

# **Entwicklung stereospezifischer HPLC- und Kapillarelektrophorese-Techniken für die pharmakokinetische Anwendung**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

von Dipl.-Biol. Thomas Ullrich  
geb. am 16.01.1969 in Sangerhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Gübitz
2. Prof. Dr. G.-J. Krauß
3. Prof. Dr. M. Weiss

Verteidigung: 15. Oktober 2001

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Chiralität .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Enantiomere und Diastereomere.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 Nomenklatur .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3 Biologische Relevanz.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.4 Gewinnung von Enantiomeren.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.5 Chirale HPLC und Kapillarelektrophorese-Trennungen .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.6 Pharmakon Fenoterol .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.7 Analyt Fenoterol .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.8 Derivatisierungstarget Fenoterol.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Pharmakokinetische Modelle .....</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Geräte und Zubehör .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Chemikalien.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Methoden.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1 HPCE.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2 HPLC.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2.1 Chromatographische Systeme.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2.1.1 Achirale Fenoterol-Bestimmung .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.2.1.2 Achirale Fenoterol-Bestimmung als FMOC-Derivat .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.1.3 Achirale Fenoterol-Bestimmung als NIC-Derivat .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.1.4 Chirale Fenoterol-Bestimmung als NEIC-Derivate .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.2.1.5 Chirale Aminoalkohol-Bestimmung als NIC-Derivate .....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2.2 Herstellung mobiler Phasen.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2.3 Derivatisierung von Fenoterol als Reinsubstanz mit FMOC.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2.4 Derivatisierung von Aminoalkoholen als Reinsubstanzen mit NIC .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2.5 Extraktion und Derivatisierung von Fenoterol aus biologischen Matrices .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.2.5.2 Festphasenextraktion .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2.5.3 Festphasenvermittelte Flüssigphasenextraktion.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2.5.4 Flüssigphasenextraktion des Fenoterols aus Kaliumphosphatpuffer .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2.5.5 Flüssigphasenextraktion des Fenoterols aus Perfusionspuffer.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2.5.6 Probenvorbereitungen für die HPLC-Analyse der NIC-Derivate des Fenoterols .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3 Massenspektroskopische Untersuchungen.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3.4. Pharmakokinetische Studien.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.4.1 Gewinnung der Tierversuchsproben .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.4.2 Perfusionspuffer-Herstellung für die Studien am isoliert perfundierten Rattenherzen .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.4.3 Injektion von Fenoterol in das <i>in situ</i>-perfundierte Rattenherz .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.4.4 Herzgewebe-Aufbereitung.....</b>	<b>22</b>

---

<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Chirale HPLC-Analytik der FMOC- und NIC-Derivate von Aminoalkoholen als Reinsubstanz .....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Derivatisierung des Fenoterols mit FMOC und NIC .....	23
3.1.2 Trennfunktionen zur Enantioseparation der FMOC- und NIC-Derivate von Aminoalkoholen .....	23
3.1.3 Chromatographie der NIC-Derivate von Aminoalkoholen .....	24
3.1.4 Polarimetrische Untersuchungen .....	29
<b>3.2 Chirale HPLC-Analytik der NIC-Derivate des Fenoterols aus biologischen Matrices .....</b>	<b>30</b>
3.2.1 Achirale Chromatographie des Fenoterols .....	30
3.2.2 Probenaufbereitung aus wäßrigen Medien .....	30
3.2.2.1 Plasma .....	30
3.2.2.1.1 Festphasenvermittelte Flüssigphasenextraktion .....	30
3.2.2.1.2 Festphasenextraktion .....	31
3.2.2.2 Phosphatpuffer .....	32
3.2.2.3 Perfusionspuffer .....	32
3.2.3 NIC-Derivatisierung von Fenoterol aus Perfusatproben .....	33
3.2.4 Säulenschalten .....	35
3.2.5 Massenspektroskopische Untersuchungen .....	37
<b>3.3 NEIC-Derivatisierung des Fenoterols .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 UV- und Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Fenoterol-Enantiomeren-Derivate des NEIC und NIC .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5 Fluoreszenz-Sensitivitätsvergleich der Fenoterolderivate des NIC und des NEIC .....</b>	<b>41</b>
<b>3.6 Chirale HPCE-Analytik des Fenoterols .....</b>	<b>43</b>
3.6.1 Chirale Selektoren .....	43
3.6.2 Optimierung der chiralen Trennung mit Cyclodextrinen in der CZE .....	45
<b>3.7 Perfusionsversuche am Rattenherzen .....</b>	<b>48</b>
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Fluorogene Derivatisierung .....</b>	<b>51</b>
4.1.1 Derivatisierung mit achiralen Reagenzien .....	51
4.1.2 Derivatisierung mit chiralen Reagenzien .....	53
4.1.3 Derivatisierung mit Isocyanaten .....	55
<b>4.2 Probenaufbereitung .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3 HPLC-Analytik .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3.1 Chirale stationäre Phasen (CSP) .....</b>	<b>62</b>
4.3.1.1 Chirale Trennung durch Einschlußkomplexierung .....	62
4.3.1.2 Chirale Trennung auf Polysaccharid-Phasen .....	64
4.3.1.3 Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamat)-CSP .....	65
4.3.1.3.1 Mobile Phase .....	65
4.3.1.3.2 Struktur-Retentions-Beziehungen .....	66
4.3.1.3.3 Phasenvergleiche .....	70
4.3.1.4 Chirale Trennung auf Pirkle-Phasen .....	71
4.3.1.5 Chirale Trennung auf Protein-Phasen .....	71
<b>4.3.2 Achirale stationäre Phasen .....</b>	<b>72</b>
<b>4.3.3 Chirale mobile Phasen .....</b>	<b>73</b>

<b>4.4 HPCE-Analytik .....</b>	<b>74</b>
4.4.1 Chirale Trennung durch Einschlußkomplexierung.....	74
4.4.2 Chirale Trennung durch Affinitätsinteraktionen (Chirale Affinitäts-EKC)...	78
4.4.3 Chirale Trennung durch Solubilisierung .....	79
<b>4.5 Pharmakokinetik.....</b>	<b>81</b>
4.5.1 Herzmodell .....	81
4.5.2 Stereospezifischer Metabolismus.....	82
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>84</b>
<b>6. LITERATUR.....</b>	<b>86</b>

## Abkürzungen, Fachausdrücke und Synonyme der verwendeten Wirkstoffe

### Abkürzungen

$\alpha$	Selektivitätsfaktor
$A_e$	bereits eliminierte Menge
AGP	acid glycoprotein (saures Glucoprotein)
AU	absorption unit (Absorptions-Intensitätseinheit)
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
ä.D.	äußerer Durchmesser
BEHP	Bis(2-ethylhexyl)phosphat
BGE	background electrolyte (Hintergrundelektrolyt)
BME	tert. Butylmethylether
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CD	Cyclodextrin
CE	capillary electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
$c(t)$	Konzentration zum Zeitpunkt t
CSP	chirale stationäre Phase
$CV^2$	relative Dispersion
CZE	capillary zone electrophoresis (Kapillarzonenelektrophorese)
D	Dosis
DM- $\beta$ -CD	2,6-di-O-methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
DS	degree of substitution (mittlerer Substitutionsgrad)
EEE	Essigsäureethylester
EKC	elektrokinetische Chromatographie
EOF	elektroosmotischer Fluß
HP- $\beta$ -CD	2-Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin
FL	Floreszenz
FLEC	9-Fluorenylethylchloroformiat
FMOC	9-Fluorenylmethylchloroformiat
FU	fluorescence unit (Floreszenz-Intensitätseinheit)
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)

IR	infraroter Lichtwellenbereich
i.D.	innerer Durchmesser
$k'$	Retentionsfaktor (Kapazitätsfaktor)
LC	liquid chromatography (Flüssigchromatographie)
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
min	Minute
MTT	mean transit time (mittlere Transitzeit)
NEIC	Naphthylethylisocyanat
NEITC	Naphthylethylisothiocyanat
NITC	Naphthylisothiocyanat
NIC	Napthylisocyanat
NP	Normalphase
PBA	phenyl boronic acid (Phenylborsäure)
PEIC	Phenylethylisocyanat
POM	polarer organischer Modus
Q	Flußrate
R	Trennfaktor
rac	racemisch
RIA	radioimmunoassay (Radioimmun-Test)
RP	reversed phase (Umkehrphase)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulphat)
sek	Sekunde
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
TM- $\beta$ -CD	2,3,6-tri-O-methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
$t_0$	Totzeit [min]
$t_R$	Retentionszeit [min]
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	ultravioletter bis sichtbarer Lichtwellenbereich
V	Verteilungsvolumen
VTT	variance of transit time (Varianz der Verweildauer)

## **Fachausdrücke**

Bolusinjektion	einmalige stoßförmige Injektion
bronchodilatorisch	bronchienerweiternde Wirkung
Enantiomere	Stereoisomere, die sich zueinander wie Bild und Spiegelbild verhalten und nicht miteinander zur Deckung zu bringen sind
Perfusat	Flüssigkeit, die ein Organ durchströmt
Racemat	äquimolares Enantiomerengemisch
Sympathikomimetika	Substanzen, die ähnliche Wirkungen wie die Stimulation sympathischer Nerven bzw. wie Noradrenalin und Adrenalin hervorrufen
tocolytisch	wehenhemmende Wirkung

## **Synonyme der verwendeten Wirkstoffe**

Buphenin (Nylidrin)	4-Hydroxy- $\alpha$ -[1-[(1-methyl-3-phenyl-propyl)amino]-ethyl]benzenmethanol
Ephedrin	$\alpha$ -[1-(Methylamino)ethyl]benzenmethanol
Epinephrin	4-[1-Hydroxy-2-(methylamino)ethyl]-1,2-benzendiol
Etilefrin	$\alpha$ -[(Ethylamino)methyl]-3-hydroxybenzenmethanol
Fenoterol	5-[1-Hydroxy-2-[(2-(4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]-amino]ethyl]-1,3-benzendiol
Hydroxyephedrin	4-Hydroxy- $\alpha$ -[1-(methylamino)ethyl]benzenmethanol
Isoprenalin (Isoproterenol)	4-[1-Hydroxy-2-[(1-methylethyl)-amino]ethyl]-1,2-benzendiol
Methoxamin	$\alpha$ -(1-Aminoethyl)-2,5-dimethoxybenzenmethanol
Norephedrin (Noradrenalin)	4-(2-Amino-1-hydroxyethyl)-1,2-benzendiol
Octopamin	$\alpha$ -(Aminomethyl)-4-hydroxybenzenmethanol
Orciprenalin (Metaproterenol)	5-[1-Hydroxy-2-[(1-methylethyl)amino]ethyl]-1,3-benzendiol
Ritodrin	4-Hydroxy- $\alpha$ -[1-[[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]amino]ethyl]-benzenmethanol

# 1. Einleitung

## 1.1 Chiralität

### 1.1.1 Enantiomere und Diastereomere



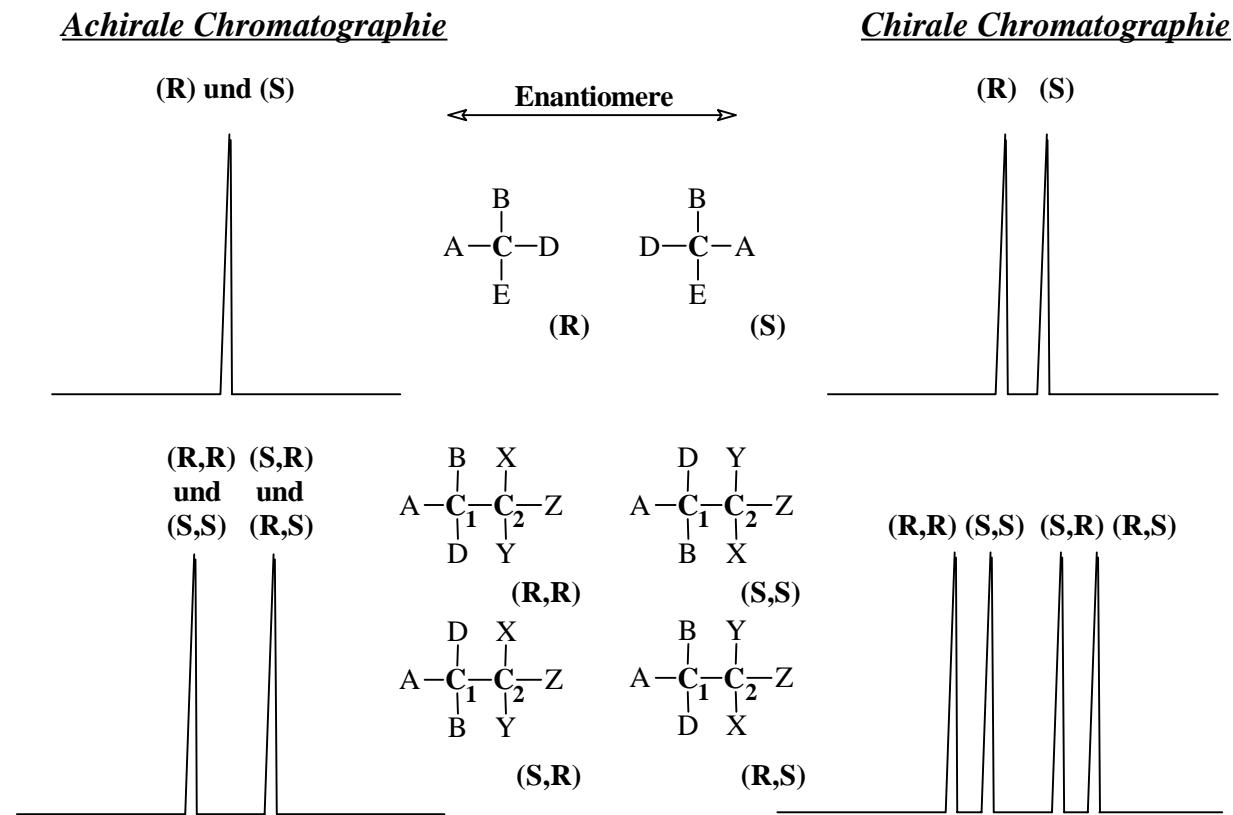
Chiralität oder Händigkeit wird in der Stereochemie (griech. stereos=starr) als Gebiet der Organischen Chemie behandelt, die sich mit Strukturen im dreidimensionalen Raum beschäftigt. Die Stereochemie befaßt sich mit Stereoisomeren, Substanzen mit unterschiedlicher räumlicher Anordnung (Konfiguration) von Atomen um ein stereogenes Zentrum (Chiralitätszentrum, zentrale Chiralität) im Molekül, die nur durch Bindungsspaltung interkonvertieren können. Die molekulare Asymmetrie ist ursächlich in der tetrahedraLEN geometrischen Natur von Atomen wie Kohlenstoff, Schwefel, Phosphor und Stickstoff zu finden, die stereogene Zentren bilden können. Am häufigsten tritt Chiralität infolge asymmetrischer Kohlenstoffatome auf. Darüber hinaus kann das Auftreten von Chiralität auch durch das Vorhandensein von Chiralitätsachsen (axiale Chiralität) oder Chiralitätsebenen (planare Chiralität) verursacht werden.

**Abb.1.** Helicale Chiralität (griech. cheir=Hand) bei der Windungsrichtung des Gehäuses der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*).

Enantiomere (griech. enantion=Gegenteil) sind solche Moleküle, die sich zueinander wie Bild und Spiegelbild verhalten und nicht miteinander zur Deckung zu bringen sind. Sie besitzen identische physikochemische Eigenschaften wie z.B. gleiche Schmelzpunkte, Dichten, IR- und UV-Spektren. Sie sind in ihren chiroptischen Eigenschaften unterscheidbar, wenn es zum Auftreten optischer Aktivität kommt. Diese Fähigkeit einer Drehung der Ebene linear polarisierten Lichts wird in der Polarimetrie genutzt, wobei sich Enantiomere nur durch die Drehrichtung, nicht aber im Betrag der Drehung unterscheiden.

Diastereomere (griech. dia=auseinander) als Stereoisomere wiederum besitzen mehrere stereogene Zentren und kommen dementsprechend als Enantiomere (Spiegelbilder, deckungsgleich) und Diastereomere (Spiegelbilder, nicht deckungsgleich) vor (Abb.2). Da jedes stereogene Zentrum in der einen oder der anderen von 2 möglichen Konfigurationen auftreten kann, gibt es  $2^n$  Stereoisomere für n Chiralitätszentren. Da jedes Stereoisomer ein Enantiomer besitzt, treten  $2^n$  Stereoisomere in Form von  $2^{n-1}$  Paaren von Enantiomeren auf, wobei jedes Enantiomeren-Paar diastereomer zu jedem anderen Paar ist. Die Anzahl der Stereoisomere kann weniger als  $2^n$  betragen, wenn durch immanente Symmetrieelemente ein Stereoisomer achiral ist oder ein Zentrum seine Stereogenität verliert. Ein typischer Fall findet sich bei der Weinsäure. Hier tritt ein Diastereomer als Enantiomeren-Paar auf, während das andere zwei zueinander spiegelbildliche Stereozentren besitzt und damit achiral ist (*meso*-Form). Es resultieren anstelle von 4 nur 3 Stereoisomere.

Diastereomere haben unterschiedliche physikochemischen Eigenschaften und sind so relativ leicht trennbar.



**Abb.2.** Chirale Trennung auf chromatographischen Säulen. Oben: ein Asymmetriezentrum (C-Atom) im Molekül: es treten 2 Stereoisomere auf, die Enantiomere sind, d.h. Spiegelbilder mit identischen physikochemischen Eigenschaften; unten: zwei Asymmetriezentren (C<sub>1</sub>- und C<sub>2</sub>-Atome) im Molekül: es treten maximal 4 Stereoisomere auf, d.h. zwei Diastereomere mit nichtidentischen physikochemischen Eigenschaften, die jeweils als Enantiomeren-Paar vorliegen (nach Wainer, 1987).

### 1.1.2 Nomenklatur

Bei Aminosäuren, Zuckern und verwandten Substanzen sind immer noch die D- und L-Konfigurationszuweisungen der Enantiomere gebräuchlich. Dieses von Emil Fischer eingeführte System leitet diese Zuweisungen von der Konfiguration des Glycerinaldehyds ab. Willkürlich wies er das (+)-Isomer als D-Isomer aus. Die D- und L-Zuweisungen orientieren sich an der Drehrichtung linear polarisierten Lichtes (Natrium d-Linie). Wird dieses Licht nach rechts verschoben, dann erhält das Isomer die D- oder (+)-Zuweisung. Alle natürlich vorkommenden Aminosäuren besitzen beispielsweise die L-Konfiguration.

Aussagen zur absoluten Konfiguration einer chiralen Substanz werden erst mit den (R,S)-Konfigurationszuweisungen nach Cahn, Ingold und Prelog möglich. Mit Hilfe von Sequenzregeln werden die vier Liganden eines jeden Chiralitätszentrums geordnet. Der Ligand mit dem niedrigsten Rang zeigt räumlich nach hinten in den Raum. Wandert das Auge vom Substituenten der höchsten Priorität nach dem mit der zweiten und dann nach dem mit der dritten Priorität in Richtung des Uhrzeigersinns, wird die Konfiguration als (R) bezeichnet. (R) steht als Abkürzung für *rectus* (lat.: rechts oder im Uhrzeigersinn). Die (S)-Konfiguration am chiralen Zentrum steht für *sinister* (lat.: links oder entgegen dem Uhrzeigersinn).

### 1.1.3 Biologische Relevanz

Trotz ihrer identischen physikochemischen Eigenschaften können sich Enantiomere in biologischen Systemen sehr unterschiedlich verhalten. Optisch aktive Substanzen treten als integraler Teil biologischer Systeme fast ausschließlich in einer Enantiomeren-Form auf. So finden sich in allen Lebewesen auf der Erde bis auf wenige Ausnahmen nur L-Aminosäuren und D-Zucker. Die verschiedenenartigen Interaktionen von Enantiomeren mit Enzymen (Pharmakologie, Toxikologie), Rezeptoren (Geruch, Pheromon-Wirkung) und Transportproteinen zeichnen verantwortlich für stereospezifische Unterschiede in ihrer biologischen Aktivität (Tab.1), ihrer Verteilung, ihrem Metabolismus und ihrer Ausscheidung.

Wirkstoff	Stereoisomer	Effekt
Thalidomid	(S)-Isomer (R)-Isomer	fruchtschädigend schlaffördernd, Antinausa
Opiate	(R,S)-Isomer (S,R)-Isomer	Narkotika (Abhängigkeit!) Hustenmittel
Penicillamin	D-Isomer L-Isomer	Antiarthritikum toxisch
Limonen	(R)-Isomer (S)-Isomer	Orangengeruch Lemonengeruch
Aspartam	(R,R)-Isomer (S,R)-Isomer	süßer Geschmack bitterer Geschmack

**Tab.1.** Beispiele chiraler Wirkstoffe und ihrer biologischen Effekte (nach White und Subramanian, 1994)

Bei mehr als der Hälfte der organischen Arzneistoffe, die in der European Pharmacopoeia 1997 enthalten waren, handelt es sich um chirale Substanzen (Roth, 1997). Aus pharmakologischer Sicht unterteilt man die Enantiomere eines Arzneistoffes, die unterschiedliche Wirkung zeigen, in das Eutomer, welches die beabsichtigte Wirkung hervorruft, und das unwirksame bzw. das für unerwünschte Nebenwirkungen verantwortliche Enantiomer, das Distomer. Im Fall der Applikation eines Racemates (äquimolares Enantiomerengemisch), von dem nur ein Enantiomer die erwünschte pharmakologische Wirkung hat, wären also fünfzig Prozent als Verunreinigung (Belastung des biologischen Systems) zu betrachten.

Der Einsatz racemischer Gemische ist dementsprechend unerwünscht und kann wie am Beispiel des Thalidomids verheerende Wirkungen haben (Tab.1). Dieses als Contergan 1956 auf den Markt gebrachte Medikament diente als Schlaf- und Beruhigungsmittel. Da es sich als besonders wirksam gegen die morgendliche Übelkeit von schwangeren Frauen erwies, wurde es bevorzugt von diesen eingenommen. Es kam in mehreren tausend Fällen zu Wachstumsstörungen an den Gliedmaßen ansonsten gesunder Kinder, was auf die Wirkung des (S)-Enantiomers zurückzuführen war (Brunner, 1999). Nur das (R)-Enantiomer hatte die gewünschten therapeutischen Wirkungen.

Es ist deshalb unerlässlich, bei der Bioanalyse chiraler Wirkstoffe oder deren Metaboliten zwischen den Stereoisomeren unterscheiden zu können.

### 1.1.4 Gewinnung von Enantiomeren

Die Erkenntnis differentieller Wirkungen von Xenobiotika-Enantiomeren (Pharmaka, Pestizide, Nahrungs- und Genußmittel, Duft- und Riechstoffe) führte in den entsprechenden Industriezweigen zu einer intensiven Erforschung der Möglichkeiten der Gewinnung von Enantiomeren. Allgemein sind nach Tietze und Eicher (1991) neben der Verwendung optisch reiner Edukte aus der Natur unter anderem folgende Wege beschreitbar:

- ◆ Mechanische Trennung: Dafür sind optimale Bedingungen zur Kristallisation erforderlich. Die erste Enantiomeren-Trennung wird Pasteur zugeschrieben, der 1848 die Kristalle von Natriumammoniumtartrat aufgrund ihrer distinkten kristallinen Erscheinung (rechts- und linkshändig) bei Temperaturen  $<26^{\circ}\text{C}$  manuell sortieren konnte (Brunner, 1999).
- ◆ Biochemische Prozesse: Diese umfassen die Umsetzung prochiraler Verbindungen in biologischen Systemen (Organismen, zellfreie Enzymsysteme oder reine Enzyme), um selektiv ein Enantiomer zu verändern.
- ◆ Differentielle Reaktivität: Der Begriff der asymmetrischen Synthese ist in der Literatur häufig zu finden für Synthesen mit diastereoselektiven Reaktionen (unter Verwendung optisch reiner Hilfsstoffe, die nach Umsetzung wieder abgespalten werden) und enantioselektiven Reaktionen (Umsetzung einer prochiralen Verbindung mit einem optisch aktiven Reagenz, in einem optisch aktiven Lösungsmittel oder mit einem optisch aktiven Katalysator). Traditionell wurden in der chiralen Synthese aus Kostengründen natürliche Quellen genutzt. Neuerdings ist eine Reihe chiraler Agenzien verfügbar, die nicht natürlich gewonnen werden und bei denen daher die Analyse ihrer chiralen Zusammensetzung notwendig wird, um die Industrienormen einer hohen Stoffendproduktreinheit zu erfüllen.
- ◆ Synthese einer racemischen Verbindung mit nachfolgender Racemat-Spaltung.

### 1.1.5 Chirale HPLC und Kapillarelektrophorese-Trennungen

Das Interesse an der Trennung optischer Isomere (chirale Trennung) ist enorm. Die Anwendung chiraler Trenntechniken ist in so unterschiedlichen Gebieten wie der Analyse von Enantiomeren-Verunreinigung in chiralen Katalysatoren und der Produktcharakteristik zur Bestimmung der Enantiomer-Reinheit bei der Synthese racemischer Verbindungen, in der forensischen Analytik, bei der Erfassung des Gehalts von Wirkstoffen und anderen Xenobiotika in biologischen Flüssigkeiten und Geweben zum Drugmonitoring oder zur Bestimmung der relativen Metabolismusraten und der Verteilung individueller Enantiomere in biologischen Systemen anzutreffen.

Dadurch ergibt sich ein Bedarf an leistungsfähigen Methoden zur Enantiomeren-Analytik. Neben der Gaschromatographie ist es die Nutzung verschiedener Trennfunktionen der HPLC und Kapillarelektrophorese, die im Laborbetrieb ihren Platz als Routinetchniken gefunden haben.

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (englisch: High Performance Liquid Chromatography; **HPLC**) ist im Bereich der Spurenanalytik für nichtflüchtige Substanzen bis heute die Methode der Wahl, die mit hoch empfindlichen Detektoren (z.B. Fluoreszenz- und elektrochemische Detektoren, sowie Massenspektrometer) ausgestattet werden kann. Sie wird u.a. zur Routineanalytik von Arzneimitteln genutzt, hat ihre aber noch größere Bedeutung in der Analytik biologischer Proben.

Die Kapillarelektrophorese (CE) bietet gegenüber der HPLC eine Reihe von Vorteilen. So werden sehr hohe Effizienzen erreicht. Das Trennsystem ist automatisierbar und leicht variierbar. Es sind Trennungen erreichbar für polare ionisierte Verbindungen, deren Analyse in der Umkehrphasen-HPLC Probleme bereitet, aber auch für ungeladene Stoffe.

Viele der in der Kapillarelektrophorese verwendeten Mechanismen der chiralen Trennung konnten aus anderen Techniken wie der HPLC übernommen werden.

Die sich in den letzten Jahren rasch entwickelnde High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE) stellt somit eine Ergänzungstechnik zur HPLC dar. Mit der CE sind aber durch ihre systemimmanente photometrische Detektionsschwäche (sehr kurze Lichtwege; 20-100  $\mu\text{m}$ ) keine so geringen Konzentrationen bestimbar wie in der HPLC. Genau diese niedrigen Nachweisgrenzen sind aber für quantitative Aussagen in der Biologie, Medizin und Pharmakologie von großem Wert.

### 1.1.6 Pharmakon Fenoterol

Von therapeutischer Relevanz sind  $\beta_2$ -Adrenozeptor-Agonisten aufgrund ihrer glattmuskulär erschlaffenden Wirkung. Fenoterol (( $\pm$ )-1-(3,5-dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-a-methyl-phenethylamino)-ethanol), Abb.3) wird bei chronischen Atemwegserkrankungen (Asthma bronchiale), zur Erweiterung der Bronchien (Broncholytikum) und zur Erschlaffung der Uterus-Muskulatur bei vorzeitig einsetzenden Wehen (Tocolytikum) eingesetzt (Forth et al., 1992; Gleiter, 1999). Das chirale Fenoterol kommt therapeutisch als (RR,SS)-Racemat zum Einsatz, ist es doch 9-20fach effektiver als das (RS,SR)-Enantiomerenpaar (Beale und Stephenson, 1972). In Analogie zu anderen direkt wirkenden  $\beta$ -Sympathikomimetika repräsentiert das (RR)-(-)-Enantiomer die pharmakologisch aktive Komponente (Ruffolo, 1991).

Die kennzeichnende Grundstruktur von  $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten besteht in einem mit einer Ethylaminogruppe substituierten Benzenring, wie er auch bei den natürlich vorkommenden sympathischen Neurotransmittern Adrenalin und Noradrenalin anzutreffen ist. Wie auch das wirksamere synthetische Äquivalent Isoprenalin zeigt Adrenalin eine unselektive Stimulierung von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren. Um die unerwünschten Nebeneffekte bei Stimulierung von  $\beta_1$ -Sympathikomimetika am Herzen (Erhöhung der Herzschlagfrequenz und des Pumpvolumens) zu vermeiden, wurde die Gruppe der  $\beta_2$ -Sympathikomimetika entwickelt. Mit der Umwandlung der Catechol- in eine Resorcinol-Struktur und der Einführung sperriger Aminosubstituenten (tertiäre Butylgruppe bei Salbutamol und Terbutalin sowie *p*-Hydroxyphenyl-Isopropylrest bei Fenoterol) kommt es zu einer  $\beta_2$ -Rezeptor-Spezifität (Hochhaus und Möllmann, 1992). In-vitro-Vergleiche verschiedener  $\beta_2$ -Sympathikomimetika an isolierten Meerschwein-Herzen ( $\beta_1$ -Adrenozeptoren) und -tracheen ( $\beta_2$ -Adrenozeptoren) zeigten zum Beispiel, daß Isoproterenol gleiche Affinität zu  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Adrenozeptoren besitzt, Orciprenalin schon selektiver für  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, Fenoterol (dem 4-hydroxyphenyl-Derivat von Orciprenalin) aber 59fach und Salbutamol 107fach selektiver

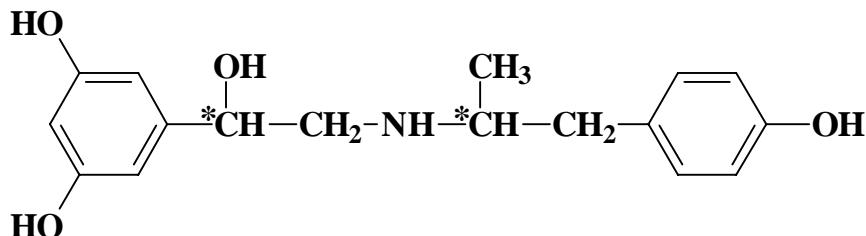


Abb.3. Strukturformel des Fenoterols. \* Chiralitätszentren.

für  $\beta_2$ -Adrenozeptoren ist. Heute scheint die Entwicklung in Richtung hydrophober  $\beta_2$ -Sympathikomimetika wie Formoterol, Salmeterol und Bambuterol mit länger anhaltender Wirkung zu gehen (Handley et al., 1998).

Im Vergleich zu Parasympathikolytika, Theophyllin und Glucocorticosteroiden (z.B. fördert Cortisol die Bildung von Dopa aus Tyrosin (Tyrosinhydroxylase-Aktivität) und Adrenalin aus Noradrenalin (Phenylethanolamin-N-Methyl-Transferase-Aktivität)) als therapeutischen Mitteln besitzen Sympathikomimetika den Vorteil der sofortigen Wirkungsentfaltung, was bei Erkrankungen der Luftwege lebenserhaltend sein kann.

Das geklonte menschliche  $\beta_2$ -Adrenozeptor-Gen auf Chromosom 5 kodiert ein Protein, das aus 413 Aminosäuren besteht (wobei nur 54 % auch bei  $\beta_1$ -Adrenozeptoren vorzufinden sind).  $\beta_2$ -Adrenozeptoren gehören einer Rezeptor-Superfamilie an, die durch das Auftreten von 7 lipophilen Transmembrandomänen charakterisiert ist. Die Agonisten passen sich in eine Lücke zwischen den Transmembransegmenten des Rezeptors ein und interagieren mit den Transmembran-Helices II und IV. Das intrazelluläre Segment wiederum interagiert mit einem G-Protein (stimulierendes guaninnukleotidbindendes Protein), welches die Verbindung von Rezeptoraktivierung zur Adenylylcyclase herstellt. Über die Wirkung von cAMP wird die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Steigerung des Efflux in den Extrazellularraum und wahrscheinlich auch durch Hemmung der Aufnahme sowie durch Aktivierung der endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase gesenkt. Die Folge ist ein verminderter Phosphorylierungsgrad des Leichtketten-Myosins; die glatte Muskulatur (vaskular, gastrointestinal, bronchial und tracheal sowie genitourinal) erschlafft.

Am Cardiomyozyten, an der glatten Muskelzelle und Skelettmuskelzelle steigern  $\beta_2$ -Sympathikomimetika, über cAMP-abhängige Proteinkinasen vermittelt, die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Die Folge ist ein erhöhter  $\text{Na}^+$ -Gradient, der über einen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch die cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermindert. Dies wirkt an Herz- und glatter Muskelzelle zusätzlich erschlaffend. Der gleiche Effekt an der Skelettmuskulatur führt wegen deren großer Masse zu Hypokaliämie (Forth et al., 1992). Die metabolischen Folgereaktionen einer Stimulierung von  $\beta_2$ -Sympathikomimetika in anderen Zellen (gesteigerte Lipolyse und Glykoneogenese) sind letztlich Ausdruck einer  $\beta$ -sympathomimetisch induzierten Bereitstellung chemischer Energie.

### 1.1.7 Analyt Fenoterol

In der Fachliteratur finden sich nur in begrenztem Rahmen pharmakokinetische Informationen, hauptsächlich aufgrund der geringen therapeutischen Konzentrationen von unter 300 pg/mL, die in der Humanmedizin zum Einsatz kommen (Leferink et al., 1982).

Bis heute ist der von Rominger et al. (1990) entwickelte **Radioimmuntest (RIA)** zur Bestimmung der Konzentration von rac. Fenoterol in biologischen Proben von bis zu 10 pg/mL die nachweisempfindlichste Methode.

Darüber hinaus gibt es noch einige Arbeiten zur Erfassung von Fenoterol mit massenspektrometrischer Detektion gekoppelt mit **Gaschromatographie (GC)** (Leferink et al., 1982; Brandts et al., 1982; Leyssens et al., 1991; Montrade et al., 1993; André et al., 1994; Couper und Brunner, 1996; Russo und Neri, 1997; Montrade et al., 1997; Ternes et al., 1998; Black und Hansson, 1999; Bakhtiar, 1999), **superkritischer Fluid-Chromatographie (SFC)** (Jones et al., 1999) und **HPLC** (Doerge et al., 1995, Ternes et al., 1998).

Achirale Methoden zur Fenoterol-Erfassung in der HPLC mit elektrochemischer Detektion (Tan und Soldin, 1984; Koster et al., 1985), UV-Detektion (Koster et al., 1986; Ackermans et al., 1992; Jacobson und Peterson, 1994; Hamoir et al., 1994; Polettini et al., 1995; Basly und Bernard, 1997; Hanna et al., 1998) und Fluoreszenzdetektion (Kuhlmann, 1998; Kramer und Blaschke, 2001) sind zahlreich.

Im Gegensatz dazu sind stereoselektive Methoden zu Erfassung der (RR,SS)-Enantiomere des Fenoterols erst in jüngerer Zeit in den Applikationslisten einiger Firmen zu finden. Die Firma Astec Inc. entwickelte eine Säule, bei der das Antibiotikum Vancomycin an Kieselgel gebunden ist (Chirobiotic V; Beesley, 1999), bei der von Chromtech Inc. angebotenen Säule handelt es sich um das Cellobiohydrolase-Enzym gebunden an Kieselgel (Chiral-CBH; Hermansson, 2001).

In der **Kapillarelektrophorese (CE)** wurden mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und Isotachophorese (Ackermans et al., 1992) sowie micellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) (Hanna et al., 1998) die Racemate des Fenoterols erfaßbar. Durch den Einsatz chiraler Selektoren gelang auch die Enantiomeren-Trennung (anionisches Cyclodextrin (CD)-Derivat Sulfobutylether- $\beta$ -CD und  $\gamma$ -CD-Phosphat, Tanaka et al., 1996; AGP, Tanaka und Terabe, 1997; HP- $\beta$ -CD immobilisiert in PEG-Gel, de Boer et al., 1999).

### 1.1.8 Derivatisierungstarget Fenoterol

Chirale Trenntechniken lassen sich formal in zwei Gruppen teilen:

- ◆ Trennung der Enantiomere auf einer chiralen stationären Phase (CSP) oder auf achiralen Phasen mit chiralen Additiva in der mobilen Phase durch **temporäre Diastereomerengbildung** und
- ◆ Trennung der nach Synthese mit einem anderen Enantiomer durch Einführung eines weiteren Chiralitätszentrums entstandenen **stabilen Diastereomere** auf achiralen Phasen.

Für Studien der Arzneistoff-Wirkung in biologischen Systemen sind hochempfindliche Trennverfahren notwendig, die den spurenanalytischen Nachweis der Substanzen erlauben.

Die Detektierbarkeit von Substanzen kann durch Vor- oder Nachsäulen-Derivatisierung verbessert werden. Bei der Nachsäulenderivatisierung wird in der HPLC das Eluat einer Säule vor dem Eintritt in den Detektor mit einer Lösung des Derivatisierungsreagenzes durch Zupumpen gemischt. Das erfordert eine schnelle und quantitative Reaktion, um eine durch Verdünnungseffekte hervorgerufene Peakverbreiterung und damit Verschlechterung der Trennleistung zu vermeiden (Wintersteiger, 1988).

Zu Trennmethoden, die auf indirekter Trennung von Enantiomeren durch Vorsäulenderivatisierung, d.h. der Derivatisierung vor dem chromatographischen Prozeß mit chiralen Reagenzien beruhen, sind mehrfach Übersichtsartikel veröffentlicht worden (Ahnhoff und Einarssen, 1989; Skidmore, 1993). Aber auch der Einsatz achiraler Reagenzien erfordert das Vorhandensein derivatisierbarer Gruppen. Zahlreiche Reagenzien stehen zur Umsetzung an den hauptsächlich in Wirkstoffen gefundenen Amino-, Hydroxyl- und Carboxylgruppen zur Verfügung (Imai und Toyo'oka, 1988; Nocter, 1994; Bardelmeijer et al., 1998).

Fenoterol und andere Aminoalkohole als bifunktionale Substanzen besitzen mit der Aminogruppe eine leicht zu derivatisierende Gruppe.

Fluorogene achirale und chirale Vertreter der hohe Reaktivität aufweisenden Derivatisierungsreagenzienklassen der Chloroformate und Isocyanate wurden für die stereoselektive und sensitive Detektion von Fenoterol nach Vorsäulenderivatisierung ausgewählt.

## 1.2 Pharmakokinetische Modelle

Die in der Pharmakologie behandelten Wechselwirkungen zwischen körperfremden Stoffen (Pharmaka, Wirkstoffe) und Organismen (biologische Systeme) lassen sich je nach Gesichtspunkt in zwei Aspekte aufschlüsseln. Während die Einflüsse des Pharmakons auf den Organismus unter dem Begriff **Pharmakodynamik** zusammengefaßt werden, beschreibt die **Pharmakokinetik**, wie das biologische System mit dem Wirkstoff umgeht (Forth et al., 1992).

Mit Hilfe verschiedener pharmakokinetischer Modelle wird versucht, die vielfältigen und komplexen Funktionen des Organismus in einer vereinfachten Form darzustellen und so einer kinetischen Betrachtungsweise zugänglich zu machen. Die Darstellung des Körpers erfolgt dabei im Sinne unterschiedlicher hypothetischer Verteilungsräume (**Verteilungsvolumen, V**) mit verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweberäumen (Rietbrock und Weiss, 1996; Gugeler und Klotz, 2000).

Das Verteilungsvolumen ist eine hypothetische Größe, um physiologische Verteilungsvorgänge von Pharmaka einer mathematischen Beschreibung und Berechnung zugänglich zu machen (Klotz, 1984). Das scheinbare Verteilungsvolumen eines Wirkstoffs vermittelt als Proportionalitätskonstante den Zusammenhang zwischen der im Körper vorhandenen Menge und der gemessenen Plasmakonzentration.

Das Verteilungsvolumen ist das Volumen, in dem sich die Wirkstoffmenge verteilen müßte, um diese Konzentration zu erzeugen. Daraus ergibt sich die fiktive Natur dieser Größe. Aufgrund der Dynamik der Verteilung im Körper ist V eine Funktion der Zeit.

Konstante Werte werden nach Bolusinjektion nur in der terminalen Gleichgewichtsphase der Verteilung erreicht, in der  $A(t)$  und  $c(t)$  exponentiell mit der gleichen Abklingkonstanten abfallen, so daß  $V_z$  (terminales Verteilungsvolumen) konstant bleibt:

$$V_z = A(t)/c(t)$$

und im stationären Zustand nach Dauerinfusion (steady state-Verteilungsvolumen  $V_{ss}$ ), da im steady state die Menge im Körper ( $A_{ss}$ ) und die Konzentration ( $c_{ss}$ ) zeitlich konstant sind:

$$V_{ss} = A_{ss}/c_{ss}$$

Das Verteilungsvolumen  $V_{ss}$  ist durch das Blutvolumen  $V_b$ , die Organvolumina  $V_i$  und die Gewebe-Plasma-Verteilungskoeffizienten  $k_i$  bestimmt:

$$V_{ss} = V_b + \sum_i k_i V_i$$

So wird bei einem Wirkstoff, der stark an Blutbestandteile bindet, V klein, während ein großes V meist dann vorliegt, wenn diese Bindung gering ist. V ergibt sich aus dem Produkt der Flußrate (Q) des Blutes und der **mittleren Transitzzeit (MTT)**:

$$V = MTT \cdot Q$$

Die mittlere Verweildauer drückt die Zeit aus, in der im statistischen Mittel die Wirkstoffmoleküle im Körper verweilen.

Die MTT kann bei beliebiger Applikationsart aus der Konzentrations-Zeit-Kurve berechnet werden:

$$MTT = AUMC/AUC$$

AUMC wird auch als 1. Kurvenmoment bezeichnet und ist definiert als die Fläche unter der Momentkurve  $tc(t)$

$$AUMC = \int_0^{\infty} c(t) dt$$

MTT ist modellunabhängig. Die statistische Definition der mittleren Verweildauer wird verständlich, wenn man hypothetisch nur eine kleine Zahl von Molekülen betrachtet. Werden z.B. 10 Moleküle appliziert und besitzt jedes Molekül eine zufällige Verweilzeit  $t_i$ , dann wäre die mittlere Verweildauer:

$$MTT = (t_1+t_2+t_3+\dots+t_{10})/10$$

Sowohl die mittlere Verweildauer (MTT) als auch die Varianz (VTT) stellen die wichtigsten Maßzahlen der Verweilzeitverteilung dar (Weiss, 1990). Das Quadrat des Variationskoeffizienten ( $CV^2$ ) wird als relative Dispersion bezeichnet und ist als Streuungsmaß von Bedeutung (Weiss, 1990, 1997):

$$CV^2 = VTT/MTT^2$$

Die zur Berechnung der pharmakokinetischen Grundparameter benötigten modellunabhängigen Größen AUC und AUMC können im Prinzip durch numerische Integration berechnet werden (**Trapezregel**).

Das Konzentrations-Zeit-Profil besteht aus Konzentrationsmeßwerten  $c_i$  ( $i=1,2,\dots,n$ ), die zu den Zeitpunkten  $t_i$  gemessen werden, d.h.  $c_i=c(t_i)$ . Dabei sei  $t_1$  der Zeitpunkt der ersten und  $t_n$  der letzten Probenahme. Für Trapeze zwischen zwei aufeinanderfolgenden Punkten  $t_i$  und  $t_{i+1}$  gilt:

$$AUC_{t_i,t_{i+1}} = 1/2(c_i+c_{i+1})(t_{i+1}-t_i)$$

woraus man die Fläche unter der Kurve von  $t_1$  bis  $t_n$  erhält:

$$AUC_{0,t_n} = \sum_{i=1}^{n-1} 1/2(c_i + c_{i+1})(t_{i+1} - t_i)$$

Man erhält die Restfläche unter der Kurve von  $t_n$  bis  $\infty$  z.B. aus der terminalen Dispositionskonstanten  $\lambda_z$  und damit die  $AUC_{0,\infty}=AUC$ :

$$AUC = AUC_{0,t_n} + c_n/\lambda_z$$

Für AUMC gilt entsprechend:

$$AUMC_{0,t_n} = \sum_{i=1}^{n-1} 1/2(c_i t_i + c_{i+1} t_{i+1})(t_{i+1} - t_i) + c_n (t_n / \lambda + 1 / \lambda z^2)$$

Die terminale Dispositionskonstante  $\lambda_z$  wird durch lineare Regression zwischen den logarithmisch transformierten Konzentrationen und der Zeit bestimmt. Man nimmt dazu mindestens die drei letzten Konzentrations-Zeit-Werte (über dem Detektionslimit der Analytik für die Konzentrationsbestimmungen).

Es gibt Computerprogramme, die diese Arbeit erledigen. Gleichzeitig können solche Computerprogramme die Dispositionskurven an bestimmte Funktionen mittels nichtlinearer Regression anpassen, d.h. die Parameter der Funktion abschätzen.

Bei einem Einkompartimentmodell wird der Körper als ein einziges Kompartiment mit dem Verteilungsvolumen  $V$  behandelt, in dem sich der Wirkstoff nach Bolusinjektion augenblicklich verteilt und dabei die Initialkonzentration  $c_0$  erzeugt. Die Konzentration fällt dann monoexponentiell ab. Obwohl das in den meisten Fällen eine unzulässige Vereinfachung darstellt, da es den Einfluß der Verteilung im Körper auf die Form der Dispositionskurve völlig vernachlässigt, wird dieses Modell wegen seiner einfachen Beschreibung oft angewendet.

Für die **monoexponentielle Dispositionskurve** im Falle des Einkompartimentsystems gilt also:

$$c(t) = c_0 \exp(-\lambda t)$$

Generell entspricht die Anzahl der Kompartimente der Anzahl der Exponentialterme in den beobachteten Dispositionskurven. Letztlich ist das Kompartimentkonzept nur ein theoretisches Hilfsmittel zur Charakterisierung der Verteilungsdynamik; deshalb könnte man anstelle von Ein- und Mehrkompartimentmodellen auch von Modellen mit augenblicklicher und verzögter Einstellung der Gleichgewichtsverteilung sprechen.

Monoton fallende Dispositionskurven nach Bolusinjektion lassen sich durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschreiben:

$$c(t) = \sum_{i=1}^n B_i \exp(-\lambda_i t)$$

In den meisten Fällen ist der Vorgang schon mit einer **Biexponentialfunktion**:

$$c(t) = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t), \alpha > \beta,$$

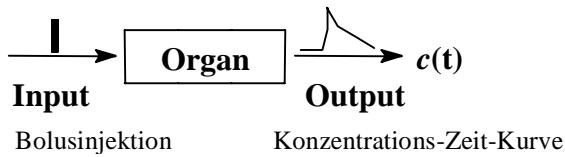
ausreichend charakterisiert, weshalb diese Funktion als Standardfunktion für die Auswertung von Dispositionskurven gilt. Dabei ist die Abklingkonstante  $\lambda_z = \beta$  und die Halbwertszeit  $t_{1/2,z} = 0,693/\beta$ . Die terminale Phase wird deshalb auch als  $\beta$ -Phase bezeichnet.

Über die Optimierung der Modellierungen für einzelne Organe (**Organmodell**) soll der Körper als Gesamtheit besser verstanden werden. Die experimentelle Grundlage auf diesem Weg bilden neben Arbeiten mit Zellkulturen häufig perfundierte Organe. Diese sind entweder ganz vom Körper isoliert (isoliert perfundierte Organe) oder aber, im Körper verbleibend, nur von zu- und ableitenden Gefäßen getrennt (*in situ*-perfundierte Organe). Die Flußraten (Q) des Perfusats durch die Organe, die zu verabreichende Dosis (D) und der resultierende Konzentrations-Zeit-Verlauf  $c(t)$  lassen sich so einfach kontrollieren (Abb. 4).



**Abb.4.** Schematische Darstellung der theoretischen Grundlagen für perfundierte Organe.

Die verschiedenen Organmodelle versuchen die Ereignisse zwischen dem Verabreichen einer definierten Dosis (Bolusinjektion; Input) und dem zu messenden Output  $c(t)$  zu modellieren (Abb. 5). Die Modelle unterscheiden sich dabei in der Vorstellung des zu untersuchenden Systems und der daraus resultierenden mathematischen Umsetzung.



**Abb.5.** Grundlagen der Organmodelle.

Von einfachen Modellen ausgehend wurden immer komplexere entwickelt, die die Abläufe im Körper zunehmend besser beschreiben. Das „well-stirred“- Einkompartimentmodell geht davon aus, daß es zu einer sofortigen Verteilung des Wirkstoffs im Kompartiment kommt, was als Vereinfachung unzulässig ist. Im Lebermodell der „parallelen Röhren“ wird dem Konzentrationsgefälle innerhalb der Sinusoïden, die wiederum aus einschichtigen Hepatozyten umgeben sind, Rechnung getragen. Der Konzentrationsausgleich auch zwischen den Sinusoïden schließlich fließt im Dispersionsmodell mit ein. Um Hepatozyten-Bindungsstellen, die für das nichtsteroidale Antiphlogistikum Diclofenac gefunden worden sind (Kuhlmann, 1998), einer mathematischen Beschreibung zugänglich zu machen, wurde das Bindungsmodell (Weiss et al., 1998) entwickelt, das sich an der perfundiert isolierten Leber als Organmodell als vorteilhaft erwiesen hat.

Für das chiral vorliegende  $\beta_2$ -Sympathikomimetikum Fenoterol sollte eine sensitive Analytik etabliert werden, die es erlaubt, pharmakokinetische Untersuchungen in einem stereoselektiven Kontext durchführen zu können. Die Entwicklung dieser Methode war dabei primär auf eine experimentelle Anwendung am isoliert-perfundierten Rattenherz ausgerichtet. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit der Analyse in Plasmaproben zu geplanten Untersuchungen der plazentalen Enantiomeren-Verteilung aufgezeigt werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Geräte und Zubehör

- ◆ Hochleistungsflüssigchromatographie-System Spectra-Physics (TSP, Darmstadt-Kranichstein): P2000-Pumpe, UV3000/FOCUS/SM5000-UV/Vis-Detektor, FL2000-Fluoreszenz-Detektor, AS 1000-Autosampler und Injektionsventil 7010 (Rheodyne, Cotati, USA) mit 20 bzw. 100  $\mu$ L Probenschleife  
Handinjektionsventil 7125 (Rheodyne, Cotati, USA) und L-6200-Pumpe (Merck, Darmstadt)  
Datenaufnahme: PC 1000 Software System Version 3.0 (TSP, Darmstadt-Kraichstein)
- ◆ Hochleistungsflüssigchromatographie-System LaChrom (Merck, Darmstadt): L-7100-Pumpe, L-7450-Diodenarray-Detektor und L-7250-Autosampler sowie polarimetrischer Detektor Chiralyser (IBZ Meßtechnik, Hannover)
- ◆ Hochleistungsflüssigchromatographie-System Merck (Merck, Darmstadt): 655A-11 Liquid Chromatograph, L-5000-LC Controller, variabler UV-Monitor 655A-23 und Injektionsventil 7161 (Rheodyne, Cotati, USA) mit 20 bzw. 100- $\mu$ L Probeschleifen  
Datenaufnahme: D-2500 Chromato-Integrator (Merck, Darmstadt)
- ◆ ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer ESQUIRE-LC (Bruker Daltonik, Bremen)
- ◆ Kapillarelektrophorese-System HP 3D CE (Hewlett-Packard, Waldbronn)  
Datenaufnahme: HP 3D CE ChemStation Software (Hewlett-Packard, Waldbronn)
- ◆ UV/Vis-Spektrophotometer Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England)
- ◆ Ultraschallbad RK 52 (Bandelin Electronic, Berlin)
- ◆ Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen)
- ◆ Membranpumpe CVC 24 (Vacuubrand, Wertheim) und Rotationsverdampfersystem Heidolph mit VV 2000 und WB 2000 (Heidolph, Schwabach)
- ◆ Verdampfungssystem UniEquip: Univac DO 4-Vacuumpumpe, Univapo 150H-Zentrifuge und Unicryo MC 2L-Thermostat (UniEquip, Martinsried)
- ◆ Säulenthermostat Jetstream 2 (WO Industrial Electronics, Österreich)
- ◆ Festphasenextraktions-Säulenprozessor SPE 12-G (J.T.Baker, Griesheim)
- ◆ pH-Meßgerät 538 (WTW, Weilheim)
- ◆ Vortexer REAX 2000 (Heidolph, Schwabach)
- ◆ Reinstwasseranlage SERALPUR Pro 90 CN (Seral, Ransbach-Baumbach)

#### **Kapillare**

- ◆ unbeschichtete CElect-FS50 CE Column 50  $\mu$ m i.D., 363  $\mu$ m ä.D. (Supelco, Bellefonte, USA)

#### **HPLC-Säulen und Zubehör**

- ◆ Chiralcel OD-RH-Edelstahlsäule 15 cm  $\times$  0,46 cm i.D.; 5  $\mu$ m (Daicel Chemical Industries, Tokyo, Japan)
- ◆ Chiralcel OJ-R-Edelstahlsäule 15 cm  $\times$  0,46 cm i.D.; 5  $\mu$ m (Daicel Chemical Industries, Tokyo, Japan)
- ◆ Serva Chiral-Si100  $\beta$ -Cyclodextrin-Edelstahlsäule 25 cm  $\times$  0,46 cm i.D.; 5  $\mu$ m (Serva, Heidelberg)

- ◆ Serva Chiral-Si100  $\gamma$ -Cyclodextrin-Edelstahlsäule 25 cm  $\times$  0,46 cm i.D.; 5  $\mu$ m (Serva, Heidelberg)
- ◆ Serva RP-18-Edelstahlsäule 25 cm  $\times$  0,46 cm i.D.; 5  $\mu$ m (Serva, Heidelberg)
- ◆ LiChrospher 100 RP-18-Edelstahlsäule 125 cm  $\times$  0,4 cm i.D.; 5  $\mu$ m (Merck, Darmstadt)
- ◆ LiChrospher RP-Select B-Edelstahlsäule 125 cm  $\times$  0,4 cm i.D.; 5  $\mu$ m (Merck, Darmstadt)
- ◆ LiChroCART 125-4 (Merck, Darmstadt)
- ◆ LiChrospher 100 RP-18-Vorsäulen, 5  $\mu$ m (Merck, Darmstadt)

## **2.2 Chemikalien**

2-Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (Cyclolab, Budapest, Hungarn)  
2,3,6-*tri*-O-Methyl- $\beta$ -CD (Cyclolab, Budapest, Hungarn)  
2,6-*di*-O-Methyl- $\beta$ -CD (Cyclolab, Budapest, Hungarn)  
Acetonitril gradient grade (Merck, Darmstadt)  
 $\beta$ -CD (Cyclolab, Budapest, Hungarn)  
 $\beta$ -CD-phosphat (Cyclolab, Budapest, Hungarn)  
Bis(2-ethylhexyl)phosphat (Merck, Darmstadt)  
BSA-Standard (Pierce, Rockford, USA)  
Buphenin (Sigma, Deisenhofen)  
carboxymethyliertes  $\beta$ -CD (Cyclolab, Budapest, Hungarn)  
Chloroform (Labscan, Dublin, Irland)  
Coomassie Brilliant Blau G 250 (Serva, Heidelberg)  
Dimethylformamid (Labscan, Dublin, Irland)  
Ephedrin (Sigma, Deisenhofen)  
Epinephrin (Sigma, Deisenhofen)  
Ethanol (Roth, Karlsruhe)  
Etilefrin (Sigma, Deisenhofen)  
Fenoterol (Sigma, Deisenhofen)  
 $\gamma$ -CD (Merck, Darmstadt)  
Isoprenalin (Sigma, Deisenhofen)  
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)  
Kaliumhexafluorophosphat (Fluka, Buchs, Schweiz)  
Methanol gradient grade (Merck, Darmstadt)  
Methoxamin (Sigma, Deisenhofen)  
Naphthylisocyanat (Aldrich, Deisenhofen)  
Natriumcholat (Sigma, Deisenhofen)  
Natriumdeoxycholat (Sigma, Deisenhofen)  
Natriumdodecylsulphat (Serva, Heidelberg)  
Natriumtaurocholat (Sigma, Deisenhofen)  
Natriumtaurodeoxycholat (Sigma, Deisenhofen)  
Norephedrin (EGA Chemie, Steinheim)  
Octopamin (Sigma, Deisenhofen)  
Orciprenalin (Sigma, Deisenhofen)  
*p*-Hydroxyephedrin (Sigma, Deisenhofen)  
Phosphorsäure 85% ig (Laborchemie, Apolda)  
Ritodrin (Sigma, Deisenhofen)  
(S)-(+)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat (Aldrich, Deisenhofen)  
Triethylamin (Serva, Heidelberg)  
Wasser (bidestilliert)

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 HPCE**

Die Versuche wurden mit einem Hewlett Packard HP 3D-CE System mit Diodenarray-Detektor und Auswerteprogramm Chemstation durchgeführt. Die Kapillare wurde mittels Luftkühlsystem (Peltier-Element) auf einer konstanten Temperatur von 20°C gehalten. Der Probenteller wurde mittels Wasserkühlung auf 15-17°C temperiert.

Die Analyte wurden in destilliertem Reinstwasser gelöst und mit einem Druck von 50 mbar für 3 sek in die Kapillare injiziert. Die anschließende Analyse erfolgte in einer unbeschichteten SUPELCO CElect FS 50 CE-Kapillare (totale Länge 64,5 cm, effektive Länge 56 cm, 363  $\mu$ m ä.D., 50  $\mu$ m i.D.) bei 30 kV positiver Polarität, bei Verwendung anionischer Cyclodextrine auch bei negativer Polarität.

Die Kapillare wurde vom Meter zugeschnitten, die äußere Polyimid-Schicht an den Enden und an der Stelle des Detektorfensters mit einem Feuerzeug abgebrannt und mit einem methanolgetränkten Tuch entfernt.

Vor der erstmaligen Verwendung wurde die unbeschichtete Kapillare je 5 min mit MeOH, Reinstwasser, Natriumhydroxid (1 M) und wiederum Reinstwasser gespült. Die Konditionierung der Kapillare vor den Läufen bestand in einer Spülung 5 min mit Phosphorsäure (0,1 M) und 10 min mit dem entsprechenden Hintergrundeletktolyten (BGE). Nach jedem Arbeitstag wurde die Kapillare jeweils 5 min mit Phosphorsäure (0,1 M) und Reinstwasser gespült.

Die Elektropherogramme wurden mit UV-Detektion bei 200 nm aufgenommen.

Die verschiedenen BGE wurden mit Reinstwasser hergestellt, vor der Verwendung filtriert und 1 min mit Helium ent gast.

Es wurden mittels Software automatisch Migrationszeiten und über die Migrationszeiten korrigierte Flächen und Breiten der Peaks bestimmt, Trennfaktoren zwischen den Peaks berechnet und die Stromstärke während der Analysen erfaßt. Die Einstellung des pH-Wertes der BGE erfolgte mit verdünnter Phosphorsäure- bzw. Kaliumhydroxid-Lösung.

### **2.3.2 HPLC**

#### **2.3.2.1 Chromatographische Systeme**

Für die Quantifizierung der Wirkstoffpeaks bei HPLC-Chromatogrammen wurden die Peakflächen herangezogen. Der Selektivitätsfaktor ( $\alpha$ ) wurde wie folgt berechnet:  $\alpha=k_2/k_1$ , wobei  $k_1$  und  $k_2$  für die Kapazitätsfaktoren der zuerst bzw. danach eluierenden Peaks stehen. Die Kapazitätsfaktoren ( $k$ ) wurden wie folgt berechnet:  $k'=(t_R-t_0)/t_0$ . Dabei entspricht  $t_R$  der Elutionszeit des Wirkstoffpeaks und  $t_0$  der Totzeit, die für den Peak der Lösungsmittelfront bestimmt wurde. Der Trennfaktor ( $R$ ) wurde berechnet mit Hilfe der Formel  $R=2(t_2-t_1)/(w_1+w_2)$ . Dabei entsprechen  $w_1$  und  $w_2$  den Peakbreiten auf Höhe der Basislinie für den zuerst bzw. danach eluierenden Peak.

##### **2.3.2.1.1 Achirale Fenoterol-Bestimmung**

System:	LiChrograph (Merck) mit D-2500 Chromato-Integrator
Mobile Phase:	Natriumacetat (30 mM)/MeCN: 70/30 (v/v)
Flußrate:	1 mL/min
Säule:	Serva RP-18 (25 cm $\times$ 0,46 cm i.D.; 5 $\mu$ m)

Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm)  
UV-Detektion: 274 nm

### 2.3.2.1.2 Achirale Fenoterol-Bestimmung als FMOC-Derivat

Für Untersuchungen verschiedener Trennfunktionen zur chiralen Trennung wurde der FMOC-Fenoterol-Peak gesammelt (10 HPLC-Läufe bei einer Derivatisierungskonzentration von 1 mg/mL Fenoterol und 100 µL-Probeinjektionen), vereinigt und eingeengt.

System: LiChrograph (Merck) mit D-2500 Chromato-Integrator  
Mobile Phase: MeCN  
Flußrate: 1 mL/min  
Säule: Serva RP-18 (25 cm × 0,46 cm i.D.; 5 µm)  
Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm)  
UV-Detektion: 230 nm

### 2.3.2.1.3 Achirale Fenoterol-Bestimmung als NIC-Derivat

Für Untersuchungen verschiedener Trennfunktionen zur chiralen Trennbarkeit und zur Aufnahme von Fluoresenzspektren wurde der NIC-Fenoterol-Peak gesammelt (10 HPLC-Läufe bei einer Derivatisierungskonzentration von 1 mg/mL Fenoterol und 100 µL-Probeinjektionen), vereinigt und eingeengt. Es wurden relative Aussagen zu den Konzentrationen des NIC-Fenoterol-Derivates über die Absorptionsdaten bei 230 nm UV-Detektion gemacht.

System: LiChrograph (Merck) mit D-2500 Chromato-Integrator  
Mobile Phase: MeCN/Wasser: 40/60 (v/v)  
Flußrate: 1 mL/min  
Säule: Serva RP-18 (25 cm × 0,46 cm i.D.; 5 µm)  
Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm)  
UV-Detektion: 230 nm

### 2.3.2.1.4 Chirale Fenoterol-Bestimmung als NEIC-Derivate

System: Spectra-Physics  
Mobile Phase: MeOH/Wasser: 55/45 (v/v)  
Flußrate: 1,5 mL/min  
Säule: Serva RP-18 (25 cm × 0,46 cm i.D.; 5 µm)  
Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5µm)  
UV-Detektion: 220 nm  
FL-Detektion:  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 236/384

### 2.3.2.1.5 Chirale Aminoalkohol-Bestimmung als NIC-Derivate

#### Fluoreszenzdetektion

System:	Spectra-Physics
Mobile Phase:	MeCN/wäßrige Phosphorsäure (3,5 mM)-Gemische
Flußrate:	0,5 mL/min
Säule:	Chiralcel OD-RH (15 cm × 0,46 cm i.D.; 5 µm)
Vorsäule:	LiChrospher 100 RP-18 (5µm)
UV-Detektion:	220 nm
FL-Detektion:	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 262/364 Bandweite des Excitationsmonochromators: 30 nm Bandweite des Emissionsmonochromators: 30 nm Bandweite des Photonenvervielfachers: 30 nm

#### Polarimetrische Detektion

Für polarimetrische Untersuchungen wurden die Substanzen wie zur Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse der NIC-Derivate des Fenoterol behandelt (2.3.2.5.6). Nach Trocknung wurde der Niederschlag in 1 mL mobiler Phase gelöst. Nach einem Verdünnungsschritt (1:10 mit der mobilen Phase) wurden 100 µL dem Chromatographen zugeführt.

System:	Merck LaChrom
Mobile Phasen:	MeCN/wäßrige Phosphorsäure (3,5 mM)-Gemische
Flußrate:	0,5 mL/min
Säule:	Chiralcel OD-RH (15 cm × 0,46 cm i.D.; 5 µm)
Vorsäule:	LiChrospher 100 RP-18 (5µm)
UV-Detektion:	220 nm

#### Säulenschalten

Die Elution der NIC-Derivate von Säule 1 kann am UV-Detektor bei 220 nm verfolgt werden. Über eine manuelle Schaltung gelangen die Derivate auf Säule 2. Nach Auftrennung werden die Enantiomer-Derivat-Signale mittels Fluoreszenzdetektor erfaßt. Zur Bestimmung der Detektionsgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3 für die NIC-Derivate des Fenoterols verwendet.

System:	Spectra-Physics und Merck-Pumpe
Mobile Phasen:	MeCN/wäßrige Phosphorsäure (3,5 mM)-Gemische
Flußrate:	0,5 mL/min
Säule 1:	LiChrospher RP-Select B (125 cm × 0,4 cm i.D.; 5 µm)
Vorsäule 1:	LiChrospher 100 RP-18 (5µm)
Säule 2:	Chiralcel OD-RH (15 cm × 0,46 cm i.D.; 5 µm) Thermostat: 25°C
Vorsäule 2:	LiChrospher 100 RP-18 (5µm)
UV-Detektion:	220 nm
FL-Detektion:	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 232/388 (für Fenoterolderivate) Bandweite des Excitationsmonochromators: 30 nm Bandweite des Emissionsmonochromators: 30 nm Bandweite des Photonenvervielfachers: 30 nm

### 2.3.2.2 Herstellung mobiler Phasen

Für die Herstellung der Natriumacetat-Lösung (30 mM) wurden 2,4612 g Natriumacetat in 1000 mL Reinstwasser gelöst. Die mobile Phase bei der achiralen HPLC-Bestimmung des Fenoterols bestand aus einer Natriumacetat/MeCN-Lösung im Verhältnis 70/30 (v/v).

Bei der Herstellung der mobilen Phase zur Fraktionierung der Fenoterolderivate des FMOC wurde MeCN und Wasser im Verhältnis 40/60 (v/v) miteinander gemischt. Zur Fraktionierung der Fenoterolderivate des NIC und bei ihrer chiralen HPLC mit Säulenschaltern wurde MeCN als mobile Phase verwendet.

Die mobile Phase bei der chiralen Trennung der NEIC-Derivate des Fenoterols setzte sich aus MeOH/Wasser im Verhältnis 55/45 (v/v) zusammen. Zur Herstellung der mobilen MeCN/wäßrige Phosphorsäure-Phasen in den angegebenen Verhältnissen zur chiralen Trennung der NIC-Derivate der untersuchten Wirkstoffe wurde dem Reinstwasseranteil Phosphorsäure (Endkonzentration 3,5 mM) zugesetzt.

Alle hergestellten wäßrige-organischen Gemische wie auch reines MeOH und MeCN wurden durch Anlegen eines Vacuums durch eine Filternutsche (Porösität 4) gefiltert und anschließend mit Helium entgast.

### 2.3.2.3 Derivatisierung von Fenoterol als Reinsubstanz mit FMOC

Zu 0,8 mL einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung (0,1 M, pH-Wert 8,7) wurden 100 µL der Probelösung (1 mM Fenoterol gelöst in Wasser) und 100 µL der Derivatisierungsreagenz (1 mM FMOC gelöst in MeCN) addiert. Nach einer Reaktionszeit von 20 min in einem Ultraschallbad bei Raumtemperatur wurde ein Aliquot des Reaktionsgemisches 1:10000 mit der mobilen Phase verdünnt und zum Flüssigchromatographen transferiert.

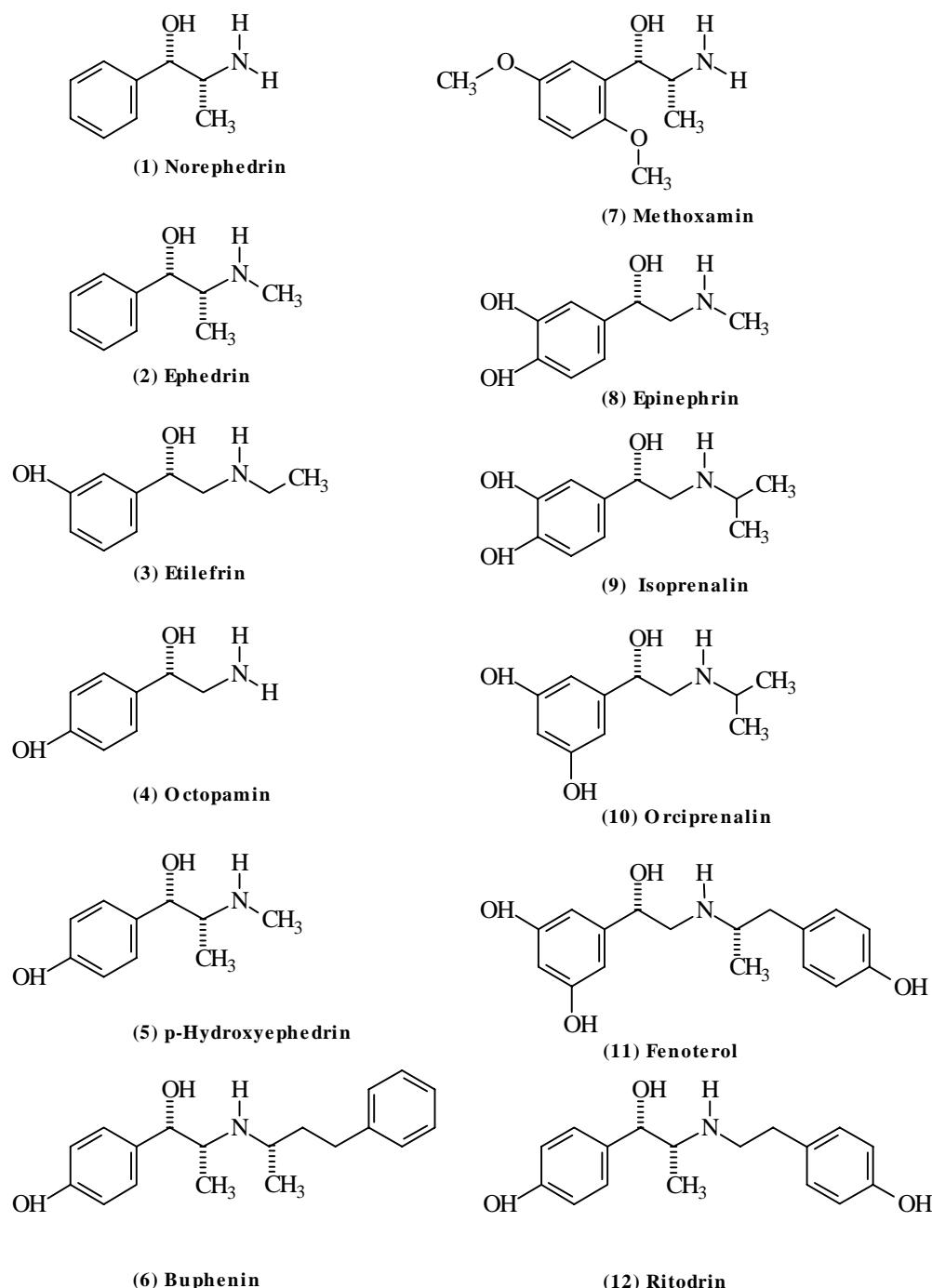
### 2.3.2.4 Derivatisierung von Aminoalkoholen als Reinsubstanzen mit NIC

Zu 2 mg der in einem frisch zubereiteten Gemisch aus 0,85 µL 1-NIC und 1 mL trockenem Chloroform und Dimethylformamid (8/2, v/v) gelösten freien Basen oder Salze der Aminoalkohole (Abb.6, 1-11) wurden 3 µL Triethylamin hinzugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 20 min in einem Ultraschallbad bei Raumtemperatur wurde ein Aliquot des Reaktionsgemisches 1:10000 mit der mobilen Phase verdünnt und zum Flüssigchromatographen transferiert.

### 2.3.2.5 Extraktion und Derivatisierung von Fenoterol aus biologischen Matrices

#### 2.3.2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt (Holtzhauer, 1995). Es wurde Coomassie Brilliant Blau G 250 (0,1 g) in 50 mL 50%igem Ethanol (v/v) gelöst, 100 mL 85%ige Phosphorsäure zugegeben und mit Reinstwasser auf 250 mL aufgefüllt. Bei Gebrauch wurden 1 Volumenanteil der Stammlösung mit 4 Volumenanteilen Reinstwasser gemischt und filtriert.



**Abb.6.** Strukturformeln der untersuchten chiralen Wirkstoffe.

Nach dem Zusammengießen von 1 mL der Bradford-Lösung zur Proteinprobe wurde gemischt (Vortex) und nach 5 min die Absorption bei 595 nm (Raumtemperatur) gemessen. Die Eichkurve wurde mit einem Serumalbumin-Standard (BSA) durchgeführt.

### 2.3.2.5.2 Festphasenextraktion

Zur Extraktion des Fenoterols aus Rattenplasma wurden C-18-Kartuschen (1 mL) der Firmen Varian und Waters verwendet. Die Extraktion wurde in einem Baker SPE-12G-Extraktionssäulen-Prozessor mittels Wasserstrahlvakuumpumpe bei einer konstanten Durchflußrate von 2 mL/min schrittweise wie folgt durchgeführt:

Konditionieren: 4x 1 mL MeOH  
4x 1 mL Wasser  
Probe auftragen: 1x 1 mL verdünntes Plasma  
Waschen: 4x 1 mL Wasser  
Eluieren: 5x 1 mL MeOH:MeCN (85:15)

In Vorversuchen wurde die erste Elutionsfraktion (1 mL) mittels Bradfordtests auf das Vorhandensein von Proteinen untersucht. Die zweite und dritte sowie die vierte und fünfte Elutionsfraktion wurden vereinigt. Die so gewonnenen drei Fraktionen wurden auf das Ausgangsvolumen der Probe eingeeengt und anschließend einer RP-HPLC zur Erfassung des Fenoterol-Gehalts zugeführt.

Zur Bestimmung von Fenoterol aus Rattenplasma wurde das Eluat eingeengt, mit Essigsäureethylester versetzt und derivatisiert (2.3.2.5.6).

### 2.3.2.5.3 Festphasenvermittelte Flüssigphasenextraktion

Auf eine Extrelut-1-Säule der Firma Merck wurde 1 mL einer 1:1 mit Wasser verdünnten Plasmaprobe (10  $\mu$ M Fenoterol enthalten) aufgetragen. Nach vollständiger Verteilung über die Festphase wurde mit 4 mL der Extraktionsflüssigkeit (Essigsäureethylester (EEE), darin 1 mM Bis(2-ethylhexyl)phosphat (BEHP) enthalten) eluiert (Abb.7).

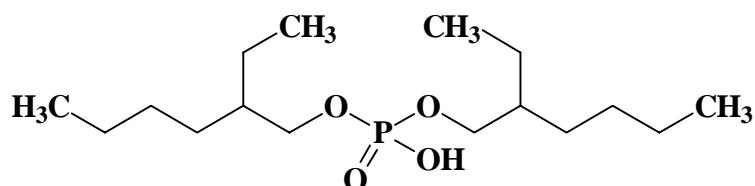


Abb.7. Strukturformel der Ionenpaaragenz Bis(2-ethylhexyl)-phosphat (BEHP).

Die organische Fraktion wurde entnommen. Die wäßrige Fraktion wurde nochmals mit 2 mL Extraktionsflüssigkeit extrahiert und der danach vereinigten organischen Fraktion wurden 500  $\mu$ L wäßrige Salzsäure (10 mM) zur Rückextraktion des Fenoterols zugesetzt. Nach Durchmischen der Phasen und anschließender Zentrifugation bei 15000 U/min für 15 min wurde die wäßrige Fraktion auf ihren Gehalt an Fenoterol untersucht. Die vereinigte organische Fraktion wurde im Bradfordtest auf Proteine untersucht.

### 2.3.2.5.4 Flüssigphasenextraktion des Fenoterols aus Kaliumphosphatpuffer

0,5 mL der wäßrige Probe (2,5  $\mu$ M Fenoterol) werden zu 0,5 mL Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,6) gegeben. Danach werden 2 mL der Extraktionsflüssigkeit (tert. Butylmethylether und Essigsäureethylester jeweils mit und ohne 1 mM BEHP) addiert und geschüttelt (2 x 30 sek), danach für 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Die organische Phase wird umgefüllt und 0,5 mL einer wäßrigen Salzsäure (10 mM) zur Rückextraktion des Fenoterols zugegeben. Die wäßrige Phase wird der achiralen HPLC zur Bestimmung des Fenoterolgehalts zugeführt.

### 2.3.2.5.5 Flüssigphasenextraktion des Fenoterols aus Perfusionspuffer

Zu 0,45 mL der wäßrigen Krebs-Henseleit-Perfusionspuffer-Probe (10  $\mu$ M Fenoterol) werden 1,1 mL Extraktionsflüssigkeit (tert. Butylmethylether und Essigsäureethylester jeweils mit und ohne 1 mM BEHP) addiert und geschüttelt (2 x 10 sek) und danach für 15 min bei 15000 U/min zentrifugiert. Die organische Phase (1 mL) wird umgefüllt und 0,45 mL einer wäßrigen Salzsäure (10 mM) zur Rückextraktion des Fenoterols zugegeben. Die wäßrige Phase wird der achiralen HPLC zur Bestimmung des Fenoterolgehalts zugeführt.

### 2.3.2.5.6 Probenvorbereitungen für die HPLC-Analyse der NIC-Derivate des Fenoterols

Zu den in Eppendorfgefäß befindlichen Perfusatpuffer-Proben (Zusammensetzung siehe 2.3.4.2) von Experimenten am isoliert perfundierten Rattenherzen werden nach dem Auftauen 1100  $\mu$ L Essigsäureethylester (1 mM BEHP enthalten) addiert und die Phasen 2  $\times$  10 sek gemischt (Vortex). Anschließend werden die Phasen in einer Zentrifuge für 15 min bei 15000 U/min und Raumtemperatur wieder getrennt. Die obere organische Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß umgesetzt. Dazu wird in Essigsäureethylester gelöstes Naphthylisocyanat zu einer Endkonzentration von 1 mM gegeben, kurz geschüttelt (Vortex) und für 15 min in einem Ultraschallbad belassen. Die Isocyanatstammlösung wird dabei stets unter Helium umgefüllt. Die über Nacht stehengelassene Probenflüssigkeit wird für 45 min bis zur Trockne verdampft, der Niederschlag in 200  $\mu$ L mobiler Phase aufgelöst und der HPLC-Analyse zugeführt.

Dieselbe Methodik wird bei der Erstellung von Eichkurven und Erfassung der Blindwerte sowie im Vorfeld der polarimetrischen Messungen herangezogen. Zur Bestimmung der Quantifizierungsgrenze wurde ein Signal-Rausch-Verhältnis von 5 für die Fluoreszenzdetektion verwendet.

## 2.3.3 Massenspektroskopische Untersuchungen

Die zu untersuchenden Peaks wurden nach dem Passieren der OD-RH-Säule gesammelt (2.3.2.1.5.3). Die mobile Phase bestand abweichend aus MeCN/Wasser (60/40, v/v). Massenspektren wurden mit einem ESQUIRE-LC-Ionenfalle-Massenspektrometer ausgestattet mit einer Elektrospray-Ionisierungsquelle (Bruker Daltonik, Bremen) durchgeführt. Die Proben wurden mit einer Spritzenpumpe bei einer Flußrate von 2  $\mu$ L/min injiziert. Bei der  $MS^3$ -Untersuchung wurden die Ionen schrittweise mit einem Massenisolationsfenster von bis zu 4 Da isoliert.

### 2.3.4. Pharmakokinetische Studien

#### 2.3.4.1 Gewinnung der Tierversuchsproben

Vor Beginn der Studien wurde die Genehmigung vom Regierungspräsidium Dessau (Genehmigung I8A5) eingeholt. Perfusatproben, Blutproben und isolierte Herzen wurden am Institut für Pharmakokinetik der Medizinischen Fakultät (Dr. Kuhlmann) gewonnen und anschließend bei -20°C gelagert. Für die Versuche wurden männliche WISTAR-Ratten aus der Zucht des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität verwendet. Die Ratten wurden im Tierhaus der Medizinischen Fakultät bei freiem Futterzugang gehalten. Das Gewicht der verwendeten Ratten schwankte zwischen 250 und 350 g, das der Herzen zwischen 1,0 und 1,2 g. Die genormten Volumina der Herz-Perfusatproben lagen zwischen 50 und 200 µL, die der Plasmaproben bei 200 µL.

#### 2.3.4.2 Perfusionspuffer-Herstellung für die Studien am isoliert perfundierten Rattenherzen

Die Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers ergibt sich wie folgt (Angaben in g/L):

NaCl	6,90
KCl	0,35
CaCl <sub>2</sub>	0,28
MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,14
NaHCO <sub>3</sub>	2,09
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16
Glucose	1,00
Na-pyruvat	0,22

Der Perfusionspuffer hat einen pH-Wert von 7,4. Zusätzlich ist noch BSA (0,1 %) enthalten. Der Perfusionspuffer wurde gefiltert (Whatman 541, Papierfilter) und für die Versuche stets frisch hergestellt.

#### 2.3.4.3 Injektion von Fenoterol in das *in situ*-perfundierte Rattenherz

Nach erfolgter Isolierung wurde das Herz bis zum Ende des Versuchs mit Perfusionspuffer durchspült (Flußraten je nach Herz zwischen 4,55 und 8,70 mL/min). Das so präparierte Herz wurde vor der ersten Bolusinjektion für die Dauer von 10 min mit Perfusionspuffer equilibriert. Danach erfolgte die erste Bolusinjektion (jeweils 100 µL einer 1 mg/mL-Probe Fenoterol gelöst im Perfusat). Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden die Proben aufgefangen. Nach Injektion wurde folgendes Samplingschema durchgeführt:

- 13 Proben jede Sekunde (50 µL)
- 13 Proben alle zwei Sekunden (100 µL)
- 13 Proben alle vier Sekunden (200 µL)
- 13 Proben alle 5 Sekunden (200 µL).

#### **2.3.4.4 Herzgewebe-Aufbereitung**

Nach Stickstoff-Aufschluß wurde abgewogenes Herzgewebe in ein mit Perfusionspuffer gefülltes Eppendorfgefäß überführt und den weiteren Extraktions- und Derivatisierungsschritten unterworfen (2.3.2.5.6).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Chirale HPLC-Analytik der FMOC- und NIC-Derivate von Aminoalkoholen als Reinsubstanz

##### **3.1.1 Derivatisierung des Fenoterols mit FMOC und NIC**

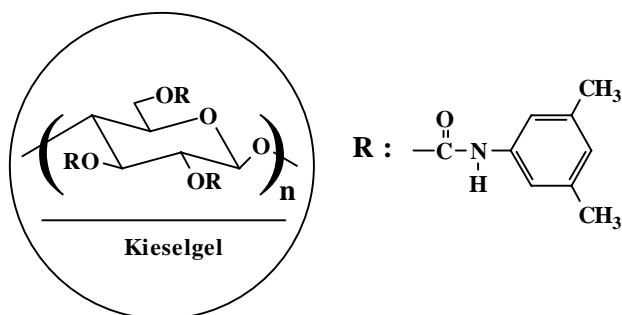
Um die Klärung der prinzipiellen Reaktionsfähigkeit des Fenoterols zur Umsetzung mit FMOC und NIC und der anschließenden chiralen Trennung ihrer fluoreszierenden Produkte ging es bei den vorangestellten Untersuchungen mit dem als Reinsubstanz vorliegenden Aminoalkohol.

Mit der entwickelten HPLC-Methode zur Bestimmung von Fenoterol (2.3.2.1.1) konnte nach den jeweiligen Derivatisierungsschritten unter den gewählten Bedingungen (2.3.2.3 bzw. 2.3.2.4) kein Fenoterol als Reinsubstanz mehr nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Das deutete darauf hin, daß Fenoterol quantitativ zu seinem FMOC- bzw. NIC-Derivat umgesetzt wurde.

##### **3.1.2 Trennfunktionen zur Enantioseparation der FMOC- und NIC-Derivate von Aminoalkoholen**

Zur Enantiomeren-Trennung der gesammelten FMOC- und NIC-Derivate des Fenoterols (2.3.2.1.2 bzw. 2.3.2.1.3) wurden vier verschiedene chirale Trennmaterialien im Umkehrphasenmodus eingesetzt: eine Celluloseester-Derivat-Säule (Chiralcel OJ-R), eine Cellulosecarbamat-Derivat-Säule (Chiralcel OD-RH) sowie eine  $\beta$ - und eine  $\gamma$ -Cyclodextrin-Säule (Serva). Die chirale Auftrennung gelang für die NIC-Derivate auf der Chiralcel OD-RH-Säule (Abb.8).

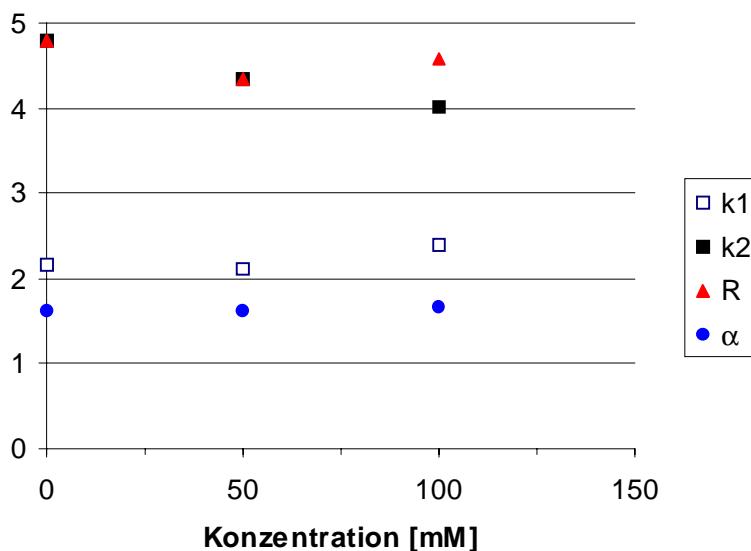
Diese Phase wurde auch erfolgreich zur Enantiomeren-Trennung der NIC-Derivate anderer Aminoalkohole verwendet (Tab.2), die unter den gleichen Bedingungen wie Fenoterol mit NIC umgesetzt wurden (2.3.2.4).



**Abb.8.** Schematischer Aufbau des kovalent an Kieselgel gebundenen Chiralcel OD-Säulenmaterials. Das Cellulosederivat stellt ein 3,5-Dimethylphenyl-Carbamat dar.

### 3.1.3 Chromatographie der NIC-Derivate von Aminoalkoholen

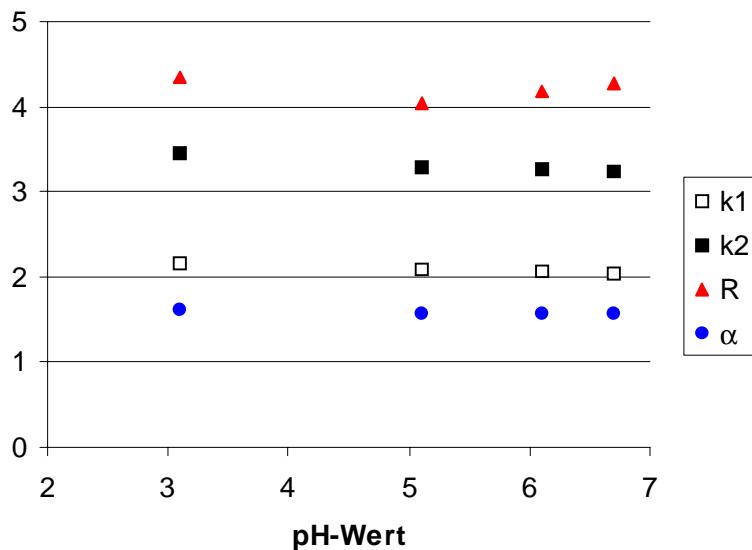
Der Einfluß der **Ionenstärke** und des **pH-Wertes** der mobilen Phase auf die Retention und Enantiomeren-Trennung wurde bei den NIC-Derivaten des *Orciprenalins* als Modellsubstanz untersucht. Dabei wurden mobile Phasen ohne und mit Kaliumhexafluorophosphat in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 und 0,05 M) und über einen pH-Bereich von 2 bis 7 verwendet. Weder die Ionenstärke noch der pH-Wert hatten deutlichen Einfluß auf Selektivität und Auftrennung. Der Selektivitätsfaktor  $\alpha$  lag bei den unterschiedlichen pH-Werten der mobilen Phase zwischen 1,57 und 1,61 und bei den verschiedenen Kaliumhexafluorophosphat-Konzentrationen bei einem konstanten pH-Wert von 3 zwischen 1,61 und 1,67. Der Trennfaktor  $R$  bewegte sich bei den Untersuchungen zum Einfluß der Ionenstärke der mobilen Phase zwischen 4,34 und 4,78 und bei den Untersuchungen zum Einfluß der pH-Werte der mobilen Phase zwischen 4,03 und 4,66 (Abb.9 und 10).



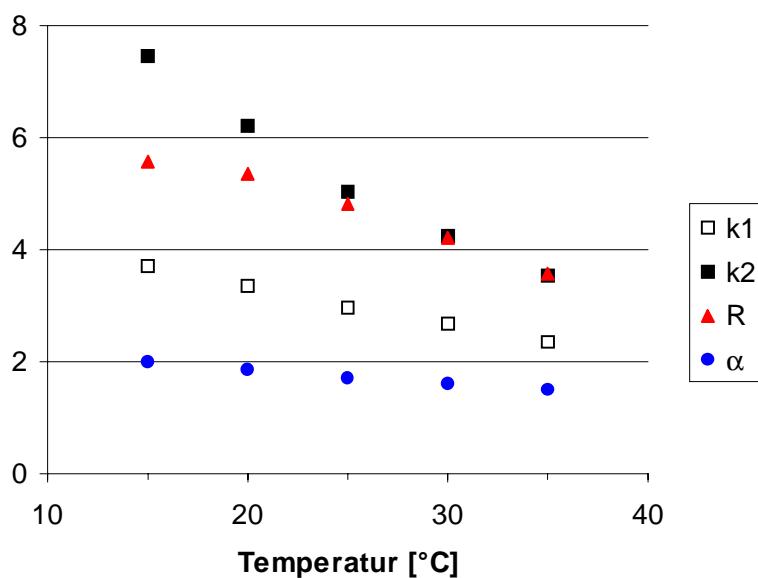
**Abb.9.** Einfluß der Ionenstärke von Kaliumhexafluorophosphat auf chromatographische Parameter bei der Enantiomeren-Trennung der Orciprenalin-Derivate des NIC. Mobile Phase: MeCN/ wäßriger Anteil: 60/40 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min, Fluoreszenzdetektion  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 262/364.

Im weiteren Verlauf der Optimierung wurde als mobile Phase ein Gemisch aus MeCN und wäßriger 3,5 mM Phosphorsäure in unterschiedlichen Verhältnissen benutzt. Zur Trennung der NIC-Derivate mit  $R>1,5$  wurde der dafür notwendige MeCN-Anteil für jeden untersuchten Aminoalkohol bestimmt. Er lag zwischen 40 % und 80 % (Tab.2).

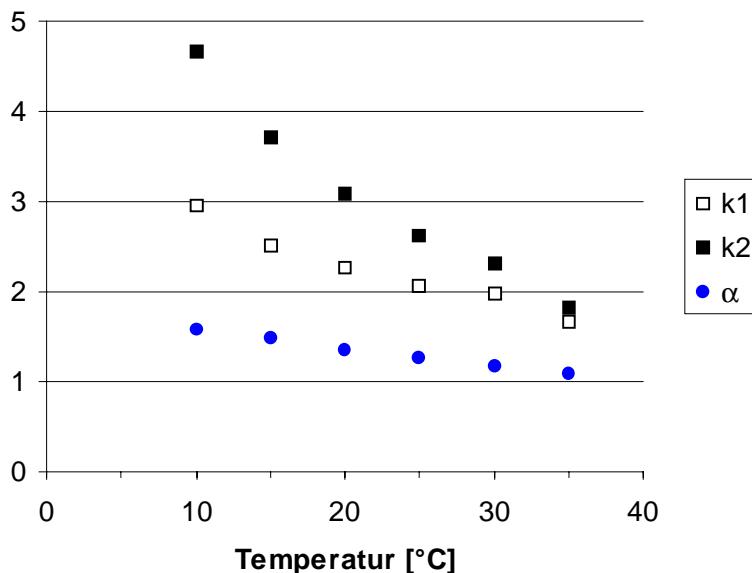
Auch der Einfluß der **Temperatur** auf die chromatographischen Parameter wurde am Beispiel der Orciprenalin-Derivate des NIC getestet. Zwischen dem untersuchten Temperaturbereich von 15 bis 35°C konnte bei Temperaterniedrigung eine Erhöhung der Trennbarkeit und Selektivität erzielt werden (Abb.11). Damit einhergehend war ein Anstieg des Rückdruckes der Säule zu verzeichnen. Für die NIC-Derivate des Fenoterols wurde der Temperatureinfluß ebenfalls untersucht (Abb.12). Es konnten die für die NIC-Derivate des Orciprenalins gefundenen Aussagen bestätigt werden.



**Abb.10.** Einfluß des pH-Wertes auf chromatographische Parameter bei der Enantiomeren-Trennung der Orciprenalin-Derivate des NIC. Mobile Phase: MeCN/ Kaliumhexafluorophosphat (0,05 M): 60/40 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min, Fluoreszenzdetektion  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 262/364, pH-Wert-Einstellung mit Phosphorsäure.



**Abb.11.** Einfluß der Temperatur auf chromatographische Parameter bei der Enantiomeren-Trennung der Orciprenalin-Derivate des NIC. Mobile Phase: MeCN/ wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (pH 2,6): 60/40 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min, Fluoreszenzdetektion  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 262/364.



**Abb.12.** Einfluß der Temperatur auf chromatographische Parameter bei der Enantiomeren-Trennung der Fenoterol-Derivate des NIC. Mobile Phase: MeCN/ wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (pH 2,6): 60/40 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min, Fluoreszenzdetektion  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 262/364. Aufgrund der Koelution des NIC-Peaks mit dem schwächer retardierten (SS)-(+)-Enantiomer konnte der Trennfaktor (R) nicht bestimmt werden (2.3.2.1).

Um auf der einen Seite die Retentionszeiten in einem vertretbaren Rahmen zu halten und auf der anderen Seite immer noch eine Enantioseparation für alle getesteten Aminoalkohole zu erzielen, wurde die chirale Säule in einem Säulenofen bei einer konstanten Temperatur von 25°C gehalten.

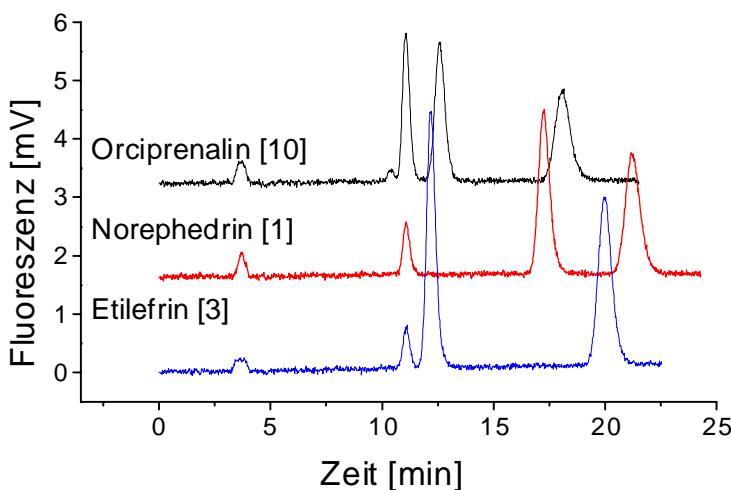
Bei allen NIC-Derivaten der Aminoalkohol-Enantiomere gelang die Basislinientrennung ( $R > 1,5$ ). Dazu waren Säulenlaufzeiten von bis zu 30 min notwendig. Nur für die NIC-Derivate des Isoprenalins (42 min) und des Methoxamins (38 min) wurden längere Zeiten benötigt. Die chromatographischen Bedingungen und Parameter für die Trennung der NIC-Derivate der einzelnen Aminoalkohole sind in Tab. 2 aufgelistet.

Abb. 13 illustriert die Enantiomeren-Trennung der NIC-Derivate des Orciprenalins, Norephedrins und des Etilefrins, Abb. 14 zeigt die chiralen Trennungen der Derivate des *p*-Hydroxyephedrins und des Fenoterols. Die NIC-Derivate wurden mit einem UV-Detektor bei 220 nm registriert. Die UV-Spektren waren identisch. Zur Steigerung der Sensitivität konnten die Derivate auch fluoreszenzdetektiert werden. Bei den Trennungen der NIC-Derivate des Fenoterols war eine Koelution des zweiten Peaks mit der überschüssigen NIC-Fraktion zu beobachten. Dieser störende Peak konnte durch Vorschalten einer RP-8-Säule (125 x 4,6) soweit retardiert werden, daß er erst nach dem zweiten Peak auftaucht. Dabei kam es jedoch zu einer Verminderung der Enantioselektivität im chromatographischen Prozeß.

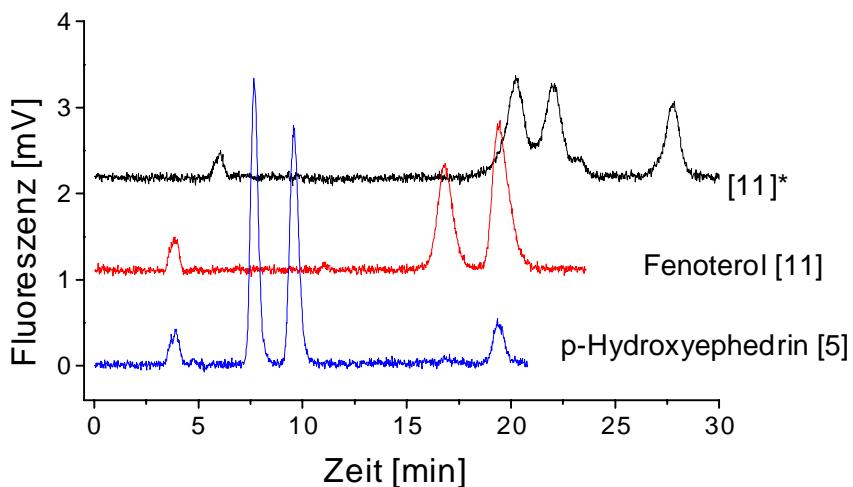
Wirkstoff	Eluent	$t_1$		$k_1$	$\alpha$	R
Buphenin	a	7.42		1.04	3.38	10.79
Orciprenalin	b	12.59	(S)-(+) <sup>p</sup>	2.43	1.61	4.68
Etilefrin	b	12.18	(R)-(-) <sup>p</sup>	2.54	1.89	7.51
Norephedrin	b	17.26	(SR)-(+) <sup>ae</sup>	3.71	1.28	3.46
Fenoterol*	b		(SS)-(+) <sup>p</sup>		-	
Ritodrin*	b		(SR)-(+) <sup>p</sup>		-	
Isoprenalin	c	36.02	(S)-(+) <sup>ae</sup>	8.34	1.10	1.66
Methoxamin	c	22.37	n.m. <sup>p</sup>	4.92	1.71	6.63
Ephedrin	c	18.18	(SR)-(+) <sup>ae</sup>	3.59	1.70	6.71
<i>p</i> -Hydroxyephedrin	c	7.67	(S)-(+) <sup>p</sup>	1.04	1.48	2.59
Epinephrin	c	9.50	(R)-(-) <sup>ae</sup>	1.48	1.21	1.57
Octopamin	d	17.50		3.98	1.14	1.68

**Tab.2.** Retentionszeit ( $t$  in min), (R)- bzw. (S)-Zuweisung mit optischer Drehrichtung, Kapazitätsfaktor ( $k$ ) für das zuerst eluierte Enantiomer sowie Enantioselektivitäten ( $\alpha$ ) und Trennfaktoren (R) für die auf einer Chiralcel OD-RH-Säule bei 25°C (20°C bei den polarimetrischen Messungen) getrennten Aminoalkoholderivate. Die optische Drehrichtung wurde entweder durch Injektion authentischer Enantiomer-Derivate (ae) oder durch polarimetrische Messung (p) bestimmt (für Methoxamin keine Drehung gemessen, n.m.). Mobile Phase: Gemisch aus MeCN/wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure im Verhältnis a: 80/20 (v/v); b: 60/40 (v/v); c: 50/50 (v/v); d: 40/60 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min.

\*Der NIC-Peak koeluierte mit dem schwächer retardierten (SS)-(+)-NIC-Enantiomer-Derivat im Fall von Fenoterol und dem stärker retardierten (RS)-(-)-NIC-Enantiomer-Derivat des Ritodrins und machte so Aussagen über deren Trennfaktor (R) nicht möglich.



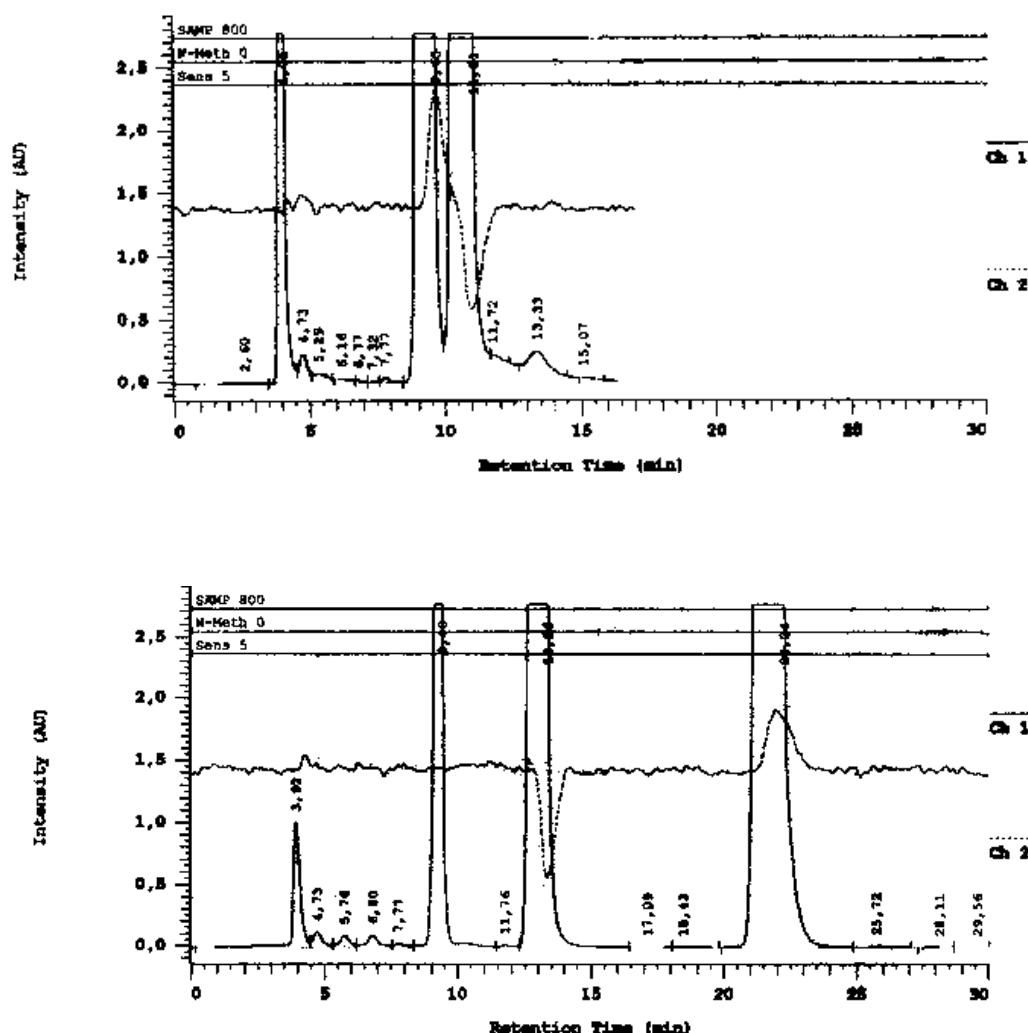
**Abb.13.** Chromatographische Trennung der (*R*)-und (*S*)-Enantiomeren-Derivate des NIC von Orciprenalin [10] und Etilefrin [3] und der (*RS*)- und (*SR*)-Enantiomeren-Derivate des NIC von Norephedrin [1] auf der Chiralcel OD-RH-Säule bei 25°C. Mobile Phase: MeCN/ wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (pH 2,6): 60/40 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min. Injektionsvolumen: 20  $\mu$ L einer 200 ng/mL Aminoalkohol-Verdünnung des Reaktionsgemisches. Fluoreszenzdetektion  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 264/362.



**Abb.14.** Chromatographische Trennung der (*R*)-und (*S*)-Enantiomeren-Derivate des NIC von *p*-Hydroxyephedrin [5] und der (*RR*)-und (*SS*)-Enantiomeren-Derivate des NIC von Fenoterol [11] auf der Chiralcel OD-RH-Säule bei 25°C. Chromatogramm [11]\*: Nach Vorschalten einer RP-8-Säule (125 x 4,6) vor die chirale Trennsäule wird eine Koelution des NIC-Peaks mit dem als zweites eluierenden Fenoterol-Enantiomeren-Derivates des NIC (Chromatogramm [11]) verhindert. Mobile Phase: MeCN/ wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (pH 2,6): 50/50 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min. Injektionsvolumen: 20  $\mu$ L einer 200 ng/mL Aminoalkohol-Verdünnung des Reaktionsgemisches. Fluoreszenzdetektion  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 264/362.

### 3.1.4 Polarimetrische Untersuchungen

Optische Rotationsbestimmungen einiger Aminoalkohol-Derivate des NIC wurden entweder über die Injektion authentischer Enantiomer-Derivate oder über polarimetrische Messung durchgeführt. Bei den polarimetrischen Messungen wurden die Aminoalkohole den in 2.3.2.5.6 beschriebenen Extraktions- und Derivatisierungsschritten unterworfen. Es wurden die NIC-Derivate der Aminoalkohole polarimetrisch gemessen, die mit einem MeCN-Anteil von 60 und 50 % in der mobilen Phase trennbar waren. Die (+)-Enantiomere des Orciprenalins, Norephedrins, Isoprenalins, Ephedrins, Fenoterols, Ritodrins und *p*-Hydroxyephedrins eluierten zuerst, die des Etilefrins und Epinephrins zuletzt (Abb.15 und Tab.2). Eine optische Aktivität der NIC-Derivate des Methoxamins konnte nicht gemessen werden.

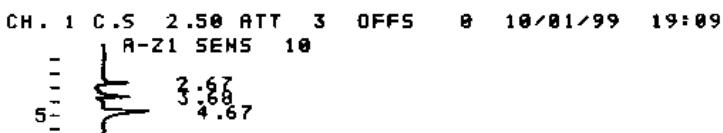
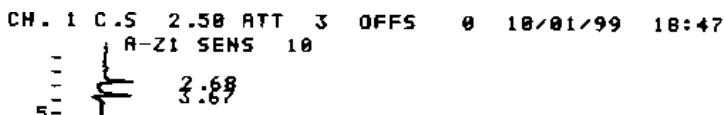


**Abb.15.** Polarimetrische Bestimmung der optischen Rotation der (*R*)- und (*S*)-NIC-Derivate des Fenoterols (oben) und des Etilefrins (unten). Chromatographische Trennung auf einer Chiralcel OD-RH-Säule bei 20°C. Mobile Phase: MeCN/wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (pH 2,6): 60/40 (v/v), Fluß: 0,5 mL/min. Injektionsvolumen: 100µL einer 100 µg/mL Aminoalkohol-Verdünnung des Reaktionsgemisches. Unteres Chromatogramm: Kanal 1 (UV-Detektion [nm]: 220), oberes Chromatogramm: Kanal 2 (optische Rotation).

## 3.2 Chirale HPLC-Analytik der NIC-Derivate des Fenoterols aus biologischen Matrices

### 3.2.1 Achirale Chromatographie des Fenoterols

Für quantitative Aussagen zu sich anschließenden Extraktionsuntersuchungen wurde eine achirale HPLC-Methode für das Fenoterol genutzt (2.3.2.1.1). Abb.16 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm. Auf einer RP-18-Säule konnte der Fenoterolpeak bei einer mobilen Phase eines MeCN/wäßrigen 30 mM Natriumacetat-Gemisches im Verhältnis 70/30 (v/v) bei einem Fluß von 1 mL/min nach ca. 4,7 min erfaßt werden.



**Abb.16.** Achirale chromatographische Erfassung von Fenoterol. Perfusionspuffer ohne (oben) und mit (unten) Fenoterol (Retentionszeit 4,7 min). Bedingungen: RP-18-Säule (250 x 4,6); mobile Phase: MeCN/ wäßriges 30 mM Natriumacetat 70/30 (v/v), Fluß: 1mL/min; UV-Detektion [nm]: 274.

### 3.2.2 Probenaufbereitung aus wäßrigen Medien

#### 3.2.2.1 Plasma

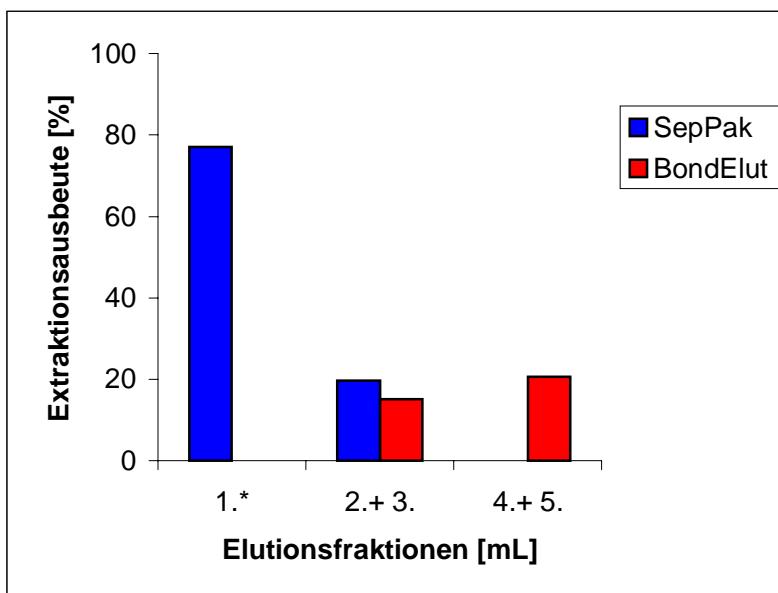
Zur Rattenplasma-Probenaufbereitung wurden verschiedene Wege beschritten. Dabei wurden die gewählten Methoden hinsichtlich des Ausschlusses der Proteinfraktion und der Extraktionsausbeute von Fenoterol überprüft.

##### 3.2.2.1.1 Festphasenvermittelte Flüssigphasenextraktion

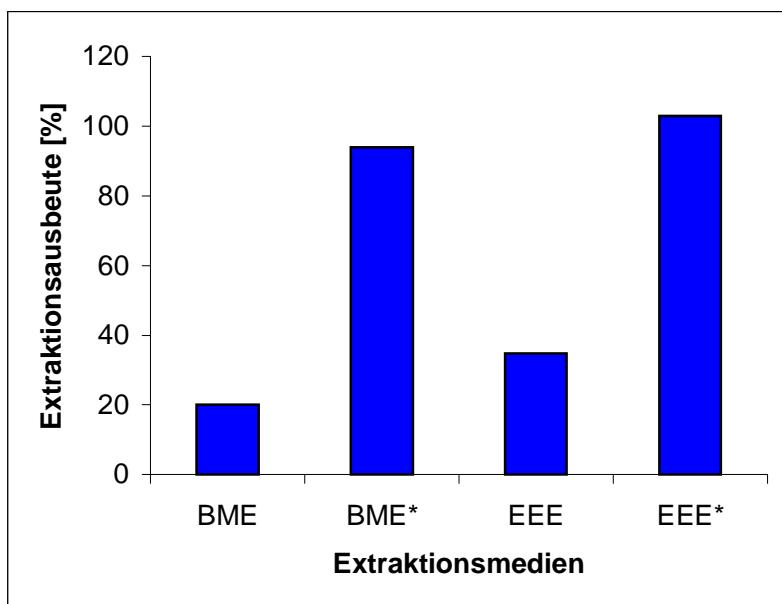
Da es bei der Ionenpaareextraktion des Fenoterols aus der wäßrigen Plasmaphase in die organische Essigsäureethylester-Phase vermittelt mit dem Ionenpaarereagenz DEHP (Abb.7) zur Emulsionsbildung kam, wurde die Extraktion auf einer Extrelut-1-Säule wiederholt. Die Bindung der Proteine an die Festphase erlaubte zwar eine proteinfreie Elution mit dem organischen Lösungsmittel, Fenoterol konnte aber nicht im Eluat nachgewiesen werden.

### 3.2.2.1.2 Festphasenextraktion

Die Extraktionsmöglichkeit von Fenoterol aus Rattenplasma mit C-18-Extraktionssäulen (1 mL) von zwei verschiedenen Anbietern wurde untersucht (Abb.17). Bei der C-18-Phase von Waters (Sep-Pak) konnten 96,8 % des eingesetzten Fenoterols (10  $\mu$ M) in den ersten 3 mL des MeOH/MeCN-Elutionsgemisches (85/15 ,v/v) wiedergefunden werden. Mit der C-18-Phase von Varian (BondElut) war im ersten Milliliter Elutionsgemisch kein Fenoterol nachweisbar, in den folgenden 4 mL betrug die Extraktionsausbeute nur 35,8 %. Der erste Milliliter des Elutionsgemisches war bei Nutzung beider Säulen proteinfrei (1\*).



**Abb.17.** Extraktionsausbeute von Fenoterol (10  $\mu$ M) unter Verwendung von zwei C-18-Festphasen-Extraktionssäulen unterschiedlicher Anbieter. 1\*: Im Bradford-Test waren keine Proteine in der ersten Fraktion nachweisbar.



**Abb.18.** Extraktionsausbeute von Fenoterol (2,5  $\mu$ M) aus Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,6) bei der Flüssigphasenextraktion in verschiedene organische Phasen (BME: tert. Butylmethylether; BME\*: tert. Butylmethylether+BEHP (1 mM); EEE: Essigsäureethylester; EEE\*: Essigsäureethylester+BEHP (1 mM)).

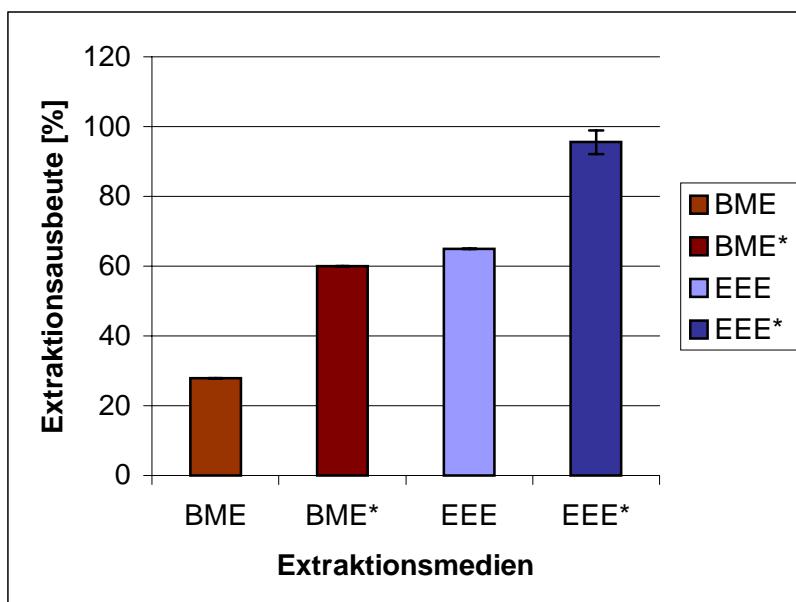
### 3.2.2.2 Phosphatpuffer

Um Hinweise zur Extraktionsfähigkeit von Fenoterol aus wäßrigen proteinfreien Proben für anschließende Perfusionsversuche zu gewinnen, wurde eine Flüssigphasenextraktion aus Phosphatpuffer mit den organischen Lösungsmitteln tert. Butylmethylether (BME) und Essigsäureethylester (EEE) jeweils mit und ohne Zusatz eines Ionenpaarreagenzes (BEHP) durchgeführt (Abb.18). In Essigsäureethylester konnten 34,7 % des Fenoterols aus dem Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 7,6) extrahiert werden, in tert. Butylmethylether waren es 20,0 %. Die Zugabe des Ionenpaarreagenzes (1 mM BEHP) führte zu einer Extraktionssteigerung des Fenoterols sowohl mit Essigsäureethylester (102,9 %) als auch mit tert. Butylmethylethers (93,9 %).

### 3.2.2.3 Perfusionspuffer

Für pharmakokinetische Untersuchungen sollten Experimente am isoliert perfundierten Rattenherzen durchgeführt werden. Hierfür wurde ein Krebs-Henseleit-Perfusionspuffer eingesetzt (2.3.4.2).

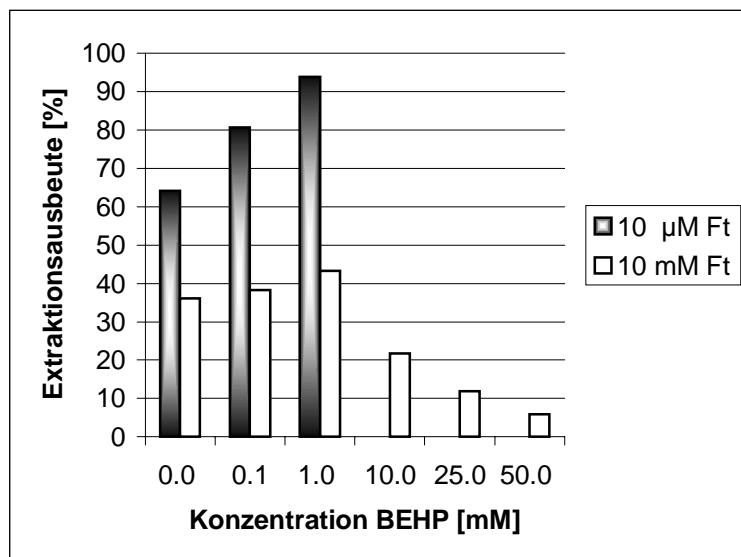
Zu Studien über eine optimierte Extraktion von Fenoterol aus wäßrigen proteinfreien Perfusionspuffer-Proben in 2 mL-Eppendorfgefäßten wurde eine Flüssigphasenextraktion mit den organischen Lösungsmitteln tert. Butylmethylether und Essigsäureethylester jeweils mit und ohne Zusatz eines Ionenpaarreagenzes (BEHP) durchgeführt (Abb.19).



**Abb.19.** Flüssigphasenextraktion von Fenoterol (10  $\mu$ M) aus Perfusionspuffer (pH 7,6) in verschiedene organische Phasen (BME: tert. Butylmethylether; BME\*: tert. Butylmethylether+BEHP (1 mM); EEE: Essigsäureethylester; EEE\*: Essigsäureethylester+BEHP (1 mM)).

In Essigsäureethylester konnten 65 % des Fenoterols aus dem Perfusionspuffer extrahiert werden, in tert. Butylmethylether waren es 28 %. Auch hier führte der Einsatz des Ionenpaarreagenzes (1 mM BEHP) zu einer Steigerung der Extraktionsausbeute sowohl bei Einsatz von Essigsäureethylester (95,6 %, Standardabweichung 3,4 %, n=6) als auch mit tert. Butylmethylether (60,1 %).

Abschließend wurde der Einfluß der Konzentration des Ionenpaarreagenzes in der organischen Essigsäureethylester-Phase auf die Extraktion untersucht (Abb.20). Bis zu 1 mM steigerten sich die Extraktionsausbeuten für beide untersuchte Konzentrationen an zu extrahierendem Fenoterol (10  $\mu$ M und 10 mM) mit Zunahme der eingesetzten Konzentration an DEHP (64,1 % bzw. 36,1 % ohne DEHP; 80,6 % bzw. 38,2 % für 0,1 mM DEHP). Sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Fenoterolkonzentrationen waren bei Zusatz von 1 mM Ionenpaarreagenz (DEHP) die Extraktionsausbeuten am höchsten (93,9 % bzw. 43,3 %). Für die höhere Konzentration an Fenoterol (10 mM) nahm die Extraktion bei Zugabe von mehr als 1 mM DEHP wieder ab (21,9 % bei 10 mM, 11,9 % bei 25 mM und 5,9 % bei 50 mM DEHP).



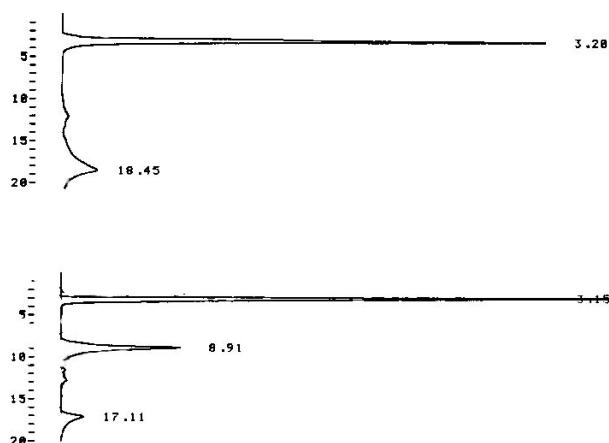
**Abb.20.** Einfluß der Konzentration des Ionenpaarreagenzes auf die Extraktion von Fenoterol (Ft, 10  $\mu$ M und 10 mM) aus Perfusionspuffer in die organische Essigsäureethylester-Phase.

### 3.2.3 NIC-Derivatisierung von Fenoterol aus Perfusatproben

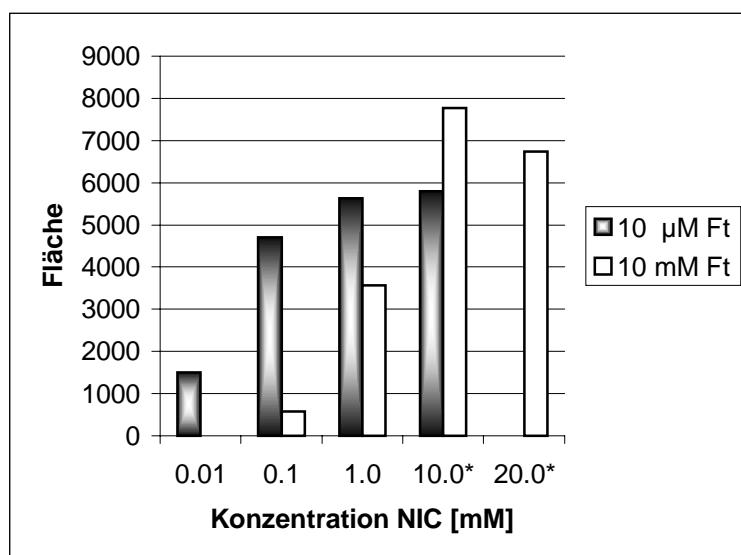
Nach erfolgreicher Flüssigphasenextraktion aus dem Perfusionspuffer in die organische Essigsäureethylester-Phase vermittelt durch das Ionenpaarreagenz BEHP wurde das Fenoterol anschließend im Extraktionsmedium mit NIC umgesetzt. Die notwendige quantitative Erfassung der NIC-Derivate des Fenoterols zur Derivatisierungsoptimierung gelang mit Hilfe einer achiralen HPLC-Methode (2.3.2.1.3).

Auf einer RP-18-Säule eluierte der Peak bei einer mobilen Phase von MeCN/Wasser (40/60, v/v) und einer Flußrate von 1 mL/min bei 8,9 min (Abb.21).

Der Einfluß der Konzentrationsverhältnisse von Fenoterol und NIC (Abb.22) und der Reaktionsdauer (Abb.23) auf die Umsetzung wurden genauer untersucht. Bei einem NIC-Zusatz von bis zu 10 mM konnte der Umsatz sowohl von 10  $\mu$ M als auch von 10 mM Fenoterol mit Erhöhung der NIC-Konzentration gesteigert werden. Dabei zeigte sich, daß bei Zugabe von 10 mM NIC zur organischen Phase sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Fenoterol-Konzentrationen die höchsten Umsätze zu verzeichnen waren. Ab einer Konzentration von 5 mM NIC traten weiße NIC-Kristalle in der Lösung auf, die bei der anschließenden Trocknung ausfielen (\*). Die weitere Erhöhung der Konzentration von NIC (20 mM) resultierte in einer verminderten Umsetzung des zugegebenen Fenoterols (10  $\mu$ M). Bei den Versuchen mit 10  $\mu$ M Fenoterol waren sowohl bei Zugabe von 1 mM als auch 10 mM NIC fast gleiche Umsätze zu verzeichnen.



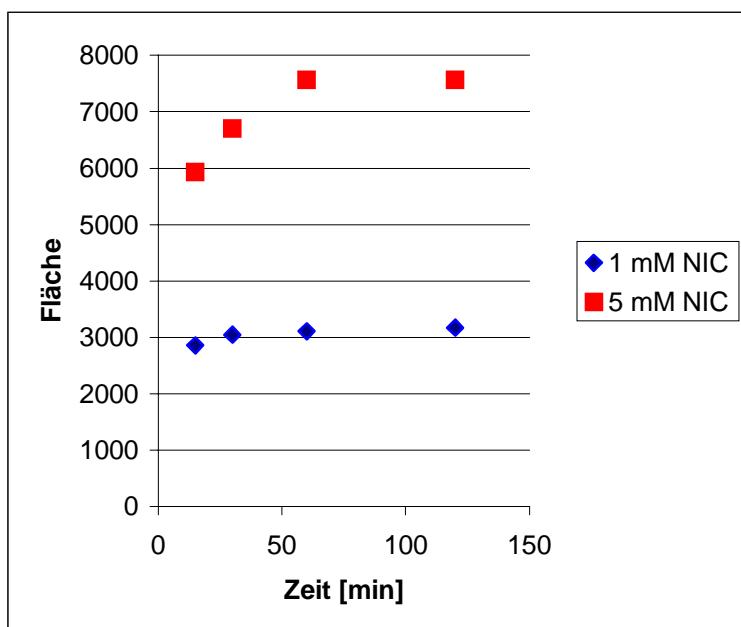
**Abb.21.** Achirale chromatographische Bestimmung des NIC-Derivates des Fenoterols. NIC-Derivatisierungsgemisch ohne (oben) und mit (unten) Zusatz von Fenoterol (Retentionszeit 8,9 min). Chromatographische Bedingungen: RP-18-Säule (250 x 4,6); mobile Phase: MeCN/Wasser (40/60, v/v), Fluß: 1mL/min; UV-Detektion [nm]: 230.



**Abb.22.** Einfluß des Konzentrationsverhältnisses zwischen dem Derivatisierungsreagenz Naphthylisocyanat (NIC) und Fenoterol (Ft) auf die Derivatisierungsausbeute.

Die Reaktion des Fenoterols (10 mM) mit NIC (1 und 5 mM) verlief schnell und war nach spätestens 60 min im Gleichgewicht, bei Zugabe von 1 mM NIC schon nach 30 min. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde NIC zur Derivatisierung des in Proben befindlichen Fenoterols in einer Konzentration von 1 mM zugegeben.

Es zeigte sich, daß die Derivate in der Reaktionslösung über Tage noch stabil vorlagen. Nach Einengung der organischen Phase und Lagerung bei -20°C waren die Derivate sogar über mehrere Wochen stabil.

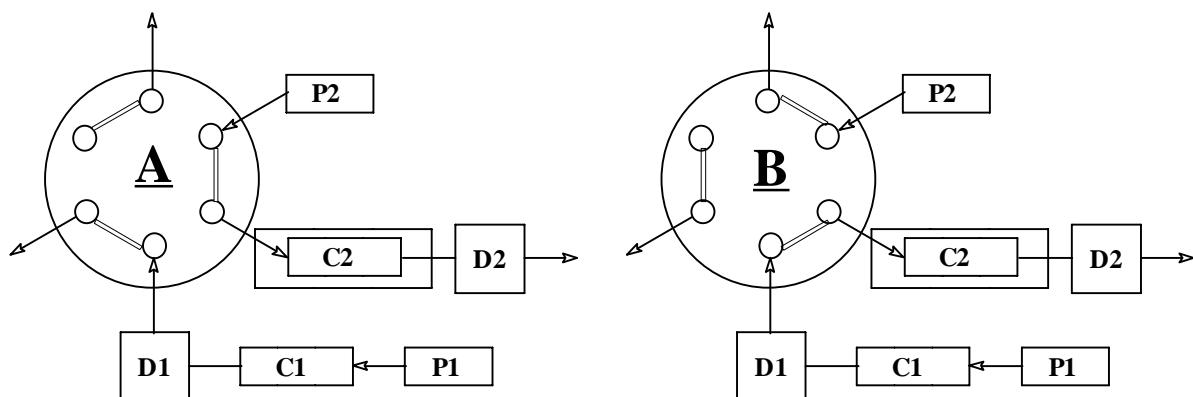


**Abb.23.** Einfluß der Reaktionsdauer der NIC-Derivatisierung von Fenoterol (10 mM) auf die Derivatisierungsausbeute.

### 3.2.4 Säulenschalten

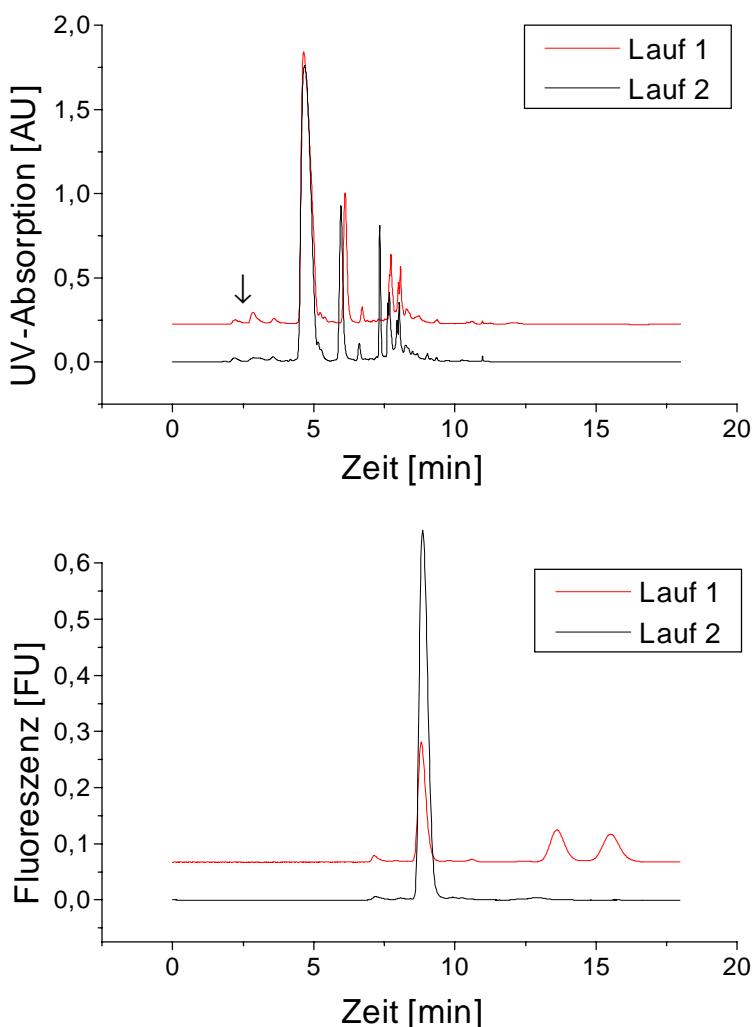
Bei der NIC-Derivatisierung des Fenoterols als Reinsubstanz konnte eine Koelution des vom NIC stammenden Peaks mit dem als zweites eluierenden Fenoterolenantiomers des NIC-Derivates verhindert werden, wenn vor die chirale Säule eine RP-8-Säule (150 x 4,6) geschaltet wurde (Abb.15). In Kauf genommen werden mußte dabei aber, daß die Enantiomer-Derivate nicht mehr basisliniengetrennt werden konnten.

Bei der Bestimmung der NIC-Derivate des Fenoterols aus Perfusatpuffer-Proben wurde aus diesem Grund ein Säulenschaltplan entwickelt, der es erlaubt, die Fenoterol-Enantiomer-Derivate des NIC basisliniengetrennt zu erfassen (Abb.24).



**Abb.24.** Schaltplan bei der chromatographischen Trennung der Enantiomere des Fenoterols als NIC-Derivate. **P1:** Pumpe 1 (dual) mit Pumpe A (mobile Phase: MeCN / wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (60/40, v/v) pH 2,6) und Pumpe B (mobile Phase: MeCN). **P2:** Pumpe 2 mit mobiler Phase: MeCN/wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (60/40, v/v) pH 2,6 und Flußrate: 0,5 mL/min. **C1:** Säule 1: RP-8 125 x 4,6. **C2:** Säule 2: OD-RH 150 x 4,6 im Säulenofen auf 25°C gehalten, **D1:** Detektor 1: UV-Detektion [nm]: 220, **D2:** Detektor 2: Fluoreszenz-Detektion:  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 232/388 (siehe 3.5). Zeitfenster: Stellung A vom Start bis zu 3,0 min und von 3,6 min bis zum Ende des Laufes, Stellung B zwischen 3,0 und 3,6 min.

Überschüssiges NIC wurde zuerst vom Fenoterol-NIC-Derivat auf einer achiralen RP-8-Säule (125 x 4,6) getrennt. Bei der gewählten mobilen Phase von MeCN / wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure pH 2,6 (60/40, v/v) eluierte das Fenoterol-NIC-Derivat (3,0-3,6 min) vor dem NIC-Peak (ab 4,9 min) (Abb.25). Durch das Transferrieren des NIC-Fenoterol-Peaks von der RP-8-Säule auf die chirale OD-RH-Säule im gewählten Zeitfenster von 3,0 bis 3,6 min wurden auch Peaks herausgefiltert, die vor dem NIC-Fenoterol-Peak eluierten und sich bei der anschließenden Auftrennung der Enantiomere in geringen Konzentrationsbereichen als störend erwiesen, wenn sie mit auf die chirale Säule gelangten. Der RP-8-Säule direkt nachgeschaltet wurde ein UV-Detektor, der die Visualisierung der Peaks nach Elution ermöglichte.



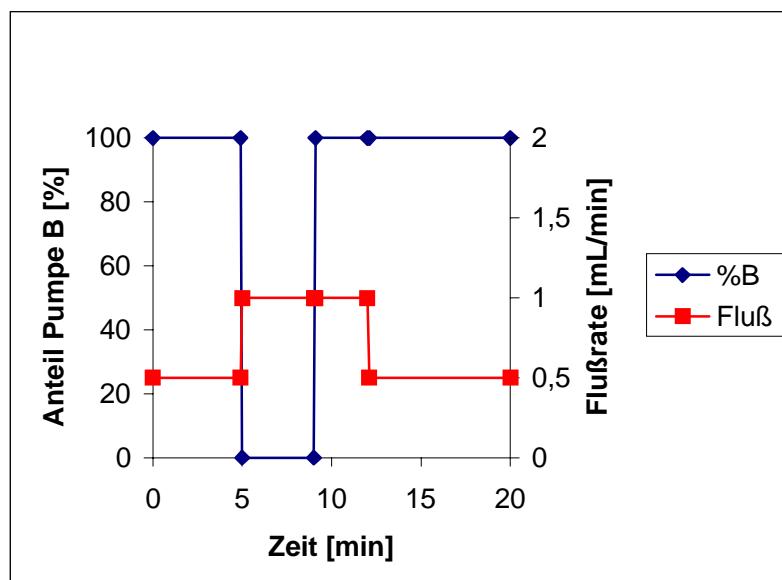
**Abb.25.** Chirale Erfassung der NIC-Derivate des Fenoterols aus einer Rattenherz-Perfusatprobe mittels Säulenschalten. Chromatographische Läufe 1 (mit Fenoterol) und 2 (ohne Fenoterol) im UV-Detektionsmodus (obere Chromatogramme, 220 nm) und im Fluoreszenzdetektionsmodus (untere Chromatogramme,  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]: 232/388$ , siehe 3.5). Der NIC-Fenoterol-Peak (↓) wird durch das Säulenschalten vom NIC-Peak abgetrennt. Nach Überführung der NIC-Fenoterol-Fraktion werden die Enantiomere auf der OD-RH-Säule fluorimetrisch detektiert (Retentionszeiten 13,9 und 15,8 min).

Auf der OD-RH-Säule gelang unter den gewählten Bedingungen (mobile Phase MeCN / wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (60/40, v/v) pH 2,6 und bei 25°C) die Basislinienauftrennung der NIC-Enantiomer-Derivate von Fenoterol (13,9 und 15,8 min) und Ritodrin (11,0 und 13,5 min) (Tab.3).

Wirkstoff	Schaltzeit	$t_1$	$k_1$	$\alpha$	R
Fenoterol	3,0-3,6	13,96	2,88	1,19	2,02
Ritodrin	3,2-3,8	11,00	2,05	1,35	3,13

**Tab.3.** Zeitfenster des Schaltens von der RP-8-Säule auf die OD-RH-Säule ( $t$  in min), Retentionszeit ( $t$  in min), Kapazitätsfaktor ( $k$ ) für das zuerst eluierte Enantiomer sowie Enantioselektivitäten ( $\alpha$ ) und Trennfaktoren (R) der auf einer Chiralcel OD-RH-Säule bei 25°C getrennten Aminoalkoholderivate. Mobile Phase: MeCN/ wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure pH 2,6 (60/40, v/v).

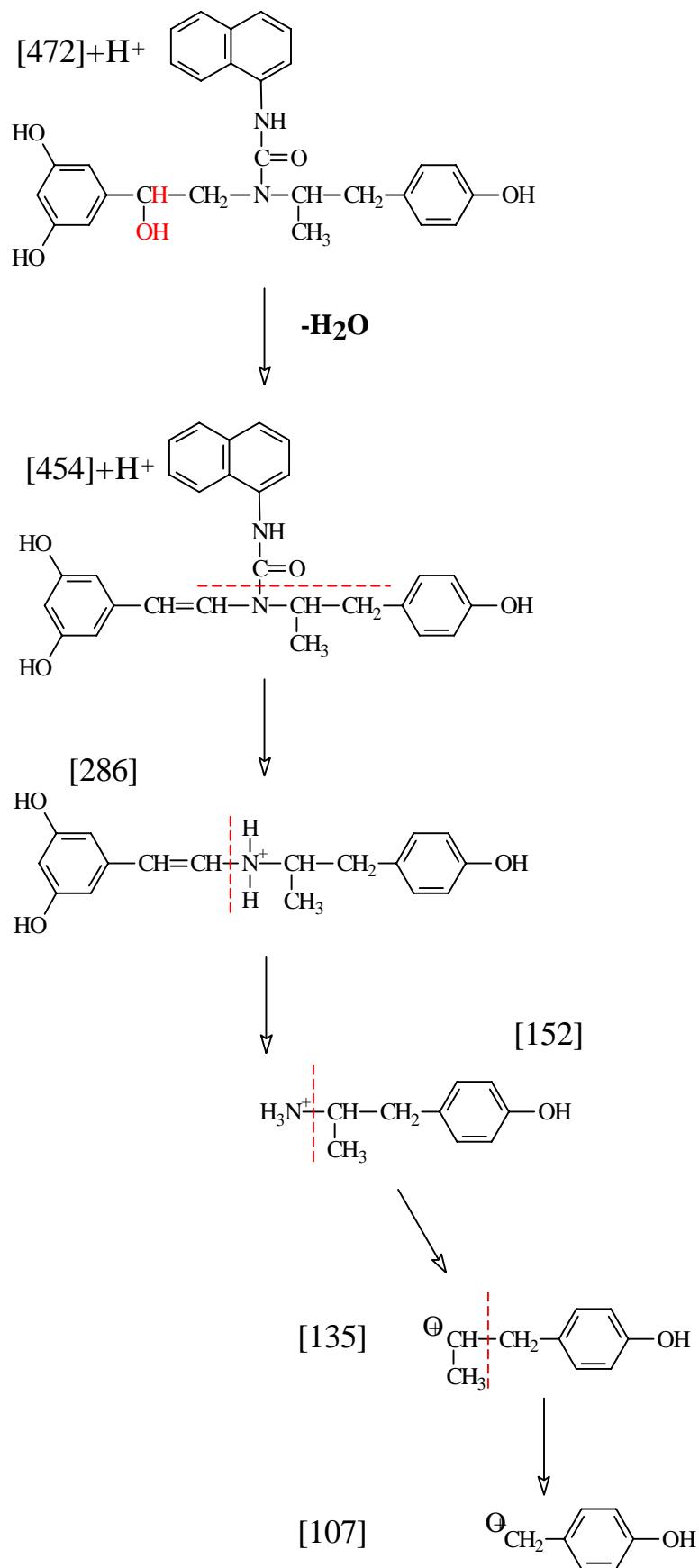
Die Dauer eines Analysenlaufes mit Säulenschalten betrug 20 min. Während der Auf trennung der Enantiomeren-Derivate auf der chiralen Säule wurde die RP-8-Säule einem Wasch- und Reäquilibrierungsschritt unterworfen (Abb.26).



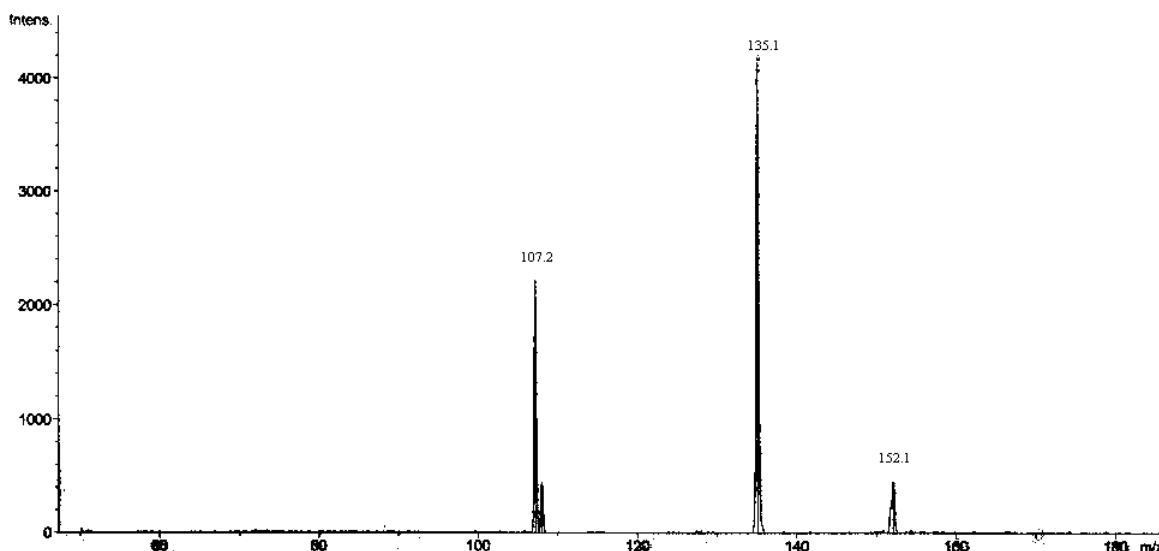
**Abb.26.** Wasch- und Äquilibrierungsprogramm für die RP-8-Säule bei der Analyse der NIC-Derivate des Fenoterols (Säulenschalten). Pumpe A mit mobiler Phase: MeCN; Pumpe B mit mobiler Phase: MeCN / wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure (60/40, v/v) pH 2,6.

### 3.2.5 Massenspektroskopische Untersuchungen

Zur Strukturanalyse wurden die Enantiomere des Fenoterols als NIC-Derivate nach dem Passieren der OD-RH-Säule gesammelt und massenspektroskopisch untersucht. Beide Peaks besaßen eine identische Massenzahl von  $[M+H^+]=473$ , die bei einem Additionsprodukt von NIC ( $M\approx 169$  g/mol) mit Fenoterol ( $M\approx 303$  g/mol) zu erwarten ist. Die weiterführende schrittweise selektive Fragmentierung des  $[M+H^+]$ -Massepeaks im MS-Ionenfalle-Versuch über die Fragmente bei 455 und 286 ergaben schließlich Massenzahlen von 152, 135 und 107. Über die gefundenen Massenzahlen konnte der Zerfallsweg des Massepeaks rekonstruiert werden (Abb.27 und 28).



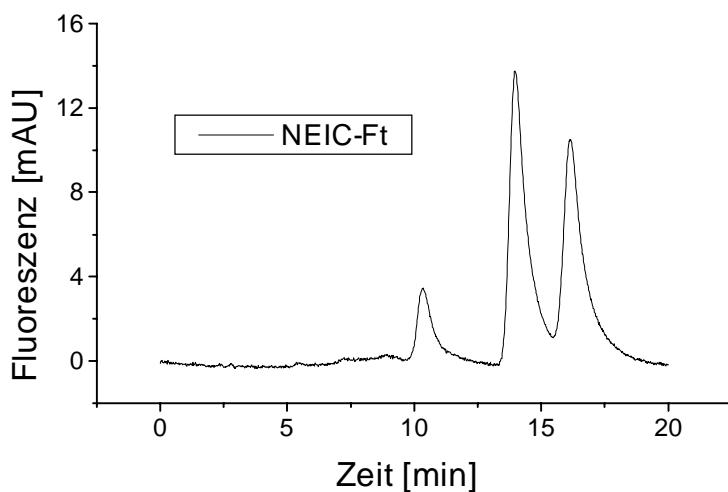
**Abb.27.** Weg des Zerfalls des NIC-Derivates des Fenoterols  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $\text{m/z}=473$ ) in der  $(\text{MS})^3$ -Untersuchung.



**Abb.28.** Selektive Fragmentierung des  $[M+H^+]$ -Massepeaks von NIC-Fenoterol ( $m/z=473$ ) in der massenspektroskopischen (MS)<sup>3</sup>-Ionenfalle-Untersuchung.

### 3.3 NEIC-Derivatisierung des Fenoterols

Alternativ zur chiralen Analyse des Fenoterols als NIC-Derivate wurde die Analyse der NEIC-Diastereomeren-Derivate des Fenoterols vorangetrieben. Nach Umsetzung des Fenoterols mit dem chiralen *(S)*- $(+)$ -Naphthylethylisocyanat (NEIC) konnten die Enantiomeren-Derivate auf einer konventionellen RP-18-Säule (250 x 4,6) aufgetrennt werden. Die Peaks eluierten bei Raumtemperatur und einer gewählten mobilen Phase von MeOH/Wasser (55/45, v/v) bei  $t_1=13,9$  und  $t_2=16,1$  min (Abb.29). Es wurde ein Selektivitätsfaktor von  $\alpha=1,21$  und einen Trennfaktor von  $R=1,65$  ermittelt. Der NEIC-Peak eluierte hier vor den NEIC-Fenoterol-Derivaten bei ca. 11 min.

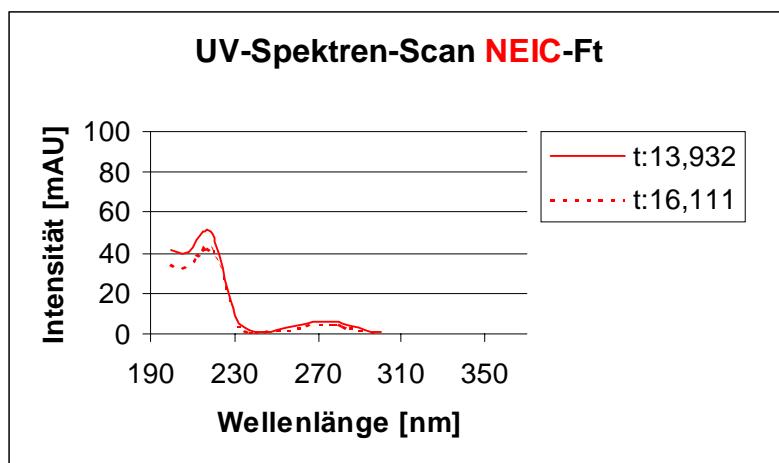


**Abb.29.** Chirale Trennung der NEIC-Derivate des Fenoterols (NEIC-Ft) auf einer RP-18-Säule. Mobile Phase: MeOH/Wasser (55/45, v/v), Flußrate: 1,5 mL/min, Fluoreszenzdetektion:  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$  232/388 (siehe 3.5). Die Retentionszeiten betrugen 13,9 und 16,1 min.

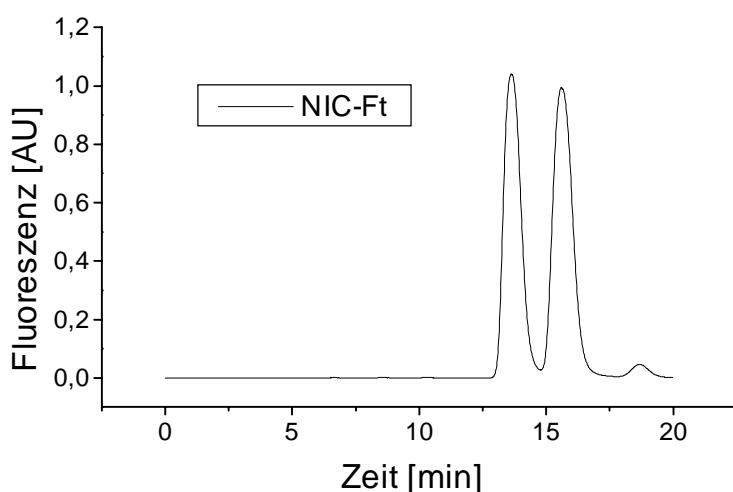
### 3.4 UV- und Fluoreszenzspektroskopische Analyse der Fenoterol-Enantiomeren-Derivate des NEIC und NIC

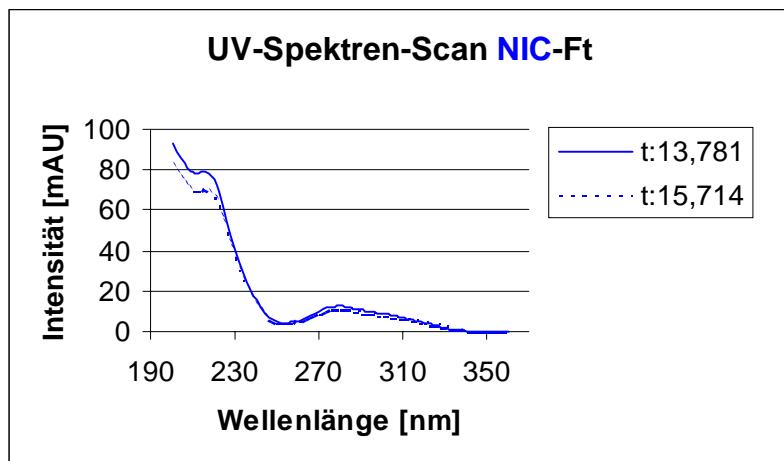
Eine Fenoterol enthaltende Perfusionspufferprobe wurden den optimierten Extraktionsschritten unterworfen, mit (S)-(+)-Naphthylethylisocyanat bzw. Naphthylisocyanat derivatisiert (jeweils 1 mM) und mit der jeweiligen mobilen Phase verdünnt. Dem Fluoreszenzdetektor wurde der UV-Detektor nachgeschaltet. Mit ihm konnten für die jeweiligen Fenoterol-Enantiomeren-Derivate bei Passieren ein UV-Scan durchgeführt werden ( $\lambda_{UV}$  [nm]: 200-400).

Für die auf einer RP-18-Säule (250 x 4,6) aufgetrennten NEIC-Enantiomeren-Derivate (NEIC-Ft) ergaben sich identische Spektren und Absorptionsmaxima bei 220 nm und 276 nm (Abb.30) für die beiden Peaks mit einer Retentionszeit von  $t_1=13,9$  und  $t_2=16,1$  min.



**Abb.30.** UV-Spektren-Scan der NEIC-Derivate des Fenoterols. Nach Umsetzung von 1 mg Fenoterol mit 1 mM (S)-(+)-Naphthylethylisocyanat und anschließender Verdünnung 1:10 mit der mobilen Phase wurden die NEIC-Fenoterol-Diastereomere (NEIC-Ft) auf einer RP-18-Säule bei einer mobilen Phase von MeOH/Wasser (55/45, v/v) und einer Flußrate von 1,5 mL/min aufgetrennt.





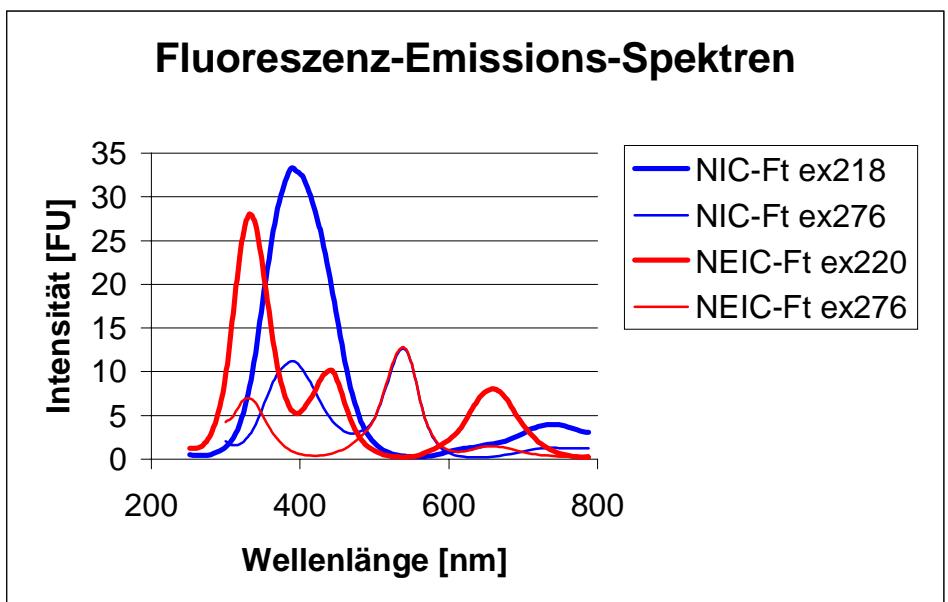
**Abb.31.** Chirale Trennung der NIC-Derivate des Fenoterols mit dazugehörigen Daten des UV-Spektren-Scans. Die NIC-Fenoterol-Diastereomere (NIC-Ft) wurden nach Säulenschalten auf einer OD-RH-Säule bei einer mobilen Phase von MeCN/wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure 60/40 (v/v) pH 2,6 und einer Flußrate von 0,5 mL/min aufgetrennt. Fluoreszenzdetektion:  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$  232/388 (siehe 3.5).

Für die nach einem Säulenschalten (3,0 bis 3,6 min) auf einer OD-RH-Säule aufgetrennten NIC-Enantiomeren-Derivate (NIC-Ft) ergaben sich für die beiden Peaks mit einer Retentionszeit von  $t_1=13,8$  und  $t_2=15,7$  identische Spektren und Absorptionsmaxima bei 218 nm und 276 nm (Abb.31). Die Absorptionsmaxima bei 218 bzw. 220 nm hatte sowohl bei den NEIC- als auch bei den NIC-Derivaten des Fenoterols eine 8fach höhere Intensität als bei 276 nm (Ergebnis nicht gezeigt).

### 3.5 Fluoreszenz-Sensitivitätsvergleich der Fenoterolderivate des NIC und des NEIC

Zum Vergleich der Empfindlichkeiten wurden gleiche Mengen an Fenoterol (10 mM) aus Perfusionspuffer extrahiert, anschließend mit jeweils 1 mM des chiralen Naphthylisocyanat (*S*)-(+)-Naphthylethylisocyanates bzw. des achiralen Naphthylisocyanats umgesetzt und mit der mobilen Phase 1:1000 verdünnt.

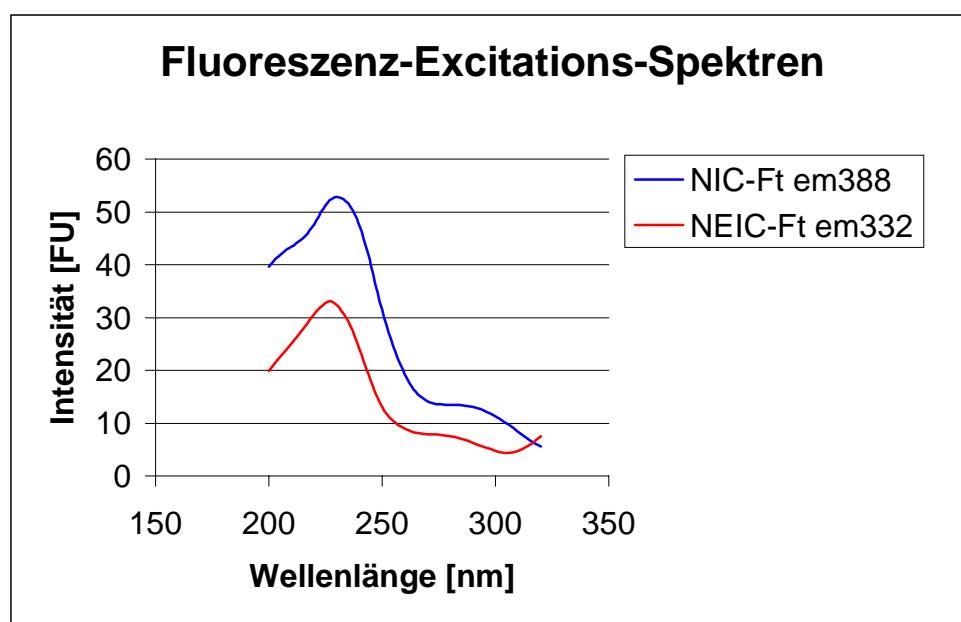
Nach Ermittlung der UV-Absorptionmaxima (3.4) wurden für die NIC- und NEIC-Derivate des Fenoterols von den beiden gefundenen UV-Maxima Fluoreszenz-Emissions-Spektren aufgenommen (Abb.32). Sowohl die NIC- als auch die NEIC-Derivate zeigten bei einer Anregungswellenlänge von 276 nm ein lokales Emissionsmaximum gleicher Intensität bei 540 nm (12,6 bzw. 12,7 FU). Für die NIC-Derivate des Fenoterols ergab sich bei Anregungswellenlängen von 218 und 276 nm ein lokales Emissionsmaximum bei 388 nm. Die Intensität der Emission bei einer Anregungswellenlänge von 218 nm lag mit 33,2 FU deutlich höher als die bei einer Anregungswellenlänge von 276 nm (11,2 FU). Darüber hinaus trat noch ein weiteres lokales Maximum bei der Wellenlänge von 748 nm (3,9 FU) auf.



**Abb.32.** Fluoreszenz-Emissionsspektren der Fenoterolderivate des NIC (NIC-Ft) und des NEIC (NEIC-Ft) bei verschiedenen Anregungswellenlängen (ex [nm]).

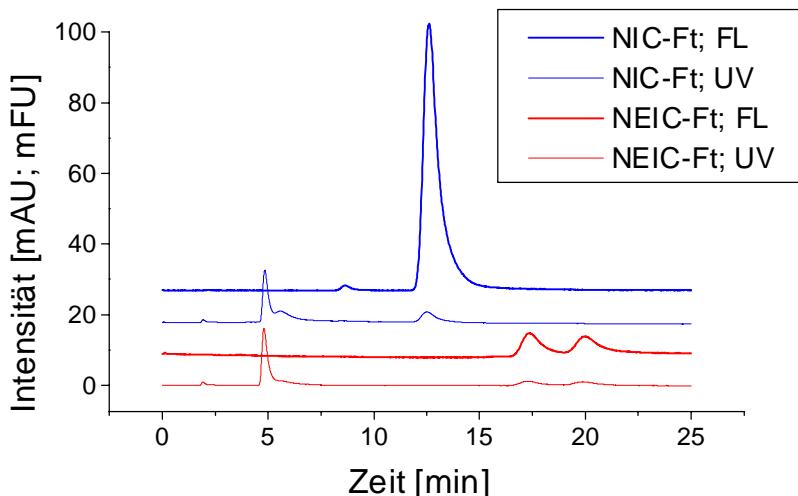
Bei der Untersuchung der NEIC-Derivate des Fenoterols fanden sich bei den gewählten Anregungswellenlängen von 220 und 276 nm Emissionsmaxima bei einer Wellenlänge von 332 nm. Die Intensität der Emission bei der Anregungswellenlänge von 220 nm lag mit 28,0 FU ebenfalls höher als die bei der Anregungswellenlänge von 276 nm (6,9 FU). Darüber hinaus traten noch weitere lokale Maxima bei den Wellenlängen von 444 nm (10,0 FU) und 660 nm (8,0 FU) auf.

Für die gefundenen Emissionsmaxima bei 388 nm für NIC-Derivat und 332 nm für NEIC-Derivat wurden Fluoreszenz-Excitations-Spektren aufgenommen (Abb.33). Die Anregungswellenlängen für die maximale Ausbeute bei der Fluoreszenzdetektion betrugen 232 nm (Intensität 52,6 FU) für das NIC-Derivat und 228 nm (Intensität 33 FU) für das NEIC-Derivat.



**Abb.33.** Excitationsspektren bei der Fluoreszenzdetektion der Fenoterol-Derivate des NIC und des NEIC.

Zuletzt wurde die Fluoreszenzempfindlichkeit der Fenoterol-Derivate des NIC und des NEIC bei identischen chromatographischen Bedingungen miteinander verglichen (Abb.34). Bei Wahl der jeweiligen ermittelten optimalen Fluoreszenz-Excitations- und Emissionswellenlängen besaß das NIC-Derivat eine höhere Intensität als die beiden NEIC-Derivate zusammen genommen.



**Abb.34.** Vergleich der Empfindlichkeit bei der Fluoreszenzdetektion der Fenoterol-Derivate des NIC (obere Chromatogramme, NIC-Ft) und des NEIC (untere Chromatogramme, NEIC-Ft) auf einer RP-18-Säule. Mobile Phase: MeOH/Wasser (55/45, v/v), Flußrate: 1,5 mL/min. UV-Detektion (UV) [nm]: 220, Fluoreszenzdetektion (FL)  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$ : 232/388 (NIC-Ft) bzw. 228/332 (NEIC-Ft).

## 3.6 Chirale HPCE-Analytik des Fenoterols

### 3.6.1 Chirale Selektoren

Cyclodextrine stellen cyclische D-Glucos-Oligosaccharide dar, die durch einen partiellen Abbau von Stärke und dem enzymatischen Binden von gelösten Glucoseeinheiten zu homogenen kristallinen toroidalen Strukturen hergestellt werden. Drei der am häufigsten verwendeten nativen CD sind  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD, die entsprechend 6, 7 und 8 Glucoseeinheiten mit inhärenter Chiralität besitzen. Die in dieser Arbeit eingesetzten  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -CD haben 35 bzw. 40 chirale Zentren. Der toroidale Körper besitzt durch das Vorhandensein der Hydroxylgruppen in 2-, 3- und 6-C-Position (zwischen 12 und 18 Hydroxylgruppen je nach Anzahl der D-Glucoseeinheiten) einen hydrophilen Rand, der die CD wasserlöslich macht. Der apolare Charakter des Hohlraums im Inneren der CD wird durch die vorhandenen Glycosidsauerstoffe und Methylenwasserstoffe bedingt. Als Konsequenz daraus besitzen CD die Fähigkeit, apolare Analyte entsprechender Größe einschließen zu können.

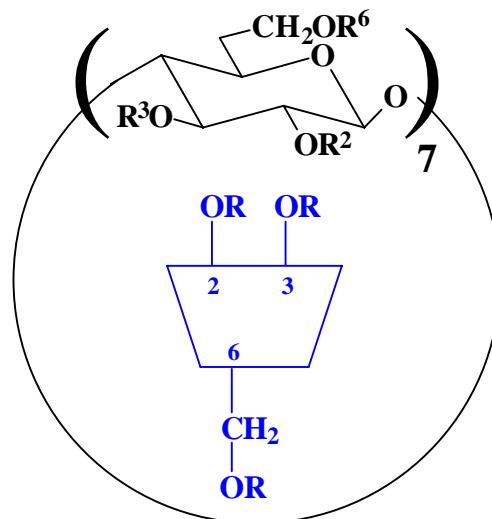
Zur kapillarelektrophoretischen Trennung der NIC-Derivate des Fenoterols im Kapillarzonenelektrophorese-Modus (CZE) wurden neben den zwei nativen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrinen folgende  $\beta$ -CD-Derivate als chirale Selektoren verwendet: Dimethyl- $\beta$ -CD, Trimethyl- $\beta$ -CD, Hydroxypropyl- $\beta$ -CD, carboxymethyliertes  $\beta$ -CD und  $\beta$ -CD-phosphat.

Im micellaren elektrokinetischen Chromatographie-Modus (MEKC) kamen folgende chirale Selektoren zum Einsatz: Natriumcholat, Natriumdeoxycholat, Natriumtaurocholat und

Natriumtaurodeoxycholat als Vertreter der Gruppe der Gallensäuren sowie die beiden nativen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine in Kombination mit Natriumdodecylsulfat.  
Die chirale Trennung der NIC-Derivate des Fenoterols gelang nicht.

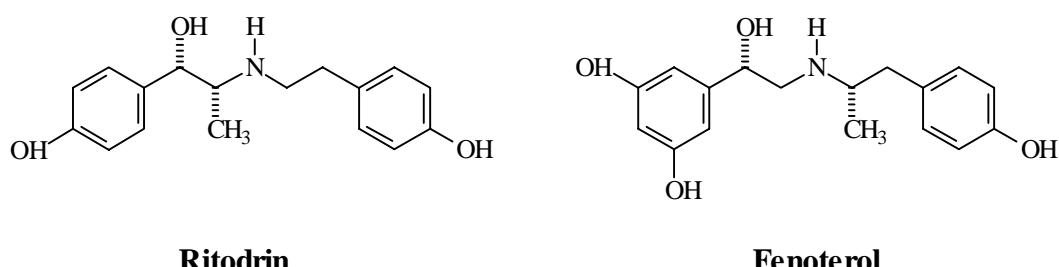
Für das Fenoterol wurden im CZE-Modus mit  $\beta$ -CD und zwei seiner Derivate (TM-und HP- $\beta$ -CD) Trennungen erzielt (Tab.4, Abb.35). Das strukturell nahe verwandte Ritodrin (Abb.36) konnte bei den Trennversuchen nur mit HP- $\beta$ -CD chiral aufgetrennt werden.

	$\beta$ -CD	TM- $\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD
$R^2$	-H	-CH <sub>3</sub>	-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OH
$R^3$	-H	-CH <sub>3</sub>	-H
$R^6$	-H	-CH <sub>3</sub>	-H
DS (Gruppe/ Ring)	-	14	$\sim 4$



**Tab.4.** Substituenten an C-Position 2, 3 und 6 und durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS) der  $\beta$ -Cyclodextrin-Moleküle, die erfolgreich zur Trennung der Enantiomere des Fenoterols eingesetzt wurden.

**Abb.35.** Schematische Darstellung der Struktur von  $\beta$ -Cyclodextrinen. Innen: Torroidstruktur. In Position 2, 3 und 6 sind die jeweiligen Substituenten eingeführt; außen: Zuckerbausteinstruktur. Im  $\beta$ -Cyclodextrin-Molekül sind 7 Glucosederivateinheiten miteinander verknüpft.

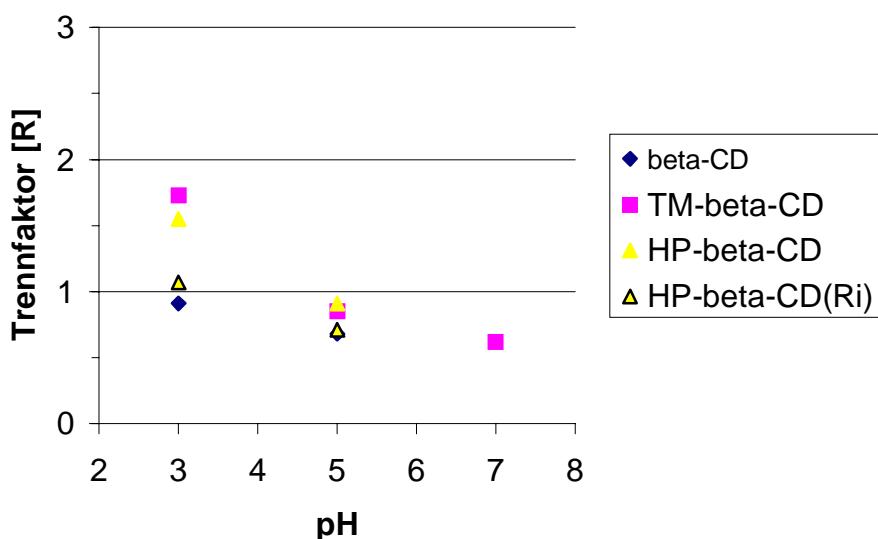


**Abb.36.** Struktur der beiden Wirkstoffe, die mit dem Einsatz von  $\beta$ -Cyclodextrinen im CZE-Modus erfolgreich chiral aufgetrennt werden konnten.

### 3.6.2 Optimierung der chiralen Trennung mit Cyclodextrinen in der CZE

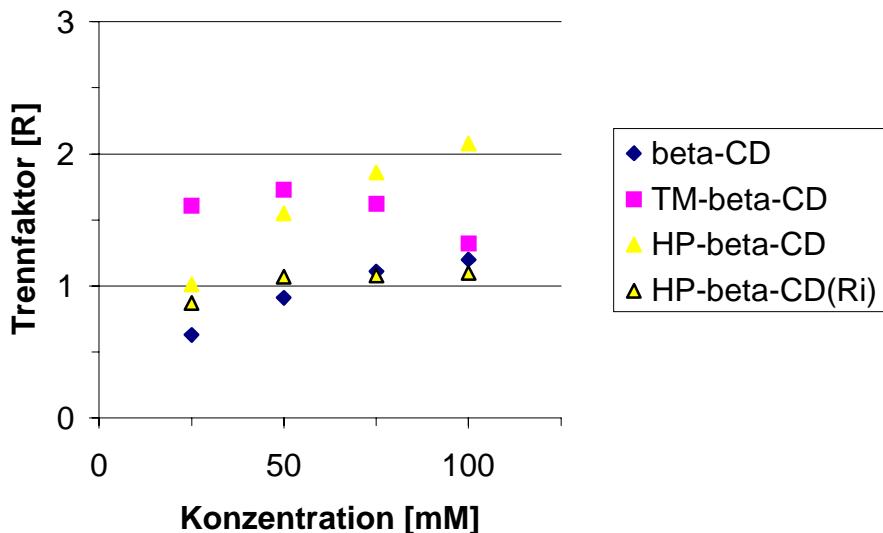
Zur Optimierung der chiralen Trennungen von Fenoterol wurden pH-Wert, Phosphat-Pufferstärke und Konzentration der eingesetzten Cyclodextrine so variiert, daß ein hoher Trennfaktor (R) erzielt werden konnte.

Zu Beginn wurde die **pH-Abhängigkeit** der Trennung mit verschiedenen chiralen Selektoren (5mM) bei drei unterschiedlichen pH-Werten des eingesetzten Phosphatpuffers (pH 3, 5 und 7) im Hintergrundelektrolyten (BGE) untersucht. Mit steigendem pH-Wert verschlechterte sich die chirale Trennung sowohl des Fenoterols als auch des Ritodrins (Abb.37). Bei einem pH-Wert von 3 sind die höchsten Trennfaktoren zu verzeichnen ( $R=0,91$  mit  $\beta$ -CD,  $R=1,73$  mit TM- $\beta$ -CD,  $R=1,55$  (Fenoterol) bzw.  $R=1,07$  (Ritodrin) mit HP- $\beta$ -CD). Diese nehmen bei einem gewählten pH-Wert von 5 ab ( $R=0,68$  mit  $\beta$ -CD,  $R=0,85$  mit TM- $\beta$ -CD,  $R=0,91$  (Fenoterol) bzw.  $R=0,71$  (Ritodrin) mit HP- $\beta$ -CD) und bei pH 7 ist nur noch mit TM- $\beta$ -CD eine Antrennung ( $R=0,62$ ) zu erzielen. Für die weiteren Optimierungsschritte wurde ein BGE-pH-Wert von 3 gewählt.



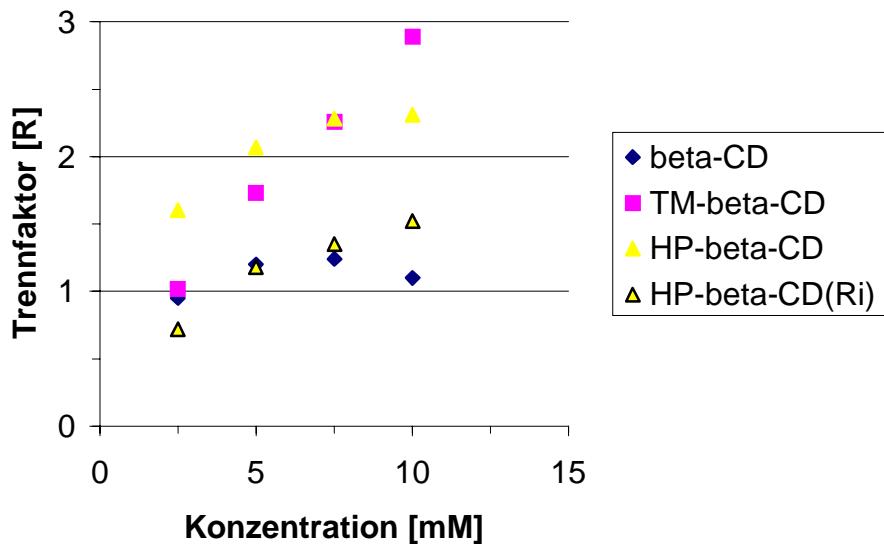
**Abb.37.** Einfluß des pH-Wertes auf die chirale Trennung von Fenoterol und Ritodrin (Ri) im CZE-Modus. Hydrodynamische Injektion einer 100  $\mu$ g/mL-Probenlösung. BGE: 5 mM des jeweiligen chiralen Selektors in Phosphatpuffer (50 mM) bei unterschiedlichen pH-Werten gelöst. Elektrophoretische Bedingungen: Spannung +30 kV, Temperatur 20°C.

Als nächstes wurde der Einfluß der **Ionenstärke** des Phosphatpuffers (25 mM bis 100 mM) auf die chirale Trennung untersucht (Abb.38). Die Trennfaktoren der Enantiomere des Fenoterols und des Ritodrins erhöhten sich mit Zunahme der Konzentration des Phosphatpuffers bei Einsatz von  $\beta$ - und HP- $\beta$ -CD (5 mM) als chirale Selektoren stetig und erreichten bei Wahl eines 100 mM-Phosphatpuffers R-Werte von 1,2 und 2,08 (Fenoterol) bzw. 1,1 (Ritodrin). Bei Einsatz von TM- $\beta$ -CD als chiralem Selektor (5 mM) nahm die Auf trennung mit steigender Pufferkonzentration bis zu einem Maximalwert bei 50 mM ( $R=1,73$ ) zu, fiel dann aber wieder ab ( $R=1,62$  bei 75 mM,  $R=1,32$  bei 100 mM). Im folgenden wurden für die jeweiligen Selektoren die Pufferkonzentrationen mit den höchsten Trennfaktoren gewählt.

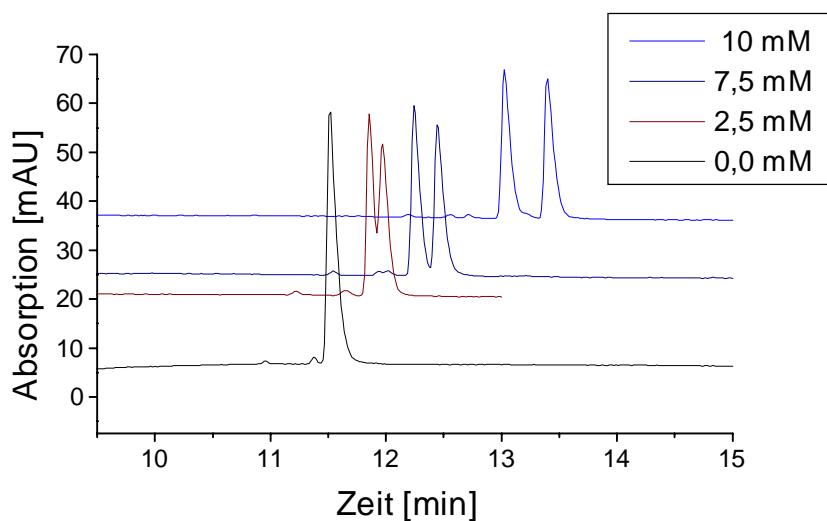


**Abb.38.** Einfluß der Ionenstärke des Puffers auf die chirale Trennung von Fenoterol und Ritodrin (Ri) im CZE-Modus. Hydrodynamische Injektion einer 100 µg/mL-Probenlösung. BGE: 5 mM des jeweiligen chiralen Selektors in unterschiedlichen Phosphatpuffer-Konzentrationen (pH 3,0) gelöst. Elektrophoretische Bedingungen: Spannung +30 kV, Temperatur 20°C.

Zuletzt wurde der Einfluß der **Konzentration** des eingesetzten chiralen Selektors auf die Trennung in einem Konzentrationsbereich bis zu 10 mM untersucht (Abb.39). Bei Einsatz von  $\beta$ -CD und HP- $\beta$ -CD ergab sich mit steigender Konzentration des Selektors zunächst eine Verbesserung der Trennung bis hin zu einem Optimum ( $\beta$ -CD: 7,5 mM,  $R=1,24$ ; HP- $\beta$ -CD: 10 mM,  $R=2,31$  für Fenoterol bzw.  $R=1,52$  für Ritodrin). Bei Einsatz von 10 mM  $\beta$ -CD nimmt der Trennfaktor dann wieder ab ( $R=1,1$ ). Bei Einsatz des TM- $\beta$ -CD als chiralen Selektor verhalten sich Konzentration und Trennfaktor im untersuchten Konzentrationsbereich linear zueinander. Die Trennung der Enantiomere des Fenoterols bei Einsatz von 10 mM ( $R=2,89$ ) ist suboptimal (Abb.40). Zu beachten ist in diesem Elektropherogramm, daß sowohl beim Fenoterol-Hauptpeak als auch beim kurz vor ihm auftauchenden Nebenpeak (mutmaßliches Zersetzungsprodukt) die verbesserte chirale Trennung bei der Konzentrationserhöhung des Selektors mit einer verlängerten Migrationszeit einher geht.



**Abb.39.** Einfluß der Konzentration der eingesetzten  $\beta$ -Cyclodextrine auf die chirale Trennung von Fenoterol und Ritodrin (Ri) im CZE-Modus. Hydrodynamische Injektion einer 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Probenlösung. BGE: Die jeweiligen chiralen Selektoren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in 100 mM (50 mM bei Einsatz von TM- $\beta$ -CD) Phosphatpuffer des pH-Wertes 3 gelöst. Elektrophoretische Bedingungen: Spannung +30 kV, Temperatur 20°C.

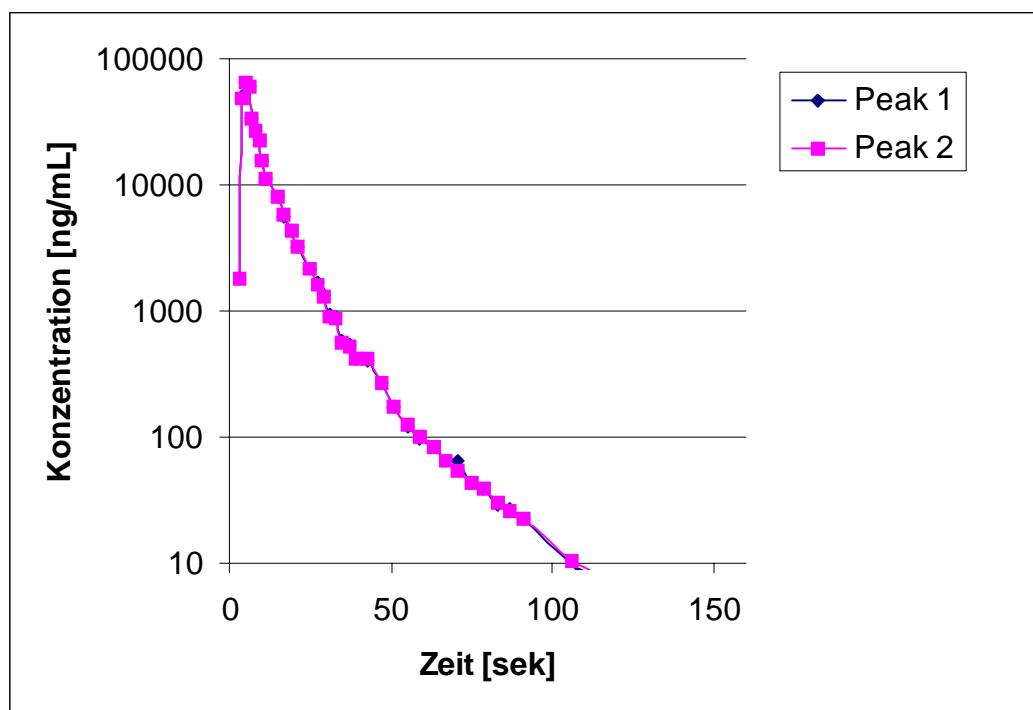


**Abb.40.** Chirale Trennung von Fenoterol (0,1 mg/mL) im CZE-Modus. Hydrodynamische Injektion einer 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ -Probenlösung. BGE: 75 mM Phosphatpuffer pH 3,0. Chiraler Selektor: TM- $\beta$ -CD. Elektrophoretische Bedingungen: Spannung +30 kV, Temperatur 20°C, UV-Detektion [nm]: 200.

### 3.7 Perfusionsversuche am Rattenherzen

Die Enantiomere des Fenoterols konnten als NIC-Derivate quantitativ verlässlich jeweils bis zu einer Konzentration von 10 ng/mL in den Perfusatversuchen am Rattenherzen verfolgt werden. Das entsprach einem Zeitfenster von bis zu 2 min bei Bolusinjektion von 100  $\mu$ L einer 1 mg/mL-Fenoterolprobe und den gewählten Flußraten. Der Gehalt an Fenoterol im Gewebe des Rattenherzens nach der Perfusion lag bei 0,6 %. Bei den untersuchten Tieren konnten weder im Perfusat noch im Rattenherzen stereospezifischen Unterschiede festgestellt werden.

Abbildung 41 gibt den Konzentrations-Zeit-Verlauf der Enantiomere (a,b) bei Herzperfusion am Versuchstier R1 wieder. Nach Gegenüberstellung der eingesetzten Fenoterolmenge (100  $\mu$ g) und der wiedergefundenen Menge (56  $\mu$ g ermittelt aus AUC der Auslaufkurve und 52  $\mu$ g aus dem Perfusatvolumen, das nicht den vorgesehenen Weg von der Aorta zur Pulmonararterie fand) wurde eine Extraktionsausbeute von 91,4 % ermittelt.



**Abb.41.** Konzentrations-Zeit-Verlauf der Fenoterol-Enantiomere als NIC-Derivate bei Herzperfusion am Versuchstier R1. Bolusinjektion 100  $\mu$ g.

Die ermittelten pharmakokinetischen Kenngrößen für Fenoterol sind in den Tabellen 5-8 aufgelistet. Die fluorimetrisch ermittelten Konzentrationen wurden sowohl mit der von Kuhlmann (1998) entwickelten achiralen (Versuchstiere R2-R6 und R8-R11) als auch mit der neuen chiralen Methode (Versuchstiere R1, R12) bestimmt.

Unter Zuhilfenahme algorithmischer Berechnungen konnten stereoselektive Unterschiede nicht festgestellt werden. Die Verweildauer der Enantiomere lag bei 8,1 sek (Tab.5), die mittlere Verweildauer rac. Fenoterols bei 9,5 sek. Bei gleichzeitiger Propranolol-Verabreichung (Tab.6) wurde eine Verweildauer der Enantiomere von 10,5 sek und für rac. Fenoterol von 13,4 sek ermittelt. Das Verteilungsvolumen der Enantiomere belief sich auf 0,97 mL, bei gleichzeitiger Propranololzugabe auf 1,13 mL. Auf das Frischgewicht des Herzens gerechnet ergaben sich fast identische Werte von 0,97 bzw. 0,99 mL/g.

Versuch	AUCn	AUC	MTT	CV <sup>2</sup>	Q	V	G	V <sub>g</sub>
R2	1137500	1138500	7,57	0,90	5,00	0,63	1,05	0,60
R3	1266500	1267100	9,32	1,11	7,60	1,18	1,10	1,07
R4	1708500	1709400	9,59	0,97	5,60	0,89	1,18	0,76
R5	1845000	1846300	11,40	0,84	6,50	1,23	1,15	1,07
<b>MW</b>	<b>1489375</b>	<b>1490325</b>	<b>9,47</b>	<b>0,96</b>	<b>6,18</b>	<b>0,98</b>	<b>1,12</b>	<b>0,88</b>
SA	294946	295094	1,36	0,10	0,98	0,24	0,05	0,20
R1a	380770	380840	8,10	1,40	7,25	0,97	1,01	0,97
R1b	377540	377610	8,09	1,40	7,25	0,97	1,01	0,97

**Tab.5.** Algorithmische Berechnungen (Purves) pharmakokinetischer Parameter von rac. Fenoterol und seiner Enantiomere (R1) bei isoliert perfundierten Rattenherzen als Organmodell mit Katheterfunktion. AUCn: Fläche unter der Kurve bis zum Meßpunkt n; AUC: Fläche unter der Kurve extrapoliert bis zu  $c(t)=0$ ; MTT: mittlere Transitzeit [sek]; CV<sup>2</sup>: relative Dispersion; Q: effektive Katheterflußrate [mL/min]; V: Verteilungsvolumen [mL]; V<sub>g</sub>: Verteilungsvolumen bezogen auf Frischgewicht [mL/g]; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung.

Versuch	AUCn	AUC	MTT	CV <sup>2</sup>	Q	V	G	V <sub>g</sub>
R8	1150500	1151200	14,77	0,56	7,60	1,87	1,10	1,70
R9	1304300	1305100	13,28	0,72	6,60	1,46	1,10	1,33
R10	1302800	1304000	11,99	1,01	6,60	1,31	1,10	1,20
R11	1462300	1463650	13,55	0,61	5,60	1,26	1,29	0,98
<b>MW</b>	<b>1304975</b>	<b>1305987</b>	<b>13,40</b>	<b>0,73</b>	<b>6,60</b>	<b>1,48</b>	<b>1,15</b>	<b>1,30</b>
SA	110248	110477	0,99	0,17	0,71	0,24	0,08	0,26
R12a	446740	447110	10,53	1,25	6,50	1,14	1,15	0,99
R12b	439190	439570	10,51	1,26	6,50	1,13	1,15	0,99

**Tab.6.** Algorithmische Berechnungen (Purves) pharmakokinetischer Parameter von Fenoterol und seinen Enantiomeren (R12) bei isoliert perfundierten Rattenherzen als Organmodell mit Katheterfunktion sowie mit Propranolol. AUCn: Fläche unter der Kurve bis zum Meßpunkt n; AUC: Fläche unter der Kurve extrapoliert bis zu  $c(t)=0$ ; MTT: mittlere Transitzeit [sek]; CV<sup>2</sup>: relative Dispersion; Q: effektive Katheterflußrate [mL/min]; V: Verteilungsvolumen [mL]; V<sub>g</sub>: Verteilungsvolumen bezogen auf Frischgewicht [mL/g]; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung.

Die mit Hilfe modellierter Berechnungen (2-fach inverse Gaußfunktion, Weiss, 1996) ermittelten pharmakokinetischen Kenngrößen für Fenoterol ohne und bei Zusatz von Propranolol sind den Tabellen 7 bzw. 8 zu entnehmen. Auch hier waren stereoselektive Unterschiede nicht zu beobachten. Weder die Verweildauer der Enantiomere und rac. Fenoterols (5,7 bzw. 5,8 sek) noch die Verteilungsvolumina im steady-state (0,7 bzw. 0,74 mL) unterschieden sich. Bei gleichzeitiger Propranolol-Verabreichung lag die mittlere Verweildauer rac. Fenoterols bei 14,3 sek und die der Enantiomere bei 4,9 sek, das steady-state-Verteilungsvolumen bei 1,66 bzw. 0,54 mL. Das entsprach bezogen auf das Frischgewicht Werten von 1,5 bzw. 0,47 mL/g.

Nr.	R <sup>2</sup>	P	MT <sub>1</sub>	MT <sub>2</sub>	CV <sup>2</sup> <sub>1</sub>	CV <sup>2</sup> <sub>2</sub>	Q	MTT	CV <sup>2</sup>	V <sub>ss</sub>	V <sub>g</sub>	G
R1a	0,95	0,23	12,31	3,77	0,91	0,15	7,25	5,76	1,41	0,70	0,69	1,01
R1b	0,95	0,23	12,25	3,74	0,92	0,14	7,25	5,72	1,43	0,69	0,68	1,01
R3	0,93	0,23	10,64	4,38	0,57	0,27	7,60	5,82	0,77	0,74	0,67	1,10

**Tab.7.** Modellierte Berechnungen pharmakokinetischer Parameter von Fenoterol und seinen Enantiomeren (R1) bei isoliert perfundierten Rattenherzen als Organmodell mit Katheterfunktion.

R<sup>2</sup>: goodness of fit; P: Wichtungsfaktor; MT<sub>1</sub>: mittlere Transitzeit für 1. inverse Gaußfunktion [sek]; MT<sub>2</sub>: mittlere Transitzeit für 2. inverse Gaußfunktion [sek]; CV<sup>2</sup><sub>1</sub>: relative Dispersion für 1. inverse Gaußfunktion; CV<sup>2</sup><sub>2</sub>: relative Dispersion für 2. inverse Gaußfunktion; Q: effektive Katheterflußrate [mL/min]; MTT: mittlere Transitzeit [sek]; CV<sup>2</sup>: relative Dispersion; V<sub>ss</sub>: Verteilungsvolumen im steady-state [mL]; V<sub>g</sub>: Verteilungsvolumen bezogen auf Frischgewicht [mL/g]; G: Frischgewicht [g].

Nr.	R <sup>2</sup>	P	MT <sub>1</sub>	MT <sub>2</sub>	CV <sup>2</sup> <sub>1</sub>	CV <sup>2</sup> <sub>2</sub>	Q	MTT	CV <sup>2</sup>	V <sub>ss</sub>	V <sub>g</sub>	G
R8	0,93	0,68	19,09	7,28	0,52	0,07	7,60	15,43	0,69	1,95	1,78	1,1
R9	0,97	0,51	20,31	7,26	0,57	0,09	6,60	13,95	0,86	1,54	1,40	1,1
R10	0,97	0,28	26,55	8,34	0,48	0,29	6,60	13,58	0,98	1,49	1,36	1,1
<b>MW</b>	<b>0,96</b>	<b>0,49</b>	<b>21,98</b>	<b>7,63</b>	<b>0,52</b>	<b>0,15</b>	<b>6,93</b>	<b>14,32</b>	<b>0,84</b>	<b>1,66</b>	<b>1,51</b>	<b>1,1</b>
<b>SA</b>	<b>0,02</b>	<b>0,16</b>	<b>3,27</b>	<b>0,50</b>	<b>0,04</b>	<b>0,10</b>	<b>0,47</b>	<b>0,80</b>	<b>0,12</b>	<b>0,21</b>	<b>0,19</b>	<b>0</b>
R12a	0,96	0,21	11,64	3,07	1,47	0,09	6,50	4,95	2,33	0,54	0,47	1,15
R12b	0,97	0,11	18,24	3,19	0,87	0,13	6,50	4,86	2,37	0,53	0,46	1,15

**Tab.8.** Modellierte Berechnungen pharmakokinetischer Parameter von Fenoterol bei isoliert perfundierten Rattenherzen als Organmodell mit Katheterfunktion sowie mit Propranolol.

R<sup>2</sup>: goodness of fit; P: Wichtungsfaktor; MT<sub>1</sub>: mittlere Transitzeit für 1. inverse Gaußfunktion [sek]; MT<sub>2</sub>: mittlere Transitzeit für 2. inverse Gaußfunktion [sek]; CV<sup>2</sup><sub>1</sub>: relative Dispersion für 1. inverse Gaußfunktion; CV<sup>2</sup><sub>2</sub>: relative Dispersion für 2. inverse Gaußfunktion; Q: effektive Katheterflußrate [mL/min]; MTT: mittlere Transitzeit [sek]; CV<sup>2</sup>: relative Dispersion; V<sub>ss</sub>: Verteilungsvolumen im steady-state [mL]; V<sub>g</sub>: Verteilungsvolumen bezogen auf Frischgewicht [mL/g]; G: Frischgewicht [g]; MW: Mittelwert; SA: Standardabweichung.

## 4. Diskussion

### 4.1 Fluorogene Derivatisierung

Die Einführung einer chromophoren oder fluorophoren Gruppe zur Verbesserung der Detektierbarkeit von Analyten verschiedener Stoffklassen in geringen Konzentrationsbereichen ist ein häufig praktizierter analytischer Schritt.

Die Kombination chromatographischer Trennverfahren wie der HPLC mit Fluoreszenzdetektion zählt neben RIA und HPLC- bzw. GC-MS immer noch zu den empfindlichsten und selektivsten Analysenverfahren der Gegenwart. Auch kapillarelektrophoretisch ist in neuerer Zeit mit der laserinduzierten Fluoreszenzdetektion (LIF) der Weg in diese Richtung geebnet worden (Chan et al., 1993a,b). Die erzielbare hohe Selektivität bei der Nutzung der Fluoreszenzdetektion ist vor allem in der Tatsache der Verwendung einer spezifischen Excitations- und Emissionswellenlänge begründet.

#### 4.1.1 Derivatisierung mit achiralen Reagenzien

Bei der chiralen Derivatisierung werden die Analyt-Enantiomere nach Umsetzung mit einem chiralen Reagenz in Diastereomere umgewandelt. Das hat den Vorteil, daß kostengünstigere und methodisch leichter zu handhabende achirale Trennphasen eingesetzt werden können.

Dem stehen eine Reihe von Risiken gegenüber. Zum einen ist die Möglichkeit von Racemisierungen während der Derivatisierung aufgrund der ungenügenden optischen Reinheit des chiralen derivatisierenden Reagenzes in Betracht zu ziehen. Das kann eine Fehlerquelle in der Genauigkeit der Enantiomeren-Bestimmung sein. So fanden Silber et al. (1980), daß die Reinheit des kommerziell bezogenen (-)-N-Trifluoroacetylprolylchlorids bei der Umsetzung mit Propranolol-Enantiomeren zwischen 85-96 % variierte.

Enantiomere können unterschiedliche Kinetiken während der Reaktion mit einem weiteren chiralen Molekül aufweisen. Das führt zu Unterschieden in der Reaktionsrate und somit spiegelt das Endverhältnis der Diastereomere nicht das Ausgangsverhältnis der Enantiomere wider.

Des weiteren sind die spektralen Eigenschaften von Diastereomeren nicht notwendigerweise identisch. Vor allem bei der Fluoreszenzdetektion kann ein Unterschied in der gemessenen Peakfläche für das derivatisierte Racemat in der unterschiedlichen Detektorsignalstärke für die beiden Diastereomere begründet liegen. So wies das (S)-Propranolol-Diacetyltaursäureanhydrid bei der Umsetzung mit (R,R)-O,O-Diacetyltaursäure ein 20 % geringeres Signal auf als das Derivat des anderen Enantiomers beim enantioselektiven Propranolol-Drugmonitoring in menschlichem Plasma (Lindner et al., 1989).

Die achirale Derivatisierung weist auf der anderen Seite keine der Nachteile der chiralen Derivatisierung auf. Hier bleiben bei der Umsetzung der Analyt-Enantiomeren mit dem achiralen Reagenz die Enantiomeren-Verhältnisse bestehen, da kein weiteres chirales Zentrum eingefügt wird. Das ist der Grund, warum anfangs mit 9-Fluorenylmethylchloroformiat (FMOC) und Naphthylisocyanat (NIC) zwei achirale Derivatisierungsreagenzien bei der Methodenentwicklung in die engere Wahl genommen wurden. Sie sind fluorogene Vertreter der Chloroformate bzw. der Isocyanate, zwei Derivatisierungsreagenzklassen, die schon längere Zeit fest etabliert sind. Die konjugierten Systeme im Molekül dieser Reagenzien haben das Potential, neben der Detektion auch zur chiralen Trennung beitragen zu können. Die Enantiomere des entstehenden Derivates mit

eingefügter fluorophorer Gruppe können aufgrund ihrer identischen physiko-chemischen Eigenschaften nur in chiraler Umgebung aufgetrennt werden (4.3.).

Die zahlreichen sich anschließenden Beispiele für die Umsetzungen von Analyten mit FMOC bzw. NIC ließen eine vereinfachte Methodenentwicklung für das Fenoterol erhoffen.

Der Einsatz des als Schutzgruppe bei der Synthese von Peptiden verwendeten 9-fluorenylmethylchloroformiates (FMOC) als fluoreszierendes Reagenz zur sensitiven achiralen Analyse von Substanzen ist aufgrund seiner Vorteile wie schneller und quantitativer Umsetzung von primären und sekundären Aminen und Gewinnung stabiler fluoreszierender Derivate in der LC (Einarssen et al., 1983, 1986; Näsholm et al., 1987; Maeder et al., 1992; Hogendoorn et al., 1999), der SFC (Veuthey und Haerdi, 1990) und der CE (Albin et al., 1991; Chan et al., 1993a,b; Bank et al., 1996) häufig zu finden. Die Automatisierungsmöglichkeit ist ein weiterer Vorteil bei der Derivatisierung von Aminen mit FMOC in der LC (Maisch et al., 1994; Kirschbaum et al., 1994).

Eine chirale Auftrennung der FMOC-Derivate von Aminosäuren gelingt mit dem Einsatz einer ChiraDex  $\gamma$ -Säule (Battermann, 1993) in der LC. Ob auch eine Trennung der Enantiomere des Aminoalkohols Fenoterol als FMOC-Derivate auf dieser CSP gelingt, sollte im Anschluß an die erfolgreich durchgeführte Derivatisierung untersucht werden (4.3.).

Ein sensitivs achirales Bestimmungsverfahren für Alkohole durch deren Umsetzung mit **Isocyananten** zu fluoreszierenden Urethanen in der DC etablierten Wintersteiger und Wenninger-Weinzierl (1981) und in der HPLC Wintersteiger et al. (1982).

Der Bestimmung aliphatischer Amine in der Luft widmen sich Andersson et al. (1984). Nach Umsetzung der flüchtigen Amine mit NIC wurden die Naphthylharnstoffe auf einer Waters C-18-RP-Säule getrennt.

Für die sensitive Bestimmung des Antiarrhythmikums Trecetilid in menschlichem Plasma schließlich wurden von Buist et al. (1998) zwei Methoden entwickelt, eine davon beinhaltete die Umsetzung mit NIC und anschließender Trennung auf einer Metachem 5 CN/E Cyano-Säule.

Die Nutzung von NIC als Derivatisierungsreagenz in der chiralen HPLC ist aus zwei Arbeiten bekannt. Hsu und Walters (1995) setzen die chiralen Antiarrhythmika Ibutilid und Artilid nach Extraktion aus biologischen Flüssigkeiten mit NIC um und trennen die entstandenen Derivate auf einer Pirkle-Phase (3,5-Dinitrobenzoyl-D-Phenylglycin-Säule).

Kennedy und Weigel (1992) gelingt es, die Naphthylurethane von zahlreichen 2,3-Epoxy-1-propanolen (Glycidole) auf einer Chiralcel OD-Säule im NP-Modus aufzutrennen. Daneben sind auch direkte Trennungen von Glycidol-Stereoisomeren ohne Derivatisierung auf einer Chiralcel OB und die indirekte Trennung der diastereomeren NEIC-Derivate auf einer Zorbax NH<sub>2</sub>-Säule beschrieben.

In Anlehnung an diese Arbeit sollte die Möglichkeit der Trennung der Harnstoff-Derivate von Fenoterol nach seiner erfolgreichen Umsetzung mit NIC auf dieser CSP untersucht werden (4.3.).

Das fluoreszierende Reagenz N-(Chloroformyl)carbazol zur Markierung von Aminosäuren und organischen Säuren und deren Trennung stellen Allenmark (1990) sowie Allenmark und Andersson (1991, 1992) vor. Die Derivate können achiral auf konventionellen RP-Phasen getrennt oder chiral auf einer Resolvosil-BSA-Kieselgel-Säule erfaßt werden. Die Derivate von einigen Aminosäuren zeigen im Vergleich zu ihren FMOC-Derivaten eine höhere Fluoreszenzintensität und kürzere Retentionszeiten. Die Harnstoffbrücke macht die Derivate stabiler als die basensensitive FMOC-Gruppe. Auch Kuhlmann et al. (1998) bedienen sich der starken Eigenfluoreszenz der Carbazol-Gruppe bei der HPLC-Bestimmung des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Diclofenac, aus dem nach photochemischer Online-Nachsäulenderivatisierung die fluorimetrisch detektierbare Carbazol-1-essigsäure entsteht. Erst in jüngster Zeit gelangen Kramer und Blaschke (2001) die Umsetzung von Fenoterol mit N-(Chloroformyl)carbazol und die sich anschließender achirale Analyse.

### 4.1.2 Derivatisierung mit chiralen Reagenzien

Eine Alternative zum Einsatz einer chiralen Säule für die Analyse der Fenoterol-Enantiomere stellt die Einführung eines weiteren chiralen Zentrums in das Molekül und die sich anschließende Diastereomeren-Trennung auf achiralen Phasen dar.

Der Einsatz von chiralem Naphthylethylisocyanat zur Diastereomeren-Trennung ist mit zahlreichen Beispielen in der Literatur belegt. Schon 1974 stellten Pirkle und Hoekstra drei Synthesewege vom kommerziell erworbenen *(R)*-(+)-1-(1-Naphthyl)ethylamin hin zum *(R)*-(-)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat vor mit der Intention, dieses chirale Derivatisierungsreagenz zur chromatographischen Trennung eines breiten Spektrums derivatisierbarer chiraler Substanzen (Alkohole,  $\alpha$ -Hydroxyester und Thiole) einzusetzen. Als Beispiel für eine erfolgreiche präparative Flüssigphasen-Trennung ist die Trennung der Urethan-Derivate des 1-(1-Naphthyl)trifluoroethanols (chirales Lösungsmittel) und die anschließende Rückgewinnung der Alkohol-Enantiomeren über eine Hydrolyse in ihrer Arbeit beschrieben. Michelsen et al. (1985) trennten einige natürlich vorkommende Glycerol-Derivate (Mono- und Di-Alkyl- und Diacyl-Glycerole) als ihre *(S)*-(+)-1-(1-Naphthyl)ethyl-Urethane in der NP-HPLC.

Die chirale Trennung der Harnstoffe des  $\beta$ -Blockers Betaxolol aus Blut nach seiner Umsetzung mit *(R)*-(-)-NEIC beschrieben Darmon und Thenot (1986). Die ebenfalls durchgeführte Derivatisierung mit *(S)*-(-)-Phenylethylisocyanat (PEIC) resultierte in Derivaten, die aufgrund der fehlenden fluorophoren Gruppe nicht an die Sensitivität der NEIC-Derivate (Detektionsgrenze 0,5 ng/mL) heranreichten.

Dunlop und Neidle (1987) trennten die D- und L-Paare einer Reihe von Aminosäuren nach Umwandlung in ihre (+)-Naphthylethylcarbamoyl-Derivate und RP-HPLC. Sie stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß das kommerziell verwendete (+)-NEIC Spuren seines (-)-Isomers enthält.

Matuszewski et al. (1990) trennen Anhydrase-Inhibitoren als potentielle Antiglaucom-Wirkstoffe als ihre *(S)*-(+)-Naphthylethyl-Harnstoff-Derivate auf einer Beckman RP-8-Säule. In einer umfassenderen Studie beschäftigten sich Matuszewski et al. 1994 noch einmal mit der chiralen Trennung der 4 Stereoisomere eines Anhydrase-Inhibitors und seinen deethylierten Isomeren-Metaboliten. Neben der Umsetzung mit *(S)*-(+)-NEIC und der anschließenden Trennung auf einer chiralen *(R)*-N-(3,5-Dinitrobenzoyl)phenylglycin-Säule (DNBPG) unter NP-Bedingungen (unvollständige Trennung der diastereomeren Harnstoff-Derivate unter achiralen chromatographischen Bedingungen) gelang die Basislinientrennung der Isomeren als auch der Stereoisomeren nach NEIC-Derivatisierung und NP-Chromatographie mit in Serie geschalteten achiralen Nitrophenyl-Säule und einer chiralen *(S)*-(3,5-Dinitrobenzoyl)leucin-Säule DNBL. In Vorversuchen stellten die Autoren fest, daß nach Derivatisierung mit NIC die Isomeren nicht effektiv auf den getesteten Pirkle-Säulen getrennt werden konnten und sie somit den indirekten Trennweg einschlugen.

Die NP-HPLC der Enantiomeren des Antiarrhythmikums Profafenon in menschlichem Plasma beschrieb Mehvar (1990) mittels Derivatisierung mit *(R)*-(-)-NEIC und Trennung auf einer Whatman Partisil-5 Kieselgel-Säule.

Carr et al. (1991) entwickelten für das Antiarrhythmikum Tocainid eine NP-HPLC nach Umsetzung mit *(S)*-(+)-NEIC und Trennung der Diastereomere auf einer Whatman Partisil 5-Kieselgel-Säule.

Zur Bestimmung der Enantiomere des aminoalkoholischen  $\beta$ -Blockers Tertanolol in biologischen Flüssigkeiten setzten Lave et al. (1991) *(S)*-(+)-NEIC ein. Die Harnstoff-Derivate konnten auf einer Altex Ultrasphere XLODS im RP-Modus getrennt werden. Vorversuche zeigten, daß eine Trennung nach Derivatisierung mit 2,3,4,6-Tetra-O-Acetylglucopyranosyl-Isothiocyanat (GITC) nicht gelingt und die Derivate des *(S)*-(-)-

Phenylethylisocyanats nur bis zu einer Konzentration von 100 ng/mL detektiert werden konnten.

Peyton et al. (1991) bestimmten die Enantiomeren-Konzentrationen des als Antidepressivums eingesetzten Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitors (SSRI) Fluoxetin und seines Metaboliten Norfluoxetin in menschlichem Plasma nach Derivatisierung mit (*R*)-NEIC auf einer Jones Apex Kieselgel-Säule im NP-HPLC-Modus.

Laethem et al. (1993) nutzten (*S*)-(-)-NEIC zur Derivatisierung des rac.  $\beta$ -Blockers Oxprenolol aus Rattenplasma.

Freitag et al. (1993) entwickelten eine NP-HPLC (Phenomenex Partisil 5-Säule) für das Antiarrhytmikum Mexiletin und zwei seiner Metabolite nach Derivatisierung mit (*S*)-(+)-NEIC nach Extraktion aus mikrobiellen Fermentationsmedien.

Die Quantifizierung der Isomere des  $\beta$ -Blockers Nadolol in menschlichem Blut erreichten Belas et al. (1995) als Naphthylethylharnstoffe nach Derivatisierung mit (*R*)-(-)-NEIC auf einer Beckman C-18-ODS-Säule im RP-Modus. Vorversuche mit (-)-Menthylchloroformiat ((-)-MCF) zeigten das Auftreten multipler Derivate in Abhängigkeit von der Reagenzkonzentration und den Reaktionsbedingungen. Deshalb wurde dieser Weg nicht weiter verfolgt.

Zur chiralen Bestimmung des zur Malaria-Prophylaxe und Behandlung eingesetzten Wirkstoffes Mefloquin in menschlichem Plasma, Urin und Blut entwickelten Souri et al. (1997) eine NP-HPLC. Die (*S*)-(+)-Naphthylethylharnstoffe wurden auf einer Phenomenex Partisil 5 ODS-Säule getrennt.

Zur chiralen Analyse von Aminosäuren wurde anstelle von FMOC chirales (+)-oder (-)-1-(9-Fluorenyl)ethylchloroformiat (FLEC) eingesetzt. Die beiden Moleküle unterscheiden sich nur dadurch, daß ein Wasserstoffatom der CH<sub>2</sub>-Gruppe im FMOC-Molekül durch eine Methylgruppe ersetzt wurde und so ein Chiralitätszentrum entsteht. Der Einsatz von FLEC ist in der Literatur sowohl im anschließenden LC- (Einarssen et al., 1987; Sanchez et al., 1988; Engewald et al., 1990; Lai, 1990; Rosseel et al., 1991; Chen et al., 1994; Vogt et al., 1995; Gunaratna und Kissinger, 1998; Fransson und Ragnarsson, 1998) als auch CE-Modus (Vogt et al., 1995) zu finden.

Nach der erfolglosen Suche geeigneter chiraler flüssigchromatographischer Trennbedingungen für die FMOC-Derivate des Fenoterols könnte sich der Weg über die Trennung der Diastereomere nach Umsetzung mit FLEC und sich anschließenden Studien als fruchtbar erweisen.

Nach Vorbild der Arbeiten von Wan et al. (1995) zur chiralen Trennung von Aminosäure-Gemischen in der CE ist zukünftig eine eingehende Studie zur chiralen CE-Trennung von Aminoalkoholen nach Umsetzung mit FMOC bzw. FLEC naheliegend.

Da Isothiocyanate gegenüber Wasser wesentlich unempfindlicher sind als die Sauerstoffanaloga, wird mit ihnen häufig auch in Wasser als Lösungsmittel gearbeitet (Becker, 1993). Ein Vergleich zwischen NIC und NITC bzw. NEIC und NEITC als Derivatisierungsreagenzien hinsichtlich der Umsetzungsbedingungen und der chiralen Trennung der entstandenen Harnstoffe bzw. Thioharnstoffe im chromatographischen Prozeß scheint lohnenswert.

Als Beispiele für den Einsatz von Isothiocyanaten in der Wirkstoff-Analytik sollen zwei Arbeiten genannt sein. Die Arbeitsgruppe von Lindahl et al. (1993) verwendete einen mit Naphthylisothiocyanat (NITC) imprägnierten Luftfilter als Probennahme- und Derivatisierungseinheit zur achiralen Bestimmung flüchtiger primärer und sekundärer Amine in der Luft in der sich anschließenden RP-HPLC (Millipore Waters Nova-Pak C-18-Säule) mit UV-Detektion.

Pianezzola et al. (1989) gelang die Enantiomeren-Erfassung des endogenen Tetrahydroisochinolin-Alkaloids Salsolinol aus menschlichem Urin nach selektiver SPE mittels Phenylborsäure (PBA) -Kartuschen und Derivatisierung mit (*S*)-1-(1-

naphthyl)ethylisothiocyanat (NEITC) sowie einer anschließenden RP-Chromatographie (Millipore/Waters Novapak-C-18-Säule) mit elektrochemischer Detektion. NEITC koppelte dabei selektiv an den Piperidylstickstoff und nicht an die auch vorhandenen phenolischen Hydroxylgruppen.

Nonsteroidale Entzündungshemmer aus der Gruppe der 2-Arylpropionsäuren wurden nach Aktivierung zu ihren Acylchloriden als chirale Reagenzien verwendet. Die Enantiomere des intensiv fluoreszierenden Benoxaprofens  $[(R,S)\text{-}2\text{-}(p\text{-Chlorophenyl})\text{-}\alpha\text{-}5\text{-Methylbenzoxazol}\text{-}\text{Essigsäure}]$  als Vertreter der  $\alpha$ -Alkyl- $\alpha$ -Arylessigsäuren wurden als stabile Fluoreszenzmarker zur Bestimmung chiraler Amine in biologischen Proben in der HPLC und DC eingesetzt (Weber et al., 1984). Neben Aminen wurde Benoxaprofen auch zur Markierung chiraler Alkohole für deren sich anschließende Trennung in HPLC und DC genutzt (Spahn et al., 1984). Die Detektionssensitivität lag im pikomolaren Bereich. Zur Enantiomeren-Bestimmung von  $\beta$ -Blockern im menschlichen Urin mittels DC kam  $(S)\text{-}(+)$  Benoxaprofenchlorid bei Pflugmann et al. (1987) zum Einsatz.

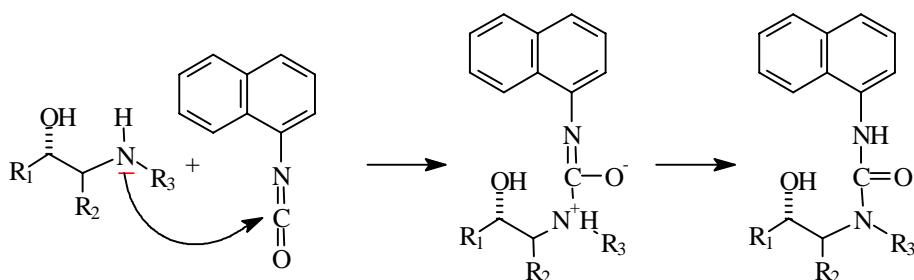
Ein weiterer Vertreter von 2-Arylpropionsäuren ist das Naproxen  $[(S)\text{-}(+)\text{-}6\text{-Methoxy-}\alpha\text{-Methyl-2-Naphthalinessigsäure}]$ , das als Enantiomer vermarktet wird, aber eine geringere Fluoreszenzintensität als das Benoxaprofen aufweist. Flunoxaprofen  $[(S)\text{-}(+)\text{-}(p\text{-Fluorophenyl})\text{-}\alpha\text{-Methyl-5-Benzoxazolessigsäure}]$  als dritter Vertreter weist aktiviert ebenfalls eine hohe Reaktivität zu Alkoholen und Aminen auf. Hier finden sich Detektionsgrenzen im unteren pikomolaren Bereich. Auch wenn ein vorangehender Aktivierungsschritt bei der Derivatisierung mit einer acylierenden Substanz erforderlich ist, bleibt die Nutzung dieser Gruppe chiraler fluoreszierender Reagenzien vielversprechend.

#### 4.1.3 Derivatisierung mit Isocyanaten

Als reaktionsfähige Carbonylverbindungen können Isocyanate bedingt durch die kumulierte Doppelbindung ( $\text{R-N=C=O}$ ) leicht nukleophile Reagenzien addieren. Sie bilden mit primären und sekundären Aminen Harnstoffe (Abb.42), mit Alkoholen Urethane und mit Wasser N-substituierte Carbamidsäuren, die unbeständig sind und in Kohlendioxid und Amin zerfallen. Die in der Literatur beschriebenen Reaktionsbedingungen zur Umsetzung von Analyten mit Isocyanaten sind nicht einheitlich.

Um eine schnelle quantitative NIC-Derivatbildung von Alkoholen zu erzielen, wurde von Wintersteiger und Wenninger-Weinzierl (1981) der Einfluß von **Katalysatoren** auf den Reaktionsverlauf untersucht. Die Autoren verwiesen auf die bekannte reaktionsbeschleunigende Wirkung von Metallsalzen, metallischem Natrium, Triethylendiamin (TED) und einer Anzahl anderer basischer Substanzen hin. Bei Einsatz von Triethylendiamin als Katalysator gelang es ihnen, primäre und sekundäre Alkohole innerhalb von 30 min und tertiäre Alkohole innerhalb von 2 h mit Isocyanaten in die entsprechenden N-Naphthylcarbaminsäureester zu überführen.

Anstelle des mutmaßlich als Katalysator bei der Bildung von Alkylarylharnstoffen wirkenden DMF setzten Andersson et al. (1984) Dioxan als Lösungsmittel bei der Derivatisierung aliphatischer Amine ein. Die Reaktion ist ebenso schnell und quantitativ wie mit DMF, es treten aber weniger störende Nebenprodukte auf. Die optimalsten Ergebnisse bei der Derivatisierung des Antiarrhythmikums Profafenon mit  $(R)\text{-}(-)$ -NEIC erhielt Mehvar (1990) bei Einsatz von Hexan als NEIC-Solvans und ohne Zugabe eines basischen Modifizierers wie TEA oder Pyridin.



**Abb.42.** Mechanismus der Bildung von NIC-Harnstoffderivaten von Aminoalkoholen.

Der Methodik von Gübitz und Mihellyes (1984) zur Umsetzung von  $\beta$ -Blockern mit NEIC folgend wurden im ersten Teil dieser Arbeit die Aminoalkohole als Reinsubstanzen in einer Lösung aus Chloroform:DMF im Verhältnis 8:2 zur Reaktion gebracht. Die Zugabe von Triethylamin bei der Umsetzung der Reinsubstanzen mit NIC erlaubte die direkte Derivatisierung der Salze ohne vorherige Freisetzung der freien Basen. Dieses Chloroform:DMF-Verhältnis von 8:2 erwies sich bei Gietl et al. (1988) als effektiver bei der Umsetzung des unspezifischen Kalziumantagonisten Prenylamin mit (*R*)-(-)-NEIC als reines Chloroform. Wurden aber mehr als 20 % DMF dem Derivatisierungsmedium zugesetzt, traten Probleme bei der anschließenden Einengung auf.

Die starke Verdünnung des Reaktionsgemisches mit der mobilen Phase bei der Umsetzung der Reinsubstanzen vereinfachte Aussagen zur Trennfähigkeit der gewählten CSP, spurenanalytische Aussagen waren aber aufgrund der auch hier gefundenen störenden Präsenz der Lösungsmittel-Peaks nach Einengung nicht machbar, was die Suche nach alternativen Reaktionsmedien veranlaßte.

Bei der NIC-Umsetzung von Cholesterin in verschiedenen Lösungsmitteln erwies sich neben Tetrachlorkohlenstoff, Aceton, Xylol und Toluol auch Essigsäureethylester als geeignetes Reaktionsmedium (Wintersteiger und Wenninger-Weinzierl, 1981). Da Essigsäureethylester auch erfolgreich zur Extraktion von Fenoterol aus wäßrigen Proben eingesetzt wurde (Brandts et al., 1982; Koster et al., 1985), bot sich ein Zusammenführen von Extraktion und Derivatisierung an.

Überschüssiges NIC reagiert bei Lösung in der mobilen Phase mit **Wasser** über die intermediär entstehende, instabile Carbaminsäure nach Decarboxylierung zu Naphthylamin, das sich wiederum mit NIC zu Dinaphthylharnstoff umsetzt. Durch die Umsetzung von Fenoterol in wasserfreiem Medium und die anschließende Überführung des getrockneten Reaktionsmixes in die wäßrige mobile Phase konnten Probleme, die bei der Nutzung von Isocyanaten als Derivatisierungsreagenz in wäßrigem Milieu berichtet werden, umgangen werden. Dabei war ein MeCN-Anteil von mehr als 50 % notwendig zur quantitativen Lösung der NIC-Derivate in der mobilen Phase. Das Lösen in reinem Wasser führte zu empfindlichen Einbußen.

Ein interferierender Peak bei der chiralen Mefloquin-Bestimmung nach Umsetzung mit (*S*)-(+)-NEIC resultierte aus dem Vorhandensein von Wasser im Reaktionsmix. Durch vollständige Trocknung der extrahierten organischen Phase vor der Derivatisierung konnte dieses Problem gelöst werden (Souri et al., 1997).

Vergleichende Untersuchungen von Wintersteiger und Wenninger-Weinzierl (1981) zur Umsetzung von Cholesterin mit NIC in mit metallischem Natrium getrocknetem bzw. in mit Wasser gesättigten Xylol zeigten wiederum, daß der Einfluß von Wasser unter den gewählten Reaktionsbedingungen gering ist. Es scheint durch den 30fachen molaren Reagenzüberschuß eine Kompensation auch größerer Mengen Wassers zu erfolgen, so daß die Derivatisierung in p.a.-Lösungsmitteln ohne Vortrocknung durchgeführt werden konnte. Bei der Methodenübernahme in die HPLC setzten Wintersteiger et al. (1982) nur noch einen 1,5fachen molaren Überschuß an NIC zur Derivatisierung ein, da bei höheren

Konzentrationen die entstehenden Nebenprodukte den chromatographischen Prozeß störten. Im NP-Modus wird der Überschuß an NIC, der aufgrund seines stark polaren Charakters schwierig von der Kieselgelsäule zu eluieren ist, durch Zusatz von Diethylamin gebunden. Im RP-Modus gelingt die Trennung der Urethane von den Zersetzungspprodukten bei NIC-Derivatisierung mittels einer RP-8-Säule, wenn die Urethane ausreichend in der mobilen Phase löslich sind (MeCN:Wasser 60:40). Ein weiteres spät eluierendes Nebenprodukt wird schneller eliminiert durch die Elution mit reinem MeCN nach Erfassung des Urethanpeaks. Als Grundlage des entwickelten Säulenschaltprogramms konnte auch in der vorliegenden Arbeit die Trennung des NIC-vom NIC-Fenoterol-Derivat-Peaks auf einer RP-8-Säule genutzt werden.

Zur Bindung des überschüssigen NEIC bei Umsetzung von 9-Amino-20(S)-Camptothecin wurde zuerst mit der mobilen Phase (MeOH:Wasser, 50,5:49,5, v/v) verdünnt (Kagel et al., 1993). Dabei wurde eine Abnahme der Retention festgestellt, was auf ein Derivatisierungsprodukt zurückgeführt wurde, das auf der Säule zurückbleibt und Interaktionsstellen blockiert. Diese Substanz (Amin) entsteht durch die Reaktion des NEIC mit Wasser in der mobilen Phase, das weiter mit dem Isocyanat zu einem Harnstoff reagiert. Die Entstehung dieses Produktes wurde durch Zugabe von MeOH vor der Analyse verhindert, da das entstehende Urethan die Chromatographie nicht beeinträchtigte und reproduzierbare Retentionszeiten der Diastereomere die Folge waren. Die Bindung überschüssigen Isocyanats verhinderte aber auch das Auftreten *di*-derivatisierter Analyte. Bei einem Wassergehalt von mehr als 10 % in der Injektionslösung präzipitierten die Diastereomere (100 µg/mL), so daß die Verdünnung der Proben mit mobiler Phase vor der Analyse nicht möglich war.

Dunlop und Neidle (1987) führten die NEIC-Derivatisierung primärer und sekundärer Aminosäuren in wäßriger Lösung durch. Dabei sollte der Einsatz eines Überschusses an NEIC seinem rapiden Zersetzen in Wasser entgegenwirken. Ein anschließender Extraktionsschritt (Cyclohexan:Ether) entfernte einen störenden fluoreszierenden Peak (mutmaßlich 1-(1-Naphthyl)ethylamin).

Eine unvollständige Derivatisierung der Enantiomere von Fluoxetin und Norfluoxetin konnte durch den Schutz der NEIC-Reagenz vor Luft durch die Überlagerung von Argon verhindert werden (Peyton et al., 1991). Die Lagerung von NIC ohne Schutzgas führte in der vorliegenden Arbeit zum Auftreten von Zersetzungspprodukten. Verhindert werden konnte das durch Überlagern der Derivatisierungsreagenz mit Stickstoff.

Bei ihren Untersuchungen stellten Dunlop und Neidle (1987) fest, daß die NEIC-Derivatisierung primärer und sekundärer Aminosäuren in wäßriger Lösung unbeeinflußt von **pH-Wert und vom Probe:Reagenz-Verhältnis** bleibt, wenn ein pH-Wert zwischen 8 und 9,5 und ein Verhältnis von 1:10 und kleiner gewählt wird.

Bei der Validierung der Methode zur Bestimmung der Enantiomeren-Konzentrationen des Fluoxetins und seines Metaboliten Norfluoxetin in menschlichem Plasma nach Extraktion und Derivatisierung mit (*R*)-NEIC erwies sich die Aufstellung getrennter Kalibrierungskurven für hohe und niedrige Konzentrationen als notwendig (Peyton et al., 1991).

Die gewählte NIC-Konzentration von 1 mM bei Umsetzung des aus den Proben gewonnenen Fenoterols ist für Konzentrationen im µM-Bereich und niedriger ausreichend. Die bei höheren Fenoterolkonzentrationen im mM-Bereich gefundene suboptimale Umsetzung wird durch eine zusätzliche Kalibrierung in diesem Bereich mit in die Messung eingespeist. Die Reaktion in Perfusionspuffer erfolgte quantitativ und schnell, selbst bei dem vorliegenden schwach basischen pH-Wert, so daß kein Zusatz basischer Modifizierer wie TEA erforderlich wurde.

Die Reaktion des NIC mit Fenoterol führt unter den gewählten Reaktionsbedingungen einheitlich zur Bildung von Harnstoffderivaten, wie die Daten der **massenspektroskopischen Untersuchungen** ergaben. Daraus läßt sich mutmaßen, daß auch die Derivate der anderen Aminoalkohole der Harnstoffklasse zugeordnet werden können. Das Auftreten von Urethanderivaten ist nur bei erhöhten Reaktionstemperaturen zu erwarten und kann über die

Erfassung kinetischer Daten Einblicke in den Reaktionsmechanismus geben. Darüber hinaus ist die Reihenfolge der Kopplung an die Hydroxylgruppen relevant bei der Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Reaktivität.

Bei der Derivatisierung des Ephedrins tritt zur sekundären Hydroxylgruppe die reaktivere Aminogruppe in Konkurrenz, die bereits bei Raumtemperatur quantitativ zum entsprechenden Harnstoff reagiert. Die Urethanbildung erfolgte durch Addition eines zweiten Reagenzmoleküls erst bei erhöhter Temperatur (Wintersteiger und Wenninger-Weinzierl, 1981).

Massenspektrometrische Analysen der *(R)*-(-)-NEIC-Derivate des Antiarrhythmikums Profafenon zeigten, daß es zur Harnstoff-, und nicht zur Urethanbildung kommt (Mehvar, 1990). Auch Lave et al. (1991) trennten nach Derivatisierung mit *(S)*-(+)-NEIC die Enantiomere des aminoalkoholischen  $\beta$ -Blocker Tertanolol als ihre Harnstoff-Derivate. Darüber hinaus konnten sie das Vorliegen einer *Mono*-Substitution mittels Massenspektroskopie bestätigen. Harnstoff-Derivate entstanden ebenso nach Umsetzung des adrenergen Norephedrins mit dem achiralen 3,5-dinitrophenylisocyanat (DNP), was mittels Massenspektroskopie bestätigt wurde (Doyle et al., 1991). Eine Urethanbildung durch Reaktion des NEIC mit der 20-Hydroxylgruppe erfolgte bei der Derivatisierung des 9-Amino-20(*S*)-Camptothecins mit *(S)*-NEIC erst lange nach der Harnstoffbildung (nach mehr als 24 h) (Kagel et al., 1993).

Um den Anforderungen hinsichtlich Empfindlichkeit bei der Entwicklung eines Bestimmungsverfahren für Alkohole gerecht zu werden, sollte das zu verwendende Derivatisierungsreagenz hohe Fluoreszenzintensität aufweisen, um diese nach erfolgter Derivatisierung auf das Analytmolekül zu übertragen (Wintersteiger und Wenninger-Weinzierl, 1981). Außerdem sollte die Reaktivität ausreichen, nicht nur mit primären und sekundären, sondern auch mit tertiären Alkoholen eine Urethanbildung zu gewährleisten. Da mit zunehmender Aromatenzahl einerseits die Fluoreszenzquantenausbeute zunimmt (keine Fluoreszenz bei Phenylisocyanat, hohe bei Anthracenisocyanat), andererseits die Reaktivität der korrespondierenden Isocyanate abnimmt, wurde als Kompromißlösung NIC als Reagenz benutzt.

Die aus der Literatur zusammengetragenen Analyt-Excitations- und Emissionswellenlängen von NIC-Derivaten (Tab.9) bzw. NEIC-Derivaten (Tab.10) weichen mehr oder weniger stark von denen ab, die nach der Fenoterolumsetzung gefundenen wurden. Es wird deutlich, daß sowohl die Struktur des Analyten als auch die des fluoreszierenden Reagenzes Einfluß auf die spektralen Eigenschaften des Additionsproduktes haben. So kann underivatisiertes Metoprolol fluorimetrisch erfaßt werden, nach Diastereomerenbildung mit GITC aufgrund der schwachen Fluoreszenz jedoch nur mit UV-Detektion (Ahnhoff und Einarssen, 1989). Die *(S)*-(+)-Naphthylethyl-Harnstoff-Derivate von Anhydrase-Inhibitoren erwiesen sich als

Autoren	Analyt	Excitation ( $\lambda_{\text{ex}}$ [nm])	Emission ( $\lambda_{\text{em}}$ [nm])
Wintersteiger und Wenninger-Weinzierl (1981)	Alkohole	301-342	343-380
Hsu und Walters (1995)	Ibutilid und Artilid	290	345
Buist et al. (1998)	Trecetilid	290	345
	Fenoterol	232	388

**Tab.9.** Fluoreszenzdetektion von Alkoholen und Aminen als ihre NIC-Derivate in der LC.

Autoren	Analyt	Excitation ( $\lambda_{\text{ex}}$ [nm])	Emission ( $\lambda_{\text{em}}$ [nm])
Gübitz und Mihellyes (1984)	$\beta$ -Blocker	285	335
Darmon und Thenot (1986)	Betaxolol	285	330
Gietl et al. (1988)	Prenylamin	285	333
Matuszewski et al. (1990)	Anhydraseinhibitoren	-	-
Mehvar (1990)	Profafenon	-	-
Carr et al. (1991)	Tocainid	220	345
Lave et al. (1991)	Tertanolol	220	320
Peyton et al. (1991)	Fluoxetin und Norfluoxetin	285	313
Laethem et al. (1993)	Oxprenolol	226	333
Freitag et al. (1993)	Mexiletin	280	340
Belas et al. (1995)	Nadolol	230	330
	Fenoterol	228	332

**Tab.10.** Fluoreszenzdetektion von Aminen als ihre NIC-Derivate in der LC. (-) keine Fluoreszenz mehr im Molekül vorhanden.

nichtfluoreszierend (Matuszewski et al., 1990). Als Grund wurde ein intramolekularer Quenching-Effekt der Naphthyleinheit mit der Thieno[2,3-b]-Thiopyran-2-Sulfonamid-Einheit der Anhydrase-Inhibitoren genannt. Bei der Trennung der D- und L-Paare einer Reihe von Aminosäuren nach Umwandlung in ihre (+)-Naphthylethylcarbamoyl-Derivate fanden Dunlop und Neidle (1987) Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen einzelnen Aminosäuren und sogar zwischen den Isomeren.

Das Auftreten eines lokalen Fluoreszenzemissionsmaximums gleicher Intensität bei 540 nm für sowohl das NEIC- als auch das NIC-Derivat des Fenoterols bei einer Anregungswellenlänge von 276 nm kann vorhandenen fluorophoren Gruppen des Aminoalkohol-Moleküls zugeschrieben werden. Kuhlmann (1998) nutzt zur achiralen Detektion des nativen Fenoterols dessen Eigenfluoreszenz bei  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$  [nm]: 218/304 nm, die jedoch nach Umsetzung mit den Isocyanaten nicht mehr vorhanden ist. Des Weiteren ist im Gegensatz zum NIC-Derivat bei dem NEIC-Derivat des Fenoterols eine Blauverschiebung der Emissionswellenlängen für beide gewählten Anregungswellenlängen von  $\lambda_{\text{ex}}$  [nm]: 276 und 218/220 (anstatt 388 und 748 nm nun 322 und 660 nm) zu beobachten. Die gefundenen maximalen Fluoreszenzintensitäten für die Isocyanatderivate des Fenoterols liegen bei Anregungswellenlängen im kurzweligen Bereich (218 bzw 220 nm) deutlich höher (um das 3fache bei dem NIC-Derivat, um das 4fache beim NEIC-Derivat) verglichen mit denen im längerwelligen Bereich (276 nm). Bemerkenswert ist das Auftauchen eines dritten lokalen Emissionsmaximums von 444 nm bei der 220-nm-Anregung des NEIC-Derivates des Fenoterols.

Ähnlich wie bei der Absorption treten auch beim Emissionsprozeß bei Variation des Lösungsmittels spektrale Verschiebungen auf. Dabei kann es sich um Änderungen der Polarität, der Dielektrizitätskonstante oder der Polarisierbarkeit des Lösungsmittels handeln. Auch in der Fluoreszenz treten bathochrome (Rotverschiebung) und hypsochrome (Blauverschiebung) Effekte auf, die Richtung der spektralen Verschiebung ist aber nur schwer aus der Polarität des Lösungsmittels vorherzusagen (Galla, 1988).

Die Zugabe von Puffern bestimmten pH-Wertes zum HPLC-Eluenten kann Änderungen sowohl in der Fluoreszenzintensität als auch im spektralen Bereich bewirken. Verschiebungen

zu höheren Wellenlängen und unterschiedliche Intensitäten werden auch bei Änderung in der Polarität mit steigender Dielektizitätskonstante beobachtet. Auch eine Erhöhung der Temperatur kann eine Verringerung der Nachweisempfindlichkeit fluoreszierender Derivate zur Folge haben. Unter den gegebenen Voraussetzungen jedoch konnte die Betrachtung dieser Einflußgrößen vernachlässigt werden, da der Vergleich der Fluoreszenzstärke der NEIC- bzw. NIC-Derivate des Fenoterols unter gleichen chromatographischen Bedingungen und jeweils optimalen Wellenlängen durchgeführt wurde.

Die gefundene Detektionsgrenze für die NIC-Enantiomeren-Derivate des Fenoterols liegt mit 2 ng/mL in einem Bereich, den auch andere Autoren als Analyt-Detektionsgrenzen nach deren Umsetzung mit einer Naphthylgruppe aufweisenden Isocyanat anführen. Die Fluoreszenzdetektion der chiralen Harnstoffe des  $\beta$ -Blockers Betaxolol nach seiner Umsetzung mit (R)-(-)-NEIC erlaubt ein Detektionsgrenze von 0,5 ng/mL (Darmon und Thenot, 1986). Die Harnstoffderivate des unspezifischen Kalziumantagonisten Prenylamin nach Derivatisierung mit (R)-(-)-NEIC konnten bis zu 1 ng/mL Plasma und 2 ng/mL Urin pro Enantiomer nachgewiesen werden (Gietl et al., 1988).

Nach (S)-(-)-NEIC-Derivatisierung des  $\beta$ -Blockers Oxprenolol finden Laethem et al. (1993) die Detektionsgrenze bei 2,5 ng/mL pro Enantiomer.

Die Fluoreszenz konzentrierter Lösungen von Fluorophoren weist im Vergleich zu einer verdünnten Lösung häufig eine Abnahme der Quantenausbeute auf. Je höher die Konzentration des Fluorophors ist, um so größer wird die Wahrscheinlichkeit, daß die emittierte Strahlung eines Moleküls von einem anderen Molekül reabsorbiert wird. Die Voraussetzung dafür ist, daß sich Emissions- und Absorptionsspektren teilweise überlappen. Reabsorption erfolgt daher in erster Linie für den kurzweligen Anteil der emittierten Strahlung. Das ist ein weiterer Grund für die Notwendigkeit des Erstellens getrennter Kalibrierungskurven für NIC-Derivate des Fenoterols in niedrigen bzw. hohen Konzentrationen.

In der Praxis ist eine immanente Eigenschaft fluoreszierender Reagenzien bis heute, daß die gewünschten Derivate und auftretende Neben- und Zerfallsprodukte meist dieselben Chromophoren aufweisen, was die Selektivität für die untersuchten Analyte vermindert (Spahn, 1988). Die Entwicklung und der Einsatz transparenter fluoreszierender Reagenzien wäre wünschenswert, d.h. die Reagenzien und ihre Zerfallsprodukte fluoreszieren nicht selbst oder bei Wellenlängen, die sich merklich von denen der umgesetzten Analyte unterscheiden.

### **4.2 Probenaufbereitung**

Obwohl Derivatisierungen von Analyten mit Isocyanaten auch schon in wässrigen Proben durchgeführt worden sind (4.1.3), wurde für die Umsetzung von Aminoalkoholen in dieser Arbeit ein wasserfreies Milieu gewählt.

Geeignete Extraktionsverfahren sollen sicherstellen, daß die zu untersuchenden Analyten aus den wässrigen Medien möglichst vollständig gewonnen werden. Sehr oft kommt es dabei auch zu einer Aufkonzentrierung, die vor allem bei Untersuchungen in niedrigen Konzentrationsbereichen wünschenswert ist.

Darüber hinaus sind solche Extraktionsbedingungen zu wählen, die es erlauben, die Analyten von Verunreinigungen zu trennen, die den weiteren Analysenprozeß beeinträchtigen können. Proteine und andere Makromoleküle müssen vor der HPLC-Analyse aus den Proben entfernt werden, da sie durch zu hohe Anteile organischer Lösungsmittel in den mobilen Phasen ausfallen können. Auch bei unspezifischer irreversibler Bindung an die Restsilanolgruppen an der Oberfläche des Trägermaterials präzipitieren die Makromoleküle und blockieren somit den Zugang zu den Poren. Die adsorptive Oberfläche verringert sich und schließlich kommt es zu einem meist irreversiblen Kapazitäts- und Selektivitätsverlust. Beim Blut ist es vor

allem die Proteinfraktion, die zur Zerstörung der Säule im weiteren chromatographischen Prozeß führen kann. Auch das dem Krebs-Henseleit-Puffer zugesetzte BSA in pharmakokinetischen Untersuchungen kann bei den weiteren analytischen Schritten zu Beeinträchtigungen führen.

Einen eleganten Weg zur Probenaufbereitung stellt die Verwendung von Säulen dar, die derart modifiziert sind, daß sie nach Auftragung unbehandelter biologischer Proben ihrer Trennfunktion entsprechend den Analyten retardieren, mit den Plasmaproteinen jedoch nicht in Kontakt kommen (**Direct Injection Technique**). Zur Vollautomatisierung der entwickelten Methode bietet sich diese Technik mit anschließender Vorsäulenderivatisierung bei Bedarf zukünftig an.

Die Fenoterol-**Flüssigphasenextraktionen** aus biologischen Matrices wurden erfolgreich mit Isobutanol (Kramer und Blaschke, 2001), tert. Butylmethylether (Rominger et al., 1990) und Essigsäureethylacetat (Brandts et al., 1982; Koster et al., 1985) durchgeführt. Bei den Arbeiten mit Essigsäureethylacetat wurden zur Steigerung der Extraktionsausbeute zusätzlich Ionenpaarreagenzien herangezogen. Koster et al. (1985) setzten *N,N'*-Methylendiacrylamid (BIS) zur Fenoterolextraktion aus Rattenplasma ein (keine Angaben zur Extraktionsausbeute). Brandts et al. (1982) konnten bei Di(ethyl)hexylphosphat-vermittelter Extraktion Fenoterol vollständig in die organische Phase überführen.

Das Ergebnis wurde im Rahmen der Optimierung der Fenoterol-Extraktion zur anschließenden Derivatisierung bestätigt. Fenoterol liegt unter den gewählten Extraktionsbedingungen als Kation vor, was eine Ionenpaarung mit der negativ geladenen Phosphatgruppe im DEHP ermöglicht. Diese Gruppierung ist im Gegensatz zu den beiden allein vorliegenden Bestandteilen unpolarer, was eine Verteilung in das organische Lösungsmittel begünstigt.

Fenoterol-**Festphasenextraktionen** aus Plasmaproben sind mit Waters Sep-Pak C-18 schon erfolgreich durchgeführt worden. Doerge et al. (1995) erzielten bei einer methanolischen Elution mit 1 % (v/v) Ammoniumacetat (0,1 M, pH 4) je nach Probe-Konzentration Ausbeuten zwischen 68-92 %. Koster et al. (1986) eluierten mit einem Gemisch aus MeCN/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM, pH 2,5) 90/10 (v/v). Zur Ausbeute sind keine Angaben gemacht worden. Mit einer C-18-Festphase eines anderen Anbieters (Bondelut, Varian) erreichten Leferink et al. (1982) bei Elution mit einem MeOH/MeCN-Gemisch von 85/15 (v/v) eine Extraktionsausbeute von 95 %.

Mit einer Kombination aus Festphasen- und Flüssigphasenextraktion konnten Tan und Soldin (1984) bis zu 73 % des Fenoterols aus menschlichem Plasma rückgewinnen. Dabei wurden zunächst über eine Sep-Pak C-18-Phase die Proteinbestandteile des Plasmas abgetrennt und anschließend aus der getrockneten methanolischen Elutionsfraktion das Fenoterol nach Wiederaufnahme in Phosphatpuffer (0,07 M, pH 6,8) mittels ionenpaarvermittelter (DEHP) Flüssigphasenextraktion in Essigsäureethylacetat überführt und rückextrahiert in Salzsäure (0,01 M).

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit mit beiden C-18-Festphasen die Proteinfraktion von der Fenoterolfraktion trennbar war, konnte eine ausreichende Extraktionsausbeute des Analyten im Eluat nur mit der Phase von Waters erzielt werden. Das weist auf Unterschiede bei der Herstellung dieser Festphasen hin.

Die genutzte **Proteinbestimmung nach Bradford** zur Aussage über den Gehalt an Proteinen ist nicht zeitaufwendig und wird durch Pufferchemikalien und reduzierende Stoffe kaum gestört. Der Test versagt nur, wenn in der Probenlösung Substanzen wie z.B. Detergenzien vorhanden sind, die in der stark phosphorsauren Lösung grobflockige Niederschläge bilden. Falsche Ergebnisse ergeben sich ebenfalls, wenn die Proteinprobe Mikroheterogenität aufweist, wie es z.B. bei der Bestimmung von nicht solubilisierten Membranproteinen der Fall sein kann. Beides kann im Rahmen der durchgeführten Arbeiten ausgeschlossen werden.

## **4.3 HPLC-Analytik**

### **4.3.1 Chirale stationäre Phasen (CSP)**

Chromatographische Trennungen basieren allgemein auf der differentiellen Adsorption der zu trennenden Substanzen an einem chromatographischen Trennmaterial im Wechselspiel mit der mobilen Phase. Die chirale Trennung erfordert die Bildung eines temporären diastereomeren Komplexes zwischen Analyt-Enantiomer und chiralem Selektor, gebunden an festem Trägermaterial oder gelöst in mobiler Phase. Ein Enantiomer wird stärker retardiert als das andere und macht so die chirale Aufspaltung möglich.

Seit Einführung der ersten kommerziell verfügbaren SP für die chirale HPLC 1981 (Pirkle et al.) ist die Zahl der CSP beträchtlich gestiegen. Heute sind ca. 140 kommerziell verfügbare und ca. 1400 nichtkommerziell entwickelte CSP in der LC bekannt (Chirbase-Datenbank mit Bestelloption aller kommerziell verfügbaren CSP und deren 2- und 3-dimensionale Darstellung unter <http://chirbase.u-3mrs.fr>).

Klassifizierungen sollen es bei analytischem Arbeiten erlauben, eine rationale Wahl der Phase für ein bestimmtes Trennproblem zu treffen. Wainer (1987) teilt CSP nach der Art ihrer Wechselwirkung in 5 Typen ein, 4 davon sollen im Anschluß vor allem im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Trennproblematik in dieser Arbeit genauer betrachtet werden. Generell zählen in der Flüssigphasen-Analytik neben einigen wenigen auf Cellulose- und Amylosederivaten basierende Phasen noch Cyclodextrin- und Protein-Phasen zu den bedeutsamsten CSP. So gelangen z.B. Ceccato et al. (1998) bei ihren Untersuchungen zur chiralen Trennung des Antidepressivums Pirlindol in der LC mit allen drei verwendeten CSP (Ovomucoid-, Dimethylphenylcellulosecarbamid (OD)- und  $\beta$ -CD-CSP) die Trennung.

Nur Phasen, die einem Ligandenaustausch mit Metallkomplexen als Trennmechanismus zugrunde liegen, konnten im Rahmen dieser Arbeit von vornherein ausgeklammert werden. Im Prinzip wird bei diesen Typ IV-Phasen eine Aminosäure (meist Prolin, Hydroxyprolin oder Valin) an eine Kieselgelmatrix oder eine Polymermatrix gebunden und der Eluent enthält Metallionen (meist Kupfer, seltener Nickel, Cobalt, Zink oder Cadmium). Der so entstehende Metallkomplex ist wiederum zur stereoselektiven Bindung von Analyten fähig, die zur Metall-Chelatierung fähig sind, was für Fenoterol nicht zutrifft.

#### **4.3.1.1 Chirale Trennung durch Einschlußkomplexierung**

Zu den Vertreter dieser diversen Gruppe stationärer Phasen vom Typ III zählen Kronenether, synthetische und Kohlenhydrat-Polymeren.

**Kronenether** als synthetische makrozyklische Polyether können selektive Komplexe mit geeigneten Kationen eingehen. Der 18-Kronen-6-Ether schließt zum Beispiel Ammonium-Ionen über Ion-Dipol-Interaktionen mit den Sauerstoffatomen ein. Mit optisch aktiven Kronenethern, chemisch verknüpft mit Kieselgel oder als Polymermatrix, lassen sich auch hier nur Aminosäuren und andere Verbindungen mit primären Aminogruppen chiral trennen.

Viele **synthetische Polymere** (besonders Polyvinyle) kommen im festen Zustand als chirale Helices vor. In Lösung verhindert die hohe Beweglichkeit der polymeren Ketten die Messbarkeit optischer Aktivität. Sind jedoch große Gruppen in die Kette eingeführt, dann wird die Mobilität eingeschränkt und die chirale Struktur erhalten. Adsorbiert auf einer Kieselgelmatrix sind solche Polymere zur Trennung einer Reihe von Analyten einsetzbar.

Durch heterogene Acylierung **mikrokristalliner Cellulose** hergestelltes Cellulose-Triacetat und Tribenzoat besitzt chirale Erkennungseigenschaften aufgrund der kristallinen Struktur des Ausgangsmaterials, das bei der Derivatisierung erhalten bleiben muß. Diese kostengünstigen chiralen Selektoren finden ihren Einsatz auch häufig bei präparativen chromatographischen

Techniken wie SMB (engl.: simulated moving bed), da sie hier in größeren Mengen gebraucht werden.

Seit Entwicklung der ersten erfolgreich eingesetzten kieselgelgebundenen CD-CSP (Armstrong et al., 1985) sind eine Reihe von Cyclodextrin-Phasen auf dem Markt. Neben den nativen CD-Phasen ( $\alpha$ - $\gamma$ ) stehen hauptsächlich modifizierte  $\beta$ -CD-Säulen wie Acetyl- und Hydroxypropylether-Phasen zur Verfügung, auf deren Selektivität durch Einführung funktioneller Gruppen an ihren sekundären Hydroxylgruppen Einfluß genommen wurde.

Jede CSP bedarf eines geeigneten mobilen Phasenmodus. Je nach Art der Zusammensetzung der mobilen Phase in der Flüssigchromatographie kann man damit einhergehende Trennmechanismen zuordnen. Multimodalen Charakter besitzen nur wenige CSP, darunter Phasen mit Cyclodextrinen und makrocyklischen Glycopeptiden als Selektor. Die erzielte Verbreiterung der Selektivitätsspanne bei Einsatzfähigkeit in den bekannten drei mobilen Phasenmodi erweitert die Möglichkeiten der chiralen Trennung beträchtlich. Die Komplexheit der Anordnung der funktionellen Gruppen und der Löslichkeit des Analyten bestimmen, in welchem Modus die CSP selektiver für eine angestrebte Trennung ist.

Im Normalphasenmodus (NP), der im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt wurde, stellen Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ - $\pi$ - und Dipol-Dipol-Interaktionen die dominierenden Interaktionsarten dar. Die mobile Phase setzt sich aus mischbaren organischen Lösungsmitteln wie häufig Hexan und Isopropanol (IPA) zusammen. Eine Verringerung der Retention und chiralen Trennung ist hier bei Erhöhung des IPA-Anteils zu beobachten.

Im Umkehrphasenmodus (RP) sind hydrophobe Einschluß-Vorgänge, Wasserstoffbrückenbindungen und sterische Interaktionen dominierend. Eine mobile Phase besteht hier aus einem wäßrigen (gepufferten oder ungepufferten) Anteil und einem mischbaren organischen Lösungsmittelanteil. Typisch für diesen Modus ist, daß mit der Erhöhung des wäßrigen Anteils eine Erhöhung der Retention und Trennfaktoren einhergeht. Sind aromatische Gruppen im Analyten vorhanden, kann es zu einer stereoselektiven Orientierung im Hohlraum aufgrund der Elektronenverteilung der aromatischen Methylengruppen mit denen der Glycosidsauerstoffe kommen. Der erste wichtige Gesichtspunkt bei der Wahl des CD für eine geeignete Retention und die chirale Erkennung ist das Einpassungsvermögen des Analyten in den Hohlraum des CD, welches eine Funktion von Größe und Form ist. Als Regel gilt, daß substituierte Phenyl-, Naphthyl- und Binaphthylringe auf  $\beta$ -CD-Phasen getrennt werden können, kleinere Moleküle auf  $\alpha$ -CD-Phasen. Moleküle mit 4 oder 5 Ringen in ihrer Struktur (Steroide) lassen chirale Trennungen auf  $\gamma$ -CD-Phasen wahrscheinlich werden.

Battermann (1993) gelang die chirale Auftrennung der FMOC-Derivate von Aminosäuren bei Einsatz einer aus sphärischem Kieselgel mit kovalent gebundenem  $\gamma$ -Cyclodextrin bestehenden CSP (ChiraDex  $\gamma$ -Säule) in der LC. Mit den eingesetzten nativen  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD-Säulen konnten jedoch im RP-Modus für die Fenoterol-Derivate des NIC und des FMOC keine Trennungen erzielt werden.

Ein Vorteil des Einsatzes wasserfreier mobiler Phasen im polaren organischen Phasenmodus (POM) ist die beobachtete Langzeitstabilität von auf Kieselgelbasis hergestellten Phasen. Dieser mobile Phasenmodus besteht aus mehreren Komponenten. MeCN und MeOH kontrollieren primär den Retentionsmechanismus. Essigsäure und TEA bestimmen die Selektivität, wenn sie ins richtige Verhältnis gesetzt sind. Mit steigendem Alkoholanteil nimmt die Retention ab. Dabei wird die Verlagerung von der Einschlußkomplexierung hin zu Wechselwirkungen an der Oberfläche des CD als Retentionsmechanismus angenommen. Mindestens 2 funktionelle Gruppen im Molekül sind notwendig, wobei sich eine davon in der Nähe des chiralen Zentrums befinden sollte. Im POM zählen neben

Wasserstoffbrückenbindungen sterische und Dipol-Dipol-Interaktionen zu den hauptsächlichen Arten der Wechselwirkung zwischen CSP und Analyt.

Neben dem Einsatz von CD-CSP im NP- und RP-Modus sind differentielle Interaktionen auch im POM möglich, wobei dann attraktive intermolekulare Interaktionen für die effiziente Enantioseparation verantwortlich sind. Der Einsatz einer  $\beta$ -CD-CSP zur Trennung von  $\beta$ -Blockern auf diesem Weg wurde von Armstrong et al. (1992) beschrieben.

Mit der empfohlenen mobilen Ausgangsphase („magic mobile phase“, Beesley, 1999, persönl. Mitteilung) von MeCN/MeOH/Essigsäure/TEA 95/5/0,3/0,2 (v/v/v/v) blieben Versuche zur chiralen Trennung des Fenoterol-Derivats des NIC sowie des Fenoterols auf der  $\beta$ -CD-Phase im POM erfolglos. Das deutet darauf hin, daß ein Einsatz von CD-Phasen zur erfolgreichen Trennung der NIC- und FMOC-Derivate des Fenoterols fragwürdig ist, sind doch neben ungenügenden Einschlußkomplexierung in wäßriger Phase auch in wasserfreier mobiler Phase keine differenzierten Wechselwirkungen feststellbar gewesen.

#### 4.3.1.2 Chirale Trennung auf Polysaccharid-Phasen

Cellulose als sehr verbreitetes organisches Polymer besteht aus unverzweigten Ketten von D-(+)-Glucoseeinheiten, die  $\alpha$ -(1,4)-verknüpft sind. Diese Polymere lagern sich parallel zueinander an, so daß seilähnliche helicale Strukturen entstehen. Cellulose und seine Derivate besitzen die Fähigkeit der enantioselektiven Interaktion. Der chirale Erkennungsmechanismus dieser Typ II-Phasen wird angenommen als eine Kombination aus Einschlußkomplexierung und attraktiven/sterischen Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen,  $\pi$ - $\pi$ - und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. (Wainer, 1987). Die freien Hydroxylgruppen der Cellulose bieten sich für Derivatisierungen an. Mit der Wahl der verschiedenen Substituenten kann wie bei den CD-Phasen Einfluß auf den chiralen Erkennungsmechanismus genommen werden.

Bei der Entwicklung von CSP auf Polysaccharidbasis in der HPLC nutzten Okamoto et al. (1984) zuerst die enantioselektiven Eigenschaften von mikrokristallinem Cellulosetriacetat nach seiner Bindung an Kieselgel. Weitere CSP-Entwicklungen aus dieser Arbeitsgruppe auf der Basis von Ester-, Carbamat- und Etherderivaten von auf Kieselgel bemäntelter Cellulose (später auch Amylose) folgten. Heute werden kovalent an die Kieselgelmatrix gebundene Cellulose- und Amylosederivat-Säulen eingesetzt.

Die CSP wurden zuerst im NP-Modus mit wasserfreien Eluenten genutzt, später wurden sie auch für den Gebrauch wäßriger Eluenten nutzbar (Suffix -R bei der Herstellerbezeichnung). Zahlreiche Anwendungen dieser CSP sind in der Literatur zu finden. Neben Cellulose tris(4-methylbenzoat) mit der Herstellerbezeichnung **OJ** (Ishikawa und Shibata, 1993; Williams et al., 1997; Vaccher et al., 1998a; OJ-R: van Overbeke et al., 1997) sind vor allem Amylose tris(1-phenylethylcarbamat) **AS** (Vaccher et al., 1998b; Wang und Chen, 1999) und Amylose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamat) **AD** (Williams et al., 1997; Ning, 1998; Ferretti et al., 1998; Vaccher et al., 1998b; Kummer und Werner, 1998; Küsters und Nozulak, 1998; Kaliszan, 1998; Wang und Chen, 1999) zu nennen.

Besonders erfolgreich erwies sich in der chiralen Analytik die Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamat)-CSP (**OD**). Auf ihr war auch die Trennung der NIC-Harnstoffe einer Reihe pharmazeutisch relevanter Aminoalkohole möglich (Ullrich et al., 2001). Damit kann das Trennpotential dieser CSP für NIC-derivatisierte Racemate wie Alkohole (Kennedy und Weigel, 1992) durch die Trennung der Amine erweiternd bestätigt werden.

Bei der chiralen Trennung über die Bildung von Diastereomerenkomplexen im chromatographischen Equilibrium wird angestrebt, daß achirale Wechselwirkungen minimal und die differenzierten chiralen Interaktionen maximal gehalten werden, da die neben den chiralen Wechselwirkungen auftretenden anderen Retentionsmechanismen unter Umständen

die chirale Erkennungs Kräfte schwächen oder eliminieren. Auf sie muß über die chromatographischen Bedingungen Einfluß genommen werden.

### 4.3.1.3 Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamat)-CSP

#### 4.3.1.3.1 Mobile Phase

Laut Hersteller zerstören gepufferte mobile Phasen mit einem pH von über 7 die OD-R-Säule, bei saurer mobiler Phase ist die Säule sehr stabil. Aus diesem Grund wurde die mobile Phase mit Phosphorsäure versetzt, so daß ein saures Milieu gegeben war. Bei den vorliegenden Studien zum Einfluß der Zusammensetzung und Konzentration von Ionen in der mobilen wäßrigen MeCN-Phase auf die Trennung von Orciprenalin als Modellsubstanz zeigte weder der Zusatz von Kaliumhexafluorophosphat noch die Veränderung des pH-Wertes Veränderungen in den chromatographischen Parametern. Das spricht für einen neutralen Charakter des NIC-Derivates des Orciprenalins.

Hiroto et al. (1994) stellten bei Untersuchungen der Konzentration von Ionen in der mobilen Phase als Einflußgrößen bei der RP-Chromatographie der Enantiomere von Carnitin und Acetylcarnitin nach Derivatisierung ihrer Carboxylgruppe mit 9-Anthryldiazomethan (ADAM) auf einer OD-R-Säule fest, daß bei Nutzung eines Perchloratpuffers weder die Ionenstärke (0,1-1 M) noch der pH-Wert (0,5 M Perchloratpuffer pH 2-6) die chromatographischen Parameter wesentlich beeinflußten.

Dem gegenüber kam der Natriumperchlorat-Konzentration und dem pH-Wert der mobilen Phase bei der Optimierung der chiralen Trennung des Antidepressivums Pirlindol auf einer OD-R-Säule in der LC eine wichtige Rolle zu (Ceccato et al., 1998).

Ishikawa und Shibata (1993) nahmen angeregt durch Studien von Ikeda et al. (1989), die eine OD-Säule erstmals unter RP-Bedingungen nutzten, genauer die Zusammensetzung und Konzentration von Ionen in der mobilen Phase als Einflußgrößen bei der RP-Chromatographie unter die Lupe.

Bei der Trennung elektrisch neutraler Analyte änderte sich das chromatographische Verhalten durch Zugabe von Elektrolyten in die mobile Phase nicht.

Für die Trennung saurer Analyte war die Zugabe einer geringen Menge einer starken Säure notwendig. So konnte eine ausreichende Retention und Enantioseparation von N-benzyloxycarbonyl-Valin erst bei niedrigen pH-Werten der mobilen Phase (pH <3) erreicht werden. Das wurde auf die Notwendigkeit der Ionisationsunterdrückung der Carboxylgruppe des Analyten mit einer sauren mobilen Phase erklärt. Perchlorsäure und Phosphorsäure waren gleichermaßen effektiv (pH 2), die Zugabe von Essigsäure reduzierte die Retention. Sie spekulierten, daß der Anteil an undissoziierter Essigsäure verantwortlich für die Unterdrückung der Retention des Analyten (N-Benzylloxycarbonyl-Leucin) ist.

Zur Trennung basischer Racemate war die Zugabe eines anionischen Chaotropen notwendig. Am Beispiel der Trennung der Enantiomere des Propranolols wurde der Einfluß verschiedener Anionen in der mobilen Phase untersucht. Retention und Trennfaktor waren abhängig von der Art des Anions. Die Reihenfolge der Retentionserhöhung folgte der Reihe der Chaotropizität der Anionen (Bezeichnung für die Eigenschaft von Substanzen, die regelmäßige, auf der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen beruhende Struktur von flüssigem Wasser zu zerstören. Chaotropen Stoffe stabilisieren die Konformation von Makromolekülen, indem sie die Bildung der zur Solvatation notwendigen H<sub>2</sub>O-Käfigstruktur verhindern. Darüber hinaus erleichtern sie bei der Verteilung den Übergang von unpolaren Molekülen aus nichtwäßrigen und wäßrigen Phasen). Der Einfluß der Kationen war grundverschieden von dem der Anionen, d.h. steigende Chaotropizität des Kations brachte Abnahme der Retention mit sich. Die Beziehung zwischen Chaotropizität des Kations und der Trennbarkeit war gering und unklar. Daraus schlossen die Autoren, daß die Zugabe eines

chaotropen Anions notwendig ist, um eine Trennung zu erreichen. Dabei ähnelt dieses chromatographische System dem in der Ionenpaarchromatographie anzutreffenden. Obwohl der Mechanismus der Einflußnahme des Kations auf die Retention unklar ist, scheinen die sekundären Interaktionen zwischen Kationen und Anionen im chromatographischen System (van der Waal, Wasserstoffbrückenbindungen) das Ionenpaar-Gleichgewicht und letztlich die Retention zu beeinflussen. Weiter schlußfolgern die Autoren, daß ein chaotropes Ion (wenig lokalisierte elektrisch Ladung, hohe Polarisierbarkeit, geringer Grad an Hydratation) fähig ist zur Partition in eine organische Phase aufgrund des geringen Verlustes an Hydratationsenthalpie beim Transfer von der wäßrigen in die organische Phase. Bei der Untersuchung effektiverer Ionenpaar-Reagenzien (hohe Chaotropizität, hohe Ladungsdelokalisation und Azidität oder hoher Extraktionskonstante) fanden die Autoren, daß die Natriumsalze von  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  und  $\text{CCl}_3\text{CO}_2^-$  vergleichbare oder noch bessere Trennungen im Vergleich zu dem von Perchlorat brachten.

Auch Studien von Aboul-Enein et al. (1996) bei der direkten Trennung einiger Propranolol-Analoga (Aryloxyaminopropan-2-ole) auf der OD-Säule im RP-Modus zeigten, daß bei Einsatz von Kaliumhexafluorophosphat in Vergleich zu Natriumperchlorat in der mobilen Phase höhere Trennfaktoren erreicht wurden. Die schon bei Ishikawa und Shibata (1993) gefundene Bedeutung der Art des eingesetzten chaotropen Anions wurde bestätigt. Die Eignung der Hexafluorophosphat-Anionen mit ihrer hohen Chaotropizität, ihrem hohen Grad an Delokalisation, ihrer Azidität und Polarisierbarkeit (aufgrund der 6 Fluoratome) und ihrer hohen Extraktionskonstante mit der organischen Phase eines Ionenpaares zur Trennung dieser Analoga unter RP-Bedingungen wurde hervorgehoben.

Mit MeCN als organischem Anteil an der mobilen Phase gelang die Trennung aller untersuchten Aminoalkohol-NIC-Derivate zufriedenstellend, so daß ein Austausch mit MeOH nicht nötig wurde. Je nach Stärke der Retention wurde der organische Anteil so gewählt, daß bei Trennfaktoren über  $R=1,5$  die Retentionszeiten möglichst gering gehalten wurden. Ishikawa und Shibata (1993) fanden beim Vergleich von MeOH und MeCN als organischen Anteil an der mobilen Phase bei der Trennung von Propranolol und Verapamil, daß zwar vergleichbare Retentionen mit MeOH (70 %) und MeCN (40 %) erreicht wurden, mit der methanolischen mobilen Phase aber die Elutionspeaks beträchtlich breiter waren (Trennfaktor geringer). MeOH (80 %) bewirkte bei Hiroto et al. (1994) eine bessere Enantioselektivität im Vergleich zu MeCN (40 %), führte aber auch zu einer Abnahme der theoretischen Bodenzahl und Selektivität zwischen Carnitin und Acetylcarnitin.

#### 4.3.1.3.2 Struktur-Retentions-Beziehungen

Kennedy und Weigel (1992) trennten im NP-Modus erstmals chiral NIC-Derivate auf einer OD-Säule (Glycidole (2,3-Epoxy-1-Propanole) als ihre Naphthylcarbamate). Aussagen zu Struktur-Retentions-Beziehungen wurden nicht gemacht. Um diese im RP-Modus für die Aminoalkohole als ihre Naphthylharnstoffe zu finden, wurden einige NIC-Derivate unter gleichen chromatographischen Bedingungen auf der OD-RH-Säule chiral aufgetrennt, was die gefundenen chromatographischen Parameter vergleichbar machte (Tab.11).

Auffallend ist, daß in *para*-Position phenylsubstituierte Hydroxylgruppen die Interaktion zwischen Analyt und CSP beträchtlich vermindern (*p*-Hydroxyephedrin, Epinephrin, Octopamin). Dieser Trend wird überlagert, wenn N-substituiert eine Propylgruppe im Molekül anzutreffen ist (Isoprenalin). Eine Ethylgruppe ist nicht in der Lage, die interaktionsvermindernde Wirkung der *p*-Hydroxylgruppe zu kompensieren (Epinephrin, *p*-Hydroxyephedrin). Entscheidend für eine hohe stereoselektive Interaktion der NIC-Derivate der Aminoalkohole ist das Vorhandensein von Phenylsubstituenten (Hydroxylgruppen bzw. methylierter Hydroxylgruppen) in Position C-5 (Etilefrin), C-2,5 (Methoxamin) oder C-3,5

Wirkstoff	$t_1$	$\alpha$
Isoprenalin	36,0	1,12
Norephrin	29,0	1,31
Orciprenalin	22,9	1,74
Methoxamin	22,3	1,80
Etilefrin	21,8	2,25
Ephedrin	18,2	1,66
Fenoterol	17,5	1,26
Octopamin	9,8	1,18
Epinephrin	9,5	1,20
<i>p</i> -Hydroxyephedrin	7,6	1,48

**Tab.11.** Retentionszeiten ( $t$  in min) und Enantioselektivitäten ( $\alpha$ ) der Aminoalkoholderivate, getrennt auf einer Chiralcel OD-RH bei 25°C. Mobile Phase: MeCN/wäßrige 3,5 mM Phosphorsäure im Verhältnis 50/50 (v/v). Die Derivate wurden nach den Retentionszeiten des zuerst eluierenden Enantiomers geordnet.

(Orciprenalin, Fenoterol). Moleküle mit *para*-phenylsubstituierter Hydroxylgruppe können nur dann mit ausreichenden Enantioselektivitätswerten auf der OD-Säule getrennt werden, wenn sich ein zweites Chiralitätszentrum in unmittelbarer Nähe zum ersten befindet (*p*-Hydroxyephedrin). Diese Ergebnisse passen sich gut in schon veröffentlichte Arbeiten mit OD-Phasen ein.

Bei seinen Untersuchungen zur chiralen Trennung von  $\beta$ -Blockern im RP-Modus konnten Ching et al. (1992) ebenfalls feststellen, daß die Trennfaktoren für Substanzen mit Phenylsubstituenten in *ortho*-Position im Vergleich zu denen in *para*-Position größer sind. Diese Befunde heben einmal mehr die Bedeutung des **Substitutionsortes am Phenylring** des Analyten hervor und können mit einer auftretenden sterischen Hinderung erklärt werden, die durch Substituenten in *para*-Position hervorgerufen wird.

Einsichten in den Trennmechanismus erlaubte auch eine Studie von Aboul-Enein et al. (1996) zur direkten Trennung einiger Propranolol-Analoga (Aryloxyamino-Propanole). Die

Trennfähigkeit hing mit der **Natur der aromatischen Gruppe** und der **Substitution an der sekundären Aminogruppe** zusammen, welche die Basizität beeinflußt. Die Dipol-Dipol-Interaktion zwischen der 3,5-dimethylphenylcarbamat- $\pi$ -Donor-Einheit der CSP und dem  $\pi$ -Akzeptor der Arylgruppe des Analyten trugen zur Auftrennung bei. Dabei stellte sich heraus, das die  $\pi$ - $\pi$ -Dipol-Interaktionen zwischen Phenylgruppe und 3,5-Dimethylgruppe stärker sind als bei Naphthoxy-Derivaten. Im NP-Modus erhöhten sich die Trennfaktoren mit steigender Kettenlänge- und Größe der Alkylseitenkette. Die Polarität am basischen Stickstoff erhöhte sich mit steigender Länge und Größe der Alkylgruppe aufgrund seines induktiven Elektronen ziehenden Effektes. Facklam und Modler (1994) trennten Enantiomeren- und Diastereomeren-Propranololanaloga (Aminalkyl- und Aminarylsubstituenten) auf. Dabei war die Trennung von der Art (aliphatisch, aromatisch) und der Größe der Substituenten am terminalen Kohlenstoffatom abhängig. Obwohl der chirale Hohlraum der CSP große Affinität zu aromatischen Gruppen zeigte, wie schon Francotte et al. (1985) postulierten, wurde nicht notwendigerweise eine bessere Trennung der aromatisch substituierten Enantiomere beobachtet. Das Vorhandensein eines Aminprotons war für die chirale Erkennung nicht erforderlich, was mit dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Der Trennerfolg der Enantiomere von Carnitin und Acetylcarnitin nach Derivatisierung ihrer Carboxylgruppe mit 9-Anthryldiazomethan (ADAM) auf einer OD-Säule im RP-Modus wurde mit Einführung der Anthracen-Einheit auf deren Interaktion mit der CSP ( $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen) und der Erhöhung der Hydrophobizität des Analyten zurückgeführt (Hiroto et al., 1994). So zeigten die Carnitin- und Acetylcarnitin-Methylester keine Enantioselektivitäten auf der Säule. Die 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM)-Derivate konnten ebenfalls nicht aufgetrennt werden, was auf das Vorhandensein der sperrigen Pyrenyleinheit zurückgeführt wurde, die einen effektiven Zugang zu den aktiven Orten für die chirale Erkennung verhindert.

Bei Untersuchungen zur chiralen Trennung von *trans*-Dihydrodiol-Metaboliten polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe stellten Landsiedel et al. (1998) die Bedeutung der **Interaktion von Hydroxylgruppen** mit der Carbamat-Einheit der CSP heraus. Bei der HPLC-Trennung der Enantiomere cyclischer 1,3-Aminoalkohol-Derivate im NP-Modus auf einer OD-Säule zeigten Péter et al. (1998), daß die Alkoholanaloga der Aminoalkohole stärker retardiert wurden als ihre Esteranaloga. Der Retentionsmechanismus wurde wie folgt abgeleitet: Beim Alkohol bildet sich die dominierende Wasserstoffbrücke zwischen dem OH-Proton des Analyten und dem Carbonylsauerstoffatom der Phenylcarbamat-Einheit, während der Carbonylsauerstoff der Esterfunktion mit dem NH-Proton des Carbamat-Restes Wasserstoffbrückeninteraktion zuläßt. Durch den Elektronen-Donor-Effekt der Methylsubstituenten an der Phenylgruppe der CSP nimmt die Azidität des NH-Protons jedoch ab, während die Elektronendichte am Carbonylsauerstoffatom des Carbamates zunehmen dürfte. Daher ist die Wasserstoffbrückenbindung schwächer bei ihrer Interaktion mit Estern im Vergleich zu der mit Alkoholen, und damit wird letztere stärker retardiert.

Die **Temperatur** ist neben der Wahl der mobilen Phase und der CSP ein brauchbares Werkzeug zur Kontrolle der Selektivität und Retention (O'Brien et al., 1997; Armstrong et al., 1985). Eine Verringerung der Temperatur im chromatographischen Prozeß kann einen Effizienzverlust aufgrund des verringerten Massetransfers mit sich bringen, der wiederum aus einer gesteigerten Eluentenviskosität und erniedrigten Analytdiffusion resultiert. Das Kühlen von Säulen in der chiralen HPLC kann aber eine geeignete Möglichkeit zur Selektivitätsverbesserung für Racemate sein. Auf die Effizienz der Trennung haben Temperaturänderungen einen großen Einfluß. Mit Temperaturanstieg verringert sich die Viskosität der mobilen Phase und steigert sich die Diffusionsgeschwindigkeiten, der erhöhte Massetransfer zwischen mobiler und stationärer Phase reduziert die Bandenverbreiterung. Auch die Retentionsreaktion kann durch Temperaturerhöhung beschleunigt werden. Bei Temperatursenkung steigt die Enantioselektivität und die Retention.

Die Beziehung von Enantiomeren-Trennung, Komplexbildung und Temperatur ist nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung:

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

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

wie folgt gegeben:

$$\ln \alpha = -(\Delta\Delta H/RT) + (\Delta\Delta S/R) + \ln \phi \quad \text{mit} \quad \begin{aligned} \Delta\Delta H & \text{Enthalpieänderung bei der Interaktion} \\ & \text{beider Enantiomere mit der CSP} \\ \Delta\Delta S & \text{Entropieänderung bei der Interaktion} \\ & \text{beider Enantiomere mit der CSP} \\ R & \text{Gaskonstante} \\ T & \text{Temperatur} \\ \phi & \text{Phasenkonstante} \end{aligned}$$

Die lineare Beziehung von  $\ln \alpha$  und  $1/T$  bringt die Bedeutung der Enthalpieänderung bei der Komplexbildung zum Ausdruck, die auch in chromatographischen Systemen oft retentionsbestimmend ist. Meist liegen exotherme Retentionsreaktionen mit nur geringen Enthalpieänderungen vor. So vermindert eine Temperaturerhöhung meist die Retention.

Wie sich für die NIC-Derivate des Orciprenalins und des Fenoterols in dieser Arbeit gezeigt hat, liegt eine lineare Beziehung zwischen  $\alpha$  und der Säulentemperatur vor. Diese Linearität stellte schon Whatley (1995) bei der chiralen Trennung von Proteinkinase-C-Inhibitoren im RP-Modus mit einer OD-R-Säule fest, wobei eine Basislinientrennung bei 0°C erreicht wurde. Trotz der großen Unterschiede in der Enantioselektivität der OD-R-Säule für die verschiedenen  $\beta$ -Blocker war das (-)-Isomer die stärker retardierte Spezies mit der größeren Absorptionsenergie (Ching et al., 1992). Die Autoren fanden eine lineare Beziehung zwischen den Werten der Differenz der freien Enthalpie zwischen den beiden eluierenden Peaks  $\delta(\Delta H^\circ)$  und der Differenz der Entropie zwischen den beiden eluierenden Peaks  $\delta(\Delta S^\circ)$ . Solches Verhalten ist nicht ungewöhnlich in Adsorptions- und Reaktionssystemen und wird als Kompensationseffekt ausgeschrieben. Aus thermodynamischer Sichtweise wird dieser Zusammenhang verständlich. Im adsorbierten Zustand besitzt das stärker retardierte Enantiomer (größeres  $-\Delta H$ ) im allgemeinen beschränktere Bewegungsfreiheit und damit niedrigere Entropiewerte als das weniger retardierte Enantiomer. Die Linearität dieser Beziehung wird durch dieses einfache Erklärungsansatz aber nicht erklärt.

Auf entropie-beeinflussende Faktoren wie Veränderung des Solvatisierungszustandes des CD oder Verluste translatorischer oder rotatorischer Freiheitsgrade während der Komplexbildung machen Lindner et al. (1995) aufmerksam. Die Entropie spielt vor allem eine große Rolle, wenn an der stationären Phase eine bestimmte räumliche Anordnung des Analyten bevorzugt wird, wie es bei chiralen Trennungen vorkommt. Würde es sich ausschließlich um Enthalpieunterschiede im chromatographischen Prozeß handeln, wäre eine einheitliche Elutionsreihenfolge der Enantiomeren-Derivate des NIC zu erwarten. Die beobachtete Umkehr der Elutionsreihenfolge der Derivate des Etilefrins und des Epinephrins lässt diese Vermutung nicht zu. Sie besitzen gemeinsam neben einer in Position C-5 substituierten Hydroxylgruppe eine Ethylgruppe N-substituiert und nur ein chirales Zentrum im Molekül. Vielmehr werden bei der chiralen Auftrennung dieser Derivate Entropie-Unterschiede die Enthalpie-Unterschiede überlagern. Genauere Studien in Analogie zu Arbeiten von O'Brien et al. (1997) und Wainer et al. (1987) sind notwendig, um die Verschiedenartigkeit der Mechanismen beim chromatographischen Prozeß auf der OD-RH-Säule zu beleuchten.

Al-Dirbashi et al. (1998) fanden bei Nutzung der OD-R-Säule zur Erfassung von Methamphetamine und seiner Metabolite Amphetamine und *p*-Hydroxymethamphetamine, daß die (*S*)-(+)-Enantiomere der DIB-Derivate der sekundären Amine früher eluieren als die der (*R*)-(-)-Enantiomere, wohingegen das (*S*)-(+)-Enantiomeren-Derivat des primären Amins Amphetamine später eluiert. Die stärker ausgeprägte Fähigkeit der Wasserstoffbrückenbindung im Fall von *p*-Hydroxymethamphetamine und Amphetamine und der daraus folgenden stärkeren Interaktion mit der Carbamatgruppe der CSP wurden als Erklärung für die beobachtete bessere Enantiomeren-Trennung dieser Substanzen im Vergleich zu Methamphetamine mit seinem Methylsubstituenten an der Aminogruppe angeführt.

Bei Propranololanaloga eluierte das (*R*)-Enantiomer sowohl im NP- als auch im RP-Modus zuerst, wenn einer oder beide Aminsubstituenten aliphatisch waren. Bei zwei aromatischen Substituenten hatte das (*S*)-Enantiomer eine kürzere Retentionszeit (Facklam und Modler, 1994).

Die OD-H-Säule (NP-Modus) konnte nicht zur Klärung der absoluten Struktur der Dihydrodiole auf der Grundlage der Elutionsreihenfolge herangezogen werden, da diese nicht einheitlich war (Landsiedel et al., 1998). Eine außergewöhnlich hohe sterische Einpassung in die helicalen Hohlräume (signifikant höhere Kapazitätsfaktoren für die Enantiomere) machten die Autoren verantwortlich für die veränderte Stärke der Interaktion mit der Carbamat-Einheit und die umgekehrte Elutionsreihenfolge. Mit Hilfe von Circulardichroismen-Spektren zeigte sich, daß bis auf die beiden Ausnahmen das (*R,R*)-(-)-Enantiomer zuerst eluierte.

#### 4.3.1.3.3 Phasenvergleiche

In der vorliegenden Arbeit gelang die Auf trennung der NIC-Derivate von Fenoterol nur auf der OD-, nicht aber auf der **OJ-Phase**. Bei ihren Untersuchungen zur chiralen Trennung von Tetrahydronaphthalen-Derivaten als Agonisten und Antagonisten-Liganden von Melatonin-Rezeptoren im NP-Modus (OD-H) stellten Vaccher et al. (1998a) heraus, daß OD- und OJ-Phasen in komplementärer Art arbeiten. Steigende Sperrigkeit der Acylsubstituenten führte zu einer Abnahme der Enantioselektivität und Auf trennung auf der OD-H-Säule, auf der OJ jedoch zu einer Zunahme beider chromatographischer Parameter. Die Carbamat-Gruppe scheint wichtig zur effizienten chiralen Trennung zu sein, weil das Carbonylsauerstoffatom und die NH-Gruppe über Wasserstoffbrückenbindungen mit den korrespondierenden Gruppen des Analytmoleküls interagieren (Witte et al., 1992; Selditz et al., 1997). Stärkere Lösungsmittel wie Alkohole wetteifern effizienter mit dem Analyten um die chiralen Orte. Die Trennfaktoren steigen mit steigender Größe des Alkohols (Isopropanol mit maximalem R), was mit der Abnahme der Fähigkeit größerer Alkohole zu tun hat, um die Wasserstoffbrückenbindungs-Orte aufgrund der sterischen Hinderung zu konkurrieren. Bei der OJ-Säule werden die besten Ergebnisse mit niedrigeren Alkoholen (MeOH und MeCN zur mobilen Phase) erzielt. Teilweiser oder vollständiger Verlust an Trennbarkeit werden beobachtet, wenn 1-Propanol oder 2-Propanol eingesetzt werden. Das weist darauf hin, daß die Wasserstoffbrückenbindung nicht die vorherrschende Interaktionsart darstellt, sondern eher  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen der aromatischen Einheit des Analyten und der CSP eine Rolle spielen.

Um die Schlüssel-Schloß-Beziehung zwischen Analyt-Enantiomer und CSP zu verstehen, sind weitergehende Untersuchungen notwendig, die neben Studien mit strukturell modifizierten Sorbaten auf einer gewählten CSP auch das Retentionsverhalten des Analyten auf unterschiedlichen CSP einschließen sollten.

Hier bietet sich ein Vergleich der OD- und **AD-Phasen** an, um Einblicke zur Bedeutung des Kohlenhydratgrundgerüstes auf den enantioselektiven chromatographischen Prozeß zu gewinnen. Mit der Amylose AD-Säule gelang die Trennung von Proteinkinase-C-Inhibitoren im RP-Modus im Gegensatz zur OD-Säule nicht (Whatley, 1995).

Die Anwendung und der Vergleich von OD- und AD-Phasen im NP-Modus bei der chiralen Trennung beinhaltete eine Arbeit von Wang und Chen (1999). Dabei zeigte sich eine Umkehr der Elutionsreihenfolge, wenn für die AD- eine OD-Säule genutzt wurde. Beim Vergleich der Retentionen von Enantiomeren auf der OD- und AD-Säule stellte sich heraus, daß die überwiegende Zahl der Analyte auf der OD-Säule stärker retardiert wurde. Da die Derivatisierungsgruppen auf beiden CSP gleich sind, kann das unterschiedliche Retentionsverhalten nur auf die konformativen Unterschiede zwischen den beiden CSP zurückzuführen sein. Die Retention ist also nicht nur von den eingeführten funktionellen Gruppen der CSP, sondern auch von ihrer höheren Strukturordnung abhängig. Wainer et al. (1987) haben die Rolle sterischer Faktoren bei der Einpassung des Analyten in die chiralen Hohlräume der CSP hervorgehoben.

Ein interessanter Ansatz zur Gewinnung von Einblicken in die Wechselwirkung bei chiralen Trennungen verspricht auch der Vergleich von **3,5-Dimethylphenylcarbamat-funktionalisierten CD-Phasen** mit der OD-Phase. Da die chiralen Selektoren bei beiden Phasentypen gleich sind, könnten Unterschiede im Retentions- und Trennverhalten von Analyten wie der Aminoalkohol-Derivate des NIC unter anderem dem Einfluß des Kohlenhydratgrundgerüstes zugeordnet werden.

#### 4.3.1.4 Chirale Trennung auf Pirkle-Phasen

Diese Phasen stellen die am besten untersuchten und kommerziell am zahlreichsten verfügbaren CSP dar (Typ I). Einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung dieser CSP leistete Pirkle mit seinen Mitarbeitern, die anfänglich Dinitrobenzoylderivate von Aminosäure-Enantiomeren (Phenylglycin und Leucin) auf Kieselgel bemäntelten, später kovalent banden, was auch polarere Lösungsmittel in der mobilen Phase einsetzbar werden ließ und somit ein breiteres Spektrum an Analyten trennbar wurden. Diesen  $\pi$ -Akzeptor-Phasen schloß sich die Entwicklung von  $\pi$ -Donor-Phasen auf der Basis von  $\beta$ -Naphthoylderivaten des Alanins an. Diese Familie wurde durch Phasen mit Selektoren erweitert, die häufig 2 chirale Zentren und Amid- oder Harnstoff-Einheiten besitzen. Ein Nachteil dieser 2. Generation von Pirkle-Phasen besteht in der häufigen Notwendigkeit der Derivatisierung ( $\pi$ -Donator-Gruppen wie Dinitrobenzoylharnstoff-, Dinitrophenyl-Harnstoff- oder Carbamat-Derivate), obwohl in manchen Fällen die Detektierbarkeit erhöht wird.

Hsu und Walters (1995) setzten die chiralen Antiarrhytmika Ibutilid und Artilid nach Extraktion aus biologischen Flüssigkeiten mit NIC um und trennten die entstandenen Derivate auf einer Pirkle-Phase (3,5-Dinitrobenzoyl-D-Phenylglycin-Säule). Vielversprechende Einblicke in die zugrundeliegenden chromatographischen Interaktionen sind bei vergleichenden Untersuchungen zur Trennung der NIC-Derivate des Fenoterols auf der Pirkle- und auf der OD-Phase möglich.

#### 4.3.1.5 Chirale Trennung auf Protein-Phasen

Diese Phasen vom Typ V schließlich besitzen komplexe Proteinstrukturen (am häufigsten Enzyme) mit sehr spezifischen Bindungsstellen. Eine Reihe von Proteinen binden spezifisch Analyte über eine Kombination aus polaren elektrostatischen und apolaren hydrophoben Wechselwirkungen. Verknüpft mit einer Kieselgelmatrix zeigen die Säulen mit diesen chiralen Selektoren hohe Spezifität, aber auch begrenzte Ladungsfähigkeit.

Das Konzept der Nutzung **makrozyklischer Antibiotika** als chirale Selektoren in CSP wurde von Armstrong auf der Pittsburgh Konferenz eingeführt. Chirobiotic V war die erste kommerziell verfügbare HPLC-Säule (Firma Astec) mit kovalenter Bindung des amphoteren Glycopeptids Vancomycin an Kieselgel. Vancomycin hat 18 chirale Zentren im Molekül, die

drei Hohlräume auskleiden. Die 2. Phase (Chirobiotic T) trägt das amphotere Glycopeptid Teicoplanin mit 23 chiralen Zentren und vier Hohlräumen als chiralen Selektor. Schließlich ist noch die Chirobiotic R-Phase mit Ristocetin A als chiraler Selektor zu nennen, die 38 chiralen Zentren (hauptsächlich von den 6 Zuckereinheiten) besitzt.

Kaliszan (1998) betonte in seiner Übersichtsarbeit quantitative Struktur-Retentionsbeziehungen in Zusammenhang mit Untersuchungen struktureller Erfordernisse von Wirkstoffen im biologischen System (Affinität zu spezifischen Bindungsstellen an Makromolekülen bei Absorption, Verteilung und Eliminierung, Hydrophobizität etc.). Dieses In-Beziehung-Setzen von Wirkstoff-Retention auf Protein-Phasen, aber auch OD-Material (Chimonczyk et al., 1998) zur biologischen Aktivität ist aufgreifenswert.

#### 4.3.2 Achirale stationäre Phasen

Kramer und Blaschke (2001) nutzten ein Säulenschalten zwischen zwei RP-Phasen (RP-18 und RP-Select B) zur Abtrennung eines störenden Peaks bei der achiralen HPLC von Fenoterol nach Umsetzung mit N-(chloroformyl)carbazol.

Al-Dirbashi et al. (1998) gelang es in ihrer enantioselektiven HPLC-Methode zur fluorimetrischen Erfassung von Methamphetamine und seiner Metabolite (Amphetamine und *p*-Hydroxymethamphetamine) in menschlichem Urin nach Umsetzung mit dem selbst hergestellten achiralen Reagenz 4-(4,5-Diphenylimidazoyl)benzoylchlorid (DIB-Cl), die sechs Enantiomeren-Derivate auf einer OD-R-Säule zu trennen. Eine Koelution zweier Enantiomeren-Peaks ((*S*)-(+)-Amphetamine und (*S*)-(+)-Methamphetamine) wird durch das Vorschalten einer C-18-Säule verhindert.

Auch Walters und Buist (1998) ließen bei ihrer enantioselektiven Methode zur Erfassung von Reboxetin (Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibitor) in Plasma dem eigentlichen chromatographischen Schritt eine Derivatisierung vorausgehen. Nach der Festphasenextraktion wurde in wasserfreiem Medium mit (+)-1-(9-fluorenyl)ethylchloroformiat (FLEC) umgesetzt, nach Trennung vom Standardderivat auf einer Kieselgelsäule im NP-Modus die Reboxetin-Derivate über ein Säulenschalten auf eine in Reihe geschaltete Cyanosäule (Interferenzen trennen) und eine OD-H-Säule (bessere Selektivität als achirale RP- und NP-Säulen) eluiert, wo die Diastereomere fluorimetrisch detektiert werden konnten.

Die Nutzung einer OD-Phase in der SFC zur Trennung von  $\beta$ -Blockern und 1,4-Benzodiazepine beschrieben Phinney et al. (1998). Dabei wurden die achiralen Selektivitäten von Cyano- und Amino-SP bei dieser gekoppelten seriellen achiralen-chiralen Säulentechnik genutzt. Die Autoren hoben die Möglichkeiten zur Vereinfachung der Methodenentwicklung in der SFC hervor, die aufgrund der Nutzung achiraler SP und nicht CSP zur Selektivitätsveränderung gegeben sind. Mit der Modifizierung der achiralen Selektivität des chromatographischen Systems kann auch möglichen Koelutionen entgegengesetzt werden. Walters und Hsu (1994) erfaßten in einer automatischen NP-HPLC die Enantiomere von Lifibrol (Hypercholesterolemia-Mittel) und seinen Metaboliten aus Hundeplasma nach Festphasenextraktion. Beim Säulenschalten zur Eliminierung spät eluierender Substanzen wurde zuerst eine Kieselgelsäule und anschließend eine OD-H-Säule eingesetzt. Bei dieser seriellen Verschaltung zweier Phasen mit unterschiedlichen Retentionsmechanismen ist zu erwarten, daß die mobile Phase die Selektivität stark beeinflußt. Die Verwendung der Kieselgelsäule erforderte bei ihren Untersuchungen eine stärkere mobile Phase.

Im Vorfeld gelang die chirale Trennung der NIC-Derivate des Fenoterols bei in Serie vorgesetzter RP-8-Säule nur bedingt. Mit dem gewählten Säulenschaltreglement und der Möglichkeit der Nutzung einer einzigen mobilen Phase ist eine vergleichsweise einfache Analytik mit Automatisierungsmöglichkeit entwickelt worden.

Hsu und Walters (1995) etwa setzten die chiralen Antiarrhytmika Ibutilid und Artiolid nach Extraktion aus biologischen Flüssigkeiten mit NIC um und trennten die entstandenen Derivate auf einer Pirkle-Phase (3,5-Dinitrobenzoyl-D-Phenylglycin-Säule) nach aufwendiger Säulenschaltung (5 separate Pumpen; neben zwei in Reihe geschalteter Cyano-Säulen zur Trennung des überschüssigen NIC kamen noch eine C-8-Säule zur schnellen achiralen Analyse und eine C-18-Säule zum temporären Halten des NIC-Derivates nach der C-8-Säule zum Einsatz. Das erlaubte die Bearbeitung von zwei Proben gleichzeitig im System. Darüber hinaus ermöglichte ein Detektor-Switch die Sammlung achiraler und chiraler chromatographischer Daten durch zwei Detektoren in einem Datenkanal.

Der Einsatz einer C-18-Phase als achirale SP zur Trennung der NEIC-Derivate des Fenoterols war nach dem Studium der Referenz-Literatur die Methode der Wahl.

Gübitz und Mihellyes (1984) berichteten von der Trennung der Enantiomeren-Harnstoffe von  $\beta$ -Blockern nach Derivatisierung mit (*R*)-(-)-NEIC mittels RP-HPLC (Knauer RP-18-Säule). Gietl et al. (1988) zeigten bei der Erfassung der Enantiomere des unspezifischen Kalziumantagonisten Prenylamin nach Derivatisierung mit (*R*)-(-)-NEIC im RP-HPLC-Modus (Waters Nova-Pak C-18-Säule), daß mit zunehmendem wäßrigen Anteil in der mobilen Phase sowohl Retentionszeit als auch Selektivität zunahm. Der Einsatz von Dinatriumhydrogenphosphat in der mobilen Phase verbesserte die Trennung der Diastereomere von Verunreinigungen, die aus der biologischen Matrix oder im Verlauf des Degradationsprozesses von NEIC bei Zugabe von Ethanolamin entstammen. Jira et al. (1991) setzten in Anlehnung der Vorschriften von Gübitz und Mihellyes (1984), Gietl et al. (1988), Darmon und Thenot (1986) bei NEIC-Derivatisierung und Pianezolla et al. (1989) bei NEITC-Derivatisierung rac.  $\beta$ -Blocker und  $\alpha$ -Sympathikomimetika neben (*IS*)-(+)-Camphor-10-sulfonylchlorid (CSC) und (*R*)-(+)-1-Phenylisocyanat mit (*R*)-(-)-NEIC um und trennten die so entstandenen Harnstoff-Derivate im RP-Modus auf einer C-18-Säule.

Eine ODS-Hypersil-Säule wurde zur Bestimmung der Enantiomeren-Reinheit einer antikanzerogenen wirkenden Substanz (9-Amino-20(*S*)-Camptothecin) im RP-Modus nach Derivatisierung mit (*S*)-NEIC von Kagel et al. (1993) eingesetzt.

Die Optimierung der Trennung der NEIC-Derivate des Fenoterols wurde aufgrund der gemessenen Empfindlichkeitseinbußen des Derivates im Vergleich zu NIC nicht vorangetrieben.

### 4.3.3 Chirale mobile Phasen

In der Flüssigchromatographie ist neben CSP der Einsatz von chiralen Selektoren in der mobilen Phase (unter Bildung von Metallkomplexen, Ionenpaaren und ungeladene chirale Additiva wie CD) eine weitere Möglichkeit der Durchführung von Enantioseparationen. Die Vorteile liegen in der Möglichkeit des Einsatzes kostengünstiger konventioneller Säulen, der leichteren Austauschbarkeit chiraler Additiva, der großen Verfügbarkeit der Additiva und der Nutzung der unterschiedlichen Selektivitäten in Vergleich zu CSP. Nachteile liegen vor allem in der Begrenzung der Detektionssysteme durch die Additiva.

Hanna et al. (1998) setzten Gallensalze (ohne und mit Phosphatidylcholin) in der Flüssigchromatographie als dynamische Bemanlung einer C-8-Kieselgelsäule erfolgreich zu Untersuchungen zum Verteilungsverhalten von Wirkstoffen (darunter Fenoterol) ein. Dabei stellten sie fest, daß die bemäntelte Phase chromatographisch vergleichbar einer gebundenen Festphase ist und die geladene Form von basischen Aminen Interaktionen mit der Phase vergleichbar denen von Phospholipidvesikeln zeigt.

Eine chromatographische chirale Trennung von Fenoterol und seines NIC-Derivates gelang bei Übernahme der beschriebenen Methodik im Rahmen dieser Arbeit nicht (Ergebnisse nicht gezeigt).

## 4.4 HPCE-Analytik

### 4.4.1 Chirale Trennung durch Einschlußkomplexierung

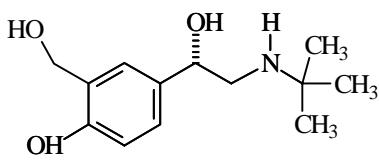
Ihre eigentliche Bedeutung in der Analytik finden chirale Additiva beim Einsatz in der Kapillarelektrophorese. Auch in der CE gibt es zwei Wege, Enantiomere zu trennen. Zum einen kann der chirale Analyt mit einem optisch aktiven Reagenz umgesetzt werden. Die entstehenden Diastereomere sind dann in achiraler Umgebung aufgrund ihrer unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften trennbar. Zum anderen ist die Bildung temporärer Komplexe der Analyt-Enantiomere mit einem chiralen Selektor möglich, der in der CE hauptsächlich als Bestandteil der mobilen Phase (BGE) auftritt. Ist nun die Stärke der Interaktionen der Enantiomere mit dem chiralen Selektor unterschiedlich, ergibt sich bedingt durch die unterschiedlichen zeitabhängigen Mobilitäten der Enantiomere im elektrischen Feld die Möglichkeit einer chiralen Analyterfassung.

Mehrere Übersichtsarbeiten beschäftigen sich mit chiralen Trennungen in der CE (Nishi und Terabe, 1995; Gübitz und Schmid, 1997; Verleysen und Sandra, 1998). Nach diesen lässt sich eine prinzipielle Einordnung in CE-Trenntechniken in wässrigen Medien vornehmen, auch wenn von Autor zu Autor geringfügige Unterschiede bestehen. Chirale Trennungen durch Ligandenaustausch wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt.

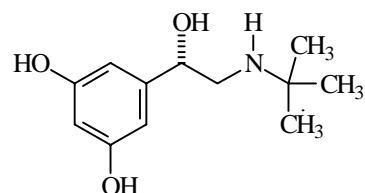
Am häufigsten werden chirale Trennungen in der CE über eine Einschlußkomplexierung im Hohlraum von Cyclodextrinen erzielt. Nur sie kamen im Verlauf der CE-Methodenentwicklung aus dieser Gruppe zum Einsatz.

CD als cyclische Oligosaccharid-Moleküle besitzen einen hydrophoben chiralen Hohlraum und eine hydrophile Oberfläche. Wainer und Drayer (1988) formulierten vier Grundregeln für die chirale Erkennung von Enantiomeren durch CD. Die Verbindungen dürfen nicht so groß sein, daß sie nicht wenigstens teilweise im CD eingeschlossen werden können; die chirale Struktur sollte nahe der Öffnung des CD-Hohlraumes gelegen sein; eine aromatische Struktur in  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Stellung zum Chiralitätszentrum sollte vorhanden sein und die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung direkt am chiralen Zentrum oder in dessen Nähe sollte bestehen. Für eine gute Trennung der Enantiomere von  $\beta_2$ -Sympathikomimetika wird eine Interaktion von 3 oder mehr Punkten zwischen den Hydroxyl- und Aminogruppen eines der Enantiomere mit den Hydroxylgruppen des CD und eine Komplexierung des (substituierten) aromatischen Rings dieses Enantiomers mit dem hydrophoben Teil des Hohlraumes für notwendig erachtet (Dalglish, 1952; Guttman et al., 1988; de Boer, 1999).

Viele Substanzen aus der Gruppe der  $\beta_2$ -Sympathikomimetika (Abb.43.) werden diesen genannten Anforderungen gerecht. Davon zeugen die zahlreichen CE-Trennungen mittels CD, die schon für Terbutalin (Fanali, 1991; Pálmarsdóttir und Edholm, 1994; Aumatell et al.,



**Salbutamol**



**Terbutalin**

**Abb.43.** Strukturformel der  $\beta_2$ -Sympathikomimetika Salbutamol und Terbutalin.

1994; Bechet et al., 1994; Stalberg et al., 1995; Ingelse et al., 1995a,b; Guttman et al., 1995; Tanaka et al., 1996; Bunke und Jira, 1996; Fanali und Camera, 1996; Stalcup und Gahm, 1996; Szemán et al., 1997; Petersson et al., 1999; de Boer et al., 1999), Salbutamol (Heuermann und Blaschke, 1993; Rogan et al., 1994; Aumatell et al., 1994; Stalberg et al., 1995; Tanaka et al., 1996; Esquisabel et al., 1997; ) und Fenoterol (Tanaka et al., 1996; de Boer et al., 1999) beschrieben worden sind. Davon ausgehend, sollte die chirale Trennung der Fenoterol-NIC-Derivate zuerst CD-vermittelt entwickelt werden.

Natives **β-CD** als chiraler Selektor wurde schon erfolgreich für Terbutalin (Fanali, 1991 und Pálmarsdóttir und Edholm, 1994 mit 15 mM  $R=2,0$ ; Aumatell et al., 1994 mit 15 mM  $R=1,9$ ; Ingelse et al., 1995a mit 2,5 mM  $R=1,26$ ) eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fenoterol-Trennfaktor von 1,24 bei einer optimalen Konzentration von 7,5 mM ermittelt.

Beim Einsatz von nativem **γ-CD** konnten weder für NIC-Fenoterol noch für Fenoterol als Reinsubstanz chirale Trennungen erzielt werden.

Die Tiefe des Hohlraums und die Löslichkeit der CD können über Modifizierungen der nativen CD erhöht werden. Dazu stehen die Hydroxylgruppen in den Positionen 2, 3 und 6 der Glycopyranose-Einheiten der CD zur Verfügung. Die verschiedenen Derivate können stark veränderte Enantioselektivitäten aufweisen. Die am häufigsten verwendeten CD-Derivate sind neben Hydroxyethyl-**β-CD** Heptakis-O-methyl-**β-CD**, Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-**β-CD**, Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)-**β-CD**, und Hydroxypropyl-**β-CD**, die auch im Rahmen dieser Arbeit ihren Einsatz fanden.

Andere Autoren setzten **DM-β-CD** erfolgreich zur chiralen Analytik von Aminoalkoholen wie Terbutalin (Fanali, 1991, mit 5 mM  $R=2,8$ ; Pálmarsdóttir und Edholm, 1994, mit 5 mM  $R=4,6$ ; Guttman et al., 1995, mit 50 mM  $R=2,3$ ; Szeman et al., 1997, mit 15 mM  $R$  zwischen 4,8 und 6,4) und Salbutamol (Rogan et al., 1994; Tanaka et al., 1996; Esquisabel et al., 1997) ein. Die Enantiomere des Fenoterols und des Ritodrins konnten mit dem dimethylierten Selektor im untersuchten Konzentrationsbereich bis 10 mM in dieser Arbeit nicht getrennt werden. Dafür gelang erstmalig die chirale Erfassung von Fenoterol mit dem trimethylierten Derivat des **β-CD** (**TM-β-CD**). Das strukturell nahe verwandte Ritodrin andererseits konnte nicht enantioselektiv getrennt werden. Um den Anteil der Position der phenylsubstituierten Hydroxylgruppen und der Nähe der zwei chiralen Zentren auf die Trennung abschätzen zu können, sind weiterführende Versuche notwendig. In diesem Kontext ist eine vertiefende Studie zur Trennung von Aminoalkoholen mit den *di*- und *tri*-methylierten Derivaten von **β-CD** lohnenswert. Auffallend sind die zum Teil hohen Konzentrationen an **DM-β-CD**, die zur Trennung von Salbutamol in saurem Puffer nötig waren (112 mM für  $\alpha=1,12$ , Rogan et al., 1994; ungenügende Trennung bei 40 mM, Tanaka et al., 1996, 20 mM mit  $R=3,09$  Equisabel et al., 1997).

Von Bedeutung bei der Untersuchung des chiralen Trennmechanismus zur Trennung der NIC-Derivate von Aminoalkoholen könnten Studien werden, die mit Dimethylphenyl-Cyclodextrinen (**DMP-CD**) als chirale Selektoren in der CE arbeiten, der nicht zur Verfügung stand. Dieser Selektor besitzt mit der dimethylphenolischen Einheit eine Struktur, die bei der OD-Phase in der LC wirksam wurde.

Mit dem erfolgreichen Einsatz von **HP-β-CD** als chiralen Selektor für die Fenoterol- und Ritodrin-Trennung konnte eine vorangegangene Arbeit von de Boer (1999) bestätigt werden. Die Autoren setzten **HP-β-CD** bei der Modellierung der Bedingungen zur Enantiomeren-Trennung von  $\beta_2$ -Sympathikomimetika als chiralen Selektor in einem Polyethylenglycol-Gel in der CE ein. Dabei untersuchten sie den Einfluß der Konzentrationen des PEG und des **HP-β-CD** auf die chirale Trennung. Mit den Polynomialgleichungen 2. Ordnung wurden die vorhergesagten Konzentrationen zur Trennung von Terbutalin (5,9 % PEG und 10 mM **HP-β-CD** für  $R=2,5$ ) Fenoterol (4,7 % PEG und 11,7 mM **HP-β-CD** für  $R=2,0$ ) und Ritodrin (6,0 % PEG und 25 mM **HP-β-CD** für  $R=1,5$ ) berechnet. Die kalkulierten Konturdiagramme deuteten

im Bereich ohne PEG-Zusatz auf einen maximalen chiralen Trennfaktor von über 7 bei weniger als 10 mM Selektorkonzentration für Terbutalin hin. Mit zunehmender Konzentration nahm die Trennung dann wieder ab. Eine chirale Trennung für Fenoterol war nach diesen Berechnungen ohne PEG im gesamten Konzentrationsbereich nicht zu erreichen. Einschränkend muß angemerkt werden, daß die Polynomiale nur gültig für einen Konzentrationsbereich von 3-9 % PEG und 8-22 mM HP- $\beta$ -CD waren.

Es wurde versucht, die gewonnenen Daten unter Zuhilfenahme der molekularen Struktur und pKa-Werte der untersuchten Analyte zu erklären. Da die aufgeführten pKa-Werte der untersuchten Analyte zwischen 8,5 und 9,3 und bei dem verwendeten BGE-pH-Wert von 2,5 vollständig protoniert vorliegen, wurden die Unterschiede in der chiralen Trennfähigkeit nur auf Unterschiede in der molekularen Struktur zurückgeführt. Die Autoren unterteilten die Analyte in 4 Gruppen: (A) Substanzen mit zwei phenolischen Hydroxylgruppen in der aromatischen Ringstruktur (Terbutalin, Isoprenalin, Fenoterol), (B) Analyte mit einer phenolischen Hydroxylgruppe und einer aliphatischen Hydroxylgruppe in der aromatischen Ringstruktur (Salbutamol), (C) Analyte mit einer phenolischen Hydroxylgruppe in der aromatischen Ringstruktur (Ritodrin, Oxedrin) und (D) Analyte mit anderen Substituenten in der aromatischen Ringstruktur (Clenbuterol). Die Vertreter der Gruppen A und D konnten am besten getrennt werden. Dabei scheint es, daß die größte Unterscheidung zwischen den Enantiomeren gefunden wird, wenn die  $\beta_2$ -Sympathikomimetika Substituenten im aromatischen Ringstruktur (und da besonders in R<sub>2</sub>- und R<sub>4</sub>-Position, Terbutalin und Clenbuterol, R jeweils 2,5) besitzen. Grund dafür dürfte die bessere räumliche Anpassung des länger retardierten Enantiomers in die CD-Hohlraum sein. Fenoterol (R=2,0) besitzt neben den anscheinend essentiellen lipophilen Substituenten an Position R<sub>2</sub> und R<sub>4</sub> auch noch einen großen R<sub>1</sub>-Substituenten, der scheinbar im Vergleich zu den Analyten Terbutalin und Isoprenalin die chirale Trennung verringert.

Salbutamol ließ sich nicht in seine Enantiomere trennen, was auf die Methoxygruppe in R<sub>2</sub>-Position zurückgeführt wird.

Zu den Parametern, deren Einfluß auf die Trennbarkeit zu Optimierungszwecken in dieser Arbeit untersucht wurden, gehörten die Konzentration des chiralen Selektors, der pH-Wert und die Ionenstärke des Phosphatpuffers. Weitere Mittel zur Optimierung der chiralen Trennung können die Veränderung der Temperatur, der elektrischen Feldstärke und des Puffers sein (Lindner et al., 1995). Auch die Zugabe organischer Modifizierer oder anderer Additiva wie Harnstoff kann die Effizienz von Trennungen stark beeinflussen, sei es über die Verbesserung der Löslichkeit der chiralen Analyten und/oder der Affinitätsverminderung der chiralen Analyten zum hydrophoben Hohlraum des chiralen Selektors. Diese Einflußnahme wurde bei den Optimierungsuntersuchungen jedoch nicht berücksichtigt, da auch ohne sie eine ausreichende chirale Trennung des Fenoterols erzielt wurde.

Durch Veränderung des pH-Wertes wird die Ionisation des Analyten beeinflußt, die für deren Mobilität und deren Wechselwirkung mit dem CD von Belang ist. Ein niedriger pH-Wert wird im allgemeinen zur Trennung kationischer Analyten eingesetzt, ein hoher pH-Wert zur Trennung anionischer Analyten. Die chirale Trennung kann über die Manipulation des EOF optimiert werden. Abhängig von den Erfordernissen kann der EOF erhöht, unterdrückt oder auch umgekehrt werden. Die Unterdrückung des EOF kann über das Bemänteln (engl.: coating) der Kapillarwand mit Polyacrylamid oder durch Zugabe von Alkylhydroxyalkylcellulose oder Polyvinylalkohol (dynamic coating), aber auch wie in dieser Arbeit durch die Herabsetzung des pH-Wertes des BGE erreicht werden. Der EOF, der die Eigenmobilität der Analyten überlagert, verschlechtert erwartungsgemäß die Trennung der Enantiomere mit steigendem pH-Wert.

Die Analyte tragen im untersuchten pH-Bereich eine positive Ladung und werden durch Wechselwirkung mit den neutralen CD, die mit dem EOF wandern, zurückgehalten. Dabei ist die Differenz der effektiven Mobilitäten der Analyt-Enantiomere in einem BGE mit höherem

pH-Wert geringer, womit sich der Abfall der Selektivität erklären lässt. Für die weitere Optimierung wurde deshalb zur Unterdrückung des EOF in der unbeschichteten Kapillare ein pH von 3,0 gewählt.

Die Erhöhung der Phosphatpufferkonzentration verbessert generell die Enantiomeren-Trennung, erhöht aber auch die Migrationszeiten infolge von Ionenpaareffekten und einer EOF-Abnahme. Darüber hinaus kann das Auftreten von Peak tailing verhindert werden. Eine obere Grenze für die Pufferkonzentration wird durch die sich erhöhende Stromstärke und daraus resultierende Wärmeentstehung diktiert, die die Effizienz der Trennung verschlechtert. Wren und Rowe (1992) postulierten in ihrem Trennmodell die Existenz einer optimalen Selektorkonzentration, die folgendermaßen berechnet werden kann:

$$[\text{CD}]_{\text{opt}} = 1/(\sqrt{K_1 K_2}) \quad \text{mit } [\text{CD}]_{\text{opt}} = \text{optimale Selektorkonzentration} \\ K_1, K_2 = \text{Komplexbildungskonstanten der Enantiomere 1,2 mit dem CD}$$

Auch bei der CD-vermittelten chiralen Trennung von Fenoterol fand sich eine optimale Selektorkonzentration (7,5 mM für  $\beta$ -CD; 10 mM für HP- $\beta$ -CD) in Bezug auf den Trennfaktor. Bei sehr hohen CD-Konzentrationen liegt das CD in so großem Überschuss vor, daß beide Enantiomere des Analyten vollständig komplexiert werden, weshalb keine Auf trennung mehr zustandekommt (Schmitt und Engelhardt, 1993). Die Trennung bei geringen CD-Konzentrationen hingegen beruht auf unterschiedlichen Aufenthaltszeiten der Enantiomere im CD, bedingt durch unterschiedliche Komplexstabilitäten. Daraus ergibt sich, daß die optimale CD-Konzentration umso niedriger ist, je höher die Affinität des Analyten zum CD ist.

Anionische CD wie carboxymethyliertes  $\beta$ -CD (CM- $\beta$ -CD), carboxyethyliertes  $\beta$ -CD (CE- $\beta$ -CD), Sulfobutylether- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD) und CD-Phosphate werden zur chiralen Trennung kationischer, neutraler und selbst anionischer Analyte eingesetzt. Sie zeichnen sich durch verbesserte Wasserlöslichkeit aus. Im ionisierten Zustand wandern sie entsprechend ihrer eigenen elektrophoretischen Mobilität. Die Anwendung des Gegenstromprinzips resultiert in größeren Trennfesten.

**SBE- $\beta$ -CD** erwies sich bei Vergleichsstudien anionischer CD-Derivate wie CM- $\beta$ - (und  $\gamma$ )-CD,  $\beta$ - (und  $\gamma$ )-CD-Phosphat als chirale pseudostationäre Phase zur Trennung einer Reihe von neutraler und basischer Analyte als sehr effektiver Selektor (Tanaka et al., 1996). Ein Trennfaktor  $R > 1,2$  in 50 mM Phosphatpuffer (pH 5) und 12 kV Spannung erzielten die Autoren für Terbutalin (0,2 mM, Wanderung zur Kathode), Salbutamol (3 mM, Wanderung zur Kathode) und Fenoterol (5 mM, Wanderung zur Anode). Unbehandelte Kapillaren waren überwiegend ungeeignet für die Trennung basischer Racemate, mutmaßlich aufgrund des starken EOF und der resultierenden kurzen Migrationszeit. Eine polyacrylamidbeschichtete Kapillare wurde bei der Trennung basischer Wirkstoffe eingesetzt, um den EOF zu unterdrücken und die Adsorption kationischer Analyte auf der Kapillaroberfläche zu verhindern. Durch die Konzentration des Selektors und die Bindungskonstante des Analyten wurde die Migrationsrichtung eingestellt. Auch Effekte des pH-Wertes des Puffers auf die Trennung wurden untersucht. Mit steigendem pH-Wert nahm die positive Ladung des basischen Analyten ab, und so verringerten sich auch die elektrostatischen Interaktionen zwischen Analyt und anionischem CD bei höherem pH-Wert. Somit wird klar, warum die meisten Analyte bei niedrigen pH-Werten und CD-Konzentrationen besser getrennt werden. Auch hier bestätigte sich, daß bei größerem K-Wert geringere CD-Konzentrationen für eine optimale Trennung nötig sind.

Die Gruppe von Analyten, zu der Terbutalin gehört, zeichnete sich durch relativ große Unterschiede in den Komplexbildungskonstanten der Enantiomere aus (große  $\alpha$ -Werte) und somit konnte die chirale Trennung bei geringen CD-Konzentrationen erfolgen.

Für die Gruppe von Analyten, zu der Fenoterol gehörte, sind große Komplexbildungskonstanten charakteristisch. Deshalb wanderten die Analyte als Komplex zur Anode. Die Erhöhung der Konzentration des Selektors erhöhte nicht den Trennfaktor. Eine CD-Konzentrationsverringerung verursachte bei Aminoglutethimid und Tri-Hexylphenidyl als Vertreter dieser Gruppe sogar eine Abnahme der apparenten Mobilitäten und eine Zunahme des Trennfaktors. Beim Versuch der Umkehr der Migrationsrichtung der Analyte dieser Gruppe zur Detektion am kationischen Ende der Kapillare innerhalb von 30 Minuten mußte die CD-Konzentration weniger als 0,05 mM betragen und trotzdem war die Enantioseparation stark herabgesetzt.

Die Gruppe von Analyten, zu der Salbutamol gehörte, besitzt relativ kleine Komplexbildungskonstanten. Darüber hinaus sind sie durch geringe Unterschiede in den Bildungskonstanten beider Enantiomere charakterisiert. Der anionische Selektor ist besonders für diese Gruppe von Nutzen, da die elektrostatischen Interaktionen die Komplexbildung stärken und der Einsatz hoher CD-Konzentrationen leicht zu verwirklichen ist aufgrund ihrer guten Löslichkeit.

Der Einsatz anionischer  $\gamma$ -CD-Derivate anstelle von  $\beta$ -CD-Derivaten scheint ein interessanter Weg. Da sich die Hohlraumgröße zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD unterscheidet, wird sich bei Austausch des Selektortyps auch die Komplexbildungskonstante zwischen Analyt und jeweiligem Selektor verändern. Die Fenoterol-Trennung gelang mit 5 mM  **$\gamma$ -CD-Phosphat** in 50 mM Phosphatpuffer bei pH 5. Wie beim Einsatz von SBE- $\beta$ -CD wanderte der Komplex zur Anode ( $R<1,2$ ). Das  $\beta$ -CD-Phosphat war nicht zur Trennung geeignet, wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde. Der  $\gamma$ -CD-Phosphat-Hohlraum scheint dagegen das Fenoterolmolekül einschließen zu können. Bei Vergleichen zwischen dem Einsatz anionischer und neutraler CD zur Trennung basischer Racemate wurde allgemein festgestellt, daß die erforderlichen Konzentrationen zur chiralen Trennung der entsprechenden Analyte beim Einsatz anionischer CD viel niedriger lagen als bei neutralen CD. Plausibel ist dieser Zusammenhang, wird doch durch die elektrostatische Interaktion zwischen kationischem Analyt und anionischem CD die CD-Analyt-Komplexierung verstärkt und das CD-Konzentrations-Optimum erniedrigt.

#### 4.4.2 Chirale Trennung durch Affinitätsinteraktionen (Chirale Affinitäts-EKC)

Affinitätsinteraktionen sind (neben Interaktionen durch Einschlüsse bedingt durch die Struktur der Moleküle) bei mehreren Klassen von chiralen Selektoren wie Polysacchariden und Alkaloiden hauptsächlich für chirale Trennungen verantwortlich. Auch die im Hinblick auf ihre Nutzung zur chiralen Trennung von Fenoterol näher behandelten Proteine und Antibiotika gehören dazu.

Nach ihrem erfolgreichen Einsatz als chirale Selektoren in der HPLC haben Proteine auch Anwendung in der CE gefunden. Abhängig vom gewählten pH-Wert können Proteine positiv oder negativ geladen sein. Ihre Ladung verleiht ihnen elektrophoretische Mobilität und sie können zur Trennung von neutralen und geladenen Analyten herangezogen werden. Zur Verhinderung von Detektionsproblemen beim Passieren von Protein durch die Detektorzelle entwickelten Tanaka und Terabe (1995) eine sogenannte partielle Trennzonen-Technik (engl.: partial separation zone technique). Dabei wird die Kapillare teilweise mit der Proteinlösung gefüllt, die den Detektor nicht erreicht. Tanaka und Terabe (1997) gelang mit dieser Technik neben 28 weiteren Racematen auch die Trennung von Fenoterol mittels Einsatzes von **AGP** (500  $\mu$ M) im Phosphatpuffer (pH 6) unter Zusatz von 10 % MeOH. In der Arbeit der Autoren von 1995 wurde ein Phosphatpuffer (50 mM) bei pH 4 mit AGP unter Verwendung einer

Polyacrylamid-beschichteten Kapillare zur Unterdrückung des EOF genutzt. Da der pI des AGP zwischen 2,9 und 3,2 liegt, wanderte der Selektor als leicht negativ geladen zur Anode mit sehr geringer Geschwindigkeit. Nur Chlorprenalin konnte von den verschiedenen getesteten basischen Stoffen unter diesen Bedingungen getrennt werden (500  $\mu$ M AGP), selbst bei Zugabe organischer Modifizierer. Da diese Technik unabhängig von Migrationsrichtung oder Geschwindigkeit der Trennzone (Protein) ist, nutzten die Autoren jetzt pH-Werte  $>4$  zur Trennung, bei dem AGP stark zur Anode wandert. Enantiomeren-Trennung findet bei Passage der Trennzone statt. Mit AGP als chiralen Selektor wanderte der Analyt schneller durch die Trennzone bei höherem pH-Wert, wenn die Ladung des Analyten unverändert bleibt, da die elektrophoretische Geschwindigkeit des AGP von dem pH-Wert abhängt. Des weiteren wird eine starke elektrostatische Interaktion zwischen dem negativ geladenen AGP und den kationischen Analyten erwartet. Enantiomeren-Trennungen mit AGP verbesserten sich mit steigendem Puffer-pH, wie hier mit 50 mM Phosphatpuffer des pH-Wertes 5 oder 6 gezeigt wurde. Um die sehr starken Interaktionen zwischen Analyten wie Fenoterol und dem Selektor zu vermindern, wurde 10 % organische Modifizierer zugesetzt. Die R-Werte unterschieden sich je nach Nutzung von AGP verschiedener Anbieter (Fenoterol zwischen 2,2 und 3,1). Auch Terbutalin (pH 6, 1000  $\mu$ M, R zwischen 1,8 und 2,5) wurde erfolgreich chiral getrennt.

Makrozyklische Antibiotika als chirale Selektoren zeigen Enantioselektivität einem beträchtlichen Anzahl von Analyten gegenüber. Sie besitzen mit ihren zahlreichen Chiralitätszentren und verschiedenen funktionellen Gruppen vielfältige Möglichkeiten der Interaktion zur chiralen Erkennung. Als primäre Interaktionsart werden Wechselwirkungen ionischer Natur angenommen. Zu den sekundären Interaktionsarten zählen sterische und hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol- und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen.

**Vancomycin** setzten Kang et al. (1998) als chiralen Selektor in der CE zur Trennung der FMOC-Derivate von Aminosäuren ein. Mit dem polykationischen Polymer Hexadimethrinbromid als EOF-Modifizierer wanderte die anionischen Analyten mit dem EOF und die Trennzeit wurde verkürzt. Darüber hinaus wurde bei Einsatz dieses BGE-Additivs die Adsorption von Vancomycin an der Kapillarwand minimiert.

Interessant wäre die Überführung der beiden vorliegenden HPLC-Methoden für Fenoterol mit Vancomycin (Chirobiotic V; Beesley, 1999) und **Cellobiohydrolase**-Enzym (Chiral-CBH; Hermansson, 2001) als chirale Selektoren in die CE.

#### 4.4.3 Chirale Trennung durch Solubilisierung

Die micellare elektrokinetische Chromatographie basiert auf dem Einsatz von micellenbildenden Substanzen, die sowohl natürlich vorkommen als auch synthetisch hergestellt werden können. Sind diese geladen, wandern sie aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität im elektrischen Feld. Geladene und elektrisch neutrale Analyten können chiral getrennt werden, wenn chirale Micellenbildner eingesetzt werden. Ursache dafür ist die stereoselektive Verteilung des Analyten zwischen dem wässrigen BGE und der Micelle. Die Analyten werden auf der hydrophoben Oberfläche der Micelle adsorbiert und interagieren mit den polaren Gruppen der micellenbildenden Substanz.

Gallensalze wie Natriumcholat (SC), Natriumdeoxycholat (SDC), Natriumtaurocholat (STC) und Natriumtaurodeoxycholat (STDC) wurden von Terabe et al. (1989) als chirale Selektoren eingeführt. Untersuchungen von Schwarz et al. (1996) zeigten, daß nur hydrophobe, kationische Wirkstoffe wie Propranolol mit den verwendeten oberflächenaktiven Gallensalzen interagierten. Sie besitzen ein Steroid-Grundgerüst und bilden helicale Micellen mit umgekehrter Micellenkonformation und wurden erfolgreich zur chiralen Trennung einer

Reihe von Analyten eingesetzt, darunter Binaphthylderivaten und DNS-Aminosäuren. Gallensalze zeigen synergistische Effekte in Kombination mit CD. Die Trennung des NIC-Derivates des Fenoterols CD-vermittelt und mit den genannten Gallensalzen gelang nicht. Bevor jedoch vom MEKC-Modus zur Trennung abgerückt werden kann, sollten weiterführende Arbeiten mit Vertretern von drei weiteren Klassen chiraler Micellenbildnern durchgeführt werden.

**Aminosäurederivate mit langen Alkylketten** (Sodium N-dodecanoyle-L-Valinate SDVal, SDAla, SDGlu, SDSer, SDThr) sind schon erfolgreich zur Trennung von chiralen Analyten eingesetzt worden. Neuere Micellenbildnern auf der Basis von langkettigen Aminosäuren wie (*R*)-dodecoxycarbonylprolin (DDCP) zeigen verbesserte Enantioselektivitäten einer Vielzahl von Analyten gegenüber. So setzten Peterson et al. (1996) (*R*)- und (*S*)-dodecoxycarbonylvalin (DDCV) erfolgreich bei der chiralen Trennung basischer Pharmazeutika (darunter Salbutamol) ein. Diese Klasse von Selektoren scheint auch bei der Trennung von Fenoterol vielversprechend zu sein.

Mittels ionischer **Alkyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside** konnten Tickle et al. (1994) Binaphthylderivate chiral auftrennen und Desbene und Fulchic (1996) verwendeten Heptyl, Octyl, Nonyl- und Decyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside zur chiralen Trennung von Aminosäuren als ihre Carbamate.

In neuerer Zeit konnte eine weitere micellenbildenden Substanzklasse basierend auf den **Tartarsäureamiden** von langkettigen Aminen und Taurin (Dalton et al., 1995) zur Trennung einiger synthetischer aromatischer Amid- und Harnstoff-Derivate etabliert werden. Diese neuen chiralen Selektoren könnten das Potential zur chiralen Trennung eines breiten Spektrums an Substanzen haben, unter ihnen die NIC-Derivate von Aminoalkoholen.

CD-vermittelte MEKC basiert auf der Nutzung ungeladener CD in Kombination mit einem achiralen Micellenbildnern wie Natriumdodecylsulfat (SDS). Die Verteilung des hydrophoben Analyten findet zwischen der wäßrigen Umgebung (engl.: bulk solution), dem CD und der negativ geladenen SDS-Micelle statt, die in entgegengesetzter Richtung zum EOF wandert und so den Analyten zurückhält. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die chirale Trennung von Fenoterol und seinen NIC-Derivaten bei Einsatz von nativem  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD in Kombination mit SDS nicht. Die Möglichkeit der chiralen Trennung der FMOC-Derivate von Aminoalkoholen ist nicht nachgegangen worden, scheint aber für fortführende Studien reizvoll. Die erfolgreiche Nutzung CD-vermittelter MEKC konnte am Beispiel der chiralen Trennung von FMOC-Aminosäuren (Wan et al., 1995) schon aufgezeigt werden. Hier spielten die Konzentration des organischen Modifizierers Isopropanol, des chiralen Selektors  $\beta$ -CD und des SDS eine große Rolle.

## **4.5 Pharmakokinetik**

### **4.5.1 Herzmodell**

Ziel aller beschriebenen Modellierungsversuche ist es, die ermittelten Daten zusammenfassen zu können, ablaufende Prozesse besser zu verstehen, verlässliche Aussagen zu ermöglichen und auch eine bessere Versuchsplanung zukünftiger Experimente zu erlauben. Der Vergleich verschiedener Arzneimittel und das Verständnis für quantitative Beziehungen zwischen pharmakokinetischen Daten und biologischen Wirkungen (Effektkinetik) wird so erst möglich.

Die von Kuhlmann (1998) entwickelte achirale HPLC-Methode für Fenoterol hat eine Nachweisgrenze von 40 ng/mL. Mit der vorliegenden chiralen Methode ist es möglich geworden, die Enantiomere des Fenoterols im Perfusat bis zu 10 ng/mL quantitativ verlässlich zu erfassen.

Den Ergebnissen aus Untersuchungen von racemischem Fenoterol in Perfusat-Lösungen konnten die mit der chiralen Methodik gewonnenen Daten gegenübergestellt werden. Der berechnete Mittelwert für die AUC<sub>n</sub> lag für rac. Fenoterol fast doppelt so hoch wie die AUC<sub>n</sub> beider Enantiomere zusammen genommen. Ebenso verhielt es sich für die extrapolierten Werte für die AUC. Die verhältnismäßig geringe Standardabweichung von ca. 20 % macht deutlich, daß es sich hierbei um methodenspezifische Unterschiede handelt.

Statistisch war bei der hohen Fenoterol-Wiederfindung von über 90 % eine mögliche Metabolisierung im Herzgewebe nicht abzusichern. Damit konnte der Frage nach einer stereospezifischen Metabolismus nicht nachgegangen werden.

Sowohl bei algorithmischer Ermittlung als auch unter Zuhilfenahme modellierter Berechnungen wurden identische mittlere Transitzeiten (MTT) und Verteilungsvolumina für rac. Fenoterol und für die Enantiomere ermittelt. Somit konnten mit der neu entwickelten chiralen Methode die mit der achiralen Methode von Kuhlmann (1998) gemachten Aussagen zum pharmakokinetischen Verhalten von Fenoterol bestätigt werden.

Mit Hilfe von Markern konnten wichtige Verteilungsvolumina bestimmt werden. Radioaktiv markiertes Wasser (<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O) ist in der Lage, den gesamten intra- und extrazellulären Raum im Herzmodell zu erreichen, <sup>14</sup>C-Saccharose und Evans Blau hingegen permeieren nicht die Zellmembran, sondern nur interstitiellen Raum bzw. vaskulären Raum. Es kann also ein Verteilungsvolumen ermittelt werden, daß mindestens dem für Evans Blau gefundenen und maximal dem für radioaktiv markiertes Wasser gefundenen entspricht. Die gefundenen geringen Transitzeiten und Verteilungsvolumina zeigen, daß Fenoterol unter den gewählten Bedingungen keine oder nur geringe Bindung bei Passage des Herzens eingeht. Das steht auch im Einklang mit Untersuchungen zur Verteilung von radioaktiv markiertem Fenoterol. Bei Ratten konnten Rominger und Pollmann (1972) in Niere, Darm und Leber Fenoterol angereichert finden, nicht aber im Herzen. Auch in Mäusen Kojima et al. (1980) war der Wirkstoff nur in Niere und Leber akkumuliert. Demgegenüber fanden sich zum Beispiel beim lipophileren Propranolol bei gleicher Versuchsdurchführung für (S)-Propranolol MTT-Werte von 292 sek und ein Verteilungsvolumen von 29,3 mL/g und für Diclofenac eine MTT von 33,8 sek und ein Verteilungsvolumen von 3,2 mL/g (Kuhlmann, 1998).

Bei zusätzlicher Applikation von Propranolol mit Fenoterol finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede der MTT und Verteilungsvolumina, die bei einer spezifischen Rezeptorbindung von Fenoterol am Herzen zu erwarten gewesen wäre.

### 4.5.2 Stereospezifischer Metabolismus

Die veröffentlichten pharmakokinetischen Arbeiten beim Menschen (Warnke et al., 1992; Hildebrandt et al., 1993, 1994; von Mandach, 1989; von Mandach et al., 1995) sind mit radioaktiv markiertem Fenoterol im RIA durchgeführt worden, der auf die Arbeit von Rominger et al. (1990) zurückgeht. Diese Methode ist bisher die einzige, die mit einer Nachweisgrenze von 20 pg/mL im Plasma oder Urin auch im mittleren therapeutischen Konzentrationsbereich von 300 pg/mL (Leferink et al., 1982) quantifizieren kann. Für tierexperimentelle Untersuchungen liegen mit einer GC-MS (Leferink et al., 1982; Couper und Drummer, 1996; Nachweisgrenze: 1 ng/mL) und einer HPLC mit elektrochemischer Detektion (Koster et al., 1985; Nachweisgrenze: 2 ng/mL) weitere empfindliche achirale Methoden für Fenoterol vor. Wird im UV-Bereich detektiert, sind Nachweisgrenzen von 6,0 µg/mL in der Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und 7,2 µg/mL in der HPLC erreicht worden (Ackermans et al., 1992). Fluorimetrisch kann Fenoterol bis zu 40 ng/mL erfaßt werden (Kuhlmann, 1998).

Der RIA ist nur anwendbar, wenn das Enantiomeren-Verhältnis des Racemats bei Passage des Wirkstoffs durch den Körper unverändert bleibt. Mit der Entwicklung der vorliegenden HPLC-Methode zur fluorimetrischen Detektion der Enantiomere des Fenoterols als ihre NIC-Derivate bis zu einer Detektionsgrenze von 2 ng/mL ist die Möglichkeit gegeben, stereospezifischen Fragestellungen nachzugehen.

Die häufig beobachtete stereoselektive Metabolisierung von chiralen Wirkstoffen kann einerseits über die Aktivität verschiedener Enzyme vermittelt sein. Beim Antikonvulsivum Mephenytoin wird das (*S*)-Enantiomer 4-hydroxyliert, wogegen das (*R*)-Enantiomer zu 5-phenyl-5-ethylhydantoin metabolisiert wird (Wedlund et al., 1985). Da die 4-Hydroxylierung bei einer deutlich höheren Rate vonstatten geht, kommt es zu einem Faktor von 200 bei der oralen Clearance von (*S*)-Enantiomer. Bei ca. 3 % der kaukasischen Bevölkerung ist aufgrund eines genetischen Polymorphismus das CYP2C8-10 (Cytochrom P450 Enzym, das die 4-Hydroxylierung katalysiert) inaktiv, daher wird bei dieser Subpopulation keine stereoselektive Disposition beobachtet. Andererseits können wie bei der stereoselektiven Metabolisierung von Propranolol die Enantiomere von einem Enzym, aber in unterschiedlicher Raten umgesetzt werden (Walle et al., 1988). Eine kinetische Studie von Gietl et al. (1988) zeigte nach oraler Einmal-Applikation höhere Plasma- und Urinkonzentrationen des (*R*)-Enantiomers des unspezifischen Kalziumantagonisten Phenylamin nach Derivatisierung mit (*R*)-(-)-NEIC. Bei pharmakokinetischen Studien bestätigte sich die Bildung der Hydroxylderivate als Hauptmetabolite bei Anhydraseinhibitoren als potentiellen Antiglaucom-Wirkstoffen, die über ihre (*S*)-(+)-Naphthylethyl-Harnstoff-Derivate detektiert wurden (Matuszewski et al., 1990). Sowohl die Bildung der Hydroxylderivate als auch die Disposition der ursprünglich eingesetzten Inhibitoren erwies sich als stereoselektiv. Demgegenüber wurden nach oraler Einmal-Applikation (20 mg) des β-Blockers Betaxolol keine Konzentrationsunterschiede zwischen den Isomeren im Blut nach der Derivatisierung mit (*R*)-(-)-NEIC festgestellt (Darmon und Thenot, 1986).

Die Enantiomere des Fenoterols konnten bei einem Versuch zur gesamtorganistischen Kinetik der **Ratte** bis zu 15 min nach i.v.-Applikation von 400 µL Fenoterol (1 mg/mL) detektiert werden (Ergebnis nicht gezeigt).

Zukünftige stereoselektive Kinetik-Untersuchungen am **Lebermodell** der Ratte, die aufgrund noch fehlender apparativer Möglichkeiten nicht durchgeführt wurden, sind nicht erfolgversprechend. Auch im Hinblick auf die Gewinnung achiraler pharmakokinetischer Daten erscheint dieses Modell ungeeignet, deutet die gefundene MTT von Fenoterol von 11,9 sek (Kuhlmann, 1998) doch auf eine ungenügende Interaktion hin.

Koster et al. (1986) untersuchten die Bildung der Glucuronid-Konjugate von Fenoterol in isolierten Rattenhepatozytenmikrosomem und Enterozytenmikrosomen mittels RIA. Die

maximale Glucuronidierungsrate des (-)-Enantiomers mit  $v_{max}=3,6$  nmol/min mg durch die hepatischen Mikrosomen und 3,4 nmol/min mg durch die intestinalen Mikrosomen war signifikant geringer als bei dem (+)-Enantiomer (6,7 bzw. 5,8 nmol/min mg). Die  $K_m$ -Werte von (-)-Fenoterol (26  $\mu$ M durch die hepatischen Mikrosomen bzw. 19  $\mu$ M durch die intestinalen Mikrosomen) waren niedriger als die von (+)-Fenoterol (57  $\mu$ M bzw. 49  $\mu$ M). Auf bei weitem nicht so ausgeprägte Unterschiede trafen die Autoren bei Untersuchungen an isolierten Zellen. Bei den  $K_m$ -Werten konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (90±20  $\mu$ M für (+)-Fenoterol und 100±20  $\mu$ M für (-)-Fenoterol durch die Hepatozyten, 510±100  $\mu$ M für (+)-Fenoterol und 470±100  $\mu$ M für (-)-Fenoterol durch die Enterozyten. Die  $v_{max}$ -Werte lagen bei 148 bzw. 372 pmol/min mg für (-)-Fenoterol in Hepatozyten bzw. Enterozyten im Vergleich zu 173 bzw. 444 pmol/min mg für (+)-Fenoterol. Die erhöhte Glucuronidierungsraten in den mikrosomalen Fraktionen wurden mit als künstlich durch Detergenzien und unphysiologisch hohe UDP-Glucuronsäure-Konzentrationen erklärt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die von Koster et al. (1986) gefundene stereospezifische Präferenz der Kopplung der Glucuronsäure am Fenoterolmolekül. Werden alle 3 phenolischen Hydroxylgruppen mit gleicher Rate glucuronidiert, ist ein Anteil von 0,33 für Fenoterol-para-Glucuronid zu erwarten. Das finden die Autoren nur bei Einsatz von (-)-Fenoterol. Die Bildung dieser Glucuronidspezies des Fenoterols ist sowohl in den Mikrosomen als auch isolierten Zellen erhöht, wenn (+)-Fenoterol als Substrat angeboten wird.

Art und Ausmaß der Metabolisierung von  $\beta_2$ -Sympatikomimetika unterscheiden sich in Ratte und **Mensch**. Die Enantioselektivität der Sulfatkonjugierung racemischen Terbutalins durch die Phenolsulphotransferase (PST) wurde *in vitro* mit menschlichem Leberzytosol und  $^{35}S$ -3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAP $^{35}S$ ) als Sulfatdonor untersucht (Walle und Walle, 1990). Die Sulfatisierung geschieht mit dem gleichen  $K_m$ -Wert (270  $\mu$ M) für beide Enantiomere, nur das Ausmaß der Sulfatisierung des (+)-Enantiomers ( $v_{max}$ ) war doppelt so hoch. Auch für Salbutamol konnten Walle et al. (1993) eine stereoselektive Sulfatkonjugierung (nur von M (Monoamin)-Isoform der PST, die P-Form war inaktiv) feststellen. Deren Effizienz ( $v_{max}/K_m$ ) war 12-fach größer für das (-)-Enantiomer als für das (+)-Enantiomer (hepatische Aktivität), was nur auf den niedrigen  $K_m$ -Wert für (-)-Salbutamol (103  $\mu$ M) im Gegensatz zu (+)-Salbutamol (1394  $\mu$ M) zurückzuführen war. Auch die intestinale und Blutplättchen-Aktivität folgte dieser Bevorzugung. Das heißt, daß nach oraler Applikation niedrigere Blutkonzentrationen des aktiven (-)-Enantiomers gefunden werden.

Für Fenoterol wurde bei Arbeiten mit isolierten humanen rekombinaten PST-Enzym von Wilson et al. (1997) festgestellt, daß die M-PST vorzugsweise an der 4-Hydroxyphenyl-Position von Fenoterol, die P-PST ausschließlich die 3,5-Hydroxyphenyl-Position sulfatiert. Die M-PST-katalysierte Sulfatierung war hochgradig selektiv für das aktive (RR)-Enantiomer, wohingegen die Sulphatierung der 3,5-Dihydroxyphenylposition leicht selektiver für das (SS)-Enantiomer war. Die P-PST-katalysierte Sulfatierung der 3,5-Hydroxyphenylposition war selektiver für das inaktive (SS)-Enantiomer.

Boulton et al. (1997) schlossen bei ihren Untersuchungen zum **transplacentalen Verteilung** der Salbutamol-Enantiomere bei Kaiserschnitt, daß ein enantioselektiver plazental-fötaler Metabolismus vorliegt, da es zu einer Verringerung des aktiven (R)-Enantiomers im Vergleich zum (S)-Enantiomer im Fötus (Konzentration in Nabelschnurblut verglichen mit mütterlichem Blut), nicht aber des (S)-Enantiomers kommt. Ob das auch für Fenoterol zutrifft, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

## 5. Zusammenfassung

Es konnte eine sensitive und selektive chirale Methode zur Quantifizierung von Fenoterol in biologischen Proben (Blut, Perfusat) bis in den unteren ng/mL-Bereich entwickelt werden. Nach der Einführung einer fluorogenen Einheit in das Molekül durch Vorsäulenderivatisierung mit Naphthylisocyanat gelang die chirale Auftrennung dieses Derivates in der HPLC auf einer Cellulose-Dimethylphenylcarbamatsäule. Die breite Anwendungsmöglichkeit dieser Methode wurde durch die Enantiomeren-Erfassung einer Reihe therapeutisch relevanter Aminoalkohole demonstriert. Eine automatisierte routinemäßige Anwendung für klinische und pharmakokinetische Analytik ist damit gegeben. Die Diastereomere des Fenoterols nach Umsetzung mit chiralem Naphthylethylisocyanat konnten auf einer RP-18-Säule erfaßt werden, zeigten aber gegenüber den Naphthylisocyanat-Derivaten verminderte Sensitivität bei der Fluoreszenzdetektion.

Die kapillarelektrophoretische Trennung des racemischen Fenoterols gelingt erstmals mit Einsatz des trimethylierten  $\beta$ -CD-Derivates.

Der Einsatz weiterer fluorogener Derivatisierungsreagenzien und chiraler Selektoren wurde vertiefend diskutiert. Fortführende Studien zur Aufklärung von Struktur-Retentionsmechanismen in chromatographischen und elektrophoretischen Systemen können hier ihren Ausgangspunkt finden.

An *in situ*-perfundierte Rattenherzen als experimentelle Grundlage der Datenermittlung zur anschließenden Auswertung mit dem physiologisch orientierten Organmodell von Weiss und Roberts (1996), welches die Verteilungsdynamik von Pharmaka an isoliert perfundierten Organen beschreibt, charakterisierten sehr geringe Verteilungsvolumina und mittlere Verweilzeiten den untersuchten Wirkstoff Fenoterol. Für diesen Aminoalkohol ist das Herzmodell somit nicht geeignet. Eine Metabolisierung konnte nicht festgestellt werden. Für weiterführende Untersuchungen am Herzen bietet sich das  $\beta_2$ -Sympathikomimetikum Salmeterol an, das aufgrund seines lipophileren Charakters eine vergleichende Gegenüberstellung zu Fenoterol rechtfertigt. Die Möglichkeit der Erfassung der Enantiomere des Salmeterols mit der vorliegenden Methode ist gegeben.

Die demonstrierte Enantiomeren-Erfassung des Fenoterols in Blutplasma kann für die Untersuchung stereoselektive Prozesse genutzt werden. Die Verteilung an der Plazenta bei tokolytisch behandelten schwangeren Frauen steht im Vordergrund.

Ullrich, Thomas

Entwicklung stereospezifischer HPLC- und Kapillarelektrophorese-Techniken für die pharmakokinetische Anwendung.

Halle, Univ., FB Biochem./Biotechnol., Diss., 102 Seiten, 2001.

## 6. Literatur

- Aboul-Enein, H.Y., L.I. Abou-Basha und S.A. Bakr.** 1996. Direct enantioselective separation of some propranolol analogs by HPLC on normal and reversed cellulose chiral stationary phases. *Chirality* **8**:153-156.
- Ackermans, M.T., J.L. Beckers, F.M. Everaerts und I.G.J.A. Seelen.** 1992. Comparison of isotachophoresis, capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the determination of salbutamol, terbutaline sulphate and fenoterol hydrobromide in pharmaceutical dosage forms. *J. Chromatogr.* **590**:341-353.
- Ahnhoff, M. und S. Einarsson.** 1989. Chiral derivatization. Ed. W.J. Lough. Chiral liquid chromatography. Blacky, Seiten 39-80.
- Albin, M., Weinberger, R., Sapp, E. und Moring, S.** 1991. Fluorescence detection in capillary electrophoresis: evaluation of derivatizing reagents and techniques. *Anal. Chem.* **63**:417-422.
- Al-Dirbashi, O., N. Kuroda, F. Menichini, S. Noda, M. Minemoto und K. Nakashima.** 1998. Enantioselective high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of methamphetamine and its metabolites in human urine. *Analyst* **123**:2333-2337.
- Allenmark, S.** 1990. A useful reagent for derivatization of amino acids. *Tetrahedron Lett.* **31**:1455-1458.
- Allenmark, S. und S. Andersson.** 1991. Chiral amino acid microanalysis by direct optical resolution of fluorescent derivatives on BSA-based (Resolvosil) columns. *Chromatographia* **31**:429-433.
- Allenmark, S. und S. Andersson.** 1992. Some mechanistic aspects on chiral discrimination of organic acids by immobilized bovine serum albumin (BSA). *Chirality* **4**:24-29.
- Andersson, K., C. Hallgren, J.-O. Levin und C.-A. Nilsson.** 1984. Determination of aliphatic amines in air by reversed-phase high-performance liquid chromatography using 1-naphthyl isocyanate derivatives. *J. Chromatogr.* **312**:482-488.
- André, F., B. Le Bizac, M.-P. Montralé, D. Maume, F. Monteau und P. Marchand.** 1994. Developments in residue assay and metabolism study of growth-promoters by mass spectrometric analysis. *Analyst* **119**:2529-2535.
- Armstrong, D.W., A. Alak, W. DeMond, W.L. Hinze und T.E. Riehl.** 1985. Separation of mycotoxins, polycyclic aromatic hydrocarbons, quinones, and heterocyclic compounds on cyclodextrin bonded phases: an alternative LC packing. *J. Liq. Chromatogr.* **8**:261-269.

- Armstrong, D.W., S. Chen, C. Chang und S. Chang.** 1992. A new approach for the direct resolution of racemic  $\beta$  adrenergic blocking agents by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **15**:545-556.
- Aumatell, A., R.J. Wells und D.K.Y. Wong.** 1994. Enantiomeric differentiation of a wide range of pharmacologically active substances by capillary electrophoresis using modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Chromatogr. A* **686**:293-307.
- Bakhtiar, R.** 1999. Letter: Complexes of amino (6-monodeoxy-6-mono)- $\beta$ -cyclodextrin probed by electrospray ionization mass spectrometry. *Eur. Mass Spectrom.* **5**:1-5.
- Bank, R.A., E.J. Jansen, B. Beekman, und J.M. Koppele.** 1996. Amino acid analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography: improved derivatization and detection conditions with 9-fluorenylmethyl chloroformate. *Anal. Biochem.* **240**:167-176.
- Bardelmeijer, H.A., H. Lingeman, C. de Ruiter und W.J.M. Underberg.** 1998. Review: Derivatisation in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **807**:3-26.
- Basly, J.P. und M. Bernard.** 1997. Radiosterilization dosimetry by ESR spectroscopy: ritodrine hydrochloride and comparison with other sympathomimetics. *Int. J. Pharmaceutics* **149**:85-91.
- Battermann, G.** 1993. Trennung chiraler FMOC-Aminosäuren mit ChiraDex® GAMMA. *Merck Spectrum* **1**:30-31.
- Beale, J.P. und N.C. Stephenson.** 1972. X-ray analysis of Th 1165 and salbutamol. *J. Pharm. Pharmac.* **24**:277-280.
- Bechet, I., P. Paques, M. Fillet, P. Hubert und J. Crommen.** 1994. Chiral separation of basic drugs by capillary zone electrophoresis with cyclodextrin additives. *Electrophoresis* **15**:818-823.
- Beesley, T.E.** 1999. Persönliche Mitteilung. Chiral Separation Seminar von Astec Inc (Whippany, USA) in Berlin.
- Becker, H.G.O.** 1993. Organikum. Organisch-chemisches Praktikum. 19. Auflage. Leipzig, Berlin, Heidelberg. J.A. Barth Verlag, Edition Deutscher Verlag der Wissenschaften, Seiten 466-469 und 619.
- Belas, F.J., M.A. Phillips, N.R. Srinivas, R.H. Barbhaiya und I.A. Blair.** 1995. Simultaneous determination of nadolol enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* **9**:140-145.
- Black, S.B. und R.C. Hansson.** 1999. Determination of salbutamol and detection of other  $\beta$ -agonists in human postmortem whole blood and urine by GC-MS-SIM. *J. Anal. Toxic.* **23**:113-118.

- Boulton, D.W., J.P. Fawcett und T.M. Fiddes.** 1997. Transplacental distribution of salbutamol enantiomers at caesarian section. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **44**:587-590.
- Brandts, P.M., R.A.A. Maes, J.G. Leferink, C.L. Ligny und G.H.E. Nieuwdorp.** 1982. Ion-pair extraction of some sympathomimetics. Description of an extraction model for terbutaline and investigation of some factors influencing the recovery of sympathomimetics. *Anal. Chim. Acta* **135**:85-98.
- Brunner, H.** 1999. Rechts oder links. Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chinchester, Brisbane, Singapore, Toronto.
- Buist, S.C., C.-Y.L. Hsu und R.R. Walters.** 1998. Sensitive determination of a new antiarrhythmic agent, trecetilide, in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **828**:259-265.
- Bunke, A. und T. Jira.** 1996. Chiral capillary electrophoresis using a cationic cyclodextrin. *Pharmazie*, **51**:672-673.
- Carr, R.A., R.T. Foster, D. Freitag und F.M. Pasutto.** 1991. Stereospecific high-performance liquid chromatographic determination of tocainide. *J. Chromatogr.* **566**:155-162.
- Ceccato, A., P. Hubert, P. Tullio, J.-F. Liégeois, A. Felikidis, J. Géczy und J. Crommen.** 1998. Enantiomeric separation of pirlindole by liquid chromatography using different types of chiral stationary phases. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**:605-614.
- Chan, K.C., G.M. Janini, G.M. Muschik und H.J. Issaq.** 1993a. Laser-induced fluorescence detection of 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatized amino acids in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **653**:93-97.
- Chan, K.C., G.M. Janini, G.M. Muschik und H.J. Issaq.** 1993b. Micellar electrokinetic chromatography of hydroxyproline and other secondary amino acids in biological samples with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **622**:269-273.
- Chen, Y.-P., M.-C. Hsu und C.S. Chien.** 1994. Analysis of forensic samples using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A* **672**:135-140.
- Chilmonczyk, Z., H. Ksycinska und I. Polec.** 1998. Application of chiral chromatographic parameters in quantitative structure-activity relationship analysis of homologous malathion derivatives. *J. Chromatogr. B* **720**:65-69.
- Ching, C.B., B.G. Lim, E.J.D. Lee und S.C. Ng.** 1992. Chromatographic resolution of the chiral isomers of several  $\beta$ -blockers over cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase. *Chirality* **4**:174-177.

- Couper, F.J. und O.H. Drummer.** 1996. Gas chromatographic- mass spectrometric determination of  $\beta_2$ -agonists in postmortem blood: application in forensic medicine. *J. Chromatogr. B* **685**:265-272.
- Dalgliesh, C.E.** 1952. The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms. *J. Chem. Soc.* **137**:3940-3942.
- Dalton, D.D., D.R. Taylor und D.G. Waters.** 1995. Synthesis and use of novel chiral surfactants in micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. A* **712**:365-371.
- Darmon, A. und J.P. Thenot.** 1986. Determination of betaxolol enantiomers by high-performance liquid chromatography. Application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.* **374**:321-328.
- De Boer, T., R. Bijma und K. Ensing.** 1999. Modelling of conditions for the enantiomeric separation of  $\beta_2$ -adrenergic sympathicomimetics by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors in a polyethylene glycol gel. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**:529-537.
- Desbene, P.L. und C.E. Fulchic.** 1996. Utilization of n-alkyl- $\beta$ -D-glucopyranosides in enantiomeric separation by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* **749**:257-269.
- Doerge, D.R., S. Bajic, L.R. Blankenship, S.W. Preece und M.I. Churchwell.** 1995. Determination of  $\beta$ -agonist residues in human plasma using liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **30**:911-916.
- Doyle, T.D., C.A. Brunner und J.A. Vick.** 1991. Enantiomeric analysis of phenylpropanolamine in plasma via resolution of dinitrophenylurea derivatives on a high performance liquid chromatographic chiral stationary phase. *Biomed. Chromatogr.* **5**:43-46.
- Dunlop, D.S. und A. Neidle.** 1987. The separation of D/L amino acid pairs by high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with optically active naphthylethyl isocyanate. *Anal. Biochem.* **165**:38-44.
- Einarsson, S., B. Josefsson und S. Lagerkvist.** 1983. Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **282**:609-618.
- Einarsson, S., S. Folestad, B. Josefsson und S. Lagerkvist.** 1986. High-resolution reversed-phase liquid chromatography system for the analysis of complex solutions of primary and secondary amino acids. *Anal. Chem.* **58**:1638-1643.

- Einarsson, S., B. Josefsson, P. Möller und D. Sanchez.** 1987. Separation of amino acid enantiomers and chiral amines using precolumn derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate and reversed-phase liquid chromatography. *Anal.Chem.* **59**:1191-1195.
- Engewald, W., H. Engalhardt, W. Götzinger, P. Klossek und H.-P. Kleber.** 1990. Methode zur Trennung der Carnitinenantioneren. *Pharmazie* **45**:629-630.
- Esquisabel, A., R.M. Hernández, A.R. Gascón, M. Igartua, B. Calvo und J.L. Pedraz.** 1997. Determination of salbutamol enantiomers by high-performance capillary electrophoresis and its application to dissolution assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**:357-366.
- Facklam, C. und A. Modler.** 1994. Separation of some enantiomers and diastereomers of propranolol derivatives by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **664**:203-211.
- Fanali, S.** 1991. Use of cyclodextrins in capillary zone electrophoresis. Resolution of terbutaline and propranolol enantiomers. *J. Chromatogr.* **545**:437-444.
- Fanali, S. und E. Camera.** 1996. Use of methylamino- $\beta$ -cyclodextrin in capillary electrophoresis. Resolution of acidic and basic enantiomers. *Chromatographia* **43**:247-253.
- Ferretti, R., B. Gallinella, F. La Torre und L. Turchetto.** 1998. Validated chiral high-performance liquid chromatographic method for the determination of trans-(-)-paroxetine and its enantiomer in bulk and pharmaceutical formulations. *J. Chromatogr. B* **710**:157-164.
- Forth, W., D. Henschler, W. Rummel und K. Starke.** 1992. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Francotte, E., R.M. Wolf, D. Lohmann und R. Mueller.** 1985. Chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases. I. Influence of the supramolecular structure of cellulose triacetate. *J. Chromatogr.* **347**:25-37.
- Fransson, B. und U. Ragnarsson.** 1998. Separation of enantiomers of  $\alpha$ -hydroxy acids by reversed-phase liquid chromatography after derivatization with 1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate. *J. Chromatogr. A* **827**:31-36.
- Freitag, D.G., R.T. Foster, R.T. Coutts und F.M. Pasutto.** 1993. High-performance liquid chromatographic method for resolving the enantiomers of mexiletine and two major metabolites isolated from microbial fermentation media. *J. Chromatogr.* **616**:253-259.
- Galla, H.-J.** 1988. Spektroskopische Methoden in der Biochemie. Georg Thiema Verlag Stuttgart New York.

- Gietl, Y., H. Spahn und E. Mutschler.** 1988. Simultaneous determination of R-and S-prenylamine in plasma and urine by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **426**:305-314.
- Gleiter, C.H.** 1999. Fenoterol: pharmacology and clinical use. *Cardiovascular drug reviews* **17**:87-106.
- Gübitz, G. und S. Mihellyes.** 1984. Optical resolution of  $\beta$ -blocking agents by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography as diastereomeric R-(-)-1-(1-naphthyl)ethylureas. *J. Chromatogr.* **314**:462-466.
- Gübitz, G. und M.G. Schmid.** 1997. Review: Chiral separation principles in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **792**:179-225.
- Gugeler, N. und U. Klotz.** 2000. Einführung in die Pharmakokinetik. Govi-Verlag Eschborn.
- Gunaratna, C. und P.T. Kissinger.** 1998. Investigation of stereoselective metabolism of amphetamine in rat liver microsomes by microdialysis and liquid chromatography with precolumn chiral derivatization. *J. Chromatogr. A* **828**:95-103.
- Guttman, A., A. Paulus, A.S. Cohen, N. Grinberg und B.L. Karger.** 1988. Use of complexing agents for selective separation in high-performance capillary electrophoresis. Chiral resolution via cyclodextrins incorporated within polyacrylamide gel columns. *J. Chromatogr.* **448**:41-53
- Guttman, A., S. Brunet, C. Jurado und N. Cooke.** 1995. Rapid chiral separation methods development by cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis for acidic and basic compounds. *Chirality* **7**:409-414.
- Hamoir, T., Y. Verlinden und D.L. Massart.** 1994. Reversed-phase liquid chromatography of  $\beta$ -adrenergic blocking drugs in the presence of a tailing suppressor. *J. Chromatogr. Sci.* **32**:14-20.
- Hanna, M., V. Biasi, B. Bond, C. Salter, A.J. Hutt und P. Camilleri.** 1998. Estimation of the partitioning characteristics of drugs: a comparison of a large and diverse drug series utilizing chromatographic and electrophoretic methodology. *Anal. Chem.* **70**:2092-2099.
- Hermansson, J.** 2001. Persönliche Mitteilung. Assoc. Professor bei Chromtech Inc. Apple Valley, USA.
- Heuermann, M. und G. Blaschke.** 1993. Chiral separation of basic drugs using cyclodextrins as chiral pseudo-stationary phases in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **648**:267-274.
- Hildebrandt, R., H. Weitzel, K. Warnke und U. Gundert-Remy.** 1993. Pharmacokinetics of fenoterol in pregnant and nonpregnant women. *J. Clin. Pharmacol.* **45**:275-277.

- Hildebrandt, R., B. Wagner, K. Preiss-Nowzohour und G. Gundert-Remy.** 1994. Fenoterol metabolism in man: sulphation versus glucuronidation. *Xenobiotica* **24**:71-77.
- Hirota, T., K. Minato, K. Ishii, N. Nishimura und T. Sato.** 1994. High-performance liquid chromatographic determination of the enantiomers of carnitine and acetylcarnitine on a chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* **673**:37-43.
- Hochhaus, G. und H. Möllmann.** 1992. Pharmacokinetic/pharmacodynamic characteristics of the  $\beta$ -2-agonists terbutaline, salbutamol and fenoterol. *Int. J. Clin. Pharmac.* **30**:342-362.
- Hogendoorn, E.A., F.M. Ossendrijver, E. Dijkman und R.A. Baumann.** 1999. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **833**:67-73.
- Holtzhauer, M.** 1995. Biochemische Labormethoden. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Hsu, C.-Y.L. und R.R. Walters.** 1995. Assay of the enantiomers of ibutilide and artilide using solid-phase extraction, derivatization, and achiral-chiral column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **667**:115-128.
- Ikeda, K., T. Hamasaki, H. Kohno, T. Ogawa, T. Matsumoto und J. Sakai.** 1989. Direct separation of enantiomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). *Chem. Lett.*, 1089-1090.
- Imai, K. und T. Toyo'oka.** 1988. Design and choice of suitable labelling reagents for liquid chromatography. Ed. R.W. Frei und K. Zech. Selective sample handling and detection in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Libr.* **39A**:209-287.
- Ingelse, B.A., F.M. Everaerts, C. Desiderio und S. Fanali.** 1995a. Enantiomeric separation by capillary electrophoresis using a soluble neutral  $\beta$ -cyclodextrin polymer. *J. Chromatogr. A* **709**:89-98.
- Ingelse, B.A., F.M. Everaerts, J. Sevcik, Z. Stransky und S. Fanali.** 1995b. A further study on the chiral separation power of a soluble neutral  $\beta$ -cyclodextrin polymer. *J. High Resol. Chromatogr.* **18**:348-352.
- Ishikawa, A. und T. Shibata.** 1993. Cellulosic chiral stationary phase under reversed-phase condition. *J. Liq. Chromatogr.* **16**:859-878.
- Jacobson, G.A. und G.M. Peterson.** 1994. High-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of ipratropium bromide, fenoterol, salbutamol and terbutaline in nebulizer solution. *J. Phar. Biomed. Analysis* **12**:825-832.

- Jira, T., C. Toll, C. Vogt und T. Beyrich.** 1991. Zur Trennung einiger racemischer  $\beta$ -Blocker und alpha-Sympathikomimetika durch HPLC nach Derivatisierung. *Pharmazie* **46**:432-434.
- Jones, D.C., K. Dost, G. Davidson und M.W. George.** 1999. The analysis of  $\beta$ -agonists by packed-column supercritical fluid chromatography with ultra-violet and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometric detection. *Analyst* **124**:827-831.
- Kagel, J.R., V.J. Stella und C.M. Riley.** 1993. A liquid chromatographic method for the determination of the enantiomeric purity of the anticancer drug, 9-amino-20(S)-camptothecin. *J. Pharm. Miomed. Anal.* **11**:793-802.
- Kaliszan, R.** 1998. Retention data from affinity high-performance liquid chromatography in view of chemometrics. *J. Chromatogr. B* **715**:229-244.
- Kang, J.-W., Y.-T. Yang, J.-M. You und Q.-Y. Ou.** 1998. Fast chiral separation of amino acid derivatives and acidic drugs by co-electroosmotic flow capillary electrophoresis with vancomycin as chiral selector. *J. Chromatogr. A* **825**:81-87.
- Kennedy, J.H. und L.O. Weigel.** 1992. Effective methods for enantioselective analysis of glycidol derivatives by liquid chromatography. *Chirality* **4**:132-135.
- Kirschbaum, J., B. Luckas und W.-D. Beinert.** 1994. Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *J. Chromatogr. A* **661**:193-199.
- Klotz, U.** 1984. Klinische Pharmakokinetik. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Kojima, S., M. Otani und A. Kubodera.** 1980. Studies on the absorption, distribution, metabolism and excretion of 1-(3,5-dihydroxyphenyl)-1-hydroxy-2-[(4-hydroxyphenyl)isopropylamino]-ethane hydrobromide (Th 1165a, fenoterol hydrobromide) in mice. *Arzneim. Forsch.* **30**:959-964.
- Koster, A.S., G.A. Hofman, A.C. Frankhuijzen-Sierevogel und J. Noordhoek.** 1985. Presystemic and systemic intestinal metabolism of fenoterol in the conscious rat. *Drug Metab. Dispos.* **13**:464-470.
- Koster, A.S., A.C. Frankhuijzen-Sierevogel und A. Mentrup.** 1986. Stereoselective formation of fenoterol-para-glucuronide and fenoterol-meta-glucuronide in rat hepatocytes and enterocytes. *Biomed. Pharmacol.* **35**:1981-1985.
- Kramer, S. und G. Blaschke.** 2001. High-performance liquid chromatographic determination of the  $\beta_2$ -selective adrenergic agonist fenoterol in human plasma after fluorescence derivatization. *J. Chromatogr. B* **751**:169-175.

- Kuhlmann, O.** 1998. Trennverfahren für die Wirkstoffanalyse und deren Einsatz in der Pharmakokinetik. Dissertation. Martin-Luther-Universität. Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät.
- Kummer, M. und G. Werner.** 1998. Chiral resolution of enantiomeric steroids by high-performance liquid chromatography on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) under reversed-phase conditions. *J. Chromatogr. A* **825**:107-114.
- Küsters, E. und J. Nozulak.** 1998. The preparative chromatographic enantioseparation of a racemic morphanthridine analog on a chiral stationary phase. *Chromatographia* **47**:440-442.
- Landsiedel, R., H. Frank, H. Glatt und A. Seidel.** 1998. Direct optical resolution of trans-dihydrodiol enantiomers of fjord-region polycyclic aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography on a modified cellulose phase. *J. Chromatogr. A* **822**:29-35.
- Laethem, M.E., M.T. Rosseel, P. Wijnant und F.M. Belpaire.** 1993. Chiral high-performance liquid chromatographic determination of oxprenolol in plasma. *J. Chromatogr.* **621**:225-229.
- Lai, F.** 1990. Chiral separation and detection enhancement of propranolol using automated pre-column derivatization. *LC Varian Application Note 3*.
- Lave, T., C. Efthymiopoulos, J.C. Koffel und L. Jung.** 1991. Determination of tertatolol enantiomers in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **572**:203-210.
- Leferink, J.G., J. Dankers und R.A.A. Maes.** 1982. A time-saving method for the determination of the  $\beta_2$  sympathomimetics terbutaline, salbutamol and fenoterol. Preliminary results. *J. Chromatogr.* **229**:217-221.
- Leyssens, L., C. Driessens, A. Jacobs, J. Czech und J. Raus.** 1991. Determination of  $\beta_2$ -receptor agonists in bovine urine and liver by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **564**:515-527.
- Lindahl, R., J.-O. Levin und K. Andersson.** 1993. Determination of volatile amines in air by diffusive sampling, thiourea formation and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **643**:35-41.
- Lindner, W., M. Rath, K. Stoschitzky und G. Uray.** 1989. Enantioselective drug monitoring of (R)-and (S)-propranolol in human plasma via derivatization with optically active (R,R)-O,O-diacetyl tartaric acid anhydride. *J. Chromatogr.* **487**:375-383.

- Lindner, W., B. Böhs und V. Seidel.** 1995. Enantioselective capillary electrophoresis of amino acid derivatives on cyclodextrin. Evaluation of structure-resolution relationships. *J. Chromatogr. A* **697**:549-560.
- Lough, W.J.** 1989. Chiral liquid chromatography. Blackie, Seiten 39-80.
- Maeder, G., M. Pelletier und W. Haerdi.** 1992. Determination of amphetamines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. On-line pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and preconcentration. *J. Chromatogr.* **593**:9-14.
- Maisch, A., J. Maier-Rosenkranz, A. Kupka und P. Földi.** 1994. Vorsäulenderivatisierung von biochemisch relevanten Aminen. *LaborPraxis* **4**:48-56.
- Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, G.A. Hessey und W.F. Bayne.** 1990. Indirect stereoselective determination of the enantiomers of a thieno[2,3-b]thiopyran-2-sulfonamide in biological fluids. *Anal. Chem.* **62**:1308-1315.
- Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer und M. Kiganda.** 1994. Analytical chiral separation of the stereoisomers of a novel carbonic anhydrase inhibitor and its deethylated metabolite, and the assignment of absolute configuration of the human metabolite and chiral degradation products. *Pharma. Res.* **11**:449-454.
- Mehvar, R.** 1990. Liquid chromatographic analysis of propafenone enantiomers in human plasma. *J. Chromatogr.* **527**:79-89.
- Michelsen, P., E. Aronsson, G. Odham und B. Akesson.** 1985. Diastereomeric separations of natural glycero derivatives as their 1-(1-naphthyl)ethyl carbamates by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **350**:417-426.
- Montrade, M.-P., B. Le Bizac, F. Monteau, B. Siliart und F. Andre.** 1993. Multi-residue analysis for  $\beta$ -agonistic drugs in urine of meat-producing animals by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **275**:253-268.
- Montrade, M.-P., D. Maume, B. Le Bizac, K. Pouponneau und F. Andre.** 1997. Mass spectrometric study of a specific derivatization reaction between *N,N*-dimethylformamide dimethylacetal and the ethanolamine moiety of  $\beta$ -agonistic drugs. *J. Mass Spectrom.* **32**:626-644.
- Näsholm, T., G. Sandberg und A. Ericsson.** 1987. Quantitative analysis of amino acids in conifer tissues by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection of their 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives. *J. Chromatogr.* **396**:225-236.
- Ning, J.G.** 1998. Direct chiral separation with Chiralpak AD converted to the reversed-phase mode. *J. Chromatogr. A* **805**:309-314.

- Nishi, H. und S. Terabe.** 1995. Optical resolution of drugs by capillary electrophoretic techniques. *J. Chromatogr. A* **694**:245-276.
- Noctor, T.A.G.** 1994. Bioanalytical applications of enantioselective high-performance liquid chromatography. Ed. Subramanian, G. A practical approach to chiral separations by liquid chromatography. VCH, Seiten 357-396.
- O'Brian, T., L. Crocker, R. Thompson, K. Thompson, P.H. Toma, D.A. Conlon, B. Feibush, C. Moeder, G. Bicker und N. Grinberg.** 1997. Mechanistic aspects of chiral discrimination on modified cellulose. *Anal. Chem.* **69**:1999-2007.
- Okamoto, Y., M. Kawashima, K. Yamamoto und K. Hatada.** 1984. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution. Cellulose triacetate and tribenzoate coated on macroporous silica gel. *Chem. Lett.* 739-742.
- Pálmarsdóttir, S. und L.-E. Edholm.** 1994. Capillary zone electrophoresis for separation of drug enantiomers using cyclodextrins as chiral selectors. Influence of experimental parameters on separation. *J. Chromatogr. A* **666**: 337-350.
- Péter, M., A. Péter, J. Eycken, P. Csomós, G. Bernáth und F. Fülöp.** 1998. High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of cyclic 1,3-amino alcohol derivatives. *J. Chromatogr. A* **816**:123-129.
- Peterson, A.G., E.S. Ahuja und J.P. Foley.** 1996. Enantiomeric separations of basic pharmaceutical drugs by micellar electrokinetic chromatography using a chiral surfactant, N-dodecoxycarbonylvaline. *J. Chromatogr. B* **683**:15-28.
- Petersson, M., K.-G. Wahlund und S. Nielsson.** 1999. Miniaturised on-line solid-phase extraction for enhancement of concentration sensitivity in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **841**:249-261.
- Peyton, A.L., R. Carpenter und K. Rutkowski.** 1991. The stereospecific determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by high-pressure liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. *Pharm. Res.* **8**:1528-1532.
- Phinney, K.W., L.C. Sander und S.A. Wise.** 1998. Coupled achiral/chiral column techniques in subcritical fluid chromatography for the separation of chiral and nonchiral compounds. *Anal. Chem.* **70**:2331-2335.
- Pianezzola, E., V. Bellotti, E. Fontana, E. Moro, J. Gal und D.M. Desai.** 1989. Determination of the enantiomeric composition of salsolinol in biological samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* **495**:205-214.

- Pirkle, W.H., J.M. Finn, J.L. Schreiner und B.C. Hamper.** 1981. A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **103**:3964-3966.
- Pirkle, W.H. und M.S. Hoekstra.** 1974. An example of automated liquid chromatography. Synthesis of a broad-spectrum resolving agent and resolution of 1-(1-naphthyl)-2,2,2-trifluoroethanol. *J. Org. Chem.* **39**:3904-3906.
- Polettini, A., M. Montagna, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, P. van Zoonen und L.A. van Ginkel.** 1995. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of  $\beta$ -agonists in urine by direct sample injection. I. Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis. *J. Chromatogr. A* **695**:19-31.
- Pflugmann, G., H. Spahn und E. Mutschler.** 1987. Rapid determination of the enantiomers of metoprolol, oxprenolol and propranolol in urine. *J. Chromatogr.* **416**:331-339.
- Rietbrock, S. und M. Weiss.** 1996. Pharmakokinetik als Grundlage der Therapie. Steinkopff Verlag Darmstadt. Ed. Rietbrock, N., A.H. Staib und D. Loew. Klinische Pharmakologie. Seiten 74-100.
- Rogan, M.M., K.D. Altria und D.M. Goodall.** 1994. Enantiomeric separation of salbutamol and related impurities using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **15**:808-817.
- Rominger, K.L. und W. Pollmann.** 1972. Vergleichende Pharmakokinetik von Fenoterol-Hydrobromid bei Ratte, Hund und Mensch. *Arzneim. Forsch.* **22**:1190-1196.
- Rominger, K.L., A. Mentrup und M. Stiasni.** 1990. Radioimmunological determination of fenoterol. Part II: Antiserum and tracer for the determination of fenoterol. *Arzneim. Forsch.* **40**:887-895.
- Rosseel, M.T., A.M. Vermeulen und F.M. Belpaire.** 1991. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of atenolol enantiomers in plasma after chiral derivatization with (+)-1-(9-fluorenyl)ethyl chloroformate. *J. Chromatogr.* **568**:239-245.
- Roth, H.J.** 1997. Chiralität in der Ph. Eur. 97. *Dtsch. Apoth. Zeitung* **137**:46-53.
- Ruffolo, R.R.** 1991. Chirality in  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenoceptor agonists and antagonists. *Tetrahedron* **47**:9953-9980.
- Russo, M.V. und B. Neri.** 1997. Fast analysis of clenbuterol and  $\beta$ -agonist residues in bovine urine using GC-MS. *Annal. Chim.* **87**:505-512.
- Sanchez, D., P. Möller, S. Einarsson und B. Josefsson.** 1988. FLEC, a new development in chiral separation and the determination of amino acids, amines and alcohols. *Janssen Chimica Acta* **6**:10-14.

- Schmitt, T. und H. Engelhardt.** 1993. Derivatized cyclodextrins for the separation of enantiomers in capillary electrophoresis. *J. High Resol. Chromatogr.* **16**:525-529.
- Schwarz, A.S., R.H.H. Neubert und H.H. Rüttinger.** 1996. Application of capillary electrophoresis for characterizing interactions between drugs and bile salts. *J. Chromatogr.* **745**:135-143.
- Selditz, U., S. Copinga, J.P. Franke, H. Wikström und R.A. de Zeeuw.** 1997. Impact of substituents on the enantioseparation of racemic 2-amidotetralins on polysaccharide stationary phases. I. Chiralcel OD. *Chirality* **8**:574-578.
- Skidmore, M.W.** 1993. Derivatization for chromatographic resolution of optically active compounds. Ed. K. Blau und J.M. Halket. *Handbook of derivatives for chromatography*. John Wiley & Sons, New York, Seiten 215-252.
- Souri, E., H. Farsam und F. Jamali.** 1997. Stereospecific determination of mefloquine in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* **700**:215-222.
- Spahn, H.** 1988. S-(+)-Flunoxaprofen chloride as chiral fluorescent reagent. *J. Chromatogr.* **427**:131-137.
- Spahn, H., H. Weber, E. Mutschler und W. Möhrke.** 1984.  $\alpha$ -alkyl- $\alpha$ -arylacetic acid derivatives as fluorescence markers for thin-layer chromatographic and high-performance liquid chromatographic assay of amines and alcohols. *J. Chromatogr.* **310**:167-178.
- Stalberg, O., H. Brötell und D. Westerlund.** 1995. Capillary electrophoretic separation of basic drugs using surface-modified C8 capillaries and derivatized cyclodextrins as structural/chiral selectors. *Chromatographia* **40**:697-704.
- Stalcup, A.M. und K.H. Gahm.** 1996. Application of sulfated cyclodextrins to chiral separations by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* **68**:1360-1368.
- Szemán, J., N. Roos und K. Csabai.** 1997. Ruggedness of enantiomeric separation by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography with methylated cyclodextrins as chiral selectors. *J. Chromatogr. A* **763**:139-147.
- Tan, Y.K. und S.J. Soldin.** 1984. Determination of salbutamol in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *J. Chromatogr.* **311**:311-317.
- Tan, Y.K. und S.J. Soldin.** 1987. Analysis of salbutamol enantiomers in human urine by chiral high-performance liquid chromatography and preliminary studies related to the stereoselective disposition kinetics in man. *J. Chromatogr.* **422**:187-195.

- Tanaka, Y. und S. Terabe.** 1995. Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases. *J. Chromatogr. A* **694**:277-284.
- Tanaka, Y., M. Yanagawa und S. Terabe.** 1996. Separation of neutral and basic enantiomers by cyclodextrin electrokinetic chromatography using anionic cyclodextrin derivatives as chiral pseudo-stationary phases. *J. High Resol. Chromatogr.* **19**:421-433.
- Tanaka, Y. und S. Terabe.** 1997. Separation of the enantiomers of basic drugs by affinity capillary electrophoresis using a partial filling technique and  $\alpha_1$ -acid glycoprotein as chiral selector. *Chromatographia* **44**:119-128.
- Terabe, S., M. Shibata und Y. Miyashita.** 1989. Chiral separation by EKC with bile salt micelles. *J. Chromatogr.* **480**:403-411.
- Ternes, T.A., R. Hirsch, J. Mueller und K. Haberer.** 1998. Methods for the determination of neutral drugs as well as  $\beta$ -blockers and  $\beta_2$ -sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. *Fresen. J. Anal. Chem.* **362**:329-340.
- Tickle, D.C., G.N. Okafo, P. Camilleri, R.F.D. Jones und A.J. Kirby.** 1994. Glucopyranoside-based surfactants as pseudostationary phases for chiral separations in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **66**:4121-4126.
- Tietze, L.F. und T. Eicher.** 1991. Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium. 2. Auflage. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, New York.
- Ullrich, T., S. Menge, M. Schmid, G. Gübitz und G.-J. Krauß.** 2001. Enantioselective high-performance liquid chromatography of therapeutically relevant aminoalcohols as their fluorescent 1-naphthyl isocyanate derivatives. *Biomed. Chromatogr.* **15**:212-216.
- Vaccher, C., E. Fourmaintraux, E. Belloli, M.-P. Vaccher, C. Beaubat und J.-P. Bonte.** 1998a. Chiral resolution of the enantiomers of tetrahydronaphthalenic derivatives, new agonist and antagonist ligands for melatonin receptors, using high-performance liquid chromatography on cellulose chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* **824**:15-23.
- Vaccher, C., E. Fourmaintraux, E. Belloli, M.-P. Vaccher, C. Beaubat und J.-P. Bonte.** 1998b. Enantiomeric resolution of melatonin ligands receptors by liquid chromatography on amylose chiral stationary phases. *Chromatographia* **48**:790-796.
- Verleysen, K. und P. Sandra.** 1998. Separation of chiral compounds by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **19**:2798-2833.
- Veuthey, J.-L. und W. Haerdi.** 1990. Separation of amphetamines by supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr.* **515**:385-390.

- Vogt, C., A. Georgi und G. Werner.** 1995. Enantiomeric separation of D/L-carnitine using HPLC and CZE after derivatization. *Chromatographia* **40**:287-295.
- van Overbeke, A.L., W.R.G. Baeyens, A. Beyaert, H.Y. Aboul-Enein und H. Oda.** 1997. Chiral resolution of several phenothiazine compounds and trimipramine, a dibenzazepine drug on Chiralcel OJ-R. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **20**:693-705.
- von Mandach, U., A. Huch und R. Huch.** 1989. Pharmacokinetic studies on fenoterol in maternal and cord blood. *Am. J. Perinatol.* **6**:209-213.
- von Mandach, U., R. Böni, J. Danko, R. Huch und A. Huch.** 1995. Pharmacokinetics of fenoterol in pregnant women. *Arzneim. Forsch.* **45**:186-189.
- Wainer, I.W.** 1987. Proposal for the classification of high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases: how to choose the right column. *Trends Anal. Chem.* **6**:125-134.
- Wainer, I.W., R.M. Stiffin und T. Shibata.** 1987. Resolution of enantiomeric aromatic alcohols on a cellulose tribenzoate high-performance liquid chromatography chiral stationary phase. *J. Chromatogr.* **411**:139-151.
- Wainer, I.W. und D.E. Drayer.** 1988. Drug stereochemistry. Analytical methods and pharmacology. Marcel Dekker, New York.
- Walle, T. und U.K. Walle.** 1990. Stereoselective sulphate conjugation of racemic terbutaline by human liver cytosol. *Br. J. Clin. Pharmac.* **30**:127-133.
- Walle, U.K., G.R. Pesola und T. Walle.** 1993. Stereoselective sulphate conjugation of salbutamol in humans: comparison of hepatic, intestinal and platelet activity. *Br. J. Clin. Pharmac.* **35**:413-418.
- Walters, R.R. und C.-Y.L. Hsu.** 1994. Chiral assay methods for lifibrol and metabolites in plasma and the observation of unidirectional chiral inversion following administration of the enantiomers to dogs. *Chirality* **6**:105-115.
- Walters, R.R. und S.C. Buist.** 1998. Improved enantioselective method for the determination of the enantiomers of reboxetine in plasma by solid-phase extraction, chiral derivatization, and column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* **828**:167-176.
- Wan, H., P.E. Andersson, A. Engström und L.G. Blomberg.** 1995. Direct and indirect chiral separation of amino acids by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **704**:179-193.
- Wang, T. und Y.W. Chen.** 1999. Application and comparison of derivatized cellulose and amylose chiral stationary phases for the separation of enantiomers of pharmaceutical compounds by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **855**:411-421.

- Warnke, K., R. Hildebrandt, K. Günther, U. Langen und U. Gundert-Remy.** 1992. The pharmacokinetics of the  $\beta_2$ -adrenoceptor agonist fenoterol in healthy woman. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **43**:663-665.
- Weber, H., H. Spahn, E. Mutschler und W. Möhrke.** 1984. Activated  $\alpha$ -alkyl- $\alpha$ -arylacetic acid enantiomers for stereoselective thin-layer chromatographic and high-performance liquid chromatographic determination of chiral amines. *J. Chromatogr.* **307**:145-153.
- Wedlund, P.J., W.S. Aslanian, J.**
- Weiss, M.** 1990. Theoretische Pharmakokinetik. Modellierung, Datenanalyse, Dosisoptimierung. Verlag Gesundheit GmbH, Berlin.
- Weiss, M.** 1996. A novel extravascular input function for the assessment of drug absorption in bioavailability studies. *Pharm. Res.* **13**:1547-1553.
- Weiss, M. und M.S. Roberts.** 1996. Tissue distribution kinetics as determinant of transit time dispersion of drugs in organs: application of a stochastic model to the rat hindlimb. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **24**:173-196.
- Weiss, M.** 1997. A note on the interpretation of tracer dispersion in the liver. *J. theor. Biol.* **184**:1-6.
- Weiss, M., O. Kuhlmann, G.-J. Krauß und M.S. Roberts.** 1998. Hepatocellular distribution and elimination kinetics of diclofenac in the isolated perfused rat liver. *Arch. Pharmacol.* **357**:R6.
- Whatley, J.A.** 1995. Chiral resolution of protein kinase C inhibitors by reversed-phase high-performance liquid chromatography on cellulose tris-3,5-dimethylphenylcarbamate. *J. Chromatogr. A* **697**:263-269.
- White, C.A. und G. Subramanian.** 1994. An introduction to enantioseparation by liquid chromatography. Ed. Subramanian, G. A practical approach to chiral separations by liquid chromatography. VCH, Seiten 1-17.
- Willems, J.G.H., A.L.L. Duchateau und B. Zwanenburg.** 1997. High-performance liquid chromatography on cellulose-based chiral stationary phases. *Chirality* **9**:727-731.
- Wilson, A.A., J. Wang, P. Koch und T. Walle.** 1997. Stereoselective sulphate conjugation of fenoterol by human phenolsulphotransferases. *Xenobiotica* **27**:1147-1154.
- Wintersteiger, R. und G. Wenninger-Weinzierl.** 1981. Neues, empfindliches Verfahren zur dünnsschicht-chromatographischen Analyse von Substanzen mit alkoholischer Hydroxylgruppe durch Reaktion mit Naphthylisocyanat. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **309**:201-208.

- Wintersteiger, R., G. Wenninger-Weinzierl und W. Pacha.** 1982. High-performance liquid chromatography of naphthyl-urethanes with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **237**:399-406.
- Wintersteiger, R.** 1988. Fluoreszenz-Derivatisierung in DC und HPLC. *GIT Suppl.* **3**:5-11.
- Witte, D.T., J.-P. Franke, F.J. Bruggeman, D. Dijkstra und R.A. De Zeeuw.** 1992. The influence of solute structure, temperature, and eluent composition on the chiral separation of 21 aminotetralins on a cellulose tris-3,5-dimethylcarbamate stationary phase in high-performance liquid chromatography. *Chirality* **4**:389-394.
- Wren, S.A.C. und R.C. Rowe.** 1992. Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis. I. Initial evaluation of a model. *J. Chromatogr.* **603**:235-241.

## **Danksagungen**

Herrn Prof. G.-J.Krauß danke ich für die mir entgegengebrachte Freundlichkeit und das Vertrauen bei der wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Prof. G. Gübitz und Herrn Dr. M. Schmid danke ich für die fruchtbare Zeit in Graz. Neben dem steten wissenschaftlichen Gedankenaustausch wird mir durch ihre offenherzige und umsorgende Art auch privat der Aufenthalt in Österreich immer in schöner Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. M. Weiss gilt mein Dank für seine Hilfe bei der Einführung in pharmakokinetische Fragestellungen und deren Bearbeitung.

Frau Dr. S. Menge war wissenschaftlich erster Ansprechpartner. Ich danke ihr besonders für den mir entgegengebrachten Respekt, aus dem im Laufe der Zeit eine Freundschaft geworden ist.

Herrn Dr. O.Kuhlmann danke ich für die zuverlässige Bereitstellung der Proben bei den Perfusatexperimenten am Rattenherzen und für seine einnehmende freundliche Art bei der Diskussion der Ergebnisse.

Frau R. Mothes danke ich für die grenzenlose Sympathie, die sie mir von Anfang an entgegengebracht hat.

Frau I. Thielemann half bei meiner Vertrautmachung mit den analytischen Verfahren bereitwillig und geduldig.

Frau Dr. A. Schierhorn nahm die massenspektroskopischen Untersuchungen vor. Dafür und für die anschließende Diskussion der Ergebnisse danke ich Ihr.

Ich danke Kristin und Torsten, die mir in dunklen Zeiten Mut zugesprochen haben.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin Ines, ohne die ich diese Arbeit nicht zuende geführt haben könnte.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ angefertigt, das von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert wurde.

## Lebenslauf

Name: Thomas Ullrich

Anschrift: Dölauer Straße 32 in 06120 Halle/Saale

geb. am : 16.01.1969  
in : Sangerhausen

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1975-1987, Abschluß: Abitur

Militärdienst: 1987-1990

Studium: Oktober 1991-März 1998 Biologiestudium an der **Humboldt-Universität Berlin**,  
1993: Vordiplom  
1994-1995 an der **University of York**, England

Promotion: Juni 1998: Beginn des Promotionsstudiums Biochemie an der **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg** als Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Transport von Wirkstoffen in biologischen Systemen“ (Betreuer: Prof. G.-J. Krauß, Fachbereich Biochemie / Biotechnologie, Abteilung Ökologische und Pflanzenbiochemie und Prof. M. Weiss, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Sektion Pharmakokinetik)  
Januar-März 1999: Forschungsaufenthalt an der **Karl-Franzens-Universität Graz**, Österreich (Prof. G. Gübitz)  
Juli 2001: Abgabe der Dissertation

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt, die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben und die den benutzten Werken entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Halle, im Juli 2001