





**Theoretische Untersuchung  
zur Enantiomerentrennung  
an carbamoylierten Chininderivaten**

**Eine Molecular Modelling Studie**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Sybille Buchwald-Werner**

aus Dorsten

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H.-D. Höltje

Korreferent: Prof. Dr. B. C. Lippold

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2001

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/buchwald-werner.html>

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1997 bis Juni 2001 am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Prof. Dr. H.-D. Höltje angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. H.-D. Höltje für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. W. Lindner und Dr. M. Lämmerhofer, Universität Wien, danke ich für die Zusammenarbeit und die Überlassung der experimentellen Daten der chromatographischen Trennungen.

Bei Prof. Dr. B. C. Lippold bedanke ich mich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises möchte ich besonders für die konstruktive Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
1.1	Enantiomere	13
1.2	Chiralität in der Natur	13
1.3	Chirale Arzneistoffe	13
1.4	Razematspaltung	14
1.5	Anwendung von Molecular Modelling	15
<b>2</b>	<b>GRUNDLAGEN ZUR ARBEIT</b>	<b>17</b>
2.1	Molekulare Wechselwirkungen	19
2.1.1	Elektrostatische Wechselwirkungen	19
2.1.2	Wasserstoffbrücken-Bindungen	19
2.1.3	Charge-Transfer-Interaktion (C.T.-Interaktion)	20
2.1.4	Dispersionskräfte	21
2.1.5	Hydrophobe Wechselwirkungen	21
2.1.6	Sterische Abstoßung	22
2.2	Chirale Erkennung	22
2.2.1	Chirale Trennung	25
2.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	26
2.3.1	Aufbau	26
2.3.2	Multistep-Verfahren	27
2.3.3	Chromatographische Kenngrößen	27
2.4	HPLC mit chiralen stationären Phasen	28
2.5	Chinin	30
2.5.1	Chinin als chiraler Selektor in der HPLC	31
2.5.1.1	Verankerung des Chinins an der Säule	31
2.5.1.2	Optimierung des Spacers	32
2.5.1.3	Mobile Phase	32
2.5.1.4	Optimierung des Chinins als Selektor	32
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTELLE DATEN</b>	<b>35</b>
3.1	Das Trennsystem	37
3.1.1	Die chirale stationäre Phase (CSP)	37
3.1.2	Die mobile Phase	38
3.1.3	Eigenschaften des Trennsystems	38
3.2	Retentionsdaten	39
3.3	Kristallstruktur	40

<b>5.1</b>	<b>Entwicklung der Arbeitsmethode</b>	<b>47</b>
5.1.1	Darstellung der CSP in den Berechnungen	47
5.1.2	Auswahl des Enantiomerenpaares zur Entwicklung der Arbeitsmethode	48
5.1.3	Aufbau der Moleküle	49
5.1.4	Simulation der mobilen Phase	50
5.1.4.1	Das Programm GROMACS	50
5.1.4.2	Das GROMACS-Krafffeld	51
5.1.4.3	Die Lösungsmittelbox im GROMACS	52
5.1.4.4	Lösungsmittel-Parameter	53
5.1.4.5	Konstruktion der Lösungsmittelbox	54
5.1.4.6	Moleküldynamik-Simulationen (MDS)	55
5.1.4.7	Parametrisierung	57
5.1.4.8	Steuerungsparameter für Dynamik-Simulationen im GROMACS	63
5.1.5	Startgeometrie und constraints	64
5.1.5.1	MDS zur Optimierung der Startgeometrie	65
5.1.6	Ermittlung der optimalen Simulationsdauer der MDS	72
5.1.7	Aufteilung der Simulationsdauer	73
5.1.8	Generell verwendetes MDS-Protokoll	74
5.1.9	Auswertungsverfahren für die Dynamiken	75
5.1.9.1	Statistische Auswertung der Wechselwirkungsenergien	76
5.1.10	MDS des 3,5-Dinitrobenzoylleucins (3,5-DNBL)	78
5.1.10.1	MDS des (S) 3,5-DNBL	78
5.1.10.2	MDS des (R) 3,5-DNBL	81
5.1.10.3	Ergebnisse der Enantiomerentrennung von 3,5-DNBL	84
<b>5.2</b>	<b>Überprüfung der Arbeitsmethode mit drei Razematen</b>	<b>89</b>
5.2.1	MDS des 2,4-Dinitrobenzoylleucins (2,4-DNBL)	89
5.2.1.1	MDS des (S) 2,4-DNBL	89
5.2.1.2	MDS des (R) 2,4-DNBL	92
5.2.1.3	Ergebnisse der Enantiomerentrennung von 2,4-DNBL	94
5.2.2	MDS des 4-Mononitrobenzoylleucins (4-MNBL)	96
5.2.2.1	MDS des (S) 4-MNBL	96
5.2.2.2	MDS des (R) 4-MNBL	99
5.2.2.3	Ergebnisse der Enantiomerentrennung von 4-MNBL	101
5.2.3	MDS des Benzoylleucins (BL)	103
5.2.3.1	MDS des (S)-BL	103
5.2.3.2	(R)-Benzoylleucin [(R)-BL]	106
5.2.3.3	Ergebnisse der Enantiomerentrennung von BL	108

5.2.4	Gesamtauswertung aller Enantiomerenpaare	110
<b>5.3</b>	<b>Vorhersage des Trennverhaltens von verschiedenen Enantiomerenpaaren</b>	<b>113</b>
5.3.1	MDS des 3,5-Dinitrobenzoyl-methylleucins (3,5-DNBTL)	113
5.3.2	MDS des Benzoylalanins (BA)	115
5.3.3	MDS des 2,4-Dinitrophenylleucins (2,4-DNPL)	118
5.3.4	MDS des N-Acetylvalins	120
5.3.5	MDS des 3,5-Dinitrobenzyloxycarbonylleucins (3,5-DNBOCL)	123
5.3.6	Quantenchemische Rechnungen zum Charge Transfer	126
5.3.7	Überprüfung der Vorhersagen	132
5.3.8	Vergleich der berechneten und experimentellen Daten	134
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>137</b>
6.1	Diskussion der entwickelten Arbeitsmethode	139
6.2	Chirale Erkennung	143
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>157</b>
<b>Anhang A</b>		<b>160</b>
Abkürzungsverzeichnis		160
<b>Anhang B</b>		<b>162</b>
Hardware		162
<b>Anhang C</b>		<b>162</b>
Software		162
<b>Anhang E</b>		<b>163</b>
Diagramme zum Verlauf der potentiellen Energie der MDS:		163



# **1 Einleitung**



## 1.1 Enantiomere

Enantiomere<sup>1</sup> sind Stereoisomere, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten. Dies beruht auf dem Vorhandensein von mindestens einem asymmetrischen Zentrum. Sie haben in achiraler Umgebung identische chemische und physikochemische Eigenschaften.[1]

Unterschiede bestehen jedoch in ihrem Verhalten gegenüber anderen chiralen<sup>2</sup> Substanzen. Die ungleiche räumliche Anordnung der Liganden am chiralen Zentrum führt zu unterschiedlichen, selektiven Wechselwirkungen.

## 1.2 Chiralität in der Natur

In der Natur findet man viele selektive Reaktionen, die auf die unterschiedlichen Wechselwirkungsmöglichkeiten von Enantiomeren zurückzuführen sind. Ein Beispiel sind Proteine, die nur aus Aminosäuren der (S)-Konfiguration<sup>3</sup> aufgebaut sind. Es resultiert eine spezifische räumliche Struktur, die Wechselwirkungen mit ebenfalls aus (S)-Aminosäuren aufgebauten Reaktionspartnern bevorzugt. Ausnahmen von dieser Regel dienen einem speziellen Zweck, wie z.B. peptidische-Spinnengifte, die R-Aminosäuren enthalten und damit die Wirkdauer durch eine verbesserte enzymatische Stabilität des Gifts erhöhen. Mit der Anzahl der chiralen Kohlenstoffatome steigt die Anzahl der theoretisch möglichen Stereoisomere ( $2^n$ ). Umso auffälliger ist, dass in der Natur meistens nur ein Isomer existiert. Dieses kann unterschiedliche Gründe haben, wie z.B. Unterschiede in der Stabilität oder das dominante Vorkommen von homochiralen Bausteinen für die Biosynthese. Der Gedanke, dass Chiralität im Zuge der chemischen Evolution entstanden ist, und folglich nur selektive und keine ungünstigen oder gar überflüssige Substanzen synthetisiert werden, scheint am wahrscheinlichsten.[2]

## 1.3 Chirale Arzneistoffe

Das Vorbild der Natur ist in der modernen Arzneimitteltherapie noch nicht vollständig verwirklicht. Ca. 28% aller Arzneistoffe sind Naturstoffe. Diese sind

---

<sup>1</sup> griech. enantion = Gegenteil

<sup>2</sup> griech. chiral = händig

<sup>3</sup> Cahn-Ingold-Prelog-Konvention von lat. S = sinister, R = rectus

chiral und zu 99% enantiomerenrein. Den größeren Anteil stellen jedoch mit 72% die Synthetika dar, die zu 38% chiral sind. Da enantioselektive Synthesen sehr zeit- und kostenintensiv sind, werden diese auch heute noch zum überwiegenden Teil als Razemate in den Handel gebracht.[3]

Razemate sind Gemische der beiden Enantiomere, die sich in ihrer Wirkqualität und Wirkquantität sowie in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften unterscheiden können.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Eigenschaften der Enantiomere einiger chiraler Arzneistoffe beschrieben. Ein Beispiel für eine schwerwiegende Nebenwirkung ist die teratogene Wirkung des Schlafmittels Thalidomid (Contergan®), für die nur eines der Enantiomere verantwortlich ist.[3] Nicht immer sind die Unterschiede so gravierend. Oft unterscheiden sich die Enantiomere nur in ihrer Wirkstärke wie beim  $\beta$ -Blocker Propranolol, bei dem die S-Form stärker wirksam ist.[4] Interessant sind auch Fälle, bei denen nur ein Enantiomer wirksam ist. Hierzu gehört das Methadon, bei dem nur die R-Form analgetisch wirkt.[5] Ein Beispiel für entgegengesetzte Wirkungen der Enantiomere ist der Calciumkanal-Ligand Bay K 8644, dessen S-Form agonistisch und die R-Form antagonistisch wirkt.[6] Pharmakokinetische Unterschiede sind beim aktiven Transport durch chirale Carrier-Systeme möglich, da hier im Gegensatz zum passiven Transport durch Diffusion, bei dem es durch gleiche physiko-chemische Eigenschaften der Enantiomere keine Unterschiede gibt, die dreidimensionale Struktur eine entscheidende Rolle spielt. Beispiele hierfür sind aus Aminosäuren aufgebaute Arzneistoffe, die in der natürlichen (S)-Konfiguration besser resorbiert werden (z.B. (S)-Dopa).[7]

Die Beispiele verdeutlichen die Notwendigkeit, die einzelnen Enantiomere einer pharmakologischen Prüfung zu unterziehen. Zulassungsbehörden in den USA, Japan und den EU-Ländern haben bereits Vorschriften eingeführt, die eine ausführliche chemische und pharmakologische Charakterisierung der Enantiomere fordern.[8], [9] Ergeben sich Unterschiede, müssen die Enantiomere getrennt und nur das optimale Enantiomer darf in den Handel gebracht werden. Diese Vorschriften wurden 1997 in einer Konferenz zur weltweiten Harmonisierung der Richtlinien für chirale Arzneistoffe international angepasst.[10]

## 1.4 Razematspaltung

Voraussetzung zur Charakterisierung der Enantiomere ist ihre Isolierung aus dem razemischen Gemisch. Der Vorgang nennt sich Razematspaltung. Das

Trennprinzip beruht auf chiraler Erkennung, wobei das Gemisch mit einer chiralen Substanz umgesetzt wird, die unterschiedliche Komplexe mit den Enantiomeren eingeht. Auf Grund der unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der gebildeten diastereomeren Komplexe können diese getrennt werden. Eine klassische indirekte Methode ist die fraktionierte Kristallisation, bei der diastereomere Salze mit unterschiedlicher Löslichkeit gebildet werden.[11] Zunehmende Bedeutung haben enzymatische und biotechnologische Verfahren, die die Selektivität und vor allem die unterschiedlichen Geschwindigkeiten der Umsetzung der Enantiomere ausnutzen und auch großtechnisch eingesetzt werden können.[3]

Für die analytische Anwendung ist die direkte Trennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung chiraler stationärer Phasen (CSP) eine weitverbreitete Methode.[12]

Allerdings fehlen zur Zeit sowohl validierte Methoden als auch die notwendige Erfahrung, um für eine Enantiomerentrennung gezielt eine geeignete CSP auswählen zu können.

## 1.5 Anwendung von Molecular Modelling

Es besteht ein großes Interesse an der Aufklärung des chiralen Trennmechanismus der verschiedenen Trennsysteme, um die Trennverfahren schneller und vor allem wirtschaftlicher validieren zu können. Zur Simulation des Trenngeschehens und damit zum besseren Verständnis dieser komplexen Vorgänge hat die Methode des Molecular Modelling in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen.[13], [14], [15], [16] Fortschritte in der Computertechnologie erlauben die immer genauere Simulation der experimentellen Vorgänge. Auf diese Weise kann die Eignung eines Trennsystems für bestimmte Raze-mate bewertet und Vorhersagen zum Trennergebnis gemacht werden. Hierbei darf nicht vergessen werden, dass die berechneten Trenndaten auf einem Modell basieren, das zwar alle Parameter so gut wie möglich wiedergibt, der Realität aber nicht exakt entspricht. Durch den Einsatz von Molecular Modelling-Verfahren werden die experimentellen Validierungsprozesse nicht ersetzt. Sie können aber durch Kombination der theoretischen Ergebnisse mit experimentellen Daten rational optimiert und daher wirtschaftlicher gestaltet werden.



## **2 Grundlagen zur Arbeit**



## 2.1 Molekulare Wechselwirkungen

Wichtigste Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung der unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen zwei Substanzen. Deshalb werden diese Vorgänge im Folgenden kurz erklärt und die Möglichkeiten, diese mit Methoden des Molecular Modellings zu berechnen, vorgestellt.

Die molekulare Erkennung zweier Substanzen und die daraus resultierende Wechselwirkung wird durch physikalisch-chemisch definierbare Kräfte bestimmt. Diese sind abhängig von der Art und Anzahl der an der Interaktion beteiligten Partialstrukturen und deren räumlicher Anordnung.

Folgende Wechselwirkungsarten werden unterschieden:

### 2.1.1 Elektrostatische Wechselwirkungen

Zu den elektrostatischen Wechselwirkungen gehören die Ion-Ion-, Ion-Dipol- und Dipol-Dipol-Interaktion. Ionische Interaktionen besitzen von allen Bindungsarten die größte Reichweite und sind daher der entscheidende Faktor dafür, dass sich zwei Moleküle wahrnehmen und zueinander finden. Die Anziehungskraft ist direkt proportional zu der Größe der Ladungen der beteiligten Moleküle und nimmt mit zunehmender Entfernung der Moleküle ab. Elektrostatische Wechselwirkungen sind außerdem umgekehrt proportional abhängig von der Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ), die ein Maß für den dämpfenden Einfluss des Mediums darstellt. Hohe Dielektrizitätskonstanten vermindern die elektrostatische Anziehungskraft, aber selbst in Wasser ( $\epsilon = 80$ ) hat sie noch einen entscheidenden Einfluss. Die Bindungsenergie einer ionischen Wechselwirkung beträgt ca. 30 kJ/mol, bei Ion-Dipol- oder Dipol-Dipol-Interaktionen beträgt sie ca. 5 kJ/mol. Oft werden elektrostatische Wechselwirkungen von geladenen Partialstrukturen durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke stabilisiert.

Elektrostatische Wechselwirkungen werden durch das Coulomb'sche Gesetz gut wiedergegeben.

### 2.1.2 Wasserstoffbrücken-Bindungen

Bei einer Wasserstoffbrücke bildet sich zwischen einem kovalent gebundenen Wasserstoffatom an einem elektronegativen Protonendonator (D) und dem freien Elektronenpaar eines anderen ebenfalls elektronegativen Protonenakzep-

tors (A) eine Bindung aus. Im Prinzip verbindet ein Proton mit positiver Partialladung zwei Atome mit negativen Partiaalladungen, die meistens Sauerstoff- oder Stickstoff-, selten Schwefel- oder Fluoratome sind. Wasserstoffbrücken bestehen zu etwa 50% aus elektrostatischen Wechselwirkungen (Dipol-Dipol-Interaktion). Durch Annäherung der Atome resultiert eine Überlappung der Orbitale, so dass sie auch einen kovalenten Anteil besitzen. Wegen des kovalenten Anteils unterliegen Wasserstoffbrücken einer strengen Geometrieabhängigkeit. Sie können nur ausgebildet werden, wenn der Abstand zwischen Protonendonator und Protonenakzeptor maximal 2,8 bis 3,2 Å beträgt und der Winkel D–H...A zwischen 100 – 180° liegt.[3] Die Bindungsenergie beträgt, je nach Abstand, bis zu 30 kJ/mol. Amide sind zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken besonders geeignet, da sie sowohl als Protonen-Akzeptor, als auch als Protonen-Donator fungieren können.

Das Auftreten von Wasserstoffbrücken wird in den Kraftfeldmethoden über die oben genannten Geometriekriterien definiert. Allerdings wird die Wechselwirkungsenergie nicht in allen Kraftfeldern korrekt berechnet, da sie oft nur aus dem elektrostatischen Anteil besteht, und der kovalente Anteil der Orbitalüberlappung unberücksichtigt bleibt.

### 2.1.3 Charge-Transfer-Interaktion (C.T.-Interaktion)

Eine C.-T.-Interaktion kann zwischen elektronenreichen und elektronenarmen  $\pi$ -Systemen ausgebildet werden. Es entsteht ein Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplex (EDA-Komplex), in dem der Elektronen-Donator reversibel Elektronen auf den Elektronen-Akzeptor überträgt. Zwei Voraussetzungen müssen erfüllt sein. Zum einen müssen die beteiligten Orbitale so angeordnet sein, dass es zu einer Überlappung kommt. Außerdem muss der Unterschied zwischen der Energie des HOMOs (Highest occupied Molecular Orbital) des Donators, welches das Elektron in das LUMO (Lowest unoccupied Molecular Orbital) des Akzeptors abgibt, geringer sein als der Energieunterschied zum LUMO des Donators. Die Bindungsenergie beträgt bis zu 30 kJ/mol. Ein Beispiel für ein elektronenarmes System sind Dinitroaromaten, bei denen die Nitrogruppen durch einen -I und -M-Effekt dem Ringsystem Elektronen entziehen. Elektronenreich sind zum Beispiel Aromaten mit zusätzlichen Substituenten mit +I und +M-Effekt, wie z.B. das Methoxychinolin. Zur theoretischen Beschreibung von Charge-Transfer-Komplexen müssen quantenchemische Berechnungen durchgeführt werden, da Kraftfelder keinen Term für diese Interaktion enthalten.

#### 2.1.4 Dispersionskräfte

Dispersionskräfte sind elektrostatische Wechselwirkungen, die in apolaren Molekülen durch schwache temporäre Dipole, die auf den ständig wechselnden Aufenthaltsort der Elektronen in den Orbitalen zurückzuführen sind, entstehen. Ihre Bindungsenergie ist mit ca. 2 kJ/mol pro Methylengruppe entsprechend gering und sehr stark vom Abstand abhängig; sie fällt mit der 6. Potenz des Abstandes. Durch großflächigen Kontakt kann ihr Einfluss allerdings beachtlich werden.

Diese Wechselwirkung wird in Kraftfeldern mit einem eigenen Term (Lennard-Jones- Potential) berücksichtigt.

#### 2.1.5 Hydrophobe Wechselwirkungen

Hydrophobe Wechselwirkungen entstehen zwischen apolaren Strukturen in wässriger Lösung. Auf diese Weise werden z.B. Proteinraumstrukturen stabilisiert oder Mizellen gebildet. Die treibende Kraft ist nicht nur Attraktion zwischen den apolaren Molekülen, sondern vor allem ein entropischer Effekt. Wassermoleküle liegen in Clustern vor, d.h. sie sind untereinander mit bis zu vier Wasserstoffbrücken verbunden. Diese werden in einem dynamischen Prozess gelöst und wieder neu gebildet. Durch Lösen einer apolaren Substanz, wird dieser Ordnungszustand weiter erhöht, da die Wassermoleküle feste Positionen um die Moleküle einnehmen. Eine derartige Ordnungszunahme ist energetisch ungünstig, da dadurch die Entropie, das Maß für die Unordnung eines Systems, abnimmt. Lagern sich nun apolare Bereiche zusammen, wird ein Teil des gebundenen Wassers wieder frei, die Entropie des Systems erhöht und folglich werden die apolaren Komplexe begünstigt. Zusätzlich erfolgt eine Stabilisierung der Komplexe durch Dispersionskräfte. Die Bindungsenergie der hydrophoben Wechselwirkung ist gering (ca. 2 kJ/mol).

Hydrophobe Wechselwirkungen sind in den Kraftfeldern nicht enthalten. Bei Molekül-Dynamik-Berechnungen mit einer Wasserbox, d.h. mit einem Lösungsmittel, das aus expliziten Wassermolekülen besteht, kann man jedoch nach einer Dynamik mit Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen eine minimale Verbesserung der Energiewerte des Wassers sehen.

### 2.1.6 Sterische Abstoßung

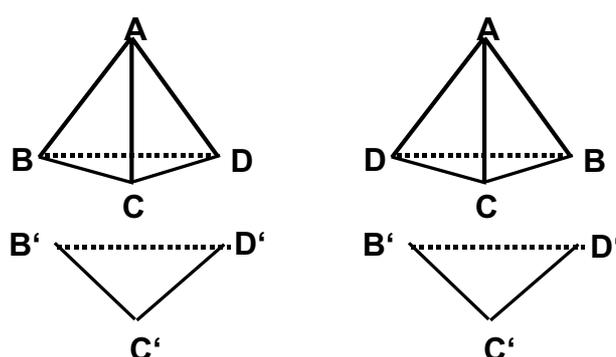
Moleküle können sich nur bis zu ihren van der Waals Radien annähern. Besitzt eine Substanz großvolumige Reste, so können diese möglicherweise die Ausbildung von attraktiven Wechselwirkungen verhindern, oder sie dirigieren die Moleküle in eine bestimmte Ausrichtung zueinander und vermitteln so selektive Interaktionen.

Literaturstellen zum Kapitel 2.1 [5], [17]

## 2.2 Chirale Erkennung

Die Wechselwirkungen von Enantiomeren mit achiralen Molekülen sind auf Grund ihrer identischen physiko-chemischen Eigenschaften gleichartig. Bei Interaktionen mit einer ebenfalls chiralen Substanz kommt es durch die unterschiedliche dreidimensionale Struktur der Enantiomere zu stereospezifischen Wechselwirkungen. Wenn stabile diastereomere Komplexe gebildet werden, spricht man von chiraler Erkennung.

Ein erstes Modell zur Beschreibung der chiralen Erkennung, die sogenannte Drei-Punkte-Wechselwirkung, wurde von Easson und Stedman bereits 1933 formuliert.[18] Es erklärt abweichende pharmakologische Aktivitäten von Enantiomeren durch das stereochemisch bedingte unterschiedliche Bindungsverhalten am Rezeptor. Die Autoren postulierten, dass zur selektiven Erkennung der Enantiomere drei der vier Substituenten des chiralen Kohlenstoffatoms eine spezifische Wechselwirkung eingehen müssen (Bild 2.1).



Enzyme / Rezeptor

Bild 2.1 Drei-Punkte-Wechselwirkungsmodell zur chiralen Erkennung nach Easson und Stedmann

Da die Interaktionen auf Grund der unterschiedlichen dreidimensionalen Struktur der Enantiomere variieren, kommt es nur in dem linken Fall zur Bildung eines stabilen Komplexes.

Das Modell wurde 1948 von Ogston wieder aufgegriffen, der es zur Erklärung der enzymatischen Decarboxylierung von L-Serin benutzte.[19]

In den fünfziger Jahren wurde das Modell für den Bereich der biologischen Enantioselektivität allgemein anerkannt, und Dalgliesh übertrug es in die Chromatographie.[20] Das Drei-Punkte-Modell wurde fortan für die Erklärung der Enantiomerentrennung an chiralen stationären Phasen benutzt und war die Grundlage zur Entwicklung zahlreicher neuer chiraler Phasen (Bild 2.2).

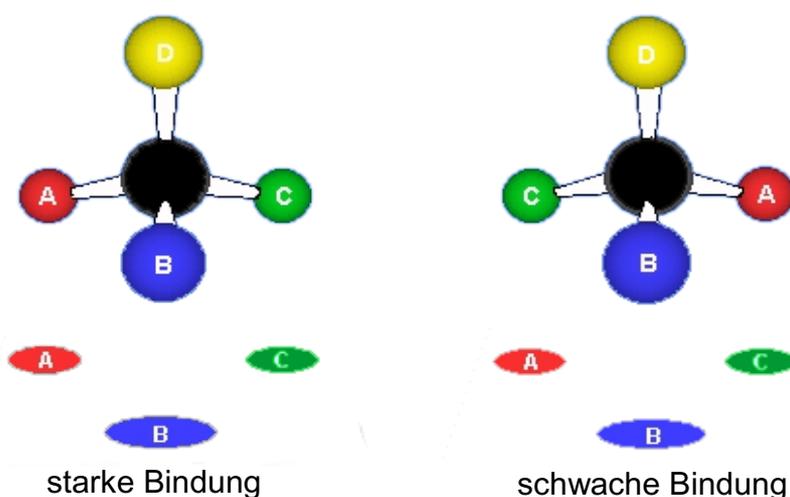


Bild 2.2 Drei-Punkte-Modell zur chiralen Erkennung

In den folgenden Jahren wurde die Drei-Punkte-Wechselwirkung näher untersucht.

Die höchste Enantioselektivität wird erreicht, wenn die drei Interaktionen von den Substituenten des Chiralitätszentrum ausgehen.

Doch auch die Kombination von zwei direkten Wechselwirkungen mit einer dritten im Abstand zum chiralen Kohlenstoff führt zu einer Trennung. Vor allem dann, wenn die dritte Wechselwirkung einen großen Einfluss auf die räumliche Orientierung der Moleküle zueinander hat. Dies ist z.B. bei  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen aromatischen Systemen der Fall. Manchmal reicht dann sogar eine einzige zusätzliche, direkt vom chiralen Kohlenstoff ausgehende Bindung für eine Enantiomerentrennung aus.

Zusätzlich werden auch repulsive, sterische Wechselwirkungen als dritte Interaktion berücksichtigt. Diese können durch sterische Abstoßung und Dirigierung der Moleküle zueinander eine enantiospezifische Komplexgeometrie verursachen, die zu chiraler Erkennung führt.

Diese Beschreibungen der chiralen Erkennung, bei denen die dritte Interaktion nicht von chiralen Kohlenstoff ausgeht, wurden sowohl von Pirkle und Pochapsky [21] als auch von Topiol und Sabio [22] als Pseudo-Zwei-Punkte-Modell bezeichnet.

Von nur zwei nötigen Interaktionspunkten gehen Sokolov und Zefirow in ihrem Zwei-Punkte-Modell aus.[23] Hierbei müssen die zwei Interaktionen für jedes Enantiomer eine spezifische, räumliche Orientierung bedingen, so dass die resultierenden Komplexgeometrien eine Trennung ermöglichen. Zusätzlich kann durch unterschiedliche starke Wechselwirkung der Enantiomere mit dem achiralen Teil der stationären Phase die Trennung verbessert werden.[24]

Die Anzahl der für eine erfolgreiche Trennung nötigen Wechselwirkungen ist abhängig von der Rigidität der Moleküle. Eine sehr flexible Struktur mit einem chiralen Kohlenstoffatom mit frei drehbaren Bindungen benötigt drei simultane Wechselwirkungen. Bei rigiden Strukturen reichen zwei Wechselwirkungen, die vom chiralen Zentrum auch weiter entfernt sein können, aus. Daher werden rigide Strukturen bevorzugt als chirale stationäre Phasen eingesetzt.[25]

Alle Modelle haben den Nachteil, dass die chirale Erkennung als statischer Prozess betrachtet wird. Erst 1996 haben Booth und Wainer auch bei der chiralen Erkennung dynamische Gesichtspunkte berücksichtigt. Sie führten eine *quantitative-enantioselective retention relationship* Studie durch (QESRR) [26]. Dabei wurden Strukturdaten mit experimentellen Retentionsergebnissen in Beziehung gesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden eingesetzt, um mit Molecular Modelling Methoden Wechselwirkungskomplexe aufzubauen und mögliche Interaktionen auf ihre Enantioselektivität hin zu prüfen. Booth und Wainer beschreiben die chirale Erkennung als einen dreistufigen Prozess:

- Schritt 1 Verteilung der Enantiomere an der CSP über eine erste Wechselwirkung
- Schritt 2 Anpassung der Konformation der Enantiomere an die CSP
- Schritt 3 Stabilisierung der gebildeten Komplexe durch weitere Wechselwirkungen, die sich durch die Konformationsanpassung enantioselectiv ergeben und damit die chirale Erkennung ermöglichen.

Diese Schritte charakterisieren den dynamischen Prozess der chiralen Erkennung. Die erste Wechselwirkung mit der CSP ist dafür verantwortlich, dass es überhaupt zu einem Kontakt mit der Säule kommt. Im Unterschied zu den vorherigen Modellen kann die erste Wechselwirkung für beide Enantiomere gleich sein. Erst anschließend kommt es zu einer optimalen räumlichen Anpassung der Struktur der Enantiomere durch die Wechselwirkungen an der CSP, die für beide unterschiedlich sein muss. Im zeitlichen Ablauf stabilisieren weitere Wechselwirkungen den Komplex und ermöglichen dadurch eine Enantiomerentrennung.

### 2.2.1 Chirale Trennung

Bei der Betrachtung dieser Theorien darf nicht vergessen werden, dass die Enantiomerentrennung ein thermodynamischer Prozess ist.

*Chirale Erkennung bedeutet noch nicht chirale Trennung.*

Die Trennung von Enantiomeren ist nur dann möglich, wenn der Unterschied der freien Energie  $\Delta\Delta G$  der gebildeten Wechselwirkungskomplexe groß genug ist. Die freie Energie setzt sich aus dem Enthalpie-Unterschied  $\Delta\Delta H$  und dem Entropie-Unterschied  $\Delta\Delta S$  zusammen. Normalerweise ist die Enthalpie für die Trennung entscheidend. Der Entropieunterschied kann nur dann bedeutend werden, wenn die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle, die an den enantio-selektiven Komplex direkt beteiligt sind, zwischen den Enantiomeren stark unterschiedlich ist. Durch Fixierung der Lösungsmittelmoleküle resultiert ein erhöhter Ordnungszustand (Entropieverlust). Dieser ungünstige Vorgang kann durch Temperaturanpassung ausgeglichen und so die chirale Trennung ermöglicht werden.[27]

Schon sehr geringe Unterschiede mit  $\Delta\Delta G = 0,024$  kJ/mol führen zu einer Selektivität ( $\alpha$ ) von  $\approx 1,01$ . Hier kann man zwar kaum von Selektivität sprechen, aber mit modernsten, optimal validierten chromatographischen Methoden wäre eine Trennung möglich. Mit steigenden  $\Delta\Delta G$ -Werten nimmt die Selektivität exponentiell zu. [25]

Solche geringen Energieunterschiede sind mit Kraftfeld-Verfahren schlecht zu simulieren, da nicht alle Wechselwirkungsarten, die in der freien Energie enthalten sind, in Kraftfeldmethoden berechnet werden können (Kapitel 2.1).

## 2.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) gehört zu den chromatographischen Verfahren, welche die Trennung von Stoffgemischen und den Nachweis der Einzelkomponenten zum Ziel haben. Die Trennung erfolgt über physikalische Vorgänge durch Adsorption und Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen. Bei der HPLC werden eine feste, stationäre Phase und eine flüssige, mobile Phase verwendet.[38]

### 2.3.1 Aufbau

Die HPLC ist eine weiterentwickelte Säulenchromatographie. Das Prinzip beruht auf einer kleineren Korngröße des Säulenmaterials, wodurch die Trennleistung zunimmt. Allerdings muss auch mit hohen Drücken (bis 350 bar) gearbeitet werden. Trotz des technischen Aufwandes hat sich die HPLC wegen ihrer Leistungsfähigkeit als Routinemethode durchgesetzt. Die Apparatur (Bild 2.3) besteht im einfachsten Fall aus einer Pumpe mit Elutionsmittelreservoir, dem Probenaufgabesystem, der Trennsäule und dem Detektor mit Schreiber.

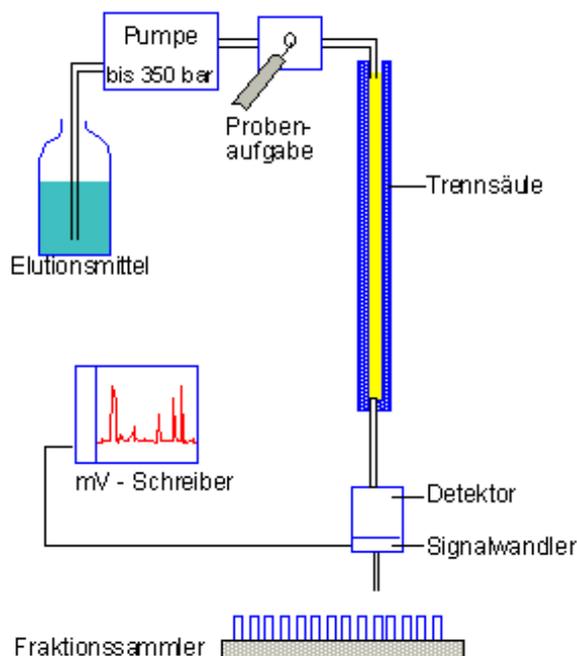


Bild 2.3 Schema einer HPLC- Apparatur[28]

### 2.3.2 Multistep-Verfahren

Das HPLC-Verfahren gehört zu den Multistep-Verfahren. Es ermöglicht die effektive Auftrennung von sehr ähnlichen Substanzen, da eine Trennung über viele, nacheinander mit dem Säulenmaterial gebildete Wechselwirkungskomplexe erfolgt. Die Trennung erfolgt kumulativ über die Zeit.

### 2.3.3 Chromatographische Kenngrößen

Die Ergebnisse der HPLC werden in einem Chromatogramm dargestellt.

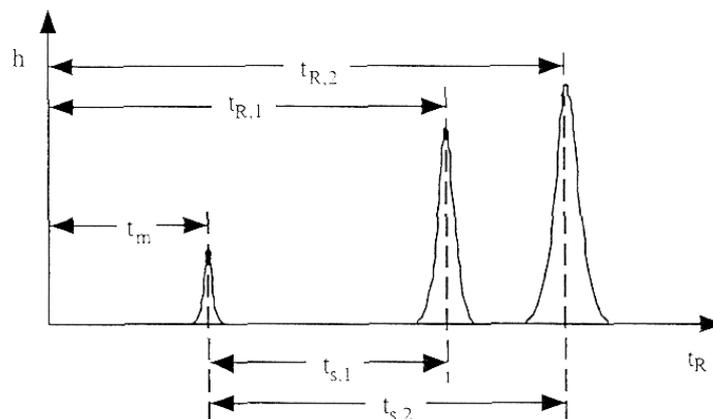


Bild 2.4 HPLC-Chromatogramm[16]

Wichtige Kenngrößen sind:

#### Retentionszeit ( $t_R$ ):

Die Retentionszeit ist die Gesamtzeit, die eine Substanz sowohl in der mobilen als auch in der stationären Phase verbringt. Man nennt sie auch Brutto-retentionszeit ( $t_{m+s}$ ).

Sie setzt sich aus der

**Totzeit ( $t_m$ )**, Aufenthalt der Substanz nur in der mobilen Phase, und der

**Nettoretentionszeit ( $t_s$ )**, Aufenthalt der Substanz in der stationären Phase, zusammen.

Sie ist abhängig vom Verteilungskoeffizienten  $K$  zwischen den Phasen, der Temperatur und der Trägergeschwindigkeit.

**Kapazitätsverhältnis ( $k'$ ):**

Das Kapazitätsverhältnis ist ein relatives Maß für die Retention und der Quotient aus der Nettoretentionszeit und der Totzeit. Es entspricht dem Verhältnis der Aufenthaltszeit in der stationären Phase zur Aufenthaltszeit in der mobilen Phase.  $k'$  wird benötigt, um die Selektivität zu berechnen.

$$k' = \frac{t_s}{t_m} \quad (2.1)$$

**Selektivität ( $\alpha$ ):**

Die Selektivität ergibt sich aus den  $k'$ -Werten zweier Substanzen. Je weiter die  $k'$ -Werte auseinander liegen, desto besser ist ihre Trennung. Die Selektivität wird durch das Verhältnis  $\alpha$  der  $k'$ -Werte der beiden Substanzen 1 und 2 beschrieben, wobei der Quotient aus der längeren durch die kürzere Retention gebildet wird. Beträgt  $\alpha = 1$  so sind die Substanzen in dem ausgewählten System nicht zu trennen.[38]

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (2.2)$$

**2.4 HPLC mit chiralen stationären Phasen**

Besonders anwenderfreundlich ist die direkte Enantiomerentrennung mit enantioselektiven CSP.

Entscheidende Vorteile dieser Methode sind nicht nur die erhöhte Selektivität durch das multistep-Verfahren, sondern auch die für die Substanz schonende Vorgehensweise. Die Enantiomere stehen nach der Trennung isoliert und unverändert im gleichen Lösungsmittel zum weiteren Einsatz zur Verfügung. Außerdem wird bei niedrigen Temperaturen, meist bei Raumtemperatur gearbeitet, so dass eine Razemisierung der CSP, wie sie bei den hohen Temperaturen der Gaschromatographie beobachtet wird, auszuschließen ist.[29]

Die CSP werden je nach ihrem Trennmechanismus in verschiedene Klassen eingeteilt.

### **Pirkle-Phasen**

Pirkle-Phasen bestehen aus kleinen Molekülen mit möglichst vielen funktionellen Gruppen für simultane Interaktionen zur chiralen Erkennung. Sie sind nach dem Vorbild der Drei-Punkte-Wechselwirkung zur chiralen Erkennung entstanden und ermöglichen meist Wasserstoffbrücken-Bindungen, Dipol-Dipol Wechselwirkungen und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen.

Als Beispiel für einen Trägerstoff sei (R)-N-(3,5 Dinitrobenzoyl) phenylglycin genannt.[30]

### **Polymer-Phasen**

Polymer-Phasen (z.B. Cellulosederivate) werden hauptsächlich für semipräparative und präparative Trennungen verwendet. Ihr Trennmechanismus ist nicht genau aufgeklärt. Auch hier sind Wasserstoffbrücken und Dipol-Dipol-Interaktionen möglich. Entscheidend ist aber, dass diese Wechselwirkungspunkte auch in einer Höhlenstruktur liegen und so die Enantioselektivität durch sterische Abstoßung in Vergleich zu Interaktionen an der Oberfläche erhöht wird.[31]

### **Cyclodextrine**

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die sechs, sieben oder acht Glucoseeinheiten  $\alpha$ -(1,4)-glycosidisch verknüpft enthalten. Zusammengesetzt bilden sie eine Röhre in der eine Trennung durch Einschlussverbindungen möglich ist. Diese Komplexe basieren auf hydrophoben Wechselwirkungen im Inneren und hydrophilen Interaktionen am Rand der Röhren.[15]

### **Protein-Phasen**

Die Trenneigenschaften von Proteinphasen beruhen entscheidend auf ionischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen. Hierbei haben sich u.a.  $\alpha_1$  saures Glucoprotein, Rinder und humanes Serumalbumin (B/HSA) als vorteilhaft erwiesen.[30],[32]

### **Liganden-Austausch-Phasen**

Der chirale Selektor von Liganden-Austausch-Phasen besitzt eine geladene Partialstruktur, mit der durch elektrostatische Anziehung geladene Enantiomere an die Säule gebunden werden. Dieser erste Kontakt muss noch nicht enantio-selektiv sein. Die Trennung erfolgt durch weitere Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrücken oder  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen.[21]

## 2.5 Chinin

Chinin gehört zu den China-Alkaloiden, den Inhaltsstoffen der Chinarinde (*Cortex chinae*). Für die industrielle Nutzung wird es aus der gelben Chinarinde (*Cinchona calisaya*) isoliert, die einen besonders hohen Chiningehalt besitzt. Obwohl eine Totalsynthese des Chinins möglich wäre, wird es aus der Droge durch einen basischen Aufschluss extrahiert, da dieses Verfahren kostengünstiger ist.[33]

Chinin besteht aus einem planaren Chinolin- und einem rigiden Chinuclidinring. Diese sind über eine Hydroxymethyl-Brücke verbunden. In 6'-Position des Chinolinrings befindet sich eine Methoxygruppe. Die unterschiedlichen funktionellen Gruppen, wie der sekundäre Alkohol, die beiden unterschiedlich basischen Stickstoffe und das heteroaromatische Ringsystem bieten eine große Anzahl an unterschiedlichen Wechselwirkungsmöglichkeiten.

Chinin besitzt vier asymmetrische Kohlenstoff-Atome und einen chiralen Stickstoff. Von den fünf Asymmetriezentren sind die chiralen Kohlenstoffe an Position acht und neun für die chirale Trennung entscheidend. Die beiden chiralen Kohlenstoffatome im Chinuclidinring sind auf Grund der Biosynthese immer gleich konfiguriert (3R,4S).[34] Aufgrund der zwei verbleibenden chiralen C-Atome an den Positionen acht und neun existieren vier Stereoisomere.

Von analytischem Interesse sind die Diastereomere Chinin (8S,9R) und Chinidin (8R,9S). Epi-Chinin (8S,9S) und Epi-Chinidin (8R,9R) werden nicht eingesetzt, da Untersuchungen gezeigt haben, dass sie keine deutlichen enantioselektiven Wechselwirkungen eingehen.[35]

Die Diastereomere Chinin und Chinidin (Bild 2.5) besitzen entgegengesetzte chirale Wechselwirkungen. So zeigen sie zum Beispiel bei experimentellen chromatographischen Trennungen umgedrehte Elutionsreihenfolgen. Sie sind quasi-Enantiomere.

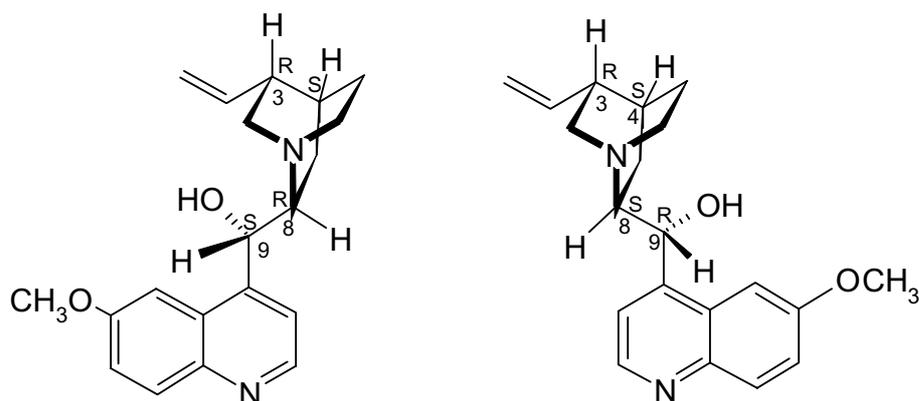


Bild 2.5 Chinin und Chinidin

Ihre hervorragende Eignung zur chiralen Trennung wurde früh erkannt. Schon 1853 benutzte Louis Pasteur Chinin als chirale Hilfsbase zur Razemattrennung durch Bildung diastereomerer Salze.[36] Chinaalkaloide werden häufig als chirale Hilfsbasen zur fraktionierten Kristallisation, als asymmetrische Katalysatoren, für asymmetrische Synthesen oder als chiraler Selektor in der direkten chromatographischen Enantiomerentrennung eingesetzt.[37]

### 2.5.1 Chinin als chiraler Selektor in der HPLC

Bei der Enantiomerentrennung an CSP werden als Säulenmaterialien sogenannte RP-Säulen (reversed phase) verwendet. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Kieselgele, deren Silanolgruppen mit Alkylgruppen derivatisiert worden sind, so dass eine lipophile Phase entsteht. Solche stationäre Phasen sind nicht enantioselektiv. Zur Herstellung einer CSP wird zuerst der chirale Selektor über eine Brücke (Spacer) kovalent an das Silanol gebunden und anschließend die verbleibenden polaren Gruppen alkyliert (Endcapping).[38]

#### 2.5.1.1 Verankerung des Chinins an der Säule

Bei der Entwicklung einer geeigneten CSP stellt sich die Frage, mit welcher funktionellen Gruppe das Chinin mittels einer Brücke an das Kieselgel befestigt werden soll.

Zuerst wurden die Hydroxylgruppe an C<sub>9</sub> und der Stickstoff des Chinuclidinrings für die Verankerung untersucht. Diese Bindungsstellen erwiesen sich als ungünstig, weil auf diese Weise entscheidende Wechselwirkungsmöglichkeiten zur chiralen Erkennung blockiert werden. Als optimal erwies sich die

Vinylgruppe des Chinuclidinrings an der ein Thioetherspacer befestigt wurde, da hierdurch weder potentielle Interaktionen blockiert, noch durch den Spacer sterisch behindert werden.[39]

### 2.5.1.2 Optimierung des Spacers

Die zweite Frage betrifft die Gestaltung des Spacers. Hier wurden zwei unterschiedlich lange Alkylketten untersucht. Je nach Polarität der zu trennenden Enantiomere erwies sich eine längere, lipophilere oder eine kürzere polare Brücke als günstiger. Da viele pharmazeutisch oder biologisch interessante Razemate polare Strukturen enthalten, wird als Spacer überwiegend ein Propylthiolether verwendet.[40]

Die so hergestellte CSP mit Chinin als chiralem Selektor stellt nicht nur durch die außerordentlich gute Fähigkeit des Chinins zu multiplen Interaktionen, sondern auch durch die kostengünstige Herstellung und die hohe Stabilität der Säule ein sehr interessantes Werkzeug zur Enantiomerentrennung dar.

### 2.5.1.3 Mobile Phase

Die mobile Phase besteht häufig aus einem Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 80:20. Untersuchungen bei verschiedenen pH-Werten und Pufferzusätzen zeigten, dass die Selektivität für saure Enantiomere steigt, wenn der Stickstoff des Chinuclidinrings protoniert vorliegt. Bei diesen pH-Bedingungen sollten die Säuregruppen der Razemate dissoziiert sein. Damit kann das Trennprinzip der chininbasierten CSP als **chirale Anionen-Austauscher-Chromatographie** bezeichnet werden. Die Variation des pH-Wertes zeigte, dass es am günstigsten ist, bei pH = 5,5 bis 6 zu arbeiten. Bei diesen Bedingungen liegt der Stickstoff des Chinuclidinrings ( $pK_a \sim 8,8$ ) protoniert vor, während die Carboxylatgruppe der Enantiomere ( $pK_a \sim 4$ ) deprotoniert ist. Bei höheren pH-Werten nehmen sowohl die Retention als auch die Selektivität ab, da die ionische Wechselwirkung an Bedeutung verliert.[40], [41]

Die Pufferzusätze (Ammoniumacetat / Essigsäure) beeinflussen die Selektivität nicht, wohl aber die Retentionszeit, da durch das Vorhandensein der Acetat-anionen die Enantiomere schneller von der Säule gespült werden. Da die Selektivität unbeeinflusst bleibt, kann durch die Pufferkonzentration eine praktikable Retentionszeit eingestellt werden.[40]

### 2.5.1.4 Optimierung des Chinins als Selektor

Durch chromatographische Untersuchungen und NMR-spektroskopische Analysen wurde die Hydroxylgruppe an C<sub>9</sub> und die Methoxylgruppe des

Chinolinrings als wichtige Wechselwirkungspartner erkannt. Die Hydroxylgruppe an C<sub>9</sub> kann als Wasserstoffbrücken-Donator agieren. Die Methoxygruppe an 6'-Position erhöht die Selektivität durch sterische Effekte.[39]

Die Bedeutung der Wasserstoffbrücken-Donatoreigenschaft wurde weitergehend analysiert. Hierzu wurde Chinin mit einem an der Hydroxylgruppe tert.-butylcarbamoyleierten Derivat verglichen.[42] Beide CSPs haben die Möglichkeit als Wasserstoffbrücken-Donator zu fungieren, das Chinin mit der Hydroxylgruppe und das Derivat mit der NH-Gruppe des Carbamats. Zum Vergleich wurden zwei verschiedene Enantiomerenpaare getestet. Die gefundenen Retentionszeiten und die Selektivitäten für beide Säulen waren annähernd gleich, wenn die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zur Trennung keine Rolle spielte. War für die chirale Erkennung zusätzlich eine Wasserstoffbrücke nötig, so war das Enantiomerenpaar an der carbamoyleierten Form besser trennbar, die Selektivität stieg um das Mehrfache. Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch andere sterisch aufwändige Strukturen an der Carbamoyl-Seitenkette die Selektivität erhöhen. Am häufigsten wird das tert.-Butylcarbamoyleichinin als chiraler Selektor verwendet.



## **3 Experimentelle Daten**



Die experimentellen Daten als Basis der vorliegende Arbeit entstammen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lindner vom Institut für Analytische Chemie der Universität Wien. In dieser Arbeitsgruppe wurde das untersuchte Trennsystem entwickelt und validiert. Das Trennsystem arbeitet mit carbamoyliertem Chinin als chiralem Selektor und wird zur Enantiomeren-trennung in der HPLC-Analytik eingesetzt. Experimentellen Daten von unterschiedlichen Benzoylleucin-Derivaten bilden die Basis zur Durchführung der theoretischen Untersuchungen.

## 3.1 Das Trennsystem

### 3.1.1 Die chirale stationäre Phase (CSP)

Als chiraler Selektor wurde tert.-Butylcarbamoylchinin kovalent an Kieselgel gebunden. Die Immobilisierung erfolgt durch eine Propylthioether-Brücke, die das Kieselgel mit der ursprünglichen Vinylgruppe des Chinins verbindet. Verbleibende Silanolgruppen wurden mit Propylthiohexanylresten hydrophobisiert, so dass eine RP-Phase entsteht. Diese ist in der folgenden Abbildung (Bild 3.1) dargestellt. Die genaue Entwicklung dieser CSP ist in Kapitel 2.5 beschrieben.

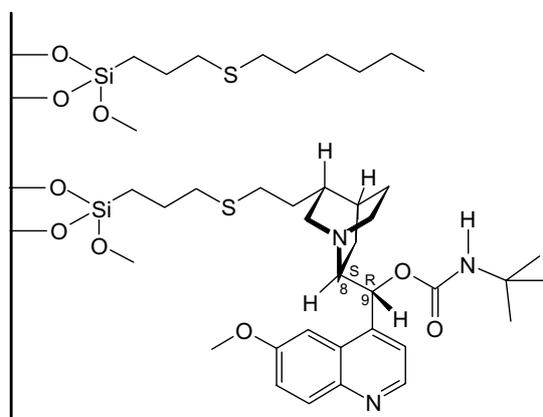


Bild 3.1 CSRP (chirale stationäre reversed phase) mit tert.-Butylcarbamoylchinin als chiralem Selektor

Daten zur Säule:

Säulendimension:	15 cm x 4,6 mm
chirale Selektordichte:	270 $\mu\text{mol}$ / g Kieselgel
spez. Oberfläche des Kieselgels:	340 $\text{m}^2$ / g

### 3.1.2 Die mobile Phase

Als mobile Phase wurde eine Methanol / Wasser-Mischung in Verhältnis 80:20 eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit einem 0,1 molaren Ammoniumacetat-Puffer auf pH = 6 eingestellt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur (298 K) durchgeführt.

### 3.1.3 Eigenschaften des Trennsystems

Das hier gewählte System hat den Vorteil, dass es aus einer rigiden Grundstruktur besteht, die die räumliche Anpassung an den Wechselwirkungs-partner einschränkt und so die Selektivität erhöht.

Die Arbeitsgruppe Lindner hat folgendes Wechselwirkungsmodell (Bild 3.2) für die Trennung von Dinitrobenzoyl-Aminosäuren an dieser CSP aufgestellt.[43], [44]

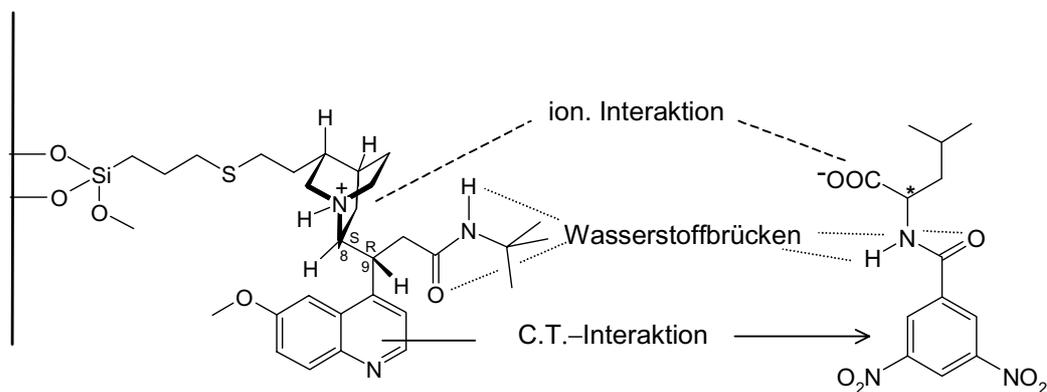
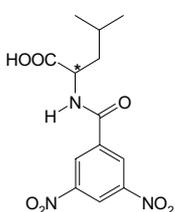
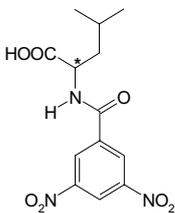
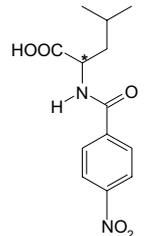
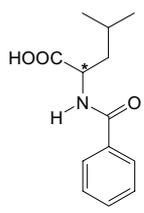


Bild 3.2 Wechselwirkungs-Modell

### 3.2 Retentionsdaten

Die Retentionsdaten ( $k'$ ,  $\alpha$ , Elutionsreihenfolge) der vier Benzoylleucinderivate sind unter den beschriebenen Konditionen entstanden.

Tabelle 3.1 Experimentelle Retentionsdaten

Selektanten	CSP mit t.-Butylcarbamoyl-Chinin		
	$k'$	$\alpha$	stärker bindendes Enantiomer
3,5-Dinitrobenzoylleucin (3,5-DNBL) 	11,74	15,9	S
2,4-Dinitrobenzoylleucin (2,4-DNBL) 	8,63	1,4	S
4-Mononitrobenzoylleucin (4-MNBL) 	7,08	4,1	S
Benzoylleucin (B-Leu) 	5,60	2,6	S

### 3.3 Kristallstruktur

Für den Wechselwirkungskomplex zwischen (S) 3,5-Dinitrobenzoylleucin und carbamoyliertem Chinin existieren die Koordinaten einer Röntgenstrukturanalyse (Bild 3.3).[35]

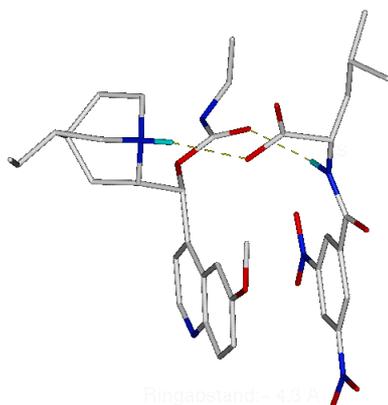


Bild 3.3 Kristallstruktur des 3,5-DNBL im Komplex mit dem chiralen Selektor. Die ionische Interaktion und eine mögliche Wasserstoffbrücke sind markiert.

## **4 Problemstellung und Zielsetzung**



Enantiomere bilden mit ebenfalls chiralen Reaktionspartnern Diastereomerenkomplexe, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden können. So können z.B. die Wechselwirkungen der Enantiomere eines Arzneistoffes mit einem chiralen Rezeptor zu unterschiedlichen Reaktionen führen. Insbesondere in der Arzneimittelentwicklung sind deshalb Untersuchungen zur Pharmakologie und Reinheit von Enantiomeren gesetzlich vorgeschrieben. Grundvoraussetzung für die Analyse der Enantiomere ist ihre Isolierung aus dem racemischen Gemisch.

Die HPLC mit chiralen stationären Phasen ist eine leistungsfähige und schnelle Methode zur Enantiomerentrennung.

Die Auswahl der geeigneten CSP für ein bestimmtes Razemat und die Optimierung des Systems bis zur optimalen Trennung ist ein sehr zeit- und arbeitsintensiver Vorgang. Um diesen Prozess zu vereinfachen, besteht ein großes Interesse daran, dass Trennverhalten von Enantiomeren an einer CSP mit theoretischen Methoden vorherzusagen. Anhand solcher Vorhersagen könnte sowohl eine geeignete CSP bestimmt werden, als auch Vorschläge zur Optimierung der Wechselwirkungen einer verwendeten CSP gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine chirale CSP mit carbamoyliertem Chinin als chiralem Selektor untersucht. Carbamoyliertes Chinin ist als chiraler Selektor besonders gut geeignet, da es durch die enthaltenen Strukturelemente die Ausbildung multipler Interaktionen erlaubt. Zusätzlich verstärkt seine semi-rigide Struktur die Enantioselektivität der Wechselwirkungen, da die räumliche Anpassung der CSP an die beiden Enantiomere eingeschränkt ist.

Auf der Grundlage von experimentellen Daten der Arbeitsgruppe Lindner sollten in der vorliegenden Arbeit durch theoretische Untersuchungen neue Einblicke in den Ablauf des Trennprozesses gewonnen werden, und so die Eignung von carbamoyliertem Chinin zur Trennung bestimmter Razemate getestet und deren Trennergebnis vorhergesagt werden.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Prozedur, mit der ein Wechselwirkungsschritt auf der chiralen Säule unter Berücksichtigung aller experimentellen Bedingungen simuliert werden kann. Als entscheidender Unterschied zu bisher durchgeführten theoretischen Untersuchungen an dieser CSP [45] sollten lange Moleküldynamik-Simulationen im Lösungsmittel, d.h. mit Berücksichtigung expliziter Lösungsmittelmoleküle, durchgeführt werden.

In einem zweiten Schritt sollte dann die entwickelte Arbeitsmethode anhand der zur Verfügung stehenden experimentellen Daten für vier Benzoylleucin-Derivate validiert und überprüft werden.

Ziel war es, die Retentionsreihenfolge und die Selektivität wiederzugeben. Des Weiteren sollten für jedes berechnete Enantiomerenpaar Aussagen über entscheidende Wechselwirkungen und deren Auftreten während der Dynamik getroffen werden.

Abschließend sollte unter Anwendung der Arbeitsmethode eine Vorhersage des Trennverhaltens für ausgewählte Enantiomerenpaare mit unbekanntem experimentellen Trenndaten gemacht werden.

## **5 Methoden, Durchführung und Ergebnisse**



Auf ein gesondertes Kapitel, das sich nur mit den einsetzbaren theoretischen Methoden beschäftigt, wird verzichtet. Detaillierte Beschreibungen der zugrundeliegenden Theorien können aus vorangegangenen Dissertationen des Arbeitskreises Höltje entnommen werden.[46], [47], [48], [49]

Da in einigen Fällen eine spezifische Anpassung der zur Verfügung stehenden Programme an die konkrete Problemstellung der Arbeit nötig war, werden die Grundlagen dieser Methoden in Zusammenhang mit der Durchführung und den Ergebnissen kurz erläutert.

## **5.1 Entwicklung der Arbeitsmethode**

Im ersten Teil der Arbeit soll eine Arbeitsmethode entwickelt werden, mit der unter Berücksichtigung aller experimentellen Bedingungen der Trennvorgang auf der Säule simuliert werden kann.

Trotz Hochleistungsrechner und moderner Software sind die Atom- und Molekülsysteme, die mit theoretischen Methoden in einem akzeptablen Zeitraum berechnet werden können, begrenzt. Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Arbeit die Entscheidung getroffen den Trennvorgang an einem 1:1-Komplex, bestehend aus je einem Molekül des chiralen Selektors und des Enantiomers, zu simulieren, um diese Komplexbildung so genau wie möglich berechnen zu können.

Im Folgenden ist schrittweise der Aufbau der Arbeitsmethode dargestellt.

### **5.1.1 Darstellung der CSP in den Berechnungen**

Zur Simulation der Wechselwirkung auf der Säule wird ein nur Molekül des chiralen Selektors eingesetzt. Der achirale Teil der Säule, das hydrophobisierte Kieselgel, wird nicht in die Simulation mit einbezogen, da es keinen enantioselektiven Einfluss auf die Trennung hat. Der Spacer besteht aus sechs Atomen und besitzt mit fünf frei drehbaren Bindungen eine große konformatorische Freiheit. Folglich kann sich das derivatisierte Chinin an der Säule in alle Richtungen drehen und die Immobilisierung an der Säule muss nicht explizit simuliert werden. Eine Berücksichtigung der Verankerung wäre z.B. durch Kraftkonstanten auf den Atomen des Spacers, sogenannten constraints, möglich. Diese Möglichkeit wird in Kapitel 5.1.5 (S. 54) untersucht. Der Spacer selbst wird in die Berechnungen mit einbezogen, da er mit seinen sterischen Effekten die Bildung der Wechselwirkungskomplexe beeinflusst. So können sich die Enantiomere dem chiralen Selektor z.B. nicht von allen Seiten gleich gut nähern.

In der folgenden Abbildung (Bild 5.1) ist der berücksichtigte Strukturteil der CSP eingerahmt.

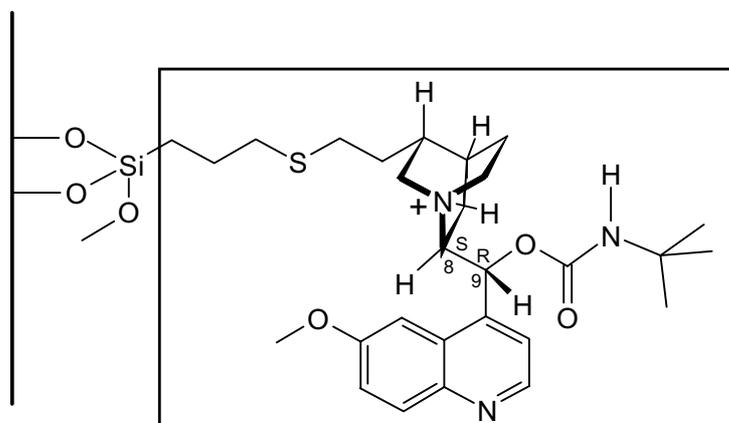
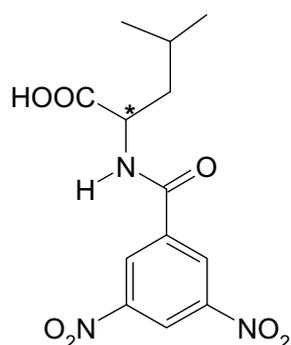


Bild 5.1 CSP, simulierte Teilstruktur eingerahmt

Auch in anderen Arbeiten wurde die zu berechnenden Partialstrukturen einer CSP nach dieses Kriterien ausgewählt.[50]

### 5.1.2 Auswahl des Enantiomerenpaares zur Entwicklung der Arbeitsmethode

Als Basis für diese Arbeit standen die Retentionsdaten von vier unterschiedlichen Benzoylleucinderivaten zur Verfügung. Wie man den experimentellen Daten in Kapitel 3.2 (S. 29) entnehmen kann, unterscheiden sie sich stark in ihrer Selektivität.



Das Enantiomerenpaar mit der deutlich größten Selektivität ist das **3,5-Dinitrobenzoylleucin** (Bild 5.2). Es besitzt einen  $\alpha$ -Wert von 15,88, und wurde daher zur Entwicklung der Arbeitsmethode ausgewählt. Es müsste zumindest tendenziell möglich sein diesen großen Unterschied im Trennverhalten der Enantiomere mit den Kraftfeldberechnungen wiederzugeben.

Bild 5.2 3,5-DNBL

Ermöglichen die Berechnungen eine Wiedergabe des Trennverhaltens des 3,5-DNBL, wird die Arbeitsmethode anschließend mit den Benzoylleucinderivaten geringerer Selektivität überprüft.

### 5.1.3 Aufbau der Moleküle

Der erste Schritt bei Molecular Modelling Untersuchungen ist die Generierung der dreidimensionalen Strukturen der zu untersuchenden Verbindungen im Computer. Im optimalen Fall stehen die Substanzen oder deren Teilstrukturen als Kristallstrukturen zur Verfügung. Eine Sammlung solcher Kristallstrukturen ist die Cambridge Crystallographic Database (CSD).[51] Sie enthält über 150.000 3D-Strukturen kleiner organischer Moleküle und Komplexe und wurde auch für die vorliegende Arbeit als eine wichtige 3D-Strukturquelle verwendet. Liegt keine Kristallstruktur oder nur ein Molekülteil als Kristallstruktur vor, so kann die zu untersuchende Verbindung aus Fragmentbibliotheken, die in den meisten Software Paketen enthalten sind, aufgebaut werden.

Für den ersten Wechselwirkungskomplexes stand eine Kristallstruktur des carbamoylierten Chinins mit dem (S) 3,5-Dinitrobenzoylleucin zur Verfügung [35], die in das Programm SYBYL6.5 [52] eingelesen wurde.

Generierte 3D-Strukturen, auch aus Kristalldatenbanken entnommene Strukturen, besitzen häufig keine optimale Geometrie. Messungenauigkeiten und Kristallpackungskräfte können bei der Aufnahme von Röntgenstrukturen zu abweichenden Bindungslängen und Bindungswinkeln führen. Die Strukturen müssen daher im gewählten Kraftfeld geometrioptimiert werden. Geometrioptimierung bedeutet die Anpassung der Molekülgeometrie auf Standardwerte des Kraftfeldes für Bindungslängen und Bindungswinkel. Dieser Vorgang wird auch als Relaxierung bezeichnet und führt zu einer Struktur mit minimaler Gesamtenergie. Die Geometrioptimierungen dieser Arbeit wurden im Tripos-Kraftfeld mit der Steepest-Descent und der Conjugate-Gradient Methode durchgeführt. Hierbei wurde ein Abbruchkriterium von 0,01 kcal/mol verwendet.

#### 5.1.4 Simulation der mobilen Phase

Die mobile Phase besteht aus einem Methanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis 80:20, das mit einem Ammoniumacetat Puffer auf pH 6 eingestellt ist.

Das Methanol/Wasser-Gemisch sollte bei den Berechnungen explizit molekular behandelt werden. Aus diesem Grund wurde für die moleküldynamischen Berechnungen das Programm GROMACS ausgewählt. [53], [54] Dieses basiert auf einem modifizierten GROMOS-Kraftfeld [55], das die Möglichkeit bietet, lange moleküldynamische Simulationen großer Systeme in einer Lösungsmittelbox in einer akzeptablen Rechenzeit durchzuführen. Die Simulation des Lösungsmittels über explizite Lösungsmittelmoleküle ist ein entscheidender Fortschritt zur realistischen Berechnung der Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Im Vakuum liegen elektrostatische Kräfte unabgeschirmt vor, und werden somit überbewertet.[56]

Der Einfluss des pH-Wertes kann indirekt in die Kraftfeldberechnungen übernommen werden, indem die Verbindungen protoniert bzw. deprotoniert behandelt werden, d.h. den Partialstrukturen die entsprechende Ladung zugewiesen wird. Da die Pufferkonzentration konstant ist und keinen Einfluss auf die Selektivität besitzt, sondern nur die Retentionszeit auf der Säule durch Anionenaustauschprozesse beeinflusst, konnte auf die Simulation der Pufferionen verzichtet werden.

##### 5.1.4.1 Das Programm GROMACS

Das Programm wurde speziell zur dynamischen Berechnung von Proteinen [57] und Membranen [58] in einer Wasserbox [59] entwickelt und stellt dafür ein anwenderfreundliches Werkzeug dar.

Um mit GROMACS auch kleine Moleküle berechnen zu können, mussten zuerst einige Hürden überwunden werden, bevor das Programm für die vorliegende Fragestellung tauglich war.

Zuerst musste das Kraftfeld modifiziert werden, d.h. fehlende Atome und Atomtypen wurden parametrisiert und eingefügt.

Die Programmroutinen zum Aufbau der Eingabedateien können nur für Proteine benutzt werden. Die Erstellung dieser Dateien für kleine Moleküle ist ein arbeits- und zeitintensiver Vorgang, der sich jedoch in Hinblick auf die schnellen und qualitativ guten moleküldynamischen Simulationen lohnt.

Das Programm GROMACS enthält die Lösungsmittel Wasser, Chloroform und DMSO. Das verwendete Lösungsmittelgemisch musste parametrisiert und generiert werden.

#### 5.1.4.2 Das GROMACS-Kraftfeld

Das GROMACS-Kraftfeld basiert wie andere Kraftfeldmethoden auf der klassischen Mechanik. Deshalb werden hier nur die Unterschiede zum SYBYL-Kraftfeld dargestellt [52].

Der out-of-plane Term für kovalente Kräfte heißt im GROMACS „improper“ Torsionswinkel ( $\xi$ ) und beschreibt nicht nur die Winkelabweichung aus der Ebene bei planaren Strukturen, sondern wird auch zur Konfigurationsfestlegung genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Chiralitätszentren über diese Funktion definiert und festgehalten, und somit eine Inversion verhindert.

improper Torsionswinkel: 
$$E_{imp} = K_{\xi} (\xi_{ijkl} - \xi_0)^2 \quad (5.1)$$



Der „improper“ Torsionswinkel beschreibt den Winkel zwischen den Ebenen der Atome i, j, k und j, k, l.

Elektrostatische und dispersive Wechselwirkungsenergien werden nach dem Coulomb- bzw. Lennard-Jones-Potential berechnet. Hierbei werden sowohl Wechselwirkungen benachbarter Atome (pair-additive), als auch weitreichende Interaktionen berücksichtigt (long-range). Der Bereich der weitreichenden Wechselwirkungen wird über einen **cut-off** definiert. Dieser beschreibt einen bestimmten Radius, innerhalb dessen die Wechselwirkungen zwischen zwei Atomen berechnet werden. Um durch diesen Cut-off keine geladenen funktionellen Gruppen zu trennen und so artifizielle Energien zu erzeugen, werden Partialstrukturen zu einer Ladungsgruppe (**charge group**) zusammengefasst, deren Mittelpunkt als Abstandskriterium dient.

Das Programm enthält einige Ansätze, um Rechenzeit zu verkürzen:

- Es gibt die Möglichkeit, mit einem doppelten Cut-off ( $R_{short}$  und  $R_{long}$ ) zu arbeiten. Innerhalb des  $R_{short}$ -Cut-offs werden die nichtbindenden Wechselwirkungen kontinuierlich berechnet. Im Bereich zwischen den Cut-offs werden die Wechselwirkungen nur zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt. In der Zwischenzeit wird der Wert konstant gehalten und zu den  $R_{short}$ -Werten addiert.

- Außerdem kann mit einem „**united-atom-Modell**“ Rechenzeit gespart werden. Bei diesem Modell werden unpolare, kovalent an Kohlenstoff gebundene Wasserstoffe nicht explizit berechnet, sondern als Teil einer Atomgruppe in die Energieberechnung der Kohlenstoffatome mit einbezogen.
- Zur Berechnung der Wassermoleküle als Lösungsmittel wird das **SPC-Wasser** [60] (simple point charge) angewendet. Es werden für das Sauerstoffatom im Wassermolekül sowohl Coulomb- als auch Lennard-Jones-Wechselwirkungen berechnet, während für die Wasserstoffatome nur Coulomb-Wechselwirkungen eingehen. Weiterhin wird der **SETTLE-Algorithmus** [61] eingesetzt, der das Wassermolekül in sich starr hält, d.h. Änderungen der Bindungslängen und Winkel werden nicht berücksichtigt.

#### 5.1.4.3 Die Lösungsmittelbox im GROMACS

Zur Durchführung von Moleküldynamik-Simulationen im Lösungsmittel wird im GROMACS mit einer Lösungsmittelbox gearbeitet. In dieser würfelförmigen Box werden die zu untersuchenden Verbindungen zentriert und das verbleibende Volumen mit dem gewünschten Lösungsmittel aufgefüllt.

Um Randeffekte zu vermeiden, wird mit **periodischen Randbedingungen** (PBC = periodic boundary conditions) [62] gearbeitet. Dabei wird die Box in alle Raumrichtungen kopiert, so dass ein unendliches Gitter entsteht (Bild 5.3). Während der Simulation bewegen sich die Strukturen in der Box. Verlässt eine Struktur die Box, so wird sie auf der entgegengesetzten Seite erneut in die Box hineingespiegelt. Somit hat das System keine Grenzfläche und damit auch keine Randeffekte.

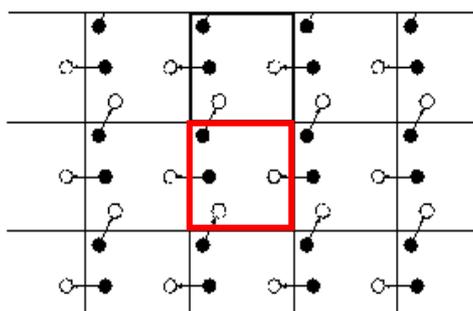


Bild 5.3 PBC zentrale Box markiert

Dieses Modell erlaubt die Verwendung kleiner Lösungsmittelboxen, wodurch die Rechenzeit minimiert wird. Der Cut-off der nicht kovalenten Wechselwirkungen darf nicht größer sein als die Hälfte der Kantenlänge der Box, da es sonst zu Wechselwirkungen der Moleküle mit ihrem eigenen Spiegelbild kommt (minimum-image model).[63]

#### 5.1.4.4 Lösungsmittel-Parameter

Zur Simulation der mobilen Phase wird ein Gemisch aus Methanol und Wasser eingesetzt. Wasser ist im GROMACS als Lösungsmittel parametrisiert und wird als SPC-Wasser zeitsparend berechnet. Dieses Modell wurde für den Wasseranteil des neuen Lösungsmittelgemisches eingesetzt.

Methanol ist bereits teilweise parametrisiert. So ist eine Eingabedatei im Programm vorhanden, deren Atomtypen aber nicht im Kraftfeld implementiert sind. Aus dieser Vorlage wurden die Ladungen übernommen und das Eingabefile neu mit den Atomtypen der Kraftfeldes aufgebaut. Die Parameter sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 5.1 Parameter der Methanols

Bezeichnung	Atomtyp	Partiellladung (e)
Methylgruppe	CH <sub>3</sub> (united Atom)	0,40
Sauerstoff	OA	-0,69
Wasserstoff	HO	0,29

Bindung	Bindungslänge (nm)	Kraftkonstante (kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CH <sub>3</sub> -OA	0,143	3,34720·10 <sup>5</sup>
OA-OH	0,10	3,31800·10 <sup>5</sup>

Bindungswinkel	Winkel (°)	Kraftkonstante (kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CH <sub>3</sub> -OA-OH	109,5	397

#### 5.1.4.5 Konstruktion der Lösungsmittelbox

Zur Konstruktion der Box wurde zuerst eine reine Wasserbox mit zehn Wassermolekülen im GROMACS generiert. Die Boxgröße wurde so gewählt, dass ihr Volumen optimal durch die zehn Wassermoleküle ausgefüllt wird. Anschließend wurden acht Wassermoleküle durch Methanolkoleküle an gleicher Position ersetzt. Die Kantenlänge der Box wurde auf 20,7 Å eingestellt und die vergrößerte Box mit dem neu generierten Lösungsmittel aufgefüllt. Danach wurde das Verhältnis der Lösungsmittelmoleküle überprüft und fehlende Wassermoleküle nachgefüllt. Ein prozentuales Verhältnis von 80:20 bedeutet: in 100 g sind 80 g Methanol und 20 g Wasser enthalten. Dividiert durch das jeweilige Molekulargewicht ergibt sich ein molares Verhältnis von 3:1. Die aufgebaute Box enthält entsprechend diesem Verhältnis 136 Methanol- und 45 Wassermoleküle (Bild 5.4).

Die Lösungsmittelbox wurde bei Raumtemperatur 100 ps in einer Moleküldynamik-Simulation equilibriert (Bild 5.5). In diesem Zeitraum konnten sich die Lösungsmittelmoleküle gleichmäßig verteilen und durchmischen. Der Verlauf der potentiellen Energie zeigt eine Gleichgewichtseinstellung des Systems nach ca. 20 ps. Das so generierte Lösungsmittelgemisch wurde in allen folgenden Berechnungen mit dieser Lösungsmittelbox zur Simulation der mobilen Phase eingesetzt.

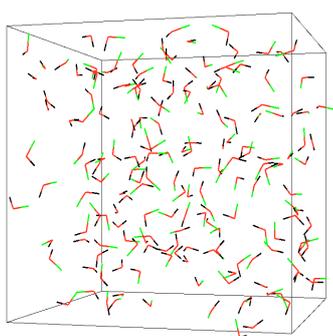


Bild 5.4 Methanol / Wasser-Box

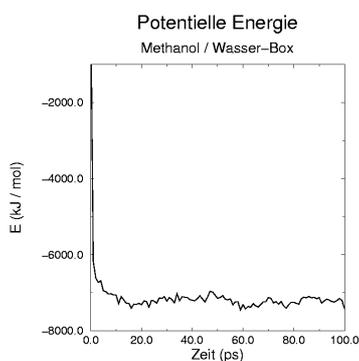


Bild 5.5 Energieverlauf der Dynamik

#### 5.1.4.6 Moleküldynamik-Simulationen (MDS)

Bei der Ausbildung von Arzneistoff-Rezeptor-Komplexen oder auch von Host-Guest-Wechselwirkungen, die bei Enantiomerentrennungen mit chiralen Selektoren auftreten, spielen dynamische Annäherungsprozesse und Konformationsänderungen der Moleküle eine wichtige Rolle. Diese werden nur in Moleküldynamik-Simulationen adäquat behandelt.

Grundlage für die Berechnungen der natürlichen Bewegung der Moleküle ist die Newtonsche Bewegungsgleichung.[64]

$$\vec{F}_i(t) = m_i \vec{a}_i(t) \qquad \vec{F}_i(t) = -\frac{\partial V}{\partial \vec{r}_i} \qquad (5.2)$$

$\vec{F}_i(t)$  = Kraft auf Atom i zum Zeitpunkt t

$m_i$  = Masse des Atoms i

$\vec{a}_i(t)$  = Beschleunigung des Atoms i zum Zeitpunkt t

V = potentielle Energie

$\vec{r}_i$  = Atomkoordinate

Wird ein Molekülsystem auf eine bestimmte Temperatur erhitzt, so wird die zugeführte Wärme in kinetische Energie umgewandelt, und als Folge davon beginnen die Moleküle zu oszillieren. Die Kraft ( $F_i$ ), die das Atom (i) erfährt, wenn seine Masse ( $m_i$ ) beschleunigt ( $a_i$ ) wird, ist der negative Gradient der potentiellen Energie (V), die eine differenzierbare Funktion der Atomkoordinaten ( $r_i$ ) ist.

Zu Beginn der Dynamik werden den Atomen zufällig nach der Maxwell-Boltzmann-Gleichung Geschwindigkeitsvektoren zugewiesen. Die Atome werden beschleunigt und ändern daher ihre Position im Raum. Nach einem definierten Zeitintervall (timestep) wird die potentielle Energie berechnet. Aus dem Energiegradienten zwischen zwei Berechnungen werden neue Geschwindigkeitsvektoren ermittelt und zugeordnet. Je kleiner der timestep gewählt wird, desto genauer ist die Berechnung, da die Geometrieänderungen der Moleküle in kleineren Zeitabschnitten erfasst werden. Da bei einem kleinen timestep die Gesamtrechnenzeit zunimmt, kann das Zeitintervall nicht beliebig verkleinert werden. Zur Orientierung dient die C-H-Bindung, die die kürzeste Schwingungsdauer aller Bindungen besitzt (ca. 10 fs). Daher muss das Zeitintervall für deren Berechnung, kleiner als zehn fs sein. Standardmäßig wird ein timestep von einer fs gewählt. Durch Integration der Bewegungsgleichungen über die Zeit werden nach definierten Zeitintervallen (meist eine ps) jeweils neue Atom-

koordinaten berechnet. Dafür wird häufig der „Verlet-Integrations-Algorithmus“ [65] oder wie in der vorliegenden Arbeit im GROMACS der „**Leap-Frog-Algorithmus**“ verwendet.

Letzterer wird hier kurz erklärt. Die Atomkoordinaten  $r_i$  werden nach jedem timestep, die Geschwindigkeitsvektoren nach jedem halben Zeitintervall  $\Delta t$  berechnet. [66]

Das Molekül ist immer in Bewegung und verändert seine Konformation. Es sind lange Dynamikläufe nötig, um den ganzen Konformationsraum zu durchsuchen. Temperaturerhöhung erleichtert den Konformationsübergang durch die erhöhte kinetische Energie, allerdings treten dann auch stark verzerrte, energetisch ungünstige Strukturen auf, so dass die erhaltenen Konformationen anschließend geometrieoptimiert werden müssen.

Die Gesamtmenge der im Verlauf der Dynamik gebildeten Konformationen ergeben ein „ensemble“, das man Trajektorie nennt.

Zu Beginn der Dynamik, in der sogenannten Equilibrierungsphase, kommt es durch die Umwandlung der zugeführten kinetischen Energie in potentielle Energie zu ruckartigen Beschleunigungen und großen Temperaturschwankungen. Das System ist nicht im Gleichgewicht und muss durch Anpassung der Geschwindigkeitsvektoren stabilisiert werden. Anschließend wird die Temperatur durch Kopplung an ein Wärmebad annähernd konstant gehalten.[67]

Für die Auswertung einer Dynamik dürfen nur Strukturen bzw. die dazugehörigen Energien nach der Equilibrierungsphase herangezogen werden. Zur Kontrolle betrachtet man den Verlauf der potentiellen Energie und der Zeit. Bleibt die potentielle Energie gleich, d.h. verläuft die Kurve parallel zur Zeitachse, ist das System im Gleichgewicht und kann ausgewertet werden. Bild 5.4 in Kapitel 5.1.4.5 (S. 44) zeigt den Energieverlauf der Dynamik zur Generierung des Lösungsmittels. Man sieht, dass das System nach ca. 20 ps im Gleichgewicht ist, und somit als Lösungsmittelmodell eingesetzt werden kann. Die Verläufe der potentiellen Energie sind für jede Dynamiksimulation der vorliegenden Arbeit im Anhang dargestellt.

#### 5.1.4.7 Parametrisierung

Da das GROMACS-Kraftfeld speziell zur Berechnung von Proteinen und Membranen entwickelt wurde, mussten zum einen neue Atomtypen für die kleinen Moleküle definiert, zum anderen bei den vorhandenen Atomtypen neue Bindungspartner parametrisiert werden.

Für Bindungslängen und Bindungswinkel wurde auf experimentelle Daten wie Röntgenkristallstrukturen oder NMR-Daten zurückgegriffen.[68] Die Kraftkonstanten wurden von vorhandenen Standardparametern für ähnliche Atomtypen bzw. Atomkombinationen im GROMACS übernommen. Daher sind diese Kraftkonstanten eventuell nicht korrekt und die berechneten Energiewerte können fehlerhaft sein. In der vorliegenden Fragestellung werden Energiedifferenzen zwischen den Wechselwirkungsenergien der Enantiomeren betrachtet. Da die Parameter für beide Enantiomeren gleich sind, handelt es sich, sollte ein Fehler vorliegen, um einen systematischen Fehler, so dass die Energiedifferenzen unbeeinflusst bleiben.

Die Partialladungen wurden von vorhandenen Beispielmolekülen mit gleichen funktionellen Gruppen übernommen. Neu eingefügt wurde die Ladungsverteilung der Nitrogruppe, basierend auf den Partialladungen der Carboxylatgruppe ohne formelle Ladung von +1. Die genauen Werte befinden sich in der folgenden Tabelle 5.2.

Im Folgenden sind die neu eingefügten Parameter tabellarisch dargestellt.

## 1. Parametrisierung der Nitrogruppe:

Tabelle 5.2 Parameter neuer Atomtypen

Bezeichnung	Atomtyp	Partiellladung (e)	Lennard-Jones-Parameter	
			A (kJ nm <sup>-6</sup> mol <sup>-1</sup> )	B (kJ nm <sup>-12</sup> mol <sup>-1</sup> )
	ON	-0,135	$2,2617 \cdot 10^{-3}$	$7,4158 \cdot 10^{-7}$
	N2	+0,27	$2,3402 \cdot 10^{-3}$	$3,3740 \cdot 10^{-6}$

Bindung	Bindungslänge (nm)	Kraftkonstante (kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
N2–ON	0,120	$4,18400 \cdot 10^5$
N2–CB	0,148	$3,34720 \cdot 10^5$

Bindungswinkel	Winkel (°)	Kraftkonstante (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
ON–N2–ON	120	502
ON–N2–CB	120	502
N2–CB–CR6	120	418
N2–CB–CB	120	418

Torsionswinkel	Winkel (°)	Kraftkonstante (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CR6–CB–N2–ON	180	5,858

„improper“ Torsionswinkel	Winkel (°)	Kraftkonstante (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CR6–CB–N2–ON	0	167,4
N2–ON–ON–CB	0	167,4

Lennard-Jones-Parameter		
	dispersiver Term (kJ nm <sup>-6</sup> mol <sup>-1</sup> )	repulsiver Term (kJ nm <sup>-12</sup> mol <sup>-1</sup> )
ON CB	$2,3006 \cdot 10^{-3}$	$1,5818 \cdot 10^{-6}$
ON CR6	$3,5361 \cdot 10^{-3}$	$2,4854 \cdot 10^{-6}$
N2 CB	$2,3402 \cdot 10^{-3}$	$3,3740 \cdot 10^{-6}$
N2 CR6	$3,5969 \cdot 10^{-3}$	$5,3015 \cdot 10^{-6}$
N2 HCR	$4,4528 \cdot 10^{-4}$	$2,2581 \cdot 10^{-7}$
C N2	$2,3877 \cdot 10^{-3}$	$2,3896 \cdot 10^{-6}$

## 2. Parametrisierung der Carbamat-Seitenkette:

Da in Programm GROMACS kein Estersauerstoff vorhanden ist, wurde dem Sauerstoff der Carbamatgruppe der Atomtyp Ethersauerstoff (OS) zugeordnet und wie im Folgenden beschrieben verändert. Da der Atomtyp OS im GROMACS nach experimentellen Daten von Zuckermolekülen parametrisiert worden ist, sind die Bindungslängen nach beiden Seiten gleich lang. In einer Carbamatgruppe ist die Bindung zur Carbonylgruppe aber kürzer als die zum Kohlenstoff. Die Bindungslängen wurden entsprechend angepasst und fehlende Winkel ergänzt.

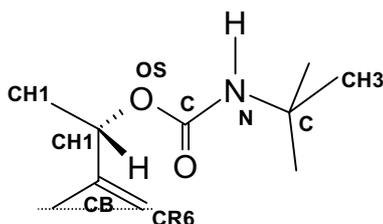


Bild 5.6 Carbamatseitenkette mit den verwendeten Atomtypen

Tabelle 5.3 Parameter für die Carbamat-Seitenkette

Bindung	Bindungslänge (nm)	Kraftkonstante (kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
OS-CH1	0,146	$2,51040 \cdot 10^5$
OS-C	0,135	$3,34720 \cdot 10^5$

Bindungswinkel	Winkel (°)	Kraftkonstante (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CH1-CH1-OS	109,5	460
CB-CH1-OS	109,5	460
C-N-C	117	502
OS-C-N	109,5	397
CH3-C-CH3	107	460

### 3. Parametrisierung der Methoxygruppe:

Für den Sauerstoff der Methoxygruppe wurde der Ethersauerstoff (OS) gewählt, die Bindungen zu den Kohlenstoffen mussten neu definiert werden.

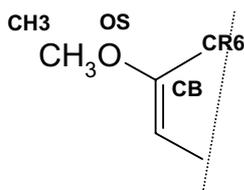


Bild 5.7 Methoxygruppe mit den verwendeten Atomtypen

Tabelle 5.4 Parameter der Methoxygruppe

Bindung	Bindungslänge (nm)	Kraftkonstante (kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CH3-OS	0,1435	2,51040·10 <sup>5</sup>
OS-CB	0,1396	3,34720·10 <sup>5</sup>

Bindungswinkel	Winkel (°)	Kraftkonstante (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CH3-OS-CB	113,5	460
OS-CB-CR6	120	460

<b>Torsionswinkel</b>	<b>Winkel</b> (°)	<b>Kraftkonstante</b> (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CR6–CB–OS–CH3	180	7,113

<b>„improper“ Torsionswinkel</b>	<b>Winkel</b> (°)	<b>Kraftkonstante</b> (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CR6–CB–OS–CH3	0	167,4

#### 4. Parametrisierung der Chiningrundstruktur:

Im Chiningrundgerüst fehlten Parameter für die Verknüpfung der Ringsysteme, Angaben über den Chinuclidin-Stickstoff und den aromatischen Stickstoff. Die eingesetzten Parameter sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

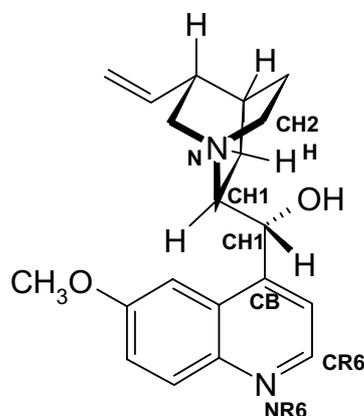


Bild 5.8 Chiningrundgerüst und die verwendeten Atomtypen

Tabelle 5.5 Parameter der Chiningrundstruktur

<b>Bindung</b>	<b>Bindungslänge</b> (nm)	<b>Kraftkonstante</b> (kJ nm <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CB–CH1	0,153	$3,34720 \cdot 10^5$
NR6–CR6	0,140	$3,34720 \cdot 10^5$

<b>Bindungswinkel</b>	<b>Winkel</b> (°)	<b>Kraftkonstante</b> (kJ rad <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup> )
CR6–NR6–CR6	120	418
NR6–CR6–HCR	120	376
CH1–CH1–CB	109,5	460

<b>Bindungswinkel</b>	<b>Winkel (°)</b>	<b>Kraftkonstante (kJ rad<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>)</b>
CR6–CB–CH1	120	418
CH2–N–H	115	502
CH2–N–CH2	116	502

<b>Torsionswinkel</b>	<b>Winkel (°)</b>	<b>Kraftkonstante (kJ rad<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>)</b>
CH1–CH1–CB–CR6	180	0,418

<b>„improper“ Torsionswinkel</b>	<b>Winkel (°)</b>	<b>Kraftkonstante (kJ rad<sup>-2</sup> mol<sup>-1</sup>)</b>
CH1–CH1–CB–CR6	0	167,4

#### 5.1.4.8 Steuerungsparameter für Dynamik-Simulationen im GROMACS

Folgende Parameter wurden für die durchgeführten Moleküldynamik-Simulationen benutzt:

Tabelle 5.6 Parameter für die Dynamik-Simulation

Parameter	Maßzahl	Standardwert in dieser Arbeit	Variation der Parameter
Simulationsdauer	ps	600	100/300
Integrationsschritt	fs	1	–
Simulationstemperatur	K	298	–
Archivierung der Konformation	ps	1	–
Cut-off (short)	nm	1,0	–
Cut-off (long)	nm	1,8	–
Wärmebad	–	ja	–
Druckregulierung	–	ja	–
Zahl für den Zufallsgenerator		173529	1969 1993 1999
Kantenlänge der Box (x, y, z)	nm	5 x 5 x 5	2 x 2 x 2

Alle moleküldynamischen Simulationen wurden bei Raumtemperatur (298 K) durchgeführt. Die Temperatur wird im Dynamikprotokoll des GROMACS angegeben.

### 5.1.5 Startgeometrie und constraints

Zur Entwicklung der Arbeitsmethode wurde das 3,5-Dinitrobenzoylleucin gewählt, da es eine sehr hohe Selektivität zeigt und zusätzlich die Kristallstruktur des (S)-Enantiomers im Komplex mit dem chiralen Selektor zur Verfügung stand. Diese Kristallstruktur diente als Ausgangsgeometrie zum Aufbau der Molekülkomplexe für die moleküldynamischen Simulationen. Die Komplexpartner wurden zu Beginn der Dynamikrechnung voneinander getrennt, um die Annäherung der beiden Reaktanden auf der Säule simulieren zu können. Die Trennung erfolgte durch Auseinanderschieben der Moleküle entlang der x-Achse. Zur Ermittlung des maximalen Startabstandes, bei dem noch eine Annäherung der Moleküle während der Dynamik erfolgt, wurden drei verschiedene Distanzen (8, 12 und 15 Å) getestet.

Die Beweglichkeit des Spacers ist abhängig von der Packungsdichte der chiralen Selektoren auf der Säule. Diese kann über die Kenndaten der Säule berechnet werden.

Die eingesetzte Säule hat ein Volumen von  $2,492 \text{ cm}^3$ . Die spezifische Oberfläche des Kieselgels beträgt  $340 \text{ m}^2/\text{g}$  und die Dichte  $0,5 \text{ g/ml}$ . [69] Daraus berechnet sich, dass die Säule mit  $1,246 \text{ g}$  Kieselgel befüllt ist. Die Belegungsrate des chiralen Selektors beträgt  $270 \text{ } \mu\text{mol/g}$ , entsprechend befinden sich bei  $1,246 \text{ g}$  Kieselgel  $336,42 \text{ } \mu\text{mol}$  derivatisiertes Chinin auf der Säule. Umgerechnet auf die Molekülanzahl sind das  $2,06 \cdot 10^{20}$  Moleküle des chiralen Selektors. Bei  $2,06 \cdot 10^{20}$  Selektormolekülen und einem Säulenvolumen von  $2,492 \text{ cm}^3$  steht jeder Kontaktstelle ein Volumen von  $12,1 \text{ nm}^3$  zur Verfügung. Teilt man die Säule idealisiert in Würfel dieses Volumens ein, so besitzt jeder Würfel eine Kantenlänge von  $4,03 \text{ nm}$  ( $4,03 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$ ). D.h. die chiralen Selektoren sind in einem Abstand von  $4,03 \text{ nm}$  ( $40,3 \text{ Å}$ ) angeordnet.

Die maximale Volumenausdehnung des Spacers beträgt in der Höhe  $4,6 \text{ Å}$ . Hierzu wird eine Sicherheitsspanne von  $1 \text{ Å}$  für Messungenauigkeiten addiert. Bei einer Volumenausdehnung von  $5,6 \text{ Å}$  besteht ein Abstand von  $34,7 \text{ Å}$  zwischen den chiralen Selektoren. Dieser Abstand ermöglicht eine freie Beweglichkeit der chiralen Selektoren unabhängig von den benachbarten Molekülen. Eine Einschränkung der Beweglichkeit des Spacers würde demnach nicht den experimentellen Bedingungen entsprechen.

### 5.1.5.1 MDS zur Optimierung der Startgeometrie

Das Verhalten der Startkomplexe für unterschiedliche Abstände zwischen den wechselwirkenden Molekülen wurde in je einer Dynamik-Simulation bei Raumtemperatur im Lösungsmittel über einen Zeitraum von zunächst 50 ps untersucht. Außerdem wurde getestet, welchen Einfluss es hat, wenn der Spacer mit constraints in seiner Beweglichkeit eingeschränkt wird. Daher wurden jeweils zwei Rechnungen durchgeführt, bei denen die letzten drei Kohlenstoffatome der Brücke einmal mit Kraftkonstanten festgehalten und einmal frei berechnet wurden. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Bild 5.9-5.19) dargestellt. In den jeweiligen Abbildungen der Komplexgeometrien wird die Startstruktur nach Atomtypen eingefärbt, die resultierende Komplexgeometrie mit constraints ist rot, die ohne constraints grün dargestellt. Um die Entwicklung objektiv beurteilen zu können, wird die Veränderung des Abstandes zwischen der Carboxylatgruppe und dem Chinuclidinstickstoff in einem Diagramm dargestellt. Wegen der großen Reichweite elektrostatischer Wechselwirkungen ist die Entwicklung des Abstandes zwischen den beiden geladenen Strukturelementen ein verlässliches Maß dafür, ob es zu einer Annäherung zwischen den Komplexpartnern kommt.

Die Lage der Partialstrukturen für die ionische Wechselwirkung ist in den Abbildungen mit einem Pfeil gekennzeichnet. Ist diese für alle drei Komplexe ähnlich, so wird ein schwarzer Pfeil verwendet. Unterscheiden sich die Positionen, markiert der schwarze die Ausgangsposition, der grüne die Position nach der Dynamik ohne constraints und der rote Pfeil die Lage nach der Dynamik mit constraints.

#### Farbkodierung:

Zum leichteren Verständnis sind die folgenden Abbildungen einheitlich nach Atomtypen kodiert.

Kohlenstoffe	grau
Sauerstoffe	rot
Stickstoffe	blau
Wasserstoffe	hellblau

Wasserstoffbrücken sind schwarz punktiert eingezeichnet.



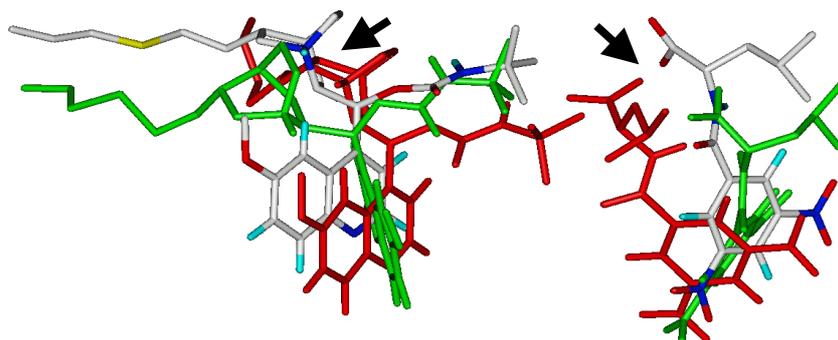
**(S)-Startgeometrie mit 15 Å Abstand:**

Bild 5.9 Vergleich der Komplexgeometrien vor und nach der Dynamik mit (rot) und ohne constraints (grün)

Bei der Analyse der beiden Dynamiken mit 15 Å Abstand beim Start fällt auf, dass sich das fixierte Chininderivat (rot), wie erwartet, kaum bewegt hat. Das 3,5-Dinitrobenzoylleucin nähert sich in diesem Fall zuerst bis unter 10 Å an, zeigt dann aber zum Ende der Dynamik eine abdriftende Tendenz. Bei der Dynamik ohne constraints (grün) kommt es zu keiner Annäherung, der Abstand wird kontinuierlich größer (Bild 5.9 und 5.10).

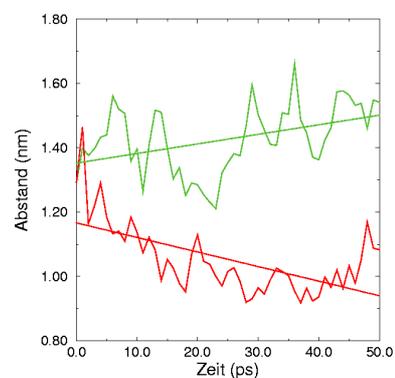


Bild 5.10 Verlauf der Abstände der ionischen Gruppen

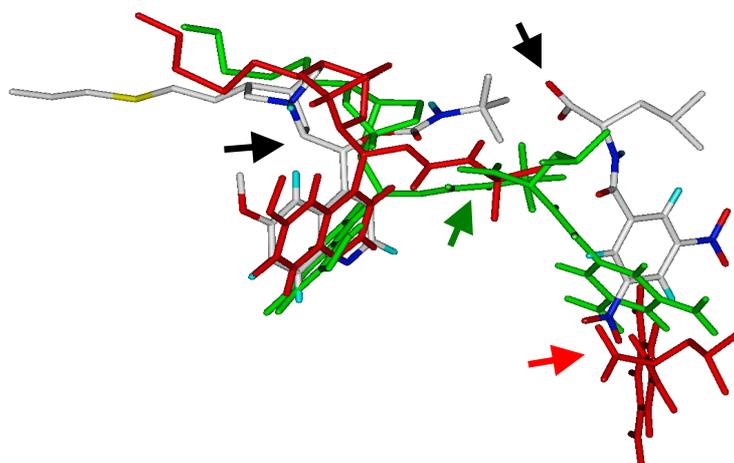
**(S)-Startgeometrie mit 12 Å Abstand:**

Bild 5.11 Vergleich der Komplexgeometrien vor und nach der Dynamik mit (rot) und ohne constraints (grün)

Auch in dieser Dynamik bewegt sich das festgehaltene Chinin (rot) kaum (Bild 5.11). Es findet keine Annäherung der Moleküle statt. In der freien Dynamik nähern sich die ionischen Gruppen mit gleichbleibender Tendenz an (Bild 5.12).

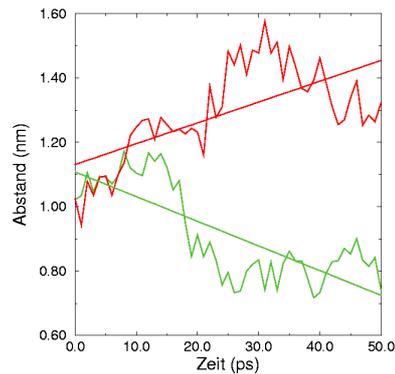


Bild 5.12 Verlauf der Abstände der ionischen Gruppen

### (S)-Startgeometrie mit 8 Å Abstand:

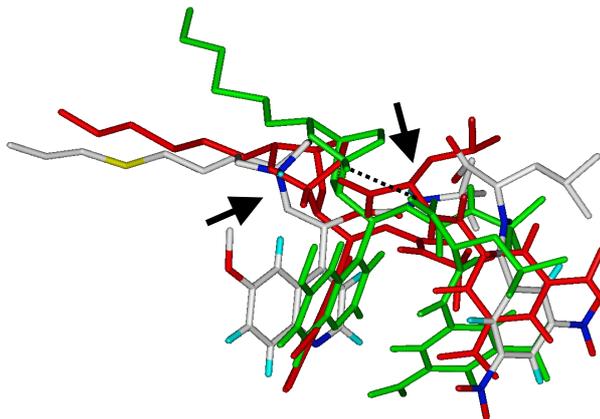


Bild 5.13 Vergleich der Komplexgeometrien vor und nach der Dynamik mit (rot) und ohne constraints (grün)

Bei einem Startabstand von 8 Å kommt es in beiden Fällen sehr schnell zu einer Annäherung bis auf weniger als 4 Å. (Bild 5.14). Bei der freien Dynamik (grün) beträgt der Abstand am Ende nur noch ca. 3 Å (Markierung schwarz punktiert) (Bild 5.13). Der Verlauf der Abstände und die gebildeten Komplexe sind bei beiden sehr ähnlich.

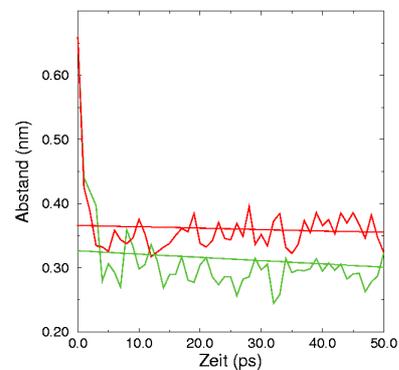


Bild 5.14 Verlauf der Abstände der ionischen Gruppen

Die Dynamiken mit einem Startabstand von 12 Å zeigen ohne constraints eine gute Annäherungstendenz auf ca. 7 Å, so dass vermutet werden kann, dass auch hier nach längerer Rechenzeit der Abstand der ionische Wechselwirkungspartner weiter verkleinert werden würde. Die Berechnung mit constraints erweist sich in diesem Fall als unbrauchbar, da keine Annäherung erfolgt. Die Anziehungskräfte zwischen den Molekülen reichen bei einem Abstand von 12 Å nicht aus, um mit eingeschränkter Beweglichkeit des chiralen Selektors eine Annäherung zu erzielen.

Der Startabstand von 15 Å erwies sich bei beiden Dynamiken als zu groß.

⇒ Zur eindeutigen Bewertung des Startabstands von 12 und 8 Å wurden die Simulationen auf 300-400 ps verlängert.

#### (S)-Startgeometrie mit 12 Å Abstand:

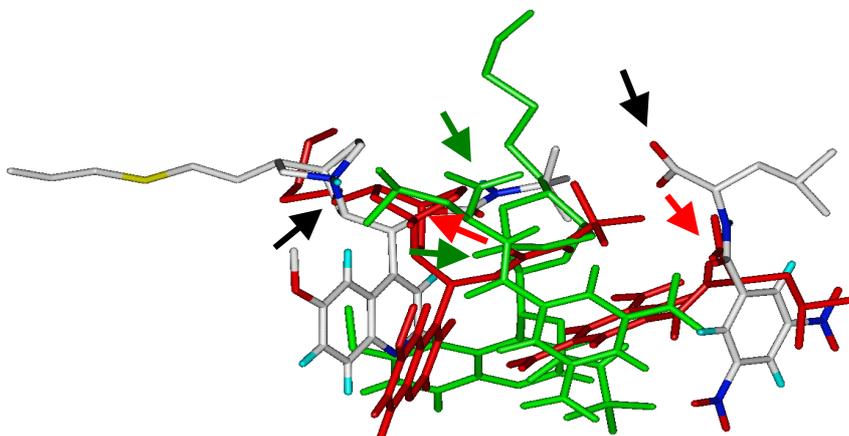


Bild 5.15 Vergleich der Komplexgeometrien vor und nach der 300 ps Dynamik mit (rot) und ohne constraints (grün)

Da beide MDS nach 300 ps eine Verkleinerung des Abstandes der ionischen Interaktion mit unerwartet ähnlichem Verlauf zeigen (Bild 5.15 / 5.16), wurde die Rechenzeit auf 400 ps erweitert. Bei Verlängerung der Rechenzeit entfernen sich die Moleküle wieder voneinander (Bild 5.16). Auf Grund dieses Verlaufes scheidet die Startgeometrie mit 12 Å Abstand ebenfalls aus.

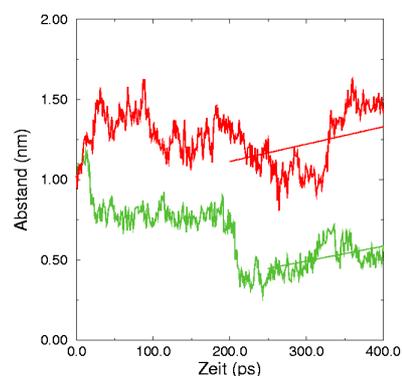


Bild 5.16 Verlauf der Abstände der ionischen Gruppen

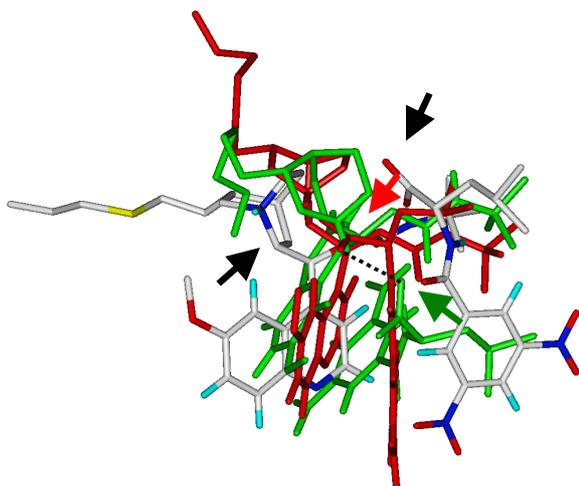
**(S)-Startgeometrie mit 8 Å Abstand:**

Bild 5.17 Vergleich der Komplexgeometrien vor und nach der 300 ps Dynamik mit (rot) und ohne constraints (grün)

Der Verlauf der Abstände der ionischen Gruppen bleibt bei auch verlängerter Rechenzeit unverändert. Der Abstand in der freien Simulation (grün) ist geringer als in der mit constraints. In beiden Fällen ist die ionische Wechselwirkung stabil (Markierung schwarz punktiert) (Bild 5.17 und 5.18). Zur besseren Beurteilung gebildeter Wechselwirkungsgeometrien wird die Bildung einer potenziellen Wasserstoffbrücke hinzugezogen.

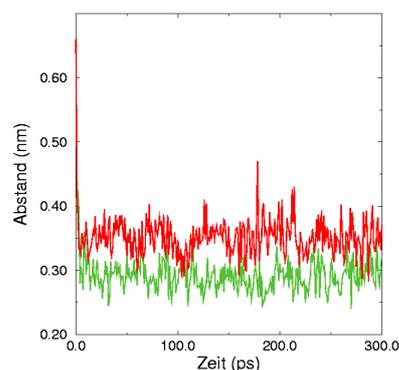


Bild 5.18 Verlauf der Abstände der ionischen Gruppen

Die Ausbildung der möglichen Wasserstoffbrücke wird zwischen der NH-Funktion des Leucins und der Carbonylfunktion der Chininseitenkette gemessen. Wie das Diagramm zeigt, wird diese Bindung bei der freien Dynamik (grün) recht schnell ausgebildet, während sie bei der Simulation mit constraints (rot) erst nach ca. 160 ps auftritt (Bild 5.19).

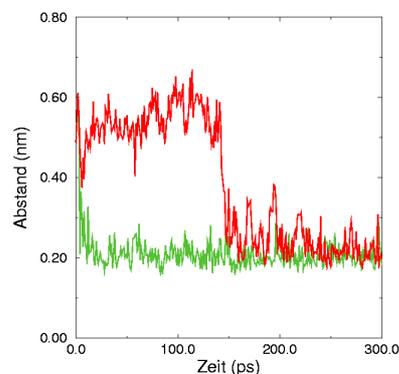


Bild 5.19 Ausbildung der Wasserstoffbrücke

Ein Startabstand von 8 Å erwies sich sowohl mit als auch ohne constraints als geeignet, deswegen wurde dieser Startabstand für die folgenden Berechnungen gewählt.

Die Berechnungen mit constraints schränken die Beweglichkeit des chiralen Selektors ein und erschweren damit die Annäherung der Moleküle. Die Simulationen mit constraints zeigen eine schlechtere Annäherung und Komplexbildung. Constraints würden zu einer Eingrenzung der Wechselwirkungsmöglichkeiten führen, die im Experiment auf der Säule nicht vorhanden ist. Die folgenden Berechnungen werden deshalb ohne constraints durchgeführt.

### 5.1.6 Ermittlung der optimalen Simulationsdauer der MDS

Die Dauer der Moleküldynamik-Simulation sollte der Zeitspanne entsprechen, die ein Wechselwirkungsvorgang auf der Säule durchschnittlich benötigt. Dieser Zeitraum lässt sich über die Kenndaten der Säule berechnen. Die Anzahl der potenziellen Wechselwirkungsstellen beträgt  $2,06 \cdot 10^{20}$ . (Berechnung s. Kapitel 5.1.5 S. 54).

Um einen Überblick über den Kontaktzeitraum zu bekommen, wird von zwei Extremfällen ausgegangen.

Die erste Annahme ist, dass die Enantiomere mit allen chiralen Selektormolekülen interagieren. Dann würde das Wechselwirkungsintervall für die experimentell bestimmten Retentionsdaten (3,5–218 min.) zwischen  $10^{-18}$  und  $10^{-16}$  Sekunden liegen.

Die zweite Annahme ist, dass die Enantiomere senkrecht durch die Säule fallen, und dabei mit allen Selektoren wechselwirken, die auf diesem Lot liegen. Die Anzahl der Interaktionen berechnet sich dann wie folgt. Bei  $2,06 \cdot 10^{20}$  Selektormolekülen und einem Säulenvolumen von  $2,492 \text{ cm}^3$  steht jeder Kontaktstelle ein Volumen von  $12,1 \text{ nm}^3$  zur Verfügung. Teilt man die Säule idealisiert in Würfel dieses Volumens ein, so besitzt jeder Würfel eine Kantenlänge von  $4,03 \text{ nm}$  ( $4,03 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$ ). D.h. bei einer Säulenlänge von  $15 \text{ cm}$  liegen  $37,22 \cdot 10^6$  Kontaktstellen direkt übereinander. Würden nur diese Punkte für Interaktionen genutzt, läge der Zeitraum für eine Wechselwirkung im Mikrosekunden-Bereich ( $10^{-6} \text{ s}$ ). Das durchschnittliche Wechselwirkungsintervall mit dem chiralen Selektor liegt demnach im Pikosekunden-Bereich ( $10^{-12} \text{ s}$ ) (Bild 5.20). Um eine repräsentative moleküldynamische Simulation durchzuführen, wurden für jedes Enantiomer MDS mit einer Berechnungsdauer im ns-Bereich durchgeführt.

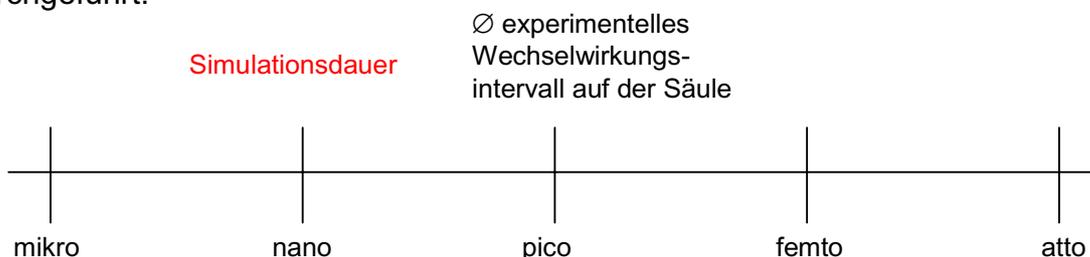


Bild 5.20 Zeitachse in Sekunden

### 5.1.7 Aufteilung der Simulationsdauer

Aus den folgenden Gründen wurde eine Gesamt-Rechendauer von 4,8 ns in acht Dynamiken à 600 ps aufgeteilt.

Zu Beginn der Moleküldynamiksimulation wird jedem Atom ein Geschwindigkeitsvektor zugewiesen, der für die Anfangsbeschleunigung der Bewegung verantwortlich ist. Die Zuordnung geschieht über einen Zufallsgenerator, der von einer willkürlich gewählten Zahl beeinflusst wird. Ändert man diese Zahl, ändern sich auch die Geschwindigkeitsvektoren, so dass die Moleküle eine andere Startbeschleunigung erhalten.

Auf diese Weise wurden, ausgehend von der gleichen Startgeometrie, acht unterschiedliche Orientierungen der Moleküle zueinander zu Beginn der MDS generiert. Während der MDS erfolgt die Annäherung daher aus verschiedenen Richtungen, wie es auch auf der Säule der Fall ist, auf der sich nach jedem Wechselwirkungskontakt mit einem Selektor und anschließender Weiterbewegung durch die Säule neue Orientierungen zu weiteren Selektormolekülen einstellen.

Wenn verschiedene Zufallszahlen, d.h. unterschiedliche Anfangsbeschleunigungen während der Berechnung gleiche Ergebnisse liefern, so erhöht sich die Signifikanz des Ergebnisses. Bei der vorliegenden Fragestellung bedeutet dies, dass in Dynamiken mit unterschiedlicher Startgeschwindigkeit vergleichbare Komplexgeometrien mit energetisch ähnliche Wechselwirkungen gefunden werden.

Ein weiteres Argument für die Aufteilung in acht Dynamiken ist, dass sich nach diesem Zeitraum stabile Komplexe gebildet haben, die nicht mehr auseinanderdriften. Nach der Annäherungsphase wird die Komplexgeometrie durch gegenseitige Anpassung (induced fit) optimiert und bleibt dann stabil. Dies kann bei optimalem Verlauf schon nach 200 ps der Fall sein. In einem solchen Fall würde eine Gesamtdynamik von 4,8 ns keine neuen Erkenntnisse bringen.

Zur Simulation der Enantiomerentrennung werden im Folgenden daher jeweils acht Dynamiken à 600 ps mit unterschiedlicher Startbewegung durchgeführt. Auf diese Weise wird die Berechnungszeit optimal ausgenutzt und möglichst viele Orientierungen während der Annäherung der Komplexe berücksichtigt. Die Auswertung der Komplexgeometrien und der Wechselwirkungsenergien erfolgt über den gesamten Simulationszeitraum, der wie gezeigt das experimentelle Zeitintervall widerspiegelt.

### 5.1.8 Generell verwendetes MDS-Protokoll

Für die moleküldynamischen Simulationen wird das Programm GROMACS benutzt. Zur Untersuchung des unterschiedlichen Trennverhaltens von Enantiomerenpaaren werden jeweils 8 Moleküldynamiksimulationen à 600 ps mit unterschiedlichen Startgeschwindigkeitsvektoren durchgeführt. Diese Simulationen werden in einer Lösungsmittelbox durchgeführt, die mit einem Methanol / Wasser-Gemisch im Verhältnis 80:20 gefüllt ist. Alle Berechnungen finden bei Raumtemperatur (298 K) statt. Die (S)-Startgeometrie wird aus der Kristallstruktur generiert, die auf der x-Achse um 8 Å auseinandergezogen wird. Für die (R)-Startgeometrie wird das (S)-Enantiomer gespiegelt und der entstandene Komplex geometrieoptimiert. Bild 5.21 zeigt die Lösungsmittelbox mit dem 3,5-DNBL-Selektor-Komplex.

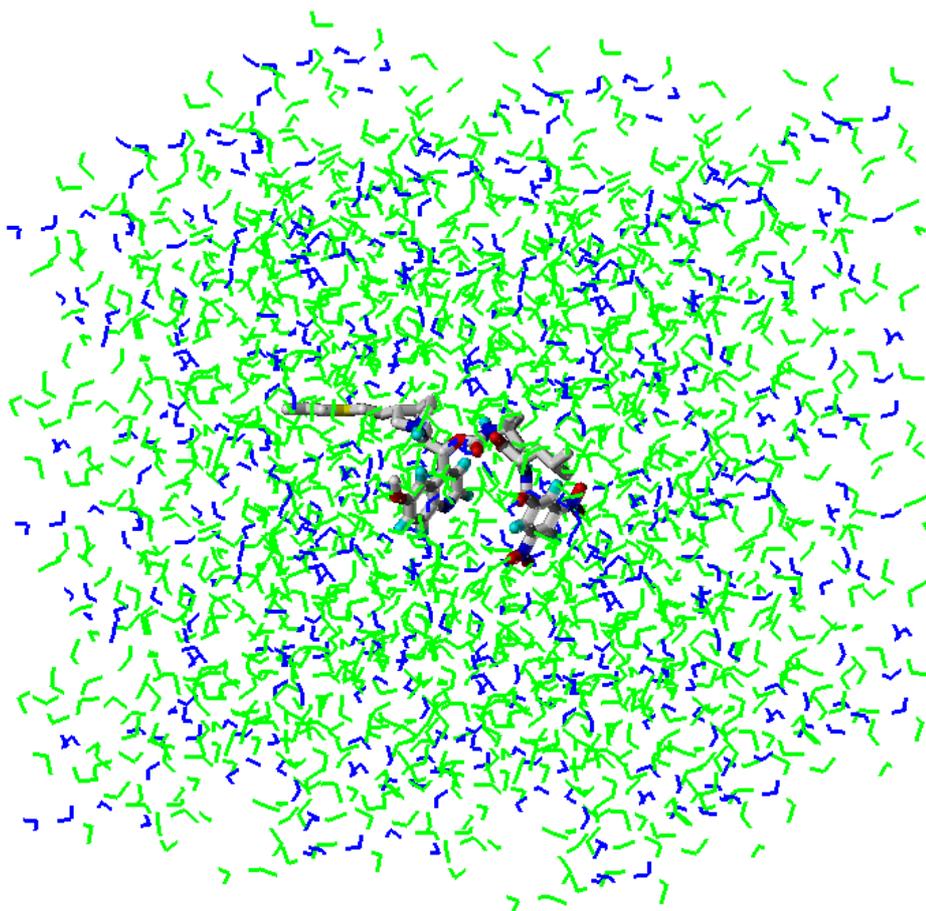


Bild 5.21 3,5-Dinitrobenzoylleucin im Komplex mit den chiralen Selektor zentriert in der Methanol (grün) / Wasser (blau) -Box

### 5.1.9 Auswertungsverfahren für die Dynamiken

Die Auswertung der Berechnungen erfolgt in drei Schritten. Zuerst wird das Auftreten der postulierten Wechselwirkungen (Kapitel 3.1.3, S. 28) über Abstandsmessungen zwischen den beteiligten funktionellen Gruppen untersucht.

Die ionische Wechselwirkung wird durch den Abstand zwischen der Carboxylatgruppe des Leucins und dem protonierten Stickstoff des Chinins definiert. Ob eine Wasserstoffbrücke zwischen der NH-Funktion des Leucins und der Carbonylfunktion der Chininseitenkette vorliegt, wird über den Abstand festgestellt. Diese Wasserstoffbrücke wird als HB1 bezeichnet. Im Verlauf der Dynamiken werden insgesamt vier verschiedene Wasserstoffbrücken gefunden, diese werden zur leichteren Unterscheidung in der Reihenfolge ihres Auftretens durchnummeriert. Der Abstand der Ringsysteme wird zwischen den Kohlenstoffatomen der Ringe, an denen der aliphatische Rest gebunden ist, gemessen. Der Verlauf der Abstände für die drei genannten Wechselwirkungen wird für alle Dynamiken gemeinsam betrachtet. Jede Wechselwirkung wird in einem Diagramm dargestellt, in dem der Verlauf jeder Dynamik in einer anderen Farbe gekennzeichnet ist.

Anhand dieser Ergebnisse ist es möglich, im zweiten Schritt MDS mit ähnlichem Verlauf in Gruppen zusammenzufassen und dann näher zu analysieren. Charakteristische Komplexgeometrien dieser Gruppen werden vorgestellt, und der Verlauf unerwarteter Wechselwirkungen über den Abstand in gesonderten Diagrammen dargestellt. Bei den Ringsystemen wird die Orientierung der Ringe ausgewertet um abzuschätzen, ob eine C.T.-Interaktion möglich wäre.

Anschließend werden die Wechselwirkungsenergien (WWE) der Dynamiken ausgewertet. Dafür werden alle Energiewerte der Dynamiken pro Enantiomer gemeinsam betrachtet. Der Verlauf der potenziellen Energie während der Dynamiken zeigt, dass diese schnell equilibriert sind, so dass eine Auswertung ab 100 ps möglich ist. Der Verlauf der potenziellen Energie ist für alle Dynamiken eines Enantiomers in einem Diagramm dargestellt. Diese Diagramme befinden sich im Anhang.

Das Vorgehen bei der statistischen Auswertung der Wechselwirkungsenergien und die Anwendung der implementierten Programmroutinen des GROMACS werden in den folgenden Kapiteln erklärt.

### 5.1.9.1 Statistische Auswertung der Wechselwirkungsenergien

Das Programm GROMACS stellt für jede Dynamik eine Energiedatei auf, in der alle Wechselwirkungsenergien pro archivierter Struktur enthalten sind. Bei den hier durchgeführten Berechnungen wurde nach jeder ps eine Struktur abgespeichert. D.h. pro Enantiomer sind insgesamt 4800 Strukturen und ihre WWEn vorhanden, die auf acht Dynamiken aufgeteilt sind. Da jeweils 100 ps zur Equilibrierung des System verbraucht werden, stehen 4000 Komplexenergien zur Auswertung zur Verfügung.

#### **g\_energy**

Im ersten Schritt wurde die Energiedatei mit der Programmroutine „g\_energy“ von GROMACS in eine lesbare Datei umgewandelt. Dabei wurde für jede ps eine Gesamtsumme aller Wechselwirkungsenergien berechnet. Man erhält eine zweispaltige Datei mit den Energiewerten pro ps.

<b>ps</b>	<b>kJ/mol</b>
100	-614
101	-659
...	...

#### **g\_analyze**

Im nächsten Schritt wurde die Programmroutine „g\_analyze“ von GROMACS angewendet. Dieses Programm berechnet Verteilungen. Die Energiewerte wurden in Cluster mit einer Spannbreite von 1 aufgeteilt, d.h. die Einteilung erfolgt nach ganzen Zahlen. Man erhält auch hier eine zweispaltige Ausgabedatei, die die Energiewerte nach abnehmender Größe und deren Anzahl enthält.

<b>ps</b>	<b>Anzahl</b>
-718	0,00199601
-717	0,00399202
...	...

Die kleinste Zahl entspricht der Anzahl 1, die anderen sind Vielfache davon. Die Ausgabedatei wurde auf ganze Zahlen umgeschrieben und als Textdatei abgespeichert.

Die erhaltenen Textdateien wurden in das Programm „excel“ eingelesen und dort weiter bearbeitet. Es wurden die Verteilungen aller Dynamiken addiert und die resultierende Gesamtverteilung in einem Diagramm dargestellt. Als Beispiel ist ein solches Diagramm abgebildet.

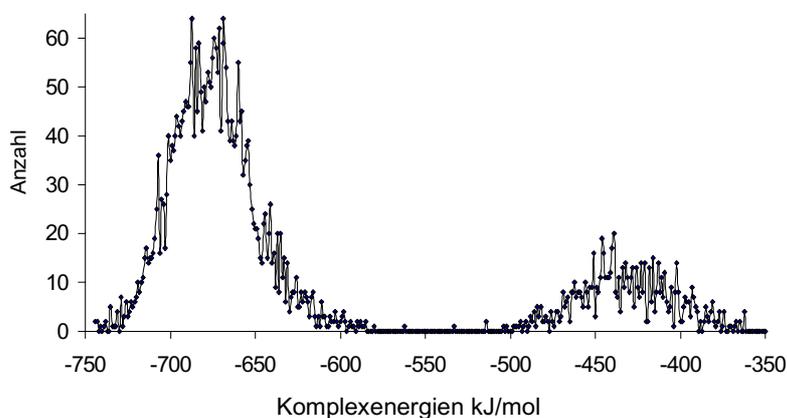


Bild 5.22 Beispiel für ein Diagramm, das die Häufigkeit der Wechselwirkungsenergien enthält

Auf der x-Achse sind die Wechselwirkungsenergien und auf der y-Achse die Anzahl ihres Auftretens aufgetragen. Die gefundenen Energiewerte lassen sich in Gruppen einteilen. In diesem Fall liegen zwei Maxima vor.

Im nächsten Schritt wurde die durchschnittliche Wechselwirkungsenergie und der prozentuale Anteil der Wechselwirkungsenergiebereiche an der Gesamtverteilung berechnet.

Zur endgültigen Bewertung der Trennbarkeit eines Enantiomerenpaares an diesem chiralen Selektor und zur Festlegung der Elutionsreihenfolge wird das arithmetische Mittel der Energiewerte herangezogen, auch wenn die Verteilung der Wechselwirkungsenergien deutliche Maxima aufweist. Dieses Vorgehen wird wie folgt begründet. Die Retentionszeit ist das Ergebnis aller Wechselwirkungsprozesse, die auf der Säule ablaufen. Sie ist eine Addition aus den Rückhaltekräften, die sich durch die Bildung stabiler und schwacher Komplexe sowie aus den abstoßenden Energien ungünstiger Komplexgeometrien ergeben. Daher werden bei der theoretischen Betrachtung des Trennvorgehens alle Wechselwirkungsenergien der kompletten Dynamiken berücksichtigt.

Die durchschnittliche Größe der Rückhaltekräfte ist deswegen auch ein anschauliches und verlässliches Maß für die experimentell bestimmten Retentionszeiten.

## 5.1.10 MDS des 3,5-Dinitrobenzoylleucins (3,5-DNBL)

### 5.1.10.1 MDS des (S) 3,5-DNBL

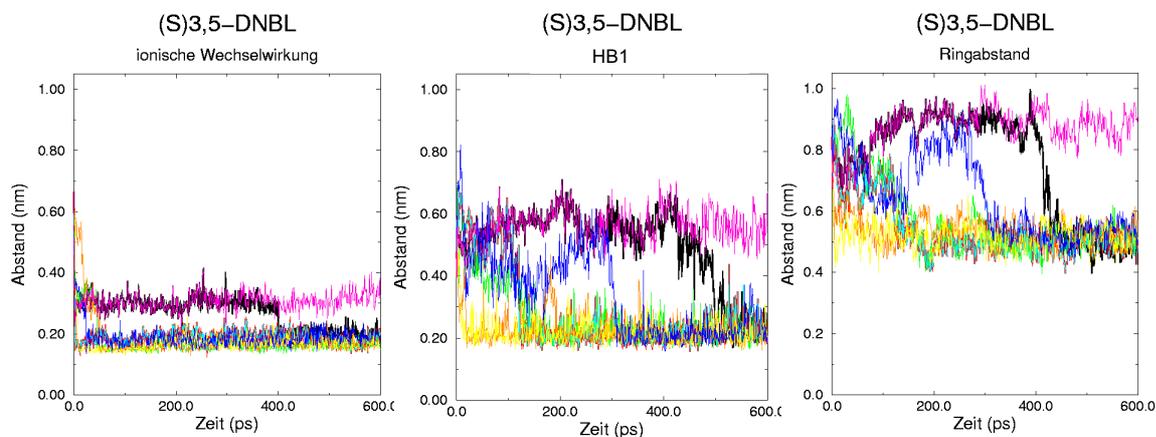


Bild 5.23 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (S) 3,5-DNBL

Die Diagramme zeigen, dass die Dynamiken in drei Gruppen eingeteilt werden können. Die Gruppen sind nach Stärke der Wechselwirkungen geordnet.

#### Gruppe 1

Diese große Gruppe zeichnet sich durch eine sehr starke und schnell gefundene ionische Interaktion aus.

In zwei dieser Berechnungen wird zeitgleich auch die HB1 ausgebildet (gelb, orange). Bei den anderen vier Simulationen erfolgt die Bildung nach 150 bis 300 ps (grün, blau, hellblau, rot) (Bild 5.23). Zum Ende dieser Dynamiken liegt ein stabiler Komplex mit ionischer Interaktion und der HB1 vor. Die Ring-systeme stehen bis zur Ausbildung der HB1 parallel, danach abgewinkelt zueinander (Bild 5.24). Die WWEn liegen zwischen -657 bis -681 kJ/mol.

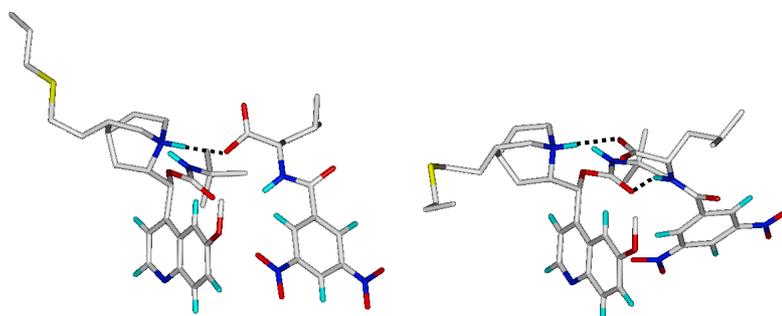


Bild 5.24 Charakteristische Komplexgeometrien mit rein ionischer Interaktion (links) und noch zusätzlicher Bildung der HB1, die punktiert markiert ist (rechts).

## Gruppe 2

In der zweiten „Gruppe“ befindet sich nur eine MDS, die in der Gesamtübersicht in schwarz dargestellt ist (Bild 5.23). Bei dieser Simulation wird die ionische Wechselwirkung nach 400 ps ausgebildet. Zeitlich versetzt folgt die Ausbildung der HB1 nach ca. 500 ps. Den Grund für dieses Verhalten zeigen die Komplexgeometrien (Bild 5.25).

Zu Beginn wird eine Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylatgruppe und der NH-Funktion der Chininseitenkette ausgebildet. Diese Wasserstoffbrücke wird als HB2 bezeichnet. In Bild 5.25 ist ihr Verlauf (rechts) und ihre Geometrie (links) dargestellt. Nach ca. 500 ps wird diese Bindung gelöst, und die ionische Wechselwirkung stellt sich ein (Bild 5.25 Mitte). Die durchschnittliche WWE dieser Dynamik liegt bei -457 kJ/mol.

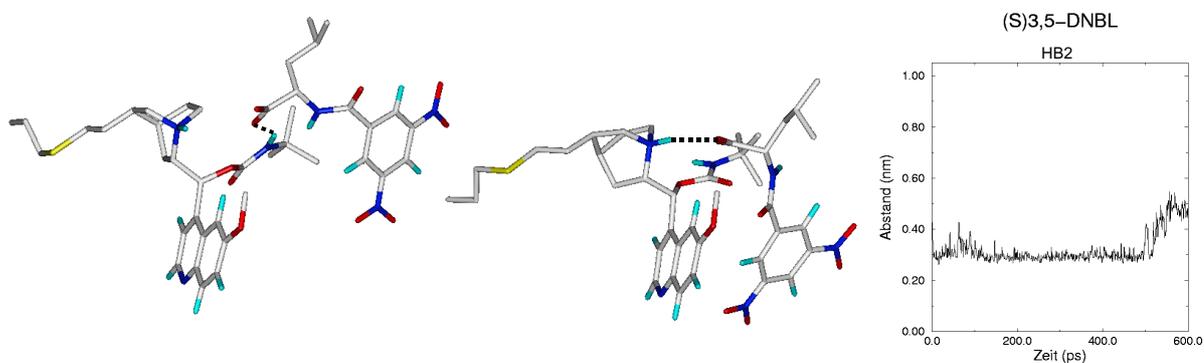


Bild 5.25 Anfängliche Komplexgeometrie (links) und Verlauf der HB2 (rechts) sowie die geänderte Komplexgeometrie mit ionischer Interaktion nach ca. 500 ps (Mitte).

## Gruppe 3

Bei einer Dynamik (Bild 5.23 magenta-farbige Kurve) findet keine Annäherung statt. Die HB1 wird nicht ausgebildet und der Ringabstand liegt bei 8-10 Å. Der Abstand der ionischen Wechselwirkungsgruppen liegt konstant bei ca. 3 Å. Man könnte erwarten, dass nach einer Annäherung auf ca. 3 Å die ionische Interaktion weiter verstärkt werden würde. Den Grund für die Stagnation zeigen die gebildeten Komplexgeometrien, von denen eine repräsentativ dargestellt ist (Bild 5.26).

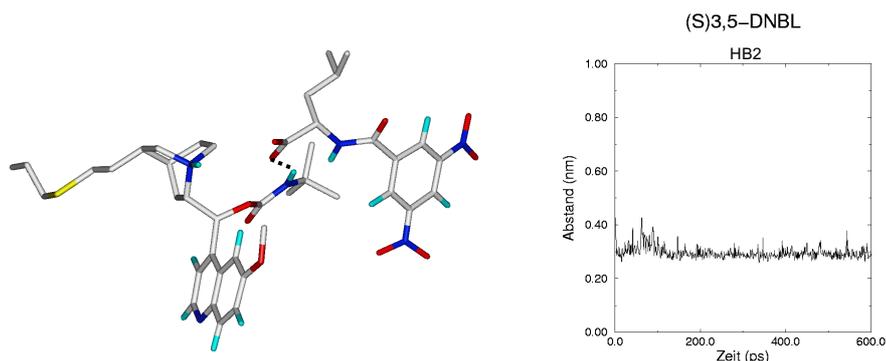


Bild 5.26 Komplexe Geometrie und Abstandsverlauf der HB2 in der MDS-Gruppe 3

Bereits zu Beginn der Dynamik wird die HB2 gebildet und bleibt, wie das Diagramm zeigt, durchgängig erhalten. Sie beeinflusst die übrige Geometrie und hält den Abstand zwischen den ionischen Interaktionspartnern konstant. Die durchschnittliche WWE dieser Dynamik liegt bei -431 kJ/mol.

Als letzter Punkt wird die Verteilung der WWEn betrachtet (Bild 5.27).

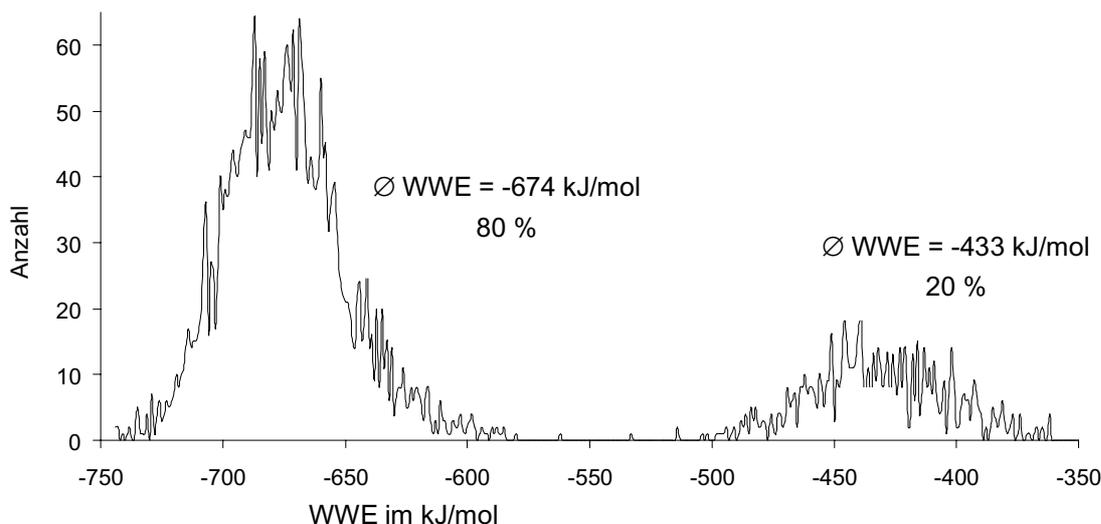


Bild 5.27 Verteilung der WWEn für (S) 3,5-DNBL

Die Verteilung der WWEn des (S)-Enantiomers zeigt zwei Maxima (Bild 5.27). Eines besitzt die durchschnittliche WWE von -674 kJ/mol und einen prozentualen Anteil von 80 %. Dieses Maximum beinhaltet sowohl die stabilste, als auch die häufigsten Komplexgeometrien und entspricht der Gruppe 1 (Bild 5.24). Das andere Maximum hat eine Durchschnittsenergie von -433 kJ/mol und nimmt den verbleibenden Anteil von 20 % ein. Hier finden sich die Komplexgeometrien der Gruppe 2 und 3 (Bild 5.25/26). Das (S)-Enantiomer des 3,5-DNBL bildet nur starke und mittelstarke Komplexe, so dass die durchschnittliche Gesamtwechselwirkungsenergie relativ hoch ist, sie liegt bei -626 kJ/mol.

### 5.1.10.2 MDS des (R) 3,5-DNBL

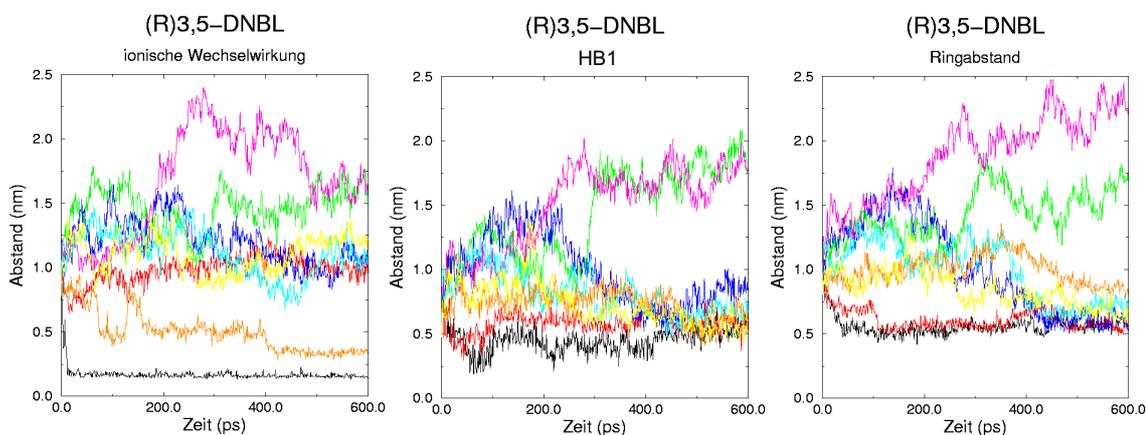


Bild 5.28 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (R) 3,5-DNBL

Es fällt auf, dass die Dynamiken der (R)-Form viel unterschiedlicher verlaufen und bei fast allen keine gute Annäherung stattfindet. Die Simulationen lassen sich in vier Gruppen einteilen.

#### Gruppe 1

Das (R)-Enantiomer bildet nur während einer Dynamik (Bild 5.28 schwarze Linie) gute Wechselwirkungen aus. Die ionische Interaktion wird schnell gefunden und bleibt stabil. Der Abstand der HB1 schwankt um 2,5-5 Å mit einer steigenden Tendenz zum Ende der Dynamik, d.h. die HB1 wird nicht konstant ausgebildet. Der Ringabstand liegt kontinuierlich bei ca. 5 Å (Bild 5.28). Die durchschnittliche WWE beträgt  $-661$  kJ/mol. Die Komplexgeometrien zeigen, dass eine Wasserstoffbrücke zwischen der Methoxygruppe des Chinins und der NH-Funktion des Leucins gebildet wird (Bild 5.29). Dieser Wechselwirkungstyp wurde für diese Molekülpaare bislang weder von der Arbeitsgruppe Lindner noch in der Literatur postuliert. Ihr wird die Bezeichnung HB3 zugeordnet. Die Interaktion bleibt, wie im Diagramm zu sehen, kontinuierlich erhalten und erlaubt keine parallele Anordnung der Ringsysteme.

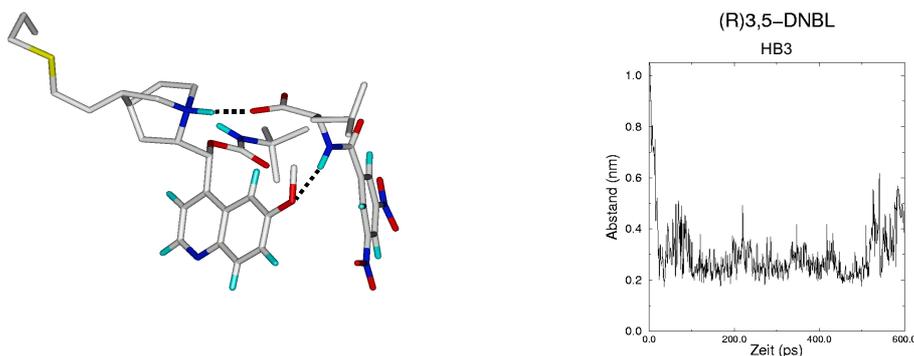


Bild 5.29 Komplexe Geometrie und Abstandsverlauf der HB3

## Gruppe 2

Bei einer MDS (hier in orange dargestellt) erfolgt die Annäherung erst nach ca. 400 ps. Es werden keine starken Wechselwirkungen ausgebildet. Der Abstand der HB1 ist größer als 5 Å und der Ringabstand bleibt größer als 10 Å. Die Annäherung der ionischen Wechselwirkungspartner auf ca. 3,5 Å ermöglicht einen relativ großen Energiegewinn von  $-367$  kJ/mol.

## Gruppe 3

Bei der in rot dargestellten Dynamik liegen die Länge der HB1 sowie der Ringabstand konstant um ca. 5 Å. Der Abstand der ionischen Interaktion, der in der Regel kleiner als die beiden anderen Abstände ist, weicht mit ca. 10 Å stark ab (Bild 5.28). Der Grund dafür wird durch die Komplexgeometrie ersichtlich. Es wird eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonylgruppe des Leucins und der NH-Funktion der Carbamatseitenkette des Chinins ausgebildet, deren Verlauf und Geometrie in Bild 5.30 dargestellt sind. Ihr wird die Bezeichnung HB4 zugeordnet. Diese stabile Wasserstoffbrücke bestimmt die Gesamtkomplexgeometrie, die keine Annäherung der ionischen Interaktionspartner erlaubt. Die durchschnittliche WWE beträgt  $-167$  kJ/mol.

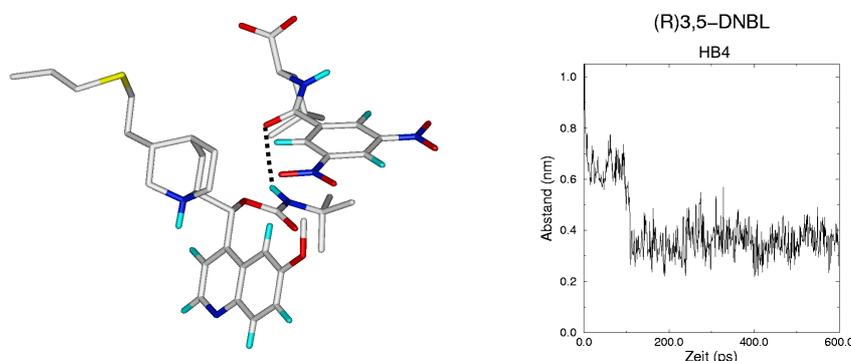


Bild 5.30 Komplexe Geometrie und Abstandsverlauf der HB4

### Gruppe 4

Diese Gruppe besteht aus den Dynamiken, die keine bindenden Wechselwirkungen ausbilden. Entweder bewegen sich die Moleküle kontinuierlich auseinander und die WWE sind mit  $-53 \text{ kJ/mol}$  extrem schlecht oder liegen mit  $+68 \text{ kJ/mol}$  sogar im positiven Bereich (grün und magenta dargestellte Dynamiken in Bild 5.28).

Oder man findet Komplexe mit Abständen, die immer oberhalb ca.  $5 \text{ \AA}$  bleiben. Die WWE liegen dann durchschnittlich bei ca.  $-100 \text{ kJ/mol}$ .

Auch die Verteilung der WWE zeigt deutlich die breitere Verteilung der Energiewerte (Bild 5.31).

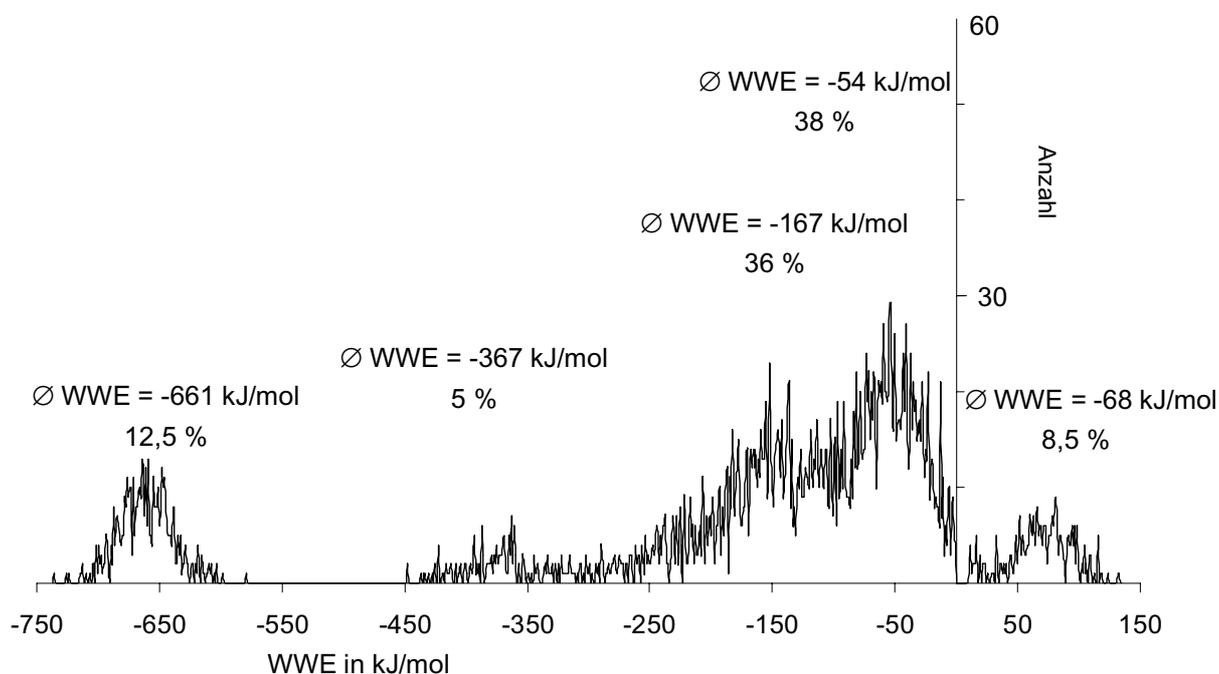


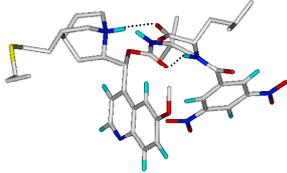
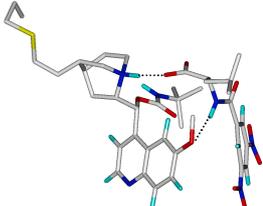
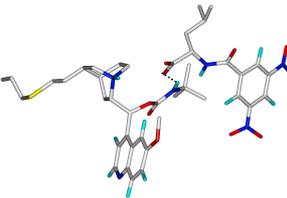
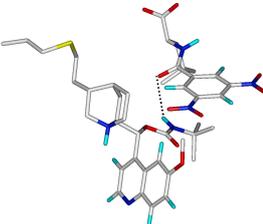
Bild 5.31 Verteilung der WWE für (R) 3,5-DNBL

Der Anteil stabiler Komplexe ist mit 12,5% gering. Die Komplexgeometrie des Maximums entspricht der Gruppe 1. Im zweithöchsten Energiebereich befinden sich nur 5% der Werte. Hier liegt die durchschnittliche WWE bei  $-367 \text{ kJ/mol}$ , die Komplexgeometrie entspricht der Gruppe 2. Im dritten Bereich, in dem noch schwache Wechselwirkungskomplexe mit  $-167 \text{ kJ/mol}$  enthalten sind, befindet sich ein größerer Anteil von 36%, der der Gruppe 3 entspricht. Das (R) 3,5-DNBL besitzt zu 38% Energiewerte im schwach negativen Bereich und sogar 8% im positiven Bereich, d.h. diese Wechselwirkungen sind abstoßend. Insgesamt bilden 46,5% keine stabilen Komplexe aus. Dementsprechend niedrig ist die durchschnittliche Gesamtwechselwirkungsenergie. Sie liegt bei  $-174 \text{ kJ/mol}$ .

### 5.1.10.3 Ergebnisse der Enantiomerentrennung von 3,5-DNBL

Zur besseren Übersicht sind die Ergebnisse für beide Enantiomere in einer Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 5.7 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere, nach Stärke der Interaktionen geordnet

(S) 3,5-DNBL		(R) 3,5-DNBL	
Komplexgeometrien	Ø WWE	Komplexgeometrien	Ø WWE
Wechselwirkungstypen	Häufigkeit	Wechselwirkungstypen	Häufigkeit
	-674 kJ/mol 80 %		-661 kJ/mol 12,5 %
<b>ion. Interaktion + HB1</b>		<b>ion. Interaktion + HB3</b>	
<b>HB2</b> ⇒ ab 400 ps Wechsel zur <b>ion. Interaktion</b>		<b>ion. Interaktion</b> ⇒ ab ca. 400 ps	-367 kJ/mol 5 %
	-433 kJ/mol 20 %		-167 kJ/mol 36 %
<b>HB2</b>		<b>HB4</b>	
			-53 kJ/mol 38 %
		—	+68 kJ/mol 8,5 %
<b>mögliche C.T.-Interaktion</b>			
	Ø = -626 kJ/mol		Ø = -174 kJ/mol

Der Vergleich der Dynamiken beider Enantiomere zeigt, dass sowohl das (S)- als auch das (R)-Enantiomer stabile Komplexe mit WWEn um ca. -660 kJ/mol ausbilden können (Tabelle 5.7 oben).

Den entscheidenden Beitrag für diese Bindungsenergie liefert die ionische Wechselwirkung, die nicht enantioselektiv ist, sondern von beiden Enantio-

meren ausgebildet werden kann. Sie ist verantwortlich für ein erstes Annähern der Moleküle. Das unterschiedliche Trennverhalten der Enantiomere basiert auf der Häufigkeit, mit der stabile Komplexe gebildet werden. So wird die ionische Wechselwirkung bei fast allen Strukturen der (S)-Form ausgebildet, aber nur bei 17,5 % der (R)-Form.

Das (S)-Enantiomer bildet viel häufiger stabile Komplexe mit dem chiralen Selektor und hat dadurch eine bedeutend höhere durchschnittliche WWE als der (R)-Enantiomer. Die Differenz der WWE beträgt -452 kJ/mol.

Das Muster der Wasserstoffbrücken ist für dieses Razemat enantioselektiv. Das (S)-Enantiomer bildet die HB1, die entscheidend die Orientierung und den Abstand der Ringsysteme beeinflusst. Die Diagramme (Bild 5.23) zeigen, dass die Ausbildung der Wasserstoffbrücke die Ringannäherung nach sich zieht. Das (R)-Enantiomer nutzt die andere Möglichkeit zur Wasserstoffbrücken-Bildung der bifunktionalen Carbamatseitenkette und bildet die HB4. Daneben existiert noch eine weitere Wasserstoffbrücke, die HB3, die in Kombination mit der ionischen Interaktion beobachtet wird. Der Energiegewinn ist allerdings sehr gering.

Bei der (S)-Form kann sich während der Annäherung auch die HB2 bilden. Diese kann eine Zwischenstufe sein, die im Verlauf durch die ionische Interaktion ersetzt wird, oder stabil erhalten bleibt. Durch Beteiligung der geladenen Carboxylatgruppe besitzt die Bindung einen hohen elektrostatischen Anteil, sodass der Energiegewinn relativ hoch ist (-430 kJ/mol).

Nur das (S)-Enantiomere bildet Komplexgeometrien mit paralleler Ringorientierung, die eine C.T.-Interaktion ermöglichen würde. Diese bilden sich zu einem Anteil von ca. 20%. Allerdings muß dieser Anteil nicht der Realität entsprechen, da C.T.-Interaktion im Kraftfeld nicht berechnet werden, und somit diese Attraktion der Ringsysteme bei der Optimierung der Komplexgeometrie fehlt. Die Einstellung der parallelen Komplexgeometrie kommt durch die anderen Interaktionen zustande. Eine quantenchemische Berechnung der potenziellen C.T.-Interaktion für das (S) 3,5-DNBL wird in Kapitel 5.3.6 (S.115) durchgeführt.

Tabelle 5.8 Vergleich der berechneten Ergebnisse mit den experimentellen Daten

(S) 3,5-DNBL		(R) 3,5-DNBL	
$k'_{\text{experimentell}}$	$\Delta \text{WWE}_{\text{berechnet}}$ (kJ/mol)	$k'_{\text{experimentell}}$	$\Delta \text{WWE}_{\text{berechnet}}$ (kJ/mol)
186,34	-626	11,74	-174

Der Vergleich mit den experimentellen Daten zeigt, dass die entwickelte Arbeitsmethode eine korrekte Wiedergabe der Elutionsreihenfolge und eine sichere Einschätzung der Trennbarkeit ermöglicht. Das (S)-Enantiomer mit der deutlich größeren WWE von -626 kJ/mol besitzt auch experimentell den höheren  $k'$ -Wert von 186,34. Die Differenz der WWEn und der experimentellen  $k'$ -Werten ist in beiden Fällen groß und erklärt zwanglos die mögliche Trennbarkeit der Enantiomere mit diesem chiralen Selektor.

Die Selektivität ( $\alpha$ ) kann durch die Wechselwirkungsenergien nicht richtig wiedergegeben werden. Sie wird aus den durchschnittlichen Wechselwirkungsenergien zu 3,6 berechnet. Der experimentelle Wert beträgt 15,88. Dieser Unterschied könnte in dem fehlenden Energieanteil der potenziellen C.T.-Interaktion begründet sein. Er wird in Kapitel 5.3.6 (S.115) näher untersucht.

**Kritikpunkt der Arbeitsmethode:**

Die durchschnittlichen WWEn der Dynamiken des (R)-Enantiomers schwanken stark. Dies könnte durch eine ungünstige Startgeometrie verursacht werden, die es erschwert, schnell und einheitlich gute Komplexgeometrien zu bilden. Obwohl während der Dynamik unterschiedliche Anordnungen durch Platzwechsel und Drehungen gefunden werden, wird im Folgenden die (R)-Startgeometrie zur Absicherung genauer untersucht.

**Überprüfung der Startgeometrie des (R)-Enantiomers**

Die eingesetzte Startgeometrie ist die gespiegelte (S)-Form aus der Kristallstruktur. Diese muss für das (R)-Enantiomer nicht optimal sein. Zum Vergleich wurde die beste Komplexgeometrie aller berechneten (R)-Dynamiken als neue Startgeometrie eingesetzt und eine erneute MDS für die (R)-Form nach gleichen Prinzipien durchgeführt. Die alte und neue Startgeometrie sind im Vergleich dargestellt (Bild 5.32).

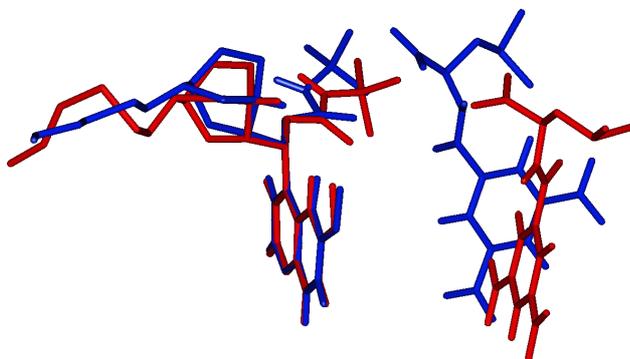


Bild 5.32 Alte Startgeometrie (blau) und neue (rot) des (R) 3,5-DNBL

Die durchschnittlichen Wechselwirkungsenergien der Dynamiken zeigten auch bei dieser Startgeometrie große Schwankungen von über  $-700$  kJ/mol bis in den positiven Bereich. Die Verteilung der WWE ist für beide Startgeometrien sehr ähnlich und eine Analyse der bei diesen Dynamiken gebildeten Komplexe zeigt keine neuen Komplexgeometrien. In Bild 5.33 sind stellvertretend die Verteilungen der WWE des (R) 3,5 DNBL dargestellt. Zum Vergleich sind die Verteilungen der WWE ausgehend von beiden Startgeometrien überlagert.

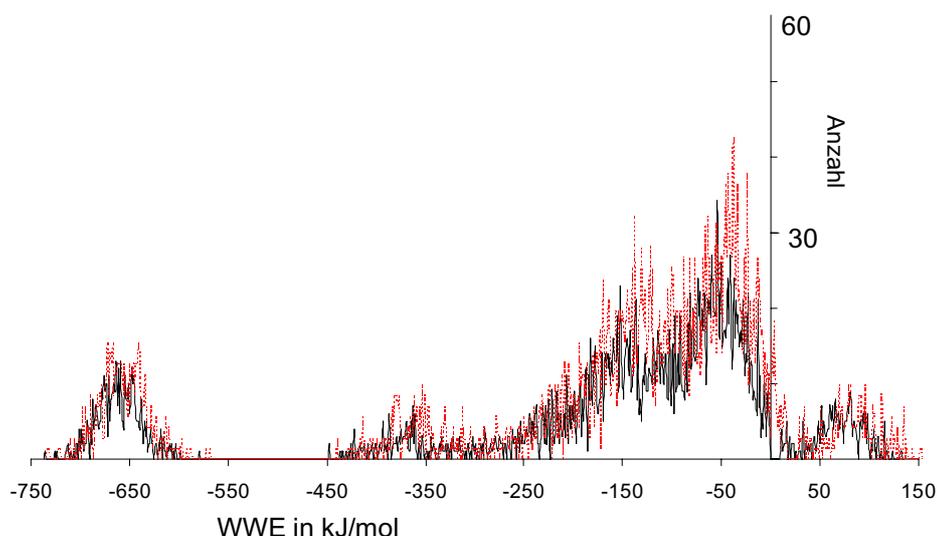


Bild 5.33 Überlagerung der Verteilung der WWEn beider (R) 3,5-DNBL-Startgeometrien

Das in Bild 5.33 dargestellte Ergebnis bestätigt, dass die Startgeometrie keinen einschränkenden Einfluss auf die Komplexbildung besitzt. Auch die neuen Berechnungen zeigen, dass es für das (R)-Enantiomer auf Grund seiner räumlichen Struktur schwieriger ist, stabile Komplexe mit dem chiralen Selektor einzugehen. Demzufolge schwanken die WWEn der Dynamiken stärker. Die Häufigkeit der Bildung stabiler Komplexe ist entscheidend für die Trennung.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Generierung der (R)-Startgeometrie aus der (S)-Form durch Spiegelung und anschließender Geometrieoptimierung eine unvoreingenommene Beurteilung der Wechselwirkungen mit den chiralen Selektor ermöglicht. Die Methode ermöglicht eine einfache, objektive Generierung der (R)-Startgeometrien und wird als standardisiertes Verfahren für die weiteren Enantiomeren eingesetzt.

## 5.2 Überprüfung der Arbeitsmethode mit drei Razematen

Die in Kapitel 5.1 entwickelte Arbeitsmethode zur Berechnung und Auswertung der Enantiomerentrennung wird bei drei weiteren Enantiomerenpaaren angewandt und überprüft. Die Darstellung der Ergebnisse und deren Auswertung erfolgt nach dem gleichen Vorgehen wie bei 3,5 DNBL.

### 5.2.1 MDS des 2,4-Dinitrobenzoylleucins (2,4-DNBL)

#### 5.2.1.1 MDS des (S) 2,4-DNBL

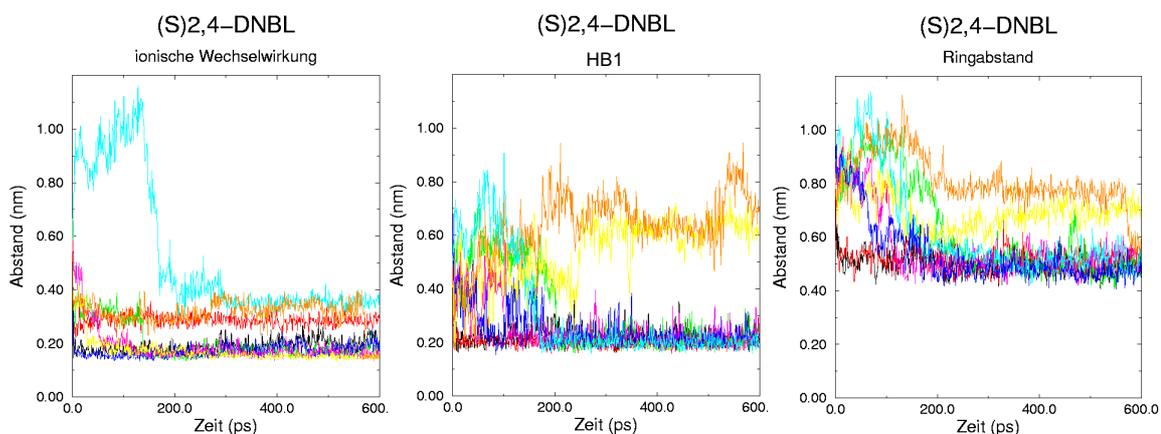


Bild 5.34 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (S) 2,4-DNBL

Die Dynamiken können in drei Gruppen eingeteilt werden.

#### Gruppe 1

Zu dieser Gruppe gehören die Simulationen (schwarz, blau, magenta und grün dargestellt) mit sehr starker ionischer Wechselwirkung, HB1 und gleichbleibendem kleinen Ringabstand (Bild 5.34). Die Komplexgeometrie ist in Bild 5.35 dargestellt. Es werden hohe Komplexenergien um -750 kJ/mol gefunden.

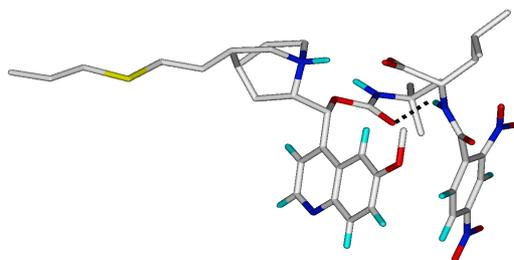


Bild 5.35 Komplexgeometrie der Gruppe 1 des (S) 2,4-DNBL

Bei etwas größerem Abstand der ionischen Interaktion (s. rot dargestellte Dynamik), beträgt die Komplexenergie nur -439 kJ/mol.

Findet die Annäherung erst nach ca. 200 ps statt (hellblau), reduziert sich die WWE weiter auf -380 kJ/mol.

## Gruppe 2

Die ionische Wechselwirkung allein kann auch zu einer hohen WWE von ca. -700 kJ/mol führen. Dieses ist bei der in gelb dargestellte Dynamik der Fall (Bild 5.34). Diese Komplexgeometrie ermöglicht keine zusätzliche Interaktion (Bild 5.36).

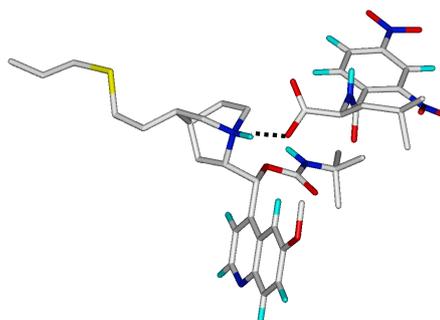


Bild 5.36 Komplexgeometrie mit ionischer Wechselwirkung

## Gruppe 3

Zur Gruppe 3 gehört eine Dynamik, die keine gute Annäherung zeigt (orange). Die ionischen Interaktionspartner nähern sich maximal auf 3 Å an. Gegen Ende zeigt der Abstand eine steigende Tendenz. Die HB1 wird nicht gefunden, und der Ringabstand ist entsprechend groß. Trotzdem zeigt diese Dynamik eine WWE von -500 kJ/mol. Dies basiert auf der HB3, die zwischen 200 und 580 ps durchgängig vorhanden ist. Die entsprechende Komplexgeometrie wird nach einer Bewegung des DNBL zur anderen Seite des Selektors aufgebaut (Bild 5.37).

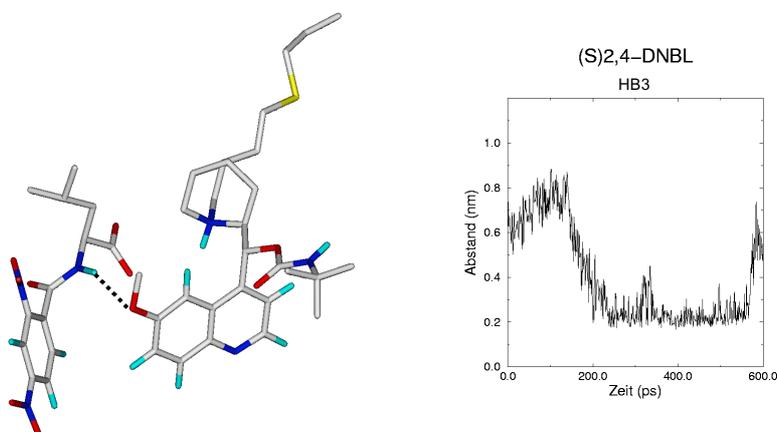


Bild 5.37 Komplexgeometrie und Abstandsverlauf der HB3

Die statistische Verteilung der WWEn zeigt zwei Maxima (Bild 5.38). Das erste Maximum entspricht der Gruppe 1 mit einer durchschnittlichen WWE von -751 kJ/mol und einem prozentualen Anteil von 66%. Das zweite beinhaltet die Komplexgeometrien der Gruppe 2 und 3. Die durchschnittliche WWE beträgt -498 kJ/mol (33%). Auch hier bildet das (S)-Enantiomer fast ausschließlich starke und mittelstarke Komplexe. Nur 1% der Energien liegen zwischen -300 und -120 kJ/mol. Die durchschnittliche Gesamtwechselwirkungsenergie beträgt -660 kJ/mol.

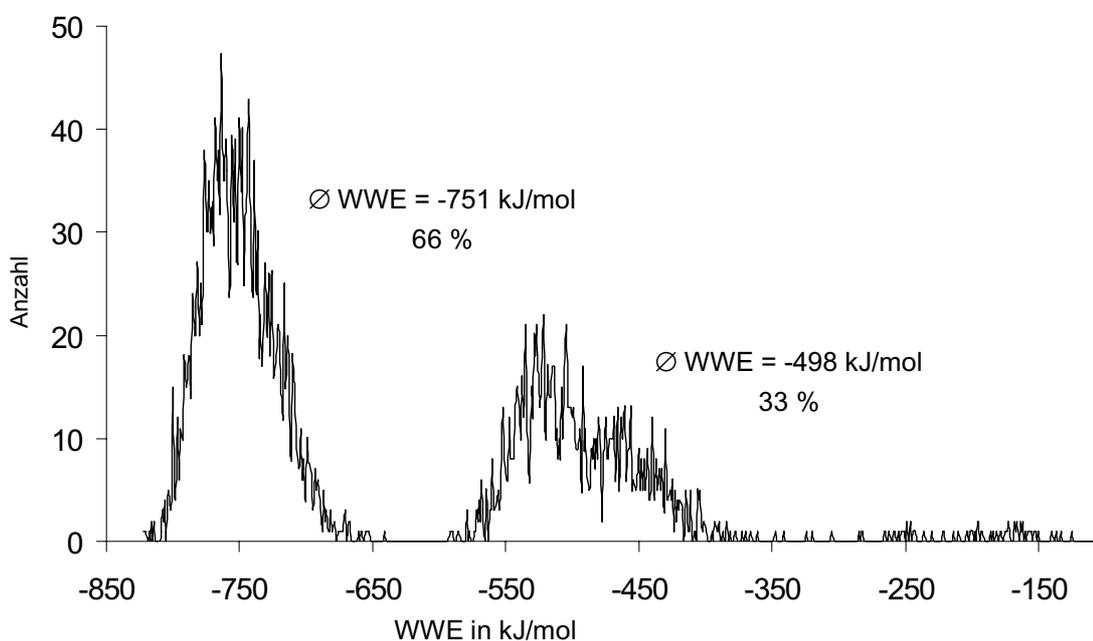


Bild 5.38 Verteilung der WWEn für (S) 2,4-DNBL

### 5.2.1.2 MDS des (R) 2,4-DNBL

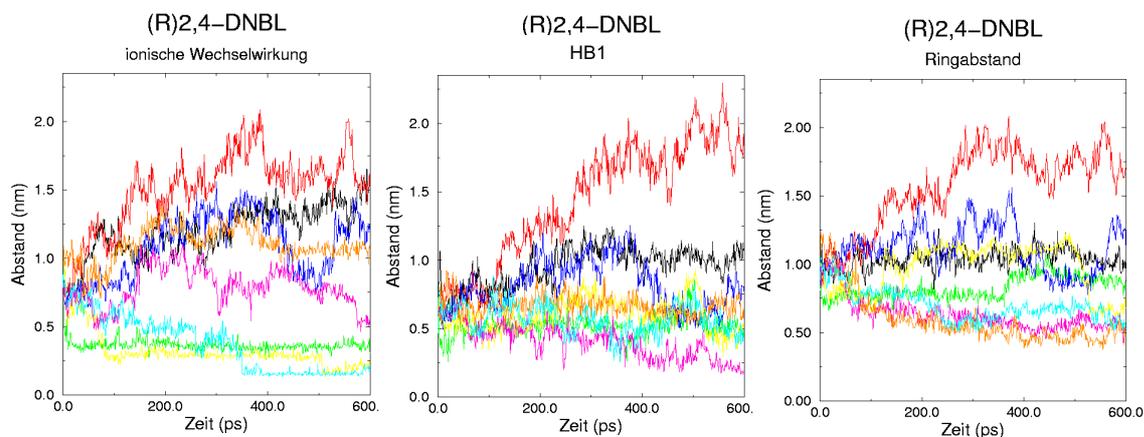


Bild 5.39 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (R) 2,4-DNBL

Die Simulationen lassen sich in vier Gruppen einteilen.

#### Gruppe 1

In dieser Gruppe befinden sich zwei Simulationen mit starker ionischer Interaktion und geringer Ausbildungstendenz der HB1 sowie unterschiedlich großen Ringabständen (Bild 5.39 in hellblau und gelb dargestellt). In beiden Fällen wird auch die HB3 gebildet. Diese bleibt bei der in hellblau dargestellten Dynamik ab ca. 220 ps konstant bestehen. Bei der anderen (gelb) bildet sie sich erst gegen Ende nach ca. 520 ps. In Bild 5.40 ist die Komplexgeometrie und der Abstandsverlauf der HB3 für diese beiden Simulationen dargestellt. Die WWen der Komplexe betragen weniger als -700 kJ/mol.

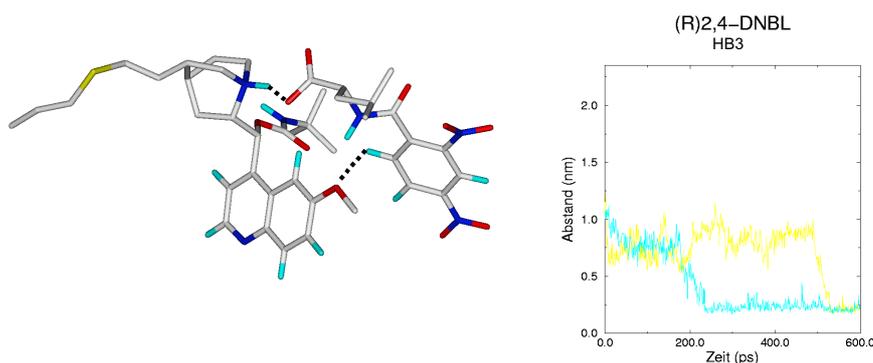


Bild 5.40 Komplexgeometrie mit ionischer Interaktion und der HB3, sowie deren Abstandsverlauf für Gruppe 1 des (R) 2,4-DNBL

#### Gruppe 2

In diese Gruppe fällt die in grün dargestellte Dynamik. Der Abstand für die ionischen Interaktionspartner beträgt konstant 3 Å. Die Länge der HB1 liegt bei

ca. 5 Å. Durch die Annäherung der ionischen Interaktionspartner auf 3 Å beträgt die durchschnittliche WWE ca. -400 kJ/mol.

### Gruppe 3

Während der in magenta dargestellten Dynamik bildet sich ab ca. 400 ps eine stabile HB1 aus (Bild 5.39). Die Komplexgeometrie ist in Bild 5.41 dargestellt. Sie führt zu einer Komplexenergie von ca. -400 kJ/mol.

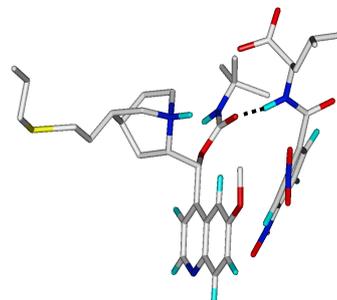


Bild 5.41 Komplexgeometrie der HB1

### Gruppe 4

Ein großer Teil der Dynamiken (schwarz, rot, blau, orange) zeigt keine Molekülannäherung (Bild 5.39) und besitzt daher sehr kleine WWEn.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass das (R)-Enantiomer eine breite Streuung der WWEn zeigt (Bild 5.42). Es bildet auch stabile Komplexe mit einer durchschnittlichen WWE von -740 kJ/mol aus, deren Häufigkeit ist aber mit nur 8% sehr gering. Die Komplexgeometrie entspricht der Gruppe 1. Ein zweiter Energiebereich um -428 kJ/mol umfasst die Geometrien der Gruppe 2 und 3. Den größten Anteil von insgesamt 63% umfassen drei Maxima, in denen keine starken Wechselwirkungen ausgebildet werden. Die durchschnittliche Gesamtwechselwirkungsenergie beträgt -285 kJ/mol.

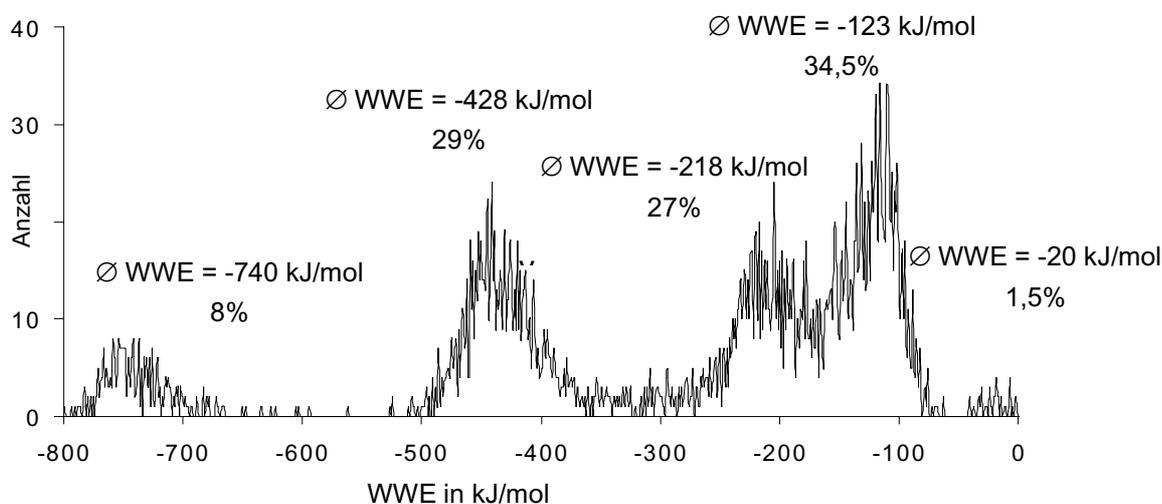
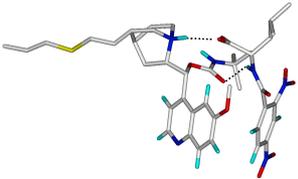
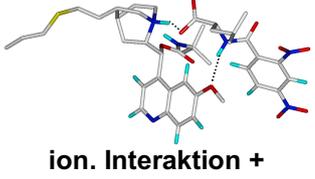
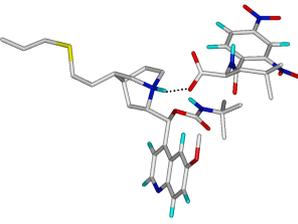
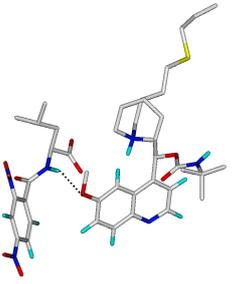
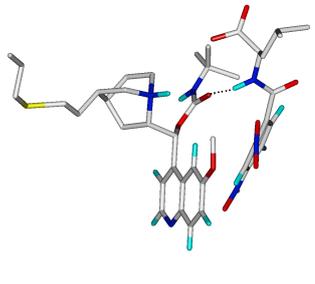


Bild 5.42 Verteilung der WWEn für (R) 2,4-DNBL

## 5.2.1.3 Ergebnisse der Enantiomertrennung von 2,4-DNBL

Tabelle 5.9 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere, nach Stärke der Interaktionen geordnet

(S) 2,4-DNBL		(R) 2,4-DNBL	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <b>ion. Interaktion + HB1</b>	-751 kJ/mol 66%	 <b>ion. Interaktion + HB3</b> ⇒ ab ca. 220/520 ps	-740 kJ/mol 8%
 <b>ion. Interaktion</b>	-498 kJ/mol 33%	<b>ion. Interaktion</b> ⇒ Abstand 3 Å	-428 kJ/mol 29%
 <b>HB3</b>		 <b>HB1</b>	
—	—	—	-218 kJ/mol 27%
—	—	—	-123 kJ/mol 34,5%
—	—	—	-20 kJ/mol 1,5
	Ø = -660 kJ/mol		Ø = -285 kJ/mol

Beide Enantiomere bilden stabile Komplexe mit hohen WWEn über -700 kJ/mol aus, bei denen wieder die ionische Interaktion die entscheidende Rolle spielt (Tabelle 5.9 oben). Es ist interessant, dass für dieses Enantiomer keine enantioselektiven Wasserstoffbrücken existieren; beide bilden die HB1 und HB3 aus. Allerdings unterscheidet sich die Komplexgeometrie bei der HB3. Bei der (S)-Form kommt es zu einer Bewegung des Moleküls auf die andere Seite des Selektors, bei der (R)-Form nicht.

Das (S)-Enantiomer bildet zu fast 100% stabile Komplexe aus, das (R)-Enantiomer nur zu 37%. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass das (S)-Enantiomer länger auf der Säule bleibt, und eine Trennung deswegen möglich ist. Die Differenz der WWE beträgt -312 kJ/mol.

Tabelle 5.10 Vergleich der berechneten Ergebnisse mit den experimentellen Daten

(S) 2,4-DNBL		(R) 2,4-DNBL	
$k'$ experimentell	$\emptyset$ WWE berechnet (kJ/mol)	$k'$ experimentell	$\emptyset$ WWE berechnet (kJ/mol)
11,83	-660	8,63	-285

Ein Vergleich mit den experimentellen Daten bestätigt die Berechnungen. Die Elutionsreihenfolge und die Trennbarkeit werden richtig wiedergegeben.

Die berechnete Selektivität ( $\alpha$ ) beträgt 2,3, die experimentell ermittelte 1,4. Die Wiedergabe der geringen Selektivität ist bei diesem Enantiomerenpaar also zumindest tendenziell möglich.

## 5.2.2 MDS des 4-Mononitrobenzoylleucins (4-MNBL)

### 5.2.2.1 MDS des (S) 4-MNBL

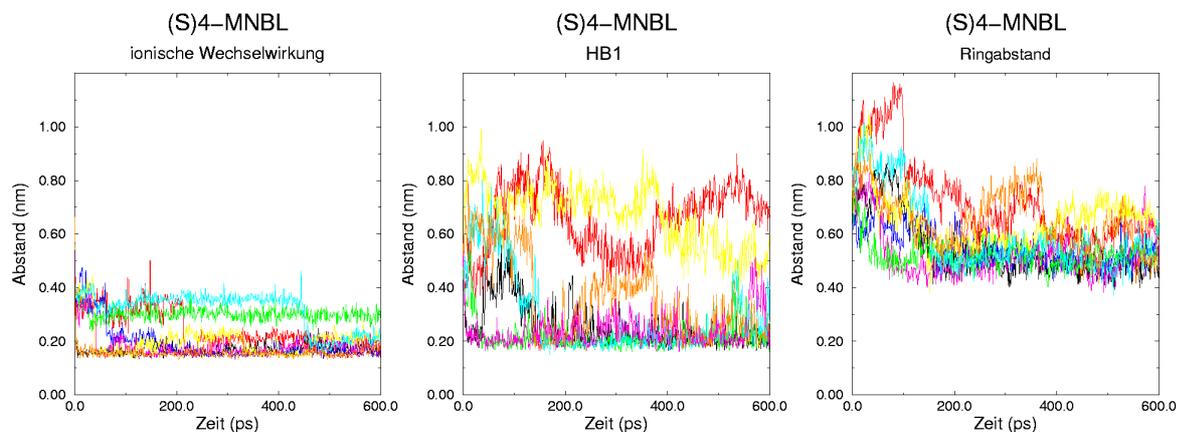


Bild 5.43 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (S) 4-MNBL

Die Simulationen können in vier Gruppen eingeteilt werden.

#### Gruppe 1

In dieser Gruppe befinden sich Dynamiken mit sehr starker ionischer Wechselwirkung und der HB1. Beide Interaktionen werden schnell ausgebildet und bleiben bei den in schwarz, blau und magenta dargestellten Dynamiken stabil erhalten. Der Ringabstand ist ebenfalls gering und konstant (Bild 5.43). Die Komplexgeometrie ist in Bild 5.44 dargestellt. Die WWE liegen durchschnittlich um  $-650$  kJ/mol.

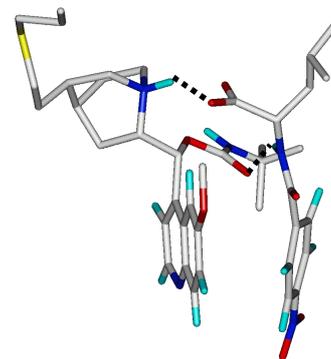


Bild 5.44 Komplexgeometrie der Gruppe 1

Die in Bild 5.43 in orange dargestellte Dynamik gehört ebenfalls in diese Gruppe. Allerdings findet sich die HB1 nicht permanent, was die durchschnittliche Komplexenergie auf  $-627$  kJ/mol reduziert.

#### Gruppe 2

Die in hellblau dargestellte Dynamik zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die Simulationen in Gruppe 1. Die HB1 wird aber erst nach 150 ps und die ionische Interaktion sogar erst nach 450 ps ausgebildet. Der Ringabstand, der durch die HB1 bestimmt wird, erreicht nach rund 200 ps einen Wert um  $5 \text{ \AA}$ . Die Energie liegt bei  $-479$  kJ/mol.

### Gruppe 3

In dieser Gruppe befindet sich nur die in Bild 5.43 grün dargestellte Simulation. Diese weist insgesamt die gleichen Interaktionen wie die Gruppen 1 und 2 auf. Die HB1 und der davon abhängige Ringabstand zeigen von Anfang an konstante Werte. Die ionischen Gruppen zeigen aber kontinuierlich einen etwas größeren Abstand von ca. 3 Å. Dadurch liegt die WWE nur bei ca. -400 kJ/mol.

### Gruppe 4

Zu dieser Gruppe gehören die zwei in gelb und rot dargestellten Dynamiken, die eine starke ionischen Interaktion aufweisen, aber auffällig große, schwankende Abstände für die HB1 und die Ringe besitzen (Bild 5.43). Der Grund dafür ist die zeitweilige Ausbildung der HB3. Diese bedingt das schwankende Verhalten der beiden obengenannten Interaktionen. In der Komplexgeometrie zeigt sich ein Wechsel in der Anordnung der Moleküle zueinander (Bild 5.45). Beide Dynamiken produzieren hohe WWEn, wobei die WWE der in rot dargestellten Simulation nur bei -574 kJ/mol liegt, da die ionische Interaktion erst nach ca. 300 ps ausgebildet wird, während die WWE der in gelb dargestellten Dynamik durchschnittlich -645 kJ/mol beträgt.

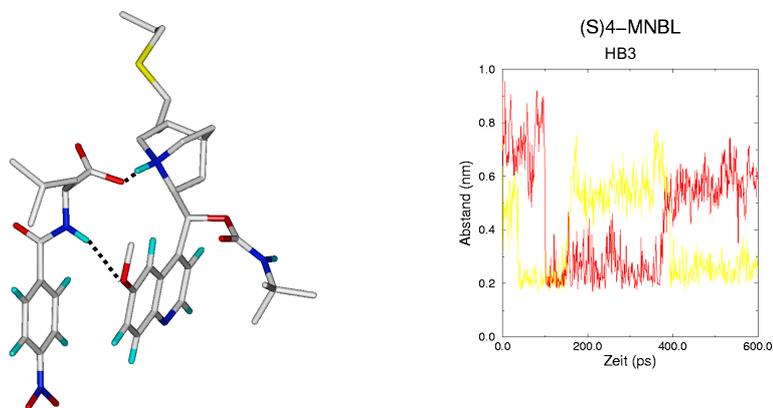


Bild 5.45 Komplexgeometrie mit ionischer Interaktion und HB3, sowie Verlauf der Abstände

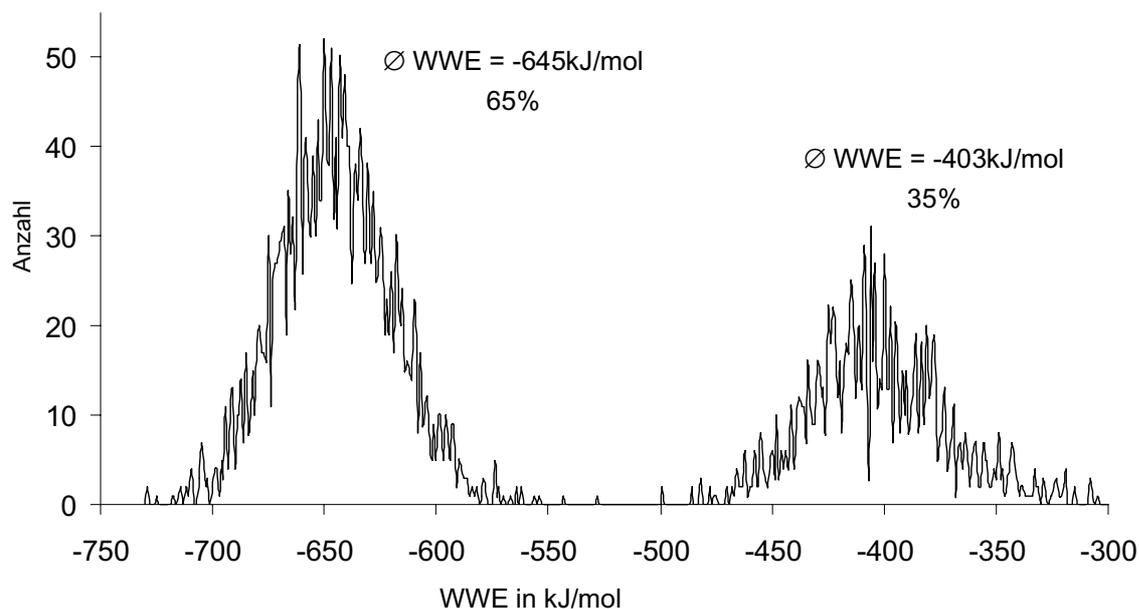


Bild 5.46 Verteilung der WWEn für (S) 4-MNBL

Die Verteilung der WWEn zeigt, dass 65% der Komplexe eine durchschnittliche WWE von  $-645$  kJ/mol haben (Bild 5.46). Die zu diesem Maximum gehörenden Komplexgeometrien entsprechen der Gruppe 1 und 4. Die verbleibenden 35% haben eine durchschnittliche WWE von  $-403$  kJ/mol. Hierzu gehören Komplexe der Gruppe 2 und 3. Die durchschnittliche Gesamtwechselwirkung beträgt  $-561$  kJ/mol.

### 5.2.2.2 MDS des (R) 4-MNBL

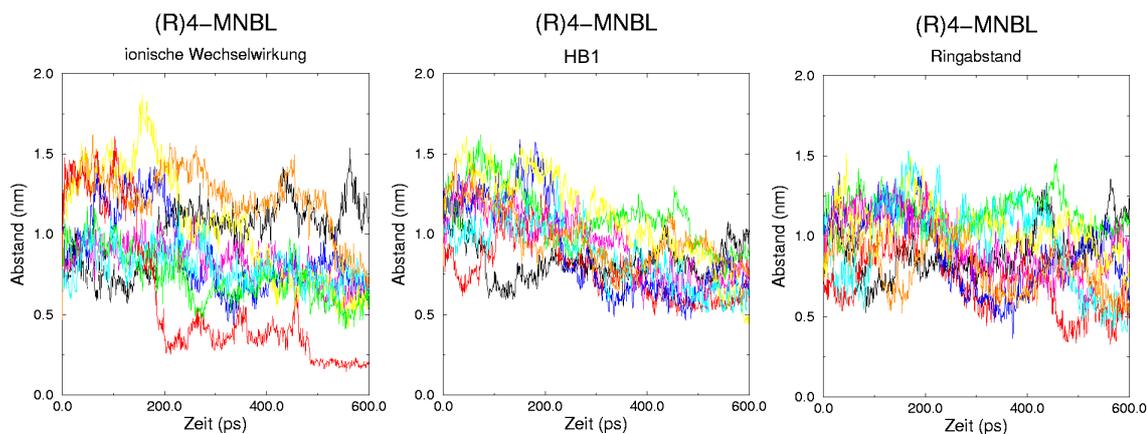


Bild 5.47 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (R) 4-MNBL

Die Diagramme zeigen, dass das (R)-Enantiomer keine stabilen Wechselwirkungen ausbildet. Fast alle Abstände der betrachteten Interaktionspartner liegen oberhalb von 5 Å und die WWE sind daher nur schwach (-100 kJ/mol).

Nur in einer Dynamik, hier in rot dargestellt, bildet sich gegen Ende der Simulationsperiode die ionische Interaktion aus. Die Annäherung der ionischen Gruppen erfolgt stufenweise.

Auffällig ist die Komplexgeometrie. Das MNBL befindet sich auf der anderen Seite des chiralen Selektors und steht auf dem Kopf im Vergleich zur Startgeometrie (Bild 5.48). Die ausgebildete ionische Interaktion führt zu einem Energiegewinn von durchschnittlich -619 kJ/mol.

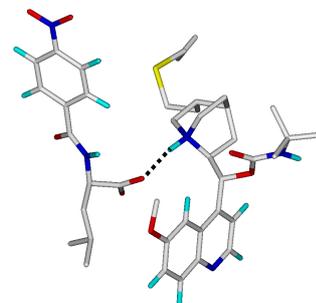


Bild 5.48 Komplexgeometrie der ionischen Interaktion nach Seitenwechsel und Drehung

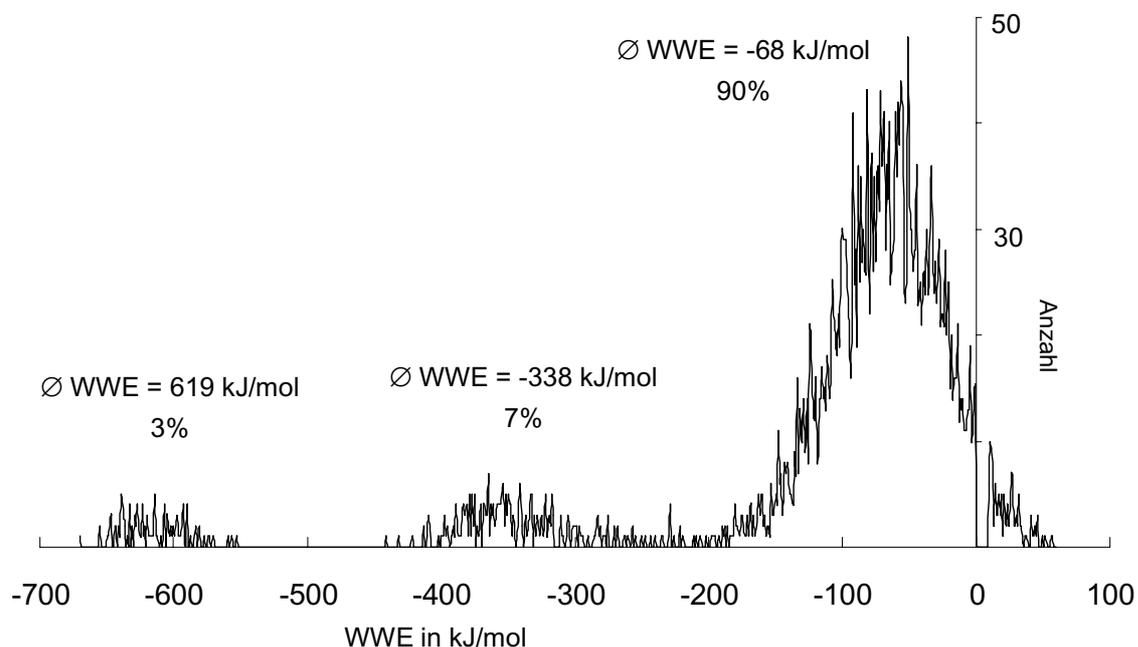
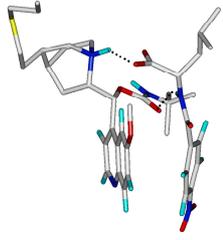
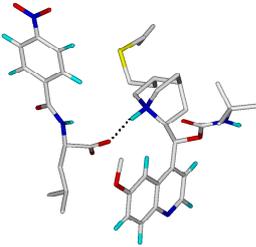
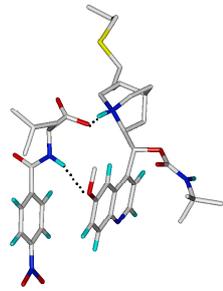


Bild 5.49 Verteilung der WWE für (R) 4-MNBL

Die Verteilung der WWE zeigt, dass 90% der WWE oberhalb  $-250$  kJ/mol liegen (Bild 5.49). Somit bildet das Enantiomer überwiegend schlechte oder gar keine Wechselwirkungen aus. Dennoch existiert ein Maximum mit einer durchschnittlichen WWE vom  $-619$  kJ/mol und einem geringen prozentualen Anteil von 3%. Zu diesem gehören Komplexgeometrien mit ionischer Interaktion (Bild 5.48). Dem mittleren Energiebereich ( $-338$  kJ/mol) kann keine konkrete Komplexgeometrie zugeordnet werden. Die WWE basiert in diesem Bereich auf der Annäherung der ionischen Gruppen. Die durchschnittliche Gesamtwechselwirkungsenergie beträgt  $-103$  kJ/mol.

## 5.2.2.3 Ergebnisse der Enantiomertrennung von 4-MNBL

Tabelle 5.11 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere im Überblick

(S) 4-MNBL		(R) 4-MNBL	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <b>ion. Interaktion + HB1</b>	-645 kJ/mol 65%	 <b>ion. Interaktion</b> ⇒ ab ca. 500 ps	-619 kJ/mol 3%
 <b>ion. Interaktion + HB3</b>			
<b>ion. Interaktion + HB1</b> ⇒ erst nach 150 ps	-406 kJ/mol 35%	<b>ion. Interaktion</b> ⇒ Abstand > 5 Å	-338 kJ/mol 7%
—	—	—	-68 kJ/mol 90%
	Ø = -561 kJ/mol		Ø = -103 kJ/mol

Die (S)-Form bildet ausschließlich stabile bis mittelstabile Komplexe. Im Gegensatz dazu liegen 90% der WWEn der (R)-Form bei durchschnittlich  $-68$  kJ/mol, d.h. es werden keine Komplexe gebildet. Nur bei einer Dynamik wird ein stabiler Komplex mit ionischer Interaktion nach ca. 500 ps ausgebildet. Dieser Komplex entsteht nach einem Seitenwechsel und Drehung und besitzt eine WWE von über  $-600$  kJ/mol.

Wie die Tabelle 5.11 zeigt, tritt bei allen stabilen Komplexgeometrien die ionische Interaktion auf. Das (S)-Enantiomer bildet zusätzlich die HB1 oder HB3.

Die Ergebnisse zeigen, dass wiederum das (S)-Enantiomer stärker gebunden wird und damit länger auf der Säule verweilt. Der Unterschied der WWEn beträgt  $-458$  kJ/mol, so dass eine Trennung der beiden 4-MNBL an diesem chiralen Selektor möglich sein sollte.

Tabelle 5.12 Vergleich der berechneten Ergebnisse mit den experimentellen Daten

(S) 4-MNBL		(R) 4-MNBL	
$k'_{\text{experimentell}}$	$\Delta$ WWE <sub>berechnet</sub> (kJ/mol)	$k'_{\text{experimentell}}$	$\Delta$ WWE <sub>berechnet</sub> (kJ/mol)
29,00	-561	7,08	-103

Die experimentellen Daten bestätigen die Elutionsreihenfolge und die Trennbarkeit.

Die experimentell ermittelte Selektivität ( $\alpha$ ) beträgt 4,1, die berechnete 5,5. Auch bei diesem Enantiomer wird die Selektivität tendenziell wiedergegeben.

Eine abschließende Wertung der Berechnungsmöglichkeiten der Selektivität der Trennungen wird erst nach Auswertung des letzten Enantiomerenpaares (Kapitel 5.2.4 S. 99) durchgeführt.

## 5.2.3 MDS des Benzoylleucins (BL)

### 5.2.3.1 MDS des (S)-BL

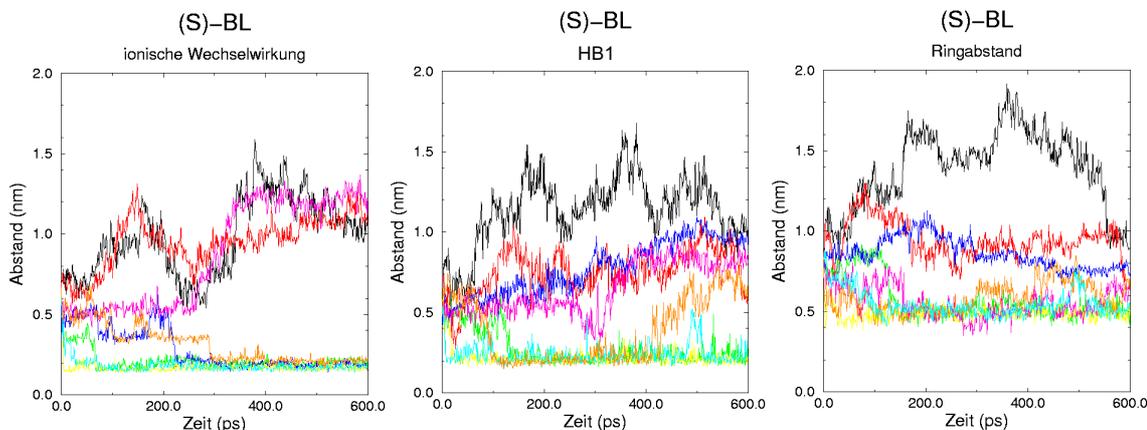


Bild 5.50 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (S)-BL

Die Ergebnisse der Berechnungen können wiederum in vier Gruppen eingeteilt werden.

#### Gruppe 1

In dieser Gruppe befinden sich drei Dynamiken (gelb, grün, hellblau) mit sehr ähnlichen, kleinen Abständen zwischen den Wechselwirkungspartnern (Bild 5.50). Alle drei dargestellten Wechselwirkungstypen werden schnell und konstant ausgebildet. Die Komplexgeometrie ist in Bild 5.51 dargestellt. Die durchschnittliche WWE ist mit  $-637$  kJ/mol sehr hoch.

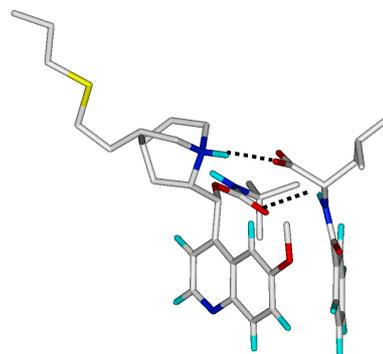


Bild 5.51 Komplexgeometrie der Gruppe 1

#### Gruppe 2

In der orange dargestellten Simulation wird die ionische Interaktion erst nach ca. 250 ps gefunden und bleibt dann konstant bestehen. Die HB1 ist zunächst stabil und löst sich nach ca. 400 ps wieder auf. Der Ringabstand zeigt den gleichen Verlauf (Bild 5.50). Das Lösen der HB1 erscheint zunächst wegen der starken ionischen Annäherung merkwürdig. Doch der in Bild 5.52 dargestellte Wechsel der Komplexgeometrien erklärt dieses Verhalten.

Die HB1 wird gelöst, dann bewegt sich das (S)-BL-Molekül auf die andere Seite des Selektors und ab ca. 450 ps wird die HB3 gebildet. Die durchschnittliche WWE liegt bei  $-574$  kJ/mol.

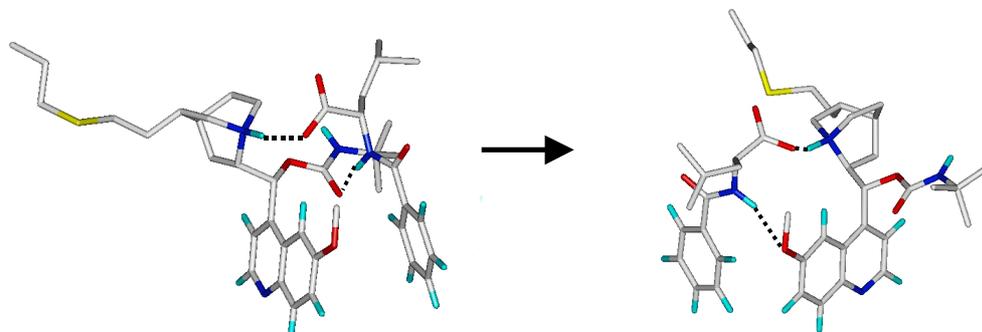


Bild 5.52 Komplexgeometrien vor und nach dem Seitenwechsel

### Gruppe 3

Die in blau dargestellte Dynamik bildet nach ca. 230 ps nur die ionische Interaktion aus. Die dargestellte Komplexgeometrie (Bild 5.53) zeigt auch hier einen Seitenwechsel und zusätzliches Drehen des Leucins um  $180^\circ$ , so dass durch diese ungünstige Orientierung keine weiteren Interaktionen eingegangen werden können. Die Komplexenergie beträgt durchschnittlich  $-563$  kJ/mol.

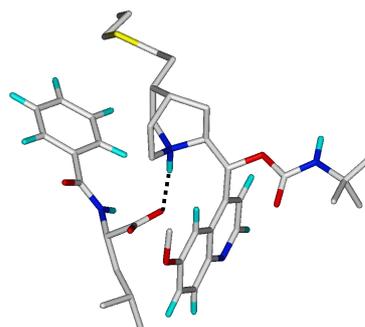


Bild 5.53 Ionische Interaktion nach Seitenwechsel und Drehung

### Gruppe 4

In dieser Gruppe befinden sich die in Bild 5.50 schwarz, rot und magenta dargestellten Dynamiken. In den Berechnungen zeigen sich keine guten Annäherungen der Wechselwirkungspartner. Die WWEn sind gering. Sie schwanken zwischen  $-69$  bis  $-134$  kJ/mol.

Die Verteilung zeigt ein ausgeprägtes Maximum, in dem 54% der Komplexe mit einer durchschnittlichen WWE von  $-637$  kJ/mol liegen (Bild 5.54). In diesen Energiebereich gehören die stabilen Komplexgeometrien der Gruppe 1–3. Es existieren drei weitere Maxima, in denen keine charakteristischen Komplexgeometrien gefunden werden. Die Energiebereiche mit durchschnittlichen WWE von  $-395$  kJ/mol (5%) und  $-258$  kJ/mol (6%) basieren auf der Annäherung der ionischen Gruppen. Dem Energiebereich zwischen  $-150$  und  $-30$  kJ/mol (35%) können keine bindenden Wechselwirkungen zugeordnet werden. Die durchschnittliche Gesamtwechselwirkungsenergie beträgt  $-411$  kJ/mol.

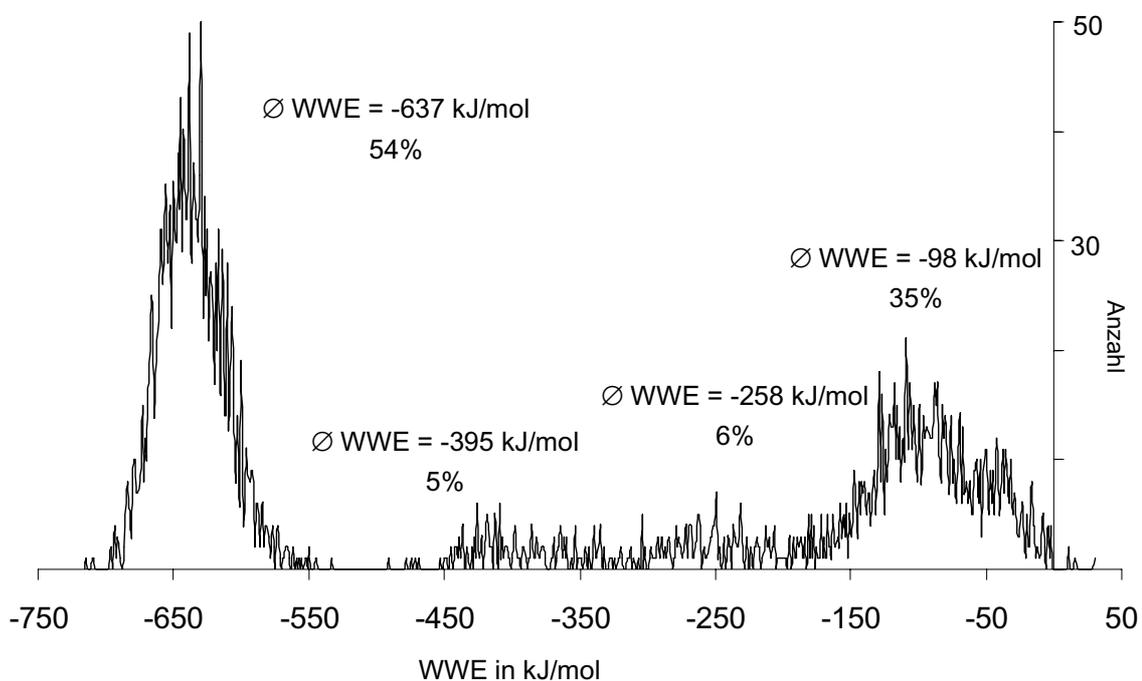


Bild 5.54 Verteilung der WWE für (S) BL

### 5.2.3.2 (R)-Benzoylleucin [(R)-BL]

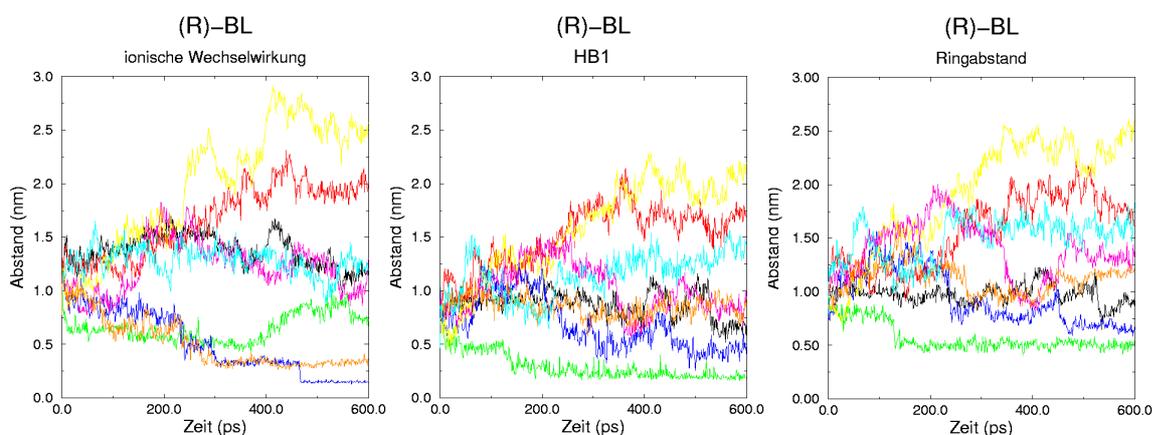


Bild 5.55 Verlauf der Wechselwirkungen in den Dynamiken für (R)-BL

Die Dynamiken lassen sich in drei Gruppen einteilen.

#### Gruppe 1

Auffällig ist der Verlauf der in grün dargestellten Simulation (Bild 5.55). Hier existiert eine stabile HB1, die einen konstanten Ringabstand von 5 Å ab ca. 170 ps bedingt. Die ionischen Interaktionspartner nähern sich zu Beginn leicht an, ab 400 ps wird der Abstand wieder vergrößert. Die Komplexgeometrien in Bild 5.56 zeigen, dass zu Beginn vorübergehend die HB2 ausgebildet wird und anschließend ein Wechsel zur HB1 stattfindet. Die so gebildete Komplexgeometrie erlaubt keine weitere Interaktion. Die durchschnittliche WWE beträgt  $-625$  kJ/mol. Diese WWE wird hauptsächlich durch die HB2 mit hohem elektrostatischen Anteil der geladenen Carboxylatgruppe geliefert.

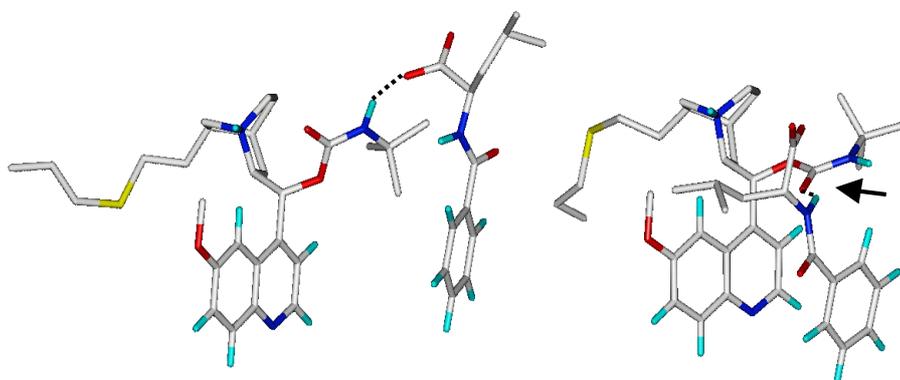


Bild 5.56 Komplexgeometrie der HB3 (links) und der HB1 (rechts)

## Gruppe 2

In diese Gruppe befinden sich zwei Dynamiken. Die orange dargestellte Simulation zeigt nach ca. 300 ps eine starke Annäherung der ionischen Interaktionspartner. Bei der in blau dargestellten Dynamik wird dieses erst nach ca. 430 ps (Bild 5.55) beobachtet. Die Komplexgeometrie ist in Bild 5.57 dargestellt. Die WWEn betragen durchschnittlich -286 kJ/mol.

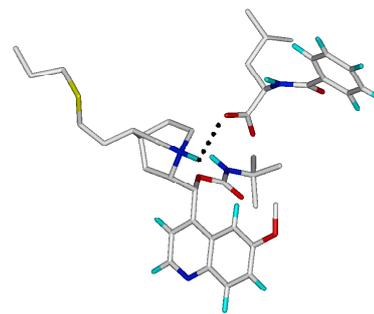


Bild 5.57 Komplexgeometrie der ionische Interaktion

## Gruppe 3

Die Dynamiken dieser Gruppe, zu ihr gehören die schwarz, rot, gelb, magenta und hellblau dargestellten Simulationen, zeigen keine Annäherung der Wechselwirkungspartner. Die WWEn sind sehr gering und liegen bei zwei der Dynamiken (gelb und rot) sogar im positiven Bereich.

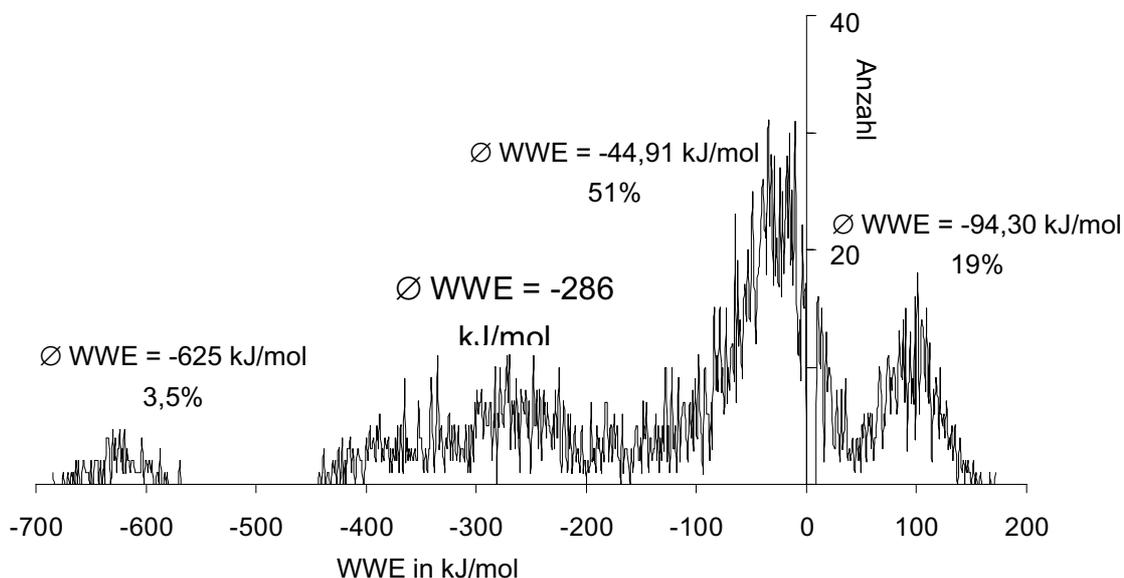
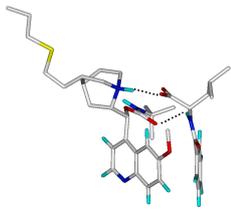
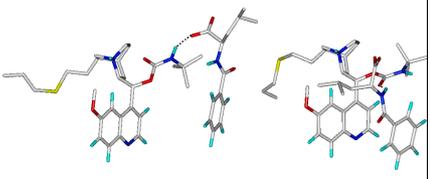
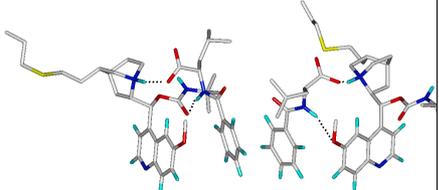
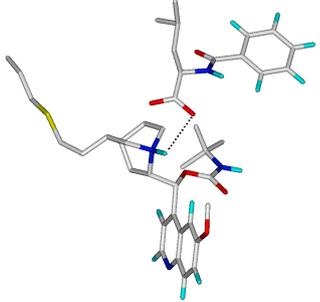
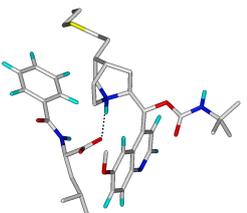


Bild 5.58 Verteilung der WWE für (R) BL

Insgesamt gesehen ist der Anteil stabiler Komplexe mit 3,5% sehr gering (Bild 5.58). Der mittlere Energiebereich mit einer durchschnittlichen WWE von -286 kJ/mol ist mit 26,5% vertreten. Zu diesem Bereich gehören die Komplexgeometrien der Gruppe 1 und 2. Der größte Energiebereich von 70% liegt oberhalb -170 kJ/mol. 19% davon besitzen sogar eine abstoßende WWE. Die durchschnittliche WWE beträgt demzufolge nur -103 kJ/mol.

### 5.2.3.3 Ergebnisse der Enantiomertrennung von BL

Tabelle 5.13 Ergebnisse der MSD beider Enantiomere im Überblick

(S) BL		(R) BL	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <p><b>ion. Interaktion + HB1</b></p>	<p>-637 kJ/mol 54%</p>	 <p><b>HB2</b> ⇒ ab ca. 170 ps <b>HB1</b></p>	<p>-625 kJ/mol 3,5%</p>
 <p><b>ion. Interaktion + HB1</b> ⇒ ab ca. 450 ps <b>HB3</b></p>		 <p><b>ion. Interaktion</b></p>	
 <p><b>ion. Interaktion</b></p>		<p>Annäherungszustände der oben genannten Interaktionen</p>	
—	-395 kJ/mol 5%	—	-45 kJ/mol 51%
—	-258 kJ/mol 6%	—	+94 kJ/mol 19%
—	-92 kJ/mol 35%	—	
	Ø = <b>-411</b> kJ/mol		Ø = <b>-103</b> kJ/mol

Selbst das (S)-Enantiomer des BL bildet nur ca. 60% stabile Wechselwirkungen aus. Die ionischen Interaktion ist an allen Komplexbildungen beteiligt und besitzt einen großen Anteil an den WWEn ( $\Delta$  -637 kJ/mol). Weitere Wechselwirkungen des (S)-Enantiomers sind die HB1 und HB3. Das (R)-Enantiomer bildet nur zu 3,5% stabile Komplexe (-625 kJ/mol) und zu 26,5% schwache Wechselwirkungen (-286 kJ/mol). Es werden die ionische Interaktion, die HB1 und die HB2 gefunden. Die schwächeren WWEn basieren auf Annäherung der beschriebenen Interaktionspartner.

Bei diesem Razemat werden enantioselektive Interaktionen gefunden. Die HB3 existiert nur für das (S)-, die HB1 nur für das (R)-Enantiomer. Die Differenz der WWEn beträgt -308 kJ/mol. Damit sollte eine Trennung möglich sein, das (R)-Enantiomer verlässt zuerst die Säule. Dieses ergeben auch die experimentellen Daten.

Tabelle 5.14 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere im Überblick

(S) BL		(R) BL	
$k'$ experimentell	$\Delta$ WWE berechnet (kJ/mol)	$k'$ experimentell	$\Delta$ WWE berechnet (kJ/mol)
14,31	-411	5,60	-103

Die Selektivität beträgt bei diesem Enantiomerenpaar berechnet 3,9 und experimentell 2,56. Damit bestätigen auch die durchgeführten Simulationen für das BL, dass eine tendenzielle Wiedergabe der Selektivität mit den Berechnungen möglich ist.

### 5.2.4 Gesamtauswertung aller Enantiomerenpaare

Tabelle 5.15 Zusammenfassung der Ergebnisse für alle vier Enantiomerenpaare

Wechselwirkungstypen	3,5-DNBL		2,4-DNBL		4-MNBL		BL	
	S	R	S	R	S	R	S	R
ion. Interaktion	x		x	x	x	x	x	x
HB1	x		x	x	x		x	x
HB2	x							x
HB3		x	x	x	x		x	
HB4		x						
enantioselektive HB	x				x		x	
<b>sehr stabile Komplexe</b>	<b>80%</b>	<b>12,5%</b>	<b>66%</b>	<b>8%</b>	<b>64%</b>	<b>3%</b>	<b>54%</b>	<b>3,5%</b>
∅ Komplexenergie kJ/mol	-626	-174	-660	-285	-561	-103	-411	-103
Differenz der WWE kJ/mol	-452		-375		-458		-308	
<b>Trennung möglich</b>	<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>	
<b>längere Retention</b>	<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>		<b>x</b>	

$k'_{\text{exp}}$	186,3	11,74	11,83	8,63	29,0	7,08	14,31	5,60
-------------------	-------	-------	-------	------	------	------	-------	------

Die Ergebnisse der Simulationen der Benzoylleucinderivate zeigen viele Gemeinsamkeiten.

Die ionische Interaktion ist in allen stabilen Komplexen mit WWE über -600 kJ/mol enthalten. Diese Wechselwirkung ist nicht enantioselektiv, aber durch die weitreichenden elektrostatischen Kräfte für eine erste Annäherung der Moleküle entscheidend. Sie besitzt einen großen Anteil an der WWE.

Das Vorkommen von Wasserstoffbrücken lässt keine generell gültige Aussage zu, da die Verteilung nicht bei allen Paaren enantioselektiv ist. Bei der (S)- und (R)-Form des 2,4-DNBL werden die gleichen Wasserstoffbrücken gefunden, bei dem 3,5-DNBL dagegen nur unterschiedliche. Trotzdem zeigen beide Paare deutliche Unterschiede in der durchschnittlichen WWE der Enantiomere und sind trennbar. Die Wasserstoffbrücken kommen mit Ausnahme der HB4 stets bei beiden Enantiomeren vor, d.h. keine ist spezifisch für ein Enantiomer. Sie unterstützen die stabile Komplexbildung und bedingen die Anordnung der

Ringsysteme. Die Existenz und der Einfluss der HB1 auf die Komplexbildung ist auch in der Literatur beschrieben.[70]

Eine Komplexgeometrie, die eine C.T.-Interaktion vermuten lässt, konnte nur bei dem (S) 3,5-DNBL gefunden werden. Hierbei muss beachtet werden, dass diese Wechselwirkung durch die verwendeten Kraftfelder nicht wiedergegeben werden kann, und somit bei der Ausbildung der Wechselwirkungsgeometrien nicht berücksichtigt wird.

Die Komplexgeometrien sind von der Startgeometrie unbeeinflusst. Es werden Komplexe gefunden, die sich rund um das Chinin anordnen, d.h. ein Positionswechsel und eine Drehbewegung auf die andere Seite des Selektors ist möglich (Bild 5.59). Die Anzahl der unterschiedlichen Anordnungen nimmt mit abnehmender Molekülgröße zu. Je weniger Nitrogruppen am Benzoylring gebunden sind, desto leichter beweglich sind die Moleküle. Dies ist durch abnehmende sterische Interaktionen zu erklären.

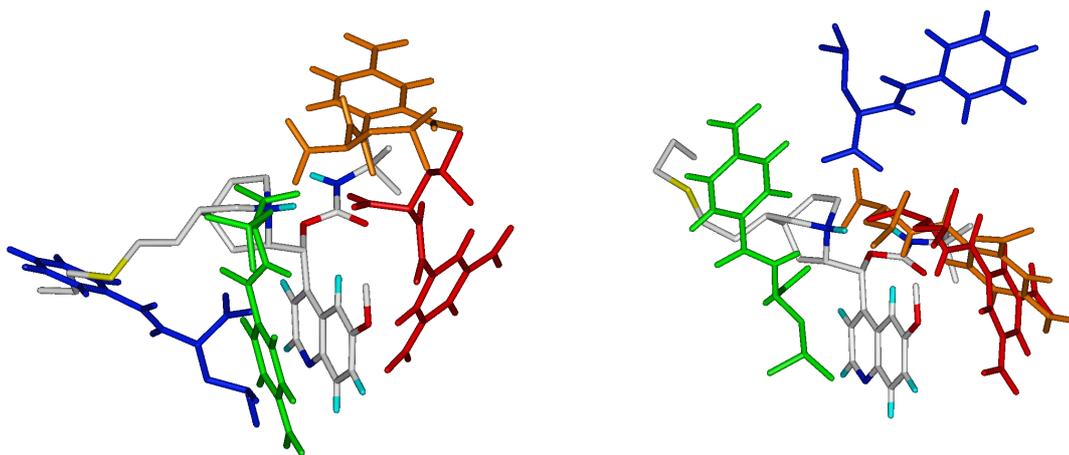


Bild 5.59 Komplexkonformationsraum für alle (S)-Enantiomere (links) und alle (R)-Enantiomere (rechts). Die Selektormoleküle sind jeweils superpositioniert worden.

Die Trennung erfolgt durch die unterschiedliche Häufigkeit, mit der bei den Enantiomeren stabile Komplexe gebildet werden. Hier zeigen die (S)-Enantiomere immer einen deutlich höheren Wert. Sie bilden zwischen 54 bis 80% stabile Komplexe. Für das (R)-Enantiomer existieren dagegen nur 3 bis 12,5% Komplexgeometrien mit hohem WWEn.

Die Ergebnisse geben die Elutionsreihenfolge für alle Enantiomerenpaare richtig wieder.

Die Selektivität der Trennung kann für drei Enantiomerenpaare tendenziell korrekt wiedergegeben werden. Die Ergebnisse sind im Vergleich mit den experimentellen Werten in der Tabelle 5.16 dargestellt.

Tabelle 5.16 Vergleich der experimentell ermittelten und der berechneten Selektivitäten

	3,5-DNBL	2,4-DNBL	4-MNBL	BL
$\alpha$ berechnet	3,6	2,3	5,5	3,9
$\alpha$ experimentell	15,9	1,4	4,1	2,6

Die sehr hohe Selektivität der Trennung des 3,5-DNBL kann nicht durch die Kraftfeldberechnungen simuliert werden. Allerdings wurden bei diesem Enantiomerenpaar 20% Komplexgeometrien mit paralleler Ringanordnung gefunden, die eine C.T.-Interaktion ermöglichen würden. Die Bedeutung dieser Beobachtung wird in Kapitel 5.3.6 (S.115) näher untersucht.

### Zusammenfassung:

Mit der entwickelten Vorgehensweise lässt sich vorhersagen, ob ein Enantiomerenpaar mit tert.-Butylcarbamoylechinin als chiraalem Selektor trennbar ist und welche Elutionsreihenfolge vorliegt.

Weiterhin können die für die Trennung wichtigen Wechselwirkungsarten bestimmt werden und deren Bedeutung anhand von Komplexgeometrien und deren WWEn bewertet werden.

Die Selektivität der Enantiomerentrennung kann nicht bei allen Enantiomerenpaaren wiedergegeben werden, was darauf zurückzuführen ist, dass im Kraftfeld nicht alle Wechselwirkungstypen berücksichtigt werden, wie z.B. C.T.-Interaktionen. In Fällen, in denen dieser Bindungstyp auftreten kann, wird die berechnete Selektivität zu niedrig vorhergesagt.

### 5.3 Vorhersage des Trennverhaltens von verschiedenen Enantiomerenpaaren

Bei der Auswertung der Enantiomerenpaare, deren Trennverhalten vorgeschagt werden soll, wird auf eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse der Moleküldynamik-Simulationen, wie sie in den vorangehenden Kapiteln durchgeführt wurde, verzichtet. Die Ergebnisse werden für jedes Razemat in einer Tabelle zusammengefasst, in der die gefundenen Komplexgeometrien, sowie deren WWE und Häufigkeit aufgeführt sind.

#### 5.3.1 MDS des 3,5-Dinitrobenzoyl-methyleucins (3,5-DNBTL)

Für diese Vorhersage wurde die Startgeometrie aus der Kristallstruktur des 3,5-DNBL übernommen, da sich das Enantiomerenpaar nur durch die zusätzliche  $\gamma$ -Methylgruppe davon unterscheidet (Bild 5.60).

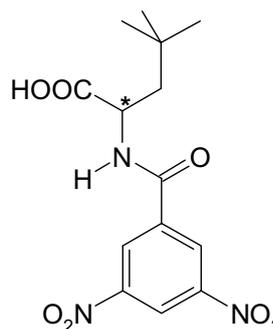
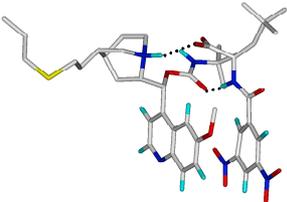
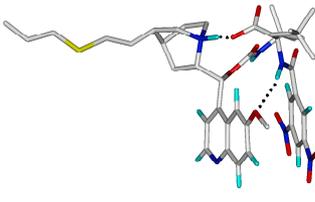
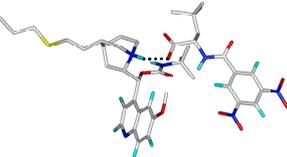
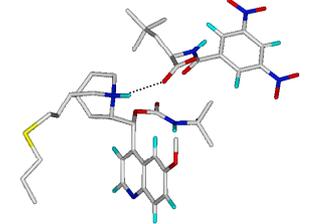


Bild 5.60 3,5 Dinitrobenzoyl-methyleucin (DNBTL)

## Ergebnisse der Enantiomerentrennung von 3,5-DNBTL

Tabelle 5.17 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere im Überblick

(S) 3,5-DNBTL		(R) 3,5-DNBTL	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <b>ion. Interaktion + HB1</b>	-760 kJ/mol 79%	 <b>ion. Interaktion + HB3</b>	-766 kJ/mol 33%
 <b>ion. Interaktion</b>		 <b>ion. Interaktion</b>	-525 kJ/mol 10,6%
—	—	—	-406 kJ/mol 12,5%
—	—	—	-208 kJ/mol 24,6%
—	-163 kJ/mol 19%	—	-120 kJ/mol 19,3%
<b>mögliche C.T.-Interaktion bei 50% der Komplexgeometrien</b>		<b>mögliche C.T.-Interaktion bei 30% der Komplexgeometrien</b>	
Ø = -631 kJ/mol		Ø = -433 kJ/mol	

Beide Enantiomere bilden stabile Komplexe mit WWEn um  $-760$  kJ/mol. Bei allen auftretenden Komplexgeometrien spielt die ionische Interaktion eine entscheidende Rolle. Die Wasserstoffbrücken sind enantioselektiv verteilt. Das (S)-Enantiomer bildet die HB1 und das (R)-Enantiomer die HB3 aus. Eine Vorhersage der Enantiomerentrennung ist über die Häufigkeit, mit der stabile Komplexe gebildet werden, möglich. Das (S)-Enantiomer bildet zu einem großen Anteil (79%) stabile Komplexe aus. Das (R)-Enantiomer bildet starke Komplexe nur mit einem Anteil von 33% und zusätzlich zu 23% mittelstarke Wechselwirkungen. Die Differenz der WWEn beträgt  $-198$  kJ/mol.

**Vorhersage:**

Es wird die Vorhersage gemacht, dass 3,5-DNBTL an dieser CSP trennbar ist und dass das (S)-Enantiomer länger auf der Säule verbleibt.

Bei beiden Enantiomeren wurden Komplexgeometrien gebildet, die eine C.T.-Interaktion vermuten lassen. Für das (S)-Enantiomer beträgt deren Anteil 50% und für das (R)-Enantiomer 30 %. Sollte es zu dieser Art von Wechselwirkung kommen, dann ist die vorhergesagte Selektivität von 1,5 zu niedrig, da die im Kraftfeld berechnete Differenz der WWE zu klein ist. In Kapitel 5.3.6 (S.115) wird die C.T.-Interaktion des 3,5-DNBTL genauer untersucht.

**5.3.2 MDS des Benzoylalanins (BA)**

Für die Startgeometrie des BA (Bild 5.61) diene ebenfalls die Kristallstruktur des (S)-3,5-DNBL im Komplex mit dem tert.-Butylcarbamoylchinin als Grundlage. Das Leucin wurde zu einem Alanin verkleinert.

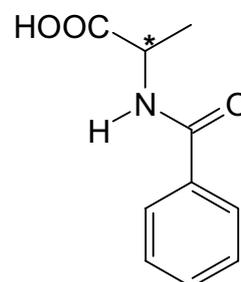
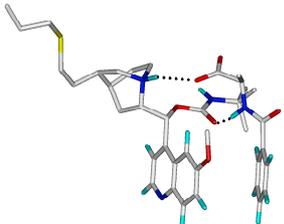
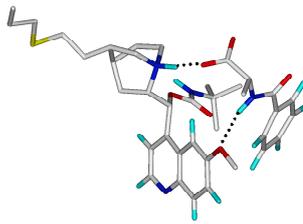
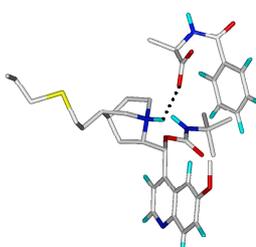


Bild 5.61 Benzoylalanin (BA)

## Ergebnisse der Enantiomertrennung von BA

Tabelle 5.18 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere im Überblick

(S)-BA		(R)-BA	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <p><b>ion. Interaktion + HB1</b></p>	-668 kJ/mol  80%	 <p><b>ion. Interaktion + HB3</b></p>	-692 kJ/mol  30%
 <p><b>ion. Interaktion + HB3</b></p>		 <p><b>ion. Interaktion</b></p>	
<p><b>ion. Interaktion</b></p>		<p><b>ion. Interaktion + ⇒ ab ca. 400 ps HB1</b></p>	
—	-266 kJ/mol 3,3%	—	-149 kJ/mol 53,6%
—	-115 kJ/mol 12,5%	—	
	<b>Ø = -576 kJ/mol</b>		<b>Ø = -360 kJ/mol</b>

Beide Enantiomere des BA können stabile Komplexe mit WWEn über  $-660$  kJ/mol ausbilden. Die ionische Interaktion ist in allen Komplexen vertreten. Sowohl das (S)- als auch das (R)-Enantiomer bilden zusätzlich zur Komplexstabilisierung die HB3 aus. Enantioselektiv ist die HB1, die nur bei der (S)-Form

auftritt. Das (S)-BA bildet zu 80% sehr stabile Komplexe, die (R)-Form nur zu 30%. Die Differenz der durchschnittlichen WWEn beträgt  $-216$  kJ/mol.

**Vorhersage:**

Es wird vorhergesagt, dass das BA-Razemat an dieser CSP trennbar ist. Das (S)-Enantiomer verbleibt länger auf der Säule. Es wird eine Selektivität von 1,6 vorausgesagt.

### 5.3.3 MDS des 2,4-Dinitrophenylleucins (2,4-DNPL)

Für das 2,4-DNPL (Bild 5.62) musste zunächst für jedes Enantiomer eine optimale Startkomplexgeometrie gefunden werden. Dafür wurden verschiedene Komplexgeometrien per Hand generiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle denkbaren Orientierungen rund um den chiralen Selektor und auch eine Drehung des 2,4-DNPL berücksichtigt wurde. Der Abstand der Moleküle wurde auf ca. 8 Å eingestellt. Ausgehend von diesen Startgeometrien wurde je eine 50 ps lange Dynamik unter den Bedingungen der Arbeitsmethode durchgeführt. Diejenige Startgeometrie, die im Verlauf der Simulation die stabilsten Komplexe ergab, wurde anschließend als Startgeometrie für die

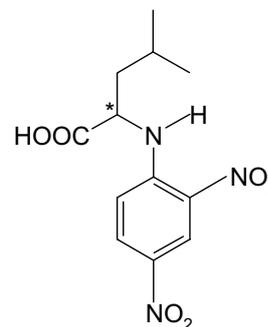


Bild 5.62 2,4-Dinitrophenylleucin

Simulation der Enantiomertrennung eingesetzt. In der folgenden Abbildung 5.63 sind die verschiedenen Startgeometrien für die (S)- und (R)-Form mit dem chiralen Selektor abgebildet. Die jeweils beste, im weiteren eingesetzte, Startgeometrie ist atomtyp-codiert eingefärbt, die anderen sind einfarbig dargestellt.

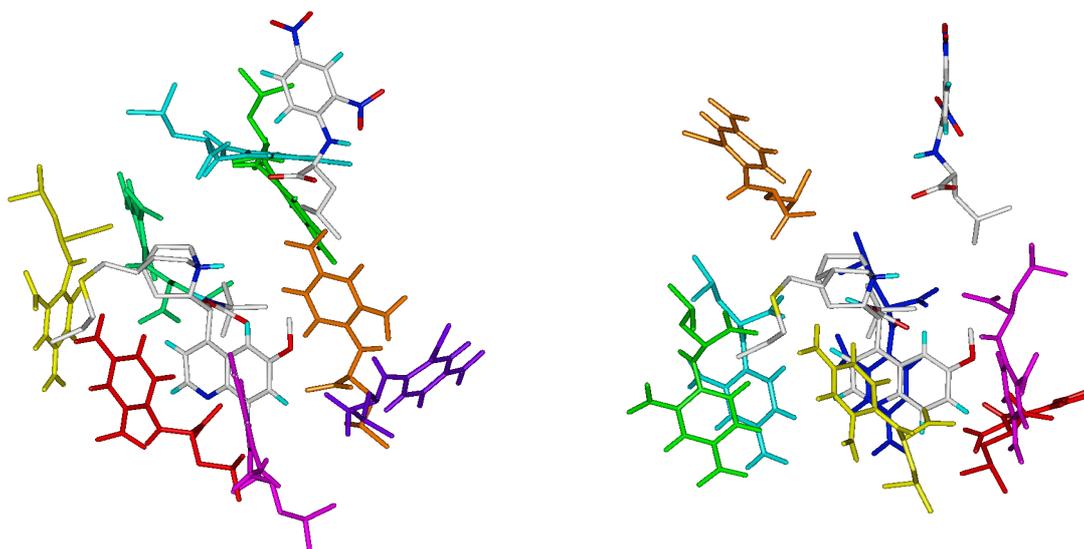
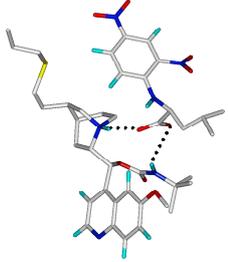
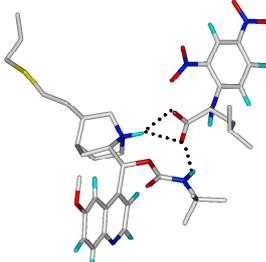
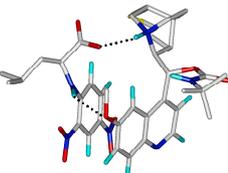


Bild 5.63 Auswahl der Startgeometrien, dargestellt für das (S)-Enantiomer (rechts), für das (R)-Enantiomer (links). Die beste Geometrie ist atomcodiert eingefärbt.

Das 2,4-DNPL besitzt als Phenylderivat nur die Möglichkeit eine Wasserstoffbrücke mit der NH-Funktion des Leucins einzugehen.

## Ergebnisse der Enantiomertrennung von 2,4-DNPL

Tabelle 5.19 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere im Überblick

<b>(S) 2,4-DNPL</b>		<b>(R) 2,4-DNPL</b>	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <p><b>ion. Interaktion + HB2</b></p>	-705 kJ/mol 50%	 <p><b>ion. Interaktion + HB2</b></p>	-716 kJ/mol 100%
 <p><b>ion. Interaktion + HB3</b></p>			
<b>ion. Interaktion</b>			
<b>ion. Interaktion</b> ⇒ Abstand >3Å	-356 kJ/mol 24,5%		
—	-139 kJ/mol 25,5%	—	—
	<b>Ø = -475 kJ/mol</b>		<b>Ø = -716 kJ/mol</b>

Beide Enantiomere bilden stabile Komplexe, in denen immer die ionische Interaktion vertreten ist. Diese beiden Enantiomere unterscheiden sich grundlegend von den Vorhergehenden. Bei fast allen Komplexgeometrien findet keine Annäherung der Ringsysteme statt. Das (S)-Enantiomer bildet die HB3 teilweise aus, die sofort eine Annäherung und Parallelisierung der Ringsysteme bedingt. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke über die NH-Funktion des DNPL ist hier im Vergleich zu den Benzoylderivaten erschwert, da die NH-Funktion direkt an den aromatischen Ring gebunden ist, und daher weniger Platz zur Annäherung der Chininseitenkette zur Verfügung steht. Die Komplexgeometrien, beider Enantiomere, mit ionischer Interaktion werden

teilweise durch eine zusätzliche Wasserstoffbrücke stabilisiert. Diese wird vom zweiten Sauerstoff der Carboxylatgruppe des DNPL zur NH-Funktion der Chininseitenkette ausgebildet.

### Vorhersage

Die Vorhersage ist eindeutig, da nur die (R)-Form ausschließlich stabile Komplexe bildet. Die Enantiomere sind an dieser CSP trennbar, und das (R)-Enantiomer verweilt länger auf der Säule. Es wird eine Selektivität von 1,5 vorausgesagt.

### 5.3.4 MDS des N-Acetylvalins

Auch für das NAV (Bild 5.64) musste zunächst für jedes Enantiomer eine optimale Startgeometrie gefunden werden. Dafür wurden verschiedene Orientierungen der Enantiomere zum chiralen Selektor in 50 ps Dynamiken getestet (Bild 5.65). Diejenige Startgeometrie, die im Verlauf der Dynamik die stabilsten Komplexe ergab, wurde als Startgeometrie für die Simulationen der Enantiomerentrennung verwendet. Sie ist atomcodiert dargestellt.

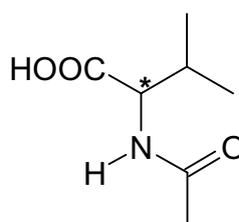


Bild 5.64 N-acetylvalin (NAV)

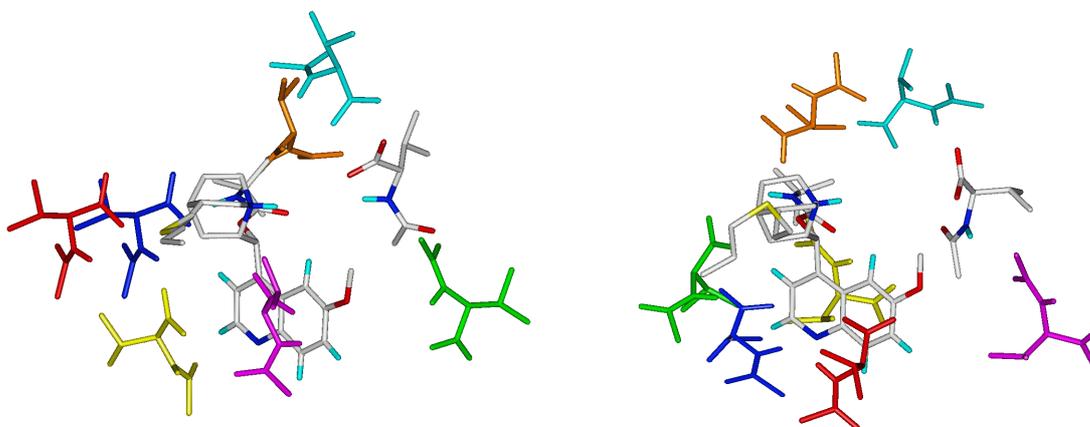
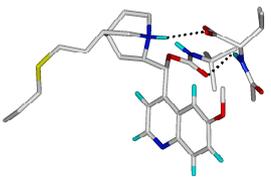
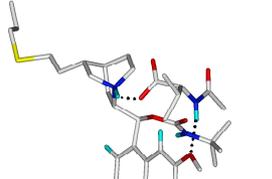
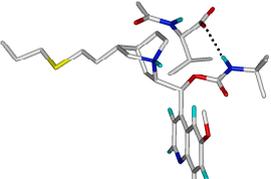
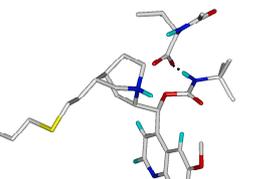


Bild 5.65 Auswahl der Startgeometrien, dargestellt für das (S)-Enantiomer (links), für das (R)-Enantiomer (rechts). Die beste Geometrie ist atomcodiert eingefärbt.

## Ergebnisse der Enantiomertrennung von NAV

Tabelle 5.20 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere im Überblick

<b>(S)-NAV</b>		<b>(R)-NAV</b>	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <b>ion. Interaktion + HB1</b>	-731 kJ/mol 13%	 <b>ion. Interaktion + HB3</b>	-722 kJ/mol 12%
 <b>HB2</b>	-462 kJ/mol 10,3%	<b>ion. Interaktion</b>	-492 kJ/mol 35%
<b>ion. Interaktion</b> ⇒ größerer Abstand	-345 kJ/mol 14,7%	<b>ion. Interaktion</b> ⇒ ab ca. 400 ps	-323 kJ/mol 31%
—	-186 kJ/mol 55,7%	 <b>HB2</b>	-168 kJ/mol 22%
—	-34 kJ/mol 6,3%		
	<b>Ø = -299 kJ/mol</b>		<b>Ø = -396 kJ/mol</b>

Die Verteilungen der WVEN für beide Enantiomere streuen über den gesamten Energiebereich zwischen  $-800$  und  $0$  kJ/mol. Dieses konnte bei keinem der vorher berechneten Razemate beobachtet werden. Der Grund dafür könnte sein, dass NAV im Vergleich zu den anderen Enantiomerenpaaren viel kleiner und leichter beweglich ist, sodass mehr Komplex-Konformationen mit unterschiedlichem Energiegehalt möglich sind. Beide Enantiomere bilden zu gleichen Anteilen (12 bzw. 13%) stabile Komplexe mit ähnlichen WVEN aus. Unterschiede in der WWE-Verteilung liegen im mittleren Energiebereich. Der

größte Anteil der WWE des (S)-Enantiomer liegt bei  $-200$  kJ/mol, der für das (R)-Enantiomer bei  $-400$  kJ/mol.

Fast alle Komplexgeometrien beinhalten die ionische Interaktion. Außerdem findet man bei beiden Enantiomeren eine Komplexgeometrie, die nur durch die HB2 gebildet wird.

Die HB1 wird selektiv bei der (S)-Form, die HB3 selektiv bei der (R)-Form gefunden.

### **Vorhersage**

Das Trennverhalten dieses Enantiomerenpaares ist im Vergleich zu den vorher berechneten Razematen schwerer einzuschätzen. Die durchschnittlichen WWE der (R)-Form beträgt  $-396$  kJ/mol, die der (S)-Form  $-299$  kJ/mol. D.H. die Differenz der WWEn beträgt nur  $-97$  kJ/mol und ist damit viel geringer als bei den vorausgehenden Berechnungen.

Es wird die Vorhersage gemacht, dass NAV an dieser CSP schwer trennbar ist und das (R)-Enantiomer länger auf der Säule verweilt. Die vorausgesagte Selektivität beträgt 1,2.

### 5.3.5 MDS des 3,5-Dinitrobenzyloxycarbonylleucins (3,5-DNBOCL)

Auch für das 3,5-DNBOCL (Bild 5.66) wurden zunächst 50 ps lange Dynamiken mit unterschiedlicher Orientierung der Moleküle zueinander zur Ermittlung der optimalen Startkomplexgeometrie durchgeführt. Da das DNBOCL größer ist als die bisher untersuchten Derivate sind die möglichen Anordnungen der Moleküle eingeschränkt. Es wurden drei verschiedene Startgeometrien generiert und die Komplexbildung während der Dynamiken ausgewertet (Bild 5.67). Die Startgeometrien (atomcodiert), die im Verlauf der Simulation die stabilsten Komplexe ergab, wurde als Startgeometrie für die Enantiomertrennung verwendet.

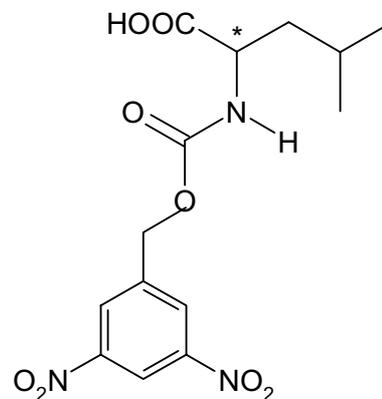


Bild 5.66 3,5-Dinitrobenzyl oxycarbonyl-leucin (DNBOCL)

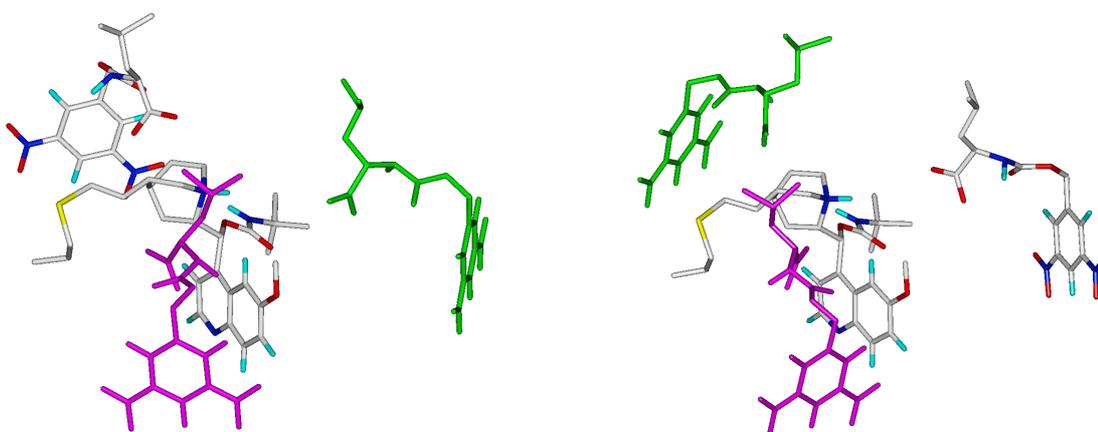
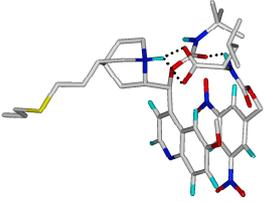
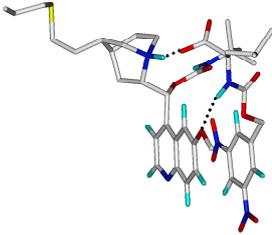
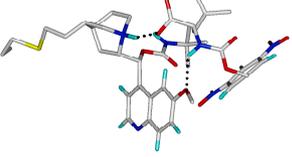
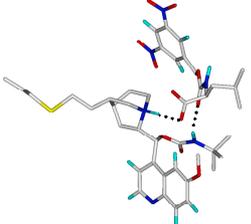
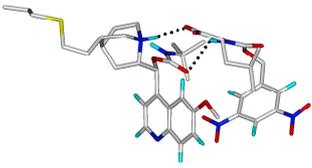


Bild 5.67 Auswahl der Startgeometrien, dargestellt für das (S)-Enantiomer (links), für das (R)-Enantiomer (rechts). Die beste Geometrie ist atomcodiert eingefärbt.

## Ergebnisse der Enantiomertrennung von 3,5-DNBOCL

Tabelle 5.21 Ergebnisse der MDS beider Enantiomere im Überblick

(S) 3,5-DNBOCL		(R) 3,5-DNBOCL	
Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit	Komplexgeometrien Wechselwirkungstypen	Ø WWE Häufigkeit
 <b>ion. Interaktion + HB1</b>	-833 kJ/mol 100%	 <b>ion. Interaktion + HB3</b>	-826 kJ/mol 100%
 <b>ion. Interaktion + HB1 oder HB3</b>		 <b>ion. Interaktion + HB3</b>	
 <b>ion. Interaktion + HB4</b>		 <b>ion. Interaktion + HB1</b>	
<b>ion. Interaktion</b>			
<b>mögliche C.T.-Interaktion bei 53% der Komplexgeometrien</b>		<b>mögliche C.T.-Interaktion bei 50% der Komplexgeometrien</b>	
	Ø = -833 kJ/mol		Ø = -826 kJ/mol

Beide Enantiomere bilden ausschließlich stabile Komplexe mit hohen WWEn von ca.  $-820$  kJ/mol aus. Die ionische Interaktion ist in allen Komplexgeometrien vertreten. Die Komplexe werden zusätzlich durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die HB1 und HB3 werden bei beiden Enantiomeren gefunden. Die

HB4 ist selektiv für das (S)-Enantiomer. Die Differenz der durchschnittlichen WWEn beträgt nur 7 kJ/mol.

Bei beiden Enantiomere wurden Komplexgeometrien gebildet, die eine C.T.-Interaktion vermuten lassen. Für das (S)-Enantiomer beträgt der Anteil 53% und für das (R)-Enantiomer 50%.

### **Vorhersage**

Nach den Kraftfeldberechnungen ist das 3,5-DNBOCL an dieser CSP nicht trennbar. Die Unterschiede der durchschnittlichen WWE sind zu klein, die Selektivität beträgt 1. Im folgenden Kapitel 5.3.6 (S.115) wird die mögliche C.T.-Interaktion genauer untersucht. Sollte es zu dieser Art von Wechselwirkung kommen, dann ist die vorhergesagte Selektivität von 1 zu niedrig, da die im Kraftfeld berechneten Differenzen der WWEn zu klein sind.

### 5.3.6 Quantenchemische Rechnungen zum Charge Transfer

Drei der untersuchten Enantiomerenpaare (R/S-3,5-DNBL; R/S-3,5-DNBTL und R/S-3,5-DNBOCL) bilden während der MDS Komplexgeometrien mit paralleler Anordnung der Ringsysteme aus. Die Orientierungen und der Abstand der Ringsysteme lassen eine C.T.-Interaktion vermuten.

Auch von der Arbeitsgruppe Lindner werden C.T.-Interaktion als wichtige Wechselwirkung zwischen den elektronenarmen Nitroaromaten der Leucinderivate und dem elektronenreichen aromatischen Ringsystem des Chinins zur Trennung der Enantiomere postuliert (s. Kapitel 3.1.3, S. 28).[43]

Weiterhin existieren in der Literatur viele Zitate, in denen bei der Trennung von dinitrobenzoylierten Aminosäuren mit  $\pi$ -Basen diese stabilisierende Interaktion als entscheidend eingestuft wird.[71], [72], [73]

Aus diesen Gründen wird die potenzielle Fähigkeit der drei Enantiomerenpaare eine Charge Transfer-Interaktion auszubilden, durch quantenchemische Rechnungen überprüft.

Das Potenzial zur Ausbildung einer Charge Transfer-Interaktion kann mithilfe von ab initio [74], [75] oder semiempirischen Methoden [76] berechnet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden semiempirische AM1-Berechnungen durchgeführt, da diese Methode im Gegensatz zu den ab initio-Verfahren zusätzliche Parameter für die Elektron-Elektron-Attraktion berücksichtigt, und somit eine bessere Wiedergabe der C.T.-Wechselwirkung liefert. [77], [78] Die Berechnungen wurden mit dem Programm SPARTAN 5.0.2 durchgeführt.[79]

Zur Ausbildung von C.T.-Interaktionen müssen zwei Bedingungen erfüllt werden. Zum einen müssen die beteiligten Orbitale so angeordnet sein, dass es zu einer Überlappung kommt. Zum anderen muss der Unterschied zwischen der Energie des HOMOs des Donators, welches das Elektron in das LUMO des Akzeptors abgibt, geringer sein als der Energieunterschied zum LUMO des Donators. [80]

Es wurden die HOMOs- und LUMOs der einzelnen Wechselwirkungspartner berechnet und die räumlichen Anordnungen der Überlappungsmöglichkeiten analysiert.

In der folgenden Tabelle 5.22 sind die Ergebnisse der Energieberechnungen zusammengestellt. Die Einzelbausteine wurden AM1-geometrieoptimiert.

Tabelle 5.22 Berechnete HOMO- und LUMO-Energien nach dem AM1-Verfahren

Substanzen	HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\Delta E$ (eV)
tert.-Butylcarbamoylechinin	-8,777	-0,450	8,3
3,5-DNBL		-2,149	6,6
3,5-DNBTL		-2,255	6,5
3,5-DNBOCL		-1,941	6,8

Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei Leucinderivate eine LUMO-Energie besitzen, die kleiner als die LUMO-Energie des Chinins ist. D.h. bei den entsprechenden Komplexen ist ein intermolekularer Elektronenübergang möglich. Je kleiner die Energieunterschiede zwischen der HOMO-Energie des Chinins als Elektronendonator und der LUMO-Energie der Leucinderivate als Elektronenakzeptoren sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass die C.T.-Interaktion auftritt. Die Energiedifferenzen sind in der dritten Spalte angegeben.

Die Ergebnisse dieses Typs von quantenchemischen Berechnungen besitzen erfahrungsgemäß eine Ungenauigkeit von  $\pm 0,1$  eV.

Die HOMO-LUMO-Energiedifferenzen der drei Enantiomerenpaare betragen 0,1 bis 0,3 eV ( $\pm 0,1$  eV). Die Wahrscheinlichkeit mit der eine C.T.-Interaktion ausgebildet wird, ist daher für das 3,5-DNBTL und das 3,5-DNBL nicht zu unterscheiden und für das 3,5-DNBOCL etwas geringer bis gleich einzuschätzen.

Die räumliche Lage der HOMOs und LUMOs zueinander wurde überprüft und dabei bestätigt, dass eine Überlappung möglich ist und die gegenüberliegenden Wellenfunktionen jeweils das gleiche Vorzeichen besitzen. Bei allen drei Enantiomerenpaaren wird auch diese Voraussetzung zur Ausbildung einer C.T.-Interaktion erfüllt.

Stellvertretend für die drei Enantiomere ist die Lage der beteiligten Orbitale des 3,5-DNBL in der folgenden Abbildung (Bild 5.68) dargestellt.

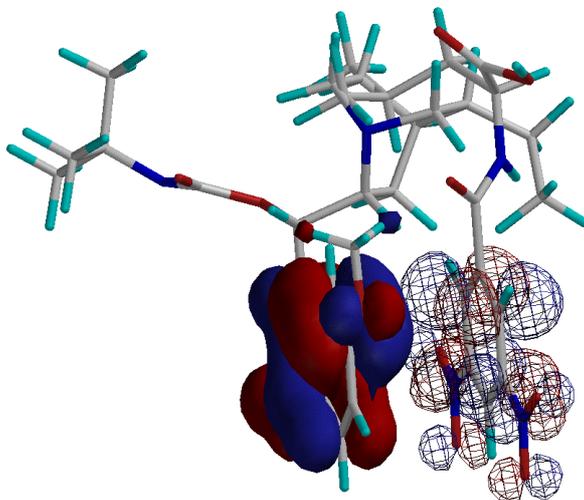


Bild 5.68 Mögliche C.T.-Interaktion des 3,5-DNBLs mit tert.-Butylcarbamoylchinin. Das HOMO ist undurchsichtig und das LUMO als Gitterstruktur dargestellt. Die blaue bzw. rote Farbe gibt die unterschiedlichen Vorzeichen der Wellenfunktion wieder.

Zur genaueren Einschätzung des Anteils der potenziellen C.T.-Interaktion an der Trennung der Enantiomere wird das prozentuale Vorkommen paralleler Ringanordnungen im Verlauf der MDS in die Betrachtung einbezogen. Diese Komplexgeometrie findet man bei drei Enantiomerenpaaren. In der folgenden Tabelle 5.23 sind die HOMO-LUMO-Energiedifferenzen und das Vorkommen paralleler Ringanordnungen für diese Enantiomerenpaare dargestellt.

Tabelle 5.23 Daten der drei Enantiomerenpaare mit potenzieller C.T.-Interaktion

Enantiomer	HOMO-LUMO- $\Delta E$ (eV)	parallele Ringgeometrien (%)	
		S	R
3,5-DNBL	6,6	20	0
3,5-DNBTL	6,5	50	30
3,5-DNBOCL	6,8	53	50

**3,5-DNBL:**

Bei diesem Enantiomerenpaar bildet nur die (S)-Form Komplexgeometrien mit paralleler Anordnung der Ringsysteme aus. Der prozentuale Anteil dieser Komplexe beträgt 20%. D.h. die im Kraftfeld berechnete WWE für das (S) 3,5-DNBL ist zu klein, da dort der C.T.-Anteil unberücksichtigt bleibt. Dieses erklärt auch, dass die berechnete Selektivität (3,6) im Vergleich zum experimentellen  $\alpha$ -Wert (15,9) zu niedrig liegt.

Es ist nicht möglich die quantenchemisch berechneten Charge Transfer-Energiewerte zu den Kraftfeldenergien zu addieren, da die Größenordnungen der Energiewerte nicht übereinstimmen. Absolute Energiewerte sind nur innerhalb des gleichen Parametrisierungssystems vergleichbar.

Allerdings ist es möglich über den Fehler zwischen den experimentellen und berechneten Selektivitäten, einen Faktor für die fehlende WWE des Kraftfeldes für das (S)-Enantiomer zu berechnen.

Die berechnete Selektivität ist 4,42x kleiner als die experimentell ermittelte Selektivität. Dieser Faktor von 4,42 entspricht einer fehlenden C.T.-Wechselwirkungsenergie, die durch 20% der Komplexgeometrien ermöglicht wird. Durch diesen Faktor kann die fehlende C.T.-Energie über die Anzahl der parallelen Ringanordnungen der weiteren Enantiomere berücksichtigt werden.

**3,5-DNBTL:**

Hier existieren sowohl für das (R)- als auch für das (S)-Enantiomer Komplexe mit paralleler Anordnung der Ringsysteme. Das (S) 3,5-DNBTL bildet diese zu 50%, das (R) 3,5-DNBTL zu 30% aus. D.h. der Energiebetrag für das (S)-Enantiomer muss um den Anteil erhöht werden, der einer C.T.-Energie für 20% paralleler Ringanordnungen entspricht.

Die HOMO-LUMO-Energiedifferenz für das 3,5-DNBL beträgt 6,6 eV und für das 3,5-DNBTL 6,5 eV, mit einer Ungenauigkeit der quantenchemischen Berechnungen von 0,1 eV. D.h. die Charge Transfer-Wahrscheinlichkeit der beiden Enantiomerenpaare ist gleich hoch, und daher kann die fehlende C.T.-Energie über die Quantifizierung der (S) 3,5-DNBL berechnet werden.

Die aus dem Quotient der Kraftfeld-Wechselwirkungsenergien berechnete Selektivität beträgt 1,5. Diese wird mit dem Faktor 4,42, entsprechend der C.T.-Energie für 20% paralleler Ringanordnungen, korrigiert. Die berechnete Selektivität erhöht sich auf 6,6.

**modifizierte Vorhersage:**

3,5-DNBTL ist an dieser CSP trennbar. Das (S)-Enantiomer bildet stärkere Wechselwirkungen aus, und besitzt daher eine längere Retentionszeit. Die Selektivität der Enantiomertrennung beträgt 6,6.

**3,5-DNBOCL:**

Auch bei dem 3,5-DNBOCL bilden beide Enantiomere in Verlauf der MDS Komplexe mit paralleler Ringanordnung aus. Dieses geschieht bei beiden Enantiomeren zu fast gleichen Anteilen [(S) 3,5-DNBOCL (53%) und (R) 3,5-DNBOCL (50%)]. Der Unterschied ist zu gering, um ihn über den Faktor für die fehlende C.T.-Energie zu berücksichtigen. Allerdings zeigen die Ergebnisse, dass die WWE des (S) 3,5-DNBOCL tendenziell höher ist als die der (R)-Form.

**modifizierte Vorhersage:**

Das (S) 3,5-DNBOCL bildet geringfügig stärkere Wechselwirkungen aus als das (R)-Enantiomer und besitzt daher die längere Retentionszeit. Eine Enantiomerentrennung des 3,5-DNBOCL ist auf Grund der geringen Energieunterschiede an dieser CSP nur schwierig möglich. Die Selektivität beträgt nach den Kraftfeldberechnungen 1. Berücksichtigt man die potenzielle C.T.-Wechselwirkung so wird die Selektivität tendenziell verbessert (>1).

### 5.3.7 Überprüfung der Vorhersagen

Die Vorhersagen der Enantiomertrennungen der fünf Enantiomerenpaare wurde anschließend experimentell in der Arbeitsgruppe Lindner überprüft.

In der folgenden Tabelle 5.24 sind die Vorhersagen den experimentellen Ergebnissen gegenübergestellt.

Tabelle 5.24 Vergleich der vorhergesagten Trennung mit den experimentellen Ergebnissen

Enantiomer	Trennbarkeit Elutionsreihenfolge	WWE kJ/mol	$\alpha_{\text{berechnet}}$	Vorhersage richtig	$\alpha_{\text{experimentell}}$	k'-Werte experimentell
(S) 3,5-DNBTL	ja	-2766	6,6	ja	8,5	11,32
(R) 3,5-DNBTL	(R) vor (S)	-433				1,33
(S)-BA	ja	-576	1,6	ja	1,7	3,82
(R) BA	(R) vor (S)	-360				2,25
(S) 2,4-DNPL	ja	-475	1,5	ja	1,3	18,33
(R) 2,4-DNPL	(S) vor (R)	-716				24,01
(S) NAV	schwierig	-299	1,2	nein	1,6	2,61
(R) NAV	(S) vor (R)	-396				1,58
(S) 3,5-DNBOCL	schwierig	-833	>1	ja	2,8	21,41
(R) 3,5-DNBOCL	(R) vor (S)	-826				7,65

Die Trennbarkeit und die Elutionsreihenfolge werden für das 3,5-DNBTL, BA, 2,4-DNPL und 3,5-DNBOCL richtig vorhergesagt.

Die Vorhersage für das NAV ist falsch.

#### BA und 2,4-DNPL:

Die berechneten Selektivitäten ( $\alpha$ ) werden für das R/S-BA und das R/S-2,4-DNPL sehr präzise vorhergesagt, da bei diesen Enantiomerenpaaren alle für die Trennung entscheidenden Wechselwirkungen mit Kraftfeldmethoden erfasst werden können.

**3,5-DNBTL und 3,5-DNBOCL:**

Die Selektivitäten des R/S-3,5-DNBTL und des R/S-3,5-DNBOCL werden tendenziell richtig vorhergesagt. Das 3,5-DNBTL besitzt sowohl berechnet als auch experimentell eine hohe Selektivität und das 3,5-DNBOCL in beiden Fällen eine kleine Selektivität. Bei beiden Enantiomerenpaaren ist der berechnete  $\alpha$ -Wert zu klein.

**NAV:**

Die Vorhersage des NAV war aus folgenden Gründen sehr schwierig.

Der Unterschied der WWE der Enantiomere beträgt nur  $-97$  kJ/mol und stellt damit die geringste Differenz aller berechneten Enantiomerenpaare dar. Außerdem bilden beide zu einem fast gleichen Prozentsatz stabile Komplexe (S = 13%, R = 12 %). Die Verteilungen der WWE streuen für beide Enantiomere stark. Obwohl das (S)-Enantiomer einen etwas größeren Anteil stabiler Komplexe besitzt, ergibt die durchschnittliche WWE aller Energiewerte einen höheren Wert für die (R)-Form. Da alle Wechselwirkungen und deren Bindungsenergien, die im Verlauf der Dynamiksimulation vorkommen, berücksichtigt werden müssen, bedeutet dies für die Vorhersage, dass das (R)-Enantiomer länger auf der Säule verweilt. Diese Vorhersage ist falsch.

Es ist schwierig die geringen Energieunterschiede dieses Enantiomerenpaars zu berechnen. Das NAV ist im Vergleich zu den anderen Enantiomerenpaaren viel kleiner und besitzt viele frei drehbare Bindungen. Daher könnte es sein, dass die Simulationsdauer nicht ausreichend war, um alle möglichen Komplexkonformationen zu finden. Um dieses zu überprüfen wurde die Simulationsdauer auf 8 ns erhöht. Für die verlängerte Dynamik betragen die Durchschnittswechselwirkungsenergien für das (S)-Enantiomer  $-306$  kJ/mol und für die (R)-Form  $-364$  kJ/mol. Die Energiedifferenz wurde also noch geringer, aber die Elutionsreihenfolge blieb erhalten. Die geringfügige Vergrößerung der WWE für das (S)-Enantiomer und die Reduktion der WWE des (R)-Enantiomers könnten vermuten lassen, dass nach viel längerer Rechenzeit das richtige Ergebnis erzielt werden könnte. Da aber beim jetzigen Stand der Technik eine Berechnung des Systems von 8 ns schon ca. 20 Tage beansprucht, wurde auf weitere Berechnungen verzichtet.

### 5.3.8 Vergleich der berechneten und experimentellen Daten

Zum Vergleich der berechneten mit den experimentellen Daten wurde die Beziehung der Selektivitäten herangezogen. Im folgenden Diagramm (Bild 5.69) sind die berechneten und die experimentell bestimmten  $\alpha$ -Werte gegeneinander aufgetragen. Die berechneten Selektivitäten ergeben sich aus den Quotienten der berechneten Wechselwirkungsenergien, die experimentell ermittelten Selektivitäten sind der Quotient aus den Kapazitätsfaktoren.

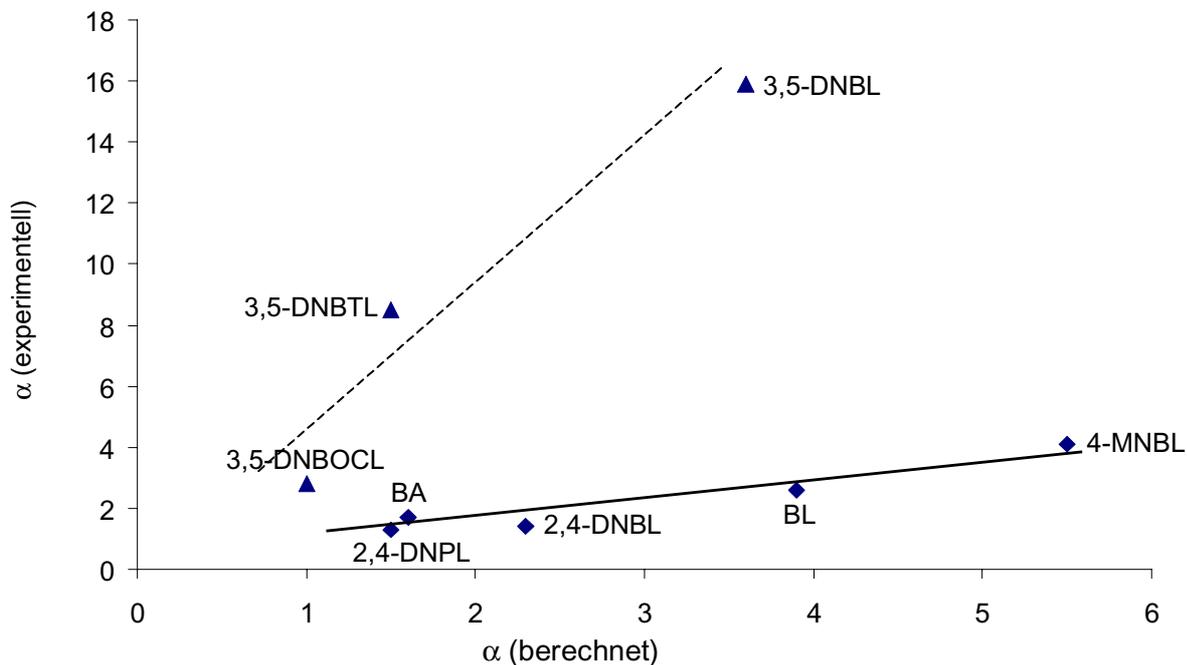


Bild 5.69 Beziehung zwischen berechneten und experimentell ermittelten Selektivitäten

**durchgezogene Gerade:**

Geradengleichung:  $y = 0,60x + 0,51$

Bestimmtheitsmaß:  $R^2 = 0,90$

Standardabweichung:  $s = 0,38$

F-Wert:  $F = 35$  (krit.  $F_{0,01} = 9,15$ )

Die Verteilung der Datenpunkte zeigt, dass diese in zwei Gruppen eingeteilt werden können.

Die größere Gruppe besteht aus sechs Datenpunkten. Zwischen den berechneten und experimentell ermittelten Selektivitäten besteht eine lineare Korrelation (Bild 5,69, durchgezogene Gerade), mit einem signifikanten Zusammenhang ( $F = 35$ ; kritischer  $F_{0,05} = 9,15$ ). Die Ergebnisse zeigen, dass die Selektivität der Trennung in dieser Datengruppe mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,90$  über die berechneten Wechselwirkungsenergien

anhand der Korrelationsfunktion vorhergesagt werden können. Alle Enantiomere dieser Gruppe zeichnen sich dadurch aus, dass für die Trennung eine C.T.-Interaktion ohne Bedeutung ist. Sie besitzen nicht die Fähigkeit, eine C.T.-Interaktion auszubilden oder weisen während der MDS keine Komplexe auf, die eine C.T.-Wechselwirkung ermöglichen würden. Wechselwirkungen, die für ihre Trennung entscheidend sind, werden in den Kraftfeldberechnungen gut wiedergegeben.

Die übrigen Datenpunkte zeigen einen anderen Zusammenhang. Zu dieser Gruppe zählen drei Enantiomerenpaare, für deren Trennung eine C.T.-Interaktion als möglich und wahrscheinlich erkannt wurde (Kapitel 5.3.6 S. 115). Ihre Selektivität kann allein durch die im Kraftfeld berechneten WWEn nicht wiedergegeben werden.

Die berechneten und experimentellen Selektivitäten der drei Enantiomerenpaare zeigen im Diagramm (Bild 5.69, gestrichelte Gerade) einen signifikanten Zusammenhang ( $F = 13,4$ ; kritischer  $F_{0,05} = 10,13$ ). Obwohl die C.T.-Interaktion im Kraftfeld nicht berücksichtigt wird, kann über die berechneten Wechselwirkungsenergien dieser Enantiomerenpaare anhand der Korrelationsfunktion die Selektivität der Trennung mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,93$  ( $s = 2,45$ ) vorhergesagt werden. Allerdings sollte die Korrelation, die hier nur mit drei Datenpaaren ermittelt worden ist, mit weiteren Untersuchungen überprüft werden.



## **6 Diskussion**



## 6.1 Diskussion der entwickelten Arbeitsmethode

Es besteht ein großes Interesse den chiralen Trennmechanismus und die Einsatzmöglichkeiten von verschiedenen chiralen stationären Phasen zur Enantiomerentrennung aufzuklären. Theoretische Untersuchungen basierend auf experimentellen Daten können Einblicke in den chromatographischen Trennungsprozess liefern. Die Ergebnisse sind umso besser, je genauer die experimentellen Bedingungen simuliert werden können. Eine vollständige Wiedergabe des Trenngeschehens setzt weiterhin voraus, dass in der Simulation alle experimentell möglichen Wechselwirkungsarten berücksichtigt werden können. Die Erfassung aller Annäherungsprozesse und möglicher Komplexgeometrien zwischen den Enantiomeren und dem chiralen Selektor ist nur mit moleküldynamische Simulationen durchführbar.

Ziel der theoretischen Untersuchungen ist es eine Berechnungsprozedur zu entwickeln, die diese Voraussetzungen erfüllt und es ermöglicht die geringen Energieunterschiede, die zur Trennung der Enantiomere führen, anhand berechneter Wechselwirkungsenergien wiederzugeben. Eine solche Arbeitsmethode kann eingesetzt werden, um das Trennverhalten weiterer Enantiomerenpaare an der verwendeten CSP vorherzusagen.

In der vorliegenden Arbeit wurden theoretische Untersuchungen mit tert.-Butylcarbamoylechinin als chiralem Selektor durchgeführt. tert.-Butylcarbamoylechinin ermöglicht durch die enthaltenen Strukturelemente die Ausbildung multipler Interaktionen und die semirigide Struktur erhöht die Enantioselektivität der Wechselwirkungen, da die räumliche Anpassung (induced-fit) an die Enantiomere eingeschränkt ist.

Die entwickelte Arbeitsmethode ermöglicht die Simulation des Trennverhaltens der untersuchten Enantiomere. Die Ergebnisse der Berechnungen zeigen einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Selektivitäten als Quotient aus den berechneten Wechselwirkungsenergien der Enantiomere und den experimentell ermittelten Selektivitäten. Dieses zeigt, dass die entwickelte Arbeitsmethode die Voraussetzung zur Wiedergabe des chromatographischen Trennverhaltens erfüllt.

Die experimentellen Bedingungen wurden so genau wie möglich wiedergeben. Es wurden die mobile Phase, die Temperatur und der im Experiment auf der Säule zur Verfügung stehende Interaktionszeitraum berücksichtigt.

Die Auswertung der Komplexgeometrien zwischen den Enantiomeren und dem chiralen Selektor, die während der langen moleküldynamischen Simulationen ausgebildet wurden, zeigt, dass alle potenziellen Wechselwirkungsstellen (Bild 6.1) des Selektors genutzt werden.

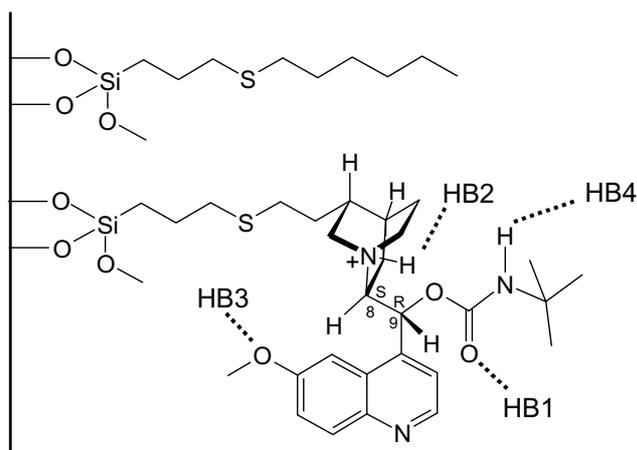


Bild 6.1 CSP mit angedeuteten möglichen Wasserstoffbrücken, die durch ihre Bezeichnung gekennzeichnet sind.

In der folgenden Tabelle 6.1 ist das Gesamtvorkommen der verschiedenen Wechselwirkungsarten, sowie die Häufigkeit ihres Auftretens während der durchgeführten Simulationen jeweils für die (R)- und (S)-Form der Benzoylleucinderivate aufgeführt. Da das Phenylleucinderivate keine HB4 ausbilden kann, wird es nicht in diese Betrachtung einbezogen.

Tabelle 6.1 Zusammenfassung der Wechselwirkungsarten und ihr Vorkommen

<b>Interaktion</b>	<b>Gesamtanzahl</b>	<b>Anzahl (S)</b>	<b>Anzahl (R)</b>
ionische Interaktion	16	8	8
HB1	11	8	3
HB2	2	1	1
HB3	11	5	6
HB4	2	1	1
C.T.-Interaktion	5	3	2

Die moleküldynamischen Berechnungen zeigen, dass die ionische Interaktion bei allen Enantiomeren ausgebildet wird, sie ist nicht enantioselektiv, sondern für einen ersten Kontakt beider Enantiomere mit der Säule verantwortlich. Die HB1 zeigt eine Tendenz zur Selektivität für die (S)-Form. Sie kommt ungefähr dreimal häufiger bei den (S)-Enantiomeren vor. Die HB2, HB3 und HB4 sowie die C.T.-Interaktion sind nicht enantioselektiv. Sie kommen bei beiden Formen vor und besitzen eine zusätzliche stabilisierende Funktion.

Interessant ist, dass alle Wechselwirkungsmöglichkeiten sowohl von der (S) als auch von der (R)-Form ausgebildet werden können. Die Trennung beruht nicht, wie man annehmen könnte, auf der Ausbildung völlig verschiedener Komplexgeometrien für die Enantiomere.

Die Auswertung der Komplexgeometrien aller Razemate zeigen, dass beide Enantiomere stabile Komplexe bilden können. Der Unterschied, der die Enantiomerentrennung ermöglicht, ist die Häufigkeit mit der diese stabilen Komplexe vorkommen.

Ebenfalls bei beiden Enantiomerenformen treten Komplexgeometrien mit einem Positionswechsel des Enantiomers auf die andere Seite des Selektors auf, oder bereits gebildete Komplexe werden wieder gelöst und in einen anderen überführt.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die entwickelte Arbeitsmethode die Simulation der chromatographischen Trennung ermöglicht. Die Vielzahl der Annäherungsorientierung sowie die resultierenden Wechselwirkungen auf der Säule werden gut wiedergegeben. Die Signifikanz der Ergebnisse bestätigt die Methode.

Das Bestimmtheitsmaß der Vorhersage beträgt 0,73 und die Standardabweichung der Korrelation liegt bei 1,15. Hier konnten aus folgenden Gründen keine besseren Ergebnisse erzielt werden.

Eine Voraussetzung zur Berechnung der Energiedifferenzen, die zur Trennung der Enantiomere führen, ist die Berücksichtigung aller möglichen Wechselwirkungsarten. In Kraftfeldberechnungen werden keine Charge Transfer-Wechselwirkungen berücksichtigt. Bei den Enantiomerenpaaren, die diese Interaktion ausbilden, fehlt dieser Energieanteil in der Wechselwirkungsenergie der Kraftfeldberechnungen. Daher wurden für drei Enantiomerenpaaren zusätzliche quantenchemischen Berechnungen durchgeführt. Die Werte der HOMO-LUMO-Energien zeigten für diese Enantiomerenpaare ein annähernd gleich starkes Charge-Transfer-Potenzial. Dieses ist darin begründet, dass die LUMO-Energie bei allen drei Enantiomeren auf einem 3,5-Dinitrobenzoylrest basiert. Eine Quantifizierung der C.T.-Energie wurde über den prozentualen Anteil paralleler Ringanordnungen, die eine solche Interaktion ermöglichen durchgeführt. Der prozentuale Anteil der parallelen Ringanordnungen, die sich während der MDS ausbilden, könnte aber zu niedrig sein. Da die potenzielle C.T.-Interaktion im Kraftfeld nicht berechnet wird, fehlt die resultierende Attraktion der Ringsysteme bei der Ausbildung der Komplexe. Die parallelen Komplexgeometrien werden im Kraftfeld durch andere Interaktionen wie z.B. Wasserstoffbrücken verursacht. Es ist zwar unwahrscheinlich, dass eine Charge Transfer-Wechselwirkung allein, zu einer Annäherung der Moleküle und Einstellung einer parallelen Ringanordnung führt( der Einfluss ist abhängig von der 3. Potenz des Abstandes[5]), aber sie würde solche Komplexgeometrien stabilisieren und das Vorkommen erhöhen. Der prozentuale Anteil der Komplexgeometrien mit paralleler Ringanordnung könnte daher etwas zu klein sein.

Dieses zeigen auch die vorhergesagten Selektivitäten für das 3,5-DNBTL und 3,5-DNBOCL, die in beiden Fällen etwas zu klein vorausgesagt werden.

## 6.2 Chirale Erkennung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die chirale Erkennung nicht statisch betrachtet werden darf. Der gefundene Trennmechanismus kann am besten mit dem dynamischen Modell von Booth und Wainer (Kapitel 2.2 S.12), das die chirale Erkennung als dreistufigen Prozess beschreibt, wiedergegeben werden.

Während der Simulation erfolgt die Annäherung an den chiralen Selektor über die ionische Interaktion, die nicht enantioselektiv ist.

Danach tritt eine Konformationsanpassung (induced fit) an den chiralen Selektor ein, während dessen z.B. eine zusätzliche Wasserstoffbrücke ausgebildet wird. Diese kann enantioselektiv sein.

Der gebildete Komplex kann im dritten Schritt durch weitere Wechselwirkungen, wie z.B. C.T.-Interaktionen stabilisiert werden.



## **7 Zusammenfassung**



In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Molecular Modelling Methoden die Enantiomerentrennung mit tert.-Butylcarbamoylechinin als chiraalem Selektor theoretisch untersucht.

Zu Beginn wurde eine Arbeitsmethode entwickelt, mit der die Enantiomerentrennung unter Berücksichtigung der experimentellen Bedingungen theoretisch berechnet werden kann. Es wurden umfangreiche moleküldynamische Simulationen durchgeführt, in denen die mobile Phase mit explizierten Lösungsmittelmolekülen in die Berechnung mit einbezogen wurde. Diese Arbeitsmethode wurde mit vier Enantiomerenpaaren überprüft und validiert. Weiterhin wurde das Trennverhalten von fünf Enantiomerenpaaren vorhergesagt.

Anhand der Ergebnisse der moleküldynamischen Simulationen war es möglich, entscheidende Wechselwirkungen für die Trennung der Enantiomere zu bestimmen und repräsentative Komplexgeometrien vorzustellen. Die mögliche Charge-Transfer-Interaktion von drei Enantiomerenpaaren wurde durch quantenchemische Berechnungen zusätzlich untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Vorhersage von Enantiomerentrennung mit tert.-Butylcarbamoylechinin als chiraalem Selektor entwickelt. Es kann die Trennbarkeit, die Elutionsreihenfolge, sowie die Selektivität der Trennung anhand berechneter Wechselwirkungsenergien vorhergesagt werden.



## **8 Literaturverzeichnis**



- [1] H. Beyer, W. Walter, W. Francke: Lehrbuch der organischen Chemie, 23. Auflage, S.Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig 1998, 126-129
- [2] H. J. Roth, C. E. Müller, G. Folkers: Stereochemie & Arzneistoffe, 1. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 1998, 23-26
- [3] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi: Wirkstoffdesign, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford; 1996, 113-127
- [4] W. A. Nugent, T. V. Rajanbabu, M. J. Burk: Beyond Nature's Chiral Pool: Enantioselective Catalysis in Industry. *Science* **1993**, 259 (5094), 479
- [5] H. Auterhoff, J. Knabe, H.-D. Höltje: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, 14. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 1999, 10
- [6] S. K. O'Neill, G. T. Bolger: Enantiomer selectivity and the development of tolerance to the behavioral effects of the calcium channel activator BAY K 8644. *Brain. Res. Bull.* **1988**, 21 (6), 865-872
- [7] E. Mutschler, M. Schäfer-Korting: Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 7. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 1996, 53
- [8] U.S. FDA, Center for Drug Evaluation and Research: FDA'S POLICY STATEMENT FOR THE DEVELOPMENT OF NEW STEREOISOMERIC DRUGS. *Drug development and industrial pharmacy* **1992**, 5(1), 1-5
- [9] J. M. Daniels, E. R. Nestmann, A. Kerr: Development of stereoisomeric (chiral) drugs: A brief review of scientific and regulatory considerations. *Drug Information Journal* **1997**, (31), 639-646
- [10] FDA: Department of health and human services: International Conference on harmonisation; Draft guidance on specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products. *Federal Register* **1997**, 62 (227), 62889-62909
- [11] V. A. Davankov: Analytical chiral separation methods. *Pure & Appl.Chem.* **1997**, 69 (7), 1469-1474
- [12] A. C. Mehta: Chiral high performance liquid chromatography of drug molecules. *J. Clin. Pharm. Ther.* **1990**, 15 (5), 313-323
- [13] R. Däppen, H. R. Karfunkel, F. J. Leusen: Computational Chemistry applied to the design of chiral stationary phases for enantiomeric separation. *J. Comput. Chem.* **1990**, 11(2), 181-193
- [14] K. B. Lipkowitz: Theoretical studies of type II-V chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1995**, 694 (1-2), 15-37
- [15] T. Beier, H.-D. Höltje: Modified cyclodextrins as chiral selectors: molecular modelling investigation on enantioselective binding properties of heptakis (2,3-di-O-methyl-6-O-tert.-butyldimethylsilyl)- $\beta$ -cyclodextrin. *J.Chromatogr B* **1998**, 708 (1-2), 1-20

- [16] W. Reichel: Dissertation, Berlin 1996
- [17] J. L. E. Reubsaet, K. Jinno: Characterisation of important interactions controlling retention behaviour of analytes in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **1998**, 17 (3), 157-166
- [18] E. H. Easson, E. Stedman: CLXX-Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action; Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochem J* **1933**, 27, 1257-1266
- [19] A. G. Ogston: Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature* **1948**, 4129, 963
- [20] C. E. Dalgliesh: The optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms. *J Chem Soc* **1952**, (137), 3940-3952
- [21] W. A. Pirkle, T. C. Pochapsky: Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. *Chem. Rev.* **1988**, 89 (2), 347-362
- [22] S. Topiol, M. Sabio: Computational chemical studies of stationary phase models. Complexes of methyl-(2-naphthyl)alanin with N-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine n-propylamide. *J Chromatogr A* **1989**, 461 (1-2), 129-137
- [23] V. I. Sokoloc, N.S. Zefirov: Enantioselectivity in two-point binding: rocking tetrahedron model. **1991**, 319, 1382-1383
- [24] V.A. Davankov: Separation of enantiomeric compounds using chiral HPLC systems. A brief review of general principles, advances and development trends. *Chromatographia* **1989**, 27 (9), 475-482
- [25] V. A. Davankov : The nature of chiral recognition: Is it a three-point interaction? *Chirality* **1997**, 9, 99-102
- [26] T. D. Booth, I. W. Wainer: Investigation of the enantioselective separation of  $\alpha$ -alkylarylcarboxylic acids on an amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase using quantitative structure-enantioselective retention relationships. Identification of a conformationally given chiral recognition mechanism. *J. Chromatogr. A* **1996**, 737 (1-2), 157-169
- [27] V Schurig, J. Ossig, R. Link: Temperature-dependent reversal of enantioselectivity on a chiral nickel(II)bis(b-diketonate) as determined by complexation gas chromatography. *Angew. Chemie* **1989**, 101, 197-198
- [28] J. Falbe, M. Regitz: *Römpp Chemie Lexikon*. 9. Auflage, Thieme-Lehrbuch Verlag, Stuttgart
- [29] D. A. Skoog, F. J. Holler, T. Nieman: *Principles of instrumental analysis*. 5. Auflage, Saunders College Verlag, London 1998
- [30] A. M. Krstulovic: Racemates versus enantiomerically pure drugs: putting high-performance liquid chromatography to work in the selection process. *J Chromatogr A* **1989**, 488 (1), 53-72

- [31] E. Yashima, M. Yamada, Y. Kaida, Y. Okamoto: Computational studies on chiral discrimination mechanism of cellulose trisphenylcarbamate. *J. Chromatogr. A* **1995**, 694 (1-2) 347-354
- [32] D. S. Hage, A. Sengupta: Characterisation of the binding of digitoxin and acetyldigitoxin to human serum albumin by high-performance affinity chromatography. *J. Chromatogr. B* **1999**, 724 (1), 91-100
- [33] E. Steinegger, R. Hänsel: *Pharmakognosie*, 4. Auflage, Springer-Lehrbuch Verlag, Berlin, Heidelberg 1992
- [34] H. Rimpler: *Biogene Arzneistoffe*, 2. Auflage, Thieme-Lehrbuch Verlag, Stuttgart 1990
- [35] N. M. Maier, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner: Enantioselective Anion Exchangers based on cinchona alkaloid-derived carbamates: influence of C8/C9 stereochemistry on chiral recognition. *Chirality* **1999**, (11), 522-528
- [36] L. C. R. Pasteur: *Acad. Sci.*, 1853 Quoted in b) J. Jacques, A. Collet, S. H. Wilen: *Enantiomers, Racemates and Resolution*. Wiley & Son, New York **1981**
- [37] C. Rosini, C. Bertucci, D. Pini, P. Altemura, P. Salvadori: Cinchona alkaloids for preparing new, easily accessible chiral stationary phases: I. 11-(10,11-Dihydro-6'-methoxy-cinchonan-9-ol)-tiopropylsilanized silica. *Tetrahedron* **1985**, 26 (28), 3361-3364
- [38] G. Rücker, M. Neugebauer, G. Willems: *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 2. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart 1992, 274-275
- [39] P. Salvadori, C. Rosini, D. Pini, C. Bertucci, P. Altemura, G. Uccello-Barretta, A. Raffaelli: A novel application of cinchona alkaloids as chiral auxiliaries: Preparation and use of a new family of chiral stationary phases for the chromatographic resolution of racemates. *Tetrahedron* **1987**, 43 (28), 4969-4978
- [40] M. Lämmerhofer, W. Lindner: Quinine and quinine derivatives as chiral selectors. I. Brush type chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography based on cinchonane carbamates and their application as chiral anion exchangers. *J Chromatogr A* **1996**, 741 (1-2), 33-48
- [41] C. Rosini, C. Bertucci, D. Pini, P. Altemura, P. Salvadori: Chiral stationary phases based on cinchon alkaloids for the HPLC resolution of racemates. *Chromatographia* **1987**, 671-677 (24)
- [42] A. Mandl, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner: Quinine versus carbamoylated quinine-based chiral anion exchangers. A comparison regarding enantioselectivity for N-protected amino acids and other chiral acids. *J Chromatogr A* **1999**, 858 (1-2), 1-11
- [43] M. Lämmerhofer, W. Lindner: Quinine and quinine carbamate based anion exchanger type chiral stationary phases. *GIT Special Chromatography International* **1996**
- [44] K.-H. Kellner, A. Blasch, H. Chmiel, M. Lämmerhofer, W. Lindner: Enantioseparation of N-protected  $\alpha$ -amino acid derivatives by liquid-liquid extraction technique employing stereoselective ion-pair formation with a carbamoylated quinine derivative, *Chirality* **1996**, 9(3), 268-273

- [45] S. Schefzick, M. Lämmerhofer, W. Lindner, K.B. Lipkowitz, M. Jalaie: Comparative molecular field analysis of quinine derivatives used as chiral selectors in liquid chromatography: 3D QSAR for the purpose of molecular design of chiral stationary phases. *Chirality* **2000**, (12), 742-750
- [46] W. Sippel: Dissertation, Düsseldorf 1997
- [47] K. Gaedt: Dissertation, Düsseldorf 1998
- [48] U. Uhrig: Dissertation, Düsseldorf 1999
- [49] A. Schappach: Dissertation, Düsseldorf 2000
- [50] N. Bargmann-Leyder, C. Sella, D. Bauer, A. Tambute, M. Caude: Supercritical fluid chromatographic separation of B-blockers on chryrosine-A: Investigation of the chiral recognition mechanism using molecular modeling. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 952-958
- [51] Cambridge Structural Database, Dr. Olga Kennard, F.R.S., Cambridge Crystallographic Data Center, UK.
- [52] SYBYL 6.5, Tripos Associates, St. Louis, Mo., USA
- [53] BIOSON Research Institute and Laboratory of Biophysical Chemistry, University of Groningen, 9747 AG Groningen, The Netherlands
- [54] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Brunnen: GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91, 43-56
- [55] BIOMOS b.v Laboratory of Physical Chemistry, ETH Zentrum, CH-8092 Zürich, Schweiz
- [56] T. E. Cheatham III, B. R. Brooks: Recent advances in molecular dynamics simulation towards the realistic representation of biomolecules in solution. *Theor. Chem. Acc.* **1998**, 99, 279-288
- [57] B. L. de Groote, S. Hayward, D. M. F. van Aalten, A. Amadei, H. J. C. Berendsen: Domain motions in Bacteriophage T4 Lysozyme; a Comparison between molecular dynamics and crystallographic data. *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **1998**, 31, 116-127
- [58] M. S. P. Sansom, D. P. Tieleman, L.R. Forest, H. J. C. Berendsen: Molecular dynamics simulations of membranes with embedded ion channels: porin, alamethicin, and influenza M2. *Biochem. Soc. Transac.* **1998**, 26, 438-443
- [59] D. van der Spoel, P. J. van Maaren, H. J. C. Berendsen: A systematic study of water models for molecular simulation: Derivation of water models optimized for use with a reaction field. *J. Chem. Phys.* **1998**, 108, 10220-10230
- [60] Center for Polymer Studies, <http://cps-www.bu.edu/Wasser/robert/work/node10.html>: The SPC water model **2001**
- [61] S. Miyamoto, P. A. Kollman: SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithms for rigid water models. *J. Comp. Chem.* **1992**, 13, 952-962
- [62] Center for Polymer Studies, <http://cps-www.bu.edu/Wasser/robert/work/node6.html>: Periodic boundary conditions **2001**

- [63] Centre de Calcul Recherche et Reseau Jussieu, [http://idf.ext.jussieu.fr/ccr/graphique/biosym/html/User\\_Guide/GenInfo/Describe\\_Sys/NonbondCut.html](http://idf.ext.jussieu.fr/ccr/graphique/biosym/html/User_Guide/GenInfo/Describe_Sys/NonbondCut.html): Minimum-Image Model, **2001**
- [64] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen: Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. *Angew.Chemie* **1990**, 102, 1020-1055
- [65] L. Verlet: Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* **1967**, 159, 98-103
- [66] R. W. Hockney, J. W. Eastwood: Computer simulation using particles. McGraw-Hill, New York, 1981
- [67] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. Dinola, J. R. Haak: Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, 81, 3684-3690
- [68] H. J. M. Bowen, J. Donohue, D. G. Jenkin, O. Kennard, P. J. Wheatley, D. H. Whiffen: Tables of interatomic distances and configuration in molecules and ions. The Chemical Society, London, **1958**
- [69] ChromBook, Merck
- [70] C.-E. Lin, F.-K. Ji: Enantioseparation and recognition mechanisms of dinitrobenzoyl-derivatized amino acids and amino alcohols on chiral stationary phases consisting of cyanuric chloride with (S or R)-phenylalanyl-(S or R)-1-(1-naphthyl)ethylamide substituent. *J Chromatogr A* **1996**, 722 (1-2), 199-209
- [71] M. H. Hyun, M. S. Na, J. S. Jin: Chiral recognition models for the liquid chromatographic resolution of  $\pi$ -acidic racemates on a chiral stationary phase derived from N-phenyl-N-alkylamide of (S)-naproxen. *J Chromatogr A* **1996**, 752 (1-2), 77-84
- [72] W. H. Pirkle, C. J. Welch: Chromatographic and  $^1\text{H-NMR}$  support for a proposed chiral recognition model. *J Chromatogr A* **1994**, 683 (1-2), 347-353
- [73] S. Topiol, M. Sabio, J. Morozz, W. B. Caldwell: Computational studies of the interactions of chiral molecules: Complexes of methyl-N (2-naphthyl)alaninate with N-(3,5-dinitrobenzoyl)leucine *n*-propylamide as a model for chiral stationary-phase interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8367-8376
- [74] P. W. Atkins, R. S. Friedman: Molecular Quantum Mechanics. 3. Auflage, Oxford University Press, Oxford 1997,
- [75] J. Sponer, F. Leszczynski, P. Hobza: Hydrogen bonding and stacking of DNA bases. A Review of quantum-chemical *ab initio* studies. *J. Biomol. Structure & Dynamics* **1996**, 14 (1), 117-135
- [76] A. van der Vaart, K. M. Merz, Jr.: Charge transfer in biologically important molecules: Comparison of high-level *ab initio* and semiempirical methods. *Int. J. Quant. Chem.* **2000**, 77, 27-43

- 
- [77] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart: AM1: A New general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902-3909
- [78] K.-J. Schleifer: Correlation of LUMO\* energies and free energies of binding for a series of nifedipin analogues. *Pharmazie* **1999**, 54 (11), 804-807
- [79] SPARTAN 4.1.1, Wavefunction, Inc., Irvine, USA
- [80] R. Foster: *Organic Charge-Transfer Complexes*, Academic Press, London and New York 1969, 1-16

## **9 Anhang**





## Anhang A

### Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Selektivität
$\Delta\Delta G$	Unterschied der freien Energie
$\Delta\Delta H$	Unterschied der freien Enthalpie
$\Delta\Delta S$	Unterschied der freien Entropie
$\varepsilon$	Dielektrizitätskonstante
2,4-DNBL	2,4-Dinitrobenzoylleucin
2,4-DNPL	2,4-Dinitrophenylleucin
3,5-DNBL	3,5-Dinitrobenzoylleucin
3,5-DNBOCL	3,5-Dinitrobenzoyloxycarbonylleucin
3,5-DNBTL	3,5-Dinitrobenzoylmethylleucin
4-MNBL	4-Mononitrobenzoylleucin
BA	Benzoylalanin
BL	Benzoylleucin
BSA	bovines Serumalbumin
C.T.	Charge-Transfer
CSD	Cambridge Crystallographic Database
CSP	chirale stationäre Phase
HB1	Wasserstoffbrücke 1
HB2	Wasserstoffbrücke 2
HB3	Wasserstoffbrücke 3
HB4	Wasserstoffbrücke 4
HOMO	Highest occupied Molecular Orbital
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

---

HSA	humanes Serumalbumin
$k'$	Kapazitätsfaktor
LUMO	Lowest unoccupied Molecular Orbital
NAV	N-acetylvalin
PBC	Periodic boundary conditions
QESRR	Quantitative-enantioselective Retention Relationship Studie
R	rectus (Cahn-Ingold-Prelog-Konvention)
S	sinister (Cahn-Ingold-Prelog-Konvention)
$t_m$	Totzeit
$t_R$	Retentionszeit
$t_S$	Nettoretentionszeit
WWE	Wechselwirkungsenergie

## Anhang B

### Hardware

Für die Berechnungen dieser Arbeit standen an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf folgende Rechner-Systeme zur Verfügung:

- SiliconGraphics Workstations:
  - IRIS INDIGO<sup>2</sup> R10000
  - IRIS INDY R5000
  - IRIS O2 R5000
- SiliconGraphics Origin2000 mit 32 R10000 Prozessoren  
(am Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität)

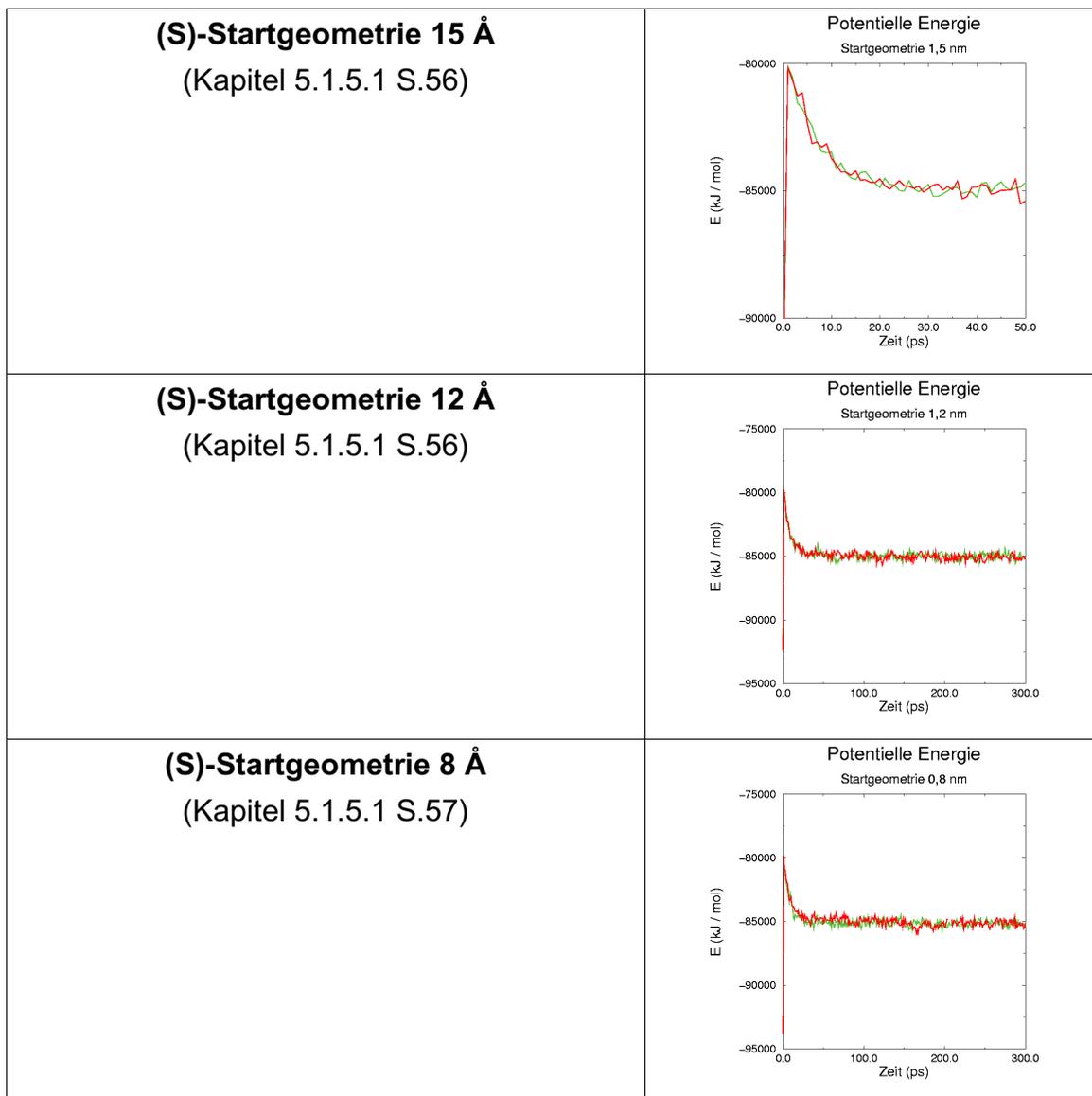
## Anhang C

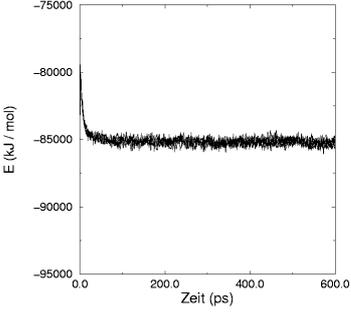
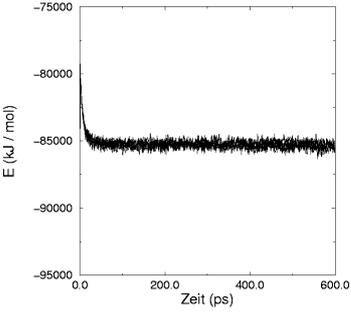
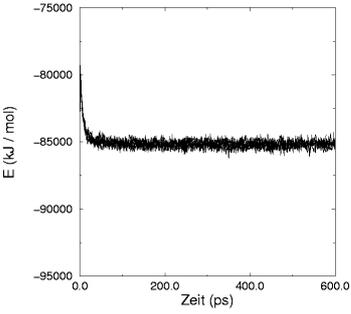
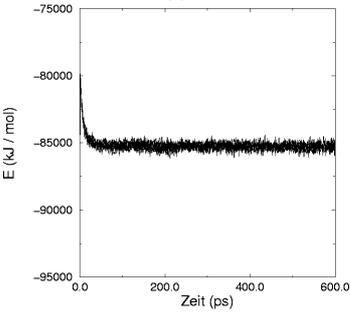
### Software

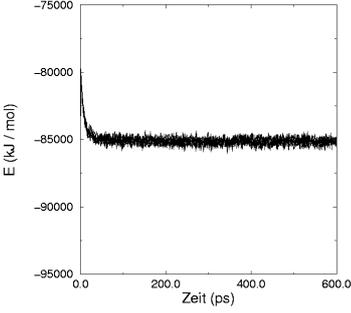
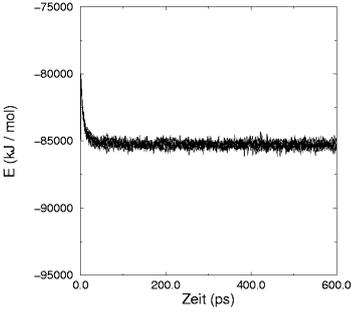
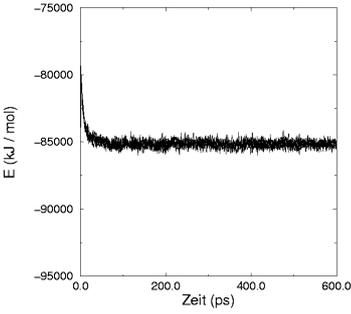
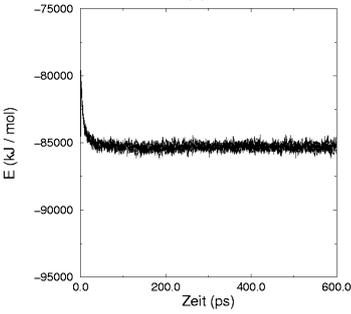
- EXCEL Tabellenkalkulationsprogramm mit dem einfache lineare und nichtlineare Regressionsanalysen durchgeführt werden können. Außerdem ermöglicht es die Darstellung der Ergebnisse in aussagekräftigen Diagrammen.
- GROMACS Molecular Modelling-Software für Moleküldynamische-Simulationen in einer Lösungsmittelbox
- SPARTAN Software-Paket zur Durchführung quantenchemischer und semiempirischer Berechnungen
- SYBYL Molecular Modelling-Software-Paket der Firma TRIPOS

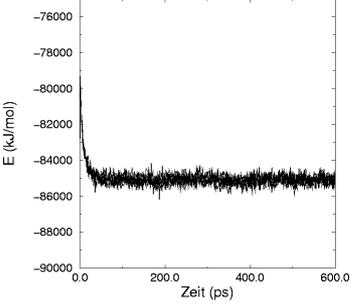
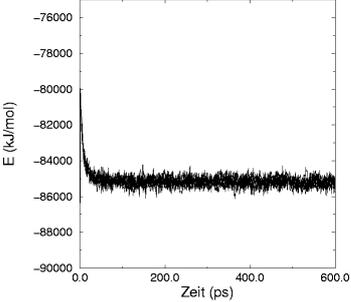
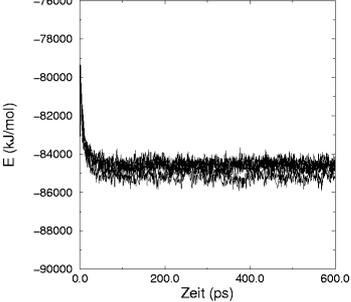
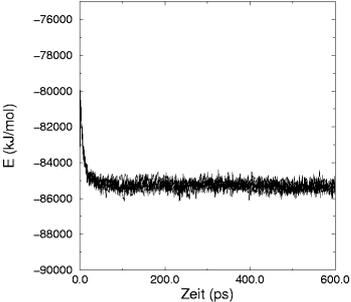
## Anhang E

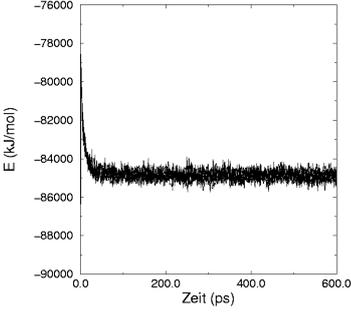
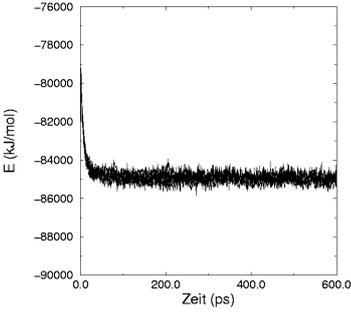
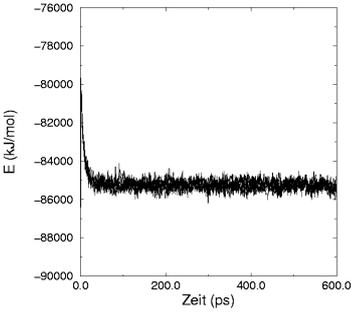
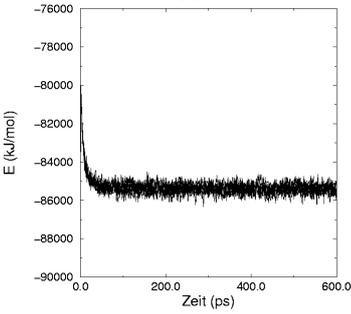
Diagramme zum Verlauf der potentiellen Energie der MDS:

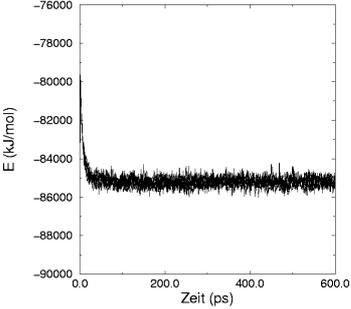
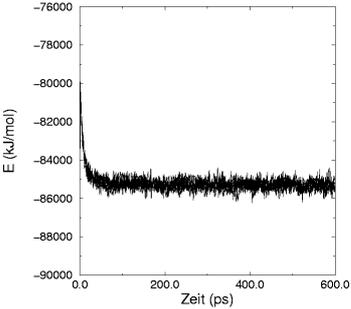


<p><b>(S) 3,5-DNBL</b> (Kapitel 5.1.10.1 S.67)</p>	<p>Potentielle Energie (S)3,5-DNBL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) 3,5-DNBL</b> (Kapitel 5.1.10.2 S.70)</p>	<p>Potentielle Energie (R)3,5-DNBL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(S) 2,4-DNBL</b> (Kapitel 5.2.1.1 S.78)</p>	<p>Potentielle Energie (S)2,4-DNBL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) 2,4-DNBL</b> (Kapitel 5.2.1.2 S.81)</p>	<p>Potentielle Energie (R)2,4-DNBL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>

<p><b>(S) 4-MNBL</b> (Kapitel 5.2.2.1 S.85)</p>	<p>Potentielle Energie (S)4-MNBL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) 4-MNBL</b> (Kapitel 5.2.2.2 S.88)</p>	<p>Potentielle Energie (R)4-MNBL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(S) BL</b> (Kapitel 5.2.3.1 S.92)</p>	<p>Potentielle Energie (S)-BL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) BL</b> (Kapitel 5.2.3.2 S.95)</p>	<p>Potentielle Energie (R)-BL</p>  <p>E (kJ / mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>

<p><b>(S) 3,5-DNBTL</b> (Kapitel 5.3.1. S.102)</p>	<p>Potentielle Energie (S)3,5-DNBTL</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) 3,5-DNBTL</b> (Kapitel 5.3.1 S.102)</p>	<p>Potentielle Energie (R)3,5-DNBTL</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(S) BA</b> (Kapitel 5.3.2 S.104)</p>	<p>Potentielle Energie (S)-BA</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) BA</b> (Kapitel 5.3.2 S.104)</p>	<p>Potentielle Energie (R)-BA</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>

<p><b>(S) 2,4-DNPL</b> (Kapitel 5.3.3 S.107)</p>	<p>Potentielle Energie (S)2,4-DNPL</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) 2,4-DNPL</b> (Kapitel 5.3.3 S.107)</p>	<p>Potentielle Energie (R)2,4-DNPL</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(S) NAV</b> (Kapitel 5.3.4 S.109)</p>	<p>Potentielle Energie (S)-NAV</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) NAV</b> (Kapitel 5.3.4 S.109)</p>	<p>Potentielle Energie (R)-NAV</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>

<p><b>(S) 3,5-DNBOCL</b> (Kapitel 5.3.5 S.112)</p>	<p>Potentielle Energie (S)3,5-DNBOCL</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>
<p><b>(R) 3,5-DNBOCL</b> (Kapitel 5.3.5 S.112)</p>	<p>Potentielle Energie (R)3,5-DNBOCL</p>  <p>E (kJ/mol)</p> <p>Zeit (ps)</p>

## Lebenslauf

**Name:** Sybille Buchwald-Werner  
**geboren am** 05. März 1969  
**in** Marl

### Ausbildung

06/1988 Abitur  
08/1988–06/1991 Ausbildung zur Chemielaborantin bei der Hoesch AG  
Dortmund  
10/1991–03/1992 Ausbildung zur geprüften Pharmareferentin bei der  
IHK, Dortmund  
04/1992–09/1996 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf  
09/1996 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
10/1996–03/1997 Pharmazie-Praktikum in der Holzwarth-Apotheke,  
Dorsten  
04/1997–09/1997 Pharmazie-Praktikum an der Heinrich-Heine-Univer-  
sität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische Chemie  
10/1997 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und  
Approbation als Apothekerin

### Wissenschaftliche Tätigkeit

10/1997–06/2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut  
für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr.  
H.-D. Höltje  
10/1997–08/2001 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für  
Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

