

Moleküle im Spiegel

Enantiomerentrennungen
mittels Kapillarelektrophorese

Prof. Dr. Gerhard K. E. Scriba
Institut für Pharmazeutische/Medizinische Chemie,
Friedrich-Schiller-Universität Jena

In dem 1871 erschienenen Kinderbuch „Through the Looking-Glass – And What Alice Found There“ des englischen Autors Lewis Carroll betritt Alice eine Welt hinter dem Spiegel. Sie erklärt ihrer Katze: „Zuerst einmal kommt das Zimmer, das du hinter dem Glas siehst – das ist genau wie unser Wohnzimmer, nur ist alles verkehrt herum. ... Wie würde es dir gefallen, im Spiegelhaus zu wohnen, Miezechen? Ich frage mich, ob sie dir dort Milch geben würden? Aber vielleicht kann man Spiegelmilch nicht gut trinken!“ Auch wenn Carroll die Wirkung spiegelbildlicher Verbindungen nicht kannte, so liegt dennoch die Vermutung nahe, dass Spiegelmilch tatsächlich vom molekularen Aufbau her betrachtet anders sein würde.



Foto: ©Elena Kalis

Warum Enantiomerenanalytik?

Es gibt Moleküle, die sich wie die linke und rechte Hand eines Menschen gleichen, d.h., sie unterscheiden sich bei derselben elementaren Zusammensetzung und Bindung der Atome in der räumlichen Anordnung der Substituenten wie Bild und Spiegelbild. Derartige Moleküle werden als Enantiomere bezeichnet, sie sind chiral (cheir = griechisch Hand; $\chi\epsilon\rho\iota$). Moleküle mit der gleichen Verknüpfung der Atome, aber unterschiedlicher räumlicher Anordnung, die in keiner Bild-Spiegelbildbeziehung zueinanderstehen, nennt man Diastereomere. Diese können chiral sein oder auch nicht. Chirale Moleküle besitzen verschiedene Wirkungen, sie können anders schmecken oder riechen bzw. unterschiedliche pharmakologische Aktivität aufweisen. So riecht das (R)-Limonen nach Orange, während das spiegelbildliche (S)-Limonen nach Zitrone riecht (Abb. 1). Ein anderes Beispiel ist der Geruch von (S)-Carvon nach Kümmel bzw. der Geruch des Enantiomers (R)-Carvon nach grüner Minze. In einer spiegelbildlichen Welt wäre also vieles anders, beispielsweise könnten wir Dinge nicht mehr an ihrem Geruch erkennen oder Zucker würde seine Süßkraft verlieren.

Im Hinblick auf Arzneistoffe, die nach der Definition des deutschen Arzneimittelgesetzes „zur Heilung oder Linderung oder zur Verhütung menschlicher oder tierischer Krankheiten oder krankhafter Beschwerden bestimmt sind“, können die Auswirkungen wesentlich

dramatischer sein. Die beiden Enantiomere eines Arzneistoffs können sich in ihrer Wirkstärke unterscheiden oder auch entgegengesetzte (u.U. toxische) Wirkungen haben. Ein Beispiel unterschiedlicher Wirkstärke von Enantiomeren findet man beim β -Blocker Propranolol, dessen (S)-Enantiomer eine 100-fach stärkere antagonistische Aktivität am β -Rezeptor aufweist als das (R)-Enantiomer. Im Gegensatz dazu wird das (S)-Penicillamin zur Behandlung der Wilsonschen Krankheit oder als Rheumatherapeutikum eingesetzt, das (R)-Enantiomer ist hingegen hoch toxisch. Dies ist nicht verwunderlich, da alle spezifischen Wechselwirkungspartner biologisch aktiver Substanzen (d.h. Rezeptoren, Enzyme, Nukleinsäure, etc.) aus enantiomerenreinen Bausteinen (Aminosäuren, Zucker, etc.) aufgebaut und somit ebenfalls chiral sind.

Die chemische Synthese führt aber häufig zu 1:1-Gemischen der Enantiomere, so genannten Racematen. Vor dem Hintergrund möglicher unterschiedlicher Wirkungen verlangen heute Zulassungsbehörden wie die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) und die European Medicines Agency (EMA) die Untersuchung der einzelnen Stereoisomere eines Wirkstoffs und dann gegebenenfalls die Entwicklung des wirksamen Enantiomers. Dies erfordert nicht nur geeignete Syntheseverfahren, sondern auch Analyseverfahren, die zwischen Enantiomeren diskriminieren. Stereoselektive Analytik ist aber nicht nur für die pharmazeutische Industrie wichtig,

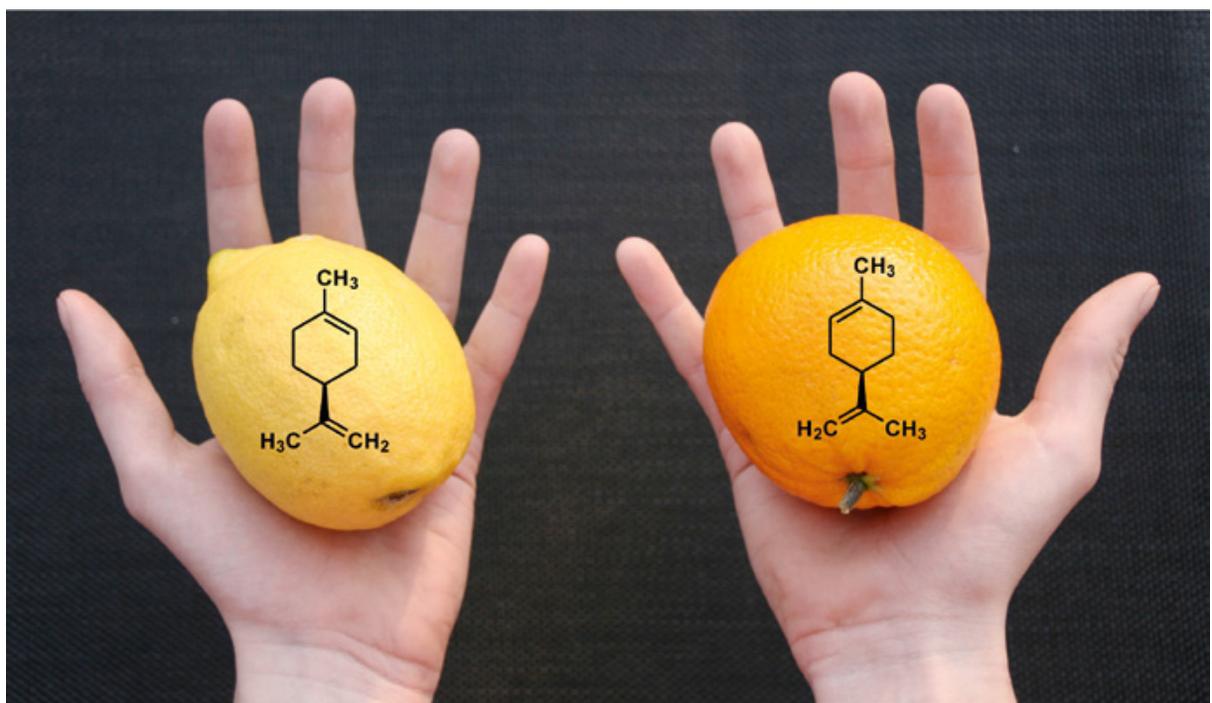


Abb. 1 Orangen enthalten (R)-Limonen, Zitronen das spiegelbildliche (S)-Limonen.

sondern betrifft auch viele weitere Bereiche der Analytik von Chemikalien, Kosmetika, Lebensmitteln, biologischem Material oder Umweltproben.

Verfahren zur Trennung von Enantiomeren

Das „klassische“ Analyseverfahren für Enantiomere ist die Polarimetrie, bei der die Drehung der Polarisationssebene linear polarisierten Lichts beim Durchtritt durch die Lösung der Substanz bestimmt wird. Das Verfahren zeichnet sich aber durch eine geringe Präzision, Störanfälligkeit und hohen Substanzverbrauch aus.

Moderne Verfahren zur Enantiomerenanalytik sind die Chromatografie und die Kapillarelektrophorese. Hierbei erfolgt die Wechselwirkung zwischen den Analyten und einem chiralen Selektor, der ebenfalls eine chirale Verbindung ist. Zur Illustration der Vorgänge wird häufig das Dreipunkt-Interaktionsmodell (Abb. 2) herangezogen, das bei aller Unzulänglichkeit eine anschauliche Erklärung liefert. Nur eines der Enantiomere kann 3 Interaktionen zum Selektor ausbilden, für das andere Enantiomer sind aufgrund der räumlichen Anordnung nur 2 Interaktionen möglich. Es ist leicht ersichtlich, dass sich die Komplexe in ihrer Stabilität unterscheiden, sodass letztendlich eine Trennung der Enantiomere erfolgt.

In der Chromatografie ist der chirale Selektor an eine stationäre Phase gebunden, in der Kapillarelektrophorese wird er dem Hintergrundelektrolyten zugegeben, man spricht hier von einer pseudostationären Phase, da der Selektor beweglich ist. Das Prinzip der chiralen Erkennung von Enantiomeren in Chromatografie und Kapillarelektrophorese ist also dasselbe, auch wenn der Transport der Substanzen zum Detektor mittels Druck in der Chromatografie bzw. aufgrund elektrokinetischer Phänomene in der Kapillarelektrophorese unterschiedlich verläuft.

Wichtige, in der Kapillarelektrophorese eingesetzte chirale Selektoren sind Cyclodextrine, makrozyklische Antibiotika wie Vancomycin oder Teicoplanin, chirale Kronenether, Metallkomplexe, Proteine oder auch chirale Mizellbildner. Aufgrund ihrer Verfügbarkeit sind Cyclodextrine die am häufigsten eingesetzten chiralen Selektoren. Dabei handelt es sich um durch mikrobiologischen Abbau von Stärke gewonnene zyklische Oligosaccharide. In den oft verwendeten α -, β - und γ -Cyclodextrinen sind 5, 6 bzw. 7 D-Glucopyranose-Einheiten α -(1,4)-glycosidisch verknüpft (siehe β -Cyclodextrin in Abb. 3). Dadurch bildet sich ein konischer Hohlkörper mit einem lipophilen Innenraum und einem hydrophilen Äußeren. Die Komplexbildung von Analyten erfolgt aufgrund hydrophober Wechselwirkungen für Substanzen, die in den Hohlraum eingelagert werden oder auch durch

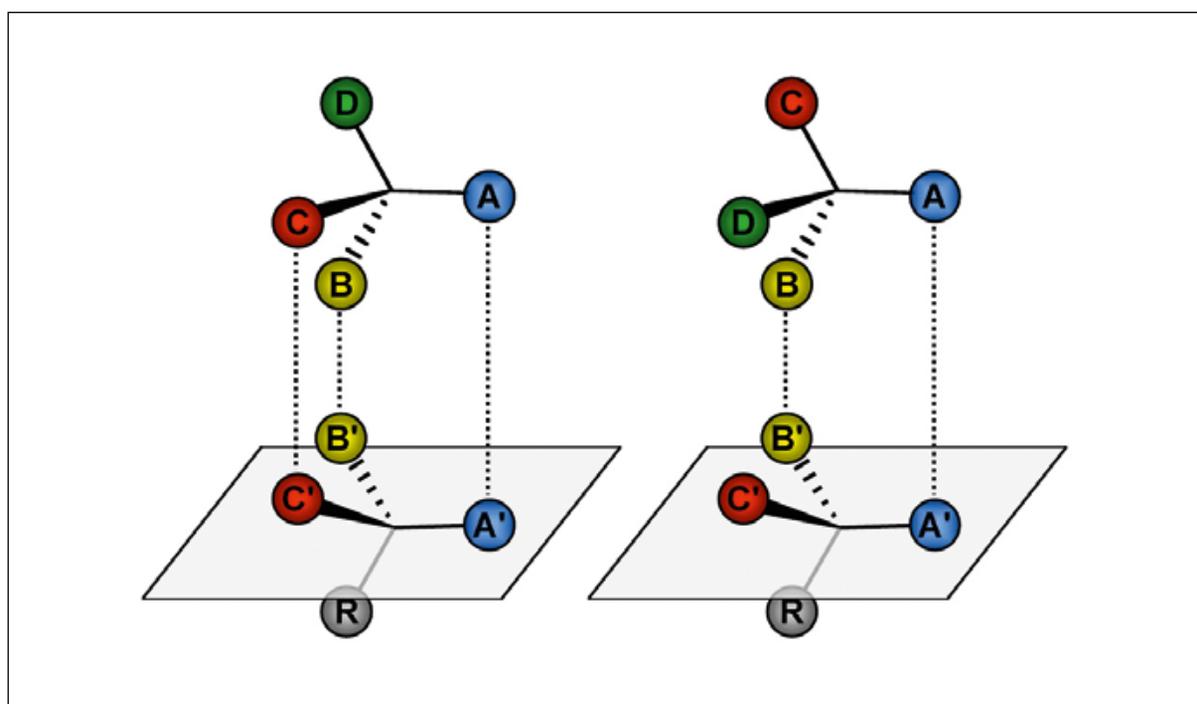


Abb. 2 Dreipunkt-Interaktionsmodell. Das linke Enantiomer kann idealerweise 3 Interaktionen zu dem chiralen Selektor ausbilden, das rechte Enantiomer nur 2.



Gerhard K. E. Scriba, geb. 1956, studierte Pharmazie in Bonn und erhielt 1980 die Approbation für Apotheker. Er promovierte an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, wo er sich 1995 für das Fach Pharmazeutische Chemie habilitierte. 1999 folgte er einem Ruf auf die C3-Professur für Pharmazeutische Chemie mit dem Schwerpunkt Pharmazeutische Analytik an die Friedrich-Schiller-Universität Jena, seit 2005 ist er geschäftsführender Direktor des Instituts für Pharmazie. Er ist Mitglied des Wissenschaftlichen Beirats des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) und des Ausschusses „Pharmazeutische Chemie“ des Arzneibuchs. Seine Forschungsarbeiten wurden mit dem Rottendorf Preis (1995) und dem Johann-Wolfgang-Döbereiner-Preis der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (1997) ausgezeichnet. Scriba ist Mitherausgeber des Kommentars zum Europäischen Arzneibuch und der Zeitschrift *Chromatographia* sowie Mitglied des Editorial Boards diverser Fachzeitschriften. Er ist Autor oder Koautor von über 125 wissenschaftlichen Publikationen sowie 11 Buchbeiträgen.

Wechselwirkung mit den OH-Gruppen. Durch Derivatisierung der primären und sekundären Hydroxygruppen können zahlreiche substituierte Cyclodextrine mit veränderten Komplexierungsverhalten hergestellt werden, die für zahlreiche Trennmodi einsetzbar sind.

Chirale Kapillarelektrophorese in der pharmazeutischen Analyse

Neben Anwendungen in der chemischen Industrie, in Lebensmitteln oder Umweltproben spielen Enantiomeren-trennungen in der pharmazeutischen Analyse eine besonders wichtige Rolle. Ein Grund ist die erwähnte unterschiedliche Wirkung der Enantiomere chiraler Arzneistoffe. Nach internationalen Richtlinien sollte das „falsche“ Enantiomer im tausendfachen Unterschuss in Gegenwart des „richtigen“ Enantiomers bestimmbar sein, d.h., einen maximalen Gehalt von 0,1 % aufweisen. Dies wurde für viele Arzneistoffe gezeigt (siehe Beispiel des Antimalariamittels Chloroquin in Abb. 4).

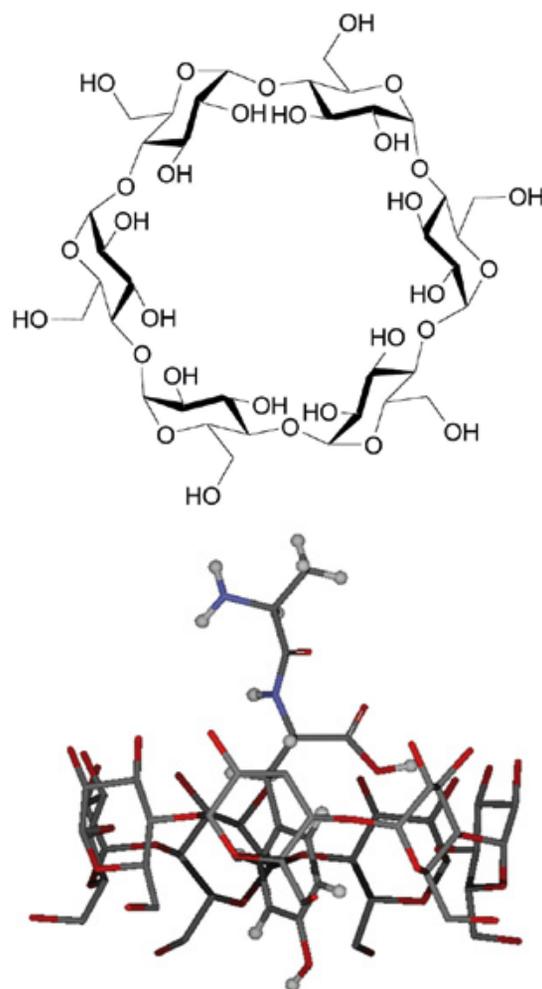


Abb. 3 Formel von β -Cyclodextrin (A) und Molecular Modeling-Ansicht des Komplexes zwischen β -Cyclodextrin und dem Dipeptid L-Alanyl-L-tyrosin (B).

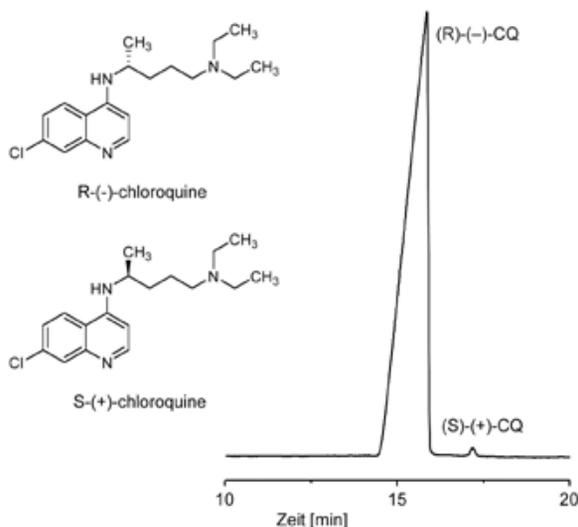


Abb. 4 Analyse mittels Kapillarelektrophorese einer Probe des (R)-Enantiomers von Chloroquin, die 0.2 % des (S)-Enantiomers enthält. Experimentelle Bedingungen: Quarzglaskapillare: effektive Länge 40 cm, 50 μm innerer Durchmesser; Hintergrundelektrolyt: 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 2,5 mit 30 mg/mL Sulfobutylether- β -cyclodextrin; Spannung 25 kV; Temperatur 20 $^{\circ}\text{C}$; Detektionswellenlänge: 225 nm.

Eine weitere wichtige Arbeitsrichtung ist die Untersuchung des enantioselektiven Metabolismus von Arzneistoffen durch den menschlichen Organismus. Da die verstoffwechselnden Enzyme ebenfalls chiral sind, entsteht häufig aus einem Enantiomer bevorzugt ein bestimmter Metabolit, während das andere Enantiomer zu einem anderen Metaboliten umgesetzt werden kann. Außerdem unterscheiden sich Menschen in der Aktivität der abbauenden Enzyme, sodass Arzneistoffwirkung und -nebenwirkung auch eine Konsequenz eines stereoselektiven Metabolismus sein können. Als ein Verfahren, das nur kleine Probenvolumina benötigt, leistet die Kapillarelektrophorese auch hier wichtige Beiträge.

Ausblick

Etwas 30 Jahre nach ihrer Einführung hat sich die Kapillarelektrophorese zu einem ausgereiften, flexiblen Analyseverfahren entwickelt, das sich in idealer Weise zur Enantiomerenanalytik eignet und in vielen Bereichen etabliert ist. Für das miniaturisierte Verfahren werden nur geringe Mengen an Probe und Chemikalien benötigt, organische Lösungsmittel werden kaum verwendet. Die Kapillarelektrophorese ist daher ein kostensparendes und umweltfreundliches Analyseverfahren. Künftige Entwicklungen liegen in einer weiteren Miniaturisierung des Verfahrens unter Verwendung von Chips, welche die Integrierung unterschiedlicher Analyseschritte erlauben (Stichwort „lab-on-a-chip“).

■ gerhard.scriba@uni-jena.de

Enantiomerenanalytik mittels Kapillarelektrophorese

In vielen Bereichen der Analytik werden Verfahren zur Enantiomerentrennung eingesetzt. Hier hat sich die Kapillarelektrophorese (CE) in den letzten Jahren als umweltfreundliche und effektive Trenntechnik etabliert. Sie gilt als eine der spannendsten und leistungsfähigsten Neuentwicklungen in der instrumentellen Analytik und zeichnet sich durch eine hohe Flexibilität, geringen Verbrauch an Probe, Chemikalien und Lösungsmitteln, hohe Auflösung und relativ einfache Methodenentwicklung aus. Die Technik eignet sich zur Analytik von Makromolekülen wie Nukleinsäuren und Proteinen, wird heute aber verstärkt für niedermolekulare Substanzen und besonders zur analytischen Trennung von Enantiomeren eingesetzt. Dabei verwendet man typischerweise Quarzglaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 25 bis 100 μm und einer Länge von 20 bis 60 cm. Diese sind mit einer Elektrolytlösung gefüllt und es wird eine Hochspannung von 10 bis 30 kV angelegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyte ist eine Funktion ihrer Ladungsdichte (Verhältnis Ladung zu Masse) sowie des allgemeinen Massenflusses, des elektroosmotischen Flusses. Enantiomere besitzen die gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften und wandern daher mit identischer Geschwindigkeit. Für eine Enantiomerentrennung ist daher der Zusatz eines chiralen Selektors erforderlich, der die Enantiomere unterschiedlich stark komplexiert. Im einfachsten Fall wird so das stärker gebundene Enantiomer gegenüber dem schwächer komplexierten Antipoden abgebremst, da der Enantiomer-Selektor-Komplex eine wesentlich höhere Masse und damit eine geringere Ladungsdichte besitzt. Es kommt zur Trennung der Enantiomere.