrimere | 77 |
| Molekularer Knoten - Knotane | 81 |
| 4.1 Trennung neuartiger supramolekularer Verbindungen mit Hilfe der chiralen HPLC | 87 |
| 4.1.1 Materialien und Methoden | 88 |
| Geräte und Zubehör | 88 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.2 Analyte | 92 |
| a) Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans | 93 |
| b) Diastereomeren-Trennung des chiralen Knotans | 95 |
| c) Versuch der Enantiomeren-Trennung von Bromyl-Octameren | 99 |
| d) Vergleich von verschiedenem chiralem Säulenmaterial bei der Enantiomeren-Trennung von Knotanen | 103 |
| Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans | 108 |
| Untersuchung der DMPC-I Säule durch die Enantiomeren-Trennung vom Decyl-Knotan | 110 |
| Untersuchung der verschiedenen <i>Francotte</i> -Säule durch die Enantiomeren-Trennung vom Bromyl-Knotan | 112 |
| Chiralcel [®] OD, DMPC-I und PMBC-I | 113 |
| Chiralpak [®] IA, DMPA-I, Chiralpak [®] AD und PECA-I | 115 |
| Untersuchung der Immobilisierung | 118 |
| 1) <i>DMPC-I und PMBC-I</i> | 118 |
| 2) <i>DMPA-I und PECA-I</i> | 121 |
| 3) <i>Chiralpak[®]IA</i> | 124 |
| e) Enantiomeren-Trennung des offenen Kleeblatt-Knotans | 126 |
| f) Enantiomeren-Trennung des Kleeblatt-Knotans | 130 |
| g) Reinigung von neuartigen Dendrimeren | 134 |
| 1) Trennung des POPAM-Dendrimers: Octasulfonimid | 135 |
| 2) Reinigung des PAMAM-Dansyl-Dendrimers: Octasulfonamid | 138 |
| 3) Reinigung des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers der 2. Generation | 139 |
| | |
| 5. Zusammenfassung | 143 |
| | |
| 6. Ausblick | 149 |
| | |
| 7. Experimenteller Teil | 156 |
| 7.1 Geräte und Zubehör | 156 |
| 7.2 HPLC-Säulen und Lösungsmittel | 157 |

| | |
|--|-----|
| 7.3 Enantiomerentrennung und Diastereomerentrennung der Knotane | 161 |
| 7.3.1 Bromyl-Knotan | 161 |
| 7.3.2 chirales Knotan | 167 |
| 7.3.3 Decyl-Knotan | 169 |
| 7.3.4 Octamer-Knotan | 171 |
| 7.3.5 offenes Klettblatt-Knotan | 173 |
| 7.3.6 Klettblatt-Knotan | 174 |
| 7.4 Reinigung und Trennung von Dendrimeren | 175 |
| 7.4.1 POPAM-Dendrimer: Octasulfonimide | 175 |
| 7.4.2 PAMAM- Dansyl-Dendrimer: Octasulfonamid | 178 |
| 7.4.3 Bis-Cyclam-Aza-Dendrimer der 2. Generation | 179 |
| 8. Literaturverzeichnis | 180 |
| 9. Publikationen | 187 |
| 9.1 Veröffentlichungen im Rahmen der Diplomarbeit | 187 |
| 9.2 Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion | 187 |
| 9.3 Posterbeiträge | 187 |
| 10. Dank | 189 |
| Lebenslauf | 191 |

1. Einleitung

Die Natur arbeitet seit Jahrmillionen mit Strukturen im Nanomaßstab, wobei diese als selbständige „Maschinen“ z.B. in der lebenden Zelle funktionieren. Wie das Molekül Myosin, ein Protein, welches an der Muskelkontraktion beim Menschen beteiligt ist und als winzige natürliche molekulare Maschine gesehen werden kann ^[1,2]. In den letzten Jahren wird an einem nur wenige Nanometer großem künstlichen Myosin-Motor gearbeitet ^[3-6]. Die Idee dieses Prinzips, Maschinen im Nanomaßstab zu konstruieren, ist von der Natur abgeschaut worden. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen jedoch ähnlich effiziente Makromoleküle synthetisiert werden wie sie bei ihren biologischen Vorbildern vorzufinden sind. D.h. den synthetisierten Molekülen oder Molekülverbänden kann eine Aufgabe zugeteilt werden und die Umsetzung wird als Ergebnis abgefragt (z.B. der künstliche Myosin-Motor bewegt sich bei Stimulierung gezielt rückwärts).

Um diesen Forschungsbereich mit dem Begriff „Nano“ entwickelte sich ein Technologiefeld, welches neue Materialien für die Anwendungen in der Krebstherapie (Sensor für die Krebsdiagnose) bis hin zum Computerchip hervorbrachte. Noch findet die Nanotechnik eher Anwendung bei Lowtech-Produkten, wie z.B. in Lacken, Kunststoffen (Antihafbeschichtungen für Badezimmerarmaturen und Druckwalzen) und Lotionen (verbesserter UV-Schutz von hochtransparenten Sonnencremes) oder zur Steigerung der Ausbeute bei chemischen Prozessen durch Katalysatoren mit nanostrukturierter Oberfläche ^[7]. So gibt es bereits wasserabweisende Duschkabinen, selbstreinigende sowie Bakterien abtötende Oberflächenschichten und in den nächsten Jahren kommen adaptive Oberflächen, die sich den äußeren Gegebenheiten anpassen, hinzu. Eine Idee ist z.B., Nanoteilchen in Fensterscheiben von Autos einzuarbeiten, da sich das Absorptionsverhalten dieser Nanoteilchen bei stärker werdendem Sonnenlicht verändert und der Innenraum wird abgedunkelt. Molekülstrukturen im Nanobereich die schon industrielle Verwendung finden, sind die im Jahr 1991 von dem Japaner *Iijima* entdeckten Nanoröhren ^[8]. Diese Nanoröhrchen sind aus Kohlenstoff, 50000-mal dünner als ein menschliches Haar, federleicht, ein russähnlichen schwarzen Material, welches wie eine Rolle aus molekularem Maschendrahtzaun aussieht (Abb. 1). Werden die Röhrchen in Kunststoff eingerührt, erreicht dieser eine sehr hohe Festigkeit. Beim Automobilbau wird dieser Kunststoff für stabile und leichte Stoßfänger verwendet. Durch Verspinnen der miteinander verwobenen Röhrchen zu meterlangen, reißfesten Fasern, können federleichte schussichere Westen hergestellt werden.

1. Einleitung

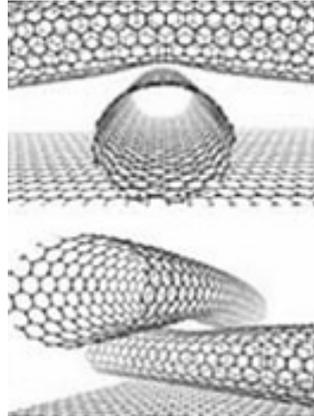


Abb. 1: Die Nanoröhren von Iijima ^[3]

Eine elektrische Eigenschaft der Nanoröhren ist das Aussenden von Elektronen bei kleiner Stromzufuhr. Mit den drei bis zehn millionstel Millimeter und streng parallel angeordneten Nanoröhren konnte ein Prototyp des Röhrendisplays zum Erstrahlen gebracht sowie das Auflösungsvermögen von Elektronenmikroskopen gesteigert werden ^[10].

Als einen Ausblick für die Zukunft wird der gezielte Zusammenbau von Maschinen oder Computern aus einzelnen Atomen und Molekülen gesehen.

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Aufreinigung und Trennung verschiedener supramolekularer Spezies, wie den Knotanen und Dendrimern (Abb. 2).

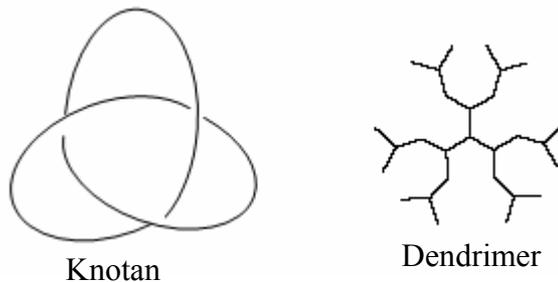


Abb.2: Strukturen eines Knotans und eines Dendrimers

Vögtle et al. entdeckte im Jahr 2000 einen molekularen Knoten („Knotan“) des Amid-Typs ^[11], dessen Synthese ohne Hilfstemplate auskommt. Jedoch ergaben sich Schwierigkeiten bei der Enantiomertrennung auf einer kommerziellen Chiralpak[®]AD Säule. Dieses Knotan (Abb. 3), ein Kleeblattknoten, ist nur in lipophilen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Dichlormethan löslich. Bei den Säulen Chiralpak[®]AD und Chiralcel[®]OD quillt durch die Verwendung von lipophilem Lösungsmittel als Teil der mobilen Phase das physisorbierte Amylose- bzw. Cellulose-tris(3,5-dimethylphenyl)carbammat auf, die Säule blutet aus. Dadurch verliert die stationäre Phase ihre Trenneigenschaften.

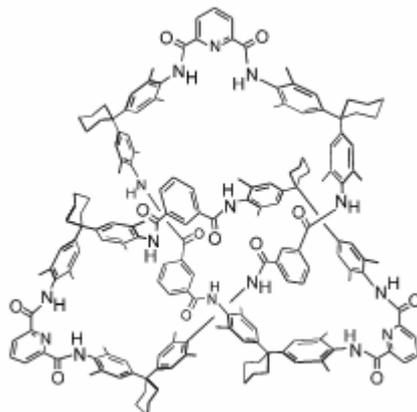


Abb. 3: Struktur des von Vögtle et al. synthetisierte Kleeblatt-Knotens

Die Knotane konnten aufgrund ihrer eingeschränkten Löslichkeit bislang nur von Okamoto et al. auf nicht kommerziell erhältlichen Chiralpak[®]AD bzw. Chiralcel[®]ODSäule in die Enantiomere getrennt werden ^[11].

2. Ziel der Arbeit

Bei diesen stationären Phasen ist das chirale Säulenmaterial kovalent an einen Silicagelträger gebunden, wodurch lipophile Lösungsmittel in der mobilen Phase verwendet werden können (im Gegensatz zu den nicht-kovalent gebundenen Säulenmaterial der Chiralpak[®] AD Säule). Durch die Arbeit von *Kaufmann*^[12] aus dem Arbeitskreis *Vögtle* konnten einige Knotane auf dem Säulenmaterial Chiral-2[®] [N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-D-phenylglycin] der Firma *Macherey und Nagel* getrennt werden. Die Trennleistung dieses Säulenmaterial, einer von *Pirkle* et al. entwickelten stationären Phase^[13,14], basiert auf ihren Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und π -Donor-Wechselwirkungen mit der Probensubstanz. Zudem kann diese Säule mit lipophilen Lösungsmitteln betrieben werden. Trotzdem konnte bei der Enantiomerentrennung von Knotane mit der Chiral-2[®] Säule keine Basislinientrennung erreicht. Ziel dieser Arbeit war es nun weitere chromatographische Möglichkeiten zur Trennung von verschiedenen Knotanen in ihre Enantiomere zu finden. Gleichzeitig sollten die Parameter Fließgeschwindigkeit und stationäre sowie mobile Phase, die eine HPLC-Trennung beeinflussen, untersucht und optimiert werden. Durch die Variation dieser Parameter sollte eine Möglichkeit gefunden werden, den Zusammenhang zwischen stationärer Phase, mobiler Phase sowie der Probensubstanz zu automatisieren. D.h. für homologe Verbindungen, wie den Knotanen, können die gleichen oder sehr ähnliche Trennungsbedingungen verwendet werden und eine Verbesserung der Bedingungen für jede einzelne Substanz wird nicht benötigt.

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit die Fragestellung bezüglich des angenommenen Mechanismus einer Knotanbildung überprüft werden. Hierfür gibt es zwei Bildungswege, wie in Abbildung 4 gezeigt^[15]. Zum einen können die Knotane aufgrund ihrer einfachen, sich selbst organisierenden Komponenten intermediär eine kurze als auch eine lange helicale Schleife bilden. Die kurze Schleife dient einem verlängerten Diamid-Baustein als Templat, während die lange Schleife durch eine spezifische gefaltete Konformation des Fadens aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommt. Beide Alternativen sind möglich. So faltet sich der längere Faden, ein Decaamid, zu einer helicalen Schleife, fädelt mit dem restlichen teil des Fadens selber durch diese entstandene Schleife und bildet dadurch einen offenen Knoten. Abschließend reagieren die beiden terminalen Aminogruppen mit einem Säuredichlorid, so dass ein Knotan entsteht. Bei der anderen Möglichkeit besteht eine intermolekulare Wirt-Gast-Komplexierung zwischen dem kurzen Faden, einem Hexaamid, und einem verlängerten Baustein. Mit Hilfe von zwei Säuredichloriden wird der „zweifach offene Knoten“ geschlossen.

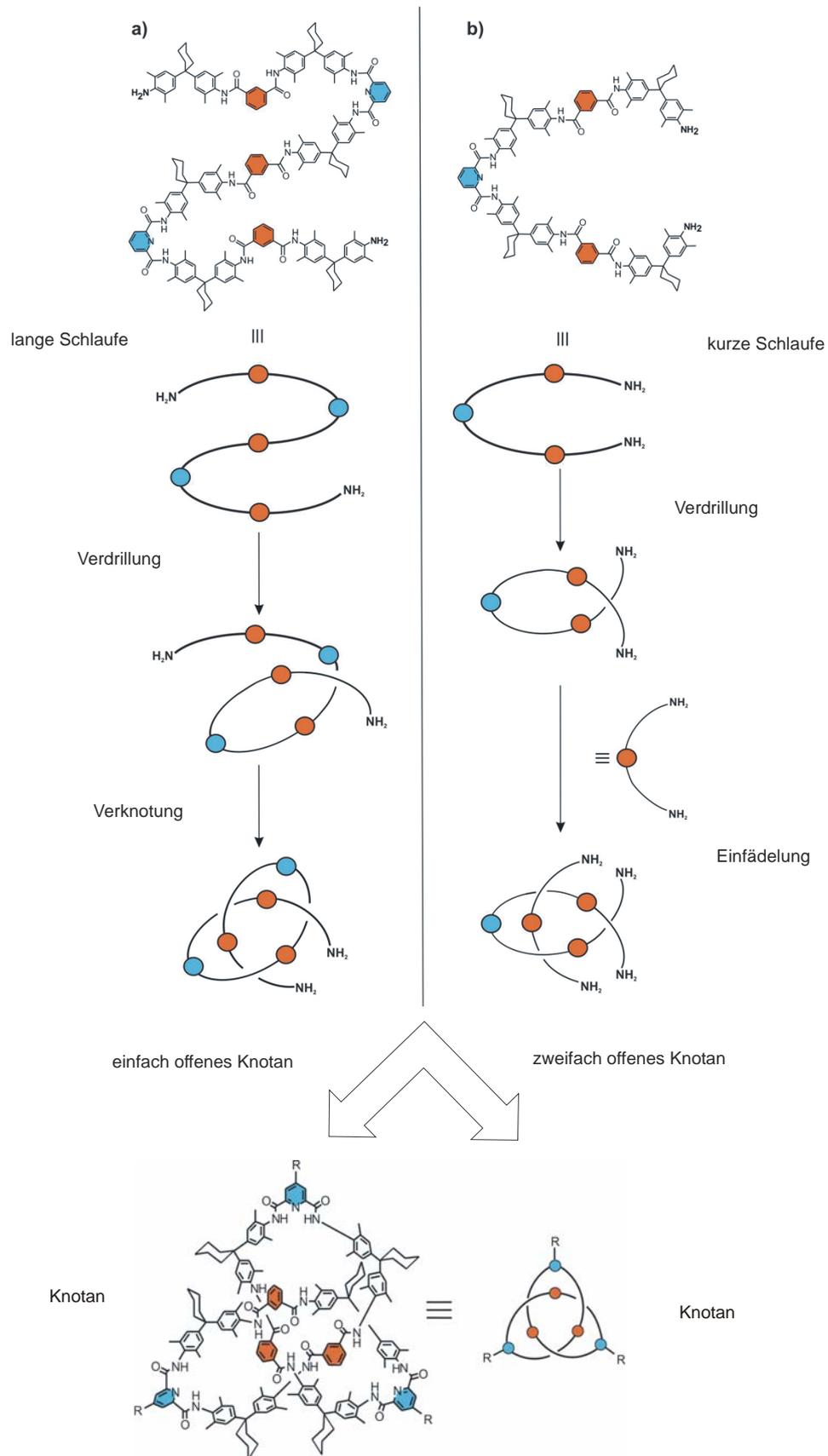


Abb. 4: Mechanistische Alternativen für die Knotan-Bildung: a) über den langen Faden, ein Decamid und b) über den kurzen Faden, ein Hexamid.

2. Ziel der Arbeit

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand in der Untersuchung, ob die von *Vögtle* et al. synthetisierten Dendrimere (Abb. 5) ^[16] in das gewünschte Produkt sowie ihre Nebenprodukte zu trennen sind. Dendritische Strukturen weisen aufgrund der Art ihrer Synthese an den Verzweigungseinheiten bzw. Linkergruppen Defekte auf.

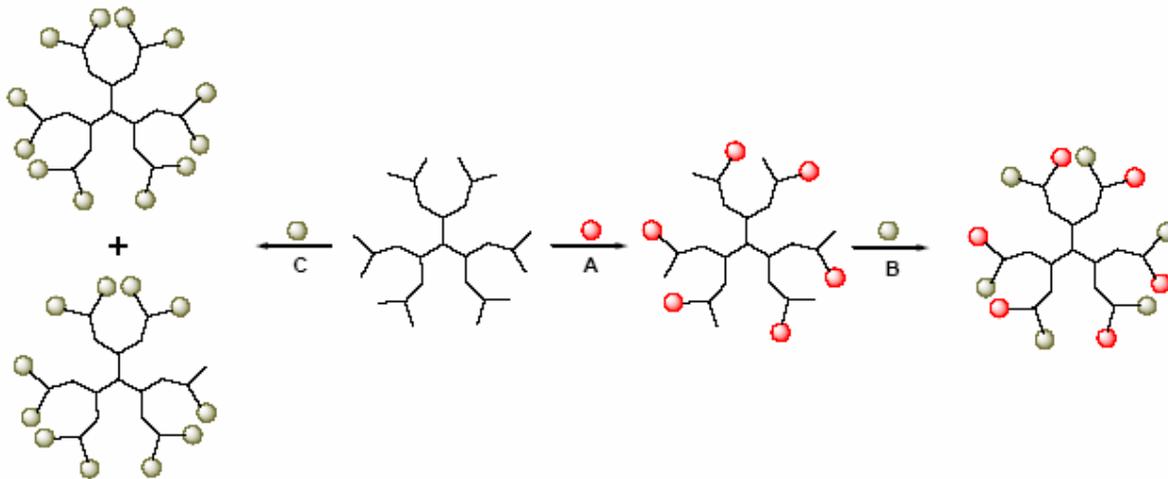


Abb. 5: Verschiedene Reaktionswege zur Funktionalisierung von Dendrimern

Von *Vögtle* et al. wurde im Jahr 1978 eine repetitive Syntheseroute zur Darstellung von Kaskadenmolekülen ^[17] beschrieben, die später zum Aufbau der POPAM-Dendrimere herangezogen wurde ^[18]. Die so synthetisierten Dendrimere besitzen als Verzweigungseinheit einen trisubstituierten Stickstoff, ebenso die von *Tomalia* et al. im Jahr 1985 nach der gleichen repetierenden Synthese hergestellten PAMAM-Dendrimere ^[19]. Durch verschiedenen Verzweigungsbausteinen sowie dendritischen Substituenten können Dendrimerverbindungen mit aufsteigenden Generationen dargestellt werden. Selbst bei der selektiven (sequenzspezifisch und regioselektiv) kontrollierten Funktionalisierung nach *Vögtle* ^[20] konnten bei der Charakterisierung der Verbindungen Strukturdefekte festgestellt werden.

3. Theoretischer Teil

3.1 Selbstorganisation

Eine zunehmende Organisation in immer größeren Zusammenhängen lässt sich vom Urknall bis zur Entstehung der Pflanzen und Tiere verfolgen. Subatomare Partikel werden zu Atomen, diese zu kleinen Moleküle, welche sich zu Makromolekülen zusammenfinden, die wiederum Zellen bilden und dann Vielzeller. Die Großenskala von Femtometern bis zu 30 m kann dabei durchlaufen werden ^[22]. An einem Beispiel der Rekonstruktion eines natürlichen Systems („Assembly-Systeme“) soll das Phänomen Selbstorganisation verdeutlicht werden:

Das Ribosom des Darmbakteriums *Escherichia coli*, der Ort wo die bakteriellen Proteine hergestellt werden, besteht aus einer großen und kleinen Untereinheit, welche drei RNA-Moleküle und 52 verschiedene Proteine enthält. Diese Substanz wird nun in seine einzelnen Komponenten getrennt und gereinigt. Anschließend werden die so in wässriger Lösung erhaltenen Moleküle für die kleine ribosomale Untereinheit wieder zusammengesüttet und es bildet sich von selber die funktionsfähige kleine Untereinheit. Bei der großen ribosomalen Untereinheit wird zuerst die RNA mit einer bestimmten Teilgruppe der Proteine gemischt und dann die übrigen Proteine hinzugefügt, um eine Untereinheit zu erhalten. Werden die beiden Untereinheiten zusammengegeben, bildet sich wieder das vollständige und funktionsfähige Ribosom ^[22-24].

An diesem Beispiel wird verdeutlicht, dass in vielen Molekülen und Molekülstrukturen ihre Wechselwirkungsweise schon enthalten ist und daher von selber funktionsfähige „Maschinen,, bilden können. In der supramolekularen Chemie wird für den Aufbau komplexer Systeme aus kleinen Bausteinen, nach dem Baukastenprinzip, schwache Wechselwirkungen ^[25,26] und Selbstorganisation zu Hilfe genommen. Es sind selbstassemblierende Strukturen mit dem Potential zu komplexen Funktionen. So stapelt *Ghadiri* Peptidringe zu Ionenkanälen ^[27,28], *Seeman* baut poröse Strukturen aus maßgeschneiderter DNA-Molekülen auf ^[29], *Lehn* vermischt verschiedene Bausteine zu einem künstlichen Self-Assembly oder *Stoddart* lässt eine molekulare Eisenbahn auf einen Ring mit Start- und Stop-Signalen fahren ^[30]. Um in diesen Mechanismus der Bildung von Molekülstrukturen durch supramolekulare Schablonen (Template) und der Faltung von Moleküle Einblicke zu erhalten, untersucht *Vögtle* die Verschlingungsweise und -art molekularer Knoten (Knotanen) ^[15].

Schlüssel-Schloss-Prinzip, Wirt-Gast-Chemie oder molekulare Erkennung

E. Fischer vertrat im Jahr 1894 seine Hypothese „Die Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat findet nur dann statt, wenn beide komplementäre Strukturen enthalten“ in der Publikation über den „Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme“^[31]. Dabei verwendete er das Bild, dass das Enzym sich zu dem Glycosid wie ein Schlüssel zum entsprechenden Schloss verhalten muss, damit sie eine chemische Wirkung aufeinander ausüben können (Abb. 6).

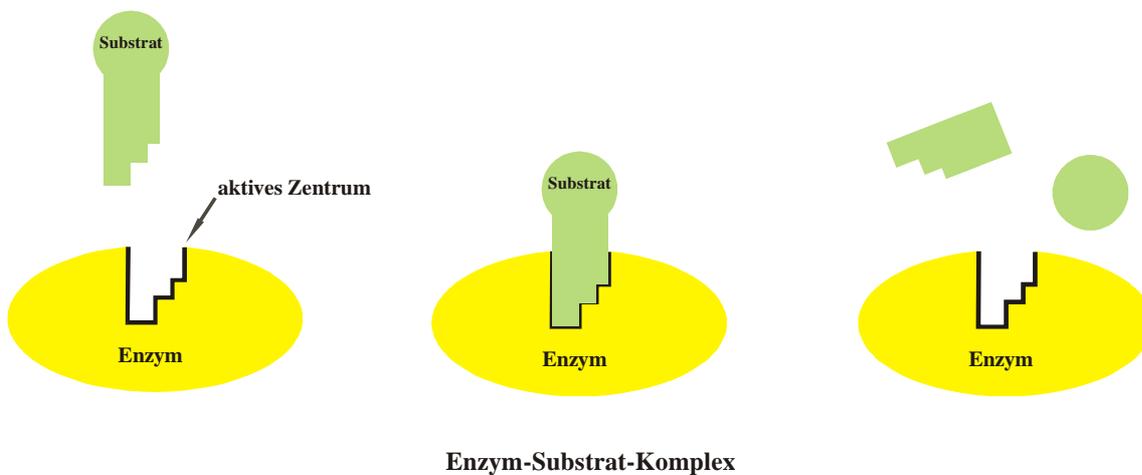


Abb. 6: E. Fischers Bild vom Schlüssel-Schloss-Prinzip

Er konnte diesen Gedanken jedoch nicht weiter verfolgen, da zu der damaligen Zeit noch keine Strukturuntersuchungen an Enzymen möglich waren. Im Jahr 1958 gelangte Koshland zu der Erkenntnis, dass viele Enzyme nicht starr sind, sondern sich durch die Wechselwirkungen mit dem Substrat der Passform anpassen („induced fit“) wie moderne Sicherheits-Schlüssel^[32]. Heutzutage ist das Schlüssel-Schloss-Prinzip in der Enzymologie unter dem Namen molekulare Erkennung bzw. in der Chemie unter dem Begriff Wirt-Gast-Chemie bekannt.

Ein neuer Ansatz der supramolekularen Chemie in diesem Gebiet ist das Design von „künstlichen Enzymen“, bekannter unter dem Namen „de novo Design von Proteinen“^[33-36].

In den 80er Jahren wurden Cyclodextrine (Abb. 7) benutzt, dessen ringförmige Mitte eine Art Bindungstasche für hydrophobe Verbindungen bildet (Abb. 8).

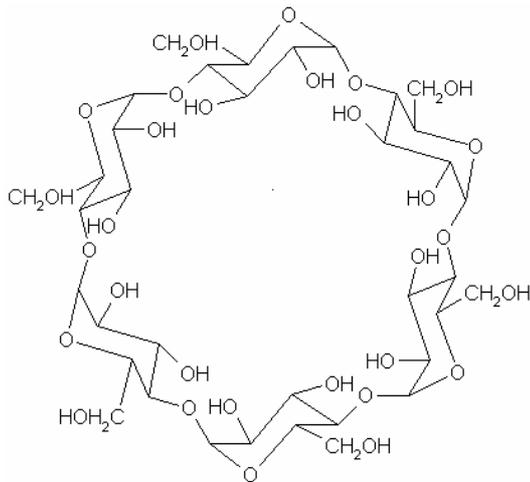


Abb.7: Das einfachste Cyclodextrin besteht aus sechs Glukosemolekülen

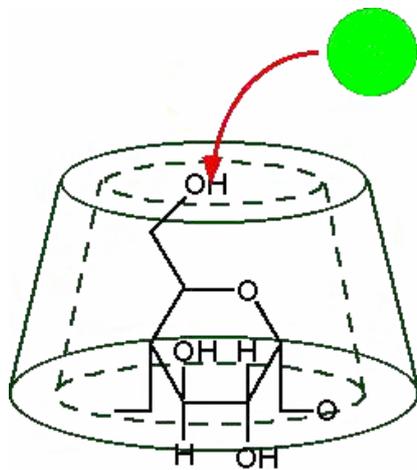


Abb. 8: Bei den Cyclodextrinen wird der konusförmige Hohlraum als eine Art Bindungstasche für hydrophobe Verbindungen benutzt

In neuerer Zeit werden Porphyrine (Abb. 9) verwendet, welche in der Natur z.B. in Chlorophyll oder in Hämoglobin zu finden sind ^[37-39].

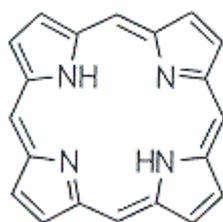


Abb. 9: Porphyrin-Ring

3. Theoretischer Teil

Zu neuen Bindungs- und Katalysewegen gelangte *Sanders et al.* (Cambridge) ^[40]. Sie synthetisierten einen Ring aus drei Porphyrin-Ringen, mit je einem Zink-Ion in der Mitte, die über Verbindungsstücke miteinander verknüpft sind. Die eingelagerten Zink-Ionen können elektronenreiche Molekülteile binden und durch diese Erkennung können Reaktionen beschleunigt werden, in diesem Fall die Diels-Alder-Reaktion. (Unter normalen Reaktionsbedingungen wird bei dieser Reaktion durch die kinetische Kontrolle das endo-Produkt gebildet, in Anwesenheit des Triporphyrins entsteht aus Stabilitätsgründen bevorzugt das exo-Produkt. ^[41]) Zu einem Enzym gehört auch ein Hemmstoff (Inhibitor). Bei dem Triporphyrin werden die drei Zink-Ionen gleichzeitig durch je ein Pyridin blockiert, welches mit dem Substrat um die Bindungsstelle konkurriert. Einziges Problem ist noch, dass dieses künstliche Enzym sein Reaktionsprodukt nach der Synthese behält. Mit Hilfe von solchen Hohlräumen im molekularen Maßstab lassen sich verschiedenartige Moleküle trennen. Kleinere Moleküle passen hinein, größere schwimmen daran vorbei oder einige Moleküle binden sich an die Innenfläche.

Im Jahr 1967 entdeckte *Pedersen* sogenannte Ionentransporter, die zu der Substanzklasse der Kronenether gehören ^[42]. Durch die Sauerstoffatome der Ethergruppen, können Metall-Ionen gebunden werden. So kann ein Metall-Ion kann mit Hilfe des Kronenethers als Transporter durch eine Membran geschleust werden. Hierbei durchwandert der Kronenether die Membran im Pendelbus-Prinzip (da die Außenseite wasserabweisend genug ist). Ringe aus zyklischen Peptiden, bestehend aus acht natürlichen oder synthetischen Aminosäuren, können sich bei entsprechenden Eigenschaften selbst zu Kleinströhrchen mit oder ohne eine Orientierung zusammenlagern. Lagern sich Peptid-Ringe in eine Membran ein, so bildet sich ein Tunnel durch den Ionen fließen können (Abb. 10).

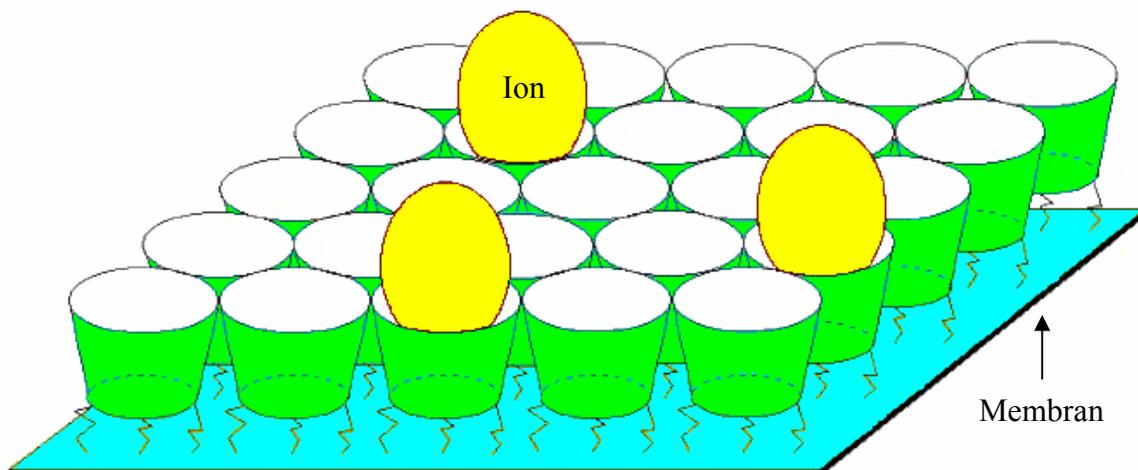


Abb. 10: Peptid-Ringe lagern sich in eine Membran und bilden so Tunnel durch die Ionen fließen können

In den 80er Jahren konnte aus gut wasserlöslichen Cyclodextrinen mit vielen langen, wassermeidenden Schwänzen, die einen „Halbkanal“ bilden“, ein Tunnel synthetisiert werden [28]. Die Cyclodextrin-Ringen dienen hierbei als „Ein- und Ausfahrt“ von zwei dieser „Halbkanäle. *Lehn* (Collège de France, Paris) ging den umgekehrten Weg, indem er den Ring in die Mitte der Membran setzte [42]. Diese sogenannten Bukettmoleküle werden aus einem Kronenether mit aufgesetzten langkettigen linearen Molekülen, wie Polyether, gebildet. Die Kettenmoleküle strecken, parallel zur Symmetrieachse des zentralen Rings, ihre „Köpfe“ aus der Membran in beide Richtungen heraus, wodurch Natrium- und Lithium-Ionen die Membran passieren können. Diese Kanäle aus dem „Ring-mit-Fransen-Prinzip“ sind nicht so wirkungsvoll wie die Peptid-Nanoröhren.

3.2 Chiralität

In der Natur finden sich viele Beispiele für Spiegelungen. So hat eine linke Hand die gleichen Furchen wie die rechte und das eine Ohr ähnelt dem anderen, sie sind eben nur spiegelverkehrt. In der Chemie gilt entsprechendes: Enzyme, Alkohole oder Säuren kommen häufig als Bild und Spiegelbild vor. Ein kleiner Unterschied, der aber große Auswirkungen z.B. auf die Wirksamkeit von Medikamenten hat. Dieses Phänomen wird Chiralität oder Händigkeit genannt und kommt aus der Stereochemie (griech. stereos = starr). Da die Chiralität ein mathematisch geometrisches Phänomen beschreibt, wird der chirale Teil eines Moleküls nach der ihr zugrunde liegenden Geometrie bezeichnet. Die klassischen Arten der Chiralität werden unterschieden nach zentrale, planare, axiale und helicale Chiralität [43].

- Zentrale Chiralität: Moleküle mit einem stereogenen Zentrum (Chiralitätszentrum), welches durch deren tetrahedralen geometrische Asymmetrie zustande kommt.
- Planare Chiralität: Moleküle mit einer stereogenen Ebene (Chiralitätsebene)
- Axiale Chiralität: Moleküle, in denen sich eine Achse mit mindestens zwei Substituentenpaaren beschreiben lässt. Hierbei sind die Substituenten eines Paares verschieden und dürfen nicht in einer Ebene liegen
- Helicale Chiralität: Moleküle mit einer helicalen Struktur, z.B. Nucleinsäure, Zucker oder Peptide.

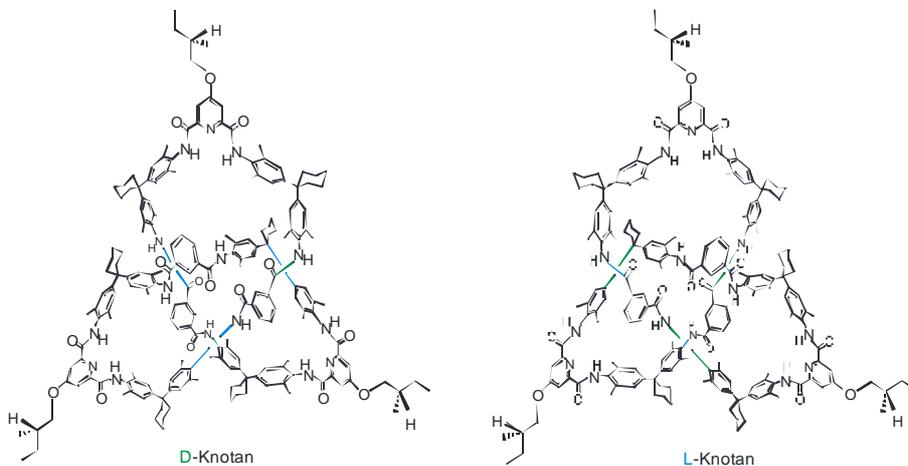
Durch die Steuerung der Kristallisation mit Hilfe von chirale Biomoleküle weisen makroskopische Objekte eine Händigkeit auf, sogar wenn die Bausteine achiral sind, so wie bei den gewundenen Schneckenhäusern (Abb. 11).

3. Theoretischer Teil



Abb. 11: Helicale Chiralität (griech. cheir = Hand) bei der Windungsrichtung des Gehäuses der bunten Baumschnecke (*Liguus virgineus*)^[44a].

Der Begriff der topologischen Chiralität wurde erst mit der Entdeckung der supramolekularen Chemie eingeführt. Mit Hilfe der topologischen Chiralität wird die äußere Gestalt eines unendlich flexiblen Moleküls beschrieben, wobei das topologische Objekt trotz der unendlichen Flexibilität nicht in sein Spiegelbild überführt werden kann^[44b].



Lord Kelvin (1893):
 “Ich nenne jede geometrische Figur oder jede Gruppe von Punkten chiral und sage, dass sie Chiralität besitzt, wenn ihr Bild in einem ebenen Spiegel, in Gedanken realisiert, nicht mit ihr zur Deckung gebracht werden kann.”

Lord Kelvin (1893):
 “Ich nenne jede geometrische Figur oder jede Gruppe von Punkten chiral und sage, dass sie Chiralität besitzt, wenn ihr Bild in einem ebenen Spiegel, in Gedanken realisiert, nicht mit ihr zur Deckung gebracht werden kann.”

Abb. 12: Definition der Chiralität von Lord Kelvin^[45]

Somit werden Substanzen mit unterschiedlicher dreidimensionaler Anordnung (Konfiguration) im Raum als Stereoisomere bezeichnet, die nur durch Bindungsspaltung interkonvertieren können. Stereoisomere mit mehreren stereogenen Zentren kommen als Enantiomere (Spiegelbilder, deckungsgleich) sowie Diastereomere (Spiegelbilder, nicht deckungsgleich) vor (Abb. 13).

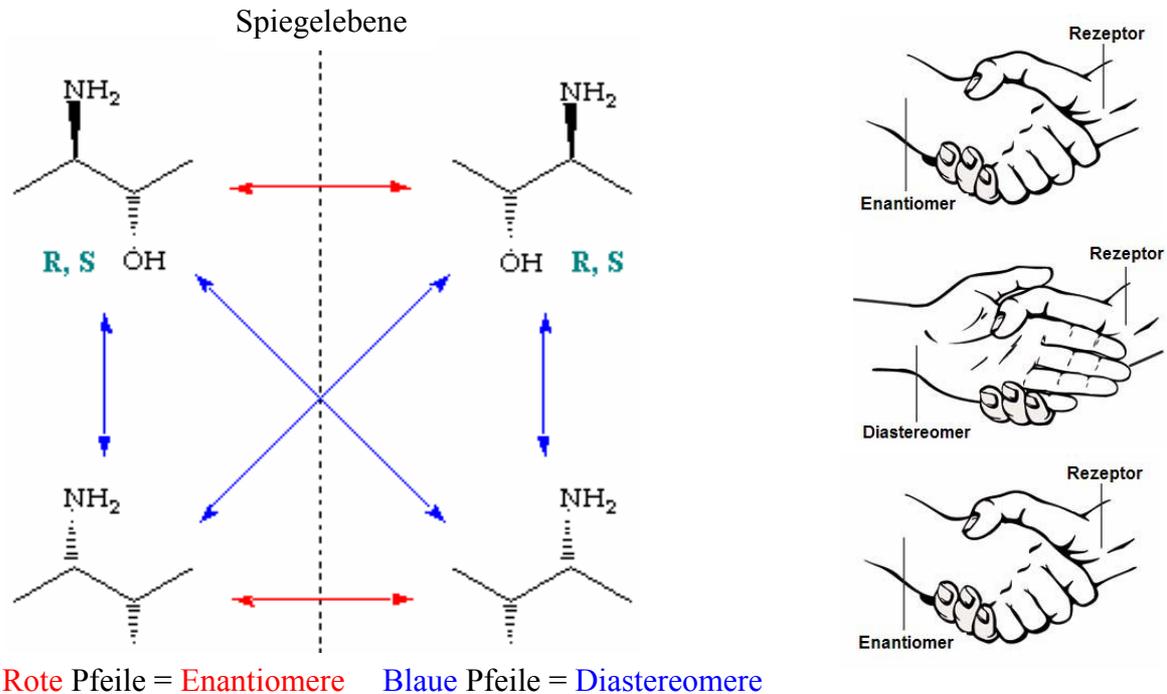


Abb. 13: Enantiomerenpaare und Diastereomerenpaare

Für jedes stereogene Zentrum mit n Chiralitätszentren gibt es 2^n Stereoisomere, da es in zwei möglichen Konfigurationen auftreten kann. Jedes Stereoisomer besitzt ein Enantiomer, wodurch 2^{n-1} Enantiomerenpaare bei 2^n Stereoisomeren auftreten und jedes Enantiomerenpaar diastereomer zu den anderen Paaren ist. Jedoch kann durch immanente Symmetrieelemente ein Stereoisomer achiral (meso-Form) sein oder ein Zentrum seine Stereogenität verlieren, dadurch kann die Anzahl der Stereoisomere unter die Anzahl von 2^n sinken.

Enantiomere (griech. enantion = Gegenteil) verhalten sich zueinander wie Bild und Spiegelbild und sind nicht miteinander zur Deckung zu bringen (Abb. 14). Ihre physikochemischen Eigenschaften wie z. B. gleiche Schmelzpunkte, Dichten, IR- und UV-Spektren sind identisch. Wenn optische Aktivität auftritt, sind sie in ihren chiroptischen Eigenschaften unterscheidbar. In der Polarimetrie wird diese Fähigkeit, Drehung der Ebene linear polarisierten Lichts, genutzt, wobei sich Enantiomere nur durch die Drehrichtung, nicht aber im Betrag der Drehung unterscheiden.

3. Theoretischer Teil

Diastereomere (griech. dia = auseinander) sind zwei Stereoisomere, die sich nicht wie Enantiomere zueinander verhalten. Sie können durch keine Symmetrieoperation ineinander überführt werden, besitzen unterschiedliche physikochemische Eigenschaften und sind relativ leicht zu trennen.

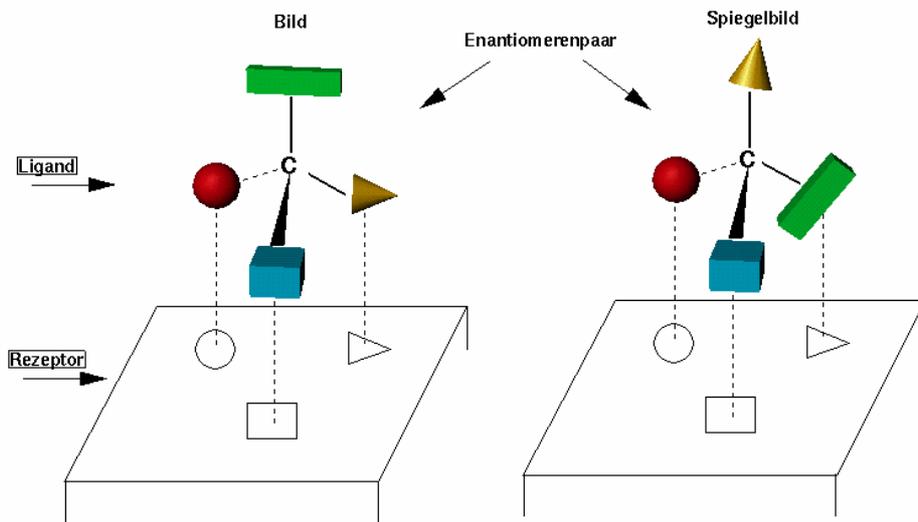


Abb. 14: Enantiomere verhalten sich wie Bild und Spiegelbild

Gewinnung von Enantiomeren

Die Reinheit chiraler Substanzen wird immer wichtiger. Je nach Form –Bild oder Spiegelbild – ruft ein Wirkstoff im Körper physiologisch ganz unterschiedliche Reaktionen hervor. Zu trauriger Berühmtheit gelangte das Beruhigungsmittel Contagan, dessen Wirkstoff *Thalidomid* (Abb. 15) in der Originalform, als Racemat, zahlreiche Föten geschädigt hat. Die R-Form enantiomerenrein dagegen hat nicht nur die gewünschte Wirkung, sondern zeigt auch keine Nebeneffekte.

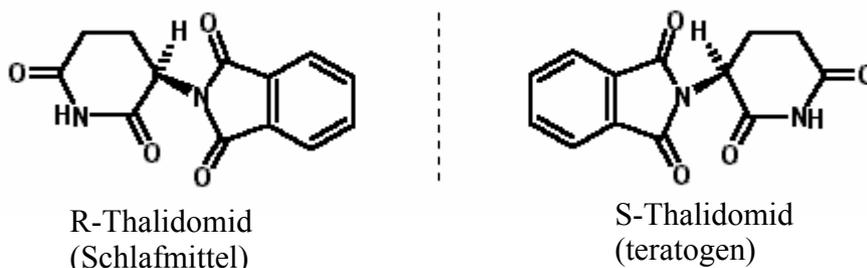


Abb. 15: Die Strukturen des Enantiomerenpaares *Thalidomid*

In neun von zehn Arzneimitteln, vom Fettsenker *Atorvastatin* bis zum Entzündungshemmer *Fluticasone*, sind heute chirale Moleküle am Werk. Nach Möglichkeit soll immer nur eine Sorte, das Bild oder Spiegelbild eines Moleküls, vorliegen. Vorteil der strukturreinen Substanzen: Die Effizienz der Produkte steigt. Landwirte brauchen weniger Pestizide, Ärzte können Medikamente mit weniger Nebenwirkungen verschreiben. Somit sind die verschiedenen Möglichkeiten der Gewinnung von Enantiomeren, vor allem bei den differentiellen Wirkungen der Xenobiotika (Pharmaka, Pestizide, Nahrungs- und Genussmittel, Duft- sowie Riechstoffe) von großem Interesse.

Pasteur konnte im Jahr 1848 aus einer übersättigten Lösung des Ammoniumsalzes der optisch inaktiven Traubensäure zwei Arten von Kristalle mit Hilfe eines Mikroskops und einer Pinzette isolieren^[46]. Sie verhielten sich wie Bild und Spiegelbild zueinander. Als er von den getrennten Kristallen die optischen Eigenschaften in einem Polarimeter vermaß, ergab sich mit einigen Kristallen eine rechtsdrehende Lösung, während die anderen Kristalle das polarisierte Licht um genau den gleichen Betrag in die entgegengesetzte Richtung drehte. Daraus leitet *Pasteur* die Chiralität (Händigkeit) der Kristalle und anschließend die Chiralität der Moleküle ab.

In der heutigen Zeit können die Spiegelbilder einer symmetrischen, nicht chiralen, Verbindung durch lebende Zellen getrennt werden. Auf kultivierten Nierenzellen des Krallenfroschs *Xenopus laevis* wird eine gemischte Kristallsuspension des Calciumtartrates, Salz der Weinsäure, aufgetragen. In den ersten Stunden des Zellwachstums besiedeln die scheinbar gleichen Kristalle bestimmte Flächen der RR-Enantiomere, dies führt zu einer Trennung der enantiomeren Formen. Daraus schloss der Arbeitskreis um *L. Addadi* (Weizmann-Institut in Rehovoth, Israel), dass die Moleküle der Zelloberfläche die Chiralität aus den aufbauenden Molekülen in die identischen Kristallformen erkennen können^[47-49]. Zu dieser Art von Kristallisation gehört auch ein bekannter physiologischer Vorgang, der Gichtanfall. Kristalle eines Harnsäure-Salzes reichern sich in einem Gelenk an und werden vom Immunsystem, den Antikörpern, als Fremdstoff erkannt. Diese sind auf Makromoleküle und Zellen eingerichtet, die Bildung der Kristalle im Keimstudium (Nukleation) wird angeregt sowie gefördert. Es kommt zur Auslösung einer Entzündungsreaktion, in gelöster Form setzt bei der gleichen Verbindung keine Immunantwort ein.

Neben der Verwendung von optisch reinen Edukten aus der Natur, gibt es nach *Tietze* und *Eicher* (1991) für synthetisierte racematische Verbindung verschiedene Arten der Racemat-Spaltung. Die Trennungsmöglichkeiten können wie folgt unterteilt werden^[50]:

3. Theoretischer Teil

- mechanische Trennung, hierzu sind optimale Bedingungen für die Kristallisation notwendig.
- biochemische Prozesse, hierbei werden prochirale Verbindungen in biologischen Systemen zur selektiven Veränderung eines der beiden Enantiomere umgesetzt (Organismen, zellfreie Enzymsysteme oder reine Enzyme).
- differentielle Reaktivität, hierzu gehört die asymmetrische Synthese mit:
 1. diastereoselektiven Reagentien, d.h. Verwendung optisch reiner Hilfsstoffe, werden nach der Umsetzung wieder abgespalten.
 2. enantioselektive Reaktionen, d.h. eine prochirale Verbindung reagiert mit einem optisch aktiven Reagenz. Hinzu kommt noch ein optisch aktives Lösungsmittel oder ein optisch aktiver Katalysator.

3.3 Das Spektroskopische Verfahren der Circular dichroismus-Spektroskopie

Im Jahr 1808 entdeckte *Malus* ^[51] das polarisierte Licht und in den Jahren 1811 und 1815 konnten *Arago* ^[52] und *Biot* die ^[53] Wellenabhängigkeit der optischen Aktivität nachweisen. D.h. die Ebene des linear polarisierten Lichtes wird durch eine chirale Substanz in Abhängigkeit von der Wellenlänge unterschiedlich stark gedreht. Die Theorie der transversalen Wellen des Lichtes führte *Fresnel* ^[54] ein und im Jahr 1822 entdeckte er das circular polarisierte Licht mit der Unterscheidung zwischen links- und rechts-polarisiertem Licht. Den Grundstein für eine in der heutigen Zeit gängige Untersuchungsmethode für chiroptische Eigenschaften von Molekülen legten im Jahr 1847 bzw. 1895 *Haidinger* ^[55] und *Cotton* ^[56]. Sie entdeckten den Circular dichroismus, der jedoch erst 65 Jahre später zu dem Bau des ersten kommerziell erhältlichen CD-Spektralpolarimeter führte. Die Circular dichroismus-Spektroskopie, meistens mit „CD“-Spektroskopie abgekürzt, ist eine Form der Absorptionsspektroskopie im UV/Vis-Bereich. Unter Circular dichroismus wird die unterschiedliche Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht durch eine optisch aktive Substanz verstanden, auch *Cotton-Effekt* ^[56] genannt. Ein chirales Molekül dreht die Ebene circular polarisierten Lichtes und bei Enantiomeren erfolgt dies um den gleichen Betrag, nur mit unterschiedlichen Vorzeichen, so dass spiegelbildliche Kurvenverläufe der *Cotton-Effekte* erhalten werden. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann die räumliche Anordnung von Molekülen nach Bild und Spiegelbild unterschieden werden.

Unter Licht wird in der Physik sinusförmig ausbreitende, elektromagnetische Strahlung bzw. Wellen verstanden. Diese Wellen setzen sich aus den beiden Feldvektoren H und E zusammen. Mit dem Feldvektor E wird die orts- als auch zeitabhängige elektrische Komponente beschrieben und mit dem Feldvektor H die magnetische Komponente, wobei die beiden Feldstärken senkrecht zueinander sowie zu der Ausbreitungsrichtung stehen. Mathematisch wird dieser physikalische Zusammenhang durch die *Maxwellschen Gleichungen* ^[57] ausgedrückt. Bei natürlichem Licht stehen die elektrischen Feldvektoren in unterschiedlichen Winkeln zu der Ausbreitungsachse. Linear polarisiertes Licht wird erhalten, wenn alle elektrischen Feldvektoren parallel zueinander stehen. Dagegen rotiert der Feldvektor E bei circular polarisiertem Licht um die Achse in Ausbreitungsrichtung (Abb.16). Daher kann durch den Drehsinn des elektrischen Feldvektors E entlang der Ausbreitungsrichtung zwischen links und rechts circular polarisiertem Licht unterschieden werden. Durch die Rotation der Welle wird eine schraubenförmige oder helicale Bewegung des Lichtes beschrieben. Somit kann das circular polarisierte Licht als eine Art „chirales Lichtes“ betrachtet werden ^[58].

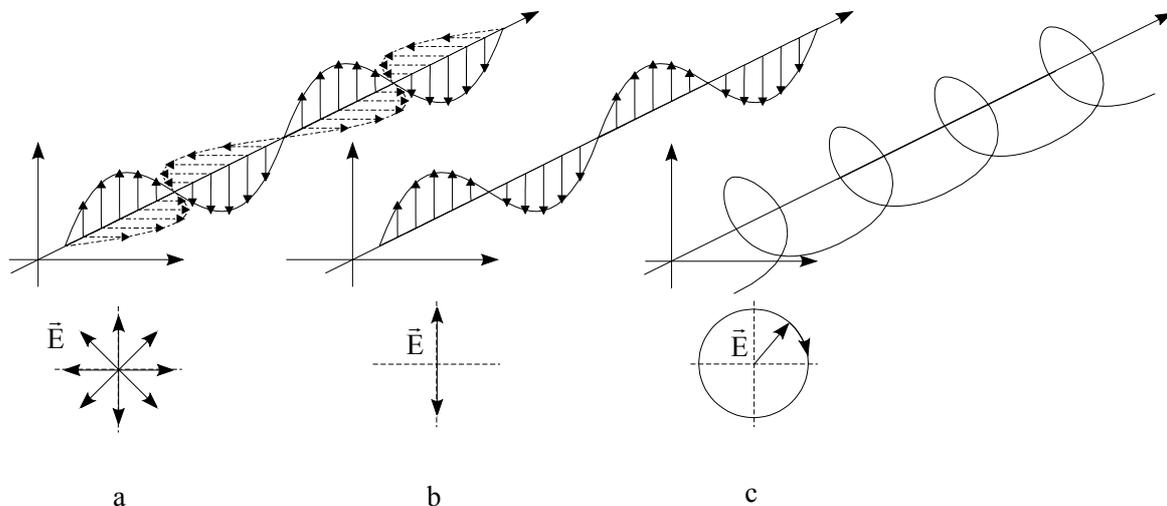


Abb. 16: a) Beim natürlichen Licht schwingt der elektrische Feldvektor E in jeder Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. b) Beim linear polarisierten Licht schwingt der Feldvektor E nur in einer Ebene. c) Beim circular polarisierten Licht beschreibt der Feldvektor E einen Kreis, wobei sein Betrag immer konstant bleibt.

Im Fall des elliptisch polarisiertes Licht ändert sich der Betrages für den elektrischen Feldvektor E periodisch, da eine Ellipse erhalten wird bei der Projektion von der Helix auf eine zu ihr senkrechten Ebene.

3. Theoretischer Teil

Bei der Überlagerung von zwei linear polarisierten Wellen mit gleicher Frequenz und Amplitude, jedoch mit einer Phasendifferenz von $\lambda/4$ bzw. $\pi/2$ sowie senkrecht zueinander stehenden Polarisations Ebenen wird circular polarisierten Strahlung erhalten. Wie in Abbildung 17 dargestellt, wird rechts circular polarisiertem Licht erhalten, wenn der Feldvektor E_1 dem Wellenzug E_2 um $\lambda/4$ vorausläuft, und bei links circular polarisiertem Licht ist dies umgekehrt.

Dagegen wird durch zwei entgegengesetzt umlaufende circular polarisierte Wellen mit gleicher Frequenz und Amplitude linear polarisiertes Licht erhalten.

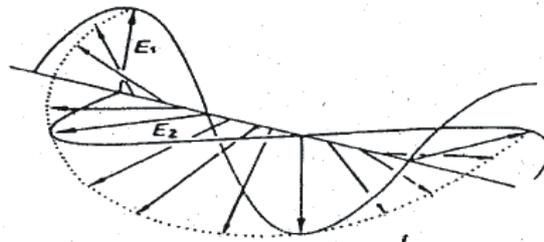


Abb. 17: Darstellung von links und rechts circular polarisiertes Licht, durch die Überlagerung von zwei linear polarisierten Wellen mit einer Phasendifferenz von $\lambda/4$ bzw. $\pi/2$

Interaktionen zwischen Licht und Materie

Wechselwirkt Licht mit Molekülen, so lässt sich dies als eine Verschiebung von Elektronen oder Ladung durch ein einwirkendes elektrisches Feld beschrieben. In der Quantentheorie wird dies als eine Änderung der energetischen Zustände des Moleküls durch die Lichtstrahlen erklärt. Die Übergänge zwischen den verschiedenen energetischen Zuständen von den Elektronen zu dem Atomkern werden neu geordnet, wodurch ein elektrisches Übergangsdipolmoment induziert wird. Ebenso wird durch das magnetische Feld des Lichtes eine Änderung der Zustände zwischen den Elektronen und dem Kern des Moleküls bewirkt, d.h. ein magnetisches Übergangsdipolmoment erzeugt. Wird nun ein Molekül im Grundzustand von Licht einer geeigneten Frequenz getroffen, wird die Energie adsorbiert und das Molekül geht in einen energetisch angeregten Zustand über. Diese Abhängigkeit wird in Resonanzbedingung wiedergegeben:

Resonanzbedingung: $\Delta E = E_{\Psi_0} - E_{\Psi_1} = h \cdot \nu$

mit: E_{Ψ_0} = Energiebetrag der Wellenfunktion Ψ_0 im Grundzustand

E_{Ψ_1} = Energiebetrag der Wellenfunktion Ψ_1 im angeregten
Zustand

Die Aufnahme dieser Energie kann gemessen werden, indem die Lichtintensität vor und nach dem Durchgang durch ein isotropes Medium bestimmt wird. Somit ergibt sich für die Gesamtheit der von einem Stoff aus einem kontinuierlichen Spektrum absorbierten Wellenlängen das Absorptionsspektrum. Optisch aktive Medien zeigen gegenüber circular und linear polarisiertem Licht unterschiedliches Verhalten und können dadurch zwischen den enantiomeren Formen des Lichtes unterscheiden. Sie drehen die Ebene des linear polarisierten Lichtes um den charakteristischen Drehwinkel α , der die Drehung beschreibt. Ist der Winkel α auf eine bestimmte Wellenlänge λ und Temperatur T genormt, wird er als spezifischer Drehwert $[\alpha]$ bezeichnet. Der spezifische Drehwert $[\alpha]$ ist sowohl abhängig von der Konzentration c der Probe als auch von der Länge l des Strahlendurchganges durch eine Probe ^[59]:

spezifischer Drehwert $[\alpha]$: $[\alpha] = \alpha \cdot l \cdot c$

mit: α = auf eine bestimmte Wellenlänge λ und Temperatur
genormter Winkel

l = Länge des Strahlendurchganges durch eine Probe
(in dm)

c = Konzentration der Probe (in g/ml)

Für zwei Enantiomere ist dieser Winkel $[\alpha]$ vom Betrag her gleich, jedoch mit unterschiedlichen Vorzeichen. Genannt wird diese unterschiedliche Brechung von links und rechts polarisiertem Licht durch optisch aktive Medien optische Rotationsdispersion (ORD) oder circulare Doppelbrechung genannt. Es ist eine Drehung der Polarisationssebene, welche durch den magnetischen Feldvektor H und die Ausbreitungsrichtung aufgespannt wird. Die zu der Polarisationssebene senkrecht stehende Ebene wird Schwingungsebene genannt.

Durch Polarisation werden bestimmte Schwingungsrichtungen der elektromagnetischen Strahlung herausgefiltert. Beim Durchtritt des Lichtes durch eine Probe nimmt die Lichtgeschwindigkeit ab, wobei diese Abnahme als Faktor gemessen werden kann und als Brechungsindex (n) definiert ist.

3. Theoretischer Teil

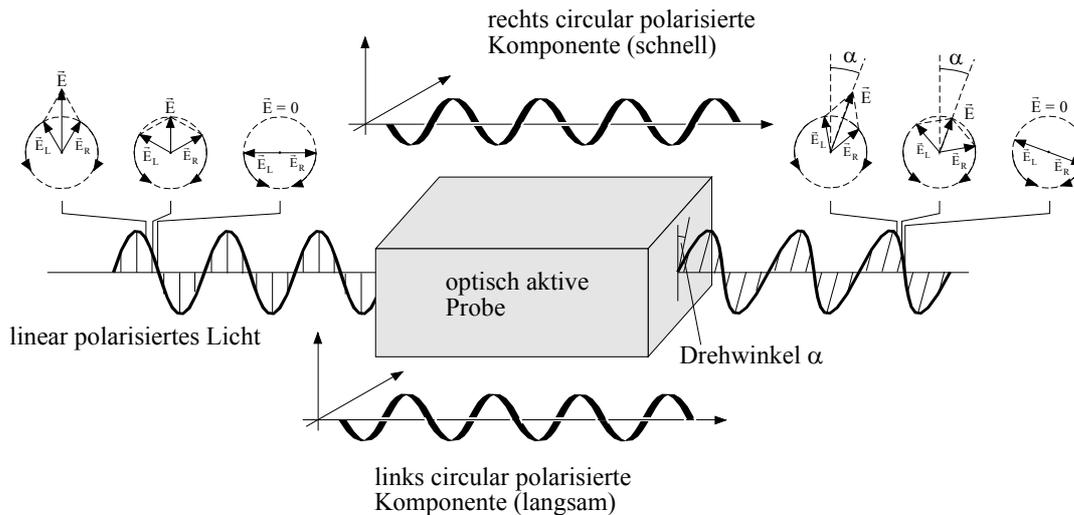


Abb. 18: Beim Durchtritt der beiden circular polarisierten Teilstrahlen durch eine optisch aktive Probe ändert sich ihre Phasenbeziehung, da sie sich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ausbreiten. Die Ebene des resultierenden linear polarisierten Lichtstrahls ist daher der Polarisationsebene des einfallenden linear polarisierten Lichtstrahls gegenüber um den Winkel α gedreht.

Dies bedeutet unterschiedliche Brechungsindizes ($n_L \neq n_R$) für die beiden circular polarisierten Teilstrahlen in einem optisch aktiven Medium. Wie in Abbildung 18 gezeigt, pflanzt sich einer der beiden Teilstrahlen mit langsamerer Geschwindigkeit fort als der andere und führt daher zu einer Phasenverschiebung der beiden circular polarisierten Lichtstrahlen, wodurch sich die Ebene des ausfallenden Lichtes dreht. Auf dieser unterschiedlichen Adsorption des eingestrahlteten Lichtes durch die beiden circular polarisierten Komponenten beruht der Circulardichroismus. Anhand der so erhaltenen Absorptionsspektren kann zwischen der Absorption von links- und rechts-polarisiertem Licht unterschieden werden. Bei den Circulardichroismus-Spektren wird die Differenz der Absorption $\Delta\varepsilon$, auch molare Extinktion genannt, gegen die Wellenlänge λ aufgetragen. Die erhaltene Circulardichroismus-Kurve wird als *Cotton-Effekt* bezeichnet. Von einem positiver *Cotton-Effekt* wird gesprochen, wenn die Wellenlänge λ_{\max} größer als die des Minimums λ_{\min} oder $\Delta\varepsilon > 0$ ist und im umgekehrten Fall, λ_{\max} ist kleiner als λ_{\min} bzw. $\Delta\varepsilon < 0$, von einem negativen Cotton-Effekt. Ein Enantiomerenpaar weist daher den gleichen Cotton-Effekt auf, nur mit unterschiedlichen Vorzeichen (Abb. 19).

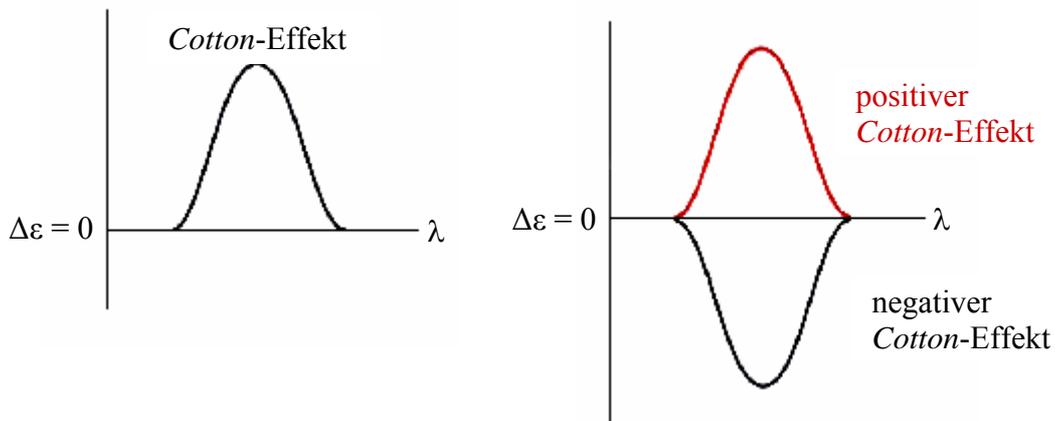


Abb. 19: Die Circulardichroismus-Kurve wird als Cotton-Effekt bezeichnet, wobei ein Enantiomerenpaar den gleichen Cotton-Effekt aufweist nur mit unterschiedlichen Vorzeichen

Aufbau eines Circulardichroismus-Spektralanalysators

Die Anordnung für die Aufnahme eines Dichroismus-Spektrums sieht folgendermaßen aus:

Lichtquelle → Monochromator → Polarisator → Probezelle →
 Analysator → Detektor

Eine Lichtquelle, meistens eine Xenondampfampe, erzeugt ein nahezu homogenes Lichtspektrum bei dem allen Wellenlängen mit gleicher Intensität ausstrahlt werden. Um bei dem einfallende Licht einen kontinuierlichen Wellenlängenbereich abfahren sowie die Absorption für jede einzelne Wellenlänge bestimmen zu können wird ein Monochromator eingesetzt. Für die anschließende circulare Polarisierung des Lichtes in die links- und rechts-polarisierten Anteile wird der Polarisator benötigt. Wenn der Polarisator und der Analysator senkrecht aufeinander stehen, wird keine Strahlung durchgelassen. Bei Anwesenheit von optisch aktivem Material wird die Strahlung durchgelassen, wodurch sich der Drehwinkel α des Analysators so dreht, bis wieder eine Sperrung für die Strahlung entsteht. Nach dem Durchgang durch die Probe werden die Lichtintensitäten durch einen Detektor registriert und an den angeschlossenen Rechner zur Auswertung weitergeleitet ^[60].

3. Theoretischer Teil

3.4. Chromatographie

3.4.1 Allgemeiner Teil

Für die Trennung optischer Isomere (chirale Trennung), zur Analyse von Enantiomeren-Verunreinigung in chiralen Katalysatoren sowie bei der Produktcharakteristik zur Bestimmung der Enantiomeren-Reinheit bei der Synthese racemischer Verbindungen wird die Chromatographie verwendet.

Verfahren

Das Verfahren der Chromatographie (griechisch khroma = Farbe) dient zur Auftrennung eines Stoffgemisches durch unterschiedliche Verteilung seiner Komponenten zwischen zwei Phasen (einer stationären und einer mobilen Phase). Der russische Botaniker *M. S. Tswett* ^[61-64] wendete dieses Prinzip erstmals 1903 an. Mit Hilfe der Chromatographie konnte er zu untersuchende einfarbige Pflanzenfarbstoffe in verschiedene Farbstoffe zerlegen.

Die Chromatographie dient heute als Möglichkeiten zur Reinheitskontrolle im Pharmabereich, Schadstoffanalytik im Umweltbereich und Produktkontrolle in der chemischen Industrie. In der Natur und bei der Synthese von Produkten kommen die meisten Stoffe als Gemische vor. Um an die Information der Art und Menge einer bestimmten Substanz zu gelangen, wird die Möglichkeit des chromatographischen Prinzips genutzt.

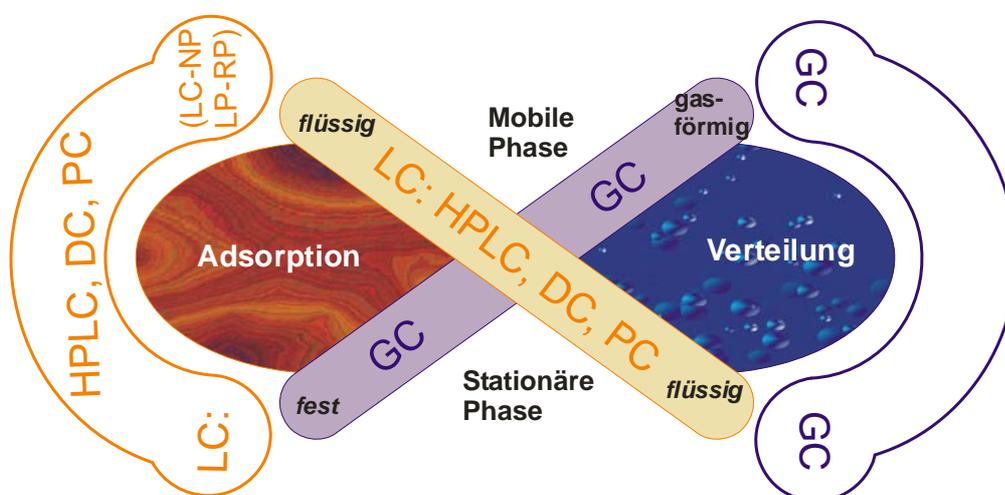


Abb. 20: Einteilung der chromatographischen Methoden nach Trennvorgang und Aggregatzustand der Phasen

Die chromatographischen Trennmethode lassen sich nach verschiedenen Gesichtspunkten einteilen:

1. Zwischen der stationären und mobilen Phase stellt sich das Verteilungs-Gleichgewicht auf Grund verschiedener physikalisch-chemischer Effekte ein:

- Adsorptions-Chromatographie - die Trennung beruht auf unterschiedlich starken adsorptiven Bindungen der Komponenten zur stationären Phase.
- Verteilungs-Chromatographie - die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der verschiedenen Komponenten.
- Ionenaustauschchromatografie - der Ionenaustauscher, die stationäre Phase, bildet zwischen den verschiedenen Ionen der mobilen Phase unterschiedlich stabile Bindungen aus.
- Siebwirkung - die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Größe der verschiedenen Komponenten. Hierbei wird zwischen drei Verfahren unterschieden:
 - Molekularsieb-Chromatographie
 - Gel-Permeations-Chromatographie (Gelfiltration)
 - Ausschluss-Chromatographie
- Affinitätschromatographie - eine hochselektive Methode, benutzt zur Trennung (durch nichtkovalente Kräfte) eine für die Substanz spezifische chemische Verbindung als stationäre Phase:
 - IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) - für Proteine
- Chirale Chromatographie - für chiralen Molekülen, wobei zur Trennung die stationäre Phase eines der Enantiomere enthält. Das bewirkt eine unterschiedlich starke diastereomere Wechselwirkung mit den beiden Enantiomeren des Racemats und dadurch eine unterschiedliche Retentionszeit.

2. Einteilung auf Grund der mobilen Phase und deren weitere Unterteilung nach den Trägern oder dem Aggregatzustand der stationären Phase:

- Flüssigchromatographie (engl. liquid Chromatography, LC)
 - a) Planare Chromatographie:
 - Papierchromatographie - als stationäre Phase dient Papier, welches entweder liegt oder senkrecht in einem Glasbehälter steht. Die mobile Phase wird durch Kapillarkräfte bewegt.
 - Dünnschichtchromatographie - als stationäre Phase dient eine z.B. mit Silikagel beschichtete Glas- oder Kunststoffplatte. Die mobile Phase wird durch Kapillarkräfte bewegt.

3. Theoretischer Teil

b) Säulenchromatographie - bei dieser Methode wird die feste stationäre Phase (Matrix) in eine Röhre gefüllt und von der flüssigen mobile Phase durchflossen:

- Niederdruckchromatographie - wird für die präparative Trennung eingesetzt (Probenmengen > 1 g, auch mehrere kg), da Säulen mit Durchmesser von einem bis vielen Zentimetern verwendet werden. Die mobile Phase wird entweder durch Schwerkraft oder zusätzlichen Druck bewegt.
- Hochdruckflüssigchromatographie (engl. HPLC: High Performance (or Pressure) Liquid Chromatography) - die verbreitetste analytische Trennmethode mit hoher Trennleistung. Die mobile Phase wird mit einer pulsationsarmen Pumpe für hohe Drücke (bis zu 400 bar) und Fließgeschwindigkeiten bis zu 5 ml/ min bewegt, während die stationäre Phase aus sehr kleinen, druckstabilen Packungsteilchen (< 10 µm) besteht. Zusätzlich wird ein Injektionssystem gebraucht.

Normalphasen-Flüssigchromatographie (normal phase liquid chromatography, NP-LC)

Umkehrphasen-Flüssigchromatographie (reversed phase liquid chromatography, RP-LC)

Ionenchromatographie (IC) - für die Trennung von Ionen werden spezielle Säulenmaterialien (Trennungsmechanismen: Ionenpaarbildung, Ionenaustausch, Ionenausschluss) benötigt.

- Elektrochromatographie (nicht Elektrophorese) - ist eine Methode im Entwicklungsstadium, in der die mobile Phase durch Anlegen einer Spannung bewegt wird.

c) Membranchromatographie - bei dieser Methode wird eine ein- oder mehrlagige Membran als feste Phase in einem Gehäuse verwendet, durch die die mobile Phase bei niedrigen Drücken bis zu 6 bar und einer 20-fach höheren Fließgeschwindigkeiten als üblich durch die Säulenchromatographie gepumpt wird.

- Gaschromatographie (GC) – bei dieser Methode wird als mobile Phase ein Gas benutzt. Die zu trennenden Komponenten werden verdampft, gelangen in die Gasphase und wandern mit ihr über die stationäre Phase (Flüssigfilm oder Feststoff), mit der sie Wechselwirkungen eingehen:

Flüssigfilm = Verteilung

Feststoff = Adsorption

- a) Gepackte Säulen - die stationäre Phase einer Säule (lange Röhre) besteht aus einem feinkörnigen Material.
- b) Kapillarsäulen - hierbei bedeckt die stationäre Phase als dünne Schicht die Säulenwand:

Flüssige stationäre Phase

Feste stationäre Phase

- Überkritische Fluidchromatographie (engl. SFC: supercritical fluid chromatography) - eine Substanz, meistens ein verdichtetes Gas (z.B. Kohlendioxid), oberhalb der stoffspezifischen kritischen Temperatur und des kritischen Druckes (Zustand zwischen Gas und Flüssigkeit) dient als mobile Phase, während als Träger der stationären Phase nur Säulen zum Einsatz kommen.

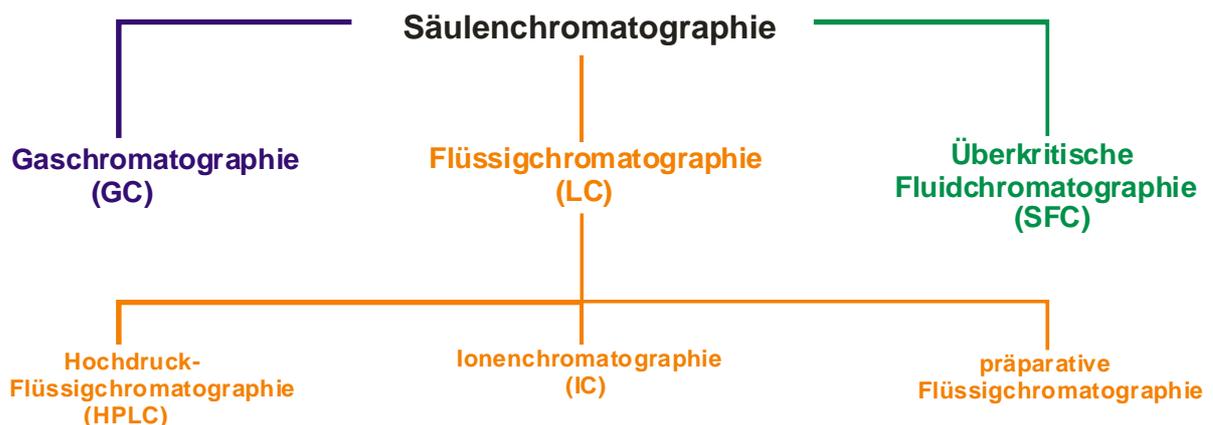


Abb. 21: Einteilung der Säulenchromatographie nach Prinzipien

Trennprozess

Bei dem Trennprozess fließen die verschiedenen Substanzen einer Probe in der mobilen Phase an einer stationären Phase vorbei. Auf ihrem Weg durch die Säule kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Substanzen und der stationären Phase, an welcher die Substanzen verschieden lange retentiert (d.h. verzögert) und von der mobilen Phase somit nicht weitertransportiert werden. Dadurch wird die Probe aufgetrennt und die einzelnen Substanzen verlassen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Säule.

Nach dem Verlassen der Säule können die Substanzen als Chromatogramm detektiert werden.

3.4.2 Physikalisch-chemischen Grundlagen

Van-Deemter Gleichung

In der dynamischen Theorie, die mathematisch durch die *Van-Deemter-Gleichung* ^[65] ausgedrückt wird, werden die Massetransfer- und Diffusionsvorgänge beim chromatographischen Trennprozess in der Säule berücksichtigt. Zudem verknüpft diese Gleichung die Trennhöhe mit der Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase.

Für die Peakform und die Effizienz der Trennung spielen mehrere Faktoren eine Rolle:

- durch den Strömungswiderstand entstehen Vermischungen
- Diffusion auf Grund von Konzentrationsunterschieden innerhalb einer Phase
- Wechselwirkungen zwischen den beiden Phasen

die durch die *Van-Deemter-Gleichung* beschrieben werden.

Vereinfacht lautet die *Van-Deemter-Gleichung*:

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

mit: H = Trennstufenhöhe,

A-Term = Eddy-Diffusion, d.h. dieser Term berücksichtigt die unterschiedliche Fließstrecken durch die Packung

B-Term = longitudinale Diffusion, d.h. dieser Term berücksichtigt die Diffusion der Substanzmoleküle in beide Richtungen der Trennstufe

C-Term = Peakverbreiterung, d.h. mit diesem Term wird die langsame Gleichgewichtseinstellung zwischen mobiler und stationärer Phase berücksichtigt

u = lineare Fließgeschwindigkeit

Abbildung 22 zeigt die verschiedenen Terme der vereinfachten *Van-Deemter-Gleichung* in einer graphischen Darstellung. Bei welchen Bedingungen die größte Trennstärke und die schmalsten Peaks erreicht werden können, kann anhand der aufgetragenen *Van-Deemter-Gleichung* im Koordinatensystem, der H-u-Funktion, abgelesen werden. Diese erreicht ein Minimum bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, das anzeigt wann die Höhe der theoretischen Böden am kleinsten und die Anzahl der Böden in einer stets gleichlangen Säule am größten ist.

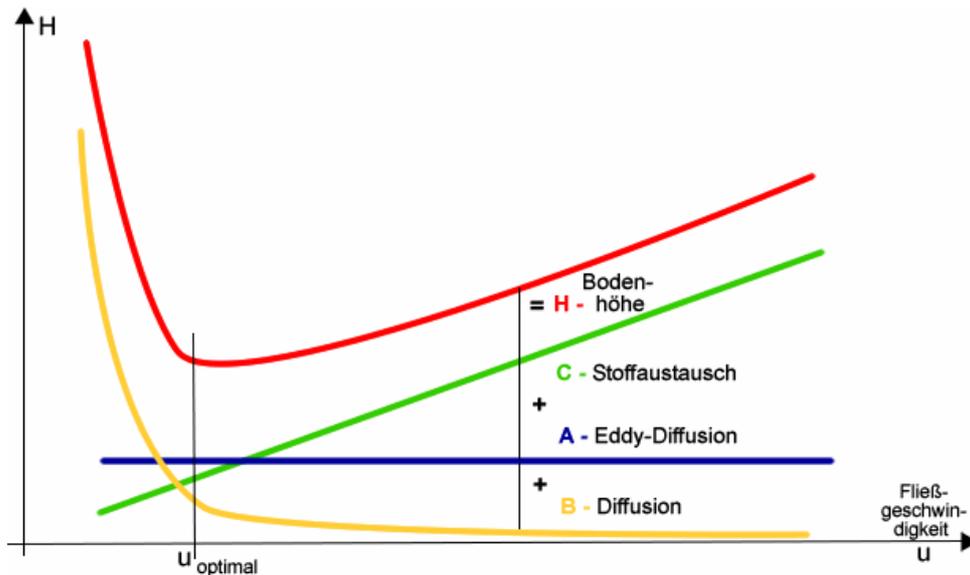


Abb. 22: Die Terme der vereinfachten Van-Deemter-Gleichung im Koordinatensystem

Entsprechend der *Van-Deemter*-Gleichung gibt es drei Terme, die Terme A, B sowie C, die zur Bandenverbreiterung und damit zur Verschlechterung der Trennleistung führen.

A-Term – Eddy-Diffusion

Der Einfluss der Packung in der Säule auf die Verbreiterung der Probenzone wird durch den Eddy-Diffusions-Term (Streudiffusion) beschrieben. Abhängig ist diese Streudiffusion von der Art des Füllmaterials, Korngröße und Packungsgüte der stationären Phase. Durch die Korngröße werden die mechanischen Widerstände beschrieben, die die stationäre Phase der mobilen Phase und somit auch den einzelnen Probenbestandteilen entgegensetzt. Dadurch legen die Moleküle der Probe unterschiedlich lange Wege zwischen den Teilchen der Packung zurück und verlassen die Säule zu unterschiedlichen Zeiten ohne dass eine Wechselwirkungen mit der Teilchenoberfläche stattfindet.

Die Teilchen durchströmen:

- 1) feinkörniges Packungsmaterial, dann wird der Weg länger als bei grobkörnigem Packungsmaterial.
- 2) eine ungleichmäßige Packung, dann bilden sich Kanäle. Die Geschwindigkeit der mobilen Phase ist in der „Strommitte“ der Kanäle am größten.
- 3) eine sehr poröse Oberfläche mit schlecht durchströmten Bereichen der Vertiefung, dann werden die Probenmoleküle erst weitertransportiert, wenn sie diese Poren durch Diffusion wieder verlassen haben.

3. Theoretischer Teil

Diese Phänome führen zu einer Peakverbreiterung und sind praktisch unabhängig von der Fließgeschwindigkeit.

In einer mathematischen Gleichung kann der A-Term folgendermaßen wiedergegeben werden:

$$A = 2 \cdot p \cdot d$$

mit: A = A-Term

p = Packungsfaktor

d = Teilchendurchmesser

B-Term – Diffusion

Der Einfluss der molekularen Diffusion entlang der Säulenachse (Axialdiffusion) wird von dem B-Term beschrieben. Ein Konzentrationsgefälle kann sowohl in einer gepackten als auch ungepackten Säule auftreten. Diese Art der Teilchenbewegung ist ein zeitabhängiger Prozess, also nur von der Verweildauer der Probenmoleküle in der mobilen Phase abhängig, und kann durch einen schnellen Fluss der mobilen Phase gering gehalten werden (hohe Strömungsgeschwindigkeiten = kürzere Verweilzeiten). Bestimmt wird der B-Term nur vom Diffusionskoeffizienten der Verbindung in der mobilen Phase.

Der B-Term ist mathematisch definiert als:

$$B = 2 \cdot D \cdot L$$

mit: B = B-Term

D = Diffusionskonstante in der mobilen Phase

L = Labyrinthfaktor (Porenstruktur) der stationären Phase

Für die Chromatographie sind die ersten beiden Vorgänge größtenteils unspezifisch, da sie in jedem (mit inertem Material) gefüllten Rohr auftreten. Daher hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Einzelsubstanzen einer Probe von den Wechselwirkungen zwischen den beiden Phasen ab. Diese wird in der Van-Deemter-Gleichung durch den Stoffaustausch C beschrieben.

C-Term – Stoffaustausch

Die Geschwindigkeit mit der die Probenmoleküle das Verteilungsgleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase erreichen wird in den C-Term (Massentransfer-Term) beschrieben. Hierbei wird die Zahl und Intensität der Wechselwirkungen der verschiedenen Substanzen mit der stationären Phase, die zu einer Verzögerung der Bewegung der Substanzmoleküle führt, betrachtet. Diese Vorgänge beruhen auf Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch, Ausschluss oder Affinität. Eine vollständige Peaktrennung kann durch die Wahl von geeigneten Verhältnissen erreicht werden, jedoch wirken die beiden oben beschriebenen Terme diesem Trenneffekt entgegen. Diese führen teilweise zu einer Rückvermischung, da der Prozess des Stoffaustausches eine gewisse Zeit benötigt. Daher wird er durch geringe Fließgeschwindigkeiten begünstigt, was aber auch die Diffusion verstärkt. Eine zu hohe Fließgeschwindigkeit hingegen führt zu einem unvollständigem Austausch, vor der Einstellung des Gleichgewichtes wird ein Teil der Probenmoleküle durch die mobile Phase weitertransportiert.

Gesucht wird für eine Säule mit vorgegebener Länge eine Strömungsgeschwindigkeit bei der die Trennstufenhöhe am kleinsten und die Trennstufenzahl am größten ist.

3.4.3 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Durch das Verfahren der Hochleistungsflüssigchromatographie (High Performance Liquid Chromatography) ^[66,67] ergibt sich die Möglichkeit mit sehr geringer Probemengen zu arbeiten, gleichbleibend gute Trennleistung und eine Beschleunigung der Analyse zu erhalten.

Es wird eine hohe Trennleistung erzielt, die durch kleine, druckstabile Packungsteilchen (<10µm), pulsationsarme Pumpen, hohe Drücke (bis zu 400 bar), entsprechende Injektionssysteme und miniaturisierten Detektoren erreicht werden.

Eine Voraussetzung für eine Probentrennung mittels HPLC ist, dass die Probe vollständig in einem als Eluent geeigneten Lösungsmittel löslich ist.

3. Theoretischer Teil

Prinzip der HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Der allgemeine Geräteaufbau einer HPLC-Anlage ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Anforderungen, welche an ein HPLC-Gerät gestellt werden sind:

- ein gleichmäßiger Fluss des Eluenten,
- eine gute Vermischung der Eluenten,
- die reproduzierbare Einbringung der Proben bei Aufrechterhaltung des Drucks, sowie
- eine hohe Nachweisstärke der Detektoren

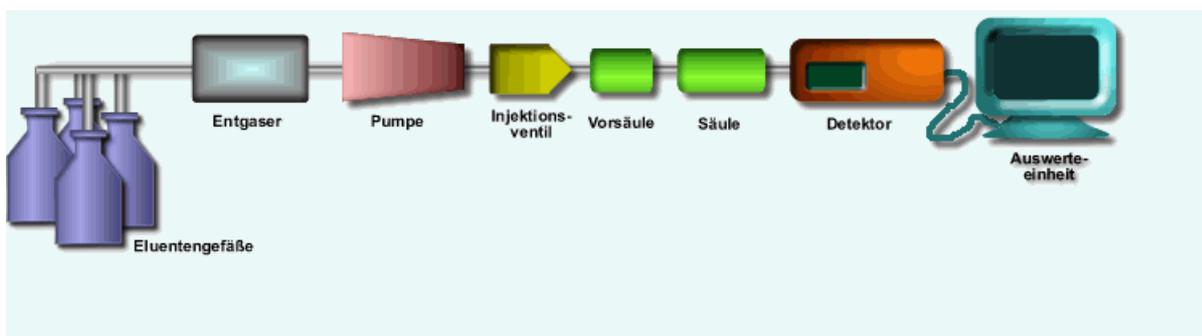


Abb. 23: Prinzip des Aufbaus einer HPLC

Eluenten – Mobile Phase

Da der Trenneffekt von der unterschiedlichen Polarität von stationärer und mobiler Phase (Eluent) bestimmt wird, hängt die Wahl des Eluenten mit dem Packungsmaterial der Säule zusammen. Hierbei lassen sich zwei Gruppen unterscheiden:

1. Eluente für die Chromatographie mit Normalphase (NP):

- stationäre Phase ist polar
- Eluenten unpolar, d.h. der Trennmechanismus beruht auf der Adsorption
- Probe muss im Eluenten lösbar sein und polare Molekülbereiche für Wechselwirkungen mit der Säule haben
- stark polare Substanzen brauchen polare Eluentenzusätze
- kein Wasser bei Kieselgel-Säulen, da die Plätze an der Säule sonst dauerhaft besetzt werden
- dissoziierte Substanzen brauchen Puffer- und Salzzusätze
- Beispiele: n-Hexan, n-Heptan, Methylchlorid, Essigester

2. Eluente für die Chromatographie an Umkehrphase (RP):

- stationäre Phase ist unpolar
- Eluente polar, d.h. der Trennmechanismus beruht auf der Verteilung
- Lösungsmittel werden in Mischungen verwendet
- je mehr organisches Lösungsmittel im Verhältnis zu Wasser verwendet wird, desto höher steigt die Elutionskraft
- Beispiele: Wasser, Methanol, Acetonitril

Die Zusammensetzung der mobilen Phase entscheidet sowohl darüber, ob ein Substanz-Gemisch getrennt werden kann, als auch über die Analysenzeiten. Bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase über die gesamte Analysenzeit konstant, wird dieses isokratische Elution genannt. Ein allgemeines Elutionsproblem besteht hierbei, dass die zuerst eluierten Substanzen gedrängt erscheinen und die stärker retardierten Substanzen breite, späte Peaks ergeben, die sogar im Grundrauschen des Detektors untergehen können.

Um eine effektive Peakauflösung in möglichst kurzer Zeit zu erhalten, wird die mobile Phase optimiert. Dies wird dadurch erreicht, dass durch verschiedene Lösungsmittelzusammensetzungen des Eluents die Verteilungskoeffizienten und somit die Kapazitätskoeffizienten beeinflusst werden. Zudem können die Laufzeiten durch hohe Fließraten verkürzt werden (Volumenabhängigkeit). Für eine gute Trennung muss die flüssige mobile Phase frei von gelösten Gasen sein. Diese Gasblasen führen sonst zu einer ungleichmäßigen Fließgeschwindigkeit des Eluents, verstärktem Rauschen im Detektor oder Geisterpeaks.

Zum Entgasen der Flüssigkeit gibt es mehrere Methoden:

- einmaliges Erwärmen des Eluents unter Vakuum
- einmalige Ultraschallbehandlung und / oder Vakuum
- ständiges Verdrängen der gelösten Gase durch das Einleiten des wenig löslichen Inertgases Helium ins Vorratsgefäß
- online-Entgasung mit einem Vakuum-Membran-Entgaser

3. Theoretischer Teil

Kontinuierlich arbeitende HPLC-Pumpe und Dosierschleife (Mehr-Wege-Ventil)

Die kontinuierlich arbeitenden HPLC-Pumpen wechseln zwischen Ansaugen und Fördern des Lösungsmittels hin und her, wodurch die Eluenten mit konstanter Fließgeschwindigkeit gegen einen hohen Druck gefördert werden.

Zustande kommt dieser Druck durch die Säulenlänge und der Teilchengröße der stationären Phase sowie von Probenbestandteilen. Ebenso spielt die Viskosität der Eluentenbestandteile eine Rolle beim Einfluss auf den Gegendruck, so üben weniger viskose Lösungsmittel einen geringeren Gegendruck auf das System aus. HPLC-Pumpen müssen pulsationsarm und totvolumenarm arbeiten, sowie eine hohe Langzeitkonstanz und Zuverlässigkeit aufweisen. Erst dann können qualitative und quantitative Aussagen aus den Detektorsignalen abgeleitet werden.

Um eine Probe in den strömenden Fluss der mobile Phase injizieren zu können, so dass sie anschließend mit Hilfe der mobilen Phase zur und über die Säule transportiert werden kann, wird ein Probenaufgabesystem benötigt. Das Probenaufgabesystem muss hierfür mehrerer Anforderungen erfüllen:

- ein exakt definiertes Volumen der Probe
- eine reproduzierbare Injektion
- kein Unterbrechen des Eluentenstroms
- einfach zu handhaben
- ein kleines Totvolumen, d.h. kaum Bandenverbreiterung
- für hohe Drücke geeignet
- chemisch inert
- Volumen veränderbar, da die Probemenge von der Empfindlichkeit des Detektors, der Verdünnung durch das Verweilen im chromatographischen System und von der Beladbarkeit der stationären Säule (Säulenmaße) hängt ab ist.

Um diese Anforderungen zu erfüllen werden Mehr-Wege-Ventile mit Dosierschleifen verwendet. Hierdurch wird eine reproduzierbare Injektion mit definiertem Injektionsvolumina ermöglicht. Die Mehr-Wege-Ventile besitzen zwei Stellungsmöglichkeiten, die Load- und die Inject-Stellung, so dass verschiedene Funktionen ausgeführt werden können.

In der Load-Stellung kann die Probe mit einer Spritze in die drucklose Schleife gefüllt werden, wobei ein Volumenüberschuss (von dem 3- bis 5-fachen) benutzt wird, um die Schleife zu spülen und gleichmäßig zu füllen. Der Eluent fließt durch die anderen zwei Wege direkt zur Säule, wie in Abbildung 24 gezeigt. Bei der Inject-Stellung fließt der Eluent durch die Schleife und transportiert dadurch die Probe zur Säule.

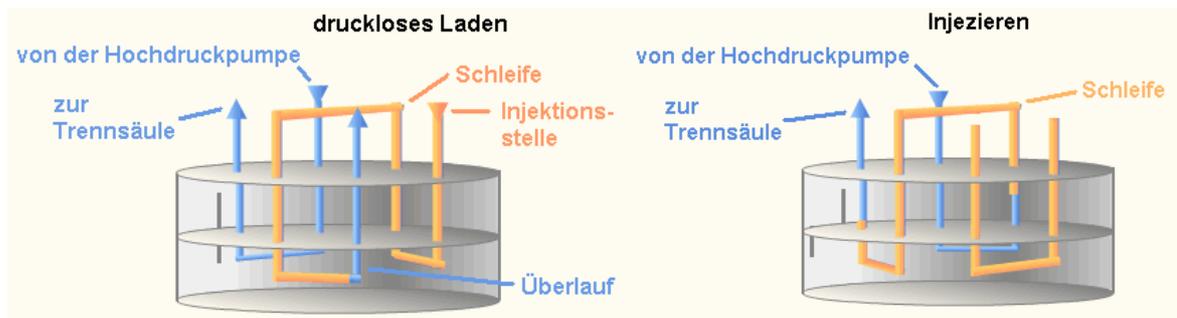


Abb. 24: Beladen und Injizieren einer Schleife

Die Vorteile der Dosierschleife sind:

- durch Auswechseln sind Schleifengrößen von 1 -1000 µl einsetzbar
- Volumen ist sehr gut reproduzierbar
- das Injizieren gegen Druck ist reproduzierbar möglich
- automatisierbar
- auch für präparative Mengen geeignet

HPLC-Säulen - Stationäre Phase

Die stationäre Phase bewirkt durch ihre Wechselwirkung mit den Probenbestandteilen den Trenneffekt. Von dem Füllmaterial der gepackten Säule hängt die Art und Stärke der Wechselwirkungen ab. So wird durch folgende Eigenschaften des Packungsmaterials die Funktion der Säule beeinflusst:

- Teilchengrößen (möglichst gleichmäßig für eine lückenlose Packung, Größen zwischen 3 und 10 µm)
- Qualität der Säulenpackung
- Porenstruktur

3. Theoretischer Teil

- Druckstabilität der Packung
- Art der chemischen Modifizierung
- Säulenmaße (Länge, Durchmesser)

Es gibt für verschiedene Trennprobleme verschiedene Säulen:

1. Universalsäulen

Für viele Trennprobleme sind die sogenannten Universalsäulen einsetzbar, da durch das Variieren der Eluentenzusammensetzung unterschiedliche Selektivitäten erreicht werden können. Bei speziellen Trennproblemen, z.B. ähnlichen Substanzen in einer Probe, gelangen diese Säulen an ihre Grenzen.

Beispiel: C₁₈-Phasen, C₈-Phasen

2. Spezialsäulen

Einige Trennprobleme können mit Hilfe von Spezialsäulen bearbeitet werden, vor allem bei Gemischen mit sehr ähnlichen Substanzen. Allerdings ist bei diesen Säulen die Variationsmöglichkeit der Eluenten gering. Diese Säulen werden mit sehr guten Selektivitäten für die viele spezielle Substanzen präpariert.

Beispiel: chirale Säulen, saure Säulen, Metallkomplexsäulen

Die Säulen unterteilen sich zudem durch ihre Trennmechanismen:

- Adsorptionschromatographie (Normalphasen)
- Verteilungschromatographie (Umkehrphasen)
- Ausschlusschromatographie
- Affinitätschromatographie
- Ionenchromatographie

Detektor und Auswerteeinheit

Mit Hilfe eines Detektors (z.B. UV/Vis-Detektor oder IR-Detektor) werden die konzentrationsproportionalen chemischen oder physikalischen Substanzeigenschaften in elektrische Signale umgewandelt. Abschließend wird zur Visualisierung der elektrischen Signale des Detektors eine Auswerteeinheit benötigt. Bei Analogsignal-Ausgabe z.B. einen Schreiber oder bei Analog/Digitalwandlung und Digitalsignal-Ausgabe z.B. einen Integrator sowie einen Computer. Das Gesamtsystem wird als Chromatograph bezeichnet.

Hierzu gehören beschriebenen Bestandteile:

- mobile Phase
- Pumpe
- Injektionsventil
- Säule (stationäre Phase)
- Detektionseinheit
- Auswerteeinheit

Dieser wird benötigt, um die experimentellen Bedingungen konstant und reproduzierbar zu halten.

Die Visualisierung der Auswerteeinheit wird Chromatogramm genannt. In diesem Chromatogramm werden die von der Säule eluierten Substanzen in der Form von Peaks dargestellt, d.h. die Konzentration der Komponente in Abhängigkeit von der Zeit. Ein Basisliniensignal wird von der mobilen Phase erzeugt (Abb.25).

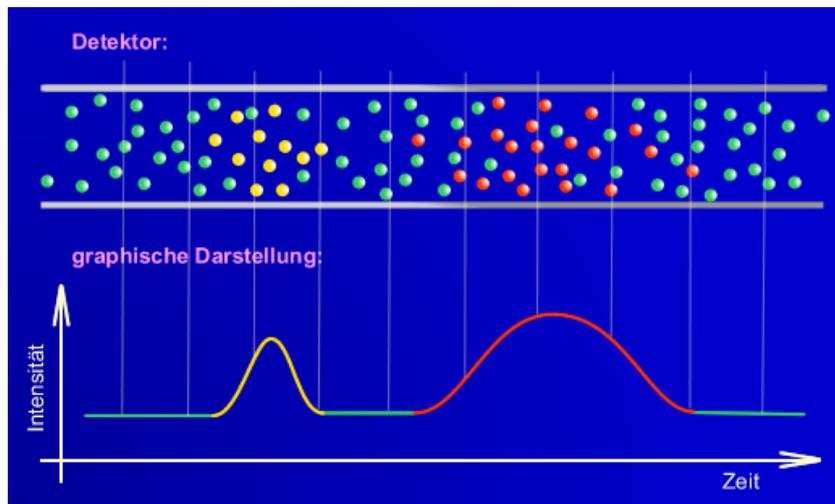


Abb. 25: Peaks als Aufzeichnungen des Mess-Signalverlaufs

Chromatogramm-Parameter und mathematische Modelle

a) Parameter

Den Chromatogrammen in Abbildung 26 können verschiedene Parameter entnommen werden:

3. Theoretischer Teil

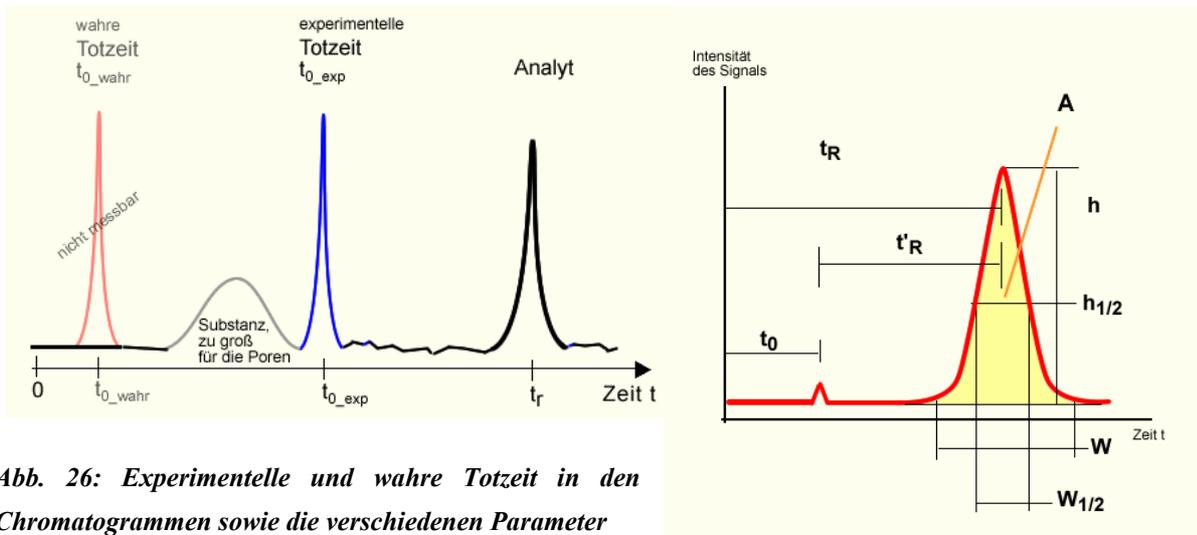


Abb. 26: Experimentelle und wahre Totzeit in den Chromatogrammen sowie die verschiedenen Parameter

- Brutto-Retentionszeit t_R :
Als Brutto-Retentionszeit t_R wird die vergehende Zeit, von der Probenaufgabe bis zum Peakmaximum, bezeichnet. Werden die chromatographischen Bedingungen streng konstant gehalten, können über die enthaltenen Substanzen qualitative Aussagen gemacht werden, da für jede Verbindung die Retentionszeit charakteristisch ist. Die vermutete Substanz wird mit einer Probe injiziert und die Retentionszeiten werden verglichen.
- Totzeit t_0 :
 - a) t_{0_wahr} gibt die nicht experimentell zugängliche Retentionszeit einer Substanz, die ohne Wechselwirkung von der Injektion bis zum Erscheinen im Detektor fließt, an. Dieser Eigenschaft entspricht die mobile Phase. Da die Poren mit mobiler Phase gefüllt sind, diffundieren die Moleküle der mobilen Phase durch die Brownsche Bewegung und nicht auf Grund eines Konzentrationsgradienten in die Poren. Somit bewegen sich die Moleküle der mobilen Phase im Durchschnitt mit der Fließgeschwindigkeit, diese ist jedoch mit dem Detektor nicht messbar.
 - b) t_{0_exp} wird als eine experimentell bestimmbare Totzeit beim Verwenden einer nichtretardierenden Komponente erhalten. Die Verweildauer einer inerten Substanz, die keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht, in einer Säule bzw. der mobilen Phase ist größer als die wahre Totzeit. Die Substanz muss erst dem Konzentrationsgradienten folgend in die Poren hineinwandern. Daher wird diese Zeit möglichst kurz gehalten, sonst führt ein längerer Aufenthalt zusätzlich zu einer Rückvermischung der Komponenten (Diffusion) und dadurch zu flacheren Peaks.

- Totvolumen V_0 :
 - a) Das Totvolumen V_0 einer Säule, gibt das benötigte Volumen an mobiler Phase zum Füllen aller Poren und Zwischenräume einer Säulenpackung an.
 - b) Das Totvolumen V_0 der gesamten HPLC-Anlage, beschreibt das benötigte Volumen an mobiler Phase zum Füllen aller Hohlräume der Anlage. Hierzu zählen das Injektionsvolumen, das Volumen der Kapillaren, der Pumpe, der Säulenpackung von Vorsäule sowie Säule und das Detektorvolumen. Da diese Bereiche zu einer Verbreiterung des Probenpfropfens führen, ohne am chromatographischen Trenngeschehen mitzuwirken, wird das Totvolumen einer Anlage möglichst klein gehalten.

Rechnerisch hängen Totzeit und Totvolumen folgendermaßen zusammen:

$$t_0 = V_0/u$$

mit: t_0 = Totzeit

V_0 = Totvolumen

u = Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase

- Netto-Retentionszeit t'_R :

Die Netto-Retentionszeit t'_R gibt die Aufenthaltszeit der Komponenten innerhalb der stationären Phase an. Sie berechnet sich aus der Differenz von der Brutto-Retentionszeit minus der Totzeit:

$$t'_R = t_R - t'_0$$

mit: t'_R = Netto-Retentionszeit

t_R = Bruttoretentionszeit

t'_0 - Totzeit

Die wahre Netto-Retentionszeit kann nicht bestimmt werden, denn sie basiert auf der exakten („wahren“) Totzeit. Hierdurch ist der Kapazitätsfaktor nur wenig aussagekräftig.

Folgende Peakparameter werden zur Berechnung von Auflösung und Bodenzahl benötigt:

- die Peakbreite an der Peakbasis, da die Basispeakbreite w experimentell nicht bestimmbar ist (Abb. 24)
- die Peak-Halbwertsbreite $w_{0,5}$ bei der Hälfte des Peakmaximums

3. Theoretischer Teil

während die Peakparameter:

- die Fläche A
- die Höhe h

zum Quantifizieren der Komponenten dienen, siehe Abbildung 29.

b) Mathematische Modellgrößen

Mit Hilfe der Modelle können komplexe Systeme erfasst, Einflüsse und Wirkungen beschrieben werden. Durch rechnerische Parameter lassen sich Systeme darstellen, optimieren und miteinander vergleichen. Der Nachteil dieser Hilfsmittel ist, dass sie nur einen Teil der Wirklichkeit wiedergeben können und daher nur in Grenzen gelten. Nach ihrer Funktion lassen sich die chromatographischen Größen einordnen:

1. zur Charakterisierung eines Stoffes:

- Der Verteilungskoeffizient K:

$$K = c_s/c_m$$

mit: K = Verteilungskoeffizient

c_s = Konzentration des Analyten in der stationären Phase

c_m - Konzentration des Analyten in der mobilen Phase

Der Verteilungskoeffizient K dient zur Bestimmung von der Konzentration einer Substanz in der stationären und in der mobilen Phase sowie der Beschreibung des theoretischen Gleichgewichtszustandes. Er setzt jedoch gleiche Volumina der Phasen voraus.

- Das Phasenverhältnis β :

$$\beta = V_m/V_s$$

mit: β = Phasenverhältnis

V_m = Volumen der mobilen Phase

V_s = Volumen der stationären Phase

Das Phasenverhältnis β ist ein Maß für das Volumenverhältnis der Phasen und dient der Korrektur des Verteilungskoeffizienten.

Wenn der Wert für das Phasenverhältnis β groß ist, dann ist die Säule relativ durchgängig und eine große Menge an mobiler Phase liegt vor. Die übliche Werte liegen für die HPLC bei: 5 bis 35.

- Kapazitätsfaktor (Retentionsfaktor) k' :

$$k' = K/\beta = (c_s \cdot V_s)/(c_m \cdot V_m)$$

mit: k' = Kapazitätsfaktor

K = Verteilungskoeffizient

β = Phasenverhältnis

c_s = Konzentration des Analyten in der stationären Phase

V_s = Volumen der stationären Phase

c_m = Konzentration des Analyten in der mobilen Phase

V_m = Volumen der mobilen Phase

Wobei der Kapazitätsfaktor (Retentionsfaktor) k' nach folgenden Formeln berechnet wird, wenn die Konzentration c in g/l angegeben wird:

$$k' = m_s/m_m$$

mit: k' = Kapazitätsfaktor

m_s = Masse des Analyten in der stationären Phase

m_m = Masse des Analyten in der mobilen Phase

Wird die Konzentration c in mol/l angegeben, gilt:

$$k' = n_s/n_m$$

mit: k' = Kapazitätsfaktor

n_m = Molzahl des Analyten in der mobilen Phase

n_s = Molzahl des Analyten in der stationären Phase

Soll der Kapazitätsfaktor k' eines Analyten experimentell bestimmt werden, nutzt man folgenden Zusammenhang:

$$k' = (t_r - t_0) / t_0$$

mit: k' = Kapazitätsfaktor

t_r = Nettoretentionszeit

t_0 = Totzeit

3. Theoretischer Teil

Der Kapazitätsfaktor k' charakterisiert die Lage eines Probensubstanz-Peaks im Chromatogramm. Der Kapazitätsfaktor ist stoffspezifisch und hängt von den Eigenschaften der stationären und mobilen Phase sowie der Temperatur ab. Er ist ein Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit und als Parameter günstiger als die Nettoretentionszeit, weil er unabhängig von der Säulenlänge und der Fließgeschwindigkeit ist.

2. zur Charakterisierung von zwei getrennten Substanzen:

- Auflösung R:

$$R = [2 (t_{r2} - t_{r1})] / (w_1 + w_2) = [1,18 (t_{r2} - t_{r1})] / (w_{0.5/1} + w_{0.5/2})$$

mit: R = Auflösung

t_r = (Brutto-)Retentionszeit

w = Basispeakbreite

$w_{0.5}$ = Peakbreite in halber Höhe

Bei der Trennung einer Probe ist das Ziel, die Komponenten in einzelne Signale aufzulösen. Zur Berechnung zu trennenden, benachbarten Peaks dient der Parameter Auflösung R. Für diesen Parameter gilt:

| | |
|---------------------|-----------------------------------|
| R = 0.50 | keine zwei Maxima |
| R = 0.75 | zwei gerade noch getrennte Maxima |
| R = 1.00 | es verbleiben 10% Peaküberlappung |
| R = mindestens 1.25 | vollständige Trennung |

Die Auflösung R ist ein Maß für die Fähigkeit des Systems zwei Substanzen mit den gewählten Bedingungen zu trennen, wobei der Wert für eine ausreichende Auflösung bei >1.5 , da bei dem Wert 1.5 nur noch 0,3% der Peakflächen überlappen.

- Selektivitätsfaktor (Trennfaktor) α :

$$\alpha = K_2/K_1 = k'_2/k'_1$$

mit: α = Selektivitätsfaktor

K = Verteilungskoeffizient

k' = Kapazitätskoeffizient

Die relative Retention wird auch als Trennfaktor α bezeichnet und dient zur Identifizierung von Probensubstanzen.

Für ihre Berechnung wird die mit der Totzeit korrigierte Retentionszeit der Probensubstanz mit der einer Bezugssubstanz verglichen. Sie ist unabhängig von der Trennsäule (Länge, Schichtdicke, Packung), aber abhängig von der Temperatur als auch den Eigenschaften der stationären sowie der mobilen Phase.

Der Trennfaktor α also ist ein Maß für die Trennbarkeit von zwei Substanzen, d.h. je größer die Differenz der Verteilungskoeffizienten ist, desto einfacher gelingt die Trennung. Ein später eluierter Stoff steht im Quotient oben, daher ist der Selektivitätsfaktor stets größer als 1. Wobei die Werte von 1 – 10 als optimal gelten.

- Lineare Geschwindigkeit u :

$$u = L/t_0$$

mit: u = Lineare Geschwindigkeit

L = Säulenlänge

t_0 = Totzeit

Durch die Fließgeschwindigkeit (mL/min), die vom Säulendurchmesser abhängig ist, kann die Geschwindigkeit eines Eluenten beschrieben werden. Die lineare Geschwindigkeit u ist dem Druckabfall längs der Säule proportional.

3. zur Charakterisierung einer chromatographischen Säule:

Das Modell von den theoretischen Böden wird für die Charakterisierung einer chromatographischen Säule eingeführt. Dieses bewirkt eine theoretische Zerlegung der Trennstrecke der chromatographischen Säule in Trennstufen, analog zur Destillation (Glockenbodenkolonne). Ein Boden ist der Teil der Säule, in dem sich das Verteilungsgleichgewicht kurzfristig und sehr kurz ein Mal eingestellt hat. Viele Böden in einer Säule bewirken hierbei eine hohe Auflösung.

- Bodenzahl N :

$$N = 16 (t_r / w)^2 = 5,54 (t_r / w_{0.5})^2$$

mit: N = Bodenzahl

t_r = (Brutto-)Retentionszeit

w = Basispeakbreite

$w_{0.5}$ = Peakbreite in halber Höhe

3. Theoretischer Teil

Aus der Gegenstromdestillation (Rektifikation) leitet sich der Begriff „Trennstufenzahl“ ab. Die Anzahl der theoretischen Böden in einer Destillationskolonne gibt das Maß der Substanzen an, die mit unterschiedlichen Siedepunkten getrennt werden können. Für die Trenn-Qualität ist die Zahl der theoretischen Trennstufen (N) in einer Trennsäule zuständig, d.h. je größer die Trennstufenzahl umso besser trennt die Säule. Jedoch ist die Bodenzahl N ist von der Retentionszeit einer Substanz abhängig, also von der Testsubstanz und dem Gerät (von Injektion bis Detektion).

Ein Vergleich zweier Säulen ist somit nur mit der gleichen Testsubstanz im selben Gerät möglich. Die üblichen Werte für die Bodenzahl N liegen bei der HPLC zwischen 1000 und 8000.

- Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens (HETP) oder Bodenhöhe H:

$$H = L/N$$

mit: H = Bodenhöhe

L = Säulenlänge

N = theoretische Bodenzahl

Das HETP (H) beschreibt das Säulenstück, in dem sich das Gleichgewicht zwischen stationärer und mobiler Phase eingestellt hat. H ist abhängig von der Teilchengröße einer Säulenpackung, der Durchflussgeschwindigkeit sowie der Viskosität der mobilen Phasen und der Gleichmäßigkeit einer Packungen. Je kleiner der Wert für HETP ist, umso mehr Böden (mit resultierender besserer Auflösung / Trennung) befinden sich in einer Säule gleicher Länge. Wobei der übliche Wert für die HPLC bei 0,1 mm liegt.

4. zur Optimierung einer Trennung

In der Tabelle 1 sind die gewünschten Optimierungs-Änderungen sowie die Möglichkeiten zum Erreichen dieser Änderung zusammengefasst:

| Gewünschte Änderung | Mittel / Weg |
|--|--|
| Erhöhung der Bodenzahl N | längere Säule |
| Verkleinerung der Bodenhöhe H | kleinere Teilchen, Viskosität der mobilen Phase verringern |
| Änderung des Kapazitätskoeffizienten k' der Substanzen | effektivste Methode: Eluentenzusammensetzung, Selektivitätsfaktors von zwei Substanzen auf Werte zwischen 1 - 10 (nicht 1, sonst keine Trennung) einstellen, Zusammensetzung der mobilen Phase, Temperatur (besonders bei Ionen), stationäre Phase ändern, chemische Effekte nutzen |

Tab.1: Optimierung

Das Ziel einer Optimierung ist eine kurze Analysenzeit bei ausreichender Trennung. Eine geeignete Beziehung zur Abschätzung der Optimierungserfolge (für ähnliche Kapazitätsfaktoren zweier Substanzen) stellt folgender Formel dar:

$$R_{\text{neu}}/R_{\text{vorher}} = (N_{\text{neu}})^{1/2}/(N_{\text{vorher}})^{1/2} = (t_{r/\text{neu}})^{1/2}/(t_{r/\text{vorher}})^{1/2}$$

mit: R = Auflösung

N = Bodenzahl

t_r = (Brutto-)Retentionszeit

3.5. Chirale HPLC

In der Analytik werden verschiedenen Methoden der Chromatographie verwendet (siehe Kapitel 3.4.1). Vor allem bei der Erfassung des Gehalts von Wirkstoffen und anderen Xenobiotika in biologischen Flüssigkeiten und Geweben, zum Drugmonitoring oder zur Bestimmung der relativen Metabolismusraten und der Verteilung individueller Enantiomere in biologischen Systemen ist die HPLC anzutreffen.

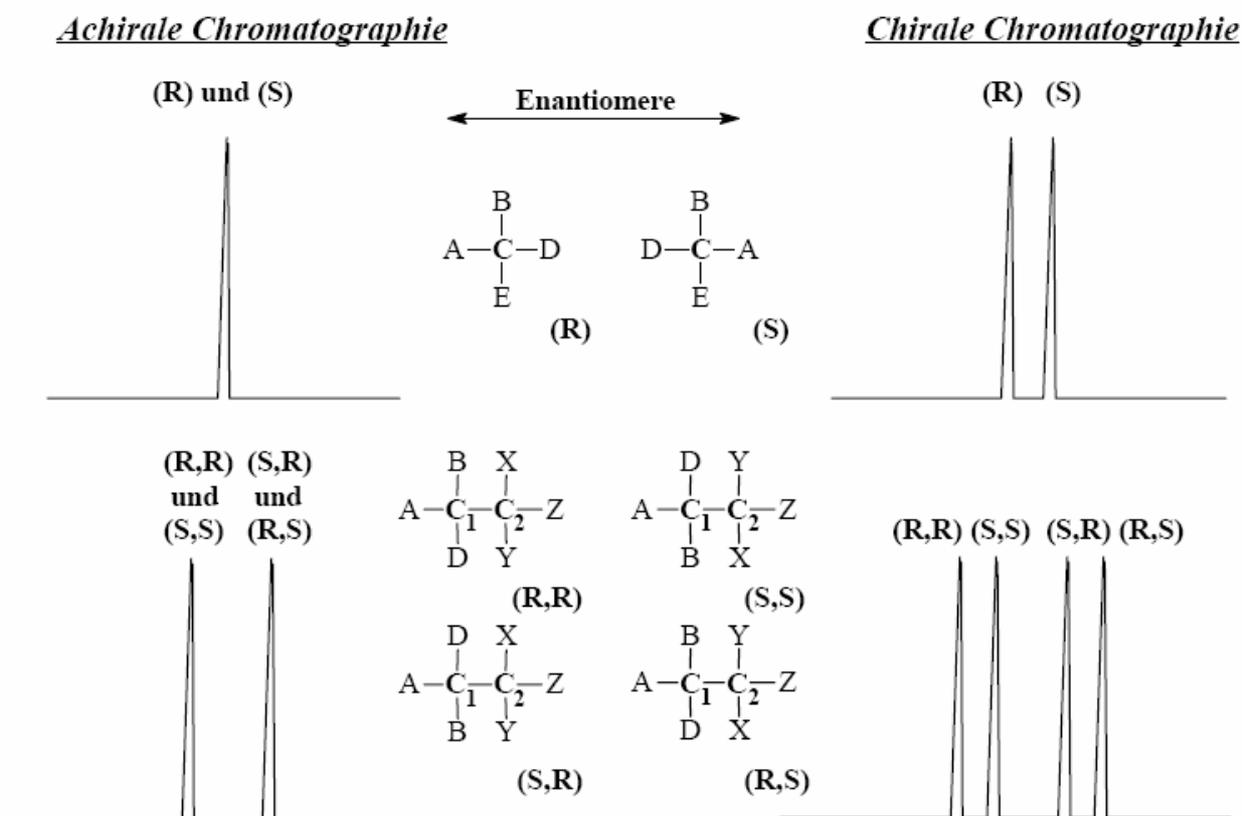


Abb. 27: Trennung mit chiralem Säulenmaterial.

Oben: ein Asymmetriezentrum (C-Atom): 2 Stereoisomere, Enantiomere;

Unten: zwei Asymmetriezentren (C₁- und C₂-Atome): maximal 4 Stereoisomere,

d.h. zwei Diastereomere, die jeweils als Enantiomeren-Paare vorliegen

(nach Wainer, 1987^[68]).

3 5.1 HPLC-Analytik

Allgemein kann die chromatographische Trennung als differentielle Adsorption der zu trennenden Substanzen an einem stationären Säulenmaterial im Wechselspiel mit der mobilen Phase beschrieben werden.

Bei der chiralen Trennung wird ein temporärer diastereomerer Komplex zwischen dem einen Analyt-Enantiomer und dem chiralen Selektor gebildet. Dadurch wird ein Enantiomer stärker retardiert und die chirale Aufspaltung wird erhalten.

3.5.1.1 Chirale stationäre Phasen (CSP)

Die ersten kommerziellen chiralen stationären Phasen sind seit dem Jahr 1981 (*Pirkle* et al. ^[69]) verfügbar. Seitdem führte die Weiterentwicklung des Säulenmaterials zu einem Anstieg auf ca. 140 kommerziell und ca. 1400 nichtkommerziell verfügbare CSPs ^[70].

Für die chirale Trennung mittels HPLC stehen daher verschiedene Säulenmaterialien zur Verfügung. Eine Klassifizierung kann bei analytischen Arbeiten sowie Trennproblemen helfen, eine rationale Wahl der Phase zu treffen. *Wainer* teilte im Jahr 1987 die CSPs in Typ I bis V ein, je nach Art der Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase ^[46a,68] (Tab.2).

3. Theoretischer Teil

| Typ | Trennprinzip | Chemie |
|---|--|---|
| I: Bürsten- oder <i>Pirkle</i> -Phase | Anziehende Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen, Charge-Transfer-Komplexe | Verschiedene chirale Selektoren, ionisch und kovalent gebunden |
| II: Polymere Helices | Anziehende Wechselwirkungen, Wirt-Gast-Komplexe | Cellulosederivate, Amylosederivate |
| III: Kavitäten (Inclusionsphasen) | Einschlussverbindungen, Wirt-Gast-Komplexe | Cyclodextrine, Kronenether, Polyacrylamide, Polymethacrylate |
| IV: Ligandenaustausch | Ligandenaustausch | Aminosäure-Metall Komplexe |
| V: Proteine | Hydrophobe und polare Protein- Wechselwirkungen, Mesophasenwechselwirkungen | α_1 -saures Glycoprotein (AGP) Rinderserumalbumin |

Tab.2: Klassifizierung chiraler stationärer Phasen

Chirale Trennung durch Einschlusskomplexierung (Inclusionsphasen; Typ III)

Zu der Art von Einschlusskomplexierungs-Phasen gehören Polysaccheride, Kronenether und synthetische Polymere, adsorbiert auf Kieselgelmatrix. Eine Trennung der Racemate wird durch das selektive Einschließen der Enantiomere in ihre chiralen Kavitäten erreicht. *Hesse* und *Hagel* ^[71] verwendeten erstmals mikrokristallines Cellulosetriacetat (CTA) zur Enantiomerentrennung.

1. Die Kronenether können als synthetische makrozyklische Polyether selektive Komplexe mit geeigneten Kationen eingehen. So schließt der 18-Krone-6-Ether über die Ion-Dipol-Interaktionen der Sauerstoffatome Ammonium-Ionen ein. Das chirale Derivat des Polyethers 18-Krone-6 mit komplexierten Amin ist in Abbildung 28 dargestellt.

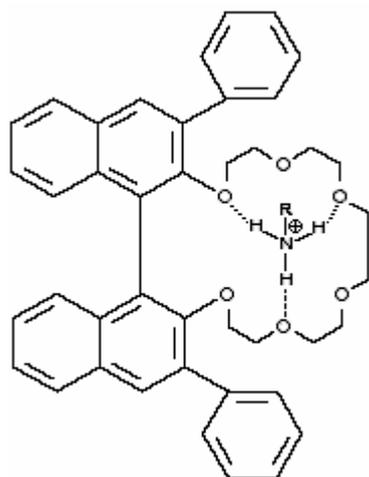


Abb. 28: Struktur des Polyethers 18-Krone-6 mit Amin

Es werden Trennungen von Aminen, Aminoalkoholen und Aminosäuren ^[72] und andere Verbindungen mit primären Aminogruppen nahe des asymmetrischen Zentrums, sowie Dipeptide an optisch aktiven Kronenethern, die chemisch an Kieselgel oder als Polymermatrix verknüpft sind, beschrieben. Durch Weiterentwicklung kann die Anzahl an trennbaren Substanzen [63] vergrößert werden. Kommerziell sind diese Säulen unter den Handelsnamen CROWNPAK[®]CR (+) und CROWNPAK[®]CR (-) erhältlich (Abb.29) ^[73].

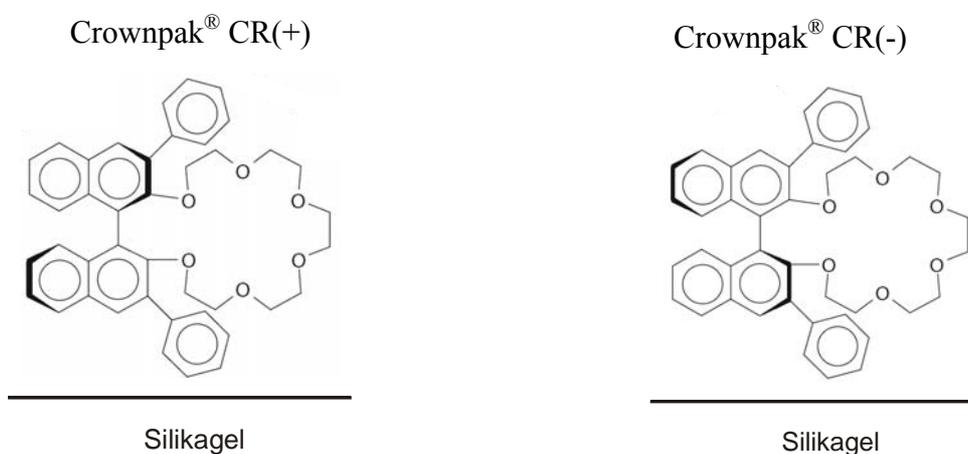


Abb. 29: Struktur des chiralen Kronenethers, der als chiraler Selektor dient und 5 μm Silikagels ummantelt. Dieses Säulenmaterialien sind als CROWNPAK[®]CR (+) und CROWNPAK[®]CR (-) erhältlich.

Saure mobile Phasen, z. B. Perchlorsäure mit einem pH-Wert von 1 bis 2, werden zur Benutzung dieser Säulen unter Standard-Bedingung eingesetzt.

3. Theoretischer Teil

Außerdem kann diese Art der Säulen als Referenz-Säulen bei der Aminosäuren-Trennung dienen, da sie den Vorteil der Umkehrung der Elutionsabfolge (mit der CR(-)-Säule werden die umgekehrten Bedingungen zur CR(+)-Säule erhalten) besitzen. Auch können mit diesen Phasen underivatisierte Substanzen getrennt werden.

2. *Blaschke* ^[74] stellte erstmals synthetische Phasen aus Polyacrylamide und Polymethacrylamide her (Abb. 30). Die polymeren Ketten von synthetischen Polyvinylen besitzen eine hohe Beweglichkeit in Lösung, während sie im festen Zustand häufig eine chirale helicale Struktur aufweisen. Durch Einlagerung von großen Gruppen in die Ketten, wird die Mobilität dieser Polyvinyle eingeschränkt und die chirale Struktur bleibt bestehen.

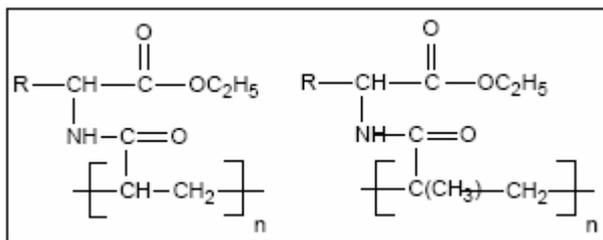


Abb. 30: Polyacrylamid und Polymethacrylamid

3. Aufgrund der mikrokristallinen Struktur von Cellulose, die nach der heterogenen Acylierung erhalten bleiben muss, besitzen die Derivate Cellulose-Triacetat und Tribenzoat chirale Erkennungseigenschaften. 1979 stellte *Okamoto*, Nagoya University (Japan) ^[75] erstmals eine Phase aus (+)-Poly(triphenylmethyl)-methacrylat her (siehe Abbildung 1.11.). Zu dieser Art der Phasen gehören die beiden Säulen Chiralpak[®]OP(+) und Chiralpak[®]OT(+). Hierbei dient als chiraler Selektor ein chirales synthetisches Methacrylat-Polymer, welches 10 µm Silikagel ummantelt (Abb.31).

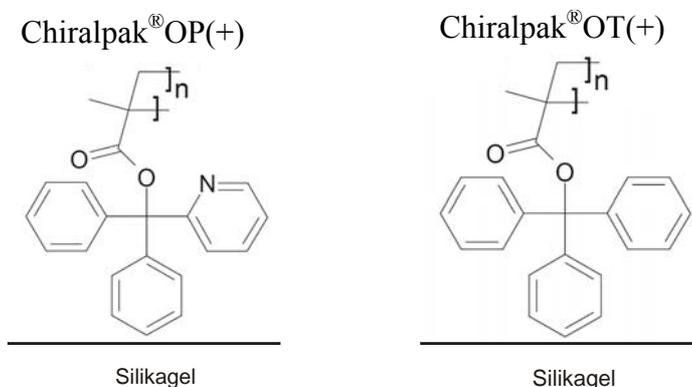


Abb. 31: Struktur von (+)-Poly(triphenylmethyl)-methacrylat

Bei dem Säulenmaterial Chiralpak[®]OT(+) ist das verwendete Polymer sehr empfindlich und zersetzt sich langsam bei der Verwendung von Alkoholen. Um diesem Phänomen auszuweichen sollten die Trennungsläufe bei niedrigen Temperaturen (0°C bis ca. 5°C) durchgeführt werden.

4. Die ersten Kieselgel-gebundenen Cyclodextrin-Phasen (CD-CSP) entwickelte *Armstrong* et al. im Jahr 1985. Heutzutage gibt es die nativen CD-Phasen (α – γ) und die modifizierte β -CD-Säulen wie Acetyl- und Hydroxypropylether-Phasen, deren Selektivität durch Einführung funktioneller Gruppen an ihren sekundären Hydroxylgruppen bestimmt wird.

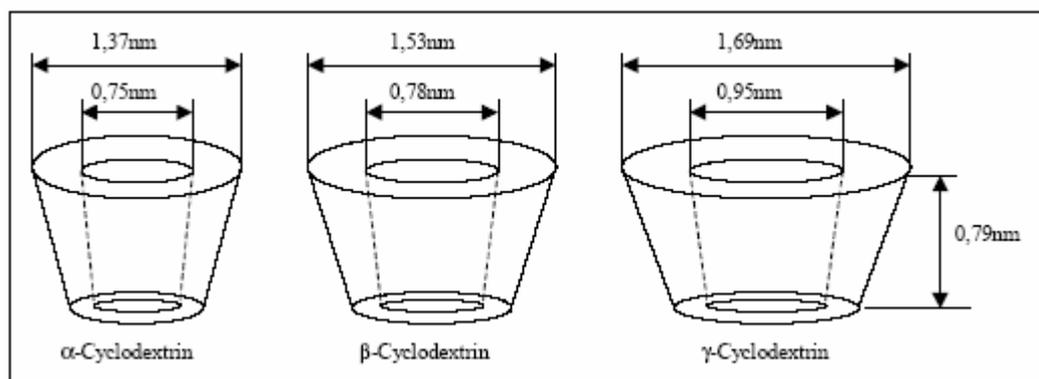


Abb. 32: Kavitäten von α -, β - und γ -Cyclodextrin

Cyclodextrine sind Ringstrukturen aus α -1,4-glycosidisch verknüpften D-Glucopyranose-Einheiten. Gebildet wird α -Cyclodextrin aus 6 Glucoseeinheiten, β -Cyclodextrin von 7 Glucoseeinheiten und γ -Cyclodextrin durch 8 Glucoseeinheiten (Abb.32). Die zylindrischen Moleküle besitzen einen hydrophilen Rand sowie eine hydrophobe Kavität und eignen sich zur Enantiomerentrennung und zur Diskriminierung von Diastereomeren und Strukturisomeren [76-78]. Cyclodextrine werden sowohl für die Hochleistungsflüssigchromatographie [79] als auch für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt [80].

Chirale Trennung auf Polysaccherid-Phasen (Polymere Helices; Typ II)

Bei dem Phasen-Typ auf Polysaccherid-Basis wird als chiraler Erkennungsmechanismus eine Kombination aus Einschlusskomplexierung und attraktiven / sterischen Interaktionen, z.B. Wasserstoffbrückenbindungen oder π - π - sowie Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, angenommen. Die verwendete Ausgangsverbindung Cellulose, aus α -(1,4)-verknüpften D-(+)-Glucoseeinheiten aufgebaut, bildet seilähnliche helicale Strukturen und kann an der freien Hydroxylgruppe derivatisiert werden. Durch die Einführung von verschiedenen Substituenten wird die chirale Erkennung beeinflusst. Sowohl Cellulose als auch seine Derivate besitzen die Fähigkeit der enantioselektiven Interaktionen.

Okamoto et al. (1984) ^[81] entwickelten CSPs auf Polysaccheridbasis von Cellulosetriacetat gebunden an Kieselgel. Die Weiterentwicklung führte zu Kieselgel ummantelter Cellulose (später auch Amylose) auf der Basis von Ester-, Carbamat- und Etherderivaten. Kovalent an die Kieselgelmatrix gebundene Cellulose- und Amylolederivate werden heutzutage hergestellt ^[82-86].

- Cellulose-tris(4-methylbenzoat) mit der Herstellerbezeichnung OJ (*Ishikawa und Shibata*, 1993 ^[87]; *Williams et al.*, 1997 ^[25]; *Vaccher et al.*, 1998 ^[88]; OJ-R: *van Overbeke et al.*, 1997 ^[89]),
- Amylose-tris(1-phenylethylcarbamate) mit der Herstellerbezeichnung AS (*Vaccher et al.*, 1998 ^[90]; *Wang und Cheng*, 1999 ^[91]),
- Amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) mit der Herstellerbezeichnung AD (*Williams et al.* ^[25], 1997; *Ning*, 1998 ^[92]; *Ferretti et al.* ^[93], 1998; *Vaccher et al.*, 1998 ^[90]; *Kummer und Werner*, 1998 ^[94]; *Küsters und Nozulak*, 1998 ^[95]; *Kaliszan*, 1998 ^[96]; *Wang und Cheng*, 1999 ^[91]).

Diese Säulen sind bei der Firma *Daicel* unter dem Namen CHIRALPAK[®] für Amylose-Derivate (Tabelle 3) und CHIRALCEL[®] für Cellulose-Derivate (Tabelle 4) im Handel erhältlich sind.

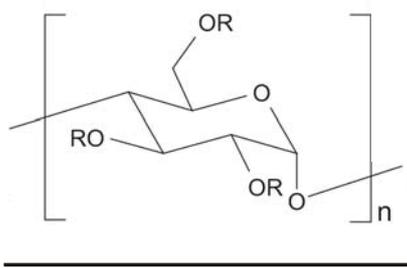
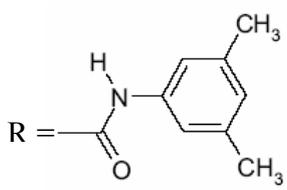
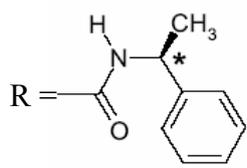
| Beispiele von Daicel-CSP auf Amylosebasis | |
|--|---|
|  Silikagel | |
|  | Chiralpak [®] AD(-H): Amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) ummanteltes Silikagel |
|  | Chiralpak [®] AS(-H): Amylose-tris-[(S)-α-methylbenzylcarbamate] ummanteltes Silikagel *: (S)- Konfiguration; chirale Seitenkette |

Tabelle 3: Beispiele von Daicel-CSP auf Amylosebasis

Zuerst konnten diese CSPs (im Normalphasenmodus, siehe Kapitel 3.1.2) nur mit wasserfreien Eluenten genutzt werden, später wurde Säulenmaterial für den Gebrauch wässriger Eluenten (Suffix –R bei der Herstellerbezeichnung) entwickelt. Wegen ihrer guten Trenneigenschaften werden die Polysaccharidphasen auf Basis der Amylose^[97] und auf Basis der Cellulose^[98] ständig weiterentwickelt. Bei dieser chiralen Trennungsmethode erwies sich die Cellulose-tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)-CSP (OD) als erfolgreich.

Andere Polysaccharide wie Chitosan, Xylan Curdulan, Dextran und Inulin sind als Phenylcarbamate-derivat getestet worden^[99].

3. Theoretischer Teil

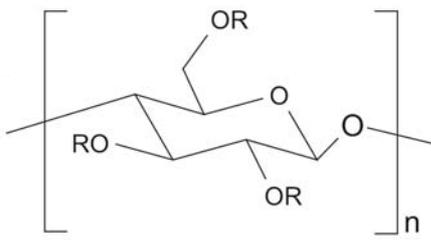
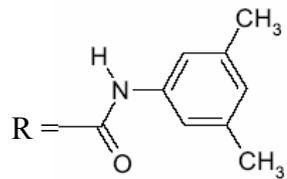
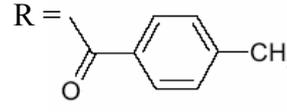
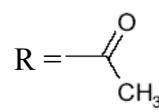
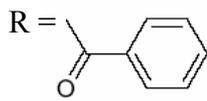
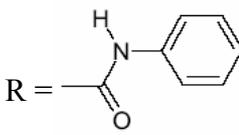
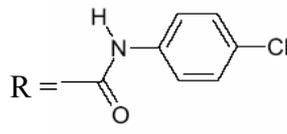
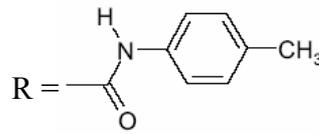
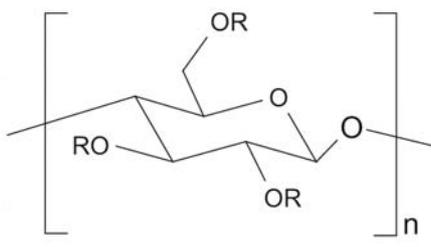
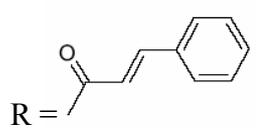
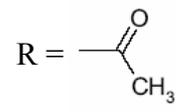
| Beispiele von Daicel-CSP auf Cellulosebasis | |
|--|---|
|  <p style="text-align: center;">Silikagel</p> | |
|  | Chiralcel [®] OD(-H): Cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) ummanteltes Silikagel |
|  | Chiralcel [®] OJ(-H): Cellulose-tris-(4-methylbenzoate) ummanteltes Silikagel |
|  | Chiralcel [®] OA: Cellulose-triacetat ummanteltes Silikagel |
|  | Chiralcel [®] OB(-H): Cellulose-tribenzoat ummanteltes Silikagel |
|  | Chiralcel [®] OC: Cellulose-tris-(phenylcarbamate) ummanteltes Silikagel |
|  | Chiralcel [®] OF: Cellulose-tris-(4-Chlorophenylcarbamate) ummanteltes Silikagel |
|  | Chiralcel [®] OG: Cellulose-tris-(4-methylphenylcarbamate) ummanteltes Silikagel |

Tabelle 4: Beispiele von Daicel-CSP auf Cellulosebasis

| Beispiele von Daicel-CSP auf Cellulosebasis | |
|---|---|
|  <p style="text-align: center;">Silikagel</p> | |
|  <p>R =</p> | Chiralcel [®] OK: Cellulose-tricinnamat ummanteltes Silikagel |
|  <p>R =</p> | Chiralcel [®] CA-1: Feines Pulver der mikrokristallinen Substanz Cellulose-triacetat |

Fortsetzung von Tabelle 4: Beispiele von Daicel-CSP auf Cellulosebasis

Einflussnahme der mobile Phasen auf die chiralen stationären Polysaccherid-Phase

Für diese chirale stationäre Polysaccherid-Phase wird sphärisches Silikagel mit dem polymerischen chiralen Selektor (Amylose- oder Cellulose-Derivat) physikalisch ummantelt. Durch diese Art der Ummantelung wird die Wahl der Laufmittel/ -gemische eingeschränkt. Ein Standard-Laufmittel für diese Säulen ist ein Gemisch aus Hexan (Heptan) und Alkohol (siehe Tabelle 5). Polare Lösungsmittel wie Ethanol, Methanol und Acetonitril werden von einigen dieser Art der Säule toleriert, aber die Benutzung dieser Lösungsmittel sollte vorsichtig gehandhabt werden. Ein sogenanntes „Ausbluten“ der Säule, d.h. eine Ablösung der Ummantelung vom Säulenmaterial wird mit diesen Lösungsmitteln bewirkt.

Für die beiden Säulen Chiralpak[®] AD(-H) und Chiralcel[®] OD(-H) können die polaren Lösungsmitteln Methanol und Ethanol jeweils alleine („pur“) als auch kombiniert in einem Methanol-Ethanol-Gemisch eingesetzt werden. Das gleiche gilt für das Lösungsmittel Acetonitril, es kann sowohl pur und in der Kombination mit Alkoholen verwendet werden.

3. Theoretischer Teil

Die folgenden Lösungsmittel sollten allerdings niemals, auch nicht für die Probenpreparation, benutzt werden: Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Dioxan, Toluol, Tetrahydrofuran, Chloroform, Methylenechlorid, Aceton, Ethylacetat. In diesem Fall tritt eine Zerstörung der Ummantelung vom Säulenmaterial schon beim ersten Gebrauch der oben genannten Lösungsmittel auf.

| Hexan / 2-Propanol | Säule | | Hexan / Ethanol | Säule |
|---------------------------|---|--|---|---|
| 100 : 0 bis 0 : 100 | Chiralpak [®] AD(-H), Chiralcel [®] OD(-H) | | 100 : 0 bis 0 : 100 | Chiralpak [®] AD(-H), Chiralcel [®] OD(-H) |
| | | | 100 : 0 bis 85 : 15 und 40 : 60 bis 0 : 100 | Chiralpak [®] AD |

Tabelle 5: Geeignete Laufmittelgemische für die chiralen stationären Polysaccherid-Phasen

Chirale Trennung auf Bürsten- oder *Pirkle*-Phasen (Typ I)

Bei den *Pirkle*-Phasen handelt es sich um chirale Monomere, die kovalent oder ionisch an Kieselgel gebunden sind ^[100-103]. Es wird zwischen π -Akzeptor-Phasen, π -Donor-Phasen auf der Basis von β -Naphthoylderivaten des Alanins und Phasen mit Selektoren unterschieden. Zu den Hauptvertreter zählen die auf Silicagel aufgetragenen Derivate des Dinitrobenzoyls der Aminosäuren-Enantiomere Phenylglycin und Leucin. Die ionischen Phasen, die zu Beginn der Entwicklung dieser Phasen von *Pirkle* und seinen Mitarbeitern hergestellt wurden, zeigen zwar eine hervorragende Selektivität, sind aber nur für relativ unpolare Fließmittel geeignet. Durch eine Weiterentwicklung zu kovalent gebundenen Phasen ^[101] konnte die Anzahl an erlaubten Fließmitteln, vor allem polaren Laufmitteln, erhöht werden ^[104]. Die Struktur der *Pirkle*-Phasen wird in Abbildung 33 gezeigt.

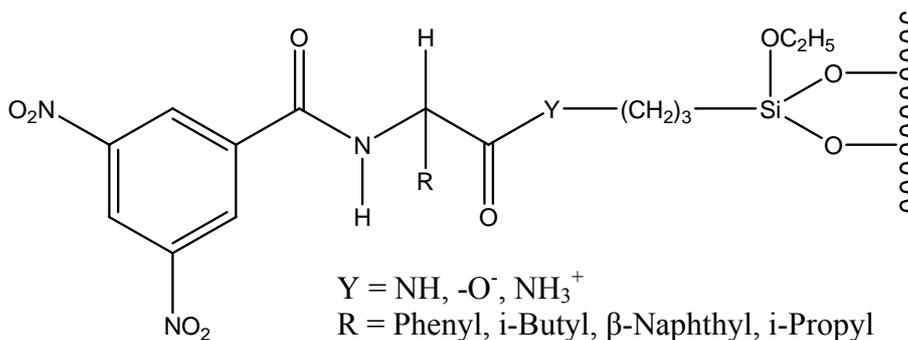


Abb. 33: Struktur von Pirkle-Phasen

In einer „Dreipunktregel“ ^[105] beschrieb *Dalgliesh*, welche Wechselwirkungen für eine Enantiomerendiskriminierung zwischen Analyt und CSP an diesen Phasen zustande kommen müssen (Abb. 34).

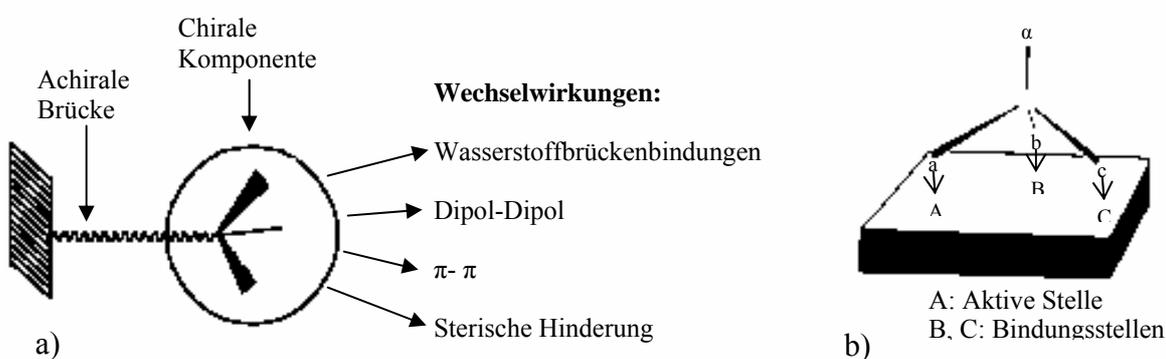


Abb. 34: a) Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Typ I CSP
 b) Dreipunkt-Kontaktmodell

Die Phasen mit Selektoren gehören zu der sogenannten 2. Generation von *Pirkle*-Phasen und besitzen häufig 2 chirale Zentren sowie Amid- oder Harnstoff-Einheiten (z.B. π -Donator-Gruppen wie Dinitrobenzoylharnstoff-, Dinitrophenyl-Harnstoff- oder Carbamat-Derivate, z.B. 3,5-Dinitrobenzoyl-D-Phenylglycin-Säule). Bei der Firma *MACHERY und NAGEL* wird für die chirale Säule „Nucleosil[®] Chiral-2“ das Säulenmaterial *N*-(3,5-Dinitrobenzoyl)-D-phenylglycin, einer Phase der 2.Generation, verwendet. Diese Phase besteht aus Antipoden, wobei das Enantiomer der chiralen Säule „Nucleosil[®] Chiral-3“ von der Firma *MACHERY und NAGEL* dem Säulenmaterial *N*-(3,5-Dinitrobenzoyl)-L-phenylglycin entspricht.

Chirale Trennung auf Protein-Phasen (Typ V)

Für die selektiven Protein-Phasen, die aber eine geringe Kapazität besitzen, werden vor allem Rinderserumalbumin ^[106-108], α_1 -saures Glycoprotein ^[109-111] oder das Eiprotein Ovomuroid ^[112] verwendet. Diese, mit der Kieselgelmatrix verknüpften, komplexen Proteinstrukturen (häufig Enzyme) mit spezifischen Bindungsstellen, binden die zu trennenden Substanzen über eine Kombination aus elektrostatischen und apolaren hydrophoben Wechselwirkungen. Einfluss auf die Trennleistung sowie Stabilität der Retentionszeit kann über diese Wechselwirkungsmechanismen, durch den pH-Wert, die Ionenstärke, die verwendeten Puffer, Ionenreagenzien und organische Modifier, geübt werden ^[113]. *Armstrong* ^[114,115] stellte das Konzept der Nutzung makrozyklischer Antibiotika als chirale Selektoren vor und die erste kommerziell verfügbare Säule dieser Art war Chirobiotic V der Firma *Astec*. Bei Chirobiotic V bindet das amphotere Glycopeptid *Vancomycin* kovalent an das Kieselgel. *Vancomycin* besitzt 18 chirale Zentren, die drei Hohlräume auskleiden. Chirobiotic T, eine Weiterentwicklung, enthält das amphotere Glycopeptid *Teicoplanin* mit 23 chiralen Zentren und vier Hohlräumen als chiralen Selektor. Schließlich gibt es noch die Chirobiotic R-Phase mit Ristocetin A als chiraler Selektor, der aus 38 chiralen Zentren (hauptsächlich von den 6 Zuckereinheiten) besteht.

Eine stereoselektive Orientierung im Hohlraum kann aufgrund durch aromatische Gruppen, die im Analyten vorhanden, und der Elektronenverteilung der aromatischen Methylengruppen mit denen der Glycosidsauerstoffe zustande kommen. Das Einpassungsvermögen des Analyten in den Hohlraum ist bei der Wahl des Cyclodextrins (siehe Kapitel: Chiral Trennung durch Einschlusskomplexierung) für eine geeignete Retention und die chirale Erkennung wichtig. Substituierte Phenyl-, Naphthyl- und Binaphthylringe können auf β -Cyclodextrin-Phasen getrennt werden, kleinere Moleküle auf α -Cyclodextrin-Phasen und Moleküle mit 4 oder 5 Ringen in ihrer Struktur (Steroide) meistens γ -Cyclodextrin-Phasen.

Chirale Trennung auf Ligandenaustausch-Phasen (Typ IV)

Bei den Ligandenaustausch-Phasen werden optisch aktive Aminosäuren, meistens L-Prolin, über einen Spacer an Kieselgel gebunden (Abb.35). Durch die Beladung der Metallionen (z.B. Kupfer) mit Aminosäuren werden Metallkomplexe gebildet.

Diese gebundenen Aminosäuren werden bei der Enantiomerentrennung aus dem Komplex verdrängt. Auf der unterschiedlichen Stabilität der Komplexbildung beruht daher das Prinzip dieser Phasen ^[116-122]. Geeignet ist diese Art der Ligandenaustauschchromatographie auch für die präparative Enantiomerentrennung ^[122].

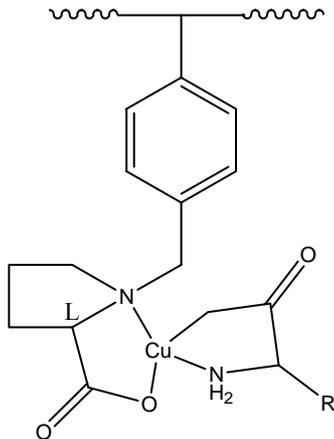


Abb. 35: Struktur von L-Prolin-Kupfer-Komplex mit einer Aminosäure

Die Phase der chiralen Säule „Nucleosil[®] Chiral-1“, der Firma *MACHEREY und NAGEL* besteht aus dem Säulenmaterial eines Kupfer-Prolin-Komplexes. Hierdurch werden die zu trennenden Substanzen chelatisiert, z.B. Aminosäuren, Dicarbonsäuren oder Diamine). Von der Firma *DAICEL* sind als chirale stationäre Ligandenaustauschphasen (Ligand Exchange Chiral Stationary Phases) folgende beiden Phasen seit dem Jahr 2005 erhältlich: Chiralpak[®]WH und Chiralpak[®]MA(+). Bei diesem Säulenmaterialien wird die stationäre chirale Phase durch die Ummantelung oder Bindung von Aminosäuren und deren Derivaten an Silikagel (mit einer Partikelgröße von 10 µm bei WH und 3 µm bei MA(+)) hergestellt (Abb.36, 37). Diese beiden Säulen können organische Modifier, wie Methanol und Acetonitril, tolerieren, entsprechend ihrer Beschreibungen.

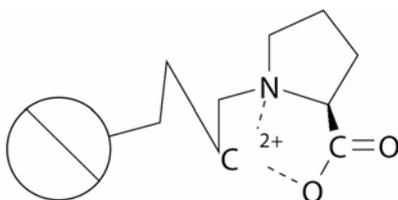


Abb. 36: Struktur von Chiralpak[®]WH, mit dieser Säule können α -Aminosäuren und ihre Derivate getrennt werden.

3. Theoretischer Teil

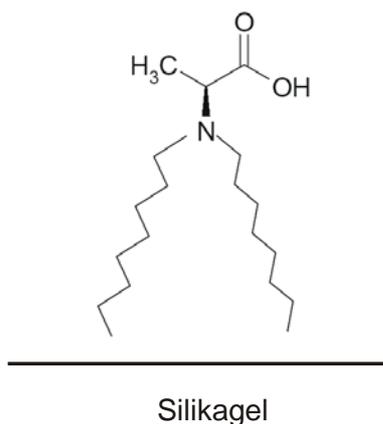


Abb. 37: Struktur von Chiralpak[®]MA(+). Diese Säule ist zur Trennung von Hydroxycarbonsäuren, Aminosäuren (eingeschlossen ihrer Derivate) und Dipeptide geeignet.

Chirale Trennung auf Anionischen-Ligandenaustausch-Phasen

Seit Ende des Jahres 2005 sind von der Firma *DAICEL* als Anion Exchange Chiral Stationary Phases folgende beiden Phasen erhältlich: Chiralpak[®]QD-AX und Chiralpak[®]QN-AX. Es sind weiche Anion-Austausch (AX) HPLC-Säulen für die enantioselektive Trennung von chiralen Säuren wie carboxylische, phosphonische, phosphinische, phosphorische oder sulfonische Säure-Gruppen. Ebenso könne weiche saure Komponenten getrennt werden wie Phenole. Auf zwei komplementären stereoisomerischen Quinin- (QN) und Quinidin- (QD) Derivaten, wie in Abbildung 38 dargestellt, basieren diese beiden Säulen (entwickelt von *W. Lindner* et al., Wien^[123]).

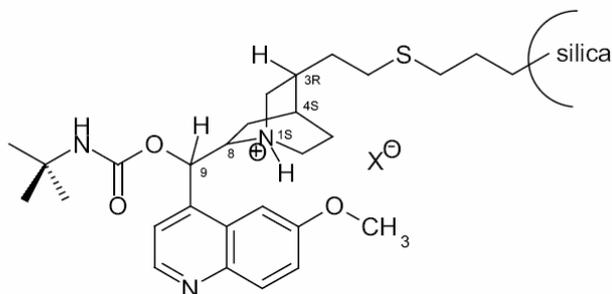


Abb. 38: Struktur von Chiralpak[®]QD-AX: *o*-9-(tertiär-butylcarbamoyl)-quinidin (8R, 9S) immobilisiert auf 5 μm Silikagel, bzw. von Chiralpak[®]QN-AX: *o*-9-(tertiär-butylcarbamoyl)-quinin (8S, 9R) immobilisiert auf 5 μm Silikagel

Aufgrund ihres pseudo enantiomerischen Charakters wird ihre umgekehrte Elutionsreihenfolge für die entgegengesetzten Enantiomere deutlich. Sie können sowohl für den reversed phase (RP, siehe Kapitel 3.5.1.2) mode oder im polar organic mode (nicht-wässrige, polare organische Lösungsmittel versetzt mit organischer Säure und Basen als Puffer-Zusatz) eingesetzt werden. Auch die Trennung von chiralen basischen oder neutralen Komponenten sollte möglich sein, jedoch unter normal phase (NP, siehe Kapitel 3.5.1.2) Konditionen. In dieser mobile phase mode zeigen diese beiden Säulen das Trennverhalten von der standard *Pirkle* type chiral stationary phase. Auf Chiralpak[®] QD-AX und Chiralpak[®] QN-AX sind alle gängigen HPLC-Laufmittel (Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran, 1,4-Dioxan oder Chloroform) einsetzbar sowie ein pH-Bereich von 2 bis 8 möglich. Typische Puffer die in dem hydro-organic mode zum Einsatz kommen sind Acetat, Format, Citrat und Phosphat.

Chirale Selektoren als Zusatz zu achiralen Trennsystemen

Durch den Zusatz von Selektoren, wie z. B. Cyclodextrin^[124-128] oder Kronenether oder Kupfersulfat an ionischen Ligandenaustausch-HPLC-Säulen^[124], kann auch an achiralen Phasen eine Enantiomerentrennung durchgeführt werden. So wurden Stellungsisomere an achiralen Phasen unter Zusatz von α - bzw. β -Cyclodextrin getrennt^[129-131].

Trennungen auf immobilisierte chirale Phasen

Seit Anfang des Jahres 2005 hat die Firma *Chiral Technologies Europe* ein Säulenmaterial auf den Markt gebracht, welches den gleichen chiralen Selektor besitzt wie Chiralpak AD (3,5-Dimethylphenylcarbamate, Abb. 39).

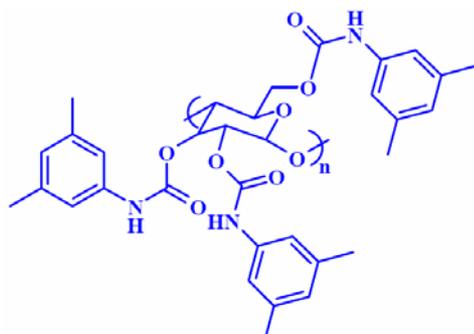


Abb. 39: Struktur des chiralen Selektors von Chiralpak[®] IA: Amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)

3. Theoretischer Teil

Jedoch ist der chirale Selektor bei der Säule Chiralpak IA immobilisiert auf funktionalisiertem 5µm Silikagel (Abb.40), dies bedeutet eine größere Kompatibilität mit einer Reihe von mischbaren organischen Lösungsmitteln (z.B. eine Erweiterung um die Lösungsmittel: Tetrahydrofuran, Ethylacetat, Chloroform, Aceton, Methyl-*tert.*-butylether). Jedes organisch mischbare Laufmittel kann in der mobilen Phase kombiniert werden, auch die Anzahl der zu verwendenden Lösungsmittel für die Probeninjektion ist erhöht. Sie ist die erste kommerziell erhältliche immobilisierte Polysaccharide-CSP (von der Firma *DAICEL*).

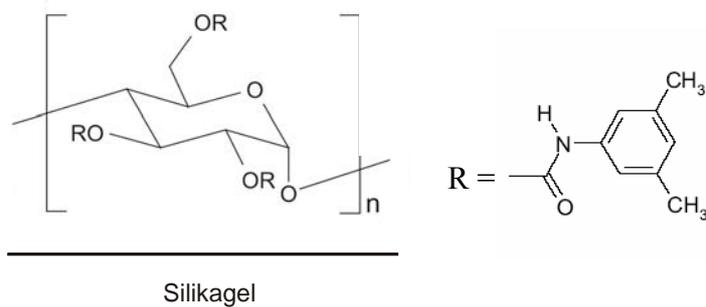


Abb. 40: Struktur von Chiralpak[®]IA (Amylose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilisiert an 5 µm Silikagel)

Dazu ist die Chiralpak[®]IB (Abb.41), ebenso eine immobilisierte Säule von der *Firma DAICEL*, die kommerziell erhältlich ist, aus Cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)-Einheiten aufgebaut.

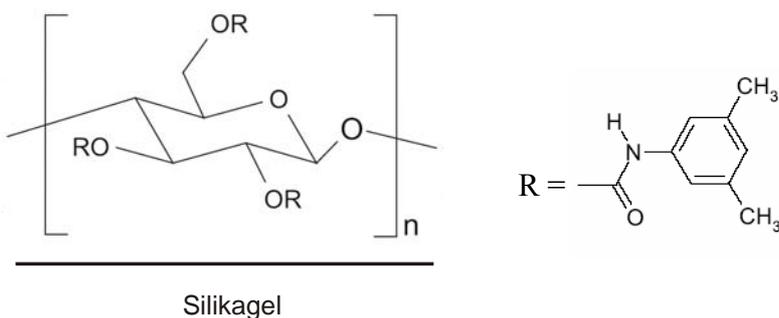


Abb. 41: Struktur von Chiralpak[®]IB (Cellulose-tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate) immobilisiert auf 5µm Silikagel)

3.5.1.2 Phasenmodi - zur Erweiterung der Möglichkeiten zur chiralen Trennung

- Normalphasenmodus (normal phase mode, NP): basiert auf die dominierenden Wechselwirkungen von Wasserstoffbrückenbindungen, π - π - und Dipol-Dipol-Interaktionen.

Für die Zusammensetzung der mobilen Phase werden mischbare organische Lösungsmittel wie Hexan und 2-Propanol (Isopropanol, IPA) verwendet. Bei einer Erhöhung des 2-Propanol-Anteils wird die Retention und chiralen Trennung verringert.

- Umkehrphasenmodus (reverse phase mode, RP): dominiert auf hydrophobe Einflussvorgänge, Wasserstoffbrückenbindungen und sterische Interaktionen.

Die mobile Phase besteht aus einem wässrigen (gepufferten oder ungepufferten) Anteil und einem damit mischbaren organischen Lösungsmittelanteil. In diesem Modus führt eine Erhöhung des wässrigen Anteils zu einer Erhöhung der Retention und Trennfaktoren.

Phasenmodi - Einflussnahme der mobile Phasen auf die chiralen stationären Polysaccherid-Phase

Von der Firma *DAICEL* werden die Säulenarten Chiralpak[®]AD-H, Chiralpak[®]AS-H und Chiralcel[®]OD-H, Chiralcel[®]OJ-H für den Gebrauch im Normalphasenmodus auch in der Version für den Umkehrphasenmodus kommerziell angeboten: Chiralpak[®] AD-RH, Chiralpak[®]AS-RH und Chiralcel[®] OD-RH, Chiralcel[®]OJ-RH. Hierbei besteht die Ummantelung aus den gleichen chiralen Selektoren wie bei der normalen stationären Phase, allerdings wird ein anderes bindendes Silikagel als Basismaterial zur Stabilisierung des CSPs benutzt. Die Umkehrphasen-Säulen werden speziell für wässrig-organische Lösungsmittel verwendet, z.B. bei Proben, welche in wässrigen Medien löslich sind / gebildet werden oder welche in der pH-Wert-Skala Flexibilität verlangen (extreme pH-Werte schädigen allerdings die Säule). Gepufferte mobile Phasen mit einem pH-Wert über 7 zerstören (laut Hersteller) die OD-R-Säule.

- *Ishikawa* und *Shibata* (1993) ^[87] untersuchten die Zusammensetzung und Konzentration von Ionen in der mobilen Phase als Einflussgrößen bei der RP-Trennung.

3. Theoretischer Teil

- *Hiroto et al.* ^[132] sahen sich im Jahr 1994 am Beispiel des derivatisierten Carnitins und Acetylcarnitins den Einfluss von Ionen-Konzentrationen in der mobilen Phase bei der Enantiomeren-Trennung auf der OD-R-Säule an. Dabei stellten sie bei Nutzung eines Perchloratpuffers fest, dass weder die Ionenstärke (0,1 – 1 M) noch der pH-Wert (0,5 M Perchloratpuffer pH = 2 – 6) die chromatographischen Parameter beeinflussten.
- *Ikeda et al.* ^[133] nutzten im Jahr 1989 erstmals eine OD-Säule unter RP-Bedingungen.
- *Ceccato et al.* (1998) ^[134] stellten bei der Optimierung der chiralen Trennung des Antidepressivums *Pirlindol* auf einer OD-R-Säule fest, dass die Natriumperchlorat-Konzentration im Zusammenspiel mit dem pH-Wert in der mobilen Phase nicht zu vernachlässigen ist.

3.5.1.3 Phasenvergleiche

1) Zwischen einer OD- und OJ-Phase:

Vaccher et al. (1998 ^[90]) untersuchten chirale Trennungen von Tetrahydronaphthalen-Derivaten als Agonisten und Antagonisten-Liganden der Melatonin-Rezeptoren im NP-Modus (OD-H). Dabei stellten sie fest, dass die OD- und OJ-Phasen (siehe Kapitel 3.5.1.1: Chirale Trennung auf Polysaccharid-Phasen) in komplementärer Art arbeiten. So führt eine steigende Sperrigkeit der Acylsubstituenten zu einer Abnahme der Enantioselektivität und Auftrennung auf der OD-H-Säule, auf der OJ-Phase jedoch zu einer Zunahme. Für die chirale Trennung ist die Carbamat-Gruppe wichtig, weil das Carbonylsauerstoffatom und die NH-Gruppe über Wasserstoffbrückenbindungen mit den korrespondierenden Gruppen des Analyten interagieren (*Witte et al.*, 1992 ^[135]; *Selditz et al.*, 1997 ^[136]). Um die Wasserstoffbrückenbindungs-Orte konkurrieren Lösungsmittel wie Alkohole mit den Analytmolekülen. Eine zunehmende Größe des Alkohols bewirkt ein Ansteigen der Trennfaktoren als Folge auftretender sterischer Hinderung durch größere Alkohole, die Fähigkeit um die Wasserstoffbrückenbindungs-Orte zu konkurrieren nimmt ab. Mit niedrigen Alkoholen (Methanol und Acetonitril zugesetzt zur mobilen Phase) werden auf der OJ-Säule die besten Ergebnisse erzielt. Ein teilweiser oder vollständiger Verlust an Trennbarkeit wird beim Zusatz von 1-Propanol oder 2-Propanol beobachtet. Die vorherrschende Interaktionsart kann daher nicht die Wasserstoffbrückenbindung darstellen, sondern eher π - π -Wechselwirkungen zwischen der aromatischen Einheit des Analyten und der CSP.

2) Zwischen einer OD- und AD-Phase:

Durch das Vergleichen einer OD- mit einer AD-Phase (siehe Kapitel 3.5.1.1: Chirale Trennung auf Polysaccharid-Phasen), wird der Einfluss des Kohlenstoffgrundgerüsts auf den enantioselektiven Prozess untersucht.

Im Jahr 1995 gelang *Whatley* ^[137] die Trennung von Proteinkinase-C-Inhibitoren auf der Amylose AD-Säule im RP-Modus, mit der OD-Säule nicht. *Wang* und *Chen* (1999) ^[91] stellten bei chiralen Trennung im NP-Modus eine Umkehr der Elutionsreihenfolge fest, wenn statt einer AD- eine OD-Säule genutzt wurde. Da die Derivatisierungsgruppen auf beiden CSPs gleich sind, sowie die überwiegende Zahl der Analyte auf der OD-Säule stärker retardiert wurde, kann dies nur auf konformatorische Unterschiede zurückgeführt werden. *Wainer* et al. hatten schon im Jahr 1987 den Einfluss von sterischen Faktoren bei der Einpassung der Analyte in die chiralen Hohlräume der CSP hervorgehoben ^[138,139].

3.5.1.4 Studien zu den Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase

Bei der Enantiomeren- und Diastereomeren-Trennung von Propanololanaloga (Aminalkyl- und Aminarylsubstituenten) ging es *Facklam* und *Modler* (1994) ^[140] um die dabei bestehende Abhängigkeit der Art (aliphatisch, aromatisch) und der Größe von Substituenten am terminalen Kohlenstoffatom. Der chirale Hohlraum der CSP zeigt große Affinität zu aromatischen Gruppen, wie *Francotte* et al. (1985) ^[141] postulierte, eine bessere Trennung der aromatisch substituierten Enantiomere wurde nicht notwendigerweise dabei beobachtet. Für die chirale Erkennung war das Vorhandensein eines Aminprotons nicht erforderlich. Die 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM)-Derivate konnten durch das Vorhandensein der sperrigen Pyrenyleinheit, die einen effektiven Zugang zu den aktiven Orten für die chirale Erkennung verhindert, nicht getrennt werden. Bei der chiralen Trennung von trans-Dihydrodiol-Metaboliten polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe untersuchten *Landsiedel* et al. (1998) ^[142] die Bedeutung der Interaktion von Hydroxylgruppen mit der Carbamat-Einheit der CSP. Daraufhin konnte *Péter* et al. (1998) ^[143] bei der Enantiomeren-Trennung cyclischer 1,3-Aminoalkohol-Derivate im NP-Modus auf einer OD-Säule zeigen, dass die Alkoholanaloga der Aminoalkohole stärker retardiert wurden als ihre Esteranaloga. Hierfür wurde folgender Retentionsmechanismus abgeleitet: die dominierende Wasserstoffbrücke beim Alkohol wird zwischen dem OH-Proton des Analyten und dem Carbonylsauerstoffatom der Phenylcarbamateinheit gebildet, der Carbonylsauerstoff der Esterfunktion lässt nur Wasserstoffbrückeninteraktionen mit dem NH-Proton des Carbamat-Restes zu.

3. Theoretischer Teil

Durch den Elektronen-Donor-Effekt der Methylsubstituenten an der Phenylgruppe der CSP nimmt die Acidität des NH-Protons ab, während die Elektronendichte am Carbonylsauerstoffatom des Carbamates zunehmen dürfte. Dadurch ist die Interaktion der Wasserstoffbrückenbindung schwächer bei den Estern im Vergleich zu den Alkoholen, die daher stärker retardiert werden.

3.5.1.5 Chirale mobile Phasen

Im Vergleich von Methanol und Acetonitril als organischen Anteil in der mobilen Phase bei der Trennung von Propanolol und *Verapamil* fanden *Ishikawa* und *Shibata* (1993) ^[87] heraus, dass vergleichbare Retentionen bei der Zugabe von Methanol (70%) bzw. Acetonitril (40%) erreicht wurden, bei der methanolischen mobilen Phase aber die Elutionspeaks breiter waren (somit der Trennfaktor geringer). *Hiroto* et al. (1994) ^[132] stellten bei Methanol (80%) eine bessere Enantioselektivität im Vergleich zu Acetonitril (40%) fest, die aber mit einer Abnahme der theoretischen Bodenzahl und Selektivität zwischen Carnitin und Acetylcarnitin einhergeht.

Der Einsatz von chiralen Selektoren

Eine weitere Möglichkeit zur Enantiomerenseparation ist der Einsatz von chiralen Selektoren in der mobilen Phase (unter Bildung von Metallkomplexen, Ionenpaaren und ungeladene chirale Additiva wie Cyclodextrine). Die Vorteile dieser Methode sind die Möglichkeiten des Einsatzes von kostengünstigen konventionellen Säulen, der Austauschbarkeit chiraler Additiva, der Verfügbarkeit verschiedener Additiva und der Nutzung unterschiedlicher Selektivitäten im Vergleich zu den CSPs. Während die Nachteile in der Begrenzung der Detektionssysteme durch die Additiva liegen. Im Jahr 1998 setzten *Hanna* et al. ^[144] Gallensalze (ohne und mit Phosphatidylcholin) als dynamische Ummantelung einer C-8-Kieselgelsäule zur Untersuchungen des Verteilungsverhalten von Wirkstoffen (*Fenoterol*) ein. Die bemantelte Phase verhält sich dabei chromatographisch wie eine gebundene Festphase und die Interaktionen mit der Phase zu der geladenen Form basischer Amine ist vergleichbar zu denen von Phospholipidvesikeln.

Der Zusatz von Elektrolyten

Das Trennverhalten von elektrisch neutralen Substanzen (Analyten) änderte sich nicht durch Zugabe von Elektrolyten in der mobilen Phase. Der Einfluss verschiedener Ionen in der mobilen Phase wurde am Beispiel der Enantiomeren-Trennung des Propanolols und seinen Analoga (Aryloxyaminopropan-2-ol) untersucht. Ein chaotropes Ion (wenig lokalisierte elektrische Ladung, hohe Polarisierbarkeit, geringer Grad an Hydratation) ist zur Partitionierung in eine organische Phase aufgrund des geringen Verlustes an Hydratationsenthalpie beim Transfer von der wässrigen in die organische Phase fähig. Effektive Ionenpaar-Reagenzien (hohe Chaotropizität, hohe Ladungsdelokalisation und Acidität oder hoher Extraktionskonstante) wie die Natriumsalze von PF_6^- , BF_4^- und $\text{CCl}_3\text{CO}_2^-$ ergeben vergleichbare oder bessere Trennungen im Vergleich zu denen von Perchlorat.

Bei sauren Analyten wird der mobilen Phase (pH = unter 7) eine geringe Menge an einer starken Säure zugesetzt. Dies kann wegen der möglichen Ionisation dieser Analyten (z.B. bei Carboxylgruppen) notwendig werden. Für die Herstellung der sauren mobilen Phase sind Perchlorsäure und Phosphorsäure gleichermaßen effektiv (pH = 2). Dagegen reduzierte die Zugabe von Essigsäure die Retention, was durch den Anteil an undissoziierter Essigsäure erklärt werden kann. Durch die Kationen konnten folgende Einflüsse erzielt werden: Die steigende Chaotropizität des Kations brachte eine Abnahme der Retention mit sich. Jedoch war die Beziehung zwischen Chaotropizität des Kations und der Trennbarkeit gering und unklar. Ebenso ist der Mechanismus der Einflussnahme des Kations auf die Retention ist unklar, es scheinen die sekundären Interaktionen zwischen Kationen und Anionen (van-der-Waals, Wasserstoffbrückenbindungen) das Ionenpaar-Gleichgewicht und letztlich die Retention zu beeinflussen. Diese Art eines chromatographischen Systems ähnelt dem der Ionenpaarchromatographie.

Basischen Racematen wird ein anionischer Chaotrop zur Trennung zugesetzt. (Die Bezeichnung chaotrop steht für die Eigenschaft von Substanzen, die regelmäßige, auf der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beruhende Struktur von flüssigem Wasser zerstören. Chaotrope Stoffe stabilisieren die Konformation von Makromolekülen, indem sie die Bildung der zur Solvatation notwendigen H_2O -Käfigstruktur verhindern. Darüber hinaus erleichtern sie bei der Verteilung den Übergang von unpolaren Molekülen aus nicht-wässrigen und wässrigen Phasen). So konnte bei den Anionen folgenden Einflüsse festgestellt werden: Die Retention und der Trennfaktor waren abhängig von der Art des Anions und die Reihenfolge der Retentionserhöhung folgte der Reihe der Chaotropizität der Anionen.

3. Theoretischer Teil

- *Ishikawa* und *Shibata* (1993) ^[87] hoben die Eignung der Hexafluorophosphat-Anionen mit ihrer hohen Chaotropizität, ihrem hohen Grad an Delokalisation, ihrer Acidität und Polarisierbarkeit (aufgrund der 6 Fluoratome) und ihrer hohen Extraktionskonstante mit der organischen Phase eines Ionenpaares zur Trennung dieser Analoga unter RP-Bedingungen hervor.
- *Aboul-Enein* et al. (1996) ^[145] erreichten auf der OD-Säule im RP-Modus durch den Einsatz von Kaliumhexafluorophosphat im Vergleich zu Natriumperchlorat in der mobilen Phase höhere Trennfaktoren. Die Trennfähigkeit hing zum einen mit der Natur der aromatischen Gruppe und der Substitution an der sekundären Aminogruppe zusammen, welche die Basizität beeinflusst. Zum anderen waren die Dipol-Dipol-Interaktion zwischen der 3,5-Dimethylphenylcarbamat- π -Donor-Einheit der CSP und dem π -Akzeptor der Arylgruppe des Analyten wichtig. Dabei stellte sich heraus, dass die π - π -Dipol-Interaktionen zwischen Phenylgruppe und 3,5-Dimethylgruppe stärker sind als bei Naphthyloxy-Derivaten. Im NP-Modus wurden die Trennfaktoren durch steigende Kettenlänge- und Größe der Alkylseitenkette erhöht. Die Polarität am basischen Stickstoff steigt mit zunehmender Länge und Größe der Alkylkette aufgrund seines induktiven Elektronen ziehenden Effektes.

3.5.1.6 Einfluss der Temperatur auf die Säulen

Neben der Wahl der mobilen Phase und der CSP (chiralen stationären Phasen) ist die Temperatur zur Kontrolle der Selektivität und Retention (*O'Brien* et al., 1997 ^[146]; *Armstrong* et al., 1985 ^[114]) geeignet. Temperaturänderungen haben auf die Effizienz der Trennung einen großen Einfluss. Wird die Temperatur verringert, tritt durch einen verringerten Massetransfer, resultierend aus einer gesteigerten Eluentenviskosität und einer erniedrigten Analytendiffusion, ein Effizienzverlust auf. Bei chiralen Säulen kann das Kühlen eine geeignete Möglichkeit zur Selektivitätsverbesserung für Racemate sein. Mit Temperaturanstieg wird die Viskosität der mobilen Phase verringert und die Diffusionsgeschwindigkeiten gesteigert. Der dadurch entstehende erhöhte Massetransfer zwischen mobiler und stationärer Phase reduziert die Bandenverbreiterung. Auch die Retentionsreaktion kann durch die Temperaturerhöhung beschleunigt werden, während eine Temperatursenkung die Steigerung von Enantioselektivität und die Retention zur Folge hat.

Nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung folgt für die Beziehung zwischen Enantiomeren-Trennung, Komplexbildung und Temperatur:

$$-\Delta\Delta G = RT \ln \alpha$$

mit: $\Delta\Delta G$ = Unterschied in der freien Energie der zwei Enantiomeren-Komplexe eines Racemats mit der CSP

R = Gaskonstante

T = Temperatur

$$\ln \alpha = -(\Delta\Delta H/RT) + (\Delta\Delta S/R) + \ln \Phi$$

mit: $\Delta\Delta H$ = Enthalpieänderung bei der Interaktion beider Enantiomere mit der CSP

R = Gaskonstante

T = Temperatur

$\Delta\Delta S$ = Entropieänderung bei der Interaktion beider Enantiomere mit der CSP

Φ = Phasenkonstante

Die Enthalpieänderung, welche im chromatographischen System oft retentionsbestimmend ist, wird durch die lineare Beziehung von $\ln \alpha$ und $1/T$ beschrieben. Bei den meisten Trennungen handelt es sich um exotherme Retentionsreaktionen mit geringen Enthalpieänderungen, eine Temperaturerhöhung würde die Retention vermindern.

Ching et al. (1992) ^[147] untersuchten die Enantioselektivität der OD-R-Säule für verschiedene β -Blocker, wobei das (-)-Isomer die stärker retardierte Spezies mit der größeren Absorptionsenergien war (Kompensationseffekt). Daraus konnten sie eine lineare Beziehung zwischen der Differenz der freien Enthalpie beider eluierenden Peaks $\delta(\Delta H^\circ)$ und der Differenz der Entropie beider eluierenden Peaks $\delta(\Delta S^\circ)$ aufstellen. Aus thermodynamischer Sichtweise kann dieser Zusammenhang wie folgt erklärt werden: das stärker retardierte Enantiomer (größeres $-\Delta H$) besitzt im adsorbierten Zustand eine beschränkte Bewegungsfreiheit und damit niedrigere Entropiewerte als das weniger retardierte Enantiomer. Aufmerksam auf Entropie-beeinflussende Faktoren wie die Änderung des Solvatisierungszustandes des Cyclodextrins oder Verluste translatorischer oder rotatorischer Freiheitsgrade während der Komplexbildung machten *Lindner et al. (1995)* ^[148,149]. Die Entropie macht sich durch die Bevorzugung einer bestimmten räumlichen Anordnung des Analyten an der stationären Phase, wie es bei chiralen Trennungen vorkommt bemerkbar.

3. Theoretischer Teil

Im Jahr 1995 stellte *Whatley* ^[137] eine lineare Beziehung zwischen α und der Säulentemperatur bei der chiralen Trennung von Proteinkinase-C-Inhibitoren im RP-Modus auf einer OD-R-Säule fest. Bei 0°C wurde eine Basislinientrennung erreicht, d.h. praktisch eine vollständige Trennung an der Grundlinie (Basislinie).

4. Spezieller theoretischer Teil

Der Begriff Computer stand im Jahr 1959 für raumfüllende Drahtgebäude. In jenem Jahr, am 29. Dezember 1959, erklärte der Physiker *Richard P. Feynman* ^[42] vor der Jahresversammlung der American Physical Society, dass Computer aus Drähten mit nur 10 oder 100 Atomen Durchmesser gebaut werden müssten und Atome in gewünschter Weise einzeln angeordnet werden könnten. Sechsvierzig Jahre später hat die moderne Technik Forschungsbereiche weiter erschlossen und entwickelt, so dass manche von *Feynmans* Vorschlägen Wirklichkeit geworden, manche ein realistisches Ziel für die kommenden Jahre ist. Heutzutage beschäftigen sich Wissenschaftler mit der Miniaturisierung von Elektronikbauteilen, neuen Materialien und Anwendungsbereichen. Das Interesse liegt bei komplizierten und leistungsfähigen Maschinen im Nanometerbereich. Jedoch kann sich über die Grundlagen der Naturgesetze keine Konstruktion hinwegsetzen. Diese Gesetze können dazu genutzt werden, um Errungenschaften bis an die Grenze des machbaren voranzutreiben, ein Beispiel sind die Rotaxane ^[150].

In der heutigen Zeit ist die Lebensdauer von neuer Technologie kurz, dies fällt besonders bei Computern auf. Wenige Monate vergehen und das vormals neue Modell gilt als veraltet – und die nun auf den Markt erhältlichen Fabrikate besitzen schnellere und mächtigere Prozessoren. Stärkere Prozessoren bedeuten aber, dass mehr Transistoren auf dem Chip Platz finden müssen. Bei gleich groß bleibenden Transistoren, hieße dass die Chips entsprechend breiter werden müssten. Ein weiterer Vorteil einer Verkleinerung der Transistoren und Drähte wirkt sich auf die Prozessoren und Schaltprozesse aus. Zwischen den Transistoren und in den Drähten fließen weniger Elektronen, dadurch wird der Prozessor nicht so heiß und die Schaltprozesse laufen schneller ab. Chiphersteller Intel brachte 1971 den ersten Mikrochip auf den Markt und seit diesem Zeitpunkt hat die Faustregel von Intel-Mitbegründer *Moore* (*Moore'sches Gesetz*) ^[42] Bestand: Alle 18 Monate verdoppelt sich die Zahl der Transistoren auf einem Prozessor gleicher Größe. Auf dem Prozessor-Chip i404 fanden 2300 Transistoren-Platz, die Elektroden waren 1000 Nanometer breit, den ersten Pentium-4-Chip durchziehen 130 Nanometer schmale Drähte und es passen 55 Millionen Transistoren drauf. Allerdings gelangen die Wissenschaftler nun an die Grenze der Silizium-Transistoren und versuchen diese durch andere Materialien zu ersetzen, wie die sogenannte molekulare Elektronik.

Bereits im Jahr 1974 wurde ein Ansatz vorgeschlagen bei dem Gruppen von Atomen die Funktion der Silizium-Transistoren übernehmen. Der Chemiker *Williams* von Hewlett-Packard (HP) und sein Team haben das Crossbar Latch, ein Prozessor-Prinzip, entwickelt.

4. Spezieller theoretischer Teil

In diesem neuen Prinzip gibt es zwei Ebenen von parallelen Nanodrähten aus Titan und Platin, die im rechten Winkel zueinander verlaufen. Die Drähte berühren sich an den Kreuzungspunkten nicht, da sie von sogenannten Pfeilern aus Rotaxan-Molekülen auf Abstand gehalten werden. Bei diesen Rotaxanen kann der Reif auf der Achse entlang gleiten, wodurch sich das Rotaxan zwischen zwei Zuständen hin- und herschalten lässt. Je nachdem wo sich der Reif auf der Achse befindet, ändert sich die Leitfähigkeit und die Kreuzungspunkte können für Strom offen oder gesperrt sein. Dieses Hin- und Herschalten erzeugt die beiden Bit-Zustände 0 und 1. Mit einer exakt berechneten Spannung, die über die sich kreuzenden Drähten angelegt wird, lässt sich jeder dieser Punkte einzeln, gezielt ansteuern sowie schalten. Dadurch kann ein Bit geschrieben und wieder auslesen werden.

Bei einem Prototyp wurden acht dieser Drähte, die eine Breite von vierzig Nanometer einnehmen und somit schmaler sind als bei den heutigen PC-Chips, gekreuzt. In einen Kreuzungspunkt, der eine Fläche von vierzig mal vierzig Nanometern einnimmt, passen mehr als tausend Rotaxan-Moleküle. Um nicht jeden Draht im Chip einzeln ansteuern zu müssen, werden bei dem Crossbar Latch die Nanodrähten auf zwei Seiten mit einigen dickeren Leiterbahnen gekreuzt. Die Drahtbündel werden hierbei über Goldteilchen nach dem Zufallsprinzip verbunden, wodurch jeder Bit-Punkt eine unverwechselbare Adresse bekommt. Mit dem Crossbar Latch lassen sich Rechenoperationen als auch die Speicherung von Bits durchführen, was ein PC-Prozessor nicht kann. Es genügen zehn Leiterbahnen, um tausend Nanodrähte zu steuern. Das Problem besteht noch darin sie millionenfach auf einem Chip anzuordnen. Die winzigen Partikel müssen kontrolliert und massenhaft auf einmal erzeugen und ganz gezielt zu geordneten Strukturen zusammengesetzt werden. Mit dem molekularen Transistor wird erst im Jahr 2010 gerechnet, eine primitive Laborversion existiert schon heute.

Selbstorganisation

Die Natur zeigt am Beispiel von Proteinen den Prozess der „Selbstorganisation“ (siehe Kapitel 3). Diese Makromoleküle übernehmen wichtige Funktionen. Sie katalysieren chemische Reaktionen und schützen durch Bildung von Antikörpern den menschlichen Organismus vor Krankheitserregern.

Rezeptoren sorgen für die Übertragung von z.B. Nervenimpulsen und Strukturproteine sind für Form und Stabilität der Zellen und Gewebe verantwortlich. Bemerkenswert ist dabei, dass – abgesehen von einigen Modifikationen – die Proteine aus nur 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind und ihre Entstehung auf einem Prozess der „Selbstorganisation“ beruht ^[151].

Die molekulare Erkennung dient als Grundlage für den Aufbau von kleinen und größeren Struktur- oder Funktionseinheiten. So entwickelte *Fischer* im Jahr 1894 das Modell der Schlüssel-Schloss-Erkennung aufgrund seiner Arbeiten an Enzymen und ihren Substraten ^[31,152]. Stimmt die Bindungsstelle des Enzyms mit dem Substrat geometrisch überein (sie besitzen die entsprechende Kompatibilität) bildet sich selektiv der Enzym-Substrat-Komplex. Diese Reaktion zwischen Rezeptor und Substrat kann auch bei einer nicht vollständigen Übereinstimmung stattfinden, nach der derzeitigen Erkenntnis ^[153]. Vor allem die gerichteten Wechselwirkungen sind für selektive Bindungen (molekulare Erkennung) mit entsprechenden Affinitäten zwischen dem Rezeptor und dem Substrat entscheidend ^[154]. Auch größere Einheiten können mit Hilfe der molekularen Erkennung entstehen. Beschrieben wird dieser Vorgang als „self-assembly“ (Zusammenlagern) ^[155] sowie Selbstassoziation ^[156]. Hiermit ist das Zusammenlagern einzelner Komponenten zu einer größeren Struktur oder Einheit durch nicht-kovalente Wechselwirkungen gemeint.

Die Selbstorganisation ist ein Prinzip der Natur. In den Komponenten müssen, neben der Möglichkeit zur Selbstassoziation, zusätzlich Informationen „gespeichert“ sein, die über selektive Wechselwirkungen weitergegeben werden und zum Aufbau sogenannter „übermolekularen Strukturen“ beitragen. In der Chemie wird das aus der Natur bekannte Prinzip der molekularen Erkennung als Supramolekulare Chemie bezeichnet. Der Begriff „supramolekulare Chemie“ wurde von *Lehn* ^[155] eingeführt, das Schema in Abbildung 42 stellt die Bereiche in der supramolekularen Chemie dar. Mit Hilfe der molekularen Erkennung reagiert der Rezeptor über intermolekulare Wechselwirkungen mit dem Substrat zu einem „Molekülkomplex“. Durch die Bildung des „Molekülkomplexes“ können verschiedene Prozesse durchlaufen werden, z.B. Translokation (das Hindurchdiffundieren durch eine Membran) oder Transformation (zusätzliche chemische Reaktionsmöglichkeiten), die beim Vorhandensein nur des Substrates nicht möglich sind. Hierbei stellt der Molekülkomplex die kleinste Einheit dar, die größeren Einheiten verbinden sich durch Selbstassoziation oder Selbstorganisation zu polymolekularen Molekülverbänden. Durch zusätzliche funktionelle Komponenten, wie z.B. freie Rezeptoren, erhalten die supramolekularen Molekülverbände die Möglichkeit Substrate in ihre Struktur einzubinden.

4. Spezieller theoretischer Teil

Chemie

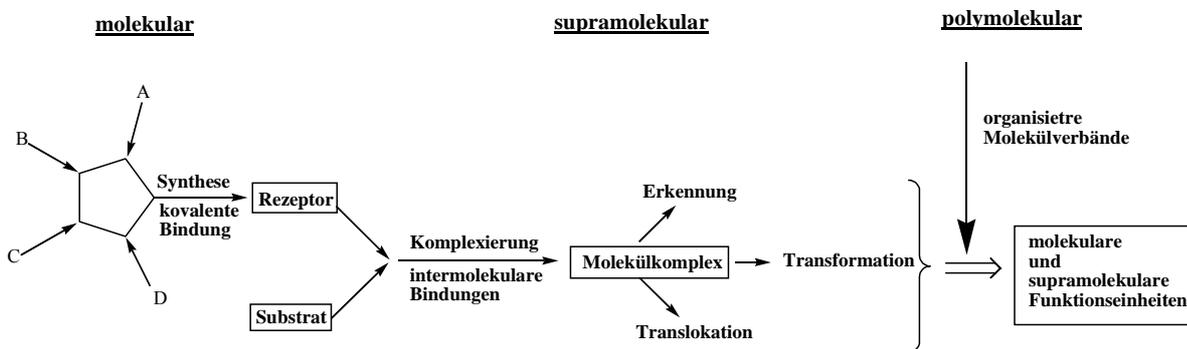


Abb. 42: Einteilung der Bereiche in der supramolekularen Chemie nach Lehn

In der supramolekularen Chemie wird die Kenntnis über intermolekulare Wechselwirkungen dazu genutzt, selbstorganisierende supramolekulare Systeme zu entwickeln. Die folgenden drei Wege hat *Lehn* dazu beschrieben ^[155]:

1. die Bildung von helicalen Metallkomplexen bzw. doppelsträngigen Helicaten
2. die Bildung von supramolekularen flüssigkristallinen Polymeren (z.B. die Bildung von metastabilen Mesophasen)
3. die Bildung größerer Festkörperstrukturen (z.B. Käfige, Gitter, Helices sowie deren Kombinationen mit Hilfe der Metallkoordination)

Die Assoziation führt über die Wahl der Komponenten zu Molekülkomplexen oder organisierten Molekülverbänden ^[156] – Dendrimeren ^[157], molekularen Schichten und Filmen ^[158], Mesophasen, polymeren Spezies oder festen Gitterstrukturen ^[159]. Polymere Spezies wurden von *Meijer* et al. Dargestellt ^[160]. Die Monomere bilden selbständig über Wasserstoffbrückenbindungen Molekülnetzwerke und organisieren sich bei Temperaturänderung um. Eine Vision von supramolekularen Material wurde von *Whiteside* formuliert: „In the next few decades, however, materials scientists will begin deliberately to design machines and manufacturing systems explicitly incorporating the principles of self-assembly“ ^[161]. So können nicht nur große Strukturen durch die supramolekulare Chemie dargestellt werden, die supramolekularen Prinzipien dienen ebenso kovalent verknüpfte molekulare Strukturen auf einfacheren Wegen zu synthetisieren ^[162], z.B. über eine Vororganisation wie sie bei den in Abbildung 43 gezeigten Molekülen üblich ist.

Frisch und *Wassermann* diskutierten im Jahr 1961 über die topologischen Isomeren von cyclischen Molekülen (Möbius Band, auf Ketten aufgefädelt Ringe und Knoten) ^[163].

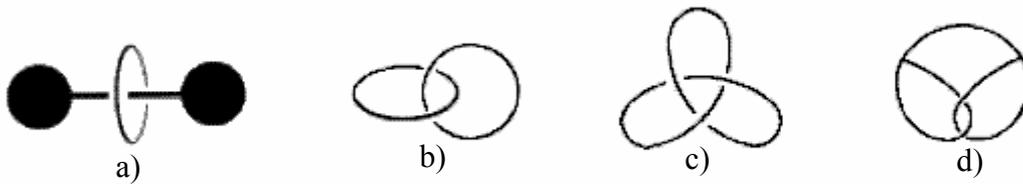


Abb. 43: Räumliche Strukturen im Nanometerbereich: a) Rotaxan, b) Catenan, c) Knotan, d) Brezelan

Die topologische Besonderheit von Rotaxan, Catenan, Brezelan sowie Knotan ist deren Strukturbildung über sogenannte „mechanische Bindung“. Die Moleküleinheiten sind nicht durch chemische Bindungen miteinander verknüpft. Um durch einfache Umsetzungen zu dem gewünschten Produkt zu gelangen, müssen sich die Strukturen durch Wechselwirkungen vororganisieren. Dabei haben sich vier Prinzipien der Vororganisation von geometrischen Nanostrukturen entwickelt:

- π/π -Wechselwirkungen helfen bei der Auffädelerung,
- hydrophobe und hydrophile Wechselwirkungen dienen bei der Nutzung des hydrophoben Hohlraumes von Makrocyclen zur Auffädelerung geeigneter Moleküle,
- Übergangsmetalle bilden Hilfskomplexe (Template) aus, nach deren Zerstörung das gewünschte Molekül erhalten wird,
- Wasserstoffbrückenbindungen.

Nach dem ersten Prinzip stellt *Stoddart* und seine Arbeitsgruppe Rotaxane und Catenane dar, z. B. gelang ihnen so die Synthese eines Pentacatenans - fünf ineinander greifende, linear angeordnete Ringe – welches bekannt ist unter dem Trivialnamen „Olympiadan“^[164]. Das zweite Prinzip, die Einfädelerung von Gastmoleküle in den hydrophoben Hohlraum durch Wechselwirkungen, dient vielen Arbeitsgruppen zur Synthese von Rotaxanen und Catenanen, z. B. *Cramer* et al.^[165] bei Catenanen, obwohl sie damals noch nicht als solche bezeichnet wurden, *Wylie* et al.^[166] und *Wenz* et al.^[167-170] für die Darstellung von Rotaxanen. Seit den sechziger Jahren ist das Prinzip des Templateffektes (Schabloneneffektes) bekannt. Er beruht auf der Koordinierung von Liganden durch ein Metallion oder Neutalmolekül, welches als Gast fungiert, so dass der dadurch entstandene Wirt-Gast-Komplex eine günstige Orientierung für die Weiterreaktion einnimmt. Im Jahr 1989 stellten *Sauvage* et al.^[171] die Synthese eines molekularen Knotens vor. Um dieses Molekül herzustellen wurden die verwendeten Bausteine vorübergehend oder permanent an ein zentrale Metallkation (Templat) gebundenen (Abb.44).

4. Spezieller theoretischer Teil

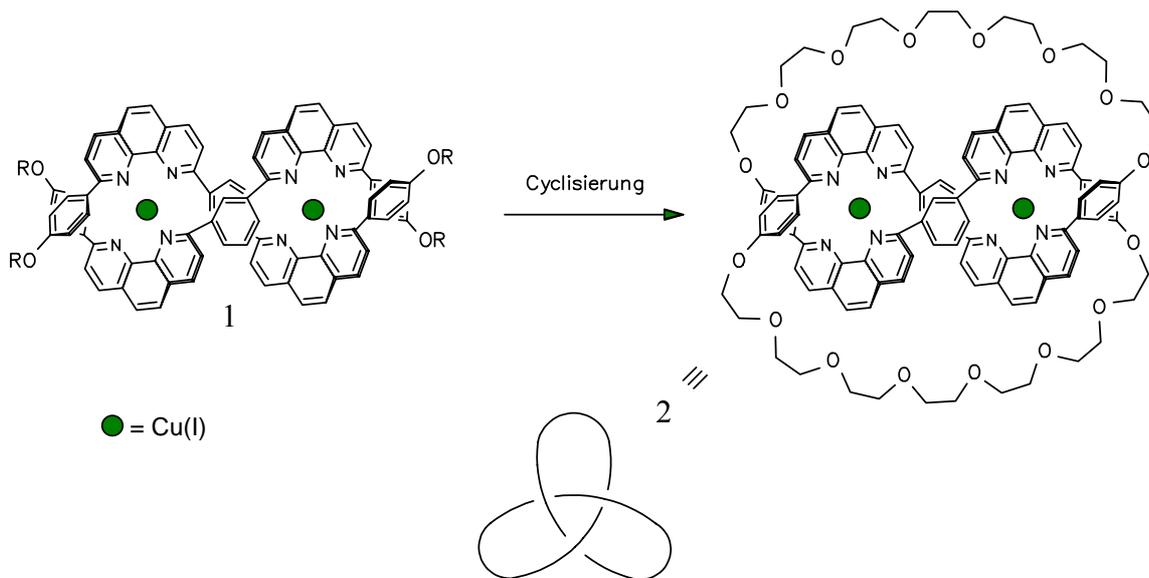


Abb. 44: Darstellung des ersten Prä-Kleeblattknotens nach Sauvage et al.

Dagegen gelang Vögtle et al. ^[172] im Jahr 2000 die Synthese des Kleeblattknotens (Abb. 45) über die Selbstorganisation der eingesetzten Bausteine durch die Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen.

Der Kleeblattknoten, ein hexameres Molekül, entsteht bei einer Eintopf-Cyclisierungssynthese unter Verdünnungsbedingungen. Durch die Kristallisation dieser Verbindung ließ sich mittels einer Röntgenstrukturanalyse die verknotete Struktur ermitteln, wie in Abbildung 46 gezeigt.

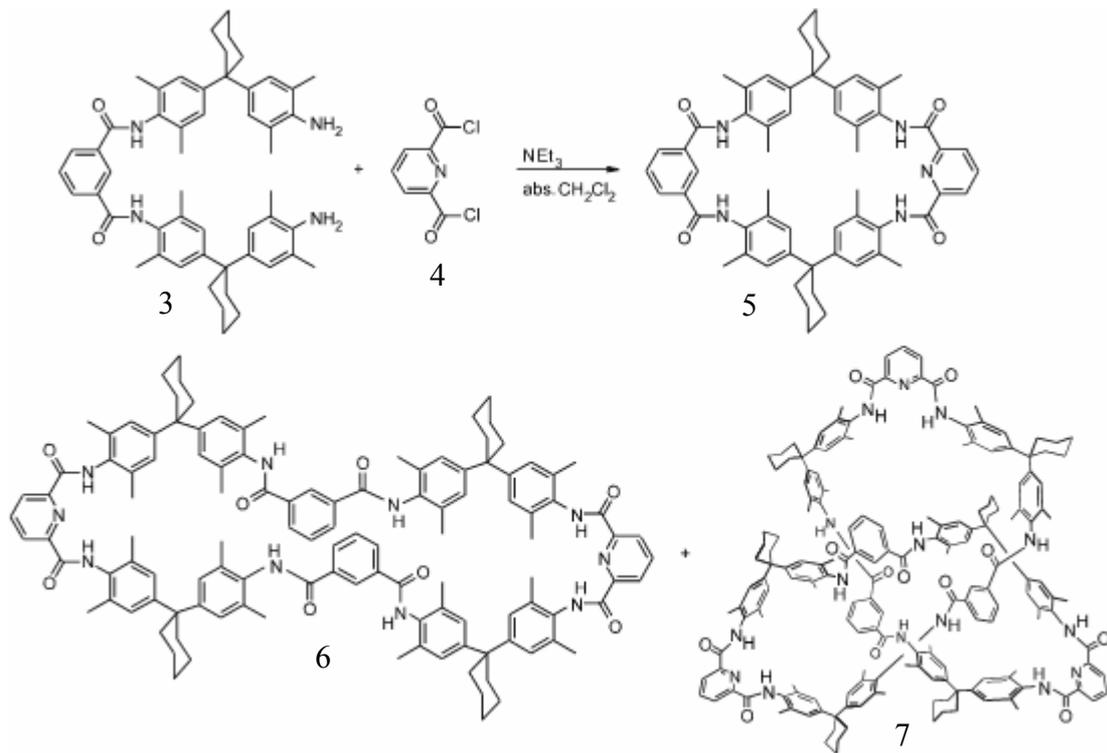


Abb. 45: Einstufige Synthese des Kleeblattknotens 7 nach Vögtle et al., bei der gleichzeitig ein dimerer 5 und ein tetramerer Makrocyclus 6 entsteht

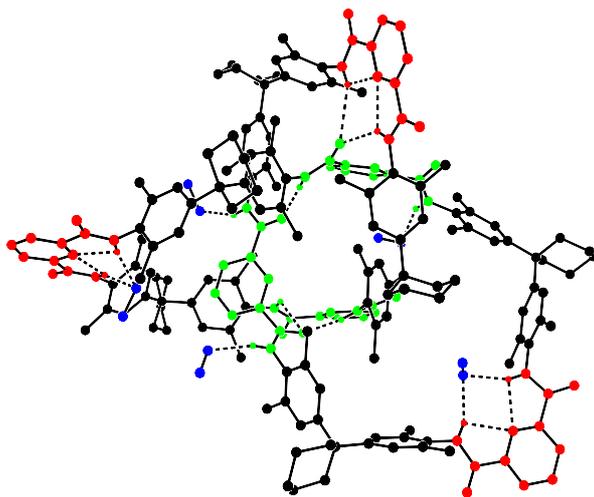


Abb. 46: Röntgenstruktur des „Bonner Knotens“

Die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen führt über entstehende Symmetrie zu der Struktur eines Knotens.

4. Spezieller theoretischer Teil

Rotaxane

1967 verwendet *G. Schill* ^[173] zum ersten Mal die Bezeichnung „Rotaxane“. Als Rotaxane werden stabförmige Moleküle auf denen makrocyclische Ringe aufgefädelt werden bezeichnet. Um zu verhindern, dass die Ringe abfädeln, werden die Enden der stabförmigen Moleküle mit Stoppergruppen versehen. Bei so einem Molekül, welches nun einen Ring chemisch gebunden hat, werden die Bindungen zwischen Ring und eingefädelttem Molekül gelöst wodurch das Rotaxan entsteht. Das Ringmolekül ist nicht durch chemische Bindungen auf dem Stabmolekül fixiert, sondern kann sich darauf entlang bewegen. Eine Direktsynthese gelang *Schill* und *Zollenkopf* zuerst ^[173]. Als [2]-Rotaxan wird ein Molekül bezeichnet, das aus einem Stabmolekül mit einem aufgefädelttem Ringmolekül besteht, während bei einem [3]-Rotaxan zwei Ringe aufgefädelt sind. Die Zahl in der eckigen Klammer vor dem Rotaxan ([n]-Rotaxan) erhöht sich mit jedem weiteren aufgefädelttem Ring. Nach drei Verfahren kann die Synthese zum Rotaxan dargestellt werden ^[174,150]:

- Threading:
das Stabmolekül fädelt einen Ring auf und die abschließend an das Stabmolekül synthetisierten Stoppergruppen verhindern das Abfädeln.
- Clipping:
das Stabmolekül mit den dranhängenden Stoppergruppen dient als Templat für die Ringbildung.
- Slipping:
das Stabmolekül mit den daran befestigten Stoppergruppen fädelt bei Temperaturerhöhung in ein Ringmolekül ein und nach der Abkühlung des Systems wird das selbstorganisierte Molekül erhalten.

Rotaxane können als eine Art Nanoventil fungieren, indem es die Form einer kleinen Porenöffnung bei Zufuhr von Energie verändert und dadurch versperrt. Es können somit einzelne Moleküle kontrollierbar eine nur wenige Nanometer große Öffnung passieren.

Dendrimere

In der Natur besitzt jedes Molekül jeglicher Größe eine wohldefinierte Struktur. Dieses Kriterium, auch große Moleküle mit einer definierten Struktur zu synthetisieren, konnte erst in den 80er Jahren verwirklicht werden mit den fußballförmigen Fullerenen und den baumartig verzweigten Dendrimeren (griechisch dendron = der Baum, griechisch meros = der Teil). Dendrimere sind fraktale Moleküle, die sich in ähnlichen Verzweigungsschritten zu immer feineren Verästelungen hin verzüngen ^[175,176]. Die Schönheit dieser Substanz weckte nach den Mathematikern, welche dieses Naturprinzip entdeckten, das Interesse der organischen Chemiker. Im Jahr 1978 synthetisierten *Vögtle et al.* ^[177] erstmals ein baumartig verzweigtes Kaskadenmolekül, welches später zu dem Begriff der Dendrimere, im Jahr 1984 von *Tomalia* ^[178,179] verwendet, führte. Eine Eigenschaft der Dendrimere ist ihre hochsymmetrische, oft kugelförmige, dreidimensionale Gestalt, wenn sie im "Generationentakt" hergestellt werden. Ausgegangen wird hierbei von einer Kerneinheit als Mittelpunkt, die mit immer neuen Verzweigungseinheiten („Generationen“) umgeben wird und dadurch ein Wachstum in alle Richtungen erreicht. Das Prinzip könnte als ein Kampf des Herakles gegen die Hydra angesehen werden. Einem „zweiköpfigen“ Molekül werden die beiden Köpfe abgeschlagen, an deren Stelle, durch die Reaktion mit Y-förmigen "Verzweigungsstücken", für jeden Kopf zwei neue nachwachsen. Wird diese Vorgehensweise über einige Generationen fortgesetzt, bilden sich vielköpfige Hydren bzw. molekulare Bäume (Abb. 47).



Abb. 47: Eine Dendrimerstruktur ^[180]

4. Spezieller theoretischer Teil

Auf dem Konzept der „Verzweigung von der Verzweigung“ beruht also die Struktur von Dendrimeren. Die Anzahl von Wiederholungen des Aufbauschnittes bzw. die Anzahl der Schalen von Verzweigungseinheiten (Abb.48) wird auch als Generationen bezeichnet ^[16,181].

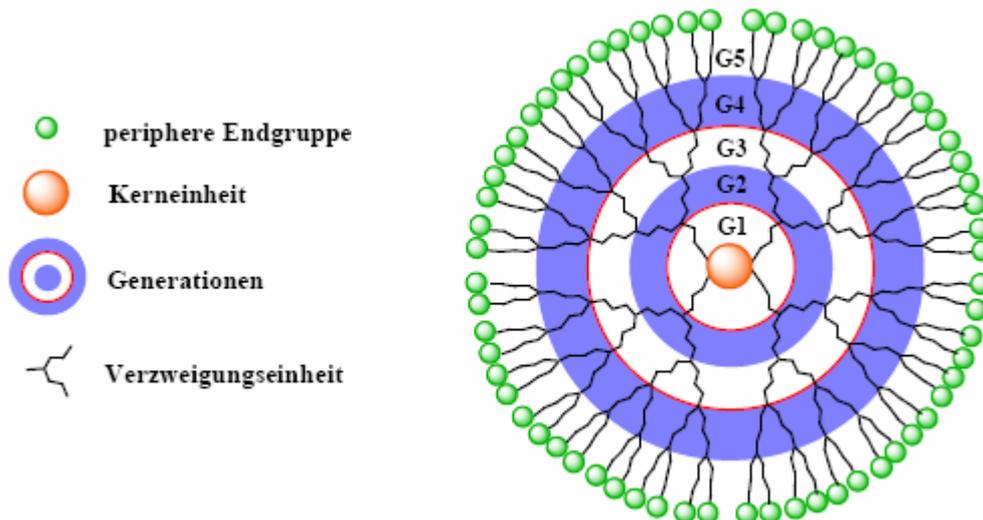


Abb. 48: Globale Gliederung von Dendrimeren in Kern-, Verzweigungseinheiten und Endgruppen

Die bekanntesten und kommerziell erhältlichen Dendrimerstrukturen sind das Poly(amidoamin)-Dendrimer (abgekürzt nur PAMAM genannt) und das Poly(propylamin)-Dendrimer (welches mit POPAM abgekürzt wird). Für die Synthese der dendritischen Moleküle werden folgende Synthesep Prinzipien verwendet: die divergente, die konvergente, die supramolekulare und die orthogonale Strategie. Verwendet wird für die Herstellung der meisten Dendrimeren die divergente oder konvergente Syntheseroute. Bei der divergenten Synthese werden die Dendrimere, ausgehend von einem Initiatorbaustein, schrittweise von innen nach außen aufgebaut und der repetitive Reaktionszyklus führt zum Wachsen der Generationsanzahl (Abb. 49) bis sterische Effekte eine weitere Reaktion der Endgruppen verhindern. Hierdurch werden hohe Generationenzahlen erreicht, jedoch verlaufen die Verzweigungsreaktionen unvollständig und dadurch entstehen Dendrimere mit Strukturdefekten. Bei einem Syntheseansatz wird kein monodisperses Produkt erhalten, d.h. die entstehenden Dendrimere besitzen keine einheitliche, identische Molmasse.

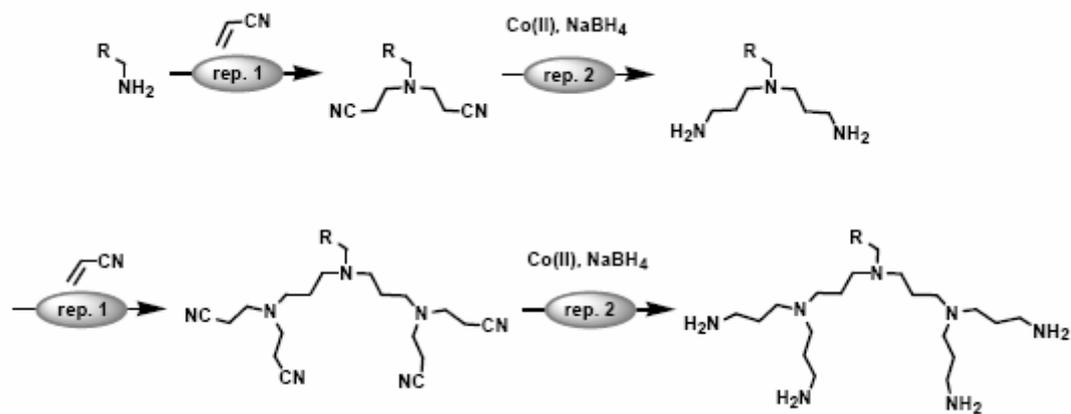


Abb. 49: Divergente Synthese des ersten Kaskadenmoleküls von Vögtle et al

Die konvergente Methode beruht auf einer Vorsynthesierung von sogenannten Dendrons der verschiedenen Generationen und einer abschließenden Kopplung mit einem oligofunktionellen Baustein, wie in Abbildung 50 dargestellt.

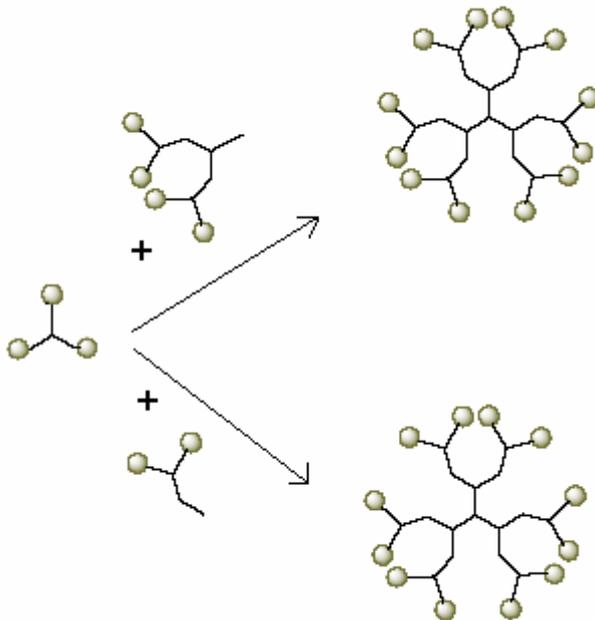


Abb. 50: Konvergente Synthesestrategie (schematisch)

Bei dieser Synthesemethode werden die Dendrimere also von außen nach innen aufgebaut. Durch die Bindung von sterisch anspruchsvollen Dendrons oder Dendrons höherer Generationen mit dem Kernbaustein, kann es aufgrund von sterischer Hinderung zu unvollständig substituierten Dendrimern kommen.

4. Spezieller theoretischer Teil

Auftretende Nebenprodukte unterscheiden sich daher stark in ihren Molekulargewichten von dem gewünschten Produkt-Dendrimer.

Meijer et al. (Technische Universität Eindhoven) gelang die erste Synthese eines Dendrimers, in dessen Hohlräume Gastmoleküle eingeschlossen wurden ^[182]. Hierzu wurden bei einem Dendrimer die 64 Amino-Endgruppen mit chiralen Aminosäuren versehen. Ende des Jahres 1994 konnten Dendrimere mit gezielt eingebauten funktionellen Gruppen und umschlossenen Hohlräumen unter der Oberfläche hergestellt werden. Ragt in den Hohlraum ein elektrisch geladener oder chemisch bindungsbereiter Molekülteil hinein, so kann dieser als spezifische Bindungstasche dienen. Mit Hilfe von Dendrimern können im biomimetrischen Bereich (Nachahmung natürlicher Substanzen) Micellen (kugelförmige Strukturen aus Lipide, Fette) oder Membranen konstruiert werden. Auch als Katalysatoren und Transporter, z.B. Transportvehikel für Pharmaka, können Dendrimere eingesetzt werden. So stellten *van Kooten et al.* (Universität Utrecht, Niederlande) fest ^[183], dass in diesen die Vorteile der homogenen mit denen der heterogenen Katalyse vereinigen. Da Dendrimere gelöste Stoffe sind, werden sie wie homogene Katalysatoren betrachtet (wirksam, aber schwer von den Reaktionsprodukten zu trennen). Ihr Vorteil ist nun die einfache Handhabung bei der Abtrennung, wie bei den heterogenen Katalysatoren (katalytisch aktive Gruppe an verschiedenartige Polymere). Aufgrund des hohen Molekulargewichts und der Kugelform sowie durch die chemischen Bindungen ergibt sich ein definierter und unveränderlicher Partikeldurchmesser. Sie lassen sich mit Hilfe der Ultrafiltrationsmethoden leicht von den Reaktionsprodukten trennen, da sie ein festgelegtes Trennverhalten besitzen. Katalytisch aktive Gruppen oder metallhaltige Gruppen können an der Peripherie (Außenschale), wie das aktivierte Nickel-Atom beim sogenannten Diaminoarylnickel-II-Komplex (katalysierte Addition von Polyhalogenalkanen an eine C-C-Doppelbindung), gebunden werden. Aber auch in den Kernbausteinen (Mittelpunkt der Struktur) können diese Gruppen eingefügt werden. Dadurch wird eine Abschirmung des Kernelements erhalten, so ist z.B. der Zink-Porphyrin-Komplex vor Redoxreaktionen geschützt und ist als Elektronen-Sammelstelle nützlich.

Es wurden auch schon andere Verbindungen als „Anfangskern“ verwendet, wie Fullerene, Kronenether, Nukleinsäure- oder Peptidbausteine.

Molekulare Knoten - Knotane

Der Begriff Knoten (aus der althochdeutschen Sprache „knoto“ steht für: knotenförmige Verdickung) wird in vielen verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen verwendet. So bezeichnet der Knoten in der See- und Luftfahrt das Geschwindigkeitsmaß oder im Verkehrswesen (auf dem See-, Straßen- und Schienennetz) den Verkehrsknoten. In der Baustatik steht die Bezeichnung Knoten für eine Verbindungsstelle von Stäben und Elementen, während in der Biologie die Ansatzstelle der Blätter an der Sprossachse danach benannt wird. Auch die Astronomie verwendet diesen Begriff für den Schnittpunkt der Bahnen von Himmelskörpern mit einer Bezugsebene und die Informationstechnik für die Netzknoten. In der Medizin wird mit Knoten eine Verdickung (Sinusknoten, AV-Knoten, Lymphknoten, Tumor, Ausweitung einer Vene) umschrieben, usw. ^[184]

Seit die Chemie den Knoten für ihr Gebiet entdeckt hat, wird mit mehr und mehr Interesse darauf geforscht. Vor allem seit *Vögtle* den sich selbst bildenden Amidknoten, auch Kleeblattknoten genannt, hergestellt hat ^[172], stieg das Interesse deutlich an. Dadurch entwickelten sich neue Unterdisziplinen in der Topologie, wie die chemische Topologie, die biochemische Topologie und die topologische Stereochemie ^[185].

Im Jahr 1989 berichteten *Sauvage* et al. ^[186] über die Synthese eines molekularen Knotens, wobei das Syntheseprinzip auf einer permanenten oder temporären Bindung zwischen einem zentralen Metallkation und den eingesetzten Molekülbausteinen beruht. Dadurch entsteht eine räumliche Nähe der reaktiven Gruppen zueinander, die einen Ringschluss zum Knoten begünstigt. *Sauvage* et al. ^[187] sind bei ihren topologisch chiralen Knotenverbindungen von zwei Bisphenantrolin-Einheiten ausgegangen, die durch zwei Cu(I)-Ionen zu einer doppelsträngigen Helix präorganisiert werden. Anschließend wurde dieser Komplex mit zwei Molekülen Diiodid durch eine vierfache Bindungsknüpfung zu dem molekularen Knoten **2** umgesetzt (siehe Abb. 51).

4. Spezieller theoretischer Teil

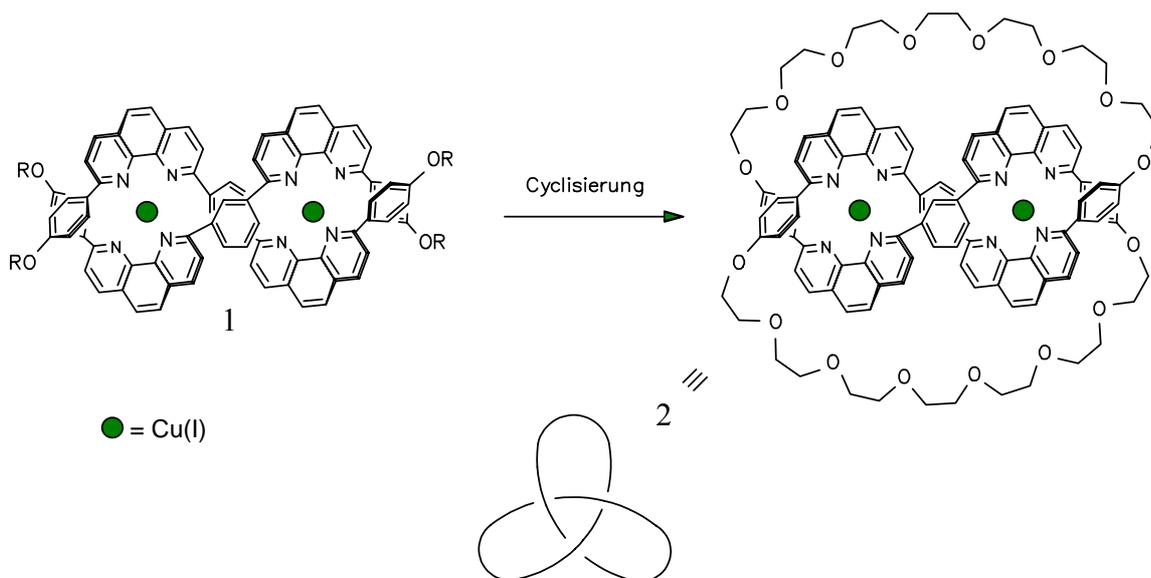


Abb. 51: Verknüpfung von zwei Bisphenantrolin-Einheiten 1 zu einem Knoten 2

Die Produktknoten **10** und **11** (Abb.52) konnten im Jahr 1996 durch eine Glaser-Reaktion^[188] synthetisiert werden und ein Jahr später, 1997, gelang *Sauvage* et al. eine Knotensynthese mittels Olefinmetathese^[189].

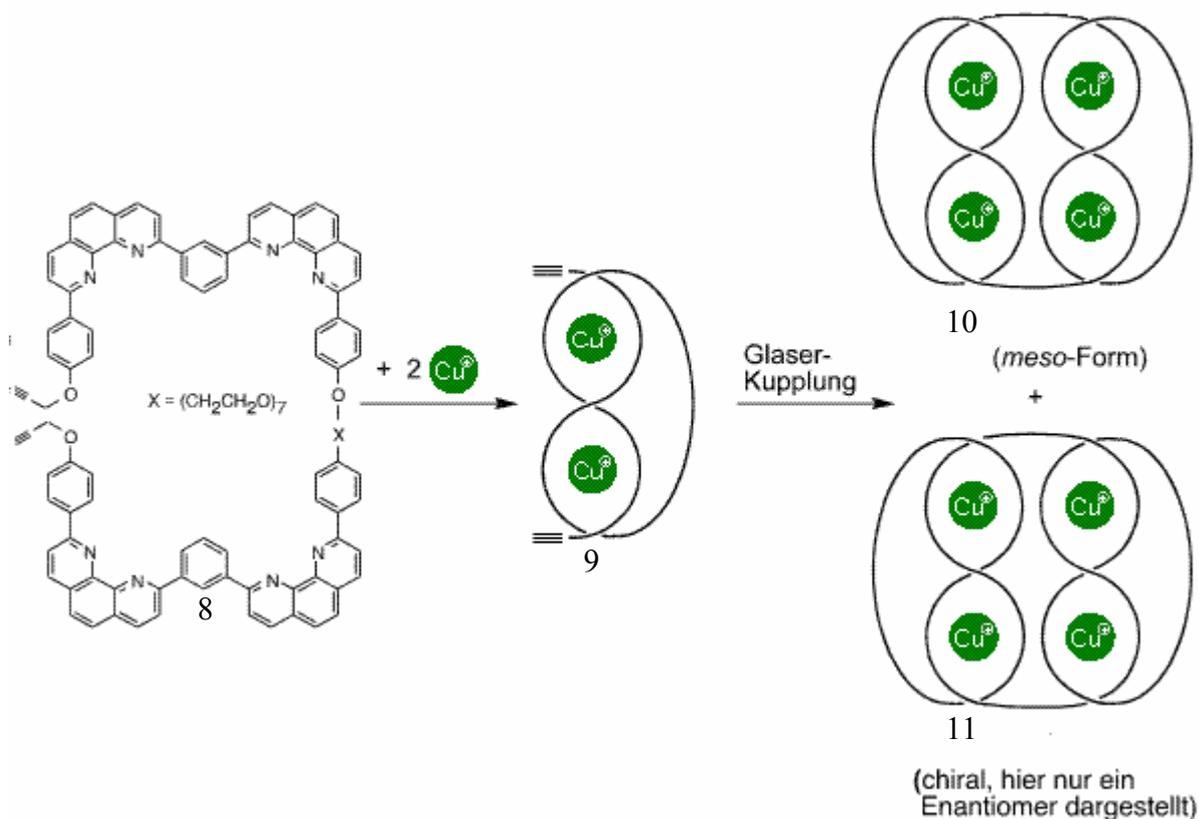


Abb. 52: Cu(I)-Ionen vermittelte Synthese der Produktknoten-Enantiomeren 10 sowie der meso-Form 11

Hierbei bilden zwei Dien-Liganden **12** unter Zugabe von Cu(I)-Ionen den homoleptischen Biskomplex **13**, der durch eine anschließende Cyclisierung den Prä-Knoten **14** liefert. Dieser wird mit Hilfe einer Hydrierung zum Dikupfer-Knoten **15** reduziert, wie in Abbildung 53 dargestellt.

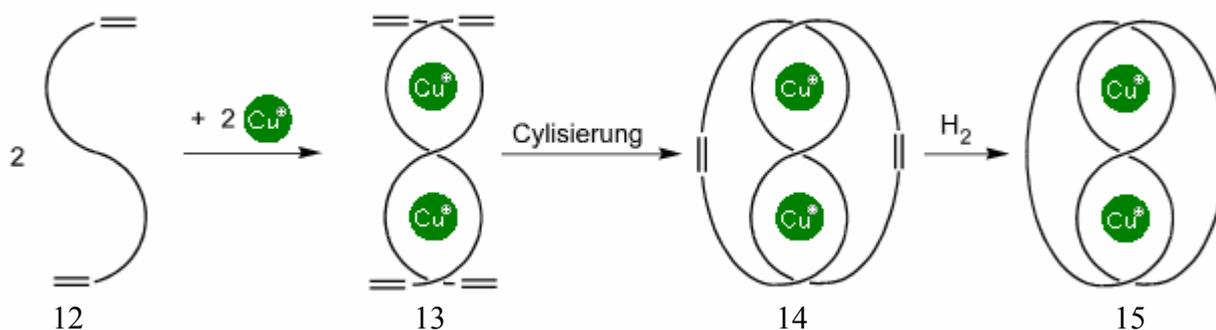


Abb. 53: Syntheseschritte zum Dikupfer-Knoten **15**

Bei diesen Knotensynthesestrategien bilden zwei Bis-Chelat-Moleküle **16** mit zwei Kupfer(I)-Ionen einen helixförmigen Zweikernkomplex **17**, dessen Cyclisierung einen Prä-Knoten **18** liefert. Durch Demetallierung sollte der Prä-Knoten **18** in den Kleeblatt-Knoten **19** überführt werden (Abb. 54).

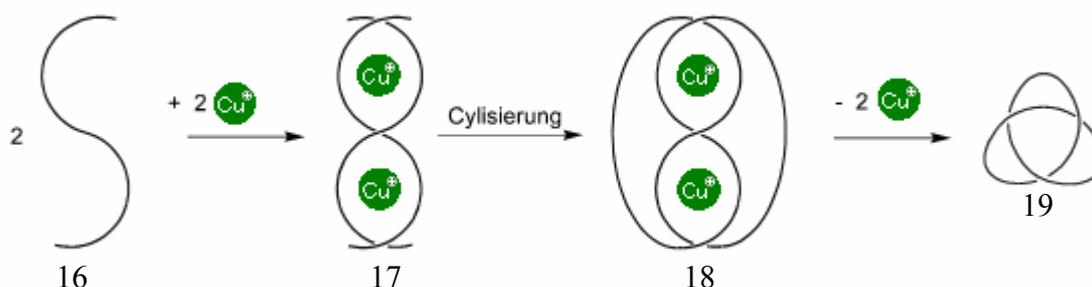


Abb. 54: Synthesestrategie zur Darstellung von des) Kleeblatt-Knoten nach Sauvage

Hunter et al. ^[190] berichtete im Jahr 2001 von der Synthese des Oligomers **22**, welches den offenen Knoten **23** reversibel in der Gegenwart von Zink(II)-Ionen bildet (Abb. 55).

4. Spezieller theoretischer Teil

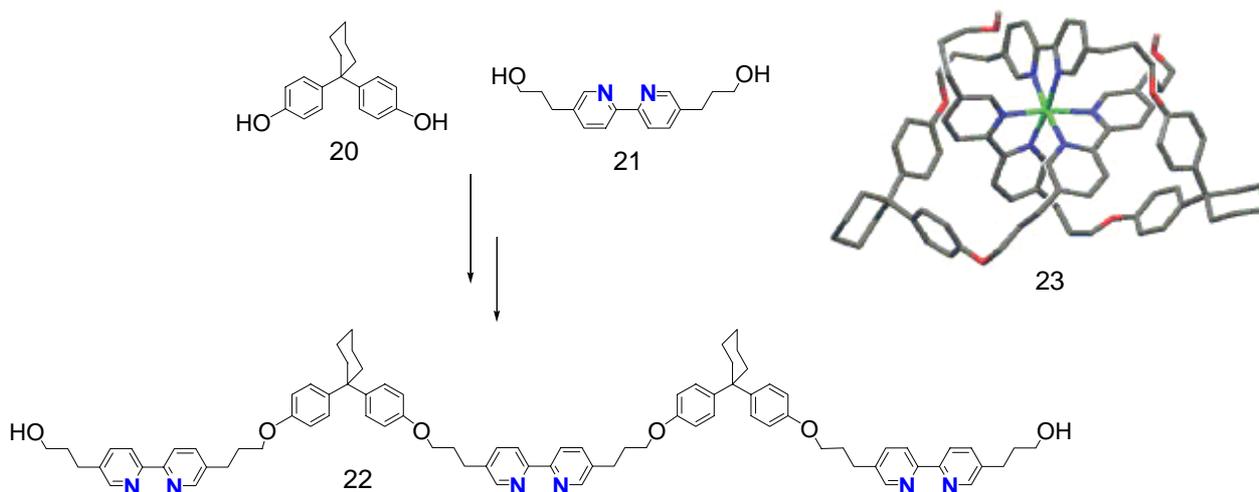


Abb. 55: Zink(II)-Ionen dienen als Templat für die Bildung des offenen Knotens 23 nach Hunter et al.^[62]

Den ersten DNA-Kleeblattknoten synthetisierten Seeman et al. im Jahr 1991 mittels einer DNA-Ligase und Magnesiumionen aus einem DNA-Einzelstrang, der aus vier Sequenzen besteht^[191]. Dabei bilden diese vier Sequenzen untereinander Wasserstoffbrücken aus und bewirken dadurch eine Verknötung (Abb.56).

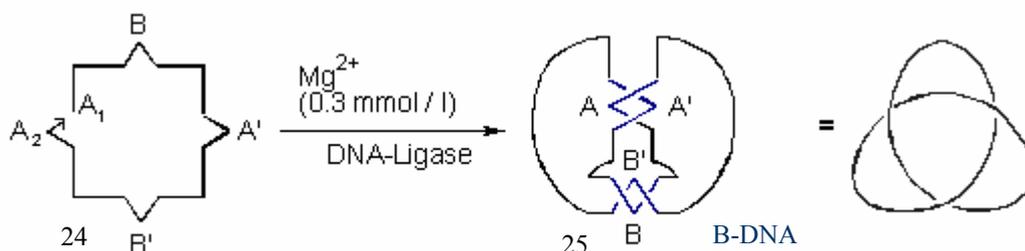


Abb. 56: Erster DNA-Kleeblattknoten nach Seeman et al

Ein Jahr später gelang es Seeman et al. den 8-förmigen Knoten herzustellen^[192], indem zwei der vier Sequenzen im Einzelstrang ausgetauscht wurden. Unter Zugabe von DNA-Ligase, Magnesiumionen und Hexaamincobalt(III)-chlorid wurden die Enden des neuen DNA-Stranges 24 zu dem Kleeblattknoten 25 verknüpft wurden sowie in Abhängigkeit von der Konzentration des Hexaamincobalt(III)-chlorids auch zu dem achtförmigen Knoten 26 (Abb.57).

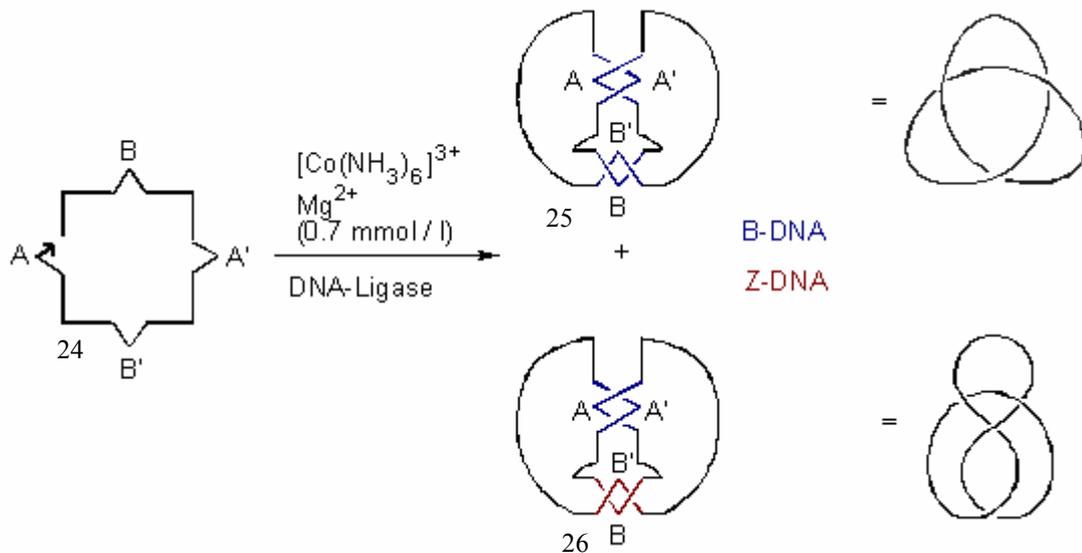


Abb. 57: Kleeblattknoten (3₁) 25 und 8-förmiger (4₁) Knoten 26 aus DNA-Strängen

Auch aus einzelnen DNA-Strängen konnten *Seeman* et al. Knoten synthetisieren ^[193-195]. Die bisher einfachste Knotensynthese gelang *Vögtle* et al. mit der einstufigen Synthese des molekularen Kleeblattknoten vom Amid-Typ (Abb. 58) ^[172,196]. Bei dieser Synthese wurde unter Verdünnungs-Bedingungen (ca. 1.4 M) in absolutem Dichlormethan durchgeführt und erfordert kein externes Templat.

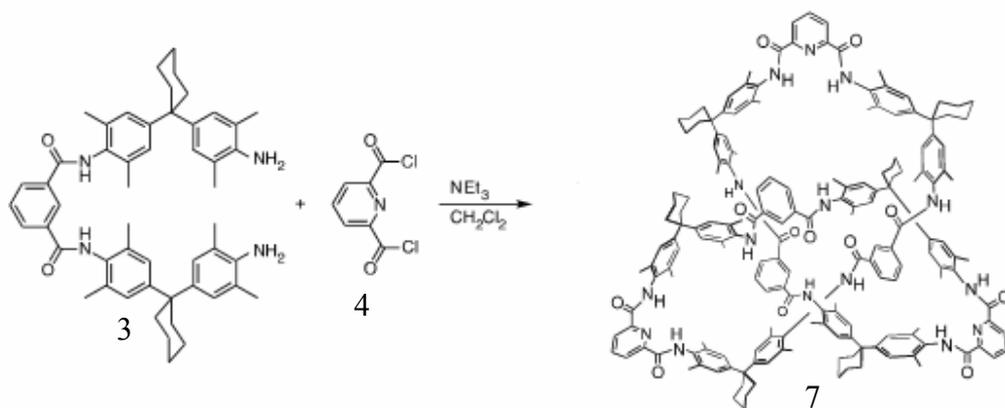


Abb. 58: Synthese des ersten Amid-Knotens 7 nach Vögtle

Die verknotete Struktur des Kleeblattknotens 7 („Knoten“, Abb. 59) konnte anhand einiger Kristalle mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse durch *Nieger* nachgewiesen werden, wie in Abbildung 60 dargestellt. Hierbei zeigte sich die Struktur des Knotan als eine Art „flachgedrückter Ball“, dessen Durchmesser 4 bis 5 Nanometer beträgt.

4. Spezieller theoretischer Teil

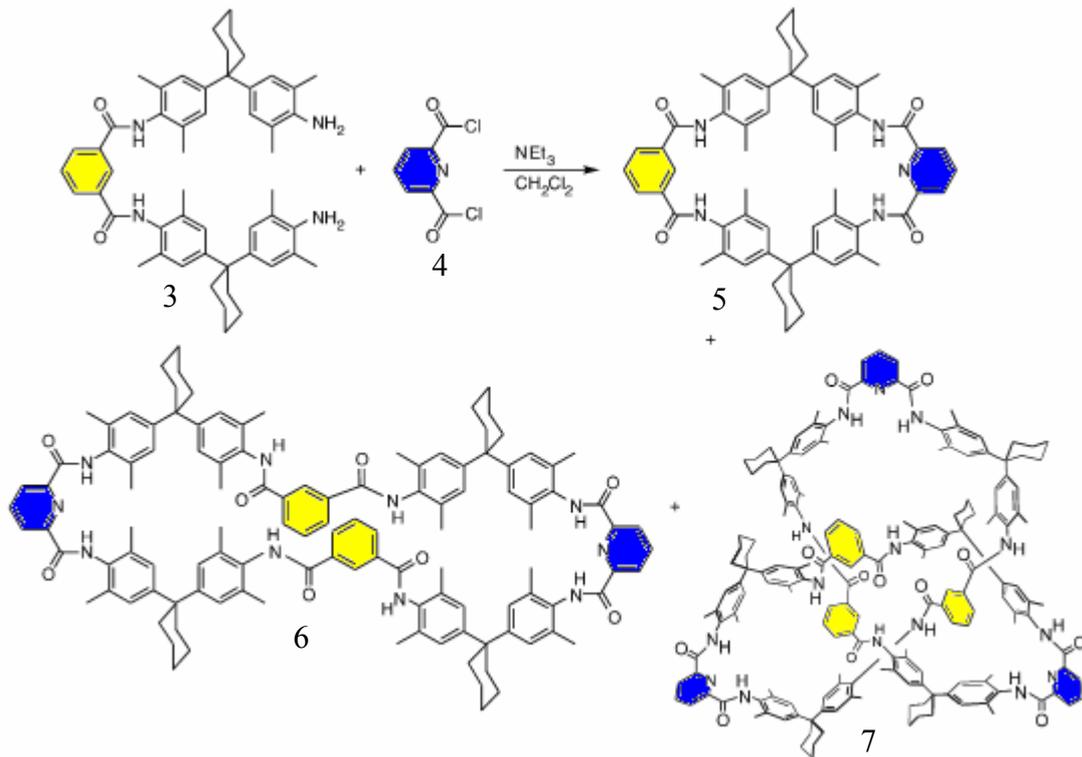


Abb. 59: Einstufen-Synthese des ersten Kleeblattknotens mit zwölf Amid-Bindungen 7 nach Vögtle et al.^[15]. Als weitere Produkte der Reaktion entstehen ein dimerer 5 und ein tetramerer Makrocyclus 6.

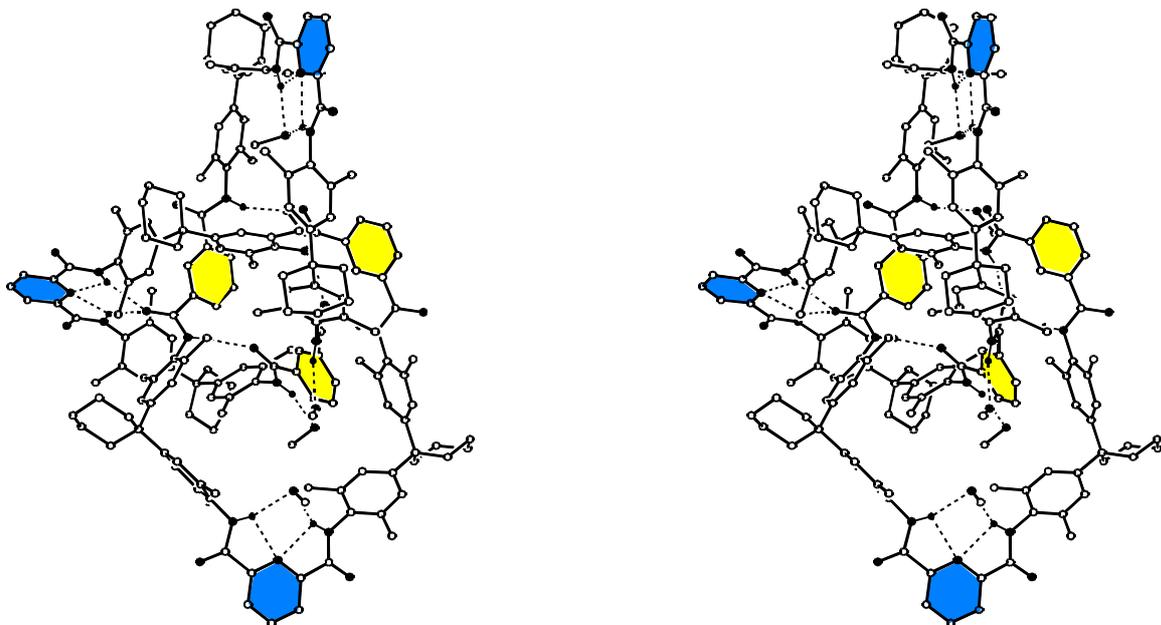


Abb. 60: Stereobild der Röntgenkristallstruktur des Amidknotens 7. Wasserstoffatome sind mit Ausnahme der Amidprotonen weggelassen. Wasserstoffbrückenbindungen sind gestrichelt dargestellt

Begründet werden kann diese Form durch die Anwesenheit von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Amidprotonen und Stickstoffatomen der Pyridin-Einheit.

Mittels HPLC gelang in Zusammenarbeit mit *Okamoto* et al. ^[11,12] die Trennung des racemischen Kleeblattknotens an der nicht kommerziell erhältlichen chiralen Säule Chiralpak AD. Die spiegelbildlichen Circular dichroismogramme der beiden Enantiomere konnten aufgenommen werden und lieferten einem (indirekten) Beweis für die Existenz des topologisch chiralen Knotans.

4.1 Trennung neuartiger supramolekularer Verbindungen mit Hilfe der chiralen HPLC

Das chromatographische Trennverfahren der HPLC mit UV-Detektion zählt zu den empfindlichsten und selektivsten Analyseverfahren der Gegenwart. Sowohl die Reinigung als auch die Trennung (Separation der Enantiomere) verschiedener supramolekularer Substanzen, wie Knotanen, Dendrimeren oder Rotaxanen, können auf der HPLC durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden.

Eine chirale Auftrennung der Knotan-Derivate gelingt mit dem Einsatz von chiralen Säulen. Ob und in welcher Weise sich die verschiedenen chiralen Säulen für die Trennung der Enantiomere eignet sollte anhand der Knotane untersucht werden. Bisher konnten die von *Vögtle* et al. synthetisierten Knotane des Amid-Typs auf den Säulen Chiralpak AD und Chiralcel OD von *Okamoto* et al. getrennt werden ^[15,197-201]. Diese Amid-Knotane sind wegen ihrer Löslichkeit auf lipophile Lösungsmittel eingeschränkt, so dass der Einsatz von lipophilen Lösungsmitteln in der mobilen Phase nur auf kovalent an einen Silicagelträger gebundenen chiralen Phasen verwendet werden können.

Für die sensitive Bestimmung von Dendrimeren mit überwiegend aliphatischen Strukturen / Struktureinheiten können mit zweier Methoden gereinigt werden. Zum einen mit der Hilfe von Nucleosil-Säulen, zum anderen werden RP-Nucleosil-Säulen eingesetzt.

Zusätzlich können die Reinigungs- und Trennwirkung der HPLC-Säulen durch die Veränderung der Parameter Fließgeschwindigkeit, stationäre und mobile Phase sowie Säulentemperatur (diese Möglichkeit war während der vorliegenden Arbeit nicht möglich) beeinflusst werden.

4. Spezieller theoretischer Teil

4.1.1 Materialien und Methoden

Die ersten immobilisierten chiralen Säulen entwickelte *Okamoto* et al. (siehe Kapitel 3), die jedoch lange Zeit nicht kommerziell erhältlich waren. Die zu trennenden Substanzen mussten zu ihm nach Japan geschickt werden. Seit Mitte des Jahres 2005 ist die erste von *Okamoto* entwickelte immobilisierten chirale Säule auch im Handel erhältlich, eine weitere soll Anfang 2006 folgen. Auch *Frankcotte* aus Zürich arbeitet an der Weiterentwicklung von immobilisierten chiralen Säulenmaterial ^[202]. So stellte er dem Arbeitskreis von *Vögtle* einige Neuentwicklungen dieses Materials zu Testzwecken zur Verfügung (siehe unten bei verwendete HPLC-Säulen).

Durch den Einsatz der immobilisierten Säulen gelingt häufig erst die Enantiomeren-Trennung der Knotane, da diese meistens nur in Dichlormethan löslich sind.

Geräte und Zubehör

- **Hochleistungsflüssigchromatographie-System:**

Die Probenreinigungen und Enantiomerentrennungen wurden mit einer HPLC-Anlage durchgeführt, die nach den Vorschlägen der Firma *TECHLAB GmbH* zusammengestellt wurde. Einzelne Geräte konnten den Anforderungen entsprechend ausgetauscht werden.

- **Pumpen:**

a) für die analytische Trennung standen eine Pumpe der Firma *WATERS*, Model590 (maximale Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min.), der Firma *TECHLAB*, Economy 2/ED (maximale Fließgeschwindigkeit von 9.99 ml/min.) und der Firma *JASCO*, PU-2080 Plus (Intelligent HPLC Pump, Serial No. B035160962) zur Verfügung

b) für die präparative Trennung stand eine Pumpe der Firma *ECOM spol.s.r.o.*, LCP 400-2 (maximale Fließgeschwindigkeit von 99 ml/min) und der Firma *JASCO*, PU-2080 Plus (Intelligent HPLC Pump, Serial No. B035160962) zur Verfügung

- **Probenaufnahme:**

erfolgte mit Probenaufgabeeventil der Firma *RHEODYNE*, 7125.

- **Detektor:**

a) bei der analytischen Trennung konnten UV-Detektoren der Firma *JASCO*, UV-975 und der Firma *ECOM spol. s.r.o.*, LCD 2084 verwendet werden.

b) bei der präparativen Trennung wurde der UV-Detektor der Firma *ECOM spol. s.r.o.*, LCD 2083 mit einer präparativen 45/55/75 µl-Küvette verwendet.

- **Fraktionssammler:**

ist von der Firma *ADVANTEC MFS, Inc.*, bestückt mit speziellen Reagenzgläsern.

- **Auswertung der Daten:**

erfolgte mit dem Softwareprogramm *Andromeda 1.7*, entwickelt von *Göckemeyer*, vertrieben von der Firma *TECHLAB*.

- **Magnetventile:**

der Firma *BÜRKERT* und der Firma *RHEODYNE*, 6-Port-Ventil PR 700-100-01 oder 10-Port-Ventil EV 700-102 wurden eingebaut.

- **Ultraschallbad:**

der Firma *Bandelin*, SONOREX RK 2555

- **Circulardichroismus-Spektrometer:**

Das verwendete Circulardichroismus-Spektrometer stammt von der Firma *Jasco*, Model J-810-150S, Serial No. B021960750.

Zum Nachweis der Enantiomeren-Separation werden CD-Spektren aufgenommen, wobei mit folgenden Parametern gearbeitet wurde:

| | |
|--------------------|-----------------------|
| Data array type: | Linear data array * 2 |
| Band width: | 1 nm |
| Response: | 1 sec |
| Sensitivity: | Standard |
| Measurement range: | 350 - 180 nm |
| Data pitch: | 0.1nm |
| Scanning speed: | 50 nm/min |
| Accumulation: | 3 |
| Cell Length: | 0.1 cm |
| Solvent: | Trifluorethanol |
| Temperature: | Room Temperature |

- **analytische Dünnschichtchromatographie:**

| | |
|---|----------------------------|
| Kieselgel 60 F ₂₅₄ beschichtete Glasplatte | von der Firma <i>Merck</i> |
| Kieselgel RP-18 F _{254s} beschichtete Glasplatte | von der Firma <i>Merck</i> |

4. Spezieller theoretischer Teil

- **Lösungsmittel (mobile Phase):**

bei der HPLC wurden Lösungsmittel der Firmen *MERCK*, *FLUKA* (*Riedel-de-Haën*) oder *J.T.Baker* in Chromalsov[®]-Qualität verwendet.

Verwendete HPLC-Säulen, Chromatographiematerialien und Lösungsmittel

- **Säulen (stationäre Phase):**

a) zur Reinigung und Trennung:

a.1) **RP-Säulen (C-18 Phasen):**

- ***Grom-Sil 120 ODS-4 HE***

Firma: *GROM Analytik + HPLC GmbH*

Säulenabmessung: 250x20 mm,

Vorsäule: 30x20 mm

Teilchengröße: 10 µm

- ***Kromasilsäulen C 18***

Firma: *MZ-ANALYSENTECHNIK*

Säulenabmessung: 250x20 mm und 250x8 mm,

Teilchengröße: 5 µm

a.2) **NP-Silicagel-Säulen:**

- ***Nucleosil 300-5***

Firma: *MACHEREY und NAGEL*

Säulenabmessung: 250x21 mm,

Vorsäule: 50x21 mm

Teilchengröße: 5 µm

- ***Kromasil 100 Sil***

Firma: *MZ-ANALYSENTECHNIK*

Säulenabmessung: 250x8 mm,

Teilchengröße: 5 µm

b) zur Enantiomerentrennung:

b.1) nicht-immobilisiertes chirales Säulenmaterial:

- ***Chiralcel*[®] OD**

Firma: *CHIRAL TECHNOLOGIES, Europe SARL (Tochterfirma von DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, Ltd.; Japan.),*

Säulenabmessung: 250x10 mm,

Teilchengröße: 10 µm

Firma: *GROM ANALYTIKCHIRAL + HPLC GmbH*

Säulenabmessung: 250x10 mm,

Teilchengröße: 20 µm

- ***Chiralpak*[®] AD**

Firma: *GROM ANALYTIKCHIRAL + HPLC GmbH*

Säulenabmessung: 250x10 mm,

Teilchengröße: 20 µm

- ***Nucleosil*[®] Chiral-2**

Firma: *MACHERY und NAGEL*

Säulenabmessung: 250x4 mm,

Säulenmaterial: *N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-D-phenylglycin (Pirkle-Phase)*

für Substanzen und Substanzgemische, die nicht in Alkoholen oder n-Alkanen löslich sind

b.1) immobilisiertes chirales Säulenmaterial:

- ***DMPA-I (Batch FA 2364/18)***

Firma: *Francotte*

Säulenabmessung: 250x4 mm,

Teilchengröße: 7 µm

- ***PMBC-I (Batch FA 2358/7)***

Firma: *Francotte*

Säulenabmessung: 250x4 mm,

Teilchengröße: 7 µm

- ***DMPC-I (Batch FA 2359/22)***

Firma: *Francotte*

Säulenabmessung: 250x4 mm,

Teilchengröße: 10 µm

4. Spezieller theoretischer Teil

- **PECA-I (Batch FA 2392/7)**
Firma: *Francotte*
Säulenabmessung: 250x4 mm,
Teilchengröße: 7 µm
- **ChiralPAK[®] IA**
Firma: *DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, Ltd,*
Säulenabmessung: 250x10 mm,
Teilchengröße: 10 µm

c) zur Trennung mit Gel-Permeations-Chromatographie

- **MZ-Gel SDplus 100**
Firma: *MZ-ANALYSENTECHNIK*
Säulenabmessung: 300x8 mm,
Teilchengröße: 5 µm

4.1.2 Analyte

In der Fachliteratur finden sich nur im begrenzten Rahmen Informationen zu den Möglichkeiten der Enantiomeren-Trennung (siehe Kapitel 3). Das Interesse der Enantiomeren-Separation von Knotanen stieg erst mit der Entdeckung des „Kleeblattknotens“ im Jahr 2000 durch *Vögtle et al* ^[10]. Aufgrund des späten Interesses der Chemiker an diesem supramolekularen Verbindungsdesign und daher jungem Thematik ist nur eine sehr begrenzte Auswahl an Literatur zur Erfassung von Knotan-Enantiomeren-Trennungen zu finden und vieles steht noch am Anfang der Entwicklung. Für Studien des Bildungsmechanismus der Knotane sind Trennverfahren notwendig, die eine analytische Enantiomeren-Separation erlauben.

Für die folgenden Trennungen wurde keine definierte Probenmenge verwendet. Es musste nur darauf geachtet werden, dass die Säule nicht überladen wurde. Dies konnte *Kaufmann* aus dem Arbeitskreis *Vögtle* an Studien mit einem [1]-Rotaxanen zeigen ^[12].

a) Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27

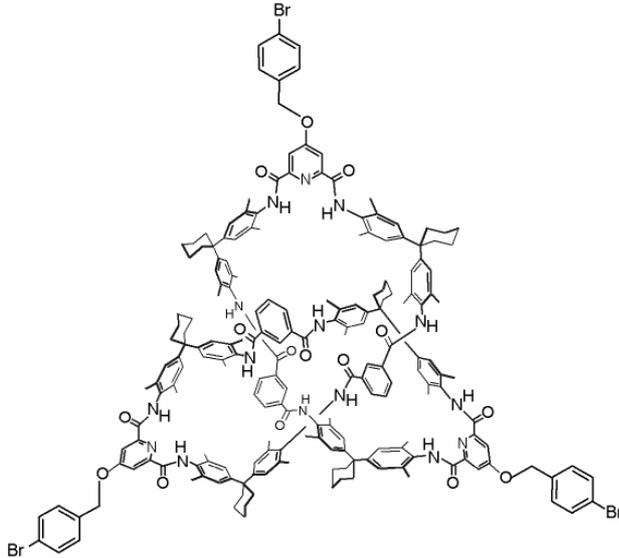


Abb. 61: Struktur des Bromyl-Knotans 27

Das Bromyl-Knotan **27** in Abbildung 61, synthetisiert von *Brüggemann* aus dem Arbeitskreis *Vögtle* war nur in den Lösungsmitteln Chloroform oder Dichlormethan vollständig löslich. Daher erfolgte die Trennung bei Raumtemperatur über die analytische chirale Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2, einer *Pirkle*-Phase, mit einem Laufmittelgemisch aus *n*-Hexan/2-Propanol im Verhältnis 50:50 und einer Fließgeschwindigkeit von 0.7 ml pro Minute.

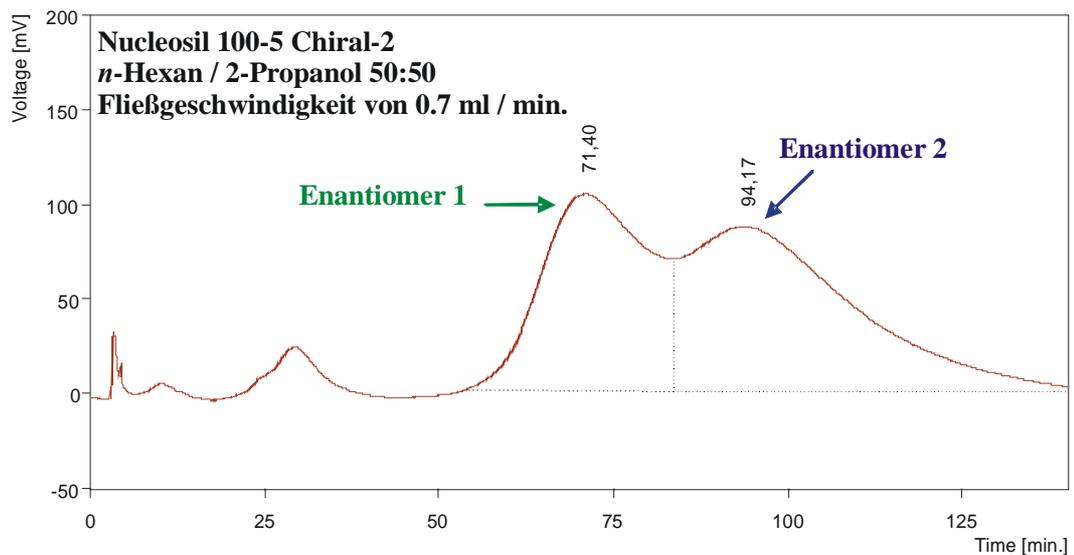


Abb. 62: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.7 ml / min.

4. Spezieller theoretischer Teil

Bei dieser Säule können sehr polare Lösungsmittel verwendet werden, ohne dass diese ausblutet. Die beiden Enantiomere konnten durch „Schneiden“ der beiden Peak-Fractionen getrennt werden (Abb. 62), da eine Basislinientrennung trotz der funktionellen Gruppen am Knotan und den möglichen Wechselwirkungen mit der stationären Phase, z.B. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen, nicht erreicht wurde.

Die erhaltenen getrennten Enantiomere ergaben bei der Circular dichroismus-Messung die erwarteten spiegelbildlich identischen Chromatogramme, siehe Abbildung 65.

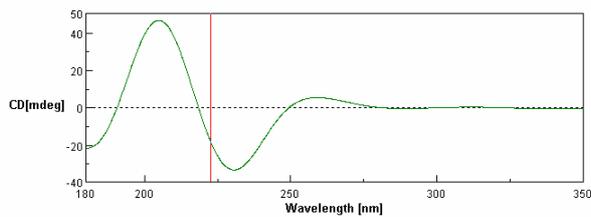


Abbildung 63: CD-Spektrum des Bromyl-Knotans 27 vom Enantiomer 1

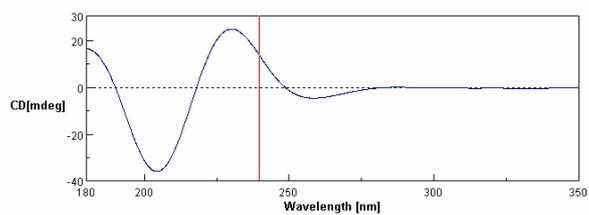


Abbildung 64: CD-Spektrum des Bromyl-Knotans 27 vom Enantiomer 2

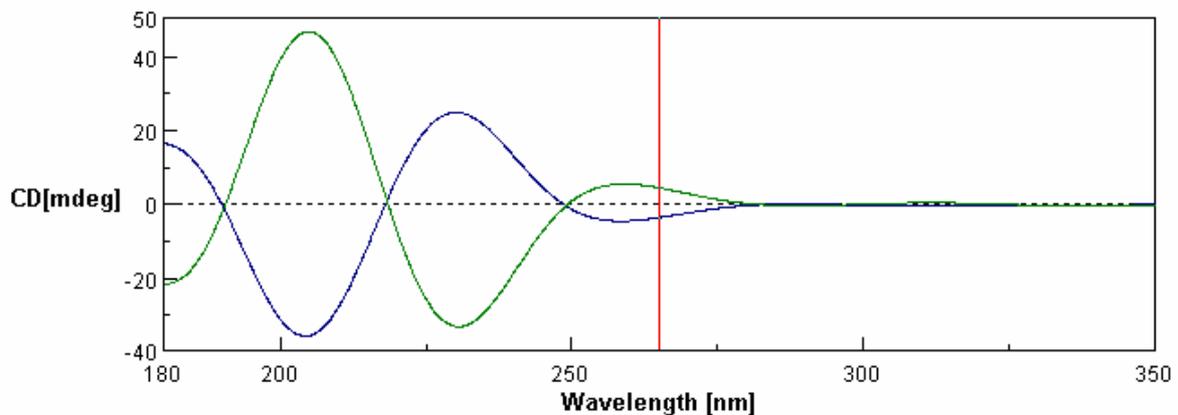


Abbildung 65: Übereinandergelegte CD-Spektren (Abb. 63, 64) des Bromyl-Knotans 27 von Enantiomer 1 und 2

b) Diastereomeren-Trennung des chiralen Knotans 28

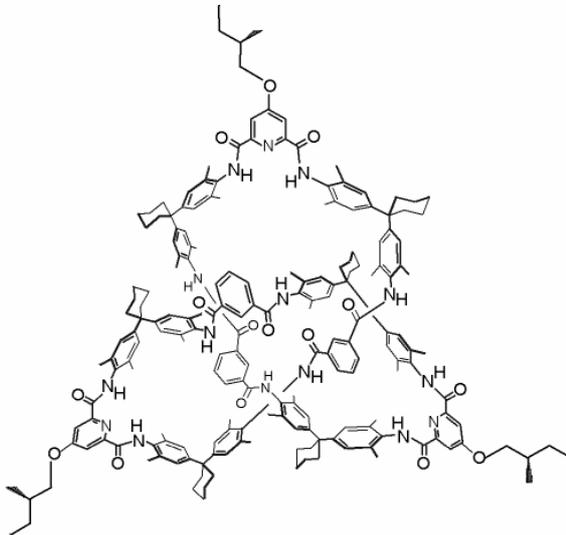


Abb. 66: Struktur des chirale Knotans 27

Bei der Synthese des chiralen Knotans **28** wurde für den chiralen Substituenten nur das *S*-Enantiomer verwendet. Dadurch entsteht bei der anschließenden Knotan-Bildung, aufgrund der topologischen Chiralität der Knotane, Diastereomere^[201].

Auch das chirale Knotan konnte nur in Chloroform oder Dichlormethan gelöst werden. Daher wurde versucht die Diastereomere dieses Knotans an einer chiralen Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2 zu trennen.

Sowohl in dem Chromatogramm von Abbildung 67 als auch in dem Chromatogramm von Abbildung 68 sind die beiden Diastereomere durch das Vorhandensein der Peakschulter (siehe Pfeile) zu erkennen. Beide Chromatogramme wurden bei Raumtemperatur mit der chiralen Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2 aufgenommen. Zuerst wurde das Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Ethanol im Verhältnis 1:100 und einer Fließgeschwindigkeit von 0.3 ml pro Minute verwendet (Abb. 67).

4. Spezieller theoretischer Teil

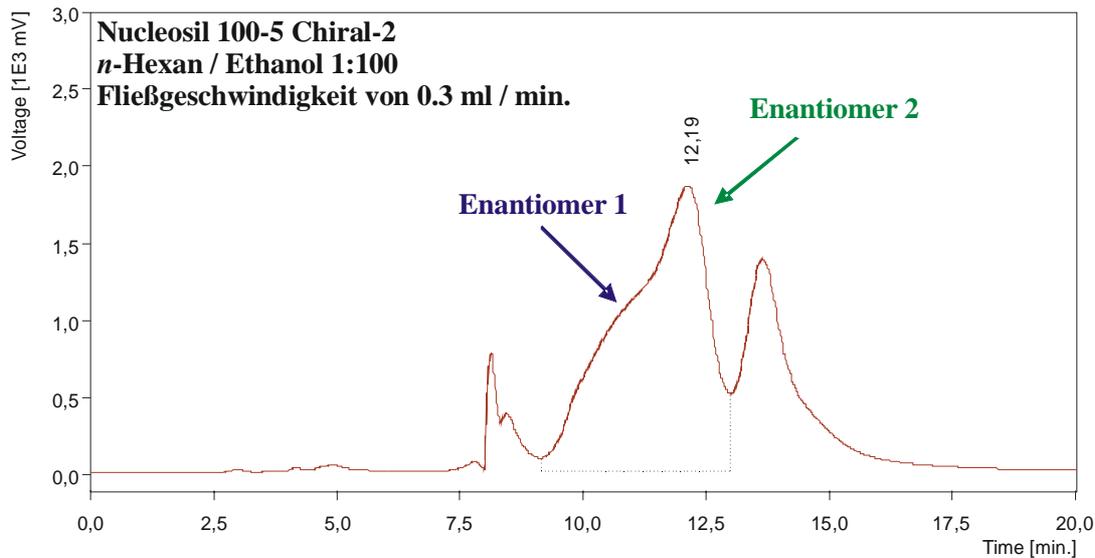


Abb. 67: Enantiomeren-Trennung des chiralen Knotans 28 mit n-Hexan / Ethanol 1:100 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.3 ml / min.

Der Austausch von Ethanol gegen Methanol wirkte sich günstig auf die Antrennung aus, da bei einem weiteren Laufmittelgemisch n-Hexan / Methanol im Verhältnis 1:100 bei einer Fließgeschwindigkeit von 0.1 ml pro Minute eingesetzt wurde (Abb. 68).

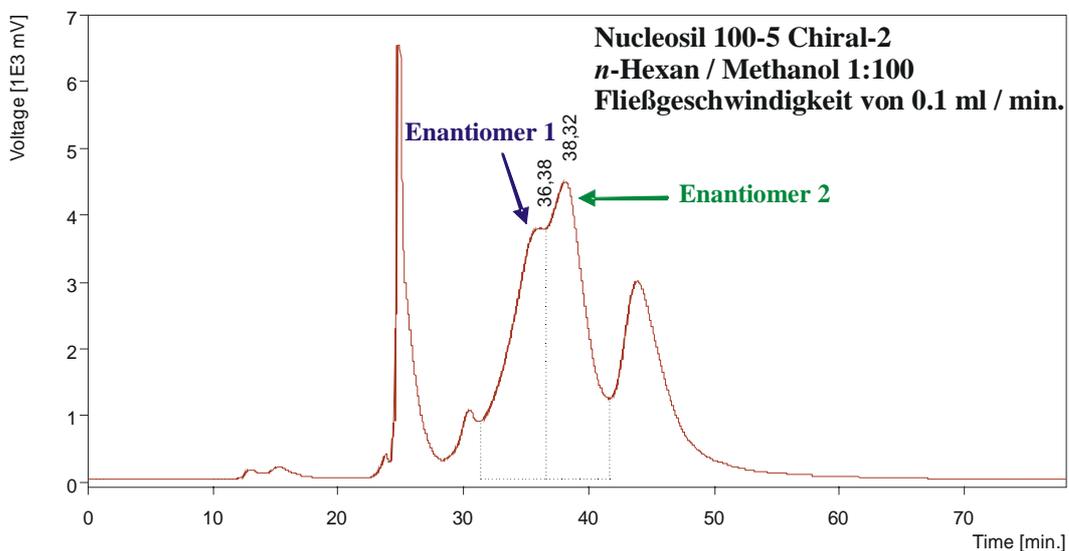


Abb. 68: Enantiomeren-Trennung des chiralen Knotans 28 mit n-Hexan / Methanol 1:100 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.1 ml / min.

Trotz der Variation verschiedener Parameter, wie Fließgeschwindigkeit oder Laufmittelzusammensetzung, konnte eine weitere Optimierung der Antrennung nicht erzielt werden.

Erst mit Hilfe der im Jahr 2005 kommerziell erhältlichen Säule Chiralpak IA gelang die Diastereomeren-Trennung des chiralen Knotans (Abb. 69). Dieser Säule ist dem strukturellen Aufbau der nicht-immobilisierten Säule Chiralpak[®]AD ähnlich sowie der nicht-kommerziell erhältlichen immobilisierten *Okamoto* Säule Chiralpak[®]AD. Bei der immobilisierten Säule ist die stationäre Phase kovalent an einen Silicagelträger gebunden, so dass diese Säule mit lipophilen Lösungsmitteln betrieben werden kann. Bislang wurde eine Basislinientrennung der Knotan-Enantiomere nur mit Hilfe dieser Säulenart erhalten. Die chirale Erkennung zwischen Substanz und Säulenmaterial wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht [82,146,203]. Wahrscheinlich beruht die Enantiomerenerkennung auf Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit sterischer Einpassung.

Zuerst wurde die Säule Chiralpak IA mit einer analytische Detektorzelle verwendet, bei der eine Basislinientrennung mit einem Laufmittelgemisch aus *n*-Hexan / Methanol / Dichlormethan im Verhältnis 1:1:10, einer Fließrate von 0.15 ml pro Minute und bei Raumtemperatur erreicht wurde.

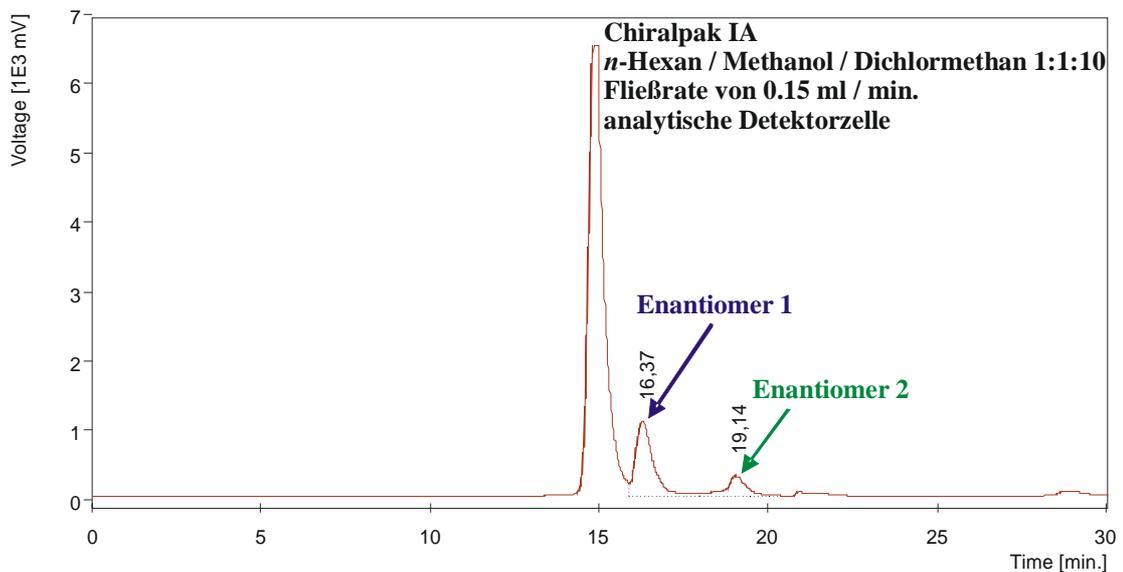


Abb. 69: Enantiomeren-Trennung des chiralen Knotans 28 mit *n*-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:10 als mobile Phase auf der Chiralpak IA Säule, einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml / min. und einer analytischen Detektorzelle

Die Peakformen und Peakverhältnisse sehen ungewöhnlich aus, wirkten sich jedoch nicht nachteilig auf die Trennung aus. Zurückzuführen ist dieses Aussehen auf den Unterschied, dass bei dem chiralen Knotan Diastereomere und nicht Enantiomere getrennt wurden.

Zum Sammeln der Fraktionen wurde anschließend die analytische Detektorzelle durch eine präparative Detektorzelle ausgetauscht.

4. Spezieller theoretischer Teil

Durch den Einsatz der präparativen Detektorzelle tritt eine Messungengenauigkeit auf, die in der Abbildung 70 zu sehen ist. Eine Basislinientrennung war daher mit dieser Detektorzelle nicht möglich. Zur Trennung bei Raumtemperatur wurde bei der präparativen Detektorzelle ein Laufmittelgemisch aus n-Hexan / Methanol / Dichlormethan im Verhältnis 1:1:1 und einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml pro Minute ermittelt.

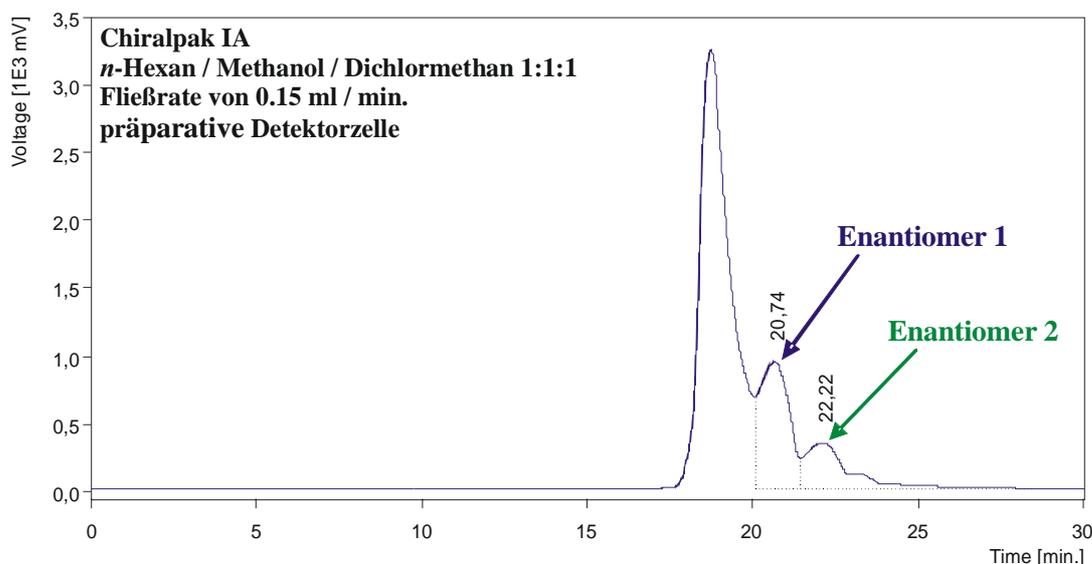


Abb. 70: Enantiomeren-Trennung des chiralen Knotans 28 mit n-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:1 als mobile Phase auf der Chiralpak IA Säule, einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml / min. und einer präparativen Detektorzelle

Die erfolgreiche Separation der beiden Diastereomere wurde anhand der identischen spiegelbildlichen Circular dichroismen belegt (Abb. 73).

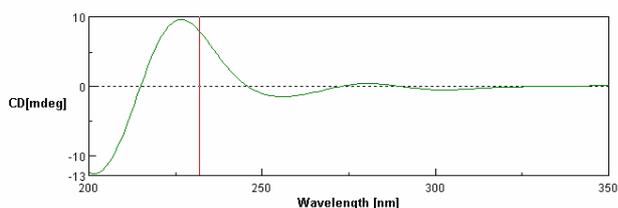


Abbildung 71: CD-Spektrum des chiralen Knotans 28 vom Enantiomer 1

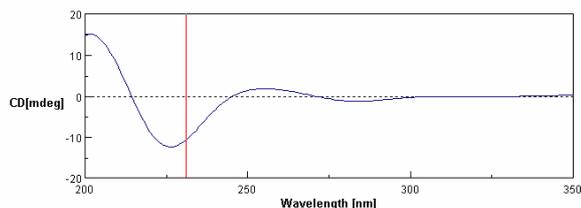


Abbildung 72: CD-Spektrum des chiralen Knotans 28 vom Enantiomer

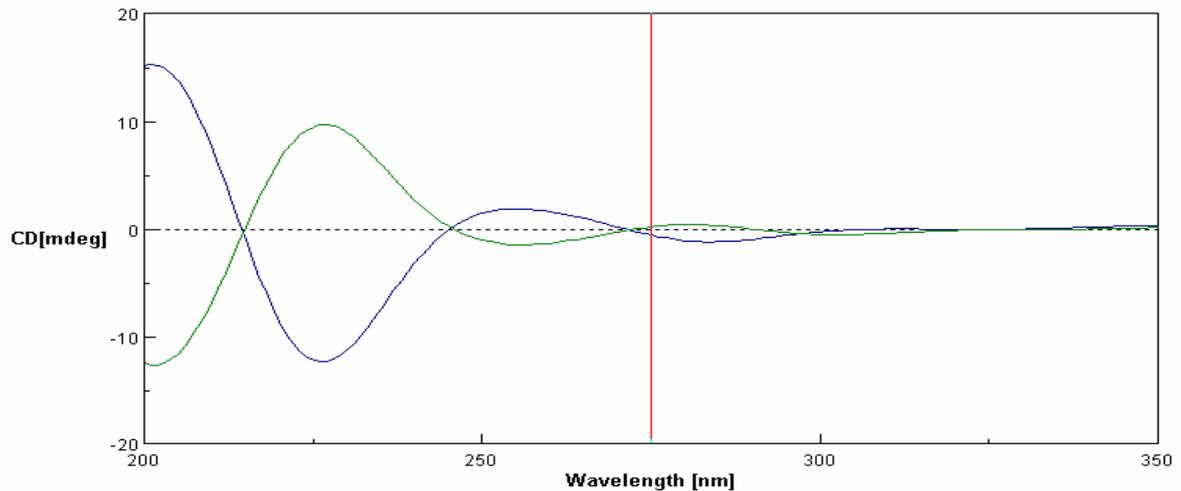


Abbildung 73: Überlappende CD-Spektren (Abb. 71, 72) des chiralen Knotans 28 von Enantiomer 1 und 2

c) Versuch der Enantiomeren-Trennung von Bromyl-Octameren

Bei der Synthese der Knotane entstehen nicht nur diese Hexamere sondern auch Octamere **32** (Abb.74).

Um zu prüfen ob Octamere chirale Moleküle sind, wurde versucht sie in ihre Enantiomere zu trennen um anschließend von den beiden Enantiomeren jeweils ein Circular dichroismus-Spektrum aufzunehmen. Hierzu wurde als Versuchsmodell das schon weiter oben beschriebene System des Bromyl-Knotans **27**, hier nun in der Form des Bromyl-Octamers **32**, verwendet, da von diesem Molekül ein ähnliches säulenchromatographisches Verhalten erwartet wie bei dem Bromyl-Knoten.

Ausgehend von den Erfahrungen mit der Trennung in die Enantiomeren bei den Knotanen wurde die chirale Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2 verwendet. Abbildung 75 zeigt das Chromatogramm mit einem Laufmittelgemisch aus *n*-Hexan / 2-Propanol im Verhältnis 30:70 und einer Fließrate von 0.5 ml pro Minute.

4. Spezieller theoretischer Teil

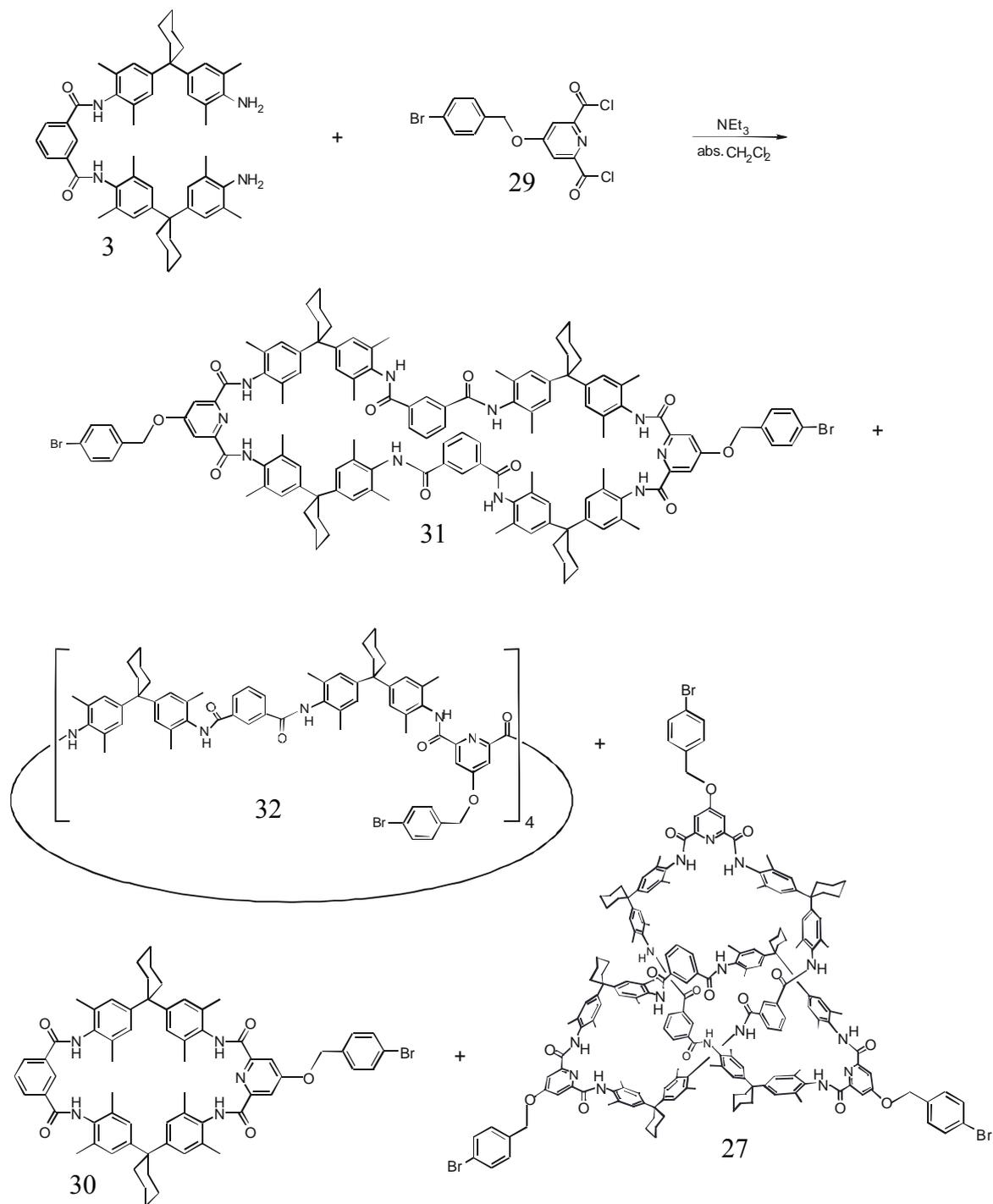


Abb. 74: Synthese des Bromyl-Octamers 32. Weitere Produkte sind das Knoten (Hexamer) 27, das Tetramer 31 und das Dimer 30.

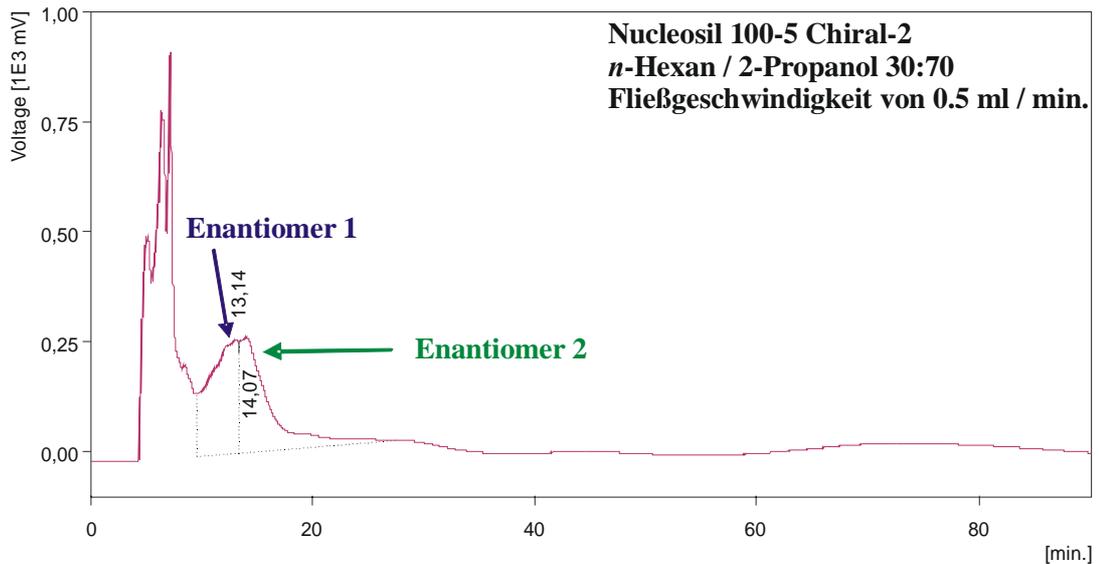


Abb. 75: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Octamers 32 mit n-Hexan / 2-Propanol 30:70 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Wie in Abbildung 75 zu erkennen ist, gestaltet sich die Enantiomeren-Separation schwieriger als erwartet. Das Chromatogramm in der Abbildung 76 wurde nun mit dem Laufmittelgemisch n-Hexan / 2-Propanol im Verhältnis 70:30 und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute aufgenommen. Trotz einer Umkehr der Polarität bei der Lösungsmittelzusammensetzung, konnte nur eine Antrennung erreicht werden. Auch bei Ausschöpfung aller zur Verfügung stehenden Möglichkeiten, wie Fließgeschwindigkeit oder Verwendung anderer Säulen (allerdings war zu der Zeit die Säule Chiralpak[®]IA noch nicht kommerziell erhältlich) wurde keine weitere Optimierung und damit bessere Trennung erzielt. Anhand der Substanzpeaks am Anfang der Chromatogrammen (in Abb. 76 liegen diese Peaks bei einer Retentionszeit zwischen 5 bis 10 Minuten) kann angenommen werden, dass bei der Synthese nicht nur das Bromyl-Octamer sich bildet. So können neben dem Octamer auch Catenane, ein Reif oder ein Octamer-Faden, „offenes Octamer“, entstehen.

Durch Schneiden der beiden nur teilweise getrennten Enantiomer-Fractionen konnte genug Substanz aufgefangen werden, um Circular dichroismen aufnehmen zu können (Abb. 79).

4. Spezieller theoretischer Teil

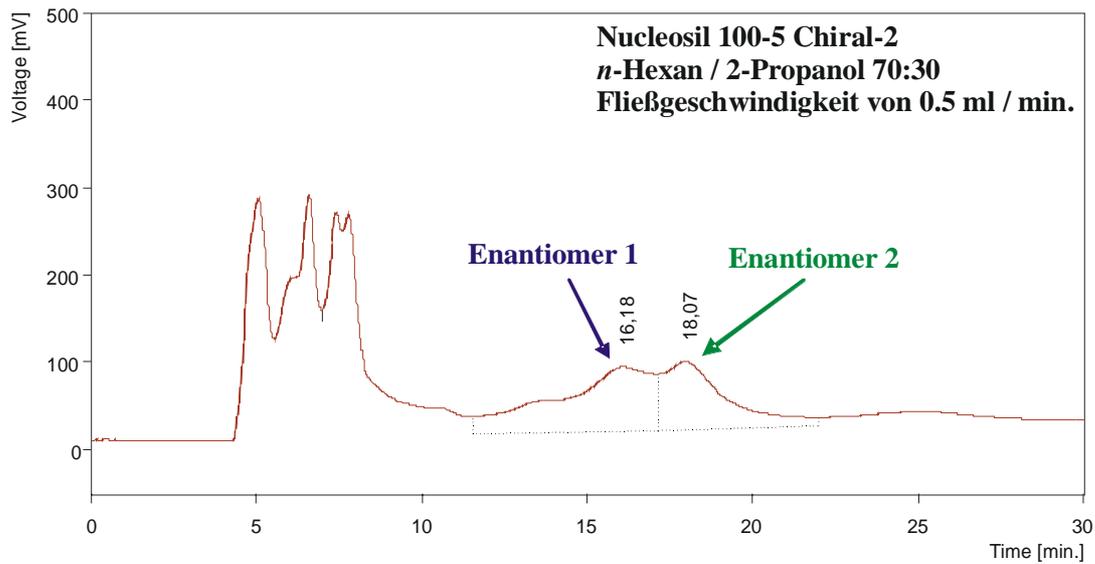


Abb. 76: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Octamers 32 mit *n*-Hexan / 2-Propanol 70:30 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-6 Chiral-2 Säule, und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

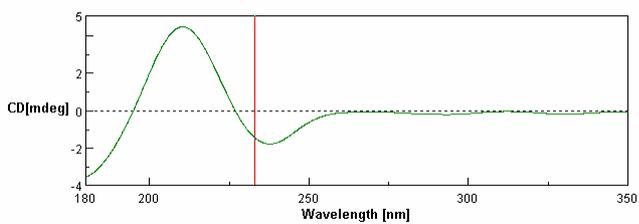


Abbildung 77: CD-Spektrum des Bromyl-Octamers 32 vom Enantiomer 1

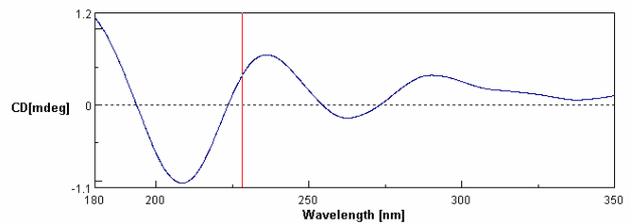


Abbildung 78: CD-Spektrum des Bromyl-Octamers 32 vom Enantiomer

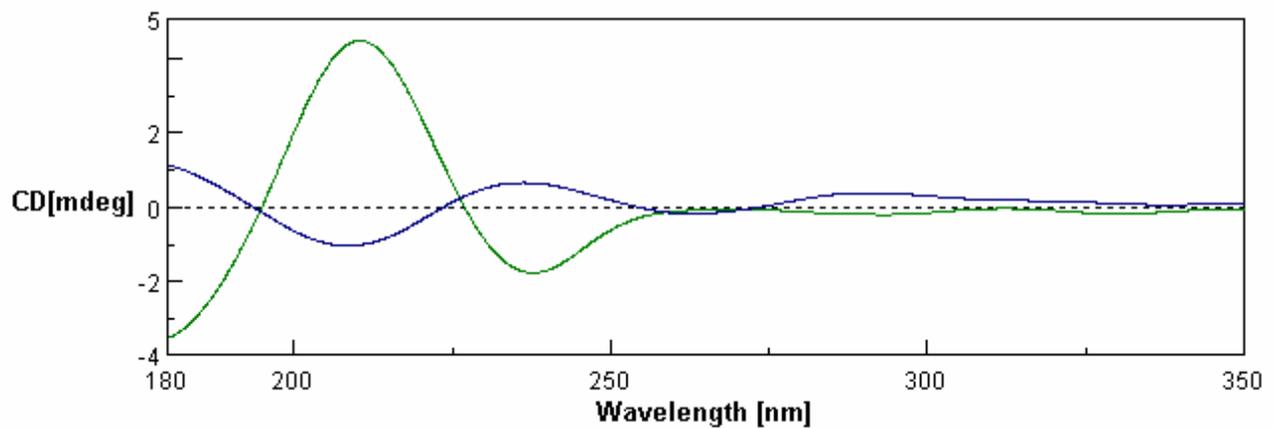


Abbildung 79: Übereinandergelegte CD-Spektren (Abb. 77, 78) des Bromyl-Octamers 32 von Enantiomer 1 und 2

Aus diesen Circular dichroismus-Spektren (Abb. 80 bis 82) ist ersichtlich, dass das Molekül chiral ist. Die Circular dichroogramme weisen spiegelbildliche Kurvenverläufe auf. Zu beachten ist bei diesen Spektren, dass die Probenkonzentration der beiden Enantiomere unterschiedlich war. Daher werden keine identischen spiegelbildlichen Circular dichroogramme erhalten, sondern die eine Kurve ist mit ihrer Intensität niedriger als die andere. Ob jedoch eine Verknotung des Octamers vorliegt, kann noch nicht bestätigt werden, da auch ein „offenes Octamer“ Chiralität aufweisen kann, z.B. durch Faltung des Octamer-Fadens über Wasserstoffbrückenbindungen. Zudem kann der Faden eine helicale Schleife bilden und das restliche Molekül fädelt sich dort „selbst hindurch“. Dieser Molekülkomplex müsste stabil genug sein, um sich nicht wieder beim Lösen in einem Lösungsmittel oder bei dem Trennvorgang zu „entknoten“. Auch diese Struktur wäre chiral und hierfür muss die Substanz noch weiter untersucht werden.

d) Vergleich von verschiedenem chiralem Säulenmaterial bei der Enantiomeren-Trennung von Knotanen

Von der Firma *Novartis Institutes for BioMedical Research (NIBR)*, wurden *Vögtle et al.* durch *Francotte* vier neuentwickelte chirale HPLC-Phasen zur Verfügung gestellt. Diese Phasen bestehen, wie die entsprechend bekannten Daicel-Phasen, aus Cellulose- bzw. Amylose-Derivaten aber in ihrer immobilisierten Form. Die Phasen wurden folgendermaßen bezeichnet:

- DMPC-I** für: 3,5-Dimethylphenylcarbammat auf Cellulose – immobilisiert
entspricht: Chiralcel OD,
- DMPA-I** für: 3,5-Dimethylphenylcarbammat auf Amylose – immobilisiert
entspricht: Chiralpak AD,
- PECA-I** für: S-Phenylethylcarbammat auf Amylose – immobilisiert
entspricht: Chiralpak AS,
- PMBC-I** für: para-Methylbenzoylcellulose – immobilisiert
entspricht: Chiralcel OJ.

Hesse und Nagel et al. stellten 1973 eine chirale stationäre Phase vor, bei der es sich um acetylierte, natürlich vorkommende, mikrokristalline Cellulose handelt ^[71].

4. Spezieller theoretischer Teil

Für dieses Säulenmaterial wurde von *Hesse* und *Nagel* ^[71] sowie später von *Francotte* et al. ^[141] ein Einschlussmechanismus zur Enantiomerenerkennung angenommen. Hierbei werden die Enantiomere in chirale Hohlräume adsorbiert, so dass für die Enantiomerentrennung die Form der Moleküle und nicht Anziehungskräfte über funktionelle Gruppen entscheidend ist. *Okamoto* et al. entwickelte das erste aus Cellulosetribenzoat bestehende Säulenmaterial. Dessen unterschiedliche Substitution der Phenylreste mit Alkyl-, Halogen-, Trifluormethyl- oder Methoxygruppen wurde systematisch untersucht, wobei eine Enantiomerenerkennung mit Elektronendonorsubstituierten Benzoatderivaten besser war als mit Elektronenakzeptorsubstituierten Derivaten ^[11]. So verbessern elektronenschiebende funktionelle Gruppen oder elektronenziehende Gruppen in *meta*- bzw. *para*-Position die Trennleistung für viele Racemate. Dagegen ist die Enantiomerenerkennung bei *ortho*-substituierten Derivaten und Derivaten mit Alkoxyresten und Nitrogruppen gering ^[84]. Durch die Substitution der Phenylgruppe wird die Polarität der Carbonylgruppe von Cellulosetribenzoat beeinflusst. Bei einer Substitution mit Elektronendonorguppen wird die Elektronendichte am Carbonylsauerstoff erhöht und z.B. Alkanole können über Wasserstoffbrückenbindungen adsorbiert werden. Jedoch ist die Methoxygruppe, welche einen starken elektronenschiebenden Effekt aufweist, aufgrund ihrer hohen Polarität, ungeeignet. Das NH-Proton der Carbamoylgruppen wird durch elektronenziehende Substituenten am Polysaccheridphenylcarbamat acider und eine Substanz, die an dieser Stelle adsorbiert erfährt ebenfalls eine starke Wechselwirkung. Dagegen nimmt bei einer polare Gruppe als Substituent das Trennvermögen der chiralen stationären Phase ab, da diese polare Gruppe zu weit vom Glucoserest entfernt ist und Racemate mit der polaren Gruppe wechselwirken. Eine weitere Möglichkeit sind π - π -Wechselwirkungen zwischen den Phenylresten eines Cellulosetribenzoat-Derivates und den aromatischen Gruppen eines zu trennenden Racemats. Das Trennvermögen einer chiralen stationären Phasen hängt also von den Substituenten am Phenylrest ab. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten den chiralen Mechanismus der Enantiomerenerkennung von Cellulosetribenzoat-Derivaten ^[49,82,203] mit Hilfe von chromatographischen, NMR-spektroskopischen und röntgenographische Untersuchungen sowie Computerstudien. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um eine Enantiomerenerkennung über Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit sterischer Einpassung. Hierbei werden die polaren Carbamoylgruppen als Hauptadsorptionsstellen angenommen, da dessen NH- und C=O-Gruppen über Wasserstoffbrückenbindungen zu einer racemischen Verbindung wechselwirken können (Abb. 80) sowie über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen der C=O-Gruppen ermöglichen.

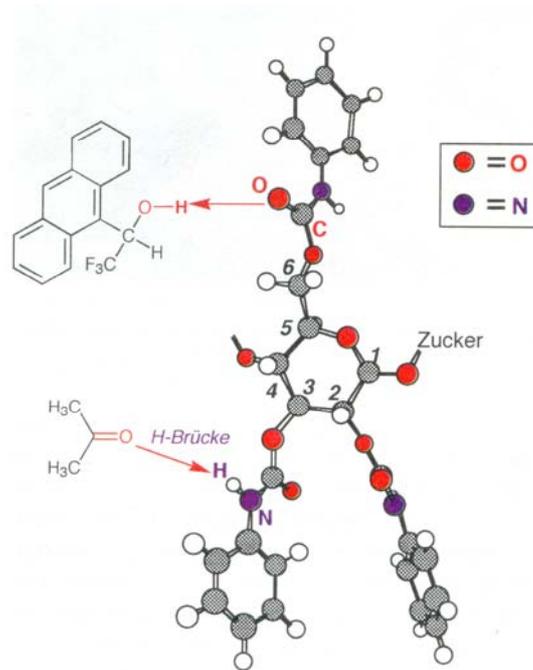


Abb. 80: Mechanismus der Enantiomerenerkennung von Cellulosetris(phenylcarbamat)-Derivaten.^[53]

Bei Amylosephenylcarbamaten wurde durch Einführung von Methyl- und Chlorsubstituenten und auch durch *para*-substituierte Methoxygruppen, im Gegensatz zu den Cellulosederivaten, die Fähigkeit zur Enantiomerenerkennung verbessert.^[82,204,205] Zurückgeführt wird dieses Phänomen auf die höhergeordneten Strukturen der Amylose- bzw. Cellulosederivate. So besitzt das Cellulosetris(phenylcarbamate) eine linksgängige 3/2-helikale Kettenkonformation, d.h. die Glucosereste sind entlang der Helixachse regelmäßig angeordnet und parallel zur Hauptkette verläuft eine chirale Helixfurche mit polaren Carbamoylgruppen. Die polaren Carbamoylgruppen orientieren sich zur Innenseite, während die hydrophoben aromatischen Gruppen an der Außenseite der Polymerkette angeordnet sind. Für das Amylosetris(phenylcarbamate) wird dagegen eine 4/1-helikale Kettenkonformation angenommen.

3,5-disubstituierte Derivate wie Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate (Chiralcel[®] OD), Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate (Chiralpak[®] AD) oder Cellulosetris(3,5-dichlorophenyl)carbamate zeigen eine hohe Enantioselektivität. Meistens lassen sich Racemate, die nicht auf Chiralcel[®] OD auf Chiralpak[®] AD auftrennen und umgekehrt, da diese beiden chiralen stationären Phasen ein ähnliches qualitatives Erkennungsvermögen für Enantiomere besitzen. Das Cellulosetris(3,5-dichlorophenyl)carbamate zeigt ein besseres Trennvermögen als Chiralcel[®] OD und Chiralpak[®] AD.

4. Spezieller theoretischer Teil

Jedoch erwies sich der Einsatz von Cellulosetris(3,5-dichlorophenyl)carbammat als schwierig, da diese Säulenmaterial sich bereits in den üblichen Normal-Phase HPLC Eluenten ^[82,206] auflöste, nur ein Methanol/Wasser war als mobile Phase möglich ^[207] Auch bei den Phasen Chiralcel[®]OD und Chiralpak[®]AD ist die Anzahl von Lösungsmitteln als mobile Phase begrenzt. Lipophile oder polare Lösungsmittel wie Tetrahydrofuran, Chloroform oder Dichlormethan können als mobile Phase nicht verwendet werden da die chirale stationäre Polysaccharid-Phasen durch diese Lösungsmittel quellen bzw. aufgelöst werden. Daher werden diese Phasen häufig mit einem Laufmittelgemisch aus n-Hexan und Ethanol oder 2-Propanol betrieben. Um diesen Nachteil zu beheben, wurden bei den chiralen stationären Phasen Chiralcel[®]OD und Chiralpak[®]AD die Positionen 2, 3 und 6 der Glucoseeinheiten über einen Diisocyanat-Spacer regioselektiv an das Silicagel gebunden.

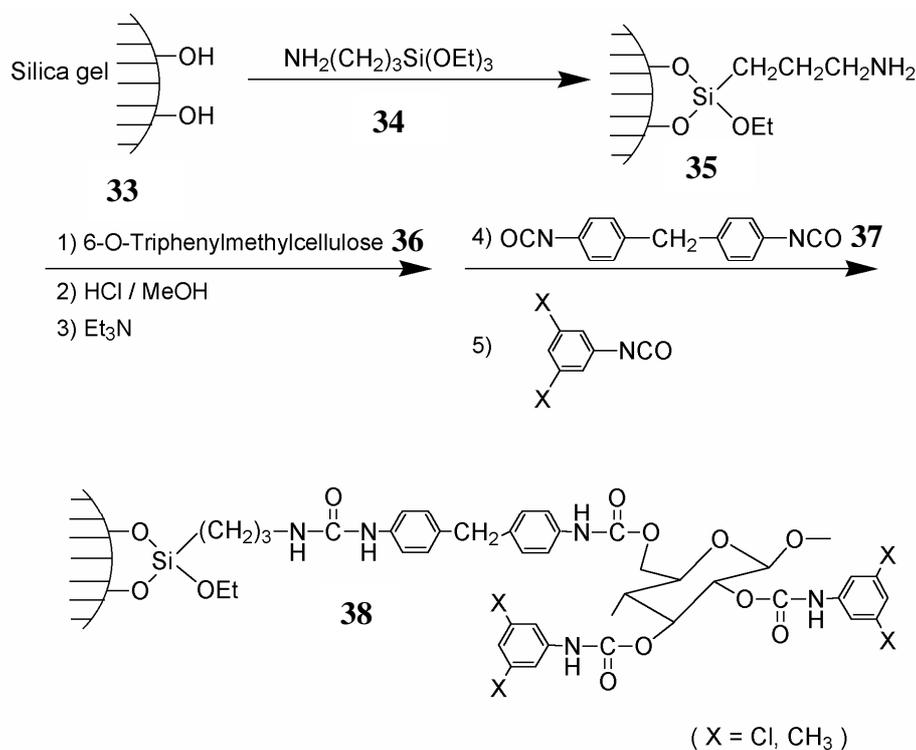


Abb. 81: Syntheseweg der ersten von Okamoto entwickelten, kovalent an Silicagel gebundenen Chiralcel[®]OD Phase

Im Jahr 1987 setzten Okamoto et al. Silicagel 33 mit 3-Aminopropyltriethoxysilan 34 zu 3-Aminopropyltriethoxysilicagel 35 um. Anschließend wurde dieses modifizierte Silicagel an Cellulose 36 gebunden und, nachdem die freien Hydroxylgruppen mit einem Überschuss an 4,4'-Diphenylmethanisocyanat 37 reagierten hatten, wurde das in Abbildung 81 Produkt als stationären Phase 38 erhalten ^[11,208].

Auf diesem Syntheseweg hergestellte chirale stationäre Phasen können die Enantiomere besser unterscheiden als chirale stationäre Phasen des Beschichtungstyps, die nicht kovalent an Silicagel gebunden sind, jedoch ist ihre Fähigkeit zur Enantiomerenerkennung verringert. Dies liegt möglicherweise an einigen chemisch an Silicagel gebundenen Hydroxygruppen der Polysaccharide, wodurch es zu einer Veränderung bei den höhergeordneten Strukturen der Polysaccharide kommt. Chiralpak[®]AD konnte im Jahr 1996 mit dem reduzierenden terminalen Rest der Amylose an Silicagel chemisch gebunden werden (Abb. 82) [209] Hierbei wird die Amylose mit der gewünschten Kettenlänge durch Polymerisation des Dikaliumsalzes von α -D-Glucose-1-phosphat **40** mit zwei verschiedenen Startermolekülen in Gegenwart einer aus Kartoffeln isolierten Phosphorylase hergestellt. Als erstes Startermolekül wurde ein mit 3-Aminopropyltriethoxysilan umgesetztes lactonisiertes Maltooligosaccharid verwendet. Ist eine definierte Kettenlänge sowie eine enge Molekulargewichtsverteilung der Amyloseketten durch enzymatische Polymerisation erreicht worden, werden diese Amyloseketten mit ihrem terminalen reduzierenden Rest an Silicagel gebunden. Durch die Bindung des terminalen Restes der Amyloseketten an das Silicagel wurde eine Reaktionsmöglichkeit der freien Hydroxygruppen direkt mit dem Silicagel vermieden und dadurch auch eine Veränderung von höhergeordneten Strukturen.

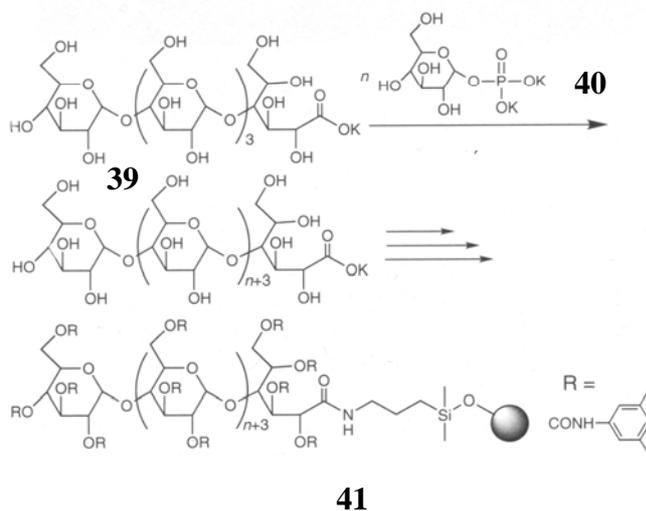


Abb. 82: Syntheseweg einer mit dem reduzierenden terminalen Rest an Silicagel gebundenen Chiralpak[®] AD Phase

Das zweite Startermolekül, dem Dikaliumsalz von α -D-Glucose-1-phosphat **40**, wird zuerst enzymatisch polymerisiert, dann lactonisiert und abschließend mit aminofunktionalisierten Silicagelen umgesetzt.

4. Spezieller theoretischer Teil

Um die verbleibenden Hydroxygruppen in die entsprechenden Carbamate zu überführen, wird bei beiden beschriebenen Syntheserouten mit Startermolekülen im letzten Schritt ein Überschuss an 3,5-Dimethylphenylisocyanat zugesetzt. Die auf diesem Wege synthetisierten chiralen stationären Phasen zeigen, wie die auf Silicagel physisorbierte Amylose, eine gute Enantiomereerkennung sowie -unterscheidung. Hierbei hebt sich die mit dem zweiten Startermolekül hergestellte chirale stationäre Phase **41** (Abb. 82) durch eine bessere Enantiomereerkennung als die mit dem ersten Startermolekül synthetisierte chirale stationäre Phase hervor. Zurückgeführt werden kann dies auf die Methodenart wie die Silicageloberfläche entschützt wird. So wird bei der Synthese mit dem ersten Startermolekül Trimethylsilylchlorid verwendet, während in dem anderen Fall 3,5-Dimethylphenylisocyanat eingesetzt wird. Im Vergleich mit der 1987 von *Okamoto* hergestellten chiralen stationären Phase besitzen die neueren Phasen eine definierte Amylosekettenlänge und eine enge Molekulargewichtsverteilung.

Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans **42**

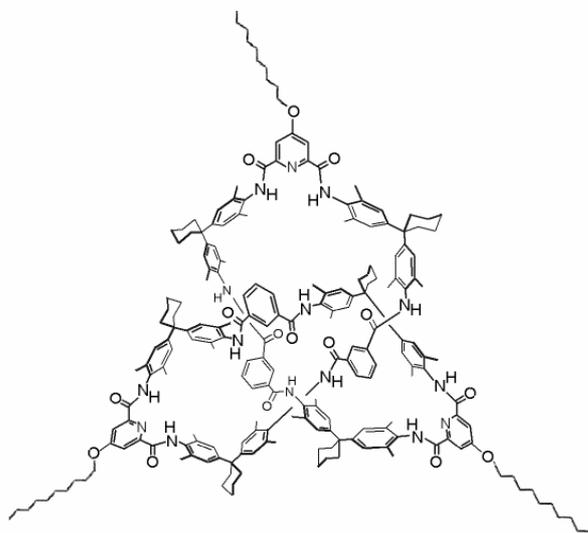


Abb. 83: Struktur des Decyl-Knotan 42

Die Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans **42** (Abb. 83), synthetisiert von *Böhmer* aus dem Arbeitskreis *Vögtle*, wurde schon von *Kaufmann* aus dem Arbeitskreis *Vögtle* durchgeführt ^[12].

Durch die drei *n*-Decylketten wird die Löslichkeit des Tris(decyloxy)knotans in Alkohol verbessert. Die Separation erfolgte auf der chiralen Säule Chiralcel[®]OD mit dem Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Ethanol im Verhältnis 88:12 und einer Fließrate von 0.8 ml pro Minute (Abb. 84).

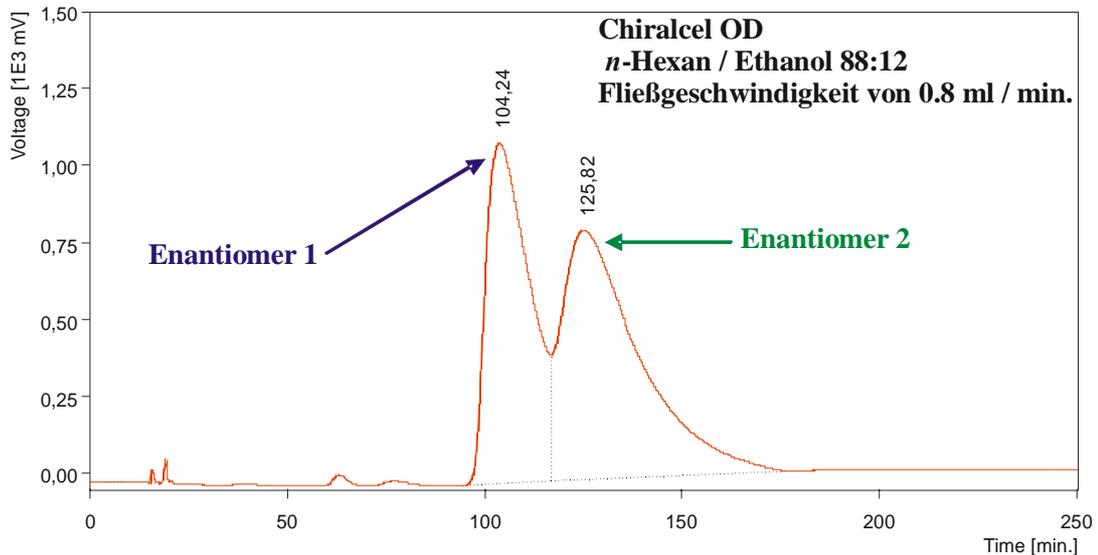


Abb. 84: Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans 42 mit *n*-Hexan / Ethanol 88:12 als mobile Phase auf der Chiralcel OD Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.8 ml / min.

Die Enantiomeren-Separation wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie belegt, siehe Abbildung 87.

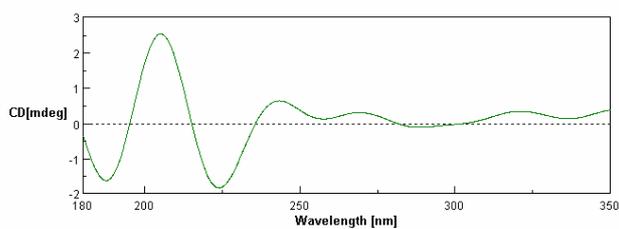


Abbildung 85: CD-Spektrum des Decyl-Knotans 42 vom Enantiomer 1

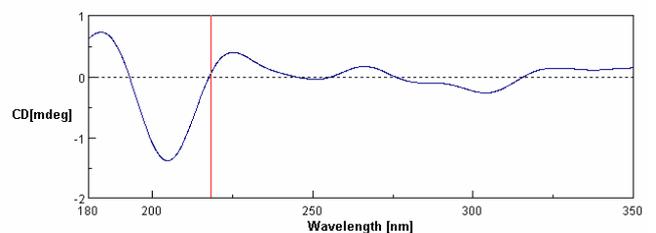


Abbildung 86: CD-Spektrum des Decyl-Knotans 42 vom Enantiomer

4. Spezieller theoretischer Teil

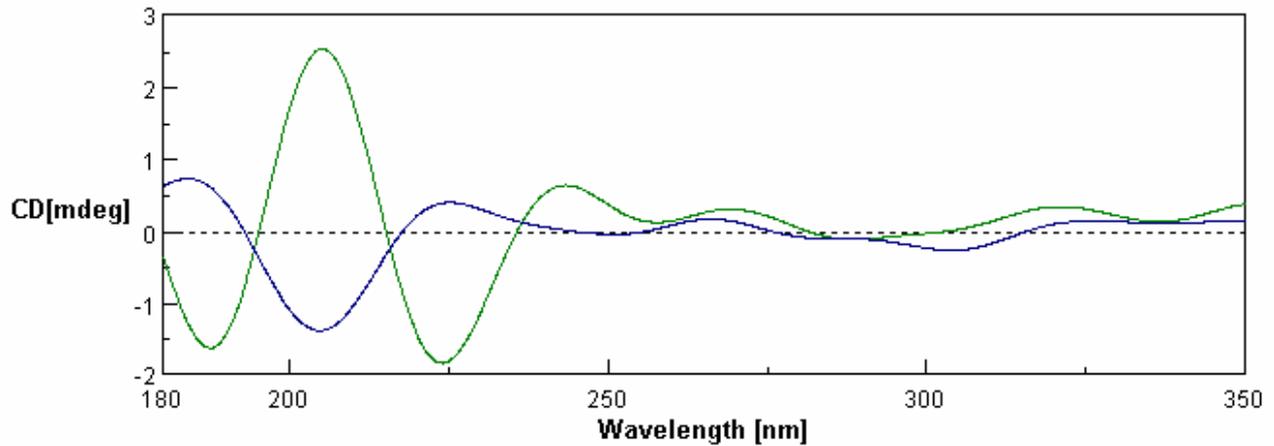


Abbildung 87: Überinandergelegte CD-Spektren (Abb. 85, 86) des Decyl-Knotans 42 von Enantiomer 1 und 2

Untersuchung der DMPC-I Säule durch die Enantiomeren-Trennung vom Decyl-Knotan 42

Mit Hilfe des Decyl-Knotans 42 wurde das chirale Säulenmaterial DMPC-I, welches Chiralcel[®]OD immobilisiert entspricht, getestet. In der Abbildung 88 wurden dieselben Bedingungen gewählt wie in Abbildung 84 (Laufmittelgemisch aus *n*-Hexan / Ethanol im Verhältnis 88:12 und einer Fließgeschwindigkeit von 2.0 ml pro Minute), eine Trennung oder eine Antrennung ist nicht zu erkennen.

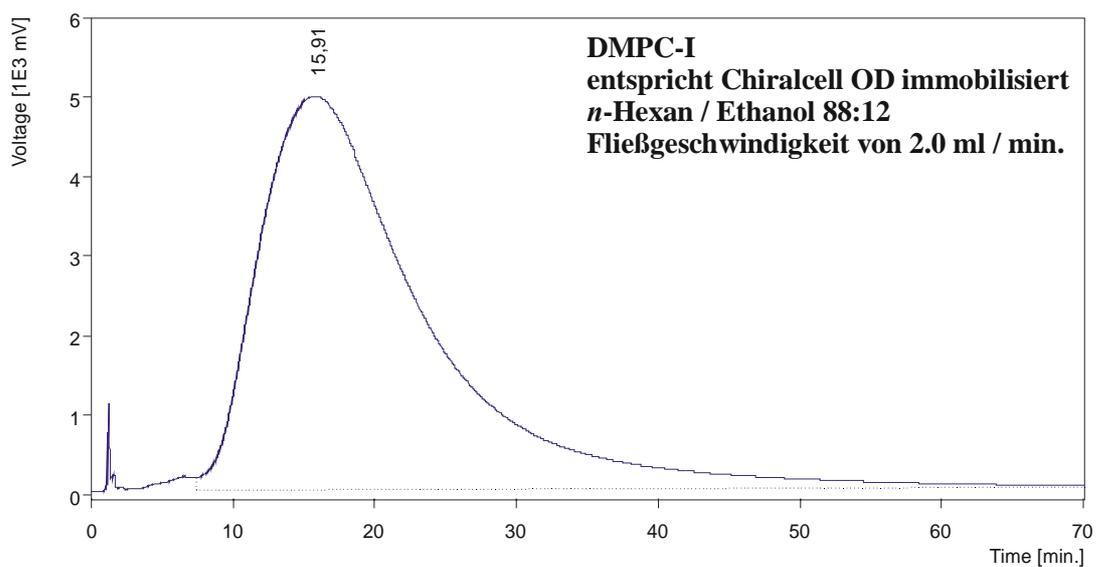


Abb. 88: Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans 42 mit *n*-Hexan / Ethanol 88:12 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 2.0 ml / min.

In den nun anschließenden Spektren wurde das Laufmittelgemisch aus *n*-Hexan / Ethanol im Verhältnis 88:12 beibehalten, jedoch die Fließgeschwindigkeit wurde variiert. Eine Verminderung der Fließgeschwindigkeit sollte eine Auftrennung in die Enantiomere bewirken.

Bei der Reduzierung der Fließgeschwindigkeit auf 1.0 ml pro Minute zeigt sich in Abbildung 89 die Andeutung einer Schulter, die bei einer weiteren Verminderung der Fließgeschwindigkeit auf 0.5 ml pro Minute (Abb. 90) zu einer Antrennung in die Enantiomere ausbildet.

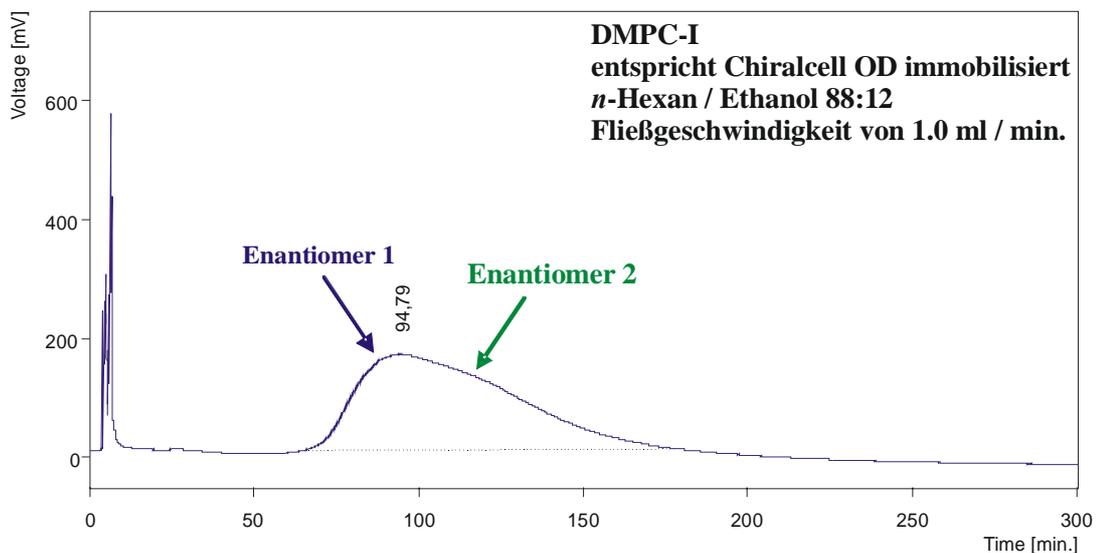


Abb. 89: Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans 42 mit *n*-Hexan / Ethanol 88:12 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 1.0 ml / min.

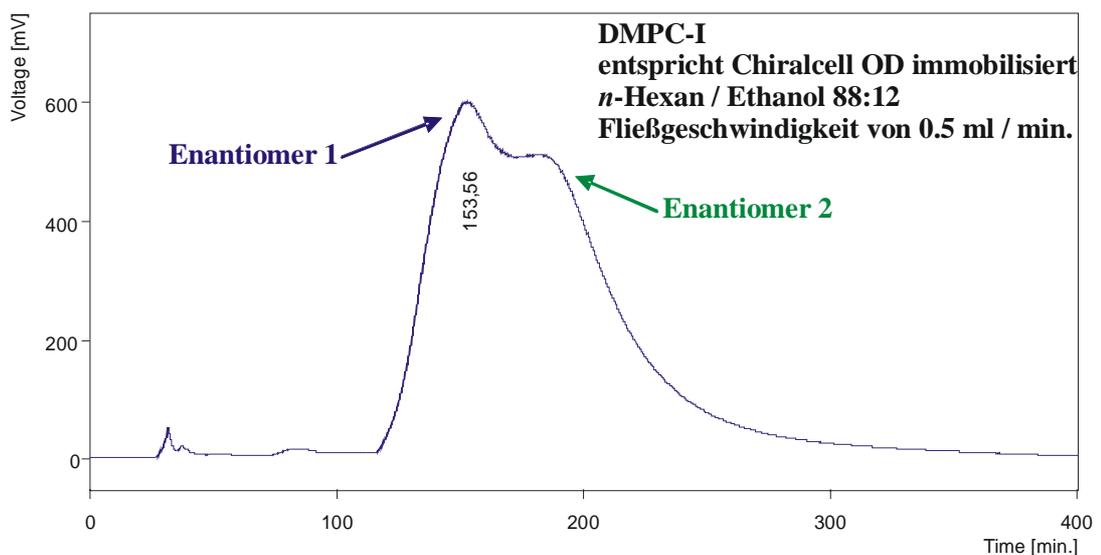


Abb. 90: Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans 42 mit *n*-Hexan / Ethanol 88:12 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

4. Spezieller theoretischer Teil

Eine weitere Reduzierung der Fließgeschwindigkeit auf 0.1 ml pro Minute führte nicht zu einer Verbesserung der Trennleistung, siehe Abbildung 91.

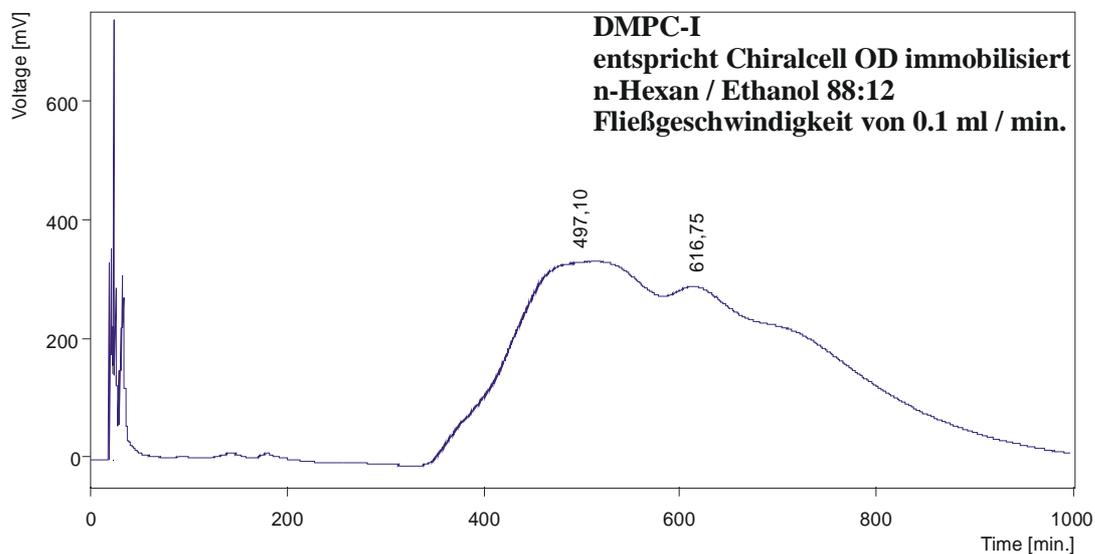


Abb. 91: Enantiomeren-Trennung des Decyl-Knotans 42 mit n-Hexan / Ethanol 88:12 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.1 ml / min.

Untersuchung der verschiedenen Francotte-Säule durch die Enantiomeren-Trennung vom Bromyl-Knotan 27

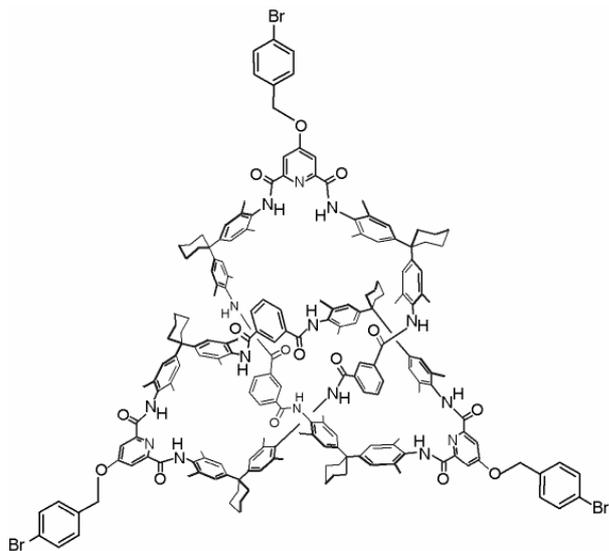


Abb. 92: Das Bromyl-Knotan 27

Der schon weiter oben, im Kapitel a) Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans **27**, auf der chiralen Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2 in seine Enantiomere getrennte Bromyl-Knotan (Abb.93), synthetisiert von *Brüggemann* aus dem Arbeitskreis *Vögtle*, wurde zum Testen der verschiedenen Säulenmaterialien verwendet.

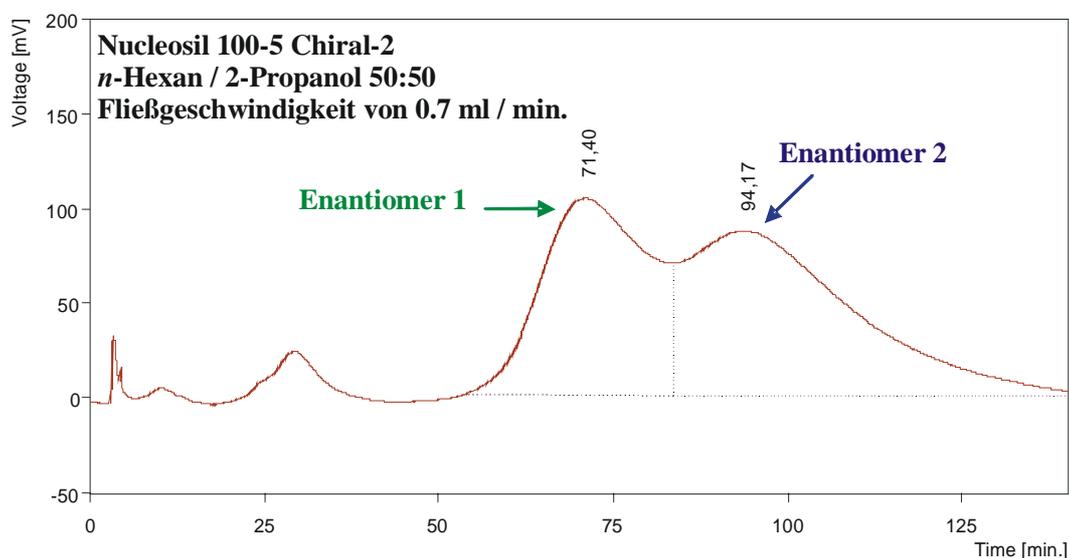


Abb. 93: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.7 ml / min.

Mit der chiralen Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2 konnte trotz der funktionellen Gruppen am Knotan und den möglichen Wechselwirkungen mit der stationären Phase, z.B. Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen, eine Basislinientrennung nicht erreicht wurde. Unter den Bedingungen dieser Trennung, mit dem Laufmittelgemisch bestehend aus *n*-Hexan / 2-Propanol im Verhältnis 50:50 und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute, wurden Probenläufe auf den folgenden verschiedenen Säulen durchgeführt.

Chiralcel[®]OD, DMPC-I und PMBC-I

Eine ebenso gute Trennung wie bei Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2 konnte mit der chiralen Säule Chiralcel[®]OD erzielt werden (Abb. 95), während bei der Abbildung 96 von der chiralen Säule DMPC-I (hier ist die Phase von Chiralcel[®]OD immobilisiert) weder eine Trennung noch eine Antrennung zu sehen ist.

4. Spezieller theoretischer Teil

Dies kann auf eine geringe Selektivität der mobilen Phase zurückgeführt werden, die durch das Fehlen eines lipophilen Lösungsmittels zustande kommt.

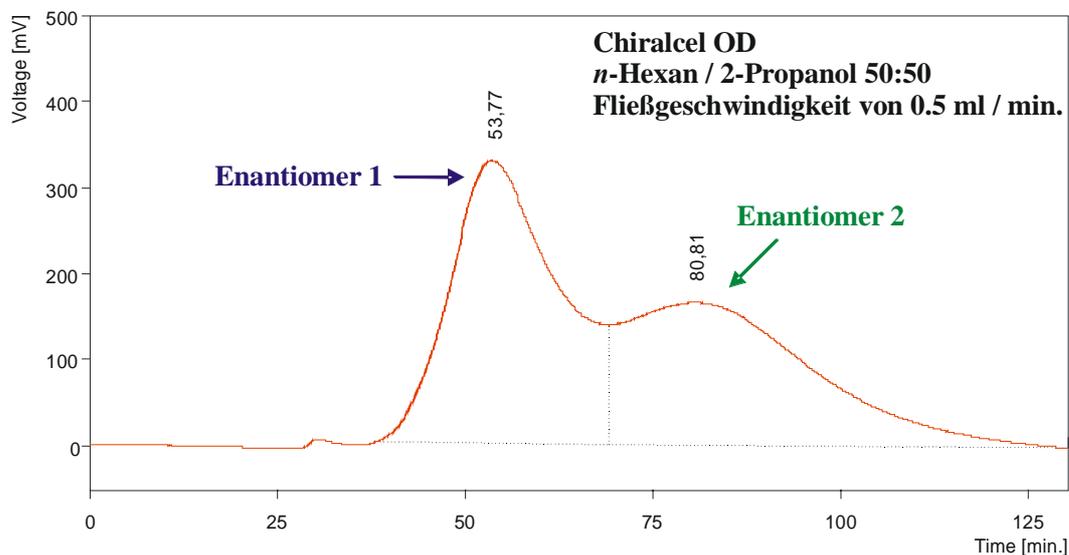


Abb. 95: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit n-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der Chiralcel OD Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Ein weiteres Problem bei dieser Art von Säule ist, dass die Probe nicht in Lösung gehalten werden kann und daher auf der Säule auskristallisiert, wodurch sich der Druck des Systems kontinuierlich erhöht. Eine Lösung ist wahrscheinlich die Zugabe von Dichlormethan oder Chloroform zu dem Laufmittelgemisch, da das Bromyl-Knotan 27 in diesen beiden Lösungsmitteln gut löslich ist.

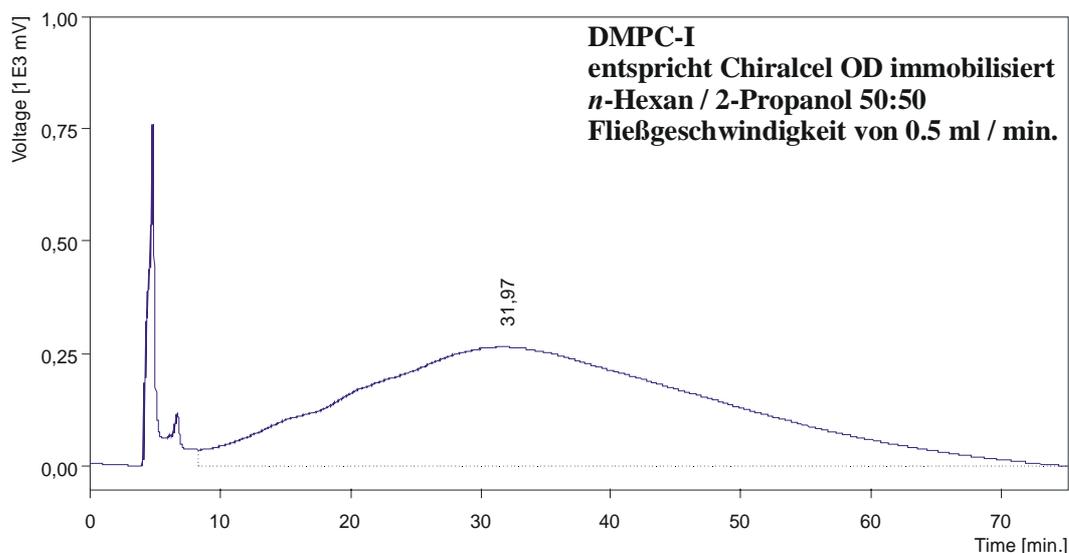


Abb. 96: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit n-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Auf der chiralen, immobilisierten Säule PMBC-I, die vom Säulenmaterial der nicht immobilisierten Säule Chiralcel®OJ vergleichbar ist, wird eine Antrennung in die Enantiomere erreicht (Abb. 97).

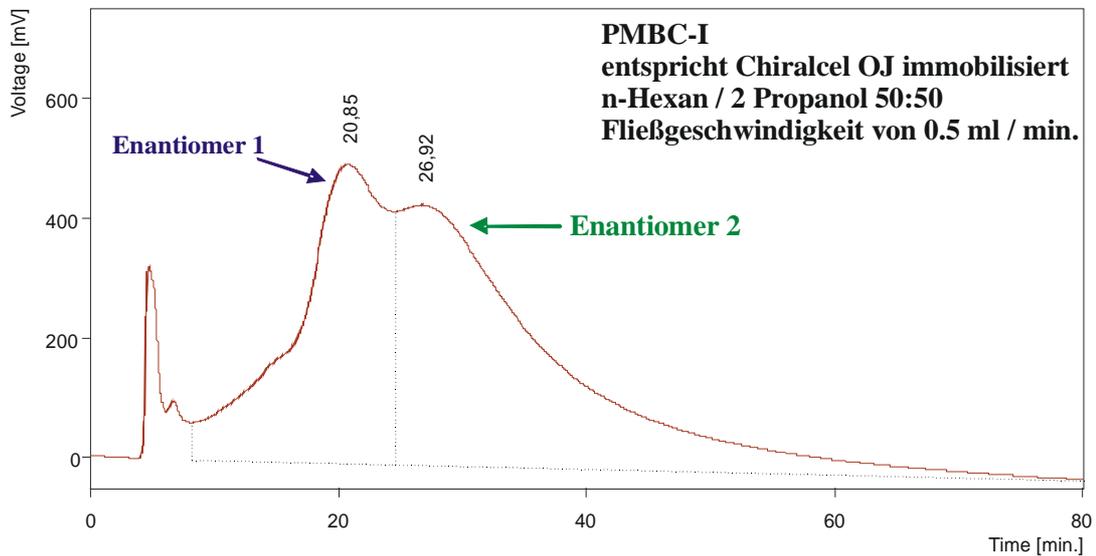


Abb. 97: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit n-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der PMBC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Chiralpak®IA, DMPA-I, Chiralpak®AD und PECA-I

Bei den chiralen, immobilisierten Säulen Chiralpak IA und DMPA-I ist in den Abbildungen 98 und 99 jeweils eine Schulter für die Antrennung in die Enantiomere zu erkennen.

Die chirale, immobilisierte Säule DMPA-I, entspricht dem Säulenmaterial der chiralen Säule Chiralpak AD, welche nicht immobilisiert ist. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sich die beiden Chromatogramme von den chiralen, immobilisierten Säulen Chiralpak IA und DMPA-I ähneln und die Kurvenverläufe dieser beiden Chromatogramme fast dieselben sind.

Ebenso zeigt sich bei der chiralen, immobilisierten Säule PECA-I, die der nicht immobilisierten Phase von der chiralen Säule Chiralpak AS ähnelt, eine Schulter als Zeichen einer Antrennung in die Enantiomere. Diese ist in Abbildung 100 dargestellt.

4. Spezieller theoretischer Teil

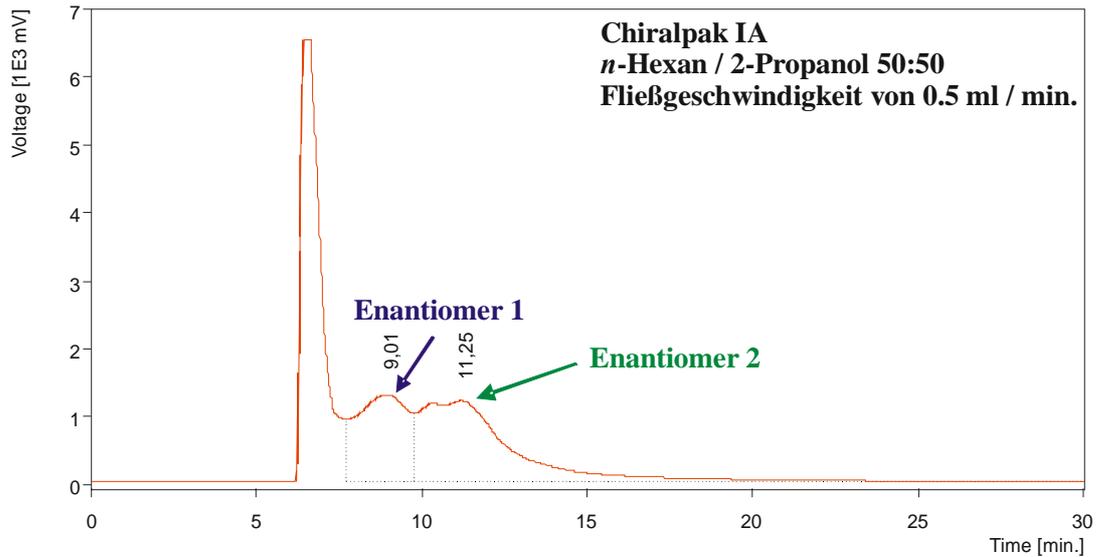


Abb. 98: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit n-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der Chiralpak IA Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

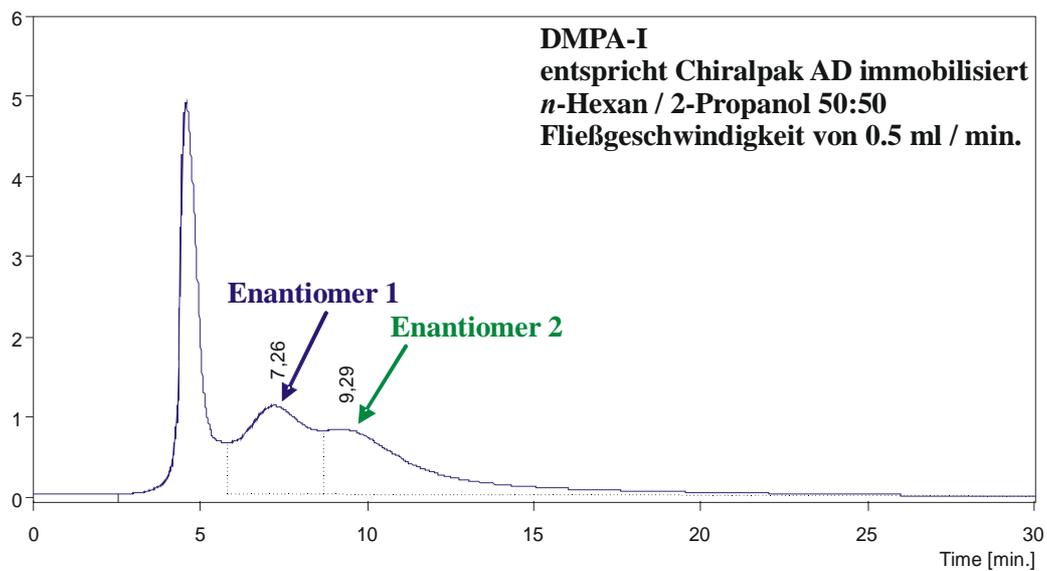


Abb. 99: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit n-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der DMPA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

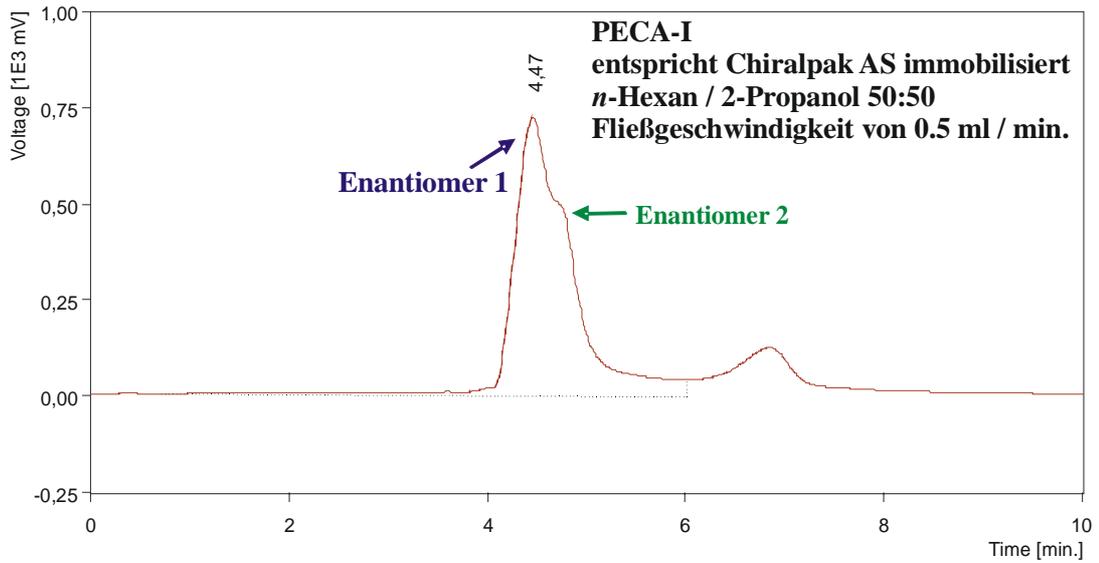


Abb. 100: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der PECA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Während mit der nicht immobilisierten Phase der chiralen Säule Chiralpak AD, wie in Abbildung 101 gezeigt, weder eine Trennung noch eine Antrennung ersichtlich wird.

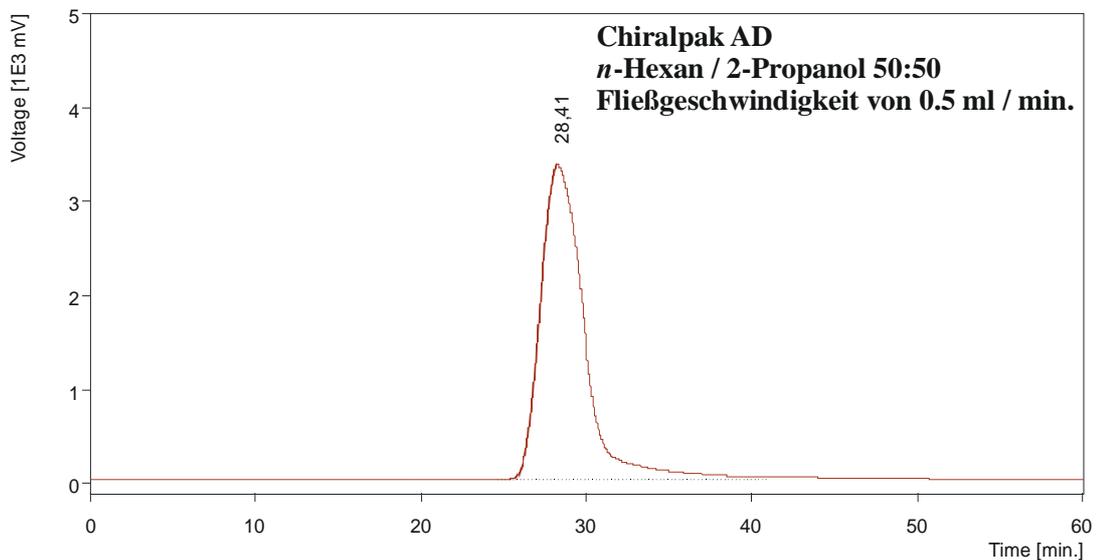


Abb. 101: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der Chiralpak AD Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

4. Spezieller theoretischer Teil

Untersuchung der Immobilisierung

Immobilisiertes chirales Säulenmaterial ist kovalent an einen Silicagelträger gebunden und kann daher mit z.B. chlorierten Lösungsmitteln betrieben werden, ohne zu quellen oder auszubluten.

Um diese Immobilisierung der Säulen auszunutzen, wurden für weitere Probenläufe Laufmittelgemische aus *n*-Hexan / Dichlormethan in den Verhältnissen 60:40, 50:50 und 40:60 verwendet.

1) DMPC-I und PMBC-I

Weder eine Trennung noch eine Antrennung konnten bei den chiralen Säulen PMBC-I und DMPC-I durch die Variation des Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Dichlormethan mit den oben genannten Verhältnisse von 60:40, 50:50 und 40:60, erreicht werden (Abb. 102 bis 107).

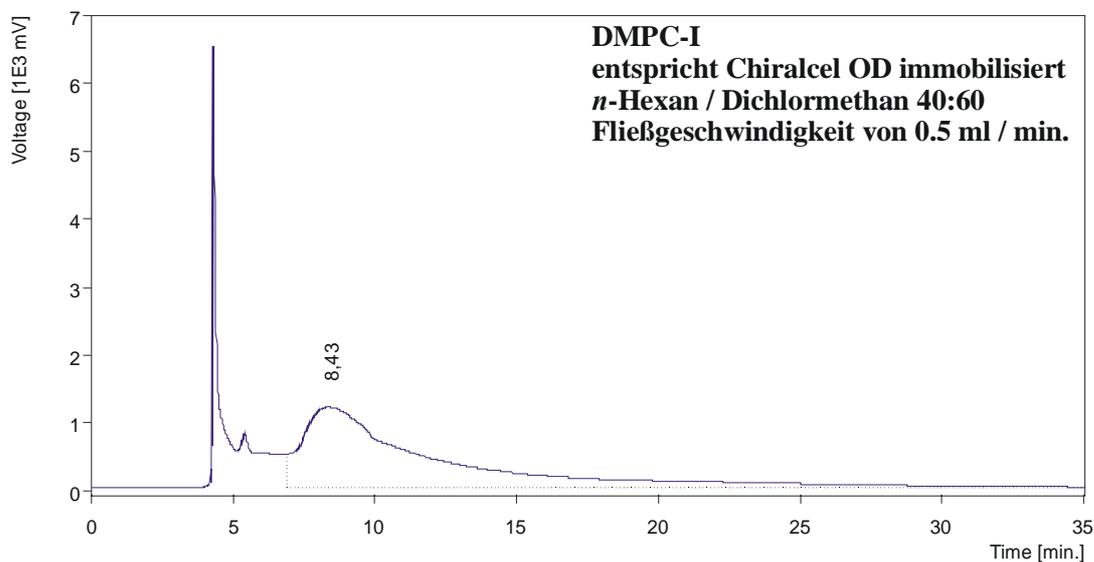


Abb. 102: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 40:60 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

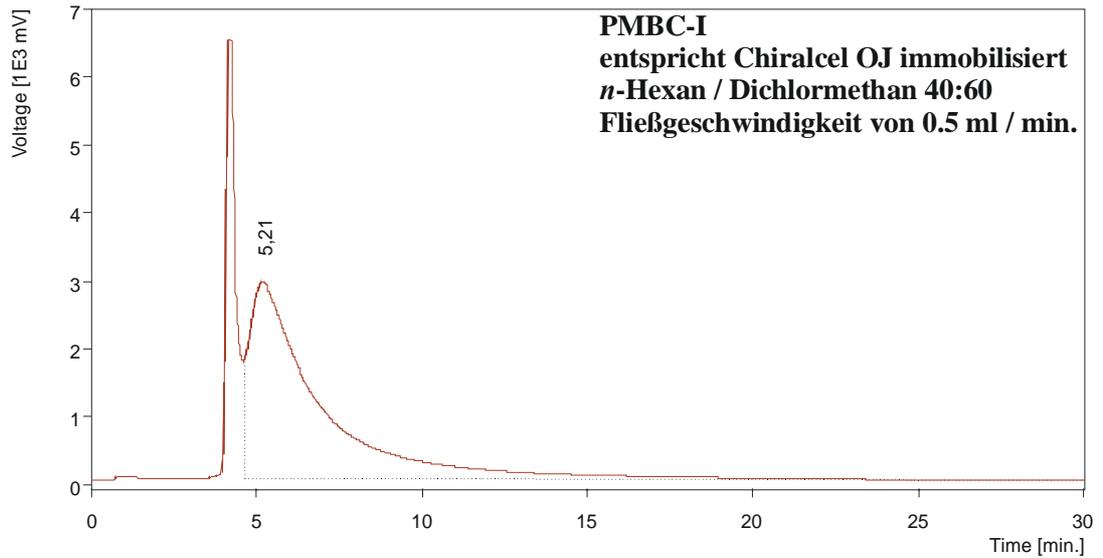


Abb. 103: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 40:60 als mobile Phase auf der PMBC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

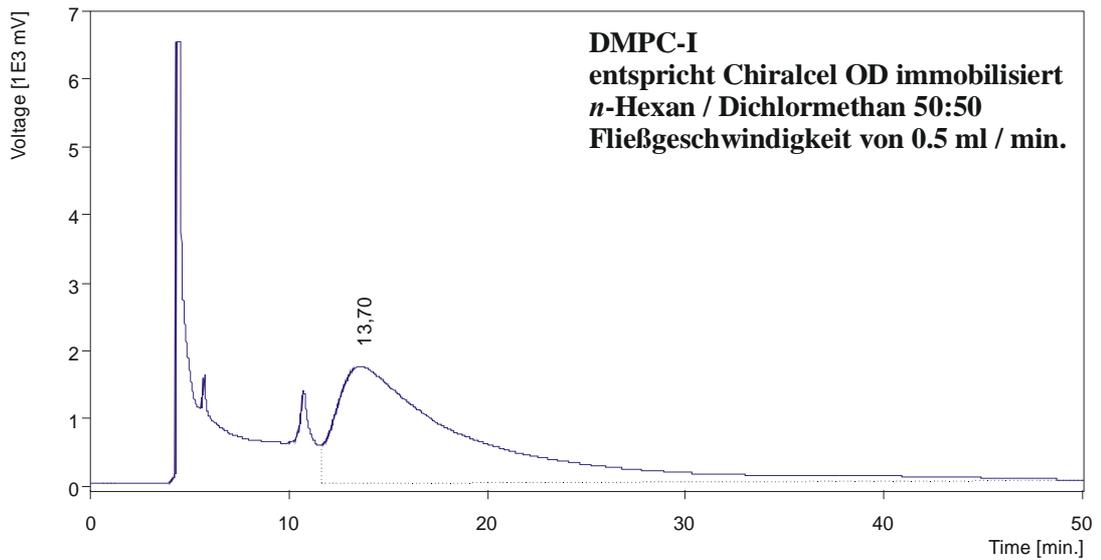


Abb. 104: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

4. Spezieller theoretischer Teil

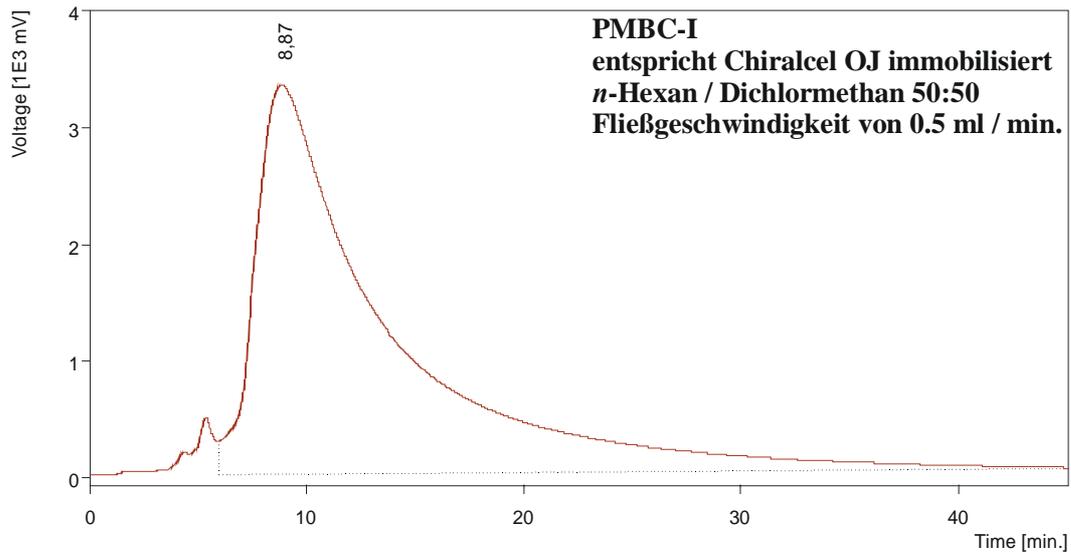


Abb. 105: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der PMBC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

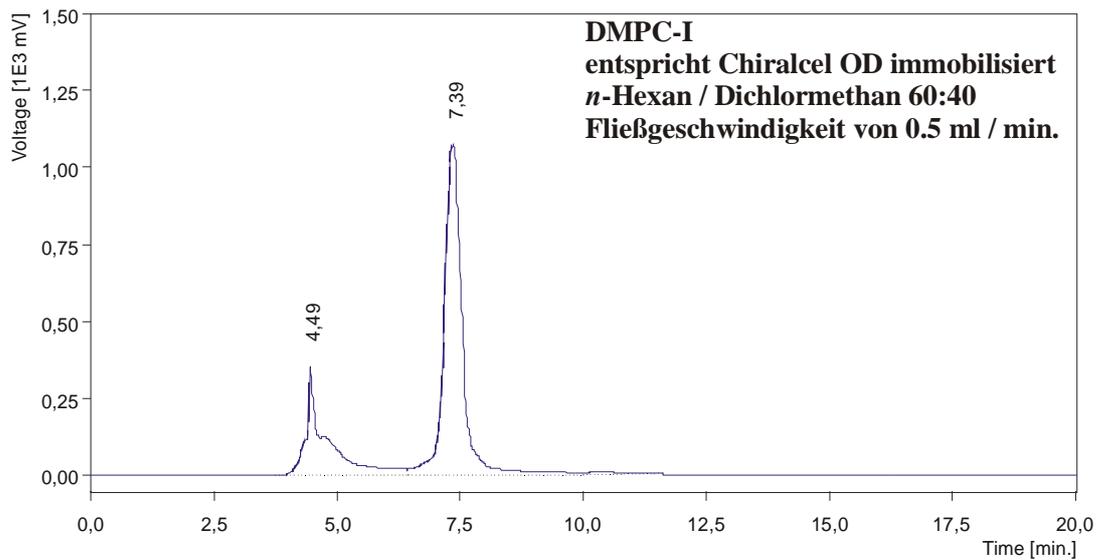


Abb. 106: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 60:40 als mobile Phase auf der DMPC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

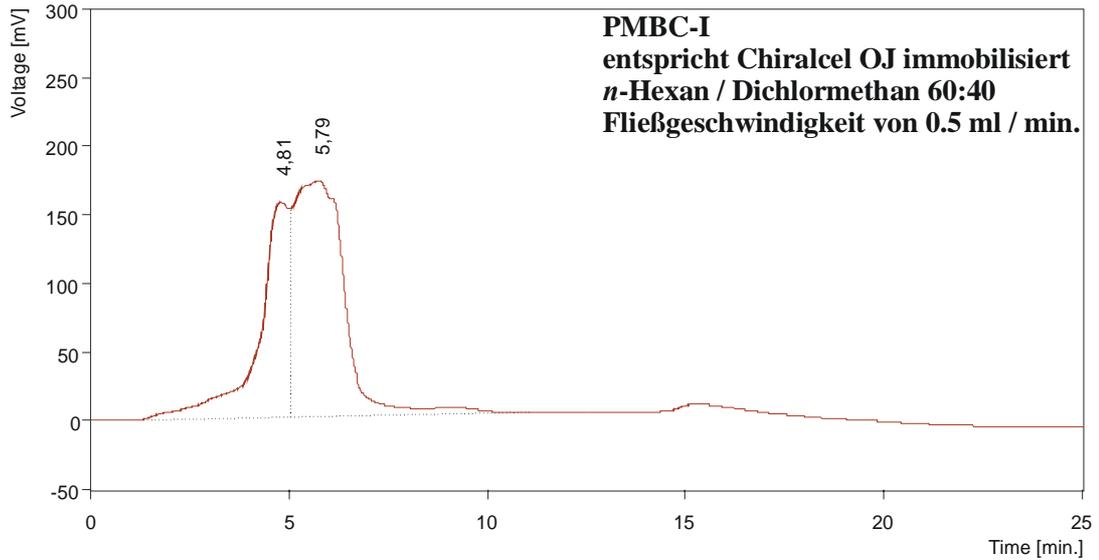


Abb. 107: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 60:40 als mobile Phase auf der PMBC-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

2) DMPA-I und PECA-I

Durch den Wechsel auf die chiralen Säulen DMPA-I und PECA-I konnte eine Enantiomerentrennung erreicht werden. Mit dem Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis 40:60 zeigte sich bereits der Beginn einer Antrennung durch eine kleine Schultervorwölbung (Abb. 108 und 109).

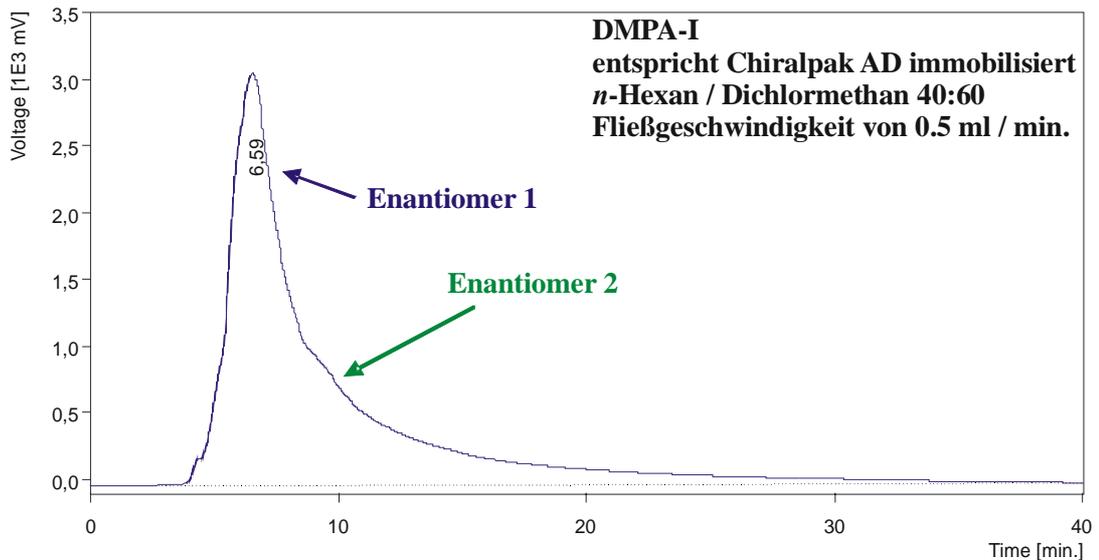


Abb. 108: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 40:60 als mobile Phase auf der DMPA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

4. Spezieller theoretischer Teil

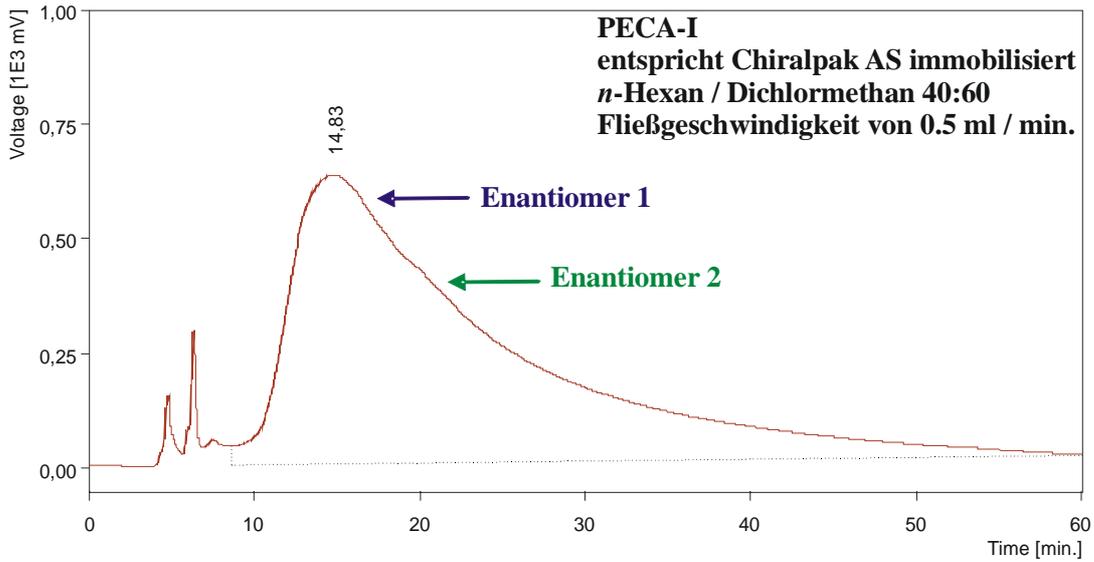


Abb. 109: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 40:60 als mobile Phase auf der PECA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Durch die Erhöhung des *n*-Hexan-Anteils bei gleichzeitiger Reduzierung des Dichlormethan-Anteils konnte die Trennleistung weiter verbessert werden. So wurde bei einem Laufmittelgemisch von *n*-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis von 50:50 eine Antrennung erreicht. In den beiden folgenden Chromatogrammen von den Säulen DMPA-I und PECA-I ist diese Antrennung dargestellt (Abb. 110 und 111).

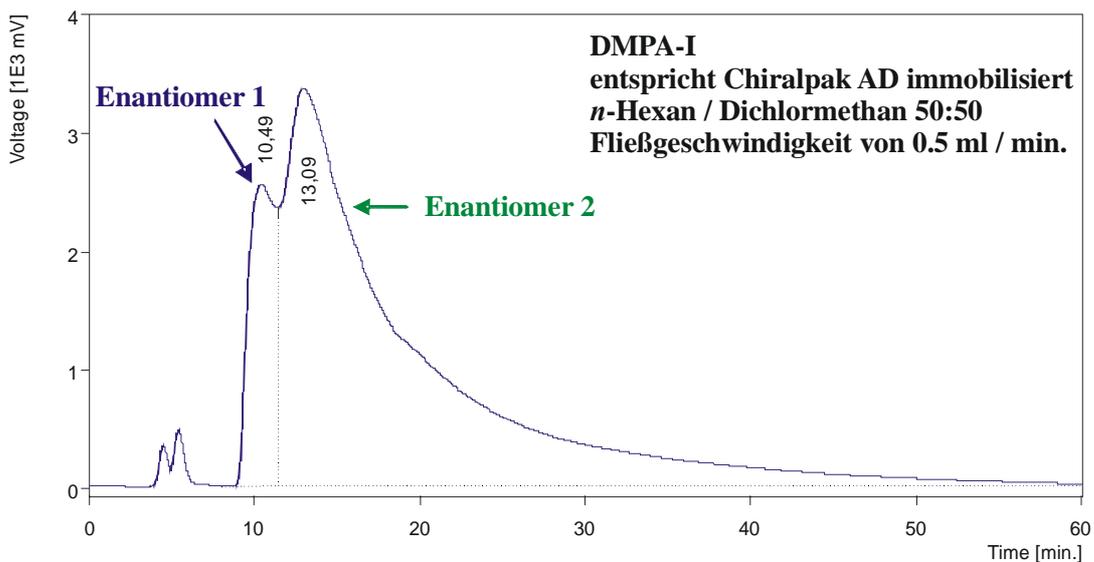


Abb. 110: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der DMPA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

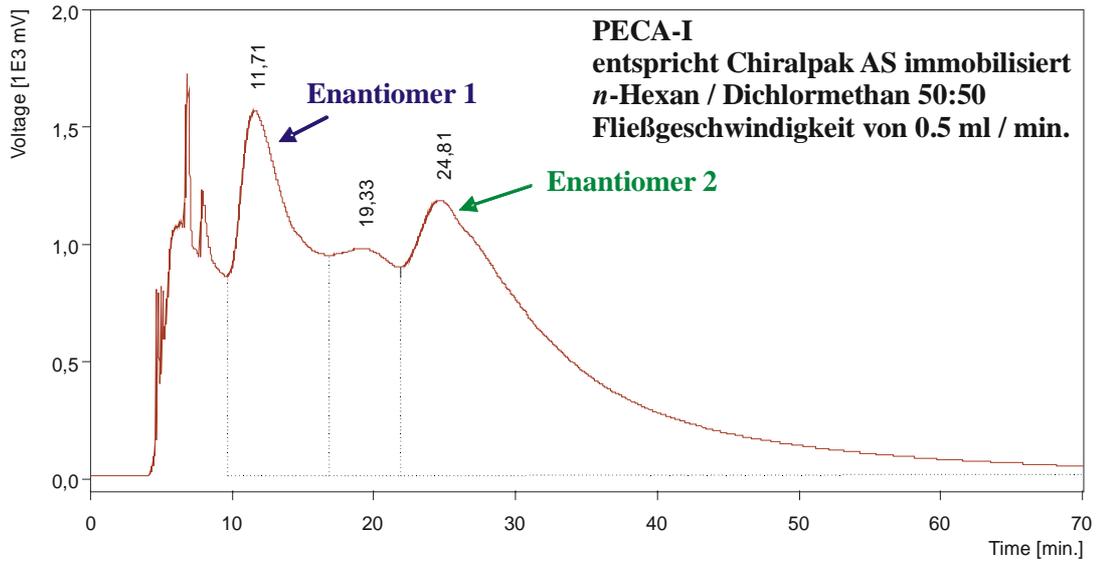


Abb. 111: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der PECA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Eine kontinuierliche Steigerung des prozentualen Anteils von *n*-Hexan und bei entsprechender Verminderung von Dichlormethan konnte die Enantiomerentrennung weiter optimiert werden. Abbildung 112 und 113 zeigen die Trennung in die beiden Enantiomere mit der Laufmittelzusammensetzung *n*-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis von 60:40.

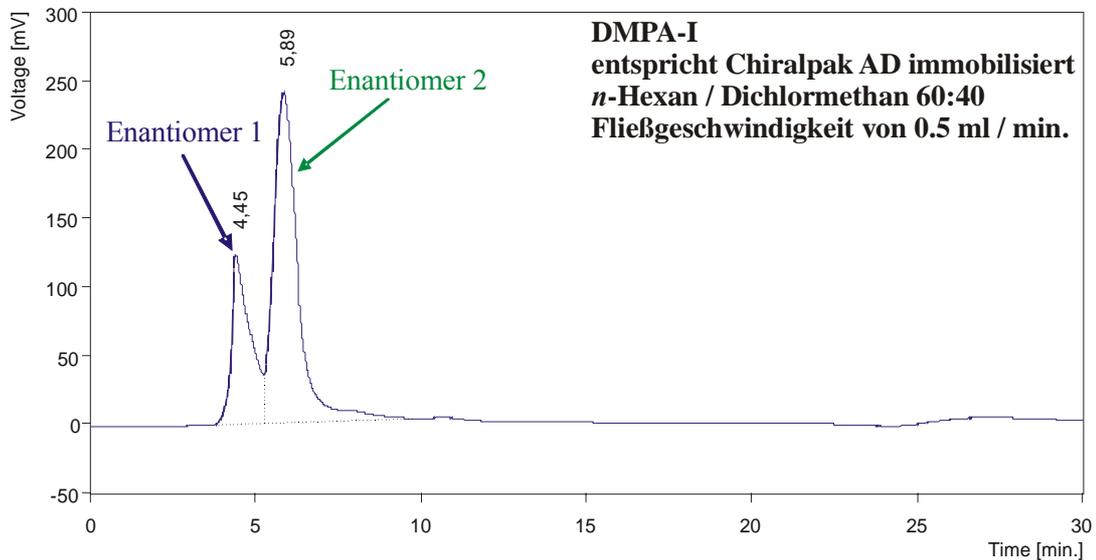


Abb. 112: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 60:40 als mobile Phase auf der DMPA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

4. Spezieller theoretischer Teil

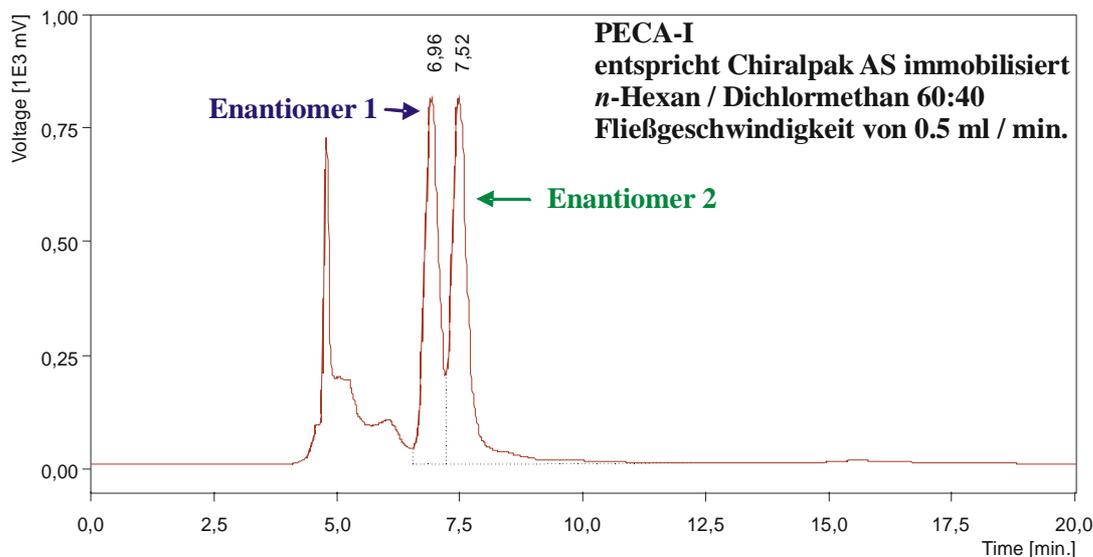


Abb. 113: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 60:40 als mobile Phase auf der PECA-I Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

3) Chiralpak[®] IA

Der Einsatz der kommerziell erhältlichen chiralen Säule Chiralpak[®] IA wirkte sich günstig auf die Enantiomertrennung aus. Auch bei dieser Säule, wie schon bei den beiden oben beschriebenen Säulen DMPA-I und PECA-I, wurde die Trennleistung durch Variation des Laufmittelgemisches optimiert. Eine Steigerung des prozentualen *n*-Hexan-Anteils verbesserte die Trenneigenschaften von Chiralpak[®] IA bei dem verwendeten Bromyl-Knotan. Wie in Abbildung 114 dargestellt wird eine Trennung in die Enantiomere bereits mit dem Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis 40:60 erhalten.

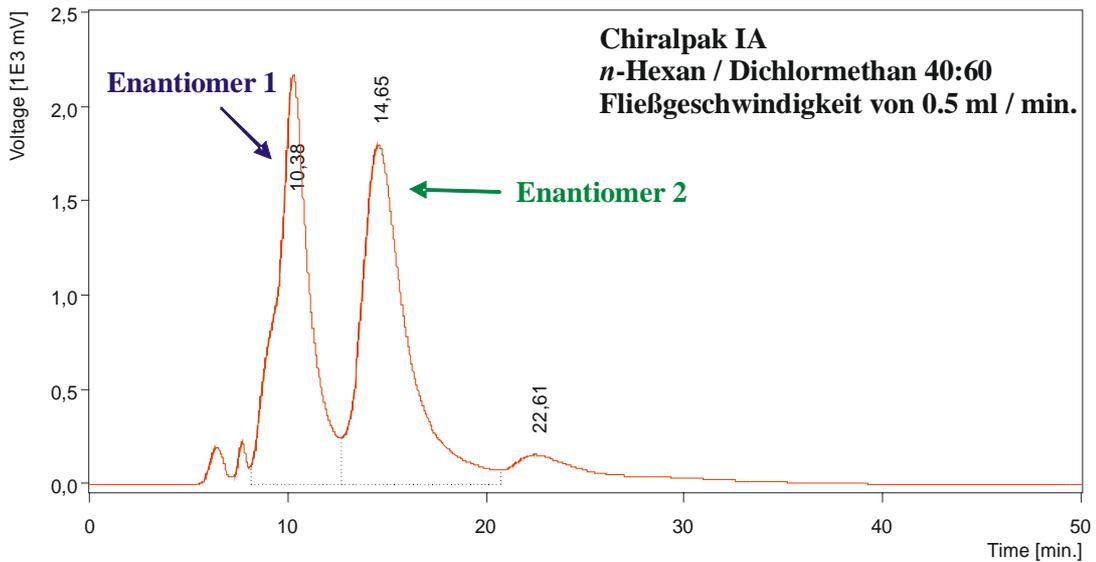


Abb. 114: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 40:60 als mobile Phase auf der Chiralpak[®]IA Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Die Trennleistung konnte mit dem Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis 50:50 weiter verbessert werden, da dadurch eine Basislinien- Trennung erzielt werden konnte (siehe Abb. 115).

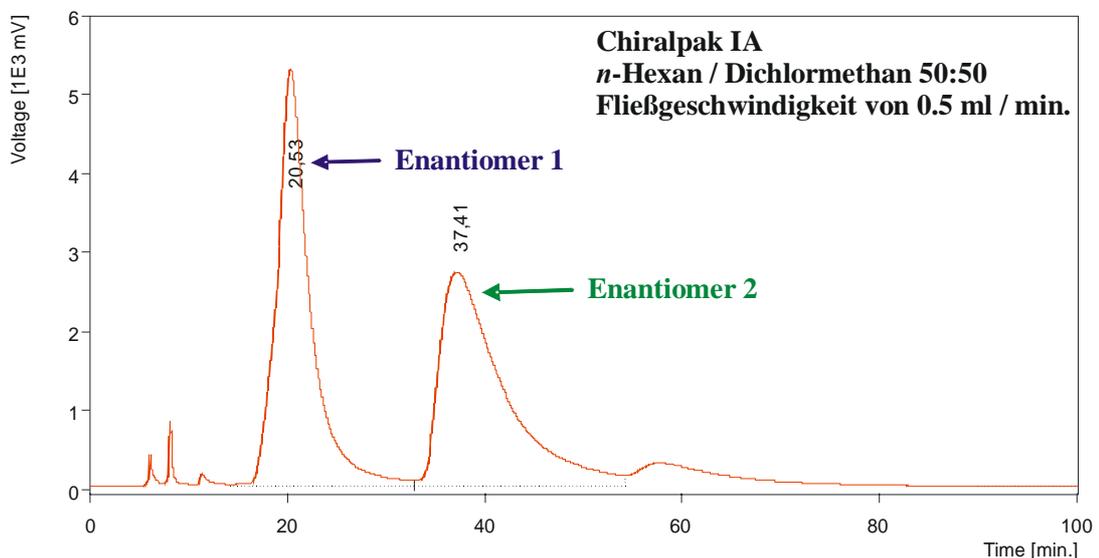


Abb. 115: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit *n*-Hexan /Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der Chiralpak[®]IA Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Bei einer weiteren Erhöhung des *n*-Hexan-Anteils sowie Verringerung des Dichlormethan-Anteils im Laufmittelgemisch wurde keine Verbesserung erreicht. Das Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis 60:40 wirkt sich eher nachteilig auf die Enantiomeren-trennung aus.

4. Spezieller theoretischer Teil

So kann zeigt Abbildung 116 eine Verschlechterung der Trennleistung.

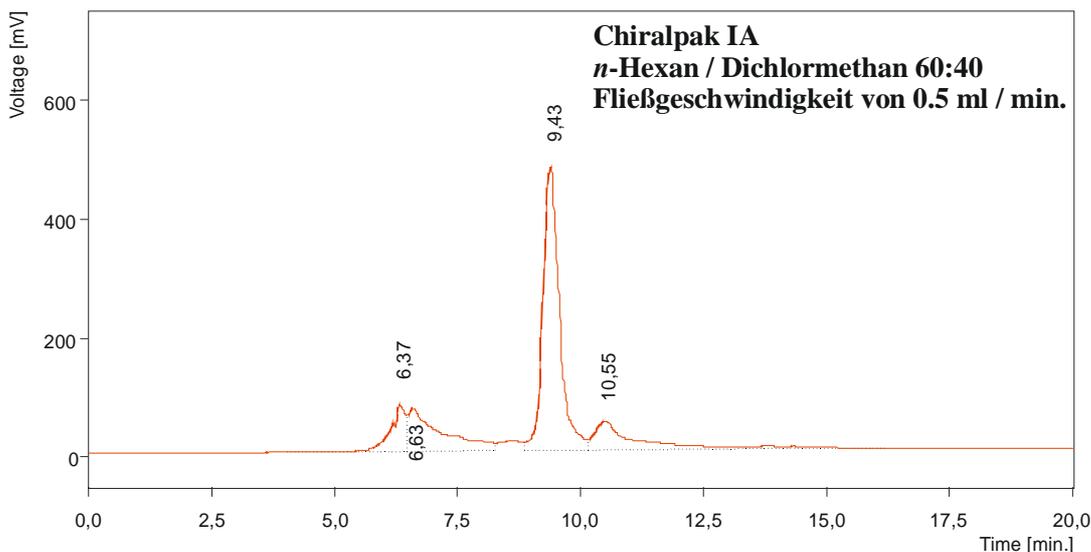


Abb. 116: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans 27 mit n-Hexan /Dichlormethan 60:40 als mobile Phase auf der Chiralpak[®] IA Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

Von dieser Säule, Chiralpak[®] IA, wurde ein ähnliches säulenchromatographisches Trennungsverhalten erwartet wie von den beiden immobilisierten chiralen Säulen DMPA-I und PEKA-I. Beim Vergleich der Abbildungen 108 bis 116 kann eine ähnliche Trennleistung dieser drei Säulen bestätigt werden.

e) Enantiomeren-Trennung des offenen Kleeblatt-Knotans 45

Knotane des Amid-Typs bilden sich unter “Selbstdurchfädung” und “Selbstverknötung” mit Hilfe des Templateffektes in einer Eintopf-Synthese. Den Mechanismus dieser Knotan-Bildung versuchen *Vögtle* et al. aufzuklären, indem der Eintopf-Synthese (Abb.117) als zusätzliche Komponente ein Stopper **44** zugegeben wurde, um die verschlungene Struktur zu terminieren (Abb.118). *Bitter* aus dem Arbeitskreis *Vögtle* synthetisierte auf diesem Wege das offene Knotan **45**.

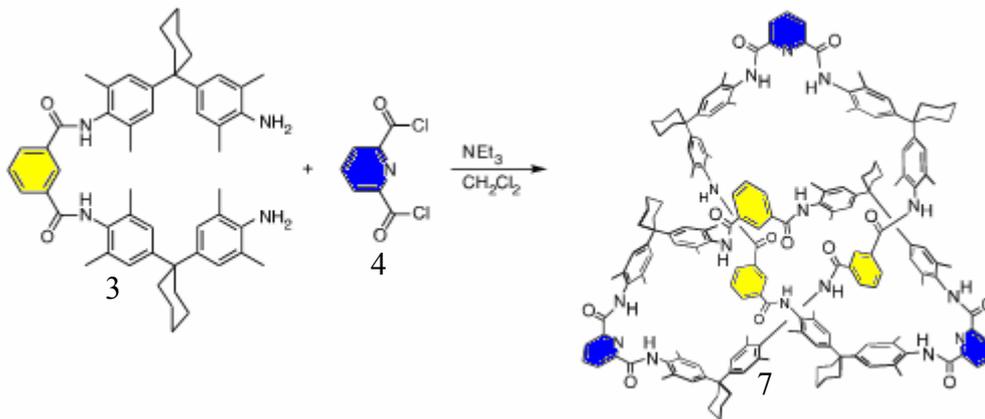


Abb. 117: Synthese des ersten Amid-Knotens 7 nach Vögtle

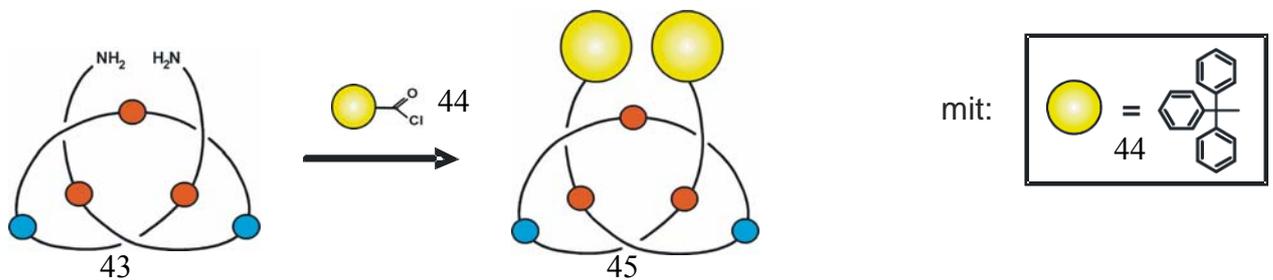


Abb. 118: Synthese des offenen Knotans mit Stoppfern

Um zu zeigen, dass sich das offene Knotan **45** gebildet hat, wird eine Enantiomeren-Separation mit Hilfe der HPLC vorgenommen (Abb. 119).

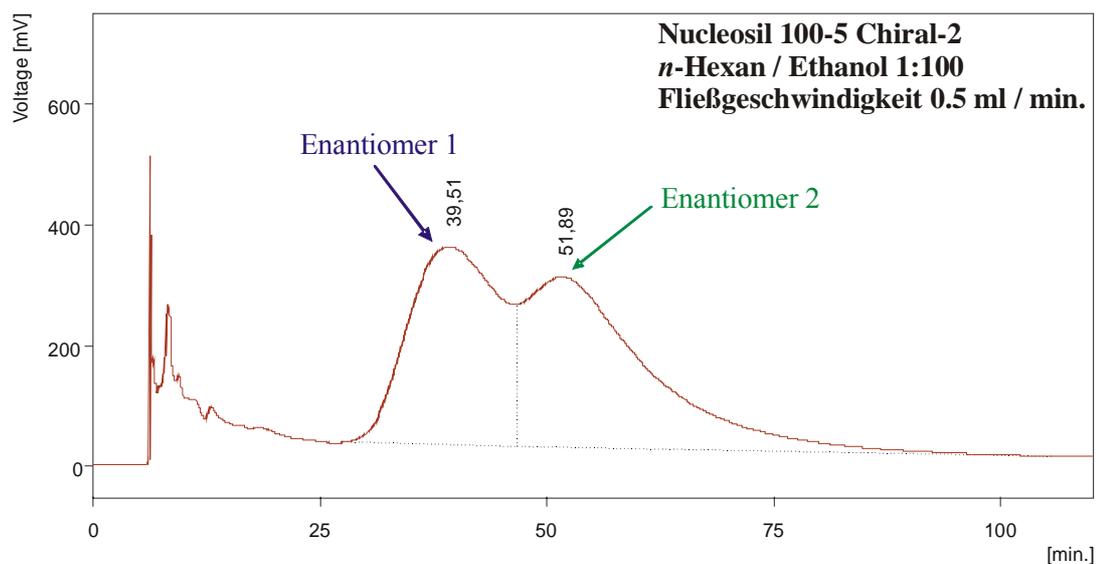


Abb. 119: Enantiomeren-Trennung des offenen Knotans **45** mit *n*-Hexan / Ethanol 1:100 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule, einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.

4. Spezieller theoretischer Teil

Dies erfolgte auf der chiralen Säule Nucleosil 100-5 Chiral-2 und einem Laufmittelgemisch *n*-Hexan / Ethanol im Verhältnis 1:100 sowie mit einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml pro Minute. Anschließend wurden die Fraktionen der teilweise getrennten Probe geschnitten und die Enantiomertrennung durch die identischen spiegelbildlichen Circular dichroismogramme belegt (Abb. 123).

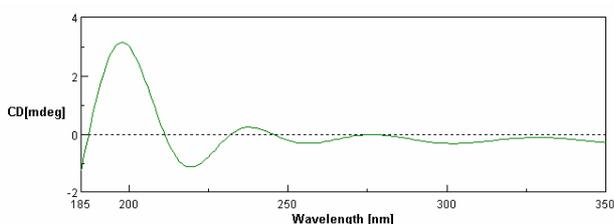


Abbildung 121: CD-Spektrum des offenen Knotans 45 vom Enantiomer 1

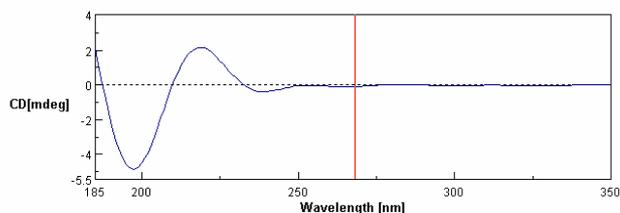


Abbildung 122: CD-Spektrum des offenen Knotans 45 vom Enantiomer

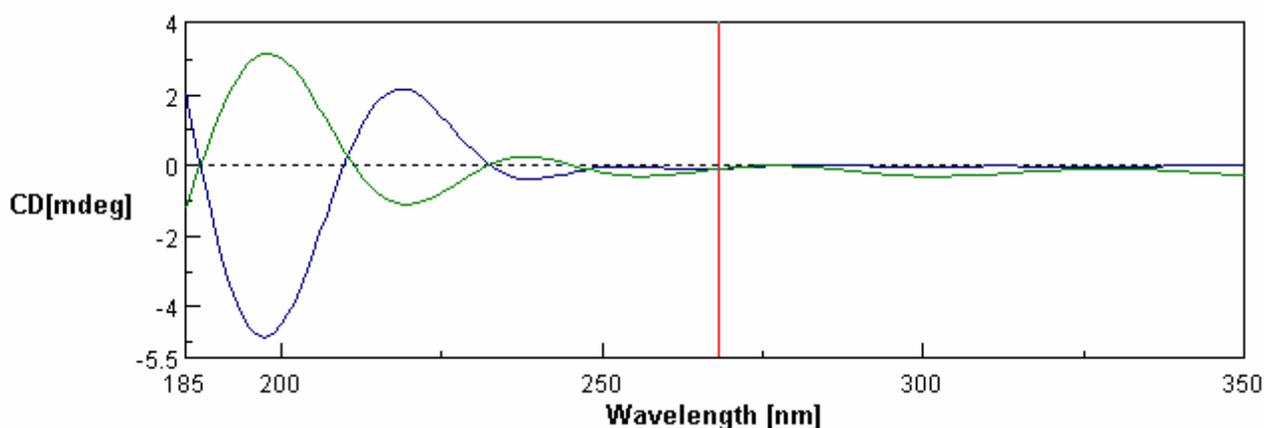


Abbildung 123: Übereinandergelegte CD-Spektren (Abb. 121, 122) des offenen Knotans 45 von Enantiomer 1 und 2

Bei dieser Synthese-Methode bildet sich nicht nur das offene Knotan **45**, sondern auch das geschlossene Knotan **7**, der Kleeblatt-Knoten (Abb. 124).

Die Enantiomeren-Trennung gelang mit der chiralen Säule Chiralpak[®]IA (Abb. 125). Das verwendete Laufmittelgemisch bestand aus *n*-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis 50:50 und einer Fließgeschwindigkeit von 0.3 ml pro Minute.

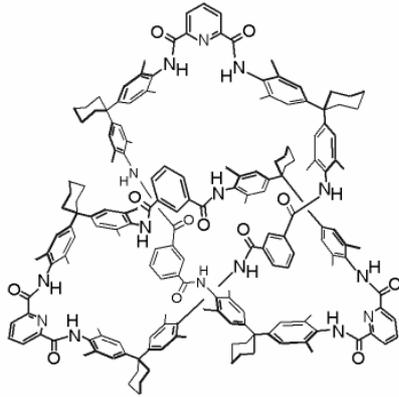


Abb. 124: Struktur des Kleeblatt-Knotens 7

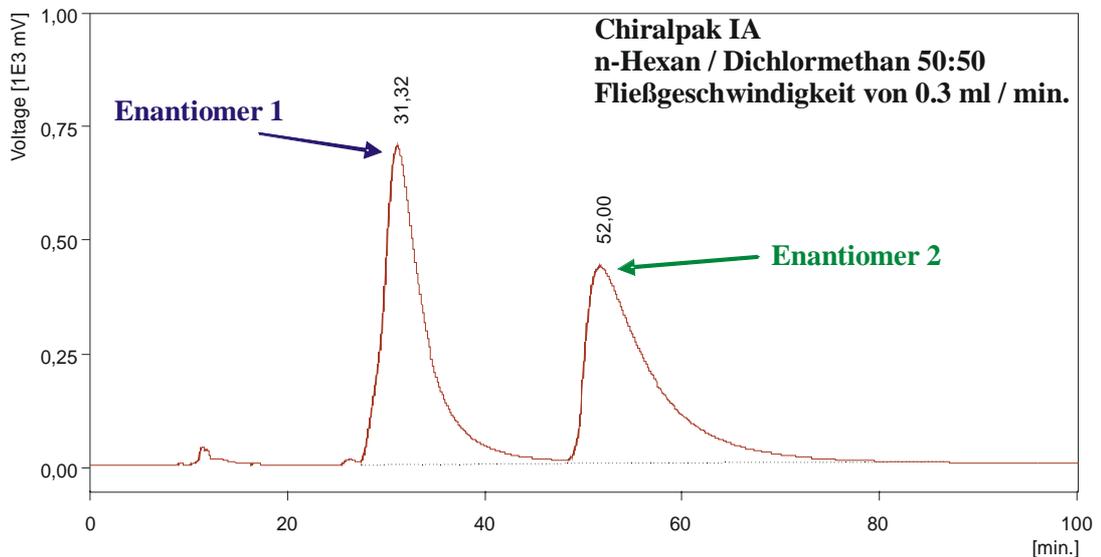


Abb. 125: Enantiomeren-Trennung des Kleeblatt-Knotens 7 mit *n*-Hexan / Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der Chiralpak IA Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.3 ml / min.

Okamoto et al. trennte den racemischen Kleeblatt-Knoten in seine Enantiomere an einer nicht kommerziell erhältlichen Chiralpak[®] AD Säule mit der Laufmittelzusammensetzung *n*-Hexan / Chloroform / 2-Propanol im Verhältnis 60:40:1 ^[199]. Dieses, von *Okamoto* entwickelte Säulenmaterial, ist kovalent an einen Silicagelträger gebunden, ebenso die chirale immobilisierte Säule Chiralpak[®] IA. Da die beiden Säulenmaterialien sich ähneln und mit chlorierten Lösungsmitteln betrieben werden können, wurde mit der Säule Chiralpak[®] IA eine Basislinien-Trennung erreicht.

f) Enantiomeren-Trennung des Kleeblatt-Knotans 7

Knotane des Amid-Typs bilden sich bei einer Einstufen-Synthese, in der ein vorgefertigter verlängerter Amidbaustein **3** mit dem Pyridindicarbonsäuredichlorid **4** unter Verdünnungsbedingungen reagiert (Abb. 126). Aus Röntgenstrukturen vom Kleeblatt-Knoten ^[172,210] und weiteren experimentellen und theoretischen Daten kann eine spezifische Faltung abgeleitet des linearen Faden-Vorläufers abgeleitet werden. Diese Faltung kommt aufgrund günstiger Wasserstoffbrücken-Bindungen in einem nicht-kompetitiven Lösungsmittel, z.B. Dichlormethan, zustande.

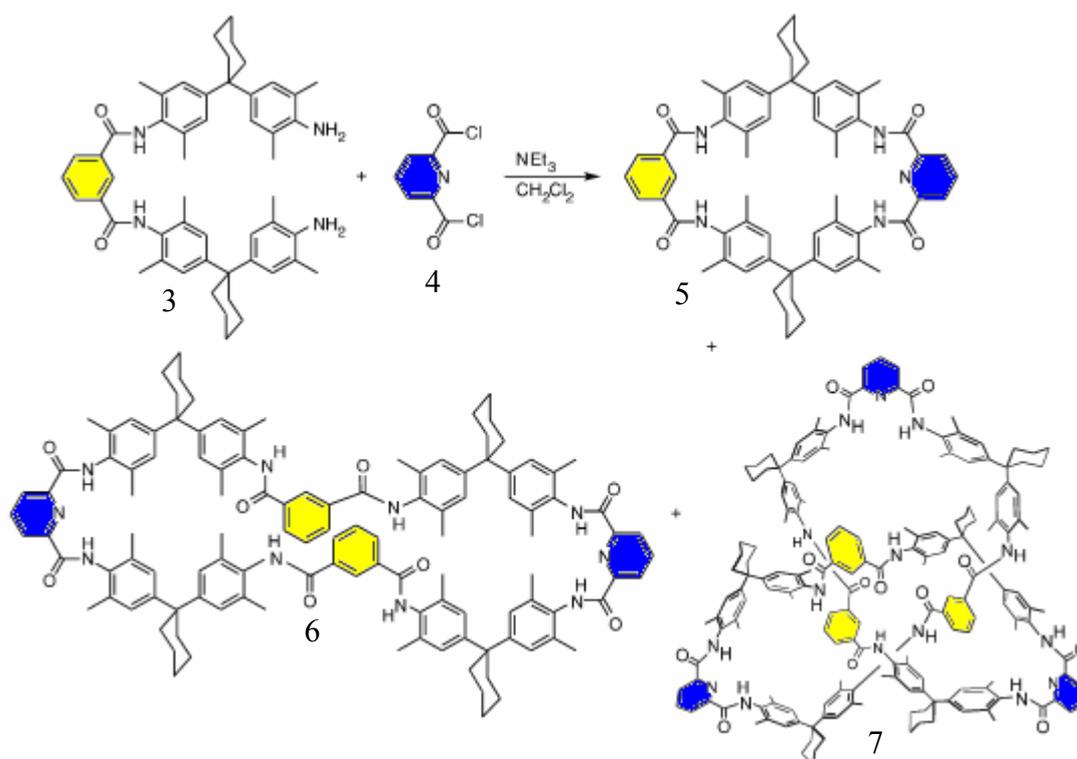


Abb. 126: Einstufen-Synthese des ersten Kleeblattknotens mit zwölf Amid-Bindungen 7 nach Vögtle et al.^[15]. Als weitere Produkte der Reaktion entstehen ein dimerer 5 und ein tetramerer Macrocyclus 6.

Lineare Oligoamide können, ähnlich wie Proteine, eine große Zahl stabiler gefalteter Konformationen einnehmen und dies führt bei dem Bildungs-Mechanismus von Knotanen zu mehreren mechanistischen Alternativen. Hierbei werden die beiden Bildungs-Modelle a) und b) aus Abbildung 127 bevorzugt. Bei der Syntheseroute a) wird zunächst ein linearer Decaamid-Fadens **46** (Abb. 127) aus drei Einheiten vom verlängerten Amidbaustein **3** (Abb. 126) und zwei Einheiten vom Pyridindicarbonsäuredichlorid **4** (Abb.126) synthetisiert.

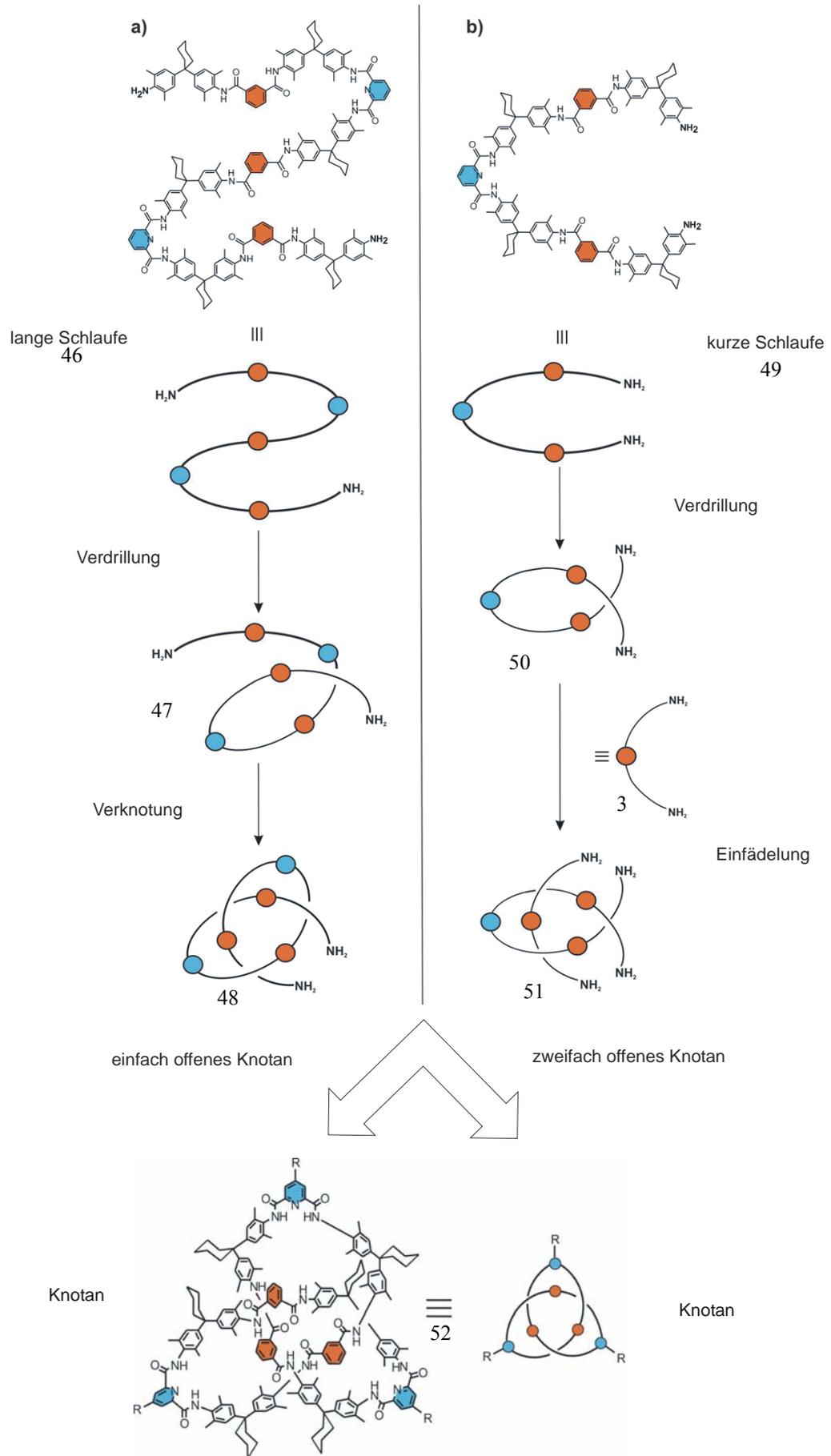


Abb. 125: Die zwei vermuteten Wege des Templat-Mechanismus zum Knotan

4. Spezieller theoretischer Teil

Anschließend faltet sich der entstandene Decaamid-Faden **46** zu einer helikalen Schleife **47** (Abb. 127), mit einer Selbstdurchfädung des restlichen Fadenteils durch diese Schleife und bildet den offenen Knoten **48**. Mit einer Einheit des Pyridindicarbonsäuredichlorid **4** (Abb.126) kann nun mit den terminalen Aminogruppen des offenen Knotens **48** (Abb.127) reagieren, so dass der geschlossene Knoten **52** entsteht. Die zweite Möglichkeit b) der Knotenbildung besteht in einer Wirt-Gast-Komplexierung zwischen dem kurzen Faden **49**, einem Hexaamid (Abb. 127), und einer Einheit des verlängerten Amidbausteins **3**. Durch die Reaktion mit zwei Einheiten des Pyridindicarbonsäuredichlorid **4** (Abb.126) kann zweifach offene Knotens **51** (Abb.127) geschlossen werden (Knoten **52**).

Brüggemann aus dem Arbeitskreis *Vögtle* synthetisierte den Kleeblatt-Knoten auf ähnlichem Wege wie *Bitter* (siehe Kapitel e) Enantiomeren-Trennung des offenen Kleeblatt-Knotens). Er verwendete anstatt Stopper die Schutzgruppen-Technik für die Herstellung des offenen Knotens. Hierbei stellte sich die Frage, ob eine Verknotung **53** oder ein langer Faden **54** vorliegt (Abb.128).

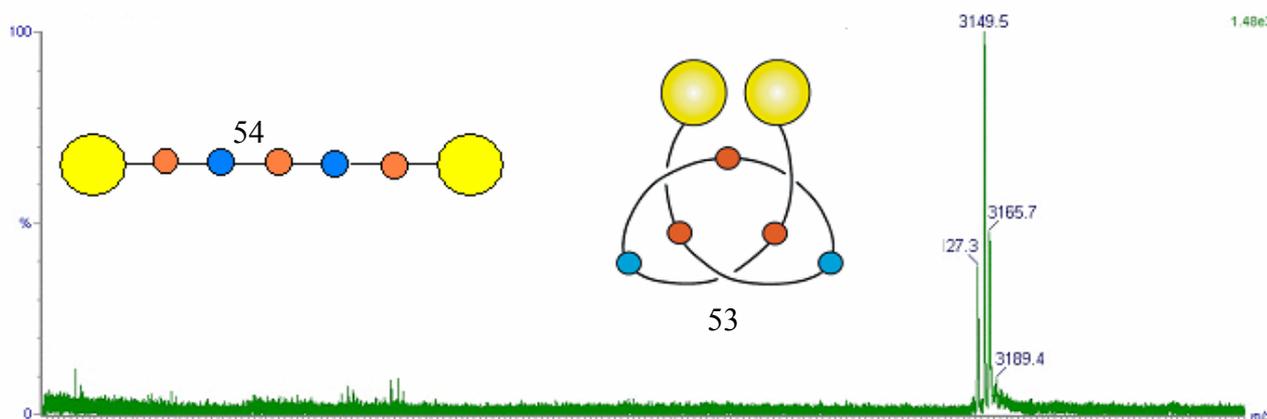


Abb. 128: MALDI-TOF-Spektrum des offenen Knotens oder Fadens

Dazu wurde im letzten Synthese-Schritt das offene Knoten **53** bzw. der Faden **44** geschlossen. Liegt ein Faden vor wird durch die Ringschließung ein nicht-chiraler Reif erhalten, während beim chiralen offenen Knoten ein racemisches Gemisch des geschlossenen Knotens **7** entsteht. Schon das offene Knoten liegt in seinen beiden Enantiomeren vor, wie bei *Bitter* festgestellt werden konnte (Abb.119). Durch die Endpunkt-Verknüpfung des offenen Knotens **45** erfolgt kann mit Hilfe der HPLC eine Aufspaltung in die beiden Enantiomere erfolgen.

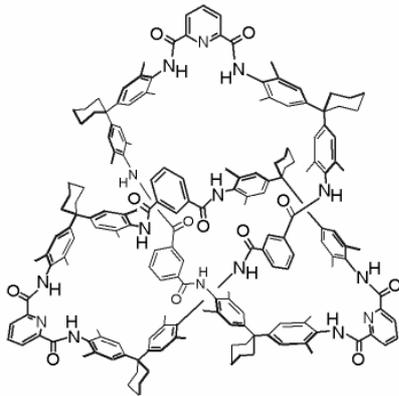


Abb. 129: Struktur des Kleeblatt-Knotens 7

Hierzu wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie bei der Enantiomeren-Trennung des Kleeblatt-Knotens bei *Bitter*, d.h. auf der chiralen Säule Chiralpak IA mit dem Laufmittelgemisch n-Hexan / Dichlormethan im Verhältnis 50:50 und der Fließgeschwindigkeit von 0.3 ml pro Minute. Abbildung 130 zeigt dieselbe Trenneigenschaften der Substanz, die auch bei dem Kleeblatt-Knoten von *Bitter* (Abb. 125) erhalten wurden.

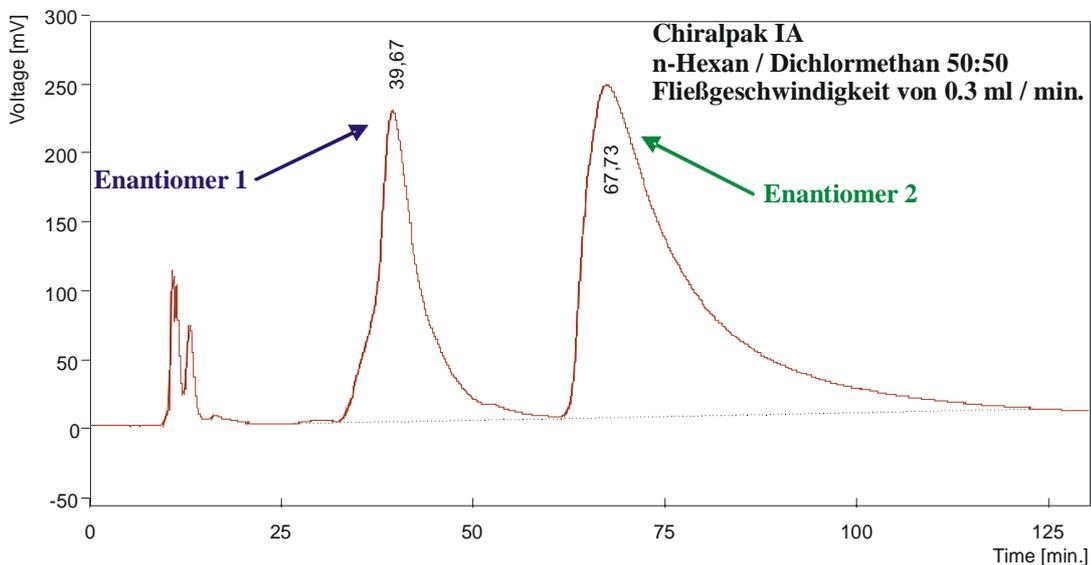


Abb. 130: Enantiomeren-Trennung des Kleeblatt-Knotens 7 mit n-Hexan / Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der Chiralpak IA Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.3 ml / min.

Um noch eine Bestätigung der Trennung zu erhalten, wurden die getrennten Enantiomer-Fractionen dieser Substanz mittels CD-Spektroskopie untersucht.

4. Spezieller theoretischer Teil

In Abbildung 133 sind die beiden identischen spiegelbildlichen Enantiomere zu erkennen, was ein Indiz auf eine chirale Substanz ist.

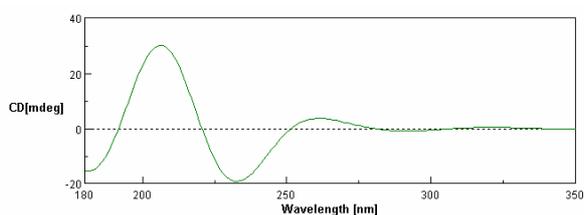


Abbildung 131: CD-Spektrum des Kleeblatt-Knotans 7 vom Enantiomer 1

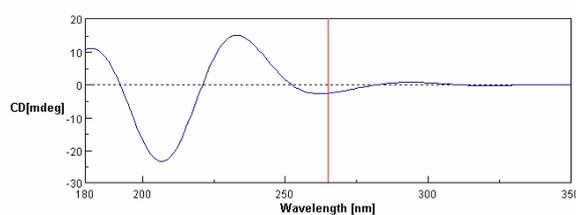


Abbildung 132: CD-Spektrum des Kleeblatt-Knotans 7 vom Enantiomer

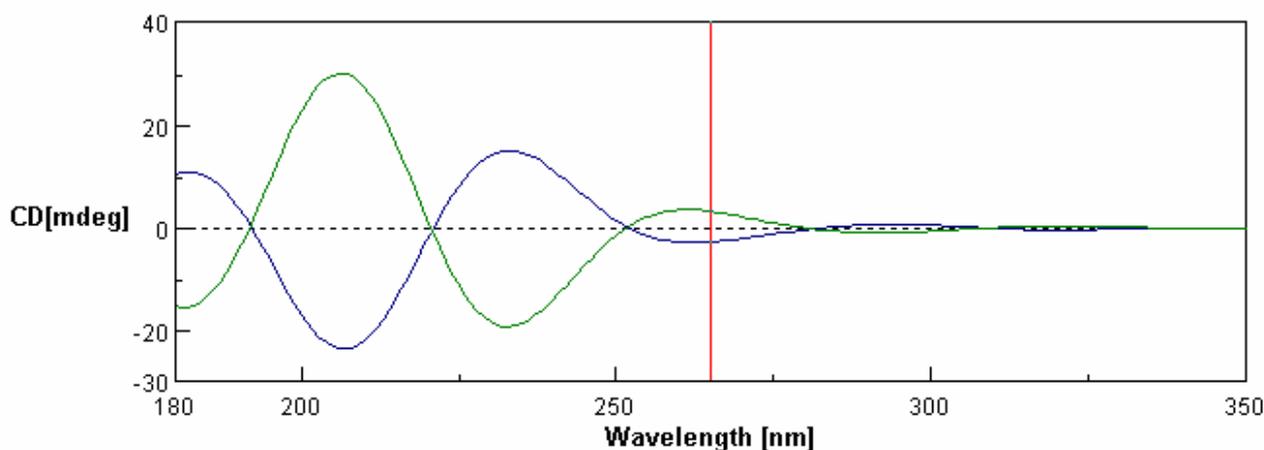


Abbildung 133: Überinandergelagerte CD-Spektren (Abb. 131, 132) des Kleeblatt-Knotans 7 von Enantiomer 1 und 2

g) Reinigung von neuartigen Dendrimeren

Dendrimere, die mit der konvergenten Methode synthetisiert werden, können aufgrund ihrer abweichenden Molekulargewichte meistens mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (Größenausschlussverfahren) getrennt werden ^[211]. Bei der divergenten Synthese von Dendrimeren entstehen durch „kleine“ Strukturdefekte Dendrimere, die sich kaum in ihren molekularen Massen unterscheiden und fast gleiche physikalischen Eigenschaften zeigen. So ist z.B. das Laufverhalten dieser Substanzen ähnlich, wodurch sie mit der üblichen Säulenchromatographie nicht voneinander getrennt werden können.

1) Trennung der POPAM-Dendrimere: Octasulfonimide 57 - 59

Bei der divergenten Synthese zu den Octasulfonimido-Dendrimeren **57** – **64** reagiert das kommerziell erhältlichen Poly(propylenimin)-Dendrimer **55** (einem POPAM-Dendrimer) mit einem hohen Überschuss an Tosylchlorid **56** in Acetonitril und in Gegenwart von Cäsiumcarbonat zu einem Gemisch aus Sulfonimiden (Abb. 134) ^[16,20]. *Fahrnavabi* aus dem Arbeitskreis *Vögtle* stellte hierbei fest, dass das Produkt **64** aus einem bereits im POPAM-Dendrimer vorliegenden Strukturdefekt (Verunreinigung) resultiert. Die Produkt **57** bis **60** konnten nur gemeinsam isoliert werden und daher sollte mittels HPLC das Produkt **57** von den drei Nebenprodukten getrennt werden.

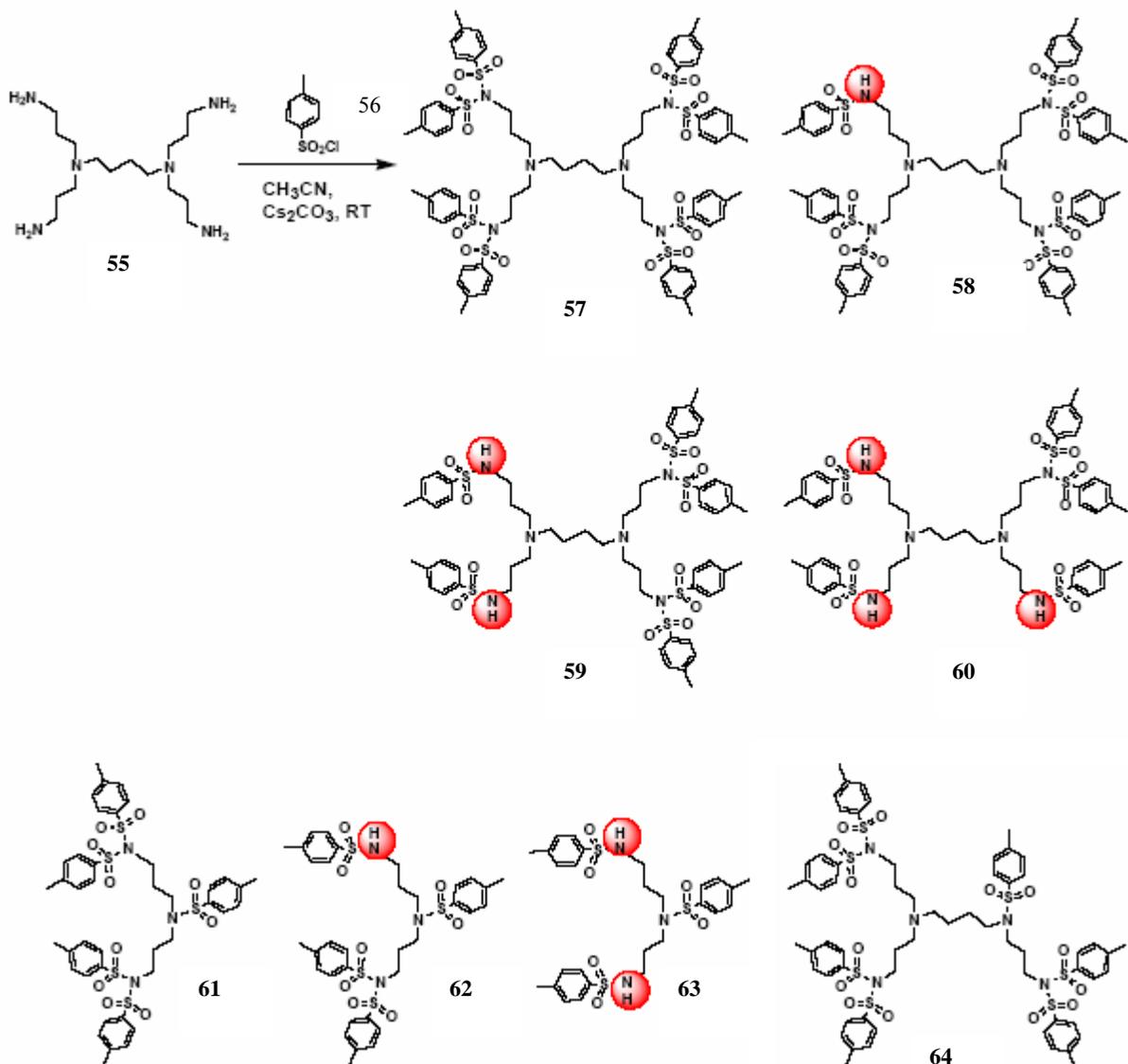


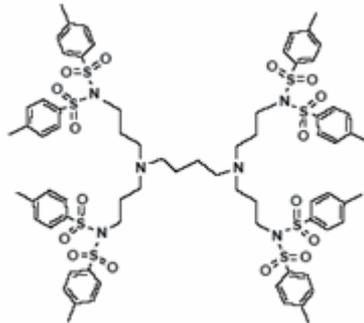
Abb. 134: Divergente Synthese des Octasulfonimido-Dendrimers. Das kommerziell erhältlichen Poly(propylenimin)-Dendrimer (einem POPAM-Dendrimer) reagiert mit einem hohen Überschuss an Tosylchlorid in Acetonitril und in Gegenwart von Cäsiumcarbonat zu einem Gemisch aus Sulfonimiden.

4. Spezieller theoretischer Teil

Die Trennung der vier Substanzen:

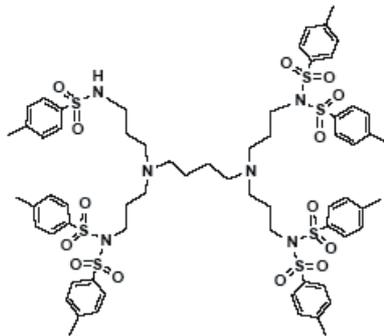
Produkt: *N,N,N',N'*-Tetrakis(3-(4-methylbenzensulfonimido)propyl)-1,4-diaminobutan

57

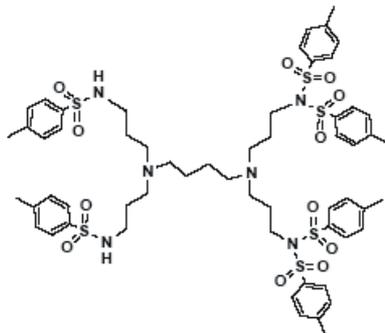


drei Nebenprodukte:

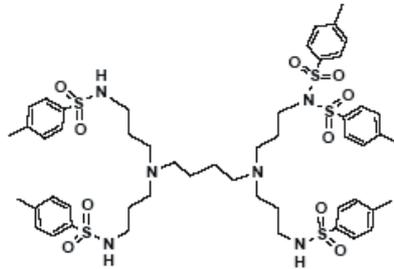
- *N*-(3-(4-methylbenzensulfonamido)-propyl)-*N,N',N'*-tris(4-methylbenzensulfonimido)-propyl-1,4-diaminobutan **58**



- *N,N*-(3-(4-methylbenzenesulfonamido)-propyl)-*N',N'*-bis(4-methylbenzenesulfonimido)propyl-1,4-diaminobutan **59**



- *N,N,N'*-(3-(4-methyl-benzensulfonamido)propyl)-*N'*-(4-methylbenzensulfon-imido)propyl-1,4-diaminobutan **60**



gelang auf der Kromasil-Säule 100 Sil 5 μm mit dem Laufmittelgemisch Diethylether / 2-Propanol im Verhältnis 1:100 und einer Fließgeschwindigkeit von 1.5 ml pro Minute (Abb. 135). Eine weitere Optimierung der Bedingungen durch Ausschöpfung aller Möglichkeiten, wie die Variation des Laufmittelgemisches und der Fließgeschwindigkeit, konnte nicht erreicht werden. So verbessert sich bei einer weiteren Verringerung der Fließgeschwindigkeit die Trennung, jedoch die Retentionszeit würde verlängern werden und eine Bandenverbreiterung würde auftreten. Nachteilig bei der Bandenverbreiterung ist die verminderte Trennleistung der Säule. Die Ursache liegt an einer niedrigen Strömungsgeschwindigkeit, die zu einer Vergrößerung der Längsdiffusion beträgt^[67], d.h. bei einer mit kleinen Teilchen ($< 10 \mu\text{m}$) gepackten Säule verringert sich die Zahl der theoretischen Trennstufen. Wie aus der Abbildungen 133 hervorgeht, ist die Reinigung oder Trennung der Dendrimere mit den zur Verfügung stehenden Säule möglich, jedoch nicht optimal. Es kam zu keiner Basislinien-Trennung und daher mussten die nicht vollständig in Fraktionen getrennten Signale geschnitten werden.

4. Spezieller theoretischer Teil

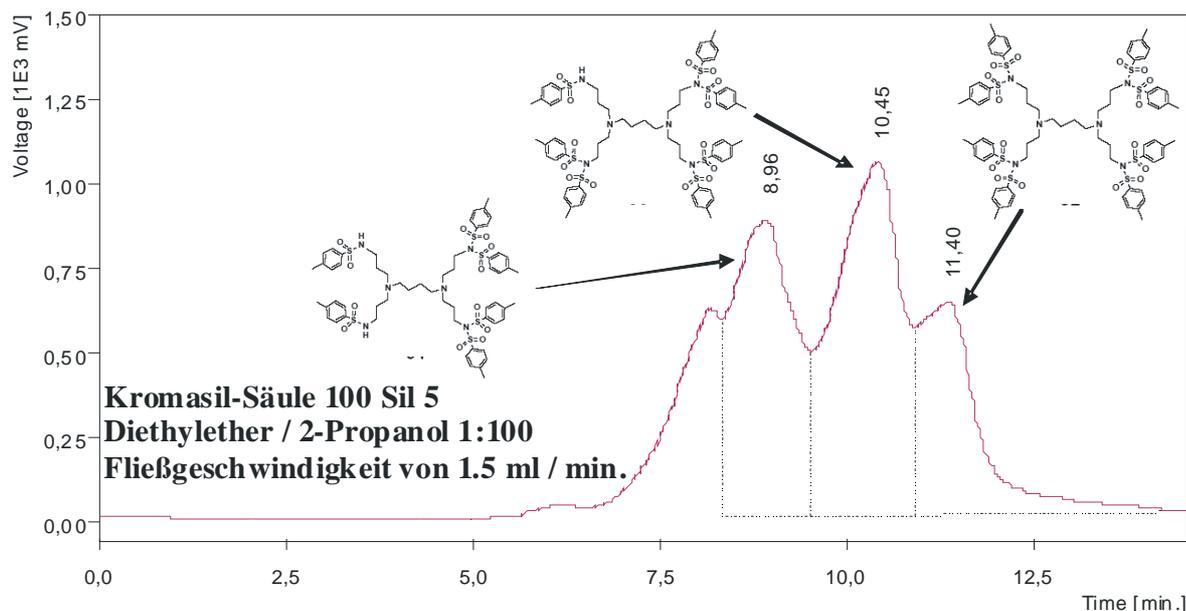


Abb. 135: Trennung des POPAM-Dendrimere: Octasulfonimide 57 - 59 mit Diethylether / 2-Propanol 1:100 als mobile Phase auf der Kromasil 100 Sil 5 μm Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 1.5 ml / min.

2) Reinigung des PAMAM-Dansyl-Dendrimers: Octasulfonamid 65

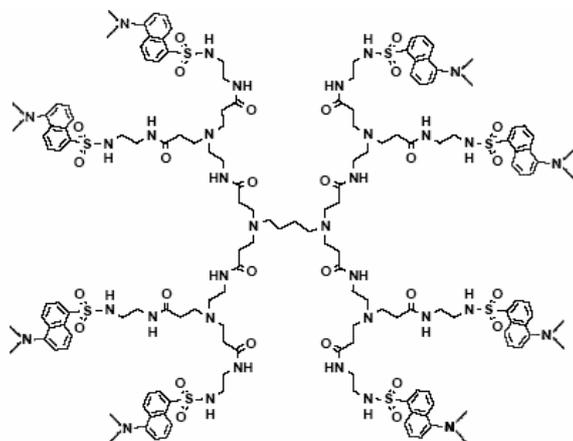


Abb. 136: Struktur des PAMAM-Dansyl-Dendrimers: Octasulfonamid 65

Das Octasulfonimid-PAMAM-Dendrimer **65** (Abb. 136) wurde von *Friedhofen* aus dem Arbeitskreis *Vögtle* auf ähnlichen Wege synthetisiert wie das POPAM-Dendrimer (siehe Abschnitt oben 1) Trennung der POPAM-Dendrimere: Octasulfonimid **57 - 59**)^[20], daher wurde von dieser Substanz ein ähnliches säulenchromatographisches Verhalten angenommen. Verwendet wurde für die Trennung, die schon bei dem POPAM-Dendrimer mit Erfolg eingesetzten Kromasil 100 Sil 5 μm Säule unter den gleichen Bedingungen.

D.h. die Reinigung sollte mit dem Laufmittelgemisch 2-Propanol / Diethylether im Verhältnis 100:1 sowie einer Fließgeschwindigkeit von 1.0 ml pro Minute erfolgen. Wie in Abbildung 137 dargestellt ist, konnte das PAMAM-Dendrimere **65** der ersten Generation mit Hilfe der HPLC nicht gereinigt werden

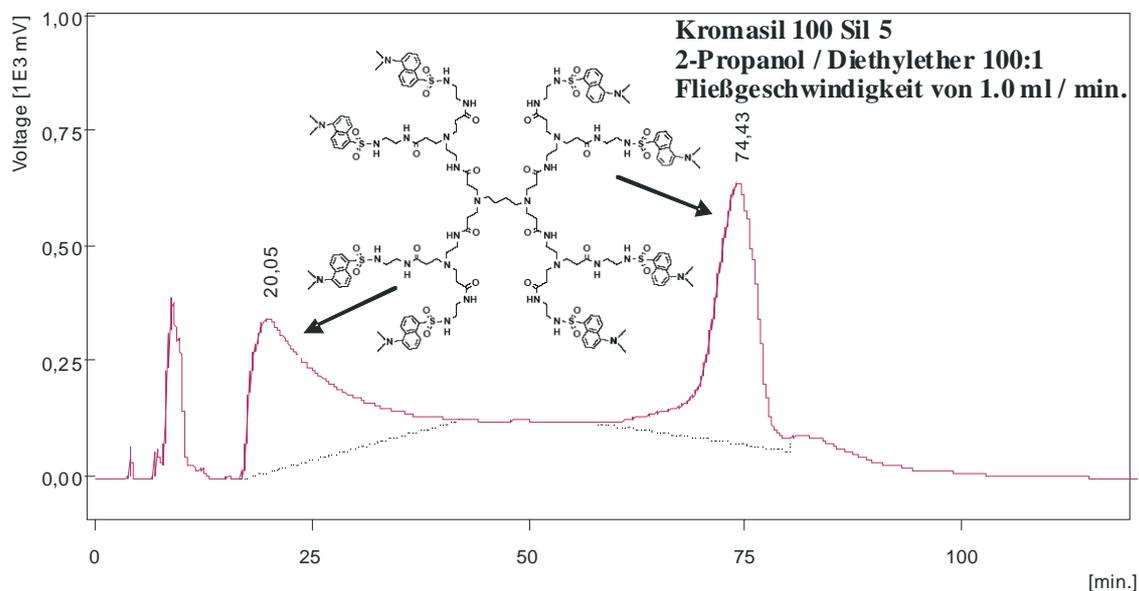


Abb. 137: Trennung des PAMAM-Dendrimers: Octasulfonamid **65 mit Diethylether / 2-Propanol 100:1 als mobile Phase auf der Kromasil 100 Sil 5 μ m Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 1.0 ml / min.**

Auch eine Variation der vorhandenen Möglichkeiten (Fließgeschwindigkeit, Zusammensetzung des Laufmittelgemisches oder Verwendung einer anderen stationären Phase) wirkte sich nicht weiter günstig auf die Trennung aus. Bei dieser Substanz zeigte sich, dass eine Reinigung von Dendrimeren, die durch eine divergente Synthese synthetisiert wurden, nicht immer möglich ist. So besitzen die bei einem Syntheseansatz entstehenden Dendrimere keine identische Molmasse, es liegt also kein monodisperses Produkt vor. Dadurch kommt es zu einer hohen Anzahl von Dendrimeren mit „kleinen“ Strukturdefekten, deren physikalischen Eigenschaften sich ähneln und wodurch wird ihre Trennung bzw. Reinigung über HPLC problematisch ist.

3) Reinigung des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers der 2. Generation **66**

Das zweikernige Bis-Cyclam-Aza-Dendrimer **66** (Abb.138) besteht aus zwei dendrylierten Cyclam-Derivaten, welche über eine Aza-Gruppe, miteinander verbunden sind, wobei zuerst das Cyclam mit Naphthalen-funktionalisierten Fréchet-Dendrons umgesetzt wurde.

4. Spezieller theoretischer Teil

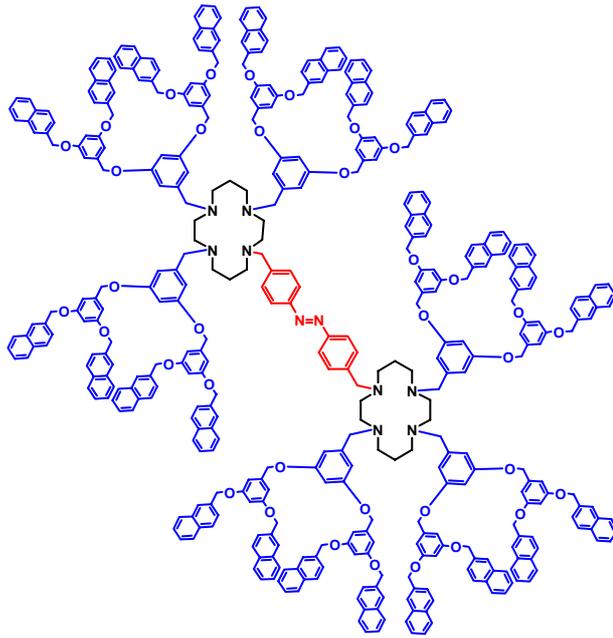


Abb. 138: Struktur des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers 66

Synthetisiert wurde diese Molekül von *van Heijst* aus dem Arbeitskreis *Vögtle* und um dieses Molekül von den bei der Synthese anfallenden Nebenprodukten abzutrennen wurde die chiralen, immobilisierten Säule Chiralpak[®] IA, dem Laufmittelgemisch n-Hexan / Methanol / Dichlormethan im Verhältnis 1:1:7 und einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml pro Minute verwendet (Abb. 139).

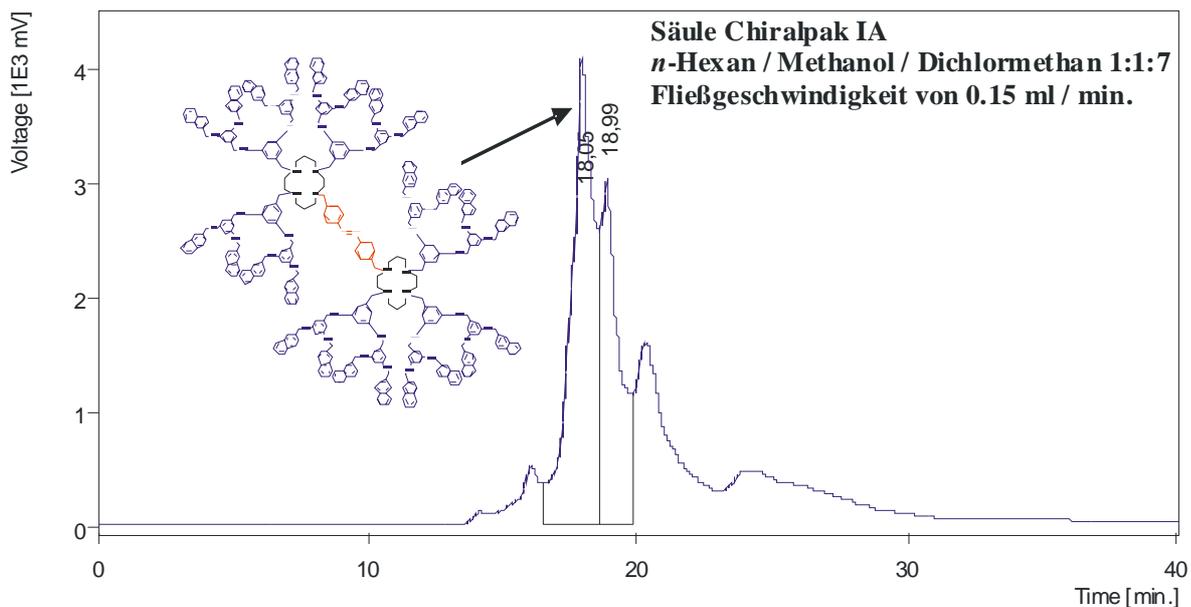


Abb. 139: Trennung des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers 66 mit n-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:7 als mobile Phase auf der Chiralpak[®] IA und einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml / min.

Das in Abbildung 139 dargestellte Chromatogramm zeigt nur eine Antrennung des Substanzgemisches. Auch bei Ausschöpfung aller vorhandenen Möglichkeiten (Säulenwechsel oder Zusammensetzung des Laufmittelgemisches oder Fließgeschwindigkeit), könnte eine weitere Optimierung der Trennung nicht erzielt werden. So wurde um ein optimales Mischungsverhältnis zu finden der prozentuale Anteil von *n*-Hexan bei 50 % gehalten und entweder der Anteil von Methanol oder Dichlormethan kontinuierlich erhöht. Jedoch führte eine weitere Steigerung sowohl des Anteils von Methanol als auch von Dichlormethan bei der mobilen Phase zu einer Erhöhung der Viskosität (z.B. η_2 -Propanol = 2.3 mPa · s). Somit wurde ebenfalls Betriebsdruckes der Säule größer und stieg auf über 90 bar an [67]. Die Säule Chiralpak[®] IA darf, wie die Säulen Chiralcel[®] OD und Chiralpak[®] AD, nicht mit einem Druck von über 50 bar betrieben werden, weil dadurch irreversible Schäden am Säulenmaterial entstehen. Eine Verringerung der Fließgeschwindigkeit war in diesem Fall auch nicht möglich, da diese zu einer Bandenverbreiterung führte (Abb. 140). Hierbei liegt die Ursache bei der niedrigen Strömungsgeschwindigkeit, die zu einer Vergrößerung der Längsdiffusion führt und somit zu einer Verringerung der Zahl an theoretischen Trennstufen (verminderte Trennleistung).

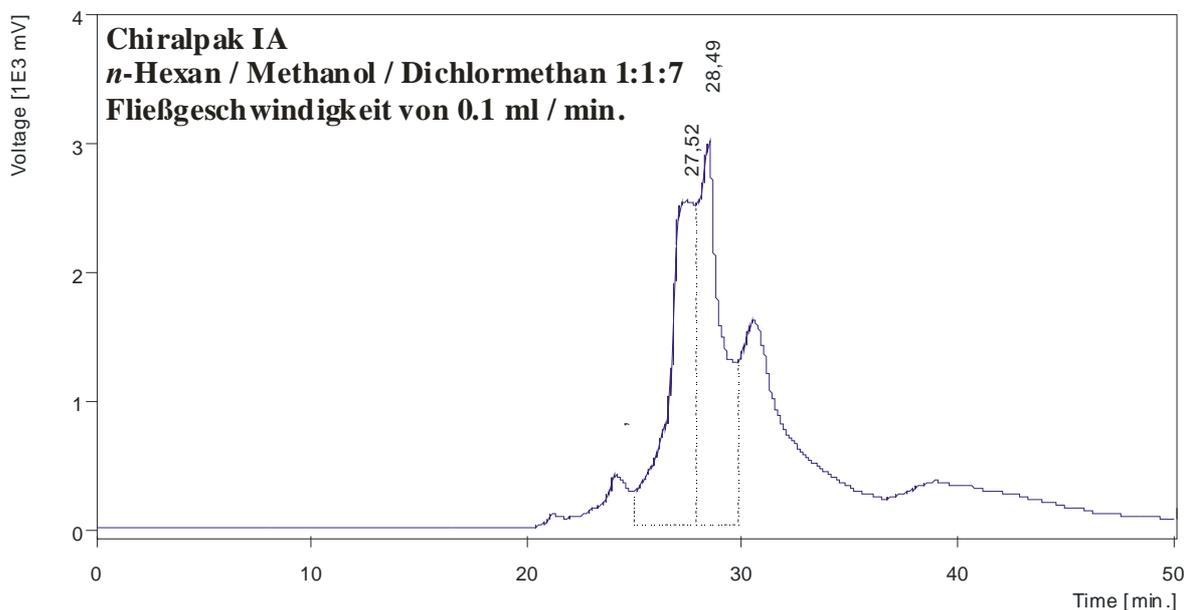


Abb. 140: Trennung des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers 66 mit *n*-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:7 als mobile Phase auf der Chiralpak[®] IA und einer Fließgeschwindigkeit von 0.1 ml / min.

Jedoch konnte durch schneiden der nicht vollständig getrennten Fraktions-Peaks genug Substanz gesammelt werden, um ein FT-IR-Spektrum aufzunehmen zu (Abb. 141).

4. Spezieller theoretischer Teil

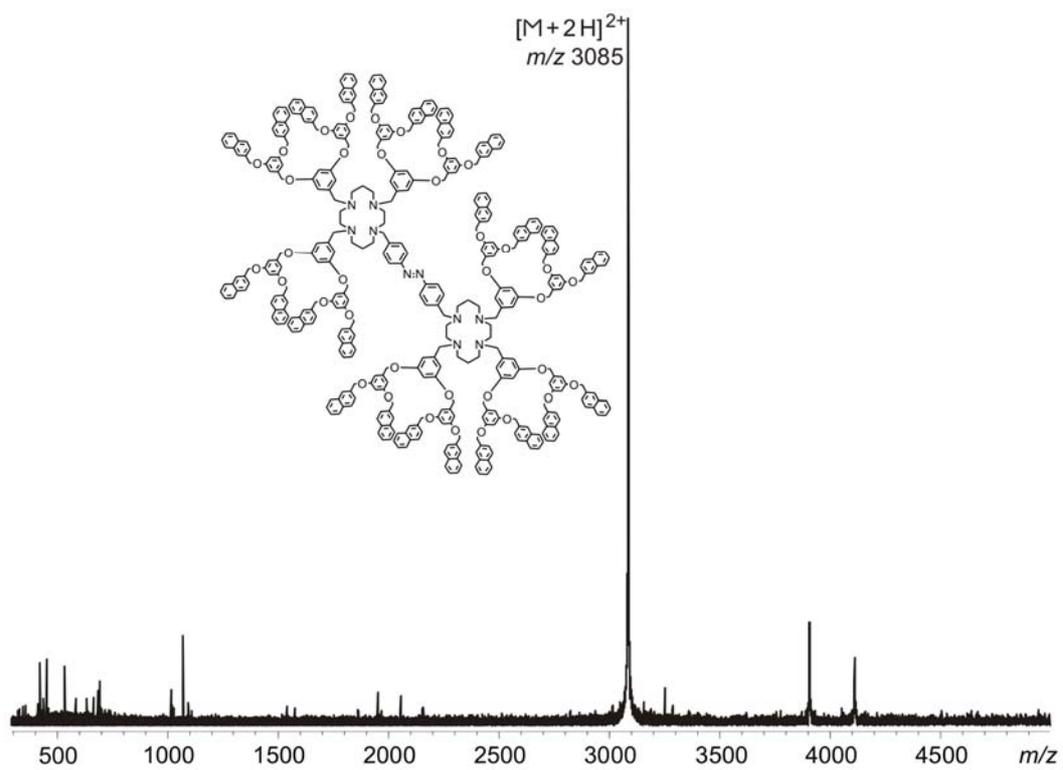


Abb. 141: FTCR-Massenspektrum des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers 66

5. Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Arbeit wurde die Trennungen von verschiedenen Knotane in ihre Enantiomere und die Reinigung einiger Dendrimere mittels HPLC experimentell untersucht. Anhand der vorliegenden Messergebnisse konnte die Trennung verschiedener Knotane in ihre Enantiomere und die Reinigung einiger Dendrimere gezeigt werden. Die erfolgreiche chirale Auftrennung des Bromyl-Knotans **27** (Abb. 142) sowie des chiralen Knotans **28** (Abb. 143) in ihre Enantiomere wurde mittels der CD-Spektroskopie nachgewiesen.

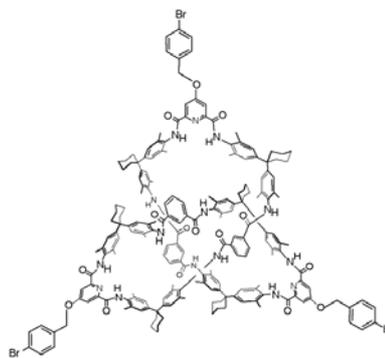
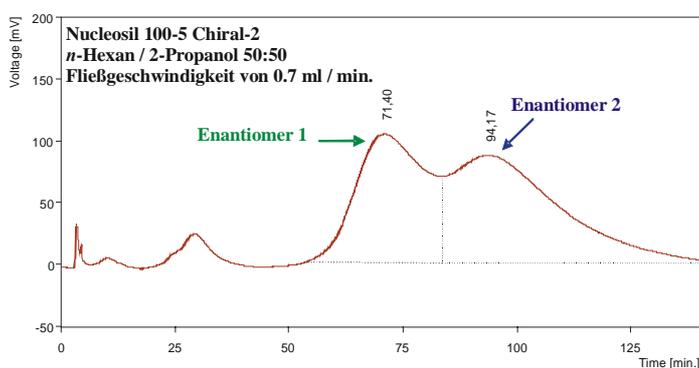


Abb. 142: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Knotans **27** mit *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.7 ml / min.

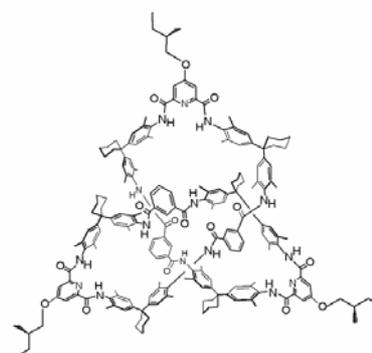
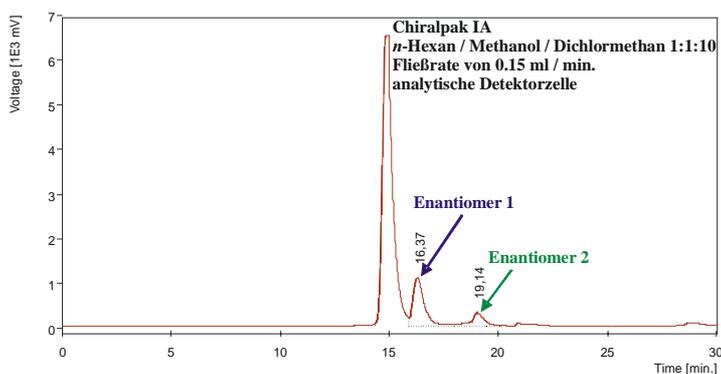


Abb. 143: Enantiomeren-Trennung des chiralen Knotans **28** mit *n*-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:10 als mobile Phase auf der Chiralpak IA Säule, einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml / min. und einer analytischen Detektorzelle

5. Zusammenfassung

Ein Indiz für die Chiralität des Bromyl-Octamers **32** konnte ermittelt werden (Abb. 144) und durch Circular dichroismen bestätigt werden. Jedoch ob eine Verknotung des Octamers **32** vorliegt, konnte noch nicht bestätigt werden, da ein „offenes Octamer“ unter Umständen ebenfalls chiral sein könnte (z.B. durch Faltung des Octamer-Fadens über Wasserstoffbrückenbindungen). Zudem scheint sich bei der Synthese nicht nur das Octamer **32** zu bilden, sondern auch Reife und Catenane. Dies kann aufgrund Peaks bei niedrigen Retentionszeiten im des Chromatogramms (Abb. 144) geschlossen werden. Hierfür muss die Substanz noch weiter untersucht werden.

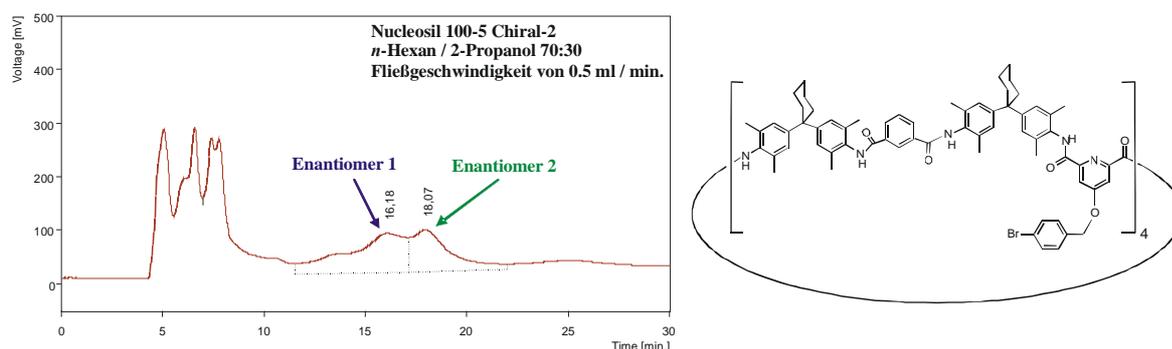


Abb. 144: Enantiomeren-Trennung des Bromyl-Octamers **32 mit n-Hexan / 2-Propanol 70:30 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-6 Chiral-2 Säule, und einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.**

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit die Fragestellung bezüglich des angenommenen Mechanismus einer Knotanbildung überprüft werden. Der offene gestoppte Knoten **45**, welcher sich durch Faltung eines Decamid-Fadens zu einer helikalen Schleife mit einer anschließenden Selbstdurchfädung des restlichen Fadenteils durch diese Schleife bildet, konnte in seine Enantiomere getrennt werden (Abb. 145).

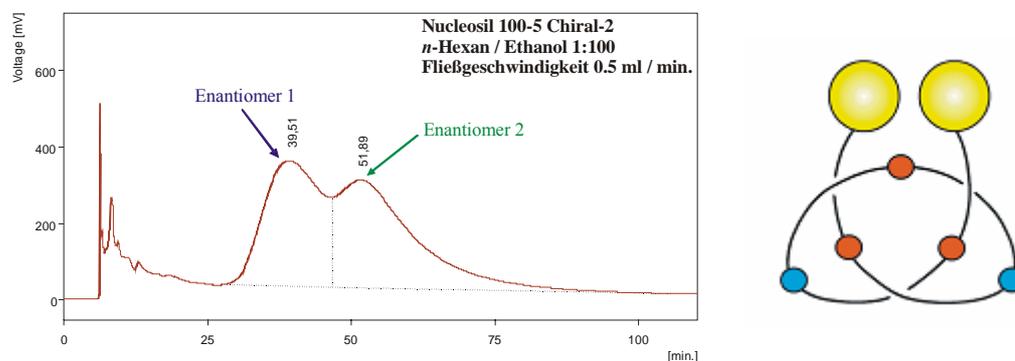


Abb. 145: Enantiomeren-Trennung des offenen Knotans **45 mit n-Hexan / Ethanol 1:100 als mobile Phase auf der Nucleosil 100-5 Chiral-2 Säule, einer Fließgeschwindigkeit von 0.5 ml / min.**

Das offene nicht-gestoppte Knotan des Kleeblatt-Knotens wurde mit Hilfe der Schutzgruppen-Technik synthetisiert. Hierbei stellte sich die Frage, ob eine Verknotung oder ein langer Faden entsteht. Dazu wurde im letzten Synthese-Schritt das offene Knotan bzw. der Faden geschlossen. Mit Hilfe der HPLC gelang eine Aufspaltung des entstandenen Kleeblatt-Knotens **7** in seine beiden Enantiomere (Abb. 146), was auch durch Circular dichroismenachgewiesen werden konnte. Hierdurch kann der angenommene Mechanismus der Knotan-Bildung über einen langen Faden, der sich durch Wasserstoffbrückenbindungen selbst verknotet, unterstützt werden.

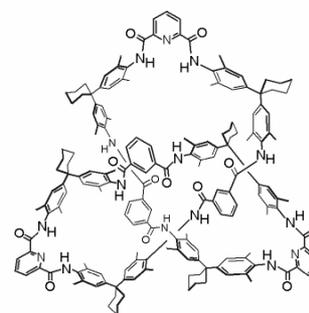
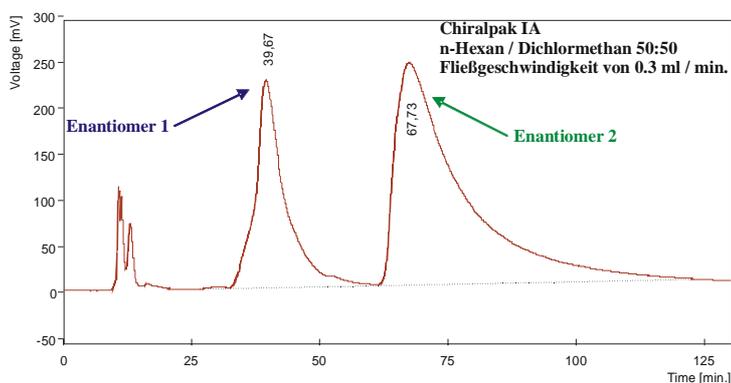


Abb. 146: Enantiomeren-Trennung des Kleeblatt-Knotans **7 mit *n*-Hexan / Dichlormethan 50:50 als mobile Phase auf der Chiralpak IA Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 0.3 ml / min.**

Zusätzlich wurden die gereinigten und in ihre Enantiomere getrennten Knotane hinsichtlich ihres Verhaltens auf unterschiedlichen stationären und mobilen Phasen sowie bei veränderten Fließgeschwindigkeiten untersucht. Die HPLC erfordert umfangreiche Messungen hinsichtlich der Auswahl eines geeigneten Säule und eines geeigneten Fließmittels. Es kann bei einer erfolgreichen Enantiomeren-Trennung der supramolekularen Spezies, speziell bei den Knotanen, nicht davon ausgegangen werden, dass die homologen Verbindungen eines Systems unter den gleichen Bedingungen getrennt werden können. Jede Verbindung muss als Einzel-Substanz betrachtet werden, damit die Bedingungen für eine Trennung oder Reinigung erfasst wird. Danach kann die Methode für das gewünschte Produkt optimiert werden. Für die Beurteilung und Auswahl einer Trennung, muss zunächst die Zeit für die Trennung ermittelt werden und mit der Haltbarkeit des Produktes / Produktgemisches verglichen werden. So kann vor allem die Wahl des Laufmittelgemisches Einfluss auf die Trennung haben, da nicht jede Substanz in dem für die Säule möglichen Lösungsmitteln löslich ist. Es ist von Interesse eine Trennung zwar möglichst schnell aber ebenso unter einer möglichst langen Lebensdauer der Säule durchzuführen.

5. Zusammenfassung

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war die Möglichkeit der Reinigung von Dendrimeren mit Hilfe der HPLC. Bei der divergenten Synthese von Dendrimeren ist der Größenunterschied vom Produkt und den Nebenprodukten klein. Ein Dendrimer gleicht von seiner Struktur her einer Kugel. Wird ein Dendrimerkern bei der Synthese nicht vollständig substituiert, d.h. es fehlt ein oder mehrere Substituenten-„Arme“, bleibt die Kugelform und –größe jedoch erhalten. Mit dem Größenausschlussverfahren kann bei diesen Dendrimeren daher nicht gearbeitet werden. Das Größenausschlussverfahren ist eine gängige chromatographische Methode bei Molekülen, die Molekülartefakte als Nebenprodukte aufweisen. So ist für die Substanzklasse der divergent hergestellten Dendrimeren diese Art der Chromatographie weder zur Reinigung noch zur Produkt-Trennung einsetzbar. Daher wurde erhofft, dass sich das Adsorptionsverhalten bei den nicht vollständig substituierten Nebenprodukten ändert. Die Produkt-Reinigung konnte, wie im Fall der Octasulfonimido-POPAM-Dendrimere **57 - 59** (Abb. 147) und des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimeren **66** (Abb.148), mit Hilfe von Kieselgel-Säulen oder sogar chiralen Säulen erfolgreich durchgeführt werden.

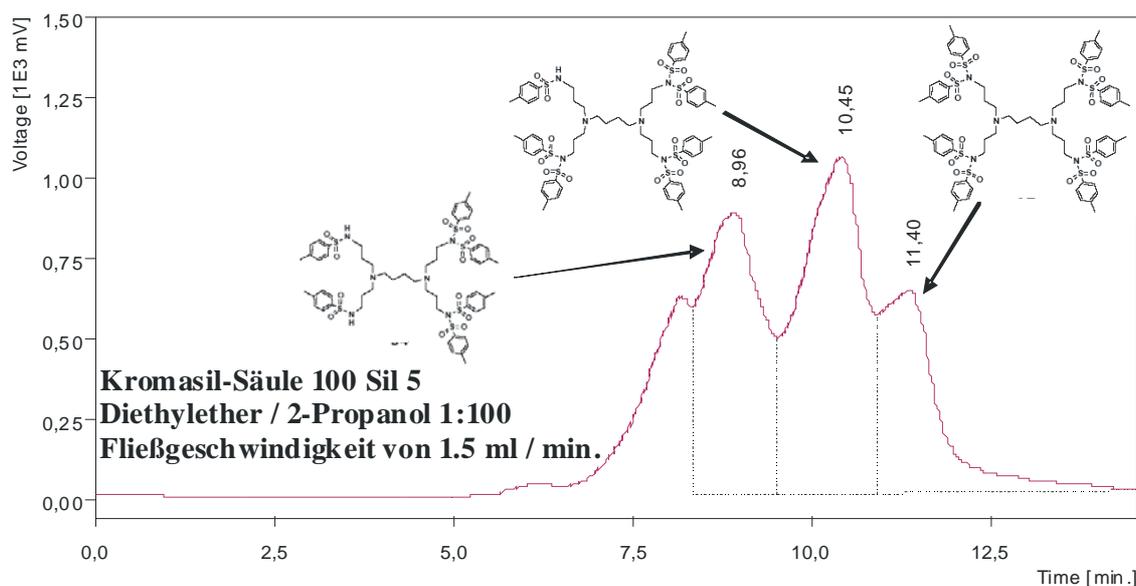


Abb. 147: Trennung der POPAM-Dendrimere: Octasulfonimid 57 - 59 mit Diethylether / 2-Propanol 1:100 als mobile Phase auf der Kromasil 100 Sil 5 μ m Säule und einer Fließgeschwindigkeit von 1.5 ml / min.

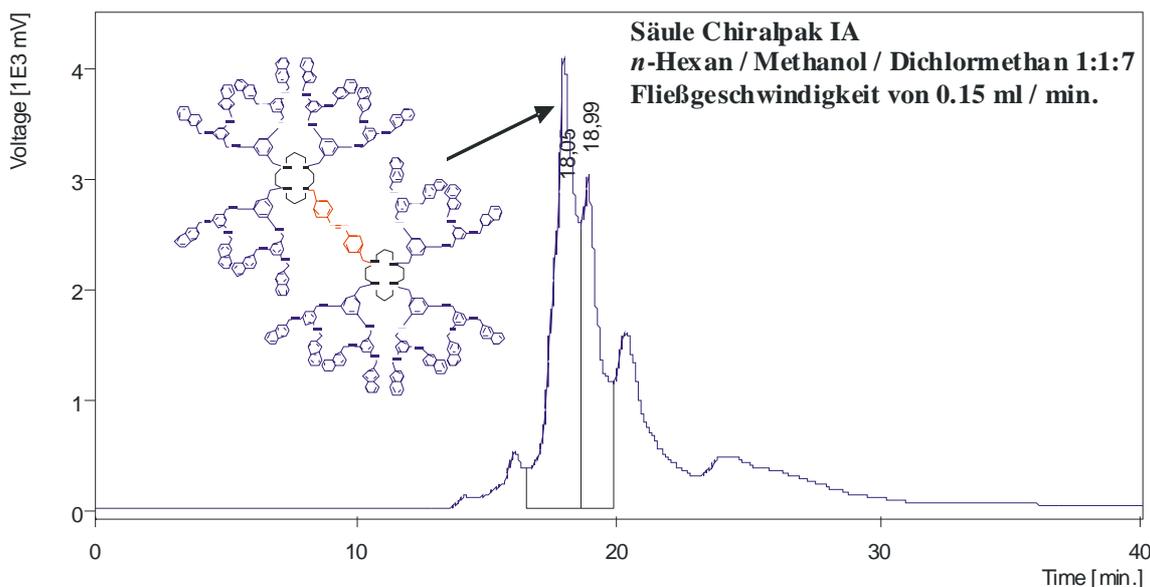


Abb. 148: Trennung des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers **66** mit *n*-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:7 als mobile Phase auf der Chiralpak[®] IA und einer Fließgeschwindigkeit von 0.15 ml / min.

Die Reinigung des Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers **66** wurde unter Einsatz der FTICR-Massenspektrometrie nachgewiesen.

Die breite Anwendungsmöglichkeit der chiralen HPLC-Methode konnte sowohl bei der Enantiomeren-Erfassung der Knotane als auch bei der Separierung des gewünschten Zielmoleküls bei den Dendrimern demonstriert werden. Für eine Automatisierung und routinemäßigen Anwendung in der supramolekularen chemischen Analytik ist diese Methode noch im Entwicklungsstadium. Vor allem die Dendrimer-Problematik zeigt gegenüber den Knotanen eine geringere Sensitivität und Selektivität. In einigen Fällen bei den Dendrimern konnte bei der Reinigung des Produktes nur ein möglicher Trend festgestellt werden, da keine optimale Trennung bzw. Antrennung erreicht werden konnte und es muss dann mit einer geringen Auflösung gearbeitet werden (z.B. Abb. 148). Fortführende Studien zur Aufklärung von Struktur- und Retentionsmechanismen in den chromatographischen Systemen können hier ihren Ausgangspunkt finden. Bisher ist das Verhalten des Bromyl-Knotans **27** auf verschiedenen Säulenmaterialien sowie das Decaalkyl-Knotans **42** unter dem Einfluss von verschiedenen Laufmittelgemischen untersucht worden. Hierbei wurde festgestellt, dass die Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und dem Produkt bzw. Produktgemisch eine wichtige Rolle spielt. So konnte das Bis-Cyclam-Aza-Dendrimer **66** auf einer chiralen Säule angetrennt werden, während auf den nicht-chiralen Säulen sowohl im Normalphasenmodus als auch im Umkehrphasenmodus weder eine Trennung noch eine Antrennung erzielt werden konnte.

5. Zusammenfassung

Auf diesen Ergebnissen kann aufbauend die Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial und dem zu trennenden bzw. zu reinigenden Substanzen analysiert werden.

Für eine Weiterentwicklung des Säulenmaterials und hinsichtlich der Automatisierung dieses Systems kann das Prinzip der molekularen Erkennung genutzt werden. In der Methodenentwicklung stellt sich somit die Hochleistungsflüssigchromatographie mit chiral modifizierten Phasen als ein aufwendiges Verfahren dar.

6. Ausblick

Eine weitere interessante Fragestellung für die HPLC ist, ob durch diese Analytik-Art Aussagen sowie Erkenntnisse für die Kinetik einer Reaktion gewonnen werden können.

Eine Möglichkeit ist die quantitative Bestimmung der Ausbeute einer Reaktion über die HPLC. Hierbei ist zu beachten, dass die zu untersuchende Reaktion bekannt ist und keine bzw. wenig Nebenprodukte entstehen. D.h. die Art der Reaktion sollte vorher schon erfolgreich durchgeführt worden sein. Eine Synthese, die dieser Voraussetzung entspricht ist die Darstellung von Rotaxanen durch physikalisches Auffädeln, die sogenannte Schmelzsynthese. (Abb.149) ^[150].

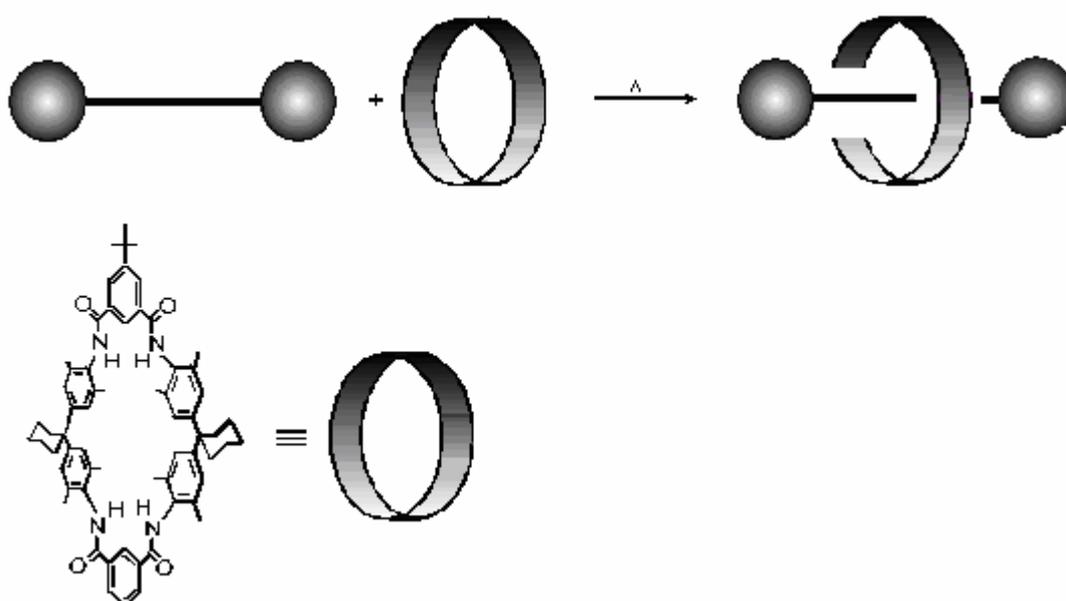


Abb. 149: Herstellung von Rotaxanen nach dem Verfahren der Schmelzsynthese

Hierbei werden äquimolare Mengen von Reif und Achse zusammengegeben sowie, um eine möglichst gute Durchmischung zu erreichen, in Dichlormethan gelöst, und in vier gleiche Teile aufgeteilt. Jede Portion wird unter vermindertem Druck bis zur Trockene eingeeengt und anschließend wird die Mischung in einem Kolben aus hitzebeständigem Duran-Glas in einem Metallbad bei ca. 350 °C bei unterschiedlichen Zeiteinheiten (von 1 min. bis hin zu 3.5 Stunden) zum Schmelzen gebracht. Nach dem Abschrecken des Reaktionskolbens in Chloroform werden die einzelnen Portionen vereinigt und säulenchromatographisch gereinigt. Für die quantitative HPLC-Bestimmung wird neben der Produktmischung noch ein interner Standard gebraucht. Dieser interne Standard besteht aus einer Substanz, die sich so ähnlich verhält wie das zu untersuchende Produkt. Bei der Schmelzsynthese der Rotaxane wäre der interne Standard ein weiteres Rotaxan.

6. Ausblick

Die Synthese des Rotaxans **69** (Abb.150):

[2]{N,N'-Bis[{3,5-di(*tert*-butyl)phenyl][1,1' biphenyl]-4,4'-dicarboxamide}}-{11'-(*tert*-butyl-5',17',23',35',38',40',43',45'-octamethyldispiro[cyclohexan-1,2'-[7,15,25,33]tetraazaheptacyclo-[32.2.2.2^{3,6}.2^{16,19}.2^{21,24}.1^{9,13}.1^{27,31}]}hexatetraconta [3,5,9,11,13(44),16,18on}rotaxan

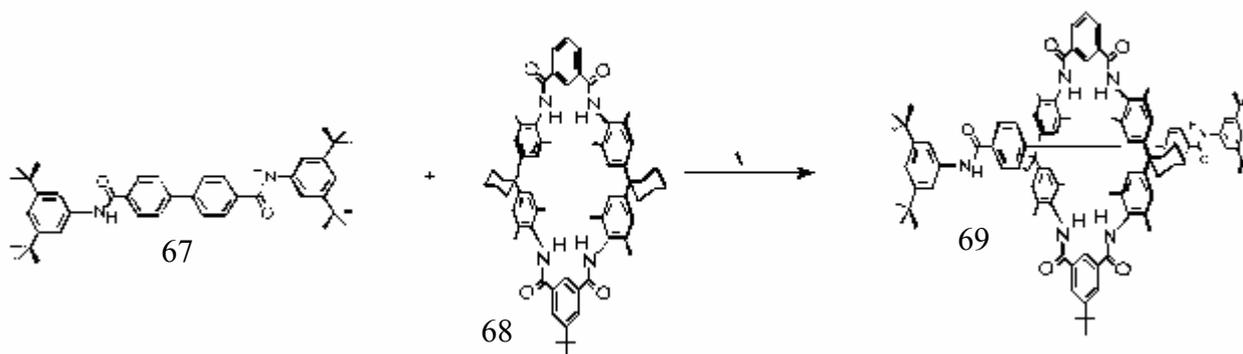


Abb. 150: Synthese des Rotaxans 69

ist ein geeignetes System, welches *Affeld* ^[150] aus dem Arbeitskreis *Vögtle* in seiner Dissertation untersucht hat. Wird dieses System auf der HPLC getrennt, ergeben sich drei Signale:

- eines für den Reif **68** mit einer Laufzeit von 3.24 Minuten (Abb. 151):

[2]{N,N'-Bis[{3,5-di(*tert*-butyl)phenyl][1,1' biphenyl]-4,4' dicarboxamide}}-{11'-(*tert*-butyl-5',17',23',35',38',40',43',45'-octamethyldispiro-[cyclohexan-1,2'[7,15,25,33] tetraazaheptacyclo-[32.2.2.2^{3,6}.2^{16,19}.2^{21,24}.1^{9,13}.1^{27,31}]}hexatetraconta [3,5,9,11,13(44),16,18, on}rotaxan

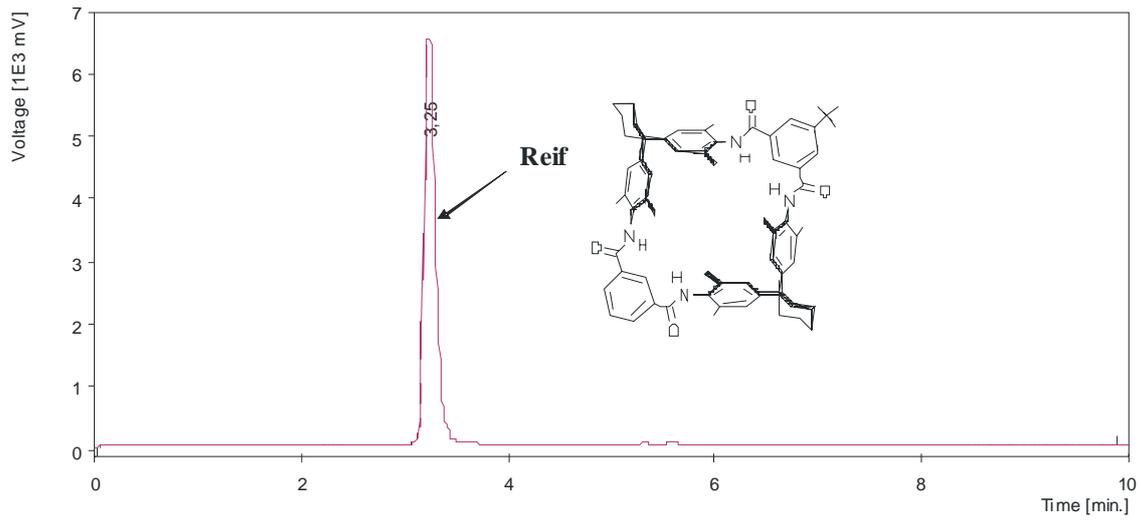


Abb. 151: Struktur des Reifes 68 mit dem entsprechenden HPLC-Chromatogramm

- eines für die Achse 67 mit einer Laufzeit von 11.34 Minuten (Abb. 152)

***N,N'*-Bis-(3,5-di-*tert*-butylphenyl)-4,4'-biphenyldicarbonsäureamid**

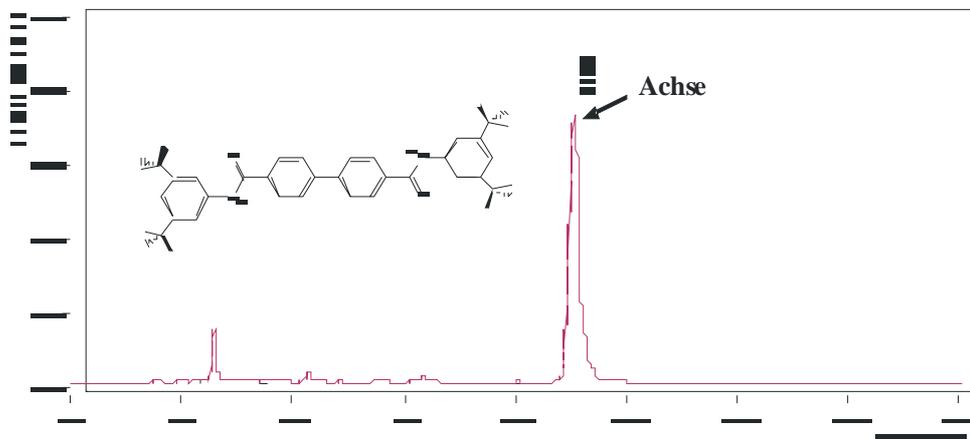


Abb. 152: Struktur der Achse 67 mit dem entsprechenden HPLC-Chromatogramm

6. Ausblick

- und eines für das Rotaxan **69** mit einer Laufzeit von 6.95 Minuten (Abb. 153).

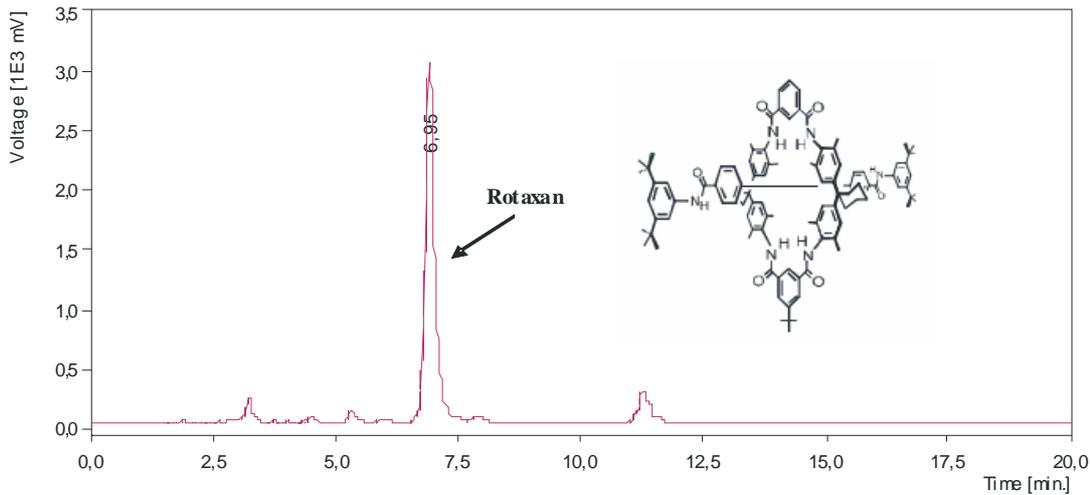


Abb. 153: Struktur des Rotaxans 69 mit dem entsprechenden HPLC-Chromatogramm

Das eine Trennung in diese drei Komponenten (Achse **67**, Rotaxan **69**, Reif **68**) auf der Säule Nucleosil RP 120 C18 5 µm mit dem Laufmittelgemisch Tetrahydrofuran / Methanol / Wasser im Verhältnis 65:15:20 und einer Fließgeschwindigkeit von 2.0 ml pro Minute möglich ist, zeigt Abbildung 154.

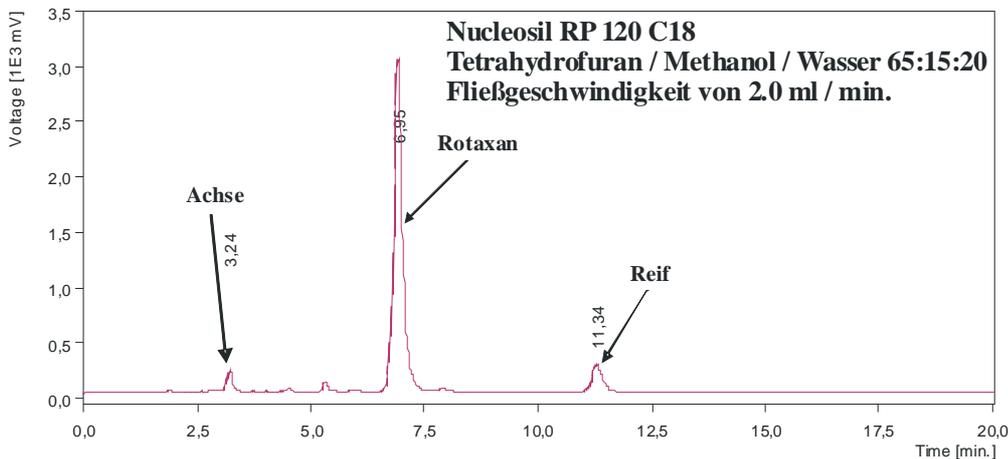


Abb. 154: HPLC-Chromatogramm von Achse 67, Reif 68 und Rotaxan 69

Der interne Standard dient als Referenz-Substanz, die dem zu untersuchenden Produktgemisch vor der Trennung auf der HPLC zugesetzt wird.

Da diese Referenz-Substanz in genauer Konzentration dem Gemisch beigemischt wird, kann anhand der Signalfläche des internen Standards die Signalfläche des zu untersuchenden Produktes bestimmt und damit auch dessen Konzentration, d.h. eine quantitative Bestimmung des gesuchten Produktes, berechnet werden.

Für den internen Standard können drei weitere, unterschiedliche Rotaxane verwendet werden:

1. [2]{(*E,E*)-4,4'-Bis{3,5-di(*tert*-butyl)phenyl}ethenyl}-1,1'-bibenzyl}-{11'-(*tert*-butyl-5',17',23',35',38',40',43',45'-octamethyldispiro[cyclohexan-1,2'-[7,15,25,33]tetraazaheptacyclo[32.2.2.2^{3,6}.2^{16,19}.2^{21,24}.1^{9,13}.1^{27,31}]hexatetraconta[3,5,9,11,13(44),16,18,21,23,27,29,31(39),34,36,37,40,42,45]octadecaen-20',1''-cyclohexan]-8',14',26',32'-tetron}rotaxan 70.

Die Retentionszeit dieses Moleküls beträgt 8.29 Minuten (Abb. 155).

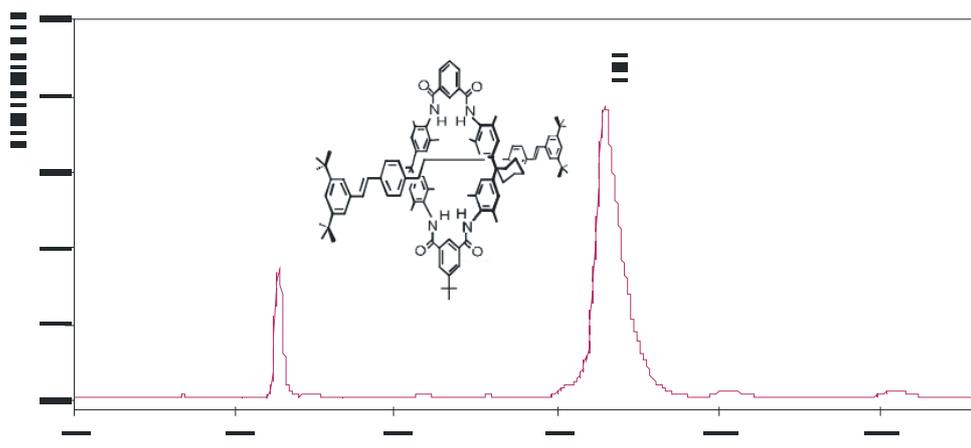


Abb. 155: Struktur des Rotaxans 70 mit dem entsprechenden HPLC-Chromatogramm

2. [2]{1,4-Bis(3,5-Di-*tert*-butylphenylazo)benzol-{11'-(*tert*-butyl-5',17',23',35',38',40',43',45'-octamethyldispiro[cyclohexan-1,2'-[7,15,25,33]tetraazaheptacyclo[32.2.2.2^{3,6}.2^{16,19}.2^{21,24}.1^{9,13}.1^{27,31}]hexatetraconta[3,5,9,11,13(44),16,18,21,23,27,29,31(39),34,36,37,40,42,45]octadecaene-20',1''-cyclohexan]-8',14',26',32'-tetron}rotaxan 71.

Die Retentionszeit dieses Molekül beträgt 5.74 Minuten (Abb. 156).

6. Ausblick

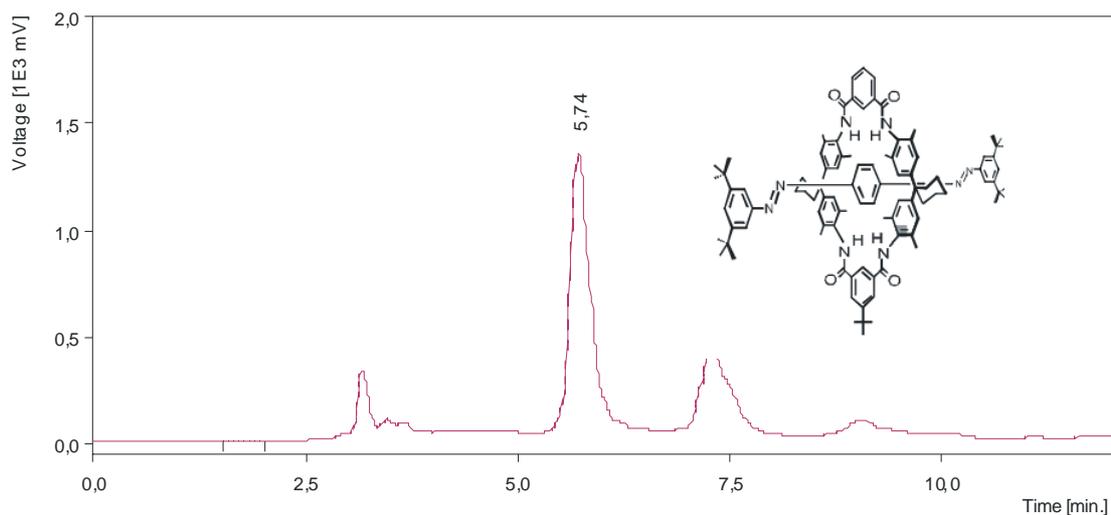


Abb. 156: Struktur des Rotaxans 71 mit dem entsprechenden HPLC-Chromatogramm

3. [2][N,N'-Bis-(3,5-di-*tert*-butylphenyl)terephthalsäurediamid]-{11'-(*tert*-butyl-5',17',23',35',38',40',43',45'-octamethyldispiro[cyclohexan-1,2'-[7,15,25,33]tetraazaheptacyclo[32.2.2.2^{3,6}.2^{16,19}.2^{21,24}.1^{9,13}.1^{27,31}]hexatetraconta[3,5,9,11,13(44),16,18,21,23,27,29,31(39),34,36,37,40,42,45]octadecaene-20',1'-cyclohexan]-8',14',26',32'-tetron} rotaxan 72.

Die Retentionszeit dieses Molekül beträgt 5.35 Minuten (Abb.157).

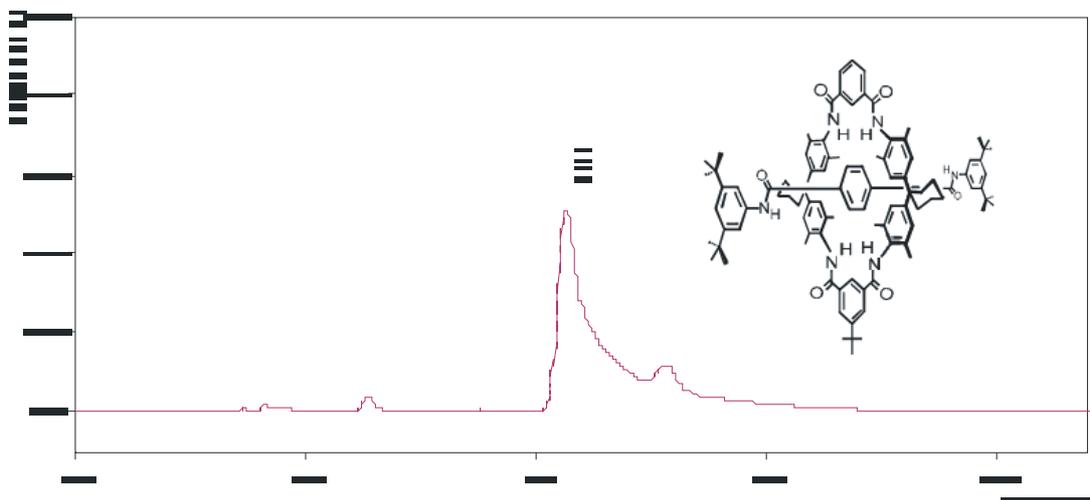


Abb. 157: Struktur des Rotaxans mit dem entsprechenden HPLC-Chromatogramm 72

Da keines der Rotaxane, die als interner Standard verwendet werden können, mit einem Signal aus dem zu untersuchenden System zusammenfällt, sind diese drei Rotaxane als interner Standard geeignet.

7. Experimenteller Teil

7.1 Geräte und Zubehör

- **Hochleistungsflüssigchromatographie-System:**
Die Probenreinigungen und Enantiomerentrennungen wurden mit einer HPLC-Anlage durchgeführt, die nach den Vorschlägen der Firma *TECHLAB GmbH* zusammengestellt wurde. Einzelne Geräte konnten den Anforderungen entsprechend ausgetauscht werden.
- **Pumpen:**
 - a) für die analytische Trennung standen eine Pumpe der Firma *WATERS*, Model590 (maximale Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min.), der Firma *TECHLAB*, Economy 2/ED (maximale Fließgeschwindigkeit von 9.99 ml/min.) und der Firma *JASCO*, PU-2080 Plus (Intelligent HPLC Pump, Serial No. B035160962) zur Verfügung
 - b) für die präparative Trennung stand eine Pumpe der Firma *ECOM spol.s.r.o.*, LCP 400-2 (maximale Fließgeschwindigkeit von 99 ml/min) und der Firma *JASCO*, PU-2080 Plus (Intelligent HPLC Pump, Serial No. B035160962) zur Verfügung
- **Probenaufnahme:**
erfolgte mit Probenaufgabeventil der Firma *RHEODYNE*, 7125.
- **Detektor:**
 - a) bei der analytischen Trennung konnten UV-Detektoren der Firma *JASCO*, UV-975 und der Firma *ECOM spol. s.r.o.*, LCD 2084 verwendet werden.
 - b) bei der präparativen Trennung wurde der UV-Detektor der Firma *ECOM spol. s.r.o.*, LCD 2083 mit einer präparativen 45/55/75 µl-Küvette verwendet.
- **Fraktionssammler:**
ist von der Firma *ADVANTEC MFS, Inc.*, bestückt mit speziellen Reagenzgläsern.
- **Auswertung der Daten:**
erfolgte mit dem Softwareprogramm *Andromeda 1.7*, entwickelt von *Göckemeyer*, vertrieben von der Firma *TECHLAB*.
- **Magnetventile:**
der Firma *BÜRKERT* und der Firma *RHEODYNE*, 6-Port-Ventil PR 700-100-01 oder 10-Port-Ventil EV 700-102 wurden eingebaut.
- **Ultraschallbad:**
der Firma *Bandelin*, SONOREX RK 2555

- **Circulardichroismus-Spektrometer:**

Das verwendete Circulardichroismus-Spektrometer stammt von der Firma *Jasco*, Model J-810-150S, Serial No. B021960750.

Zum Nachweis der Enantiomeren-Separation werden CD-Spektren aufgenommen, wobei mit folgenden Parametern gearbeitet wurde:

| | |
|--------------------|--|
| Data array type: | Linear data array * 2 |
| Band width: | 1 nm |
| Response: | 1 sec |
| Sensitivity: | Standard |
| Measurement range: | 350 - 180 nm |
| Data pitch: | 0.1nm |
| Scanning speed: | 50 nm/min |
| Accumulation: | 3 |
| Cell Length: | 0.1 cm |
| Solvent: | Trifluorethanol von den Firmen: <i>MERCK, FLUKA (Riedel-de-Haën)</i> |
| Temperature: | Room Temperature |

7.2 HPLC-Säulen und Lösungsmittel

Verwendete HPLC-Säulen, Chromatographiematerialien und Lösungsmittel

- **Säulen (stationäre Phase):**

a) zur Reinigung und Trennung:

a.1) **RP-Säulen (C-18 Phasen):**

- ***Grom-Sil 120 ODS-4 HE***

Firma: *GROM Analytik + HPLC GmbH*

Säulenabmessung: 250x20 mm,

Vorsäule: 30x20 mm

Teilchengröße: 10 µm

7. Experimenteller Teil

- ***Kromasilsäulen C 18***

Firma: *MZ-ANALYSENTECHNIK*

Säulenabmessung: 250x20 mm und 250x8 mm,

Teilchengröße: 5 µm

a.2) NP-Silicagel-Säulen:

- ***Nucleosil 300-5***

Firma: *MACHEREY und NAGEL*

Säulenabmessung: 250x21 mm,

Vorsäule: 50x21 mm

Teilchengröße: 5 µm

- ***Kromasil 100 Sil***

Firma: *MZ-ANALYSENTECHNIK*

Säulenabmessung: 250x8 mm,

Teilchengröße: 5 µm

b) zur Enantiomerentrennung:

b.1) nicht-immobilisiertes chirales Säulenmaterial:

- ***Chiralcel[®] OD***

Firma: *CHIRAL TECHNOLOGIES, Europe SARL (Tochterfirma von DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, Ltd; Japan.),*

Säulenabmessung: 250x10 mm,

Teilchengröße: 10 µm

Firma: *GROM ANALYTIKCHIRAL + HPLC GmbH*

Säulenabmessung: 250x10 mm,

Teilchengröße: 20 µm

- ***Chiralpak[®] AD***

Firma: *GROM ANALYTIKCHIRAL + HPLC GmbH*

Säulenabmessung: 250x10 mm,

Teilchengröße: 20 µm

- ***Nucleosil[®] Chiral-2***
Firma: *MACHEREY und NAGEL*
Säulenabmessung: 250x4 mm,
Säulenmaterial: *N*-(3,5-Dinitrobenzoyl)-*D*-phenylglycin (*Pirkle*-Phase)
für Substanzen und Substanzgemische, die nicht in Alkoholen oder
n-Alkanen löslich sind

b.1) immobilisiertes chirales Säulenmaterial:

- ***DMPA-I (Batch FA 2364/18)***
Firma: *Francotte*
Säulenabmessung: 250x4 mm,
Teilchengröße: 7 µm
- ***PMBC-I (Batch FA 2358/7)***
Firma: *Francotte*
Säulenabmessung: 250x4 mm,
Teilchengröße: 7 µm
- ***DMPC-I (Batch FA 2359/22)***
Firma: *Francotte*
Säulenabmessung: 250x4 mm,
Teilchengröße: 10 µm
- ***PECA-I (Batch FA 2392/7)***
Firma: *Francotte*
Säulenabmessung: 250x4 mm,
Teilchengröße: 7 µm
- ***ChiralPAK[®] IA***
Firma: *DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, Ltd,*
Säulenabmessung: 250x10 mm,
Teilchengröße: 10 µm

c) zur Trennung mit Gel-Permeations-Chromatographie

- ***MZ-Gel SDplus 100***
Firma: *MZ-ANALYSENTECHNIK*
Säulenabmessung: 300x8 mm,
Teilchengröße: 5 µm

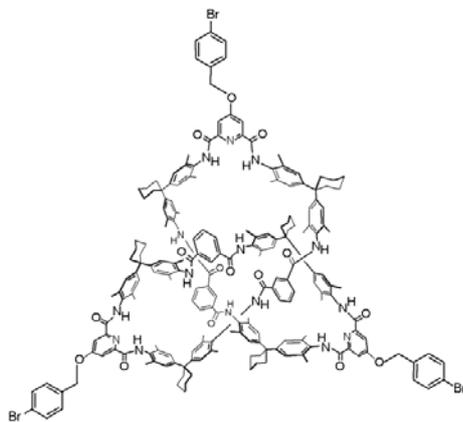
7. Experimenteller Teil

- **analytische Dünnschichtchromatographie:**
 - Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Glasplatte von der Firma *Merck*
 - Kieselgel RP-18 F_{254s} beschichtete Glasplatte von der Firma *Merck*
- **Lösungsmittel (mobile Phase):**

bei der HPLC wurden Lösungsmittel der Firmen *MERCK*, *FLUKA* (*Riedel-de-Haën*) oder *J.T.Baker* in Chromalsov[®]-Qualität verwendet.

7.3 Enantiomerentrennung und Diastereomerentrennung der Knotane

7.3.1 Bromyl-Knotan 27



[3₁]Cyclopropan[29',65',101'-tribromobenzyloxy-5',17',23',35',41',53',59',71',77',89',95',107',110',112',115',117',120',122',125',127',130',132',135',137'-tetracosamethyl-8',14',26',32',44',50',62',68',80',86',98',104'-dodecaoxohexaspiro{tricyclohexan-1-2'',20'-1'',38'-1''''-[7',15',25',33',43',51',61',69',79',87',97',105',116',126',136']penta-decaazanonadecacyclo[104.2.2.2^{3',6'}.2^{16',19'}.2^{21',24'}.2^{34',37'}.2^{39',42'}.2^{52',55'}.2^{57',60'}.2^{70',73'}.2^{75',78'}.2^{88',91'}.2^{93',96'}.1^{9',13'}.1^{27',31'}.1^{45',49'}.1^{63',67'}.1^{81',85'}.1^{99',103'}]octatriacontahectan[3',5',9',11',13'(111'),16',18',21',23',27',29',31'(116'),34',36',39',41',45',47',49'(121'),52',54',57',59',63',65',67'(126'),70',72',75',77',81',83',85'(131'),88',90',93',95',99',101',103'(136'),106',108',109',112',114',117',119',122',124',127',129',132',134',137']tetrapentacontaen-56'-1''''',74'-1''''''',92'-1''''''''-tricyclohexan}]-knotan

| | |
|-----------------------|--|
| Stationäre Phase: | Nucleosil 100-5 Chiral-2 ≡ (<i>N</i> -(3,5-Dinitrobenzoyl)- <i>D</i> -phenylglycin) |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / 2-Propanol 50:50 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.7 ml / min |
| Detektor: | UV, λ=254 nm |
| Retentionszeit: | t ₁ = 71.40 min.; t ₂ = 94.17 min |
| CD-Chromatogramm: | von beiden Enantiomeren |

7. Experimenteller Teil

Stationäre Phase: Chiralcel[®]OD ≡ Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat
Mobile Phase: *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50
Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
Retentionszeit: $t_1 = 53.77$ min.; $t_2 = 80.81$ min

Stationäre Phase: DMPC-I ≡ Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat,
immobilisiert
Mobile Phase: *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50
Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
Retentionszeit: $t_1 = 20.85$ min.; $t_2 = 26.92$ min.

Stationäre Phase: DMPC-I ≡ Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat,
immobilisiert
Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 40:60
Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
Retentionszeit: $t = 8.43$ min.

Stationäre Phase: DMPC-I ≡ Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat,
immobilisiert
Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 50:50
Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
Retentionszeit: $t = 13.70$ min.

Stationäre Phase: DMPC-I ≡ Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat,
immobilisiert
Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 60:40
Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
Retentionszeit: $t = 7.39$ min.

Stationäre Phase: PMBC-I \equiv para-Methylbenzoylcellulose, immobilisiert
 Mobile Phase: *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50
 Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
 Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
 Retentionszeit: $t_1 = 20.85$ min.; $t_2 = 26.92$ min.

Stationäre Phase: PMBC-I \equiv para-Methylbenzoylcellulose, immobilisiert
 Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 40:60
 Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
 Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
 Retentionszeit: $t = 5.21$ min.

Stationäre Phase: PMBC-I \equiv para-Methylbenzoylcellulose, immobilisiert
 Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 50:50
 Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
 Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
 Retentionszeit: $t = 8.87$ min.

Stationäre Phase: PMBC-I \equiv para-Methylbenzoylcellulose, immobilisiert
 Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 60:40
 Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
 Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
 Retentionszeit: $t = 5.79$ min.

Stationäre Phase: Chiralpak[®] AD \equiv Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat
 Mobile Phase: *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50
 Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
 Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
 Retentionszeit: $t = 28.41$ min.

7. Experimenteller Teil

Stationäre Phase: Chiralpak[®]IA ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50

Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: $t_1 = 9.01$ min.; $t_2 = 11.25$ min.

Stationäre Phase: Chiralpak[®]IA ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 40:60

Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: $t_1 = 10.38$ min., $t_2 = 14.65$ min.

Stationäre Phase: Chiralpak[®]IA ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 50:50

Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: $t_1 = 20.53$ min., $t_2 = 37.41$ min.

Stationäre Phase: Chiralpak[®]IA ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 60:40

Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: nicht bestimmbar

Stationäre Phase: DMPA-I ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbammat,
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / 2-Propanol 50:50

Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: $t_1 = 7.26$ min.; $t_2 = 9.29$ min.

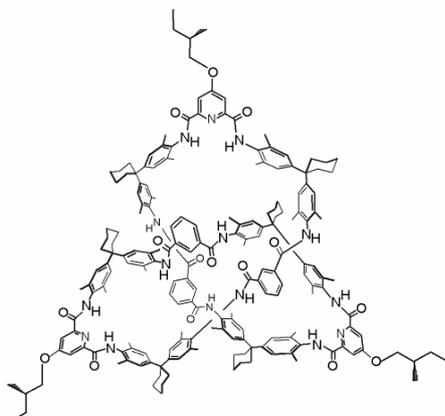
| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | DMPA-I \equiv Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate, immobilisiert |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Dichlormethan 40:60 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm |
| Retentionszeit: | $t = 6.59$ min. |
| Stationäre Phase: | DMPA-I \equiv Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate, immobilisiert |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Dichlormethan 50:50 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm |
| Retentionszeit: | $t_1 = 10.49$ min., $t_2 = 13.09$ min. |
| Stationäre Phase: | DMPA-I \equiv Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate, immobilisiert |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Dichlormethan 60:40 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm |
| Retentionszeit: | $t_1 = 4.45$ min., $t_2 = 5.89$ min. |
| Stationäre Phase: | PECA-I \equiv Amylosetris(<i>S</i> -Phenylethyl)carbamate, immobilisiert |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / 2-Propanol 50:50 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm |
| Retentionszeit: | $t = 4.47$ min. |
| Stationäre Phase: | PECA-I \equiv Amylosetris(<i>S</i> -Phenylethyl)carbamate, immobilisiert |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Dichlormethan 40:60 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm |
| Retentionszeit: | $t = 14.83$ min. |

7. Experimenteller Teil

Stationäre Phase: PECA-I \equiv Amylosetris(*S*-Phenylethyl)carbamat, immobilisiert
Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 50:50
Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
Retentionszeit: $t_1 = 11.71$ min., $t_2 = 24.81$ min.

Stationäre Phase: PECA-I \equiv Amylosetris(*S*-Phenylethyl)carbamat, immobilisiert
Mobile Phase: *n*-Hexan / Dichlormethan 50:50
Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min
Detektor: UV, $\lambda=254$ nm
Retentionszeit: $t_1 = 6.96$ min., $t_2 = 7.52$ min.

7.3.2 chirales Knotan 28



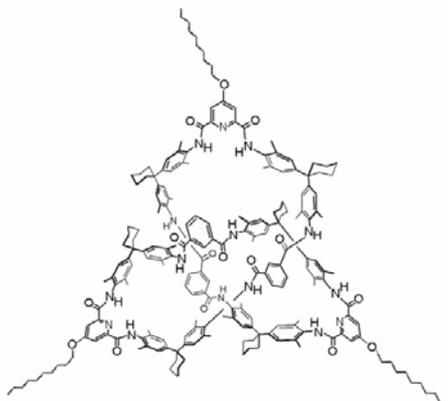
[3]₁]Cyclopropan[29',65',101'-tri-(S)-(+)-2methylbutyloxy-5',17',23',35',41',53',59',71',77',89',95',107',110',112',115',117',120',122',125',127',130',132',135',137'-tetracosamethyl-8',14',26',32',44',50',62',68',80',86',98',104'-dodecaoxohexaspiro{tricyclohexan-1-2'',20'-1'',38'-1'''}-[7',15',25',33',43',51',61',69',79',87',97',105',116',126',136']penta-decaazanonadecacyclo[104.2.2.2^{3',6'}.2^{16',19'}.2^{21',24'}.2^{34',37'}.2^{39',42'}.2^{52',55'}.2^{57',60'}.2^{70',73'}.2^{75',78'}.2^{88',91'}.2^{93',96'}.1^{9',13'}.1^{27',31'}.1^{45',49'}.1^{63',67'}.1^{81',85'}.1^{99',103'}]octatriacontahectan[3',5',9',11',13'(111'),16',18',21',23',27',29',31'(116'),34',36',39',41',45',47',49'(121'),52',54',57',59',63',65',67'(126'),70',72',75',77',81',83',85'(131'),88',90',93',95',99',101',103'(136'),106',108',109',112',114',117',119',122',124',127',129',132',134',137']tetrapentacontaen-56'-1''''',74'-1''''',92'-1''''''-tricyclohexan}]-knotan

| | |
|-----------------------|--|
| Stationäre Phase: | Nucleosil 100-5 Chiral-2 ≡ (N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-D-phenylglycin) |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Ethanol 1:100 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.3 ml / min |
| Detektor: | UV, λ=254 nm |
| Retentionszeit: | t = 12.19 min. |
| CD-Chromatogramm: | nein, da die Enantiomeren nicht getrennt werden konnten |

7. Experimenteller Teil

| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | Nucleosil 100-5 Chiral-2 \equiv (<i>N</i> -(3,5-Dinitrobenzoyl)- <i>D</i> -phenylglycin) |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Methanol 1:100 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.1 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm |
| Retentionszeit: | $t_1 = 32.38$ min.; $t_2 = 38.32$ min |
| CD-Chromatogramm: | nein, da die Enantiomeren nicht getrennt werden konnten |
| Stationäre Phase: | Chiralpak®IA \equiv Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:10 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.15 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm, analytische Zelle |
| Retentionszeit: | $t_1 = 16.37$ min.; $t_2 = 19.14$ min |
| CD-Chromatogramm: | ja, von beiden Enantiomeren |
| Stationäre Phase: | Chiralpak®IA \equiv Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:1 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.15 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm, präparative Zelle |
| Retentionszeit: | $t_1 = 20.74$ min.; $t_2 = 22.22$ min |
| CD-Chromatogramm: | ja, von beiden Enantiomeren |

7.3.3 Decyl-Knotan 42



[3₁]Cyclopropan[29',65',101'-tridecyloxy-5',17',23',35',41',53',59',71',77',89',95',107',110',112',115',117',120',122',125',127',130',132',135',137'-tetracosamethyl-8',14',26',32',44',50',62',68',80',86',98',104'-dodecaoxohexaspiro{tricyclohexan-1-2'',20'-1'',38'-1''''-[7',15',25',33',43',51',61',69',79',87',97',105',116',126',136']penta-decaazanonadecacyclo[104.2.2.2.2^{3',6'}.2^{16',19'}.2^{21',24'}.2^{34',37'}.2^{39',42'}.2^{52',55'}.2^{57',60'}.2^{70',73'}.2^{75',78'}.2^{88',91'}.2^{93',96'}.1^{9',13'}.1^{27',31'}.1^{45',49'}.1^{63',67'}.1^{81',85'}.1^{99',103'}]octatriacontahectan[3',5',9',11',13'(111'),16',18',21',23',27',29',31'(116'),34',36',39',41',45',47',49'(121'),52',54',57',59',63',65',67'(126'),70',72',75',77',81',83',85'(131'),88',90',93',95',99',101',103'(136'),106',108',109',112',114',117',119',122',124',127',129',132',134',137']tetrapentacontaen-56'-1''''',74'-1''''''',92'-1''''''''-tricyclohexan}]-knotan

| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | Chiralcel [®] OD ≡ Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamat |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Ethanol 88:12 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.8 ml / min |
| Detektor: | UV, λ=254 nm |
| Retentionszeit: | t ₁ = 104.24 min.; t ₂ = 125.82 min. |
| CD-Chromatogramm: | ja, von beiden Enantiomeren |

7. Experimenteller Teil

Stationäre Phase: DMPC-I \equiv Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate,
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Ethanol 88:12

Fließgeschwindigkeit: 2.0 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: $t = 15.91$ min.

Stationäre Phase: DMPC-I \equiv Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate,
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Ethanol 88:12

Fließgeschwindigkeit: 1.0 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: $t = 94.79$ min.

Stationäre Phase: DMPC-I \equiv Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate,
immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Ethanol 88:12

Fließgeschwindigkeit: 0.5 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: $t = 153.56$ min.

Stationäre Phase: DMPC-I \equiv Cellulosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamate,
immobilisiert

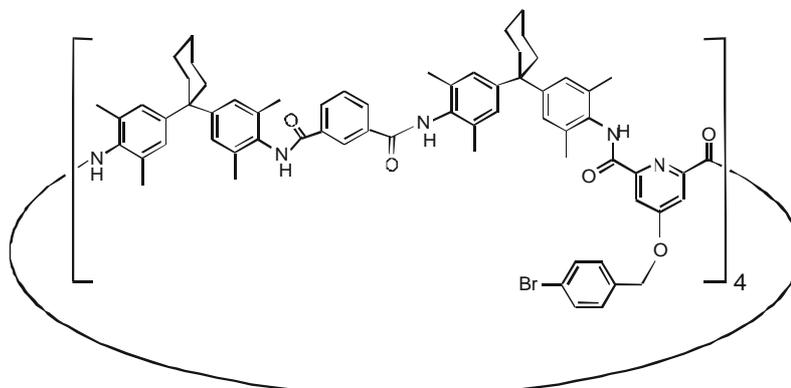
Mobile Phase: *n*-Hexan / Ethanol 88:12

Fließgeschwindigkeit: 0.1 ml / min

Detektor: UV, $\lambda=254$ nm

Retentionszeit: nicht bestimmbar

7.3.4 Octamer-Knotan 32



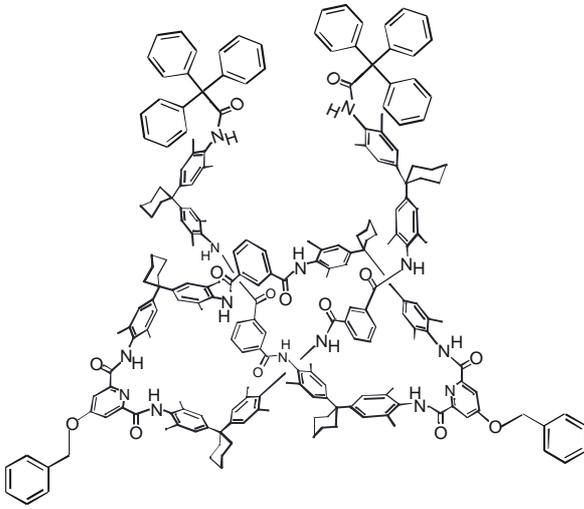
5',17',23',35',41',53',59',71',77',89',95',107',113',125',131',147',150',152',155',157',160',
 162',165',167',170',172',175',177',180',182',185',187-dotriamethyloctaspiro
 {octacyclohexan-1-2',20'-1'',38'-1''',56'-1''''',74'-1''''''',92'-1''''''''',110-1''''''''''',128-
 1'''''''''''''}[7',15',25',33',43',51',61',69',79',87',97',105',115',123',133',141',147',157',
 167',177']cosaazapentacosacyclo[140.2.2.2^{3',6'}.2^{16',19'}.2^{21',24'}.2^{34',37'}.2^{39',42'}.2^{52',55'}.2^{57',60'}.
 2^{70',73'}.2^{75',78'}.2^{88',91'}.2^{93',96'}.2^{106',109'}.2^{111',114'}.2^{124',127'}.2^{129',132'}.1^{9',13'}.1^{27',31'}.1^{45',49'}.1^{63',67'}.
 1^{81',85'}.1^{99',103'}.1^{117',121'}.1^{135',139'}]tetraoctacontahecta[3',5',9',11',13'(182'),16',18',21',
 23',27',29',31'(177'),34',36',39',41',45',47',49'(172'),52',54',57',59',63',65',67'(167'),
 70',72',75',77',81',83',85'(162'),88',90',93',95',99',101',103'(157'),106',108',111',113',11
 7',119',121'(152'),124',126',129',131',135',137',139'(147'),142',144',146',148',150',153',
 155',158',160',163',165',168',170',173',175',178',180',183']doheptacontaen[8',14',26',
 32',44',50',62',68',80',86',98',104',116',122',134',140']hexadecaon

| | |
|-----------------------|--|
| Stationäre Phase: | Nucleosil 100-5 Chiral-2 ≡ (<i>N</i> -(3,5-Dinitrobenzoyl)- <i>D</i> -phenylglycin) |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / 2-Propanol 30:70 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, λ=254 nm |
| Retentionszeit: | t ₁ = 13.14 min.; t ₂ = 14.07 min |
| CD-Chromatogramm: | nein, da die Enantiomeren nicht getrennt werden konnten |

7. Experimenteller Teil

| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | Nucleosil 100-5 Chiral-2 \equiv (<i>N</i> -(3,5-Dinitrobenzoyl)- <i>D</i> -phenylglycin) |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / 2-Propanol 70:30 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm, |
| Retentionszeit: | $t_1 = 16.18$ min.; $t_2 = 18.07$ min |
| CD-Chromatogramm: | ja, von beiden Enantiomeren |

7.3.5 offenes Klettblatt-Knotan 45

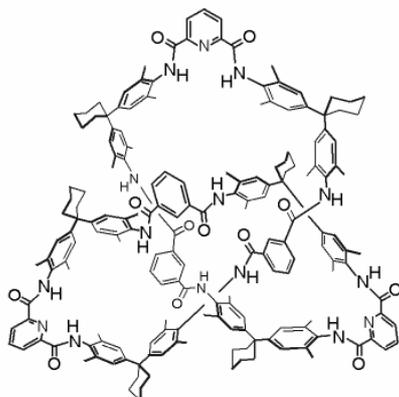


***N,N'*-Bis-[*N''*-({4-[1-(4-amino-3,5-dimethylphenyl)cyclohexylidene]-2',6'-dimethylphenyl}-2,6-pyridindicarbonamidyl)-*N'''*-({4-[1-(4-(triphenylmethyl)amino-3,5-dimethylphenyl)cyclohexylidene]-2',6'-dimethylphenyl}-1,5-isophthalsäurediamidyl)-{4-[1-(4-amino-3,5-dimethylphenyl)cyclohexylidene]-2',6'-dimethylphenyl}]-1,5-isophthalsäureamid**

| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | Nucleosil 100-5 Chiral-2 \equiv (<i>N</i> -(3,5-Dinitrobenzoyl)- <i>D</i> -phenylglycin) |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Ethanol 1:100 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm |
| Retentionszeit: | $t_1 = 39.51$ min.; $t_2 = 51.89$ min. |
| CD-Chromatogramm: | wahrscheinlich, dann von beiden Enantiomeren |

7. Experimenteller Teil

7.3.6 Klettblatt-Knotan 7



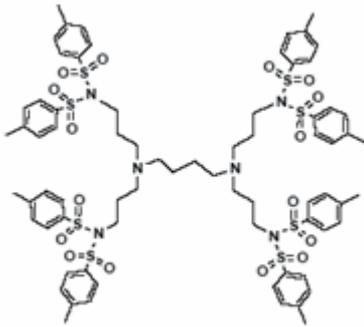
**[3₁]Cyclopropan-5',17',23',35',41',53',59',71',77',89',95',107',110',112',115',117',
120',122',125',127',130',132',135',137'-tetracosamethylhexaspiro{hexacyclohexan-1-
2',20'-1'',38'-1''',56'-1''''',74'-1''''''',92'-1'''''''''}[7',15',25',33',43',51',61',69',79',87',
97',105',111',121',131'] pentadecaazanonadecacyclo[104.2.2.2^{3',6'}.2^{16',19'}.2^{21',24'}.2^{34',37'}.
2^{39',42'}.2^{52',55'}.2^{57',60'}.2^{70',73'}.2^{75',78'}.2^{88',91'}.2^{93',96'}.1^{9',13'}.1^{27',31'}.1^{45',49'}.1^{63',67'}.1^{81',85'}.1^{99',103'}]
octatriacontahecta[3',5',9',11',13'(136'),16',18',21',23',27',29',31'(131'),34',36',39',41',4
5',47',49'(126'),52',54',57',59',63',65',67'(121'),70',72',75',77',81',83',85'(116'),88',90',9
3',95',99',101',103'(111'),106',108',109',112',114',117',119',122',124',127',129',132',134'
,137']tetrapentacontaen[8',14',26',32',44',50',62',68',80',86',98',104']dodecaon}knotan**

| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | Chiralpak®IA ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamat |
| Mobile Phase: | <i>n</i> -Hexan / Dichlormethan 50:50 |
| Fließgeschwindigkeit: | 0.3 ml / min |
| Detektor: | UV, λ=254 nm, präparative Zelle |
| Retentionszeit: | t ₁ = 39.67 min.; t ₂ = 67.73 min |
| CD-Chromatogramm: | ja, von beiden Enantiomeren |

7.4 Reinigung und Trennung von Dendrimeren

7.4.1 POPAM-Dendrimere: Octasulfonimide 57 - 59

a) 57

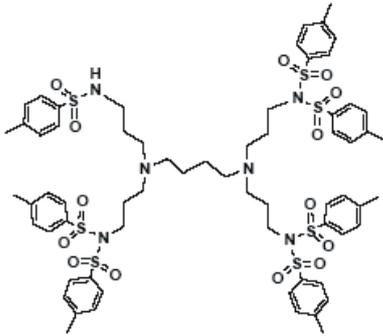


***N,N,N',N'*-Tetrakis(3-(4-methylbenzenesulfonimido)propyl)-1,4-diaminobutan**

| | |
|-----------------------|---------------------------------|
| Stationäre Phase: | Kromasil-Säule 100 Sil 5 µm |
| Mobile Phase: | Diethylether / 2-Propanol 1:100 |
| Fließgeschwindigkeit: | 1.5 ml / min |
| Detektor: | UV, λ=254 nm, präparative Zelle |
| Retentionszeit: | t = 11.40 min |

7. Experimenteller Teil

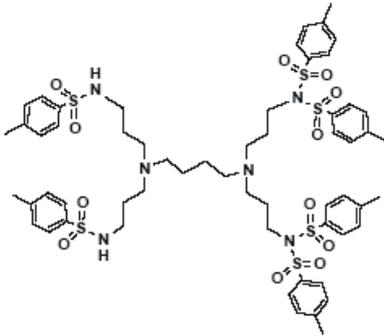
b) 58



***N*-(3-(4-methylbenzenesulfonamido)-propyl)-*N,N',N'*-tris(4-methylbenzenesulfonimido)-propyl-1,4-diaminobutan**

| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | Kromasil-Säule 100 Sil 5 μm |
| Mobile Phase: | Diethylether / 2-Propanol 1:100 |
| Fließgeschwindigkeit: | 1.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm, präparative Zelle |
| Retentionszeit: | $t = 10.45$ min |

c) 59

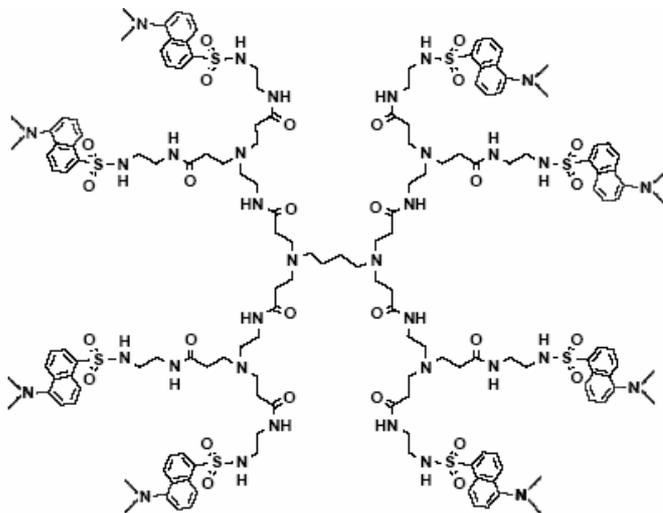


***N,N*-(3-(4-methylbenzenesulfonamido)propyl)-*N',N'*-bis(4-methylbenzenesulfonimido)propyl-1,4-diaminobutan**

| | |
|-----------------------|---|
| Stationäre Phase: | Kromasil-Säule 100 Sil 5 μm |
| Mobile Phase: | Diethylether / 2-Propanol 1:100 |
| Fließgeschwindigkeit: | 1.5 ml / min |
| Detektor: | UV, $\lambda=254$ nm, präparative Zelle |
| Retentionszeit: | $t = 8.96$ min |

7. Experimenteller Teil

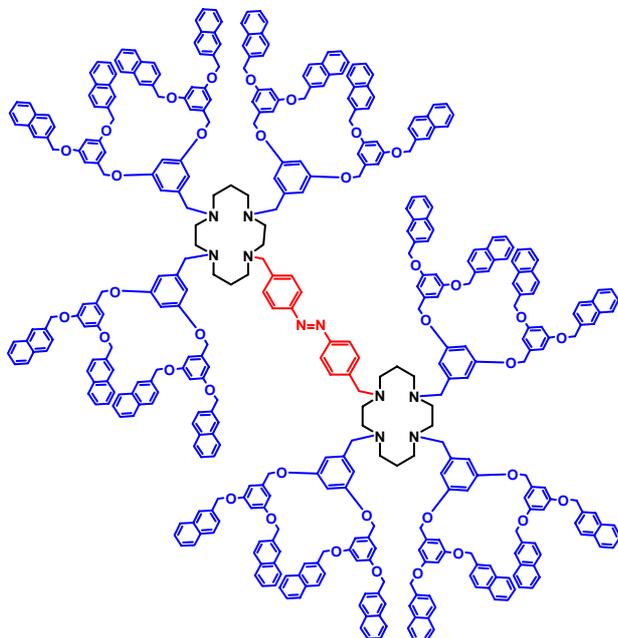
7.4.2 PAMAM- Dansyl-Dendrimers: Octasulfonamid 65



1,4-Diaminobutan(*N,N,N',N'*):(3-oxo-4-aza-7-aza-heptyl(7,7)^{G₁}/_{4n}): (3-oxo-4-aza-7-aza—7-Dansyl-heptyl)₈-kaskadan ^[212]

| | |
|-----------------------|---------------------------------|
| Stationäre Phase: | Kromasil-Säule 100 Sil 5 μm |
| Mobile Phase: | Diethylether / 2-Propanol 1:100 |
| Fließgeschwindigkeit: | 1.0 ml / min |
| Detektor: | UV, λ=254 nm, präparative Zelle |
| Retentionszeit: | nicht bestimmbar |

7.4.3 Bis-Cyclam-Aza-Dendrimers der 2. Generation 66



1,1'-[1,4-Phenylbis(methylen)]-4,4',8,8',11,11'-hexakis[3,5-bis(2'-oxymethylnaphthyl)benzyl]bis(1,4,8,11-tetraazacyclotetradecan)

Stationäre Phase: Chiralpak[®] IA ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamat immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:7

Fließgeschwindigkeit: 0.15 ml / min

Detektor: UV, λ=254 nm

Retentionszeit: t = 18.05 min.

Stationäre Phase: Chiralpak[®] IA ≡ Amylosetris(3,5-dimethylphenyl)carbamat immobilisiert

Mobile Phase: *n*-Hexan / Methanol / Dichlormethan 1:1:7

Fließgeschwindigkeit: 0.1 ml / min

Detektor: UV, λ=254 nm

Retentionszeit: t = 27.52 min.

8. Literaturverzeichnis

- [1] J. T. Finer, R. M. Simmons, J. A. Spudich, *Nature* **1994**, *368*, 113 - 119.
- [2] I. Rayment, H. M. Holden, M. Whittaker, C. B. Yohn, M. Lorenz, K. C. Holmes, E. A. Milligan, *Science* **1993**, *261*, 58 - 65.
- [3] I. Rayment, W. R. Rypniewski, K. Schmidt-Bäse, R. Smith, D. R. Tomchick, M. M. Benning, D. A. Winkelmann, D. Wesenberg, H. M. Holden, *Science* **1993**, *261*, 50 - 58.
- [4] a) B. J. Schnapp, *Nature* **1995**, *373*, 655 - 656.;b) S. C. Schuster, *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure* **1994**, *23*, 509 - 539.
- [5] J. A. Spudich, *Nature* **1994**, *372*, 515 - 518.
- [6] I. Rayment, H. M. Holden, *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19*, 129 - 134.
- [7] a) K. E. Drexler, *Engines of creation. The coming era of nanotechnology*, Fourth Estate Ltd., London, **1990**; b) K. E. Drexler, C.Peterson, G.Pergamit, *Experiment Zukunft. Die nanotechnologische Revolution*, Addison-Wesley, Bonn, **1994** ;c) E. W. Taylor, *Science* **1993**, *261*, 35 - 36.
- [8] S. Ijima, *Nature* **1991**, *56*, 354.
- [9] <http://www.br-online.dewissen-bildungthemananoroehren.xml1.jpg>
- [10] O. Safarowsky, M. Nieger, R. Fröhlich, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1616; O. Safarowsky, M. Nieger, R. Fröhlich, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1699.
- [11] Y. Okamoto, R. Aburatani, S. Miura, K. Hatada, *J. of Liq. Chromatogr.* **1987**, *10*, 1613.
- [12] A. Kaufmann, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn, **2003**.
- [13] R. Däppen, H. Arm, V. R. Meyer, *J. Chromatography* **1986**, *373*, 1.
- [14] W. H. Pirkle, R. Däppen, *J. of Chromatogr.* **1987**, *404*, 107.
- [15] F. Vögtle, O. Lukin, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1480 - 1501.
- [16] H. Fakhrnavabi, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn, **2005**.
- [17] a) E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis* **1978**, 155 - 158; b) F. Vögtle, N. Feuerbach, *Top. Curr. Chem.* **1998**, *197*, 1 - 18.
- [18] Die Abkürzung POPAM steht für Poly(propylamin), dieses beschreibt den sich immer wiederholenden Baustein des Dendrimers. Oft sieht man auch die strukturell gleichbedeutende Abkürzung PPI, für Poly(propylenimin). Das Produkt wird kommerziell von DSM als AstramolTM vertrieben.
- [19] a) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.* **1985** (Tokyo), *17*, 117 - 132; b) D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard III, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 119 - 157; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 138 - 175.
- [20] F. Vögtle, H. Fakhrnavabi, O. Lukin, S. Müller, J. Friedhofen, C. A. Schalley, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4717 - 4724.
- [21] E. Regis, *Nano. Remaking the world atom by atom*, Bantam Books, New York, **1995**.
- [22] M. Groß, *Nature* **1995**, *373*, 105 - 106.
- [23] M. Kam, D. Perl-Treves, R. Sfez, L.Addadi, *Journal of Molecular Recognition* **1994**, *7*, 257 - 264.
- [24] A. Ciechanover, A. L. Schwartz, *FASEB Journal* **1994**, *8*, 182 - 191.
- [25] A. J. Doig, D. H. Williams, *Journal of Molecular Biology* **1991**, *217*, 389 - 398.
- [26] N. Muller, *Trends in Biochemical Sciences* **1992**, *17*, 459 - 463.
- [27] L. Echegoyen, *Nature* **1994**, *369*, 276 - 277.

- [28] a) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. M. Buehler, *Nature* **1994**, 369, 301--304; b) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, 366, 324 - 327.
- [29] a) J. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, 350, 631--633; b) Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1661.
- [30] R. A. Bissell, E. Cordova, A.E. Kaifer, J.F. Stoddart, *Nature* **1994**, 369, 133-137.
- [31] F. W. Lichtenthaler, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2456 - 2467.
- [32] D. E. Koshland, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2468 - 2472.
- [33] S. E. Brenner und, A. Berry, *Protein Sci.* **1994**, 3, 1871 - 1882.
- [34] M.R. Ghadiri, M.A. Case, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1663 - 1666.
- [35] H.-B. Kraatz, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2143 - 2144.
- [36] A. Pessi, *Nature* **1993**, 362, 367 - 369.
- [37] D. E. Robertson, *Nature* **1994**, 368, 425 - 432.
- [38] T. E. Creighton, *Proteins. Structures and molecular properties* (2nd ed.), W.H. Freeman and Co., New York, **1993**.
- [39] L. Stryer, *Biochemie* (4. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1991**.
- [40] H. L. Anderson, A. Bashall, K. Bashall, M. McPartlin, J.K.M. Sanders, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 445 - 447.
- [41] C.J. Walter, J.K. Sanders, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 223 - 225.
- [42] <http://people.cryst.bbk.ac.uk>; *Expeditionen in den Nanokosmos. Die technologische Revolution im Zellmaßstab*
- [43] A. Sobanski, R. Schmieder, F. Vögtle, *Chemie in unserer Zeit* **2000**, 3, 160 - 169.
- [44] a) www.jaxshells.org; b) D. A. Walba, *Tetrahedron* **1985**, 41, 3161.
- [45] a) Lord Kevin, *Baltimore Lectures*, **1884**, 436; *Baltimore Lectures, Appendix H*, **1904**, 439; b) H. Brunner, *Rechts oder Links*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **1999**.
- [46] a) L. Pasteur, *Comp. Rend. Paris* **1848**, 26, 535 - 538; b) E. L. Eliel, S. H. Wilen, L. N. Lander, *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley, New York, **1994**.
- [47] L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 159 - 176.
- [48] D. Hanein, B. Geiger, L. Addadi, *Science* **1994**, 263, 1413 - 1416.
- [49] M. Kam, D. Perl-Treves, D. Caspi, L. Addadi, *FASEB Journal* **1992**, 6, 2608 - 2613.
- [50] L. F. Tietze, T. Eicher, *Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium* (2. Auflage), Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, New York, **1991**.
- [51] E. L. Malus, *Mém. Soc. d'Arcueil*, **1808**, 2, 143.
- [52] D. A. Arago, *Mém. Class. Sci. Math. Phys. Impér. France*, **1811**, 12, 93 - 115.
- [53] J. B. Biot, *Ann. Chem. Phys.* **1815**, 4, 90; *Mém. Acad. Sci.* **1817**, 2, 41.
- [54] A. Fresnel, *Bull. Sci. Soc. Philomathique* **1824**, 147, 158.
- [55] W. Haidinger, *Ann. Phys.* **1847**, 70, 531.
- [56] a) A. Cotton, *Comp. rend.* **1895**, 120, 989; b) A. Cotton, *Ann. Chim. Phys.* **1896**, 8, 347.
- [57] J. C. Maxwell, *Philos. Trans.* **1865**, 155, 459.
- [58] G. Pawlitzki, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, Bonn, **2003**.
- [59] J. B. Biot, *Mém. Acad. Sci. France* **1838**, 15, 93.
- [60] A. F. Drake, *J. Phys.* **1986**, E19, 170.
- [61] M. Tswett, *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci. Biol. Sect.* **1903**, 14, 6.

8. Literaturverzeichnis

- [62] K. Beneke, *Mitteilungen der Kolloid-Gesellschaft*, Band VIII, Verlag Reinhard Knof, Nehnten, **1999**, S. 216.
- [63] E. Soczewinski, *Chem. Anal. (Warsaw)* **2003**, *48*, 345.
- [64] M. Tswett, *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **1906**, *24*, 316.
- [65] Van Deemter, *Chem. Eng. Su.* **1956**, *5*, 271.
- [66] A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, *Biochem. J.* **1941**, *35*, 1358.
- [67] V. R. Meyer, *Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*, Otto Salle Verlag GmbH & Co, Frankfurt am Main, **1999**.
- [68] W. Wainer, *Trends Anal. Chem.* **1987**, *6*, 125-134.
- [69] W. H. Pirkle, J. M. Finn, J. L. Schreiner, B.C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3964 – 3966.
- [70] kostenpflichtige Chirbase-Datenbank <http://chirbase.u-3mrs.fr>
- [71] G. Hesse, R. Hagel, *Chromatographia* **1973**, *6*, 277 – 280.
- [72] H. M. Hyun, J. S. Jin, H. J. Koo, W. Lee, *J. Chromatogr. A* **1999**, *837*, 75 – 82.
- [73] Säulenname der Firma Daicel.
- [74] G. Blaschke, *Chem. Ber.* **1974**, *107*, 237 – 252.
- [75] Y. Okamoto, K. Suzuki, K. Otha, K. Hatada, H. Yuki, *Amer. Chem. Soc* **1979**, *101*, 4765 – 4766.
- [76] D. W. Armstrong, W. DeMond, A. Alak, W. L. Hinze, T. E. Riehl, K. H. Bui, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 234 – 237.
- [77] K. Fujimura, T. Ueda, T. Ando, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 446 – 450.
- [78] Y. Kawaguchi, M. Tanaka, M. Nakae, K. Funazo, T. Shono, *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1852 – 1857.
- [79] K. Cabrera, D. Lubda, *GIT Spezial Chromatographie* **1992**, *2*, 77 – 79.
- [80] D. W. Armstrong, J. R. Faulkner Jr. S. M. Han, *J. Chromatogr.* **1988**, *452*, 323 – 330.
- [81] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Yamamoto, K. Hatada, *Chem. Lett.* **1984**, 739-742.
- [82] Y. Okamoto, R. Aburatini, T. Fukumoto, K. Hatada, *Chem. Lett.* **1987**, 1857 – 1860.
- [83] Y. Okamoto, T. Senoh, H. Nakane, K. Hatada, *Chirality* **1989**, *1*, 216 – 222.
- [84] Y. Okamoto, M. Kawashima, K. Hatada, *J. Chromatogr.* **1986**, *363*, 173 – 186.
- [85] A. Ichida, T. Shibata, I. Okamoto, Y. Yuki, H. Namikoshi, Y. Toga, *Chromatographia* **1984**, *19*, 280 – 284.
- [86] Y. Okamoto, R. Aburatani, Y. Kaida, K. Hatada, *Chem. Lett.* **1988**, 1125 – 1128.
- [87] A. Ishikawa, T. Shibata, *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 859 – 878.
- [88] C. Vaccher, E. Fourmaintraux, E. Belloli, M.-P. Vaccher, C. Beaubat und J.-P. Bonte, *J. Chromatogr. A* **1998**, *824*, 15 – 23.
- [89] A. L. van Overbeke, W. R. G. Baeyens, A. Beyaert, H. Y. Aboul-Enein, H. Oda, *J. Kiq. Chrom. Rel. Technol.* **1997**, *20*, 693 – 705.
- [90] C. Vaccher, E. Fourmaintraux, E. Belloli, M.-P. Vaccher, C. Beaubat und J.-P. Bonte, *Chromatographia* **1998**, *48*, 790 – 796.
- [91] T. Wang und Y. W. Cheng, *J. Chromatogr. A* **1999**, *855*, 411 – 421.
- [92] J.G. Ning, *J. Chromatogr. A* **1998**, *805*, 309 – 314.
- [93] R. Ferretti, B. Gallinella, F. La Torre, L. Turchetto, *J. Chromatogr. B* **1998**, *710*, 157 – 164.
- [94] M. Kummer, G. Werner, *J. Chromatogr. A* **1998**, *825*, 107 – 114.
- [95] E. Küsters, J. Nozulak, *Chromatographia* **1998**, *47*, 440 – 442.
- [96] R. Kaliszan, *J. Chromatogr. B* **1998**, *715*, 229 – 244.

- [97] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 101 – 109.
- [98] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A* **1994**, *670*, 39 – 49.
- [99] Y. Okamoto, M. Kawshima, K. Hatada, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5357 – 5359.
- [100] W. H. Pirkle, D. W. House, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1957 – 1960.
- [101] W. H. Pirkle, C. J. Welch, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 138 – 140.
- [102] W. H. Pirkle, J. M. Finn, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4037 – 4040.
- [103] W. H. Pirkle, M. H. Hyun, B. Banks, *J. Chromatogr.* **1984**, *316*, 585 – 604.
- [104] C. A. White, G. Subramanian, *A practical approach to chiral separation by liquid chromatography*, VCH Weinheim, **1994**, 1 – 17.
- [105] C. E. Dalglish, *J. Chem. Soc.* **1952**, *137*, 3940 – 3942.
- [106] J. Hermansson, *J. Chromatogr.* **1983**, *269*, 71 – 80.
- [107] S. Allenmark, B. Bomgren, H. Boren, *J. Chromatogr.* **1983**, *264*, 63 – 68.
- [108] E. Domenici, C. Bertucci, P. Salvadori, I. W. Wainer, *Chirality* **1990**, 263 – 268.
- [109] J. Hermansson, *J. Chromatogr.* **1985**, *325*, 379 – 384.
- [110] G. Schill, I. W. Wainer, S. A. Barkan, *J. Chromatogr.* **1986**, *365*, 73 – 88.
- [111] J. Hermansson, *Trends Anal. Chem.* **1989**, *8*, 251 – 259.
- [112] T. Miwa, T. Miyakawa, M. Kayano, *J. Chromatogr.* **1987**, *408*, 316 – 322.
- [113] D. E. Nichols, R. A. Glennon, *Hallucinogenes: Neurochemical, behavioral and clinical Perspectives*, Raven Press, New York, **1984**, 95 – 142.
- [114] D. W. Armstrong, A. Alak, W. DeMond, W. L. Hinze, T. E. Riehl, *J. Liq. Chromatogr.* **1985**, *8*, 261 – 269.
- [115] D. W. Armstrong, S. Chen, C. Chang, S. Chang, *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, *15*, 545 – 556.
- [116] V. A. Davankov, S. V. Rogozhin, A. V. Semechkin, T. P. Sachkova, *J. Chromatogr.* **1973**, *82*, 359 – 365.
- [117] V. A. Davankov, *Adv. Chromatogr.* **1980**, *18*, 139 – 195.
- [118] G. Gübitz, W. Jellenz, G. Löfler, W. Santi, *J. High Resolut. Chromatogr.* **1979**, *2*, 145 – 146.
- [119] G. Gübitz, W. Jellenz, W. Santi, *J. Liq. Chromatogr.* **1981**, *4*, 701 – 712.
- [120] G. Gübitz, W. Jellenz, W. Santi, *J. Chromatogr.* **1981**, *203*, 377 – 384.
- [121] G. Gübitz, *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, *9*, 519.
- [122] W. Dawankow, *Ligandenaustauschchromatographie und Gewinnung optisch aktiver Verbindungen*, Ideen des exakten Wissens, **1972**, 319 – 325.
- [123] Katalog sowie Informationsblatt von 2005 der Firma Daicel.
- [124] K. Cabrera, G. Schwinn, *Kontakte* (Darmstadt) **1989**, *3*, 3 – 8.
- [125] K. Cabrera, D. Lubda, *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 433 – 438.
- [126] M. Pawlowska, J. Zukowski, *J. High resolute. Chromatogr.* **1991**, *14*, 138 – 140.
- [127] J. Debowski, J. Jurczak, D. Sybilska, *J. Chromatogr.* **1983**, *282*, 83 – 88.
- [128] K. Shimada, T. Oe, Y. Hirose, Y. Komine, *J. Chromatogr.* **1997**, *478*, 339 – 347.
- [129] J. Zukowski, D. Sybilska, D. Jurczak, *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2215 – 2219.
- [130] J. Debowski, D. Syblaska, *J. Chromatogr.* **1986**, *353*, 409 – 416.
- [131] D. Sybilska, J. Debowski, J. Jrzak, J. Zukowski, *J. Chromatogr.* **1984**, *286*, 163 – 170.
- [132] T. Hiroto, K. Minato, K. Ishii, N. Nishimura, T. Sato, *J. Chromatogr. A* **1994**, *673*, 37 – 43.

8. Literaturverzeichnis

- [133] K. Ikeda, T. Hamasaki, H. Kohno, T. Ogawa, T. Matsumoto und J. Sakai, *Chem. Lett.* **1989**, 1089 – 1090.
- [134] A. Ceccato, P. Hubert, P. Tullio, J.-F. Liégeois, A. Felikidis, J. Géczy, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 605 – 614.
- [135] D. T. Witte, J.-P. Franke, F. J. Bruggeman, D. Dijkstra, R.A. De Zeeuw, *Chirality* **1992**, *4*, 389 – 394.
- [136] U. Selditz, S. Copinga, J. P. Franke, H. Wikström und R. A. de Zeeuw, *Chirality* **1997**, 574 – 578.
- [137] J. A. Whatley, *J. Chromatogr. A* **1995**, *697*, 263 – 269.
- [138] I. W. Wainer, R. M. Stiffin, T. Shibata, *J. Chromatogr.* **1987**, *411*, 139 – 151.
- [139] I. W. Wainer, D. E. Drayer, *Drug stereochemistry: Analytical methods and pharmacology*. Marcel Dekker, New York, **1988**.
- [140] C. Facklam, A. Modler, *J. Chromatogr. A* **1994**, *664*, 203 – 211.
- [141] E. Francotte, R. M. Wolf, D. Lohmann, R. Mueller, *J. Chromatogr.* **1985**, *347*, 25 – 37.
- [142] R. Landsiedel, H. Frank, H. Glatt, A. Seidel, *J. Chromatogr. A* **1998**, *822*, 29 – 35.
- [143] M. Péter, A. Péter, J. Eycken, P. Csomós, G. Bernáth, F. Fülöp, *J. Chromatogr. A* **1998**, *816*, 123 – 129.
- [144] M. Hanna, V. Biasi, B. Bond, C. Salter, A. J. Hutt, P. Camilleri, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2092 – 2099.
- [145] H. Y. Aboul-Enein, L. I. Abou-Basha, S. A. Bakr, *Chirality* **1996**, *8*, 153 – 156.
- [146] T. O'Brien, L. Crocker, R. Thompson, K. Thompson, P. H. Toma, D. A. Conlon, B. Feibush, C. Moeder, G. Bicker, N. Grinberg, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1999 – 2007.
- [147] C. B. Ching, B. G. Lim, E. J. D. Lee, S. C. Ng, *Chirality* **1992**, *4*, 174 – 177.
- [148] W. Lindner, M. Rath, K. Stoschitzky, G. Uray, *J. Chromatogr.* **1989**, *487*, 375 – 383.
- [149] W. Lindner, B. Böhs, V. Seidel, *J. Chromatogr. A* **1995**, *697*, 549 – 560.
- [150] A. Affeld, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, **2000**.
- [151] www.schuelerakademie.de/dsa/2002/1/kurs13.html
- [152] E. Fischer, *Ber. Deutsch. Chem.*, **1894**, *3*, 2985.
- [153] A. L. Lehniger, *Prinzipien der Biochemie* (2. Auflage), Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, **1994**.
- [154] A. Werner, *Zeitschr. Anorg. Chem.* **1893**, *3*, 267.
- [155] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1347-1362.
- [156] D. Philp, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1242-1286.
- [157] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendritic Molecules*, VCH Weinheim, **1996**.
- [158] a) G. Decher, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1993**, *49*, 795-800; b) G. Decher, *Angw. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 138-175.
- [159] J. P. Mathias, E. E. Simanek, C. T. Seto, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1848.
- [160] E. M. Meijer, *Science* **1997**, *278*, 1601.
- [161] www.nanothinc.com/nanosci/what/whitesides/selfassembling.materials.html
- [162] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH Weinheim, **1995**.
- [163] H. L. Frisch, E. Wassermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *83*, 3789.
- [164] D. B. Amabilino, P. R. Ashton, A. S. Reder, N. Spencer, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1316.
- [165] A. Lüttrinhuis, F. Cramer, H. Prinzbach, F. M. Henglein, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1958**, *613*, 185.
- [166] R. S. Wylie, D. H. Macartney, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3136 – 3138.
- [167] G. Wenz, F. Wolf, M. Wagner, S. Kubik, *New J. Chem.* **1993**, *17*, 729-738.
- [168] H. Ogino, *New J. Chem.* **1993**, *17*, 683 - 688.
- [169] G. Schill, N. Schweickert, H. Fritz, W. Vetter, *Chem. Ber.* **1988**, *121*, 961 - 970.

- [170] J. S. Manka, D. S. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2440.
- [171] a) C. O. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *Angewandte Chemie* **1989**, *101*, 192; b) C.O. Dietrich-Buchecker, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1202 - 1204.
- [172] a) O. Safarowsky, M. Nieger, R. Fröhlich, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1699-1701; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1616-1618; b) F. Vögtle, A. Hüntten, E. Vogel, S. Buschbeck, O. Safarowsky, J. Recker, A.-H. Parham, M. Knott, W.M. Müller, U. Müller, Y. Okamoto, T. Kubota, W. Lindner, E. Francotte, S. Grimme, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2534-2537; *Int. Ed.* **2001**, *40/13*, 2468-2471.
- [173] G. Schill, H. Zollenkopf, *Nachr. Chem. Techn.* **1967**, *15*, 149.
- [174] G. Schill, *Catenanes, Rotaxanes and Knots*, Academic Press, New York, **1971**.
- [175] J. Breitenbach, *Spektrum der Wissenschaft* **1993**, *9*, 26 - 30.
- [176] P. Hodge, *Nature* **1993**, *362*, 18--19.
- [177] H.-B. Meikelburger, W. Jaborek, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1609 - 1614.
- [178] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W.A. Goddard, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 119 - 157.
- [179] D. A. Tomalia, P. R. Dvornic, *Nature* **1994**, *372*, 617 - 618.
- [180] www.almaden.ibm.com
- [181] J. Issberner, R. Moors, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2507 - 2514.
- [182] J. F. G. A. Jansen, E. M. M. de Brabander-van den Berg, E. W. Meijer, *Science* **1994**, *266*, 1226 - 1229
- [183] J. W. J. Knapen, *Nature* **1994**, *372*, 659 - 663.
- [184] www.wikipedia.de
- [185] a) A. Sobanski, R. Schmieder, F. Vögtle, *Chemie in uns. Zeit* **2000**, *3*, 160-169; b) O. Safarowsky, B. Windisch, A. Mohry, F. Vögtle, *J. Prakt. Chem.* **2000**, *342*, 437-444.
- [186] J.-P. Sauvage, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 319-327.
- [187] E. Vogel, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, **2001**.
- [188] C. Dietrich-Buchecker, G. Rapenne, J.-P. Sauvage, *Chem. Commun.* **1997**, 2053-2054.
- [189] R. F. Carina, C. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9110-9116.
- [190] C. A. Hunter, P.C. Mayers, *Nature* **2001**, *411*, 763.
- [191] J. E. Mueller, S. M. Du, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6306-6308.
- [192] N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9652-9655.
- [193] E. Flapan, N. C. Seeman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2249-2250.
- [194] S. M. Du, B. D. Stollar, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1194-1200.
- [195] A. Hüntten, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, **2001**.
- [196] S. Buschbeck, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, **2002**.
- [197] O. Lukin, T. Kubota, Y. Okamoto, F. Schelhase, A. Yoneva, W.M. Müller, U. Müller, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4681-4684.
- [198] O. Lukin, W.M. Müller, U. Müller, A. Kaufmann, C. Schmidt, J. Leszczynsky, F. Vögtle, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3507-3517.
- [199] O. Lukin, J. Recker, A. Böhmer, W. M. Müller, T. Kubota, Y. Okamoto, M. Nieger, R. Fröhlich, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 451.
- [200] O. Lukin, T. Kubota, Y. Okamoto, A. Kaufmann, F. Vögtle, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2804-2810.
- [201] O. Lukin, A. Yoneva, F. Vögtle, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1236-1238.
- [202] E. Francotte: persönliche Mitteilung.

8. Literaturverzeichnis

- [203] I. W. Wainer, M. C. Alembik, *J. Chromatogr.* **1986**, 358, 85.
- [204] B. Chankvetadze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. of Chromatogr. A* **1995**, 694, 101.
- [205] Y. Okamoto, T. Ohashi, Y. Kaida, E. Yashima, *Chirality* **1993**, 5, 616.
- [206] Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1072; Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 1020.
- [207] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Chem. Lett.* **2000**, 352.
- [208] E. Yashima, H. Fukaya, Y. Okamoto, *J. of Chromatogr. A* **1994**, 677, 11.
- [209] N. Enomoto, S. Furukawa, Y. Ogasawara, H. Akano, Y. Kawamura, E. Yashima, Y. Okamoto, *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2789.
- [210] J. Recker, W.M. Müller, U. Müller, T. Kubota, Y. Okamoto, M. Nieger, F. Vögtle, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4434-4442.
- [211] R. Schmieder, *Dissertation*, Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität, **2000**.
- [212] J. H. Friedhofen, F. Vögtle, *New J. of Chem.* **2006**, 30, 32-34.

9. Publikationen

9.1 Veröffentlichungen im Rahmen der Diplomarbeit

K. H. Dötz, J. Stendel Jr., S. Müller, M. Nieger, S. Ketrat, M. Dolg,

Organometallics **2005**, *24*, 3219-3228

Haptotropic Metal Migration in Densely Substituted Hydroquinoid Phenanthrene Cr(CO)₃ Complexes

9.2 Veröffentlichungen im Rahmen der Promotion

F. Vögtle, H. Fakhrnabavi, O. Lukin, S. Müller, J. Friedhofen, C. A. Schalley,

Eur. J. Org. Chem. **2004**, 4717-4724,

Towards a Selective Functionalization of Amino-Terminated Dendrimers,

9.3 Posterbeiträge

J. Recker, A. Böhmer, S. Buschbeck, A. Kaufmann, O. Mermagen, S. Müller, F. Vögtle,

Molekulare Knoten durch Templatsynthese und deren topologische Chiralität,

SFB 624 Begutachtung, Jan. 2001, Bonn

U. Hahn, G. Pawlitzki, A. Kaufmann, O. Lukin, S. Buschbeck, J. Recker, A. Böhmer, S. Bitter,

F. Schelhase, R. Henkel, O. Mermagen, S. Müller, F. Vögtle,

Chirality and Topology,

Chiralitäts-Symposium, Sept. 2002, Hamburg

9. Publikationen

F. Vögtle, J. Recker, O. Lukin, W. M. Müller, U. Müller, O. Mermagen, J. Brüggemann, A. Böhmer, S. Buschbeck, A. Kaufmann, S. Müller, J. Marrero-Tellado,
Topologically Chiral Molecular Knots: Templatation, Functionalization, Conformational Dynamics,
SFB 624 Symposium, Dez. 2002, Walberberg

F. Vögtle, O. Lukin, W. M. Müller, A. Böhmer, O. Mermagen, J. Brüggemann, A. Yoneva, A. Kaufmann, S. Müller,
Topologically Chiral Molecular Knots: Templatation, Functionalization, Conformational Dynamics,
SFB 624 „ Templates – From the design of chemical templates towards reaction control“
Symposium, Okt. 2003, Bonn

F. Vögtle, O. Lukin, W. M. Müller, A. Böhmer, O. Mermagen, J. Brüggemann, A. Yoneva, A. Kaufmann, S. Müller,
Topologically Chiral Molecular Knots and Their Assemblies: Templatation and Functionalization,
Joint Workshop “Templates meet Catalysis, Juni 2004, Bonn

K. H. Dötz, J. Bennewitz, J. Schneider, J. Stendel jr., S. Ketrat, S. Müller, M. Dolg,
Chromium-Templated Synthesis and Haptotropic Metal Migration in Extended Arenes,
Joint Workshop “Templates meet Catalysis, Juni 2004, Bonn

F. Vögtle, O. Lukin, W. M. Müller, A. Böhmer, J. Brüggemann, G. Richardt, S. Müller
Molekulare Knoten - durch Templatsynthese und deren topologische Chiralität,
SFB 624 „Template – Vom Design chemischer Schablonen zur Reaktionssteuerung“
Begutachtung, Feb. 2005, Bonn

F. Vögtle, J. Brüggemann, A. Böhmer, S. Bitter, W. M. Müller, G. Richardt, S. Müller, A. Yoneva, L. De Cola, H. Fuchs, F. Vergeer,
Templatsynthesen zu Molekularen Knoten,
SFB 624 Symposium, Nov. 2005, Schleiden

10. Dank

Ich bedanke mich bei:

Allen Mitarbeitern von Herrn *Prof. Dr. Fritz Vögtle* und *Prof. Dr. Christoph Schalley* für die Hilfsbereitschaft und vielfältige Unterstützung.

Herrn *Prof. Dr. Fritz Vögtle* und *Priv. Doz. Christoph Schalley* für die gewährte Unterstützung, die anregenden Diskussionen und Ratschläge.

Meinen derzeitigen und ehemaligen Laborkollegen für viel unterhaltsame Momente *Jörg Friedhofen, Dr. Gabriele Richardt, Karsten Portner, Jeroen an Heijst, Jens Brüggemann, Albena Yoneva, Frauke Schelhase, Athanasia. Böhmer, Roman Henkel, Dr. Stephan Bitter, Ute und Walter Müller, Friedhelm Luppertz, Oliver Mermagen, Dr. Astrid Kaufmann, Dr. Nicole Werner* und *Dr. Patrick Dragut, Dr. Gregor Pawlitzki*.

Jeroen an Heijst und *Dr. Manfred Müller* für das sorgfältige und konstruktive Korrekturlesen.

Dem MALDI-Team *Thorsten Felder, Roman Henkel, Dr. Stephan Bitter* und *Jens Brüggemann* für die sachkundige Aufnahme zahlreicher MALDI-Spektren.

Prof. Dr. Christoph Schalley, Dr. M. Engesser sowie *Dr. G. Eckhardt* und seinem Team für die Aufnahme der Massenspektren.

Der zentralanalytischen Abteilung für die Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren.

Jeroen van Heijst, der mir bei meinen Computerproblemen geholfen hat.

Jörg Friedhofen, Jeroen an Heijst, Jens Brüggemann, Athanasia. Böhmer und *Dr. Stephan Bitter* für die zur Verfügung gestellten Substanzen.

Jens Brüggemann für die zur Verfügungstellung zahlreicher Knoten sowie Octamer-Zeichnungen.

Ulrike Blank, Dr. Gabriele Richardt und Steffi Rabus für ihre stetige Hilfsbereitschaft und gute Laune.

Abschließend meinen Eltern, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen mein Studium und die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichten.