

**Untersuchung interkonvertierender
Stereoisomere und Reaktionen höherer
Ordnung sowie Bestimmung der
kritischen Mizellbildungskonzentration
mittels Kapillarelektrophorese**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Sarah Walz

aus Schopfheim

-2016-

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

M. Sc. Sarah Walz

aus Schopfheim

Tag der mündlichen Prüfung:

18. Juli 2016

**Untersuchung interkonvertierender
Stereoisomere und Reaktionen höherer
Ordnung sowie Bestimmung der
kritischen Mizellbildungskonzentration
mittels Kapillarelektrophorese**

Dekan

Gutachter

Prof. Dr. Gerald Linti

Prof. Dr. Oliver Trapp

Prof. Dr. Dirk-Peter Herten

Die experimentellen Durchführungen der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Februar 2013 bis April 2016 am Organisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg unter Anleitung von Prof. Dr. Oliver Trapp durchgeführt.

Für Sven und meine Familie

*Die Neugier steht immer an
erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.*

Galileo Galilei

Kurzfassung

Die vorliegende Dissertationsschrift gliedert sich in vier Abschnitte und befasst sich mit der Bestimmung der Rotationsbarrieren interkonvertierender Stereoisomere sowie der Ermittlung der kritischen Mizellbildungskonzentrationen (CMC). Darüber hinaus wurden zwei Reaktionen höherer Ordnung mittels Kapillarelektrophorese (CE) untersucht.

Erstmalig konnte die Barriere einer Interkonversion zwischen drei interkonvertierenden Spezies des Captoprildisulfids, dem Dimer eines Prolin-basierenden Medikaments, bestimmt werden. Bei diesem Isomerisierungsprozess handelt es sich um eine *E/Z*-Isomerisierung der im Molekül vorliegenden Prolin-Peptidbindung. Da eine direkte Berechnung aus dynamischen HPLC-Experimenten nicht möglich ist, wurde die Barriere durch Vergleich mit simulierten Chromatogrammen des Programms *ChromXWin* erhalten. So konnte die Rotationsbarriere zwischen dem *EE*-Konformer und den enantiomeren *EZ*- und *ZE*-Konformationen auf $\Delta G^\ddagger = 84.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ bestimmt werden. Für den zweiten Interkonvertierungsprozess ausgehend vom Enantiomerenpaar *EZ*- und *ZE*-Captoprildisulfid konnte eine Barriere von $\Delta G^\ddagger = 85.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ermittelt werden.

Im zweiten Abschnitt wird von der Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von Natriumdodecylsulfat (SDS) in einem Wasser-Acetonitril-Gemisch berichtet. Zur Bestimmung der CMC kamen unterschiedliche auf der Kapillarelektrophorese (CE) basierende Techniken zum Einsatz. Zum einen wurde die Leitfähigkeit der Lösung mit steigendem SDS-Gehalt gemessen und zum anderen wurde die Änderung der elektrophoretischen Mobilität von unterschiedlichen Markerverbindungen (Naphthalin, Rhodamin 123 und Coumarin 153) in Anwesenheit von SDS verfolgt. Zusätzlich wurde die Änderung der elektrophoretischen Mobilität eines Systempeaks in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration zur CMC-Bestimmung herangezogen. Die erhaltenen Werte sind in guter Übereinstimmung miteinander. Mit einigen dieser Techniken gelang es zusätzlich, eine Mizellbildung bis zu einem Acetonitril-Gehalt von 35 % (ACN, v/v) nachzuweisen.

Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf Ringspannungs-begünstigte Azid-Alkin-Cycloadditionen (SPAAC) und deren Geschwindigkeitskonstante untersucht. Die Reaktion wurde unter Einsatz verschiedener Azide bei unterschiedlichen pH-Werten in wässrigem Medium mit einem Zusatz von 28 % ACN zur Löslichkeitsvermittlung durchgeführt. Zusätzlich wurde die Auswirkung der Anwesenheit von SDS-Mizellen auf die Geschwindigkeitskonstante untersucht, wobei abhängig von der Hydrophobie des Azids eine Steigerung oder ein Rückgang der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden konnte. Aufgrund der starken Wechselwirkungen zwischen Reaktanden und SDS-Molekülen war es möglich die Reaktion in Wasser unter Zusatz von SDS unterhalb der CMC durchzuführen, wobei auf den Einsatz von cytotoxischem ACN als organisches Co-Solvens verzichtet werden konnte. Durch geeignete Wahl der Reaktanden, des Reaktionsmediums, sowie des pH-Wertes konnte die

Reaktionsgeschwindigkeit um einen Faktor von 300 gesteigert werden. Um die Verwendung dieser Reaktion in biologischen Markierungsexperimenten zu ermöglichen, wurden abschließend erfolgreich *on-column* Reaktionen durchgeführt.

Der letzte Teil beschäftigt sich mit der *o*-Phthaldialdehyd-Derivatisierung (OPA) von Aminosäuren am Beispiel von L-Phenylalanin. Hierbei konnte eine pH-Abhängigkeit der Reaktion beobachtet werden, wobei diese nicht nur Auswirkungen auf die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch auf die Bildung von Nebenprodukten hat. Durch ausführliche CE-MS/MS-Experimente gelang es, einige Nebenprodukte der Reaktion zu identifizieren. Zudem wurde der Einfluss von unterschiedlichen Reaktandenverhältnissen auf die Produktbildung untersucht. Abschließend wurde die Derivatisierungsreaktion erfolgreich *on-column* durchgeführt, sodass solche Derivatisierungen künftig online im CE-Setup erfolgen können.

Abstract

The present thesis consists of four parts and deals with the determination of isomerization barriers and the investigation of the critical micelle concentration (CMC). Additionally, two reactions of higher order were studied using capillary electrophoresis (CE).

For the first time, it was possible to determine the isomerization barrier of three interconverting captopril disulfide species, that is the dimer of a proline based drug. Due to the proline moiety in captopril disulfide, the isomerization concerns a *E/Z*-isomerization of the proline peptide bond. Since it is not possible to get direct access to the isomerization barrier based on dynamic HPLC measurements, the barrier was determined by comparison of the experimental chromatograms with simulated ones derived by using *ChromXWin*. Hence, the isomerization barrier of the *EE*-isomer into the enantiomeric *EZ*- and *ZE*-conformers could be calculated to $\Delta G^\ddagger = 84.5 \text{ kJ mol}^{-1}$. The second interconversion involves the isomerization of the *EZ*- and *ZE*-enantiomers into the *ZZ*-isomer with an isomerization barrier of $\Delta G^\ddagger = 85.5 \text{ kJ mol}^{-1}$.

The second part of this work deals with the investigation of the critical micelle concentration (CMC) of sodium dodecyl sulfate (SDS) in a water-acetonitrile-solvent mixture. Based on the capillary electrophoresis (CE) setup, the CMC was determined using different techniques: conductivity measurements, investigation of the change of the electrophoretic mobility using naphthalene, rhodamine 123 and coumarin 152 as marker substances in presence of SDS and additionally the investigation of the change of the electrophoretic mobility by tracing a system peak. The CMCs determined by these methods are in good agreement and it was also possible to verify a CMC value up to 35 % of acetonitrile (ACN).

In the third part, the influence of different factors on the strain-promoted azide-alkyne-cycloaddition (SPAAC) reactions and their reaction rates have been investigated. The reactions were performed using different azides under various pH values in an aqueous media. For solubility reasons, 28 % ACN was used to guarantee that all reactants were completely dissolved. Additionally, the impact of the presence of SDS micelles on the reaction rate was studied, whereas an acceleration or a decrease in the reaction kinetics could be observed depending on the hydrophobicity of the utilized azide compound. As a consequence of the strong interaction between reactants and SDS molecules, it was possible to perform the reaction solely in water with addition of SDS below the CMC value. Consequently, the use of cytotoxic ACN as organic modifier could be abandoned. By careful selection of reactants and reaction conditions, it was possible to tune the reaction and accelerate it by a factor of 300. To enable the use of this reaction in biological labelling experiments, *on-column* reactions were successfully performed.

Moreover, the derivatization reactions of the amino acid L-phenylalanine with *o*-phthalaldehyde (OPA) were studied. The obtained results indicate that the reaction is pH dependent. The pH dependency does not only affect the reaction rate but also the formation of different side products.

By performing detailed CE-MS/MS experiments, it was possible to identify some of these formed side products. Furthermore, by varying the respective reactant equivalents, the influence on the product formation was studied. Finally, the reaction was successfully performed *on-column* paving the way for future derivatization reactions of amino acids online in a CE setup.

Veröffentlichungen

Sarah Walz, Sylvia Weis, Mareike Franz, Frank Rominger, Oliver Trapp, *Electrophoresis* **2015**, 36, 796-804.

Investigation of the Enantiomerization Barriers of the Phthalimidone Derivatives EM12 and Lenalidomide by Dynamic Electrokinetic Chromatography

Jana Steflova, Martin Stefl, Sarah Walz, Michael Knop, Oliver Trapp, *Electrophoresis* **2016**, 37, 1287-1295.

Comprehensive Study on Critical Micellar Concentrations of SDS in Acetonitrile–Water Solvents

Konferenzbeiträge

Posterpräsentationen

22nd International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques and the 8th Nordic Separation Science Symposium (ITP2015, 8th NoSSS), Helsinki, Finnland

“Reliable Electrophoretic Method for Reaction Kinetics Monitoring of Strain-Promoted Alkyne Azide Click Reactions”

38th International Symposium on Capillary Chromatography (38th ISCC), Riva del Garda, Italien

“Stereodynamics of EM12, Lenalidomide and Captopril Disulfide: from Enantiomerization to Complex Isomerization”

CE-Forum, Marburg, Deutschland

“Evaluation of Various Interconversion Profiles Determined by Dynamic Elektrokinetic Chromatography Using Unified Equation”

International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis 2013 (CECE 2013), Brno, Tschechien

“Investigation of the Interconversion Barriers of EM12 and Lenalidomide by DEKC”

Vortrag

26. Doktorandenseminar des Arbeitskreises Separation Science der GDCh-Fachgruppe Analytische Chemie, Hohenroda, Deutschland

„Verfolgung der Reaktionskinetik von Ringspannungs-begünstigten Azid-Alkin-Klickreaktionen mittels Kapillarelektrophorese“

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> (Atmosphärendruck-Chemische Ionisation)
BGE	Backgroundelektrolyt
CD	Cyclodextrin
CHES	<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CMC	<i>critical micelle concentration</i> (kritische Mizellbildungskonzentration)
CTAB	Cetylammoniumbromid
CZE	<i>capillary zone electrophoresis</i> (Kapillarzonenelektrophorese)
δ	chemische Verschiebung
d	Tag(e)
DNS-Cl	Dansylchlorid
DCE	dynamische Kapillarelektrophorese
DEMA	Diethylmethylamin
DEKC	dynamische elektrokinetische Chromatographie
DFT	Dichte-Funktional-Theorie
DGC	dynamische Gaschromatographie
DHPLC	<i>dynamic high performance liquid chromatography</i>
DM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltosid
DMEKC	dynamische mizellare elektrokinetische Chromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP-F	2,4-Dinitrofluorbenzol
DTAB	Dodecyltrimethylammoniumbromid
EE	Ethylacetat
EI	<i>electron impact</i> (Elektronenstoß-Ionisation)
EIC	<i>extracted ion chromatogram</i> (extrahiertes Ionenchromatogramm)
EMD	<i>electromigration dispersion</i> (Elektromigrationsverteilung)
EOF	Elektroosmotischer Fluss
eq.	Äquivalente
ESI	<i>electrospray ionization</i> (Elektrospray-Ionisation)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
h	Stunde(n)

HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i> (höchstes besetztes Molekülorbital)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
I_s	Ionenstärke
J	Kopplungskonstante
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i> (niedrigstes unbesetztes Molekülorbital)
NDA	Naphthalin-2,3-dicarboxyaldehyd
MEKC	mizellare elektrokinetische Chromatographie
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
<i>o</i>	ortho
oc	<i>on-column</i>
ocRCE	<i>on-column</i> Reaktionskapillarelektrophorese
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
Phe	L-Phenylalanin
PE	Petrolether
ppm	<i>parts per million</i>
R_f	Retentionsfaktor
refl	<i>reflux</i> (Rückfluss)
SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPAAC	<i>Strain-promoted azide-alkyne-cycloaddition</i> (Ringspannungs-begünstigte Azid-Alkin-Cycloaddition)
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymehtyl)-aminomethan
RT	Raumtemperatur
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Kenntnisstand	1
1.1	Kapillarelektrophorese	1
1.1.1	Mizellare elektrokinetische Chromatographie	5
1.1.2	<i>On-column</i> Reaktionskapillarelektrophorese.....	11
1.1.3	Dynamische Kapillarelektrophorese und Chromatographie.....	14
1.2	<i>E/Z</i> -Isomerisierung von Prolin-Peptidbindungen	17
1.3	1,3-dipolare Cycloadditionen.....	20
1.3.1	<i>Huisgen</i> Cycloaddition.....	20
1.3.2	Ringspannungs-begünstigten Azid-Alkin-Cycloaddition.....	21
1.4	Derivatisierung von Aminosäuren in der Kapillarelektrophorese ...	28
2	Zielsetzung.....	45
3	Ergebnisse und Diskussion	49
3.1	<i>E/Z</i> -Isomerisierung von Prolin-Peptidbindungen	49
3.2	Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration mittels Kapillarelektrophorese	56
3.2.1	Bestimmung der CMC mittels Leitfähigkeitsmessung im CE-Setup.....	56
3.2.2	Bestimmung der CMC mittels Mobilitätsmethode der MEKC.....	59
3.2.3	Bestimmung der CMC anhand der Mobilitätsänderung des Systempeaks	63
3.2.4	Vergleich der erhaltenen CMC-Werte.....	65
3.3	Ringspannungs-begünstigte Azid-Alkin-Cycloaddition.....	68
3.3.1	Bestimmung der pK_a -Werte.....	68
3.3.2	Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit aus den <i>off-column</i> CE-Messungen....	73
3.3.3	Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Reaktanden und SDS- Molekülen.....	82
3.3.4	Einfluss von Mizellen auf die Reaktionsgeschwindigkeit.....	84
3.3.5	<i>On-column</i> Experimente.....	91

3.4	Derivatisierung von Aminosäuren.....	94
3.4.1	Synthese des entsprechenden Phthalimidin-Derivats.....	94
3.4.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Derivatisierungsreaktion.....	96
3.4.3	CE-MS/MS-Experimente	100
3.4.4	Untersuchung der Reaktion mit einem OPA-Analogon.....	107
3.4.5	Einfluss des Verhältnisses der eingesetzten Reaktanden auf die Reaktion.....	110
3.4.6	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion.....	116
3.4.7	<i>on-column</i> Derivatisierungsreaktion	118
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	123
5	Experimenteller Teil	131
5.1	Allgemeine Angaben.....	131
5.2	Synthesen.....	134
5.2.1	Derivatisierung von Aminosäuren.....	134
5.2.1.1	(<i>S</i>)-2-(1-Oxoisoindolin-2-yl)-3-phenylpropionsäure.....	134
5.2.1.2	2,3-Dihydro-1 <i>H</i> -inden-1,2-diol.....	135
5.2.1.3	2-(2-Oxoethyl)benzaldehyd.....	136
5.3	Elektrophoretische und chromatographische Messbedingungen .	137
5.3.1	CE.....	137
5.3.2	ocRCE	138
5.3.3	DHPLC.....	138
5.3.4	CE-MS/MS	139
5.4	Herstellung der Puffer	139
5.5	Probenpräparation für kapillarelektrophoretische und chromatographische Messungen.....	139
5.5.1	Bestimmung der kritischen Mizellenbildungskonzentration.....	139
5.5.2	Click-Reaktion	140
5.5.3	Derivatisierung von Aminosäuren.....	140
6	Anhang	143
6.1	SPAAC-Reaktion.....	143

6.2	Derivatisierung von Aminosäuren.....	144
6.2.1	Parameter des Röntgenbeugungsexperiments	144
6.2.2	Verwendete Puffersysteme.....	145
7	Literaturverzeichnis.....	149

EINLEITUNG UND
KENNTNISSTAND

1 Einleitung und Kenntnisstand

Die Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) ist eine effiziente, leistungsstarke und vielseitig einsetzbare Separationstechnik. Neben Trennung von stereolabilen Verbindungen (Enantiomere,^[1,2] Rotamere^[3] und Atropisomere^[4]) wird die CE auch in Trennung von Biomolekülen^[5-7] eingesetzt. Die Anwendung von CE in der enantioselektiven Analyse wird in vielen Bereichen der chemischen und pharmazeutischen Industrie, wie beispielsweise in der pharmazeutischen Analyse, Lebensmittelüberwachung, Bioanalyse, Umweltanalyse und Analyse der Agrochemikalien, benötigt.^[8] Der Zusatz von chiralen Selektoren kann zum einen über den Backgroundelektrolyt erfolgen,^[9] oder durch Immobilisierung der chiralen Selektoren auf Kapillarewand.^[10-12]

Dabei ist es vor allem in der Lebensmittelüberwachung wichtig Gefahrstoffe zu identifizieren, beispielsweise können Amine in Gegenwart von Alkohol und Acetaldehyd physiologische Auswirkungen hervorrufen, die mitunter mit Kopfschmerzen, Erbrechen und Diarrhö einhergehen.^[13] Bereits 0.05–0.50 mg intravenöse beziehungsweise 3–8 mg subkutane Verabreichung von Aminen werden als toxisch für einen Erwachsenen angesehen.^[13] Hierbei ist CE eine effiziente Technik, da die Nachweisgrenzen im 10^{-8} M Bereich liegen.^[14]

Zudem findet die CE auch bei *on-column* Reaktionen, Katalysen und Derivatisierungen Verwendung.^[15-17]

1.1 Kapillarelektrophorese

Mit CE ist es möglich, organische und anorganische Ionen, neutrale Moleküle, chirale und achirale Substanzen, Biopolymere, wie beispielsweise DNA, RNA, Peptide und Proteine sowie deren Fragmente, wie auch chemische und biologische Partikel zu separieren.^[17] Zwischen den einzelnen Messmodi kann meist allein durch Wechsel des Backgroundelektrolyts (BGE) umgeschaltet werden. Dies ist ein Vorteil gegenüber der HPLC (*high performance liquid chromatography*), bei der die zum Teil sehr teuren Chromatographiesäulen getauscht werden müssen. Neben der Anwendungsvielfalt bietet die CE weitere Vorteile gegenüber der herkömmlichen HPLC. Die CE besitzt eine größere Effizienz und damit eine bessere Auflösung der Analyten und es werden bei elektrophoretischen Trennungen eine hohe Anzahl an theoretischen Böden (einige Hunderttausend) erreicht.^[18] Die Effizienz nimmt allerdings bei Verwendung von Kapillaren mit größeren Innendurchmessern ($>100 \mu\text{m}$) ab, da die durch Reibung der Ionen im elektrischen Feld entstehende Wärme (*Joule'sche Wärme*) nicht ausreichend abgeführt werden kann.^[19] Aus diesem Grund bildet sich zwischen Kapillaroberfläche und dem Inneren der Elektrolytlösung ein Tempe-

aturgradient aus. Des Weiteren können Analysen in freier Lösung stattfinden, was die Untersuchung von physikalischen Interaktionen zwischen zwei Substanzen ermöglicht.^[18] Zudem werden geringere Mengen an Analyten und auch an Puffern benötigt, was die Menge an chemischen Abfällen reduziert. Eine große Limitierung dieser Technik in der gebräuchlichsten Detektionsart (UV, Ultraviolett) ist die unzureichende Konzentrationssensitivität, die durch den optischen Weg durch die Probe beschränkt ist. Dem kann zum Beispiel durch Derivatisierung, spezielle Detektionsmodi oder Probenvorkonzentration Abhilfe geschaffen werden.^[17]

Das Prinzip von kapillarelektrophoretischen Trennungen basiert auf dem Gesetz von *Kohlrausch*, das die Wanderung von geladenen Teilchen in Lösung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit unter Einfluss eines elektrischen Feldes beschreibt.^[20] Diese Wanderung verursacht den elektroosmotischen Fluss (EOF). Dieser ist definiert als die relative Bewegung einer Flüssigkeit gegen eine stationäre geladene Oberfläche (hier die Kapillarwand), die durch ein elektrisches Feld hervorgerufen wird.^[21] Die Geschwindigkeit des EOFs v_{EOF} (Gl. 1) ist linear abhängig von der angelegten elektrischen Feldstärke E , wobei die elektrophoretische Mobilität des EOFs μ_{EOF} den Proportionalitätsfaktor darstellt.

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E \quad (1)$$

Durch die Bewegung der geladenen Teilchen und dessen Hydrathüllen wird ein Fluss der gesamten Lösung hervorgerufen. Dadurch entsteht das für CE typische stempelförmige Elutionsprofil, das in Abbildung 1a zu sehen ist. Dieses Elutionsprofil wird aufgrund der in der Kapillare gleichförmigen Verteilung der Triebkraft erhalten, wobei die Geschwindigkeit an jedem Punkt innerhalb der Kapillare identisch ist (graphisch angedeutet durch Vektoren in Abbildung 1a). Nur in direkter Nähe zur Kapillarwand, in der Region der ausgebildeten Doppelschicht, verringert sich die Geschwindigkeit.



Abbildung 1. Elutionsprofile von Elektrophorese-basierenden Techniken (a) und Druck-basierenden Techniken (b).

Im Gegensatz dazu ist in Abbildung 1b das parabolische Elutionsprofil von Druck-gesteuerten Chromatographiearten (wie zum Beispiel HPLC) dargestellt. Dabei ist die Geschwindigkeit der wandernden Flüssigkeit nicht uniform innerhalb der Kapillare. In der Nähe der Kapillarwand wird

die geringste Geschwindigkeit, in der Mitte der Kapillare die höchste Geschwindigkeit verzeichnet.^[21] Das bringt eine Peakverbreiterung der injizierten Analytenplugs mit sich, die im Falle von Elektrophorese-basierenden Techniken vernachlässigt werden kann.^[14,22]

Die eben schon erwähnte Doppelschicht nach *Stern* ist in Abbildung 2 dargestellt.^[21] Das Modell nach *Stern* vereinigt die Vorstellungen von *Helmholtz*, *Gouy* und *Chapman*. *Helmholtz* beschreibt dabei die Wechselwirkung von Ionen mit gegensätzlicher Ladung oder Dipolen mit geladenen Oberflächen und die Ausbildung einer starren Schicht (*Helmholtz-Schicht*).^[23] Hierbei wird die thermische Bewegung der Teilchen der starren Schicht vernachlässigt. Diese wird beim Modell nach *Gouy* und *Chapman* berücksichtigt, wobei von der Ausbildung einer diffusen Doppelschicht ausgegangen wird.^[23] Beide Modelle entsprechen nicht der Realität, wobei *Helmholtz* die Rigidität der an der Oberfläche angelagerten Ionen überschätzt, während im *Gouy-Chapman*-Modell die Starrheit in direkter Nähe zur Oberfläche unterbewertet wird. Das *Stern*-Modell vereinigt beide Ansätze und kombiniert die *Helmholtz*-Schicht mit einer diffusen Doppelschicht nach *Gouy* und *Chapman*.

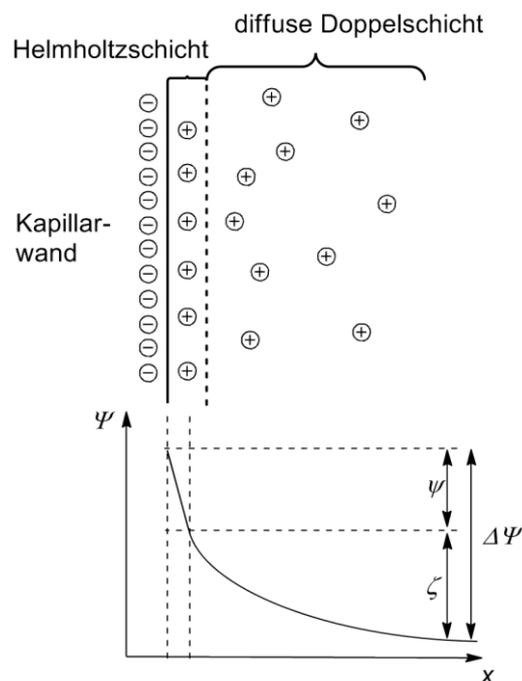


Abbildung 2. Modell der ausgebildeten Doppelschicht nach *Stern*.^[21]

Durch Kontakt zwischen wässrigem Puffer mit der Glasoberfläche, der Kapillarenwand, werden die Silanolgruppen hydrolysiert und es entstehen SiOH_2^+ , SiOH^- oder SiO^- Gruppen, deren Bildung abhängig von dem pH-Wert der wässrigen Lösung ist. Durch elektrostatische Wechselwirkungen werden Gegenionen an der Kapillarenwand adsorbiert um die Ladung aus-

zugleichen, die die sogenannte *Helmholtz*-Schicht bilden. An diese schließt sich die diffuse Doppelschicht an. Dieses Doppelschichtensystem erzeugt ein elektrisches Potential Ψ zwischen der Silicaoberfläche und der Pufferlösung. Innerhalb der starren Helmholtzschicht nimmt ψ linear mit dem Abstand zur Kapillareninnenwand x ab (Abbildung 2). Das Potential innerhalb der diffusen Doppelschicht wird ζ -Potential genannt und nimmt mit dem Abstand x exponentiell ab (Abbildung 2). Mit steigendem pH-Wert steigt der Dissoziationsgrad der Silanolgruppen der Kapillareninnenwand, bis bei etwa pH 8 diese vollständig dissoziiert vorliegen. Die zunehmende negative Ladung auf der Kapillaroberfläche führt zu einem Anstieg des ζ -Potentials. Die in Gleichung 1 bereits verwendete elektrophoretische Mobilität des EOFs μ_{EOF} ist, wie aus Gleichung 2 ersichtlich, abhängig vom ζ -Potential.

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \varepsilon}{4\pi \eta} \quad (2)$$

Dabei beschreibt ε die Dielektrizitätskonstante und η die Viskosität des Mediums. Durch Zugabe von Acetonitril (ACN) zum BGE ändert sich das ζ -Potential, was direkt aus Gleichung 2 folgt, da $\varepsilon/\eta = \text{const.}$ für ACN ist.^[24]

Die beobachtete Mobilität μ_o von Analyten lässt sich nach Gleichung 3 berechnen. In diese Berechnung fließt die Kapillarlänge l_{tot} (in m), die Länge der Kapillare bis zum Detektor l_{eff} (in m) und die angelegte Spannung U (in V) mit ein. Zudem werden die Migrationszeiten der Analyten t_M (in min) benötigt.^[25]

$$\mu_o = \frac{l_{tot} l_{eff}}{U t_M 60} \quad (3)$$

$$\mu_{eff} = \mu_o - \mu_{EOF} \quad (4)$$

Die effektive Mobilität μ_{eff} setzt sich aus der beobachteten Mobilität μ_o und der Mobilität des elektroosmotischen Flusses μ_{EOF} zusammen. Die effektive Mobilität beschreibt die elektrophoretische Beweglichkeit der Teilchen im angelegten elektrischen Feld.

Elektropherogramme weisen häufig zusätzliche Peaks auf, die keinem der injizierten Analyten zugeordnet werden können. Diese Peaks werden Systempeaks genannt und entstehen durch eine Störung der vormals gleichmäßigen Zusammensetzung des BGEs durch Injektion einer Probe auf die Kapillare. Diese Störung oder Systemzone kann in einigen Elektrolytzusammensetzungen entlang der Kapillare zum Detektor wandern und einen Peak verursachen.^[26] Zusätzlich besitzt ein Puffersystem so viele Systemzonen, wie es Pufferkomponenten enthält, da diese mit ihrer

eigenen elektrophoretischen Mobilität Richtung Detektor wandern.^[27] Problematisch können Systempeaks bei der Interaktion mit Analyten werden, wenn beide gleiche oder ähnliche elektrophoretische Mobilitäten besitzen, da die Analytenpeaks dadurch eine Distorsion und eine Peakverbreiterung erfahren können. Durch Linearisierung der Theorie der Elektromigration gelang es der Gruppe um Gas, das Computerprogramm *PeakMaster* zur Berechnung der Systempeaks der eingesetzten Puffer und weitere Parametern zu entwickeln.^[27,28]

Weicht die Leitfähigkeit des Analytplugs beträchtlich von der des BGEs ab, so wird die elektrische Feldstärke entlang der Kapillare nicht homogen sein, was zu asymmetrischen Analytenpeaks führt. Dieses Phänomen wird Elektromigrationsverteilung (EMD) genannt und kann die Effizienz der Trennung herabsetzen.^[29] Beim Auftreten der EMD wird der Peak typischerweise zu einer Dreieckform deformiert, wobei sich die beobachtete Migrationszeit (Spitze des Peaks) von der theoretischen Migrationszeit (a_1 , Gl. 5) unterscheidet, wobei eine Peakverbreiterung beobachtet wird.^[30] Peaks mit diesen Distorsionen wurden in der vorliegenden Arbeit durch Anwendung der *Harhoff-Van der Linde*-Funktion (Gl. 5) angepasst und somit auch die Migrationszeit bestimmt.^[31-35]

$$f(t) = y_0 + \frac{\frac{a_0 a_2}{a_1 a_3 \sqrt{2\pi}} \exp\left(-0.5 \left(\frac{t - a_1}{a_2}\right)^2\right)}{\frac{1}{\exp\left(\frac{a_1 a_3}{a_2^2}\right) - 1} + 0.5 \left(1 + \left(\operatorname{Erf}\left(\frac{t - a_1}{a_2 \sqrt{2}}\right)\right)\right)} \quad (5)$$

a_0 beschreibt die Peakfläche, a_1 die Peakmitte, was der Migrationszeit der Substanz im Falle eines Gauß-förmigen Peaks entspricht, a_2 entspricht der Standardabweichung für nicht verzerrte Peaks, a_3 ist ein Maß für die Peakdistorsion.

1.1.1 Mizellare elektrokinetische Chromatographie

Die mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) ist neben der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) eine der wichtigsten Messmodi in der CE und wurde 1984 von *Terabe et al.* vorgestellt.^[36] Dabei benötigt die MEKC den Zusatz von Tensiden oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration CMC, wobei die CMC eine wesentliche Eigenschaft von Tensiden beschreibt. Die Trennung in der MEKC basiert auf der unterschiedlichen Verteilung der Analyten zwischen dem Mizelleninneren, der sogenannten pseudo-stationären Phase, und der wässrigen Lösung.^[25] Durch Variation der Tenside können neutrale, wie auch geladene Substanzen getrennt werden. Zudem werden häufig Tenside in der CZE eingesetzt, um den EOF zu verändern oder die Trennung der Analyten zu verbessern.

Anionische Mizellen besitzen eine geringere Nettogeschwindigkeit als die wässrige Lösung selbst, da sie aufgrund ihrer Ladung in Richtung der Anode beschleunigt werden, wobei diese Bewegung durch den EOF überlagert wird. Durch die Verteilung zwischen wässrigem Puffer und dem Mizelleninneren wird die elektrophoretische Mobilität des Analyten verändert und es wird ein Wert zwischen der elektrophoretischen Mobilität des Analyten in Abwesenheit des Tensids und der elektrophoretischen Mobilität der Mizelle selbst erhalten.^[19]

Mizellen sind sphärische makromolekulare Gebilde, die sich ab einer gewissen Konzentration, der CMC, aufgrund von Phasen-gesteuerter Gruppierung aus amphiphilen Tensiden bilden (Abbildung 3). Die kritische Mizellbildungskonzentration ist definiert als Konzentration, unter derer das Tensid sich nicht in Mizellen zusammenlagert, jedoch jede weitere Tensidzugabe in der Bildung von Mizellen endet.^[37] Da die Werte von den unterschiedlichen Eigenschaften der Tenside, wie auch von der jeweiligen Bestimmungsmethode und von den verwendeten Puffer- beziehungsweise Lösungsmittelzusammensetzungen, dem pH-Wert und weiteren Faktoren abhängen, sollten immer die Bedingungen angegeben werden, unter welchen die Bestimmung der Werte erfolgte. Tensidmoleküle besitzen ein hydrophiles und ein hydrophobes Fragment und lagern sich in wässrigem Milieu (oder anderen polaren Lösungsmitteln) zusammen, um die hydrophobe Komponente jedes Moleküls vom polaren Lösungsmittel abzuschirmen. Dies ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt, wobei der hydrophile Teil des monomeren Tensids (links) durch den grauen Kreis, der hydrophobe Teil durch die geschlängelte Linie veranschaulicht ist.

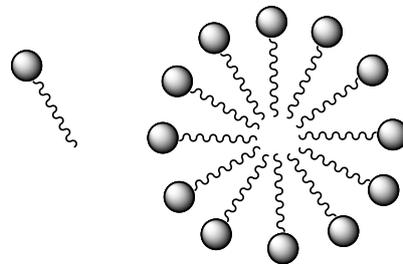


Abbildung 3: Graphische Darstellung eines Tensidmoleküls (links) und der daraus entstehenden Mizelle (rechts).

Zusätzlich zu ihrer Fähigkeit, durch Selbstassemblierung Makromoleküle zu bilden, können Mizellen auch hydrophobe Gastmoleküle einlagern, da diese besser im hydrophoben Mizelleninneren löslich sind als in der polaren Umgebung außerhalb der Mizelle. Durch die Einlagerung kommt es zu einer lokalen Steigerung der Konzentration des Gastmoleküls im Vergleich zu der freien Lösung. Aus diesem Grund finden Mizellen als Katalysatoren zur Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit Anwendung.^[38] Häufig hierfür eingesetzte Tenside sind in Abbildung 4 dargestellt.

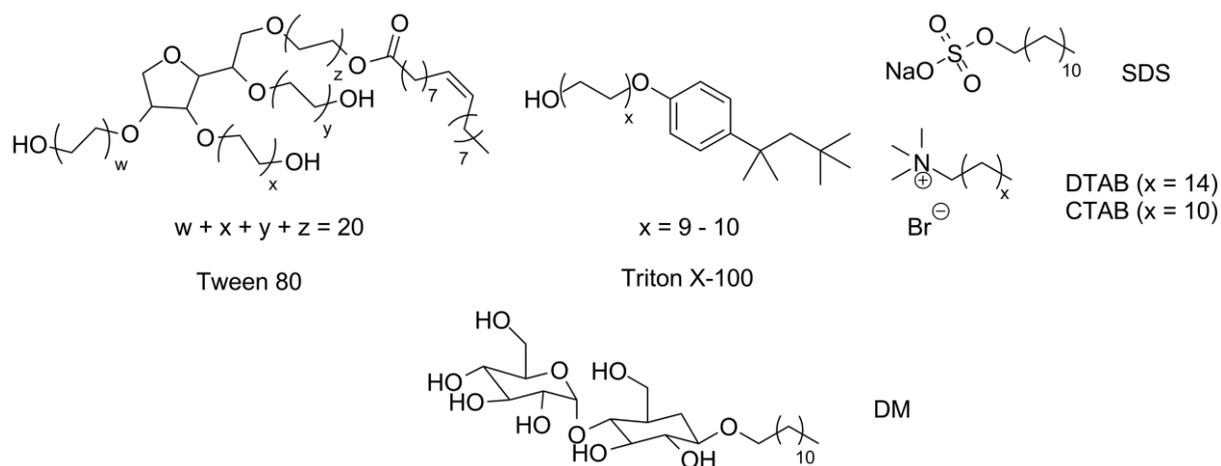


Abbildung 4. Häufig eingesetzte Tenside in der mizellaren Katalyse.

Wird ein kationisches Tensid, wie zum Beispiel DTAB oder CTAB (Abbildung 4) in der MEKC eingesetzt, muss dessen Adsorption an die negativ geladene Kapillarwand beachtet werden, da dies zum Invertieren des EOFs führen kann. Im Falle von anionischem SDS, wobei es sich um eines der weitverbreitetsten und am besten untersuchten Tenside handelt,^[39] sind die repulsiven Wechselwirkungen zwischen den dissoziierten Silanolgruppen der Kapillarinnenwand mit den anionischen SDS-Molekülen groß genug, um eine Adsorption zu vermeiden, wodurch das Zeta-potential konstant bleibt.^[40]

Um zusätzlich zu den Mizellen die Löslichkeit von hydrophoben Substanzen in Puffersystemen zu erhöhen, werden häufig organische Additive zugesetzt. Dabei handelt es sich oft um Alkohole (Methanol, Ethanol, Propanol), aber auch um ACN. Gründe dafür sind die passenden physikalischen Eigenschaften in Bezug auf Siedepunkte, Schmelzpunkte, Viskositäten, relative Permittivitäten und geringe Toxizitäten und weitere Faktoren wie zum Beispiel geringe Anschaffungskosten dieser Lösungsmittel in geeigneter Reinheit.^[41]

Die wichtigste Größe, die in Zusammenhang mit Tensiden genannt wird, ist die kritische Mizellbildungskonzentration CMC. Zur Bestimmung der CMC von Tensiden können verschiedenste Techniken eingesetzt werden, wie zum Beispiel Leitfähigkeitsmessungen, Messung der Oberflächenspannung, Spektralphotometrie, Cyclovoltammetrie, NMR und auch CE.^[25] Üblicherweise wird die CMC durch Auftragung einer physikalischen Eigenschaft gegen die zugesetzten Tensidkonzentration aus der Änderung der Steigung bestimmt. Allerdings sind einige der Methoden ungeeignet, um die CMC in komplexen Systemen, wie sie in der MEKC Verwendung finden, zu bestimmen. Aus diesem Grunde wird die CMC optimalerweise unter identischen Bedingungen wie bei MEKC-Experimenten bestimmt.

Bei der Bestimmung mittels CE finden hauptsächlich vier Methoden Anwendung. Die erste basiert auf der linearen Abhängigkeit des Retentionsfaktors eines Analyten mit der Mizellkonzentration

während MEKC-Untersuchungen.^[25,36,42] Dabei kommt es zu Schwierigkeiten bei der Berechnung des Retentionsfaktors der Mizelle selbst, da es zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den monomeren oder mizellaren Tensiden und den zugesetzten hydrophoben Verbindungen kommt. Bei der zweiten Methode wird die Tatsache genutzt, dass sich die elektrophoretische Mobilität einer hydrophoben Markerverbindung mit der Tensidkonzentration ändert.^[40] Durch graphische Auftragung der elektrophoretischen Mobilität gegen die Tensidkonzentration wird eine ausgeprägte Änderung der Steigung beim Erreichen der CMC erhalten. Nachteil dieser Methode ist, dass die CMC auch durch Einsatz von hydrophoben Markerverbindungen beeinflusst werden kann, da diese als Katalysatoren in der Mizellbildung agieren können. Dieser Messfehler wird jedoch minimiert, wenn nur geringe Mengen an Markersubstanz eingesetzt werden, wie es in der MEKC üblich ist.^[40] Auf der anderen Seite ist die Vielfältigkeit dieser Methode in Bezug auf Pufferzusammensetzungen, pH-Wert, Ladung des Tensids, als auch organische Additive von großem Vorteil.

Die dritte Methode basiert auf der Messung der elektrischen Stromstärke in Abhängigkeit der Tensidkonzentration bei einer gegebenen Spannung. Diese Methode ist eine CE-basierende CMC-Bestimmung der oft üblichen Leitfähigkeitsmessung. Durch Auftragen der elektrischen Stromstärke gegen die zugesetzte Tensidkonzentration wird eine Funktion mit zwei linearen Abschnitten mit unterschiedlichen Steigungen erhalten. Dabei beschreibt der lineare Teil mit Tensidkonzentrationen unterhalb der CMC die monomere Aggregation des Tensids, der zweite mit Tensidkonzentrationen oberhalb der CMC die mizellare Aggregation. Der Schnittpunkt der beiden Geraden, die durch diese linearen Anteile gelegt werden können, beschreibt die CMC. Nachteil dieser Bestimmungsmethode ist die geringe Differenz in den Steigungen der linearen Abschnitte, was für die eindeutige Bestimmung der CMC hinderlich ist. Erschwerend kommt hinzu, dass die gemessenen Stromstärkenänderungen in der CZE beziehungsweise MEKC sehr gering sind, so dass die Genauigkeit dieser Bestimmungsmethode darunter leidet.

2008 publizierten *Lokajova et al.* eine Methode zur Untersuchung der Mizellenbildung unter Zuhilfenahme der Mobilität von Systempeaks.^[43] Vorteil dieser Methode gegenüber der beiden erstgenannten ist die Abwesenheit von Markersubstanzen, die die Mizellenbildung beeinflussen können. Systempeaks werden nicht durch Analyte hervorgerufen, sondern durch Puffersubstanzen selbst oder durch Störphänomene, die bei einer elektrophoretischen Trennung auftauchen. Diese werden durch bewegliche Veränderung der ursprünglich gleichmäßigen Beschaffenheit des BGEs verursacht, die durch die Injektion des Analyten auf die Kapillare auftreten. Systempeaks können detektiert werden, wenn mindestens einer der Pufferkomponenten detektierbar ist, sei es über indirekte UV-Absorption oder Leitfähigkeitsmessungen. Die von dieser Gruppe bestimmten CMC-Werte liegen bei 3.1 mM für SDS in einem MOPS/LiOH-Puffer bei einer konstanten Ionenstärke von 15.2 mM beziehungsweise bei 2.2 mM bei $I_s = 25.3$ mM. Die CMC ist in

Pufferlösungen kleiner als in Wasser, da die Wechselwirkungen der hydrophilen und meist geladenen Fragmente geschwächt und somit die Mizellbildung favorisiert wird.^[25]

Bei der CMC-Bestimmung unter Zuhilfenahme der Mobilitätsmethode müssen geeignete Marker-substanzen eingesetzt werden. Anforderungen an diese sind zum einen eine gute Detektierbarkeit, im Falle von UV-Detektion eine ausreichende UV-Absorption, zum anderen sollte die Substanz trotz ihrer hydrophoben Eigenschaft eine ausreichende Löslichkeit in dem untersuchten Puffersystem aufweisen. Ferner sollte die Markersubstanz aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften in das Mizelleninnere inkorporiert werden können. SDS-Mizellen besitzen einen hydrophoben Kern mit der Eigenschaft eines Wasserstoffbrückenbindungsdonors,^[25] sodass es sich bei der Markersubstanz um eine hydrophobe Verbindung handeln sollte. Je größer der Unterschied in den Bindungskonstanten zwischen Markersubstanz und monomeren Tensiden und zwischen Markerverbindung und Mizellen ist, desto präziser wird die Bestimmung der CMC. Um Löslichkeitsproblemen vorzubeugen, werden häufig organische Additive zugesetzt, die wiederum die CMC beeinflussen.

Unterhalb der CMC kommt es zu sogenannten solvophobischen Wechselwirkungen zwischen monomeren Tensidmolekülen und hydrophoben Analyten, was die effektive elektrophoretische Mobilität bereits vor Erreichen der CMC verändert.^[24]

Vorteile der Bestimmung der CMC mittels CE ist die Untersuchung der Mizellbildung unter identischen Bedingungen, wie sie in der MEKC zu finden sind und somit direkt auf diese übertragen werden können.

Misra et al. publizierten CMC-Werte für Wasser-ACN-Gemische, die mittels Leitfähigkeitsmessungen beziehungsweise durch Messung der Oberflächenspannung bestimmt wurden, die in Tabelle 1 gelistet sind (linke Spalte Bestimmung durch Leitfähigkeitsmessungen, rechte Spalte Messung der Oberflächenspannung).^[44]

Jacquier et al. beschrieben 1995 die Bestimmung der CMC mittels CE unter Einsatz von neutralen Markermolekülen in Borat-Puffer und in Abwesenheit von organischen Additiven.^[40] Ein Jahr später untersuchte dieselbe Gruppe den Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die CMC.^[45] Die Ergebnisse der Gruppe können Tabelle 1 entnommen werden. Die Zunahme der CMC durch Zusatz von ACN kann durch die Änderung des hydrophoben Charakters der Lösung erklärt werden, der aufgrund der Erhöhung der Löslichkeit des Tensids die Selbstassemblierung stört.^[46]

Seifar et al. untersuchten den Trennmechanismus von MEKC-Experimenten unter Einfluss von organischen Additiven und bestimmten mittels Leitfähigkeitsmessung Werte für die CMC bei steigender Konzentration an ACN in Wasser, wie auch in Tris-Puffer.^[24]

1998 veröffentlichten *Lopez-Grio et al.* eine Studie über den Einfluss von diversen organischen Additiven auf die CMC, die publizierten Werte können ebenfalls Tabelle 1 entnommen werden.^[47]

Thorsteinsdottir und Mitarbeiter publizierten die Bestimmung der CMC durch die Änderung der elektrophoretischen Mobilität von Peptiden in Phosphat-Puffer, die beschriebenen Werte sind in Tabelle 1 gelistet.^[48]

Tabelle 1. Übersicht der in der Literatur beschriebenen CMC-Werte bei variierendem ACN-Gehalt, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Beschreibung der Bestimmungsarten verzichtet. Diese sind dem Text zu entnehmen.

ACN [%]	CMC [mM]					
	<i>Jacquier et al.</i> ^[40,45]	<i>Seifar et al.</i> ^[24]	<i>Lopez-Grio et al.</i> ^[47]	<i>Misra et al.</i> ^[44]	<i>Misra et al.</i> ^[44]	<i>Thorsteinsdottir et al.</i> ^[48]
0	5.29 ^a	7 ^b /6 ^c	-	8.2 ^b	8.2 ^b	3 ^d
1	-	-	5.9 ^b	-	-	-
3	-	-	6.5 ^b	-	-	-
4	-	-	-	12 ^b	11.5 ^b	-
5	3.67 ^a	-	6.9 ^b	-	-	4 ^d
8	-	-	-	14.8 ^b	14.2 ^b	-
10	4.55 ^a	13 ^b /10 ^c	10.2 ^b	-	-	4 ^d
12	-	-	-	19.2 ^b	18.4 ^b	-
13	-	-	10.8 ^b	-	-	-
15	7.71 ^a	-	12.2 ^b	-	-	5 ^d
16	-	-	-	25 ^b	25 ^b	-
18	-	-	21.2 ^b	-	-	-
20	-	27 ^b /32 ^c	29.6 ^b	32 ^b	35.5 ^b	7 ^d
24	-	-	-	44 ^b	45.8 ^b	-
30	-	48 ^b /71 ^c	-	-	-	-

^a in 5 mM Borat-Puffer; ^b in H₂O; ^c in 8.3 mM Tris-Puffer; ^d Phosphat-Puffer

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, differieren die Literatur-bekanntes CMC-Werte stark. So publizierten *Thorsteinsdottir et al.* bei 20 % Zusatz an ACN eine CMC von 7 mM in einem Phosphat-Puffer ($I_s = 50$ mM).^[48] *Seifar et al.* erhielten eine CMC von 32 mM mittels Leitfähigkeitsmessung in 5 mM Borat-Puffer. In Wasser wurden bei einem identischen ACN-Gehalt von 20 % von unterschiedlichen Gruppen CMC-Werte zwischen 27 und 35.5 mM publiziert.^[24,44,47] Jedoch wurden die Werte mit unterschiedlichen Verfahren bestimmt, was einen direkten Vergleich erschwert.

Zudem wird in der Literatur beschrieben, dass hohe ACN-Konzentrationen (> 40 %) die Mizellbildung verhindern,^[45] während wiederum andere Gruppen von Mizellbildung bis zu 70 % ACN berichten.^[24,49]

1.1.2 *On-column* Reaktionskapillarelektrophorese

On-column Reaktionskapillarelektrophorese (ocRCE) beschreibt das Ablaufen einer Reaktion, die zwischen Injektor und Detektor in der Kapillare stattfindet.^[15]

Bei der Derivatisierung von Analyten in der CE gibt es vier wesentliche Methoden. Zum einen ist es möglich, die Derivatisierungsreaktion vor der kapillarelektrophoretischen Analyse außerhalb durchzuführen, was als präkapillarische Derivatisierung bezeichnet wird. Da es bei den verwendeten chemischen Derivatisierungsreaktionen und -reagenzien sowie der Menge an zuge-setztem Reagenz keine Einschränkungen gibt, wird diese oft angewendet.^[17,50-59] Darüber hinaus ist kein zusätzlicher apparativer Aufbau notwendig und besondere Reaktionsbedingungen wie erhöhte Temperatur oder Aufarbeitung der Probe nach der Derivatisierung sind möglich. Nachteile dieser Methode sind die großen Probenmengen, die erforderlich sind, und der große Arbeitsaufwand. Des Weiteren werden von den relativ großen Probenmengen (im Bereich von einigen Mikrolitern) nur circa ein Tausendstel (wenige Nanoliter) zur Analyse benötigt, wobei die überschüssige Probe als Abfall anfällt.^[60]

Im Gegensatz zur präkapillarischen Derivatisierung steht die postkapillarische Derivatisierung. Dabei wird der Trennkapillare eine Reaktionskammer sowie eine Detektionskapillare nachgeschaltet. Diese Methode wird häufig bei instabilen Analyten, aber auch bei Substanzen mit mehreren zu derivatisierenden funktionellen Gruppen eingesetzt.^[50] Dabei kann die Einbringung der Reaktionskammer sowohl eine Peakverbreiterung als auch eine Verdünnung der Probe verursachen. Zudem muss der apparative Aufbau verändert werden.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer *in-line* Derivatisierung, bei der Analyt und Derivatisierungsreagenz über ein T-förmiges Teilstück zur Reaktion gebracht werden.^[50] Vorteile dieser selten gebräuchlichen Methode sind die mögliche Aufreinigung der Probe vor der Derivatisierung, eine Echtzeitanalyse der Produkte und die geringen verwendeten Probenmengen.^[50]

Die letzte Methode umfasst die *on-column* Derivatisierung. Dabei wird der Analyt innerhalb der elektrophoretischen Kapillare derivatisiert, wobei der Analyt und das Derivatisierungsreagenz über das Inlet oder das Outlet auf die Kapillare aufgebracht werden können.^[50] Die Kapillare dient in dieser Methode nicht nur als Trennungsmittel, sondern auch als Reaktionskammer. Die Mischung der beiden Reaktanden erfolgt dabei entweder durch Diffusion oder durch Elektromigration.^[50] Diese Methode benötigt nur geringe Proben- wie auch Reagenzienmengen (eine zwei bis drei Größenordnungen geringere Menge als bei der präkapillarischen Derivatisierung),^[17] zudem wird die Veränderung der Proben minimiert und es besteht die Möglichkeit, den Vorgang zu automatisieren. Durch die Automatisierung aller Schritte (Injektion, Mischen der Reaktanden, Inkubation, Separation und Detektion) können Fehler und auch die Durchführungszeit reduziert werden. Ferner wird die Probenverdünnung durch das geringe Volumen der Reaktionskammer beziehungsweise der Kapillare nahezu verhindert.^[17] Darüber hinaus kann die *on-*

column Derivatisierung ohne zusätzliche Modifikation der Hardware durchgeführt werden. Zusammenfassend können die Vorteile dieser Derivatisierungsmethode mit den Anforderungen an eine nachhaltige analytische Chemie (*green chemistry*) in Einklang gebracht werden.^[17]

Die unterschiedlichen Mischungsverfahren können, wie oben schon erwähnt in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen können die Reaktanden durch Diffusion (Abbildung 5d-g), zum anderen durch Elektromigration (Abbildung 5a-c) zur Reaktion gebracht werden. Im letzteren Fall handelt es sich um die *electrophoretically mediated microanalysis* (EMMA).

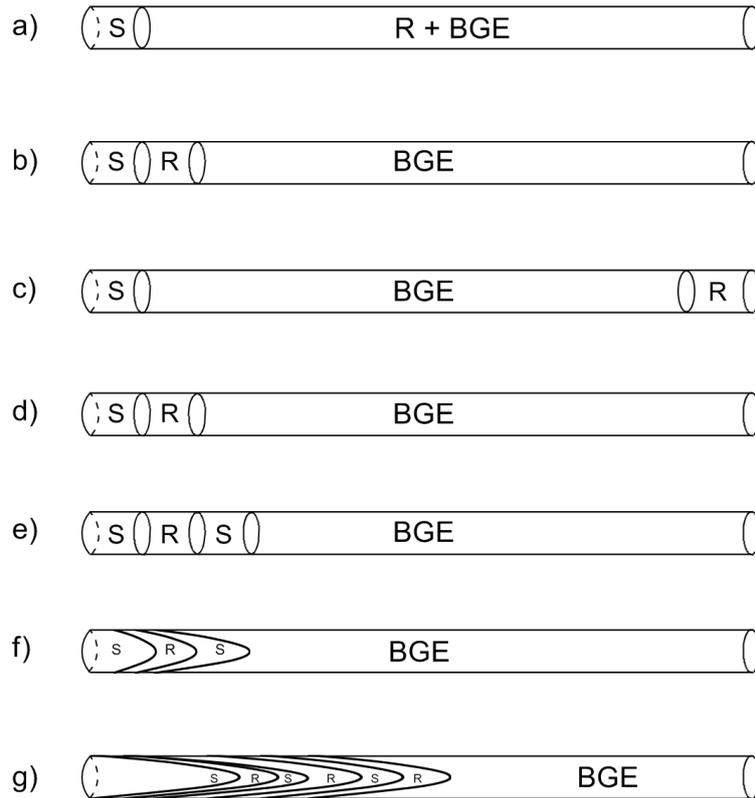


Abbildung 5. Übersicht über verschiedene Methoden zur Vermischung der Reaktanden in der Kapillare nach Glatz (S: Substrat, R: Reagenz, BGE: Backgroundelektrolyt).^[17]

EMMA wurde zuerst von *Bao* und *Regnier* 1992 für enzymatische Reaktionen beschrieben und basiert auf den unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Reaktanden, die durch Anlegen einer Spannung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zum Detektor wandern.^[6] Durch Injektion des langsamer migrierenden Substrats vor dem schneller migrierenden durchwandern sich beide Zonen durch Anlegen einer Spannung und reagieren währenddessen miteinander. Dabei erfahren die Substanzen nahezu keine Verdünnung beim Mischen durch Elektromigration und durch Vermeiden von turbulenten Strömungen kann Peakverbreiterung minimiert werden. Hinzu kommt, dass sich die beiden Reaktanden zonen innerhalb von Sekunden mischen, insofern diese schmal sind. EMMA kann grundsätzlich in zwei verschiedenen Modi durchgeführt werden.

Die erste Variante wird kontinuierlicher Modus, Langzeitkontakt-Modus oder bei *on-column* Derivatisierungsreaktionen *throughput* Technik genannt. Wie in Abbildung 5a dargestellt, ist die Kapillare mit dem Laufpuffer (BGE) und dem Reagenz (R) gefüllt und das Substrat (S) wird injiziert. Durch Anlegen einer Spannung durchwandert die Bande von R den Laufpuffer mit dem Substrat und reagiert währenddessen mit diesem.

Im Gegensatz dazu werden bei der zweiten Variante (Abbildung 5b) einzelne Plugs des Substrats sowie des Reagenz R injiziert. Aus diesem Grund wird diese auch *plug-to-plug* Methode genannt. Zunächst wird die Komponente mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität auf die Kapillare aufgebracht, die von der mit größerer elektrophoretischen Mobilität nach Anlegen einer Spannung durchwandert wird. Sind die elektrophoretischen Mobilitäten der Reaktanden unbekannt, können diese auch Sandwich-artig (vgl. Abbildung 5e) injiziert werden. Im Zusammenhang mit *on-column* Derivatisierungsreaktionen wird diese Methode auch *zone-passing* Technik genannt und wird häufig eingesetzt, wenn von den Reaktanden nur begrenzte Mengen verfügbar oder diese teuer sind, da nur Nanolitermengen benötigt werden. Bei beiden bisher vorgestellten Methoden wird die Reaktion erst nach Anlegen der Spannung gestartet.

Sind Reagenz und Substrat von entgegengesetzter Ladung, so wird häufig auf die sogenannte *electro-injection* Analyse (EIA) zurückgegriffen (Abbildung 5c). Hierbei werden die Reaktanden gleichzeitig an den gegensätzlichen Enden der Kapillare aufgetragen und werden, wie bei EMMA, durch Anlegen der Spannung vermischt beziehungsweise zur Reaktion gebracht.

Zur Mischung zweier Reaktanden durch Diffusion gibt es zwei unterschiedliche Methoden. Zum einen werden Substrat und Reagenz als einzelne Plugs (Abbildung 5d, e), zum anderen sehr schmale Plugs mit parabolischem Profil (Abbildung 5f, g), charakteristisch für laminare Strömungen innerhalb einer Kapillare, auf die Kapillare gebracht. Hierbei ist anzumerken, dass es sich bei den Sandwich-artigen Injektionsreihenfolgen (Abbildung 5e, f, g) um die effizientere Methode handelt, da der Diffusionsweg auf die Hälfte reduziert wird.^[17] Durch eine angemessene Wartezeit zwischen Injektion und Anlegen einer Spannung können sich die Reaktanden durch Diffusion vermischen. Die so entstandenen Reaktionsprodukte können durch Anlegen einer Spannung direkt analysiert werden.

1.1.3 Dynamische Kapillarelektrophorese und Chromatographie

Dynamische Kapillarelektrophorese und dynamische Chromatographie beschreiben einen Sonderfall der Reaktionskapillarelektrophorese beziehungsweise der Reaktionschromatographie und sind definiert als Methode zur Untersuchung von Interkonversionsprozessen, die in der Zeitskala der kapillarelektrophoretischen oder chromatographischen Separation stattfinden.^[15]

Die Bestimmung von kinetischen Daten durch den Einsatz von dynamischen Chromatographiearten (beispielsweise dynamische HPLC oder dynamische GC) oder dynamischer Kapillarelektrophorese (DCE) hat einige Vorteile. So werden zum Beispiel nur geringe Mengen des Racemats benötigt. Außerdem spielen Verunreinigungen bei der Exaktheit der Bestimmung der kinetischen Daten keine Rolle, da diese bei der chromatographischen beziehungsweise elektrophoretischen Trennung von der zu untersuchenden Verbindung separiert werden.^[61]

Es sind drei verschiedene Verknüpfungen von Interkonversionsprozessen und der Trennung der einzelnen Isomere mittels Chromatographie oder Kapillarelektrophorese denkbar. Bei der ersten verläuft die Interkonversion, verglichen mit der chromatographischen oder elektrophoretischen Trennung, sehr langsam ab, sodass getrennte Peaks für die einzelnen Isomere erhalten werden. Im zweiten Fall verlaufen die chromatographische oder elektrophoretische Trennung, wie auch der Interkonversionsprozess in derselben Zeitskala ab, sodass sich im Chromatogramm beziehungsweise im Elektropherogramm Peaks befinden, die über ein Plateau miteinander verbunden sind. Im letzten Fall verläuft die Interkonversion schneller als die chromatographische oder elektrophoretische Trennung, sodass nur ein einzelner Peak von allen Isomeren erhalten wird. Welches der drei Szenarien vorliegt, kann vor allem durch Variation der Temperatur beeinflusst werden, da diese einen starken Einfluss auf die Interkonversionsgeschwindigkeit hat.

Um einen Interkonversionsprozess von Enantiomeren verfolgen zu können, muss die elektrophoretische beziehungsweise chromatographische Trennung in chiraler Umgebung durchgeführt werden. Häufig werden in der DCE und DGC (modifizierte) Cyclodextrine eingesetzt.^[8] In Abbildung 6 ist die schematische dreidimensionale Struktur von nativem β -Cyclodextrin gezeigt. Dieses verfügt über ein hydrophobes Inneres und ein hydrophiles Äußeres und bildet mit den Analyten einen Inklusionskomplex.^[22,62]

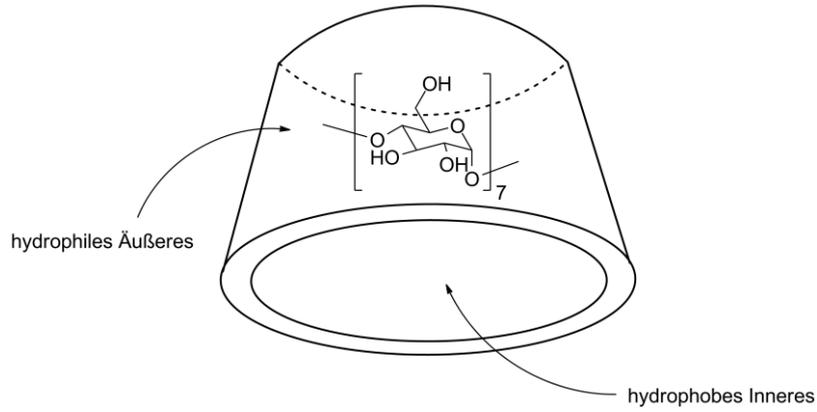


Abbildung 6. Schematische dreidimensionale Struktur von β -Cyclodextrin.

Mit Hilfe des *DCXplorers*,^[61] ein Programm, das von *O. Trapp* entwickelt wurde und auf der *Unified Equation* (Gl. 6) basiert,^[63] kann die Geschwindigkeitskonstante für die Hin- und die Rückreaktion der Interkonversionsprozesse k_1 und k_{-1} direkt aus den Chromatogrammen beziehungsweise den Elektropherogrammen erhalten werden. Gleichung 6 beschreibt die analytische Lösung der *Unified Equation* für den Fall, dass die Signalintensität des zuerst eluierten Isomers bei t_R^A größer oder gleich ist als die des später eluierten Isomers bei t_R^B .

$$k_1^{ue} = -\frac{1}{t_R^A} \left(\begin{array}{l} \ln \left(\frac{100B_0 + A_0 \left(100 - h_p \left(1 + \sqrt{\frac{2}{\pi N}} \right) \right)}{t_R^B - t_R^A} \right) \\ B_0 \left(\frac{h_p e^{-\frac{(t_R^A - t_R^B)^2}{2\sigma_B^2}} - 100 e^{-\frac{(t_R^A - t_R^B)^2}{8\sigma_B^2}}}{\sigma_B \sqrt{2\pi}} + \frac{100}{t_R^B - t_R^A} \right) \\ -\ln \left(\frac{100 e^{-\frac{(t_R^B - t_R^A)^2}{8\sigma_A^2}} - h_p}{\sigma_A \sqrt{2\pi}} + \frac{h_p \left(1 + \sqrt{\frac{2}{\pi N}} \right) - 100}{t_R^B - t_R^A} \right) \end{array} \right) \quad (6)$$

mit

$$\sigma_i = \frac{w_i}{\sqrt{8 \ln 2}} \quad \text{und } i = \{A, B\} \quad (7)$$

σ_i ergibt sich aus den Halbwertsbreiten bei halber Peakhöhe w_i , der zu trennenden Isomere A und B. N beschreibt die Anzahl der theoretischen Böden der chromatographischen beziehungsweise der elektrophoretischen Trennung und kann durch folgende Gleichung berechnet werden.^[64]

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R^i}{w_i} \right)^2 \quad (8)$$

Die Berechnungen mittels *Unified Equation* basieren auf zeitabhängigen Verteilungsfunktionen des stochastischen Modells der Chromatographie.

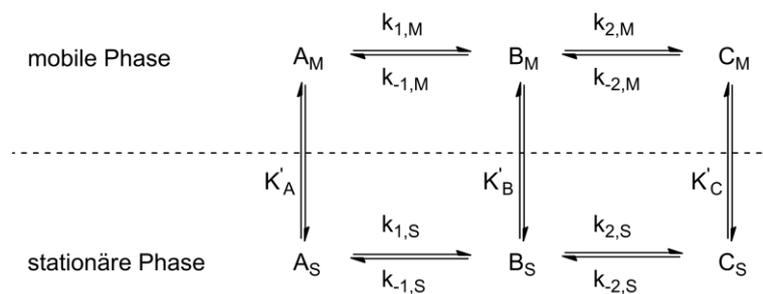
Aus den erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten lässt sich nun mit Hilfe der *Eyring*-Gleichung (Gl. 9) die thermodynamische Aktivierungsenergie ΔG^\ddagger des Interkonversionsprozesses berechnen.^[65]

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{k h}{k_B \kappa T} \right) \quad (9)$$

Die Aktivierungsenthalpie ΔH^\ddagger sowie die Aktivierungsentropie ΔS^\ddagger können graphisch aus der Auftragung von $\ln(k_i T^{-1})$ gegen T^{-1} (*Eyring*-Plot) mit Hilfe von temperaturabhängigen Messungen aus der Steigung beziehungsweise dem Abszissenabschnitt erhalten werden.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Interkonversion von drei Stereoisomeren kann durch den Vergleich mit simulierten Chromatogrammen erfolgen, diese werden mit dem von *O. Trapp* entwickelten Programm *ChromXWin* erhalten. *ChromXWin* simuliert Chromatogramme, basierend auf dem theoretischen Bodenmodell und ist eine Weiterentwicklung des Programms *ChromWin*.^[66]

In Schema 1 ist das allgemein gültige Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase dreier interkonvertierender Isomere in einem theoretischen Boden während einer chromatographischen Trennung dargestellt.^[67,68]



Schema 1. Allgemeines Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase der Isomerisierungsreaktion dreier Stereoisomere während einer chromatographischen Trennung.

Dabei werden die Isomere A und C in B umgewandelt und B in A und C. Die Interkonversion findet sowohl in der mobilen als auch in der stationären Phase statt.

1.2 E/Z-Isomerisierung von Prolin-Peptidbindungen

Eine Amidbindung oder auch Peptidbindung ist grundsätzlich aufgrund ihres partiellen π -Charakters planar gebaut. Somit muss bei einer Isomerisierungsreaktion eine Rotation um 180° um diese Bindung erfolgen. X-Prolinpeptidbindungen (X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure) liegen in größerem Maßstab auch in *trans*-Konformation vor als Peptide mit sekundären Peptidbindungen.^[69] Problematisch ist jedoch die Bezeichnung der Konformationen. Die Peptidbindungen können als *cis/trans* oder als *E/Z* beschrieben werden. Dabei handelt es sich beim *Z*-Konformer um die *trans*-Konformation der Peptidbindung, da bei der *cis/trans*-Unterscheidung die Stellung der Reste zueinander betrachtet wird (siehe Abbildung 7 links). Durch Beschreibung einer Peptidbindung mittels *E/Z*-Stereodeskriptoren erfolgt die Zuordnung aufgrund der Prioritätenverteilung der Reste nach der CIP-Nomenklatur (siehe Abbildung 7 rechts), wobei das Sauerstoffatom gegenüber dem Rest R^1 die höhere Priorität besitzt (wenn von Peptiden ausgegangen wird und R^1 somit zunächst ein Kohlenstoffatom trägt).^[70,71]

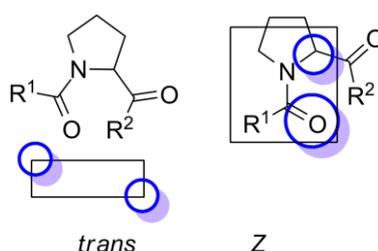


Abbildung 7. Unterschied der Bezeichnung der Peptidbindungen mit unterschiedlichen Stereodeskriptoren (*trans* links, *Z* rechts).

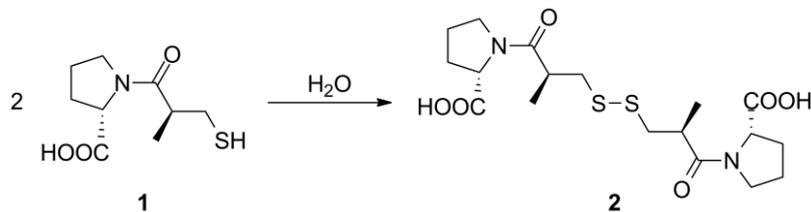
Einige Verbindungen erfahren eine reversible Umwandlung in einem Zeitfenster von wenigen Minuten. Typischerweise handelt es sich bei solchen Umwandlungen um Isomerisierungsreaktionen. Diese finden auch während chromatographischen und elektrophoretischen Trennungen statt, sodass außergewöhnliche Chromatogramme oder Elektropherogramme mit auftretender Peakseparation, Plateaubildung, Peakkoaleszenz oder sogar „schrägen“ Peaks erhalten werden.^[72,73]

Da die Interkonversion von *Z*- zu *E*-Prolin-Peptidbindungen relativ langsam im Vergleich zur biologischen Zeitskala abläuft und diese zusätzlich abhängig ist von dem pH-Wert, wie auch der Hydrophobizität des umgebenden Mediums, ist es von großer Bedeutung, die genaue Isomerenzusammensetzung von Prolin-basierten Medikamenten zu kennen.^[74]

Captopril (1-((2*S*)-3-Mercapto-2-methylpropanoyl)-prolin, **1**, Schema 2) wird als Medikament gegen Bluthochdruck eingesetzt, wobei vermutet wird, dass Captopril über die Thioifunktionalität an die aktive Seite des Angiotensin I-konvertierenden Enzyms (ACE) bindet und dieses für den

Blutdruck verantwortliche Enzym dadurch hemmt.^[75] Zudem wird in der Literatur die pharmazeutische Wirkung von Captopril gegen hartnäckige Herzinsuffizienz und Thrombose beschrieben.^[76,77] Ferner wird der pharmazeutische Einsatz von Captopril gegen Krebserkrankung untersucht.^[77]

Captopril ist chemisch relativ instabil und unterliegt in Wasser einer spontanen Oxidation zum dimeren Captoprildisulfid (**2**, Schema 2).^[78] Darüber hinaus kommt es bei Lagerung von Captoprilhaltigen Tabletten unter extremen klimatischen Bedingungen zur Bildung von Captoprildisulfid als hauptsächlichem Abbauprodukt.^[78] Auch in Blut und Blutplasma ist Captopril chemisch nicht stabil, wobei auch hier die Oxidation zum Dimer erfolgt (Schema 2).^[79]



Schema 2. Umsetzung von Captopril zum dimeren Captoprildisulfid.

Hinzukommend bildet Captopril im Körper gemischte Disulfide mit den Thiol-haltigen Aminosäuren Cystein and Glutathion und bindet an Proteine unter Ausbildung einer S–S-Bindung.^[80] Die Disulfidbrücke des Captoprildisulfids kann in Anwesenheit von Glutathion gespalten werden und es wird das monomere Captopril und ein gemischtes Disulfid von Captopril und Glutathion erhalten. Dies ist auch *in vitro* aber auch *in vivo* zu beobachten, wie Untersuchungen von *Drummer et al.* gezeigt haben.^[80]

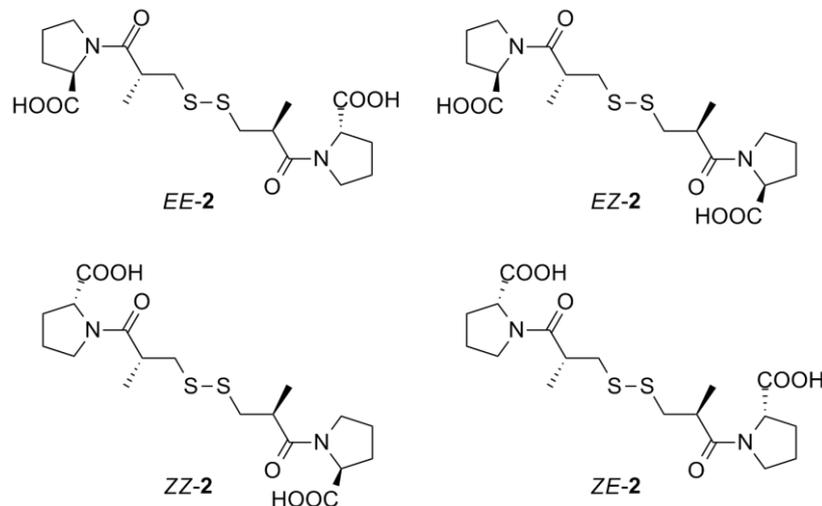


Abbildung 8. Strukturformeln der Rotamere des Captoprildisulfids.

Anhand der Lewisformel in Schema 2 ist erkennbar, dass es sich bei Captoprildisulfid um ein Isomerengemisch von vier Rotameren handelt. So kann das in Schema 2 abgebildete *EE*-Isomer, aber auch das *EZ*-, das *ZE*- und das *ZZ*-Isomer auftreten (vgl. Abbildung 8). Die Rotamere lassen sich durch Rotation um eine formale Einfachbindung reversibel ineinander überführen.

Allerdings besitzt die formale Einfachbindung einen partiellen Doppelbindungscharakter, wie es in Amid- beziehungsweise Peptidbindungen üblich ist.

Im Festkörper ist das *ZZ*-Isomer die favorisierte Konformation, wie *Bojarska et al.* durch Röntgenbeugungsexperimente am Kristall des Captoprildisulfids zeigen konnten.^[77] *Remko et al.* untermauerten diese Erkenntnisse mit quantenchemischen Untersuchungen, bei denen sich auch das *ZZ*-Konformer als das stabilste herausstellte.^[78]

Die gesteigerte Stabilität des *ZZ*-Isomers bei niedrigen pH-Werten kann durch die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Wasserstoffatom der protonierten Hydroxylgruppe der Säuregruppe und der Carbonylgruppe der Seitenkette erklärt werden.^[75] Diese Stabilisierung kann aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Anordnung im *EE*-Isomer nicht auftreten. Jedoch kann die Favorisierung des *ZZ*-Isomers auch bei physiologischem pH-Wert beobachtet werden, wobei unter diesen Bedingungen noch circa zwei Drittel der Amidbindungen in *Z*-Konfiguration vorliegen.^[75]

Der Interkonversionsprozess von Captopril und Captoprildisulfid wurde zunächst von *Rabenstein et al.* mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht.^[75] Dabei konnten Gleichgewichtskonstanten der konformalen Änderung ermittelt werden. Jedoch waren Geschwindigkeitskonstanten des Interkonversionsprozesses weder für Captopril noch für dessen Dimer zugänglich. *Owens et al.* gelang es, sowohl die Diastereomere als auch die Rotamere des Captoprils mittels HPLC zu trennen. Dennoch war eine Untersuchung der Kinetik der Rotation nicht möglich.^[81]

Die Interkonversion von Captoprildisulfid wurde das erste Mal eingehend von *Nishikawa et al.* untersucht, die in ihrer Publikation die reversible Interkonversion der vier Isomere und deren charakteristische Elutionsprofile beschrieben.^[72]

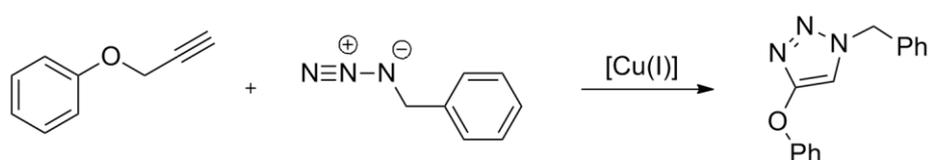
Erst *O. Trapp* war es durch Entwicklung der *Unified Equation* möglich, die kinetischen und thermodynamischen Parameter des Interkonversionsprozesses des monomeren Captoprils zu ermitteln.^[1] Da die *Unified Equation* allerdings nur zwei interkonvertierende Substanzen berücksichtigt, konnte auch damit jedoch keine Untersuchung der Kinetik der Interkonversion des Captoprildisulfids erfolgen.

1.3 1,3-dipolare Cycloadditionen

1.3.1 Huisgen Cycloaddition

Die nach *Huisgen* benannten 1,3-dipolare Cycloadditionen sind exergone Reaktionen, bei der zwei ungesättigte Reaktanden umgesetzt werden. Diese bieten eine große Vielfalt zur Herstellung von fünfgliedrigen Heterocyclen. Werden terminale Alkine und Azide als Reaktanden eingesetzt, so werden 1,2,3-Triazole erhalten, die entweder 1,4- oder 1,5-substituiert sind.^[82] Diese werden zu fast gleichen Teilen gebildet.^[83,84]

Wird der Reaktion katalytisch Cu(I) zugesetzt, handelt es sich um die Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Klickreaktion (CuAAC-Reaktion) und es werden ausschließlich 1,4-substituierte 1,2,3-Triazole gebildet (Schema 3).^[82,85-87]



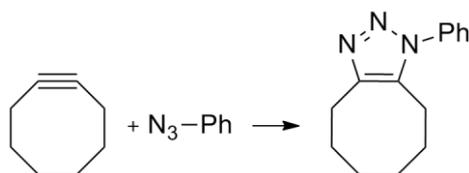
Schema 3. Beispiel einer Cu(I)-katalysierten Alkin-Azid-Klickreaktion nach *Rostovtsev et al.*^[82]

Dabei findet oft eine Kupfer(II)-Quelle in Verbindung mit einem Reduktionsmittel Verwendung, wodurch die katalytisch aktive Cu(I)-Spezies *in situ* generiert wird. Cu(II)-Salze sind günstiger und oft von höherer Reinheit als Cu(I)-Salze. In der in Schema 3 gezeigten Reaktion kam Kupfersulfat-pentahydrat und Natriumascorbat in einem Wasser-*tert*-Butanol-Gemisch zum Einsatz.^[82] Nach acht Stunden konnte das 1,4-substituierte Triazol in einer Ausbeute von 91 % erhalten werden. Dies zeigt einen Vorteil der CuAAC, denn es handelt sich um eine sehr unempfindliche katalytische Reaktion, die auch im wässrigen Milieu und in einem weiten pH-Bereich (pH 4 – pH 12) abläuft.^[82] Zudem ist vollständiger Umsatz bei Raumtemperatur mit Reaktionszeiten von sechs bis 36 Stunden zu beobachten.

Nachteil der CuAAC ist der Cu(I)-Rückstand in den Produkten. Cu(I) ist nicht nur cytotoxisch,^[88-90] sondern bindet auch an die katalytisch aktiven Zentren in Enzymen und blockiert oder reduziert damit die biologische Aktivität,^[89] was ein Einsatz in biologischen Markierungsexperimenten schwierig gestaltet. Zudem geht Cu(I) eine Disproportionierungsreaktion in wässrigem Milieu ein, sodass die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt wird.^[89]

1.3.2 Ringspannungs-begünstigte Azid-Alkin-Cycloaddition

Bei der Ringspannungs-begünstigten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) handelt es sich um eine Katalysator-freie [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Cycloalkin und einem Azid, die erstmals 1953 von *Blomquist* und *Liu* beschrieben wurde (Schema 4).^[91] Dabei wird das Alkin nicht durch die Anwesenheit eines Katalysators, wie zum Beispiel Kupfer bei der CuAAC, aktiviert, sondern durch eine vorliegende Ringspannung. Cyclooctin ist das kleinste isolierbare Cycloalkin.^[92] Größere Cycloalkine sind stabil, zeigen aber nur moderate Reaktivität in Cycloadditionsreaktionen.^[92] Im Cyclooctin liegt ein $\text{CH}_2\text{-C}_{\text{sp}}\text{-C}_{\text{sp}}$ -Bindungswinkel von 163° vor.^[93] Dies entspricht einer Ringspannung von ungefähr 18 kJ mol^{-1} .^[90] Dadurch ist der Übergangszustand der SPAAC gegenüber dem Grundzustand begünstigt, was sich in beachtlicher Beschleunigung der Reaktion gegenüber ungespannten Alkinen widerspiegelt. Schon *Blomquist* und *Liu* vermuteten eine große Ringspannung als Ursache der „explosionsartigen“ Reaktion von Cyclooctin mit Phenylazid.^[91] 1961 beschrieben *Wittig* und Mitarbeiter das erhaltene Produkt der Reaktion zwischen Cyclooctin und Phenylazid als unten dargestelltes Triazol (Schema 4).^[94]



Schema 4. Allgemeines Reaktionsschema einer Ringspannungs-begünstigten Azid-Alkin-Cycloaddition zwischen Cyclooctin und Phenylazid.

Zudem handelt es sich bei der SPAAC um eine bioorthogonale Reaktion. Dies bedeutet, dass die Reaktanden inert gegenüber der biologischen Umgebung sind.^[88] Aus diesem Grund und weil die Markierung regiospezifisch abläuft, wird die SPAAC unter anderem zum Markieren von komplexen Biomolekülen verwendet.^[38] Die hierfür benötigte Azideinheit kann über unterschiedliche Weisen in Biomoleküle, wie Polysaccharide, Lipide und Proteine eingebracht werden. Unter anderem werden dafür Stoffwechselmechanismen, kovalent gebundene Inhibitoren und enzymatische Transfers benutzt.

Von *Baskin et al.* wurde postuliert, dass während der SPAAC-Reaktion das LUMO (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*, niedrigstes unbesetztes Molekülorbital) des Alkins mit dem HOMO (engl. *highest occupied molecular orbital*, höchstes besetztes Molekülorbital) des Azids interagiert.^[95] Aus diesem Grund sollte die Einführung elektronenziehender Gruppen in Progargylposition die Reaktion beschleunigen, da durch diese Einführung die LUMO-Energie herabgesetzt

wird (Abbildung 9).^[96] Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, führt die Einführung von Fluorsubstituenten in Propargylstellung zu einer größeren Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Einführung von Ethersubstituenten.

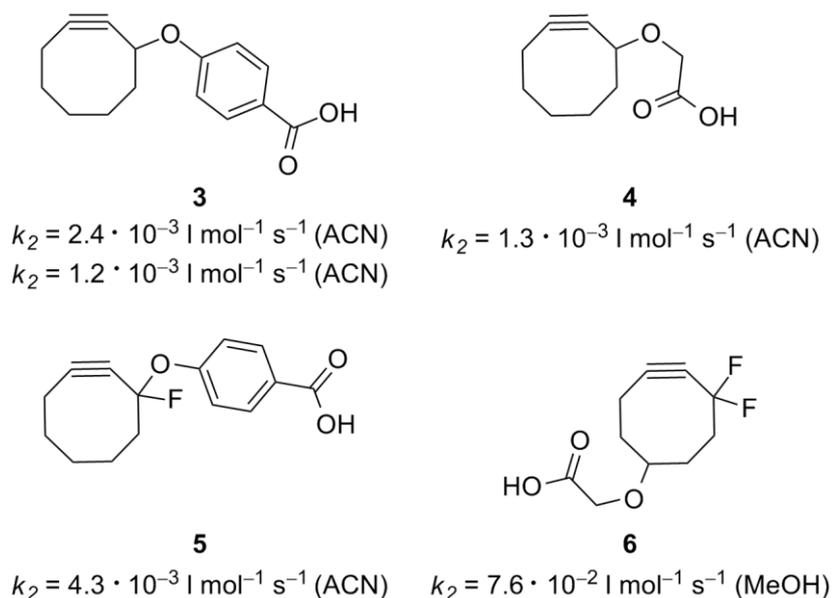
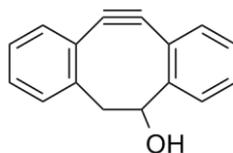


Abbildung 9. Ausgewählte Cyclooctine und deren Geschwindigkeitskonstanten einer SPAAC-Reaktion mit Benzylazid in angegebenen Lösungsmitteln.^[95,96]

Für die Umsetzung des Cycloalkins **3** mit Benzylazid in ACN wurden verschiedene Geschwindigkeitskonstanten publiziert. So beschrieben *Bertozzi* und Mitarbeiter 2004 eine geringere Geschwindigkeitskonstante von nur $1.2 \cdot 10^{-3} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ als dieselbe Arbeitsgruppe zwei Jahre später veröffentlichte.^[90,96]

Um die Reaktionsgeschwindigkeit weiter zu steigern, wurden zusätzliche Benzylgruppen eingeführt, da in diesen Molekülen eine höhere Ringspannung und eine verminderte Distorsionsenergie erwartet wurde.^[97,98] Zusätzlich schirmt das Wasserstoffatom des aromatischen Systems in *ortho*-Position die Alkineinheit gegenüber nucleophilen Angriffen ab.



7

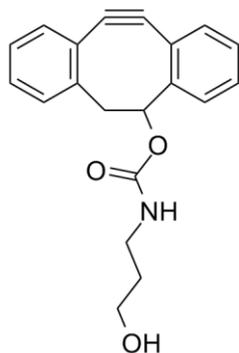
$$k_2 = 0.17 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}, 0.057 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (MeOH)}$$

$$k_2 = 2.3 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (H}_2\text{O/ACN 1:4 (v/v))}$$

Abbildung 10. Dibenzocyclooctin und dessen Reaktionsgeschwindigkeiten mit Benzylazid in einer SPAAC-Reaktion in angegebenen Lösungsmitteln.^[97,98]

Wie aus Abbildung 10 ersichtlich, kommt es zu einer enormen Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit der SPAAC nach Einführung der aromatischen Systeme in direkter Nachbarschaft zum Alkin. Wie schon bei den zuvor vorgestellten Cycloalkinen finden sich auch hier in der Literatur unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktion des Cycloalkins mit Benzylazid im selben Lösungsmittel. So publizierte die Gruppe um *Boons* 2011 eine um den Faktor drei höhere Reaktionsgeschwindigkeit, als sie 2008 angegeben hatten.^[97,98] Möglicher Grund für die Abweichung können die unterschiedlichen Analytikverfahren zur Verfolgung der Reaktionskinetik sein. 2008 untersuchten *Boons* und Mitarbeiter die Reaktion mittels ¹H-NMR- und 2011 mittels UV-Spektroskopie. Zudem konnte durch einen Wechsel des Lösungsmittels die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert werden.

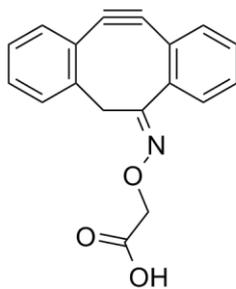
Weitere Modifikationen der Cycloalkinkomponente führten zu nachstehenden Beispielen (Abbildung 11).



8

$$k_2 = 6.96 \cdot 10^{-2} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

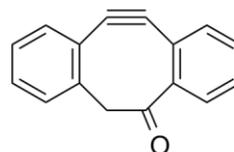
(MeOH)



9

$$k_2 = 6.11 \cdot 10^{-2} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

(MeOH)



10

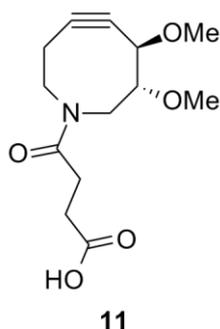
$$k_2 = 2.59 \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

(MeOH)

Abbildung 11. Cycloalkine, die durch weitere Modifikation erhalten wurden, mit zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeiten der Reaktion mit Benzylazid.^[98]

Durch die Umwandlung des Alkohols **7** in das Carbamat **8** tritt kaum eine Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit auf.^[98] Überraschenderweise reagiert das Oxim **9** nicht schneller mit Benzylazid als Alkohol **7**. Durch Oxidation von **7** zum Keton **10** kann die Reaktionsgeschwindigkeit um etwa Faktor zwei gesteigert werden. DFT-Untersuchungen von *Mbua et al.* zeigten, dass Cycloalkin **10** eine geringere Distorsionsenergie benötigt, um den strukturellen Übergangszustand zu erreichen.^[98] Diese Beobachtungen führten zu der Erkenntnis, dass die Reduktion der benötigten Distorsionsenergie in einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mündet.

Um die Hydrophilie der Cycloalkinkomponente zu erhöhen und somit unspezifische Wechselwirkungen zu Serumproteinen beim Durchführen von biologischen Markierungsexperimenten zu vermeiden, wurde von *Sletten et al.* ein Heteroatomcycloalkin synthetisiert und in der SPAAC-Reaktion untersucht (Abbildung 12).^[99] Die Reaktionskinetik wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie verfolgt. Beim Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten fällt auf, dass das Heteroatomcycloalkin **11** deutlich langsamer reagiert als die Dibenzo-substituierten Derivate **8-10**.



$$k_2 = 3.0 \cdot 10^{-3} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (ACN)}$$

Abbildung 12. Von *Sletten et al.* synthetisiertes Heteroatomcycloalkin mit Geschwindigkeitskonstante für eine SPAAC mit Benzylazid in ACN.^[99]

Allerdings kann im Gegensatz zu **3** und **4** eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Diese kann durch die zusätzliche Ringspannung, die kürzere C–N-Bindung oder durch den sp²-Charakter des Amidstickstoffatoms erklärt werden.^[99]

Delft und Mitarbeiter kombinierten zwei Mechanismen zur Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit, indem sie Dibenzo-substituierte Heteroatomcycloalkine in der SPAAC-Reaktion einsetzten, die über eine *exo*-cyclische Amidbindung verfügten (Abbildung 13).^[89]

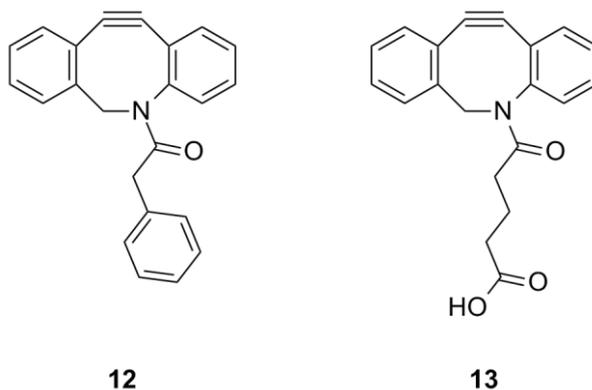
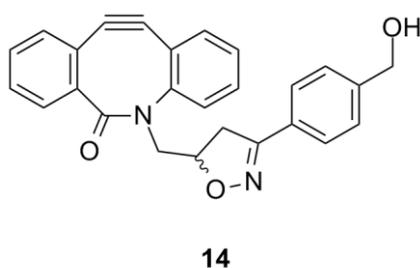


Abbildung 13. Azadibenzocyclooctin mit Reaktionsgeschwindigkeiten einer SPAAC-Reaktion mit Benzylazid in Methanol.^[89]

Verglichen mit den bereits genannten Reaktionsgeschwindigkeiten laufen die SPAAC-Reaktionen mit Azadibenzocyclooctinen schneller ab als die zuvor beschriebenen Cyclooctinsysteme. Dabei kommt es zu einer geringeren Steigerung im Vergleich zu den Dibenzo-substituierten Systemen (**8–10**), jedoch zu einer fast 100-fachen Beschleunigung der Reaktion relativ zu dem Heteroatom-substituierten System **11**.

Jewett et al. kombinierten die Vorteile einer Amidgruppe im Ring mit ihrer Fähigkeit der Delokalisation des freien Elektronenpaares des Stickstoffatoms und die daraus folgende strukturelle Rigidität mit den Reaktions-beschleunigenden Dibenzogruppen in Propargylstellung zu Biarylazacyclooctinon **14** (Abbildung 14).^[100]



$$k_2 = 0.96 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ (ACN)}$$

Abbildung 14. Biarylazacyclooctinon mit Reaktionsgeschwindigkeit einer SPAAC-Reaktion mit Benzylazid in ACN.^[100]

Untersuchungen von **14** in einer SPAAC-Reaktion mit Benzylazid ergaben dabei eine mehr als dreifach höhere Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Dibenzo-substituierten Azaderivate **12** und **13**. Die Reihenfolge der zunehmenden Reaktivität von Dibenzo-substituierten Derivaten (**8–10**) über Dibenzo-substituierte Azaderivate (**12, 13**) zu Biarylazacyclooctinon (**14**) ist ein

Hinweis auf eine direkte Korrelation der steigenden Anzahl von sp^2 -hybridisierten Atomen im Ring mit der Reaktivität im Einsatz in der SPAAC-Reaktion.

Nachteil für biologische Markierungsexperimente der Dibenzoderivate ist die starke Lipophilie und die daraus resultierende schlechte Wasserlöslichkeit. Zudem können die Verbindungen zu unspezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen führen. Um das zu verhindern und die SPAAC-Reaktion weiter zu beschleunigen, wurde über die Verwendung von Tensiden nachgedacht. Die sehr hydrophoben Cyclooctine, vor allem die Dibenzoderivate, werden dabei im hydrophoben Mizelleninneren angereichert. Daraus resultiert eine höhere lokale Reaktandenkonzentration und die SPAAC-Reaktion zwischen diesen Cyclooctinen und hydrophoben Aziden wird somit beschleunigt. In Abbildung 15 sind Cycloalkinderivate dargestellt, die in einer Mizellen-katalysierten SPAAC untersucht wurden.^[38,101] Die in Abbildung 15 angegebenen Reaktionsgeschwindigkeiten beziehen sich auf die SPAAC-Reaktion mit Benzylazid in Abwesenheit von Tensidmolekülen.

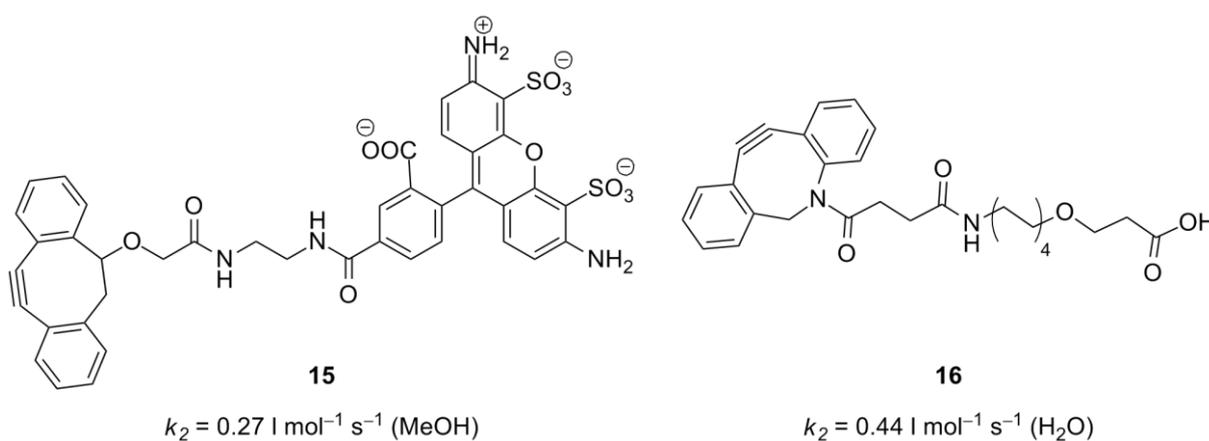


Abbildung 15. Untersuchte Cycloalkinderivate in der Mizellen-katalysierten SPAAC-Reaktion und deren Geschwindigkeitskonstanten mit Benzylazid ohne Tensidzugabe in gegebenen Lösungsmitteln.^[38,101]

In Abwesenheit von Tensiden beziehungsweise Mizellen sind die Reaktionsgeschwindigkeiten mit denen der Azidibenzoderivate (Abbildung 13) zu vergleichen. Durch die Zugabe von DM (*n*-Dodecyl- β -D-Maltosid) konnte für eine Reaktion von **15** mit einem Rhodopsinderivat (Photorezeptor) eine Reaktionsgeschwindigkeit von $3.2 \cdot 10^2 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erhalten werden.^[101] Diese ist 10^3 -Größenordnungen größer als die der Reaktion von **15** mit Benzylazid. Jedoch wurden die Reaktionen in unterschiedlichen Reaktionsmedien durchgeführt und durch den Wechsel der Azidkomponente können die Reaktionsgeschwindigkeiten kaum miteinander verglichen werden.

Heemstra und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss von Mizellenbildner auf die Reaktion zwischen **16** und Benzylazid.^[38] Die publizierten Reaktionsgeschwindigkeiten sind in Tabelle 2

gelistet. Die Tensidadditive wurden dem Reaktionsgemisch in der zweifachen kritischer Mizellbildungskonzentration zugesetzt.

Tabelle 2. Reaktionsgeschwindigkeiten der Reaktion zwischen **16** und Benzylazid in Wasser mit verschiedenen Tensidadditiven.^[38]

Tensid	k_2 (16 + BnN ₃) [l mol ⁻¹ s ⁻¹]
-	0.44 ± 0.04
Tween 80	2.79 ± 0.97
Triton X-100	4.67 ± 0.54
SDS	40.4 ± 2.0
DTAB	40.4 ± 2.7
CTAB	78.7 ± 3.5

Durch den Einsatz von Tween 80 kommt es zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor sechs, durch den Einsatz von Triton X-100 um den Faktor elf. Bei diesen beiden Tensiden handelt es sich um nichtionische Verbindungen. Eine starke Beschleunigung erfährt die Reaktion bei Zusatz von SDS und DTAB (Faktor 92). Wird jedoch CTAB als Mizellenbildner eingesetzt, wird die Reaktion um Faktor 179 beschleunigt. Bei den drei zuletzt genannten Tensiden handelt es sich um ionische Verbindungen. Somit kann die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur durch hydrophobe Wechselwirkungen, sondern auch durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beeinflusst werden.

1.4 Derivatisierung von Aminosäuren in der Kapillarelektrophorese

Derivatisierungsreaktionen beschreiben Modifikationen von Substraten, um diesen für unterschiedliche Anwendungen geeignetere Eigenschaften zu verleihen.^[102] Oft sind Derivatisierungsreaktionen in der analytischen Chemie den chromatographischen beziehungsweise elektrophoretischen Untersuchungen vorangestellt, um UV-absorbierende oder fluoreszierende Gruppen zur verbesserten Detektion der Analyte einzuführen, da es sich hierbei um die gebräuchlichsten Detektionsverfahren handelt.^[60] Zudem können Derivatisierungsreaktionen zur Trennung von Enantiomeren eingesetzt werden. Hierbei werden Enantiomere in Diastereomere überführt, sodass diese in achiraler Umgebung getrennt werden können. Des Weiteren wird die Wichtigkeit einer Derivatisierung auch bei der Analyse von Naturstoffen, biogenen Aminen in Lebensmitteln, Peptiden, Herbiziden, chiralen Aminosäuren und in der Proteomik beschrieben.^[50]

Meist wird bei den Untersuchungen mittels *on-column* Derivatisierung Kapillarzonenelektrophorese (CZE) oder Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) eingesetzt.^[17] An die in der *on-column* Derivatisierung eingesetzten Reagenzien werden besondere Anforderungen gestellt. Zum einen muss die Derivatisierungsreaktion möglichst schnell und unter milden Bedingungen verlaufen und eine hohe Effizienz besitzen.^[17,103] Zum anderen sollten Nebenprodukte, wenn überhaupt, nur in geringen Mengen gebildet werden. Wie auch bei der präkapillaren Derivatisierung bilden Amine die Hauptkomponenten der zu derivatisierenden funktionellen Gruppen. Grund dafür ist unter anderem das große Vorkommen dieser funktioneller Gruppe in biologischen Proben, wie zum Beispiel in Aminosäuren, Peptiden, Glucosaminen, biogenen Aminen (Histamin, Serotonin, Dopamin), Proteinen, Antibiotika und Alkaloiden.^[17]

In Abbildung 16 sind gängige Derivatisierungsreagenzien für Amine und Aminosäuren dargestellt.^[103-105] Dabei stehen verschiedene funktionelle Gruppen für die Derivatisierungsreaktion zur Verfügung. Bei 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl), Dansylchlorid (DNS-Cl) und 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNP-F) handelt es sich um halogenierte Verbindungen, die unter Halogenwasserstoffsäure-Abspaltung zu den entsprechenden derivatisierten Aminen beziehungsweise Aminosäuren reagieren. Diese Verbindungen können auch zur Modifikation von sekundären Aminen eingesetzt werden. Zudem können Amine und Aminosäuren mit Isocyanaten wie Phenylisocyanat zu stabilen Phenylthiohydantionen (PTH) umgesetzt werden.^[105] Darüber hinaus kann eine Kondensationsreaktion zwischen aromatischen *o*-Dialdehyden, wie beispielsweise Naphthalin-2,3-dicarboxyaldehyd (NDA) und *o*-Phthaldialdehyd (OPA), und primären Aminen und Aminosäuren stattfinden.

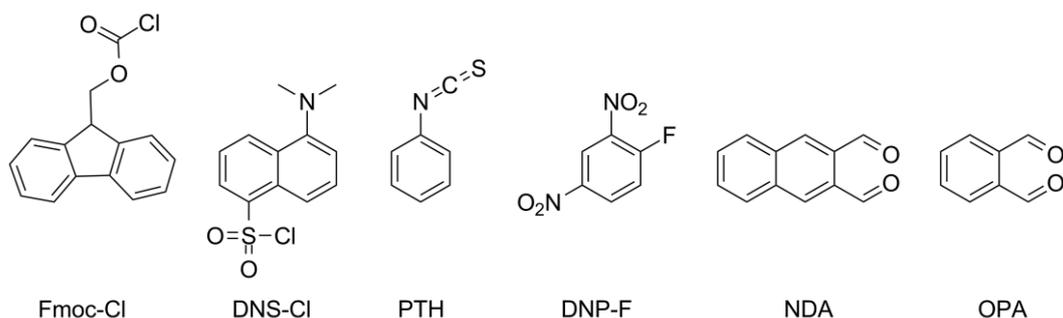


Abbildung 16. Häufige Derivatisierungsreagenzien für Amine und Aminosäuren.

Der Einsatz von Phenylisocyanat und Dansylchlorid in *on-column* Derivatisierungsreaktionen ist nur schwer möglich, da beide Derivate eine lange Reaktionszeit für die Umsetzung mit Aminen und Aminosäuren besitzen.^[60]

Am weitesten verbreitet ist der Einsatz von OPA zur Derivatisierung von primären Aminen.^[106] OPA reagiert schnell mit Aminosäuren und das überschüssige OPA-Reagenz hat keinen Einfluss auf die elektrophoretische Trennung, was den Einsatz in *on-column* beziehungsweise postkapillarischen Derivatisierungsreaktionen ermöglicht.^[104]

Im Übersichtsartikel von *Molnar-Perl* von 2001 über Derivatisierung von Aminosäuren mit OPA werden bei mehr als 99 % der zitierten Publikationen Thiole als zusätzliche Nucleophile und Reduktionsmittel der Derivatisierungsreaktion zugesetzt.^[107] In den meisten Fällen handelt es sich dabei um 2-Mercaptoethanol,^[13,51,52,108-120] *N*-Acetylcystein^[121-125] oder Ethanthiol.^[124] Dabei wird die Derivatisierung von Aminen und Aminosäuren mit OPA in Anwesenheit von Thiolen meist unter basischen Bedingungen durchgeführt,^[52,112] wobei es zur Bildung von Nebenprodukten kommt, die wahrscheinlich durch Disproportionierung oder Autooxidation entstehen.^[107] Das Hauptprodukt **17** sowie eines der Nebenprodukte **18** der Reaktion zwischen OPA mit einem Amin in Anwesenheit eines Thiols sind in Abbildung 17 dargestellt. Das Nebenprodukt konnte durch NMR-spektroskopische Untersuchungen identifiziert werden.^[107]

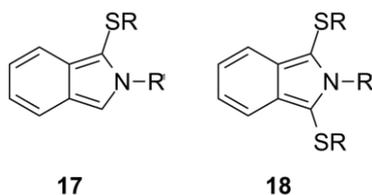


Abbildung 17. Produkt und Nebenprodukt der Derivatisierung von primären Aminen mit OPA in Anwesenheit einer Thiolkomponente.^[107]

Bereits Mitte der 60er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde die Derivatisierung von Aminen und Aminosäuren von *Cohn et al.* beschrieben.^[126,127] Dabei wurden bei der Umsetzung von OPA mit

Aminen und Aminosäuren in stark basischem Milieu Fluoreszenz-aktive Verbindungen erhalten. Ferner wurde die Derivatisierung von Glutathion mit OPA beschrieben, wobei Glutathion sowohl als Amino- als auch als Thiolkomponente fungiert.

1971 wurde OPA das erste Mal als Derivatisierungsreagenz für Aminosäuren und Amine von *Roth* in der heute noch gebräuchlichen Vorgehensweise beschrieben.^[120] Hier kam 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel zum Einsatz. Unter anderem wurde der Einfluss der Mischreihenfolge getestet und festgestellt, dass bereits OPA mit Aminosäuren zu einem nicht-fluoreszierenden Produkt reagiert.

Grigg und Mitarbeiter untersuchten 1985 die Reaktion zwischen OPA und primären beziehungsweise sekundären Aminen und Aminosäuren unter sauren Bedingungen in Abwesenheit von Thiolverbindungen.^[128] Dabei konnten einige Intermediate, die in Abbildung 18 gezeigt sind, isoliert werden.

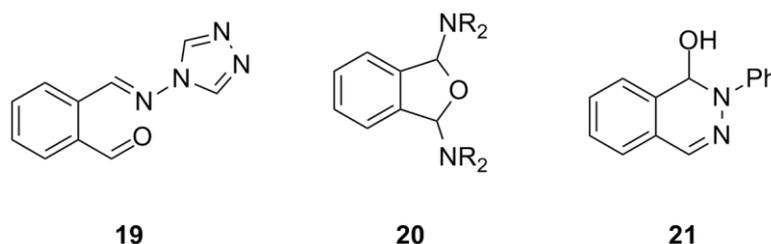
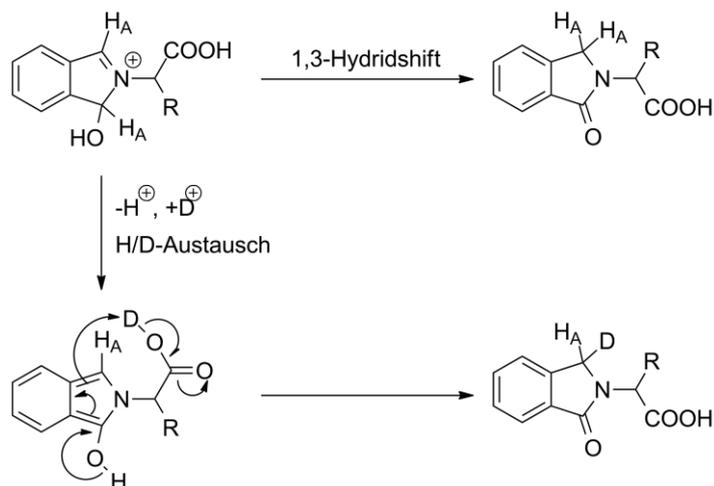


Abbildung 18. Isolierte Intermediate von Reaktionen von OPA mit primären und sekundären Aminen.

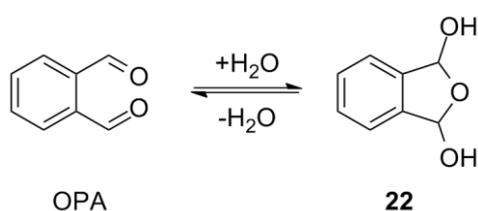
Anhand des Auftretens des Monoimins **19** und des cyclischen Intermediats **21** während der Reaktion kamen *Grigg et al.* zu zwei unterschiedlichen Abfolgen der einzelnen Reaktionsschritte. Beide Varianten sind in Schema 5 dargestellt. Bei der ersten Möglichkeit handelt es sich um einen intramolekularen 1,3-Hydridshift unter Mitwirkung der Hydroxylgruppe der Hydroxyiminiumspezies, wobei das Phthalimidin-Derivat gebildet wird (Schema 5 oben). Die zweite Ausführung der Gruppe bezieht einen Deprotonierungs- und Reprotonierungsschritt über das Isoindolinol mit ein (Schema 5 unten). Durch Durchführen der Reaktion in deuterierter Essigsäure konnte die zweite Variante bestätigt werden, da im Produkt die benzyliche Methylengruppe teilweise deuteriert vorlag. Bei der analogen Reaktion von OPA mit Alaninmethylester wurde ein geringerer Grad der Deuterierung festgestellt, was den Rückschluss zulässt, dass es sich bei dem letzten Reaktionsschritt um einen intramolekularen Mechanismus handelt.



Schema 5. Möglicher Reaktionsmechanismus der Reaktion zwischen OPA und einer α -Aminosäure nach Grigg *et al.*^[128]

Zudem konnte durch die Deuterierungsversuche keine Inkorporation von Deuterium an das stereogene Zentrum beobachtet werden, was den Rückschluss zulässt, dass es sich bei diesem Wasserstoffatom unter den gewählten Reaktionsbedingungen um ein nicht-azides Wasserstoffatom handelt.

Bereits 1977 untersuchten *DoMinh et al.* die Reaktion von OPA mit Ammoniak und Aminen.^[129] Dabei bewiesen sie das Vorliegen des cyclischen Hydrats von OPA **22** in einer wässrigen OPA-Lösung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Durch Trocknen der Substanz konnte OPA zurückgewonnen werden. Somit steht OPA mit **22** in einem reversiblen Gleichgewicht (Schema 6).



Schema 6. Gleichgewicht zwischen OPA und dem cyclischen Hydrat **22** in Wasser.

Die Reaktion von OPA mit Ammoniak in kaltem Dimethylsulfoxid (DMSO) führte irreversibel zum cyclischen Derivat **23** (Schema 7). Durch Dehydrierung und Umlagerung wurde dieses in das Phthalimidin-Derivat **24** überführt.

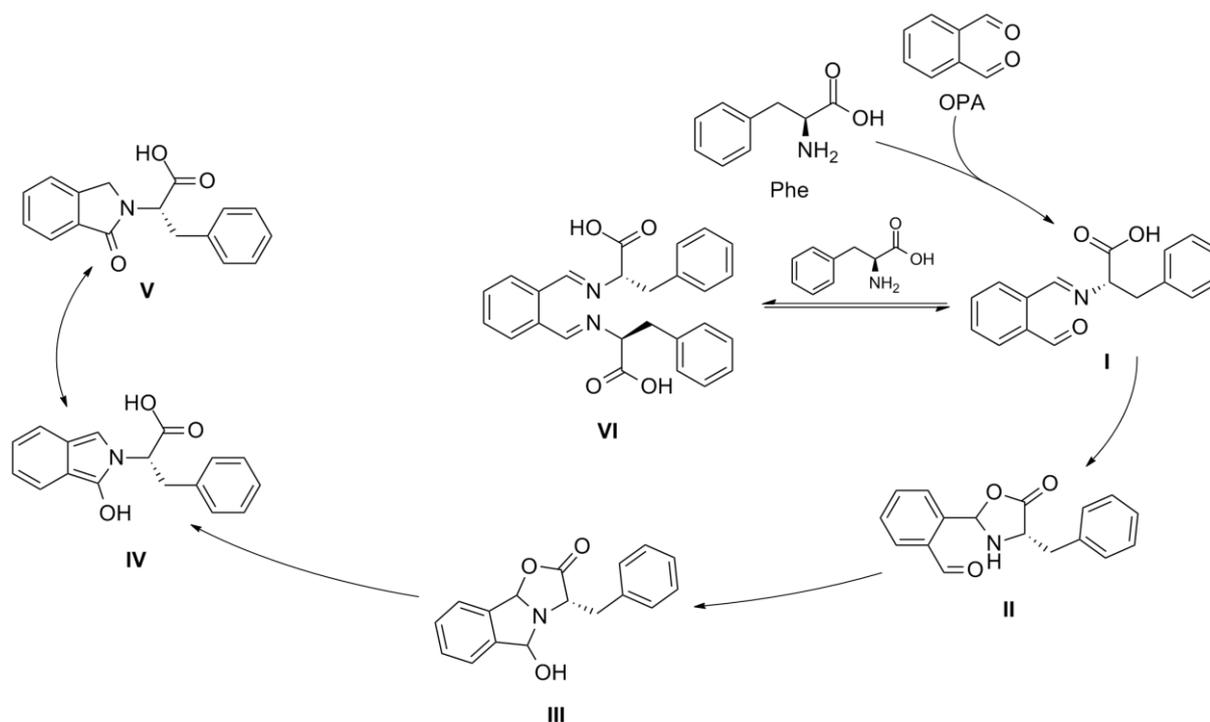
Dabei wurden einige Peaks im Elektropherogramm erhalten, die weder dem Reagenz, den Aminosäuren noch den derivatisierten Aminosäuren zuzuordnen waren.

Die selbe Gruppe widmete sich zwei Jahre später dem Vergleich verschiedener Derivatisierungsmethoden. Sie verglichen die präkapillarische mit den *on-column* Techniken, die auf Diffusion beziehungsweise Elektromigration basierenden Mischungsmethoden (vgl. Abbildung 5e beziehungsweise 5a). Da bei letztgenannter Methode das Reagenz, im vorliegenden Fall OPA, dem BGE zugesetzt wird und somit im Überschuss vorliegt, wird für die Derivatisierungsreaktion von OPA mit Aminosäuren eine Kinetik pseudo-erster Ordnung erwartet. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin konnte mit $3.6 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden.^[130] Durch die kürzeren Reaktionszeiten während der Derivatisierung mit EMMA werden im Vergleich zu den anderen Methoden kleinere Peakflächen der derivatisierten Aminosäuren detektiert. Auch das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und die Anzahl der theoretischen Böden waren bei beiden *on-column* Derivatisierungsmethoden am kleinsten.

Im selben Jahr veröffentlichten *Taga et al.* eine weitere Publikation, in der das Hauptaugenmerk auf die *zone-passing* Methode gelegt wurde.^[18] Dabei wurde die Derivatisierungsreaktion an einem Aminosäurengemisch, bestehend aus drei Aminosäuren (L-Methionin, L-Alanin, L-Glutaminsäure), untersucht. Unter anderem wurden die Injektionszeiten der Aminosäuren, wie auch die von OPA variiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Erhöhung der Injektionszeit des Reagenzes zu einer vermehrten Bildung des Derivatisierungsproduktes führte, wobei die Erhöhung der Injektionszeit der Aminosäure nahezu keinen Einfluss auf die gebildete Menge an Produkt hatte. Dies lässt sich durch die höhere Konzentration der Aminosäure im Vergleich zu OPA während des Überlappens der Plugs erklären, während im ersteren Fall eine höhere Konzentration von OPA vorliegt und die Derivatisierungsreaktion somit schneller abläuft. Zusätzlich wurde die angelegte Spannung variiert. So konnten bei höheren Spannungen geringere Mengen an Produkt nachgewiesen werden, da durch Anstieg der Spannung die Geschwindigkeit des EOFs erhöht wird und somit die Migrationszeiten der Analyte und die Überlappungszeit reduziert werden. Eine Abschätzung der Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion pseudo-erster Ordnung zwischen OPA und L-Phenylalanin ergab eine Geschwindigkeitskonstante von $8.83 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.^[18]

Allin et al. schlugen 1996 schließlich einen Mechanismus für die Reaktion zwischen OPA und Aminosäuren und Aminoalkoholen vor, bei denen die Säure- beziehungsweise die Alkoholfunktionalität als intramolekulares Auxiliar die Reaktion beschleunigt, da mit aliphatischen Aminen das Produkt nur in geringen Mengen isoliert werden konnte.^[131] Dieser Mechanismus ist am Beispiel der Reaktion zwischen Phenylalanin und OPA in Schema 8 abgebildet. Im ersten Schritt wird Phenylalanin unter Ausbildung des Imins **I** an OPA addiert. Dieses steht im Gleichgewicht mit dem Diimin **VI**, das durch Addition eines zusätzlichen Phenylalaninmoleküls gebildet wird. Im nächsten Schritt ist der Nachbargruppeneffekt der Säuregruppe involviert, wobei diese das Imin-

Kohlenstoffatom nucleophil angreift und das cyclische Oxazolidin **II** erhalten wird. Durch erneuten nucleophilen Angriff des inzwischen sekundären Stickstoffatoms an das verbleibende Carbonyl-Kohlenstoffatom resultiert die tricyclische Struktur **III**. Durch das Vorhandensein einer Abgangsgruppe sowie der vorliegenden Ringspannung wird der Tricyclus unter Regenerierung der Säuregruppe geöffnet und es ergibt sich das Isoindolderivat **IV**. Dieses wird unter Ausbildung eines aromatischen Systems als Triebkraft in das stabilere Phthalimidin-Derivat **V** umgelagert.



Schema 8. Vorgeschlagener Mechanismus der Derivatisierung von Aminosäuren, hier L-Phenylalanin (Phe), mit *o*-Phthalaldehyd (OPA) nach *Allin et al.*^[131]

Zusätzlich konnten *Allin et al.* einige Phthalimidinderivate in guten Ausbeuten synthetisieren. So erhielten sie zum Beispiel bei der Reaktion von Phenylalanin mit OPA in ACN nach 12 Stunden Erhitzen unter Rückfluss das entsprechende Derivat in einer Ausbeute von 64 %. Um den oben dargestellten Mechanismus zu belegen, wurden Intermediate isoliert. Mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bewiesen sie, dass das gebildete Imin aus Benzaldehyd und 2-Amino-3-methylbutanol im Gleichgewicht mit seiner cyclischen Form liegt. Dieses cyclische Produkt der Reaktion zwischen OPA und Ephedrin konnte mit einer Ausbeute von 92 % isoliert werden.

Vier Jahre später publizierten *Breytenbach et al.* die Synthese weiterer Phthalimidin-Derivate diverser Aminosäuren mit Ausbeuten von 33–87 % sowie deren antibakterielle Wirkung.^[132]

Zuman verfasste 2004 einen Übersichtsartikel über die Reaktionen von OPA mit Nucleophilen.^[133] Er beschreibt die Chemie, ausgehend von Aldehyden, in wässriger Lösung als kompliziert, da diese

zusätzlich als Hydrate vorliegen. In Abbildung 21 sind die Formen von OPA in wässriger Lösung zu sehen. Neben der reaktivsten Form, dem OPA selbst, existiert das acyclische (**28**) wie auch das cyclische Monohydrat (**22**) zu 20 %, 8 % beziehungsweise 72 %.^[134] Die Existenz des cyclischen Hydrats **22**, sowie das Vorliegen eines Gleichgewichts zwischen **22** und OPA wurde bereits von *DoMinh et al.* nachgewiesen.^[129]

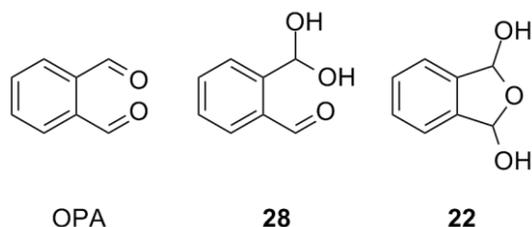


Abbildung 21. In wässrigem Medium vorliegende Formen von OPA nach *Zuman*.^[133]

Dabei wird das Dihydrat nicht gebildet, da der elektronenziehende Effekt der $\text{CH}(\text{OH})_2$ -Gruppe auf die verbleibende Aldehydgruppe geringer ist als die Reaktivität der Aldehydgruppe gegenüber einem nucleophilen Angriff einer der Hydroxylgruppen des Hydrats **28**. Da sich das Gleichgewicht zwischen acyclischem und cyclischem Hydrat schneller einstellt als zwischen OPA und acyclischem Hydrat, liegt letztgenanntes nur in geringen Mengen vor. Somit handelt es sich hierbei um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Hydratisierung. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Dehydratisierung selbst ist die Säure-katalysierte Ringöffnung des Hemiacetals **22** zum acyclischen Hydrat **28**. Zudem verläuft die Einstellung beider Gleichgewichte Säure-Base-katalysiert.^[134] Glycin wird unter Ausbildung der cyclischen Struktur **29** schneller an **28** addiert als an OPA selbst (Abbildung 22). Das cyclische Intermediat **29** unterliegt einer Dehydratisierung und geht in das Produkt, das Phthalimidin-Derivat, über.

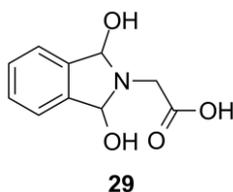
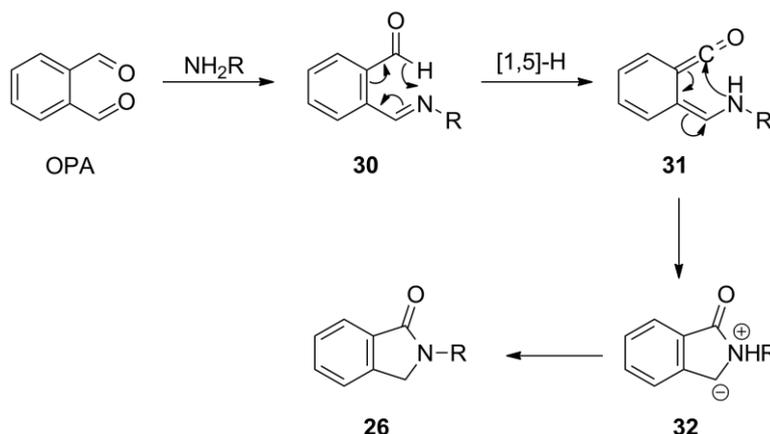


Abbildung 22. Strukturformel des Intermediats der Reaktion von OPA mit Glycin.^[133]

Die Reaktion zwischen einigen Aminosäuren und OPA (im Verhältnis 1:2) bei pH 10.5 verläuft relativ langsam für Derivatisierungsreaktionen und ist erst nach 0.3 (Lysin) bis zwei Stunden (Glycin) beendet.

Bei der Reaktion zwischen Histamin und OPA in alkalischer Lösung bei pH 12.5 wird ein instabiles fluoreszierendes Produkt gebildet, das in fluoreszente und nicht-fluoreszente Substanzen zerfällt. Jedoch war es nicht möglich, die Struktur dieser Substanz aufzuklären.

2005 postulierten *Alajarin et al.* den in Schema 9 abgebildeten Mechanismus der Reaktion zwischen OPA und Aminen auf Grundlage von theoretischen Berechnungen. [135]



Schema 9. Postulierter Mechanismus der Reaktion zwischen OPA und Aminen nach *Alajarin et al.* [135]

OPA reagiert mit einem Amin unter Ausbildung des Imins **30**, wobei dieses einer [1,5]-H sigmatropen Umlagerung unterliegt und in das Ketene **31** übergeht. Der H-Shift wird von *Alajarin et al.* als Schlüsselschritt in dem Mechanismus beschrieben. Anschließend kommt es zu einem nucleophilen Angriff des Stickstoffatoms des Enamins an das Kohlenstoffatom des Ketens unter Bildung der cyclischen Verbindung **32**, die durch einen intramolekularen Protonentransfer in das Phthalimidin-Derivat **26** übergeht. Mithilfe von quantenchemischen Untersuchungen wurde diese Reaktionssequenz als exothermer Prozess bestimmt, wobei der nucleophile Angriff des Stickstoffatoms keine Energiebarriere aufweist und wie der intramolekulare Protonentransfer exotherm verläuft. Zudem untersuchten *Alajarin et al.* zwei weitere mögliche Reaktionsmechanismen, die energetisch ungünstiger sind als der oben gezeigte (Schema 9). Bei einem dieser Möglichkeiten handelt es sich um den entsprechenden Mechanismus, den *Grigg et al.* bereits für die Reaktion zwischen OPA und Ammoniak vorgeschlagen hatten (Schema 5). [128]

Kulla et al. berichteten von der Untersuchung der Reaktion von OPA mit Ammoniak in einem Borat-Puffer bei pH 9.3 mittels Polarographie und UV-Spektroskopie. [136] Der in dieser Publikation vorgestellte Reaktionsmechanismus ist in Schema 10 dargestellt und unterscheidet sich wesentlich von dem von *Allin et al.* vorgeschlagenen Mechanismus (Schema 8), in dem die Bildung des

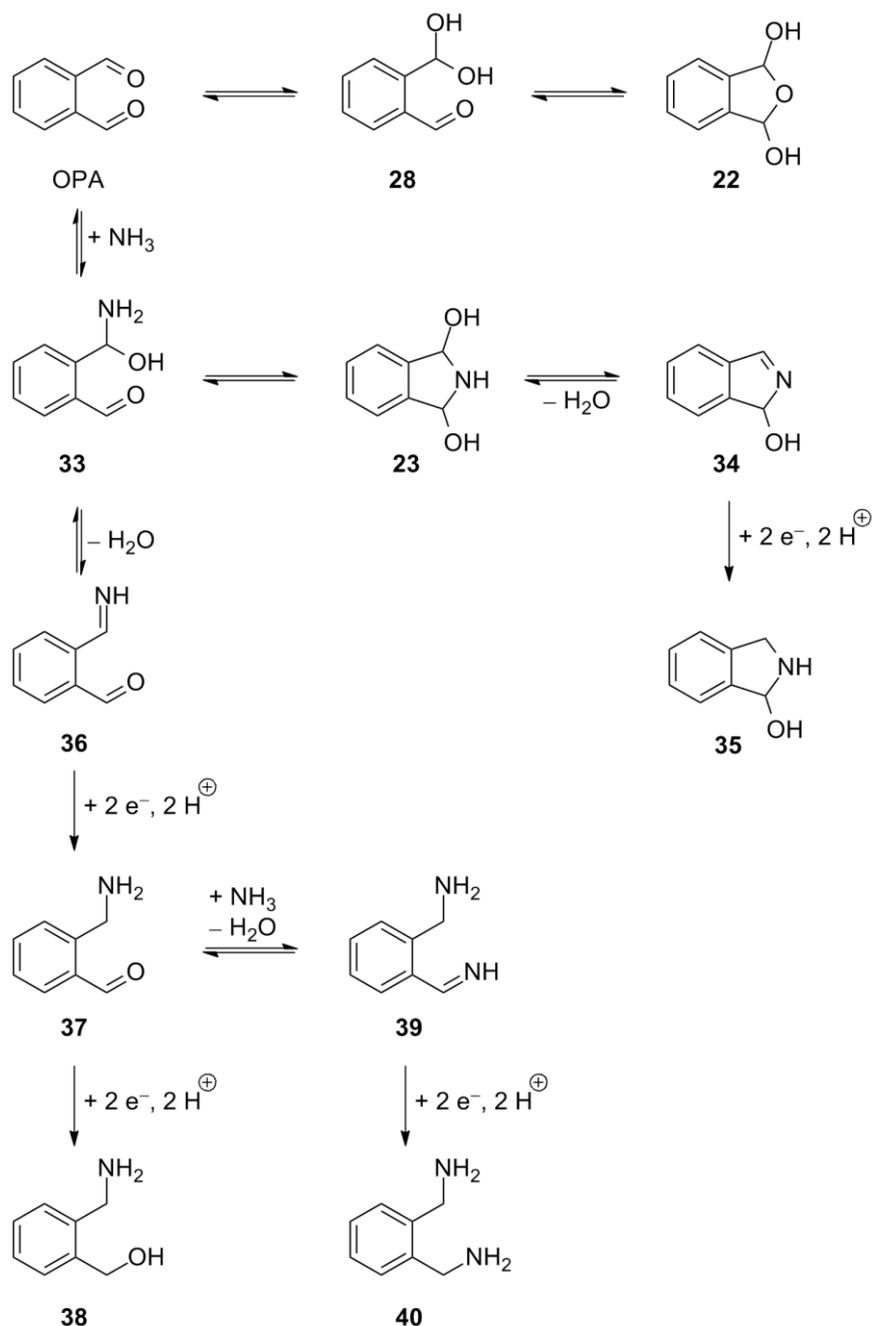
Imins als essentieller Schritt beschrieben wird.^[131] Dabei beruht der von *Allin et al.* vorgeschlagene Mechanismus auf Identifizierungen von Produkten beziehungsweise Intermediaten. *Kulla et al.* hingegen beziehen sich auf die Verfolgung von Gleichgewichten und deren zu Grunde liegenden Kinetiken.

OPA liegt, wie bereits oben erwähnt und von *DoMinh et al.* und *Zuman* untersucht,^[129,133] in wässriger Lösung als Gleichgewicht zwischen drei Formen vor (Dialdehyd OPA, acyclisches Monohydrat **28**, cyclisches Hemiacetal **22**). Durch die Additionsreaktion von Ammoniak an OPA unter Ausbildung von **33** wird OPA aus dem Gleichgewicht entfernt (Schema 10), wobei sich dieses sehr schnell wiederinstellt. Werden große Ammoniakkonzentrationen verwendet, kann eine Addition von Ammoniak an das acyclische Monohydrat **28**, gefolgt von einer Dehydratisierung der geminalen Hydroxylgruppe, nicht ausgeschlossen werden. Wie in Schema 10 abgebildet, reagiert **33** weiter zum cyclischen Intermediat **23**. Somit handelt es sich bei der Reaktion von OPA mit Ammoniak zum Imin **36** um eine konkurrierende Nebenreaktion und nicht wie von *Allin et al.*^[131] beschrieben um einen essentiellen Reaktionsschritt zum Produkt.

Die Reduktion der Iminokomponenten **36** und **39** sowie des cyclischen Intermediats **34** wurde beobachtet, womit das gleichzeitige Vorliegen von mehreren Iminokomponenten nachgewiesen wurde.

Im Vergleich zur bestimmten Gleichgewichtskonstante zwischen OPA und **23** von $4 \cdot 10^2 \text{ l mol}^{-1}$ liegen die für Isophthalaldehyd und Terephthalaldehyd um einige Größenordnungen darunter ($2.5 \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1}$, $4.75 \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1}$). Das legt den Schluss nahe, dass die Cyclisierung einen großen Einfluss auf die Reaktivität gegenüber Ammoniak besitzen muss. Durch Ansäuern der Reaktionslösung nach Bildung von **34** konnte mittels UV-Spektroskopie der Zerfall von **34** und die Anreicherung von OPA beobachtet werden und somit das Vorliegen von Gleichgewichtsreaktionen bewiesen werden.

Zudem diskutierten *Kulla et al.*,^[136] dass sich die Reaktion von OPA mit Ammoniak in drei Phasen gliedert. Die erste beinhaltet eine schnelle Reaktion innerhalb der ersten zwei Minuten. Anschließend läuft eine langsamere Reaktion in einem Zeitrahmen von fünf bis 60 Minuten ab. In der letzten Phase nach 60 Minuten ist die Bildung von Nebenprodukten mit Absorptionsmaxima von über 350 nm und fluoreszierenden Spezies mit inbegriffen.



Schema 10. Reaktionsschema der Reaktion von OPA mit Ammoniak nach Kulla *et al.*[136]

Das UV-Spektrum, der in der ersten Phase gebildeten Substanz, weist keinen isobestischen Punkt mit den später aufgenommenen Spektren auf, was ein Indiz für das Vorliegen einer konkurrierenden Nebenreaktion und nicht für die Bildung eines Intermediats der langsamer verlaufenden Reaktion ist. Anhand des Absorptionsmaximums und des Reduktionspotentials konnte die Substanz als Imin **36** identifiziert werden, wobei die Bildung des Aminoalkohols **33** und die anschließende Dehydratisierung zu schnell abläuft, um sie detektieren zu können. Die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion von OPA mit Ammoniak zum Imin **36** konnte zu $1.1 \cdot 10^2 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Dabei läuft die Reaktion mit steigendem pH-Wert schneller ab.[136]

In Phase 2 nimmt das Reduktionspotential des Imins **36** wie auch das von OPA ab, wobei im selben Maße ein neues Reduktionspotential des Reaktionsgemischs und somit eine neue Verbindung entsteht. Die Abnahme des Reduktionspotentials von **36** deutet darauf hin, dass dieses zurück zum Aminoalkohol **33** reagiert, welcher einer Cyclisierung unterliegt, wodurch **34** gebildet wird. Die Geschwindigkeitskonstante für die Abnahme der Konzentration von OPA beträgt $9.2 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ist nahezu identisch mit der Bildung von **34** ($9.0 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Das legt den Schluss nahe, dass OPA in **34** umgewandelt wird und in diesem Schritt nur sehr geringe Mengen an Intermediaten, wie zum Beispiel **33** oder **23**, oder Nebenprodukten (**36**) gebildet werden. Grund für das Auftreten von Intermediaten und Nebenprodukten in geringen Konzentrationen ist die größere Stabilität des Produktes **34**, dessen Bildung auch die Triebkraft der Reaktion ist. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen OPA und Ammoniak konnte bei pH 9.3 auf $9.1 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.^[136] Zudem konnte eine pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von *Kulla et al.* festgestellt werden, wobei die Ionenstärke der Reaktionslösung konstant gehalten wurde. Die Geschwindigkeitskonstante nimmt mit Erhöhung des pH-Wertes von 8.3 auf 9.8 um den Faktor 10 ab. Die Reaktion verläuft zudem Säure-katalysiert ab, vor allem der Schritt der Ringbildung erfolgt laut *Kulla et al.* schneller in Anwesenheit von Säure.

Die ablaufenden Prozesse in Phase 3 gehen mit der Abnahme der Konzentration von **23** einher, was an der Abnahme der Absorptionsbande bei 262 nm festzumachen ist.

Wird anstelle von Ammoniak 2-Aminoethanol mit OPA umgesetzt, verläuft die Reaktion bei pH 9.5 so schnell, dass diese mittels UV-Spektroskopie und Polarimetrie nicht verfolgt werden konnte. Erst eine Senkung des pH-Wertes auf 8.5 ermöglichte die Untersuchung der Reaktion. Auch hier konnten keine Intermediate detektiert werden. Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante ergab einen Wert von $1.1 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Jedoch gab die Gruppe keine Erklärung für die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bei Wechsel der Reaktanden von Ammoniak zu 2-Aminoethanol an. Allerdings könnte das Vorliegen eines zweiten Nucleophils im Molekül (der Hydroxylgruppe) und damit die Möglichkeit der Cyclisierung eine Beschleunigung der Reaktion, analog zu dem von *Allin et al.* postuliertem Mechanismus,^[131] verursachen. Bei längeren Reaktionszeiten nimmt die Absorptionsbande bei 262 nm (**23**) ab und es tauchen bei 301 und 330 nm neue Banden auf.^[136] Das zeigt den großen Einfluss der Reaktionszeit auf diese Reaktion.

2012 veröffentlichten *Klima et al.* eine Untersuchung der Reaktion zwischen OPA und 2-Aminoethanol unter verschiedenen Reaktionsbedingungen.^[137] Die von dieser Gruppe isolierten Produkte sind in Abbildung 23 zu sehen.

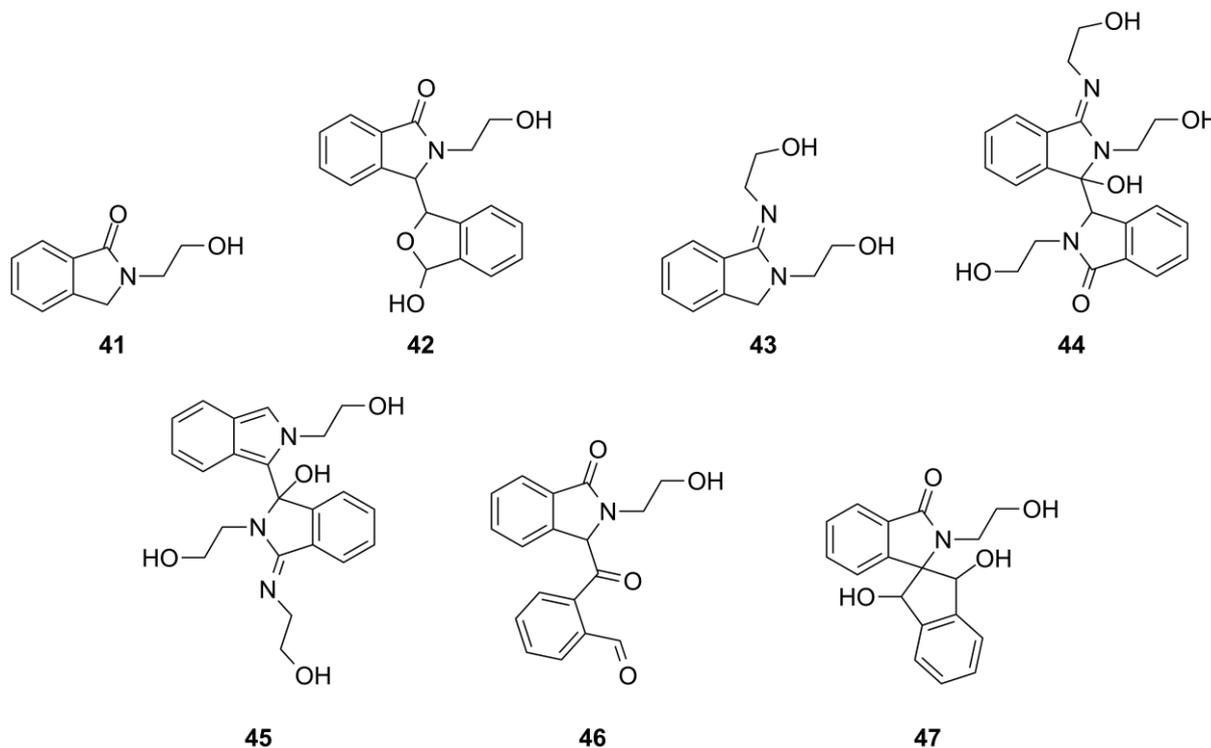


Abbildung 23. Isolierte Produkte der Reaktion von OPA mit 2-Aminoethanol unter verschiedenen Reaktionsbedingungen nach *Klima et al.*^[137]

Wird die Reaktion in ACN mit einem leichten Überschuss an 2-Aminoethanol (1:1.25) durchgeführt, so wird ein Gemisch erhalten, wobei **41** und **42** die Hauptprodukte darstellen. Das Auftreten einer Struktur wie **42** wurde bereits von *DoMinh et al.* bei der Untersuchung der Reaktion zwischen OPA und Aminen beschrieben.^[129] Unter diesen Reaktionsbedingungen liegt OPA hauptsächlich als Dialdehyd und nicht als Hydrat vor. Bei der Durchführung der Reaktion in Borat-Puffer bei pH 9.5 mit erneutem Überschuss der Aminokomponente (1:1.7) konnten zwei Produkte isoliert werden (**41** und **43**). Die Struktur von **43** wurde durch eine Kristallstrukturanalyse bestätigt.^[138] In einem Puffer aus 2-Aminoethanol und Salzsäure (2:1) konnten nach der Reaktion mit OPA **43**, **44** und 2-(Hydroxymethyl)benzaldehyd isoliert werden. Bei langsamer Zugabe der Reaktanden zueinander wird zusätzlich **45** erhalten. Zudem konnte die Bildung weiterer Spezies beobachtet werden, die laut den Autoren von makromolekularer Natur sind.^[137] Bereits *DoMinh et al.* beschrieben die Bildung eines dunkel gefärbten Polymers.^[129] Bei der Zugabe eines Überschusses an OPA (4:1, 2:1) konnte neben nicht umgesetztem Ausgangsmaterial als Hauptprodukt Verbindung **41** isoliert werden. Zusätzlich konnte **46** erhalten werden, was nur unter diesen Bedingungen gelang, da es unter anderen Reaktionsbedingungen mit noch

nicht umgesetzten 2-Aminoethanol zu **44** reagiert. Wird OPA in hohen Konzentrationen (100 mM) eingesetzt, werden zusätzlich drei Diastereomere der Spiroverbindung **47** erhalten.

Die Bildung von **43**, **44** und **46** kann nur durch eine Reaktionssequenz beschrieben werden, in der eine Oxidation mit inbegriffen ist. Diese Produkte wurden auch beim Durchführen der Reaktion unter Stickstoffschutzgasatmosphäre beobachtet. Die Autoren schließen daraus, dass OPA, ähnlich wie in der Cannizzaro-Reaktion, eine Doppelrolle besitzt.^[139-141] Zum einen fungiert es als elektrophiles Substrat und zum anderen als Oxidationsmittel, indem es als Hydridakzeptor agiert. Diese Annahme wird durch die Isolation von 2-(Hydroxymethyl)benzaldehyd gestützt.

2

ZIELSETZUNG

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Dissertationsschrift sollen Interkonversionsbarrieren sowie die kritische Mizellbildungskonzentration von Natriumdodecylsulfat bestimmt werden. Zudem sollen zwei Reaktionen höherer Ordnung mittels Kapillarelektrophorese untersucht werden.

Zunächst sollen die Rotamere des dimeren Captoprils (Captoprildisulfid) mittels DHPLC getrennt werden. Anhand Temperatur-abhängiger DHPLC-Experimente soll Zugang zu kinetischen als auch thermodynamischen Parametern der Interkonversion des Captoprildisulfids erhalten werden. Da eine direkte Berechnung dieser Daten aus den DHPLC-Experimenten nicht möglich ist, sollen kinetische und thermodynamische Daten durch Vergleich der experimentell ermittelten Chromatogramme mit Simulationen des Programms *ChromXWin* erhalten werden. Im Anschluss daran sollen diese Werte mit Rotationsbarrieren von Di- und Triprolinen verglichen werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit soll die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von Natriumdodecylsulfat (SDS) mit steigendem Acetonitril-Gehalt (ACN) des wässrigen Puffers mittels diverser CE-basierender Techniken ermittelt werden. Die CMC soll mittels Leitfähigkeitsmessung wie auch Mobilitätsanalyse von unterschiedlichen Markerverbindungen und von Systempeaks erfolgen.

Darauffolgend sollen Untersuchungen von Ringspannungs-begünstigten Azid-Alin-Cycloadditionsreaktionen (SPAAC-Reaktionen) stattfinden. Diese Reaktion wurde hinsichtlich des Einflusses der Cycloalkinkomponente bereits ausreichend untersucht. Aus diesem Grunde soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Azidkomponente analysiert werden. Zudem soll der pH-Wert der Reaktionslösung variiert werden und somit die Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert ermittelt werden. Darüber hinaus soll aufbauend auf den Ergebnissen der CMC-Bestimmung der Einfluss von Mizellen auf die Reaktionsgeschwindigkeit der SPAAC-Reaktionen untersucht werden. Ferner sollen *on-column* Reaktionen durchgeführt werden, um eine künftige Anwendung in der Markierung von Peptiden und Proteinen zu ermöglichen.

Hinzukommend soll die Derivatisierungsreaktion von Aminosäuren mit OPA am Beispiel von L-Phenylalanin untersucht werden. Bislang ist der Reaktionsmechanismus der Reaktion zwischen OPA und Aminosäuren ungeklärt, obwohl einige konträre Vorschläge zu dessen Ablauf existieren. Hinzukommend sind viele Einflüsse auf die Reaktion, wie beispielsweise die Rolle des pH-Wertes sowie die Pufferzusammensetzung, noch nicht hinreichend untersucht worden. Dies ist notwendig um die Derivatisierungsreaktionen von Aminosäuren mit OPA zuverlässig durchführen zu können, da aktuell einige widersprüchliche Vorschriften zur Durchführung der Derivatisierung in der Literatur vorhanden sind.^[142] Zudem sind kinetische Daten dieser Reaktion kaum vorhanden, da es sich um eine komplexe Reaktion handelt. Diese sollen in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden.

ERGEBNISSE UND
DISKUSSION

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 *E/Z*-Isomerisierung von Prolin-Peptidbindungen

In diesem Kapitel soll auf die *E/Z*-Isomerisierung von Prolin-Peptidbindungen am Beispiel des Dimers des Prolin-basierenden Medikaments Captopril eingegangen werden und diese mit der *E/Z*-Isomerisierung von Di- und Triprolinderivaten verglichen werden. Da bei diesem Interkonvertierungsprozess vier Isomere beteiligt sind, ist kein direkter Zugang zu kinetischen wie auch thermodynamischen Daten möglich. Aus diesem Grund wurden Simulationen mittels *ChromXWin* mit experimentell ermittelten Chromatogrammen verglichen und so kinetische und thermodynamische Daten der Interkonversion des Captoprildisulfids erhalten.

Die Untersuchung der *E/Z*-Isomerisierung der Di- und Triprolinderivate (Abbildung 24) wurden in einem 20 mM Borat-Puffer bei pH 9.3 mittels DCE durchgeführt.^[143] Dabei handelt es sich, wie aus Abbildung 24 ersichtlich, um *N*-Acetyl-geschützte Derivate, die am C-Terminus eine Amidgruppe anstelle der Carboxylgruppe tragen.

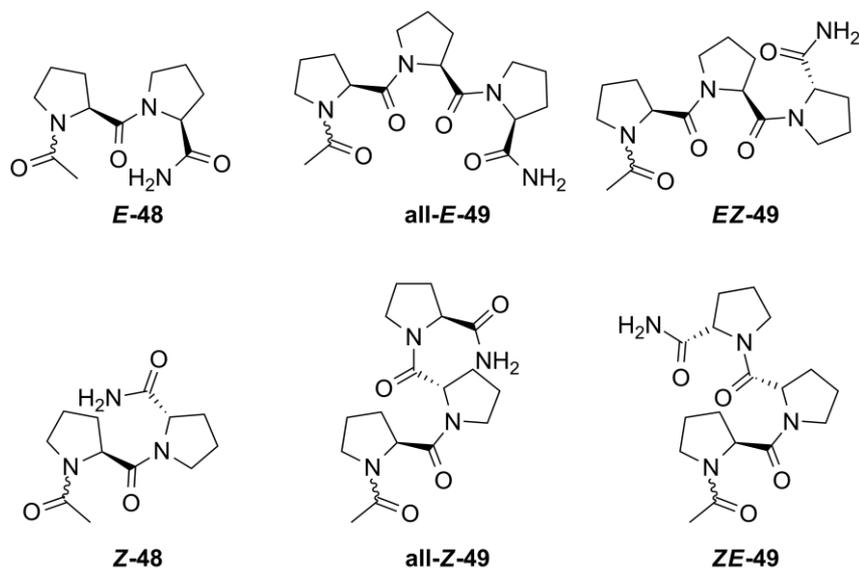


Abbildung 24. Strukturformeln der Di- und Triprolinderivate mit möglichen Konformationen der Peptidbindungen.

Die erhaltenen kinetischen und thermodynamischen Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3. Kinetische und thermodynamische Daten der Interkonversion von **48** und **49**.^[143]

	48	49
$k^{UE}_{Z \rightarrow E} [10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	0.12	0.22
$k^{UE}_{E \rightarrow Z} [10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	0.97	2.30
$\Delta G^{\ddagger}_{298.15 \text{ K}, Z \rightarrow E} [\text{kJ mol}^{-1}]$	93.7 ± 0.9	92.2 ± 0.9
$\Delta G^{\ddagger}_{298.15 \text{ K}, E \rightarrow Z} [\text{kJ mol}^{-1}]$	88.5 ± 0.9	86.4 ± 0.9

Da für das Diprolin **48** als auch das Triprolin **49** lediglich zwei ineinander konvertierende Spezies beobachtet werden konnten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob es sich bei der Interkonversion um die *N*-Acetyl-Prolin-Peptidbindung oder um die Prolyl-Prolin-Peptidbindung handelt. Hierfür wurde *N*-Acetyl-Prolin **50** unter identischen Bedingungen vermessen. Das erhaltene Elektropherogramm ist in Abbildung 25 dargestellt.

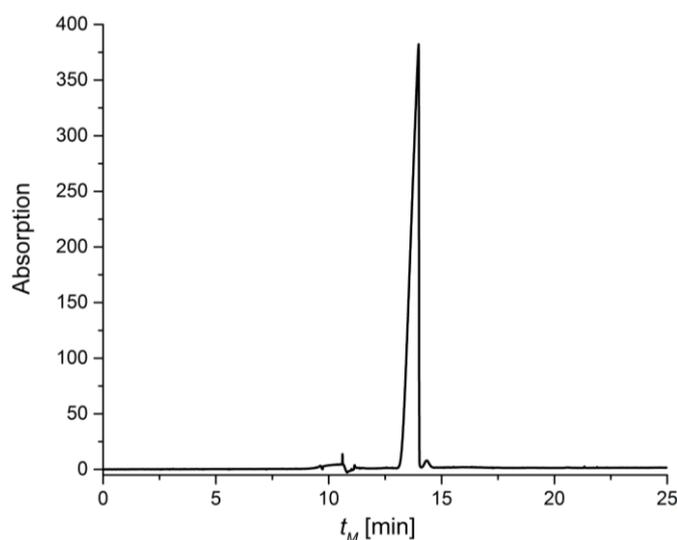


Abbildung 25. Elektropherogramm von *N*-Acetyl-Prolin **50**. Separationsbedingungen: 20 mM Borat-Puffer (pH 9.3), $T = 8 \text{ }^\circ\text{C}$, $U = 10 \text{ kV}$, $\lambda = 210 \text{ nm}$.

Wie aus Abbildung 25 ersichtlich, wurde ein einzelner Peak mit großer Intensität und ein Peak mit sehr geringer Intensität erhalten. Zwischen beiden Peaks konnte bei Temperaturerhöhung keine Plateaubildung beobachtet werden, wie es für interkonvertierende Stereoisomere typisch ist. Da es sich um käuflich erworbenes *N*-Acetyl-Prolin mit einer Reinheit von 99 % handelt, könnte der zweite Peak von einer Verunreinigung stammen.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Isomerisierung der in *N*-Acetyl-Prolin beinhaltenen Amidbindung zu schnell vonstattengeht, als dass sie mittels DCE verfolgt werden kann. Folglich wurde im Falle von **48** und **49** die *E/Z*-Isomerisierung der Prolyl-Prolinpeptidbindung untersucht.

Zur Untersuchung der *E/Z*-Isomerisierung des Captoprildisulfids wurden zunächst Temperaturabhängige DHPLC-Experimente durchgeführt. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 26 dargestellt.

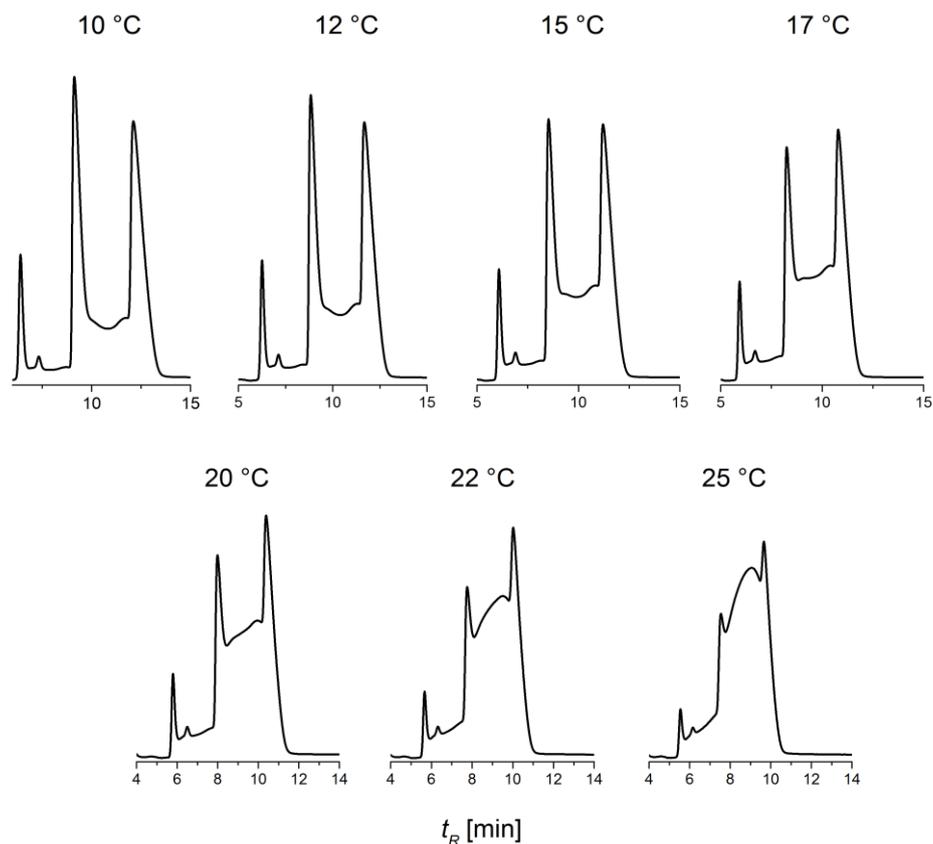


Abbildung 26. Chromatogramme der Interkonversion der Rotamere von Captoprildisulfid in Abhängigkeit von der Temperatur.

Anhand der DHPLC-Experimente ist deutlich erkennbar, dass mit zunehmender Temperatur die Plateauhöhen zwischen den einzelnen Peaks ansteigen. Dies wurde bereits von *Nishikawa et al.* gezeigt, die die Rotamere des Captoprildisulfids ebenfalls mittels DHPLC getrennt haben.^[72] Zudem erhielten *Nishikawa et al.* beinahe identische Chromatogramme bei ihren Experimenten, wobei sie jedoch auf eine Zuordnung der Peaks verzichteten.

Abbildung 26 ist zu entnehmen, dass zwei der Konformationen gegenüber der dritten favorisiert werden. Aufgrund der Trennung in achiraler Umgebung können die Enantiomere *EZ-2* und *ZE-2* nicht voneinander getrennt werden. Wird davon ausgegangen, dass die gleichen Konformationen der Rotamere in Lösung wie im Festkörper favorisiert werden, kann eine Zuordnung auf Grundlage der von *Bojarska et al.* publizierten Kristallstruktur erfolgen, die eine Begünstigung der *ZZ*-Konformation gegenüber den anderen fanden.^[77] Somit handelt es sich bei dem Rotamer, das nur in geringen Mengen vorliegt um *EE-2*. Aufgrund der Rotation einer Captoprileinheit muss der mittlere Peak durch *EZ-2* und *ZE-2* hervorgerufen werden. Folglich wird das Rotamer *ZZ-2* zuletzt

eluiert. Diese Zuordnung wird durch die Aussage von *Rabenstein et al.* gestützt, die eine Favorisierung der Z-Konfiguration der Prolin-Peptidbindungen beschreiben.^[75]

Auf Grundlage der chromatographischen Daten, wie Retentionszeit, Peakhöhe und Peakbreite bei halber Höhe können mittels *ChromXWin* die Chromatogramme bei gegebenen Geschwindigkeitskonstanten der Interkonversion von Captoprildisulfid simuliert werden. Durch Vergleich der erhaltenen Chromatogramme und Plateauhöhen können nun die Geschwindigkeitskonstanten erhalten werden. In Abbildung 27 ist der Vergleich von einigen experimentell erhaltenen mit simulierten Chromatogrammen gezeigt.

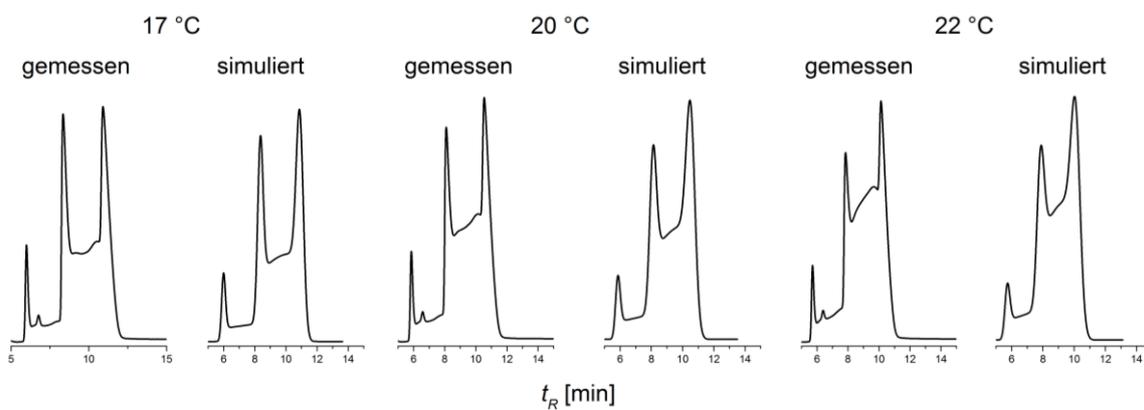


Abbildung 27. Vergleich der gemessenen und simulierten Chromatogramme bei unterschiedlichen Temperaturen.

Zusätzlich zu den bereits in Abbildung 27 gezeigten Chromatogrammen wird mittels *ChromXWin* Zugang zu den Peakflächen der einzelnen Isomere erhalten. Diese sind exemplarisch für eine dynamische Trennung in Abbildung 28 dargestellt.

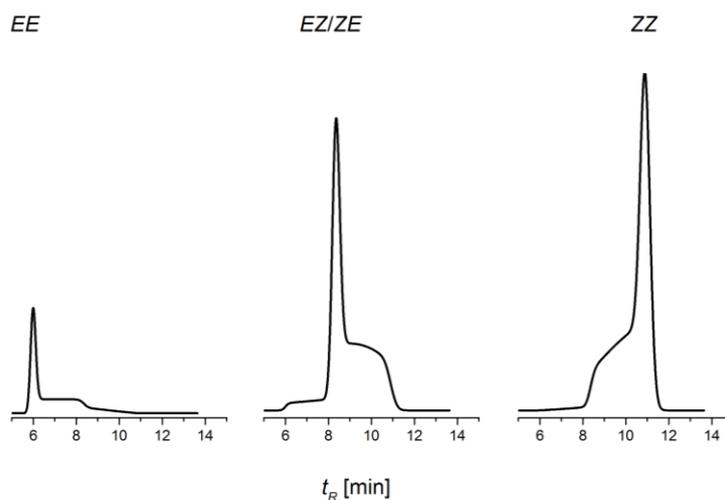


Abbildung 28. Darstellung der mittels *ChromXWin* erhaltenen Peakflächen der einzelnen Isomere von Captopril disulfid bei 17 °C.

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten und Freien Energien sind für alle untersuchten Temperaturen in

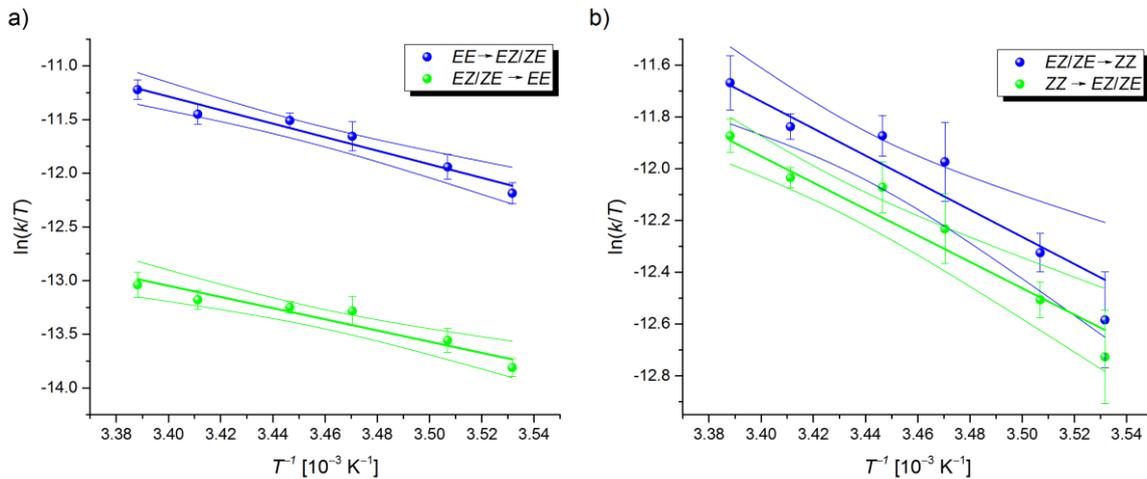
Tabelle 4 zusammengefasst. Die Interkonversion des Captopril disulfids bei 25 °C verursacht ein hohes Plateau zwischen dem zweiten und dritten Peak, sodass die Auswertung bei diesen Bedingungen nicht durchgeführt werden konnte.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der *EE*-Konformation um die ungünstigste Konformation, demnach verläuft die Rotation von diesem Konformer zu *EZ-2* oder *ZE-2* schneller ab als die Rotation der Enantiomere zum stabilsten *ZZ*-Konformer.

Für die Interkonversion des monomeren Captopriols von der *E*- zur *Z*-Konformation ist bei 20 °C eine Geschwindigkeitskonstante von $1.04 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ in der Literatur beschrieben.^[1] Die Rückreaktion von *Z-1* zu *E-1* verläuft mit einer Geschwindigkeitskonstante von $0.80 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Diese Werte liegen unter den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte. Dies lässt sich jedoch leicht erklären, da das *EE*-Konformer zwei verschiedene Rotationen eingehen kann, um zu dem Enantiomerenpaar *EZ-/ZE-2* zu gelangen. Zudem besitzt das *ZZ*-Konformer gegenüber seinem Monomer *Z-1* größere Stabilisierungseffekte.

Tabelle 4. Übersicht über kinetische und thermodynamische Daten der Interkonversion des Captopril-disulfids bei 20 °C.

T [°C]	k_1 [10^{-3} s^{-1}]	k_2 [10^{-3} s^{-1}]	ΔG_1 [kJ mol $^{-1}$]	ΔG_2 [kJ mol $^{-1}$]
	k_{-1} [10^{-3} s^{-1}]	k_{-2} [10^{-3} s^{-1}]	ΔG_{-1} [kJ mol $^{-1}$]	ΔG_{-2} [kJ mol $^{-1}$]
10	1.45 ± 0.14	0.98 ± 0.19	84.6 ± 0.2	85.6 ± 0.4
	0.29 ± 0.02	0.85 ± 0.16	88.4 ± 0.2	86.0 ± 0.4
12	1.87 ± 0.21	1.27 ± 0.09	84.6 ± 0.3	85.6 ± 0.2
	0.37 ± 0.04	1.06 ± 0.07	88.5 ± 0.3	86.0 ± 0.2
15	2.51 ± 0.33	1.83 ± 0.27	84.8 ± 0.3	85.6 ± 0.4
	0.49 ± 0.06	1.41 ± 0.18	88.7 ± 0.3	86.2 ± 0.3
17	2.92 ± 0.29	2.03 ± 0.11	85.1 ± 0.2	86.0 ± 0.1
	0.51 ± 0.05	1.67 ± 0.07	89.3 ± 0.2	86.4 ± 0.1
20	3.13 ± 0.29	2.12 ± 0.11	85.8 ± 0.2	86.8 ± 0.1
	0.56 ± 0.05	1.74 ± 0.07	90.0 ± 0.2	87.2 ± 0.1
22	3.97 ± 0.37	2.54 ± 0.27	88.1 ± 0.2	86.9 ± 0.3
	0.64 ± 0.08	2.06 ± 0.14	90.3 ± 0.3	87.4 ± 0.2


Abbildung 29. Eyring-Plots der Interkonversion von Captoprildisulfid (a) von EE zu EZ/ZE und dessen Rückreaktion, b) von EZ/ZE zu ZZ und dessen Rückreaktion).

Die Berechnung der ΔG -Werte erfolgte mittels der Eyring-Gleichung (Gl. 9). In Abbildung 29 sind die zugehörigen Eyring-Plots beider Interkonversionsprozesse dargestellt. Aus den Eyring-Plots konnten die in Tabelle 5 zusammengefassten thermodynamischen Daten erhalten werden, wobei ΔH^\ddagger aus der Steigung und ΔS^\ddagger aus dem Abszissenabschnitt berechnet wurde.

Tabelle 5. Übersicht der thermodynamischen Daten der Interkonversion des Captoprilidisulfids.

	ΔG^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	ΔH^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	ΔS^\ddagger [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
<i>EE</i> → <i>EZ/ZE</i>	84.5 ± 0.5	51.9 ± 2.6	-109 ± 12
<i>EZ/ZE</i> → <i>EE</i>	89.0 ± 0.5	40.6 ± 3.1	-163 ± 59
<i>EZ/ZE</i> → <i>ZZ</i>	85.5 ± 0.5	49.6 ± 3.7	-120 ± 22
<i>ZZ</i> → <i>EZ/ZE</i>	86.0 ± 0.5	47.1 ± 2.7	-130 ± 20

Durch Interaktion des Captoprilidisulfids mit den C₁₈-Ketten der stationären Phase (RP C-18 HPLC-Säule) nimmt die Entropie einen stark negativen Wert an. Aus diesem Grund kann ein Vergleich der Daten mit Literaturwerten nicht erfolgen, da diese mittels DCE, das heißt ausschließlich in mobiler Phase, erhalten wurden.

Für die Interkonversion des monomeren Captoprils publizierte *O. Trapp* eine Rotationsbarriere von 89.2 ± 0.3 kJ mol⁻¹ zwischen *E*- und *Z*-Konformer und von 89.6 ± 0.3 kJ mol⁻¹ zwischen *Z*- und *E*-Konformer.^[1] Aufgrund eines schneller ablaufenden Interkonversionsprozesses im Falle des Captoprilidisulfids liegen auch die Werte der Rotationsbarriere niedriger als die des monomeren Captoprils.

Die Di- und Triproline **48** und **49** besitzen eine höhere Rotationsbarriere als das monomere Captopril sowie das dimere Captoprilidisulfid. Die Interkonversionsbarriere von der *E*- in die *Z*-Konformation beträgt für **48** 88.5 kJ mol⁻¹ für **49** 86.4 kJ mol⁻¹. Die Barriere der jeweiligen Rückreaktion wurde auf 93.7 kJ mol⁻¹ und 92.2 kJ mol⁻¹ für **48** beziehungsweise **49** bestimmt. Die größeren Interkonversionsbarrieren der Di- und Triproline sind ein Indiz auf die ausgeprägte Rigidität des Oligo-Prolin-Grundgerüsts.

3.2 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration mittels Kapillarelektrophorese

In diesem Kapitel der vorliegenden Arbeit wird über unterschiedliche Verfahren zur Bestimmung der CMC von SDS berichtet und die erhaltenen Ergebnisse verglichen. Die Untersuchungen hierzu wurden in Kooperation mit Dr. Jana Steflova durchgeführt. Hierbei wurden die Messungen in einem MOPS/LiOH-Puffersystem (20 mM/10 mM, pH 7.16, $I_s = 10$ mM) mit variierendem ACN-Gehalt (0–50 %, v/v) und mit SDS-Konzentrationen in einem Bereich von 0–50 mM durchgeführt.

3.2.1 Bestimmung der CMC mittels Leitfähigkeitsmessung im CE-Setup

Um die CMC mittels Leitfähigkeitsmessung im CE-Setup zu bestimmen, wurden zunächst CE-Experimente durchgeführt, wobei die Stromstärke der ersten fünf Minuten der elektrophoretischen Messungen gemittelt wurde. Die Leitfähigkeit G wurde berechnet ($G = R^{-1} = I/U$) und anschließend gegen die SDS-Konzentration bei unterschiedlichen ACN-Konzentrationen aufgetragen. Für sechs unterschiedliche ACN-Konzentrationen sind diese Auftragungen in Abbildung 30 dargestellt. Dabei ist in Abwesenheit des organischen Additivs eine starke Änderung der Steigung beim Übergang des ersten linearen Bereichs zum zweiten zu erkennen. Diese Änderung wird mit steigender ACN-Konzentration geringer. Schon bei 25 % ACN (v/v) ist eine Unterteilung des Schaubilds in zwei lineare Parts schwierig.

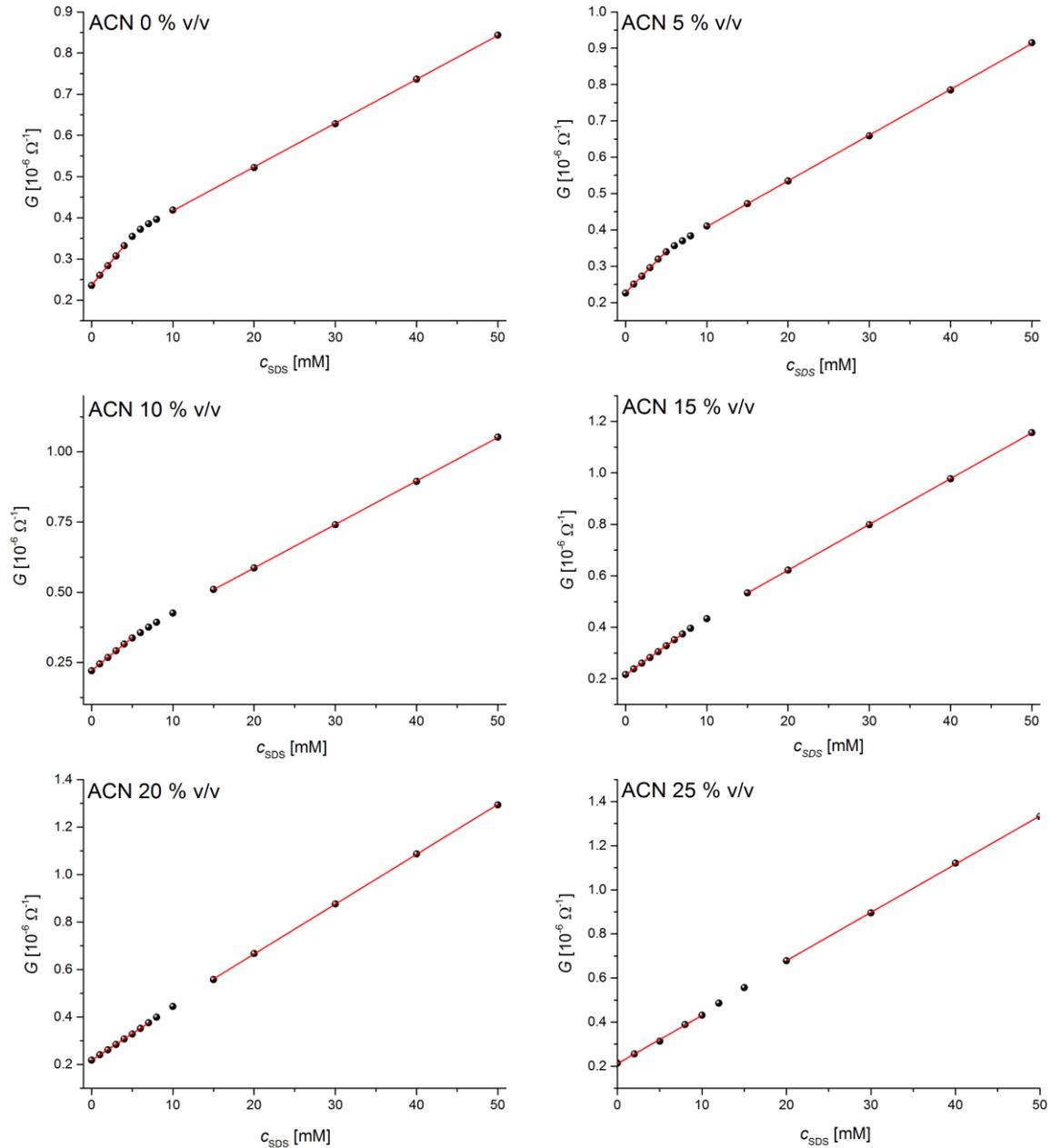


Abbildung 30. Bestimmung der CMC durch Auftragung der Leitfähigkeit gegen die eingesetzten SDS-Konzentrationen bei unterschiedlichem ACN-Gehalt der Pufferlösung.

Der Bereich der niedrigen beziehungsweise der hohen SDS-Konzentrationen wurde jeweils durch einen linearen Fit angepasst und die Schnittpunkte beider Geraden, was der CMC entspricht, bestimmt (Abbildung 31 links). Die CMC kann zusätzlich noch durch Auftragung der dritten Ableitung der erhaltenen Funktion als x-Achsenabschnitt ermittelt werden (Abbildung 31 rechts). Die aus diesen zwei Auswertungsverfahren erhaltenen CMC-Werte variieren nur minimal. So beträgt die CMC bei 5 % ACN, die durch den Schnittpunkt der Geraden ermittelt wurde, 5.3 mM, diejenige, die über die dritte Ableitung erhalten wurde, 5.0 mM.

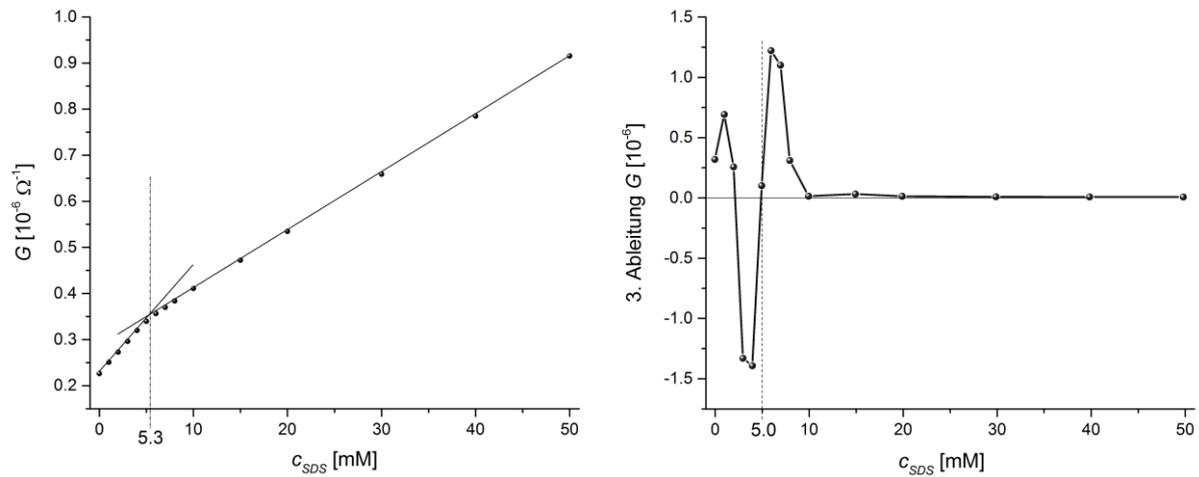


Abbildung 31. Bestimmung der CMC mittels Leitfähigkeitsmessungen im CE-Setup durch Ermittlung des Schnittpunktes beider Geraden der linearen Bereiche (links) beziehungsweise durch Auftragung der dritten Ableitung der Leitfähigkeit gegen die SDS-Konzentration (rechts) bei 5 % ACN (v/v).

Im untersuchten Puffersystem in Abwesenheit von ACN beträgt die CMC 5,6 mM beziehungsweise 5,5 mM, bestimmt mittels Auswertung der Schnittpunkte beziehungsweise der dritten Ableitung. Mit steigendem ACN-Gehalt kann eine minimale Abnahme der CMC auf 5,3 beziehungsweise 5,0 mM beobachtet werden (Schnittpunktanalyse, 3. Ableitung). Dieses Phänomen des Rückgangs der CMC wurde bereits durch *Jacquier et al.* beschrieben und sie erklärten es durch die Stabilisierungseffekte der SDS-Mizellen durch ACN in geringen prozentualen Anteilen (<10 %, v/v) im Vergleich zum vorliegenden Elektrolyten.^[45] Bei steigender ACN-Konzentration nimmt die CMC zu (exakte Werte sind in Tabelle 6 gelistet), was durch die Denaturierung der SDS-Mizellen aufgrund der sinkenden Polarität der Lösung erklärt werden kann. Dabei ist anzumerken, dass bei 15 % ACN (v/v) die Werte zwischen den beiden Bestimmungsmethoden stark differieren ($\Delta_{CMC} = 3,1$ mM). Grund dafür ist, dass bei dieser ACN-Konzentration kaum eine Änderung der Steigung zu erkennen ist (vgl. Abbildung 29), was die Schnittpunktanalyse erschwert. Eine Bestimmung der CMC mit ausreichender Verlässlichkeit oberhalb dieser ACN-Konzentration war aus diesem Grund nicht möglich.

3.2.2 Bestimmung der CMC mittels Mobilitätsmethode der MEKC

Um die CMC mittels Mobilitätsmethode bestimmen zu können, wurde, wie von *Jacquier et al.* vorgeschlagen, Naphthalin als Markersubstanz eingesetzt.^[40,45] Zusätzlich wurde 0.2 % DMSO als EOF-Marker zugesetzt, um die effektive elektrophoretische Mobilität bestimmen zu können. Zur CMC-Bestimmung wurden MEKC-Experimente mit Naphthalin als Probe in einem MOPS/LiOH-Puffersystem gelöst und sowohl mit unterschiedlichen SDS- als auch ACN-Konzentrationen durchgeführt. Die erhaltenen effektiven elektrophoretischen Mobilitäten sind in Abbildung 32 gegen die variierenden SDS-Konzentrationen und Puffersysteme mit steigendem ACN-Gehalt aufgetragen.

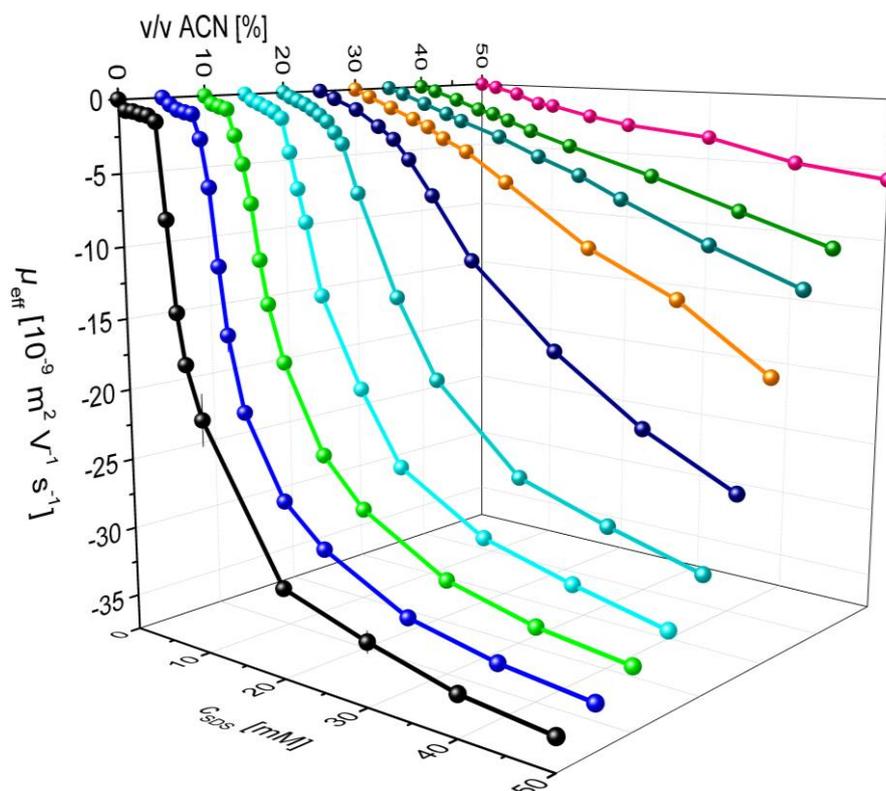


Abbildung 32. Elektrophoretische Mobilität von Naphthalin in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration und dem ACN-Gehalt.

Wie bei der Änderung der Leitfähigkeit in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration und von dem ACN-Gehalt, kann in Abwesenheit von ACN eine ausgeprägte Änderung der Steigung in der Kurve erkannt werden (Abbildung 32 schwarz). Bis zu einem ACN-Gehalt von etwa 25 % (Abbildung 32 marineblau) kann diese Änderung mit bloßem Auge erkannt werden. Bei höherem ACN-Gehalt des Elektrolyten ist diese Änderung zunehmend schwächer ausgeprägt, bis sie ab einem ACN-Gehalt von 40 % nicht mehr auszumachen ist. Durch Verschiebung der Änderung in der Steigung zu höheren SDS-Konzentrationen mit zunehmendem ACN-Gehalt nimmt auch die CMC zu (exakte Werte sind in Tabelle 6 gelistet). Hinzukommend kann eine geringe Abnahme der effektiven

elektrophoretischen Mobilität vor Erreichen der CMC beobachtet werden, die durch solvophobische Wechselwirkungen zwischen monomeren SDS-Molekülen und Naphthalin erklärt werden kann.

Zudem wurde die CMC unter Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 (Abbildung 33 links) und Coumarin 153 (Abbildung 33 rechts) mittels Mobilitätsmethode bestimmt.

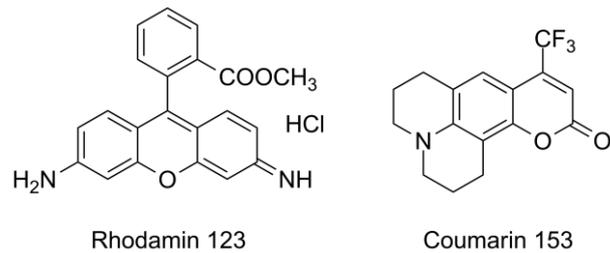


Abbildung 33. Eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe zur Bestimmung der CMC.

Dabei wurden MEKC-Experimente mit steigendem SDS- und ACN-Gehalt in einem MOPS/LiOH-Puffersystem durchgeführt und die elektrophoretischen Mobilitäten der Fluoreszenzfarbstoffe ermittelt. In Abbildung 34 sind die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten von Rhodamin 123 in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration und dem ACN-Gehalt dargestellt.

Die effektive elektrophoretische Mobilität von Rhodamin 123 ändert sich in Abwesenheit von ACN stark bei schrittweiser Erhöhung der SDS-Konzentration (Abbildung 34 schwarz). Wie schon zuvor bei der Untersuchung der effektiven elektrophoretischen Mobilität des Naphthalins in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration (vgl. Abbildung 32) fällt eine geringer werdende Änderung der effektiven elektrophoretischen Mobilität mit zunehmendem ACN-Gehalt auf. Bei dem höchsten untersuchten ACN-Gehalt von 50 % ist keine Änderung mehr in der Steigung zu erkennen (Abbildung 34 violett).

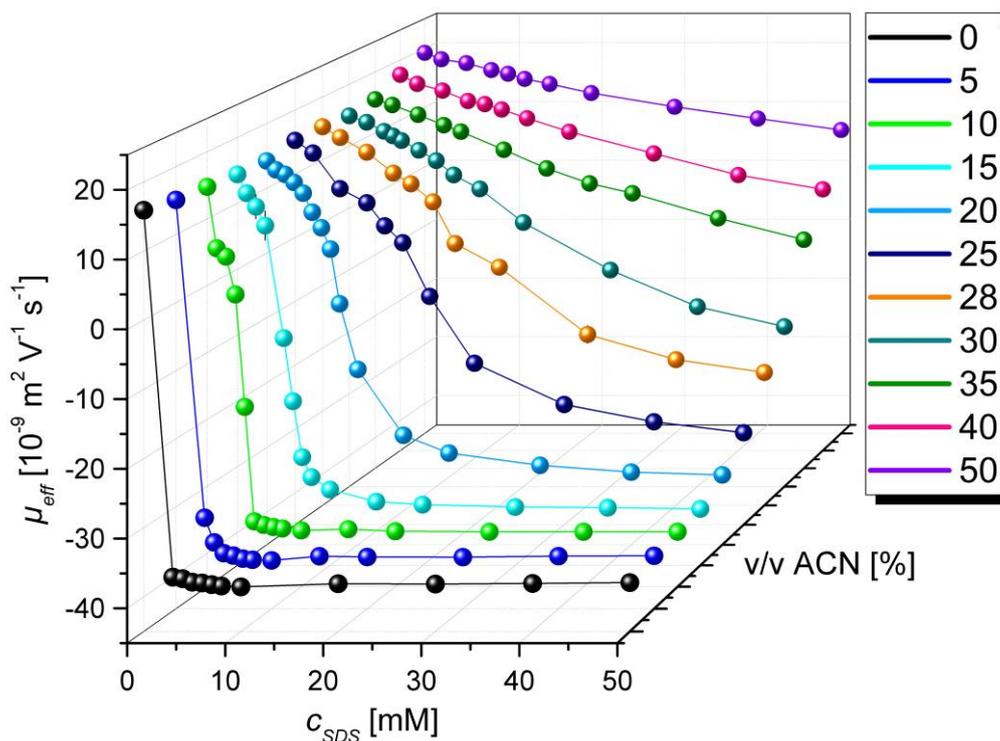


Abbildung 34. Änderung der elektrophoretischen Mobilität von Rhodamin 123 in Abhängigkeit der SDS-Konzentration und dem ACN-Gehalt.

Freire et al. untersuchten die Wechselwirkungen zwischen Rhodamin 123 und SDS und kamen zu dem Schluss, dass bei steigenden SDS- und geringen Rhodamin 123-Konzentrationen ($c_{R123} = 0.01$ mM) drei unterschiedliche Spezies während des Komplexierungsprozesses detektiert werden können.^[144] So liegen bei geringen SDS-Konzentrationen (bis 2.5 mM) 1:1 Addukte von SDS und Fluoreszenzfarbstoff vor. Diese lagern sich bei steigenden SDS-Konzentrationen (bis zur CMC) zu prä-mizellaren Aggregaten zusammen, wobei die Anzahl der SDS-Moleküle in den Aggregaten geringer ist als in den Mizellen, die sich ab der CMC ausbilden.

In Abbildung 35 sind die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten von Rhodamin 123 (schwarz), Coumarin 153 (blau) und Naphthalin (grün) in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration bei verschiedenen ACN-Konzentrationen (0 % oben links, 10 % oben rechts, 28 % unten links, 50 % unten rechts) dargestellt.

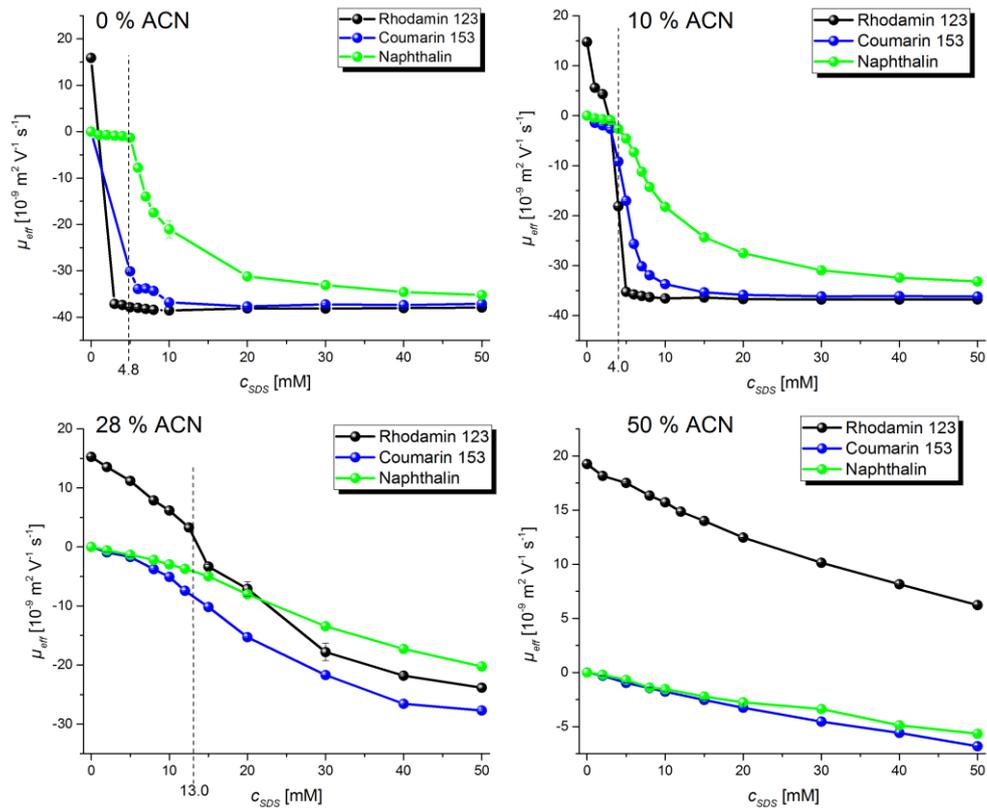


Abbildung 35. Änderung der elektrophoretischen Mobilität von Rhodamin 123 (schwarz), Coumarin 153 (blau) und Naphthalin (grün) in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration und von dem ACN-Gehalt; die bestimmten CMC-Werte sind durch vertikale Linien markiert.

Die unter diesen Bedingungen bestimmten Werte der CMC sind durch senkrechte Linien gekennzeichnet. In Abwesenheit von ACN kann ein deutlicher Unterschied zwischen den drei untersuchten Verbindungen beobachtet werden. So ändert sich die effektive elektrophoretische Mobilität μ_{eff} von Rhodamin 123 mit Zugabe von SDS enorm. Dies kann durch die ausgeprägten Wechselwirkungen zwischen den Fluoreszenzfarbstoffen und SDS erklärt werden, die auf hydrophoben und zusätzlich noch auf elektrostatischen Wechselwirkungen basieren. Bei Coumarin 153 entfallen die elektrostatischen Wechselwirkungen, was sich in einer geringeren Änderung von μ_{eff} mit zunehmender SDS-Konzentration niederschlägt. Aufgrund der geringeren Hydrophobizität von Naphthalin, verglichen mit Coumarin 153, nimmt die Ausprägung der Wechselwirkung ab und somit ist auch die abrupte Änderung in der effektiven elektrophoretischen Mobilität weniger markant.

3.2.3 Bestimmung der CMC anhand der Mobilitätsänderung des Systempeaks

Zusätzlich zu der CMC-Bestimmung mittels Leitfähigkeitsmessung im CE-Setup und der Verfolgung der Änderung der effektiven elektrophoretischen Mobilität von Markerverbindungen wurde die kritische Mizellbildungskonzentration durch die Untersuchung der Änderung von μ_{eff} von Systempeaks bei steigender SDS-Konzentration und in Abhängigkeit von dem ACN-Gehalt im wässrigen Puffer durchgeführt. Der Fokus dieser Untersuchung wurde auf die Änderung von μ_{sys} des schnellen anionischen Systempeaks gelegt. In Abbildung 36 sind entsprechende Elektropherogramme dargestellt, wobei der besagte Systempeak farblich hervorgehoben wurde.

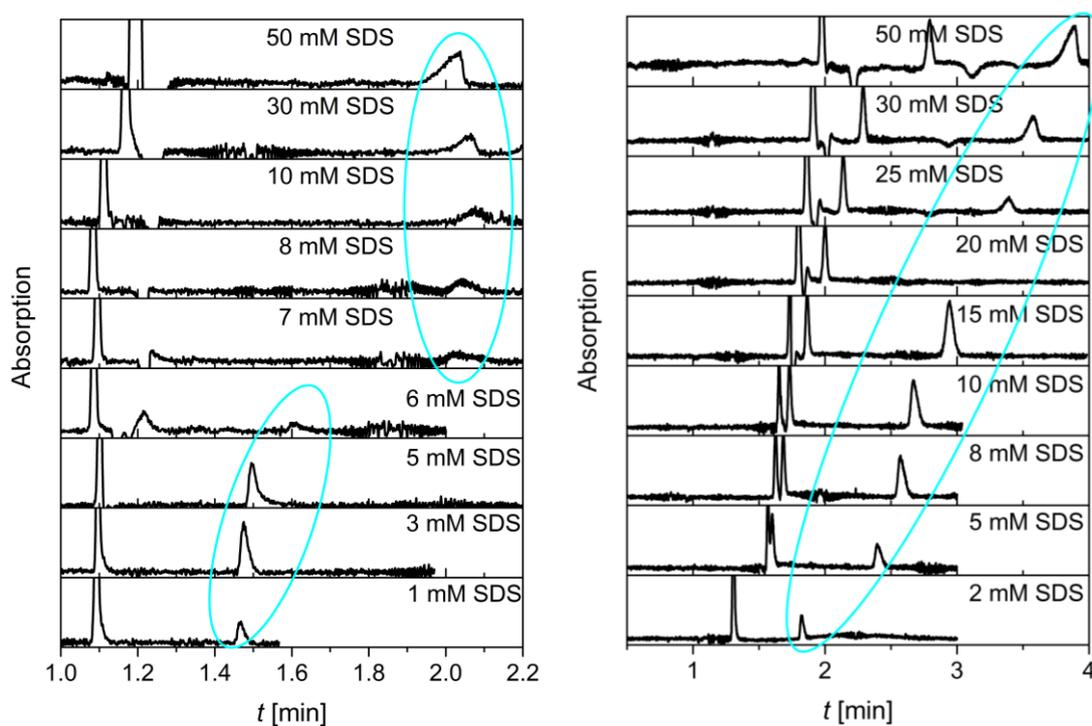


Abbildung 36. Elektropherogramme der CMC-Bestimmung durch die Verfolgung der Änderung der elektrophoretischen Mobilität des schnellen anionischen Systempeaks in Abwesenheit von ACN (links) und bei 35 % ACN (v/v , rechts).

Auf der linken Seite sind die Elektropherogramme in Abwesenheit von ACN mit steigender SDS-Konzentration abgebildet, auf der rechten Seite beim Zusatz von 35 % ACN (v/v). Bei einem ACN-Gehalt von 35 % ist zu erkennen, dass sich der Systempeak, der eine elektrophoretische Mobilität nahe null besitzt, bei steigender SDS-Konzentration aufspaltet und sich μ_{sys} von einem der beiden aufgespaltenen Systempeaks signifikant bei Zusatz von SDS ändert. Um die exakten elektrophoretischen Mobilitäten zu erhalten, wurden alle Peaks mit der HVL-Funktion angepasst (vgl. Abschnitt 1.1, Gl. 5).^[35]

In Abbildung 37 sind die erhaltenen Änderungen der elektrophoretischen Mobilität des schnell migrierenden anionischen Systempeaks in Abhängigkeit von SDS-Konzentration und ACN-Gehalt des verwendeten Puffers dargestellt.

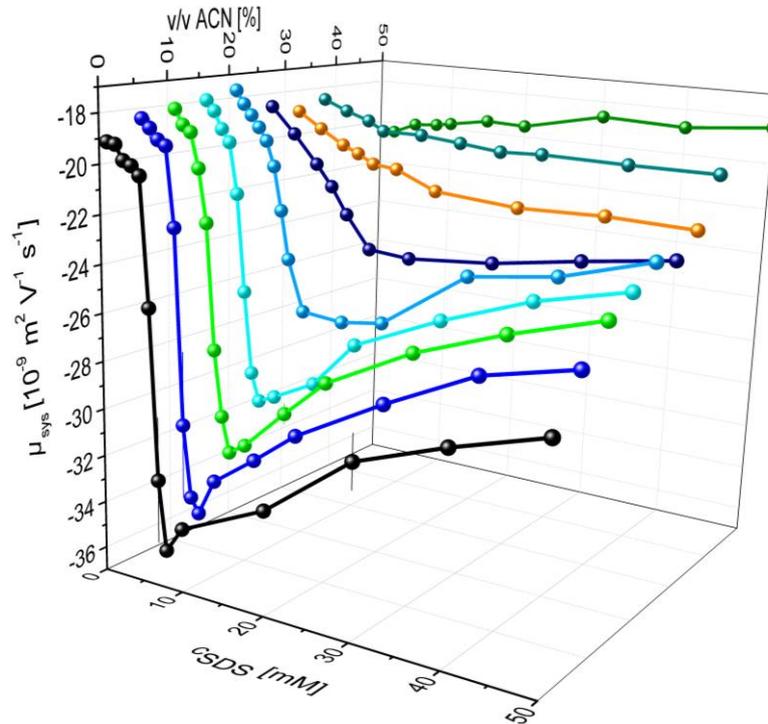


Abbildung 37. Elektrophoretische Mobilität des Systempeaks in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration und dem zugesetztem ACN-Gehalt.

Wie schon bei den zuvor vorgestellten Ergebnissen ist eine signifikante Änderung der elektrophoretischen Mobilität bei niedrigem ACN-Anteil zu erkennen. Diese Änderung ist bis zu einem ACN-Gehalt von 25 % ACN (v/v) deutlich sichtbar (Abbildung 37 marineblau). Zudem ist die Verschiebung dieser Änderung hin zu größeren SDS-Konzentrationen erkennbar, was mit der Zunahme der CMC verknüpft ist. Die exakten CMC-Werte sind in Tabelle 6 gelistet.

3.2.4 Vergleich der erhaltenen CMC-Werte

In Abbildung 38 sind die in der vorliegenden Arbeit mit unterschiedlichen Methoden ermittelten Werte für die CMC graphisch dargestellt. Die exakten Werte können Tabelle 6 entnommen werden.

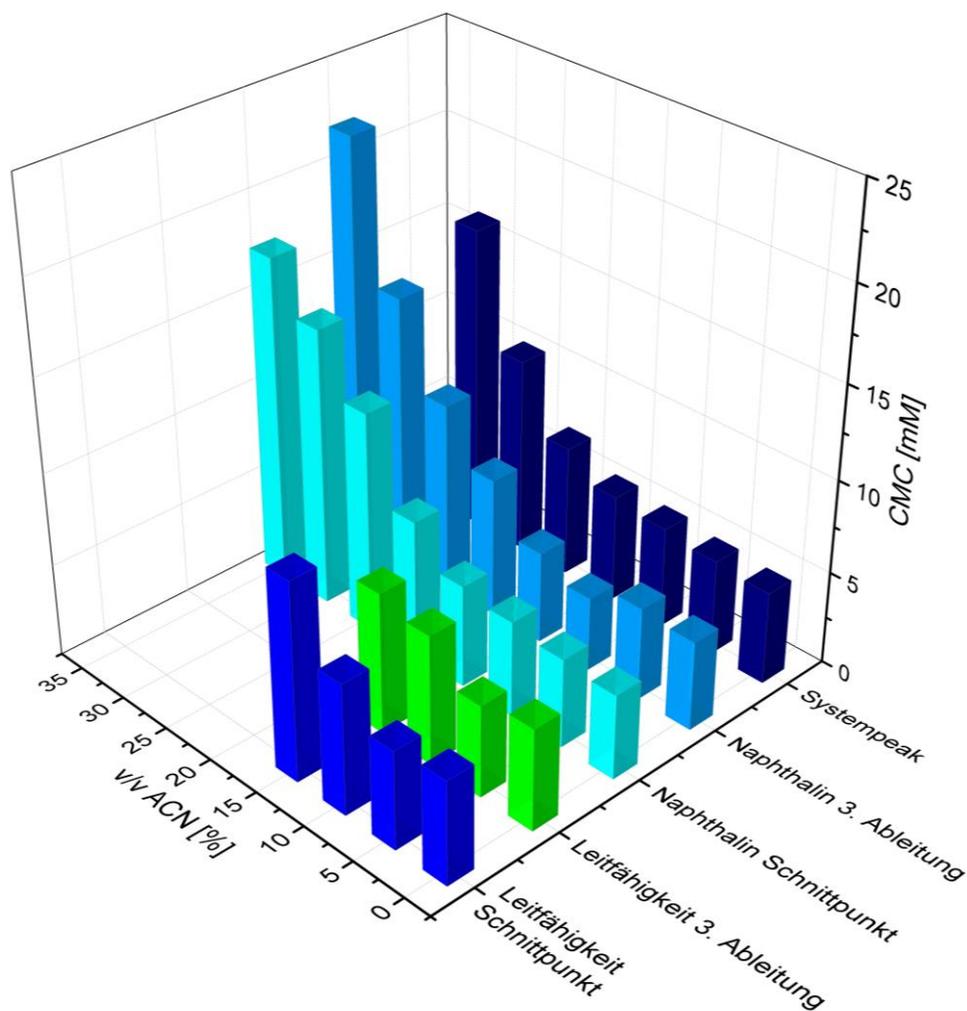


Abbildung 38. Vergleich der CMC-Werte, die mit unterschiedlichen Methoden in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden.

Aus Abbildung 38 ist deutlich ersichtlich, dass die CMC durch Messung der elektrophoretischen Mobilitätsänderung von Naphthalin oder des Systempeaks bis zu höheren ACN-Konzentrationen (bis 35 % v/v) bestimmt werden kann als es mittels Leitfähigkeitsmessung der Fall ist.

Die CMC in Abwesenheit von ACN differieren nur um maximal 1 mM. Deutlich erkennbar ist dabei, dass die Bestimmung der CMC über die Messung der Änderung der elektrophoretischen Mobilität, sei es unter Verwendung einer Markerverbindung oder unter Zuhilfenahme von Systempeaks, nur um maximal 0.4 mM voneinander abweichen. Somit sind die aus diesen Messverfahren erhaltenen

CMC-Werte besser miteinander vergleichbar als mit den Werten, die mittels Leitfähigkeitsmessung bestimmt wurden. Jedoch ist bei der Bestimmung der CMC mittels Leitfähigkeitsmessung zu beachten, dass in der CE nur geringe Strömstärkenänderungen zu beobachten sind, was einen größeren Messfehler als bei anderen Bestimmungsmethoden verursachen kann.

Die geringe Abnahme der CMC mit steigendem ACN-Gehalt, die bei der Bestimmung mittels Leitfähigkeitsmessung zu beobachten ist, konnte durch Verfolgung der Änderung der elektrophoretischen Mobilität nicht erhalten werden. Jedoch ist dieses Phänomen in der Literatur bekannt und wird mit auftretenden Stabilisierungseffekten der Mizellen bei geringem Anteil ACN (< 10 %, v/v) begründet.^[45]

Zudem konnte durch die Bestimmung der CMC mittels Verfolgung der Änderung der elektrophoretischen Mobilität die CMC bis zu einer ACN-Konzentration von 35 % (v/v) ermittelt werden, wobei durch Leitfähigkeitsmessung nur Werte bis 15 % ACN (v/v) erhalten werden konnten.

Generell liegen die CMC-Werte, die durch Leitfähigkeitsmessungen erhalten wurden, über denen der übrigen Messmethoden, was ein Hinweis auf die geringere Sensitivität dieser Messmethode gegenüber der Bestimmung mittels Verfolgung der Änderung der elektrophoretischen Mobilität sein kann.

Tabelle 6. Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit ermittelten CMC-Werte

v/v ACN [%]	CMC [mM]				
	Leitfähigkeitsmessung		Elektrophorese		
	Schnittpunkt	3. Ableitung	Naphthalin Schnittpunkt	Naphthalin 3. Ableitung	Systempeak
0	5.6	5.5	4.6	4.8	5.0
5	5.3	5.0	4.8	5.0	5.2
10	7.1	7.0	5.2	4.0	5.5
15	10.7	7.6	5.5	5.0	5.8
20	-	-	7.5	7.5	7.1
25	-	-	11.9	10.2	10.6
30	-	-	15.0	14.7	16.5
35	-	-	17.5	22	-

Die CMC für das verwendete Puffersystem in Abwesenheit von ACN liegen im Bereich von 4.6 bis 5.6 mM (Schnittpunktanalyse der Änderung von μ_{eff} von Naphthalin beziehungsweise Schnittpunktanalyse der Leitfähigkeitsmessung). Diese Werte liegen unter der CMC, die von *Misra et al.* und *Seifar et al.* publizierten Daten in Wasser und Tris-Puffer (8.2 mM,^[44] 7 mM,^[24] 6 mM,^[24] vgl.

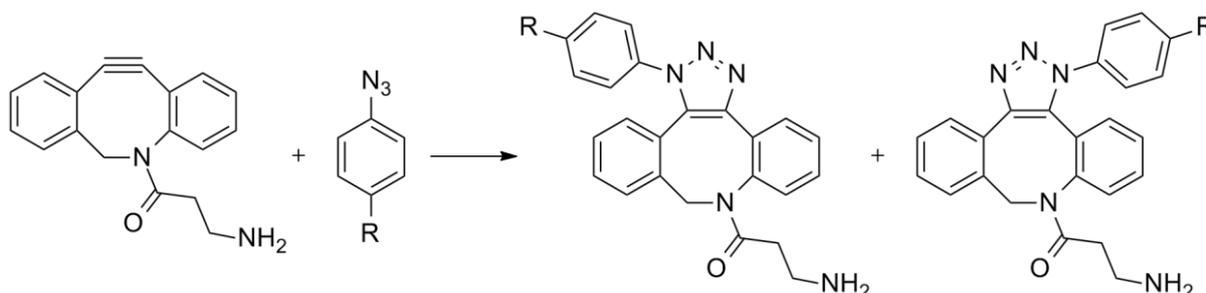
Abschnitt 1.1.1). Dabei kann die Abnahme der CMC mit Zugabe von Elektrolyten durch die Schwächung der Wechselwirkungen der hydrophilen Fragmente der monomeren Tensidmoleküle erklärt werden. *Lokajova et al.* publizierten CMC-Werte im gleichen Puffersystem, allerdings bei höheren Ionenstärken und erhielten dabei eine geringe CMC von 3.1 mM bei $I_s = 15.2$ mM.^[43] Die hier ermittelten Werte wurden bei einer Ionenstärke von $I_s = 10$ mM erhalten. Somit kann der Einfluss der Ionenstärke für die Abweichung des in der Literatur publizierten Werts von den hier vorgestellten Werten verantwortlich sein.

Durch Vergleich der ermittelten CMC-Werte mit Literaturwerten bei hohen ACN-Konzentrationen fällt auf, dass diese um Faktor zwei bis fünf größer sind. Dabei liegen die durch Mobilitätsverfahren bestimmten CMC-Werte zwischen 14.7 und 16.5 mM, wobei diese Werte abhängig von der Analysemethode sind. In der Literatur werden durch Leitfähigkeitsmessungen bestimmte CMC-Werte von 71 mM in einem Tris-Puffer und 41 mM in Wasser bei identischem ACN-Gehalt beschrieben.^[24] Bei 20 % ACN konnte in der vorliegenden Arbeit CMC-Werte zwischen 7.1 und 7.5 mM erhalten werden, die in sehr guter Übereinstimmung mit den CMC-Werten von *Thorsteinsdottir et al.* in einem Phosphat-Puffer sind (7 mM).^[48] Während *Seifar et al.* CMC-Werte von 27 mM in einem Tris-Puffer und 32 mM in Wasser bei 20 % ACN veröffentlichten.^[24] Somit liegen die hier bestimmten Werte in der großen Spanne, die durch die Literaturwerte gegeben ist. Das macht eine Einordnung der hier erhaltenen CMC-Werte in die Literaturwerte äußerst schwierig, da diese nicht konsistent sind. Allerdings sind die erhaltenen CMC-Werte in der sehr ähnlich wie die von *Thorsteinsdottir et al.* und *Jacquier et al.* publizierten Werte,^[40,45,48] da beide Gruppen die Untersuchungen ebenfalls mittels CE durchführten, kann dies auf die Ungenauigkeit der anderen Bestimmungsmethoden hinweisen.

Das einzige konsistente Phänomen, ist die Zunahme der CMC mit steigender ACN-Konzentration, die auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte. Jedoch ist schon der Anteil der prozentualen Zunahme der CMC widersprüchlich in der Literatur dargelegt. Die Größenordnung der hier vorgestellten CMC-Daten konnten durch Fluoreszenzmessungen bestätigt werden.^[145]

3.3 Ringspannungs-begünstigte Azid-Alkin-Cycloaddition

Zur Untersuchung der in Schema 11 allgemein abgebildeten Ringspannungs-begünstigten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) wurden zunächst die pK_a -Werte der Reaktanden bestimmt, um anschließend die Auswahl der Puffersysteme auf die Eigenschaften der Reaktanden abzustimmen.



Schema 11. Reaktionssequenz der Ringspannungs-begünstigten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC).

Im Anschluss wurden die Reaktionen mittels *off-column* Reaktionskapillarelektrophorese analysiert und aus den so erhaltenen Ergebnissen die Kinetik der Reaktionen unter verschiedenen Bedingungen erhalten. Nachfolgend wurde der Einfluss von Mizellen auf die Reaktionsgeschwindigkeiten untersucht und *on-column* Experimente durchgeführt. Die Arbeiten zu diesem Thema wurden in Kooperation mit Dr. Jana Steflva durchgeführt. Die Synthesen einiger eingesetzter Azide (**52**, **53**, **55**) wurden von Dr. Skrollan Stockinger im Rahmen ihrer Promotion durchgeführt.^[146-148]

3.3.1 Bestimmung der pK_a -Werte

Durch pH-abhängige CE-Messungen wurden die pK_a -Werte der in Abbildung 39 gezeigte Reaktanden ermittelt, um pH-abhängige Experimente und den Einfluss von Dissoziation beziehungsweise Protonierung der Reaktanden auf die Reaktionsgeschwindigkeit besser diskutieren zu können. Dabei wurden alle Messungen in Puffersystemen bestehend aus einer Mischung aus Wasser und ACN (72:28 v/v) durchgeführt, da einige Reaktanden nur geringe Löslichkeit in wässrigen Pufferlösungen zeigten.

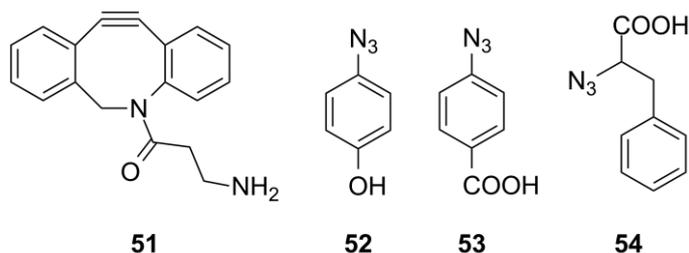


Abbildung 39. Cycloalkin **51** und drei Azide (**52–54**), deren pK_a -Werte ermittelt wurden.

Hierfür wurden die Reaktanden in Puffersystemen vermessen, die einen pH-Bereich von 2.5–12 abdeckten (siehe Anhang 6.1), und deren elektrophoretischen Mobilitäten nach Gleichung 3 (siehe Abschnitt 1.1) bestimmt. Exemplarisch sind diese Messungen mit Zusatz von DMSO als EOF-Marker für **53** in Abbildung 40 gezeigt, bei denen eine deutliche Änderung der effektiven elektrophoretischen Mobilität mit steigendem pH-Wert ersichtlich ist.

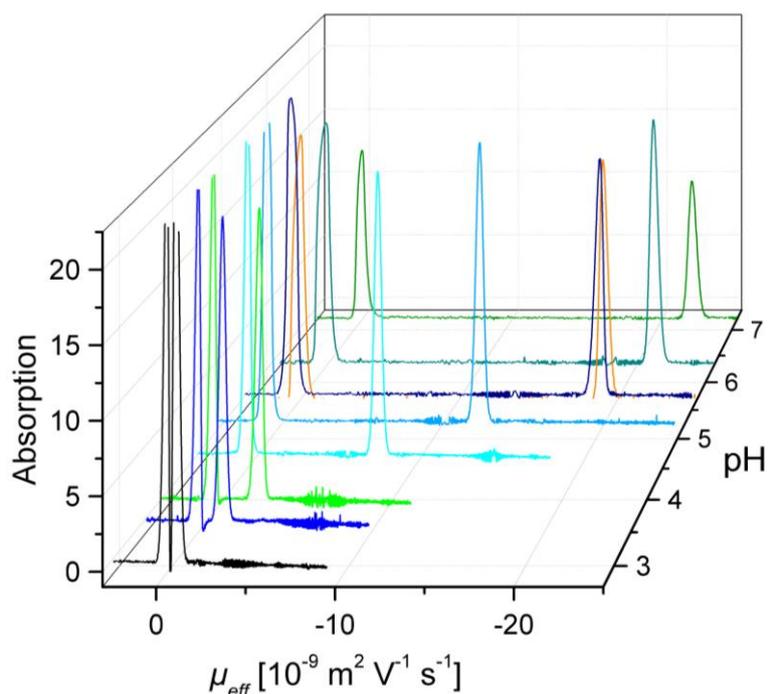


Abbildung 40. Elektropherogramme in Abhängigkeit von dem pH-Wert des BGEs von **53** zur Bestimmung des pK_a -Wertes.

Aus den effektiven Mobilitäten der einzelnen Substrate in Puffersystemen mit unterschiedlichen pH-Werten wurden die Dissoziationskonstanten mit Hilfe folgender Gleichungen erhalten. Die beobachtete Abhängigkeit der Mobilitäten gegenüber dem pH-Wert wurde durch folgende Gleichungen für Kationen, Anionen beziehungsweise Ampholyte angepasst, wobei μ_i^0 für die ionische Mobilität des i -ten Analyts steht.

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_C^0}{1 + 10^{(pH-pKa)}} \quad (10)$$

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_A^0}{1 + 10^{(pKa-pH)}} \quad (11)$$

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_A^0 10^{(pH-pKa_C)} + \mu_C^0 10^{(pKa_A-pH)}}{1 + 10^{(pH-pKa_C)} + 10^{(pKa_A-pH)}} \quad (12)$$

In Abbildung 41 sind die elektrophoretischen Mobilitäten der einzelnen Reaktanden gegen den pH-Wert aufgetragen und mit der entsprechenden Fit-Funktion (Gl 10-12) dargestellt. Zudem wurden die pK_a -Werte für die erhaltenen Triazole aus der Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Azid **52** ermittelt (Abbildung 41e, f).

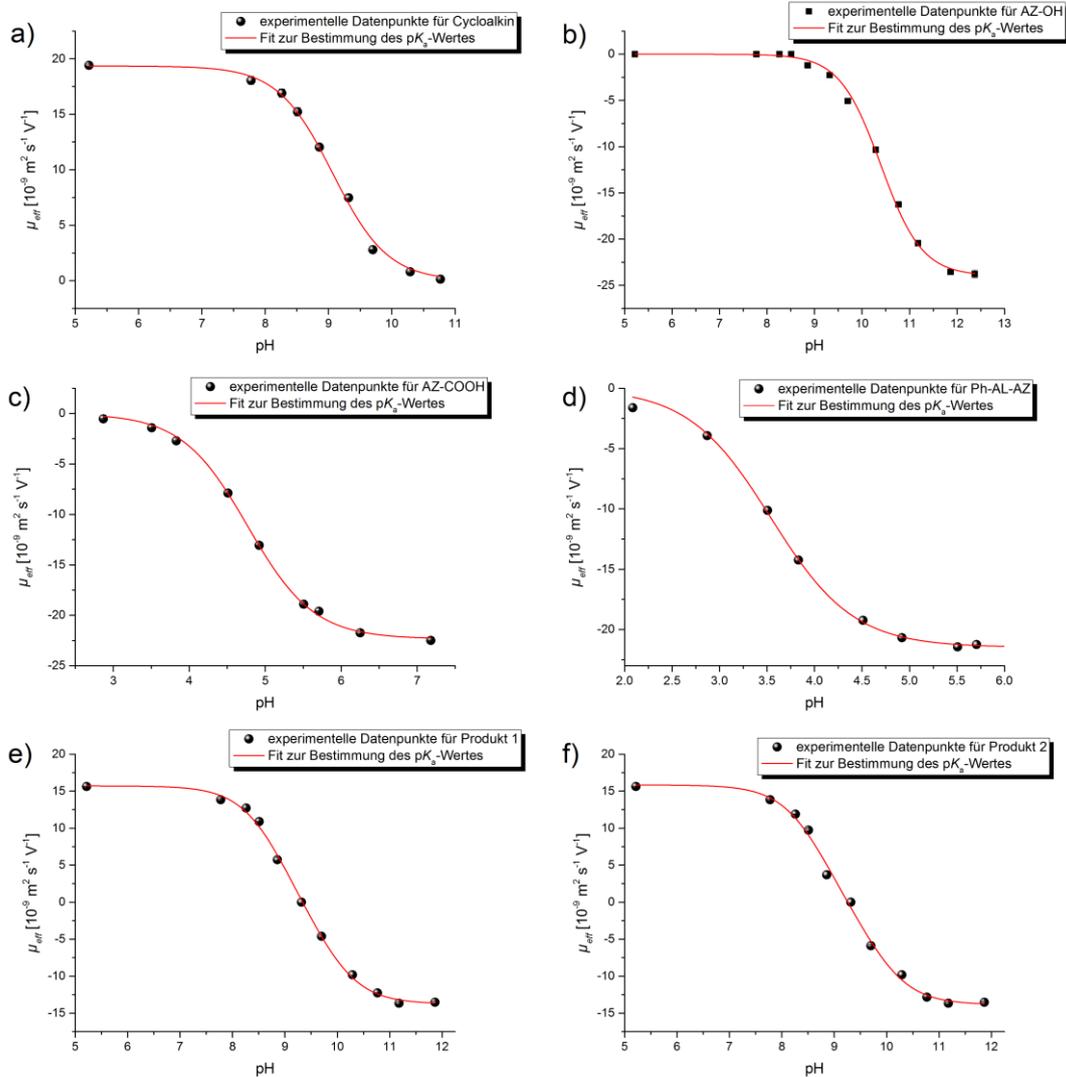


Abbildung 41. Bestimmung der pK_a -Werte der Reaktanden **51** (a), **52** (b), **53** (c), und **54** (d) sowie der Produkte (e, f) der SPAAC-Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und AZ-OH **52**.

Die aus den in Abbildung 41 gezeigten Graphen erhaltenen pK_a -Werte sind in Tabelle 7 gelistet. Bei den Produkten der Reaktion zwischen **51** und **52** handelt es sich um Ampholyte, die zwei pK_a -Werte besitzen, wobei sich der erstgenannte auf die Protonierung der NH_2 -Gruppe und der zuletzt genannte auf die Protonierung der OH-Gruppe bezieht.

Tabelle 7. pK_a -Werte der eingesetzten Reaktanden **51**, **52**, **53** und **54** sowie der Produkte der Reaktion zwischen **51** und **52**.

	pK_a	pK_a^a
Cycloalkin 51	9.07 ± 0.03	9.78
AZ-OH 52	10.37 ± 0.03	10.95
AZ-COOH 53	4.77 ± 0.02	4.17
Ph-AL-AZ 54	3.54 ± 0.02	3.85
Produkt 1 aus 51 und 52	8.82 ± 0.05	9.11
	9.79 ± 0.06	10.62
Produkt 2 aus 51 und 52	8.69 ± 0.07	9.11
	9.76 ± 0.08	10.62

^a die theoretischen Werte wurden mit *MarvinSketch* berechnet.

Aufgrund dem Zusatz von ACN weichen die mittels *MarvinSketch* berechneten pK_a -Werte stark von den experimentell ermittelten Werte ab.

Die unterschiedlichen Ladungszustände bei variierendem pH-Wert der Reaktanden **51–54** sind in Abbildung 42 graphisch veranschaulicht. Als schwarze senkrechte Linien wurden dabei die pH-Werte der Puffersysteme integriert, in denen die SPAAC-Reaktion und deren Kinetik näher untersucht wurde. Die Auflistung dieser Puffersysteme ist in Tabelle 8 zu sehen.

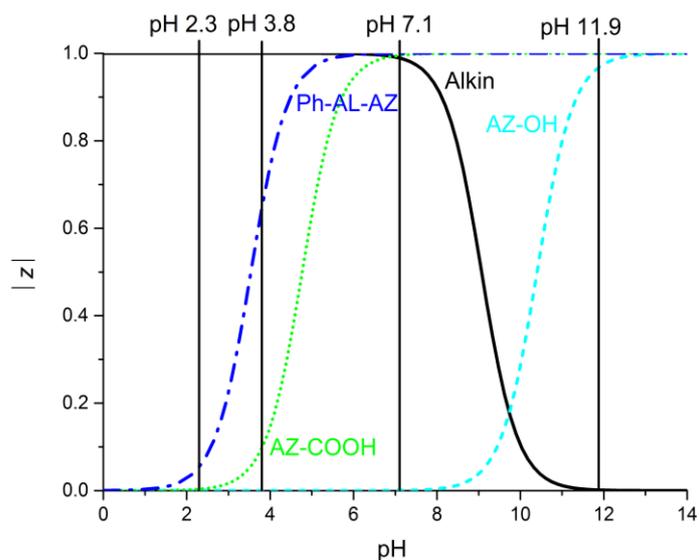


Abbildung 42. Graphische Veranschaulichung der Ladungen des Cycloalkins 51 und der Azide 52-54.

Tabelle 8. Auflistung der verwendeten Puffersysteme für die Untersuchungen der SPAAC-Reaktion und deren Eigenschaften.

Pufferzusammensetzung	c [mM]	I_s [mM]	pH_{exp} in $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$	pH_{exp} in H_2O	$\text{pH}_{\text{theor}}^a$
Maleinsäure/LiOH	13/5.5	9.97	2.29	2.39	2.39
Zitronensäure/LiOH	15/10	10.0	3.77	3.37	3.36
Phosphorsäure/NaOH	12/15	18.0	7.09	6.73	6.57
β -Alanin/LiOH	7/10	9.96	11.87	11.45	11.45

^atheoretische Berechnung des pH-Wertes erfolgte mit dem Programm *PeakMaster* 5.3.^[28]

3.3.2 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit aus den *off-column* CE-Messungen

Durch Integration des allgemeinen Geschwindigkeitsgesetzes (Gl. 13) wird Gleichung 14 erhalten, wobei [A] und [B] die Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktanden A und B darstellen und k die Geschwindigkeitskonstante beschreibt. Aus diesem integrierten Geschwindigkeitsgesetz (Gl. 14) wird durch Einsetzen der direkten Proportionalität zwischen der Konzentration c und der Absorption A (Gl. 15) Gleichung 16 erhalten.

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][B] \quad (13)$$

$$\ln \frac{c_{A0}c_B}{c_{B0}c_A} = (c_{B0} - c_{A0})kt \quad (14)$$

$$c = \frac{\varepsilon}{A} \quad (15)$$

$$\ln \frac{c_{A0}\varepsilon_A}{c_{B0}\varepsilon_B} + \ln \frac{A_B}{A_A} = (c_{B0} - c_{A0})kt \quad (16)$$

$$\ln \frac{A_B}{A_A} = (c_{B0} - c_{A0})kt \quad (17)$$

Dabei stellt der erste Teil auf der linken Seite der Gleichung eine Konstante dar. Somit kann (16) zu (17) weiter vereinfacht werden, da die Konstante lediglich den Abszissenabschnitt beschreibt. Durch die lineare Auftragung von $\ln \frac{A_B}{A_A}$ (mit A = Cycloalkin, B = Azid) gegen t kann k aus der Steigung des Graphen ermittelt werden.

In Abbildung 43 sind die Elektropherogramme von *off-column* Experimenten der Reaktion von Cycloalkin **51** und 4-Hydroxyphenylazid (**52**) dargestellt. Hierbei wurden die Reaktanden direkt im elektrophoretischen Vial gemischt und es wurde etwa alle vier Minuten aus dieser Reaktionsmischung injiziert. Bei dem zuerst eluierten Peak handelt es sich um das Cycloalkin **51**, da es unter den gegebenen Separationsbedingungen ungeladen ist und somit eine elektrophoretische Mobilität von $\mu = 0 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ besitzt. Wie aus Abbildung 43 ersichtlich, nimmt der mittlere Peak mit steigender Reaktionszeit an Intensität zu. Hierbei handelt es sich um das Produktgemisch beider Isomere (siehe Schema 11), die unter den verwendeten Trennbedingungen nicht voneinander separiert werden können. Bei der zuletzt eluierten Komponente handelt es sich um das 4-Hydroxyphenylazid (**52**).

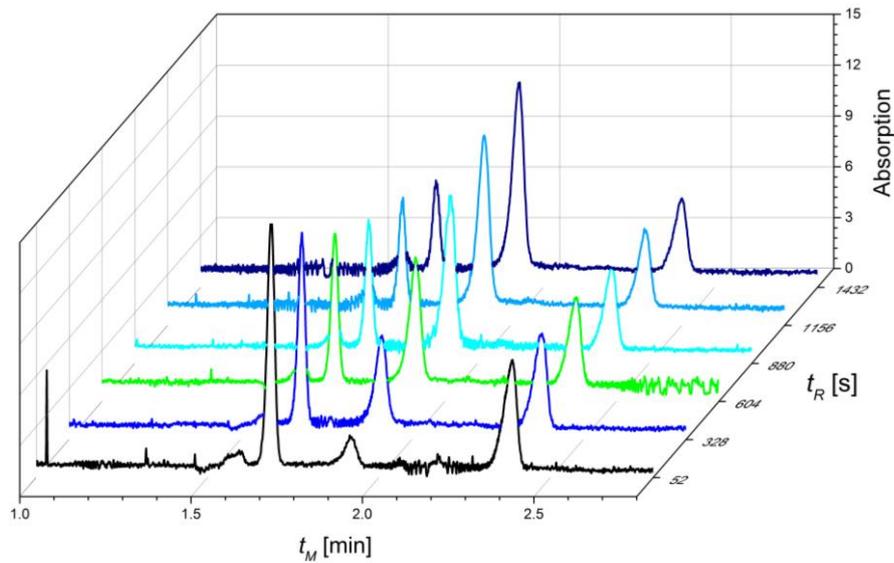


Abbildung 43. *Off-column* CE-Messungen der Reaktion zwischen Cycloalkin 51 und Azid 52 in Abhängigkeit von der Reaktionszeit (in 7 mM β -Alanin/10 mM LiOH, 28 % ACN, pH 11.9, 20 kV, 50 mbar, $\lambda = 210$ nm).

Anhand der elektrophoretischen Messungen der *off-column* Experimente konnte mit der oben beschriebenen Gleichung (Gl. 17) eine lineare Auftragung und damit die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen erhalten werden. In Abbildung 44 ist exemplarisch die lineare Regression für die Reaktion zwischen 51 und 54 bei pH 11.9 dargestellt.

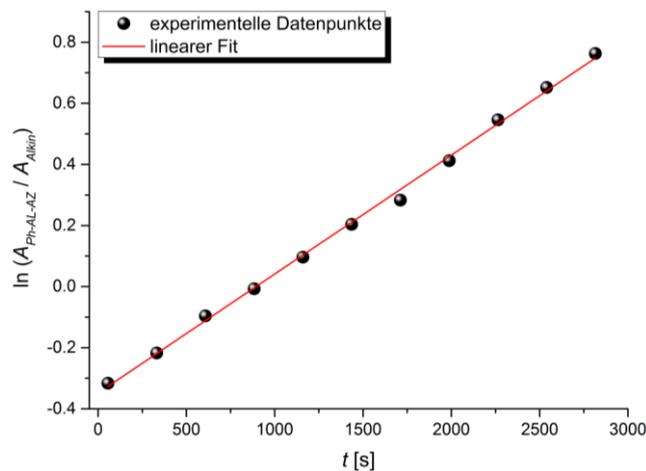


Abbildung 44. Lineare Regression zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen Cycloalkin 51 und Azid 54 bei pH 11.9 (Güte des linearen Anpassung $R^2 = 0.99793$).

Zusätzlich zu den in Abbildung 39 gezeigten Aziden wurde die SPAAC-Reaktion zusätzlich für zwei weitere Azide untersucht (Abbildung 45).

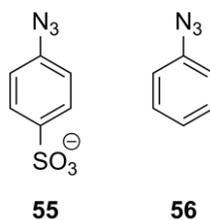


Abbildung 45. Weitere Azide, die in der SPAAC-Reaktion untersucht wurden (sulfatiertes Phenylazid **55**, Phenylazid **56**).

Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten sind in Abbildung 46 für die Reaktionen zwischen Cycloalkin **51** und den Aziden **52–56** graphisch veranschaulicht.

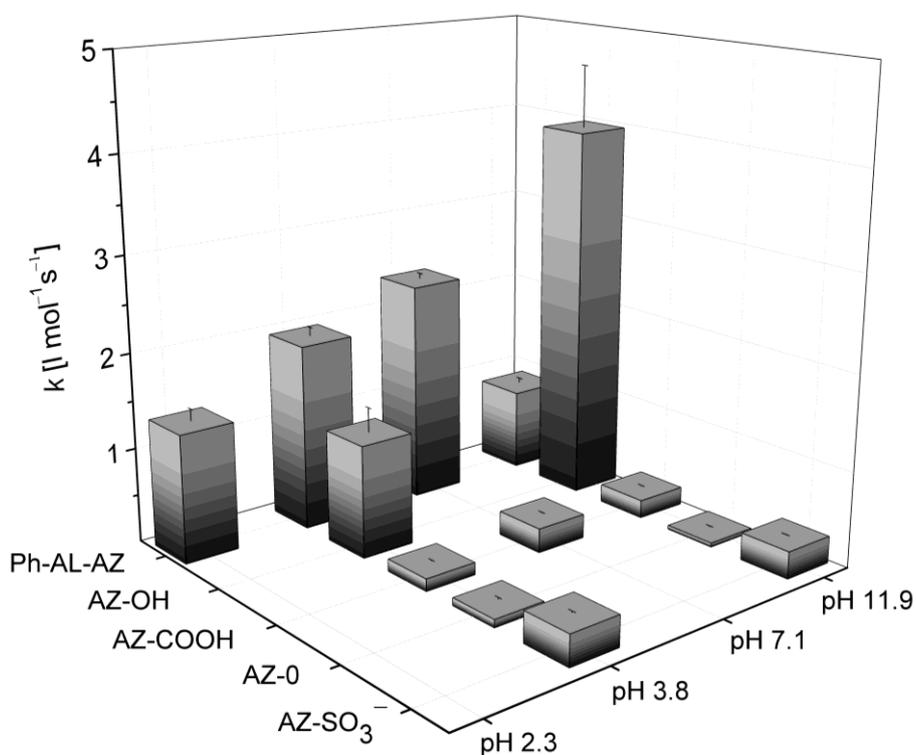


Abbildung 46. Übersicht über die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen zwischen den gegebenen Aziden **52–56** und dem Cycloalkin **51** bei unterschiedlichen pH-Werten.

Aufgrund des niedrigen pK_a -Wertes des Phenylalaninazids (**54**) wurde die Reaktion mit Cycloalkin **51** in vier unterschiedlichen Puffersystemen mit verschiedenen pH-Werten untersucht. Beim niedrigsten pH-Wert (pH 2.3) liegt das Phenylalaninazid fast vollständig protoniert vor (96 %), bei pH 3.8 liegen 65 % der Säuregruppen des Azids **54** dissoziiert vor. Bei neutralem pH-Wert ist das Azid komplett dissoziiert und somit negativ geladen. In diesem pH-Bereich liegt das Cycloalkin **51** protoniert vor. Dieses ist erst bei einem pH-Wert von 11.9 vollständig dissoziiert. Mit dem Grad der Dissoziation des Azids **54** steigt auch die Geschwindigkeit der Reaktion mit dem protonierten Cycloalkin [**51**+H]⁺ (von $k_2 = 1.35 \pm 0.13$ l mol⁻¹ s⁻¹ über $k_2 = 1.96 \pm 0.09$ l mol⁻¹ s⁻¹

bis $k_2 = 2.34 \pm 0.06 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), wobei die Reaktion zwischen dissoziiertem Cycloalkin **51** und dissoziiertem Azid **54** langsamer verläuft ($k_2 = 0.86 \pm 0.05 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als die Reaktion zwischen fast vollständig protoniertem Azid **54** und protoniertem Cycloalkin **51** (pH 2.3).

Die pK_a -Werte des 4-Hydroxyphenylazids (**52**) und des Cycloalkins **51** liegen im selben Bereich, womit es ausreichend ist, die Reaktion bei zwei verschiedenen pH-Werten zu untersuchen, um alle möglichen Ladungszustände der Reaktanden abzudecken. Im Sauren bei pH 3.8 liegt das Azid **52** ungeladen, das Cycloalkin **51** jedoch positiv geladen vor, während im Basischen (pH 11.9) das Cycloalkin ungeladen, das Azid jedoch negativ geladen vorliegen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion beider Reaktanden verläuft im Sauren (pH 3.8) langsamer als im Basischem (pH 11.9), da der elektronenschiebende Effekt der dissoziierten Hydroxylgruppe den der ungeladenen Hydroxylgruppe noch übersteigt. Somit kann durch einfache pH-Werterhöhung die Reaktionsgeschwindigkeit um mehr als Faktor drei gesteigert werden (von $k_2 = 1.18 \pm 0.26 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 3.8 auf $k_2 = 3.96 \pm 0.66 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 11.9).

Wird der Phenylazidgrundkörper dagegen mit einem elektronenziehenden Substituenten ausgestattet, hat das einen negativen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Dieses Phänomen wurde am Beispiel des 4-Carboxyphenylazids (**53**) untersucht. Um alle eventuellen Ladungszustände zu untersuchen, wurde die Reaktion in drei unterschiedlichen Puffersystemen bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Bei pH 3.8 liegen das Azid **53** hauptsächlich (zu 90 %) und das Cycloalkin **51** vollständig protoniert vor, während bei neutralem pH-Wert das Azid dissoziiert ist, wobei das Cycloalkin weiterhin eine positive Ladung trägt, die dieses jedoch im Basischen (bei pH 11.9) verliert. Wie auch bei Phenylalaninazid (**54**) kann eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um einen Faktor 2 mit steigendem pH-Wert beobachtet werden (von $k_2 = (1.29 \pm 0.08) \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 3.8 auf $k_2 = (2.53 \pm 0.09) \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7.1). Wird der pH-Wert weiter auf einen Wert von 11.9 erhöht, so kommt es zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit (auf $k_2 = (1.90 \pm 0.08) \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Trotz Abnahme verläuft die Reaktion unter basischen Bedingungen schneller ab als unter sauren (bei pH 3.8). Dabei ist die Reaktion dieses Azids um mehr als das 20-fache langsamer als die Reaktion desselben Alkins mit 4-Hydroxyphenylazid (**52**) unter identischen Bedingungen.

Die Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und sulfatiertem Phenylazid **55** wurde in nur zwei unterschiedlichen Puffersystemen untersucht, in denen einmal **51** protoniert (pH 3.8) und einmal dissoziiert (pH 11.9) vorliegt, da **55** im gesamten untersuchten pH-Bereich dissoziiert vorliegt. Die Reaktion verläuft im Sauren bei pH 3.8 minimal schneller ($k_2 = (3.22 \pm 0.15) \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$)

als im Basischen bei pH 11.9 ($k_2 = (2.84 \pm 0.04) \cdot 10^{-1} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Die Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion und der Reaktion zwischen **51** und **53** besitzen die gleiche Größenordnung, allerdings sind die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen **51** und **55** geringfügig größer (circa Faktor 2.5 bei pH 3.8 beziehungsweise 1.5 bei pH 11.9).

Das Phenylazid (**56**) trägt keine funktionellen Gruppen, die protoniert oder deprotoniert werden können, somit liegt es im gesamten pH-Bereich ungeladen vor. Wie auch bei **55** wurde deshalb die Reaktion bei nur zwei verschiedenen pH-Werten untersucht. Derselbe Trend wie für **55** lässt sich auch bei Phenylazid **56** erkennen. Die Geschwindigkeitskonstante ist bei pH 3.8 um Faktor zwei größer ($k_2 = (8.25 \pm 2.21) \cdot 10^{-2} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als im Basischem bei pH 11.9 ($k_2 = (4.21 \pm 1.07) \cdot 10^{-2} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Allerdings verläuft die Reaktion um einen Faktor von etwa 4 im Sauren und einen Faktor von etwa 7 im Basischen langsamer als die Reaktion zwischen **51** und **55**.

Aufgrund der Verwendung von Benzylazid als Azid der Wahl in der Literatur, werden nur die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Phenylazid **56** mit Literaturwerten verglichen. Im Falle der übrigen eingesetzten Azide kann kein Vergleich mit Literaturwerten erfolgen, da die elektronischen Eigenschaften des Azids die Reaktionsgeschwindigkeit drastisch beeinflussen kann.

Die von *Debets et al.* beschriebene Reaktion zwischen Cycloalkin **13**, das strukturell sehr große Ähnlichkeiten mit **51** aufweist, und Benzylazid verläuft bedeutend schneller ($k_2 = 0.31 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als die hier untersuchte Reaktion. Ein möglicher Grund dafür kann das unterschiedliche Reaktionsmedium sein, aber auch die geringen Unterschiede in den elektronischen Eigenschaften zwischen Benzyl- und Phenylazid.

Anhand der relativ großen Fehler der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von **51** und **56** lässt sich erkennen, dass die Genauigkeit in der Bestimmung dieser bedeutend geringer war als für die Reaktionen von **51** mit den anderen Aziden. Grund hierfür war die Volatilität des Phenylazids (**56**). Zur Untersuchung der Volatilität des Phenylazids wurde dieses in verschiedenen Puffersystemen gelöst und in bestimmten Zeitintervallen mittels CE vermessen. Als Referenzsubstanz diente DMSO. In Abbildung 47 ist die prozentuale Abnahme der Absorption über eine Zeitspanne von circa zwei Stunden gezeigt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Zusammensetzung und der pH-Wert des Puffersystems wie auch die Konzentration des Mizellenbildners kaum Einfluss auf die Volatilität besitzen.

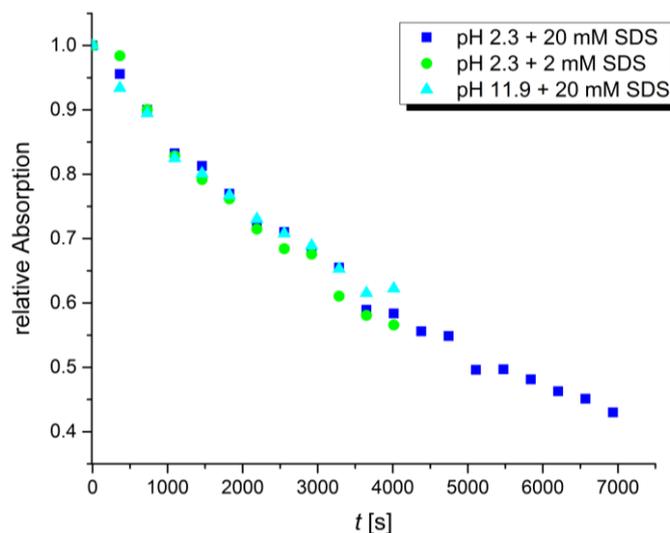


Abbildung 47. Untersuchung der Volatilität des Phenylazids **56**.

Auf weitere kinetische Untersuchungen der SPAAC-Reaktion mit dem Phenylazid wurde daher verzichtet, da die Volatilität des Azids die Konzentration selbiges in der Reaktionsmischung senkt und somit keine genaue Konzentration des Phenylazids angegeben werden konnte.

Wie aus Abbildung 46 ersichtlich, ist die Reaktionsgeschwindigkeit im Falle von Elektronenreichen Aromaten (**52**, $[\mathbf{52-H}]^-$) größer als beim Vorliegen von Elektronen-ärmeren (**53**, **54**, **55**, **56**). Wobei die Erhöhung der Elektronendichte im Aromaten (Übergang von **52** auf $[\mathbf{52-H}]^-$) eine erneute Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit sich bringt.

Da fast alle ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten der unterschiedlichen Reaktanden demselben Trend folgen und unter basischen Bedingungen deutlich langsamer mit **51** reagieren als im Neutralen oder Sauren, muss dies auf Eigenschaften des Cycloalkins zurückzuführen sein. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Azide **53** und **56** sind relativ klein, weshalb die pH-Abhängigkeit nur für die Azide **54** und **55** genauer untersucht wurde. Für **52** konnte dieser Trend nicht beobachtet werden, da hier vermutlich der Einfluss des Cycloalkins durch die stärker werdenden elektronischen Effekte des Azids kompensiert wird, da beide Reaktanden einen ähnlichen pK_a -Wert besitzen und somit nur die Reaktionen zwischen $[\mathbf{51+H}]^+$ und **52** und **51** und $[\mathbf{52+H}]^+$ untersucht werden konnten.

In Abbildung 48 sind die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen zwischen **51** und den Aziden **54** und **55** gegen den pH-Wert aufgetragen, wobei der pK_a -Wert des Cycloalkins mit einer senkrechten Linie markiert wurde.

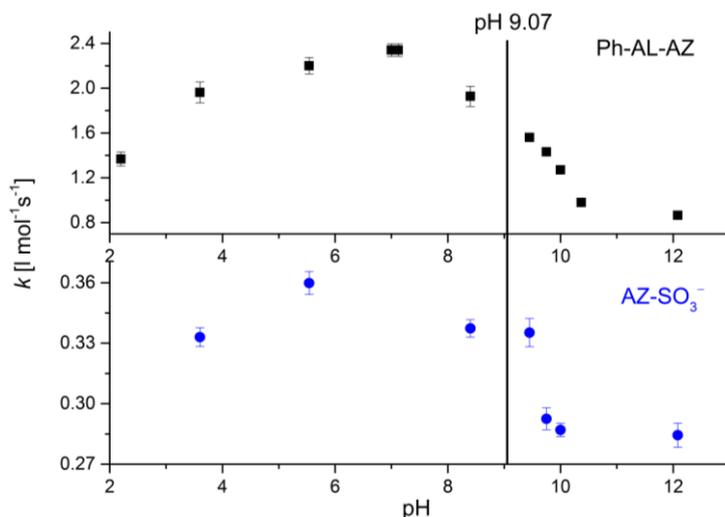


Abbildung 48. Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der Reaktionen zwischen Cycloalkin 51 und Phenylalaninazid 54 beziehungsweise sulfatiertem Azid 55 vom pH-Wert. Als senkrechte Linie ist der pK_a -Wert des Cycloalkins 51 gekennzeichnet.

Aus Abbildung 48 ist deutlich zu erkennen, dass die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit dem pK_a -Wert des Cycloalkins zusammenfällt. Somit muss die Protonierung der Aminogruppe einen Einfluss auf die Reaktion beziehungsweise deren Geschwindigkeit haben. Um den Einfluss auf die Reaktion besser verstehen zu können, wurde die Reaktion zwischen 54 und 51 bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt.

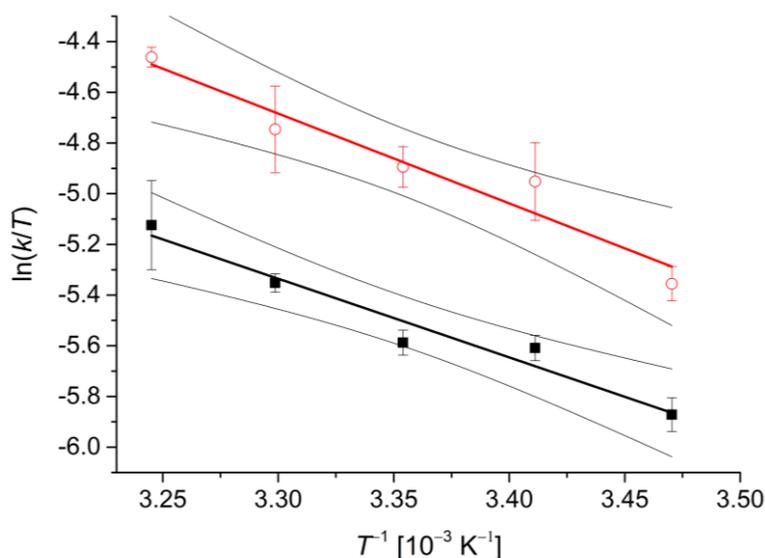


Abbildung 49. Eyring-Plot der Reaktion zwischen Ph-AL-AZ (54) mit neutralem (schwarz) beziehungsweise protoniertem (rot) Cycloalkin 51. Die Fehler beschreiben die 95 % Konfidenzintervalle.

Aus den Reaktionen bei unterschiedlichen Temperaturen wurden Eyring-Plots erstellt (Abbildung 49). Anhand dieser konnten die Aktivierungsparameter bestimmt werden, die in Tabelle 9 gelistet sind.

Tabelle 9. Übersicht über die Aktivierungsparameter der Reaktion von Ph-AL-AZ (54) mit protoniertem Cycloalkin [51+H]⁺ beziehungsweise Cycloalkin 51.

	[51+H] ⁺ + 54	51 + 54
ΔH^\ddagger [kJ mol ⁻¹]	29.5 ± 5	29.5 ± 5
ΔS^\ddagger [J mol ⁻¹ K ⁻¹]	-140 ± 15	-145 ± 15
$\Delta G^\ddagger_{20\text{ }^\circ\text{C}}$ [kJ mol ⁻¹]	70.0 ± 0.4	71.5 ± 0.1

Bei den hier ermittelten Werten liegt die Freie Enthalpie der Reaktion von Cycloalkin **51** mit Ph-AL-AZ (**54**) 1.5 kJ mol⁻¹ über der der Reaktion des protonierten Alkins [51+H]⁺ mit demselben Azid.

Um diese Beobachtungen zusätzlich zu verifizieren, wurden von Dr. Golo Storch quantenchemische (DFT)-Untersuchungen einer Modellreaktion durchgeführt. Hierbei wurde aufgrund von Vereinfachung Methylazid als Modellazid verwendet, das strukturell kleiner und somit einfacher zu berechnen ist. Dies ist auch in der Literatur eine gängige Methode.^[149] Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 50 graphisch veranschaulicht.

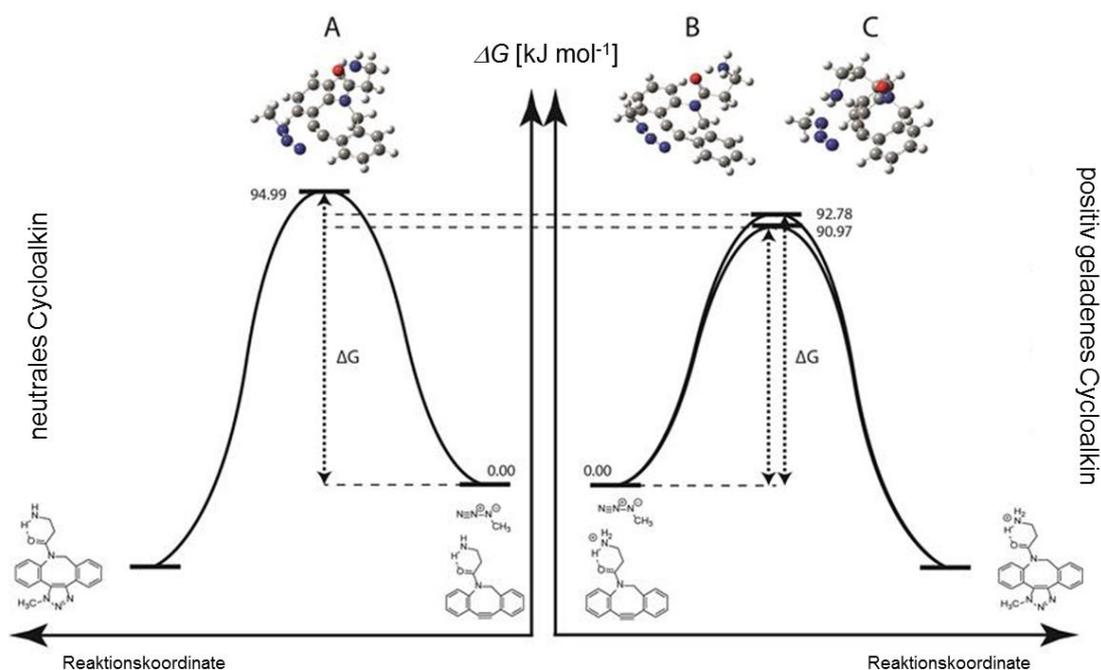


Abbildung 50. DFT-Untersuchungen auf einem B3LYP/cc-pvTZ-Niveau des Übergangszustands und des Reaktionspfads der Reaktion zwischen einem Modellazid (Methylazid) mit ungeladenem beziehungsweise geladenem Cycloalkin 51, dargestellt sind die Gibbs'schen Energien.

Dabei sind zwei mögliche strukturelle Anordnungen im protonierten Cycloalkin [**51**+H]⁺ berücksichtigt worden. In der ersten (Abbildung 50B) befindet sich die protonierte „Seitenkette“ in das umliegende Medium gerichtet, wobei sie einen 6-gliedrigen Ring, prochelatisch stabilisiert, mit der Carbonylfunktion ausbildet. Dieser wird auch beim ungeladenen Cycloalkin (Abbildung 50A) nach Strukturoptimierung erhalten. Auch in der zweiten Anordnung (Abbildung 50C) lagert sich das Azid stabilisierend an die Alkineinheit an. Hierbei spannt ein Proton der NH₃⁺-Gruppe ein Dreieck zwischen dem Stickstoffatom des Azids und dem Kohlenstoffatom des Alkins auf.

Liang et al. publizierten für die Reaktion zwischen Dibenzo-Cyclooctin mit Methylazid eine Gibb'sche Enthalpie von 91.6 kJ mol⁻¹.^[150] Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werten. Zudem untersuchten *Gordon et al.* die Reaktion zwischen einer dem Diarylazacyclooctinon-Derivat **14** ähnlicher Verbindung, die lediglich eine Methylgruppe als Rest am Stickstoffatom trägt und Benzylazid und erhielten für die experimentell ermittelte Gibb'sche Enthalpie einen Wert von 73.2 kJ mol⁻¹. Mittels DFT-Untersuchungen (B3LYP/6-31G(d)) konnte diese Gruppe eine freie Enthalpie von 100 kJ mol⁻¹ erhalten. Wie bei den in dieser Arbeit vorgestellten Werten der Gibb'schen Enthalpie ist auch hier eine deutliche Differenz zwischen den experimentellen und den errechneten Werten zu erkennen. Dies kann durch eine Überschätzung der errechneten Werte von 20-25 kJ mol⁻¹ erklärt werden, die bereits in der Literatur beschrieben ist.^[149] Somit liegen die mittels DFT-Untersuchungen erhaltenen Werte in guter Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Daten.

Aufgrund der DFT-Untersuchungen konnte die experimentell ermittelte Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion zwischen **51** und den Aziden **53**, **54**, **55** und **56** (Abbildung 46) mit steigendem pH-Wert auf den Wegfall der stabilisierenden Effekte der NH₃⁺-Einheit im Cycloalkin zurückgeführt werden.

3.3.3 Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Reaktanden und SDS-Molekülen

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen SDS-Molekülen und den Reaktanden der SPAAC-Reaktion wurden diese in Pufferlösungen mit unterschiedlicher SDS-Konzentration gelöst und anschließend deren elektrophoretische Mobilität mittels MEKC bestimmt. Durch die unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit den anionischen SDS-Molekülen unterscheidet sich die elektrophoretische Mobilität der Addukte von der der Reinsubstanzen. Die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilitäten der Reaktanden von der SDS-Konzentration ist in Abbildung 51 gezeigt.

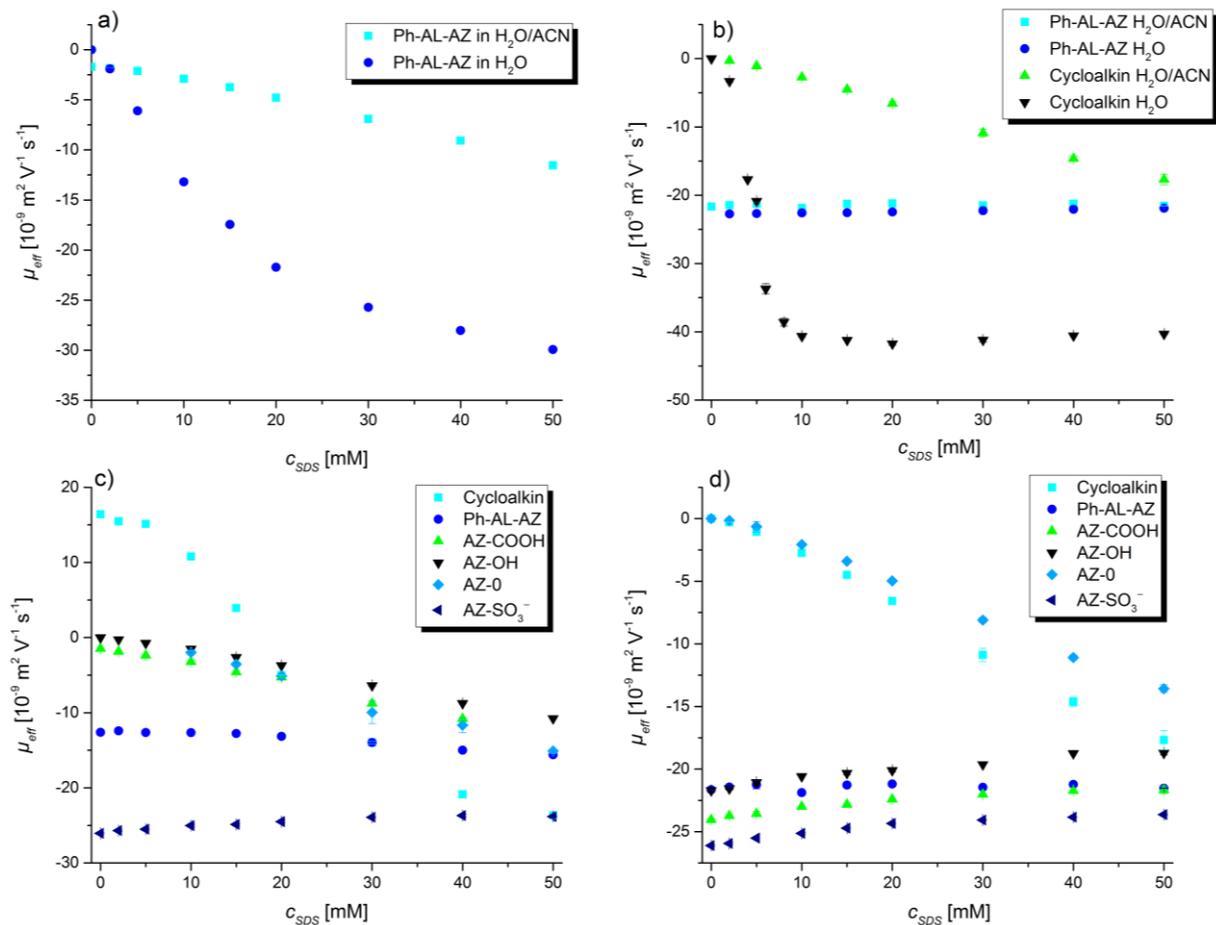


Abbildung 51. Änderung der elektrophoretischen Mobilität der Reaktanden der SPAAC-Reaktion in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration (a) bei pH 2.3, b) bei pH 11.9, c) bei pH 3.8, d) bei pH 11.9).

In Abbildung 51a ist die Änderung der elektrophoretischen Mobilität des Phenylalaninazids (**54**) im Wasser-ACN-Gemisch und in wässrigem Milieu bei pH 2.3 gezeigt. Deutlich erkennbar ist, dass die Interaktion des Azids mit SDS im Wasser-ACN-Gemisch signifikant schwächer ausfällt, was an der geringeren Abnahme der elektrophoretischen Mobilität erkennbar ist. Abbildung 51b zeigt die elektrophoretische Mobilität von Cycloalkin **51** und Phenylalaninazid (**54**) im Wasser-ACN-

Gemisch und im wässrigen Milieu in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an SDS. Es fällt auf, dass das Cycloalkin im Wässrigen stärker mit den SDS-Molekülen interagiert als im Wasser-ACN-Gemisch, was auf die veränderte Polarität des Lösungsmittels zurück geführt werden kann. In Abbildung 51c und d sind die elektrophoretischen Mobilitäten der Reaktanden im Wasser-ACN-Gemisch bei pH 3.8 beziehungsweise 11.9 dargestellt. Bei pH 3.8 (Abbildung 51c) zeigt das Cycloalkin **51** die größte Affinität zu SDS-Molekülen, was an der raschen Änderung der elektrophoretischen Mobilität zu erkennen ist. Zudem kommt es zu signifikanten Wechselwirkungen zwischen AZ-COOH (**53**) und SDS-Molekülen, was darauf zurückgeführt werden kann, dass bei pH 3.8 das Azid zu 90 % protoniert vorliegt, somit relativ hydrophob ist und aus diesem Grund Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den SDS-Molekülen eingeht. Auch das per se ungeladene Phenylazid sowie das unter diesen Bedingungen neutrale AZ-OH wechselwirken mit SDS. Ph-AL-AZ und AZ-SO₃⁻ liegen negativ geladen vor und es kommt somit zu sehr geringen Wechselwirkungen zwischen den Aziden und SDS, da es zu repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Aziden und negativ geladenem SDS kommt. Bei pH 11.9 (Abbildung 51d) wird die starke Affinität der ungeladenen Verbindungen (Cycloalkin **51**, Phenylazid **56**) zu SDS in der raschen Abnahme der elektrophoretischen Mobilitäten deutlich. Die anderen vier Azide zeigen hingegen kaum eine Änderung der elektrophoretischen Mobilität mit steigender SDS-Konzentration.

3.3.4 Einfluss von Mizellen auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Anschließend wurde der Einfluss von Mizellen auf die Reaktionsgeschwindigkeit untersucht. Als Mizellenbildner wurde SDS eingesetzt, das ab einer bestimmten Konzentration, der CMC, Mizellen bildet, die als abgeschlossene Reaktionskammern angesehen werden können (vgl. Abschnitt 3.2). Bei einem ACN-Gehalt von 28 % (v/v) liegt die CMC bei 13 mM. In Abbildung 52 sind die gemessenen Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen von Cycloalkin **51** mit den Aziden **52**, **53**, **55** und **56** graphisch dargestellt.

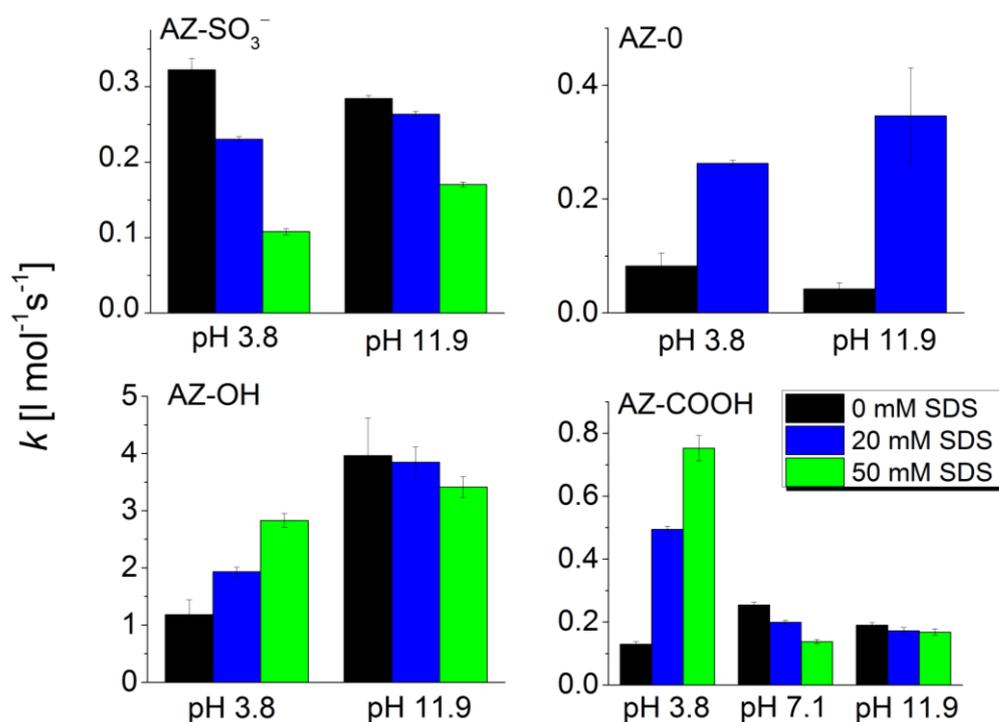


Abbildung 52. Übersicht über die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktionen zwischen dem Cycloalkin **51** und verschiedenen Aziden (**52**, **53**, **55**, **56**) in einem Wasser-ACN-Gemisch bei unterschiedlichen pH-Werten und SDS-Konzentrationen.

Das sulfatierte Phenylazid **55** liegt im gesamten untersuchten pH-Bereich negativ geladen vor und befindet sich somit bevorzugt in der hydrophilen Lösung. Zusätzlich kommt es zu repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenem Azid **55** und negativ geladenen SDS-Molekülen. Aufgrund der hohen Hydrophobizität des Cycloalkins **51** und der gegensätzlichen Ladung (bei niedrigen pH-Werten) im Vergleich zu SDS hält sich dieses bevorzugt im hydrophoben Inneren der SDS-Mizellen auf. Aus diesem Grunde nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender SDS-Konzentration ab, da es zu einer effizienteren räumlichen Trennung der beiden Reaktanden kommt. Im Basischen liegt das Cycloalkin **51** neutral vor und besitzt geringere Wechselwirkungen mit den SDS-Molekülen, da die elektrostatischen Wechselwirkungen entfallen. Deshalb ist die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender SDS-Konzentration

geringer ausgeprägt als im Sauren. Aufgrund der großen Hydrophilie des Azids **55** wird die Einlagerung in das Mizelleninnere verhindert, in dem sich das Cycloalkin **51** befindet.

Der gegenläufige Trend kann bei der Reaktion zwischen Phenylazid (**56**) und Cycloalkin **51** beobachtet werden. Beide Reaktanden sind hydrophob und wechselwirken somit stark mit den SDS-Molekülen und werden dabei in das Mizelleninnere eingelagert. Da das Mizelleninnere, wie bereits erwähnt, als geschlossene Reaktionskammer angesehen werden kann, kommt es zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bei zunehmender SDS-Konzentration.

Das gleiche Phänomen lässt sich auch bei der Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Hydroxylphenylazid **52** bei niedrigem pH-Wert (wenn sowohl Alkin als auch Azid protoniert vorliegen) beobachten. Sobald **52** dissoziiert vorliegt, bilden sich repulsive elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Azid und SDS-Molekülen, wie bei **55**, aus. Hinzukommend nehmen die attraktiven Wechselwirkungen zwischen Alkin und SDS-Molekülen ab, da die elektrostatischen Wechselwirkungen wegfallen und sich die Anziehung nur noch auf die hydrophobe Assoziation beschränkt. Aus diesen Gründen nimmt die Geschwindigkeitskonstante bei zunehmender SDS-Konzentration im Basischen ab.

Bei der Reaktion des Cycloalkins **51** mit dem Carboxylphenylazid **53** alle möglichen Ladungskombinationen der Reaktanden untersucht werden sollten, wurden die Geschwindigkeitskonstante bei einem zusätzlichen pH-Wert ermittelt. **53** ist im Sauren (pH 3.8) ungeladen und interagiert mit den SDS-Mizellen. Wie bereits erwähnt, wechselwirkt das Cycloalkin **51** im Sauren stark mit den SDS-Mizellen und somit kommt es zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bei zunehmender SDS-Konzentration, da die Reaktanden in einem relativ abgeschlossenen Reaktionssystem miteinander reagieren und sich somit näherkommen. Bei pH 7.1 liegt das Azid **53** negativ geladen und das Cycloalkin **51** positiv geladen vor. Durch die Hydrophilie des Azids befindet sich dieses bevorzugt in der wässrigen Lösung, wobei sich das Cycloalkin hauptsächlich im Mizelleninneren aufhält. Somit kommt es mit steigender SDS-Konzentration zu einer effizienteren räumlichen Trennung der beiden Reaktanden, was mit einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit einhergeht. Bei der Reaktion zwischen neutral geladenem Cycloalkin **51** und negativ geladenem Azid **53** hat die erhöhte Zugabe von SDS geringere negative Auswirkungen auf die Reaktionsgeschwindigkeit als im Neutralen, was auf die schwächeren Wechselwirkungen zwischen Cycloalkin und SDS-Mizellen zurückzuführen ist.

Im Anschluss wurden identische Untersuchungen für die Reaktion zwischen Ph-AL-AZ (**54**) und Cycloalkin **51** durchgeführt. Die graphische Darstellung der Geschwindigkeitskonstanten ist in Abbildung 53 (links) gezeigt. Um erneut die Einflüsse aller möglichen Ladungskombinationen der

Reaktanden untersuchen zu können, wurden die Geschwindigkeitskonstanten zusätzlich bei pH 2.3 ermittelt. Bei diesem pH-Wert liegt das Azid zu 96 % protoniert vor, wobei es bei pH 3.8 bereits zu 61 % aus dissoziierter Säure besteht.

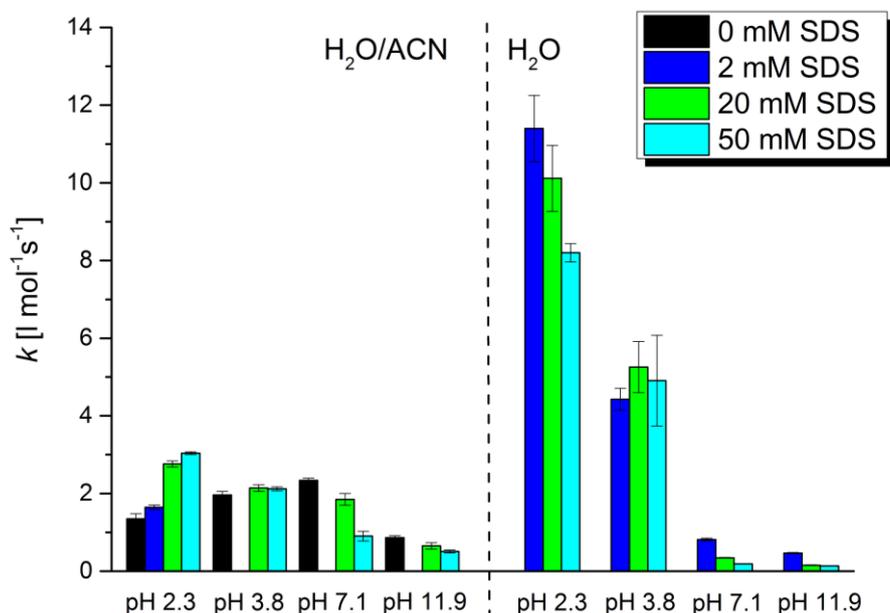


Abbildung 53. Übersicht der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen Phenylalaninazid **54** und Cycloalkin **51** in einem Wasser-ACN-Gemisch beziehungsweise in Wasser bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Konzentrationen an SDS.

Zunächst wurde die Reaktion im zuvor schon verwendeten Wasser-ACN-Gemisch untersucht. Liegt in diesem Gemisch der Hauptbestandteil des Azids protoniert vor (pH 2.3), so kommt es zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit zunehmender SDS-Konzentration, da sowohl das Azid als auch das Cycloalkin mit den SDS-Molekülen interagieren und sich somit bevorzugt im Mizelleninneren aufhalten. Wird der pH-Wert des Reaktionsgemisches auf 3.8 erhöht, hat eine steigende SDS-Konzentration nahezu keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, da das Azid sowohl protoniert als auch dissoziiert vorliegt. Bei weiterer pH-Werterhöhung kommt es, wie bei der Reaktion von **51** mit den Aziden **52** und **53**, zu einer Abnahme der Geschwindigkeitskonstante, wobei auch hier die Abnahme bei pH 7.1 stärker ausgeprägt ist als bei pH 11.9, was auf die schwächeren Wechselwirkungen des dissoziierten Cycloalkins **51** mit den SDS-Mizellen zurückzuführen ist.

Aufgrund der starken Wechselwirkungen des Azids **54** mit SDS war es möglich, dieses in wässrigem Medium mit geringer SDS-Konzentration (unterhalb der CMC) zu lösen, wodurch auf das cytotoxische ACN als organisches Co-Solvens verzichtet werden konnte (Abbildung 53 rechts). Durch Wechsel des Lösungsmittels konnte die Reaktion um das circa 7-fache beschleunigt werden. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender SDS-Konzentration bei pH 2.3

kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann es auf die pH-Wertänderung zurückzuführen sein, da der pK_a -Wert von SDS 1.9^[151] beträgt und SDS somit bei pH 2.3 noch nicht vollständig dissoziiert vorliegt. So ändert sich der pH-Wert von 2.39 in einer 2 mM SDS-Lösung auf 2.56 in einer 20 mM SDS-Lösung und steigt weiter auf 2.78 in einer 50 mM SDS-Lösung. Zum anderen kann die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit durch die auftretenden Verdünnungseffekte hervorgerufen werden, da bei höheren Konzentrationen mehr Mizellen vorliegen und die Reaktanden sich somit in unterschiedlichen Mizellen aufhalten können.

Wird die Reaktion bei pH 3.8 durchgeführt, ändert sich die Geschwindigkeitskonstante mit steigender SDS-Konzentration nur innerhalb der Grenzen der Messfehler, jedoch langsamer als bei pH 2.3 ab. Allerdings verläuft die Reaktion im wässrigen Medium immer noch schneller als im Wasser-ACN-Gemisch. Unter neutralen beziehungsweise basischen Bedingungen ist die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Ph-AL-AZ **54** um einiges geringer als im Säuren und im Wasser-ACN-Gemisch. In diesem pH-Bereich liegt das Azid dissoziiert vor und es kommt zu repulsiven elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Azid und den SDS-Molekülen. Durch die große Hydrophobizität und aufgrund des Fehlens des organischen Co-Solvens interagiert das Cycloalkin stark mit SDS und wird somit in das Mizelleninnere eingelagert. Infolgedessen werden die beiden Reaktanden räumlich voneinander getrennt, wobei eine geringere Geschwindigkeitskonstante als im Säuren und im Wasser-ACN-Gemisch erhalten wird.

Um nachzuweisen, dass die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit nach Zusatz von SDS nicht auf die höhere Ionenstärke, sondern auf den Effekt der Mizellen zurückzuführen ist, wurden Untersuchungen mit erhöhter Ionenstärke durch Zusatz von NaCl durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 54 dargestellt und werden mit den Geschwindigkeitskonstanten dieser Reaktion in rein wässrigem Milieu unter Zusatz von SDS wie auch im Wasser-ACN-Gemisch verglichen. Die Geschwindigkeitskonstanten konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit der Reaktanden nicht in wässrigem Puffer unter Zusatz von NaCl bestimmt werden.

In Abbildung 54 links sind die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Azid **54** in wässrigem Milieu in Abhängigkeit von pH-Wert und SDS-Konzentration dargestellt. während rechts die Geschwindigkeitskonstanten derselben Reaktion im Wasser-ACN-Gemisch in Abhängigkeit von dem pH-Wert, der SDS-Konzentration sowie der NaCl-Konzentration zu sehen sind. Aus Abbildung 54 ist deutlich ersichtlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten in wässrigem Milieu unter Zusatz von SDS diejenigen im Wasser-ACN-Gemisch unter Zusatz von SDS oder NaCl bei weitem übersteigen.

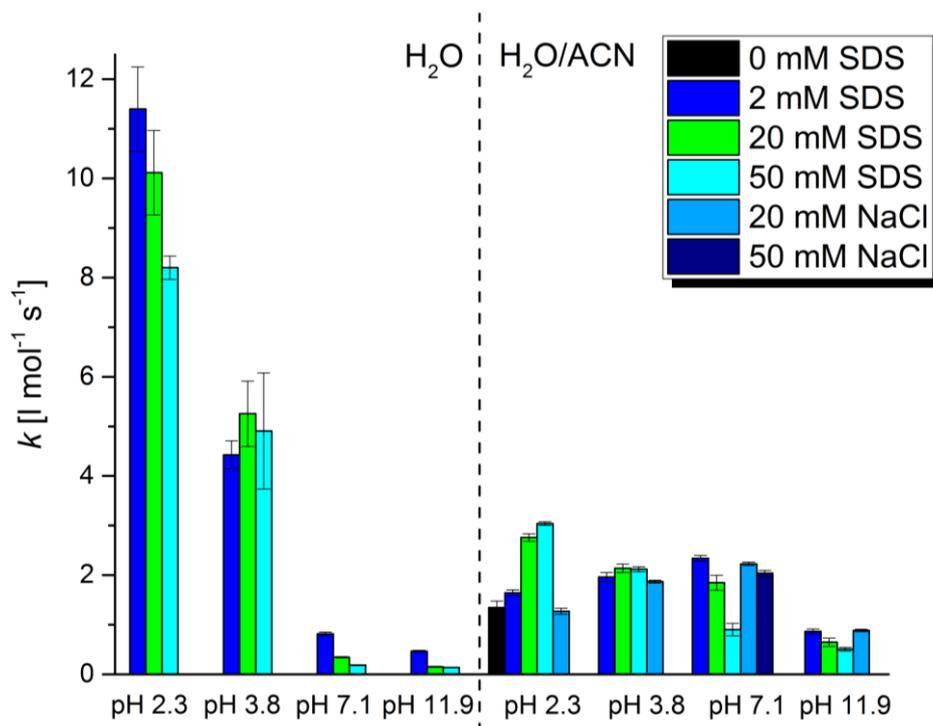
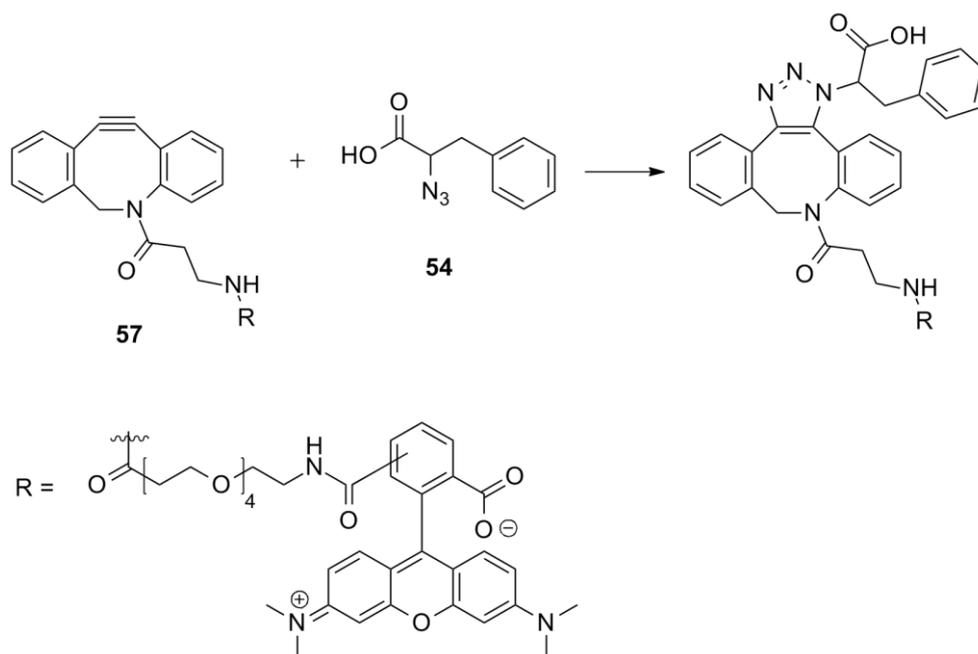


Abbildung 54. Übersicht der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen Cycloalkin 51 und Ph-AL-AZ 54 in wässrigem Milieu und in einem Wasser-ACN-Gemisch unter Zusatz von SDS und NaCl.

Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion bei pH 2.3 im Wasser-ACN-Gemisch unter Ausschluss von SDS stimmt in den Fehlergrenzen mit der beim selben pH-Wert unter Zusatz von 20 mM NaCl ermittelten Geschwindigkeitskonstante überein ($k_2 = 1.35 \pm 0.13 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $k_2 = 1.27 \pm 0.06 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Dagegen kann eine Steigerung der Geschwindigkeitskonstante um Faktor 1.2 (2 mM SDS, $k_2 = 1.64 \pm 0.06 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), 2 (20 mM SDS, $k_2 = 2.76 \pm 0.08 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) beziehungsweise 2.3 (50 mM, $k_2 = 3.04 \pm 0.03 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) bei Zusatz von SDS verzeichnet werden. Auch bei pH 3.8, 7.1 und 11.9 konnten keine signifikanten Änderungen der Geschwindigkeitskonstante bei NaCl-Zugabe beobachtet werden. Somit kann die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit auf den Effekt der Mizellbildung und nicht auf die Erhöhung der Ionenstärke zurückgeführt werden.

Untersuchungen des Einflusses von SDS auf die Kinetik wurden zudem für ein Fluoreszenzmarkiertes Cycloalkinderivat **57** und dessen Reaktion mit der azidierten Aminosäure Ph-AL-AZ **54** durchgeführt (Schema 12).



Schema 12. Reaktion zwischen PEG-Cycloalkin **57** und Ph-AL-AZ **54**.

Die Reaktionen wurden in den selben Puffersystemen durchgeführt, allerdings wurde die Konzentration an Mizellenbildnern im Separationspuffer auf 10 mM minimiert, da bei einer höheren SDS-Konzentration eine Co-Migration der Reaktanden zu beobachten war. In Abbildung 55 sind die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten bei verschiedenen pH-Werten in einem Wasser-ACN-Gemisch (links) und in wässrigem Milieu (rechts) unter Zusatz von SDS graphisch veranschaulicht. Die Durchführung der Reaktion ohne Zusatz von Mizellenbildnern ist nicht möglich, da das PEG-Cycloalkin **57** aufgrund seiner großen Hydrophobizität nicht in Wasser löslich ist.

Im Wasser-ACN-Gemisch kann derselbe Trend wie bei der Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und AZ-OH **52** beobachtet werden, allerdings sind die Auswirkungen wegen der höheren Hydrophobizität des PEG-Cycloalkins **57** gegenüber dem Cycloalkin **51** stärker ausgeprägt. Demnach interagiert das PEG-Cycloalkin **57** stark mit SDS-Molekülen. Bei pH 2.3 liegt das Azid hauptsächlich protoniert vor, was die Hydrophobizität und damit auch die Wechselwirkung mit SDS-Molekülen verstärkt. Aus diesem Grund kommt es zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit mit erhöhter SDS-Konzentration. Bei pH 11.9 treten repulsive elektrostatische Wechselwirkungen zwischen negativ geladenem Azid **54** und negativ geladenen SDS-Molekülen auf, die zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender SDS-Konzentration führen, da das PEG-Cycloalkin auch unter diesen Bedingungen stark mit den SDS-Molekülen wechselwirkt. Die so hervorgerufene räumliche Trennung der Reaktanden wird mit steigender SDS-Konzentration verstärkt.

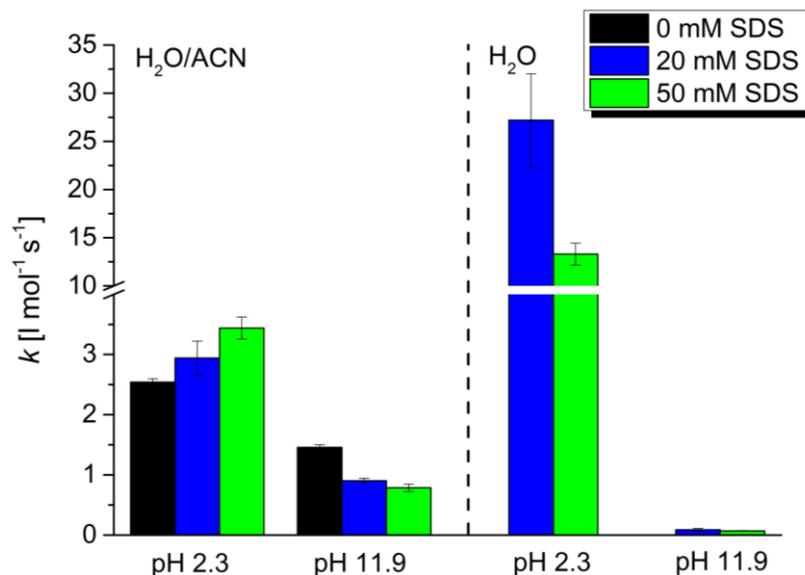


Abbildung 55. Übersicht der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen PEG-Cycloalkin **57** und Phenylalaninazid **54** bei verschiedenen pH-Werten in einem Wasser-ACN-Gemisch (links) und in wässrigem Medium (rechts) mit Zusatz von Mizellenbildner.

Wird die Reaktion in wässrigem Milieu unter Zusatz von SDS durchgeführt, können um etwa Faktor 10 höhere Geschwindigkeitskonstanten ermittelt werden. So kann die Geschwindigkeitskonstante von $k_2 = 2.94 \pm 0.28 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 2.3 im Wasser-ACN-Gemisch bei einer SDS-Konzentration von 20 mM auf $k_2 = 27.2 \pm 4.81 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beim selben pH-Wert und identischer SDS-Konzentration nur durch Verzicht auf das organische Co-Solvens gesteigert werden. Der relativ große Fehlerwert kommt dadurch zustande, dass die Reaktion auch bei niedriger Konzentration von nur 0.6 mM Azid **54** so schnell abläuft, dass sie innerhalb der ersten drei CE-Messungen beendet ist. Eine Steigerung der SDS-Konzentration führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante, was durch Verdünnungseffekte aber auch Änderungen im pH-Wert erklärt werden kann.

Durch die starke Wechselwirkung des PEG-Cycloalkins **57** mit den SDS-Molekülen wird dieses in das Mizelleninnere inkorporiert. Da es, wie schon erwähnt, im Basischen zu repulsiven Wechselwirkungen zwischen Azid **54** und SDS-Molekülen kommt, werden die Reaktanden räumlich effizient getrennt, wodurch die Reaktanden kaum miteinander reagieren. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion unter Zusatz von 20 mM SDS von $k_2 = 27.2 \pm 4.81 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 2.3 auf $k_2 = 0.09 \pm 0.02 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 11.9 und nimmt somit um einen Faktor von über 300 ab. Folglich konnte durch den Einsatz von Mizellen eine größere Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erhalten werden, als *Anderton et al.* publizierten.^[38] Hier konnte durch den Einsatz von SDS in der zweifachen CMC eine Steigerung von Faktor 100 erhalten werden. Auch hier wurde die Reaktion in Wasser durchgeführt.

3.3.5 *On-column* Experimente

Anhand der Kenntnisse der Reaktionsgeschwindigkeiten konnten nun geeignete Bedingungen für *on-column* Experimente mittels EMMA gewählt werden. So wurde zunächst die Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Azid **52** untersucht, da hier die größten Geschwindigkeitskonstanten im Separationspuffer erhalten wurden. Um Peakverbreiterung durch Diffusion zu vermeiden, wurden die Reaktanden nur in geringen Konzentrationen eingesetzt, was eine große Geschwindigkeitskonstante der Reaktion für eine erfolgreiche *on-column* Reaktion nötig macht.

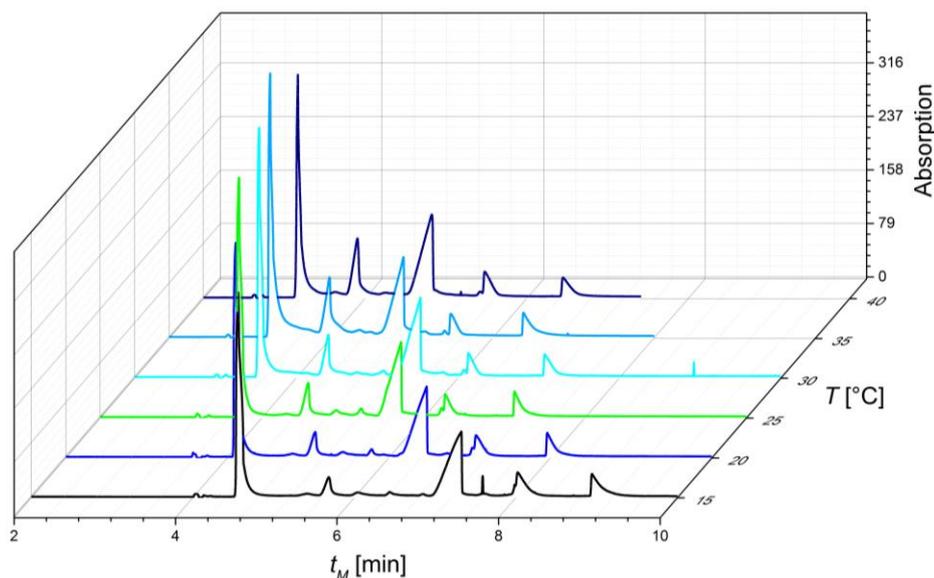


Abbildung 56. *On-column* RCE-Messungen der Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Azid **52** mit steigender Temperatur (in 7 mM β -Alanin, 10 mM LiOH, 28 % ACN, pH 11.9, 20 kV, 50 mbar, $\lambda = 210$ nm, Verwendung von Benzoesäure als interner Standard).

Aufgrund der höheren Migrationszeit des Azids **52** wurde dieses zuerst injiziert. Nach dem Auftragen eines Pufferplugs auf die Kapillare, das eine Reaktion durch Diffusion verhindern soll, wurde das Cycloalkin **51** injiziert. Durch Anlegen einer Spannung von 20 kV wurde die Separation und Reaktion gestartet. Demzufolge wurde die Reaktion mittels EMMA durchgeführt (vgl. Abschnitt 1.1.2). In Abbildung 56 sind die erhaltenen Elektropherogramme bei unterschiedlichen Kapillartemperaturen dargestellt.

Um die Stabilität der Injektionen verfolgen zu können, wurde beiden Reaktanden mit Benzoesäure ein interner Standard in gleichen Konzentrationen zugesetzt. Dieser erscheint in zwei separaten Peaks mit höheren Migrationszeiten als die der Reaktanden und des Produkts im Elektropherogramm. Der zuerst eluierte Peak kann dem nicht reagierten Cycloalkin **51** zugeordnet werden. Der nachfolgende Peak wird durch das Produktgemisch verursacht. Bei steigender Kapillar- und damit auch Reaktionstemperatur wird, wie aus Abbildung 56 ersichtlich, mehr Produkt gebildet. Darauf folgend wird das Azid **52** eluiert.

Zusätzlich wurde eine zweite SPAAC-Reaktion mittels ocRCE untersucht. In Anlehnung an biologische Markierungsexperimente wurde ein Farbstoffderivat als Cycloalkinkomponente (**57**) und eine azidierte Aminosäure (**54**) als Azidkomponente eingesetzt. Das Reaktionsschema ist bereits in Schema 12 abgebildet.

Da diese Reaktion unter sauren Bedingung schneller verläuft als unter basischen, die Separation des Reaktionsgemisches aber unter basischen Bedingungen effizienter stattfindet, wurde in diesem Fall auf die Mischung durch Diffusion zurückgegriffen. Dabei können die Reaktanden gelöst in einem anderen Puffer injiziert werden und reagieren somit unter anderen Bedingungen, als die elektrophoretische Trennung vonstattengeht. Die Injektionssequenz ist in Abbildung 57 graphisch veranschaulicht.

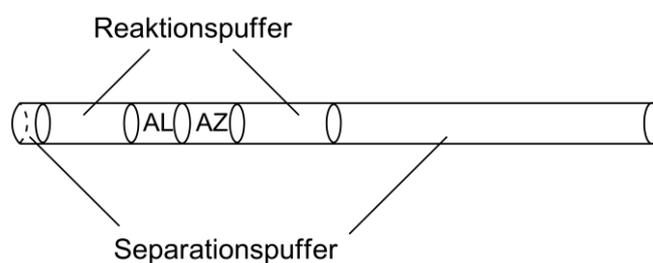


Abbildung 57. Injektionssequenz der Reaktion zwischen PEG-Cycloalkin **57** und Ph-AL-AZ-**54** mittels ocRCE und Mischung durch Diffusion.

Bei dem Separationspuffer handelt es sich um den zuvor schon verwendeten β -Alanin/Lithiumhydroxid-Puffer (7 mM/10 mM) in einem Wasser-ACN-Gemisch mit 10 mM SDS. Der Reaktionspuffer bestand aus 13 mM Maleinsäure, gemischt mit 5.5 mM Lithiumhydroxid im selben Wasser-ACN-Gemisch und ebenfalls mit Zusatz von 10 mM SDS. Um eine Diffusion von Separationspuffer in die Reaktionszone und so die Änderung des pH-Wertes zu vermeiden, wurde vor und nach der Injektion der Reaktanden noch jeweils ein Plug des Reaktionspuffers auf die Kapillare gegeben. Nach der Injektion der oben dargestellten Sequenz wurde das Gemisch durch Diffusion, das heißt durch einfaches Stehenlassen, zur Reaktion gebracht. Die Wartezeiten bis zum Anlegen der Spannung und somit der Beendigung der Reaktion und gleichzeitigem Beginn der Separation betragen 0.1, 2 und 10 Minuten. Die erhaltenen Elektropherogramme sind in Abbildung 58 dargestellt.

Abbildung 58a und b zeigen die Referenzexperimente des Azids **54** beziehungsweise des PEG-Cycloalkins **57**. Für diese wurde anstelle des zweiten Substrats ein gleich großer Plug des Reaktionspuffers injiziert. Durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Puffersystemen in getrennten Plugs treten in den Elektropherogrammen mehr Systempeaks auf, als sonst üblich. In Abbildung 58d, e und f ist die Reaktion, wie oben beschrieben, in Puffer mit niedrigem pH-Wert

durchgeführt und die Wartezeit beziehungsweise Reaktionszeit steigt von 0.1 über 2 bis 10 Minuten. Unter den hier verwendeten Trennungsbedingungen ist es möglich, für jedes gebildete Produkt einen Peak zu erhalten, wobei keine Basislinientrennung erreicht wurde.

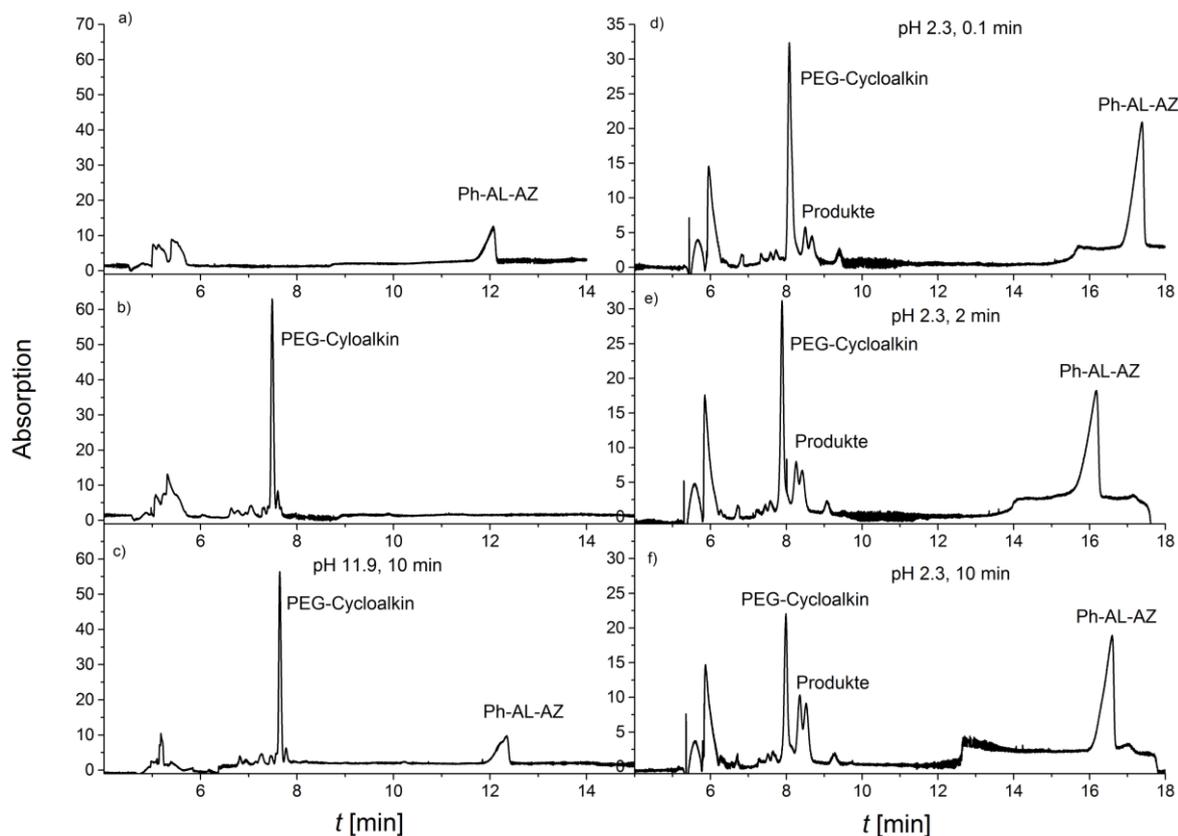


Abbildung 58. Elektropherogramme der *on-column* Reaktionskapillarelektrophorese der Reaktion zwischen PEG-Cycloalkin 57 und Ph-AL-AZ 54.

Wie zu erwarten, nehmen die Produktpeaks mit steigender Reaktionszeit zu und die Reaktandenpeaks im selben Maße ab. Zum Vergleich wurde dieselbe Injektionsreihenfolge noch mit Puffer mit hohem pH-Wert durchgeführt. Das erhaltene Elektropherogramm ist in Abbildung 58c zu sehen. Es ist zu erkennen, dass sich kein Produkt gebildet hat, auch wenn die Reaktionszeit mit 10 Minuten relativ lang war. Aufgrund dieser Ergebnisse ist deutlich, dass die Reaktion unter hohem pH-Wert zu langsam für den Einsatz in der ocRCE abläuft.

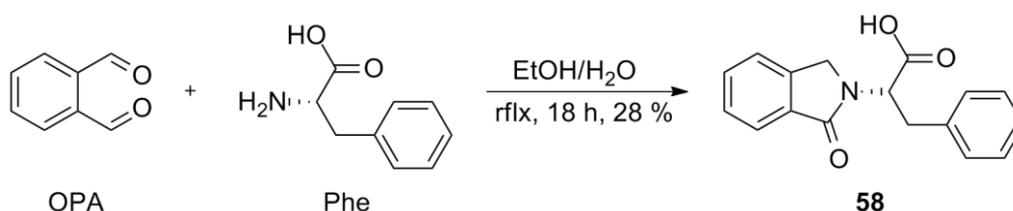
Somit konnte gezeigt werden, dass die hier vorgestellten SPAAC-Reaktionen erfolgreich in der *on-column* Reaktionskapillarelektrophorese und damit auch in *on-column* Markierungsexperimenten eingesetzt werden können.

3.4 Derivatisierung von Aminosäuren

Im nachfolgenden Kapitel werden die erhaltenen Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Untersuchung der Reaktion zwischen OPA und Aminosäuren vorgestellt. Die Derivatisierungsreaktion erfolgte unter Einsatz von L-Phenylalanin als Aminosäurekomponente. Zunächst wurde das Produkt, Phthalimidin-Derivat **58**, als Vergleichssubstanz synthetisiert. Anschließend wurde der Einfluss des pH-Wertes, wie auch verschiedener Eduktverhältnisse auf die Derivatisierungsreaktion untersucht. Ferner wurden Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion in unterschiedlichen Puffersystemen und bei diversen pH-Werten ermittelt.

3.4.1 Synthese des entsprechenden Phthalimidin-Derivats

Um das entsprechende Produkt der Reaktion zwischen OPA und L-Phenylalanin, das Phthalimidin-Derivat **58**, bei *off-column* Experimenten eindeutig identifizieren zu können, wurde dieses zunächst nach einer Vorschrift von *Jia et al.* synthetisiert (Schema 13).^[152]



Schema 13. Synthese des entsprechenden Phthalimidinderivats der Reaktion zwischen OPA und L-Phenylalanin (Phe) nach *Jia et al.*^[152]

Zur Synthese von **58** wurde 1 eq L-Phenylalanin (Phe) in einem 9:1 Gemisch (v/v) aus Ethanol und Wasser vorgelegt und eine Lösung von 1 eq. OPA in Ethanol zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt und heiß abfiltriert. Nach Umkristallisation aus heißem ACN wurde das Produkt in einer Ausbeute von 28 % als farbloser Feststoff erhalten. Durch langsames Abdampfen einer ungesättigten wässrigen Lösung des Produktes konnten für Röntgenbeugungsexperimente geeignete Einkristalle erhalten werden. Die gemessene Struktur ist in Abbildung 59 zu sehen (Strukturparameter im Anhang, Abschnitt 6.2.1).

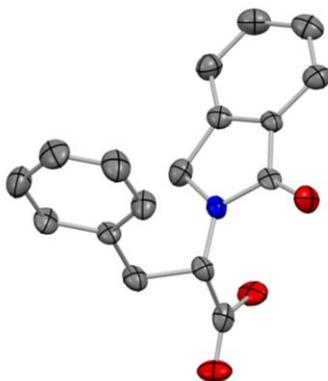


Abbildung 59. Aus dem Röntgenbeugungsexperiment erhaltene Struktur von **58**. Die Ellipsoide sind mit einer Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 50 % angegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Wasserstoffatome verzichtet.

Anhand der Strukturermittlung aus den Röntgenbeugungsexperimenten konnte **58** eindeutig als das von *Grigg et al.*^[128] und anderen^[131-133,135,137] vorgestellte Produkt der Reaktion zwischen OPA und Aminosäuren charakterisiert werden. Anschließend wurde die effektive elektrophoretische Mobilität sowie das Absorptionsspektrum von **58** bestimmt, um es in darauffolgenden Untersuchungen identifizieren zu können. In Abbildung 60 ist das entsprechende Elektropherogramm und das Absorptionsspektrum des Produkts in wässriger Lösung dargestellt. Zur Bestimmung der effektiven elektrophoretischen Mobilität wurde DMSO als EOF-Marker zugesetzt und ein Wert von $\mu_{eff} = -19.7 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Das UV-Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 248 \text{ nm}$ und eine Schulter bei 230 nm.

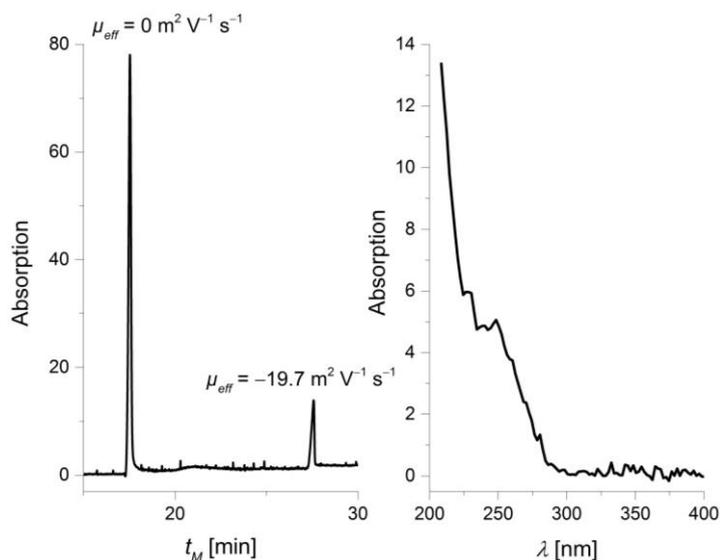


Abbildung 60. Elektropherogramm (links) und UV-Spektrum (rechts) von **58** (BGE 30 mM Ammoniak, 27 mM Essigsäure, pH 8.6, Detektionswellenlänge $\lambda = 214 \text{ nm}$)

Um geladene Spezies zu erhalten (Dissoziation der Säuregruppe des Phenylalanins), wurden alle elektrophoretischen Trennungen im Basischen bei pH 8.6 in einem Ammoniak/Essigsäure-Gemisch (30 mM/27 mM) durchgeführt.

3.4.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Derivatisierungsreaktion

Nach erfolgreicher Synthese wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktion untersucht. Hierbei wurde die Reaktion in *off-column* Experimenten in unterschiedlichen Puffersystemen, die einen pH-Wertbereich von 1.5 bis 12.5 abdeckten, untersucht. Die verwendeten Puffersysteme sind im Anhang aufgelistet (Abschnitt 6.2.2). In der Literatur wird wässriger Borat-Puffer als sehr geeignetes Puffersystem zur Durchführung dieser Reaktion dargestellt.^[153] Da die Bildung von Boratkomplexen bei der Verwendung dieses Puffersystems nicht ausgeschlossen werden kann, wurde die Reaktion bei dem entsprechenden pH-Wert zusätzlich in einem weiteren Puffersystem untersucht (45 mM Diethylmethylamin/40 mM HCl, pH 9.5).

In Abbildung 61 sind die erhaltenen Elektropherogramme in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden anstatt der Migrationszeiten die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten aufgetragen. Die Separationsbedingungen wurden hinsichtlich der Trennung aller Intermediate beziehungsweise Produkte und nicht im Hinblick auf deren Peakformen optimiert. Der Zusatz eines EOF-Markers war bei diesen Experimenten überflüssig, da überschüssiges OPA mit der Geschwindigkeit des EOFs migriert und somit für den Peak bei $\mu_{eff} = 0 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ verantwortlich ist. Aufgrund der Interaktion des unterschiedlich intensiven Systempeaks mit einer effektiven elektrophoretischen Mobilität nahe null mit Phenylalanin wird zum Teil kein Peak für Phenylalanin erhalten. Bei pH 9.3 (Abbildung 61 marineblau) kann ein sehr breiter und in anderen Fällen ein Peak mit hohem EMD-Wert mit $\mu_{eff} = -1.97 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ Phenylalanin zugeordnet werden. Alle Elektropherogramme wurden ein bis zwei Minuten nach dem Zusammengeben der Reaktanden aufgenommen.

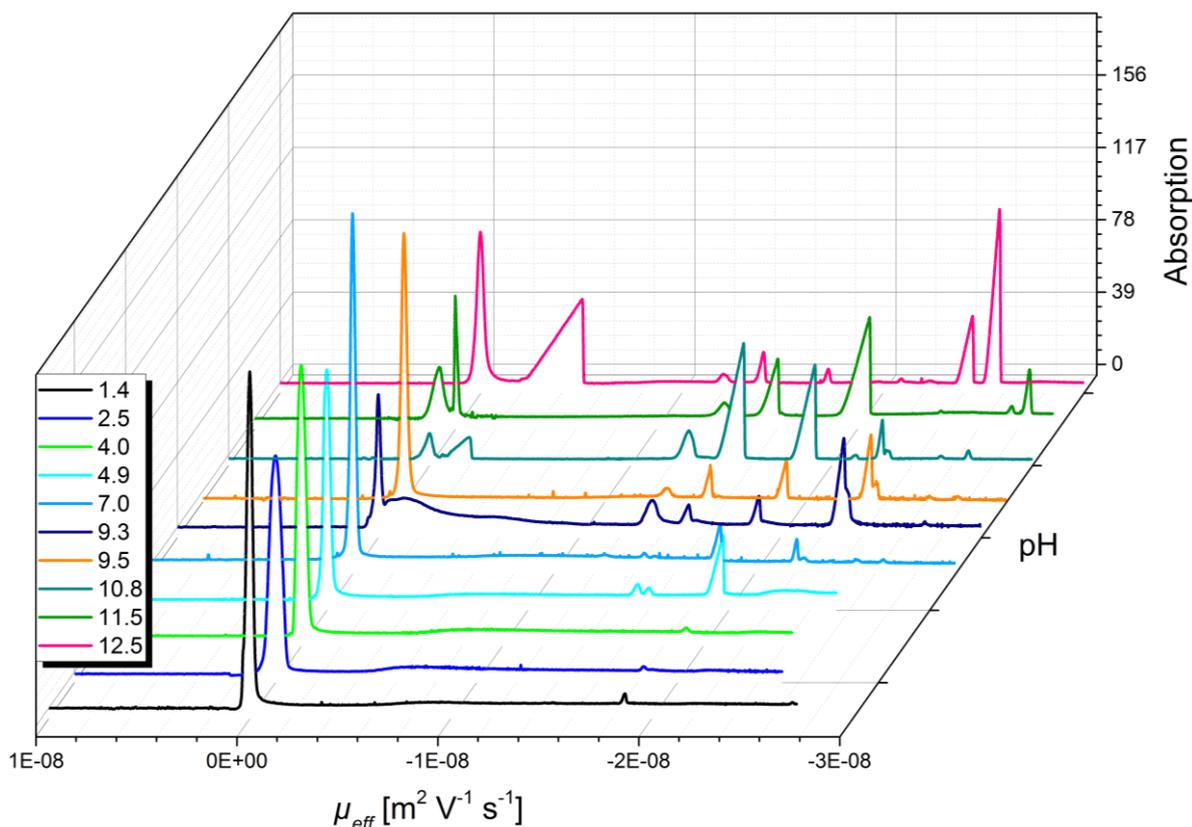


Abbildung 61. Elektropherogramme der *off-column* Experimente der Reaktion zwischen OPA und Phe in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Reaktionsmediums.

Im Sauren (pH 1.4–4.0, Abbildung 61 schwarz, blau, grün) reagieren diese langsamer als ab pH 4 (Abbildung 61 cyan) und **58** kann als Hauptprodukt sowohl aufgrund der effektiven elektrophoretischen Mobilität als auch des Absorptionsspektrums identifiziert werden. Bei den Reaktionen ab pH 7.0 (Abbildung 61 hellblau) ist die Bildung von einigen zusätzlichen Spezies zu beobachten. Anders als in der Literatur beschrieben (Bildung von Nebenprodukten erst nach 60 Minuten),^[136] werden diese auch schon nach sehr kurzer Reaktionszeit detektiert. Dabei handelt es sich zum Teil um Verbindungen mit Absorptionsmaxima bei größeren Wellenlängen (bis 333 nm, siehe Abbildung 62) als diejenigen von **58**. Das lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um höhere Kondensationsprodukte mit einem ausgeprägten konjugierten π -System handeln muss.

In Abbildung 62 sind die UV-Spektren der hauptsächlich gebildeten Nebenprodukte zu sehen. Die Verbindung mit einer effektiven elektrophoretischen Mobilität von $-13.0 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 62a) wird lediglich ab einem pH von 9.3 gebildet (Abbildung 61 marineblau bis pink) und besitzt zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda = 251 \text{ nm}$ und 291 nm . In Abbildung 62b ist das UV-Spektrum der entstehenden Verbindung mit einer effektiven elektrophoretischen Mobilität von $-15.5 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dargestellt. Es ist ein deutliches Absorptionsmaximum bei $\lambda = 247 \text{ nm}$ mit einer Schulter bei $\lambda = 283 \text{ nm}$ zu erkennen.

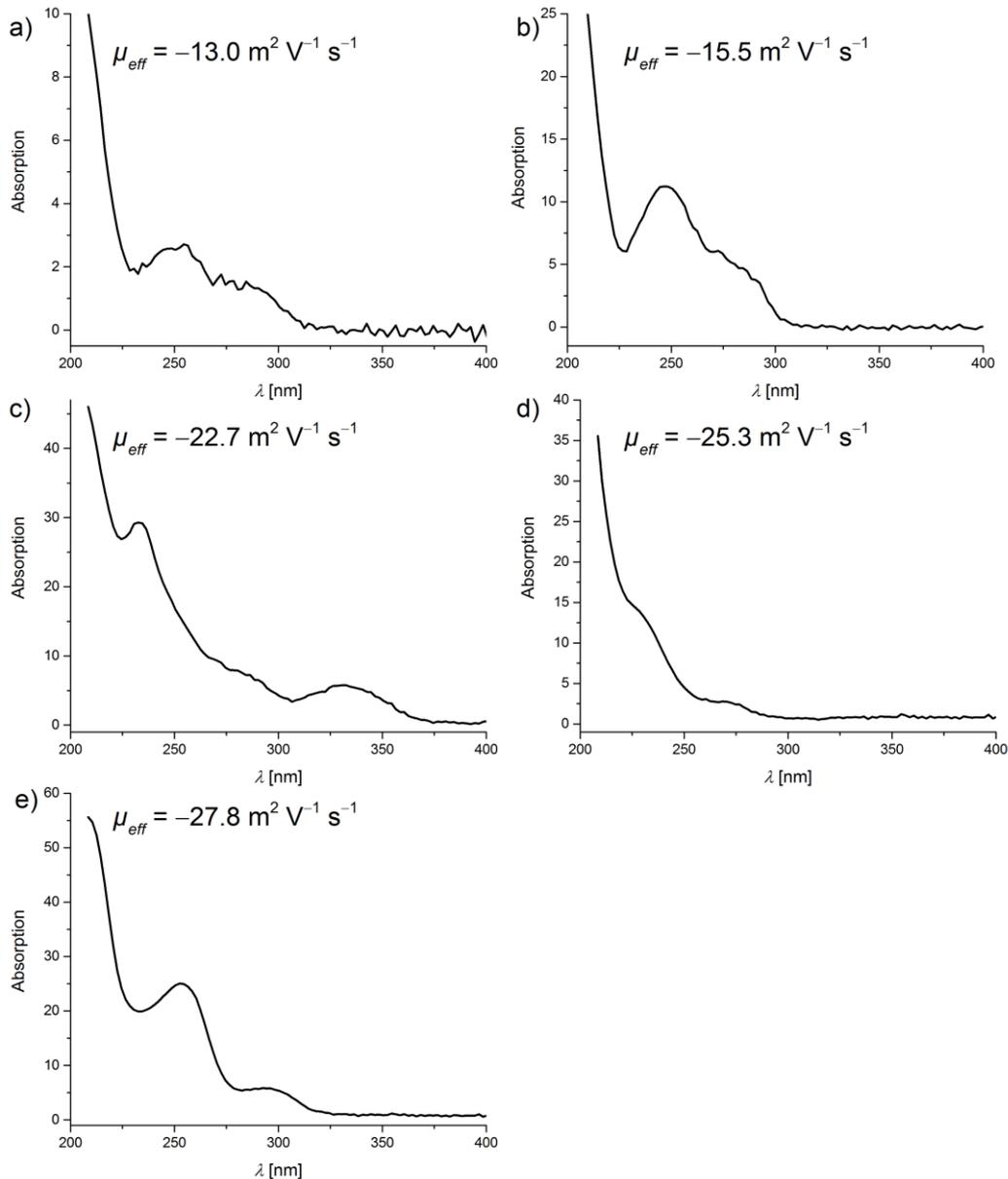


Abbildung 62. UV-Spektren und effektive elektrophoretische Mobilitäten von einigen gebildeten Nebenprodukten im Basischen (a) und b) in 300 mM DEMA-, c) in 20 mM Borat-, d) und e) in 40 mM LiOH-Puffer; zugehörige Elektropherogramme sind in Abbildung 61 dargestellt).

Beide UV-Spektren (Abbildung 62a und b) weisen Ähnlichkeiten auf, wobei die Absorptionsmaxima in Abbildung 62b im Vergleich zu a einer minimalen hypsochromen Verschiebung unterliegen. Die Übereinstimmung der beiden UV-Spektren deutet auf eine vergleichbare Struktur der Verbindungen hin. Auch diese Verbindung wird nur im Basischen (ab pH 9.3, Abbildung 61 marineblau bis pink) gebildet.

Die Verbindung mit einer effektiven elektrophoretischen Mobilität von $-22.7 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ wird ausschließlich in einem pH-Bereich von 7.0 bis 9.5 (Abbildung 61 hellblau, marineblau, orange)

beobachtet und weist mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 333$ nm das am weitesten bathochrom verschobene Absorptionsmaximum auf. Zudem zeigt das UV-Spektrum (Abbildung 62c) eine intensive Bande bei $\lambda = 233$ nm und eine Bande geringer Intensität bei $\lambda = 283$ nm. Abbildung 62d und e zeigen die UV-Spektren von Verbindungen ($\mu_{eff} = -25.3 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\mu_{eff} = -27.8 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), die nur in minimalen Mengen bei pH 7.0 bis pH 10.8 gebildet werden. Erst bei höherem pH-Wert (11.5, 12.5) werden ausreichende Mengen für ein UV-Spektrum erhalten. Während die Verbindung mit größerer effektiver elektrophoretischer Mobilität (Abbildung 62d) kaum absorbiert, können in Abbildung 62e deutliche Absorptionsmaxima beobachtet werden. Diese liegen bei letztgenannter Verbindung bei $\lambda = 253$ und 295 nm. Bei erstgenannter Verbindung können Absorptionsmaxima bei $\lambda = 229$, 269 und 305 nm ausgemacht werden (Abbildung 62d). Hinsichtlich der Lage ähneln diese den Absorptionsmaxima des in Abbildung 62c dargestellten UV-Spektrums, jedoch kommt es zu einer sehr geringen hypsochromen Verschiebung um 4, 14 beziehungsweise 25 nm.

Wie auch schon bei *Kulla et al.* beschrieben, kann eine pH-Abhängigkeit der Reaktion beobachtet werden.^[136] Wobei sich diese Abhängigkeit, wie aus Abbildung 61 ersichtlich ist, nicht nur auf die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch auf die Bildung von Nebenprodukten beziehungsweise die Menge an gebildeten Nebenprodukten bezieht.

3.4.3 CE-MS/MS-Experimente

Um die beobachteten Nebenprodukte genauer untersuchen zu können, wurden CE-MS/MS-Experimente der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in Borat- (20 mM, pH 9.3) und Lithiumhydroxid-Puffer (40 mM, pH 12.5) durchgeführt. Bedingt durch die große Anzahl an gebildeten Nebenprodukten wurden diese beiden Puffersysteme ausgewählt. Als Ionisierungsmethoden wurden Elektronenstoßionisation (ESI) und Atmosphärendruck-Chemische Ionisation (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) eingesetzt. In Abbildung 63 sind extrahierte Ionenchromatogramme (EICs) der intensivsten m/z -Werte der Reaktion in beiden Puffersystemen und mit unterschiedlichen Ionisationsarten dargestellt. In der linken Spalte sind die EICs der Reaktion in Borat-Puffer (20 mM, pH 9.3), in der rechten Spalte diejenigen in LiOH-Puffer (40 mM, pH 12.5) zu sehen. ESI⁻ (Abbildung 63 mittlere Zeile) wurde als Ionisationsmethode aufgrund der geringeren Sensitivität und unzureichenden Ionisierung der Verbindungen im Reaktionsgemisch im Vergleich zu ESI⁺ nur in Verbindung mit einem der beiden Puffersysteme verwendet. Unter Verwendung von APCI im Negativ-Modus konnten weder bei Durchführung der Reaktion in Borat- noch in LiOH-Puffer die enthaltenen Verbindungen ionisiert werden.

Als m/z -Werte mit der größten Intensität konnten bei Durchführung der Reaktion in Borat-Puffer unter Verwendung von ESI⁺ als Ionisationsmethode (Abbildung 63 links oben) zehn unterschiedliche Werte erhalten werden ($m/z = 133, 135, 282, 429, 545, 563, 585, 692$). **58** konnte sowohl anhand der exakten Masse des Molpeaks ($[M+H]^+$), der effektiven elektrophoretischen Mobilität, wie auch des Fragmentierungsschemas dem m/z -Wert von 282 zugeordnet werden (siehe Schema 15). Dabei konnte $[M-COOH]^+$ als Hauptfragment mit $m/z = 236.1302$ identifiziert werden.

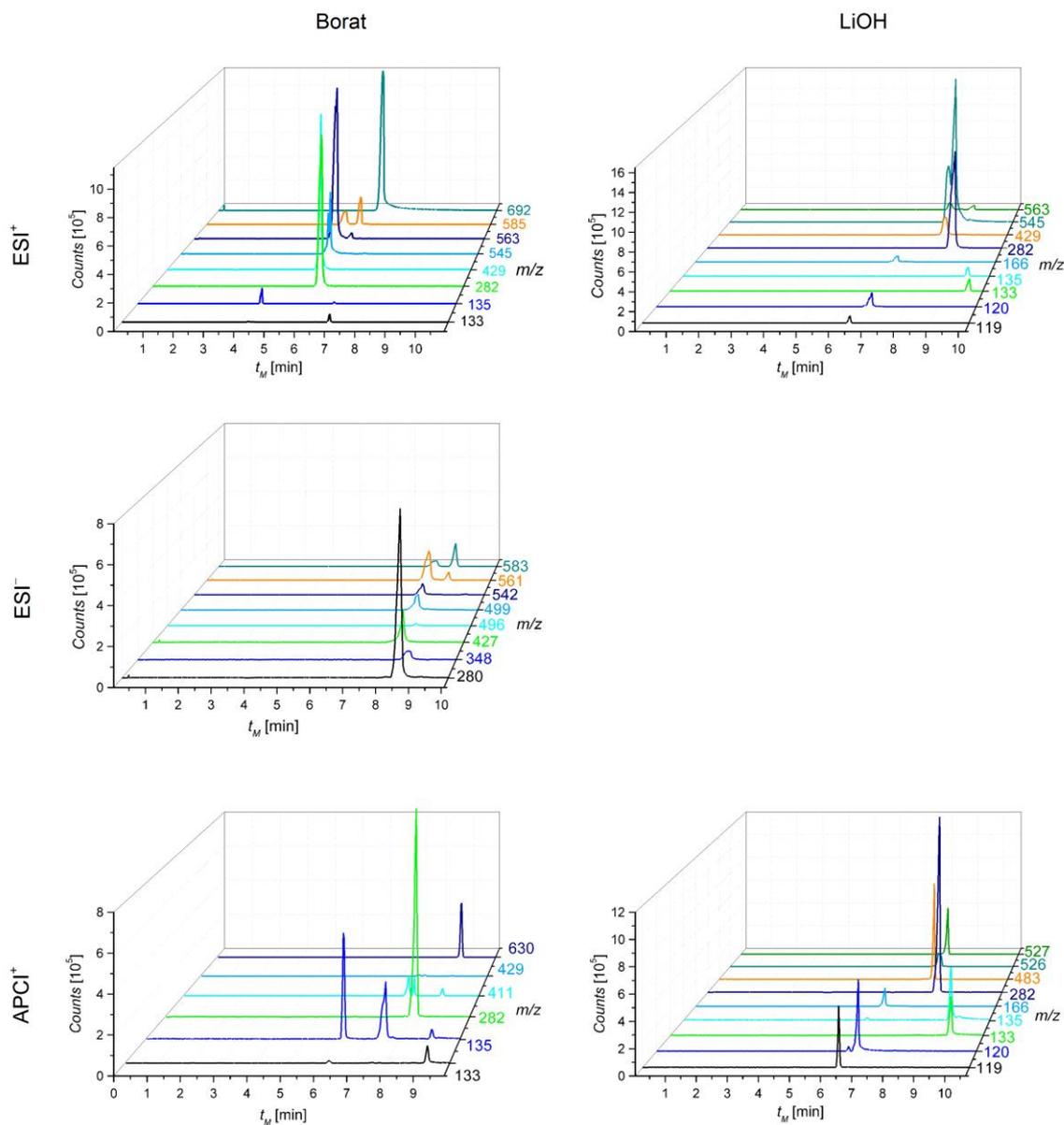
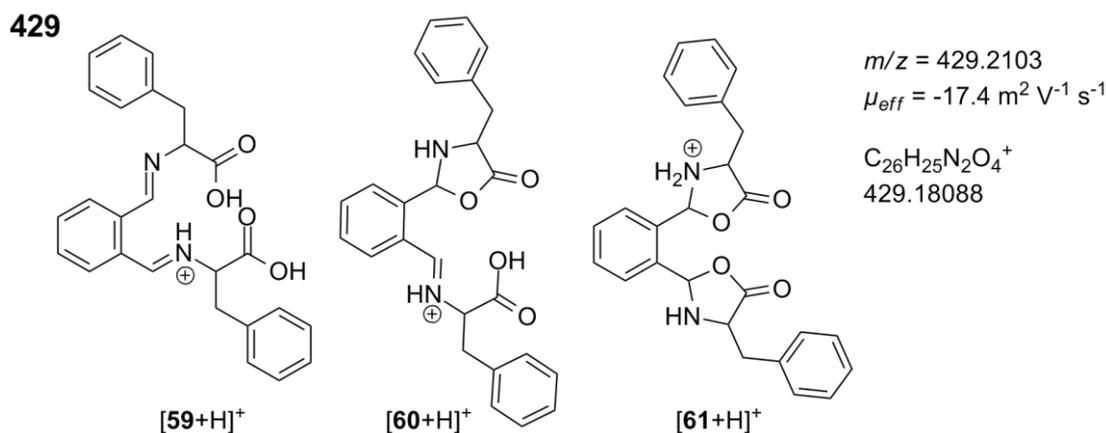


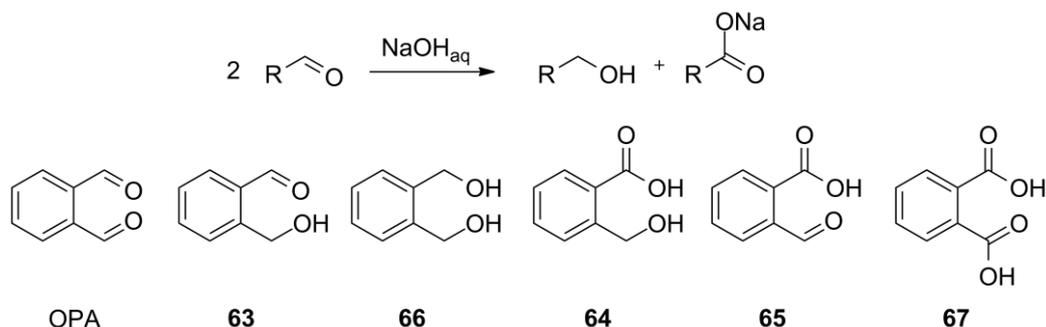
Abbildung 63. Extrahierte Ionenchromatogramme der CE-MS/MS-Experimente in unterschiedlichen Puffersystemen (Borat linke Spalte, LiOH rechte Spalte) und unter Verwendung verschiedener Ionisierungsmethoden (ESI⁺ obere Zeile, ESI⁻ mittlere Zeile, APCI⁺ untere Zeile).

Der m/z -Wert von 429 entspricht dem Diimin, das nach *Allin et al.* als Nebenprodukt gebildet wird.^[131] Dieses kann als offene Struktur (**59**, Abbildung 64), monocyclische (**60**, Abbildung 64) oder bicyclische Struktur (**61**, Abbildung 64) vorliegen, wobei **59**, **60** und **61** im Gleichgewicht vorliegen. Aus dem Fragmentierungsschema konnte nur die offene Struktur **59** identifiziert werden.

Abbildung 64. Zuordnung des Diimins zu dem m/z -Wert 429.

Zudem konnten höhere Kondensationsprodukte mit m/z -Werten bis zu 692 detektiert werden. Ein Kondensationsprodukt konnte zweifelsfrei als Hemiacetal ($m/z = 563$) identifiziert werden (siehe Schema 15). Aufgrund der beinahe identischen effektiven elektrophoretischen Mobilität im Vergleich zu einem Nebenprodukt mit $\mu_{eff} = -15.3 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (vgl. Abbildung 61 und Abbildung 62) erfolgte die Zuordnung der Struktur zu diesem Peak.

Die Zuordnung der Strukturen zu beiden Signalen mit $m/z = 135$ (Borat-Puffer mit ESI⁺, LiOH-Puffer mit APCI⁺) erfolgte über die effektive elektrophoretische Mobilität. Zum einen handelt es sich um 2-(Hydroxymethyl)benzaldehyd (**63**, Schema 15), zum anderen um ein Fragment ($[\text{64}-\text{H}_2\text{O}]^+$) der 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**64**, Schema 15). Die Zuordnung von **64** gelang durch Analyse des Fragmentierungsmusters, wobei der Molpeak bei $m/z = 153$ eine sehr schwache Intensität aufweist. Auch der Molpeak der entsprechenden Verbindung, die zu $m/z = 133$ fragmentiert, ist nur schwach zu erkennen. Bei dieser Verbindung handelt es sich um 2-Formylbenzoesäure **65**. Zusätzlich zur Identifizierung anhand des Fragmentierungsschemas wurde **65** durch Vergleich der effektiven elektrophoretischen Mobilität in Einzelmessungen der Reinkomponente bestätigt. Somit kann auch die Strukturidentifizierung der 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure gefestigt werden, da beide Verbindungen durch die große strukturelle Übereinstimmung auch vergleichbare effektive elektrophoretische Mobilitäten besitzen. Diese Verbindungen können durch die im Basischen ablaufende Cannizzaro-Reaktion entstehen (Schema 14).



Schema 14. Allgemeines Reaktionsschema einer Cannizzaro-Reaktion und mögliche Nebenprodukte, die dadurch aus OPA entstehen können.^[154]

Aus Schema 14 ist ersichtlich, dass neben den zuvor beschriebenen Nebenprodukten **64** und **65** auch noch weitere entstehen können. Durch elektrophoretische Trennung mit den hier verwendeten Separationsbedingungen können OPA, **63** und **66** jedoch nicht voneinander getrennt werden, da diese Verbindungen allesamt ungeladen vorliegen und somit mit der Geschwindigkeit des EOFs migrieren. Die effektive elektrophoretische Mobilität der Phthalsäure ist mit $-41.1 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (berechnet aus Vergleichsmessungen, entspricht einer Migrationszeit von $t_M = 58 \text{ min}$ unter diesen Separationsbedingungen) zu gering, sodass diese den Detektor unter den hier verwendeten Separationsbedingungen nicht innerhalb der Messzeit erreicht.

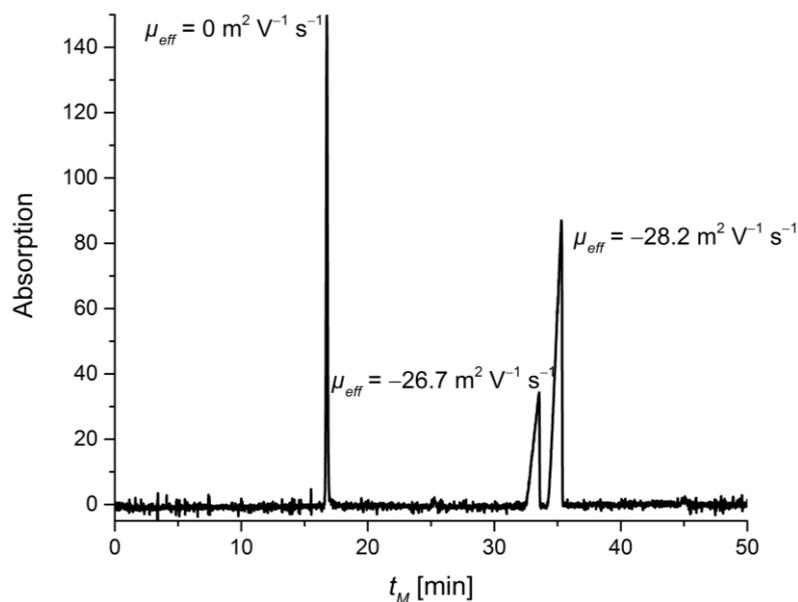


Abbildung 65. Elektropherogramm einer OPA-Lösung in 40 mM LiOH (pH 12.5) nach fünf Wochen Lagerung bei 4 °C. Zusätzlich sind die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten der migrierenden Verbindungen angegeben.

In Abbildung 65 ist das Elektropherogramm einer OPA-Lösung in 40 mM LiOH (pH 12.5) nach fünf Wochen Lagerung bei 4 °C dargestellt. Neben OPA ($\mu_{\text{eff}} = 0 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) sind deutlich zwei weitere

Verbindungen mit geringeren effektiven elektrophoretischen Mobilitäten erkennbar. Durch Vergleich der effektiven elektrophoretischen Mobilitäten und der UV-Spektren (Abbildung 66) konnte eine Zuordnung der Verbindungen zu 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**64**, $\mu_{eff} = -26.7 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und 2-Formylbenzoesäure (**65**, $\mu_{eff} = -28.2 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) erfolgen. Zudem gelang es, diese Spezies in den *off-column* Experimenten zu identifizieren (vgl. Abbildung 61 und Abbildung 62d, e). Wie oben bereits erwähnt, werden 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure und 2-Formylbenzoesäure hauptsächlich unter stark basischen Bedingungen (ab pH 11.5) gebildet. Jedoch können Peaks geringer Intensität mit identischen effektiven elektrophoretischen Mobilitäten bereits ab pH 7.0 beobachtet werden.

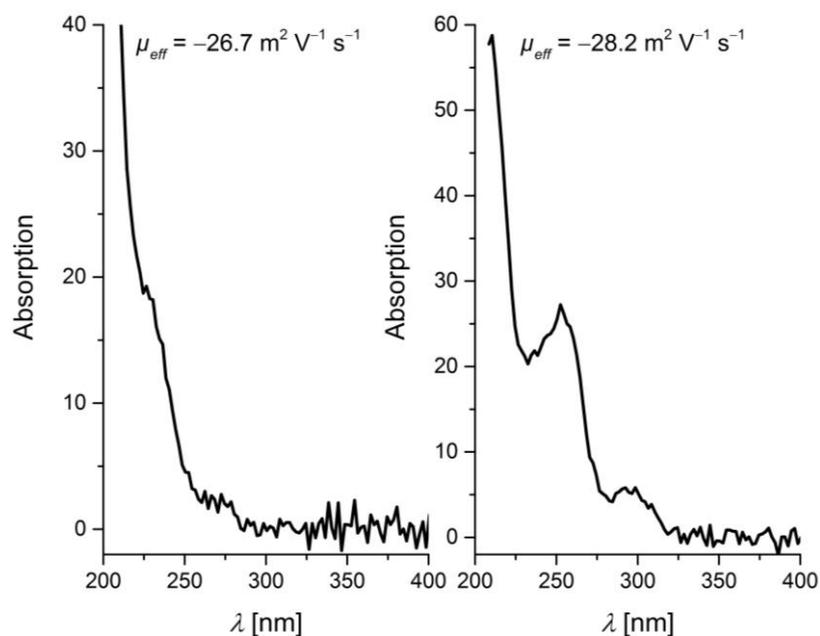
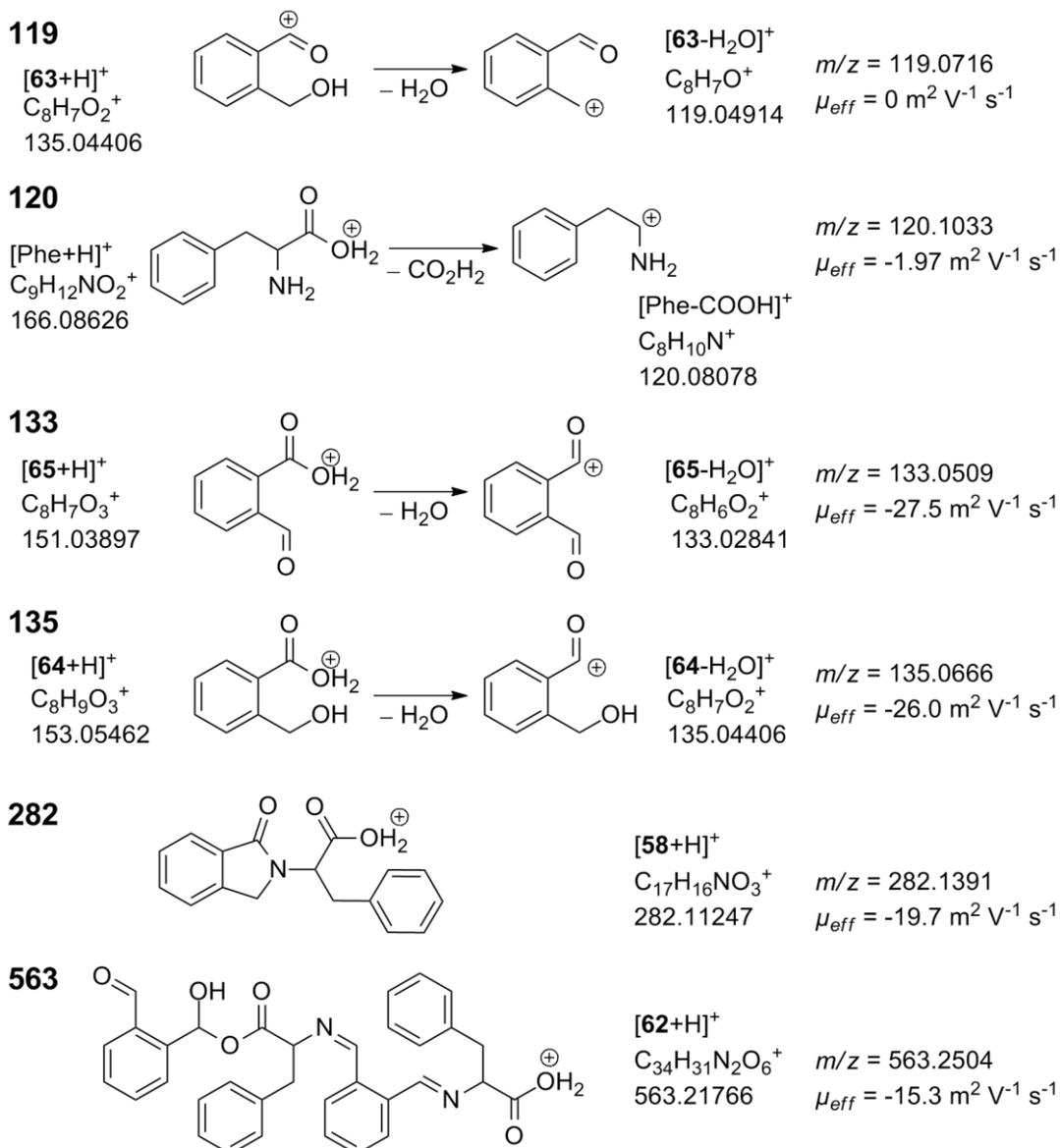


Abbildung 66. UV-Spektren der in Abbildung 65 gezeigten Peaks einer OPA-Lösung.

Beim Vergleich der EICs unterschiedlicher Ionisierungsmethoden fällt auf, dass die m/z -Werte, der mit ESI^+ aufgenommenen Spektren deutlich größer sind als in den Spektren mit APCI^+ . Dies kann durch die Tatsache erklärt werden, dass es sich bei ESI um eine verhältnismäßig sanfte Ionisationsmethode handelt, bei der es kaum zur Fragmentierung der Stammverbindung kommt. Bei der Verwendung von APCI hingegen treten vermehrt Fragmentierungen auf, wobei der Molpeak nicht oder nur in geringem Anteil detektiert werden kann. Die effektiven elektrophoretischen Mobilitäten von $m/z = 692$ (ESI^+) und $m/z = 630$ (APCI^+) sind mit $-23.3 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ identisch. Diese Verbindung ($m/z = 692$) wird bei Durchführung der Reaktion unter höherem pH-Wert (40 mM LiOH, pH 12.5) nur in geringen Mengen gebildet, weshalb auf ihre Darstellung in Abbildung 63 rechte Spalte verzichtet wurde.



Schema 15. Übersicht der eindeutig identifizierten Verbindungen mittels CE-MS/MS-Messungen und der zugehörigen m/z -Werte sowie der effektiven elektrophoretischen Mobilitäten.

Zudem fällt auf, dass einige m/z -Spuren zwei Maxima besitzen, was die Vermutung nahelegt, dass es sich bei diesen Verbindungen entweder um Konstitutionsisomere mit unterschiedlichen effektiven elektrophoretischen Mobilitäten handelt oder dass mindestens eines der beiden Maxima von einem Fragmention hervorgerufen wird. Ersteres ist bei der hier untersuchten Reaktion sehr wahrscheinlich, da sich die Nebenprodukte aus einer geringen Anzahl an Bausteinen zusammensetzen. Allerdings ist das Vorhandensein von Fragmentionen mit gleichem Masse-zu-Ladung-Verhältnis nicht auszuschließen.

Mittels CE-MS/MS-Experimenten konnten keine Bildung der entsprechenden Nebenprodukte, die von *Klima et al.* bei der Reaktion zwischen OPA und 2-Aminoethanol isoliert und identifiziert wurden,^[137] beobachtet werden. Die entsprechenden Nebenprodukte sind in Abbildung 67 gezeigt. Neben den Strukturformeln sind die m/z -Werte der $[M+H]^+$ -Ionen angegeben. In den MS/MS-Spektren konnten weder die in Abbildung 67 gezeigten m/z -Werte noch die m/z -Werte einiger Fragmente dieser Verbindungen beobachtet werden.

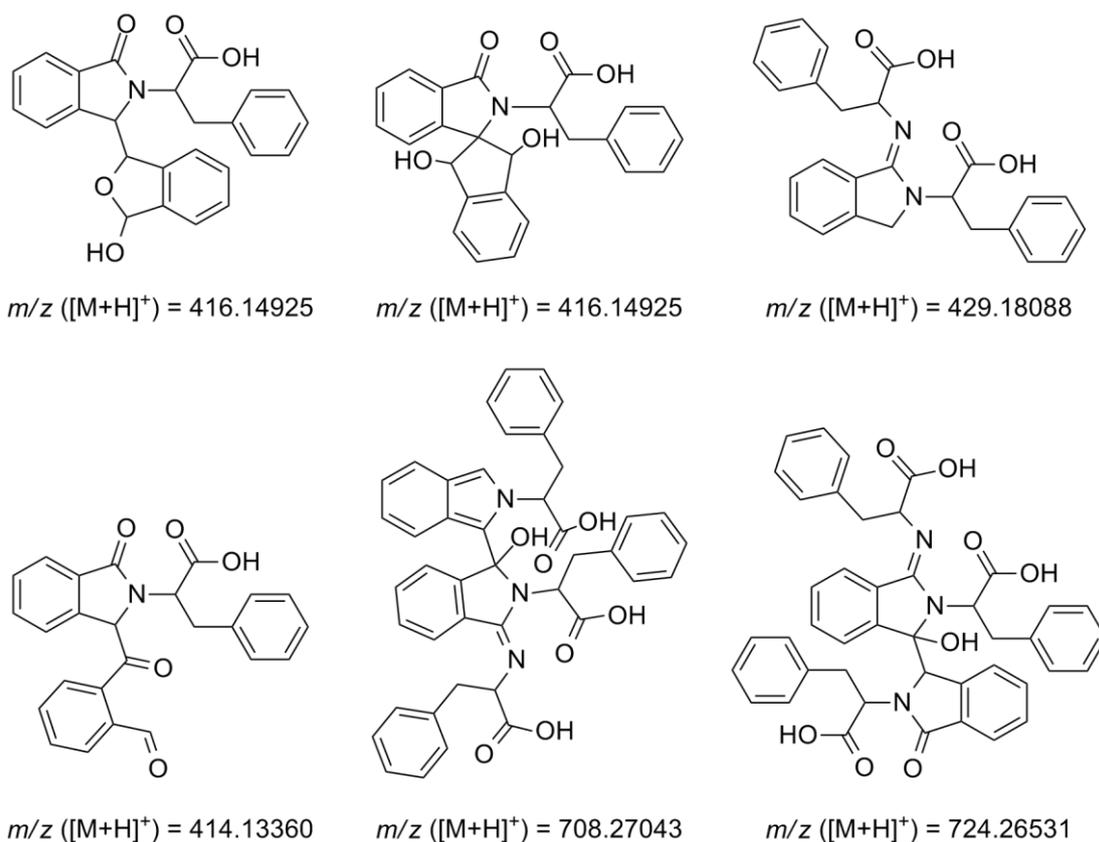
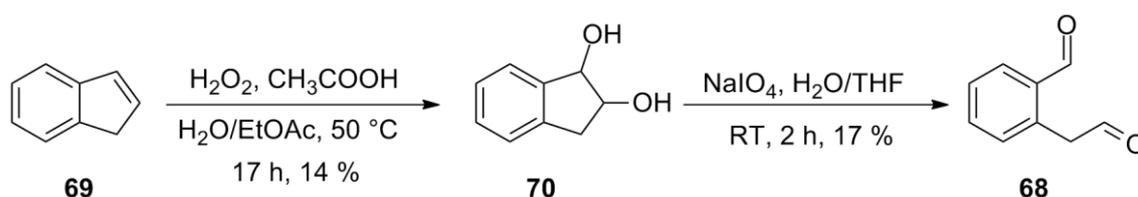


Abbildung 67. Entsprechende Nebenprodukte der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin, die *Klima et al.* für die Reaktion zwischen OPA und 2-Aminoethanol isolierten.^[137]

3.4.4 Untersuchung der Reaktion mit einem OPA-Analogen

Ausgehend von den bereits postulierten Mechanismen tritt das Imin (vgl. **I**, Schema 8) als Zwischenprodukt der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin auf.^[131,135] Aus diesem Grund wurde versucht die Bildung dieses anhand des um eine CH₂-Gruppe verlängerten Analogons von OPA (Homo-OPA, **68**) zu verfolgen. Aufgrund der zusätzlichen CH₂-Gruppe wurden die elektronischen Eigenschaften der zweiten Carbonylfunktion verändert, wobei die Weiterreaktion zur cyclischen Verbindung langsamer ablaufen und somit besser verfolgbar sein sollte.

Zur Synthese von **68** wurde Inden (**69**) unter Verwendung von Persäure in das Diol **70** überführt, das durch anschließende Periodatspaltung zum Homo-OPA (**68**) geöffnet wurde (Schema 16).



Schema 16. Synthese des CH₂-verlängerten Analogons **68** von OPA über Diolbildung mit Persäure und anschließender Periodatspaltung.

Zunächst wurde Inden (**69**) in Anwesenheit von einem fünffachen Überschuss an Wasserstoffperoxid und Essigsäure in einem Wasser-Ethylacetat-Gemisch (1:1, v/v) bei 50 °C für 17 Stunden erhitzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Diol **70** als farbloser Feststoff und in einer Ausbeute von 14 % erhalten werden. Die durchgeführte Analytik in Form von ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie stimmt mit den in der Literatur publizierten Daten überein.^[155,156] Im zweiten Syntheseschritt wurde das Diol **70** in Tetrahydrofuran (THF) vorgelegt und eine wässrige Lösung von Natriumperiodat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Extraktion wurde das erhaltene Rohprodukt, wie in der Literatur beschrieben, erneut in Dichlormethan aufgenommen und über Nacht über Magnesiumsulfat gerührt.^[156] Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte Homo-OPA **68** als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 17 % erhalten werden. In Abbildung 68 sind die erhaltenen Elektropherogramme der Reaktion zwischen Homo-OPA und Phenylalanin in drei unterschiedlichen Puffersystemen dargestellt.

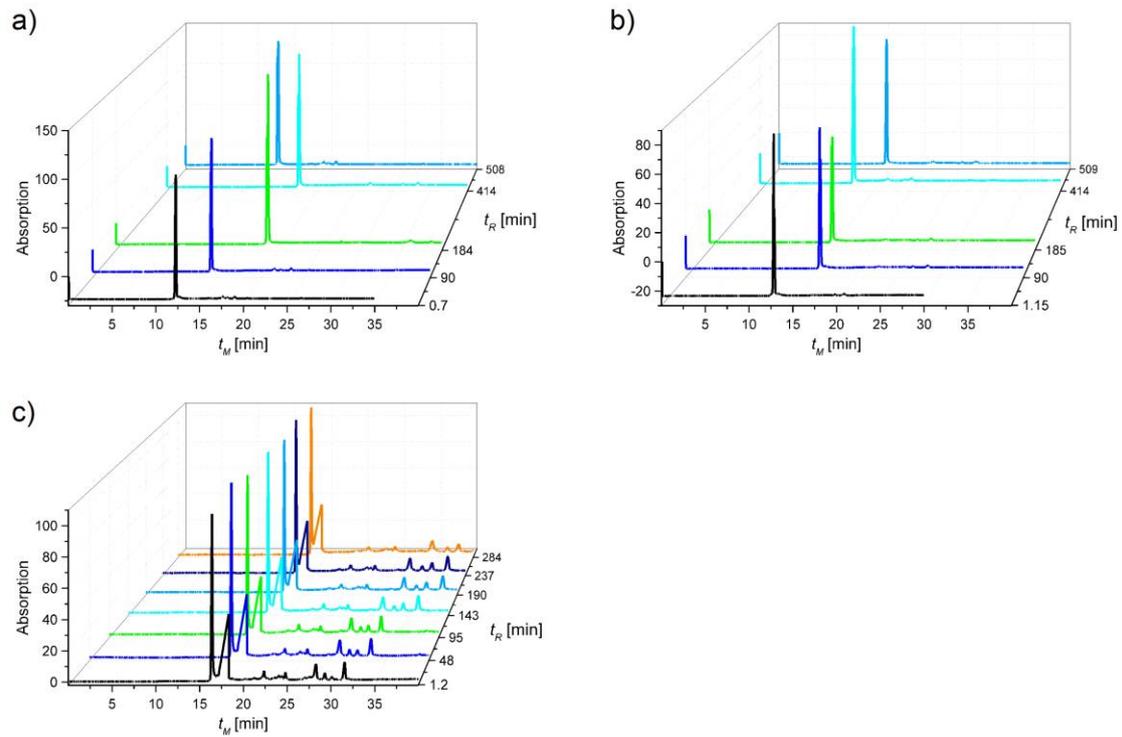


Abbildung 68. Elektrochromatogramme der *off-column* Experimente der Reaktion zwischen Homo-OPA (68) und Phenylalanin mit steigender Reaktionszeit bei unterschiedlichen pH-Werten (a) pH 1.4, b) pH 4.0, c) pH 12.5).

Es ist deutlich erkennbar, dass sich auch bei dieser Reaktion bereits nach einer Minute mehrere Verbindungen mit unterschiedlichen effektiven elektrophoretischen Mobilitäten bilden. Diese wurden nicht näher untersucht, da die Experimente eigentlich zur Identifizierung des Imins dienen sollten. Die Identifizierung stellte sich aufgrund mehrerer gebildeter Produkte als schwierig heraus und wurde verworfen.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung des Imins stellt die Verfolgung der Umsetzung von Benzaldehyd mit Phenylalanin dar. Die erhaltenen Elektropherogramme sind in Abbildung 69 dargestellt.

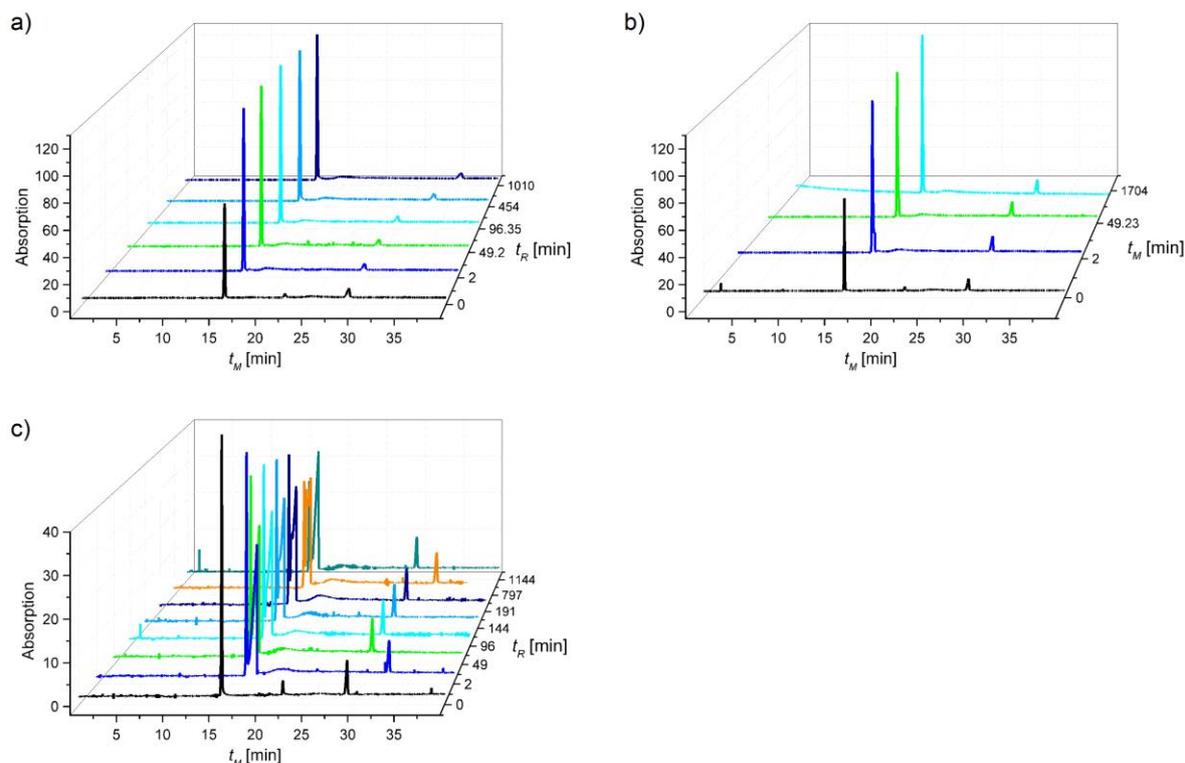


Abbildung 69. Elektropherogramme der *off-column* Experimente der Reaktion zwischen Benzaldehyd und Phenylalanin in Abhängigkeit der steigenden Reaktionszeit bei unterschiedlichen pH-Werten (a pH 4.0, b pH 7.0, c pH 10.8).

Wie Abbildung 69 zeigt, konnten keine zusätzliche Spezies im Vergleich zu den Elektropherogrammen von reinem Benzaldehyd (jeweils das schwarze Elektropherogramm) identifiziert werden. Das lässt darauf schließen, dass die Bildung des Imins sehr schnell erfolgen muss, wie bereits von *Kulla et al.* beschrieben wurde.^[136] Zudem kommt es durch Vorliegen von Wasser in hoher Konzentration zu einer raschen Hydrolyse des gebildeten Imins. Folglich wird das Gleichgewicht, das der Iminbildung zugrunde liegt, weit auf die Seite der Edukte (in diesem Fall Benzaldehyd, Phenylalanin) verschoben und das Imin tritt nur in sehr geringen Konzentrationen auf.

3.4.5 Einfluss des Verhältnisses der eingesetzten Reaktanden auf die Reaktion

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Produktbildung auf die eingesetzten Äquivalente der Reaktanden untersucht. Der Konzentrationsbereich sowohl für OPA als auch für Phenylalanin lag zwischen 10 und 45 mM. Die Untersuchungen wurden unter Verwendung identischer Puffersysteme durchgeführt, die bereits bei den CE-MS/MS-Experimenten zum Einsatz gekommen sind (20 mM Borat-Puffer pH 9.3, 40 mM LiOH-Puffer pH 12.5). Hinzukommend wurden vier hauptsächlich gebildete Nebenprodukte hinsichtlich ihrer Bildung in Abhängigkeit von Reaktandenverhältnis und Reaktionsmedium untersucht.

Üblicherweise wird bei dieser Art von Experimenten auf den Zusatz eines internen Standards zurückgegriffen, um eventuelle Schwankungen in den injizierten Volumina korrigieren zu können und die Peakflächen der Substanzen auf die Peakfläche des internen Standards zu referenzieren. Diese internen Standards müssen allerdings UV-aktiv sein. Zudem muss deren effektive elektrophoretische Mobilität zwingend von der der Reaktanden und jeglicher Produkte, Nebenprodukte beziehungsweise Intermediate verschieden sein. Dies wäre mit $\mu_{eff} > 0 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ umsetzbar. Jedoch muss der interne Standard auch gegenüber der eingesetzten und entstehenden Nucleophile und Elektrophile unreaktiv sein. Der hier benötigte interne Standard muss zwingend eine effektive elektrophoretische Mobilität von $\mu \neq 0 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ besitzen, da er andernfalls mit OPA interferieren würde. Folglich muss der interne Standard eine Ladung tragen. Dies lässt sich nur schwer mit der chemischen Inertheit gegenüber den Verbindungen im Reaktionsgemisch vereinbaren. Hinzukommend ist die exakte chemische Struktur sowohl einiger Nebenprodukte, als auch deren Intermediate bislang unbekannt. Aus diesem Grund wurde auf den Einsatz eines internen Standards verzichtet und zum Vergleich der Experimente auf den prozentualen Anteil der Peakflächen Bezug genommen.

In Abbildung 70 sind die relativen Peakflächen des Produktes **58** in Abhängigkeit von der eingesetzten Äquivalente der Reaktanden und des Reaktionsmediums dargestellt. Abbildung 70a zeigt die relativen Peakflächen nach einer Minute Reaktionszeit, Abbildung 70b nach 50 Minuten.

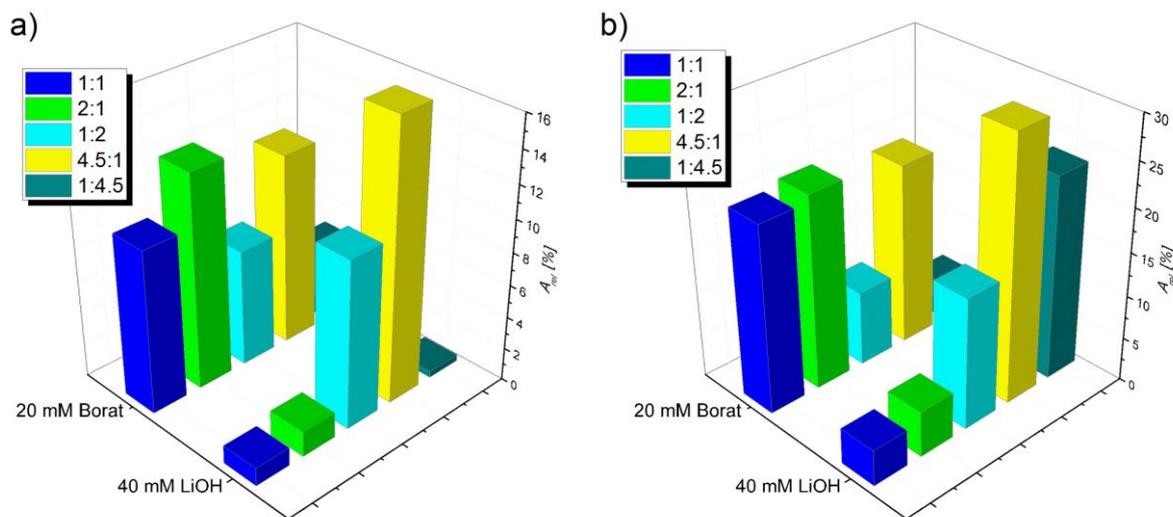


Abbildung 70. Relative Peakflächen des Produktes 58 in Abhängigkeit von der eingesetzten Äquivalente der Reaktanden (erstgenannte Zahl steht für die eingesetzten Äquivalente von OPA, zweitgenannte für die von Phenylalanin) sowie des Reaktionsmediums (a) nach einer Minute Reaktionszeit, b) nach 50 Minuten Reaktionszeit).

Wird die Reaktion in Borat-Puffer durchgeführt, so lässt sich eine klare Abhängigkeit des gebildeten Produkts von den eingesetzten Äquivalenten an OPA erkennen. Beim Zusatz eines Überschusses an OPA (Abbildung 70 grün, gelb) kommt es zur vermehrten Bildung des Produktes **58**, wobei dieser Effekt nach einer Reaktionszeit von einer Minute deutlich ausgeprägter ist als nach 50 Minuten. Dieses Phänomen, dass ein Überschuss an OPA zu erhöhter Bildung von **58** kommt, beschrieben schon *Taga et al.*^[130] Dies wurde von *Taga et al.* durch die schneller ablaufende Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin beim Zusatz von OPA im Überschuss erklärt.

Der Einsatz von Phenylalanin im Überschuss (Abbildung 70 cyan, dunkelcyan) bewirkt eine geringere Bildung von **58** als beim Durchführen der Reaktion mit äquimolaren Mengen (Abbildung 70 blau).

Wird LiOH als Reaktionsmedium gewählt, kann keine eindeutige Abhängigkeit zwischen den Mengen an gebildetem Produkt und den eingesetzten Äquivalenten der Reaktanden festgestellt werden. Beim Einsatz von OPA in großem Überschuss (4.5:1, Abbildung 70 gelb) wird **58** sehr schnell in großen Mengen, relativ zum Reaktionsgemisch gesehen, gebildet. Dies kann auch bei Verwendung von zwei Äquivalenten Phenylalanin und einem Äquivalent OPA beobachtet werden (Abbildung 70 cyan).

Durch Vergleich der in Abbildung 70 gezeigten Diagramme ist deutlich erkennbar, dass die erhöhte Produktbildung im Borat-Puffer unter Einsatz von OPA im Überschuss sich nach 50 Minuten der gebildeten Menge an **58** im äquimolaren Ansatz anpasst, wobei die Differenz zu den gebildeten Mengen an **58** unter Überschuss von Phenylalanin steigt. Im LiOH-Puffer kommt es zu einem starken Anstieg der relativen Menge an gebildetem Produkt **58**, wenn OPA und Phenylalanin im Verhältnis von 1:4.5 (Abbildung 70 dunkelcyan) eingesetzt werden. Auch nach 50

Minuten Reaktionszeit wurde relativ gesehen die größte Menge an **58** beim Einsatz von OPA in großem Überschuss (4.5:1) beobachtet (Abbildung 70b gelb).

Durch Variation der eingesetzten Äquivalenten der Reaktanden wird nicht nur das Produkt **58** in unterschiedlichen relativen Mengen gebildet, sondern auch einige Nebenprodukte. Aus diesem Grunde wurden die relativen Peakflächen vier hauptsächlich gebildeter Nebenprodukte untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**64**), 2-Formylbenzoesäure (**65**) und das Hemiacetal **62** zum anderen um ein strukturell unbekanntes Nebenprodukt.

In Abbildung 71 sind die relativen Peakflächen eines der gebildeten Nebenprodukte (**62**) der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in LiOH-Puffer in Abhängigkeit der Reaktandenverhältnisse dargestellt. Aufgrund der Co-Elution von **62** mit einem weiteren nur in Borat-Puffer entstehenden Nebenprodukt wurde auf seine Darstellung für die Reaktion in Borat-Puffer verzichtet, da aus diesem Grund die Peakfläche des reinen Hemiacetals mit $\mu_{eff} = -15.5 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nicht bestimmt werden konnte.

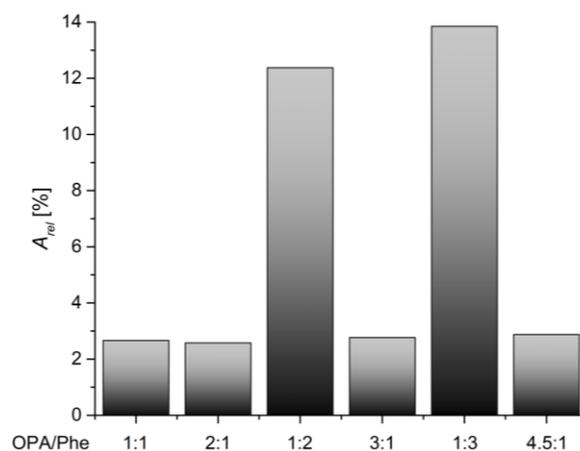


Abbildung 71. Relative Peakflächen des Hemiacetals **62** mit $\mu_{eff} = -15.5 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in Abhängigkeit der eingesetzten Verhältnisse der Reaktanden bei der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in 40 mM LiOH-Puffer (pH 12.5).

Wie aus Abbildung 71 ersichtlich, kann eine deutliche Abhängigkeit der Bildung von **62** von den Reaktandenverhältnissen ausgemacht werden. **62** wird vermehrt bei einem Überschuss an Phenylalanin gebildet (OPA/Phe 1:2, 1:3). Dies lässt darauf schließen, dass diese Verbindung aus mehreren Phenylalanineinheiten aufgebaut ist und somit die Zuordnung der Struktur zu diesem Peak bekräftigt wird. Der Einsatz von OPA im Überschuss verändert die relative Menge an gebildetem Nebenprodukt nur minimal.

In Abbildung 72 sind die relativen Peakflächen des Nebenprodukts **NP1** mit effektiver elektrophoretischer Mobilität von $-22.7 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin nach einer Reaktionszeit von einer Minute in Abhängigkeit der eingesetzten Verhältnisse der Reaktanden in Borat- als auch LiOH-Puffer gezeigt. In letztgenanntem Puffersystem wird **NP1** nur in Anwesenheit von OPA in großem Überschuss gebildet (OPA/Phe 3:1 gelb, 4.5:1 dunkelcyan). Die relative Menge dieses Nebenproduktes im Reaktionsgemisch bleibt dabei bei steigender OPA-Konzentration (von 3:1 auf 4.5:1; von Abbildung 72 gelb zu dunkelcyan) nahezu konstant. Wird die Bildung im Borat-Puffer betrachtet, so wird relativ gesehen am meisten von **NP1** beim Mischen von OPA und Phenylalanin im Verhältnis von 1:2 gebildet (Abbildung 72 cyan). Ein Überschuss von OPA führt, wie aus Abbildung 72 ersichtlich, zu einem geringeren prozentualen Anteil des Nebenproduktes **NP1** am Reaktionsgemisch. Dieser Effekt ist bei größer werdendem OPA-Überschuss stärker ausgeprägt.

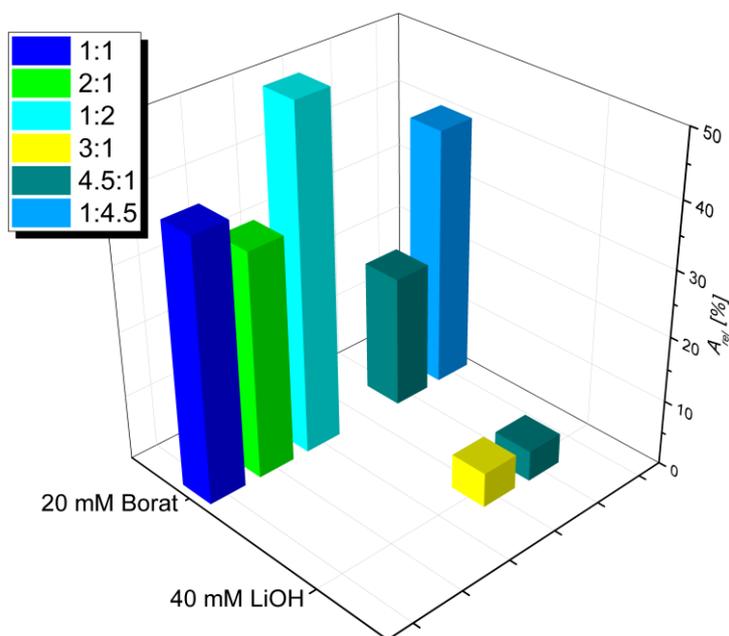


Abbildung 72. Relative Peakflächen des Nebenprodukts NP1 mit einer effektiven elektrophoretischen Mobilität von $-22.7 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in Abhängigkeit der eingesetzten Verhältnisse der Reaktanden in verschiedenen Puffersystemen.

Da keine Aussagen über die exakten Mengen, sondern nur über die prozentualen Anteile der Peakfläche des gebildeten Nebenprodukts gemacht werden können, kann das unterschiedliche Bildungsverhalten von **NP1** mit $\mu_{eff} = -22.7 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auch auf die verschiedenen Zusammensetzungen der Reaktionsgemische zurückgeführt werden, sodass die absoluten Konzentrationen identisch sein können, während die prozentualen Anteile im Reaktionsgemisch sich jedoch unterscheiden.

In Abbildung 73 sind die prozentualen Peakflächen der Nebenprodukte 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**64**, links) und 2-Formylbenzoesäure (**65**, rechts) mit geringster effektiver elektrophoretischer Mobilität in unterschiedlichen Puffersystemen und in Abhängigkeit von dem Verhältnis der eingesetzten Reaktanden dargestellt.

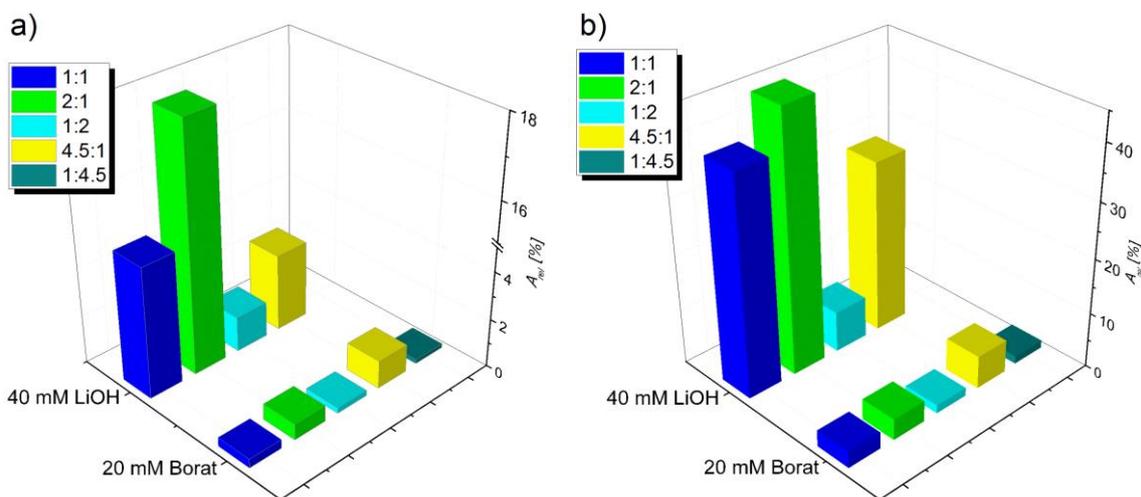


Abbildung 73. Relative Peakflächen zweier Nebenprodukte der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin bei unterschiedlichen Verhältnissen der beiden Reaktanden und in verschiedenen Puffersystemen (a) **64** mit $\mu_{eff} = -25.3 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, b) **65** mit $\mu_{eff} = -27.8 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Aus der graphischen Darstellung ist klar erkennbar, dass die Nebenprodukte **64** und **65** zu einem größeren Prozentsatz bei der Reaktion von OPA und Phenylalanin im LiOH-Puffer gebildet werden als beim Durchführen derselben Reaktion in Borat-Puffer. Abbildung 73a zeigt die relativen Peakflächen von **64** ($\mu_{eff} = -25.3 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$), die bei der Reaktion in Borat-Puffer nur etwa 1 % der gesamten Peakflächen der entstandenen Verbindungen und nicht umgesetzten Reaktanden ausmacht, wobei der höchste Wert bei einem OPA/Phenylalanin-Verhältnis von 4.5:1 erreicht wird (1.2 %). Bei höherem pH-Wert (in LiOH-Puffer, pH 12.5) erreicht diese bis zu 18 % (OPA/Phe 2:1, Abbildung 73 grün). Werden OPA und Phenylalanin im Verhältnis 1:1 zur Reaktion gebracht, wird eine relative Peakfläche von 15 % erreicht. Unter Einsatz der Reaktanden im Verhältnis von 1:2 und 4.5:1 werden prozentuale Peakflächenanteile von nur 1.5 % beziehungsweise 3.2 % erreicht. Auch hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass **64** in gleicher Konzentration gebildet wird, jedoch die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches variiert. Indes kann durch einen Vergleich der absoluten Peakflächen, die sich um Faktor 17 unterscheiden, darauf geschlossen werden, dass **64** bei Einsatz der Reaktanden im Verhältnis 2:1 (OPA/Phe) vermehrt gebildet wird.

Gleicherweise verhalten sich die relativen Peakflächen von **65** ($\mu_{eff} = -27.8 \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, Abbildung 73b) in Abhängigkeit von den eingesetzten Reaktandenverhältnissen, wie auch der untersuchten

Puffersysteme zueinander. Allerdings liegen die Werte der prozentualen Peakflächen über denjenigen von **64**. Auch in diesem Fall sind die prozentualen Anteile der Peakflächen unter Verwendung des LiOH-Puffers merklich größer als beim Durchführen der Reaktion in Borat-Puffer. Zudem kann der größte Wert bei dem Einsatz von OPA und Phenylalanin in einem Verhältnis von 2:1 im LiOH-Puffer auf 47 % ermittelt werden. Dies entspricht fast der Hälfte aller Peakflächen der im Reaktionsgemisch enthaltenen UV-aktiven Verbindungen und ist somit ein Hinweis auf die Bildung von **65** in großer Menge.

Der Unterschied der relativen Peakflächen von **64** und **65** zu einander kann auch auf unterschiedliche Absorptionskoeffizienten zurückzuführen sein. Wie bereits erwähnt (Abbildung 62) verfügt 2-Formylbenzoesäure (**65**) um eine signifikant größere Absorption als 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**64**).

In Abbildung 74 sind Aufnahmen der Reaktionslösungen in beiden Puffersystemen (links LiOH-Puffer, rechts Borat-Puffer) dargestellt. Anhand dieser ist durch einen rein optischen Vergleich die Aussage möglich, dass unter Einsatz von unterschiedlichen Äquivalenten der Reaktanden die relative Zusammensetzung des Reaktionsgemisches variiert. Während ein Überschuss an OPA zu einer eher gelblichen Reaktionslösung führt, kommt es durch Einsatz von Phenylalanin im Überschuss zu einer rötlichen bis bräunlichen Färbung derselben, die ein Hinweis auf das Vorhandensein des dunkel gefärbten Polymers ist, das bereits von *DoMinh et al.* beschrieben wurde.^[129]



Abbildung 74. Optischer Vergleich der Reaktionslösungen der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in unterschiedlichen Verhältnissen der Reaktanden, links in LiOH-Puffer, rechts in Borat-Puffer (Verhältnisse in LiOH OPA/Phe: 1:1, 2:1, 1:2, 3:1, 1:3, 4.5:1, 1:4.5; Verhältnisse in Borat OPA/Phe: 1:1, 2:1, 1:2, 4.5:1, 1:4.5).

3.4.6 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion

Da aus oben bereits genannten Gründen auf die Verwendung eines internen Standards verzichtet wurde, konnte keine Kalibrierung der Peakflächen erfolgen. Um trotzdem Zugang zu kinetischen Daten zu erhalten, wurde auf die Auswertung mittels Massenbilanz zurückgegriffen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Peakfläche von OPA zum Zeitpunkt $t = 0$ min der Anfangskonzentration von OPA ($C_{OPA} = 10$ mM) entspricht. Die erste kapillarelektrophoretische Messung wurde zwischen ein und zwei Minuten nach Starten der Reaktion durchgeführt. Die Anfangspeakfläche von OPA wurde durch Extrapolation aus der Auftragung der Peakflächen gegen die Reaktionszeit erhalten. Dadurch kann nun die graphische Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante aus der Auftragung von C_{OPA}^{-1} gegen t erfolgen. In Abbildung 75 ist exemplarisch eine lineare Regression zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante dargestellt.

Aufgrund des schnellen Ablaufens der Reaktion konnten maximal fünf Messpunkte in die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante einfließen, was sich unter Umständen auf die Größe des Fehlers der hier ermittelten Daten auswirken könnte.

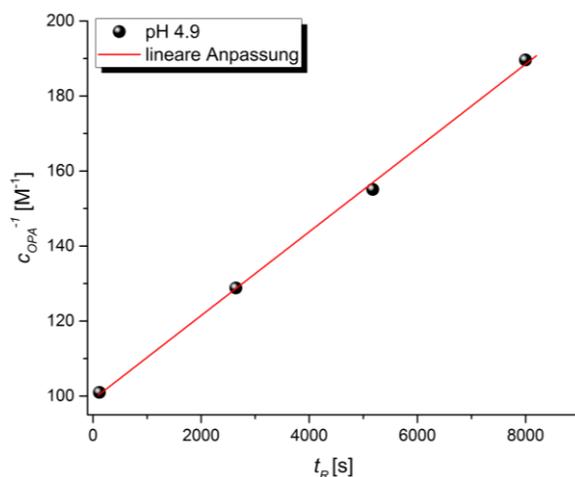


Abbildung 75. Lineare Regression zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin bei pH 4.9 (Güte der linearen Anpassung $R^2 = 0.99885$).

In Abbildung 76 sind die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten graphisch dargestellt. Es ist ein signifikanter Anstieg der Geschwindigkeitskonstante mit steigendem pH-Wert zu erkennen. Ein möglicher Grund könnte die pH-abhängige Bildung des Imins sein, die mit steigendem pH-Wert schneller abläuft.^[136] Grund für die Abnahme der Geschwindigkeitskonstante im stark basischen kann eine vergleichbar schnell ablaufende, eintretende Konkurrenzreaktion sein. Anhand der Auswertung der prozentualen Peakflächen in Abschnitt 3.4.5 kann die Bildung von **64** und **65** als solch eine schnell ablaufende Konkurrenzreaktion identifiziert werden. Dabei muss es sich um die Cannizzaro-Reaktion handeln, da es sich bei **64** und **65** um 2-(Hydroxymethyl)-benzoesäure beziehungsweise 2-Formylbenzoesäure handelt.

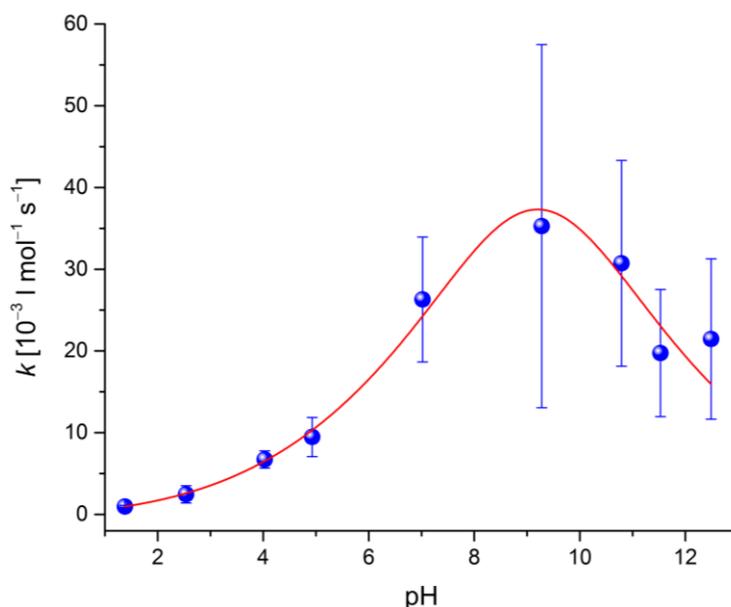


Abbildung 76 . Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in Abhängigkeit des pH-Wertes mit einer Anpassungsfunktion. Die Fehler sind als Standardabweichungen ausgedrückt.

Mit steigender Geschwindigkeitskonstante werden auch die Fehler größer, da die Reaktion bereits nach Aufzeichnung von zwei bis drei Datenpunkten beendet ist. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in 20 mM Borat-Puffer (pH 9.3) ist mit $k_2 = (35.3 \pm 22.2) \cdot 10^{-3} \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ der größte Wert, allerdings auch mit dem größten Fehler.

Hinzukommend ist diese hier ermittelte Geschwindigkeitskonstante (bei pH 9.3) um circa Faktor 40 größer als die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zwischen OPA und Ammoniak bei pH 9.3, die von *Kulla et al.* publiziert wurde.^[136] Jedoch beschrieb dieselbe Gruppe eine weitaus höhere Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion zwischen OPA und 2-Aminoethanol bei pH 8.5 ($k_2 = 1.1 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), wobei bei pH 9.5 die Reaktion zu schnell ablief, um eine Geschwindigkeitskonstante mit den verwendeten Techniken zu ermitteln.^[136]

Taga et al. konnten für die Reaktion zwischen OPA und L-Phenylalanin in einem ocRCE-Setup Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung mit $k_1 = 3.6 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $k_1 = 8.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ermitteln.^[18,130] Diese stimmen gut mit den Werten in der vorliegenden Arbeit überein. Folglich konnte trotz des Verzichts auf einen internen Standard und somit durch die Anwendung der Massenbilanz die Geschwindigkeitskonstanten in zufriedenstellender Genauigkeit ermittelt werden.

3.4.7 *on-column* Derivatisierungsreaktion

Abschließend wurden *on-column* Experimente durchgeführt, um künftige Derivatisierungen von Aminosäuren im ocRCE Setup realisieren zu können.

Bei der Verwendung von Puffern im basischen pH-Bereich wird ein schneller EOF in Richtung Kathode erhalten und die Aminosäuren werden stärker zurückgehalten als OPA, sodass OPA vor dem hier verwendeten Phenylalanin eluiert wird. Daher wurde Phenylalanin vor OPA injiziert. Bei der *on-column* Untersuchung wurde die EMMA-Methode angewendet (vgl. Abschnitt 1.1.2), wobei sich beide Edukt-Plugs in der Kapillare treffen, überlappen, dabei miteinander reagieren und anschließend voneinander getrennt werden. In Abbildung 77 sind die erhaltenen Elektropherogramme der *on-column* Experimente in Borat-Puffer (20 mM, pH 9.3) mit steigender Kapillar- und somit auch Reaktionstemperatur dargestellt, da laut Literatur wässriger Borat-Puffer als sinnvollstes Reaktionsmedium für die Derivatisierung von Aminosäuren mit OPA befunden wurde.^[153] In pink markiert ist der Produktpeak zu erkennen.

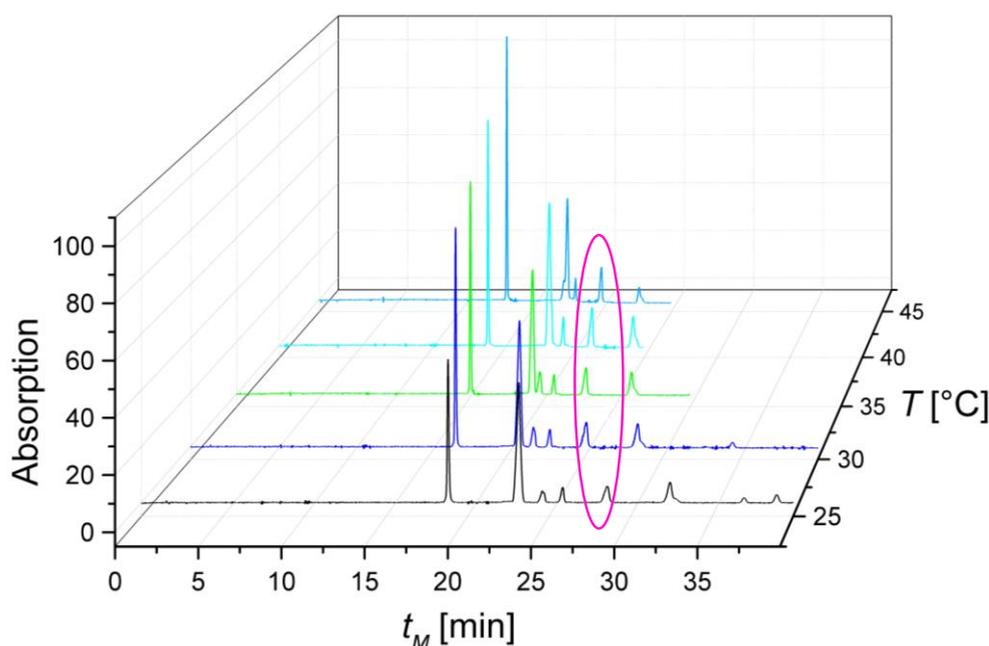


Abbildung 77. Elektropherogramme der ocRCE Experimente der Reaktion zwischen OPA und Phenylalanin in Borat-Puffer (20 mM, pH 9.3) in Abhängigkeit von der Kapillartemperatur (25 bis 45 °C). In pink ist der Produktpeak markiert.

Aus Abbildung 77 ist zu erkennen, dass mit steigender Temperatur die Trenneffizienz abnimmt und so der zweite und dritte Peak bei 40 °C co-eluierten, wobei diese bei 35 °C noch getrennt sind. Bei 45 °C ändert sich die Elutionsreihenfolge und der vormals dritte Peak ist als Schulter des vormals zweiten Peaks zu erkennen. Zusätzlich zum Produktpeak sind weitere Peaks zu erkennen. Mittels Vergleich der UV-Spektren konnten Nebenprodukte identifiziert werden, die auch in den *off-column* Experimenten (Abbildung 61) beobachtet wurden. Einzig der Peak mit der größten

effektiven elektrophoretischen Mobilität, abgesehen von OPA, konnte ausschließlich in den *on-column* Experimenten beobachtet werden. Dieser Peak konnte dem nicht reagierten Phenylalanin durch Vergleichsmessungen und anhand des UV-Spektrums zugeordnet werden. Durch Wechsel des BGEs von Ammoniumacetat auf Borat im Vergleich zu den *off-column* Experimenten verursacht das Phenylalanin unter diesen Bedingungen einen scharfen, klar identifizierbaren Peak.

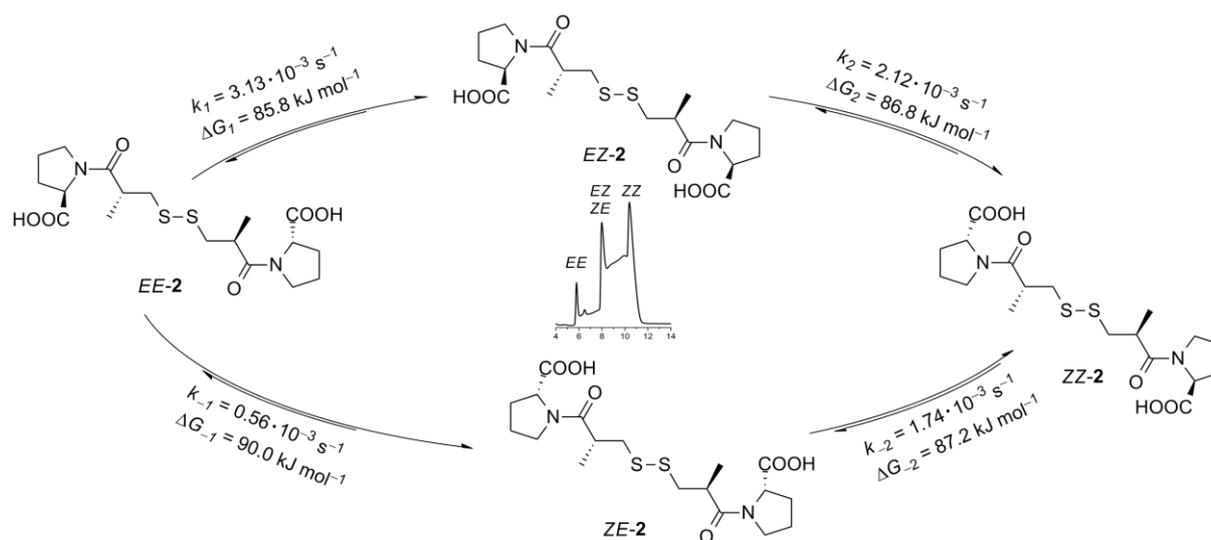
Allerdings kann kein exakter Wert der effektiven elektrophoretischen Mobilität bestimmt werden, da Phenylalanin zunächst nicht durch Elektromigration, sondern durch Anlegen eines Drucks (Injektion von Puffer und OPA) in der Kapillare wandert. Da aus oben schon ausgeführten Gründen auf den Einsatz von einem internen Standard nicht zurückgegriffen werden konnte, kann keine Korrektur der Migrationszeit hinsichtlich der Fortbewegung mittels angelegtem Druck während der Injektion der Pufferplugs beziehungsweise von OPA vorgenommen werden.

ZUSAMMENFASSUNG
UND AUSBLICK

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Dissertationsschrift gliedert sich in vier Abschnitte und befasst sich mit der Bestimmung der Rotationsbarrieren interkonvertierender Stereoisomere sowie der Ermittlung der kritischen Mizellbildungskonzentrationen (CMC). Darüber hinaus wurden zwei Reaktionen höherer Ordnung mittels Kapillarelektrophorese (CE) untersucht. Hierbei handelt es sich zum einen um Ringspannungs-begünstigte Azid-Alkin-Cycloadditionen (SPAAC) und zum anderen um Derivatisierungsreaktionen von Aminosäuren mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA).

Erstmalig konnten die Rotationsbarrieren von drei interkonvertierenden Stereoisomeren des Captoprildisulfids bestimmt werden. Aufgrund der chromatographischen Trennung in achiraler Umgebung konnten die Enantiomere *EZ-2* und *ZE-2* nicht voneinander separiert werden. Bei der Interkonversion des Captoprildisulfids handelt es sich um eine *E/Z*-Isomerisierung der im Molekül vorhandenen Amidbindung (Schema 17).



Schema 17. Übersicht über den Interkonversionsprozess von Captoprildisulfid. Die gegebenen Geschwindigkeitskonstanten und Interkonversionsbarrieren wurden bei 20 °C ermittelt.

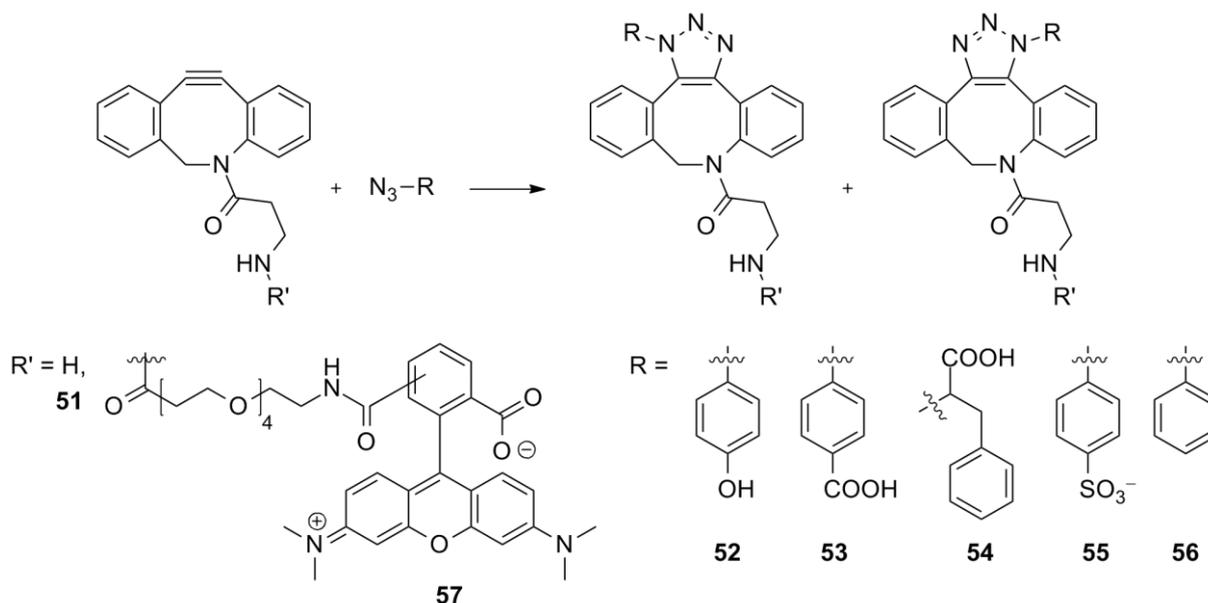
Durch Vergleich mit Literaturdaten konnte das *ZZ*-Isomer als das stabilste Isomer identifiziert werden. Anschließend erfolgte die Simulation der Chromatogramme unter Verwendung von *ChromXWin*. Durch Vergleich der experimentellen Chromatogramme mit den aus der Simulation erhaltenen Chromatogramme konnten die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten und die Rotationsbarrieren dieser Interkonversionsprozesse zu $\Delta G^\ddagger = 85.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ für die Isomerisierung vom *EE*- zum Enantiomerenpaar *EZ/ZE*-Captoprildisulfid und $\Delta G^\ddagger = 86.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ für den Übergang von den Enantiomeren zum *ZZ*-Captoprildisulfid bestimmt werden.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit widmet sich der Ermittlung der CMC von Natriumdodecylsulfat (SDS) in einem MOPS/LiOH-Puffersystem. Diese konnten für unterschiedliche Acetonitril-Konzentrationen (ACN) unter Anwendung diverser Bestimmungsverfahren erhalten werden, wobei nicht nur die Methoden zur Bestimmung der CMC, sondern auch die Datenanalyse variiert wurde. Zunächst wurde die CMC mittels Leitfähigkeitsmessung im CE-Setup bestimmt, wobei die Datenauswertung durch Schnittpunktanalyse und Auswertung der dritten Ableitung erfolgten. Zudem wurde Naphthalin als Markersubstanz der Mizellen eingesetzt und mittels Mobilitätsanalyse die CMC bestimmt. Neben Naphthalin kamen zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Rhodamin 123, Coumarin 153) als Markersubstanzen zum Einsatz. Auch hier erfolgte die CMC-Bestimmung mittels Mobilitätsanalyse. Als letztes Bestimmungsverfahren kam die Verfolgung der elektrophoretischen Mobilität von Systempeaks zum Einsatz. Diese ändert sich, wie auch bei der zuvor angesprochenen Mobilitätsanalyse, mit steigender SDS-Konzentration. Die CMC-Daten der unterschiedlichen Bestimmungsverfahren differieren nur minimal bei identischen ACN-Konzentrationen. Jedoch gestaltet sich ein Vergleich mit Literaturwerten schwierig, da diese nicht konsistent sind und sich um bis zu einem Faktor 5 unterscheiden (vgl. Tabelle 1, Abschnitt 1.1.1). Zudem ist der Einfluss von Faktoren wie Ionenstärke und pH-Wert auf die CMC noch nicht ausreichend untersucht und verstanden, um die hier erhaltenen Werte in die Literaturwerte einzuordnen.

Der dritte Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen von Ringspannungs-begünstigten Alkin-Azid-Cycloadditionsreaktionen (SPAAC-Reaktionen, Schema 18). Hierfür wurden zunächst die pK_a -Werte der Reaktanden in dem zu untersuchenden Wasser-ACN-Gemisch bestimmt und anhand der ermittelten Werte geeignete Reaktionsbedingungen für die nachfolgenden Untersuchungen ausgemacht. Die Reaktionen zwischen Cycloalkin **51** und den Aziden **52–56** wurden bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht sowie deren Geschwindigkeitskonstanten bestimmt. Eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstante mit steigendem pH-Wert konnte auf die Protonierung des Cycloalkins **51** zurückgeführt werden. Für die Reaktion zwischen Cycloalkin **51** und Phenylalaninazid (**54**) wurden die Aktivierungsparameter der Reaktion sowohl bei niedrigem pH-Wert, bei dem das Cycloalkin ausschließlich in protonierter Form vorliegt, als auch bei hohem pH-Wert, bei dem das vollständig dissoziierte Cycloalkin vorliegt, bestimmt und die erhaltenen Werte konnten mit quantenchemischen Untersuchungen verglichen werden.

Anschließend wurde der Einfluss des Mizellenbildners SDS auf die Edukte der Reaktion untersucht und die dadurch resultierende Änderung der Reaktionskinetik durch Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten analysiert. Hierbei zeigte sich, dass es unter Verwendung von zwei hydrophoben Edukten bei Erhöhung der SDS-Konzentration zu einer Beschleunigung der Reaktion kommt, da diese bevorzugt in das hydrophobe Mizelleninnere eingelagert werden und somit die lokale Reaktandenkonzentration in dieser gebildeten Reaktionskammer erhöht ist, was letztendlich zu der beobachteten Beschleunigung führt. Folglich führt eine steigende SDS-

Konzentration zu dem Reaktionsgemisch eines hydrophoben und eines hydrophilen Edukts zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, da aus der Inkorporation des hydrophoben Edukts in das Mizelleninnere und der Verbleib des hydrophilen Edukts in wässriger Lösung eine räumliche Trennung der Reaktanden folgt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Beschleunigung der Reaktion tatsächlich auf die Mizellen-bildende Eigenschaft von SDS zurückzuführen ist und nicht auf der gleichzeitig stattfindenden Erhöhung der Ionenstärke der Reaktionslösung beruht.

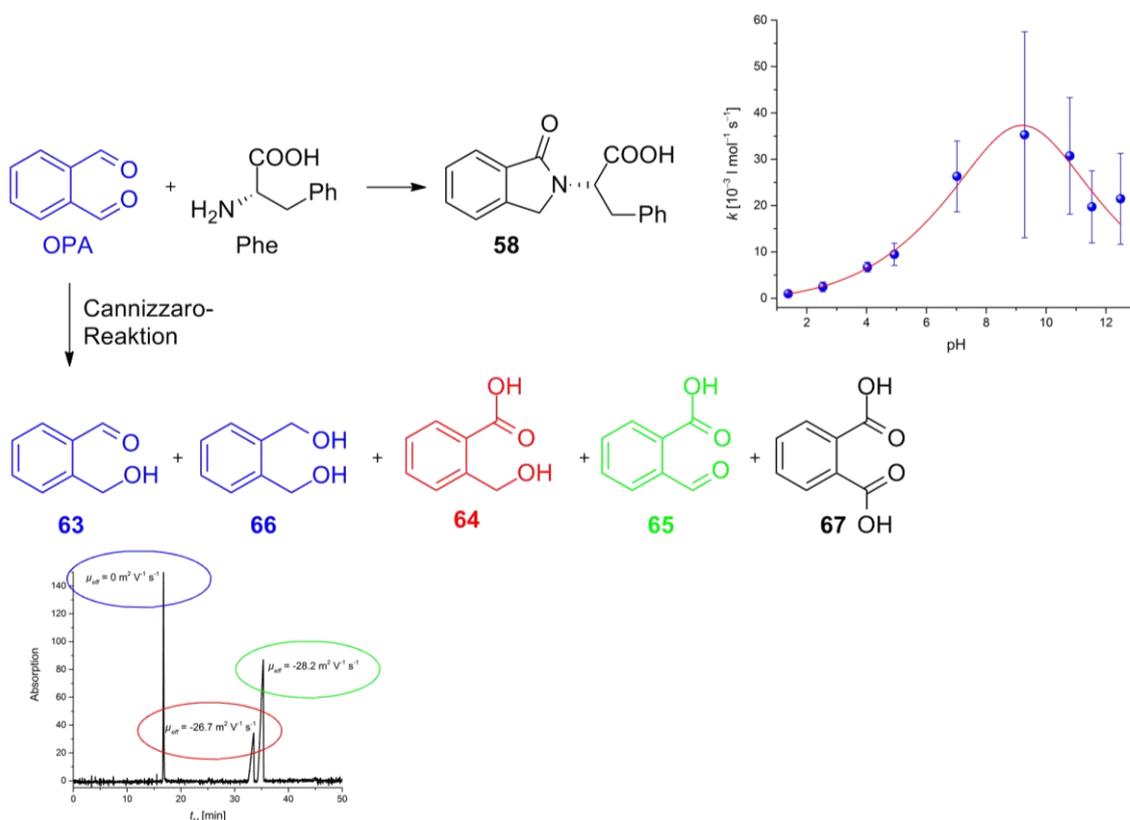


Schema 18. Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SPAAC-Reaktionen.

Aufgrund der starken Wechselwirkungen zwischen SDS und den Edukten konnte auf den Einsatz des cytotoxischen Acetonitrils als Co-Solvens verzichtet werden, was einen künftigen Einsatz in biologischen *in vivo* Markierungsexperimenten ermöglicht. Abschließend konnte anhand von zwei SPAAC-Reaktion gezeigt werden, dass es möglich ist, solche Reaktionen mittels *on-column* Reaktionskapillarelektrophorese (ocrCE) durchzuführen und zu untersuchen, wobei die Mischung der Reaktanden zum einen durch Elektromigration und zum anderen durch Diffusion erfolgte. Die Durchführung dieser Reaktionen mittels ocrCE bildet die Grundlage für die *on-column* Markierung von Biomolekülen, wobei Markierung, Separation und Detektion innerhalb der Kapillare vonstattengehen.

Der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit behandelt die Untersuchungen zur Derivatisierung von Aminosäuren mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) am Beispiel von L-Phenylalanin (Schema 19). Zu Beginn wurde mit Phthalimidon-Derivat **58** das zu erwartende Hauptprodukt als Vergleichssubstanz erfolgreich synthetisiert und charakterisiert. In *off-column*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der gebildeten Nebenprodukte pH-abhängig ist. So kommt es im

Sauren nur in sehr geringen Mengen zur Bildung von Nebenprodukte. Unter neutralen und basischen Bedingungen konnten weitaus mehr Nebenprodukte detektiert werden. Durch Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten bei unterschiedlichen pH-Werten konnte eine pH-Abhängigkeit der Reaktionskinetik erhalten werden.



Schema 19. Übersicht der Derivatisierungsreaktion von L-Phenylalanin mit OPA sowie Änderung der Geschwindigkeitskonstante in Abhängigkeit des pH-Werts und der Konkurrenzreaktion mit allen möglichen Produkten (Cannizzaro-Reaktion) sowie ein Elektropherogramm einer OPA-Lösung in 40 mM LiOH nach fünfwöchiger Lagerung bei 4 °C, wobei die unterschiedlichen entstandenen Spezies entsprechend farblich den Peaks zugeordnet wurden.

Anhand von CE-MS/MS-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei einigen Nebenprodukten um höhere Kondensationsprodukte mit bis zu $m/z = 692$ handelt. Somit konnte die Aussage von *DoMinh et al.* und *Klima et al.* bestätigt werden, die von der Bildung makromolekularer Nebenprodukte berichteten.^[129,137] Außerdem konnten Produkte einer stattgefundenen Cannizzaro-Reaktion identifiziert werden, die im stark basischen als Konkurrenzreaktion abläuft (vgl. Schema 19). Wie von *Kulla et al.* publiziert,^[136] verläuft die Bildung des Imins aus OPA und Phenylalanin zu schnell, um sie mit den hier verwendeten Methoden verfolgen zu können. Auch durch Variation der elektronischen Eigenschaften des Aldehyds, durch Einführen einer CH_2 -Gruppe oder Verzicht auf die zweite Carbonylgruppe (Homo-OPA, Benzaldehyd) konnte die Bildung des Imins nicht verfolgt werden.

Im Anschluss wurde der Einfluss des Reaktandenverhältnisses auf die Reaktion in zwei unterschiedlichen Puffersystemen untersucht. Hierbei wurde auf die Auswertung der prozentualen Peakflächen zurückgegriffen, da der Einsatz eines internen Standards nicht möglich gewesen ist. Diese Untersuchungen ergaben, dass innerhalb von 50 Minuten prozentual gesehen weniger Produkt bei Verwendung eines Phenylalanin-Überschusses in Borat-Puffer gebildet wurde als bei einem OPA-Überschuss im selben Puffersystem. Grund hierfür kann die in Gegenwart eines Überschusses von OPA gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit sein, wie es bereits von *Taga et al.* publiziert wurde.^[130] Abgesehen von dem Produkt wurden die prozentualen Peakflächen von vier hauptsächlich gebildeten Nebenprodukten untersucht. Bei diesen Nebenprodukten handelt es sich um 2-(Hydroxymethyl)benzoesäure (**64**) und 2-Formylbenzoesäure (**65**), die in Schema 19 dargestellt sind sowie um das Hemiacetal **62** und ein bislang strukturell unbekanntes Nebenprodukt (**NP1**). Die Bildung von **62** zeigt eine deutliche Abhängigkeit von den eingesetzten Eduktverhältnissen. Eine erhöhte Zugabe an OPA zum Reaktionsgemisch zieht kaum Änderungen der prozentualen Peakfläche von **62** nach sich. Jedoch erhöht sich dessen prozentualer Anteil beträchtlich, wenn Phenylalanin im Überschuss eingesetzt wird, was den Rückschluss zulässt, dass dieses Nebenprodukt aus mehreren Phenylalanineinheiten aufgebaut sein muss, was durch die Durchführung von CE-MS/MS-Experimenten und die Zuordnung dieses Peaks zur Verbindung **62** bewiesen werden konnte. Die Bildung von **NP1** kann lediglich unter Verwendung des Borat-Puffers als Reaktionsmedium beobachtet werden, während es in LiOH-Puffer nur in Anwesenheit eines großen OPA-Überschusses (OPA/Phe > 3:1) identifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu kommt es im Borat-Puffer bei Verwendung eines Phenylalanin-Überschusses zur vermehrten Bildung von **NP1**, der allerdings nicht so stark ins Gewicht fällt, wie bei **62** beschrieben. Dies lässt, wie bereits bei **62** einen Rückschluss auf das Vorhandensein von mehreren Phenylalanineinheiten in **NP1** zu. Die Bildung von **64** und **65** in Abhängigkeit der eingesetzten Reaktandenverhältnisse weisen ähnliche Trends auf (OPA/Phe 2:1 > 1:1 > 4.5:1 > 1:2 für LiOH, OPA/Phe 4.5:1 > 2:1 > 1:1 > 1:2 für Borat). Jedoch werden **64** und **65** nur zu geringen Anteilen in Borat-Puffer gebildet (maximal 1.2 % **64**, maximal 6.0 % **65**), was mit dem langsameren Ablauf der Cannizzaro-Reaktion im schwach basischen erklärt werden kann.

Zudem gelang es, Phenylalanin in einem oCRCE-Setup in der Kapillare zu derivatisieren und das dabei entstandene Phthalimidon-Derivat eindeutig zu identifizieren. Diese Erkenntnisse können direkt auf die Derivatisierung von weiteren Aminosäuren und Aminen übertragen werden, wodurch diese Derivatisierungen schneller, ressourcenschonender und auch mit geringerem apparativen Aufwand durchgeführt werden können. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Reaktion von OPA mit Phenylalanin um eine sehr komplexe und pH-abhängige Reaktion handelt. Aufgrund der Komplexität müssen weitere Untersuchungen in Hinblick auf den Einfluss zusätzlicher Faktoren, wie beispielsweise die Temperatur und die Ionenstärke des eingesetzten Puffers, erfolgen.

EXPERIMENTELLER TEIL

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Angaben

Chemikalien und Lösungsmittel

Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders erwähnt, von der Chemikalienausgabe der Universität Heidelberg bezogen (*Sigma Aldrich* (München, Deutschland), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland)) oder direkt bei den Firmen *Acros* (Geel, Belgien), *ABCR* (Karlsruhe, Deutschland), *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland), *Sigma Aldrich* (München, Deutschland), *TCI* (Tokio, Japan) oder *VWR* (Radnor, Pennsylvania, USA) gekauft und ohne weitere Aufarbeitung verwendet. Die verwendeten absoluten Lösungsmittel THF, Dichlormethan, Diethylether, Acetonitril und Toluol wurden der Trocknungsapparatur *MB SPS-800* (*MBRAUN*, Garching, Deutschland) mit Trocknungssäulen der Universität Heidelberg entnommen. Deuterierte Lösungsmittel für NMR-Spektren wurden über *Sigma Aldrich* (München, Deutschland) bezogen. Alle wässrigen Lösungen für die kapillarelektrophoretischen Messungen wurden mit $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ Reinstwasser aus einem *Millipore-Q* System (*Millipore*, Marlborough, Massachusetts, USA) beziehungsweise einer *VWR Purity PU 15* (*VWR*, Radnor, Pennsylvania, USA) hergestellt.

Kapillarelektrophorese

Die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wurden auf einem *Agilent 3DCE* System (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt, welches mit einem Diodenarraydetektor (DAD) ausgestattet war. Zur Auswertung der erhaltenen Elektropherogramme kam das Programm *DCXplorer MMX Version 1.0.0.0*^[157] und *Chemstation* von *Agilent* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland) zum Einsatz. *Fused-silica* Kapillaren für kapillarelektrophoretische Messungen mit einem Innendurchmesser von $50 \mu\text{m}$ wurden von *Microquartz* (München, Deutschland) bezogen.

Säulenchromatographie

Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel (Porengröße 60 \AA , 70-230 Mesh, $63\text{-}200 \mu\text{m}$) der Firma *Sigma Aldrich* (München, Germany) verwendet. Die Säulen wurden in Suspension gepackt.

Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographie wurde mit *Polygram® Sil G/UV 254* Fertigfolien mit Fluoreszenzindikator der Firma *Macherey Nagel GmbH & Co. KG* (Düren, Germany) durchgeführt. Substanzen

wurden durch Fluoreszenzlöschung während Bestrahlung mit ultraviolettem Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm detektiert oder durch Anfärben mit KMnO_4 , PMA, Ninhydrin oder Vanilin sichtbar gemacht.

Kernspinresonanz (NMR)

^1H -NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur auf Geräten der Firma *Bruker* aufgenommen. Es standen folgende Modelle zur Verfügung: *Bruker Avance III 300* (300.51 MHz), *Bruker Avance DRX 300* (300.13 MHz), *Bruker Avance III 400* (400.33 MHz), *Bruker Avance III 500* (500.13 MHz) und *Bruker Avance III 600* (600.24 MHz; *Bruker*, Billerica, MA, USA). Die Kalibrierung wurde durch die jeweiligen Lösungsmittelsignale vorgenommen.^[158] Chemische Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben, Kopplungskonstanten J in Hz. Zur Beschreibung der Multiplizitäten der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet.

Tabelle 10: NMR-Bezeichnungen.

s	Singulett
bs	Breites Signal
d	Dublett
t	Triplett
q	Quartett
m	Multiplett

Außerdem wurden Kombinationen der in Tabelle 10 aufgeführten Abkürzungen benutzt. ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei Raumtemperatur auf folgenden Geräten protonenentkoppelt aufgenommen: *Bruker Avance III 300* (75.567 MHz), *Bruker Avance DRX 300* (75.471 MHz), *Bruker Avance III 400* (100.66 MHz), *Bruker Avance III 500* (125.76 MHz) und *Bruker Avance III 600* (150.94 MHz; *Bruker*, Billerica, MA, USA). Zur Kalibrierung der Spektren dienten Lösungsmittelsignale der eingesetzten deuterierten Lösungsmittel.^[158] Die Zuordnung der Signale erfolgte auf Grundlage zweidimensionaler Spektren (COSY, HSQC, HMBC).

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren und hoch aufgelöste Massenspektren wurden von den Mitarbeitern der massenspektrometrischen Abteilung am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg unter der Leitung von Herrn Dr. Gross an folgenden Geräten aufgenommen: *Bruker ApexQe hybrid 9.4 T FT-ICR* (*Bruker*, Billerica, MA, USA) und *Finnigan MAT TSQ 700 JEOL JMS-700*

magnetic sector Finnigan MAT, Bremen, Germany). Neben der Ionisationsmethode wurde der Molpeak angegeben.

Röntgenbeugungsexperimente

Röntgenbeugungsexperimente wurden auf einem *Bruker APEX-II_azar area detector* (Bruker, Billerica, MA, USA) mit Mo K α Strahlung ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) durchgeführt.

Software

Die folgenden Softwareprogramme wurden verwendet: *Agilent ^{3D}CE ChemStation Rev.B.01.03* (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), *ChemBioDraw Ultra 12.0* (CambridgeSoft, PerkinElmer, Waltham, USA), *DCXplorer MMX Version 1.0.0.0*,^[157] *ChromXWin VersionMMXIV*, *OriginPro 2015G* und *OriginPro 2016G* (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA), *MassHunter B.07.00* (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), *PeakMaster 5.3*,^[28] *Marvin Sketch Version 15.11.16* (ChemAxon, Budapest, Ungarn).

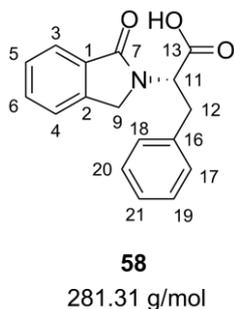
Computerchemische Methoden

Die quantenchemischen Untersuchungen wurden mit dem Programm *Gaussian 09 Revision D.01* der Firma Gaussian Inc. (Wallingford, USA) durchgeführt.

5.2 Synthesen

5.2.1 Derivatisierung von Aminosäuren

5.2.1.1 (S)-2-(1-Oxoisoindolin-2-yl)-3-phenylpropionsäure



L-Phenylalanin (3.69 g, 22.4 mmol, 1.00 eq.) wurde in 270 ml Ethanol und 30.0 ml Wasser vorgelegt. Eine Lösung von *o*-Phthaldialdehyd (OPA, 3.00 g, 22.4 mmol, 1.00 eq.) in 200 ml Ethanol wurde tropfenweise hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt und danach im Vakuum eingengt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das erhaltene Rohprodukt aus heißem Acetonitril umkristallisiert. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten (1.74 g, 6.18 mmol, 28 %). Geeignete Kristalle

zur Durchführung von Röntgenbeugungsuntersuchungen wurden durch langsames Abdampfen einer wässrigen Lösung bei Raumtemperatur erhalten.

¹H-NMR (400.33 MHz, DMSO)

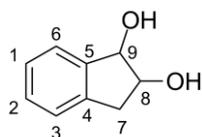
δ = 3.22 (dd, $^2J_{H,H} = 14.7$ Hz, $^3J_{H,H} = 3.4$ Hz, 1H, H-12a), 3.41 (dd, $^2J_{H,H} = 14.5$ Hz, $^3J_{H,H} = 11.4$ Hz, 1H, H-12b), 4.40 (s, 2H, H-9), 5.15 (dd, $^3J_{H,H} = 11.2$ Hz, $^3J_{H,H} = 4.8$ Hz, 1H, H-11), 7.12-7.16 (m, 1H, H-21), 7.20-7.27 (m, 4H, H-17, H-18, H-19, H-20), 7.43-7.47 (m, 1H, H-4), 7.55-7.60 (m, 2H, H-3, H-6), 7.62-7.63 (m, 1H, H-5) ppm.

¹³C-NMR (100.66 MHz, DMSO)

δ = 34.7 (C-12), 47.3 (C-9), 54.8 (C-11), 122.9 (C-5), 123.4 (C-6), 126.5 (C-21), 127.9 (C-4), 128.4 (C-19, C-20), 128.5 (C-17, C-18), 131.5 (C-2), 131.6 (C-3), 137.5 (C-16), 141.9 (C-1), 167.8 (C-7), 171.9 (C-13) ppm.

HR-MS (ESI)

$m/z = 280.0976$ [M-H]⁻, berechnet $m/z = 280.0979$.

5.2.1.2 2,3-Dihydro-1*H*-inden-1,2-diol**70**

150.17 g/mol

Inden (5.00 g, 43.0 mmol, 1.00 eq.) wurde in 100 ml eines Gemischs aus Wasser und Ethylacetat (1:1 v/v) auf 50 °C erhitzt. Nach Erreichen der Reaktions-temperatur wurden Wasserstoffperoxid (9.91 g, 215 mmol, 5.00 eq.) und Ameisensäure (30 %, 20.9 g, 215 mmol, 5.00 eq.) langsam zu getropft und das Gemisch 17 Stunden erhitzt. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit 50.0 ml Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂, PE/EE 8:1, 4:1, 3:1, *R_f* = 0.08 in PE/EE 4:1) konnte das Produkt als farbloser Feststoff erhalten werden (896 mg, 5.97 mmol, 14 %).

¹H-NMR (400.33 MHz, CDCl₃)

δ = 2.95-3.00 (m, 1H, H-7a), 3.12-3.17 (m, 1H, H-7b), 4.51-4.55 (m, 1H, H-8), 5.01 (d, $^3J_{H,H}$ = 4.95 Hz, 1H, H-9), 7.24-7.29 (m, 3H, H-1, H-2, H-3), 7.43-7.45 (m, 1H, H-6) ppm.

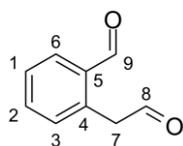
¹³C-NMR (100.66 MHz, CDCl₃)

δ = 38.8 (C-7), 73.5 (C-8), 76.0 (C-9), 125.1 (C-6), 125.4 (C-3), 127.3 (C-2), 128.9 (C-1), 140.2 (C-5), 142.0 (C-4) ppm.

HR-MS (EI⁺)

m/z = 150.0674 [M]⁺, berechnet m/z = 150.0681.

5.2.1.3 2-(2-Oxoethyl)benzaldehyd

**68**

148.16 g/mol

2,3-Dihydro-1*H*-inden-1,2-diol (720 mg, 4.79 mmol, 1.00 eq.) wurde in 26.0 ml THF vorgelegt. Natriumperodat (1.23 g, 5.75 mmol, 1.25 eq.) wurde in 52.0 ml Wasser gelöst und zum Diol gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und im Vakuum eingeeengt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 50.0 ml Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde in 5.00 ml Dichlormethan aufgenommen und über Nacht über Magnesiumsulfat (1.51 g) gerührt. Nach Filtrieren, Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂, PE/EE 8:1, EE, *R_f* = 0.01) wurde das Produkt als gelber Feststoff erhalten (122 mg, 0.82 mmol, 17 %).

¹H-NMR (400.33 MHz, CDCl₃)

δ = 4.16 (s, 2H, H-7), 7.27-7.28 (m, 1H, H-3), 7.52-7.62 (m, 2H, H-1, H-2), 7.84-7.87 (s, 1H, H-6), 9.81 (s, 1H, H-8), 10.06 (s, 1H, H-9) ppm.

¹³C-NMR (100.67 MHz, CDCl₃)

δ = 48.2 (C-7), 128.1 (C-3), 129.0 (C-6), 131.1 (C-1, C-2), 134.0 (C-5), 134.2 (C-4), 193.2 (C-9), 198.2 (C-8) ppm.

HR-MS (ESI⁺)

m/z = 148.0512 [M]⁺, berechnet *m/z* = 148.0524.

5.3 Elektrophoretische und chromatographische Messbedingungen

5.3.1 CE

Neue Kapillaren wurden vor Messungen stets 10 min mit 1 M NaOH und 10 min mit Wasser gespült. Zudem wurde vor jeder Messung 2 min mit Wasser und anschließend 3 min mit Puffer gespült. Die Injektionen erfolgten hydrodynamisch am anodischen Ende der Kapillare. Die Elektropherogramme wurden mit einem Diodenarraydetektor bei unterschiedlichen Wellenlängen ($\lambda = 210 \pm 5, 214 \pm 5, 230 \pm 5, 254 \pm 5$ und 280 ± 5 nm) aufgenommen.

***E/Z*-Isomerisierung von Prolinpeptidbindungen**

Untersuchungen zur Interkonversionsbarriere von *N*-Acetyl-Prolin **50** wurden mit einer *fused-silica* Kapillare durchgeführt, deren Innendurchmesser 50.0 μm betrug. Die Länge der Kapillare bis zum UV-Detektor betrug 40.0 cm (totale Länge 48.5 cm). **50** wurde hydrodynamisch (40 s x 50 mbar) am anodischen Ende der Kapillare injiziert und wurde bei $\lambda = 210$ nm detektiert. Die Temperatur der Kapillare, an die 10 kV angelegt wurde, wurde während der Messung konstant auf 8 °C gehalten.

Bestimmung der CMC

Die kapillarelektrophoretischen Untersuchungen wurden mit einer *fused-silica* Kapillare durchgeführt, deren Innendurchmesser 50.0 μm betrug. Die Länge der Kapillaren wurde variiert. Die Untersuchungen zur kritischen Mizellbildungskonzentration in Abhängigkeit von dem organischen Additiv wurden mit einer Kapillare mit 35.9 cm totaler Länge (27.4 cm effektive Länge) durchgeführt. Die angelegte Spannung betrug 20 kV und die Kapillartemperatur 20 °C.

SPAAC

Die Länge der eingesetzten Kapillare betrug 50.0 cm (totale Länge) beziehungsweise 41.5 cm (effektive Länge). Die Substanzen wurden hydrodynamisch (3 s x 50 mbar) am anodischen Ende der Kapillare aufgebracht und durch Anlegen einer Spannung von 20 kV wurden die Substanzen getrennt. Die Detektionswellenlänge lag bei $\lambda = 214$ nm. Die Temperatur der Kapillare betrug 20 °C. Zur Bestimmung der pK_a -Werte wie auch für die *off-column* Reaktion zwischen PEG-AL und Ph-AL-AZ wurde eine kürzere Kapillare verwendet (35.9 cm beziehungsweise 27.4 cm).

Derivatisierungsreaktion zwischen OPA und Phenylalanin

Bei der Untersuchung der Derivatisierungsreaktion von Aminosäuren mit OPA wurde eine Kapillare mit 80 cm (71.5 cm effektive Länge) totaler Länge verwendet. Die Substratlösungen wurden am anodischen Ende mit einem Druck von 50 mbar in die Kapillare injiziert. Die Injektionszeiten lagen zwischen 2 und 5 s. Die Temperatur betrug 25 °C, die angelegte Spannung

10 kV. Die Elektropherogramme wurden mit einem Diodenarraydetektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 214$ nm aufgenommen.

5.3.2 ocRCE

SPAAC-Reaktion

Für die ocRCE mittels EMMA wurden Kapillaren mit einer totalen Länge von 56.0 cm (effektiver Länge 47.5 cm) verwendet. Die Konzentrationen der Edukte lagen bei 5 mM im Reaktionspuffer. Auch der interne Standard (Benzoessäure) wurde in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt. Die Injektionssequenz war wie folgt: 5 s x 30 mbar Azid, 90 s x 30 mbar Puffer, 5 s x 30 mbar Cycloalkin. Die Separationsspannung lag bei 20 kV.

Für die ocRCE mit Diffusionsmischung der Reaktanden wurde eine Kapillare mit 50.0 cm totaler Länge (41.5 cm effektiver Länge) verwendet. Die Reaktanden beziehungsweise Pufferplugs wurden wie folgt in eine mit β -Alanin/LiOH-Puffer (7 mM/10 mM, 72/28 v/v H₂O/ACN, 10 mM SDS) gefüllte Kapillare injiziert: 20 s x 50 mbar Maleinsäure/LiOH (13 mM/5.5 mM, 72/28 v/v H₂O/ACN, 20 mM SDS), 5 s x 50 mbar Azid **54** (gelöst im Reaktionspuffer), 5 s x 50 mbar PEG-Cycloalkin **57** (gelöst im Reaktionspuffer), 10 s x 50 mbar Maleinsäure/LiOH (13 mM/5.5 mM, 72/28 v/v H₂O/ACN, 20 mM SDS).

Derivatisierung von Aminosäuren

Die ocRCE-Experimente wurden durch Anwendung der EMMA-Methode durchgeführt. Hierbei wurde zunächst Phenylalanin (10 mM in 20 mM Borat-Puffer, 5 s x 50 mbar) gefolgt von einem weiteren Pufferplug (20 mM Borat-Puffer, 5 s x 50 mbar) injiziert. Im Anschluss daran wurde OPA auf die Kapillare aufgebracht (10 mM in 20 mM Borat-Puffer, 5 s x 50 mbar). Zum Schluss wurde ein erneuter Pufferplug injiziert (20 mM Borat-Puffer, 20 s x 50 mbar) und eine Spannung von 10 kV angelegt. Das Temperaturintervall für die Messung lag zwischen 25 °C und 45 °C

5.3.3 DHPLC

E/Z-Isomerisierung

Die DHPLC-Experimente wurden auf einer *LiChrospher*[®] 100 RP-18 (5 μ m) *LiChroCART*[®]250-4 HPLC-Säule von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) mit einer mobilen Phase bestehend aus einem 25 mM Ammoniumacetat-Puffer in 30 % MeOH und 70 % Wasser mit einer eingestellten Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Detektionswellenlänge lag bei $\lambda = 230$ nm.

5.3.4 CE-MS/MS

Ein *Agilent 7100 CE System* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland) wurde mit einem *Agilent 6520 Accurate-Mass Q-TOF MS System* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt unter Bedienung mit der *MassHunter Software* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, Deutschland). Die Länge der Kapillare betrug 55 cm bis zum Massendetektor. Ein UV-Detektor war in diesem Setup nicht miteinbezogen. Die Fragmentorspannung wurde konstant bei 175 V gehalten. Als *Sheathliquid* kam NH_4OAc 30/27 in 50 % MeOH (v/v) zum Einsatz. Es wurde in einem Massenbereich von $m/z = 100\text{--}3000$ gemessen. Die Fragmentierung in der zweiten Dimension wurde durch Kollisions-induzierte Dissoziation erreicht und lag in einem Bereich von 7 bis 33 eV.

5.4 Herstellung der Puffer

Zur Herstellung der eingesetzten Puffer wurden die jeweiligen Salze in Reinstwasser (18 M Ω cm) gelöst. Zur vorherigen Berechnung der pH-Werte, Ionenstärken und Pufferkapazität kam das Programm *PeakMaster* 5.3 zum Einsatz.

5.5 Probenpräparation für kapillarelektrophoretische und chromatographische Messungen

5.5.1 Bestimmung der kritischen Mizellenbildungskonzentration

Eine Stammlösung von Rhodamin 123 (5.3 mM in MeOH) wurde für alle Untersuchungen auf 0.53 mM mit Puffer verdünnt und DMSO als EOF-Marker zugesetzt.

Eine Stammlösung von Coumarin 153 (2 mM in MeOH) wurde für alle Untersuchungen auf 0.66 mM mit Puffer verdünnt und DMSO als EOF-Marker zugesetzt.

Eine Stammlösung von Naphthalin (20 mM in ACN) wurde für alle Untersuchungen auf 0.40 mM mit Puffer verdünnt und DMSO als EOF-Marker zugesetzt.

5.5.2 Click-Reaktion

Zunächst wurden Stammlösungen der Reaktanden angesetzt. Die Konzentration dieser für das Cycloalkin **51** und das PEG-Cycloalkin **57** betrug 50 mM in ACN und wurde mit jeweiligem Puffer auf 0.5 mM für die *off-column* Experimente verdünnt

Die Konzentrationen der Stammlösungen der Azide betragen 10 mg/ml im jeweiligen Puffer (AZ-OH 74 mM, AZ-COOH 61 mM, Ph-AL-AZ 52 mM, AZ-SO₃Na 45 mM, Az-0 84 mM) und wurden für die Untersuchungen auf 1 mM mit weiterem Puffer verdünnt. Alle Stammlösungen wurden bei -18 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion zwischen PEG-Cycloalkin und Ph-AL-AZ wurden die Reaktanden auf 0.5 mM beziehungsweise 0.6 mM verdünnt.

Für die ocRCE-Experimente mit EMMA wurden die Stammlösungen von Cycloalkin **51** und AZ-OH **52** auf jeweils 5 mM mit dem jeweiligen Reaktionspuffer verdünnt.

Für die ocRCE-Experimente mittels Diffusion wurden Lösungen des PEG-Cycloalkins **57** und des Phenylalaninazids **54** mit einer Konzentration von 2 mM eingesetzt.

5.5.3 Derivatisierung von Aminosäuren

OPA-, Benzaldehyd- und Phenylalanin-Stammlösungen wurden in den jeweiligen Puffern mit einer Konzentration von 50 (OPA, Benzaldehyd) beziehungsweise 100 mM (Phe) angesetzt. Für die Stammlösung von Homo-OPA wurde ACN eingesetzt, wobei die Konzentration 50 mM betrug. Alle hergestellten Stammlösungen wurden bei 4 °C gelagert. Für die Untersuchungen wurden die Stammlösungen mit dem jeweiligen Puffer auf 10 mM verdünnt.

6

ANHANG

6 Anhang

6.1 SPAAC-Reaktion

Tabelle 11. Puffersysteme, die zur pK_a -Bestimmung der SPAAC-Reaktanden eingesetzt wurden.

Pufferzusammensetzung	c [mM]	pH_{exp}	pH_{theor}^a
Ameisensäure/LiOH	150/7	2.87	2.56
Ameisensäure/LiOH	50/9.15	3.51	3.11
Ameisensäure/LiOH	30/9.6	3.83	3.41
Essigsäure/LiOH	60/9.9	4.51	4.01
Essigsäure/LiOH	30/10	4.92	4.41
Essigsäure/LiOH	20/10	5.22	4.76
Essigsäure/LiOH	15/10	5.51	5.2
MES/LiOH	45/10	5.71	5.51
MES/LiOH	20/10	6.25	6.01
MOPS/LiOH	20/10	7.18	7.16
Tricin/LiOH	40/10	7.78	7.63
Tricin/LiOH	20/10	8.26	8.11
Tricin/LiOH	15/10	8.51	8.41
CHES/LiOH	40/10	8.86	9.03
CHES/LiOH	20/10	9.32	9.51
β -Alanin/LiOH	20/10	10.29	10.18
β -Alanin/LiOH	12/10	10.77	10.75
β -Alanin/LiOH	7/10	11.87	11.48
LiOH	10	12.38	11.95

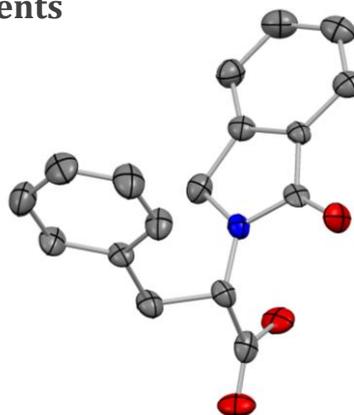
^a theoretische pH-Wertberechnungen wurden mit dem Programm *PeakMaster* 5.3 durchgeführt.

6.2 Derivatisierung von Aminosäuren

6.2.1 Parameter des Röntgenbeugungsexperiments

Kristalldaten und Strukturverfeinerung für **58**

Summenformel	C ₁₇ H ₁₅ NO ₃	
Molmasse	281.30	
Temperatur	200(2) K	
Wellenlänge	0.71073 Å	
Kristallsystem	orthorhombisch	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2	
Z	4	
Gitterkonstanten	a = 11.282(3) Å	α = 90°
	b = 20.883(5) Å	β = 90°
	c = 5.8888(13) Å	γ = 90°
Zellvolumen	1387.4(5) Å ³	
Dichte (berechnet)	1.347 g/cm ³	
Absorptionskoeffizient μ	0.093 mm ⁻¹	
Kristallform	plate	
Kristallgröße	0.300 x 0.120 x 0.020 mm ³	
Kristallfarbe	farblos	
Gemessener Theta-Bereich	1.950 bis 21.959°	
Indexgrenzen	-11 ≤ h ≤ 11, -21 ≤ k ≤ 21, -6 ≤ l ≤ 6	
Gemessene Reflexe	8468	
Unabhängige Reflexe	1690 (R(int) = 0.0840)	
Beobachtete Reflexe	1300 (I > 2σ(I))	
Absorptionskorrektur	Semi-empirical from equivalents	
Max/min Transmission	0.96 und 0.81	
Strukturverfeinerung	Full-matrix least-squares an F ²	
Daten/Restraints/Parameter	1690 / 0 / 194	
Goodness-of-fit an F ²	1.02	
R-Werte (I > 2σ(I))	R1 = 0.049, wR2 = 0.093	
Flack-Parameter	-1.7(10)	
Extinktionskoeffizient	n/a	
Max/min Restelektronendichte	0.18 und -0.20 eÅ ⁻³	



6.2.2 Verwendete Puffersysteme

Tabelle 12. Auflistung der verwendeten Puffersysteme als Reaktionsmedien und BGE zur Derivatisierung von Aminosäuren mit *o*-Phthalaldehyd.

Pufferzusammensetzung	<i>c</i> [mM]	pH _{exp}	pH _{theo} ^a	<i>I</i> _S [mM]	Pufferkapazität [mM]
HCl	40	1.38	1.47	40	98
Ameisensäure/LiOH	500/38	2.54	2.62	40	92
Essigsäure/LiOH	200/40	4.03	4.10	40	75
Essigsäure/LiOH	60/40	4.93	4.98	40	31
Phosphorsäure/NaOH	20/30	7.02	6.99	40	12
Natriumtetraborat	20	9.28	9.07	40	46
DEMA/HCl	45/40	9.54	9.60	40	10
DEMA/HCl	80/40	10.79	10.49	40	48
DEMA/HCl	300/40	11.53	11.29	40	93
LiOH	40	12.49	12.50	40	91
Ammoniak/Essigsäure	30/27	8.64	8.36	27	6.3

^a theoretische berechnete pH-Werte wurden mit dem Programm *PeakMaster* 5.3 erhalten.

LITERATURVERZEICHNIS

7 Literaturverzeichnis

- [1] O. Trapp, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 487-493.
- [2] S. Walz, S. Weis, M. Franz, F. Rominger, O. Trapp, *Electrophoresis* **2015**, *36*, 796-804.
- [3] G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2409-2415.
- [4] K. P. Scharwächter, D. H. Hochmuth, H. Dittmann, W. A. König, *Chirality* **2001**, *13*, 679.
- [5] N. H. H. Heegaard, T. J. D. Jørgensen, L. Cheng, C. Schou, M. H. Nissen, O. Trapp, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3667-3673.
- [6] J. Bao, F. E. Regnier, *J. Chromatogr. A* **1992**, *608*, 217-224.
- [7] H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* **1989**, *465*, 331-343.
- [8] B. Chankvetadze, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1168*, 45-70.
- [9] S. Terabe, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **1989**, *8*, 129-134.
- [10] V. Schurig, M. Jung, S. Mayer, S. Negura, M. Fluck, H. Jakubetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 2222-2223.
- [11] V. Schurig, M. Jung, S. Mayer, M. Fluck, S. Negura, H. Jakubetz, *J. Chromatogr. A* **1995**, *694*, 119-128.
- [12] D. W. Armstrong, Y. Tang, T. Ward, M. Nichols, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1114-1117.
- [13] P. Lehtonen, M. Saarinen, M. Vesanto, M.-L. Riekkola, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1992**, *194*, 434-437.
- [14] H. Engelhardt, W. Beck, J. Kohr, T. Schmitt, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 659-680.
- [15] O. Trapp, *Electrophoresis* **2010**, *31*, 786-813.
- [16] S. Sandel, S. K. Weber, O. Trapp, *Chem. Eng. Sci.* **2012**, *83*, 171-179.
- [17] Z. Glatz, *Electrophoresis* **2015**, *36*, 744-763.
- [18] A. Taga, M. Sugimura, S. Honda, *J. Chromatogr. A* **1998**, *802*, 243-248.
- [19] J. Gorse, A. T. Balchunas, D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1988**, *11*, 554-559.
- [20] F. Kohlrausch, *Annalen der Physik* **1897**, *298*, 209-239.
- [21] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, **1993**.
- [22] F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellente, F. P. Smith, *Forensic Science International* **1998**, *92*, 75-88.
- [23] P. W. Atkins, J. de Paula, M. Bär, A. Schleitzer, C. Heinisch, *Physikalische Chemie*, Wiley, **2006**.
- [24] R. M. Seifar, J. C. Kraak, W. T. Kok, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2772-2778.
- [25] C.-E. Lin, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 467-478.
- [26] B. Gaš, V. Hruška, M. Dittmann, F. Bek, K. Witt, *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 1435-1446.
- [27] M. Štědrý, M. Jaroš, V. Hruška, B. Gaš, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3071-3079.
- [28] M. Jaroš, V. Hruška, M. Štědrý, I. Zusková, B. Gaš, *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3080-3085.
- [29] S. C. Beale, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 279-300.
- [30] M. Jaros, K. Vceláková, I. Zusková, B. Gas, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2667-2677.
- [31] G. L. Erny, E. T. Bergström, D. M. Goodall, S. Grieb, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4862-4872.
- [32] G. L. Erny, E. T. Bergström, D. M. Goodall, *J. Chromatogr. A* **2002**, *959*, 229-239.
- [33] T. Le Saux, A. Varenne, P. Gareil, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3094-3104.
- [34] P. Dubský, M. Dvořák, L. Müllerová, B. Gaš, *Electrophoresis* **2015**, *36*, 655-661.
- [35] P. C. Haarhoff, H. J. Van der Linde, *Anal. Chem.* **1966**, *38*, 573-582.

- [36] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111-113.
- [37] P. Muller, *Pure Appl. Chem., Vol. 66*, **1994**, p. 1077.
- [38] G. I. Anderton, A. S. Bangerter, T. C. Davis, Z. Feng, A. J. Furtak, J. O. Larsen, T. L. Scroggin, J. M. Heemstra, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1687-1691.
- [39] E. Kientz, Y. Holl, *Colloid. Polym. Sci.* **1994**, *272*, 141-150.
- [40] J. C. Jacquier, P. L. Desbène, *J. Chromatogr. A* **1995**, *718*, 167-175.
- [41] K. Včeláková, I. Zusková, S. P. Porras, B. Gaš, E. Kenndler, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 463-472.
- [42] S. Terabe, M. Shibata, Y. Miyashita, *J. Chromatogr. A* **1989**, *480*, 403-411.
- [43] J. Lokajová, V. Hruška, E. Tesařová, B. Gaš, *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1189-1195.
- [44] P. K. Misra, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Colloid Surface* **1991**, *57*, 1-10.
- [45] J. C. Jacquier, P. L. Desbène, *J. Chromatogr. A* **1996**, *743*, 307-314.
- [46] A. Rodríguez, M. d. M. Graciani, M. L. Moyá, *Langmuir* **2008**, *24*, 12785-12792.
- [47] S. López-Grío, J. J. Baeza-Baeza, M. C. García-Alvarez-Coque, *Chromatographia* **1998**, *48*, 655-663.
- [48] M. Thorsteinsdóttir, C. Ringbom, D. Westerlund, G. Andersson, P. Kaufmann, *J. Chromatogr. A* **1999**, *831*, 293-309.
- [49] L. K. Shao, D. C. Locke, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 897-906.
- [50] A. Wuethrich, J. P. Quirino, *Electrophoresis* **2016**, *37*, 45-55.
- [51] G. Blundell, W. G. Brydon, *Clin. Chim. Acta* **1987**, *170*, 79-83.
- [52] K. D. Petridis, H. Steinhart, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1995**, *201*, 256-260.
- [53] T. V. Nedelkoska, G. K. C. Low, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *511*, 145-153.
- [54] A. Santalad, P. Teerapornchaisit, R. Burakham, S. Srijaranai, *Anal. Chim.* **2007**, *97*, 935-945.
- [55] L. Bosch, A. Alegría, R. Farré, *J. Chromatogr. B* **2006**, *831*, 176-183.
- [56] L. Gwatidzo, B. M. Botha, R. I. McCrindle, *Food Chem.* **2013**, *141*, 2163-2169.
- [57] I. Boogers, W. Plugge, Y. Q. Stokkermans, A. L. L. Duchateau, *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189*, 406-409.
- [58] H. P. Fitznar, J. M. Lobbes, G. Kattner, *J. Chromatogr. A* **1999**, *832*, 123-132.
- [59] J. C. M. Waterval, H. Lingeman, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* **2000**, *21*, 4029-4045.
- [60] A. Taga, S. Honda, *J. Chromatogr. A* **1996**, *742*, 243-250.
- [61] O. Trapp, *J. Chromatogr. B* **2008**, *875*, 42-47.
- [62] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* **1996**, *735*, 77-121.
- [63] O. Trapp, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 189-198.
- [64] O. Trapp, E. W. Pearce, J. R. Kimmel, O. K. Yoon, I. A. Zuleta, R. N. Zare, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1358-1365.
- [65] H. Eyring, *Chem. Rev.* **1935**, *17*, 65-77.
- [66] O. Trapp, V. Schurig, *Comput. Chem.* **2001**, *25*, 187-195.
- [67] M. Jung, V. Schurig, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 529-534.
- [68] W. Bürkle, H. Karfunkel, V. Schurig, *J. Chromatogr. A* **1984**, *288*, 1-14.
- [69] S. Wernisch, O. Trapp, W. Lindner, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *795*, 88-98.
- [70] G. P. Moss, *Pure Appl. Chem., Vol. 68*, **1996**, p. 2193.
- [71] R. S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.* **1966**, *78*, 413-447.
- [72] T. Nishikawa, R. Abe, Y. Sudo, A. Yamada, K. Tahara, *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 1395-1398.
- [73] V. Schurig, *Chirality* **1998**, *10*, 140-146.
- [74] R. Ledger, E. Stellwagen, *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 845-850.
- [75] D. L. Rabenstein, Y. Theriault, *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 33-39.

- [76] K. L. Duchin, S. M. Singhvi, D. A. Willard, B. H. Migdalof, D. N. McKinstry, *Clin. Pharmacol. Ther.* **1982**, *31*, 452-458.
- [77] J. Bojarska, W. Maniukiewicz, A. Fruzinski, L. Sieron, M. Remko, *Acta Crystallogr. C* **2015**, *71*, 199-203.
- [78] M. Remko, J. Bojarska, A. Remková, W. Maniukiewicz, *Comput. Theor. Chem.* **2015**, *1062*, 50-55.
- [79] B. H. Migdalof, M. J. Antonaccio, D. N. Mc Kinstry, S. M. Singhvi, S.-J. Lan, P. Egli, K. J. Kripalani, *Drug Metabolism Reviews* **1984**, *15*, 841-869.
- [80] O. H. Drummer, L. Routley, N. Christophidis, *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 1197-1201.
- [81] P. K. Owens, L. A. Svensson, J. Vessman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *25*, 453-464.
- [82] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- [83] W. Kirmse, L. Horner, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1958**, *614*, 1-3.
- [84] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, *2*, 565-598.
- [85] C. Nolte, P. Mayer, B. F. Straub, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 2147-2149.
- [86] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12705-12712.
- [87] B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **2013**, *340*, 457-460.
- [88] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem Soc Rev* **2010**, *39*.
- [89] M. F. Debets, S. S. van Berkel, S. Schoffelen, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 97-99.
- [90] N. J. Agard, J. a. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*.
- [91] A. T. Blomquist, L. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2153.
- [92] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805-815.
- [93] H. Meier, H. Petersen, H. Kolshorn, *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 2398-2409.
- [94] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [95] J. M. Baskin, J. a. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. a. Miller, A. Lo, J. a. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*.
- [96] N. J. Agard, J. M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 644.
- [97] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285-2287.
- [98] N. E. Mbua, J. Guo, M. A. Wolfert, R. Steet, G. J. Boons, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1912.
- [99] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3097-3099.
- [100] J. C. Jewett, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688.
- [101] H. Tian, T. P. Sakmar, T. Huber, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1314-1322.
- [102] W. J. M. Underberg, J. C. M. Waterval, *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3922-3933.
- [103] S. Oguri, *J. Chromatogr. B* **2000**, *747*, 1-19.
- [104] H. Wan, L. G. Blomberg, *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 43-88.
- [105] J. T. Smith, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3078-3083.
- [106] H. A. Bardelmeijer, J. C. M. Waterval, H. Lingeman, R. v. t. Hof, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2214-2227.
- [107] I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 283-302.
- [108] Y. S. Wu, H. K. Lee, S. F. Y. Li, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1441-1447.
- [109] M. Albin, R. Weinberger, E. Sapp, S. Moring, *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 417-422.
- [110] M. Kobayashi, E. Ichishima, *Anal. Biochem.* **1990**, *189*, 122-125.
- [111] L. Pripis-Nicolau, G. de Revel, S. Marchand, A. A. Beloqui, A. Bertrand, *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 731-738.

- [112] M. Tian, J. Zhang, A. C. Mohamed, Y. Han, L. Guo, L. Yang, *Electrophoresis* **2014**, *35*, 577-584.
- [113] M. W. Lada, T. W. Vickroy, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4560-4565.
- [114] M. W. Lada, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2790-2797.
- [115] J. E. Thompson, T. W. Vickroy, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2379-2384.
- [116] L. Tao, J. E. Thompson, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4015-4022.
- [117] H. Lochmann, A. Bazzanella, K. Bächmann, *J. Chromatogr. A* **1998**, *817*, 337-343.
- [118] M. W. Lada, T. W. Vickroy, R. T. Kennedy, *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 617-625.
- [119] P. Lindroth, K. Mopper, *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1667-1674.
- [120] M. Roth, *Anal. Chem.* **1971**, *43*, 880-882.
- [121] S. Oguri, S. Watanabe, S. Abe, *J. Chromatogr. A* **1997**, *790*, 177-183.
- [122] S. Oguri, Y. Ohta, C. Suzuki, *J. Chromatogr. B* **1999**, *736*, 263-271.
- [123] S. Oguri, M. Kumazaki, R. Kitou, H. Nonoyama, N. Tooda, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1472*, 107-114.
- [124] I. Molnár-Perl, *J. Chromatogr. B* **2011**, *879*, 1241-1269.
- [125] S. Oguri, K. Yokoi, Y. Motohase, *J. Chromatogr. A* **1997**, *787*, 253-260.
- [126] V. H. Cohn, J. Lyle, *Anal. Biochem.* **1966**, *14*, 434-440.
- [127] V. H. Cohn, P. A. Shore, *Anal. Biochem.* **1961**, *2*, 237-241.
- [128] R. Grigg, H. Q. N. Gunaratne, V. Sridharan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1183-1184.
- [129] T. Do Minh, A. L. Johnson, J. E. Jones, P. P. Senise, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 4217-4221.
- [130] A. Taga, A. Nishino, S. Honda, *J. Chromatogr. A* **1998**, *822*, 271-279.
- [131] S. M. Allin, C. C. Hodkinson, N. Taj, *Synlett* **1996**, 1996, 781-782.
- [132] J. C. Breytenbach, S. van Dyk, I. van den Heever, S. M. Allin, C. C. Hodkinson, C. J. Northfield, M. I. Page, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1629-1631.
- [133] P. Zuman, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3217-3238.
- [134] P. Zuman, N. Salem, E. Kulla, *Electroanalysis* **2009**, *21*, 645-649.
- [135] M. Alajarín, P. Sánchez-Andrada, C. López-Leonardo, Á. Álvarez, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7617-7623.
- [136] E. Kulla, P. Zuman, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3771-3780.
- [137] J. Klíma, M. Polášek, J. Ludvík, J. Urban, *J. Heterocycl. Chem.* **2012**, *49*, 1202-1209.
- [138] J. Urban, J. Ludvík, J. Fabry, M. Dusek, K. Fejfarova, *Acta Crystallogr. E* **2009**, *65*, o2092-o2093.
- [139] S. Cannizzaro, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1853**, *88*, 129-130.
- [140] T. A. Geissman, *Organic Reactions*, John Wiley & Sons Inc., New York, **2004**.
- [141] Wöhler, Liebig, *Annalen der Pharmacie* **1832**, *3*, 249-282.
- [142] N. Salem, P. Zuman, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7802-7808.
- [143] S. Walz, *Untersuchung interkonvertierender Stereoisomere und Reaktionen mittels Kapillarelektrophorese*, Masterarbeit, Universität Heidelberg, **2012**.
- [144] S. Freire, J. Bordello, D. Granadero, W. Al-Soufi, M. Novo, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 687-696.
- [145] J. Šteflová, M. Štefl, S. Walz, M. Knop, O. Trapp, *Electrophoresis* **2016**, *37*, 1287-1295.
- [146] S. Stockinger, *Anwendungen in der Komplexierungs-Gaschromatographie und on-column Reaktions-Gaschromatographie & Entwicklung eines mehrwertigen sowie kontinuierlichen molekularen Logik-Systems*, Dissertation, unveröffentlichte Ergebnisse, Universität Heidelberg, **2014**.
- [147] B.-Y. Ryu, T. Emrick, *Macromolecules* **2011**, *44*, 5693-5700.
- [148] S. Nonogaki, M. Toriumi, *J. Macromol. Sci. -Chem.* **1988**, *25*, 617-626.

- [149] C. G. Gordon, J. L. Mackey, J. C. Jewett, E. M. Sletten, K. N. Houk, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199-9208.
- [150] Y. Liang, J. L. Mackey, S. A. Lopez, F. Liu, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17904-17907.
- [151] S. Chakraborty, D. Shukla, A. Jain, B. Mishra, S. Singh, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *335*, 242-249.
- [152] T. Jia, W.-L. Zhang, Y. Chen, S.-L. Cai, H.-B. Yi, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1050*, 211-215.
- [153] S. S. Simons, D. F. Johnson, *Anal. Biochem.* **1977**, *82*, 250-254.
- [154] L. Kurti, B. Czako, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Science, Oxford, **2005**.
- [155] S. Chandrasekhar, C. Narsihmulu, S. S. Sultana, N. R. Reddy, *Chem. Commun.* **2003**, 1716-1717.
- [156] E. E. Maciver, P. C. Knipe, A. P. Cridland, A. L. Thompson, M. D. Smith, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 537-540.
- [157] *DCXplorer* wurde für die Auswertung von Elutionsprofilen der dynamischen Chromatographie (DGC, DHPLC, DSFC, DOTLC) und Kapillarelektrophorese (DCE, DCEC, DMEKC, DOTCE) entwickelt und läuft unter Windows (2000, XP, Vista, 7, 10). Das Programm basiert auf der unified equation, mit der Geschwindigkeitskonstanten von Reaktionen erster Ordnung aus den Interkonversionsprofilen berechnet werden können. Alle Elektropherogramme sind im *ASCII* Format zugänglich. *DCXplorer* ist direkt bei Prof. Dr. O. Trapp erhältlich. (trapp.uni-heidelberg.de, **2016**).
- [158] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

DANKSAGUNG

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in all den Jahren durch mein Leben, mein Studium und meine Promotion begleitet haben und die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

Mein erster Dank richtet sich an meinen Doktorvater *Prof. Dr. Oliver Trapp* für die interessante Themenstellung, die tolle Betreuung, die immer ermutigende und motivierende Art und die stete Diskussionsbereitschaft während meiner Promotion. Außerdem möchte ich für die zahlreichen Möglichkeiten danken, meine Ergebnisse auf nationalen und auch internationalen Konferenzen vorzustellen.

Prof. Dr. Dirk-Peter Herten möchte ich an dieser Stelle für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit danken.

Den analytischen Abteilungen des Organisch-Chemischen Instituts danke ich für die Messung von Massenspektren, NMR-Spektren sowie Kristallstrukturanalysen. Zudem geht ein großer Dank an alle mehr oder weniger stillen Helfer der chemischen Institute.

Den aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter des Arbeitskreises Trapp danke ich für alle fachlichen, sowie nicht fachlichen Gespräche.

Ein großer Dank geht an die liebe *Ute*, du bist die gute Seele des AKs. Danke für all die Sachen, die du gemacht hast und immer noch tust und vor allem auch für dein offenes Ohr in jeder Situation. Vielen Dank für deine Hilfe bei den „lästigen“ Laborarbeiten, wie Laufmittel testen und Säulen allgemein. Liebe *Brigitte* vielen Dank, dass du in den letzten paar Monaten immer ein offenes Ohr hattest und dich um die organisatorischen Sachen gekümmert hast.

Bei *Lou* und *Golo* möchte ich für die nette Aufnahme im „neuen“ Labor und die tolle Atmosphäre bedanken (auch an *Max* für die letzten paar Monate ;)). Danke Lou, dass du mich auch ein zweites Mal wiederaufgenommen hast und mein Chaos immer wieder ertragen hast ;)

Außerdem möchte ich mich bei allen bedanken, die den Unialltag ein bisschen schöner und unterhaltsamer und weniger trist gemacht haben: *Steffi* und *Alex, Johannes* (jetzt wo du nicht mehr so weit weg „wohnst“, kann man dich auch öfter mal besuchen kommen ;)), *Malte* und *Marina, Ela* und *Svenja*.

Ein großer Dank geht an das *Inkompetenz Zentrum Heidelberg* für ihr stetes Bemühen meine Mittagspausen zu versüßen ;)

Vielen Dank an die fleißigen Bienchen (*Brigitte, Lou, Steffi, Suse* und *Sven*), die diese Arbeit auf Fehler (ob inhaltlich oder grammatikalisch) untersucht haben.

Danke Mädels (*Lou, Lydia, Steffi, Suse*), dass es euch gibt und ich euch (wenn auch zum Teil erst spät) hier kennen gelernt hab. Vielen, vielen Dank an meine beiden Süßen, *Lou* und *Suse* (Frau Doktor und Frau Doktor), dass ihr mit mir gelitten und gelacht habt und das Studium manchmal auch Studium habt sein lassen. Danke für gemeinsame Stunden hier an der Uni und viel wichtiger die abseits davon. Danke für eure Unterstützung zu jederzeit und vor allem danke für die jahrelange Freundschaft. Ich bin gespannt was die Zukunft so für uns bereit hält ;)

Vielen Dank *Kenny* und *Rina* für eure jahrelange Freundschaft (schon mehr als ein Jahrzehnt), für die vielen Erlebnisse, die wir miteinander erleben durften und die schönen Momente nicht nur während unserer Schulzeit.

Meinen lieben Eltern (*Mama, Papa* und *Ursula*) möchte ich für alles danken was ihr je für mich getan habt. Danke, dass ihr seit Jahren (oder besser gesagt schon mehreren Jahrzehnten ;)) immer hinter mir steht. Danke für die finanzielle Unterstützung, ohne die das Studium weitaus schwieriger geworden wäre. Danke für eure mentale Unterstützung und einfach, dass ihr da seid. Vielen Dank meine lieben Geschwister (*Michel, David, Laura* und *Fabio*) für unzählige schöne Erlebnisse und auch für eure Unterstützung, sei es in Form von einem Long Island, einem Telefonat oder einfach einer schönen Zeichnung von euch beiden „Kleinen“ (Tut mir leid, *Laura*, dass ich dich da nochmal dazu zähle :*). Danke *Michel* und *David*, dass es daheim und generell mit euch nie langweilig war. Danke, dass ihr immer auf eure kleine Schwester aufgepasst habt und auch, dass ihr immer da seid. Ihr alle zusammen seid die besten Geschwister, die man sich wünschen kann!

Der letzte und größte Dank gebührt meinem Verlobten. Vielen Dank *Sven*, dass du mir nicht nur in letzter Zeit den Rücken freigehalten hast und meine „tollen“ Launen daheim und auch an der Uni ertragen hast. Danke für deine bedingungslose, unendliche Liebe und deine beständige Unterstützung in allen Lebenslagen. Danke für die schönen gemeinsamen Stunden, Tagen, Wochen, Monate und Jahre und auf, dass noch viele dazu kommen werden. Um dir für alles zu danken, was du für mich getan hast, reicht leider der Platz hier nicht aus... Deshalb einfach danke, dass du immer an meiner Seite bist. Wie heißt es so schön: „... und wenn du fällst, bin ich bei dir...“

Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät der Universität Heidelberg

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Untersuchung interkonvertierender Stereoisomere und Reaktionen höherer Ordnung sowie Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration mittels Kapillarelektrophorese“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum Unterschrift