

KAPILLARELEKTROPHORETISCHE BESTIMMUNG VON KOHLENHYDRAT-ENANTIOMEREN*

B. Lachmann* und C. R. Noe

Institut für Pharmazeutische Chemie

Universität Wien

Althanstraße 14, A-1090 Wien

Capillary Electrophoresis of Carbohydrates

Abstract:

Capillary electrophoresis is a versatile analytical technique for the determination of a very widespread range of compounds. Many applications for the separation of different pharmaceuticals, ions, herbicides and biomolecules such as DNA, proteins and peptides have been published over the last decade. A comparatively new field is the separation and determination of carbohydrates by capillary electrophoresis, especially the assignment of absolute configuration. These methods will also gain importance in the field of pharmaceutical carbohydrate analysis. In this review a short overview of the different methods and separation procedures is given and some applications for the separation of sugar enantiomers are described in more detail.

(*Keywords: capillary electrophoresis of carbohydrates, sugar enantiomers, capillary zone electrophoresis*)

Einleitung

Neben den Proteinen, den Nukleinsäuren und den Fetten stellt die Gruppe der Kohlenhydrate eine weitere wichtige Klasse von Biomolekülen dar. Die Struktur der verschiedenen Kohlenhydrate ist, bedingt durch ihre Polyfunktionalität, äußerst komplex. Dies wird im Vergleich mit dem Aminosäuremuster von Proteinen besonders deutlich. Während aus zwei neutralen L-Aminosäuren

*Herrn em. Univ.-Prof. Dr. W. Fleischhacker mit den besten Wünschen zum 70. Geburtstag gewidmet.

nur ein Dipeptid gebildet wird, können z. B. zwei Moleküle D-Glucose auf 11 unterschiedliche Arten miteinander verknüpft sein. Bei Kombination von zwei unterschiedlichen Hexosen können, ohne Berücksichtigung der Konfiguration an den anomeren Zentren, 16 verschiedene Disaccharide entstehen, bei drei verschiedenen Hexosen ergeben sich schon 81 verschiedene Varianten von Trisacchariden, bei verschiedenen Anomerenformen der beteiligten Zucker erhöht sich diese Zahl auf mehr als 700 Isomere¹. Bei Berücksichtigung der jeweils zwei Enantiomere (D und L) existieren insgesamt alleine 16 unterschiedliche Aldohexosen, diese können zu einer unüberschaubaren Menge an Oligosacchariden verknüpft sein. Neben ihrer strukturellen Vielfalt stellen Zucker außerdem die Gruppe von Biomolekülen dar, die den Hauptteil der Biomasse bilden².

Zur Analytik dieser komplexen Verbindungen werden verschiedene instrumentelle Verfahren angewendet. Neben unterschiedlichen HPLC-Methoden wurden vor allem GC-Methoden etabliert. Verwendet werden zur gaschromatographischen Bestimmung die verschiedensten Derivatisierungsverfahren³. Diese führen zu peracetylierten Alditolen, methylierten Verbindungen, Trifluoracetaten und zu verschiedenen Trimethylsilyloximen⁴. HPLC-Methoden zur Trennung underivatisierter Zucker sind bekannt, jedoch ist die Trennung von Zuckerenantiomeren mittels fester oder flüssiger chiraler Phasen ohne vorhergehende Derivatisierung bisher nicht gelungen. In den meisten Fällen werden die Analyte aber auch bei den HPLC-Trennungen derivatisiert^{5,6}. Verschiedene Verfahren wurden entwickelt, so z. B. GC-Methoden zur Trennung der Trifluoracetatderivate von König et al.⁷, die eine Enantiomeren-Trennung an chiralen Phasen ermöglichen. Anwendungen zur Trennung von enantiomeren Zuckern nach Umsetzung zu Diastereomeren sind ebenfalls bekannt. Die in der Literatur beschriebenen GC- bzw. HPLC-Verfahren zur Enantiomerentrennung haben oft den Nachteil, daß nach Derivatisierung zwei Diastereomere pro Zucker-Enantiomer entstehen. Die beiden Diastereomere entstehen z. B. durch Derivatisierungsreaktionen am anomeren Zentrum⁸ oder durch Verwendung chiraler Oxime⁹, die zu E-/Z-Isomeren führen. Eine Technik, die im letzten Jahrzehnt in der Analytik dieser Verbindungsklasse immer mehr an Bedeutung gewonnen hat, ist die Kapillarelektrophorese. Sie stellt für diese sehr hydrophilen Analyte ein breites Spektrum an Methoden zur Verfügung.

Methoden zur kapillarelektrophoretischen Bestimmung von Zuckern

Als Verfahren zur kapillarelektrophoretischen Bestimmung von Kohlenhydraten oder Zuckern werden vor allem Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und Micellarelektrokinetische Chromatographie (MEKC) verwendet. Diese Verfahren ermöglichen auch die Bestimmung der

Zuckerenantiomere. Zur Größenbestimmung von Oligosacchariden und zur Identifikation von Glykosylierungsstrukturen werden zusätzlich kapillarelektrophoretische Verfahren eingesetzt. Hierbei können sowohl underivatisierte Strukturen analysiert werden, als auch eine Derivatisierungsreaktion der Trennung vorangestellt werden. In der Literatur ist in mehreren Übersichtsartikeln^{10,11,12} eine Vielzahl von Methoden beschrieben, auf die wichtigsten soll hier eingegangen werden.

Kapillarelektrophoretische Verfahren in stark alkalischen Medien

Kohlenhydrate sind als vicinale Alkohole sehr schwache Säuren mit pK_a -Werten zwischen 12 und 13. Damit sind sie unter den üblichen Trennbedingungen nicht ionisiert und zeigen dementsprechend im elektrischen Feld keine Eigenmobilität. Erst bei pH-Werten oberhalb von 12 kommt es zur Dissoziation der Hydroxylgruppen und zur Entstehung negativ geladener Spezies. Um diese Trennbedingungen zu generieren, wurden entsprechende Versuche in 10 mM Natronlauge durchgeführt, jedoch liegt ein Problem dieses Verfahrens in der Detektion. Für die Verwendung von starken Alkalien als Puffer wurden verschiedene Verfahren zur elektrochemischen Detektion beschrieben¹³, unter anderem auch die Verwendung eines PAD¹⁴ (Puls-amperometrischer-Detektor), jedoch sind die entsprechenden Detektoren für die Kapillarelektrophorese nicht käuflich zu erwerben.

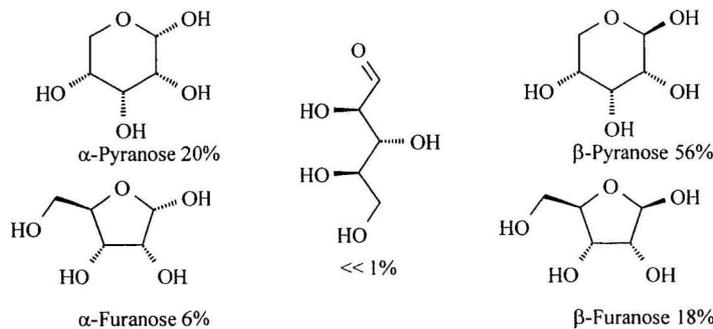


Abb. 1: Gleichgewichtszusammensetzung der D-Ribose in wässriger Lösung bei 40° C nach¹⁵

Kohlenhydrat-Metall-Komplexe

Verschiedene zwei- und dreiwertige Metallkationen bilden mit mehrwertigen Alkoholen positiv

geladene Komplexe, deren Stabilität von der Konfiguration der beteiligten Hydroxylgruppen abhängt. So führt der Zusatz von verschiedenen Metall-Ionen zu wäßrigen Zuckerlösungen zu positiv geladenen Metall-Aldose-Komplexen¹⁶. Auch diese Komplexe lassen sich kapillarelektrophoretisch trennen, bei Verwendung von z. B. Erdalkalitionen¹⁷ als Pufferkomponente können die entsprechenden positiv-geladenen Derivate nachgewiesen werden.

Bestimmung von Kohlenhydraten nach Komplexierung mit Borationen

Eine andere Möglichkeit, zu geladenen Zuckern zu gelangen, ist die Komplexierung mit Borationen¹⁸ (Abb. 2). Zucker bilden als vicinale Diole mit Borationen negativ geladene Komplexe. Aufgrund der sterischen Anordnung der verschiedenen Hydroxyl-Gruppen kommt es zu unterschiedlichen Komplexen, welche sich auch in ihrer Stabilität unterscheiden.

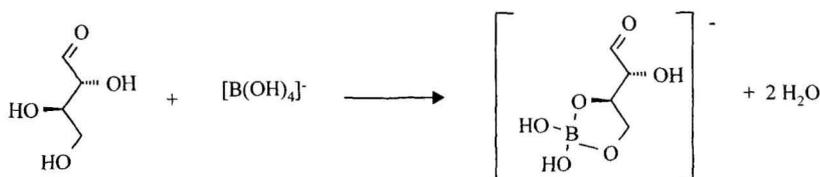


Abb. 2: Hypothetischer Borat-Komplex der D-Erythrose

Somit entstehen, je nach Konformation der entsprechenden Zucker, unterschiedliche Bruttoladungen der Analyte die eine elektrophoretische Trennung¹⁹ möglich machen. Hofstetter-Kuhn et al.²⁰ erreichten mit Hilfe dieser Methode elektrophoretische Trennungen underivatisierter Zucker in einem Borat-Puffer. Da die Boratkomplexierung jedoch durch die Vielzahl der vorliegenden Formen nicht einheitlich ist, resultieren breite Signale für die Analyte. Dies ist auch auf die verschiedenen, vorliegenden zyklischen Halbacetale zurückzuführen (s. Abb. 1). Eine Verbesserung der Peaksymmetrie konnte durch eine Temperaturerhöhung erreicht werden, dies erhöht zusätzlich die Empfindlichkeit der Messung, da dann die offenkettige Carbonylform in höheren Konzentrationen im Gemisch vorliegt. Für nichtreduzierende Zucker²¹ wurde eine verbesserte Peakform bei niedrigeren Temperaturen publiziert. Unter diesen Bedingungen sind kapillarelektrophoretische Kohlenhydrat-Bestimmungen in Wein, Honig und Fruchtsäften beschrieben worden²². Allerdings gelang auch hier nicht die Trennung von Zucker-Enantiomeren.

Auf der unterschiedlichen Dissoziation der Kohlenhydrate in stark basischen Lösungen beruhen verschiedene Methoden der indirekten Detektion. Eine der ersten Veröffentlichungen²³ dieser Methodik beschreibt z. B. die Trennung von drei Zuckern unter Verwendung von Cumarin 343 als fluoreszierenden Hintergrundelektrolyten und indirekter LIF-Detektion. Eine andere Möglichkeit der indirekten Detektion ist die Bestimmung der underivatisierten Zucker im UV-Bereich²⁴. Dabei wird die Verdrängung eines dem Puffer zugesetzten, stark UV-aktiven Hintergrundelektrolyten (z. B. Sorbinsäure^{25,26} oder Tryptophan²⁷) durch den Analyten gemessen und die negativen Signale ausgewertet. Die Kombination von Boratkomplexierung mit indirekter UV²⁸-Detektion zeigte wesentlich verbesserte Nachweisgrenzen und eine im allgemeinen deutlich symmetrischere Peakform. Im Gegensatz zu den neutralen Sacchariden sind die negativ geladenen Zuckersäuren schon bei sauren pH-Werten dissoziiert, bei niedrigerem pH-Wert bestimmbar und mittels indirekter UV-Detektion²⁹ nachweisbar. Auch die Kombination von elektrochemischer Detektion mit vorangehender Trennung der Zucker in einem Boratpuffer ist beschrieben³⁰, hierbei wird vor der Detektion der Boratpuffer mit 0.4 M Natronlauge versetzt, damit die elektrochemische Reaktion ablaufen kann. Die Nachweisgrenzen dieses Systems sind schlechter als bei der Verwendung von Natronlauge als Puffer, durch die Boratkomplexierung erhöht sich jedoch die Trennleistung im Vergleich zu diesen Systemen.

Eine weitere Möglichkeit der Detektion, die Verwendung eines R. I. (Brechungsindex)-Detektors, wurde von Bruno et al.³¹ für die Kapillarelektrophorese adaptiert.

Kapillarelektrophoretische Bestimmung von Kohlenhydraten nach Derivatisierung

Zur weiteren Verbesserung der Trenneffizienz und der Nachweisgrenzen wurden Verfahren zur Derivatisierung von Kohlenhydraten an die Bedingungen der Kapillarelektrophorese adaptiert bzw. neu entwickelt. Hierbei wurden für kapillarelektrophoretische Verfahren die folgenden Reaktionen zur Derivatisierung genutzt:³²

1. Bildung von Schiffchen Basen und anschließende Reduktion - Reduktive Aminierung am Carbonylkohlenstoff³³
2. Umsetzung mit Ammoniumsalzen zu den 1-Amino-1-desoxyalditolen³⁴ und anschließende Derivatisierung der Aminfunktion, z. B. mit 3-(4-Carboxybenzoyl)-2-quinolincarboxyaldehyd (CBQCA)³⁵ oder 5-Carboxytetramethylrhodaminsuccinimidylester (TRSE³⁶).

3. Derivatisierung durch Kondensation saurer Kohlenhydrate mit Aminen³⁷
4. Derivatisierung von freien Aminfunktionen³⁸
5. Bildung von 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP) Derivaten³⁹
6. Derivatisierung mit Hydrazinen zu den entsprechenden Hydrazonen⁴⁰

Die Derivatisierung der Kohlenhydrate verbessert im allgemeinen nicht nur die Nachweisgrenzen durch die höhere molare Extinktion der Derivate, sondern führt auch meist zu schärferen Signalen, da durch die Derivatisierungsreaktion ein einheitliches Produkt entsteht und Isomere nicht mehr vorliegen. Neben der Derivatisierung mit UV-aktiven Gruppen werden vermehrt Fluorophore als Reagenzien eingesetzt. Dies erhöht die Nachweisempfindlichkeit nochmals. Die erste zur Analytik genutzte reduktive Aminierung von Aldosen wurde mit 2-Aminopyridin (2-AP) durchgeführt⁴¹. Dieses Reagenz wurde sowohl zur pre-column Derivatisierung vor einer HPLC-Trennung⁴² verwendet als auch zur elektrophoretischen Auftrennung⁴³ von Kohlenhydraten. Die Detektion der Derivate erfolgte mittels Fluoreszenz. Dieses Verfahren wurde von Honda et al.⁴⁴ 1989 für die Kapillarelektrophorese unter Verwendung eines Boratpuffers adaptiert, dabei konnte mit UV-Detektion bei 240 nm eine Nachweisgrenze von wenigen Picomol erreicht werden. Nach Bildung des sekundären Amines durch die reduktive Aminierung ist auch die Bestimmung bei sauren pH-Werten möglich. So wurden verschiedene Maltoseoligomere⁴⁵ nach Derivatisierung mit 2-AP in einem saurem Phosphatpuffer aufgetrennt

Andere häufig verwendete Reagenzien sind Derivate der Aminobenzoesäure, so z. B. 2-Aminobenzoesäure⁴⁶, 4-Aminobenzoesäure⁴⁷, 4-Aminobenzonitril⁴⁸, und 4-Aminobenzoesäureethylester⁴⁹. Die Detektion von Ketosen ist nach der Reaktion mit den 4-Aminobenzoesäurederivaten möglich, jedoch findet in diesem Fall keine quantitative Umsetzung statt. Alle diese angegebenen Methoden nach der Umsetzungen mit Aminobenzoesäurederivaten beziehen sich auf kapillaronenelektrophoretische Verfahren. Bei der Verwendung von 4-Aminobenzonitril besteht ebenfalls die Möglichkeit, Kohlenhydrate in einem Tris-Phosphat-Puffer unter Zusatz von SDS zu trennen. Als Trennmethode wird hier die MEKC⁵⁰ verwendet. Ebenfalls auf der reduktiven Aminierung basiert die Umsetzung von reduzierenden Sacchariden mit Aminonaphthylsulfonsäurederivaten. Diese Verbindungsklasse zeigt native Fluoreszenz und wird deshalb sowohl als UV-Chromophor als auch als Fluorophor verwendet. Das am häufigsten eingesetzte Derivat ist ANTS (8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure) mit einem Excitationsmaximum bei 223 nm. Da für diese Wellenlänge keine LIF-Detektoren zur Verfügung stehen, wird ein zweites Maximum bei 360 nm

verwendet und zur Anregung ein He/Cd-Laser⁵¹ benützt. Die entstehende Emission wird bei 520 nm gemessen, jedoch ist die Empfindlichkeit nur um eine Zehnerpotenz besser als bei der Messung der UV-Absorption bei 223 nm⁵¹. Sie beträgt für die Fluoreszenzdetektion 5×10^{-8} M, dies entspricht einer Massensensitivität von ca. 400 amol. Die Nachweisgrenze kann weiter gesenkt werden, wenn anstatt des He/Cd-Lasers ein frequenzverdoppelter Argon-Ionen-Laser eingesetzt wird. In diesem Fall kann ein Detektionslimit von 10^{-9} M erreicht werden⁵². Es wurden diverse Applikationen unter Verwendung von ANTS publiziert, eine Übersicht hierzu gibt unter anderem der Artikel von Paulus und Klockow⁵². Bei Verwendung von 7-Aminonaphthalin-1,3-disulfonsäure (ANDS) als Derivatisierungseagens konnten die erreichten Nachweisgrenzen nicht weiter verbessert werden. Es lassen sich Massensensitivitäten von bis zu 80 fmol erreichen⁵³. Ein weiteres Sulfonsäurederivat, Aminopyren-1,4,6-trisulfonsäure (APTS), wurde 1995⁵⁴ eingeführt. Hier liegt die Anregungswellenlänge bei 455 nm, so daß ein unmodifizierter Argon-Ionen-Laser benutzt werden kann. Die erreichbaren Nachweisgrenzen wurden in den entsprechenden Publikationen nicht genannt, sie sollten jedoch in ähnlichen Bereichen liegen wie für die ANTS-Derivate. Bei der Verwendung dieses Derivates in Kombination mit einem Boratpuffersystem zeigt sich ein prinzipielles Problem. Da die entstehenden Derivate durch die Sulfonsäuregruppen des Reagenzes schon negativ geladen sind, wird die Boratkomplexierung behindert, dies führt zu schlechteren Trennergebnissen bei der Verwendung dieses Puffersystems.

Von El Rassi et al.³⁷ wurde ein Verfahren publiziert, welches Sulfanilsäure als Reagenz verwendet. Hierbei handelt es sich nicht um eine reduktive Aminierung, sondern die Carboxylgruppe negativ geladener Zuckersäurederivate wird mit der Aminfunktion des Reagenzes umgesetzt. Die entstehenden Derivate sind durch die vorhandene Sulfonsäuregruppe stark sauer und können deshalb bei niedrigen pH-Werten getrennt werden.

Die durch Kondensation von zwei Molekülen PMP mit einem Molekül eines reduzierenden Zuckers entstehenden Bis-PMP-Derivate zeigen keine native Fluoreszenz und können dementsprechend nur mittels UV-Absorption detektiert werden. Die Derivate sind durch die Dissoziation der Phenolgruppe ebenfalls bei basischem pH-Wert negativ geladen, jedoch kann in einem Boratpuffer eine vollständige Trennung sowohl der Aldopentosen als auch der Aldoheptosen in je einem Lauf⁵⁵ durchgeführt werden. Auch die Trennung dieser Derivate nach Komplexbildung mit Erdalkalitionen ist, ebenso wie eine MEKC Methode⁵⁶, publiziert.

Die besten Nachweisgrenzen werden nach der Derivatisierung mit TRSE erreicht. Die

Massensensitivität erreicht dabei Bereiche zwischen zepto und yocto Mol⁵⁷. So können noch 8×10^{23} mol des Zuckerderivates unter Verwendung eines He/Ne-Lasers nachgewiesen werden⁵⁸.

Neu eingeführt wurde in den letzten beiden Jahren⁵⁹ unter anderem die Bestimmung von Zuckern durch die direkte UV-Bestimmung nach Komplexierung mit Kupfer-(II)-Ionen⁶⁰, die Verwendung von 2-Aminobenzamid als neutralem Derivatisierungsreagenz⁶¹ sowie die Verwendung von Bioelektroden, die verschiedene Enzyme beinhalten, zur elektrochemischen Detektion⁶². Von besonderem pharmazeutischen Interesse sind sicherlich die Arbeiten zur Analytik von Glykosylierungsmustern pharmazeutisch relevanter, rekombinant hergestellter Proteine, wie z. B. Erythropoietin⁶³ oder die von Wätzig et al. durchgeführte Qualitätskontrolle von Pentosanpolysulfaten⁶⁴ mittels CZE. Eine Anwendung von klinischer Bedeutung ist der Einsatz eines CZE-Verfahrens zur Bestimmung von reduzierenden Zuckern im Urin nach Derivatisierung mit APTS⁶⁵. Diese kann im Sinne eines postnatalen Screenings zur Detektion einer Galactose-Intoleranz verwendet werden.

Enantiomerenanalytik von Kohlenhydraten

Trotz der Vielzahl von publizierten kapillarelektrophoretischen Methoden zur Bestimmung von Kohlenhydraten sind nur wenige Verfahren bekannt, welche eine Enantiomerenanalytik beinhalten. Bei diesen Methoden wurden zwei unterschiedliche Wege beschritten, einerseits die Derivatisierung mit einem achiralen Reagenz und die anschließende Trennung mit Hilfe eines chiralen Selektors, andererseits die Umsetzung mit einem chiralen Reagenz und die Trennung der entstehenden Diastereomere in einem achiralen Puffersystem. Keine der bisher entwickelten Methoden ermöglicht jedoch die Trennung underivatisierter Zuckerenantiomere.

Stefansson und Novotny⁶⁶ gelang als Ersten die kapillarelektrophoretische Trennung von Monosaccharid-Enantiomeren nach Derivatisierung mit unterschiedlichen aromatischen Aminen (s. Abb. 3) und unter Zusatz von verschiedenen Cyclodextrinen als chiralen Additiven. Als Hintergrundelektrolyten verwendeten sie neben Boratpuffer - mit pH-Werten zwischen 7.4 und 10.2 - Phosphat- und Ammoniumacetatpuffer, wobei in dem Phosphatpuffer noch eine teilweise Trennung der Aldoseenantiomere, in dem Ammoniumacetatpuffer jedoch keine Enantiomertrennung beobachtet wurde. Die Boratkomplexbildung erhöhte in diesem Fall nicht nur die Mobilität der Derivate sondern führte zusätzlich zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung zwischen den Enantiomerenpaaren.

Die Autoren untersuchten ebenfalls die Eignung von verschiedenen Cyclodextrinderivaten für die Trennung der Aldose-Enantiomere. Dabei konnte außer mit den nativen Cyclodextrinen nur mit Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin eine Trennung erreicht werden, nicht jedoch mit verschiedenen methylierten Derivaten.

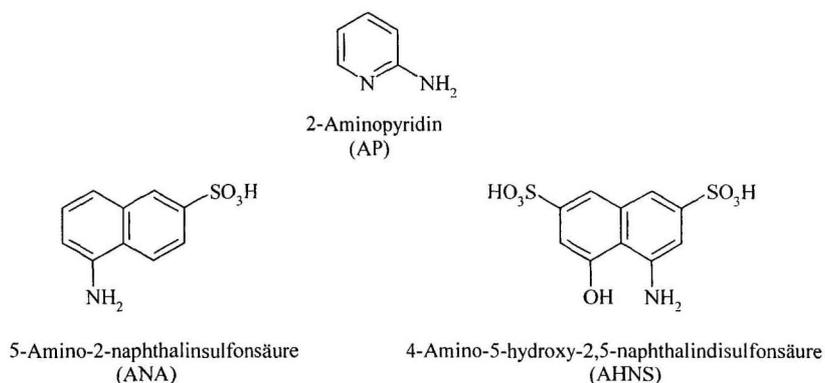


Abb.3: Verwendete Derivatisierungsreagenzien

Insgesamt zeigte von den untersuchten Cyclodextrinen – in allen verwendeten Puffersystemen – β -Cyclodextrin in einer Konzentration von 15 mM die höchste Auflösung, unabhängig von der Größe des verwendeten Reagenzes. Insgesamt konnten die besten Ergebnisse bei der Verwendung von ANA als Derivatisierungsreagenz erhalten werden, die schlechteste Auflösung wurde nach der Umsetzung mit 2-AP beobachtet.

Honda et al. untersuchten die Trennung von Aldose-Enantiomeren unter Verwendung von Valinderivaten⁶⁷ nach Umsetzung mit PMP (s. Abb. 4) zu den Bis-PMP-Derivaten. Dabei wurden enantiomere Gemische von Arabinose, Xylose, Glucose und Galactose verwendet. Die Autoren evaluierten verschiedene Puffersysteme mit chiralen Diskriminatoren. Sie konnten jedoch weder mit Cyclodextrinen in Boratpuffern, noch unter MEKC-Bedingungen unter SDS-Zusatz eine Enantiomerentrennung erreichen.

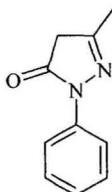


Abb. 4: PMP (1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon)

Lediglich bei Verwendung des chiralen Micellbildners R- bzw. S-N-Dodecoxycarbonylvalin gelang die Trennung, jedoch wurde in dieser Publikation bei Verwendung dieses Puffers keine Diastereomerentrennung gezeigt und nach den angegebenen Daten hatten das D-Galactose- und das D-Glucosederivat fast identische Migrationszeiten. Vorteilhaft an dieser Methode ist die Möglichkeit, durch Wechsel der Konfiguration des verwendeten Tensides die Migrationsreihenfolge der PMP-Derivate zu vertauschen. Während bei Verwendung des R konfigurierten Micellbildners die L-Aldose schneller migriert, hat bei Einsatz des S-N-Dodecoxycarbonylvalins die D-Aldose die kürzere Migrationszeit.

Keine Trennung konnte in diesem System erreicht werden, wenn ein anderes Derivatisierungsreagenz, wie z. B. 2-AP oder ANTS, verwendet wurde. Auch führten geringe Änderungen an dem chiralem Diskriminator zu keiner Enantiomerentrennung mehr. So konnten die Bis-PMP-Derivate von D- und L-Glucose mit N-Lauroylvalin unter sonst identischen Bedingungen nicht getrennt werden.

Ein anderer Weg wird mit der Derivatisierung der Zucker mit einem enantiomerenreinen Reagenz beschrieben. Die nach Umsetzung von enantiomeren Zuckern mit einem chiralen Amin, wie z. B. Phenylethylamin⁶⁸, entstehenden Aminoalditole sind Diastereomere und können deshalb in einem achiralen System getrennt werden. Unter Verwendung dieses Reagenzes entwickelte Oshima et al. gaschromatographische⁶⁹ und HPLC-Trennungen⁷⁰ von Aldoseenantiomeren. Die Derivatisierungsreaktion läuft hierbei nach demselben Schema ab wie bei der reduktiven Aminierung mit einem achiralen Reagenz, wie sie von Stefansson und Novotny⁶⁶ durchgeführt wurde. Es wird nur ein Derivatisierungsschritt benötigt, und es entsteht deswegen kein erhöhter Aufwand. Diese Methode wurde 1995 von Noe und Freissmuth⁷¹ an die Kapillarelektrophorese adaptiert und zur Bestimmung der Produktverteilung von Aldolisierungsreaktionen⁷² verwendet.

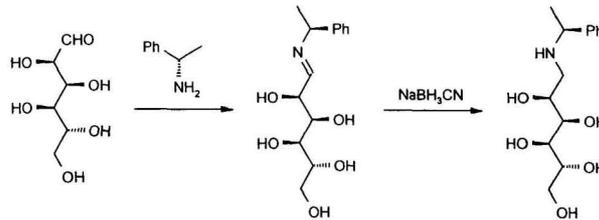


Abb. 5: Reduktive Aminierung mit (S)-1-Phenylethylamin und Natriumcyanoborhydrid am Beispiel der D-Glucose.

Neben der Bestimmung der Zuckerdiastereomere ist mit dieser Methode auch eine Zuordnung der absoluten Konfiguration in komplexen Gemischen möglich, sowie die Ermittlung der Enantiomerenverhältnisse. Nach der Erweiterung dieser Methode auf die Pentosen⁷³ konnten sämtliche bei der Aldolisierung von Glykolaldehyd-Formaldehyd-Gemischen auftretenden Produkte identifiziert werden.

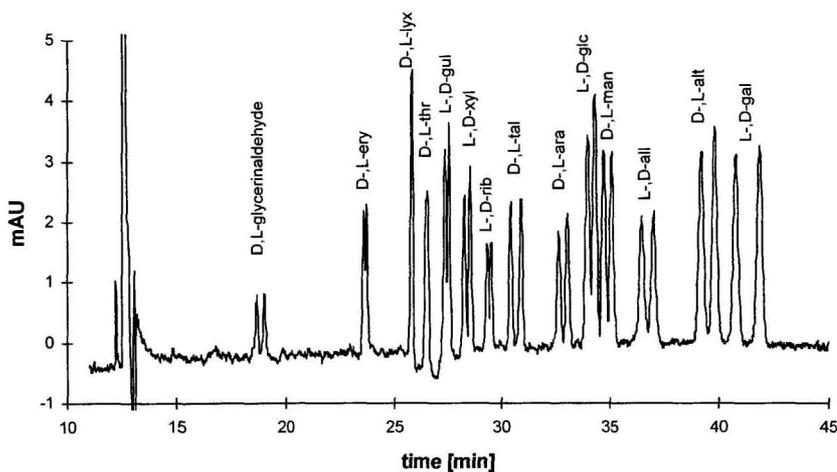


Abb. 6: Trennung eines Aldohexosenstandardgemisches⁷¹.

Aufbauend auf diese Arbeiten wurden einerseits verschiedene Applikationen entwickelt, z. B. die Bestimmung der Aldosezusammensetzung verschiedener pharmazeutischer Pflanzengummen⁷⁴ sowie die Bestimmung von reduzierenden Zuckern in diversen Getränken⁷⁵.

Andererseits wurde als Weiterentwicklung dieser Methodik zudem versucht, möglichst viele verschiedene Zuckerspezies zu bestimmen. So vielseitig die Methode im Falle von Aldosen ist, läßt sie sich bei Ketosen nur für einen qualitativen Nachweis verwenden. Eine Quantifizierung ist infolge einer unvollständigen Derivatisierung nicht möglich⁷⁶. In Abbildung 7 ist die Trennung von mit *rac*-1-Phenylethylamin derivatisierter D-Fructose gezeigt.

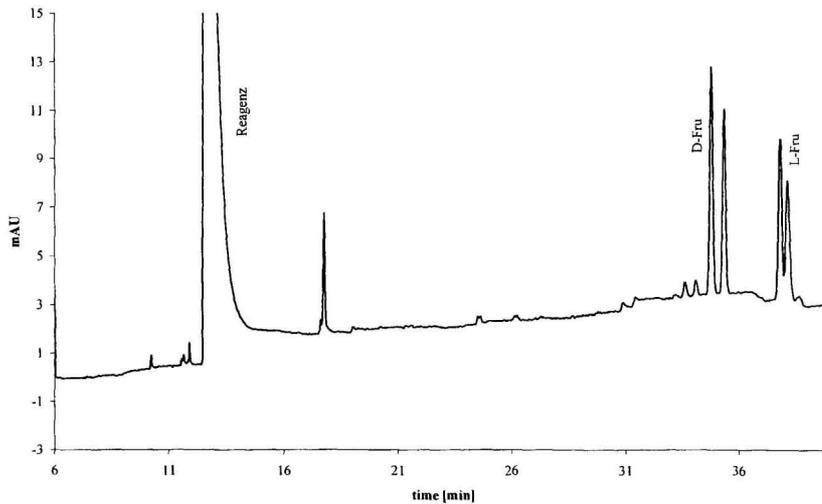


Abb. 7: Elektropherogramm von D-Fructose umgesetzt mit *rac*-1-Phenylethylamin; Puffer: 100 mM Tetraborat, pH 9.8; Kapillare: 50 μ m, 80/87 cm Länge; 28 kV, 22 °C.

Die Quantifizierung von reduzierenden Aldosen hingegen ist möglich. Dabei besitzen fast alle Zuckerderivate, abgesehen von den 2-Aminoacetyl-2-desoxyderivaten, gleiche molare Absorptionskoeffizienten, so daß von den Peakflächenverhältnissen direkt auf die in der Probe enthaltenen Anteile an Aldosen geschlossen werden kann.

Auch bei dieser Methode kann, wie bei der Trennung der enantiomeren PMP-Derivate, ein Wechsel der Migrationsreihenfolge der Enantiomere erfolgen. Dies geschieht durch die Derivatisierung mit dem enantiomeren Reagens (R)-Phenylethylamin⁷³ und kann zur Absicherung der Ergebnisse dienen.

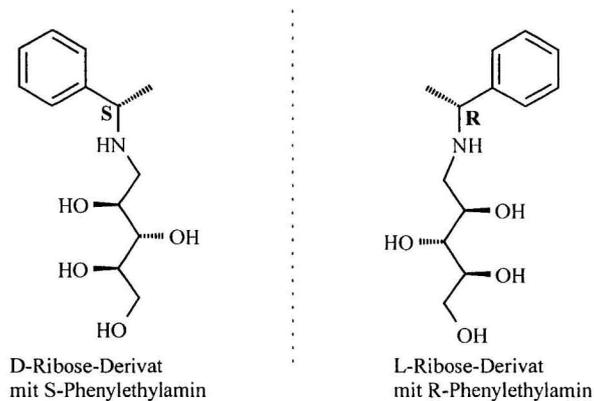


Abb. 8: Beispiel enantiomerer Derivate mit gleichen Migrationszeiten, nach⁷³.

Da bei der Umsetzung von einer D-Aldose mit dem R-konfiguriertem Amin ein Derivat entsteht, welches enantiomer zu dem Derivat einer L-Aldose mit S-konfiguriertem Amin ist, besteht zusätzlich die Möglichkeit, solche Aldosen zu ersetzen, die nicht käuflich sind. Die entsprechenden Derivate zeigen in dem achiralen Trennsystem ein identisches Verhalten.

Die Kapillarelektrophorese ist, bedingt durch die Vielzahl der beschriebenen Verfahren insbesondere für die Analytik so hydrophiler Substanzen wie Zuckern, inzwischen eine etablierte Methode. Die hier vorgestellten Möglichkeiten zur Enantiomerenanalytik von Zuckern sind in vielen Fällen den sonstigen chromatographischen Methoden zumindest ebenbürtig, wenn nicht gar überlegen.

Literatur:

- ¹ Kobata A., (1992), *Eur. J. Biochem.* 209: 483
- ² Lehmann J., (1976), *Chemie der Kohlenhydrate*, Georg Thieme Verlag, Heidelberg
- ³ Chaplin M. F., Kennedy J. F., (1994), *Carbohydrate Analysis*, 2. Aufl., Oxford University Press, Oxford
- ⁴ Churms S. C., (1990), *J. Chromatogr.* 500: 555
- ⁵ Honda S., (1984), *Anal. Biochem.* 140: 1
- ⁶ Hase S., (1996), *J. Chromatogr.* 720: 173
- ⁷ König W. A., Benecke I., Sievers S., (1981), *J. Chromatogr.* 217: 71
- ⁸ Reznicek G., Susmann O., Böhm K., (1993), *Sci. Pharm.* 61: 35
- ⁹ Schweer H., (1982), *J. Chromatogr.* 243: 149
- Schweer H., (1983), *J. Chromatogr.* 259: 164
- ¹⁰ Susuki S., Honda S., (1998), *Electrophoresis* 19: 2539
- ¹¹ El Rassi Z., Mechref Y., (1996), *Electrophoresis* 17: 275
- ¹² siehe auch: (1996), *J. Chromatogr. A* 720: 323 ff
- ¹³ Colón L. A., Dadoo R., Zare R., (1993), *Anal. Chem.* 65: 476
- ¹⁴ O'Shea T. J., Lunte S. M., LaCourse W. R., (1993), *Anal. Chem.* 65: 948
- ¹⁵ Belitz H.-D., Grosch W., (1992), *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 233
- ¹⁶ Angyal S. J., Davies K. P., (1971), *Chem. Commun.* 10: 500
- ¹⁷ Honda S., Yamamoto K., Suzuki S., Ueda M., Kakehi K., (1991) *J. Chromatogr.* 588: 327
- ¹⁸ Böseken J., (1949), *J. Adv. Carbohydr. Chem.* 4: 189
- van Duin M., Peters J., Kieboom A., van Bekkum H., (1984), *Tetrahedron* 40: 2901
- ¹⁹ Foster A. B., (1957), *Adv. Carbohydr. Chem.* 12: 81
- ²⁰ Hofstetter-Kuhn S., Paulus A., Gassmann E., Widmer H., (1991), *Anal. Chem.* 63: 1541
- ²¹ Arenthof A. M., Michaelsen S., Sorensen H., (1993) *J. Chromatogr. A.* 652: 517
- ²² Klockow A., Paulus A., Figueiredo V., Widmer H. M., (1994) *J. Chromatogr. A* 680: 187
- ²³ Garner T. W., Yeung E. S., (1990) *J. Chromatogr.* 515: 639
- ²⁴ Yeung E. S., (1995) *Adv. Chromatogr.* 35: 1
- ²⁵ Vorndran A., Oefner P., Scherz H., Bonn G., (1992), *Chromatographia* 33: 163
- ²⁶ Oefner P., Vorndran A., Grill E., Huber C., Bonn G., (1992) *Chromatographia* 34: 308

- ²⁷ Lu B., Westerlund D., (1996) *Electrophoresis* 17: 325
- ²⁸ Plocek J., Chmelik J., (1997), *Electrophoresis* 18: 1148
- ²⁹ Bergholdt A., Overgaard J., Colding A., Frederiksen R., (1993), *J. Chromatogr.* 644: 412
- ³⁰ Cassidy R. M., Lu W., Tse V. P., (1994), *Anal. Chem.* 66: 2578
- ³¹ Bruno A. E., Krattinger B., Maystre F., Widmer H. W., (1991), *Anal. Chem.* 63: 2689
- ³² El Rassi Z., (1998), *High Performance Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*, Beckman, Fullerton CA.
- ³³ Blomberg L., Wieslander J., Norberg T., (1993), *J. Carbohydr. Chem.* 12: 265
- ³⁴ Borch R. F., Bernstein M. D., Durst H. D., (1971), *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2897
- ³⁵ Liu J., Shirota O., Wiesler D., Novotny M., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2302
- ³⁶ Zhao J. Y., Dietrich P., Zhang Y., Hindsgaul O., Dovichi N. J., (1994), *J. Chromatogr. B* 657: 307
- ³⁷ Mechref Y., El Razzi Z., (1994), *Electrophoresis* 15: 627
- ³⁸ Bardelmeijer H. A., Lingeman H., de Ruiter C., Underberg W. J. M., (1998), *J. Chromatogr. A* 807: 3
- ³⁹ Honda S., Akao E., Suzuki S., Okuda M., Kakehi K., Nakamura J., (1989), *Anal. Biochem.* 180: 351
- ⁴⁰ Perez S. A., Colón L. A., (1996), *Electrophoresis* 17: 352
- ⁴¹ Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85: 257
- ⁴² Takemoto H., Hase S., Ikenawa T., (1985), *Anal. Biochem.* 145: 245
- ⁴³ Hase S., Hara S., Matsushima Y., (1979), *J. Biochem.* 85: 217
- ⁴⁴ Honda S., Iwase S., Makino A., Fujiwara S., (1989), *Anal. Biochem.* 176: 72
- ⁴⁵ Nashabeh W., El Rassi Z., (1990), *J. Chromatogr.* 514: 57
- ⁴⁶ Sato K., Okubo A., Yamazaki S., (1998), *Anal. Biochem.* 262: 195
- ⁴⁷ Grill E., Huber C., Oefner P., Vorndran A., Bonn G., (1993), *Electrophoresis* 14: 1004
- ⁴⁸ Grill E., Huber C., Oefner P., Schwaiger H., Bonn G., (1994), *Electrophoresis* 15: 941
- ⁴⁹ Grill E., Huber C., Oefner P., Vorndran A., Bonn G., (1992), *Chromatographia* 34: 109
- ⁵⁰ Schweiger H., Oefner P. J., Huber C., Grill E., Bonn G., (1994), *Electrophoresis* 15: 941
- ⁵¹ Klockow A., Widmer H. M., Amado R., Paulus A., (1994), *Fresenius, J. Anal. Chem.* 680: 187
- ⁵² Paulus A., Klockow A., (1996), *J. Chromatogr. A* 720: 353
- ⁵³ Lee K. B., Al-Hakim, Loganathan D., Linhardt R. J., (1991), *Carbohydr. Res.* 214: 155

- Lee K. B., Desai U., Palcic M. M., Hindsgaul O., Linhardt R. J., (1992), *Anal. Biochem.* 205: 108
- ⁵⁴ Chen F., Evangelista R. A., (1995), *Anal. Biochem.* 230: 273
- Evangelista R. A., Liu M., Chen F., (1995), *Anal. Chem.* 67: 2239
- ⁵⁵ Honda S., Suzuki S., Nose A., Yamamoto K., Kakehi K., (1991), *Carbohydr. Res.* 215: 193
- ⁵⁶ Honda S., (1996), *J. Chromatogr. A* 720: 337, Zitat 23
- ⁵⁷ Zhang Y., Le X., Dovichi N. J., Compston C. A., Palcic M. M., Dietrich P., Hindsgaul O., (1995), *Anal. Biochem.* 227: 368
- ⁵⁸ Le X., Zhang Y., Dovichi N. J., Compston C. A., Palcic M. M., Beever R. J., Hindsgaul O., (1997), *J. Chromatogr. A* 781: 515
- ⁵⁹ El Rassi Z., (1999), *Electrophoresis* 20: 3134
- ⁶⁰ Bazzanella A., Bächmann K., (1998), *J. Chromatogr. A* 799: 283
- ⁶¹ Tran N. T., Taverna M., Dechamps F. S., Morin P., Ferrier D., (1998), *Electrophoresis* 19: 2630
- ⁶² Baldwin R. P., (1999), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19: 69
- ⁶³ Pantazaki A., Taverna M., Vidal-Madjar C., (1999), *Anal. Chimica Acta* 383: 137
- ⁶⁴ Degenhardt M., Benend H., Wätzig H., (1998), *J. Chromatogr. A* 817: 297
- ⁶⁵ Lin L. J., Li S. F. Y., (1999), *Electrophoresis* 20: 3450
- ⁶⁶ Stefansson M., Novotny M., (1993), *J. Am. Chem. Soc.* 115: 11573
- ⁶⁷ Honda S., Taga A., Kotani M., Grover E. R., (1997), *J. Chromatogr. A* 792: 385
- ⁶⁸ S-(-)-1-Phenylethylamin, respektive R-(+)-1-Phenylethylamin
- ⁶⁹ Oshima R., Yamauchi Y., Kumanotani J., (1982), *Carbohydr. Res.* 107: 169
- ⁷⁰ Oshima R., Kumanotani J., (1983), *J. Chromatogr.* 259: 159
- ⁷¹ Noe C. R., Freissmuth J., (1995), *J. Chromatogr. A* 704: 503
- ⁷² Noe C. R., Knollmüller M., Ettmayer P., (1991), *Liebigs Ann. Chem.* 417
- Noe C. R., Knollmüller M., Ettmayer P., Freissmuth J., (1994), *Liebigs Ann. Chem.* 611
- ⁷³ Noe C. R., Freissmuth J., Rothley D., Lachmann B., Richter P., (1996), *Pharmazie* 51: 868
- ⁷⁴ Noe C. R., Freissmuth J., Rothley D., Lachmann B., (1996), *Sci. Pharm.* 64: 185
- ⁷⁵ Noe C. R., Lachmann B., Möllenbeck S., Richter P., (1999), *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 208: 148
- ⁷⁶ Durch das bei der reduktiven Aminierung entstehende neue Chiralitätszentrum resultieren für jedes Enantiomer zwei Signale, deren Gesamtpeakfläche allerdings geringer ist als diejenige einer äquimolaren Menge einer Aldose.