

# **Kapillarelektrophoretische Reinheitsanalytik verschiedener Arzneistoffe des Europäischen Arzneibuchs**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Claudia Borst**  
aus Klingenberg am Main

Würzburg 2011







# **Kapillarelektrophoretische Reinheitsanalytik verschiedener Arzneistoffe des Europäischen Arzneibuchs**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Claudia Borst**  
aus Klingenberg am Main

Würzburg 2011

Eingereicht am .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter .....  
2. Gutachter .....  
der Dissertation

1. Prüfer .....  
2. Prüfer .....  
3. Prüfer .....  
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....







Für meine Eltern & meine Schwester

## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

**Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe.**

Ihr möchte ich hiermit herzlich dafür danken, dass sie mich so freundlich in ihren Arbeitskreis aufgenommen hat, mir ein interessantes und vielseitiges Thema anvertraut hat und für Fragen und Problemen immer ein offenes Ohr hatte.

Dem Springer-Verlag Heidelberg möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Besonders danken möchte ich sämtlichen Kollegen im AK Holzgrabe, die alle Mittags- und Kaffeepausen zu dem gemacht haben, was sie sind. Ohne sie hätte die Arbeit auf einige Auflockerungen verzichten müssen!

Frau Ebner und Frau Möhler möchte ich für die vielen aufschlussreichen und oft auch lustigen Gespräche danken, die mich immer gerne ins Sekretariat gelockt haben!

Ebi, danke, dass Du die Geduld hattest, einem Analytiker die Synthese näher zu bringen und mich unterstützt hast, indem Du die Messungen und Auswertungen der NMR-Spektren übernommen hast!

Dem ehemaligen CE-(B)-Labor, Daniela Brinz und Dr. Yaser Bitar, möchte ich dafür danken, dass sie mir beigebracht haben, die manchmal auch launischen CE-Geräte zu beherrschen!

Mein besonderer Dank geht an das „aktuelle“ CE-Labor, an Jan, Chribü(me), unseren Sonnenschein, und Alex, den begeisterten H(R)obbyhasser! ☺ Danke für die große Diskussionsbereitschaft über fachliche Fragen, aber auch mal über Privates, wie den neuesten Wikipedia-Eintrag, Klatsch und Tratsch von GMX, Bayern3 & Co., Kochrezepte aller Art, die Nanny, die Simpsons, Buffy, Serien im Allgemeinen, Schuhe, ...! Ohne euch wäre die Zeit sicherlich nicht so schnell und schön verflogen!

Tim, danke, dass Du schon zu Studiumszeiten immer für mich da warst, dass Du die Promotion mit mir angefangen und durchgezogen hast! Pharmazie ohne Dich kann ich mir gar nicht so recht vorstellen!

Ein riesiges Dankeschön geht an meine Lieblings-Synthetiker Andreas Hartung, Eva Kugelmann und Jessica Klöckner:

- ♥ Danke Andi, Meister aller PCs, dass Deine DJ-Tätigkeiten auch Schwung in einen tristen Tag gebracht haben.
- ♥ Danke Eva, dass Du mir den Zucker im Kaffeepausen-Kaffee abgewöhnt und mir keinen blauen Wing-Tsun-Fleck übel genommen hast.
- ♥ Danke Jessy, für die aufwendige NMR-Hilfe, alle gemütlichen Pfeifen in großer und kleiner Runde und für die Erkenntnis, dass ein Schlüsselbändchen auch „assig“ aussehen kann! ☺

Ihr wart immer mein Zufluchtsort, wenn gerade gar nichts geklappt hat, oder wenn es einfach Zeit für eine Pause war!

Vielen lieben Dank an meine ganze Familie, an Groß und Klein, dass ihr meine Arbeit immer gut fandet und mich immer unterstützt habt! Ohne euch hätte ich es nie so weit geschafft!

Und Dir, Chrissi, möchte ich für Deine unermüdliche Unterstützung, für Deinen Zuspruch und für jede Aufmunterung danken. Und dafür, dass du mich immer zum Lachen bringen kannst. Danke für alles!!

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

## Artikel

Claudia Borst, Ulrike Holzgrabe

*„Enantioseparation of dopa and related compounds by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography“*

J. Chromatogr. A 1204 (2008) 191-196.

Claudia Borst, Ulrike Holzgrabe

*„Comparison of chiral electrophoretic separation methods for phenethylamines and application on impurity analysis“*

J. Pharm. Biomed. Anal. 53 (2010) 1201-1209.

## Abstracta und Kongressbeiträge

Claudia Borst, Ulrike Holzgrabe

*“Enantioseparation of phenylalanine and related amino acids by cyclodextrin-modified MEEKC”*

DPhG-Jahrestagung, Bonn, 2008.

Claudia Borst, Ulrike Holzgrabe

*„Determination of quetiapine and three metabolites by means of nonaqueous capillary electrophoresis“*

DPhG-Jahrestagung, Jena, 2009.

Während der Arbeit wurde bei der Erstellung eines Buchkapitels mitgewirkt:

### Mitarbeit

Ulrike Holzgrabe, Claudia Borst, Christine Büttner, Yaser Bitar

Kapitel 11: "*Quantitative analysis in pharmaceutical analysis*"

in

Ann Van Eeckhaut, Yvette Michotte

*"Chiral separations by capillary electrophoresis"*

Chromatographic Science Series, Band 100, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 2010.



# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Reinheitsanalytik im Europäischen Arzneibuch	2
1.2	Kapillarelektrophorese	4
1.2.1	Grundlagen	4
1.2.1.1	Geräteaufbau	4
1.2.1.2	Physikalische Grundlagen der Kapillarelektrophorese	8
1.2.1.3	Methodenoptimierung	12
1.2.2	Methoden der Kapillarelektrophorese	12
1.2.2.1	Kapillaronenelektrophorese (CZE)	13
1.2.2.2	Micellare elektrokinetische Kapillarelektrophorese (MEKC)	13
1.2.2.3	Elektrokinetische Kapillarelektrophorese mittels Mikroemulsion (MEEKC)	15
1.2.2.4	Wasserfreie Kapillarelektrophorese (NACE)	16
1.3	Chiralität	18
1.3.1	Grundlagen	18
1.3.2	Chirale Arzneistoffe	20
1.3.3	Chirale Trennungen in der Kapillarelektrophorese	22
1.3.3.1	Cyclodextrine als chirale Selektoren	23
1.3.3.2	Übersicht über die eingesetzten Cyclodextrine	28
1.3.3.3	Weitere chirale Selektoren	30
1.3.4	Chirale Trennungen im Europäischen Arzneibuch	35
1.4	Validierung	38
1.4.1	Allgemeine Grundlagen	38
1.4.2	Selektivität	40
1.4.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	40
1.4.4	Linearität	41
1.4.5	Arbeitsbereich	41
1.4.6	Präzision	42
1.4.7	Richtigkeit	42
1.4.8	Robustheit	43
1.4.9	Systemeignung	43
<b>2</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>ETHAMBUTOL</b>	<b>47</b>
3.1	Übersicht	48
3.1.1	Mykobakterien und Antituberkulotika	48
3.1.2	Analytik	50
3.2	Aufgabenstellung	50
3.3	Stereoselektive Synthese	50
3.4	Cyclodextrin-modifizierte CZE	54
3.4.1	Methodenentwicklung	54
3.5	Ergebnisse der Untersuchungen von Ethambutol	58
<b>4</b>	<b>ENANTIOMERENTRENNUNG MITTELS MEEKC</b>	<b>61</b>
4.1	Aminosäuren	62
4.1.1	Übersicht	62



4.1.2	Aufgabenstellung .....	67
4.1.3	Methodenentwicklung .....	67
4.1.3.1	Individuelle Methoden .....	67
4.1.3.2	Allgemein anwendbare Methoden .....	70
4.1.4	Validierung .....	75
4.1.4.1	Wiederholpräzision .....	75
4.1.4.2	Detektionsgrenzen .....	79
<b>4.2</b>	<b>Ephedrin-Derivate .....</b>	<b>81</b>
4.2.1	Übersicht .....	81
4.2.1.1	Physiologie .....	83
4.2.1.2	Pharmakologie .....	84
4.2.2	Aufgabenstellung .....	84
4.2.3	Methodenentwicklung .....	84
4.2.4	Methodenvergleich .....	88
4.2.5	Validierung .....	94
4.2.6	Reinheitsanalytik der Ephedrin-Derivate im Europäischen Arzneibuch .....	102
4.2.6.1	Überblick .....	102
4.2.6.2	MEEKC-Methode zur Trennung verwandter Substanzen in Anlehnung an das Europäische Arzneibuch 6 .....	102
4.2.6.3	Bestimmung der Detektionsgrenze der MEEKC-Methoden .....	105
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der Enantiomerentrennung mittels MEEKC .....</b>	<b>107</b>
<b>5</b>	<b>REINHEITSANALYTIK VON QUETIAPIN UND VERWANDTEN SUBSTANZEN .....</b>	<b>109</b>
<b>5.1</b>	<b>Übersicht .....</b>	<b>110</b>
5.1.1	Indikation und Wirkung der Neuroleptika .....	110
5.1.2	Stoffgruppen der Neuroleptika .....	110
5.1.3	Pharmakologie .....	112
5.1.4	Metabolite und Verunreinigungen von Quetiapin .....	113
5.1.5	Analytik .....	115
<b>5.2</b>	<b>Aufgabenstellung .....</b>	<b>115</b>
<b>5.3</b>	<b>Strukturaufklärung von Quetiapinlactam .....</b>	<b>115</b>
<b>5.4</b>	<b>NACE-Methode .....</b>	<b>117</b>
<b>5.5</b>	<b>CZE-Methode .....</b>	<b>123</b>
5.5.1	Methodenentwicklung .....	124
5.5.2	Validierung .....	126
5.5.2.1	Wiederholpräzision .....	126
5.5.2.2	Detektionsgrenzen .....	127
<b>5.6</b>	<b>Ergebnisse der Reinheitsanalytik von Quetiapin .....</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>	<b>139</b>
<b>8.1</b>	<b>Reagenzien und Materialien .....</b>	<b>140</b>
8.1.1	Arzneistoffe, Derivate und verwandte Substanzen .....	140

8.1.2	Puffer- und Hintergrundelektrolytsubstanzen.....	142
8.1.3	Substanzen für die Ethambutol-Synthese.....	142
8.1.4	Cyclodextrine .....	143
8.1.5	Lösungsmittel .....	144
<b>8.2</b>	<b>Geräte und Software .....</b>	<b>144</b>
<b>8.3</b>	<b>Herstellung der Lösungen und CE-Bedingungen.....</b>	<b>145</b>
8.3.1	Ethambutol – Synthese und Analytik .....	146
8.3.1.1	NMR-Untersuchung zur Ethambutol-Synthese .....	146
8.3.1.2	CZE-Methoden für Ethambutol.....	146
8.3.2	Enantiomerentrennung mittels MEEKC .....	149
8.3.2.1	Aminosäuren .....	149
8.3.2.2	Ephedrin-Derivate.....	153
8.3.3	Quetiapin und verwandte Substanzen .....	155
8.3.3.1	Messungen zur Strukturaufklärung von Quetiapinlactam .....	155
8.3.3.2	NACE.....	159
8.3.3.3	CZE .....	161
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>165</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>169</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Reinheitsanalytik im Europäischen Arzneibuch

Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.), das zurzeit in der 7. Auflage mit seinen entsprechenden Nachträgen gültig ist, wird von der europäischen Arzneibuchkommission und dem Gesundheitsausschuss des Europarats ausgearbeitet. Es enthält Vorschriften für Arzneistoffe, Arzneipflanzen, Impfstoffe, Blut und Blutprodukte, verschiedene Medizinprodukte, Darreichungsformen, Behältnisse und die dafür verwendeten Materialien, sowie Reagenzien und Hilfsstoffe, aber auch die anzuwendenden Methoden. Sein Zweck ist die Harmonisierung der nationalen Rechtsvorschriften über die Herstellung, den Vertrieb und den Verkehr von Arzneimitteln in Europa [1]. Das Arzneibuch definiert demnach die Qualitätsparameter aller Arzneistoffe unabhängig davon, ob sie chemisch-synthetischer, pflanzlicher oder tierischer Natur sind. Es schreibt außerdem die Methoden vor, mit denen die Qualität der Arzneistoffe zu prüfen ist. Die Qualitätsprüfung bezieht sich auf die Identität, die Reinheit und den Gehalt des jeweiligen Stoffes. Erst nach diesen Prüfungen darf im positiven Fall der Arzneistoff oder die Droge als Arzneimittel gehandelt bzw. zu einem Arzneimittel verarbeitet werden. Die Qualitätsanforderungen sind in Form von Monographien im Arzneibuch verankert.

Im Hinblick auf die Reinheit der Arzneistoffe ist im Ph. Eur. eine Liste aller bekannten und möglichen Verunreinigungen angegeben, die nachweislich durch die Reinheitsprüfungen der Monographie erfasst werden. Da aber nicht alle möglichen Verunreinigungen durch die vorgeschriebenen Prüfungen erfasst werden können, appelliert das Ph. Eur. an den gesunden Menschenverstand und an die gute pharmazeutische Praxis. Denn ist eine eventuell vorhandene Verunreinigung mit den Prüfungen nicht nachweisbar, so darf nicht angenommen werden, dass sie toleriert werden kann [2].

Die in den Monographien vorgeschriebenen Tests sind dafür ausgelegt, sowohl organische als auch anorganische Verunreinigungen zu detektieren [3]. Die Kontrolle über Lösungsmittelrückstände ist in einem eigenen Kapitel (Ph. Eur. 5.4) beschrieben. Die ICH-Richtlinie Q3A(R2) befasst sich mit der Qualifizierung und Quantifizierung von Verunreinigung in chemisch hergestellten Wirkstoffen, die bisher noch nicht zugelassen waren [4]. Auch hier werden die Verunreinigungen in drei Gruppen (organische Verunreinigungen, anorganische

Verunreinigungen und Rückstände von Lösungsmitteln) unterteilt. Dabei werden solche Verunreinigungen, die aufgrund einer guten Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice, GMP) nicht auftreten sollten, nicht berücksichtigt. Beispiele hierfür sind polymorphe Formen und Enantiomere.

Um die unterschiedlichen Verunreinigungen identifizieren und quantifizieren zu können, bedarf es verschiedener Analysemethoden. Im Ph. Eur. werden in Kapitel 2.2 alle physikalischen und physikochemischen Methoden erläutert, die in den verschiedenen Monographien eingesetzt werden [5]. Eine wichtige Rolle spielt hier die Methode der Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC), die im Kapitel 2.2.29 beschrieben wird. Der Trennmechanismus basiert auf der Verteilung der Analyten zwischen zwei nicht-mischbaren Phasen. Die Probe wird bei der HPLC auf die stationäre Phase, die Trennsäule, aufgegeben. Mit Hilfe von Pumpen wird die gelöste Analysenprobe und die mobile Phase, die meist aus Mischungen von verschiedenen organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmitteln und wässrigen Puffern besteht, durch die Trennsäule zum Detektor transportiert. Die HPLC dient zur Trennung von Substanzgemischen sowie ihrer qualitativen und quantitativen Analyse [6].

Unter 2.2.47 wird im Ph. Eur. die Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) beschrieben, wobei auf die Grundlagen im Nachfolgenden noch eingegangen wird (s. Kapitel 1.2). In der Reinheitsanalytik des Ph. Eur. findet die CE verschiedene Einsatzgebiete. Eine große Rolle spielt hier die Peptidmustercharakterisierung, bei der nach chemischem oder enzymatischem Verdau Peptide oder Proteine in die einzelnen Aminosäuren sequenziert und diese analysiert werden [7]. Beispiele hierfür sind u. a. die Monographien von Alteplase, Aprotinin, Erythropoietin oder  $\alpha$ -1-Proteaseinhibitor. Aber auch bei biologischen Proben für die Analyse von Nucleinsäuren aus RNA oder DNA kann die CE herangezogen werden [8], wie beispielsweise bei dem humanen Papillomavirus- oder Rotavirus-Vaccin. Nicht nur bei biotechnologischen Stoffen, sondern auch bei chemischen Wirkstoffen wird die Reinheit mittels CE bestimmt. In den Monographien von Gluthation und Levocabastin wird

kapillarelektrophoretisch auf verwandte Substanzen, bei Ropivacain und Galantamin auf Enantiomerenreinheit geprüft.

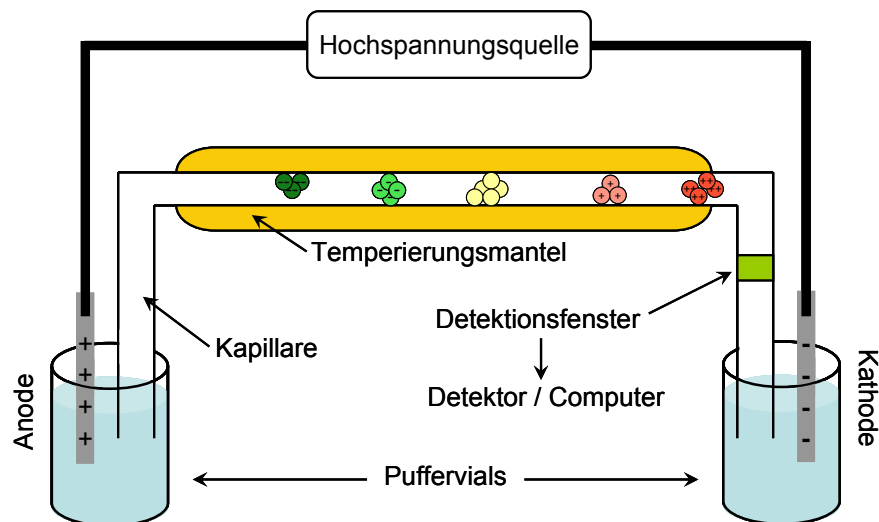
## **1.2 Kapillarelektrophorese**

Elektrophorese beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem leitfähigen, meist flüssigen Medium, die unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zustande kommt. Bei unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten kommt es zur Auftrennung der Teilchen. Die Kapillarelektrophorese ist ein analytisches Trennverfahren, das die Trenntechnik der klassischen Elektrophorese mit den instrumentellen Methoden der Chromatographie hinsichtlich der direkten Detektion der getrennten Proben vereint [9].

### **1.2.1 Grundlagen**

#### **1.2.1.1 Geräteaufbau**

Der schematische Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abbildung 1 dargestellt. In der CE findet die Migration der Moleküle in einer mit Elektrolytlösung gefüllten Glaskapillare statt. Gewöhnlich werden Quarzglaskapillaren verwendet, die aus geschmolzenem Siliciumdioxid hergestellt werden [9]. Um einem Brechen der Kapillare vorzubeugen, dient eine Polyimidummantelung als Schutzschicht. Für die Messungen werden üblicherweise Kapillaren von 20 - 100 cm Länge und einem Innendurchmesser von 25 – 100 µm herangezogen.



**Abbildung 1: schematische Darstellung einer Kapillarelektrophorese.**

Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, befasst sich das Kapitel 2.2.47 des Ph. Eur. mit den Grundlagen der CE. Hierbei wird auch beschrieben, dass eine Apparatur für die CE aus folgenden Bestandteilen aufgebaut sein muss:

- „Einer regelbaren Hochspannungs-Gleichstromversorgungsquelle,
- zwei Puffervorrats-Gefäße, in denen die Flüssigkeitsspiegel auf die gleiche Höhe eingestellt sind und welche die vorgeschriebene Anoden- und Kathodenlösung enthalten,
- zwei Elektroden (Kathode und Anode), die in die Puffer der Vorratsgefäße eintauchen und mit der Stromquelle verbunden sind,
- einer Trennkapillare (...), die, falls sie mit einigen spezifischen Detektor-Typen angewendet wird, ein optisches Fenster enthält, das sich in einer Linie mit dem Detektor befindet (...),
- einem geeigneten Einspritzsystem,
- einem Detektor, der die Menge der zu bestimmenden Substanzen, die in einer gegebenen Zeit einen Abschnitt der Trennkapillare durchströmen, erfasst (...),
- einem Thermostat-System zum Einhalten einer konstanten Temperatur innerhalb der Kapillare, um eine gute Vergleichspräzision für die Trennung zu erreichen,
- einem Aufzeichnungsgerät und einem geeigneten Integrator oder einem Computer.“ [10]

Zu Beginn der Messung werden wenige Nanoliter der Probe auf die mit Trennpuffer gefüllte Kapillare aufgegeben. Hierfür muss ein Kapillarende in das Vial eintauchen, in dem die gelöste Probe vorliegt. Die Injektion kann auf hydrostatische, hydrodynamische oder elektrokinetische Weise erfolgen. Durch Anheben des Probenvials entsteht bei der hydrostatischen Probenaufgabe ein Höhenunterschied von Proben- und Puffervial, so dass sich ein Siphoneffekt einstellt, der die Analysenlösung in die Kapillare zieht. Bei der häufig angewandten hydrodynamischen Injektion wird an das System von außen Druck angelegt. Sowohl bei der hydrostatischen als auch bei der hydrodynamischen Injektion kann über die Höhe des Drucks und die Zeit der Injektion das aufzugebene Probenvolumen durch das Hagen-Poiseuillesches Gesetz berechnet werden. Um reproduzierbare Aufgabevolumina und präzise Ergebnisse (Peakfläche und -höhe) zu erhalten ist es wichtig, dass Proben- und Auslassgefäß die gleiche Füllhöhe aufweisen, dass es zu keinen unerwünschten Siphoneffekten kommt [9, 11].

Dagegen wirkt bei der elektrokinetischen Injektion ein elektrisches Feld auf die Probenlösung, so dass es zu einer Migration der Probenteilchen in die Kapillare kommt. Auch hier handelt es sich um eine präzise Aufgabetechnik. Jedoch muss bedacht werden, dass nicht die echte Zusammensetzung der Probe repräsentiert wird, da die Wanderung der Probe in die Kapillare von der eigenen Mobilität der Teilchen abhängt [9, 11].

Während der Messung taucht die Kapillare mit beiden Enden in jeweils ein Puffergefäß ein. Über zwei Elektroden, die ebenfalls in die Puffervials eintauchen, wird Hochspannung erzeugt (-30 bis +30 kV). So bildet sich in der Kapillare ein elektrisches Feld aus, was die Wanderung der Probenbestandteile bewirkt. Die hierbei entstehende Joule'sche Wärme kann über das Thermostat-System der Kapillare, das in Abbildung 1 als Temperierungsmantel dargestellt ist, ausgeglichen und die Temperatur dadurch weitestgehend konstant gehalten werden. Diese Systeme können mit Luft oder mit einer speziellen Kühlflüssigkeit betrieben werden. Am Detektionsfenster, das sich vor dem Auslassgefäß befindet, ist ein Detektor angeschlossen, mit dem eine qualitative und quantitative Auswertung über den Computer erfolgen kann.



In der CE stellt die häufigste Detektionsart die Absorptionsspektroskopie dar [9, 10]. Dabei kann die Detektion *online*, d. h. direkt in der Kapillare, erfolgen. Absorption ist im UV- [12, 13] und sichtbaren (Vis) [14] Bereich möglich. Substanzen, die sich zur Fluoreszenz anregen lassen, können durch den Einsatz der Fluorimetrie detektiert werden. Im Gegensatz zu UV/Vis-Detektoren muss der Detektor hier mit zwei Filtern ausgestattet sein, da sich Anregungs- und Messwellenlänge unterscheiden. Bei der Fluoreszenz-Detektion, die oft laser-induziert ist, müssen die Proben, die keine Eigenfluoreszenz aufweisen, mit fluoreszierenden Gruppen z. B. Fluoresceinisothiocyanat [15] oder 3-(4-Brombenzoyl)-2-chinolinicarboxaldehyd [16] derivatisiert werden. Eine indirekte Detektion ist eine Alternativmethode zum Nachweis nicht UV-absorbierender und nicht fluoreszierender Verbindungen. Hier muss der Hintergrundelektrolyt eine Eigenabsorption oder -fluoreszenz besitzen, so dass die Analyten durch die entsprechende Löschung einen Peak im Elektropherogramm hervorrufen [17].

Nachteilig bei der direkten Detektion sind die Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten. Die später migrierenden Proben wandern langsamer durch die Kapillare und das Detektionsfenster, so dass sie breitere Peaks und dadurch größere Peakflächen verursachen. Bei der qualitativen Auswertung muss dieser Sachverhalt berücksichtigt und mit einberechnet werden. Allen Werten der vorliegenden Arbeit liegen entsprechend korrigierte Peakflächen zugrunde, die durch das Fläche-Migrationszeit-Verhältnis berechnet werden.

Ein weiterer Nachteil ist die Tatsache, dass als Schichtdicke, welche die Strahlung des Detektors passieren muss, nur der sehr geringe Kapillarinne Durchmesser zur Verfügung steht, was die Konzentrationsempfindlichkeit herabsetzt. Durch „bubble“- [18] oder Z-Zellen [19] kann die Detektionsstrecke jedoch verlängert, und die Empfindlichkeit des Systems damit erhöht werden.

Des Weiteren können die Proben auch außerhalb der Kapillare detektiert werden. Leitfähigkeits-, amperometrische oder massenspektrometrische Detektion können für spezifische Anwendungen eingesetzt werden [10].

### 1.2.1.2 Physikalische Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Die CE basiert auf der Wanderung geladener Teilchen innerhalb einer mit Elektrolytlösung gefüllten Kapillare unter Einfluss eines elektrischen Feldes.

#### Elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit $v_{ep}$

Jedes Teilchen bewegt sich mit konstanter Geschwindigkeit, der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit, die von der elektrophoretischen Mobilität und der Feldstärke abhängig ist [10].

**Formel 1:** 
$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \left( \frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

$\mu_{ep}$ : elektrophoretische Mobilität

$E$ : elektrische Feldstärke

$q$ : wirksame Ladung des gelösten Bestandteils

$\eta$ : Viskosität der Elektrolytlösung

$r$ : Stoke'scher Radius des gelösten Bestandteils

$V$ : angelegte Spannung

$L$ : Gesamtlänge der Kapillare

Wenn sich einzelne Probenpartikel in  $r$  und  $q$  unterscheiden, kann es aufgrund variierender Masse-Ladungs-Verhältnisse zur Auftrennung der Substanzen kommen.

#### Elektroosmotische Geschwindigkeit $v_{eo}$

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes bewegt sich auch die Elektrolytlösung innerhalb der Kapillare. Dieser Effekt wird als elektroosmotischer Fluss (EOF) bezeichnet. Der EOF kommt zustande, da die innere Oberfläche der Quarzglas-Kapillaren aus Silanolgruppen (Si-OH) besteht, die ab einem pH-Wert von ca. 3 deprotoniert vorliegen. Diese negativen Oberflächenladungen ziehen positiv geladene Ionen aus der Elektrolytlösung an, die sich in einer nahen, starren und einer weiter entfernten, beweglichen Schicht anordnen. In dieser diffusen Doppelschicht bildet sich das sogenannte Zeta-Potential, das in der starren Schicht linear, und in der diffusen Schicht exponentiell abnimmt. Im elektrischen Feld wandert nun die bewegliche Schicht

in Richtung Kathode. Da die Kationen solvatisiert vorliegen, ziehen sie die übrige Pufferlösung mit sich, wodurch der EOF entsteht. Der EOF ist proportional zum Zeta-Potential, das wiederum proportional zur Dicke der Doppelschicht ist. Die Geschwindigkeit des EOF ist abhängig von der Ladungsdichte an der Kapillaroberfläche und den Puffereigenschaften [9, 10, 11, 20, 21].

**Formel 2:** 
$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \left( \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

- $\mu_{eo}$ : elektroosmotische Mobilität  
 $\varepsilon$ : Dielektrizitätskonstante der Pufferlösung  
 $\zeta$ : Zeta-Potential der Oberfläche der Kapillare

Substanzen, die keine eigene elektrophoretische Mobilität besitzen, werden vom elektrischen Feld nicht beeinflusst. Sie migrieren alle zeitgleich mit dem EOF und können dadurch auch ohne Ladung detektiert werden.

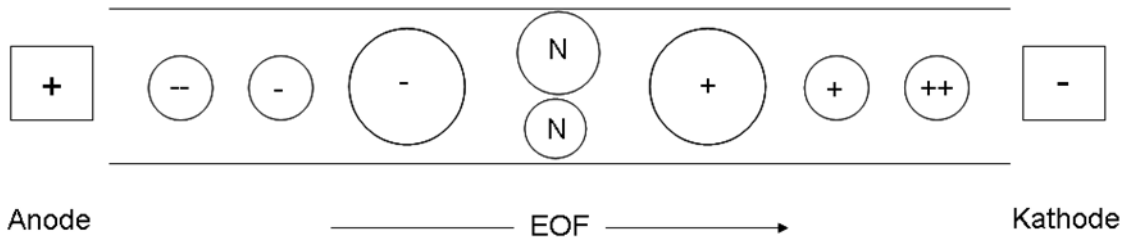
#### Geschwindigkeit des gelösten Bestandteils $v$

Um die effektive Wanderungsgeschwindigkeit eines Teilchens zu berechnen, müssen sowohl die elektrophoretische als auch die elektroosmotische Geschwindigkeit berücksichtigt werden [10].

**Formel 3:** 
$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

Ohne EOF würden die Anionen im elektrischen Feld von der positiv geladenen Anode angezogen werden und ins Einlassgefäß wandern, ohne den Detektor zu passieren. Oft überlagert aber die Geschwindigkeit des EOF die Eigenbewegung, so dass auch Anionen detektiert werden können.

Aus Formel 1 – 3 lässt sich nun eine allgemeine Migrationsreihenfolge für verschiedene Substanzen vorhersagen, wie sie auch in Abbildung 1 gezeigt wird. Aufgrund des hohen Masse-Ladungs-Verhältnisses wandern kleine, mehrfach geladene Kationen am schnellsten, gefolgt von kleinen, dann von großen einfach positiv geladenen Substanzen. Alle Neutralteilchen wandern unabhängig von ihrer Größe mit dem EOF. Zuletzt werden die Anionen, abhängig von Masse und Ladung, vom Detektor erfasst [11].



**Abbildung 2: Detektionsreihenfolge gelöster Substanzen in der CE.**

Zeit des gelösten Bestandteils zum Durchwandern der Kapillare t

Um die Zeit t zu berechnen, die benötigt wird, um eine Substanz zu detektieren, muss die effektive Länge l der Kapillare berücksichtigt werden, die Aufschluss über die Strecke von Anfang der Kapillare bis zum Detektor gibt [10].

**Formel 4:** 
$$t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l \times L}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}$$

Die bis hierhin beschriebenen Gleichungen dienen hauptsächlich theoretischen Berechnungen, die in der Praxis aufgrund vieler schwer bestimmbarer Parameter kaum Anwendung finden. Um dennoch das CE-System und die angewendete Methode zu überprüfen, können die Anzahl der theoretischen Böden N, die Auflösung  $R_s$  und der Symmetriefaktor  $A_s$  aus den Elektropherogrammen errechnet werden [10].

Anzahl theoretischer Böden N

**Formel 5:** 
$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

$t_R$ : Wanderungszeit oder Entfernung auf der Basislinie zwischen dem Einspritzpunkt und dem Schnittpunkt der durch das Maximum des dem Bestandteil entsprechenden Peaks gezogenen Senkrechten mit der Basislinie

$w_h$ : Peakbreite in halber Peakhöhe

Die Anzahl der theoretischen Böden gibt Auskunft über die Effizienz des Systems. Mit der Bodenzahl wird der Effekt der Bandenverbreiterung beschrieben, der die Zonen in der Kapillare durch Transport und Dispersion ausgesetzt sind. Eine große Anzahl spricht für ein effizientes System [9, 10].

Auflösung  $R_s$ 

**Formel 6:** 
$$R_s = \frac{1.18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} - w_{h2}} \quad \text{mit } t_{R2} > t_{R1}$$

Mit  $R_s$  wird die Trennung zweier Peaks beschrieben. Ab einem Wert von 1,4 spricht man allgemein von einer Basislinientrennung. Wenn keine vollständige Trennung vorliegt, kann der Grad der Auflösung auch mit dem Peak-zu-Tal-Verhältnis angegeben werden, wobei die Höhe des Tals  $H_v$  und die Peakhöhe des kleineren Peaks  $H_p$  einberechnet werden [10]. Diese Berechnung wird hauptsächlich bei sehr unterschiedlich großen Peaks, wie z. B. Hauptpeak und Verunreinigung, eingesetzt.

**Formel 7:** 
$$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$$

Symmetriefaktor  $A_s$ 

**Formel 8:** 
$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ : Peakbreite bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe

$d$ : Entfernung der durch das Maximum des Peaks gezogenen Senkrechten und dem aufsteigenden Kurvenast bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe

Signal-Rausch-Verhältnis (S/N)

Aus einem Elektropherogramm kann außerdem die Detektionsgrenze und die Quantifizierungsgrenze eines Stoffes berechnet werden, indem das Verhältnis vom Signal  $S$  zum Rauschen der Basislinie  $N$  bestimmt wird. Die Detektionsgrenze ist bei einem S/N-Wert von 3, für die Quantifizierungsgrenze bei einem S/N-Wert von 10 definiert.

**Formel 9:** 
$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

$H$ : Peakhöhe, gemessen vom Peakmaximum bis zur extrapolierten Basislinie des Signals, die beidseitig gleichmäßig über eine Distanz, die dem 20fachen der Peakbreite in halber Höhe entspricht, betrachtet wird.

*h*: Bereich des Untergrundrauschens, das nach Einspritzen einer Blindlösung erhalten wird, betrachtet über eine Distanz, die dem 20fachen der Peakbreite in halber Peakhöhe entspricht und die möglichst gleichmäßig verteilt auf beiden Seiten der Stelle liegt, an der jener Peak auftreten würde.

### **1.2.1.3 Methodenoptimierung**

An den in Kapitel 1.2.1.2 beschriebenen Gleichungen lässt sich ablesen, welche Parameter das Ergebnis der kapillarelektrophoretischen Trennung beeinflussen. Bei der Entwicklung einer CE-Methode können demnach verschiedene Faktoren verändert werden, um das Ergebnis zu optimieren. Zwei Proben werden voneinander getrennt, wenn sie mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (s. Kapitel 1.2.1.2., Formel 1 – 3) durch die Kapillare wandern und in zeitlichem Abstand den Detektor passieren. Um die Geschwindigkeiten zu beeinflussen, lassen sich im Wesentlichen zwei Arten von Parametern variieren. Zum einen können die Geräte-Parameter Spannung, Polarität, Temperatur sowie Länge und innerer Durchmesser der Kapillare verändert werden. Zum anderen kann aber auch die Zusammensetzung der Elektrolytlösung abgewandelt werden. So können verschiedene Arten und Konzentrationen an Puffersubstanzen untersucht werden, und der pH-Wert der Pufferlösung kann variiert werden. Außerdem ist es möglich, organische Lösungsmittel oder andere modifizierende Substanzen, sogenannte Additiva, beispielsweise für eine chirale Trennung, zuzusetzen [10, 22]. Ferner ist es möglich die Kapillare mit Alkylsilanen zu beschichten. Diese richten ihre hydrophoben Alkylreste ins Innere der Kapillare, so dass die Oberfläche einen mehr oder weniger hydrophoben Charakter aufweist, der von der Länge der Alkylkette abhängt [9, 22].

## **1.2.2 Methoden der Kapillarelektrophorese**

Die Vielseitigkeit der CE ist durch die Möglichkeit der Methodenwahl stark erhöht [23]. Durch verschiedenartige Elektrolytlösungen oder Zusätze zum Trennpuffer ergeben sich unterschiedliche Trenntechniken. Das Ph. Eur. beschreibt in Kapitel 2.2.47 die Kapillarzonenelektrophorese, die Kapillar-Gelelektrophorese,

die isoelektrische Fokussierung in Kapillaren und die mizellare elektrokinetische Chromatographie. Daneben wird in der Literatur auch die Isotachophorese beschrieben, die auf Verdrängungsvorgängen basiert [9, 11]. Außerdem können mittels CE Affinitätsuntersuchungen durchgeführt werden [24].

In den folgenden Abschnitten wird lediglich auf die in dieser Arbeit angewendeten Methoden eingegangen, d. h. die Kapillarzonenelektrophorese (CZE), die wasserfreie CE (NACE), die elektrokinetische Chromatographie mittels Mikroemulsion (MEEKC) und die artverwandte mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC).

### **1.2.2.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)**

Die CZE war die erste Methode, die als kapillarelektrophoretische Trenntechnik entwickelt wurde. 1981 gelang es *Jorgenson et al.* Aminosäuren, Dipeptide und Amine mittels Phosphatpuffer zu trennen [25]. Die CZE ist auch heute noch die am häufigsten angewandete Methode der CE. Sie beruht auf einem einfachen Trennpuffer, in dem die Probenbestandteile der Analysenlösung, die als konkrete Zone auf die Kapillare aufgegeben wird, in unterschiedliche, diskrete Zonen aufgetrennt werden. Trennprinzip sind die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten, die von den elektrophoretischen Mobilitäten, also dem Masse-Ladungs-Verhältnis, abhängig sind (s. Kapitel 1.2.1.2). Ungeladene Substanzen können mittels CZE nicht voneinander getrennt werden, da sie mit dem EOF migrieren (s. Abbildung 2, Kapitel 1.2.1.2).

### **1.2.2.2 Micellare elektrokinetische Kapillarelektrophorese (MEKC)**

Die Methode der MEKC wurde 1984 von der Arbeitsgruppe *Terabe et al.* entwickelt [26]. Im Gegensatz zum einfachen Trennpuffer der CZE wird der Elektrolytlösung hier ein Detergens zugesetzt. Diese oberflächenaktiven Moleküle sind amphiphil aufgebaut und bilden strukturbedingt ab einer substanzspezifischen Konzentration, der kritischen mizellaren Konzentration (CMC), Mizellen aus, indem sich die hydrophoben Alkylketten aneinander lagern. Diese Mizellen sind kugelförmig und tragen eine nach außen gerichtete Ladung, so dass sie im elektrischen Feld eine elektrophoretische Mobilität

zeigen. Im Inneren sind sie dagegen hydrophob. In der Lösung können sich die Probenbestandteile zwischen der wässrigen Phase des Trennpuffers und den Mizellen verteilen, die als pseudostationäre Phase dienen. Die Trennung der Substanzen ist nun nicht einzig vom Masse-Ladungs-Verhältnis abhängig, sondern zusätzlich vom Verteilungskoeffizienten zwischen den beiden Phasen. Da sich im hydrophoben Kern auch neutrale Analyten lösen, können in der MEKC neben geladenen auch ungeladene Moleküle getrennt werden. Ebenso kann die Auflösung von Substanzen mit ähnlicher elektrophoretischer Mobilität verbessert werden [27].

Eines der weit verbreitetsten Tenside ist das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS), dessen CMC in Wasser bei 8.2 mM liegt. Vielfache Verwendung als anionische Tenside finden auch Gallsäure-Derivate, wie Natriumcholat (CMC: 10 mM) oder Natriumdeoxycholat (CMC: 2.7 mM). Aber auch Aminosäure-Derivate, wie z. B. Natrium-*N*-dodecanoyl-*L*-valinat und (*R*)-*N*-Dodecoxy-carbonylvalin (CMC nicht bekannt), oder Glucopyranosid-Derivate, wie z. B. *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-glucopyranosidmonosulfat (CMC: 0.19 mM), können eingesetzt werden [28, 29]. Neben den anionischen finden auch kationische Detergentien, wie z. B. Cetyltrimethylammoniumbromid (CMC: 0.92 mM) und Cetylpyridiniumchloridmonohydrat (CMC: 0.12 mM) ihren Einsatz [29]. Die daraus entstehenden positiv geladenen Mizellen werden im elektrischen Feld von der Kathode angezogen. Gleichzeitig bewirken sie aber auch eine Umkehr des EOF, da die negativ geladenen Silanolgruppen der Kapillarwand mit den kationischen Tensiden elektrostatische Wechselwirkungen zeigen. Dieser Effekt tritt schon unterhalb der CMC auf. Um die Substanzen dennoch detektieren zu können, wird an das System eine Umkehrspannung angelegt, wodurch sich der Detektor auf der anodischen Seite der Kapillare befindet. Dahingegen werden Mizellen aus anionischen Tensiden von der Anode angezogen. Bei einem genügend starken EOF werden jedoch auch diese Moleküle zum negativ geladenen Ende der Kapillare transportiert.

Weiterhin können auch nichtionische (z. B. *n*-Nonyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und verschiedene Polyethylenglykolether-, sog. Brij-Derivate) oder zwitterionische oberflächenaktiven Substanzen (z. B. *N*-(2-Hydroxy-*n*-dodecyl)-*L*-threonin) als Mizellbildner verwendet werden [28, 29].

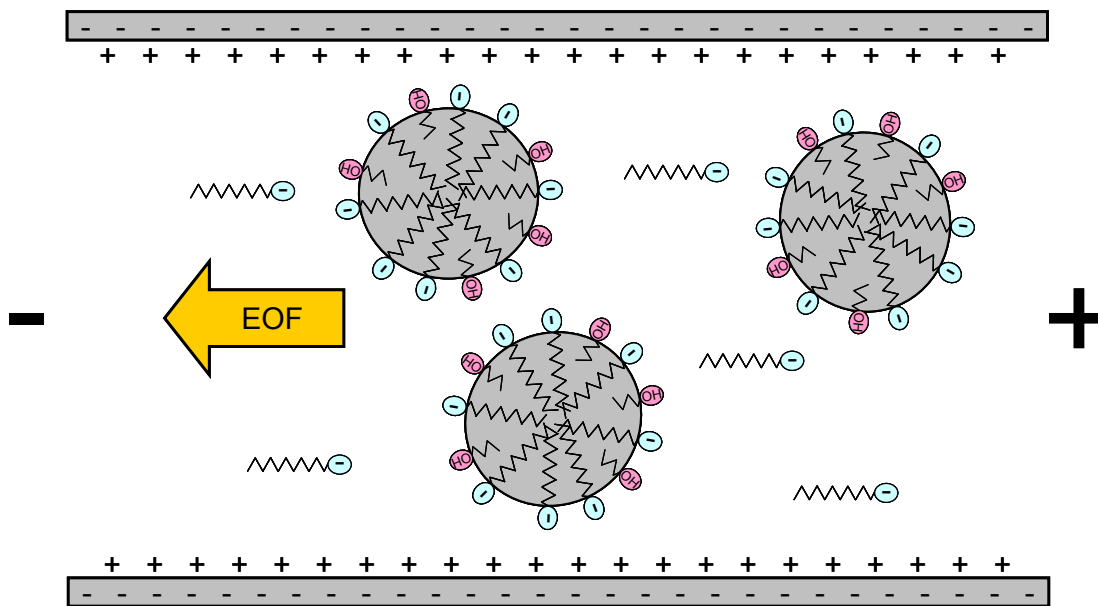


### 1.2.2.3 Elektrokinetische Kapillarelektrophorese mittels Mikroemulsion (MEEKC)

Die MEEKC ist eng verwandt mit der Trenntechnik der MEKC. In beiden Fällen wird die Methode durch eine pseudostationäre Phase ergänzt. Bei der MEEKC liegen jedoch keine einfachen Mizellen vor, vielmehr wird als Elektrolytlösung eine Mikroemulsion (ME) eingesetzt. MEs wurden 1943 erstmalig von *Hoar et al.* beschrieben [30]. Hierbei handelt es sich um ein System, das aus einer hydrophilen, wässrigen Phase und einer lipophilen Ölphase besteht. Beide Phasen sind hier mit Hilfe einer amphiphilen Substanz verbunden. Im Gegensatz zur MEKC, bei der sich Mizellen bilden, wird bei der hauptsächlich angewendeten Öl-in-Wasser-ME ein Öltröpfchen von den Tensiden eingeschlossen, wodurch sich ein kugelförmiger Emulsionstropfen ergibt. Außerdem können zur Stabilisierung der ME kurzkettige Alkohole (wie 1-Butanol) als Co-Tenside zugegeben werden, die die Funktion der Tenside unterstützen. Der geladene Teil der Detergens-Moleküle ragt in die wässrige Phase, während sich die hydrophoben Alkylketten mit dem Öltröpfchen nach innen ausrichten. Die Ölphase liegt in der ME fein dispergiert vor, so dass die Öltröpfchen nur wenige Nanometer groß sind. Der Zusatz der amphiphilen Substanzen reduziert die Oberflächenspannung zwischen den beiden unmischbaren Phasen auf nahezu null [31].

MEs sind thermodynamisch stabil und transparent. Die Lichtstreuung, die durch den Tyndall-Effekt ausgelöst wird, wird höchstens als schwache Opaleszenz wahrgenommen [32, 33].

Die Idee, eine ME als Elektrolytlösung in der CE einzusetzen, wurde 1997 von *Watarai et al.* entwickelt [34]. Durch den hydrophoben Ölkern der ME-Tröpfchen ist es möglich, nicht nur neutrale Substanzen, sondern auch sehr lipophile Analyten voneinander zu trennen. In der MEEKC wird die Migration der Probenbestandteile sowohl von der elektrophoretischen Mobilität, als auch von der Hydrophobizität der Moleküle beeinflusst.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der MEEKC mit SDS als Tensid und 1-Butanol als Co-Tensid.

Die ME-Tröpfchen verhalten sich analog den Mizellen der MEKC. Auch in der MEEKC ist SDS das am meisten eingesetzte Detergens. Durch die Sulfat-Gruppen tragen die ME-Tröpfchen an der Oberfläche negative Ladungen. Damit richtet sich die Wanderungsrichtung zur Anode. So werden auch die Substanzen, die ein hohes Inklusionsverhalten in den Ölkern aufweisen, zum positiv geladenen Ende der Kapillare mittransportiert. Zeigt der EOF jedoch eine höhere Mobilität als die Eigenmobilität der stabilisierten Ölphase, können alle Substanzen vom Detektor auf der kathodischen Seite erfasst werden (s. Abbildung 3).

#### 1.2.2.4 Wasserfreie Kapillarelektrophorese (NACE)

In vielen Methoden der wässrigen CE werden dem Trennpuffer organische Modifier zugesetzt, um durch eine Mobilitätsveränderung oder Beeinflussung des EOF ein Trennproblem zu lösen [9]. 1984 wurde von *Walbroehl et al.* [35] die erste Methode entwickelt, deren Elektrolytlösung aus reinen organischen Lösungsmitteln bestand, ohne dass ein wässriger Bestandteil zugegeben wurde.

In der wasserfreien (*engl.: non-aqueous*) CE wird ein leitfähiger Elektrolyt in einem organischen Lösungsmittel oder einem Lösungsmittelgemisch gelöst,

anstatt in einem wässrigen Puffer. Analog zu einer wässrigen CZE-Methode liegen die Probenbestandteile gelöst vor und können aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität in der Kapillare wandern. Bei unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten ergibt sich auch hier eine Trennung der Proben in einzelne Zonen. Obwohl die Trenntechnik in der NACE und der CZE übereinstimmen, erzielen die Methoden unterschiedliche Ergebnisse. Dies liegt darin begründet, dass sich im organischen Medium die Ladung bzw. der  $pK_a$ -Wert einer Substanz im Gegensatz zu einem wässrigen Puffer unterscheiden kann [27]. Ebenso variieren in der Regel die Größe der Solvathülle und die daraus resultierende Masse der Moleküle. Durch die veränderte Masse und Ladung ergibt sich eine neue Mobilität des Analyten, die für spezielle Trennprobleme nützlich sein kann [36, 37, 38]. Die wasserfreie CE zeigt noch weitere Vorteile im Vergleich zur wässrigen CE. Aufgrund der größeren Autoprotolysekonstante der organischen Lösungsmittel zeigt die wasserfreie Methode oft bessere Ergebnisse als wässrige Trennpuffer [39, 40]. Die niedrige Viskosität des organischen Puffersystems führt außerdem zu kurzen Analysezeiten [41]. Ein weiterer Vorzug stellt die erhöhte Löslichkeit dar, die viele Stoffe in organischen Lösungsmitteln zeigen.

Des Weiteren ist es möglich, die Trenntechnik der NACE durch Additiva zu ergänzen, wie es bei wässrigen CE-Methoden gängig ist (s. Kapitel 1.2.2.1-3). So können Tenside (z. B. Brij) und Kronenether zugesetzt werden, die die elektrophoretische Mobilität der Analyten verändern [42]. Auch ionische Additiva wie SDS und Tetrabutylammoniumperchlorat können helfen die Selektivität und Auflösung einzelner Probenbestandteile zu verbessern [43]. Außerdem zeigt auch im wasserfreien Medium das oberflächenaktive SDS einen positiven Effekt auf die Löslichkeit vieler Substanzen. Für die Trennung von Enantiomeren können, genau wie bei wässrigen CE-Methoden, Cyclodextrine als chirale Selektoren zugesetzt werden [44, 45].

## 1.3 Chiralität

### 1.3.1 Grundlagen

Chiralität ist die „Händigkeit“ eines Moleküls und stellt eine besondere Form seiner Stereoisomerie dar. Unter Stereoisomeren versteht man solche Isomere, deren Atome in der gleichen Reihenfolge verbunden sind, deren räumliche Anordnung sich aber unterscheidet. Wenn sich zwei Verbindungen wie Bild und Spiegelbild verhalten, sind sie chiral, da sie weder eine Symmetrieebene noch ein Symmetriezentrum besitzen. Diese Moleküle bezeichnet man als Enantiomere. Ein Atom, das aufgrund seines Substituentenmusters (vier verschiedene Substituenten) keine Spiegelebene besitzt, wird als asymmetrisch substituiertes Atom, Stereozentrum oder Chiralitätszentrum bezeichnet. Hierbei handelt es sich meistens um ein Kohlenstoffatom, aber auch Phosphor, Schwefel oder Stickstoff können ein Chiralitätszentrum darstellen. Chirale Substanzen können physikalisch anhand der optischen Aktivität erkannt werden.

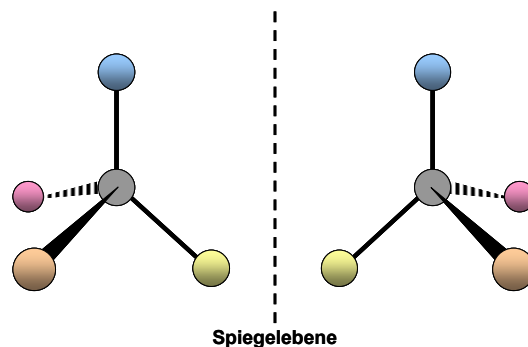


Abbildung 4: Darstellung von Enantiomeren an einer Spiegelebene.

Das Molekül ist hier in der Lage, die Schwingungsebene linear polarisierten Lichts um einen bestimmten Betrag in eine Richtung zu drehen. Die beiden Enantiomere unterscheiden sich bei diesem Versuch lediglich in der Drehrichtung, der Betrag der Drehung bleibt gleich. Wird die Ebene des linear polarisierten Lichts im Uhrzeigersinn gedreht, nennt man das Enantiomer rechtsdrehend oder (+)-Enantiomer, entgegen gesetzt spricht man von (-) oder linksdrehend. Der Grad der Drehung ist dabei abhängig von den Versuchsbedingungen wie Konzentration, Temperatur und Lösungsmittel, so dass zu Vergleichszwecken diese Parameter eingehalten werden müssen.

Chirale Substanzen werden in (*R*)- und (*S*)-Enantiomere unterschieden. Hierbei spricht man von der CIP-Nomenklatur, die auf Robert Sidney Cahn, Christopher Kelk Ingold und Vladimir Prelog zurückzuführen ist. Diese Zuordnung richtet sich nach der absoluten strukturellen Konfiguration der Substanz, wobei den Substituenten des Chiralitätszentrums bestimmte Prioritäten zugeordnet werden, die von der Höhe der jeweiligen Ordnungszahl abhängig ist. Geht man davon aus, dass der Substituent mit der niedrigsten Priorität (= niedrigste Ordnungszahl) nach hinten zeigt, betrachtet man die Reihenfolge der anderen drei Substituenten mit absteigender Priorität. Sind diese im Uhrzeigersinn angeordnet, handelt es sich um das (*R*)-Enantiomer, umgekehrt spricht man vom (*S*)-Enantiomer.

Untersucht man das Racemat einer chiralen Substanz, in dem das (+)- und das (-)-Enantiomer equimolar vorliegen, ist keine optische Aktivität zu beobachten, da sich die Links- und Rechtsdrehung ausgleichen. Ebenso kann bei achiralen Substanzen keine Drehung gemessen werden, da sie optisch inaktiv sind [28, 46].

In einer achiralen Umgebung verhalten sich die Enantiomere gleich. Erst wenn sie einer chiralen Umgebung ausgesetzt sind, können die Enantiomere einer chiralen Verbindung sehr unterschiedliche Wirkungen zeigen.

Es ist eine sehr große Anzahl chiraler Naturstoffe bekannt. Auch im menschlichen Körper sind die meisten Moleküle chiral, wobei viele dieser Substanzen in ihrer natürlichen Form hauptsächlich enantiomerenrein auftreten, wie z. B. Aminosäuren (mit Ausnahme des achiralen Glycins) und Zucker. Die räumliche Ausrichtung der körpereigenen Stoffe hat Einfluss auf pharmakodynamische Vorgänge (z. B. Wechselwirkung mit Enzymen, Rezeptoren und Ionenkanälen) und pharmakokinetische Prozesse (z. B. Proteinbindung, Metabolisierung, Verteilung), wie sie Fremdstoffe, d. h. auch Arzneistoffe, im Körper erfahren.

### 1.3.2 Chirale Arzneistoffe

Wie bei den Naturstoffen gibt es auch unter den heute zugelassenen Arzneistoffen viele chirale Verbindungen. Früher wurden oft Racemate als Wirkstoffe eingesetzt, wohingegen in den letzten Jahren die Tendenz zu enantiomerenreinen Substanzen zu erkennen ist [47]. Das ist eine Konsequenz aus der Tatsache, dass sich die biologische Aktivität der Enantiomere unterscheiden kann. Monographien im Ph. Eur., die ein spezielles Enantiomer einer chiralen Substanz beschreiben, müssen immer auf die Enantiomerenreinheit überprüft werden. Dieser Test wird oft durch die Messung der optischen Drehung durchgeführt. Hierfür wird die spezifische Drehung  $[\alpha]_D^{20}$  der gelösten Substanz mittels Polarimeter bestimmt. Sie ist definiert durch den Drehwinkel  $\alpha$  (angegeben in Grad) der Drehung der Polarisationssebene bei der Wellenlänge der D-Linie des Natriumlichts ( $\lambda$ : 589,3 nm), gemessen bei 20 °C, einer Schichtdicke von 1 cm und einer Konzentration von 1 g/ml des Arzneistoffes im vorgegebenen Lösungsmittel [48]. Ebenso wird in vielen Monographien, die Racemate als Arzneistoffe beschreiben, die optische Drehung als Reinheitsuntersuchung vorgeschrieben [1].

**Formel 10:** 
$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l \times c}$$

Obwohl zwei Enantiomere dieselben physiochemischen Eigenschaften, wie z. B. Schmelzpunkt und Löslichkeit, besitzen, weisen sie oft unterschiedliche pharmakologisch-toxikologische Aktivitäten auf. Dieser Sachverhalt lässt sich damit erklären, dass auch viele biologische Systeme und biochemische Prozesse auf spezifischen Wechselwirkungen verschiedener chiraler Strukturen wie Enzym-Substrat- oder Rezeptor-Ligand-Komplexen basieren (s. Kapitel 1.3.1). Dies kann dazu führen, dass ein Enantiomer inaktiv ist oder sogar toxische Effekte auslösen kann. So ist z. B. das (S)-Enantiomer des  $\beta$ -Blockers Propranolol [49] und des Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmers Citalopram (auch Escitalopram genannt) [50] 100-fach aktiver als die entsprechende (R)-Verbindung. Bei vielen Substanzen sind die Aktivitätsunterschiede allerdings nicht so stark ausgeprägt, so dass auch das Racemat als Arzneistoff eingesetzt

werden kann. Beispiele hierfür sind Cetirizin mit der aktiveren (*R*)-Verbindung (= Levocetirizin) [51] und Warfarin mit dem aktiveren (*S*)-Enantiomer [52].

Es können aber auch toxische Effekte auftreten: Bei der Behandlung des Morbus Parkinson traten lange Zeit schwere Nebenwirkungen auf, bis nur noch das reine (*S*)-Enantiomer des Dopa (= Levodopa) eingesetzt wurde [53] (s. auch Kapitel 4.1.1). Ebenso ist die Enantiomerenreinheit von D-Penicillamin wegen der Toxizität des L-Penicillamin von großer Bedeutung [54].

Wegen der pharmakodynamischen Unterschiede, die zwei Enantiomere aufweisen können, ist es in vielen Fällen zweckmäßig, ein einzelnes Enantiomer anstelle des Racemats einzusetzen. Jedoch ist Enantiomerenreinheit nicht immer sinnvoll, wie das Beispiel von Ibuprofen zeigt. Obwohl das (*R*)-Enantiomer von Ibuprofen eigentlich inaktiv ist, zeigt es im Körper analgetische und antipyretische Wirkungen, da das inaktive Isomer durch enzymatisch katalysierte, endogene Reaktionen zum aktiven (*S*)-Ibuprofen umgesetzt wird [55].

Obwohl viele Arzneistoffe heute enantiomerenrein eingesetzt werden, können chirale Verunreinigungen auftreten. Diese können Rückstände aus der Synthese sein oder auch durch eine geringe Stabilität der Konfiguration verursacht werden. Folglich ist es bei Wirkstoffen, die aus nur einem Isomer bestehen, wichtig, die Enantiomerenreinheit bzw. den Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess, *ee*) zu bestimmen. Hiermit wird überprüft, ob der Gehalt an enantiomerer Verunreinigungen überschritten wird [56, 57, 58]. Der prozentuale Enantiomerenüberschuss lässt sich mit folgender Gleichung berechnen [56]:

**Formel 11:** 
$$ee(\%) = \frac{(R - S)}{(R + S)} \times 100$$

R: Konzentration oder prozentuale Peakfläche von Enantiomer 1  
S: Konzentration oder prozentuale Peakfläche von Enantiomer 2

Ergibt sich aus der Berechnung ein Wert von 100%, liegt die untersuchte Substanz enantiomerenrein vor, wohingegen ein Ergebnis von 0% auf ein Racemat schließen lässt. Möchte man den Gehalt einer enantiomeren Verunreinigung (enantiomeric impurity, *ei*) bestimmen, also den prozentualen Anteil von Enantiomer 2 in Enantiomer 1, kann Formel 12 herangezogen werden [56].

**Formel 12:** 
$$ei(\%) = \frac{S}{(R + S)} \times 100$$

Neben HPLC-Methoden und NMR-Spektroskopie kann zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses auch CE-Analytik herangezogen werden. Auf die Grundlagen der chiralen Trennung mittels kapillarelektrophoretischer Techniken wird im nachfolgenden Kapitel 1.3.3 näher eingegangen.

### ***1.3.3 Chirale Trennungen in der Kapillarelektrophorese***

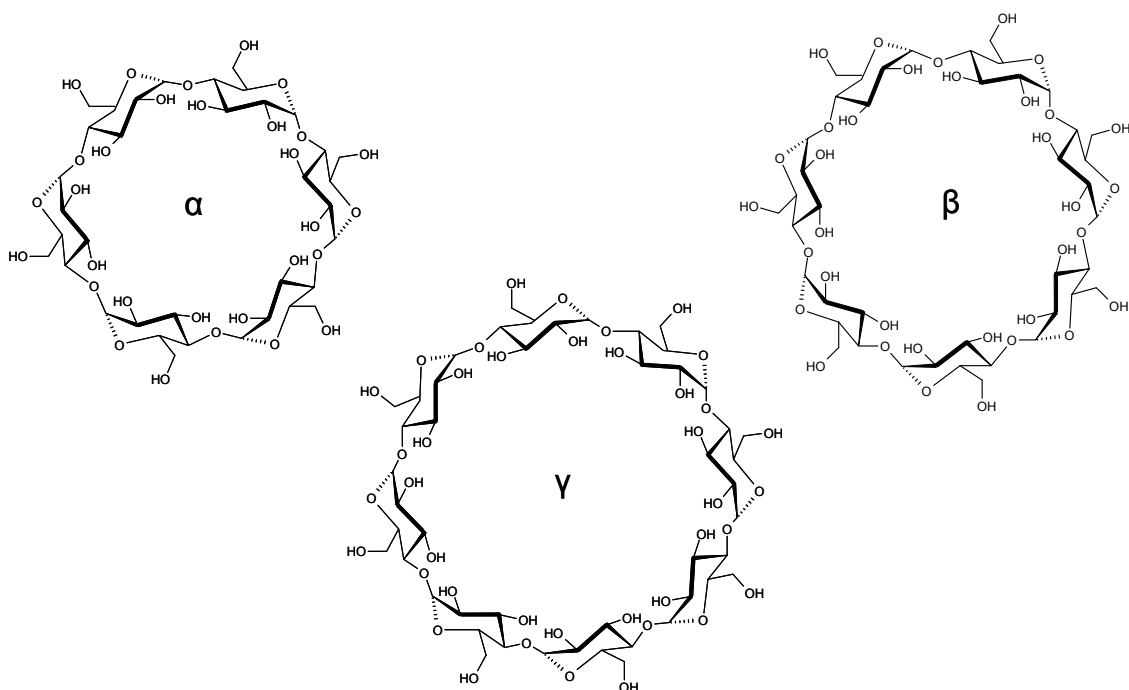
Die Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Enantiomerentrennung ist oft wichtig, um die Sicherheit von chiralen Arzneistoffen garantieren zu können. Da sich die Enantiomere in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften nicht unterscheiden, muss ein chirales Umfeld geschaffen werden, um eine Trennung bewirken zu können. In der CE wird das erreicht, indem der Elektrolytlösung eine optisch aktive Substanz zugesetzt wird, ein sogenannter chiraler Selektor. Eine weitere Möglichkeit eine chirale Umgebung zu bilden, besteht darin, den chiralen Selektor an die Kapillarwand zu binden, und damit eine chirale Beschichtung der Kapillare aufzubauen. Die Enantiomere können nun mit dem chiralen Selektor temporäre Diastereomeren-Komplexe bilden. Wenn nur eines der Enantiomere bevorzugt mit der chiralen Umgebung in Wechselwirkung tritt, kommt es zur Auftrennung der beiden Analyten im elektrischen Feld. Dies erfolgt entweder aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten der Diastereomerenkomplexe oder durch eine unterschiedliche Komplexstabilität, d. h. die unterschiedliche Verweilzeit des Enantiomers im Cyclodextrin [9, 28, 59, 60, 61].

Im Folgenden werden verschiedene Stoffe näher erläutert, mit deren Hilfe man eine chirale Umgebung schaffen kann, indem man sie der Elektrolytlösung zusetzt oder auch an der Kapillarwand immobilisiert.



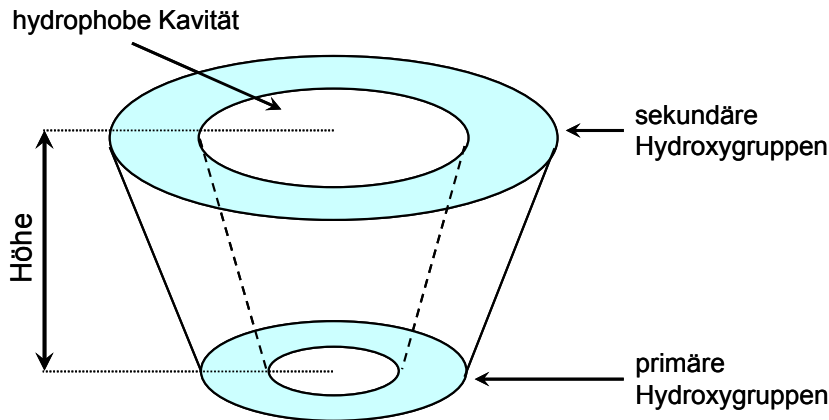
### 1.3.3.1 Cyclodextrine als chirale Selektoren

Bei Cyclodextrinen (CDs) handelt es sich um cyclische Oligosaccharide, die aus D-Glucosemonomeren bestehen und die  $\alpha$ -1,4-glykosidisch miteinander verbunden sind. Die Darstellung der CDs erfolgt durch enzymatischen Abbau von Stärke durch Cyclodextringlykosyltransferasen aus Bakterien wie *Bacillus macerans* [62], *Bacillus megaterium* [63] oder *Bacillus cereus* [64]. Das Grundgerüst der CDs unterscheidet sich in der Anzahl der D-Glucose-Monomere. Je nachdem, ob 6, 7 oder 8 Einheiten verbunden sind, spricht man von  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -CD (s. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Struktur der nativen Cyclodextrine  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$**

Die dreidimensionale Struktur, die entsteht, wenn sich Glucose-Einheiten im energetisch günstigsten Zustand anordnen, bildet einen Hohlraum, der an die Form eines Kegelstumpfes erinnert. Die Hydroxylgruppen sind nach außen gerichtet, was dem Molekül seine Polarität verleiht. Dagegen wird der Hohlraum durch das Kohlenstoffgrundgerüst und die glykosidischen Sauerstoffatome gebildet, was das Innere lipophil macht (s. Abbildung 6).



**Abbildung 6: Dreidimensionale, kegelförmige Darstellung eines CD.**

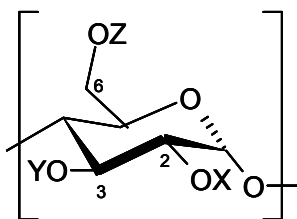
Die verschiedenen nativen CDs unterscheiden sich in vielen Eigenschaften, von denen die Parameter, die die Größe und die Löslichkeit betreffen, in Tabelle 1 dargestellt sind [65].

**Tabelle 1: Wichtige physikalische und chemische Daten von nativen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CDs.**

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Anzahl der Glucoseeinheiten	6	7	8
durchschnittl. Außendurchmesser [nm]	1,37	1,53	1,69
durchschnittl. Innendurchmesser [nm]	0,57	0,78	0,95
Höhe [nm]	0,78	0,78	0,78
Wasserlöslichkeit [mg/ml]	145	18,5	232

Wenn die räumlichen Anordnungen passend sind, können sich fremde Moleküle in das Innere der CDs einlagern. Diesen Sachverhalt machen sich schon seit vielen Jahren sowohl die Nahrungsmittel- als auch die Kosmetikindustrie zu Nutze. CDs können hier als Stabilisatoren von verschiedenen Inhaltsstoffen dienen, z. B. von Aromastoffen oder Anti-Aging-Produkten. Außerdem können die CDs Geruchspartikel in ihrem Hohlraum einschließen und somit neutralisieren. Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie auch in pharmazeutischen Gebieten als Hilfsstoffe eingesetzt. Durch Einsatz von CDs können Reizungen an physiologischen Barrieren, wie an der gastrointestinalen Mucosa oder der Netzhaut, vermindert, die Löslichkeit von Arzneimitteln (besonders von Parenteralia) verbessert oder schlechter Geruch und Geschmack maskiert werden [66, 67].

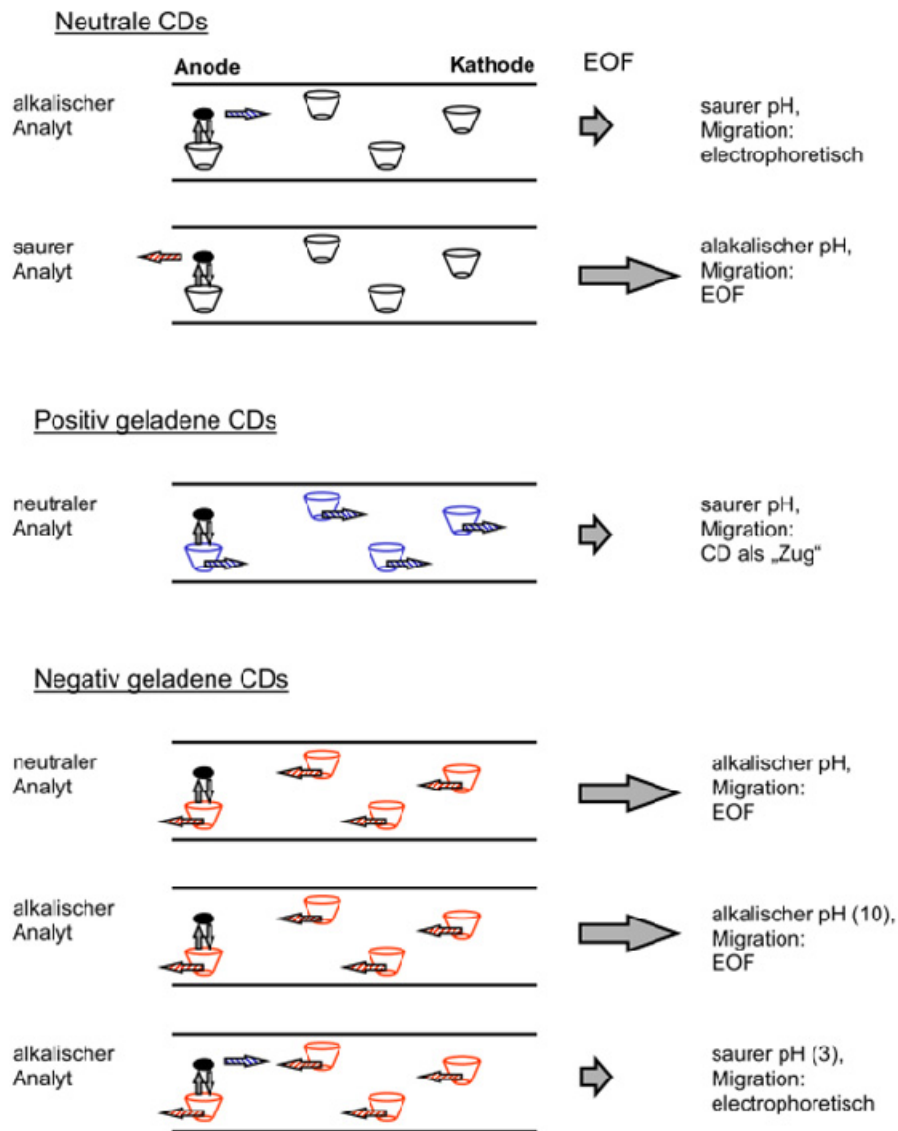
Aber auch in der Reinheitsanalytik sind CDs wichtige Hilfsstoffe. Unter der großen Auswahl an chiralen Selektoren finden CDs den häufigsten Einsatz. Abhängig von ihrer sterischen Ausrichtung können sie Arzneistoffe unterschiedlich stark einschließen. In der CE bilden die CDs deshalb eine pseudostationäre Phase, in die sich die Analyten einlagern können, wobei eine labile Einschlussverbindung entsteht. Der lipophile Teil des Gastmoleküls lagert sich im Inneren des CDs an, während der polare oder geladene Molekülteil aus dem Konus herausragt. Bei der Einlagerung spielen Kräfte, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, ionische Wechselwirkungen und sterische Effekte eine wichtige Rolle. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen ist nun nicht mehr allein von der elektrophoretischen Mobilität abhängig, sondern zusätzlich vom Inklusionsverhalten in die hydrophobe Kavität des CDs. Um eine Trennung zweier Substanzen mittels CDs zu erzielen, müssen sich entweder die Komplexbildungskonstanten der Stoffe, oder aber die Mobilitäten der Komplexe unterscheiden. Um die Selektivität der CDs bei (z. B. chiralen) Trennungen zu erhöhen, ist es möglich, die Hydroxylgruppen in Position 2, 3 und 6 der



einzelnen Glucoseeinheiten z. B. mit Sulfat-, Methyl- oder Acetyl-Resten zu derivatisieren (s. auch Kapitel 1.3.3.2). Dadurch kann die Höhe des Kegels verlängert, die Löslichkeit des CDs im entsprechenden Lösungsmittel erhöht und die Fähigkeit zur Komplexbildung mit

verschiedenen Arzneistoffen verbessert werden. Je nach Derivatisierungssubstituent liegt das CD ungeladen bzw. positiv oder negativ geladen vor [28, 65].

Neutrale CDs besitzen selbst keine elektrophoretische Mobilität und wandern mit dem EOF. Daher können mit neutralen CDs nur Substanzen getrennt werden, die selbst geladen sind und damit eine eigene Mobilität aufweisen, wodurch die Substanzen schneller oder langsamer als der EOF wandern.



**Abbildung 7: Migrationsverhalten in Abhängigkeit von Ladung der verwendeten CDs und der Basizität des Analyten.**

Positiv geladene CDs dagegen besitzen eine elektrophoretische Mobilität und migrieren in Richtung Kathode. Sie werden meistens zusammen mit einer Elektrolytlösung eingesetzt, die einen sauren pH-Wert hat. Der EOF ist hier stark unterdrückt, so dass die Migration hauptsächlich durch die eigene Mobilität zustande kommt. Im Falle eines basischen Trennpuffers würden sich der EOF und die elektrophoretische Mobilität des CDs gegenseitig verstärken, womit die Migration sehr beschleunigt wäre. Die Zeit für Wechselwirkungen zwischen Analyt und CD ist damit verringert, was eine Trennung erschwert. Positiv geladene CDs werden, im Gegensatz zu den vorher besprochenen

ungeladenen CDs, meist bei neutralen Analyten eingesetzt, da sie durch die Komplexbildung mit dem chiralen Selektor zur Kathode transportiert werden. Dagegen migrieren negativ geladene CDs durch ihre elektrophoretische Mobilität in Richtung Anode. Ist der EOF bei basischem pH-Wert des Trennpuffers sehr stark, werden diese CDs zur Kathode transportiert. Bei saurem pH-Wert und unterdrücktem EOF erreichen sie den Detektor jedoch nicht, sondern wandern zurück in das Puffergefäß auf der Einlassseite. Neutrale Substanzen können daher nur mit negativ geladenen CDs getrennt werden, wenn der pH-Wert so alkalisch ist, dass die Analyten mit dem EOF zum Detektor wandern können. Ist die zu untersuchende Substanz bei hohen pH-Werten der Elektrolytlösung selbst positiv geladen, wandert sie, trotz der zur Anode gerichteten CDs, schnell zum Detektor, da auch der EOF stark ausgeprägt ist. Dagegen führt eine positive Ladung des Analyten bei niedrigen pH-Werten des Trennpuffers dazu, dass die Migration langsam stattfindet. Dadurch steigt die Zeit für Wechselwirkungen zwischen Substanz und chiralem Selektor und die Trennbedingungen werden verbessert. Wenn die Mobilität der temporären Diastereomeren-Komplexe auch die Analyten in Richtung der Anode wandern lässt, ist eine Spannungsumkehr nötig, um die Substanzen bestimmen zu können, da durch die negative Spannung an der anodischen Seite der Kapillare detektiert wird.

Obwohl die hier beschriebenen Wechselwirkungen der CDs bekannt sind, ist es bei der Entwicklung einer chiralen Trennmethode dennoch selten möglich, den besten chiralen Selektor vorherzusagen. Jedoch wurde von Williams und Vigh [68] ein quantitativer Ansatz zur Beschreibung der Trennleistung von Enantiomeren unter Verwendung geladener CDs entwickelt.

Im sogenannten CHARM-Modell (charged resolving agent migration) wird gezeigt, dass bei ähnlichen enantioselektiven Wechselwirkung geladene CDs eine größere und schnellere Auflösung erzielen als ungeladene CDs. Die Trennung von starken Elektrolyten mit mehrfach geladenen CDs führt in Abwesenheit eines EOF (z. B. durch den Einsatz neutral beschichteter Kapillaren) unabhängig vom pH-Wert zu ähnlichen Auflösungen. Dagegen zeigt sich für schwache Elektrolyte eine hohe Auflösung bei einem niedrigen pH-Wert für die

nicht ionenselektive Trennung von schwachen Säuren und die ionenselektive Trennung von schwachen Basen. Bei hohen pH-Werten findet man eine gute Trennung für die ionenselektive Trennung von schwachen Säuren und die nicht ionenselektive Trennung von schwachen Basen. Demnach ist es für eine effiziente Methodenentwicklung (einschließlich der Suche nach dem geeigneten geladenen CD) sinnvoll, lediglich zwei Trennpuffer zu untersuchen, einen mit saurem (z. B. 2.2), den anderen mit basischen pH-Wert (9.5 oder höher) [68].

### 1.3.3.2 Übersicht über die eingesetzten Cyclodextrine

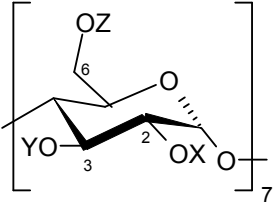
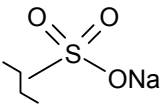
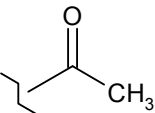
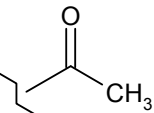
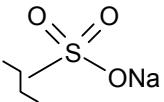
Im Nachfolgenden sind alle Cyclodextrine, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, aufgeführt und nach Substituentenmuster geordnet.

#### Native Cyclodextrine

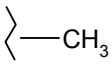
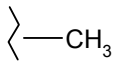
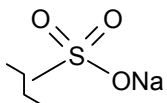
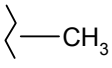
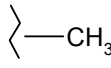
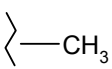
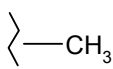
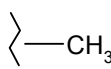
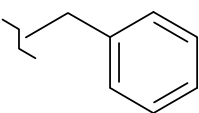
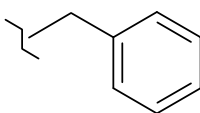
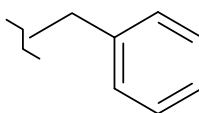
Als native CDs wurden die üblich verwendeten Verbindungen eingesetzt, d. h.  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD. Die entsprechenden Strukturen sind in Kapitel 1.3.3.1 dargestellt.

#### Derivatisierte Cyclodextrine mit regioselektiven Substituenten

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Cyclodextrine I**

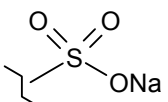
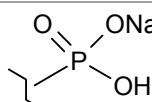
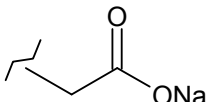
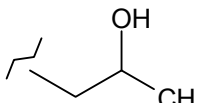
				
	X	Y	Z	Ladung
<i>Heptakis(6-sulfato)-<math>\beta</math>-CD, Natriumsalz</i>	H	H		neg.
<i>Heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)-<math>\beta</math>-CD, Natriumsalz</i>				neg.

Fortsetzung Tabelle 2

<i>Heptakis</i> (2,3-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD, Natriumsalz				neg.
<i>Heptakis</i> (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD		H		neutral
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -CD				neutral
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri-O-benzoyl)- $\beta$ -CD				neutral

### Derivatisierte Cyclodextrine mit unterschiedlichem Derivatisierungsgrad

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Cyclodextrine II

	X, Y oder Z	Derivatisierungsgrad	Ladung
sulf. $\beta$ -CD, Natriumsalz		7 – 11 Mol pro 1 Mol CD	neg.
phosphat. $\beta$ -CD, Natriumsalz		7 – 11 Mol pro 1 Mol CD	neg.
Carboxymethyl- $\beta$ -CD, Natriumsalz		7 – 11 Mol pro 1 Mol CD	neg.
2-Hydroxypropyl- $\beta$ -CD		0.7 mol pro 1 Mol Glucose	neutral





- Aminoglykoside, wie z. B. Kanamycin [74] und
- Heparine [75].

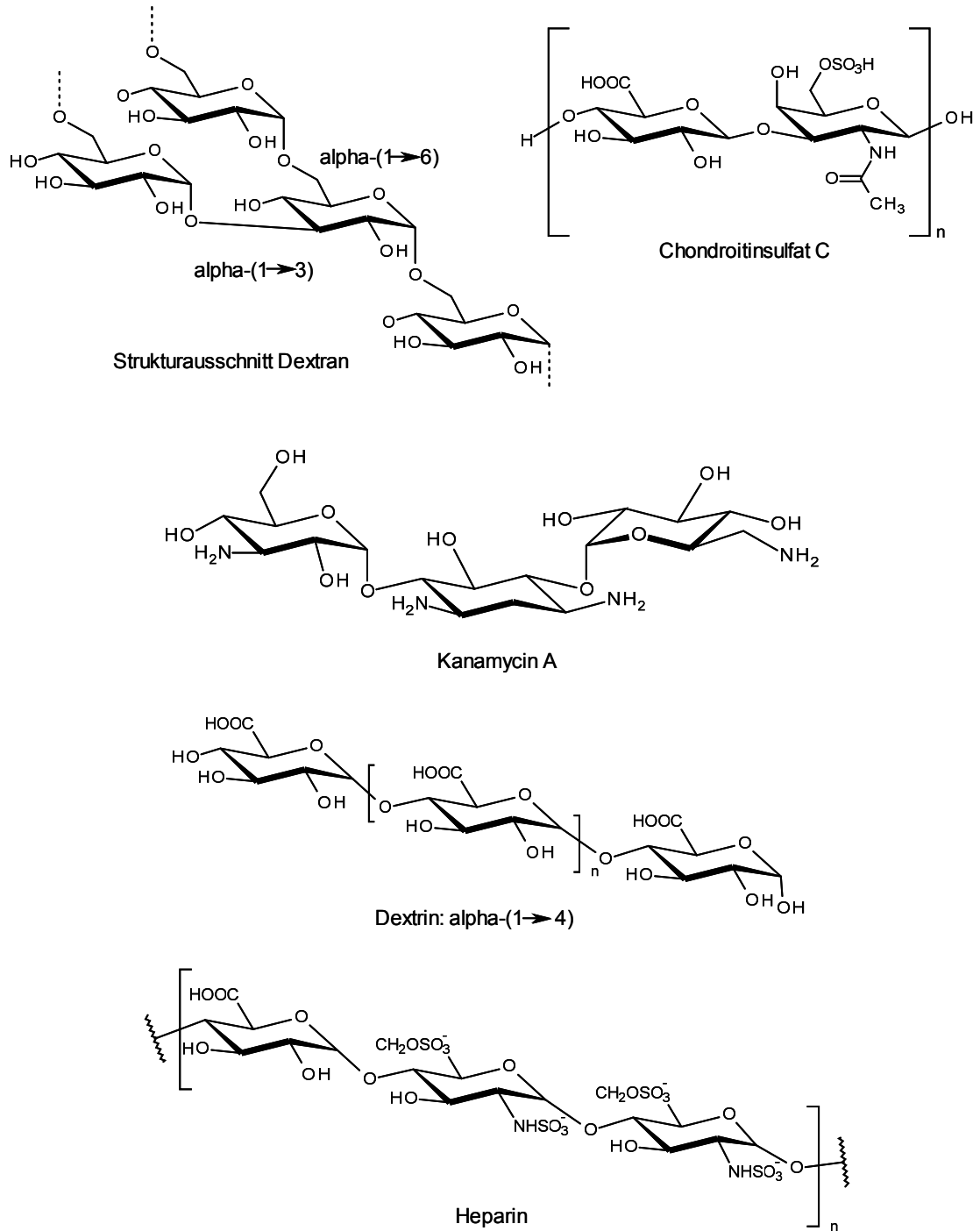
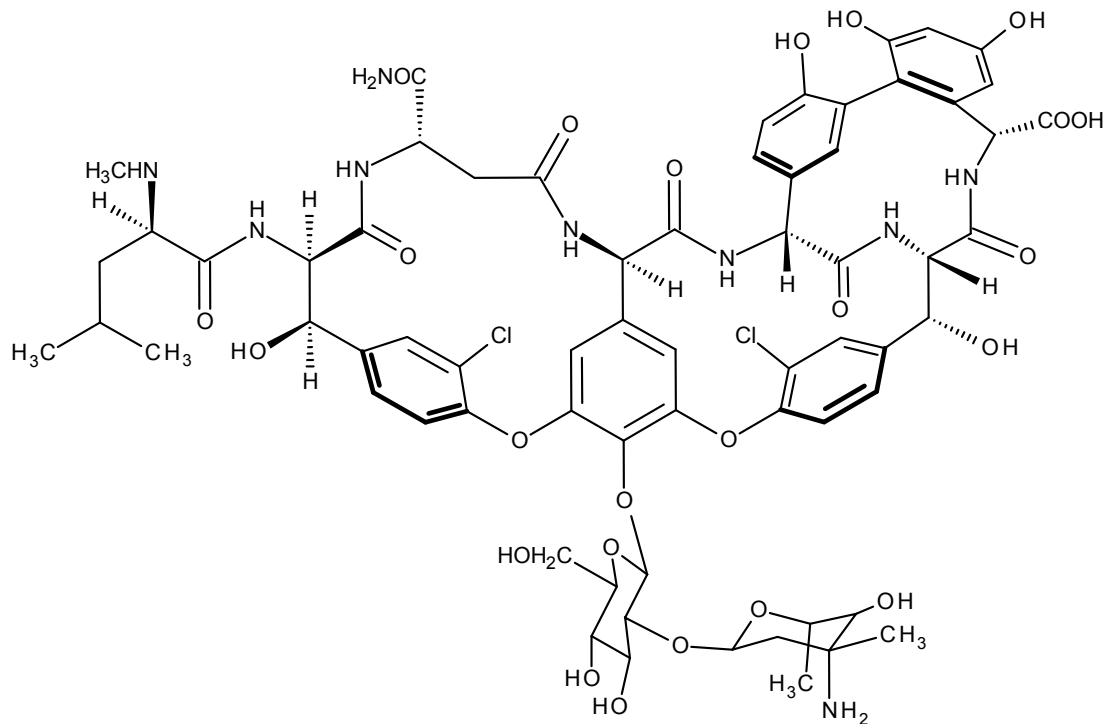


Abbildung 9: Strukturbeispiele für die linearen Oligo- und Polysaccharide.

Der Mechanismus der Enantiomerentrennung ist auch bei den linearen Oligo- und Polysacchariden sehr vielfältig. Er reicht von Wasserstoffbrückenbindungen über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräften bis hin zu ionischen Wechselwirkungen, soweit ionische Gruppen vorhanden sind. Deshalb ermöglichen die verschiedenen Saccharide einen Einsatz als chiralen Selektor bei verschiedenartigen chiralen Substanzen [28, 70].

### Makrozyklische Antibiotika

Unter makrozyklischen Antibiotika versteht man Moleküle mit einem mittleren Molekulargewicht von 700 – 2000 Dalton, wie z. B. Vancomycin (s. Abbildung 10) und Rifamycin. Neben der antibakteriellen Wirkung konnte die Bindung dieser Antibiotika an Carboxylgruppen von Aminosäuren beobachtet werden, was den Versuch initiiert hat, sie als chirale Selektoren einzusetzen. Dank der Verschiedenheit der funktionellen Gruppen bieten Antibiotika eine Vielzahl an Interaktions-Möglichkeiten, die oft hohe chirale Trennleistungen zur Folge haben. Die Größe des Moleküls und die sterische Ausrichtung der funktionellen Gruppen bestimmen dabei die enantioselektiven Eigenschaften der verschiedenen makrozyklischen Antibiotika. Der Trennmechanismus beruht hauptsächlich auf elektrostatischen Wechselwirkungen. Daneben wirken auch Dipol-Dipol-Kräfte, verursacht durch elektronegative Atome, und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, die durch aromatische Substituenten ausgelöst werden. Durch eine kegel- oder schalenförmige Anordnung der Substituenten, die in Abbildung 10 am Beispiel von Vancomycin angedeutet wird, kann es aber auch bei den Antibiotika zu Einschlussverbindungen kommen [28, 69, 70, 76].



Vancomycin

**Abbildung 10: Strukturbeispiel für makrozyklische Antibiotika: Vancomycin.**

### Proteine

Proteine, wie bovine und humane Serumalbumine, sind natürliche Polymere, die aus optisch aktiven Aminosäuren zusammengesetzt sind. Aufgrund ihres Wechselwirkungsmusters zählen sie zu den affinitätsbasierten chiralen Selektoren. Im Gegensatz zu den meisten anderen chiralen Selektoren ist ihre sterische Struktur und damit die stereoselektive Wechselwirkung stark abhängig vom pH-Wert und der Zusammensetzung des Hintergrundelektrolyten. Eine Veränderung des Trennpuffers kann demnach sowohl den Analyten als auch das Protein in seiner Struktur beeinflussen. Dieser Sachverhalt kann die Entwicklung einer chiralen Trennmethode erschweren [28, 69].

### Chirale Mizell- und Mikroemulsionsbildner

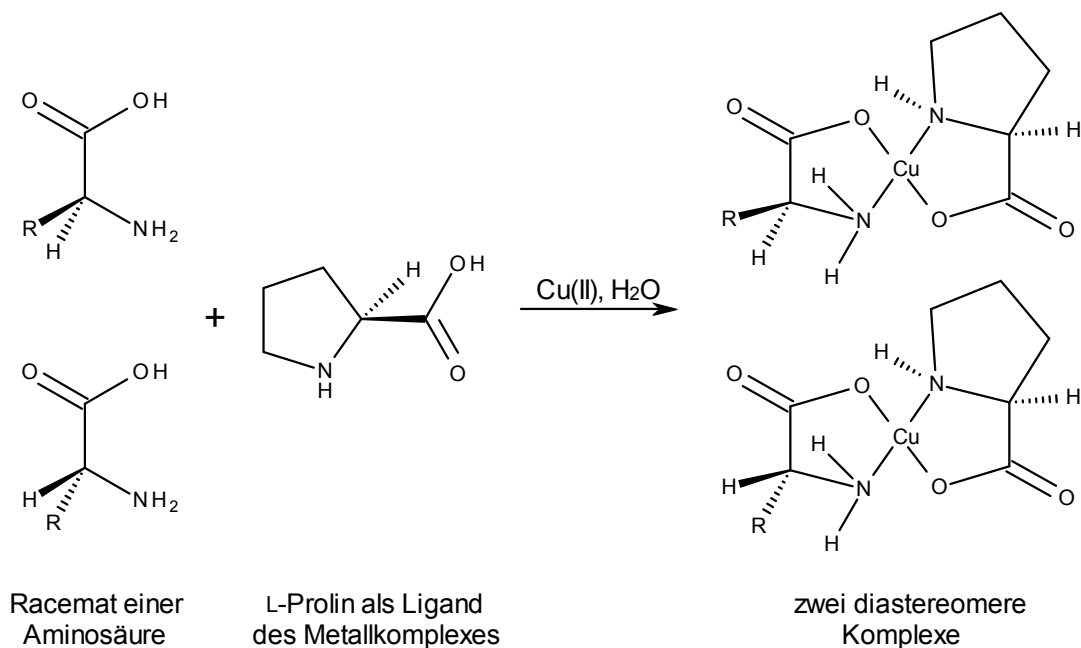
Neben dem Zusatz der oben genannten chiralen Selektoren können nahezu alle Komponenten einer ME verwendet werden, um eine chirale Umgebung zu schaffen. Die Arbeitsgruppe um Aiken setzte das chirale Öl (2*R*,3*R*)-Di-*n*-butyltartrat ein, um die Enantiomere (1*R*,2*S*)- und (1*S*,2*R*)-Ephedrin

voneinander zu trennen [77]. Außerdem fand das chirale Öl (S)-(+)-2-Octanol [78, 79, 80], das chirale Tensid Dodecoxycarbonylvalin [81, 82, 83] oder das chirale Co-Tensid (S)-2-Hexanol [82, 84] vermehrt Einsatz.

### Metallkomplexe

Abschließend sollen in der Reihe der chiralen Selektoren noch die Metallkomplexe genannt werden, deren Trennprinzip auf *Ligandenaustausch* beruht.

Ein Metallion besitzt die Eigenschaft als Elektronenpaar-Akzeptor zu fungieren. Wenn ein Molekül ein oder mehrere Elektronenpaare frei zur Verfügung hat, kann es als Ligand dienen, womit es zu einer Bindung mit dem Metallion kommen kann. Aus einem zweiwertigen Metallion (z. B. Kupfer, Zink, Nickel oder Cadmium) als Zentralkation und aus mindestens zwei chiralen bifunktionellen Liganden (meistens L-Aminosäuren) kann sich so ein Chelatkomplex bilden, der dem HGE einer CE-Methode als Trennmedium zugegeben wird. Hier kann es zum Ligandenaustausch kommen, indem der chirale Analyt einen Liganden ersetzt, so dass sich ein gemischter, ternärer Komplex aus Analyt, Metallion und Ligand bildet (s. Abbildung 11).



**Abbildung 11: Beispiel des Wirkmechanismus eines Metallkomplexes aus L-Prolin und Cu(II)-Ionen zur chiralen Trennung einer Aminosäure [85].**

Im Fall einer Racemattrennung bilden sich nun zwei unterschiedliche, ternäre Komplexe, die zueinander diastereomer sind. Beide Komplexe besitzen mindestens zwei chirale Zentren, von denen aber eines gleichgerichtet ist. Zu einer Enantiomertrennung kommt es, wenn sich die Stabilitätskonstanten der beiden diastereomeren Komplexe unterscheiden, so dass unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten der Analyten in der Kapillare resultieren [28, 70, 86].

### 1.3.4 Chirale Trennungen im Europäischen Arzneibuch

Die Vielzahl der enantiomerenreinen Wirkstoffe im Ph. Eur. 7 erfordert die Überprüfung der Substanzen auf chirale Verunreinigungen. Jede Monographie eines Arzneistoffes gibt die genaue Vorgehensweise für die Reinheitsanalytik vor. Zu großen Teilen wird der Test auf Enantiomerenreinheit mittels Polarimetrie durchgeführt, wobei die spezifische Drehung der Substanz bestimmt wird (s. Kapitel 1.3.2). Als Beispiele können hier die Monographien von Acetylcystein, Ascorbinsäure, Digitoxin, Naproxen und Simvastatin aufgeführt werden.

Weiterhin werden aber auch chromatographische und kapillarelektrophoretische (CE) Methoden verwendet, um die Reinheit einer chiralen Substanz zu überprüfen. Als chromatographische Verfahren werden hier die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), die Gaschromatographie (GC) und die Dünnschichtchromatographie (DC) herangezogen. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht der chiralen Arzneistoffe des Ph. Eur. 7, deren chirale Reinheit mit einer anderen Methode als der spezifischen Drehung getestet wird.

**Tabelle 4: Übersicht chiraler Arzneistoffe und deren chiraler Trennmethode.**

<b>Methode</b>	<b>Arzneistoff</b>	<b>chiraler Selektor</b>
CE	Galantaminhydrobromid	$\alpha$ -CD im HGE
CE	Ropivacainhydrochlorid, Monohydrat	DM- $\beta$ -CD im HGE
DC	Fluordopa (für Injektionszwecke)	chirale DC-Platte ( $\text{Cu}^{2+}$ , (+)-/(-)-Hydroxyprolin
GC	Korianderöl	chirale Säule (BC)
GC	Kümmelöl	chirale Säule (BC)

Fortsetzung Tabelle 4

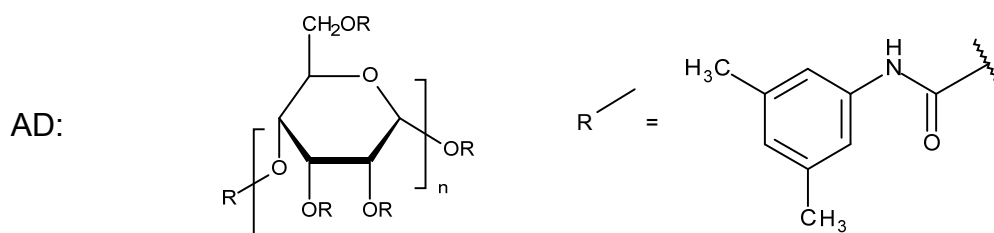
Methoden	Arzneistoff	chiraler Selektor
GC	Lavendelöl	chirale Säule (BC*)
GC	Neroliöl/Bitterorangenblütenöl	chirale Säule (BC*)
HPLC	Benazeprilhydrochlorid	chirale Säule (AGP*)
HPLC	Dexachlorpheniraminmaleat	chirale Säule (Amyl.*)
HPLC	Esketaminhydrochlorid	chirale Säule (AGP*)
HPLC	Esomeprazolmagnesium, Trihydrat	chirale Säule (AGP*)
HPLC	Lamivudin	chirale Säule (BC*)
HPLC	Levodopa	Cu(II)-Acetat + <i>N,N</i> -Dimethyl-L-Phenylalanin
HPLC	Levodropropizin	chirale Säule (OD*)
HPLC	Methotrexat	chirale Säule (BA*)
HPLC	Methyldopa	Cu(II)-Acetat + <i>N,N</i> -Dimethyl-L-Phenylalanin
HPLC	Naproxen	chirale Säule ( $\pi^*$ )
HPLC	Naproxen, Natriumsalz	chirale Säule ( $\pi^*$ )
HPLC	Oxaliplatin	chirale Säule (OC*)
HPLC	Paroxetinhydrochlorid, wasserfrei	chirale Säule (AGP*)
HPLC	Paroxetinhydrochlorid, Hemihydrat	chirale Säule (AGP*)
HPLC	Pramipexoldihydrochlorid, Monohydrat	chirale Säule (OD*)
HPLC	Repaglinid	chirale Säule (AGP*)
HPLC	Selegilinhydrochlorid	chirale Säule (OD*)
HPLC	Sertralinhydrochlorid	chirale Säule (AD*)
HPLC	Tamsulosinhydrochlorid	chirale Säule (AD*)
HPLC	Timololmaleat	chirale Säule (AD*)
HPLC	Valsartan	chirale Säule (OD*)

\* Abkürzungsverzeichnis für  $\pi$ , AD, AGP, Amyl., BA, BC, OC und OD s. S. 37.

Am häufigsten werden für chirale Trennungen HPLC-Methoden herangezogen, an deren stationäre Phase ein chiraler Selektor kovalent gebunden ist, so dass man von einer „chiralen Säule“ sprechen kann. Die einsetzbaren Selektoren mit

ihren entsprechenden Abkürzungen sind nachfolgend entweder namentlich oder strukturell aufgelistet.

$\pi$ : Kieselgel, an dessen Partikel 1-(3,5-Dinitrobenzamid)-1,2,3,4-tetrahydrophenantren kovalent gebunden ist. Es zeigt sowohl ( $\pi$ )-Akzeptor als auch ( $\pi$ )-Donor-Eigenschaften.

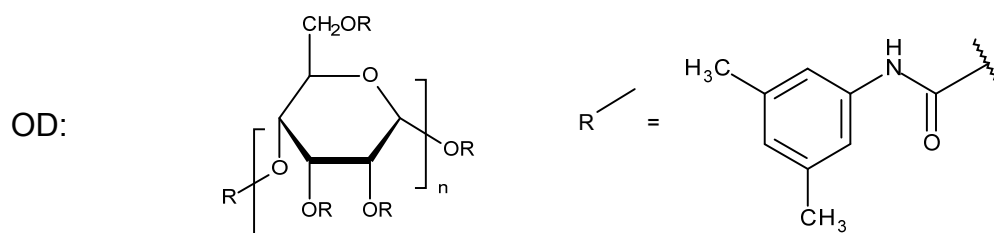
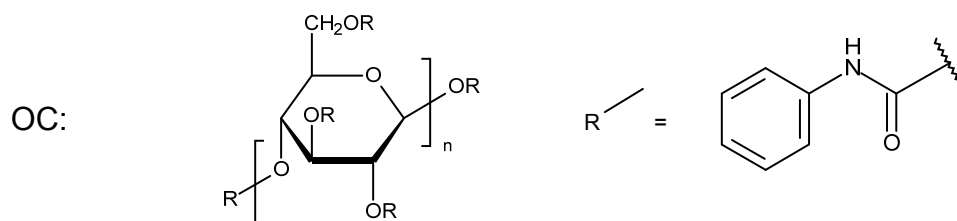


AGP:  $\alpha$ 1-Glycoprotein

Amyl.: Amylose-Derivat

BA: bovines Albumin

BC:  $\beta$ -CD



Bei der HPLC-Methode für Levodopa und Methyldopa allerdings wird anstatt mit einer chiralen Beschichtung der Säule mit Kupferacetat und *N,N*-Dimethyl-L-Phenylalanin gearbeitet, das dem Fließmittel zugesetzt wird. Als chiraler Selektor dient hier der Metallkomplex, an dem die chirale Trennung mittels Ligandenaustausch stattfinden kann.

Weiterhin sind GC-Methoden beschrieben, die ausschließlich für die Untersuchung von Ölen herangezogen werden. In diesen Methoden wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es sich nicht um Enantiomertrennungen handelt, sondern um die Abtrennung chiraler, verwandter Substanzen allgemein. Hierbei wird die GC-Säule für die Untersuchung jedes Öles mit  $\beta$ -CD als chiraler Selektor beschichtet.

Einzig für Fluordopa (für Injektionszwecke) wird die chirale Trennung mittels DC auf einer Kieselgel-Platte durchgeführt. Ein Metallkomplex aus Kupfer(II)-Ionen und (+)- oder (-)-Hydroxyprolin wird an die DC-Platte gebunden. Ähnlich wie bei der Reinheitsprüfung von Levo- und Methyldopa findet die chirale Trennung mittels Ligandenaustausch statt.

Schließlich wird für zwei Substanzen, Galanthaminhydrobromid und Ropivacainhydrochlorid, die CE zur Enantiomertrennung genutzt. Ganz klassisch werden hierbei der Elektrolytlösung entweder das native  $\alpha$ -CD oder das derivatisierte Dimethyl- $\beta$ -CD zugesetzt, die Einschlussverbindungen mit den Analyten eingehen können. Über unterschiedliche Stabilitätskonstanten oder durch unterschiedliche elektrophoretische Mobilitäten der Diastereomerenkomplexe können die einzelnen Enantiomere aufgetrennt werden.

## **1.4 Validierung**

### **1.4.1 Allgemeine Grundlagen**

Unter Validierung versteht man den Prozess, der durchgeführt wird, um sicher zu stellen, dass eine analytische Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist. Von verschiedenen Organisationen, wie z. B. der "United States Food and Drug Administration" (FDA) und der "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC), wurden Richtlinien für eine Validierung konzipiert, um die Qualitätssicherung zu gewährleisten [87, 88]. Im Rahmen der "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use" (ICH) haben sich die Europäische Union, Japan und die USA auf gemeinsame Richtlinien geeinigt [89]. Im November 2005 wurden zwei separate ICH-Richtlinien, Q2A und Q2B,



zu einer Richtlinie Q2(R1) zusammengefasst. Darin sind die für die Validierung notwendigen Parameter, die Besonderheiten, die im Zusammenhang mit einer Zulassung zu berücksichtigen sind und die für die Validierung analytischer Methoden erforderlichen experimentellen Daten sowie deren statistische Interpretation beschrieben [90]. Diese Richtlinie wurde von der "Pharmacopoeial Discussion Group" (PDG) angenommen. Damit gilt sie für das europäische, japanische und amerikanische Arzneibuch als Grundlage für die Validierung von Methoden. Zusätzlich wurden vom "European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare" (EDQM) im "Technical Guide for the Elaboration of Monographs" verschiedene Vorgaben und spezielle Anleitungen zusammengefasst, die im Ph. Eur. als Richtlinie gelten [91]. Darin sind die Validierungs-Parameter Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich, Richtigkeit, Präzision, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Robustheit und Systemeignung beschrieben.

Nach welchen Parametern eine Methode validiert werden soll, hängt von dem Ziel ab, das die Methode erreichen möchte (qualitative oder quantitative Bestimmung der Hauptkomponente oder von Verunreinigungen). Hierzu gibt die ICH-Richtlinie eine detaillierte Übersicht (s. Tabelle 5).

**Tabelle 5: Validierungsanforderungen nach ICH-Richtlinie Q2(R1) [90].**

Validierungselement	Art der analytischen Methode			
	Identität	Prüfung auf Verunreinigungen		Gehalt
	qualitativ	quantitativ	Grenzwert	quantitativ
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision				
→ Wiederholbarkeit	-	+	-	+
→ Vergleichbarkeit	-	+	-	+
Selektivität	+	+	+	+
Nachweisgrenze	-	-	+	-
Bestimmungsgrenze	-	+	-	-
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

Der Parameter „Robustheit“ wird zwar in der Übersicht nicht erwähnt, wird aber nach ICH-Richtlinie bei allen Prüfverfahren empfohlen.

### **1.4.2 Selektivität**

Unter Selektivität versteht man die Fähigkeit einer Methode, verschiedene Komponenten, deren Anwesenheit zu erwarten ist, nebeneinander zu bestimmen und eindeutig identifizieren zu können, ohne dass sie sich gegenseitig stören. Nach dem „Technical Guide“ kann eine mangelhafte oder fehlende Selektivität der Methode für die untersuchte Substanz durch eine alternative analytische Methode ersetzt werden. Ist z. B. eine Gehaltsbestimmung des Ph. Eur. für den entsprechenden Wirkstoff nicht selektiv, kann der Gehalt dennoch auf die vorgeschlagene Weise ermittelt werden. Dem wird vorausgesetzt, dass die vorgeschriebenen Reinheitsprüfungen durchgeführt wurden und damit sichergestellt ist, dass die zu erwartenden Verunreinigungen maximal in den Höchstmengen auftreten.

Die Selektivität ist eines der wichtigsten Beurteilungskriterien für Reinheitsanalysen, da es die Voraussetzung für weitere Auswertungsparameter ist. Zur Überprüfung der Identität der auftretenden Peaks werden Referenzsubstanzen herangezogen. Außerdem kann die Auflösung zwischen zwei Peaks oder die Anzahl der theoretischen Böden ausgewertet werden [89, 90, 91].

### **1.4.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze**

Die Nachweisgrenze (limit of detection, *LOD*) beschreibt die kleinste Konzentration der untersuchten Substanz, die mit der entsprechenden Methode detektiert werden kann. Die Bestimmungsgrenze (limit of quantification, *LOQ*) dagegen gibt die geringste Analytkonzentration wieder, die mit der untersuchten Methode quantifiziert werden kann. Nach der ICH-Richtlinie Q2(R1) wird für die Limitierung einer Verunreinigung die Nachweisgrenze, für die quantitative Bestimmung der Verunreinigung die Bestimmungsgrenze verwendet.

Sowohl die Nachweis- als auch die Bestimmungsgrenze können mit unterschiedlichen Methoden ermittelt werden. Die Grenzen können visuell festgelegt oder aus dem Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) ermittelt werden. Aber auch die Berechnung aus der Standardabweichung des Blindwertes oder der Kalibriergerade sind möglich. Bei der Auswertung des Signals des Analyten und dem Rauschen der Basislinie wird für die Nachweisgrenze ein Verhältnis von 3:1, für die Bestimmungsgrenze ein Verhältnis von 10:1 empfohlen [89, 90, 91].

#### **1.4.4 Linearität**

Die Linearität einer Methode beschreibt die Fähigkeit, innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind. Hierzu sollen mindestens fünf Analytkonzentrationen untersucht werden, die über den gesamten Arbeitsbereich annähernd gleichmäßig verteilt liegen. Zur Beurteilung des Analysensignals als Funktion der Konzentration wird für die statistische Auswertung die Berechnung der linearen Regression empfohlen. Es ergibt sich eine Gerade, die durch Ordinatenschnittpunkt und Steigung angegeben wird. Zusätzlich lässt sich der Korrelationskoeffizient (R) und das Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) ermitteln. Für einen linearen Zusammenhang bei der Prüfung auf Verunreinigungen sollte hier der Wert von  $R \geq 0,98$  bzw. von  $R^2 \geq 0,96$  nicht unterschritten werden [89, 90, 91].

#### **1.4.5 Arbeitsbereich**

Als Arbeitsbereich einer analytischen Methode wird das Intervall zwischen unterer und oberer Probenkonzentration bezeichnet, in dem Präzision, Linearität und Richtigkeit nachgewiesen sind. Er orientiert sich an der zu erwartenden Konzentration der Analysenlösung. Die Grenzen des Arbeitsbereiches werden durch die Anforderungen des jeweiligen Prüfverfahrens bestimmt. Die ICH-Richtlinie Q2(R1) fordert für verschiedene Anwendungen eine Mindestgröße des Arbeitsbereiches. So muss der Arbeitsbereich bei der Gehaltsbestimmung eines Wirkstoffes wenigstens 80 –

120%, bei der Untersuchung der Gleichförmigkeit des Gehaltes 70 – 130% der zu erwartenden Konzentration der Testlösung abdecken [89, 90, 91].

#### **1.4.6 Präzision**

Präzision beschreibt die Streuung der Ergebnisse bei wiederholter Messung derselben homogenen Probe. Ein rechnerisches Maß für die Präzision, in der auch zufällige Fehler erfasst werden, ist die Standardabweichung (SDV), die relative Standardabweichung (RSD) und der Vertrauensbereich. Man unterscheidet zwischen Wiederholpräzision und Vergleichbarkeit. Die Wiederholpräzision wird laborintern innerhalb eines kurzen Zeitraums, d. h. innerhalb einer Messreihe ermittelt. Die Messbedingungen werden konstant gehalten. Bei der Vergleichbarkeit dagegen werden z. B. die Messzeiträume, die Bearbeiter, die Analysengeräte und die verwendeten Reagentien (Chargen) variiert. Auch sie kann laborintern, aber auch innerhalb eines Ringversuchs überprüft werden [89, 90, 91].

In den Richtlinien der FDA ist zusätzlich die Unterscheidung zwischen System- und Methodenpräzision zu finden [92]. Bei der Systempräzision wird dieselbe Probe mehrmals vermessen, so dass Schwankungen, die das Analysengerät verursacht (wie z. B. Injektion, Detektion, Integration), erfasst werden. Dagegen wird bei der Bestimmung der Methodenpräzision eine Probe mehrmals hergestellt und vermessen. So wird zusätzlich zu den Parametern der Systempräzision auch der Einfluss der Probenherstellung (wie z. B. Wiegen, Verdünnen, Filtrieren) untersucht.

#### **1.4.7 Richtigkeit**

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Übereinstimmung zwischen dem gemessenen Wert und einem als wahr akzeptierten Wert oder einem als richtig anerkanntem Referenzwert. Wenn die Übereinstimmung nicht ausreichend groß ist, liegen vermutlich systematische Fehler vor. Zur Beurteilung der Richtigkeit einer Methode zur quantitativen Bestimmung kann

entweder das *Vergleichsverfahren* oder die *Wiederfindung* herangezogen werden.

Beim Vergleichsverfahren werden die Mittelwerte der zu untersuchenden Methode mit den Mittelwerten eines etablierten (validierten), unabhängigen Verfahrens verglichen. Die statistische Auswertung erfolgt mittels t-Test. Hierbei dürfen sich die Ergebnisse nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Für die Wiederfindung wird eine definierte Menge einer zertifizierten Referenzsubstanz zur Analysenprobe gegeben und der Gehalt bestimmt. Daraus kann die prozentuale Wiederfindung berechnet werden. Findet die Aufstockung der Probenkonzentration auf verschiedenen Konzentrations-ebenen statt, kann auch die Wiederfindungsfunktion als lineare Regression berechnet werden [89, 90, 91].

#### **1.4.8 Robustheit**

Unter Robustheit versteht man die Fähigkeit einer analytischen Methode, auch unter variierenden Bedingungen unverfälschte oder nahezu unverfälschte Ergebnisse zu liefern. Sie ist ein Hinweis auf die Zuverlässigkeit im Routinebetrieb und wird durch kleine, überlegte Änderungen der Methodenparameter untersucht [89, 90, 91]. Zu diesen Parametern zählen z. B. Probenvorbereitung, Temperatur der Säule (HPLC) bzw. der Kapillare (CE), pH-Wert und Zusammensetzung der mobilen Phase (HPLC) bzw. der Elektrolytlösung (CE) oder Flussrate (HPLC) bzw. Spannung (CE). Die Ergebnisse der Robustheits-Untersuchungen können zahlenmäßig nicht erfasst werden. Es können lediglich einige Parameter verglichen werden. So kann beispielsweise die Änderung der Auflösung eines kritischen Peakpaares, der Retentions- oder Migrationszeiten, der Anzahl der theoretischen Böden oder des Symmetriefaktors beurteilt werden.

#### **1.4.9 Systemeignung**

Der Systemeignungstest stellt zwar kein eigenes Validierungselement dar, er ist aber in den meisten analytischen Methoden ein wichtiger Bestandteil. Während

in der Validierung der prinzipielle Nachweis der Eignung des Prüfverfahrens erbracht wird, stellt der Systemeignungstest die Eignung eines bestimmten Systems zu einem bestimmten Zeitpunkt sicher. Die für die Zuverlässigkeit kritischen Faktoren können aus den Validierungsdaten abgeleitet werden. Bestandteile eines Systemeignungstests können Bodenzahl, Auflösung, Systempräzision oder Retentions- bzw. Migrationszeiten sein. Bei der Untersuchung dieser Parameter dürfen die Ergebnisse in vorgegebenen Akzeptanzgrenzen schwanken, die für jede Methode eigens festgelegt werden [89, 90, 91].

## **2 ZIEL DER ARBEIT**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit unterschiedlichen Arzneistoffen und Arzneistoffgruppen des Europäischen Arzneibuchs 6. Diese Stoffe sollen in Hinblick auf ihre verwandten, teilweise chiralen Substanzen untersucht werden, um kapillarelektrophoretische Methoden zur Reinheitsanalytik zu entwickeln.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit dem Antituberkulotikum Ethambutol. Die offizinelle (*S,S'*)-Form des Wirkstoffes soll von seinem Enantiomer und der achiralen *meso*-Verbindung getrennt werden. Die beiden stereoisomeren Verunreinigungen müssen dafür synthetisiert werden.

Im zweiten Teil wird die Methode der elektrokinetischen Chromatographie mittels Mikroemulsion (MEEKC) näher untersucht. Auch hier sollen chirale Substanzen voneinander getrennt werden. Zum einen handelt es sich um indirekt sympathomimetisch wirkende Phenylethylamine. Eine schon bestehende kapillarelektrophoretische Methode für vier Ephedrin-Derivate soll als Vergleich dienen, um die Trennleistung der neu entwickelten MEEKC-Methode abzuwägen. Außerdem sollen einige Aminosäuren, die natürlicherweise in der L-Form auftreten, von ihren Enantiomeren getrennt werden. Als chirale Selektoren werden die nativen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine und verschiedene Derivate des  $\beta$ -Cyclodextrins eingesetzt.

Zuletzt soll für das atypische Neuroleptikum Quetiapin und drei seiner verwandten Substanzen eine Trennmethode entwickelt werden, die aufgrund einer verbesserten Löslichkeit der Analyten auf wasserfreier Basis bestehen soll. Neben den schon bekannten Verunreinigungen Quetiapindesethanol und Quetiapin-*N*-Oxid soll auch Quetiapinlactam untersucht werden, dessen Struktur unbekannt ist. Im Vorfeld muss der Molekülaufbau mittels massenspektrometrischer und infrarot (IR)- und kernresonanz (NMR)-spektroskopischer Untersuchungen aufgeklärt werden.



## **3 ETHAMBUTOL**

## 3.1 Übersicht

### 3.1.1 Mykobakterien und Antituberkulotika

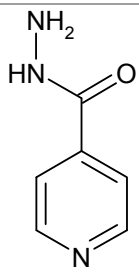
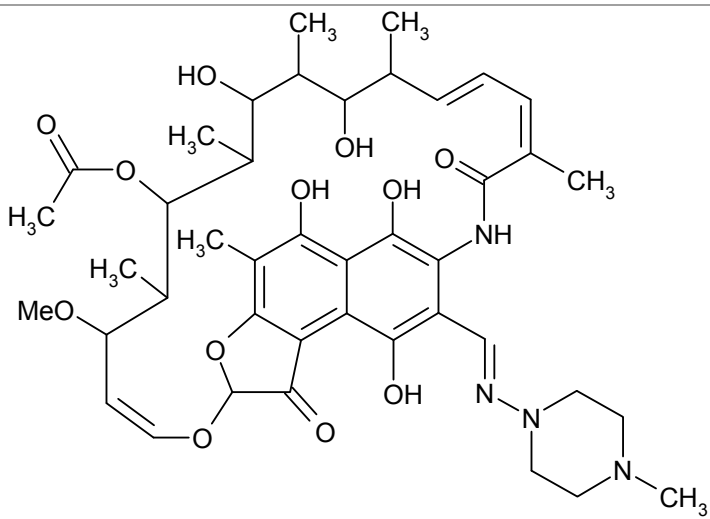
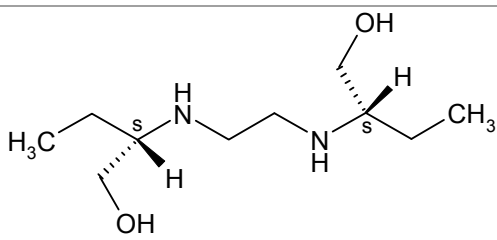
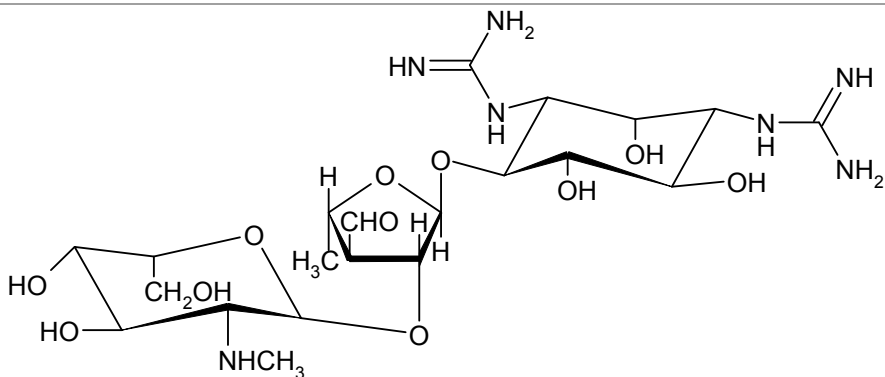
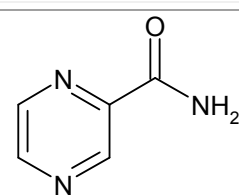
Mykobakterien, zu deren meist verbreiteten Arten *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium leprae* gehören, sind die Erreger von Tuberkulose, Lepra und atypischen, d. h. nicht-tuberkulösen Mykobakteriosen. Die Behandlung dieser Erkrankungen ist mit vielen antibakteriellen Antiinfektiva nicht erfolgreich. Vielmehr ist eine spezielle Therapie erforderlich, da die Mykobakterien besondere Merkmale aufweisen: Die hydrophobe Zellwand der Bakterien, die durch den hohen Anteil an lipophilen Mykolsäuren zustande kommt, machen diese weitgehend säurefest. Dazu weisen die Erreger ein langsames Wachstum auf, was einen Angriff in der Proliferationsphase erschwert, sie persistieren lange in Makrophagen und entwickeln leicht Resistenzen.

Deshalb bedarf es spezifisch wirkender, gut gewebeängiger Antiinfektiva, der Antituberkulotika. Um eine erfolgreiche Tuberkulosetherapie zu gewährleisten, ist ein ununterbrochener Langzeiteinsatz über mehrere Monate und eine Kombinations- und Stufentherapie notwendig.

Die Gruppe der Antituberkulotika ist in Mittel der 1. und 2. Wahl, d. h. in Basis- und Reservestoffe unterteilt. Die Mittel der 1. Wahl sind Isoniazid, Pyrazinamid, Ethambutol, Rifampicin und Streptomycin (s. Tabelle 6). Während Isoniazid, Pyrazinamid, Rifampicin und Streptomycin bakterizid wirken, ist Ethambutol der einzige Stoff, der eine bakteriostatische Wirkung aufweist. In sensiblen Mykobakterien stört Ethambutol den Stoffwechsel und den Aufbau der Zellwand, wobei der genaue Wirkmechanismus nicht geklärt ist. Als synergistische Stoffe zur Ethambutol-Therapie werden Isoniazid und Rifampicin eingesetzt [93, 94].

Ethambutol kann besonders bei überhöhter Dosierung zu Nebenwirkungen führen, die sich in Form von reversiblen oder auch irreversiblen Sehstörungen auswirken. Seltener treten Hyperurikämie, Magen-Darm-Störungen und allergische Reaktionen auf.

Tabelle 6: Übersicht Antituberkulotika

<p><b>Isoniazid</b> CAS: 54-85-3 <math>C_6H_7N_3O</math> <math>M_r</math>: 137.1 g/mol</p>	
<p><b>Rifampicin</b> CAS: 13292-46-1 <math>C_{43}H_{58}N_4O_{12}</math> <math>M_r</math>: 822.9 g/mol</p>	
<p><b>Ethambutol</b> CAS: 74-55-5 <math>C_{10}H_{24}N_2O_2</math> <math>M_r</math>: 204.3 g/mol</p>	
<p><b>Streptomycin</b> CAS: 57-92-1 <math>C_{21}H_{39}N_7O_{12}</math> <math>M_r</math>: 581.6 g/mol</p>	
<p><b>Pyrazinamid</b> CAS: 98-96-4 <math>C_5H_5N_3O</math> <math>M_r</math>: 123.1 g/mol</p>	

### 3.1.2 Analytik

In der Vergangenheit wurde Ethambutol mittels CE mehrfach aus pharmazeutischen Formulierungen von Substanzen mit ähnlichem Wirkspektrum abgetrennt. Die Detektion erfolgte einerseits mit direkter UV-Detektion, z. B. im Basischen bei Einsatzes eines Natriumboratpuffers, pH 9.5 ( $\lambda$ : 200 nm) [95] oder im sauren Milieu mit einem mit Kupfersulfat versetzten Natriumacetatpuffer ( $\lambda$ : 264 nm) [96, 97]. Aber auch Leitfähigkeitsdetektoren [98] oder Elektrochemilumineszenzdetektoren [99] wurden zur Ethambutol-Bestimmung verwendet. Ebenso ist eine Enantiomerentrennung in der Literatur beschrieben. Hierzu wird ein Tris-Phosphatpuffer, pH 2.5 verwendet, der mit Hydroxybutyl- $\beta$ -CD als chiraler Selektor versetzt ist. Auch hier fand eine direkte UV-Detektion bei 214 nm statt [100].

### 3.2 Aufgabenstellung

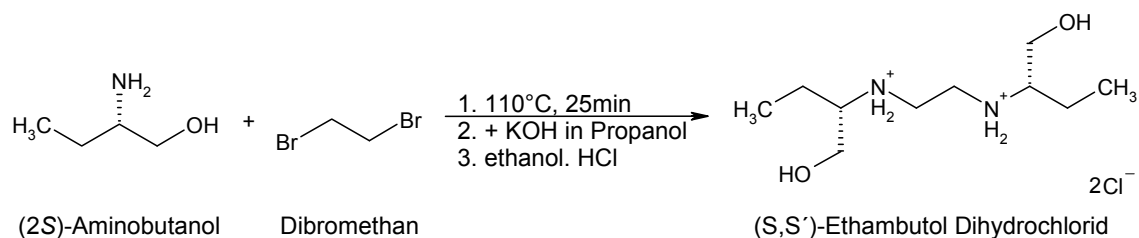
Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte eine CE-Trennmethode für das offizinelle (*S,S'*)-Ethambutol, dessen (*R,R'*)-Enantiomer und die *meso*-Verbindung entwickelt werden. Als Technik wurde die CZE gewählt, die durch CDs als chirale Selektoren modifiziert wurde. Da die stereoisomeren Verunreinigungen von Ethambutol nicht erhältlich waren, wurden sie im Vorfeld synthetisiert.

### 3.3 Stereoselektive Synthese

Im Ph. Eur. ist (*S,S'*)-Ethambutoldihydrochlorid in einer Monographie beschrieben. Dort werden als Verunreinigungen neben 1,2-Dichlorethan und 2-Amino-1-butanol auch das Entantiomer (*R,R'*)-Ethambutol und die achirale *meso*-Verbindung genannt.

Da die beiden stereoisomeren Verunreinigungen im Gegensatz zur offizinellen (*S,S'*)-Verbindung nicht kommerziell erhältlich sind, mussten diese synthetisiert werden. Hierzu wurde der Syntheseweg für (*S,S'*)-Ethambutoldihydrochlorid

von *Wilkinson, Shephard et al.* [101, 102] herangezogen (s. Abbildung 12), der zur Synthese des (*R,R'*)-Enantiomers wie folgt angepasst wurde.



**Abbildung 12: Syntheseweg von Ethambutoldihydrochlorid nach *Wilkinson, Shephard et al.* [101, 102]**

Im ersten Versuch wurde (*R*)-2-Amino-1-butanol in 10-fachem molarem Überschuss zu 1,2-Dibromethan gegeben und im Ölbad für 25 min auf 110 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktion wurde Kaliumhydroxid in heißem Propanol zugefügt. Das hier ausgefallene Kaliumbromid konnte mit Hilfe eines Lösungsmittelgemisches, bestehend aus gleichen Anteilen von Aceton und Propanol, abfiltriert werden. Danach wurde das erhaltene Filtrat unter Kühlung im Eisbad mit 5.5 M Salzsäurelösung (in 2-Propanol) versetzt. Über Nacht entstanden im Kühlschrank unter Zugabe von einigen Tropfen Diethylether weiße Kristalle. Diese wurden mit Ethanol umkristallisiert und durch NMR-Spektroskopie als das Edukt (*R*)-2-Amino-1-butanolhydrochlorid identifiziert.

Da keine Umsetzung stattgefunden hatte, wurde die Reaktion von 2-Amino-1-butanol und Dibromethan mit Hilfe der Mikrowelle durchgeführt (115 °C, 1.5 h). Die Reaktion wurde im geschlossenen System in einem Bombenrohr aus Polytetrafluorethylen, ummantelt mit einem Polyetheretherketon, durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte in gleicher Weise. Allerdings konnte auch hier nur das Edukt als Hydrochlorid isoliert werden. Um die Reaktion von 2-Aminobutanol mit Dibromethan zu initiieren, wurden Temperatur und Zeit erhöht (3.5 h bzw. für 48 h im Ölbad bei 140 °C), was jedoch keine Umsetzung brachte.

Daraufhin wurde eine Synthesevorschrift der Arbeitsgruppe *Kritsyn et al.* getestet [103]. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 13 dargestellt.

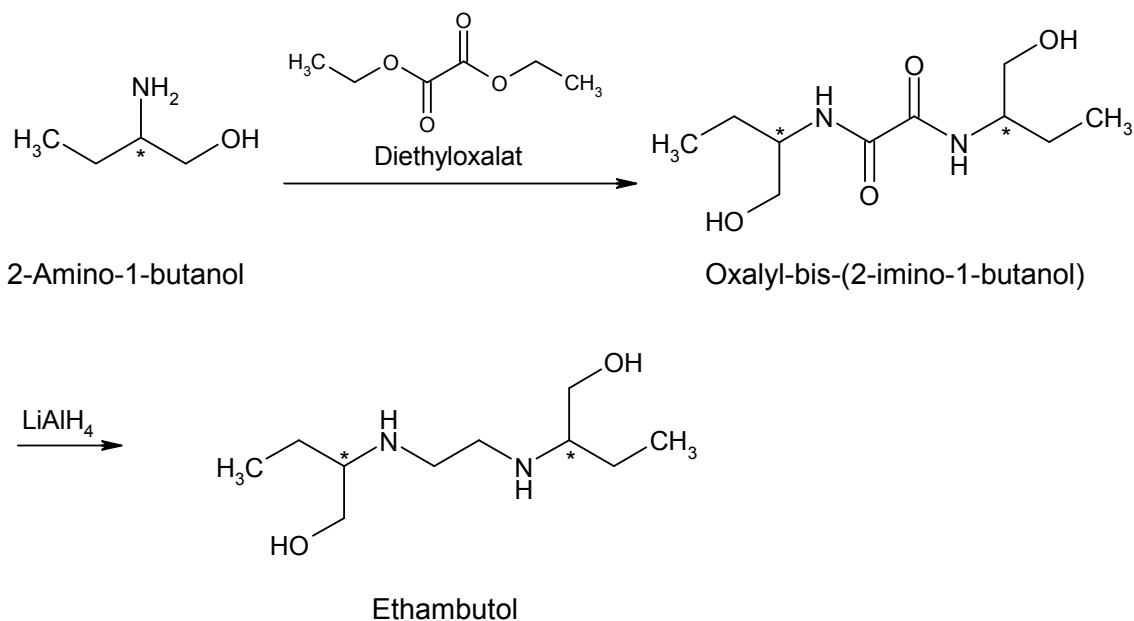


Abbildung 13: Syntheseweg von Ethambutol nach *Kritsyn et al.* [103]

Auf diese Weise konnten alle Stereoisomere von Ethambutol synthetisiert werden. Die Konfiguration des Edukts 2-Amino-1-butanol bestimmt dabei das Produkt. Aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten kann die *meso*-Verbindung vom Racemat getrennt werden.

Edukt	Produkt
( <i>S</i> )-2-Aminobutanol	( <i>S,S'</i> )-Ethambutol
( <i>R</i> )-2-Aminobutanol	( <i>R,R'</i> )-Ethambutol
( <i>RS</i> )-2-Aminobutanol	( <i>RS,R'S'</i> )-Ethambutol (Racemat) und ( <i>RS,S'R'</i> )-Ethambutol ( <i>meso</i> -Verbindung)

Racemisches 2-Amino-1-butanol wurde mit Diethyloxalat versetzt. Das Reaktionsgemisch erwärmte sich und präzipitierte vollständig. Die entstandene Substanz wurde dreimal mit Aceton gewaschen, filtriert und getrocknet. Das Pulver wurde mit Tetrahydrofuran (THF) gemischt, unter Schutzgas tropfenweise mit Lithiumaluminiumhydrid in THF versetzt und über Nacht unter Rückfluss gekocht. Nach und nach wurden anschließend Natronlauge, Wasser und nochmals Natronlauge zugegeben. Mit weiterem THF wurde die Reaktion für 20 min unter Rückfluss erhitzt und anschließend heiß filtriert. Während des

Abkühlens fielen Kristalle aus, die wieder in Ethanol gelöst wurden. Dieser alkoholischen Lösung wurde isopropanolische Salzsäure zugesetzt, bis der pH-Wert sauer war. Über Nacht fiel so ein weißer Feststoff aus, der nach Trocknen mittels NMR-Spektroskopie als *meso*-Ethambutoldihydrochlorid identifiziert wurde. Der THF-Überstand (s. o.) wurde im Vakuum getrocknet, doch racemisches Ethambutol ließ sich daraus nicht isolieren.

Im nächsten Versuch wurde die Synthese mit (*R*)-2-Amino-1-butanol angesetzt und nach den gleichen Bedingungen wie zuvor durchgeführt. Das Lösungsmittel THF wurde wieder im Vakuum entfernt, wobei ein gelblicher Feststoff auskristallisierte. Nach zweimaliger Umkristallisation mit Diethylether bildeten sich weiße Kristalle, die mittels NMR-Spektroskopie als (*R,R'*)-Ethambutol identifiziert werden konnten. Auch die (*S,S'*)-Verbindung konnte hergestellt werden, indem der Synthesevorgang mit (*S*)-2-Amino-1-butanol als Edukt wiederholt wurde (Vergleich der NMR-Messungen mit Literaturwerten [104]). Die erhaltenen NMR-Werte deckten sich mit bereits veröffentlichten Messungen [104]. Somit standen für die anstehende CE-Untersuchung alle stereoisomeren Verunreinigungen des offizinellen Ethambutol zur Verfügung. Um sicherzustellen, dass sowohl (*S,S'*)- als auch (*R,R'*)-Ethambutol enantiomerenrein vorlagen, wurde die optische Drehung beider Substanzen bestimmt. Der Mittelwert der Literaturwerte für die optische Drehung von (*S,S'*)-Ethambutol liegt bei 13.6° bei einer Konzentration von 2 g Substanz gelöst in 100 ml Wasser [104, 105]. Für das synthetisierte (*S,S'*)-Ethambutol wurde am Polarimeter eine Drehung von 13.4°, für (*R,R'*)-Ethambutol entsprechend von -13.6° ermittelt. Diese Ergebnisse versichern eine hohe Enantiomerenreinheit.

## 3.4 Cyclodextrin-modifizierte CZE

### 3.4.1 Methodenentwicklung

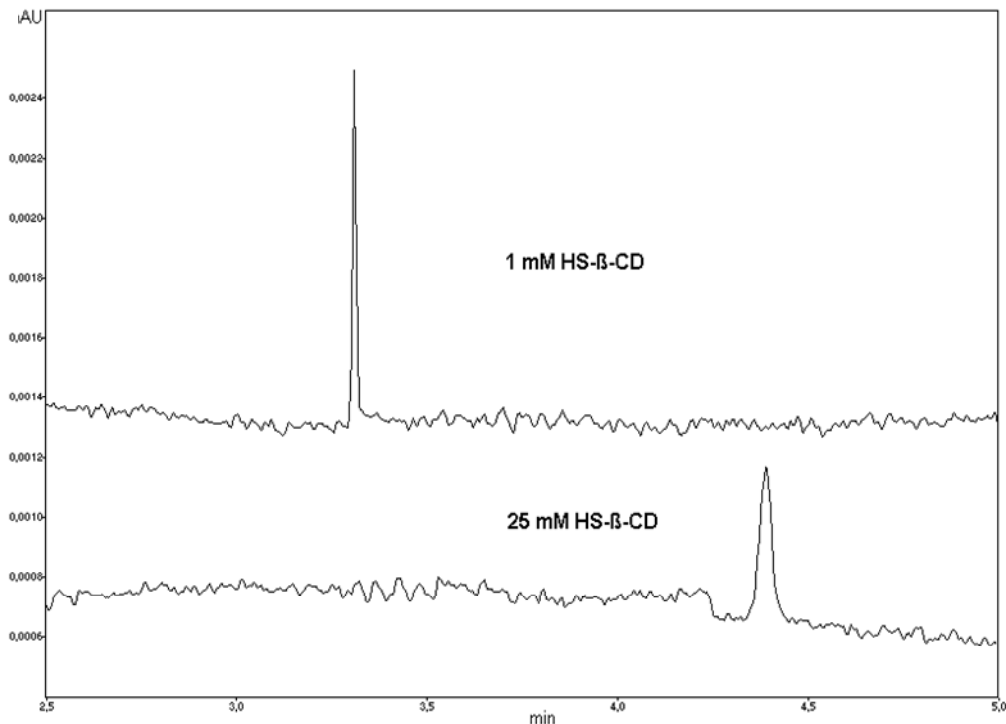
Das Ziel dieser Untersuchung bestand darin eine Methode zu entwickeln, mit der Ethambutol und die beiden stereoisomeren Verunreinigungen quantifiziert werden können. Da Stereoisomere grundsätzlich die gleiche Struktur- und Summenformel aufweisen und sich nur in ihrer räumlichen Anordnung unterscheiden, wird ein chirales Umfeld zur Trennung benötigt. Auch wenn die *meso*-Verbindung trotz der zwei Stereozentren achiral ist, wird im Folgenden von „chiraler Trennung“ gesprochen. Um ein chirales Umfeld schaffen zu können, wurden dem HGE verschiedene CDs zugesetzt.

Es wurde eine Analysenlösung mit 0.2 mg/ml (*S,S'*)-Ethambutol und 0.2 mg/ml der beiden stereoisomeren Verunreinigungen in 0.1 M Salzsäure hergestellt vorlagen. Ethambutol liegt aufgrund der beiden basischen Stickstoffatome im sauren Milieu zweifach protoniert vor, so dass es in der CE-Kapillare zum kathodischen Ende wandert. Bei pH 2.5 ist der EOF jedoch weitgehend unterdrückt, wodurch die Wanderung der positiv geladenen Analyten nicht zusätzlich beschleunigt wird. Folglich verlängert sich die Zeit, in der die Stereoisomere mit den CDs interagieren können.

Im ersten Schritt wurde ein Phosphatpuffer gewählt, der aus 60 mM Natriumdihydrogenphosphat bestand und auf den pH-Wert 2.5 eingestellt wurde. Als Testlauf wurde der HGE ohne Zusatz von CDs verwendet. Bei einer angelegten Spannung von 25 kV und einer Temperatur von 20 °C konnte ein Peak bei 1.4 min detektiert werden. Die Intensität des Peaks war allerdings sehr gering, obwohl bei niedriger Längenwelle detektiert wurde ( $\lambda$ : 200 nm). Da Ethambutol kein Chromophor besitzt, ist die eingesetzte Konzentration von 0.2 mg/ml je Substanz zu gering, um die Elektropherogramme gut analysieren zu können. Daher wurde die Konzentration der Analysenlösung auf 1 mg/ml je Stereoisomer angehoben. Durch die Erhöhung zeichnete sich der Peak der Ethambutol-Stereoisomere gut vom Basisrauschen ab. Mit dieser Analysenlösung und dem Phosphatpuffer als HGE wurden nun Messungen durchgeführt, wobei der Zusatz verschiedener CDs (s. Kapitel 1.3.3.2) in drei unterschiedlichen Konzentrationen (1, 5 und 25 mM) untersucht wurde. Auffällig



war die Tatsache, dass bei Verwendung von negativ geladenen CDs eine Umkehrspannung angelegt werden musste, um Ethambutol zu detektieren. Obwohl Ethambutol im Sauren zweifach positiv geladen vorliegt, wanderte es nicht zum Detektor an der Kathode. Die Komplexbildung von Ethambutol und den negativ geladenen CDs war stark genug ausgeprägt, um die Analyten in Richtung der Anode wandern zu lassen. Da der EOF im sauren Milieu fast vollständig unterdrückt war, konnte dieser Effekt nicht kompensiert werden. Durch das Anlegen einer negativen Spannung an die Kapillare wurde der Detektor auf die Seite der Anode verschoben, so dass die Analyten das Detektionsfenster passieren konnten. Mit keinem der eingesetzten CDs konnte Ethambutol von seinen Verunreinigungen abgetrennt werden. Auch Variationen am HGE, wie Erhöhung der Salzkonzentration auf 80 und 100 mM und Erniedrigung des pH-Wertes auf 2.0, verbesserten die Trennleistung der Methode nicht. Ebenso führte eine Anpassung der Geräteparameter, wie Temperaturveränderung  $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  und Spannungsveränderung auf 10, 15 oder 20 kV, zu keiner Auftrennung der Analyten. Die Veränderungen wirkten sich einzig auf die Migrationsgeschwindigkeit aus. Eine Senkung der Temperatur bewirkt eine verlangsamte Wanderung in der Kapillare. Eine Erniedrigung der Spannungstärke erniedrigt den Stromfluss und ebenso die Migration. Der verringerte pH-Wert zeigte kein Einfluss. Die Unterdrückung des EOF ist bei pH 2.5 so stark ausgeprägt, dass eine weitere Senkung kaum Auswirkungen hatte. Bei der Verwendung der verschiedenen CDs in unterschiedlichen Konzentrationen war nur der Einfluss der Zusammensetzung des HGE erkennbar. Mit einer höheren Konzentration an CD oder der Salzkonzentration, steigt die Ionenstärke an und damit die Viskosität des HGE. Dies führt zu einer verlangsamten Migration, sowohl bei den neutralen CDs mit Normalspannung als auch bei den negativ geladenen CDs mit Umkehrspannung (s. Abbildung 14 am Bsp. von HS- $\beta$ -CD).



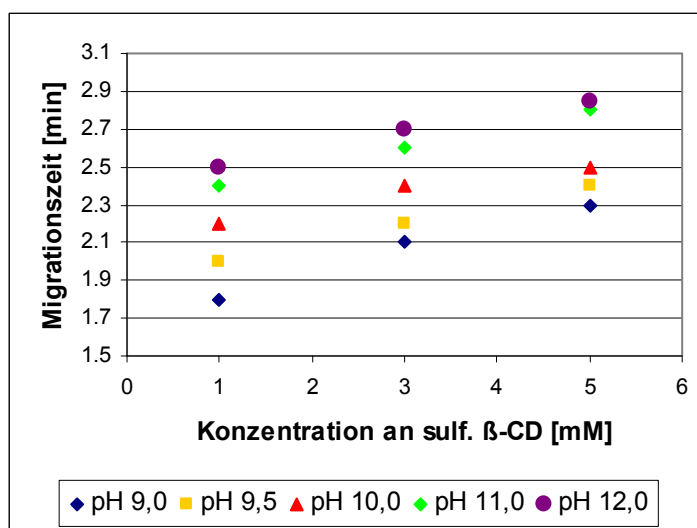
**Abbildung 14: CZE mit 80 mM Phosphatpuffer, pH 2.5, mit Zusatz verschiedener Konzentrationen an HS-β-CD.**

Da mit dem sauren HGE keine Trennung der Stereoisomere erzielt werden konnte, wurde im Folgenden ein Tetraborat-Puffer verwendet. Ein entscheidender Vorteil dieses HGE war die Tatsache, dass Ethambutol im alkalischen Milieu ungeladen vorliegt, so dass die freien Elektronenpaare der Stickstoff-Atome als schwaches Chromophor wirken können. Dadurch war die Detektion deutlich intensiver als im Sauren. Außerdem ist die Affinität der ungeladenen Substanzen zur hydrophoben Bindungstasche des CDs erhöht, was eine Trennung positiv beeinflussen kann.

Obwohl die Stereoisomere im alkalischen Puffer keine Ladungen aufweisen, die die Wanderungsgeschwindigkeit beschleunigen können, bewegen sich die Substanzen aufgrund des starken EOF in kurzer Zeit in Richtung Kathode. Da alle ungeladenen Substanzen in der CZE zeitgleich mit dem EOF migrieren, ist es für das Trennproblem von Ethambutol nicht sinnvoll, ungeladene CDs einzusetzen, da mit diesen keine Auftrennung stattfinden kann. Die geladenen chiralen Selektoren dagegen besitzen eine eigene Migration, so dass durch Komplexierung der CDs mit den Analyten unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten entstehen und die stereoisomeren Verunreinigungen voneinander ge-

trennt werden könnten. Da die negativ geladenen CDs zur Anode wandern, wird die Migrationszeit von Ethambutol verlängert, sobald sich ein Komplex zwischen der Substanz und dem chiralen Selektor ausbildet. Dieser Sachverhalt wurde schon im sauren Milieu beobachtet, da bei Anwendung der negativ geladenen CDs aufgrund der Komplexbildung Umkehrspannung angelegt werden musste, um die Substanzen detektieren zu können.

Für die Untersuchungen im Basischen wurde ein Tetraboratpuffer gewählt, der in den Konzentrationen 12.5 und 20 mM hergestellt wurde. Diese Puffer wurden jeweils auf pH 9.0, 9.5, 10.0, 11.0 und 12.0 eingestellt. Bei Zugabe der negativ geladenen CDs (s. Kapitel 1.3.3.2) konnten die erwarteten Beobachtungen gemacht werden. Mit steigender CD-Konzentration und gleichbleibendem HGE stieg die Migrationszeit an. Ein steigender pH-Wert des HGE führte ebenfalls zu verlängerten Migrationszeiten. Obwohl der EOF bei erhöhtem pH ansteigt, verlangsamt sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten. Dies scheint durch die Komplexbildung mit dem chiralen Selektor bewirkt zu werden, dessen Deprotonierungsgrad ansteigt und dessen Mobilität damit in Richtung Anode steigt. Dieser Veränderung ist in Abbildung 15 als Diagramm dargestellt.



**Abbildung 15:** Abhängigkeit der Migrationszeit von pH-Wert und Konzentration an chiralem Selektor

Doch auch im basischen Milieu konnte trotz verschiedener Variationen (Spannung, Temperatur, Art des CDs, Konzentration des CDs und des Puffersalzes) keine Trennung von Ethambutol und seinen Verunreinigungen erreicht werden.

Daraufhin wurde dieses Projekt abgebrochen (s. Abbildung 16 am Bsp. von HS- $\beta$ -CD).

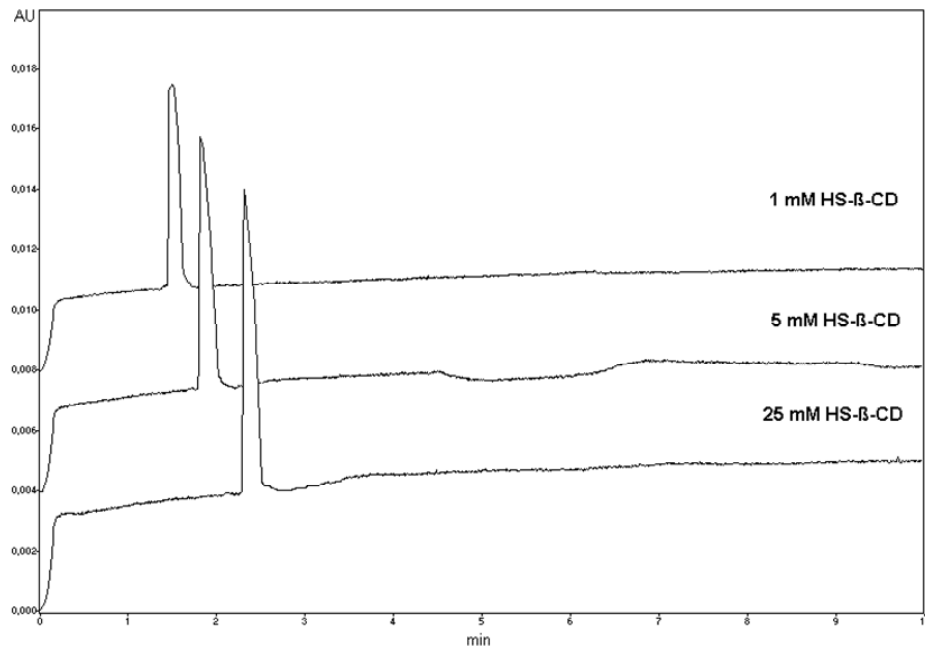


Abbildung 16: CZE mit 20 mM Tetraboratpuffer, pH 2.5, mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen an HS- $\beta$ -CD.

### 3.5 Ergebnisse der Untersuchungen von Ethambutol

Nachdem die beschriebene Synthese nach *Wilkinson, Shepherd et al.* [101, 102] zu keinem positiven Ergebnis geführt hatte, konnte mit der Vorschrift der Arbeitsgruppe um *Kritsyn et al.* [103] sowohl (*S,S'*)-Ethambutol als auch das (*R,R'*)-Enantiomer und die *meso*-Verbindung synthetisiert werden.

Zur Entwicklung einer chiralen CZE-Trennmethode der drei Substanzen wurde zuerst ein saurer HGE eingesetzt. Die verwendeten Puffer wurden aus verschiedenen Konzentrationen an Natriumdihydrogenphosphat hergestellt und auf den pH-Wert 2.0 bzw. 2.5 eingestellt. Im Sauren liegen die Substanzen zweifach protoniert vor, so dass eine Migration in Richtung der Kathode erfolgt. Jedoch stehen durch diese Protonierung die Elektronenpaare der Stickstoff-Atome nicht zur Verfügung, um als chromophores System zu dienen. Dadurch wird selbst bei der Messwellenlänge 200 nm eine Detektion schwierig, da die Intensität der Peaks auch bei hoher Substanzkonzentration relativ gering ist. Mit

1 mg/ml je Ethambutol-Stereoisomer war der Peak dennoch erkennbar, da er sich deutlich vom Basislinienrauschen abhob. Auch bei den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von *Lin et al.* [100] wird die Schwierigkeit der Detektion deutlich, da das Basislinienrauschen in den Elektropherogrammen stark ausgeprägt ist. Allerdings konnten in dieser Arbeit die Analyten im sauren Puffer auch nach verschiedenen Variationen an HGE nicht voneinander getrennt werden. Die Arbeitsgruppe um *Lin* [100] führte die Enantiomerentrennung von (*S,S'*)- und (*R,R'*)-Ethambutol erfolgreich mit Hydroxybutyl- $\beta$ -CD durch. Die gute Trennleistung des chiralen Selektors führen sie auf die verhältnismäßig lange Hydroxybutyl-Seitenkette zurück, die verantwortlich ist für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Eine Auftrennung der Ethambutol-Isomere mit den in dieser Arbeit verwendeten CD-Derivaten war nicht möglich.

Deshalb wurden die folgenden Versuche mit basischem Tetraboratpuffer unternommen. Die Analyten lagen nun ungeladen in der Lösung vor und migrierten deshalb zeitgleich mit dem EOF. Durch Zugabe eines geladenen chiralen Selektors hätten nun durch Komplexierung unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten resultieren können. Die Detektion der Substanzen war durch die freien Elektronenpaare der Stickstoff-Atome im alkalischen Puffer deutlich stärker. Aber auch mit verschiedenen basischen Puffersystemen konnte keine Trennung von Ethambutol und seinen Verunreinigungen erreicht werden.

Insgesamt konnte das vorliegende Trennproblem mittels CD-modifizierter CZE nicht gelöst werden. Einzig der Einfluss der Zusammensetzung des HGE und die Veränderungen der Migrationszeit durch unterschiedliche Geräteeinstellungen konnte untersucht werden.



# **4 ENANTIOMERENTRENNUNG MITTELS MEEKC**

Die MEEKC ist eine Variante der kapillarelektrophoretischen Trennanalytik, in der eine ME, meist Öl in wässriger Phase, als HGE eingesetzt wird. Besonders bei Löslichkeitsproblemen der Analyten in wässrigen Systemen weist die MEEKC Vorzüge auf. Des Weiteren können neutrale Analysesubstanzen getrennt werden, wenn sie unterschiedliche Verteilungseigenschaften zwischen der pseudostationären, inneren öligen und der äußeren wässrigen Phase der ME aufweisen (vgl. Kapitel 1.2.2.3).

Da die MEEKC bei den angesprochenen Problemen Vorteile im Vergleich zu anderen CE-Methoden zeigt, aber besonders in der Enantiomerentrennung bis heute recht wenig eingesetzt wurde, wurde in diesem Teil der Arbeit die Methode der MEEKC untersucht. Dazu wurden Stoffe herangezogen, die schon zuvor mittels CE-Methoden untersucht wurden und in der Literatur beschrieben sind.

## **4.1 Aminosäuren**

### **4.1.1 Übersicht**

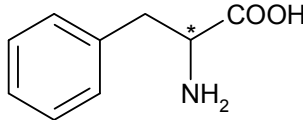
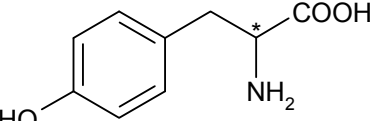
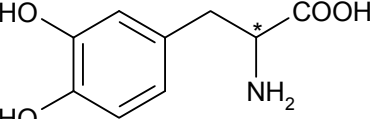
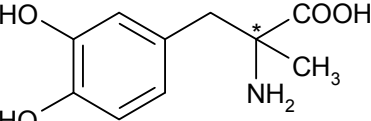
Aminosäuren sind chirale Moleküle, die in der Natur zumeist in der L-, seltener in der D-Form existieren. In menschlichen Proteinen kommen ausschließlich die L-Aminosäuren vor, weshalb diese L-Aminosäuren proteinogen genannt werden. In den letzten Jahren wurde die Enantiomerentrennung von Aminosäuren mittels verschiedener kapillarelektrophoretischer Methoden vielfach untersucht. Bei einem Überblick über die publizierten Methoden lassen sich Trends ablesen, mit welchen Methoden Erfolge erzielt werden können. Oft werden gute Ergebnisse mittels Liganden-Austausch-CE mit [106, 107, 108, 109] und ohne vorheriger Derivatisierung [110, 111, 112, 113] der zu untersuchenden Aminosäuren erzielt. Auch die CD-modifizierte CE mit [114, 115, 116, 117] und ohne vorheriger Derivatisierung der Aminosäuren [118, 119, 120, 121] wird oft verwendet. Aber auch die Zusätze von Kronenethern [122], Albumin aus menschlichem Serum [123], Chinchona-Alkaloide [124] oder Antibiotika wie Vancomycin [125], Teicoplanin [126] und Avoparcin [127] als chirale Selektoren führen zur Trennung von racemischen Aminosäuren. Ebenso ist es möglich die Kapillaroberfläche zu modifizieren, indem man die chiralen



Selektoren, wie z. B. CDs [128] oder Polytergurid [129] an die Silanolgruppen bindet oder die zu untersuchenden Stoffe direkt chiral derivatisiert [130].

Die in dieser Arbeit untersuchten aromatischen Aminosäuren sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Aminosäuren**

<p><b>Phenylalanin</b> CAS der (2S)-Form: 63-91-2 <math>C_9H_{11}NO_2</math> <math>M_r</math>: 165.2 g/mol</p>	
<p><b>Tyrosin</b> CAS der (2S)-Form: 587-33-7 <math>C_9H_{11}NO_3</math> <math>M_r</math>: 181.2 g/mol</p>	
<p><b>Dopa (Dihydroxyphenylalanin)</b> CAS der (2S)-Form: 59-92-7 <math>C_9H_{11}NO_4</math> <math>M_r</math>: 197.2 g/mol</p>	
<p><b>Methyldopa</b> CAS der (2S)-Form: 300-48-1 <math>C_{10}H_{13}NO_4</math> <math>M_r</math>: 211.2 g/mol</p>	

### Phenylalanin

Die essentielle Aminosäure L-(2S)-Phenylalanin kann im menschlichen Körper in L-Tyrosin, L-Dopa und schließlich L-Noradrenalin und L-Adrenalin (früher auch Epinephrin bzw. Norepinephrin genannt) umgewandelt, oder zu Fumarsäure und Acetessigsäure abgebaut werden. Dagegen weist das Krankheitsbild der Phenylketonurie, der häufigste Enzymdefekt des Aminosäurestoffwechsels in Deutschland, eine Aktivitätsminderung oder einen Aktivitätsverlust an L-Phenylalanin-Hydroxylase auf, so dass L-Tyrosin falsch zu Phenylpyruvat und Phenylacetat abgebaut wird. Diese Produkte sind toxisch und hemmen die Myelinbildung. Außerdem sind psychomotorische Retardierung und erhöhte Krampfneigung sowie als schwerwiegendstes

Symptom eine gestörte geistige Entwicklung die Folge, wenn die Krankheit unbehandelt bleibt. Nur eine Phenylalanin-freie Diät kann diese Symptome abwenden. Daher wird heutzutage bei Neugeborenen am dritten Lebenstag ein spezifischer Test mittels Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt [93, 131].

### Tyrosin

L-Tyrosin ist eine nichtessentielle, proteinogene Aminosäure, die zu Melanin und (wie unter Phenylalanin beschrieben) zu den Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin umgesetzt werden kann. Aber auch in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) ist es von großer Bedeutung, da diese iodierete Derivate des Tyrosins darstellen (s. Abbildung 17). Daher findet L-Tyrosin medizinische Anwendung bei Patienten mit gestörter Schilddrüsenfunktion [62, 94, 131].

### Levodopa

Levodopa wurde erstmals 1961 zur Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt. Mb. Parkinson ist eine Erkrankung der Basalganglien, die sich in der Degeneration dopaminergener Neuronen ausdrückt. Aus dieser Degeneration resultiert ein Mangel an Dopamin im Striatum. Gleichzeitig kommt es zu einer Enthemmung von cholinergen Interneuronen. Durch dieses Ungleichgewicht zwischen adrenerger und cholinergischer Neurotransmission werden schließlich die Symptome des Mb. Parkinson ausgelöst. Bei diesen Symptomen unterscheidet man im Allgemeinen zwischen *motorischen*, *vegetativen* und *psychischen* Störungen. Die motorischen Störungen unterteilt man weiter in Plus-Symptome wie Ruhetremor und Sprachstörungen und in Minus-Symptome wie Hypo- und Akinese. Dagegen drücken sich die vegetativen Störungen z. B. durch einen erhöhten Tränen- und Speichelfluss sowie erniedrigtem Blutdruck aus. Depressive Verstimmungen, verlangsamte Denkabläufe und Demenz ordnet man den psychischen Störungen zu.

Zur Behandlung des Mb. Parkinsons stehen neben Levodopa verschiedene Wirkstoffgruppen zur Verfügung:

- Dopaminrezeptor-Agonisten (Selegilin und Entacapon)
- Muscarinrezeptor-Antagonisten (Benzatropin und Biperidin)
- *N*-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten (Amantadin und Memantin).

Die Gabe von Dopamin, der eigentlich fehlenden Substanz, ist nicht möglich, da Dopamin nach oraler Gabe nicht über die Blut-Hirn-Schranke ins zentrale Nervensystem, dem Wirkort, aufgenommen wird. Gegenwärtig ist das wichtigste und wirksamste Medikament Levodopa. Als Aminosäure kann es mittels aktiver Aminosäure-Transporter die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird danach von der Dopadecarboxylase in die Wirkform Dopamin umgewandelt. Um zu verhindern, dass Levodopa schon in der Peripherie decarboxyliert wird, gibt man Levodopa in Kombination mit Decarboxylasehemmern, wie z. B. Carbidopa und Benserazid. Eine Übersicht über den Zusammenhang der untersuchten Aminosäuren im Stoffwechsel ist in Abbildung 17 zu sehen [93, 94].

### Methyldopa

Auch  $\alpha$ -Methyldopa ist ein Substrat und damit ein Hemmstoff der Dopadecarboxylase. Es wird in Anlehnung an die Synthese der körpereigenen Katecholamine erst in  $\alpha$ -Methyldopamin und anschließend in  $\alpha$ -Methylnoradrenalin umgesetzt. Dieses wird als falscher Transmitter gespeichert und wirkt an  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren sogar stärker als Noradrenalin selbst. Die Aktivierung der  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren führt zu einer Senkung des Aktionspotentials im Sympathikus, was die Senkung des peripheren Widerstands und damit eine Blutdrucksenkung bewirkt. Da dieser Effekt langsam eintritt, ist  $\alpha$ -Methyldopa vor allem bei schwangeren Patientinnen indiziert. Aufgrund schwerer Nebenwirkungen wie Depressionen und Parkinsonismus kommt es nur als Antihypertonikum der 2. Wahl zum Einsatz [93, 94].

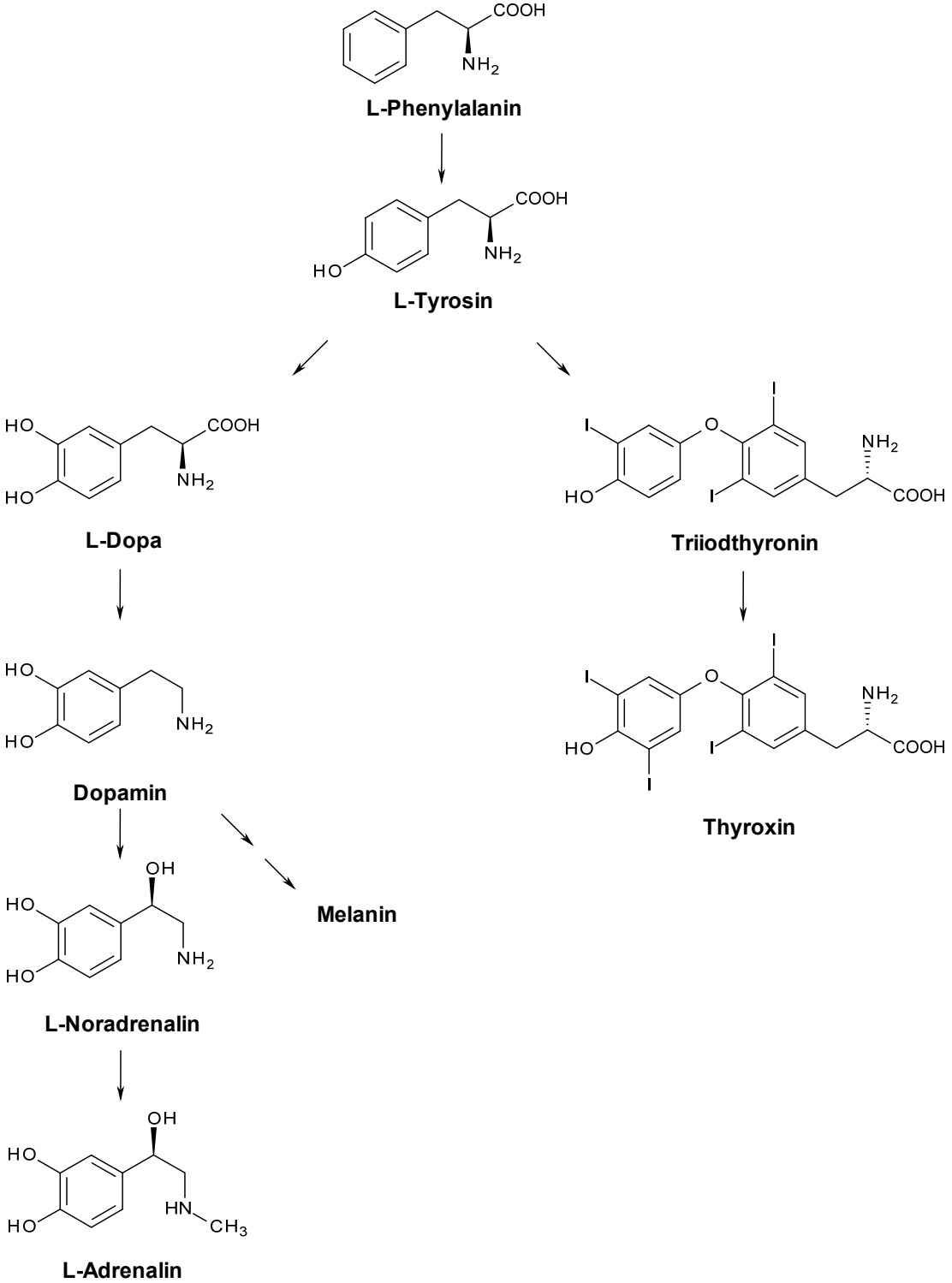


Abbildung 17: Biosynthesewege ausgehend von L-Phenylalanin

## Analytik

In der Vergangenheit wurden die beschriebenen Aminosäuren vielfach in Hinblick auf chirale Trennungen untersucht. Viele dieser Methoden weisen allerdings einen oder mehrere Nachteile auf. Auffällig sind zum einen relativ lange Migrationszeiten bei Phenylalanin [132], Tyrosin [133] oder Dopa [134], zum anderen die unvollständigen Enantiomerentrennungen von jeder der vier Aminosäuren [135, 136, 137, 138] und auch die Verwendung von kommerziell kaum verfügbaren chiralen Selektoren, wie Sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin [139].

### **4.1.2 Aufgabenstellung**

Im folgenden Teil der Arbeit sollten die Racemate der Aminosäuren Dopa, Methyldopa, Tyrosin und Phenylalanin unter Zuhilfenahme einer CD-modifizierten MEEKC-Methode chiral getrennt werden. Dazu sollte eine robuste Methode entwickelt und anschließend validiert werden.

### **4.1.3 Methodenentwicklung**

#### **4.1.3.1 Individuelle Methoden**

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurden verschiedene MEs getestet, um den Einfluss der Zusammensetzung der ME auf die Migrationszeit der Aminosäuren, am Beispiel von DL-Dopa, zu untersuchen. Ein chiraler Selektor wurde dazu nicht eingesetzt. Die erste ME wurde in Anlehnung an die Zusammensetzung der ME von *Bitar et al.* [140] aus den Komponenten 0.8% (w/w) Octan, 6.62% (w/w) 1-Butanol, 2.0% (w/w) 2-Propanol, 4.44% (w/w) SDS und 86.14% (w/w) Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5) hergestellt. Bei einer Temperatur von 25 °C, einer Umkehrspannung von -20 kV und einer effektiven Kapillarlänge von 30 cm ergab sich für racemisches Dopa eine Migrationszeit von 25 min. Danach wurden die Konzentrationen der organischen Komponenten verringert und außerdem auf den Zusatz des organischen

Modifiers 2-Propanol verzichtet. Diese ME bestand aus 0.5% (w/w) Octan, 3.0% (w/w) 1-Butanol, 1.5% (w/w) SDS und 95.0% (w/w) Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5). Bei unveränderten Geräteeinstellungen konnte mit der abgewandelten ME racemisches Dopa nun kaum verändert innerhalb von 23 min detektiert werden. Um die Analysenzeit zu verkürzen, wurde anschließend die Ölkomponente *n*-Octan gegen Ethylacetat ersetzt. Ansonsten blieb die Zusammensetzung der ME gleich. Diese Variation führte zu einer deutlich beschleunigten Migration, so dass der Peak innerhalb von 6 min detektiert werden konnte. Daraufhin wurde diese ME verwendet, um den Einfluss des Einsatzes von verschiedenen CD-Derivaten zu untersuchen.

In den ersten Versuchen wurden die nativen Formen von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD untersucht, da sie die einfachsten und damit kostengünstigsten CD darstellen. Eingesetzt wurden jeweils Konzentrationen von 0.75, 1.5 und 3.0%. Spannung und Temperatur blieben im Vergleich zu den Vorversuchen unverändert. Da sich die Racemate so nicht trennen ließen, wurden der ME folgende derivatisierte  $\beta$ -CD in gleichen Konzentrationen zugesetzt:

- *Heptakis*(2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -CD, *Heptakis*(2,3,6-tri-*O*-methyl)- $\beta$ -CD und Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (jeweils neutral),
- *Heptakis*(2,3-di-*O*-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD (HDMS), *Heptakis*(2,3-di-*O*-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD (HDAS) und *Heptakis*(6-sulfato)- $\beta$ -CD (HS) (jeweils negativ geladen).

Die Enantiomere von *DL*-Dopa konnten nur durch den Zusatz von HS- $\beta$ -CD partiell getrennt werden. Durch Austauschen des chiralen Selektors in das strukturell ähnliche, allerdings uneinheitlich sulfatierte  $\beta$ -CD (sulf.  $\beta$ -CD), dessen Derivatisierungsgrad zwischen 7 und 11 variiert, und einer Anpassung der Spannungstärke, konnte *DL*-Dopa in 10 min mit einer Auflösung von 3.1 basisliniengetreunt werden (s. Abbildung 18). Die ME bestand aus 0.5% (w/w) Ethylacetat, 1.5% (w/w) SDS, 3.0% (w/w) 1-Butanol, 95.5% (w/w) Phosphatpuffer, 20 mM, pH 2.5 und aus 1.25% (w/w) des chiralen Selektors sulf.  $\beta$ -CD.

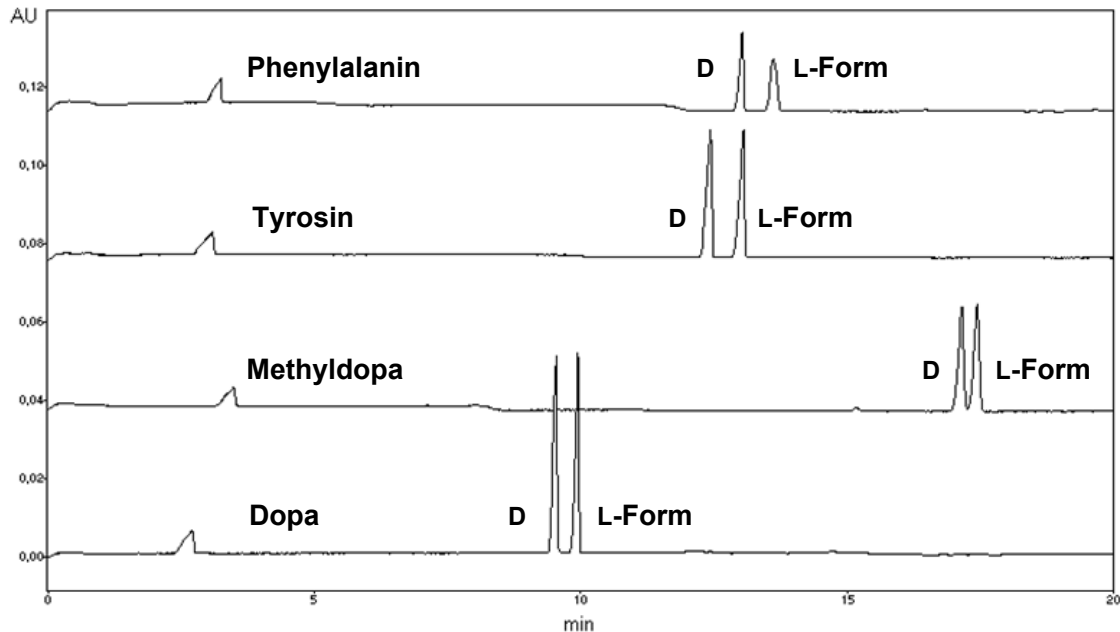
Mit dieser ME konnte trotz einer Erhöhung der Konzentration des chiralen Selektors keine Basislinientrennung für die Racemate von Methyldopa, Phenyl-

alanin oder Tyrosin erreicht werden. Eine Reduzierung des pH-Wertes des wässrigen Puffersystems von 2.5 auf 2.0 bewirkte eine partielle Trennung von *DL-Phenylalanin*. In Hinblick auf eine Verbesserung der Auflösung wurde der ME der organische Modifier 2-Propanol zugegeben, weil damit sowohl die Leitfähigkeit des HGE als auch die Solvatation und die  $pK_a$ -Werte der Analyten beeinflusst wird, was einen positiven Effekt auf die Trennung bewirken kann. Außerdem wurden die Konzentrationen der einzelnen Komponenten der ME geringfügig verändert. Der Anteil von Ethylacetat und 1-Butanol wurde erhöht, die Menge an SDS dagegen minimal verringert. Durch den höheren Ölanteil aber den insgesamt gesehenen gleichbleibenden Anteil an Tensiden, entstehen größere Öltröpfchen als innere Phase der ME, wodurch die hydrophoben Wechselwirkungen stärker ausgeprägt sind. Die ME enthielt 1.0% (w/w) Ethylacetat, 1.4% (w/w) SDS, 4.0% (w/w) 1-Butanol, 2.8% (w/w) 2-Propanol und 90.8% (w/w) Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.0). *DL-Phenylalanin*, die am wenigsten polare Substanz der untersuchten Aminosäuren, konnte so durch den Einsatz von 4% sulf.  $\beta$ -CD mit einer Auflösung von 3.1 in 13 min basisliniengetreunt werden (s. Abbildung 18).

Mit einer vergleichbaren ME, bei der lediglich die Konzentration der Ölkomponente, des Co-Tensids und des sulf.  $\beta$ -CDs verringert wurden, war es innerhalb derselben Zeit möglich, *DL-Tyrosin* in seine Enantiomere aufzutrennen. Die Auflösung betrug 3.3 für die ME mit 0.4% (w/w) Ethylacetat, 1.4% (w/w) SDS, 3.6% (w/w) 1-Butanol, 2.8% (w/w) 2-Propanol und 91.8% (w/w) Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.0) (s. Abbildung 18).

Zur Trennung von *DL-Methyldopa* musste die ME dagegen mehrfach angepasst werden. Der pH-Wert wurde, wie bei *DL-Dopa*, auf 2.5 eingestellt und die Salzkonzentration zusätzlich auf 40 mM verdoppelt. Der erhöhte pH-Wert steigert minimal den EOF, der in Richtung Kathode fließt und der bei pH 2.0 gänzlich unterdrückt ist. Die Anhebung der Salzkonzentration erhöht die Viskosität des HGE. Beide Veränderungen bewirken eine verlängerte Migrationszeit, wodurch dem Analyten ein längerer Zeitraum für Wechselwirkungen mit dem chiralen Selektor zur Verfügung steht. Im Gegensatz zur ME, die zur Trennung von *DL-Dopa* eingesetzt wurde, modifizierte 2-Propanol wieder den HGE, mit den oben genannten Effekten. Mit

einer gesteigerten Konzentration an sulf.  $\beta$ -CD auf 4.0% wurde das Racemat innerhalb von 17 min getrennt ( $R_s$ : 1.4), wobei die ME aus 1.0% (w/w) Ethylacetat, 1.5% (w/w) SDS, 3.0% (w/w) 1-Butanol, 2.0% (w/w) 2-Propanol und 92.5% (w/w) Phosphatpuffer (40 mM, pH 2.5) bestand (s. Abbildung 18).



**Abbildung 18: optimierte CD-modifizierte MEEKC-Methoden für die rac. Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Methyldopa und Dopa.**

Vergleicht man diese Trennungen nun mit den unterschiedlichen CE-Methoden, die in der Literatur beschrieben und in der Übersicht (Kapitel 4.1.1) aufgeführt sind, kann man erkennen, dass die genannten Mängel (wie teure chirale Selektoren, lange Migrationszeit und unvollständige Trennungen) mittels der MEEKC-Methode nicht auftreten. Alle vier Stoffe konnten mittels dem kommerziell leicht verfügbaren sulf.  $\beta$ -CD basisliniengetrennt werden. Die langen Migrationszeiten von über 20 min für Phenylalanin, Tyrosin und Dopa [132, 133, 134] waren mit den entwickelten MEEKC-Methoden deutlich kürzer. Mit Hilfe einer ME konnten demnach Methoden entwickelt werden, die bessere Ergebnisse erzielten, als bereits veröffentlichte Methoden

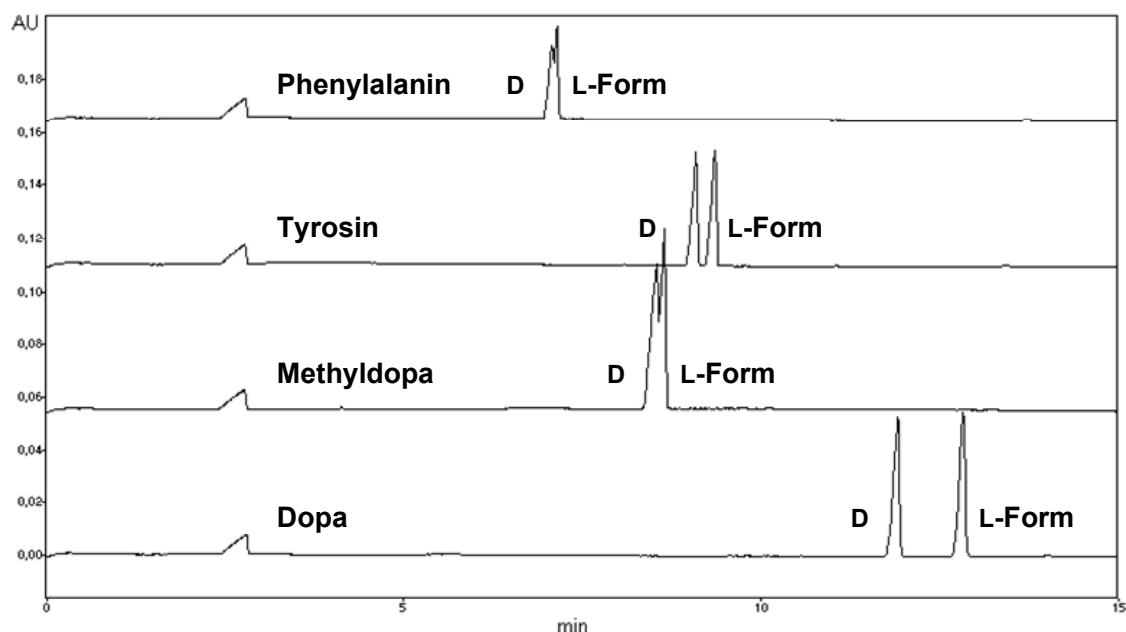
#### 4.1.3.2 Allgemein anwendbare Methoden

Im vorhergehenden Kapitel wurden individuelle Methoden beschrieben, die zur Trennung der Racemate führten. Im nächsten Schritt sollte eine allgemein



anwendbare Methode entwickelt werden, die alle vier Aminosäuren trennt. Um den Einfluss der einzelnen Komponenten der ME zu vergleichen, wurden drei verschiedene MEs herangezogen, die alle mit 4.0% sulf.  $\beta$ -CD versetzt wurden. Die Messbedingungen zwischen den einzelnen Methoden wurde nicht verändert und wie bei den Trennungen von DL-Tyrosin, DL-Methyldopa und DL-Dopa zuvor auf eine Spannung von -15 kV und eine Temperatur von 20 °C festgesetzt.

Die Zusammensetzung der zuerst untersuchten ME war ähnlich die der ME für die Trennung von DL-Dopa bzw. DL-Methyldopa. Die Bestandteile waren 1.0% (w/w) Ethylacetat, 1.5% (w/w) SDS, 3.0% (w/w) 1-Butanol und 94.5% (w/w) Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5) (*ME I*). Bei Einsatz dieses HGE migrierten alle Racemate innerhalb von 12 min, wobei nur für DL-Dopa und DL-Tyrosin Basislinientrennung erfolgte ( $R_s$ : 5.5 und 1.8). DL-Methyldopa und DL-Phenylalanin ließen sich nur partiell trennen (s. Tabelle 8 und Abbildung 19).



**Abbildung 19: Trennung der Aminosäuren mit *ME I***

Nach vielen Modifikationsschritten und der daraus resultierenden *ME II* konnten alle vier Aminosäure-Racemate voneinander basisliniengetrennt werden. Der Anteil an SDS war im Gegensatz zu *ME I* leicht erniedrigt, der Anteil an 1-Butanol dagegen erhöht. Insgesamt wurde die Konzentration an oberflächen aktiven Substanzen angehoben, so dass sich in der ME mehr oder auch

stabilere Öltröpfchen bilden konnten. So wurden wiederum die hydrophoben Wechselwirkungen im HGE unterstützt. Außerdem wurde 2-Propanol als organischer Modifier eingesetzt, so dass *ME II* mit den Bestandteilen 1.0% (w/w) Ethylacetat, 1.4% (w/w) SDS, 4.0% (w/w) 1-Butanol, 2.8% (w/w) 2-Propanol und 90.8% (w/w) Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5) entstand. Die Trennungen erfolgten innerhalb von 26 min (s. Tabelle 8 und Abbildung 20).

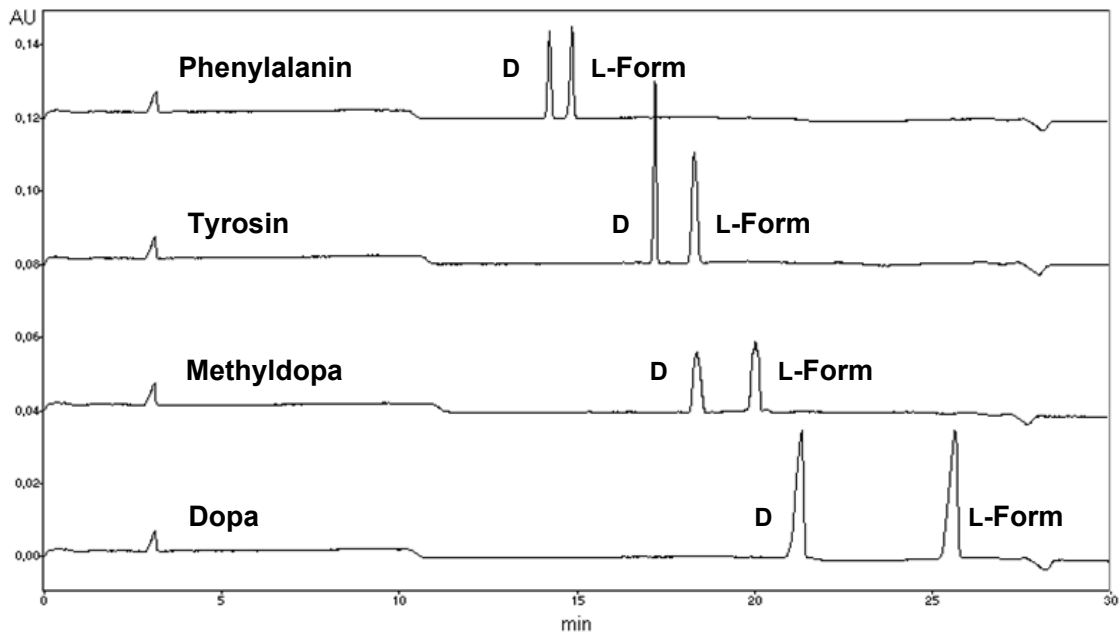
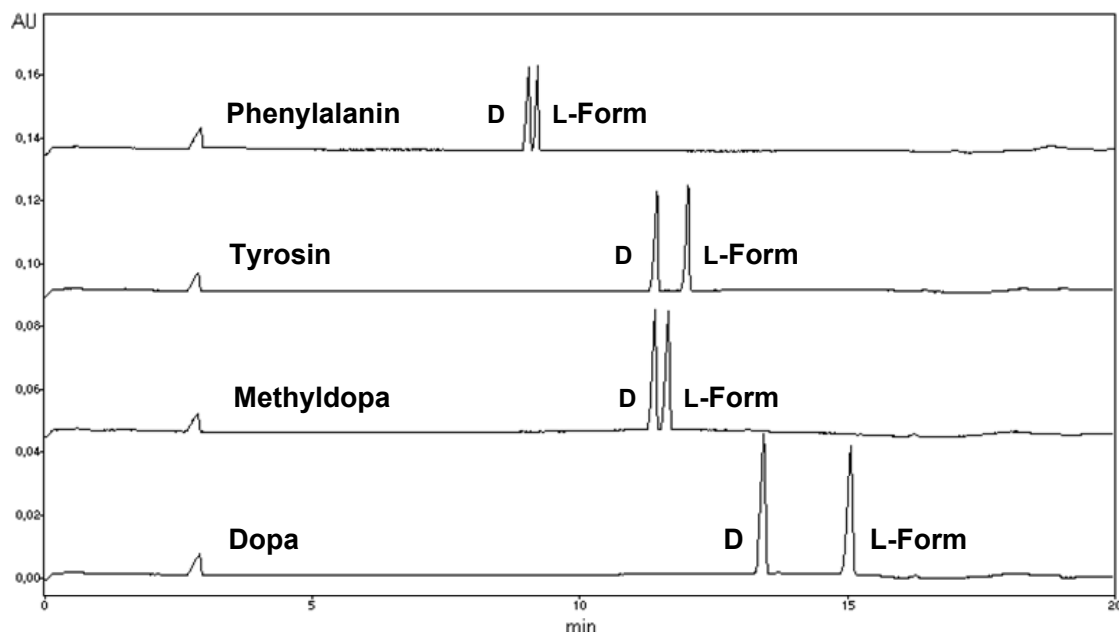


Abbildung 20: Trennung der Aminosäuren mit *ME II*

Mit *ME II* wurden für alle vier racemischen Aminosäuren gute Auflösungen erreicht. Nachteilig war die lange Migrationszeit. Um die Analysenzeit zu verkürzen, wurden weitere Variationen an der ME vorgenommen. Sowohl der Anteil der Ölkomponente, also auch der Anteil von 1-Butanol und 2-Propanol wurden verringert, die Konzentration von SDS wieder minimal angehoben. Der Effekt der vermehrten und stabileren Öltröpfchen wurde weitestgehend zurück genommen, der organische Modifier mit seinem positiven Einfluss jedoch beibehalten. Durch die verringerte Konzentration an Bestandteilen wurde zusätzlich die Viskosität der HGE verringert, was die Migrationszeiten der Substanzen grundsätzlich verkürzt. Die Komponenten von *ME III* lagen in folgenden Anteilen vor: 0.5% (w/w) Ethylacetat, 1.5% (w/w) SDS, 3.0% (w/w) 1-Butanol, 2.0% (w/w) 2-Propanol und 93.0% (w/w) Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5). Mit *ME III* und 4.0% sulf.  $\beta$ -CD konnten die vier racemischen

Aminosäuren innerhalb 15 min mit zufriedenstellender Auflösung getrennt werden (s. Tabelle 8 und Abbildung 21).



**Abbildung 21: Trennung der Aminosäuren mit ME III**

Bei pH 2.5 sind alle Substanzen positiv geladen und der EOF ist fast komplett unterdrückt, da auch die Silanolgruppen der Kapillaroberfläche größtenteils protoniert vorliegen. Aufgrund ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses werden die Substanzen von der Kathode angezogen und besitzen eine Eigenbewegung in diese Richtung. Neben dieser Antriebskraft wechselwirken die Substanzen auch mit dem HGE, indem sie sich zwischen den negativ geladenen Öltröpfchen der ME oder den negativ geladenen CDs und dem wässrigen Puffer verteilen. Die negativ geladenen Komplexe bewegen sich zur Anode, also in die entgegengesetzte Richtung. Bei diesen Messungen musste Umkehrspannung an das System angelegt werden, um die Analyten detektieren zu können. Daraus kann man schließen, dass die Substanzen mit den negativ geladenen Komplexen gewandert sind. Sowohl die CDs als auch die Öltröpfchen besitzen ein hydrophobes Inneres, mit dem unpolare Substanzen stärker und damit länger wechselwirken als polare.

Die Migrationsreihenfolge Phenylalanin > Tyrosin  $\approx$  Methyldopa > Dopa kann demnach anhand der Polarität der Substanzen erklärt werden, die mit wachsender Anzahl der phenolischen OH-Gruppen ansteigt. Phenylalanin besitzt keine OH-Gruppe und wird so als erstes an der Anode detektiert, da es

das stärkste Inklusionsverhalten in die Komplexe zeigt. Tyrosin mit einer OH-Gruppe folgt in der Reihenfolge, ebenso wie Methyldopa, das zwar zwei OH-Gruppen ausweist, dessen Polarität aber durch die zusätzliche Methylgruppe reduziert ist. Den Abschluss bildet das polare Dopa.

**Tabelle 8: Zusammensetzungen der ME I, II und III und Ergebnisse der Trennungen der untersuchten Aminosäuren.**

Zusammensetzung	<i>ME I</i>		<i>ME II</i>		<i>ME III</i>	
Ethylacetat [%]	1.0		1.0		0.5	
SDS [%]	1.5		1.4		1.5	
1-Butanol [%]	3.0		4.0		3.0	
2-Propanol [%]	0.0		2.8		2.0	
Phosphatpuffer 20 mM, pH 2.5 [%]	94.5		90.8		93.0	
Aminosäure	$t_m$	$R_s$	$t_m$	$R_s$	$t_m$	$R_s$
Dopa	12	5.5	21	10.3	14	5.4
Tyrosin	9	1.8	17	3.6	11	8.4
Phenylalanin	7	<b>0.5</b>	15	4.5	9	1.4
Methyldopa	8	<b>0.4</b>	18	5.6	11	1.9

$t_m$  = Migrationszeit [min] des zuerst detektierten Peaks, d. h. der D-Form jeder Aminosäuren.

Vergleicht man die mit den verschiedenen MEs erhaltenen Migrationszeiten und Auflösungen der Enantiomere, lassen sich folgende Tendenzen erkennen. Ohne Einsatz eines organischen Modifiers (*ME I*) migrieren die Aminosäuren innerhalb kurzer Zeit. Dabei ist jedoch die Trennung für DL-Phenylalanin und DL-Tyrosin nicht ausreichend. Durch Zugabe von 2-Propanol steigen sowohl die Migrationszeiten als auch die Werte für die Auflösung der Enantiomere stark an. Mit reduziertem Anteil der Ölkomponente und des Co-Tensids werden die Analysenzeiten wieder verkürzt, wobei für alle untersuchten Aminosäuren eine Basislinientrennung erreicht werden kann.

#### 4.1.4 Validierung

Die in diesem Abschnitt der Arbeit entwickelten Methoden wurden hinsichtlich der Wiederholpräzision (Auflösung, Migrationszeiten, Verhältnis der korrigierten Peakflächen und Anzahl der theoretischen Böden) und der Detektionsgrenze validiert.

##### 4.1.4.1 Wiederholpräzision

Da sich sowohl mit den individuell entwickelten Methoden als auch mit *ME II* und *ME III* gute Ergebnisse erzielen ließen, wurden diese Methoden in Hinblick auf die Wiederholpräzision validiert. *ME I* wurde hierfür aufgrund der schlechten Trennung von Phenylalanin und Methyldopa nicht berücksichtigt.

Für die Untersuchungen wurde die Auflösung der Enantiomere, die Migrationszeiten beider Peaks und das Verhältnis der korrigierten Peakflächen ermittelt und die relative Standardabweichung (RSD) in Prozent bestimmt. Die Analysenlösungen bestanden aus 0.2 mg/ml jedes Enantiomers und wurden sechs Mal injiziert. Die Gerätebedingungen und die Zusammensetzung der ME waren für jede Messung, der Methode entsprechend, identisch. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 9: Ergebnisse der Bestimmung der Wiederholpräzision von jeweils sechs Messungen**

Aminosäure	Auflösung		Migrationszeit				Verhältnis der korrigierten Peakflächen	
	$R_s$	RSD [%]	D-AS [min]	RSD [%]	L-AS [min]	RSD [%]	Peak1/ Peak2	RSD [%]
<i>mit individuell entwickelten Methoden:</i>								
Phenylalanin	3.14	2.43	13.1	0.99	13.7	1.23	0.97	2.97
Tyrosin	3.27	2.67	12.4	0.60	13.0	0.64	1.00	0.43
Methyldopa	1.40	1.17	17.0	1.88	17.3	1.91	1.00	0.58
Dopa	3.10	1.45	9.5	0.98	9.8	0.98	1.03	0.27

Fortsetzung Tabelle 9

<i>mit ME II:</i>								
	$R_s$	RSD [%]	D-AS [min]	RSD [%]	L-AS [min]	RSD [%]	Peak1/ Peak2	RSD [%]
Phenylalanin	4.5	1.95	14.6	2.02	15.2	2.16	1.01	0.59
Tyrosin	3.6	1.37	17.2	0.42	18.3	0.57	1.00	2.28
Methyldopa	5.6	2.36	18.3	0.60	20.0	0.51	1.11	8.61
Dopa	10.3	0.80	21.3	0.82	25.6	1.08	1.05	1.47
<i>mit ME III:</i>								
	$R_s$	RSD [%]	D-AS [min]	RSD [%]	L-AS [min]	RSD [%]	Peak1/ Peak2	RSD [%]
Phenylalanin	1.4	2.54	8.9	2.47	9.0	2.54	1.00	0.90
Tyrosin	8.4	1.17	11.2	1.91	11.8	1.96	1.00	0.44
Methyldopa	1.9	1.89	11.2	1.99	11.4	2.01	0.99	0.38
Dopa	5.4	2.60	13.5	2.11	15.2	2.55	1.04	1.67

D-AS: D-Form jeder Aminosäure, Peak 1

L-AS: L-Form jeder Aminosäure, Peak 2

Mit den individuell entwickelten Methoden wurden für alle untersuchten Parameter sehr gute Ergebnisse ermittelt. Alle RSD-Werte lagen unter 3%. Für die Untersuchungen der Migrationszeiten bzw. des Verhältnisses der korrigierten Peakflächen ergaben sich sogar viele Werte von unter 1%, was auf eine hohe Präzision hinweist.

Für die Messungen mit *ME II* und *III* wurden ebenfalls zufriedenstellende Werte erzielt. Hier lag die maximale RSD für alle untersuchten Parameter bei 2.60%. Einzig die große Standardabweichung des Verhältnisses der Peakflächen von Methyldopa (mit *ME II*) ist auffallend. Diese Schwankung von über 8% könnte durch die Form der Peaks zustande kommen, die von der Form einer idealen Gauß-Kurve deutlich abweicht, da sie eine sehr breite und unsymmetrische Form aufweisen (s. Abbildung 20). Insgesamt liefern aber auch die beiden allgemein anwendbaren Methoden präzise Ergebnisse mit Werten von unter

3%. In Analogie zu den individuell entwickelten Methoden finden sich unter den Migrationszeiten und den Verhältnissen der korrigierten Peakflächen sehr gute RSD-Werte von unter 1%.

Um die Auffälligkeit der schlechten Peakform von Methyldopa mit *ME II* genauer zu untersuchen, wurden die Messungen der Wiederholpräzision zusätzlich in Hinblick auf die Anzahl der theoretischen Böden ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Auswertung der Wiederholpräzision von jeweils sechs Messungen: Zahl der theoretischen Böden.**

Aminosäure	Anzahl der theoretischen Böden N			
<i>mit individuell entwickelten Methoden:</i>				
	N der D-AS	RSD [%]	N der L-AS	RSD [%]
Phenylalanin	107363	3.47	57747	2.67
Tyrosin	71223	3.06	88299	2.74
Methyldopa	102197	3.24	102651	2.45
Dopa	88025	3.76	98574	3.34
<i>mit ME II:</i>				
Phenylalanin	101444	2.72	102051	2.28
Tyrosin	158158	2.87	90492	3.71
Methyldopa	49642	4.65	50407	3.89
Dopa	53016	2.90	56329	2.75
<i>mit ME III:</i>				
Phenylalanin	103936	3.18	103957	3.22
Tyrosin	107941	2.84	119117	3.51
Methyldopa	122193	3.13	116193	2.76
Dopa	118948	3.09	108284	1.49

D-AS: D-Form jeder Aminosäure, Peak 1

L-AS: L-Form jeder Aminosäure, Peak 2

Die Bodenzahl gibt, wie in Kapitel 1.2.1.2 beschrieben, Auskunft über die Effizienz des Systems und ist abhängig von der Peakhalbwertsbreite und der Migrationszeit. Dementsprechend weisen schmale Peaks eine höhere Anzahl an theoretischen Böden auf als breite Peaks, was für eine größere Effizienz der Trennung spricht.

Betrachtet man die Anzahl der theoretischen Böden aus den Messungen mit den individuell entwickelten Methoden, ist besonders auffällig, dass der Wert von L-Phenylalanin (N: 57747) lediglich halb so groß ist wie der Wert der D-Aminosäure, die mit einer Bodenzahl von 107363 ein gutes Ergebnis aufweist. Das Elektropherogramm mit dem kleineren und breiteren zweiten Peak (D-Phenylalanin) verdeutlicht diese Auswertung. Ebenso kann man die Bodenzahlen für Tyrosin erklären (N: 71223 und 88299), wenn man die relativ breiten Peaks betrachtet. Dass auch der Wert von Dopa nicht viel größer ist, liegt an der kürzeren Migrationszeit.

Bei den Messungen mit *ME II* sticht die hohe Anzahl an theoretischen Böden für D-Tyrosin ins Auge, was aufgrund der schmalen Peakform zu erwarten war. Dagegen zeigen Dopa und Methyldopa breite Peaks mit entsprechend niedrigen Werten für N.

Wie auch schon bei der Auswertung der Migrationszeiten, konnten auch für die Bodenzahlen die besten Ergebnisse mit *ME III* erzielt werden. Die Werte liegen für alle acht Enantiomerenpeaks über 100000 und bestätigen damit die Effizienz der Methode.

Betrachtet man die Untersuchungen der Bodenzahlen in Hinblick auf die Abweichungen der einzelnen Messungen, fällt auf, dass die Schwankungen der prozentualen RSD relativ gering sind. Die meisten Werte liegen um die 3%, es gibt keine Ausreißer. Die höchsten Abweichungen, mit Werten von 4.65 und 3.89%, sind bei Methyldopa zu finden, das mit *ME II* vermessen wurde. Diese Messungen ergaben auch die schlechten Werte für das Verhältnis der korrigierten Peakflächen (RSD: 8.61%). Die beiden niedrigen und breiten Peaks von DL-Methyldopa sind nicht gut reproduzierbar, wodurch sich die Flächen bei mehreren Messungen unterscheiden können. Zusätzlich bedingt die ungünstige Peakform eine schlechtere Effizienz der Trennung, was die geringe Bodenzahl zeigt.



Alle Messungen betrachtend liegt für die Anzahl der theoretischen Böden kein RSD-Wert über 5%, so dass sicher ist, dass die Methode präzise Ergebnisse liefert.

#### 4.1.4.2 Detektionsgrenzen

Für die individuell entwickelten MEEKC-Methoden wurden zusätzlich die Detektionsgrenzen bzw. *limit of detection* (LOD) gemäß Ph. Eur. 7 (Signal-Rausch-Verhältnis 3:1) untersucht. Für die natürliche L-Form der Aminosäuren wurde der absolute LOD-Wert bestimmt. Dabei ergab sich für L-Phenylalanin eine Grenze von 1.0 µg/ml, für L-Tyrosin von 0.2 µg/ml, für L-Methyldopa von 2.0 µg/ml und für Levodopa von 0.5 µg/ml. Diese Grenzwerte spielen besonders für die pharmazeutisch eingesetzten Stoffe Methyldopa und Levodopa eine wichtige Rolle, falls die Plasmaspiegel eines Patienten analytisch überprüft werden sollen. Nach oraler Gabe einer üblichen Dosis von 250 mg Levodopa bzw. 750 mg Methyldopa, werden maximale Plasmakonzentrationen von 2.4 µg/ml [141] bzw. 3.6 µg/ml [142] erreicht. Diese Substanzkonzentrationen können mit den entwickelten Methoden detektiert werden, d. h., sie können für entsprechende analytische Tests herangezogen werden.

Außerdem wurde für jede D-Aminosäure, die als Verunreinigung der L-Form behandelt werden kann, der prozentuale LOD-Wert in Anwesenheit der Hauptkomponente (der entsprechenden L-Aminosäure) ermittelt. D-Phenylalanin kann neben seiner Hauptkomponente bis zu einem Gehalt von 0.44% detektiert werden. Die Grenzen für D-Tyrosin und D-Methyldopa lagen bei 0.33%. Die niedrigst gelegene Grenze bei einem Wert von 0.22% konnte für D-Dopa bestimmt werden. Diese prozentualen Werte liegen sehr niedrig, was eine gute Methode auszeichnet.

Im Ph. Eur. 7 wird in den Monographien von Levodopa und L-Methyldopa die Enantiomerenreinheit bestimmt, wobei die Grenzen für das entsprechende D-Enantiomer jeweils auf 0.5% festgelegt sind. Da mit der entwickelten MEEKC-Methode für D-Dopa und D-Methyldopa Werte von 0.22 bzw. 0.33% im

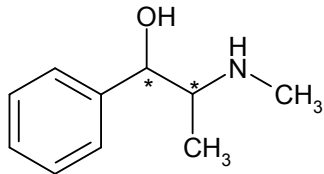
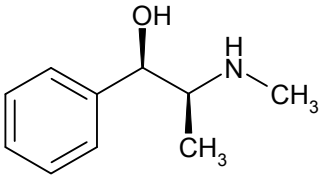
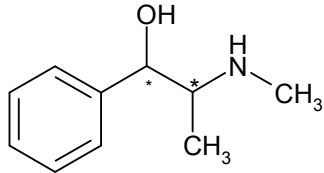
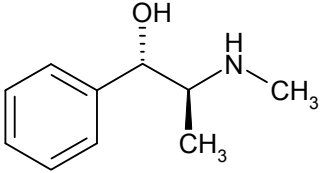
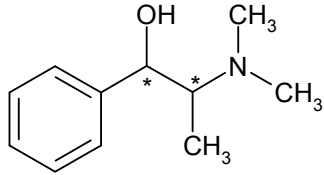
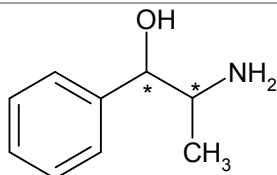
Verhältnis zur Hauptkomponente erreicht werden, kann sie zur Bestimmung auf Arzneibuchqualität herangezogen werden.

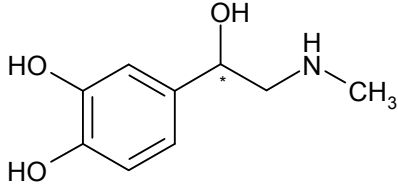
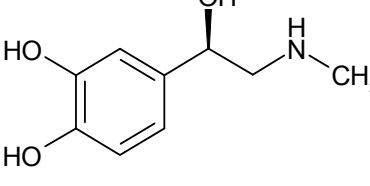
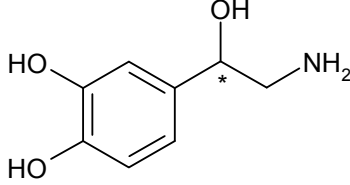
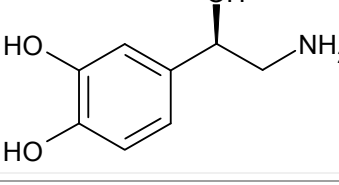
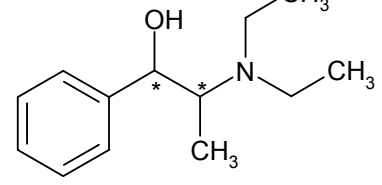
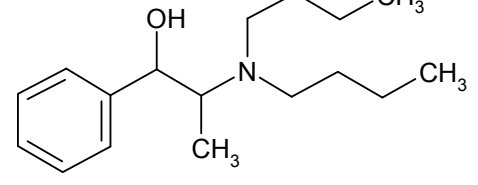
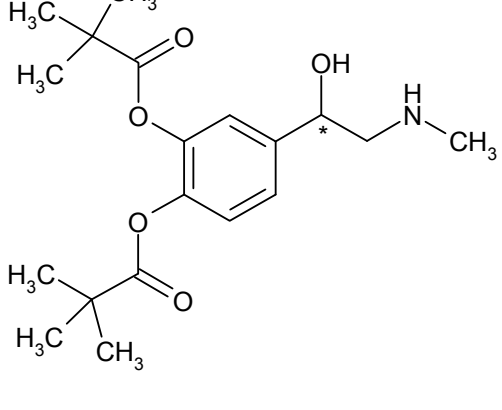

## 4.2 Ephedrin-Derivate

### 4.2.1 Übersicht

Ephedrin ist der Hauptwirkstoff von *Ephedra vulgaris* und kann wie einige seiner Derivate als indirektes Sympathomimetikum eingesetzt werden. Die Grundstruktur geht auf  $\beta$ -Phenylethylamin zurück [93]. Im Folgenden sind die untersuchten Substanzen tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Ephedrin-Derivate

Substanz	Beschrieben im Ph. Eur. 7	allgemeine Angaben
 <p><b>Ephedrin</b></p>	 <p>(1<i>R</i>,2<i>S</i>)-Ephedrin</p> <p>als Base als HCl-Salz als Hemihydrat</p>	<p><math>M_r</math>: 165.2 g/mol <math>C_{10}H_{15}NO</math></p> <p>CAS: 229-42-3 CAS: 50-98-6 CAS: 50906-05-3</p>
	als HCl-Salz des Racemats	CAS : 134-71-4
 <p><b>Pseudoephedrin</b></p>	 <p>(1<i>S</i>,2<i>S</i>)-Pseudoephedrin als HCl-Salz</p>	<p><math>M_r</math>: 165.2 g/mol <math>C_{10}H_{15}NO</math></p> <p>CAS: 345-78-8</p>
 <p><b>(N)-Methylephedrin</b></p>	nicht offizinell	<p><math>M_r</math>: 179.3 g/mol <math>C_{11}H_{17}NO</math> CAS: 552-79-4 für (1<i>R</i>,2<i>S</i>)-Form</p>
 <p><b>Norephedrin</b></p>	als HCl-Salz des Racemats	<p><math>M_r</math>: 151.2 g/mol <math>C_9H_{13}NO</math> CAS: 154-41-6</p>

 <p><b>Adrenalin</b></p>	 <p>(1<i>R</i>)-Adrenalin</p>	<p><math>M_r</math>: 183.2 g/mol  <math>C_9H_{13}NO_3</math></p> <p>CAS: 51-43-4</p>
 <p><b>Noradrenalin</b> (nur bei Verunreinigungsuntersuchungen eingesetzt)</p>	 <p>(1<i>R</i>)-Noradrenalin</p> <p>als HCl-Salz                  als Tartrat-Salz</p>	<p><math>M_r</math>: 205.6 g/mol  <math>C_8H_{11}NO_3</math></p> <p>CAS: 329-56-6                  CAS: 108341-18-0</p>
 <p><b>Diethylnorephrin</b></p>	<p>nicht offizinell</p>	<p><math>M_r</math>: 243.8 g/mol  <math>C_{13}H_{21}NO</math>                  CAS: 37025-56-2 für (1<i>S</i>,2<i>R</i>)-Form</p>
 <p><b>2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol</b></p>	<p>nicht offizinell</p>	<p><math>M_r</math>: 263.4 g/mol  <math>C_{17}H_{29}NO</math>                  CAS: 1190202-22-2 für (1<i>S</i>,2<i>S</i>)-Form</p>
 <p><b>Dipivefrin</b></p>	<p>als HCl-Salz des Racemats</p>	<p><math>M_r</math>: 351.4 g/mol  <math>C_{19}H_{29}NO_5</math></p> <p>CAS: 64019-93-8</p>
 <p><b>2-Amino-1-phenylethanol</b></p>	<p>nicht offizinell</p>	<p><math>M_r</math>: 137.2 g/mol  <math>C_8H_{11}NO</math>                  CAS: 2549-14-6 für (<i>R</i>)-Form</p>

#### 4.2.1.1 Physiologie

Viele Derivate von  $\beta$ -Phenylethylaminen, im Folgenden kurz PEA genannt, bilden zusammen mit verschiedenen Imidazol-Verbindungen (z. B. Naphazolin, Clonidin) die Gruppe der Adrenozeptor-Agonisten. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren, die weiter in  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - sowie in  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren unterteilt werden.

Adrenozeptoren kommen sowohl im zentralen Nervensystem als auch in der Peripherie vor, wobei sie im peripheren Gewebe den Sympathikus aktivieren. Physiologisch wirken die im Nebennierenmark gebildeten Hormone Adrenalin und Noradrenalin (die aus Phenylalanin, Tyrosin und Dopa synthetisiert werden, s. Kapitel 4.1.1) aktivierend auf den Sympathikus.

Weiterhin unterscheidet man zwischen *direkt* und *indirekt* wirkenden Sympathomimetika. Im Unterschied zu den direkten Sympathomimetika, die an den Adrenozeptoren selbst als Agonisten wirken, setzen die indirekten Sympathomimetika Noradrenalin aus den Speichergranula der sympathischen Nervenendigungen frei und hemmen dessen Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt und den Metabolismus. Dieses erhöhte Noradrenalinangebot steigert den Sympathikustonus, was wiederum zu einer  $\alpha$ -adrenergen Vasokonstruktion führt. Durch die Leerung der Speicher von Noradrenalin kann eine längerfristige Gabe von indirekten Sympathomimetika zu Tachyphylaxie führen [93, 94].

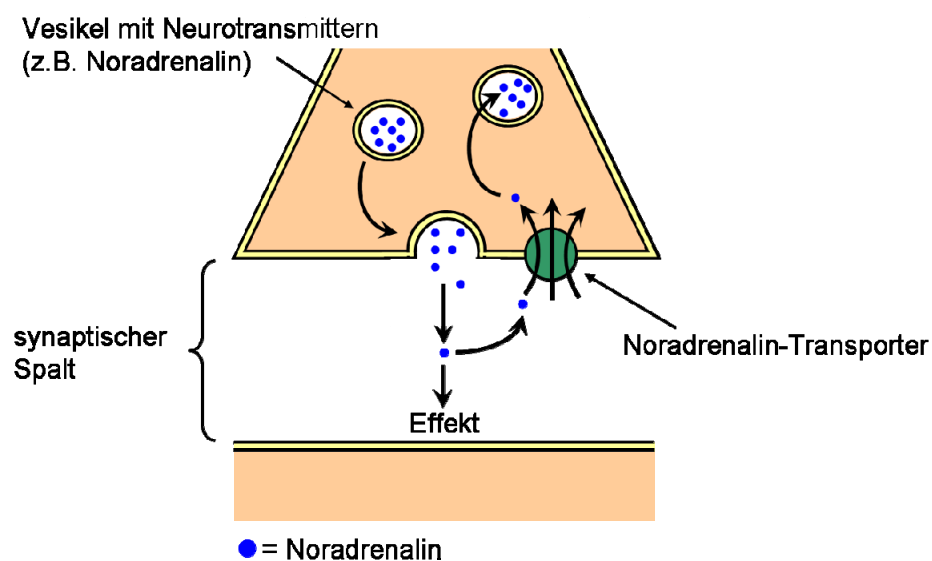


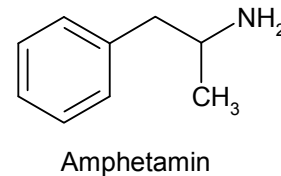
Abbildung 22: Noradrenalin-Ausschüttung in den synaptischen Spalt.

#### 4.2.1.2 Pharmakologie

In *Ephedra vulgaris* finden sich neben dem Hauptwirkstoff Ephedrin auch die drei Derivate Pseudo-, Methyl- und Norephedrin [143, 144]. Früher wurde *Ephedra Herba* als Asthma-Medikament eingesetzt, da es bronchodilatatorisch wirkt. Heute finden Ephedrin und viele seiner Derivate ihren Einsatz hauptsächlich bei Erkältungskrankheiten und Allergien. Dort wirken sie als orale Bronchodilatoren und Vasokonstriktoren [62, 93, 94].

Dipivefrin, ein Ester und gleichzeitig Prodrug von Adrenalin, findet, genau wie Adrenalin selbst, Einsatz am Auge. Beim chronischen Offenwinkelglaukom senken sie den Augeninnendruck. Der genaue Wirkmechanismus hierzu ist allerdings noch unklar [94].

Die angesprochenen PEA besitzen strukturell gesehen auch große Ähnlichkeit zu Amphetamin. Diese Verwandtschaft erklärt auch, warum viele PEA missbräuchlich als Anorektika oder Dopingmittel verwendet werden.



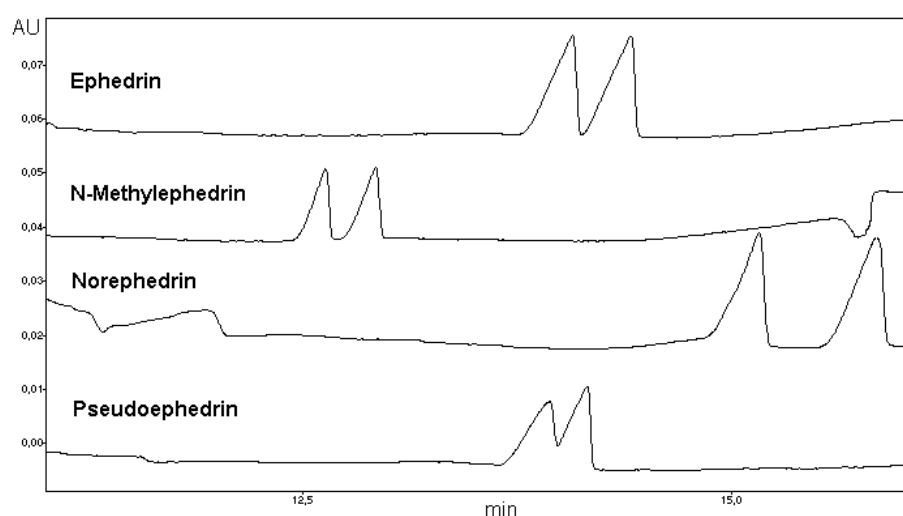
#### 4.2.2 Aufgabenstellung

Die Racemate von Ephedrin, Pseudoephedrin, *N*-Methylephedrin und Norephedrin sollten mittels CD-modifizierter MEEKC-Methode getrennt werden, um mit der von *Wedig et al.* [145, 146] entwickelten CZE-Methode verglichen zu werden. Diese CZE-Methode wurde deshalb der Entwicklung der MEEKC-Methode zu Grunde gelegt. Die MEEKC-Methode wurde danach zur Trennung weiterer Ephedrin-Derivaten verwendet.

#### 4.2.3 Methodenentwicklung

Zunächst wurde eine ME, ausgehend von den Parametern der CZE-Methode, mit 50 mM Phosphatpuffer pH 3.0 hergestellt. Als weitere Bestandteile dienen 0.4% Ethylacetat als Ölkomponente, 1.4% SDS als Tensid, 3.6% 1-Butanol als Co-Tensid und 2.8% 2-Propanol als organischer Modifier. Auch der chirale

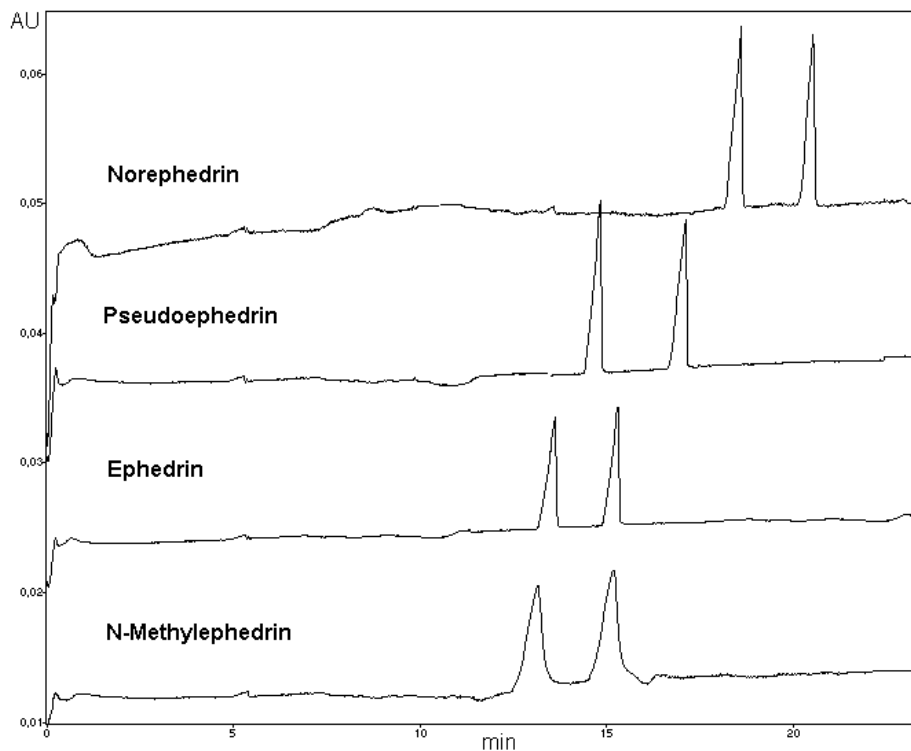
Selektor HDAS- $\beta$ -CD wurde übernommen und vierprozentig der ME zugefügt. Bei 20 °C und einer Spannung von -15 kV wurden für racemisches Ephedrin, *N*-Methylephedrin und Norephedrin Auflösungen von maximal 0,5 erreicht, die Enantiomere von Pseudoephedrin migrierten zeitgleich. Eine Erhöhung der CD-Konzentration auf 4.5 bzw. 5.0% verbesserte die Trennung zwar in geringem Maße, jedoch wuchs das Rauschen der Basislinie stark an, so dass ein weiterer Zusatz an HDAS- $\beta$ -CD nicht möglich war. Um die Selektivität zu erhöhen, wurde die ME folgendermaßen modifiziert. Zuerst wurde die Konzentration der Ölkomponente verdoppelt, was zu größeren Öltröpfchen als innere Phase der ME führt und die hydrophoben Wechselwirkungen im System verstärkt. Im zweiten Schritt wurde die Ionenstärke des Phosphatpuffers auf 20 mM reduziert, was besonders die Viskosität des HGE sinken lässt und abschließend die Konzentration an SDS auf 1.0% herabgesetzt, wodurch nochmals die Größe der Öltröpfchen angehoben wird. Mit 4.5% HDAS- $\beta$ -CD und -13 kV konnten für die Racemate von Ephedrin und *N*-Methylephedrin Auflösungen von 1.1 und 1.5 erreicht werden. Dagegen waren zur Trennung von Nor- und Pseudoephedrin weitere Modifikationen nötig. Mit einer Absenkung des pH-Wertes auf 2.5, was weniger die Protonierung der Analyten beeinflusst als viel mehr die Unterdrückung des EOF bewirkt, und einer negativen Spannung von -17 kV konnten die besten Werte mit 5% HDAS- $\beta$ -CD für Nor- und Pseudoephedrin erzielt werden ( $R_s$ : 2.3 und 0.8).



**Abbildung 23: MEEKC-Methode unter individuell optimierten Bedingungen: rac. Ephedrin und *N*-Methylephedrin mit 4.5% HDAS- $\beta$ -CD (ME s. o.), Spannung: -13 kV, Temp.: 20 °C. Rac. Nor- und Pseudoephedrin mit 5.0% HDAS- $\beta$ -CD (ME s. o.), Spannung: -17 kV, Temp.: 20 °C.**

Auch die Enantiomere von Ephedrin wurden nun basisliniengetrennt. Die besten Trennungen, die mit HDAS- $\beta$ -CD erreicht werden konnten, sind in Abbildung 23 dargestellt.

Da nur drei der Substanzen basisliniengetrennt werden konnten und die Form der Peaks auffällig breit, d. h. die Trennleistung ungenügend war, war das Ergebnis nicht zufriedenstellend. Deshalb wurde die Zusammensetzung der ME nochmals geringfügig verändert und schließlich der chirale Selektor HDAS- $\beta$ -CD gegen 4.0% sulf.  $\beta$ -CD ersetzt. Hiermit wurde eine vollständige Trennung aller Ephedrin-Derivate erreicht, die in Abbildung 24 zu sehen ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

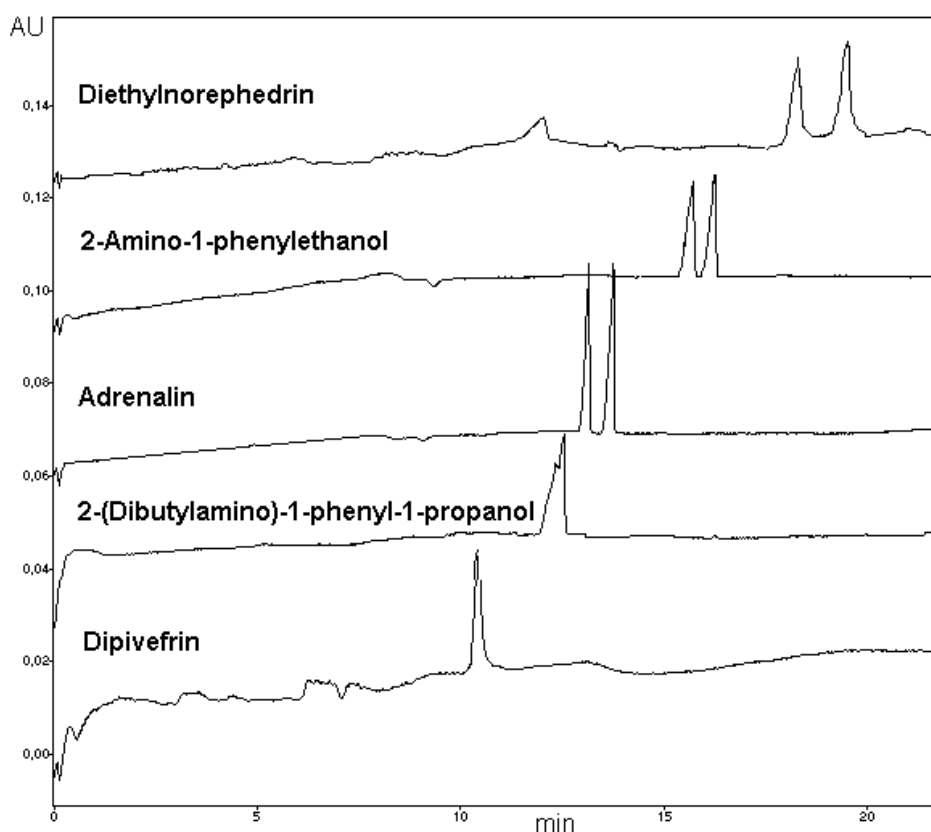


**Abbildung 24:** MEEKC-Methode der rac. Ephedrin-Derivate mit 4.0% sulf.  $\beta$ -CD (ME s. o.), Spannung: -15 kV, Temp.: 20 °C.

Um die jeweiligen Peaks den entsprechenden Enantiomeren zuzuordnen, wurden den Analysenproben höhere Konzentrationen an (+)-Enantiomer zugegeben, so dass diese anhand ihrer Peakgröße identifiziert werden konnten. Dieses „Spiken“ zeigte bei allen vier Ephedrin-Derivaten eine schnellere Migration der (+)-Enantiomere, d. h. (1*S*,2*R*)-Ephedrin, (1*S*,2*R*)-*N*-Methylephedrin, (1*S*,2*R*)-Norephedrin und (1*S*,2*S*)-Pseudoephedrin, im Vergleich zu den (-)-Enantiomeren.



Mit dieser CD-modifizierten MEEKC-Methode sollten im Anschluss noch weitere racemischen Ephedrin-Derivate chiral getrennt werden. Die Enantiomertrennung von Diethylnorephedrin, 2-Amino-1-phenylethanol, Adrenalin, 2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol und Dipivefrin wurde auf diese Weise untersucht (s. Abbildung 25).



**Abbildung 25: MEEKC-Methode für weitere rac. Ephedrin-Derivate. Trennbedingungen s. Abbildung 24**

Für die Racemate von Diethylnorephedrin, 2-Amino-1-phenylethanol und Adrenalin konnte unter gleichen Bedingungen ebenfalls eine Basislinientrennung erreicht werden. Die Enantiomere von 2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol wurden partiell getrennt und das Dipivefrin-Racemat zeigte keine Auflösung. Auch durch weitere Variationen, z. B. der Zusammensetzung der ME, der Art und der Konzentration des chiralen Selektors oder der Trennbedingungen, ließ sich keine Verbesserung erzielen. Die beiden Moleküle scheinen aufgrund der großen Hydrophobizität keine Wechselwirkungen mit der Kavität der  $\beta$ -CDs einzugehen. Außerdem stellen 2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol und Dipivefrin die beiden größten Moleküle in der Untersuchungsreihe

dar. Hier wäre es interessant gewesen derivatisierte  $\gamma$ -CDs als chirale Selektoren einzusetzen, da sie aufgrund des achten Glucosebausteins eine größere Kavität aufweisen. Diese wäre unter Umständen für die beiden großen Moleküle passend gewesen. Leider konnten diese Untersuchungen nicht durchgeführt werden, da die Derivate von  $\gamma$ -CD nicht kostengünstig zu erwerben waren. In Tabelle 12 sind die Werte der chiralen Trennungen aller untersuchten Arzneistoffe gegenübergestellt.

**Tabelle 12: Migrationszeiten und  $R_s$ -Werte aller Ephedrin-Derivate, ermittelt durch MEEKC bzw. CZE**

racemisches Ephedrin-Derivat	$t_m$ [min] MEEKC	$R_s$ MEEKC	$t_m$ [min] CZE	$R_s$ CZE
Dipivefrin	10.4	0.0	-	-
2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol	11.0	1.1	-	-
Adrenalin	13.0	3.5	-	-
<i>N</i> -Methylephedrin	13.2	6.0	14.5	12.4
Ephedrin	13.7	4.0	14.1	11.2
Pseudoephedrin	14.4	5.7	13.9	3.8
2-Amino-1-phenylethanol	15.6	3.4	-	-
Diethylnorephedrin	17.8	2.4	-	-
Norephedrin	18.4	5.0	13.0	8.2

$t_m$ : Migrationszeit des ersten Peaks

#### 4.2.4 Methodenvergleich

Anhand der HDAS- $\beta$ -CD-modifizierten CZE-Methode von *Wedig et al.* [145, 146] konnten alle PEA-Racemate Ephedrin (E), Pseudoephedrin (P), *N*-Methylephedrin (M) und Norephedrin (N) mit hoher Trennleistung und Selektivität in einem Lauf getrennt werden. Dabei migriert zuerst Norephedrin, danach Pseudoephedrin und zum Schluss Ephedrin vor *N*-Methylephedrin. Die beste Auflösung zeigt das Racemat von *N*-Methylephedrin, gefolgt von



Molekül, das Norephedrin, zuerst migriert und die „schwereren“ Substanzen nach steigender Masse folgen.

Der Vergleich der  $R_s$ -Werte der untersuchten PEA zeigt, dass die Werte der Auflösung, mit Ausnahme von *N*-Methylephedrin, für beide Methoden entgegengesetzt sind.

Auflösung:	CZE:	M > E > N > P
	MEEKC:	M > P > N > E

Diese Unterschiede in der Auflösung lassen sich durch die Verwendung von unterschiedlichen chiralen Selektoren erklären.

Für Vergleichszwecke wurden die vier Ephedrin-Derivate auch mittels CZE mit sulf.  $\beta$ -CD als chiraler Selektor (0.7 und 4.0%) untersucht, wobei der HGE einmal aus 20 mM Phosphatpuffer, pH 2.5 (s. MEEKC-Methode) und das andere Mal aus 50 mM, pH 3.0 (s. *Wedig et al.* [146]) bestand. Bei dieser CZE-Methode musste an das System Umkehrspannung angelegt werden, um die Substanzen detektieren zu können, da sie mit den negativ geladenen CDs zur Anode wandern. Jedoch konnte bei keinem der beiden Puffersysteme eine vollständige Trennung erzielt werden. Durch Zugabe von 4.0% sulf.  $\beta$ -CD zum Phosphatpuffer mit 50 mM Salzkonzentration und pH 3.0 wurden lediglich sechs Peaks detektiert, da zwei Peakpaare überlappten. Die relativ hohe Konzentration des chiralen Selektors beschleunigt die Wanderung der Substanzen so stark, dass nur eine ungenügende Trennung stattfinden kann. Wird dagegen die niedrigere Konzentration von 0.7% zugesetzt, sind im HGE mit 50 mM, pH 3.0 sieben Peaks erkennbar (s. Abbildung 27).

Ähnlich verhält es sich für den 20 mM Phosphatpuffer, pH 2.5. Mit 4.0% sulf.  $\beta$ -CD überlappt (+)-Methyldopa mit (+)-Ephedrin, sowie (-)-Methyldopa mit (-)-Norephedrin (s. Abbildung 28).

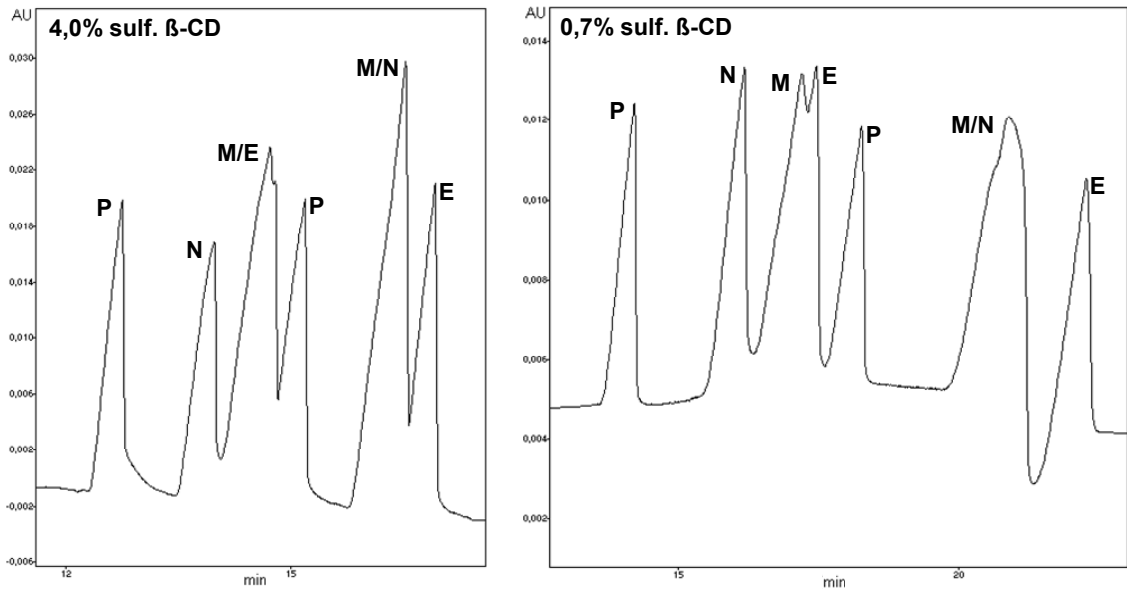


Abbildung 27: CZE-Methode mit 50 mM Phosphatpuffer, pH 3.0.

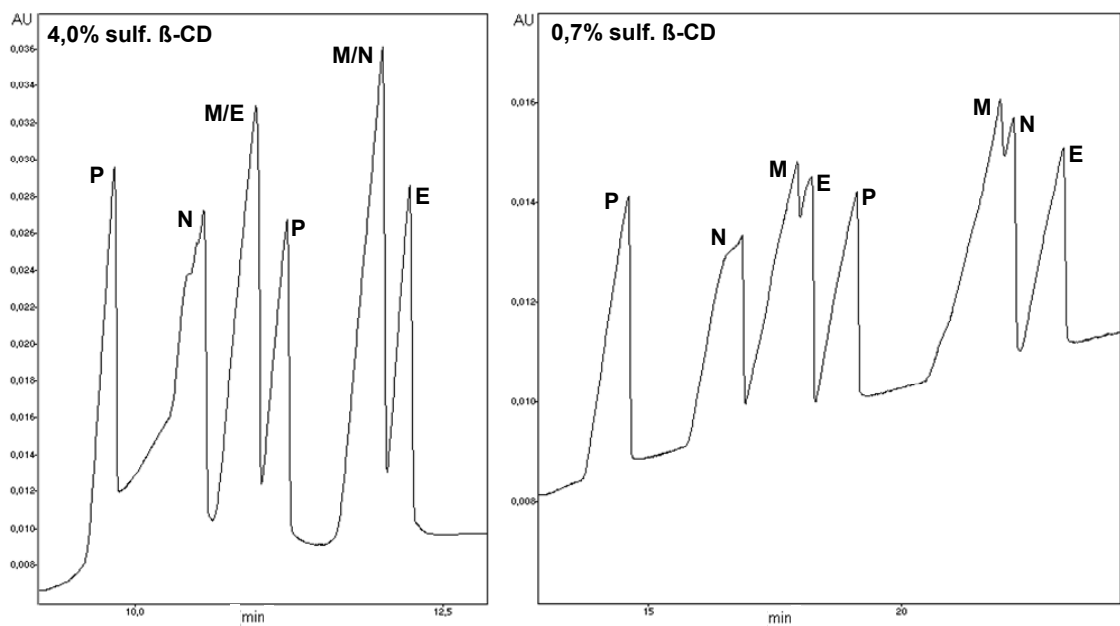


Abbildung 28: CZE-Methode mit 20 mM Phosphatpuffer, pH 2.5.

Die besten Ergebnisse wurden mit 20 mM Phosphatpuffer, pH 2.5 beobachtet. Obwohl zwei Peaks partiell getrennt waren, konnten hier alle acht Substanzen detektiert und zugeordnet werden (s. Abbildung 29).

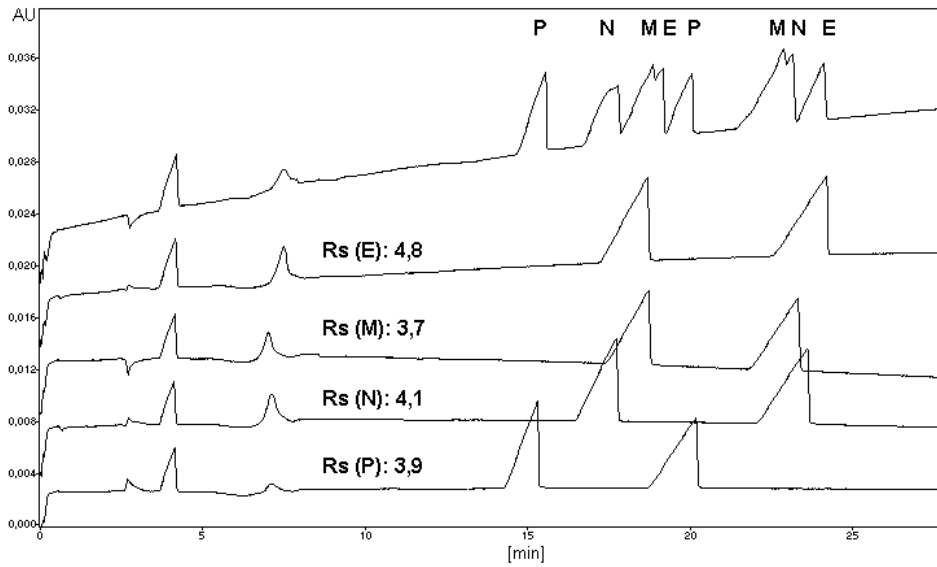


Abbildung 29: CZE mit 20 mM Phosphatpuffer, pH 2.5 mit 0.7% sulf.  $\beta$ -CD.

Durch weitere Anpassung der CD-Konzentration, d. h. durch Erhöhung auf 2.0% sulf.  $\beta$ -CD, konnte zwar die Auflösung zwischen den einzelnen Racematen vergrößert und die Form der Peaks verbessert werden, dennoch wurde keine Basislinientrennung aller vier Racemate in einem Lauf erreicht (s. Abbildung 30).

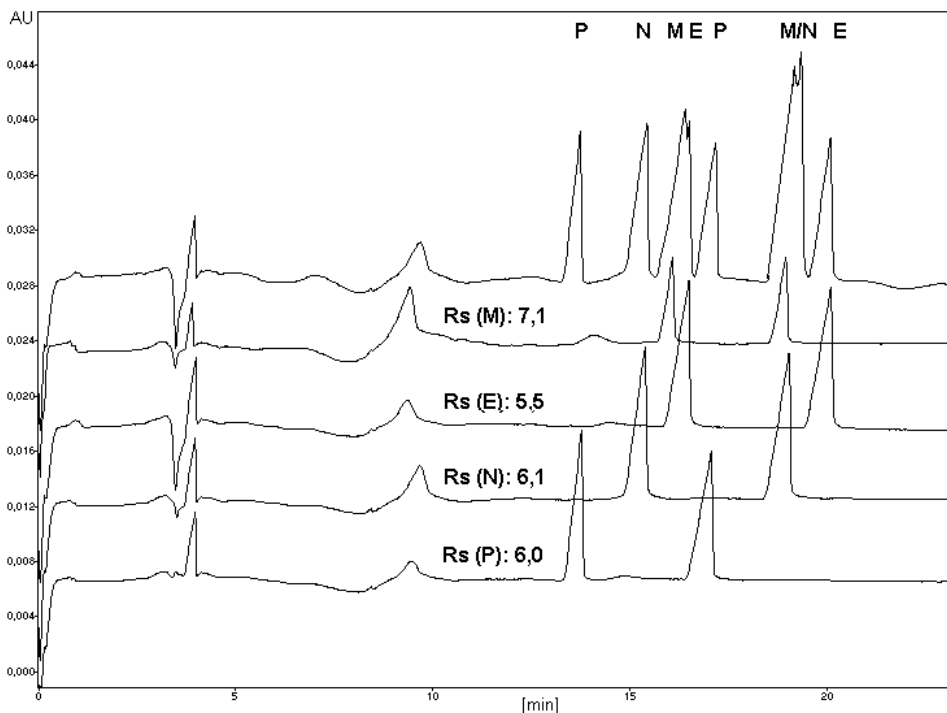


Abbildung 30: CZE mit 20 mM Phosphatpuffer, pH 2.5 mit 2.0% sulf.  $\beta$ -CD.

Die verbesserte Trennleistung des Systems mit 2.0% im Gegensatz zu 0.7% des chiralen Selektors lässt sich nicht nur an den höheren  $R_s$ -Werten ablesen, sondern auch an der Anzahl der theoretischen Böden für die einzelnen Substanzen. Während die PEA-Enantiomere, die mit 0.7% sulf.  $\beta$ -CD getrennt wurden, alle Bodenzahlen um 3500 (1. Peak) und 5000 (2. Peak) aufweisen, liegt der Wert für N bei den Trennungen mit 2.0% um ein dreifaches höher ( $N_{\text{Peak1}} \approx 11000$ ,  $N_{\text{Peak2}} \approx 14500$ ).

Die Trennung der Ephedrin-Derivate konnte auch mit einer weiteren CZE-Methode erzielt werden. Die Arbeitsgruppe von *Liu et al.* setzte das neutrale Dimethyl- $\beta$ -CD als chiralen Selektor ein [149], womit zeitgleich rac. Ephedrin, rac. *N*-Methylephedrin, rac. Norephedrin und (1*S*,2*S*)-Pseudoephedrin voneinander getrennt werden. Diese Methode verwendet Trispuffer von 50 – 90 mM mit einem pH-Wert von 2.5 und den chiralen Selektor in einer Konzentration von 15 - 45 mM, was 2 - 6% entspricht. Der erste Peak der einzelnen Substanzen erscheint in der Reihenfolge N > E > M > P, ähnlich der CZE-Methode von *Wedig et al.* Die zugehörigen  $R_s$ -Werte wurden von *Liu et al.* nicht genannt. Allerdings sind sie grafisch ausgewertet, woraus man erkennen kann, dass alle racemischen Substanzen innerhalb von 22 min basisliniengetreunt werden.

Beim Vergleich der CZE-Methode von *Wedig et al.* [146] und der MEEKC-Methode zeigen beide sowohl Vor- als auch Nachteile. Mit beiden Methoden werden die Racemate innerhalb 20 min basisliniengetreunt. Wenn alle vier PEA in einem Lauf trennt werden sollen, ist die CZE-Methode aufgrund der verkürzten Analysenzeit von Vorteil. Im Gegensatz hierzu sind mit der MEEKC-Methode vier einzelne Läufe nötig. Werden alle vier PEA-Racemate in einer MEEKC-Analyse untersucht, werden nur sieben Peaks detektiert, da (1*R*,2*S*)-Ephedrin und (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin komigrieren. Jedoch ist gegenwärtig kein Arzneimittel auf dem Markt, das alle PEA enthält, so dass dieses Problem in der Reinheitsanalytik nicht auftauchen sollte. Der große Vorteil der MEEKC ist der Einsatz des deutlich günstigeren sulf.  $\beta$ -CDs im Verhältnis zum 20-fach teurerem HDAS- $\beta$ -CD. Zusätzlich konnte diese Methode auch die Enantiomere

weiterer Ephedrin-Derivate, und zwar von Diethylnorephedrin, 2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol, 2-Amino-1-phenylethanol und Adrenalin, trennen.

#### **4.2.5 Validierung**

Die entwickelte, mit sulf.  $\beta$ -CD modifizierte MEEKC-Methode wurde anhand von Ephedrin und Pseudoephedrin in Bezug auf Präzision, Robustheit, Linearität des Gehalts der Verunreinigung und Detektionsgrenze validiert.

##### Präzision

Um die Präzision der Methode zu überprüfen, wurde eine Ephedrin-Lösung, bestehend aus 99.0% (1*R*,2*S*)-Ephedrin und 1.0% (1*S*,2*R*)-Ephedrin, fünfmal injiziert und jeweils mit identischer ME vermessen. Die Geräteparameter wie Spannung und Temperatur wurden konstant gehalten. Die so erhaltenen Elektropherogramme wurden anhand der Migrationszeiten, des Verhältnisses der korrigierten Peakflächen beider Enantiomere und der Auflösung der Enantiomerenpeaks ausgewertet. Die prozentuale relative Standardabweichung wurde als Maß der Güte herangezogen. Mit Pseudoephedrin wurde auf die gleiche Weise verfahren. Die Lösung war hier aus 99.0% des offizinellen (1*S*,2*S*)-Pseudoephedrin und 1.0% der „Verunreinigung“ (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin zusammengesetzt. Die Auswertung ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Die niedrigen prozentualen Abweichungen der Migrationszeit, des Verhältnisses der korrigierten Peakflächen und der Auflösung zeigen, dass die Methode präzise Ergebnisse liefert. Dennoch liegen die RSD-Werte teilweise über den gewünschten 3%. Bei den Untersuchungen der Migrationszeiten von (1*S*,2*R*)- und (1*R*,2*S*)-Ephedrin wird dieser Wert um über 1% überschritten, bei den Migrationszeiten von (1*S*,2*S*)- und (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin und den Auflösungen von beiden Stoffen schwankt die prozentuale Abweichung um den angestrebten Grenzwert. Durch den Einsatz des unregelmäßig sulfatierten  $\beta$ -CDs mit Derivatisierungsgrad von 7 - 11 kann es auch bei definierter mengenmäßiger Zugabe des chiralen Selektors zu minimalen Unterschieden in der



Zusammensetzung des HGE kommen. So kann es während der einzelnen Messungen mit immer neuem HGE zu kleinen Differenzen kommen, was die RSD-Werte erklären kann.

Tabelle 13: Auswertung der Präzision

		<b>(1S,2R)- Ephedrin</b>	<b>(1R,2S)- Ephedrin</b>	<b>(1S,2S)- Pseudo.</b>	<b>(1R,2R)- Pseudo.</b>
<b>Migrationszeit</b>	[min]	13.71	14.57	14.37	15.20
	RSD	0.57	0.67	0.39	0.49
	RSD [%]	4.15	4.63	2.75	3.19
<hr/>					
<b>Verhältnis der korrigierten Peakflächen</b>		0.011		0.011	
	RSD	0.0002		0.0001	
	RSD [%]	1.50		0.87	
<hr/>					
<b>Auflösung</b>		4.0		5.70	
	RSD	0.12		0.18	
	RSD [%]	3.12		3.23	

### Robustheit

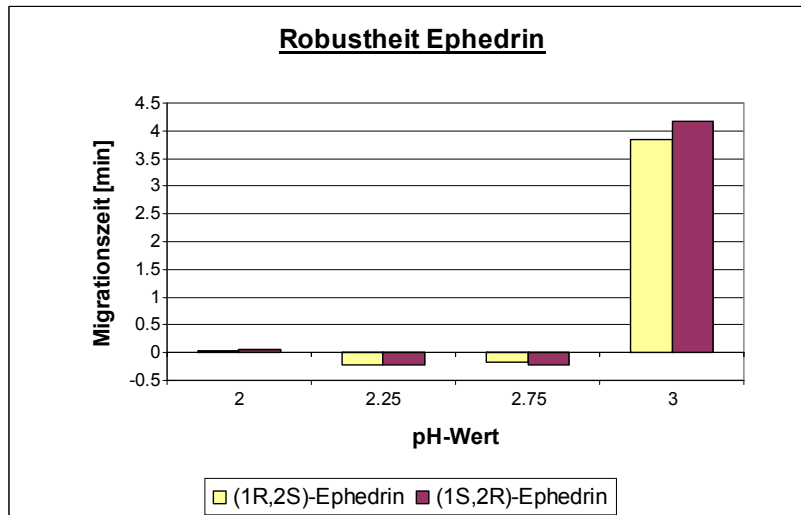
Bei den folgenden Untersuchungen der Robustheit wurde überprüft, ob die entwickelte MEEKC-Methode auch bei kleinen Änderungen der ME in der Lage ist, das Trennproblem zu bewältigen. Dazu wurde der wässrige Puffer, d. h. die äußere Phase der ME, auf zwei Arten abgewandelt. Einmal wurde der pH-Wert, der ursprünglich auf 2.5 eingestellt war, im Bereich von 2.0 – 3.0 verwendet, das andere Mal wurde die Ionenstärke des Phosphatpuffers von anfänglich 20 mM im Bereich von 10 - 50 mM untersucht.

### Robustheit – Variationen des pH-Wertes

Zuerst wurde der pH-Wert des Phosphatpuffers aus der ME in 0.25er Schritten im oben genannten Bereich von 2.0 bis 3.0 verändert. Die Analysenlösungen

entsprachen den Substanzlösungen, die bei der Präzisionsuntersuchung verwendet wurden. Die Auswertungen der Migrationszeiten und der Auflösung zwischen beiden Enantiomeren sind in den Abbildung 31 und Abbildung 32 als Abweichung von der Originalmethode dargestellt.

a)



b)

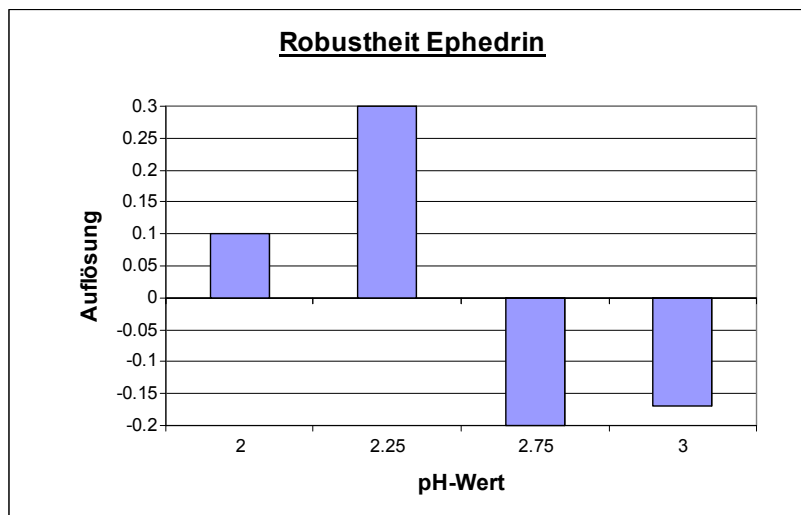


Abbildung 31: Abweichung a) der Migrationszeiten und b) der Auflösung von Ephedrin (original: 13.7 min und 14.6 min,  $R_s$ : 4.0) beim Einsatz unterschiedlicher pH-Werte des Phosphatpuffers im Vergleich zu pH 2.5.

Bei Betrachtung von Diagramm a) wird deutlich, dass Veränderungen des pH-Wertes im Bereich von 2.0 – 2.75 kaum Einfluss auf die Migrationszeit haben. Ab pH-Wert 3.0 verlängert sich die Zeit jedoch sprunghaft um ca. 4 min. Die Auflösung der beiden Enantiomerenpeaks dagegen zeigen über das ganze Intervall nur geringe Veränderungen, was sich gut an den kleinen  $\Delta R_s$ -Werten auf der y-Achse in Abbildung 31 ablesen lässt.

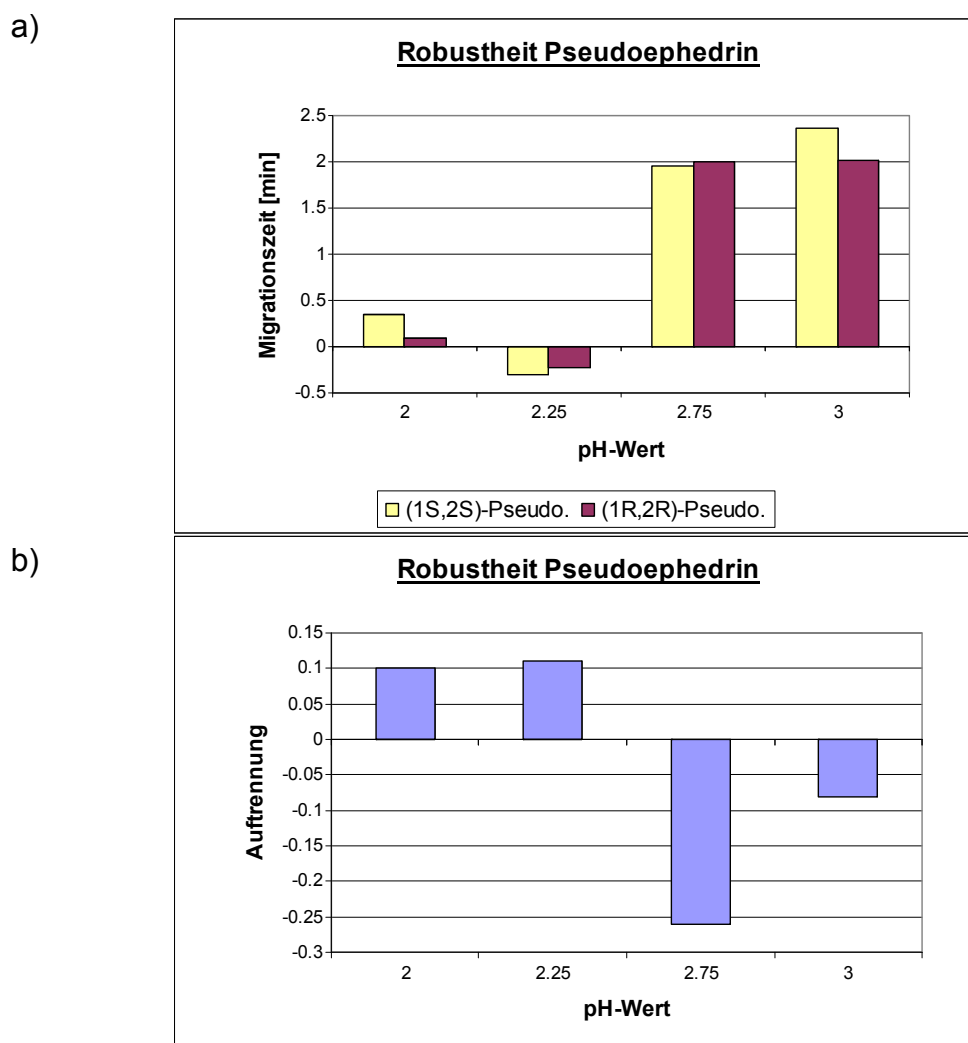


Abbildung 32: Abweichung a) der Migrationszeiten und b) der Auflösung von Pseudoephedrin (original: 14.4 min und 15.2 min,  $R_s$ : 5.7) beim Einsatz unterschiedlicher pH-Werte des Phosphatpuffers im Vergleich zu pH 2.5.

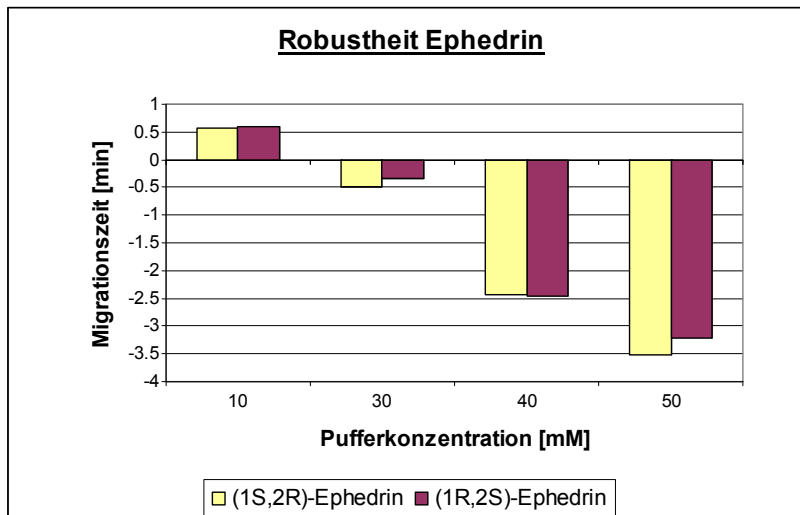
Die Migrationszeiten der Pseudoephedrin-Enantiomere zeigen unterhalb von pH 2.5 kaum eine Veränderung. Bei Erhöhung des pH-Wertes steigt hier aber auch die Migrationszeit um ca. 2 min an. Die Auflösung zwischen den beiden Enantiomerenpeaks zeigen, ähnlich wie bei Ephedrin, kaum unterschiedliche Werte.

#### Robustheit – Variation der Pufferkonzentration

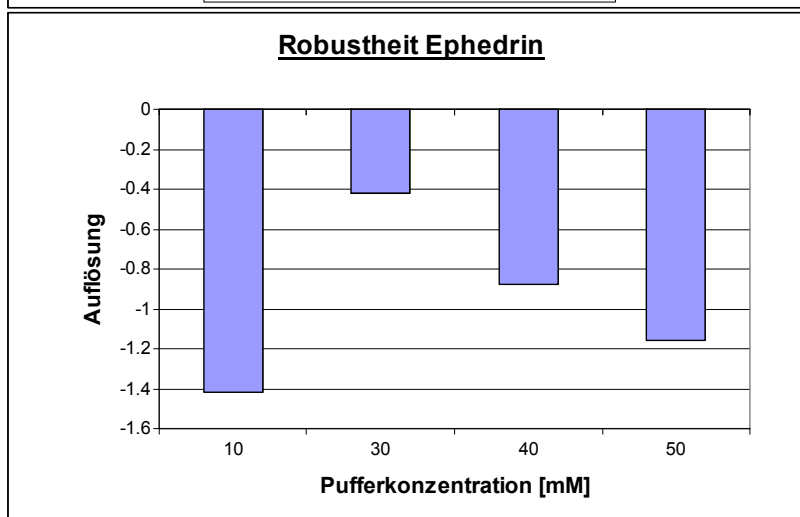
Die entwickelte MEEKC-Methode besteht aus einer ME mit einem Natrium-Phosphatpuffer der Konzentration 20 mM. Um die Robustheit weiter zu untersuchen, wurde die Konzentration der Salzkomponente des Puffers in 10 mM Schritten im Bereich von 10 – 50 mM variiert. Die Auswertung erfolgte

wieder anhand der Migrationszeiten und des Verhältnisses der korrigierten Peakflächen (s. Abbildung 33 und 34).

a)

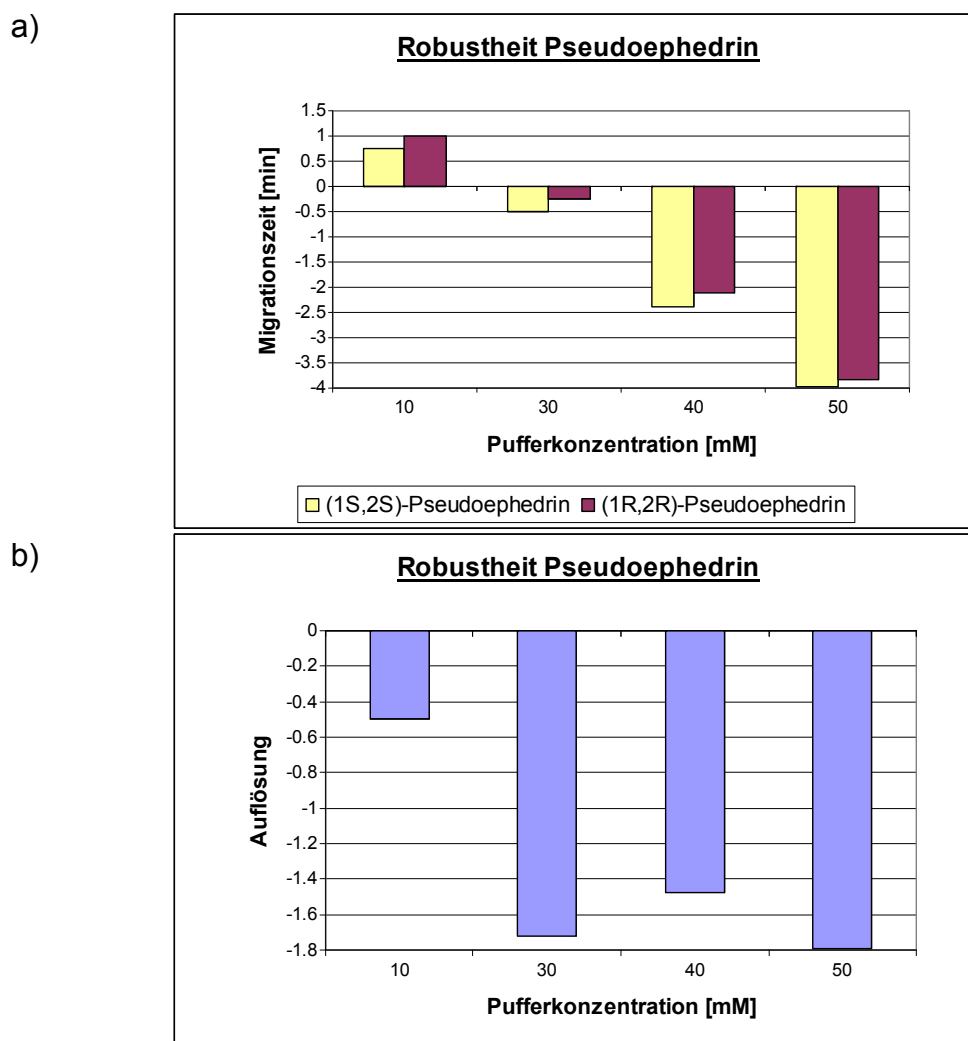


b)



**Abbildung 33: Abweichung a) der Migrationszeiten und b) der Auflösung von Ephedrin (original: 13.7 min und 14.6 min,  $R_s$ : 4.0) beim Einsatz unterschiedlicher Salzkonzentrationen des Phosphatpuffers im Vergleich zu 20 mM.**

Eine Erhöhung der Pufferkonzentration führt erwartungsgemäß zu einer beschleunigten Migration, da der EOF durch die gesteigerte Ionenstärke des Hintergrundelektrolyts verringert wird und die negativen Mizellen mitsamt der Ephedrinmoleküle schneller zur Anode wandern können. Die Auflösung der Enantiomeren-Peaks verschlechtert sich bei jeder Variation der Pufferkonzentration deutlich.



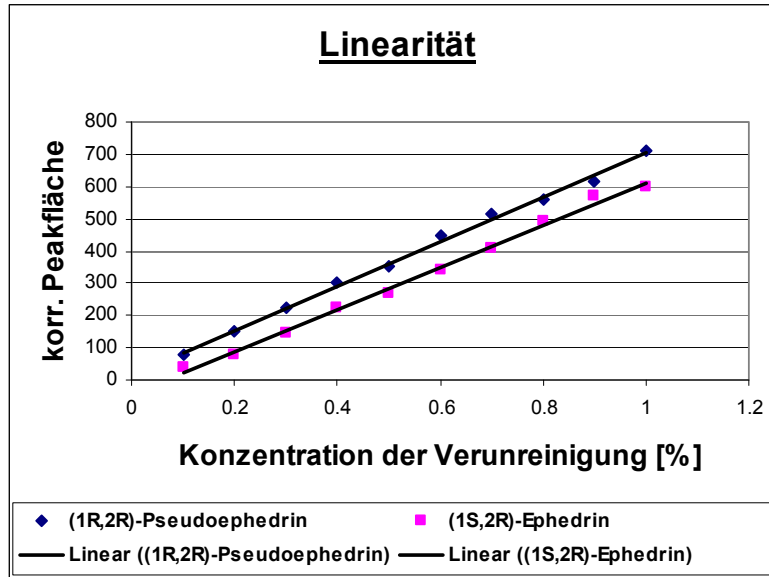
**Abbildung 34: Abweichung a) der Migrationszeiten und b) der Auflösung von Pseudoephedrin (original: 14.4 min und 15.2 min,  $R_s$ : 5.7) beim Einsatz unterschiedlicher Salzkonzentrationen des Phosphatpuffers im Vergleich zu 20 mM.**

Die Auswirkungen der veränderten Pufferkonzentrationen zeigen sich bei Pseudoephedrin in der gleichen Weise wie bei Ephedrin. Die Migrationszeiten steigen annähernd proportional zur erhöhten Pufferkonzentration an, während die Auflösung bei jeder Variation abnimmt.

#### Linearität des Gehalts der Verunreinigung

Im nächsten Schritt wurde die Linearität der Verunreinigung bei einem Gehalt von 0.1 – 1.0% in Gegenwart der Hauptkomponente bestimmt. Als Verunreinigung wurde hier wieder das Enantiomer des Arzneistoffes angesehen, das keine eigene Monographie im Ph. Eur. 7 besitzt, also (1S,2R)-Ephedrin und (1R,2R)-Pseudoephedrin (s. Abbildung 35 und 36). Auf Basis der

korrigierten Peakflächen wurde eine Regressionsgerade erstellt und das Bestimmtheitsmaß berechnet. Dieser Wert gibt Auskunft über das Maß der linearen Approximation.



Ephedrin:  $y = 655.03x - 43.067$   $R^2 = 0.9954$   
 Pseudoephedrin:  $y = 689.94x + 15.333$   $R^2 = 0.9973$

Die Werte des Bestimmtheitsmaßes nahe 1 bestätigen, dass der Gehalt der Verunreinigung auch in niedrigen Konzentrationen präzise bestimmt werden kann.

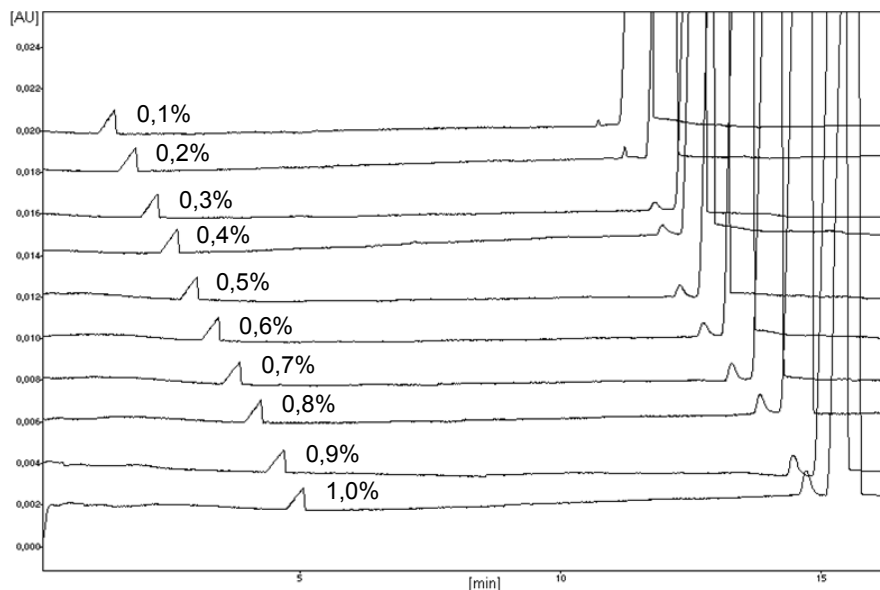
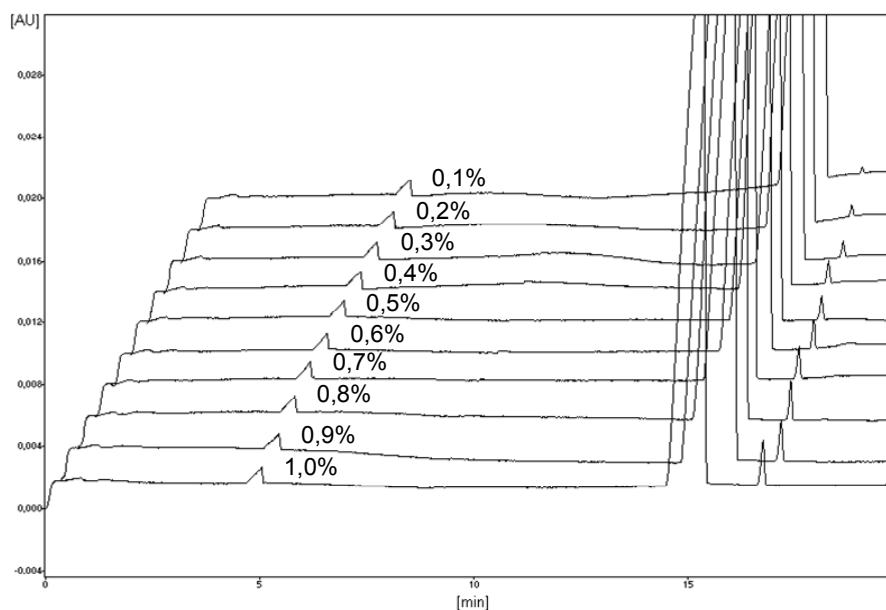


Abbildung 35: Chirale Trennung von (1R,2S)-Ephedrin und seiner Verunreinigung (1S,2R)-Ephedrin in Konzentrationen von 0.1 – 1.0%.



**Abbildung 36: Chirale Trennung von (1*S*,2*S*)-Pseudoephedrin und seiner Verunreinigung (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin in Konzentrationen von 0.1 – 1.0%.**

### Detektionsgrenze

Die Detektionsgrenzen wurden nach den Richtlinien des Ph. Eur. 7 untersucht, d. h. sie wurden anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses 3:1 bestimmt. Für die im Ph. Eur. 7 beschriebenen Enantiomere (1*R*,2*S*)-Ephedrin und (1*S*,2*S*)-Pseudoephedrin wurden die absoluten LOD-Werte bestimmt. Die Grenzen lagen bei 1.9 bzw. 1.6 µg/ml. Nach oraler Gabe liegen die maximalen Plasmakonzentrationen bei einer üblichen Dosis von Ephedrin (ca. 50 mg) unter 200 ng/ml [150, 151], von Pseudoephedrin (ca. 100 mg) um 300 ng/ml [152, 153]. Folglich reichen die mittels MEEKC bestimmten Detektionsgrenzen reichen aus, um die Substanzen im Plasma bestimmen zu können. Allerdings wurde bei der entwickelten Methode besonderes Augenmerk auf die Enantiomertrennung gelegt, die bei der Reinheitsanalytik der Substanzen zum Tragen kommt. Für diesen Zweck ist die Methode sehr gut geeignet.

Zusätzlich wurden für (1*S*,2*R*)-Ephedrin und (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin, die als Verunreinigung des im Arzneibuch beschriebenen Enantiomers behandelt werden können, die prozentualen LOD-Werte in Anwesenheit der entsprechenden Hauptkomponente ermittelt. (1*S*,2*R*)-Ephedrin kann neben (1*R*,2*S*)-Ephedrin bis in einer Konzentration von 0.067% detektiert werden. Der prozentuale LOD-Werte für (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin belief sich auf 0.05% im Verhältnis zu seiner Hauptkomponente (1*S*,2*S*)-Pseudoephedrin.

## **4.2.6 Reinheitsanalytik der Ephedrin-Derivate im Europäischen Arzneibuch**

### **4.2.6.1 Überblick**

Tabelle 11 (Kapitel 4.2.1) zeigt, in welcher Form und Konfiguration die PEA Ephedrin, Pseudoephedrin, Norephedrin, Dipivefrin, Adrenalin und Noradrenalin im Ph. Eur. 7 aufgelistet sind. Bei Betrachtung der einzelnen Monographien erkennt man, dass viele verwandte Substanzen als spezifizierte Verunreinigungen des beschriebenen Arzneistoffes aufgeführt sind. Daher werden manche der oben genannten PEA gegenseitig als Verunreinigungen angegeben.

So ist z. B. Ephedrin eine Verunreinigung von (1*S*,2*S*)-Pseudoephedrinhydrochlorid, Pseudoephedrin von (1*R*,2*S*)-Ephedrinhydrochlorid, Adrenalin von (1*R*)-Noradrenalinhydrochlorid bzw. -tartrat, Noradrenalin von (1*R*)-Adrenalin bzw. (1*R*)-Adrenalintartrat und racemisches Adrenalin von racemischem Dipivefrin. Die als Verunreinigungen aufgeführten Stoffe Ephedrin, Pseudoephedrin und Adrenalin werden hinsichtlich ihrer Konfiguration nicht genauer beschrieben.

Mit Hilfe der zuvor entwickelten MEEKC-Methode (s. Kapitel 4.2.3) sollten die Verunreinigungen voneinander getrennt werden. Danach sollten die Detektionsgrenzen ermittelt werden und dann überprüft werden, ob die im Ph. Eur. 7 angegebenen Konzentrationsgrenzen für die jeweilige Verunreinigung erreicht werden können.

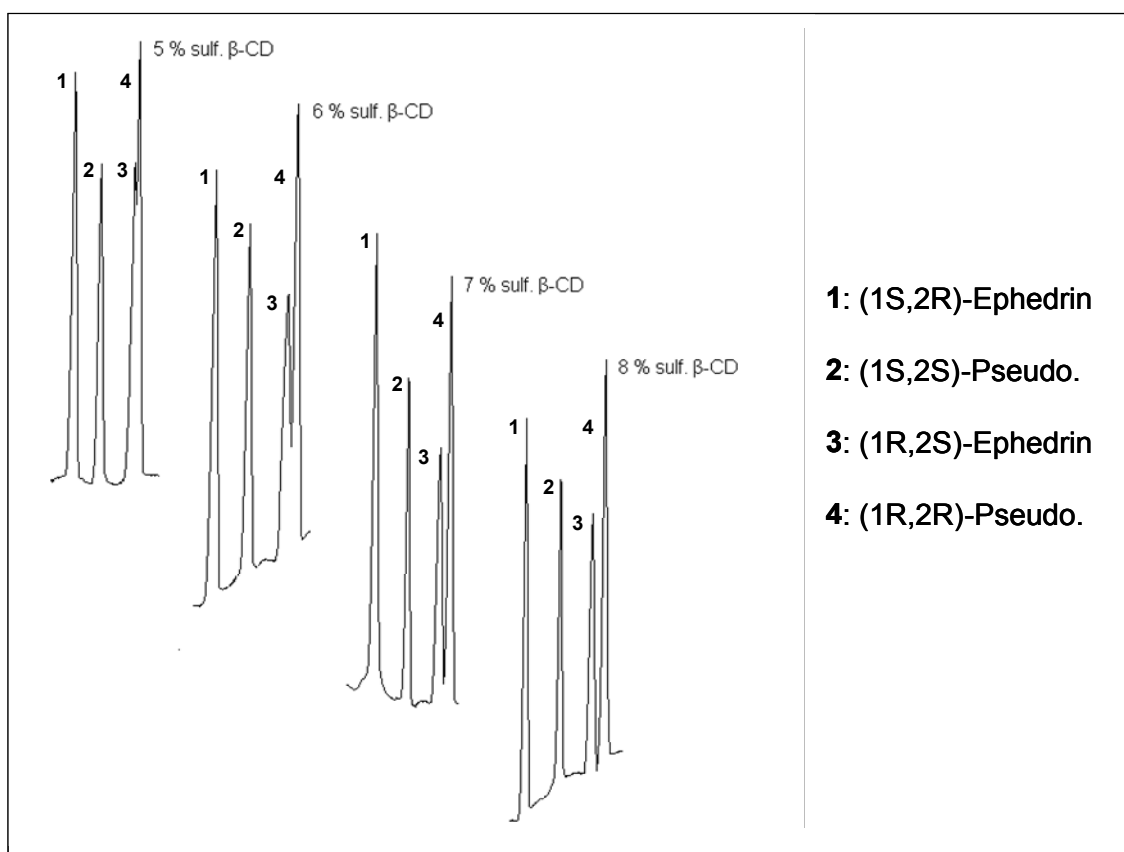
### **4.2.6.2 MEEKC-Methode zur Trennung verwandter Substanzen in Anlehnung an das Europäische Arzneibuch 6**

Die MEEKC-Methode wurde dann auf die PEA-Paare Ephedrin/Pseudoephedrin, Adrenalin/Noradrenalin und Adrenalin/Dipivefrin angewendet. Mit Ausnahme von Noradrenalin wurden hierfür alle Substanzen als Racemate eingesetzt.

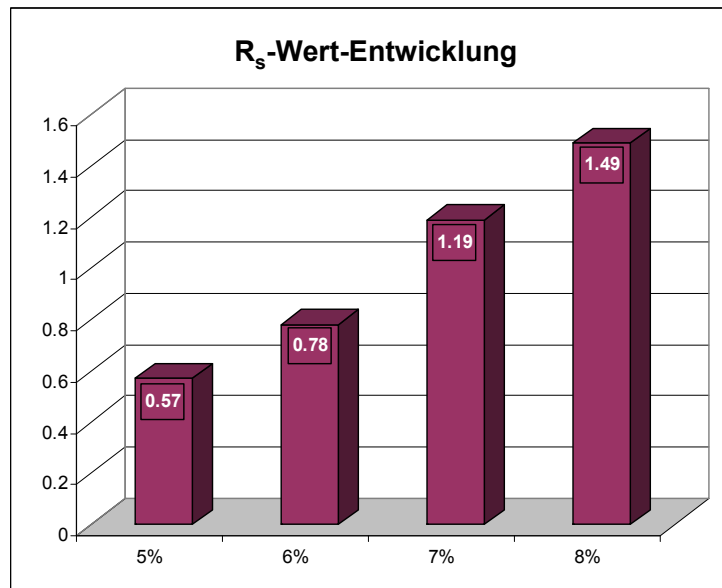


Bei der Untersuchung der ersten Substanzen, Ephedrin und Pseudoephedrin, zeigte sich, dass sich mit der validierten MEEKC-Methode lediglich drei Peaks detektieren ließen. Die langsamer wandernden Substanzen, (1*R*,2*S*)-Ephedrin und (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin, komigrierten vollständig. Durch schrittweise Erhöhung der Konzentration des chiralen Selektors wurde mit 5% sulf.  $\beta$ -CD eine erste partielle Trennung der beiden überlappenden Substanzen erreicht. Bei einer Konzentration von 8% sulf.  $\beta$ -CD erfolgte die erwünschte Basislinientrennung. Die weiteren elektrophoretischen Bedingungen der Methode wurden nicht verändert.

In Abbildung 37 ist zu sehen, wie sich die Auflösung der überlagerten Peaks mit steigender CD-Konzentration verbessert. In Abbildung 38 ist zusätzlich der Anstieg der zugehörigen  $R_s$ -Werte dargestellt.

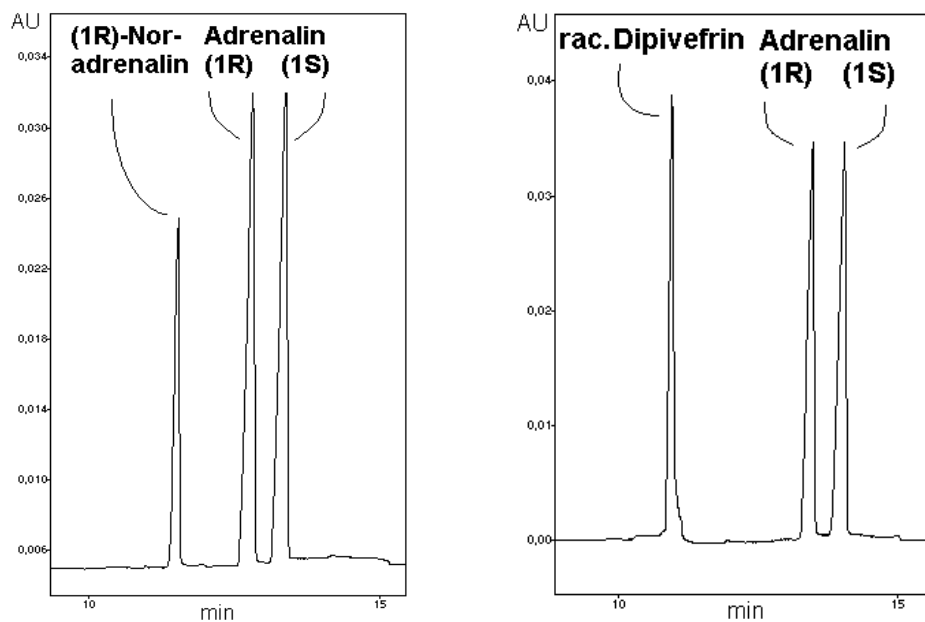


**Abbildung 37: Trennung von racemischem Ephedrin und racemischem Pseudoephedrin mit unterschiedlichen CD-Konzentrationen mittels MEEKC.**



**Abbildung 38:** Entwicklung der Auflösung zwischen (1*R*,2*S*)-Ephedrin und (1*R*,2*R*)-Pseudoephedrin mittels MEEKC.

Die Auflösung der anderen beiden PEA-Paare, Adrenalin/Noradrenalin und Adrenalin/Dipivefrin, erfolgte ohne Modifikation der validierten MEEKC-Methode mit 4% sulf.  $\beta$ -CD. Racemisches Adrenalin konnte in seine Enantiomere aufgetrennt und von (1*R*)-Noradrenalin bzw. von racemischen Dipivefrin (s. Abbildung 39) abgetrennt werden. Die Enantiomere von Dipivefrin trennten sich, wie in der Methodenentwicklung beschrieben (s. 4.2.3), nicht auf.



**Abbildung 39:** Trennung von racemischen Adrenalin von (1*R*)-Noradrenalin bzw. von racemischen Dipivefrin mittels MEEKC.

#### 4.2.6.3 Bestimmung der Detektionsgrenze der MEEKC-Methoden

Abschließend wurden die Methoden (MEEKC mit 4% sulf.  $\beta$ -CD für Adrenalin-Noradrenalin, Adrenalin-Dipivefrin, MEEKC mit 8% sulf.  $\beta$ -CD für Ephedrin-Pseudoephedrin) hinsichtlich des Maximalgehalts der entsprechenden Verunreinigung untersucht. Im Ph. Eur. 7 sind die Höchstgrenzen für die Verunreinigungen folgendermaßen angegeben:

**Tabelle 14: Verunreinigungsgrenzen laut Ph. Eur. 7**

Gehalt der Verunreinigung	Verunreinigung	Hauptkomponente
1.0%	Ephedrin	(1S,2S)-Pseudoephedrin
0.5%	Pseudoephedrin	(1R,2S)-Ephedrin
0.2%	Noradrenalin	(1R)-Adrenalin
0.1%	(1RS)-Adrenalin	(1RS)-Dipivefrin

Um zu überprüfen, ob die MEEKC-Methoden geeignet sind, die Verunreinigungen in Konzentrationen in oder unter dem vom Ph. Eur. genannten Maximalwert zu detektieren, wurden die Detektionsgrenzen für die einzelnen Verunreinigungen bestimmt. In Anlehnung an das Ph. Eur. wurden auch hier die prozentualen Werte ermittelt. Aus Tabelle 15 wird ersichtlich, dass die mit der MEEKC-Methode ermittelten prozentualen LOD-Werte deutlich unter den vom Ph. Eur. geforderten Grenzen liegen. Zusätzlich ist die Auflösung zwischen den einzelnen Peaks angegeben, woraus zu erkennen ist, dass die Substanzen basisliniengetrennt sind.

Da mit dieser Untersuchung sicher gestellt war, dass die Verunreinigungen in sehr geringen Mengen detektiert werden können, wurde danach von jeder Substanz je eine Charge mit der entsprechenden Methode untersucht. In keiner der untersuchten Proben wurden die gesuchten Verunreinigungen gefunden.

Tabelle 15: Auswertung der MEEKC-Methode

Verunreinigung in Hauptkomponente	% LOD der Verunreinig.	Peak-Reihenfolge	Rs-Werte Peak1/Peak2 Peak2/Peak3
Ephedrin in (1S,2S)-Pseudoephedrin	0.1%	1. (1S,2R)-Ephedrin 2. (1S,2S)-Pseudoeph. 3. (1R,2S)-Ephedrin	4.4 4.0
Pseudoephedrin in (1R,2S)-Ephedrin	0.1%	1. (1S,2S)-Pseudoeph. 2. (1R,2S)-Ephedrin 3. (1R,2R)-Pseudoeph.	4.0 1.6
Noradrenalin in (1R)-Adrenalin	0.06%	1. (1R)-Noradrenalin 2. (1S)-Adrenalin 3. (1R)-Adrenalin	5.4 3.5
(1RS)-Adrenalin in (1RS)-Dipivefrin	0.067%	1. (1RS)-Dipivefrin 2. (1S)-Adrenalin 3. (1R)-Adrenalin	12.3 3.5

### 4.3 Ergebnisse der Enantiomerentrennung mittels MEEKC

Für die Aminosäuren Dopa, Methyldopa, Phenylalanin und Tyrosin konnten sowohl für jede Substanz einzeln als auch für alle vier Substanzen zusammen MEEKC-Methoden entwickelt werden. Durch den Einsatz des chiralen Selektors sulf.  $\beta$ -CD konnten die Racemate der Aminosäuren in ihre Enantiomere aufgetrennt werden. Ebenso wurde für die Phenylethylamine Ephedrin, Pseudoephedrin, *N*-Methylephedrin und Norephedrin eine chirale Trennmethode entwickelt. Mit dieser CD-modifizierten MEEKC-Methode konnte auch für Adrenalin, 2-Amino-1-phenylethanol und Diethylnorephedrin Basislinien-trennung erzielt werden.

Die Zusammensetzung der ME hat großen Einfluss auf die Trennleistung des Systems, was in verschiedenen Variationsschritten gezeigt werden konnte. Die Ionenstärke des wässrigen Puffersystems beeinflusst, wie auch bei CZE-Methoden, die Viskosität der wässrigen Phase, während der pH-Wert entscheidend für den Dissoziationsgrad der Analyten ist. Besonders die Art und Konzentration des eingesetzten chiralen Selektors wirkt sich auf die Größe der Auflösung zwischen den Enantiomeren aus. Aber auch die Anwesenheit eines organischen Modifiers hatte in vielen Fällen einen positiven Effekt auf die Trennung. Des Weiteren beeinflussen die Konzentrationen an Ölkomponente, Tensid und Co-Tensid insbesondere die Migrationszeit.

Im Vergleich mit einigen Methoden, die für die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen in der Literatur schon beschrieben sind, erweisen sich die entwickelten MEEKC-Methoden als zufriedenstellend. Für die aromatischen Aminosäuren fanden sich in den Methoden der Literatur Probleme wie zu lange Migrationszeiten für Phenylalanin [132], Tyrosin [133] und Dopa [134] von 25 bzw. 30 min oder unvollständige Trennungen der Enantiomere von Phenylalanin [135], Tyrosin [136], Dopa [137] und Methyldopa [138]. Für die Trennung von DL-Methyldopa verwendete die Arbeitsgruppe von *Dolezalová* [139] den teuren und kommerziell schwer verfügbaren chiralen Selektor Sulfobutylether- $\beta$ -CD. Mit den hier entwickelten MEEKC-Methoden traten diese Nachteile nicht auf. Vielmehr wurden die Racemate in akzeptablen Zeitspannen basisliniengetrennt, wobei ein kostengünstiger, chiraler Selektor, das sulf.  $\beta$ -CD,

eingesetzt wurde. Dabei erwies sich die Methode als zuverlässig, was die Untersuchungen der Wiederholpräzision zeigten. Außerdem wurden die Detektionsgrenzen bestimmt, wobei sich für die vier Aminosäuren Werte von 0.2 – 2.0 µg/ml ergaben, die geeignet sind für eine Reinheitskontrolle von Arzneistoffen.

Die MEEKC-Methode, die für Ephedrin und einige seiner Derivate entwickelt wurde, erwies sich im direkten Vergleich mit der CZE-Methode von *Wedig et al.* [145, 146] als ebenbürtig. Ephedrin, Pseudoephedrin, *N*-Methylephedrin und Norephedrin konnten mit beiden Methoden innerhalb von 20 min basisliniengetreunt werden. Die MEEKC-Methode konnte anhand von (*1RS,2S'R'*)-Ephedrin und (*1RS,2R'S'*)-Pseudoephedrin validiert werden. Die geringen prozentualen Standardabweichungen der untersuchten Parameter, Migrationszeit, Verhältnis der korrigierten Peakflächen und Auflösung, zeigen, dass die Methode präzise Ergebnisse liefert. Zusätzlich ist die Linearität der Verunreinigung bei einem Gehalt von 0.1 – 1.0% in Gegenwart der Hauptkomponente gewährleistet. Durch Modifikationen der Methode, wie veränderte Pufferkonzentration und veränderter pH-Wert des wässrigen Puffers, wurde die Robustheit des Systems getestet. Hierbei zeigte sich, dass die gewählten Parameter sehr nahe am Optimum für die Trennungen liegen. Für die Ephedrin-Derivate, die in dieser Arbeit untersucht wurden und die außerdem im Ph. Eur. 7 geführt sind, wurde die MEEKC-Methode zur Trennung der verwandten Substanzen herangezogen. Durch LOD-Bestimmungen konnte sichergestellt werden, dass die Methode die Verunreinigungen in geringeren Konzentrationen, als vom Ph. Eur. 7 vorgeschrieben, nachweisen kann.

Alle Ergebnisse betrachtend lässt sich zusammenfassen, dass die MEEKC gute Ergebnisse für die chirale Trennung liefert. Auch wenn die Herstellung einer ME aufwändiger ist als die eines einfachen, wässrigen Puffers, zeigt eine ME besonders bei Löslichkeitsproblemen der Analyten oft Vorteile im Vergleich zu rein wässrigen Systemen. Die MEEKC kann als wirkungsvolle Technik der Enantiomerentrennung anerkannt werden.

# **5 REINHEITSANALYTIK VON QUETIAPIN UND VERWANDTEN SUBSTANZEN**

## 5.1 Übersicht

### 5.1.1 Indikation und Wirkung der Neuroleptika

Neuroleptika gehören zur Gruppe der Psychopharmaka. Zu ihren Hauptindikationen zählen Schizophrenie und Manie, aber auch Erregungs- und Angstzustände. Sie verbessern die psychischen Beschwerden, beeinträchtigen dabei jedoch nicht die intellektuellen Fähigkeiten. In der pharmazeutischen Anwendung werden besonders die drei Hauptwirkungen der Neuroleptika genutzt, die bei den verschiedenen Neuroleptika-Gruppen unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Zu den Hauptindikationen zählen:

- die Minderung der Positivsymptomatik (wie z. B. Wahnvorstellungen),
- die Abschwächung der Minussymptomatik (wie z. B. Apathie),
- Sedierung in manischen Phasen sowie bei psychotisch bedingten Schlafstörungen.

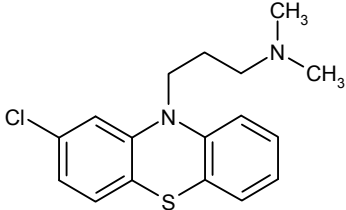
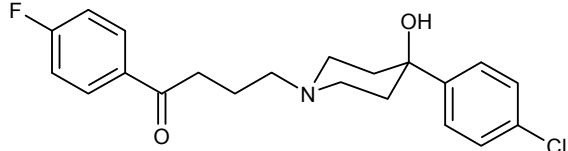
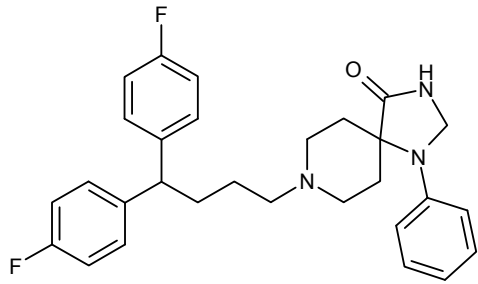
Des Weiteren wirken einige Neuroleptika zusätzlich schwach antidepressiv und anxiolytisch und können die Gedächtnisleistung und Konzentrationsfähigkeit des Patienten verbessern [93, 94].

### 5.1.2 Stoffgruppen der Neuroleptika

Die große Anzahl an Neuroleptika wird in Gruppen eingeteilt, wobei hinsichtlich ihres Alters zwischen den älteren, den „klassischen“ und den neueren, den „atypischen“ Neuroleptika unterschieden wird. Zu den klassischen Neuroleptika zählen Verbindungen vom *Phenothiazin*-, *Butyrophenon*- und *Diphenylbutylpiperidin*-Typ (s. Tabelle 16).



Tabelle 16: Übersicht klassische Neuroleptika

Substanzgruppe der klassischen Neuroleptika	Stoffbeispiel	Strukturformel
Phenothiazine	<b>Chlorpromazin</b> CAS: 50-53-3 $C_{17}H_{19}ClN_2S$ $M_r$ : 318.9 g/mol	
Butyrophenone	<b>Haloperidol</b> CAS: 52-86-8 $C_{21}H_{23}ClFNO_2$ $M_r$ : 375.9 g/mol	
Diphenylbutylpiperidine	<b>Fluspirilen</b> CAS: 1841-19-6 $C_{29}H_{31}F_2N_3O$ $M_r$ : 475.6 g/mol	

Dieser Gruppe stehen die sogenannten atypischen Neuroleptika gegenüber. Im Gegensatz zu den klassischen weisen die atypischen Neuroleptika kaum extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen auf und beeinflussen zusätzlich zur Unterdrückung der Plus symptomatik auch die Minussymptomatik der Schizophrenie positiv. Eine konkrete Gruppeneinteilung liegt im Fall der atypischen Neuroleptika nicht vor, allerdings lassen sie sich grob in *Benzamide*, *tricyclische* und *sonstige* Stoffe einteilen (s. Tabelle 17) [93, 94].

Tabelle 17: Übersicht atypische Neuroleptika

Substanzgruppe der atypischen Neuroleptika	Stoffbeispiel	Strukturformel
Benzamide	<p><b>Amisulprid</b></p> <p>CAS: 71675-85-9  <math>C_{17}H_{27}N_3O_4S</math>  <math>M_r</math>: 369.5 g/mol</p>	
tricyclische Stoffe	<p><b>Clozapin</b></p> <p>CAS: 5786-21-0  <math>C_{18}H_{19}ClN_4</math>  <math>M_r</math>: 326.8 g/mol</p>	
sonstige Stoffe	<p><b>Risperidon</b></p> <p>CAS: 106266-06-2  <math>C_{23}H_{27}FN_4O_2</math>  <math>M_r</math>: 410.5 g/mol</p>	

### 5.1.3 Pharmakologie

Der Wirkmechanismus der Neuroleptika ist bis heute nur teilweise bekannt. Sicher jedoch ist, dass Neuroleptika in die synaptische Erregungsübertragung eingreifen, indem sie Neurotransmitterrezeptoren, besonders die Dopaminrezeptoren, hemmen. Hierbei wirken die klassischen Neuroleptika besonders an den  $D_2$ - (und  $D_3$ -) Rezeptoren, wobei die atypischen Neuroleptika zusätzlich an weiteren Rezeptoren, z. B. an  $5-HT_{2A}$ -Rezeptoren angreifen [154]. Diese Blockade führt zur Wirksamkeit der atypischen Neuroleptika gegen die

Negativsymptomatik der Schizophrenie. Diese pharmakologischen Eigenschaften machen z. B. Quetiapin zu einem häufig angewandten Medikament, das besonders bei Patienten eingesetzt wird, die zuvor zusätzlich dopaminerge Störungen, wie z. B. Morbus Parkinson (s. Kapitel 4.1.1) aufweisen [155].

#### **5.1.4 Metabolite und Verunreinigungen von Quetiapin**

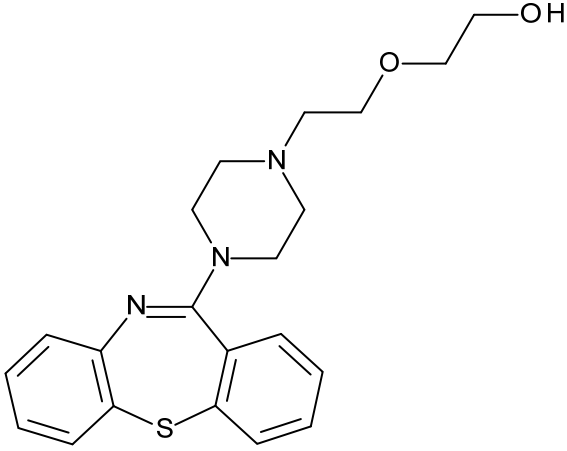
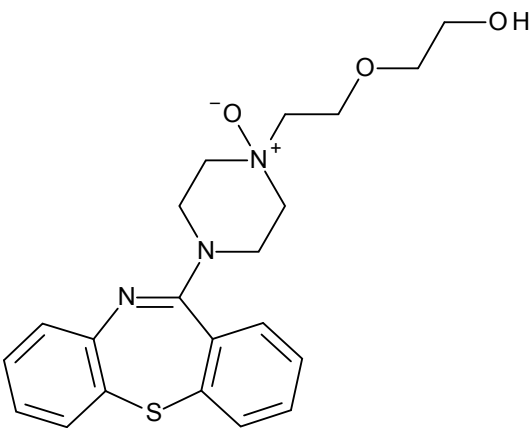
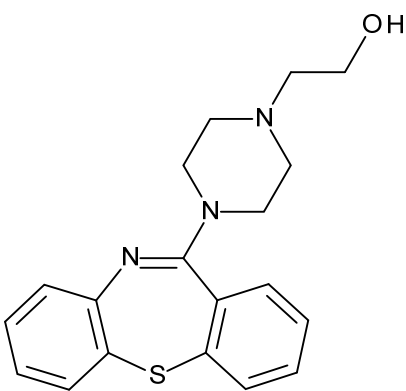
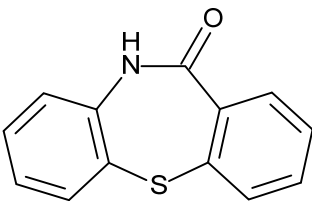
Quetiapin wird in der Leber metabolisiert, hauptsächlich vom Enzym CYP 3A4, wobei nur 5% der Substanz unverändert ausgeschieden werden. Nach oraler Gabe liegt der aktive Metabolit *N*-Desalkylquetiapin zu 35% im Blut vor [156]. Andere Untersuchungen finden Quetiapinsulfoxid als Hauptmetaboliten, der in einer Konzentration von 15% vorliegt, und zwei aktive Metabolite, 5% 7-Hydroxyquetiapin und 2% 7-Hydroxy-*N*-desalkylquetiapin. Insgesamt wurden mehr als zehn Metabolite strukturell aufgeklärt [157, 158].

Sowohl die Oxidation als auch die oxidative Desalkylierung sind vorherrschende Metabolisierungsschritte von CYP 3A4, so dass die *N*-Oxid- und die Desethanolform leicht nachvollziehbare Metabolite von Quetiapin darstellen. Allgemein werden Amidinstrukturen häufig zu Aminen abgebaut [159], wodurch im Fall des Quetiapin die Lactamform entsteht (Strukturen s. Tabelle 18).

Quetiapinlactam stellt aber gleichzeitig auch ein Edukt aus der Synthese dar, so dass es auch als Verunreinigung des Arzneistoffes auftreten kann [160, 161]. Die Bezeichnung als Verunreinigung stimmt ebenfalls mit der Monographie von Quetiapinfumarat überein, die in Pharmeuropa veröffentlicht wurde und als Vorlage für das 2011 erschienene Ph. Eur. 7 dient [162]. Dort sind neben Quetiapin-*N*-Oxid, Quetiapindesethanol und Quetiapinlactam noch sieben weitere Verunreinigungen aufgeführt.

Der nachfolgende Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Entwicklung einer CE-Analytik von Quetiapin und seinen verwandten Substanzen Quetiapin-*N*-Oxid, Desethanolquetiapin und Quetiapinlactam.

Tabelle 18: Quetiapin und verwandte Substanzen

<p><b>Quetiapin</b></p> <p>CAS: 111974-69-7  <math>C_{21}H_{25}N_3O_2S</math>  <math>M_r</math>: 383.5 g/mol</p>	
<p><b>Quetiapin-N-Oxid</b></p> <p>CAS: nicht vergeben  <math>C_{21}H_{25}N_3O_3S</math>  <math>M_r</math>: 399.5 g/mol</p>	
<p><b>Quetiapindesethanol</b></p> <p>CAS: 329216-67-3  <math>C_{19}H_{21}N_3OS</math>  <math>M_r</math>: 339.5 g/mol</p>	
<p><b>Quetiapinlactam</b></p> <p>CAS: 3159-07-7  <math>C_{13}H_9NOS</math>  <math>M_r</math>: 227.1 g/mol</p>	

### **5.1.5 Analytik**

In den letzten Jahren wurden verschiedene Methoden beschrieben, mit deren Hilfe Quetiapin aus Tabletten quantifiziert wurde, z. B. mittels Spektrometrie [163, 164], CZE [163], Voltammetrie [165], Differentialpuls-Polarographie [166] und HPTLC mit densitometrischer und videodensitometrischer Detektion [167]. Weitere Methoden wurden für die quantitative Bestimmung von Quetiapin aus biologischen Proben beschrieben. Diese Methoden umfassen Gaschromatographie [168, 169, 170], HPLC mit UV-Detektion für die Bestimmung von Quetiapin als alleinige zu untersuchende Substanz [171], oder in Gegenwart anderer Antipsychotika [172, 173, 174], Antidepressiva [172, 175] und verschiedener Metabolite [176, 177, 178]. Ebenso wurden HPLC-ESI-MS [179, 180], UPLC-MS/MS [181, 182], HPLC-MS/MS [183, 184] oder auch LC-TOF/MS [157] und CZE-Methoden [185, 186] für die Quantifizierung von Quetiapin aus biologischen Flüssigkeiten beschrieben.

## **5.2 Aufgabenstellung**

Ziel dieser Untersuchung war es, eine kapillarelektrophoretische Trennmethode zu entwickeln, mit der Quetiapin und drei seiner verwandten Substanzen, Quetiapin-*N*-Oxid, Quetiapindesethanol und Quetiapinlactam (Strukturen s. Tabelle 18), voneinander getrennt werden können. Hierbei war die Problematik zu berücksichtigen, dass Quetiapinlactam im wässrigen Milieu praktisch unlöslich ist. Die entwickelte Methode sollte abschließend validiert werden.

## **5.3 Strukturaufklärung von Quetiapinlactam**

Von Prof. Fathalla Belal aus Kairo erhielt unsere Arbeitsgruppe Quetiapin als Reinsubstanz und zusätzlich die drei genannten Substanzen. Die Substanzen stammten vom „Drug Control Center“ aus Riyadh, Saudi Arabien. Quetiapindesethanol und Quetiapin-*N*-Oxid sind bekannte Substanzen und werden in der Literatur vielfach beschrieben. Der Name „Quetiapinlactam“

dagegen ist weitgehend unbekannt, so dass die genaue Struktur ungewiss war. Zu Beginn der Arbeit musste daher die Struktur der als Quetiapinlactam bezeichneten Substanz geklärt werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl massenspektrometrische (MS) als auch infrarot (IR)- und kernresonanz (NMR)-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt.

#### NMR-Untersuchungen

Für Quetiapinlactam wurde sowohl ein  $^1\text{H}$ -NMR als auch ein  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum gemessen, wofür die Substanz in DMSO- $d_6$  gelöst wurde.

#### IR-Untersuchungen

An einer Diamant-ATR-Einheit konnten aus der Reinsubstanz von Quetiapinlactam mittels eines Biorad-PharmalyzIR FT-IR-Spektrometer Peaks bei verschiedenen Wellenzahlen gemessen werden, wobei die wichtigsten im Folgenden aufgeführt sind:

IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3035, 1643, 742.

#### Massenspektrometrische Untersuchungen: ESI-MS

In den ersten MS-Untersuchungen fand die Ionisierung des Analyten mittels Elektrosprayionisation (ESI) statt. ESI gilt als „sanfte“ Ionisationstechnik und liefert in der Regel Molekülionen oder Quasi-Molekülionen. Die Messungen von Quetiapinlactam wurden mit positiver Spannung durchgeführt. Für die Masse wurde ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von  $m/z$ : 475.0 gefunden.

Anschließend wurde eine Fragmentierung mittels der CID-Technik (collision induced dissociation) durchgeführt und folgende  $m/z$ -Ionen gemessen:  $m/z$ : 228.1, 370.7, 416.9, 492.7, 570.2, 718.7.

Der Totalionenstrom der Fragmentierung ist in Abbildung 47 (s. Kapitel 8.3.3.1) dargestellt.

#### Massenspektrometrische Untersuchungen: EI-MS

Die Elektronenstoßionisation (EI) stellt im Gegensatz zur ESI eine härtere Ionisierungstechnik dar. Hier werden die Moleküle mit Elektronen mit verhältnismäßig hoher kinetischer Energie beschossen, wobei sich

Radikalkationen oder Kationen bilden. Die „harte Ionisation“ hat zur Folge, dass Dimerisierungsvorgänge selten auftreten. Bei der Untersuchung von Quetiapinlactam konnte als Ergebnis der Molekülpeak von  $m/z$ : 227.1 identifiziert werden.

#### Ergebnis der Strukturaufklärung

Durch die IR-Messungen konnten die wichtigsten Strukturmerkmale der als Quetiapinlactam bezeichneten Substanz belegt werden. Die breite Bande bei  $3035\text{ cm}^{-1}$  ergibt sich aus der NH-Schwingung des aromatischen Amids. Die Bande der Carbonylgruppe aus dem aromatischen Amid ist bei  $1643\text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Weiterhin können die beiden diortho-substituierten Aromaten der Wellenlänge  $742\text{ cm}^{-1}$  zugeordnet werden.

Mittels der ESI-MS-Messung sollte die molare Masse bestimmt werden, wobei sich der Wert von 475.0 ergab. Erklären lässt sich dies mit der Annahme, dass das Molekül durch die sanfte Ionisierung dimerisiert vorliegt und sich dabei zusätzlich ein Natriumaddukt gebildet hat. Auch die meisten Werte der folgenden Fragmentierungs-Untersuchung lagen insgesamt sehr hoch, d. h. weit über der molekularen Masse von Quetiapin selbst ( $M_r$  (Quetiapin):  $383.5\text{ g/mol}$ ), was diese Aussage bekräftigt. Durch die harte Ionisierung in der EI-Messung konnte die Masse von 227.1 endgültig bestätigt werden.

Außerdem trugen die  $^1\text{H-NMR}$ - und die  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren dazu bei, den strukturellen Aufbau von Quetiapinlactam als Dibenzo[b,f][1,4]thiazepin-11(10H)-on (Strukturformel s. Tabelle 18) zu identifiziert werden. Durch das Erscheinen der Zeitschrift Pharmeuropa 22.1 [162] wurde später zusätzlich bestätigt, dass die gefundene Struktur als verwandte Substanz behandelt wird.

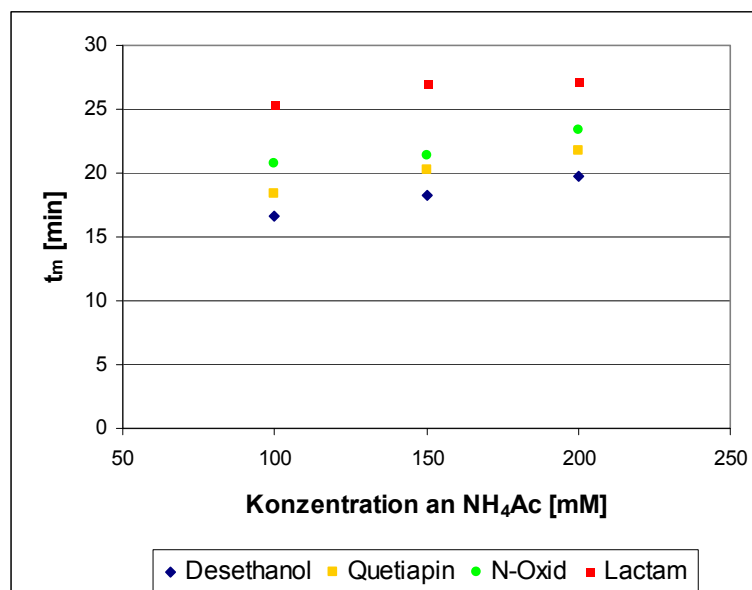
## **5.4 NACE-Methode**

Quetiapin und die drei genannten verwandten Substanzen sind gut löslich in einer Mischung aus Acetonitril (ACN) und Methanol (MeOH). Schon der Zusatz geringer Mengen Wasser oder wässrigen Puffers führt zur Präzipitation von

Quetiapinlactam. Deshalb musste zur Detektion aller Substanzen eine wasserfreie Methode entwickelt werden.

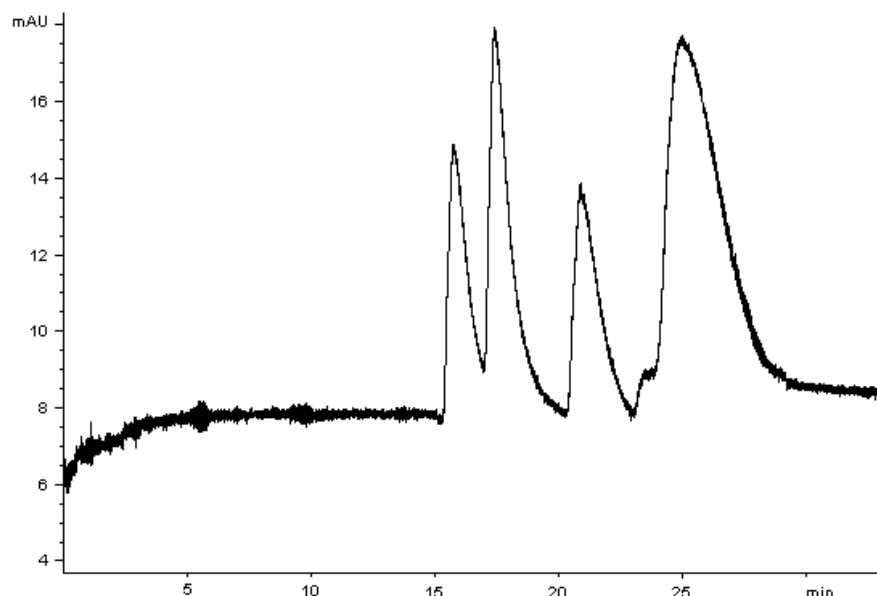
Als HGE wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Methanol gewählt, wobei in dieser organischen Phase zur Erhöhung der Leitfähigkeit das Salz Ammoniumacetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) gelöst wurde. Des Weiteren wurde dem HGE Essigsäure ( $\text{AcOH}$ ) zugesetzt, um die Analyten zu protonieren und eine schnelle Migration zu ermöglichen.

Es wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von MeOH und ACN verwendet, um den Einfluss der Ionenstärke von Ammoniumacetat in unterschiedlichen Konzentrationen (20 – 200 mM) zu untersuchen. Schon die ersten Untersuchungen, die an einem Agilent-CE-Gerät durchgeführt wurden, gestalteten sich als schwierig, da der Strom bei vielen Messungen instabil war oder ganz zusammenbrach, so dass keine Trennung der Substanzen erfolgen konnte. Eine Veränderung der angelegten Spannung und der Trenntemperatur hatte keinen positiven Einfluss auf den Stromfluss. Anhand weniger auswertbarer Messungen konnte dennoch der erwartete Zusammenhang zwischen erhöhter Ionenstärke und verlängerter Migrationszeit im Bereich von 100 – 200 mM Ammoniumacetat beobachtet werden. Durch die zunehmende Konzentration des Salzes steigen auch die Viskosität des HGE und dadurch schließlich die Migrationszeiten der Substanzen an.



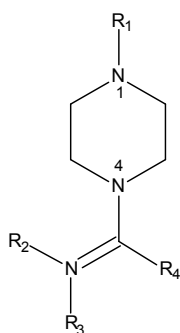
**Abbildung 40: Veränderung der Migrationszeit mit HGE: ACN/MeOH/AcOH (49:49:2, v/v/v) durch Erhöhung der Salzkonzentration.**





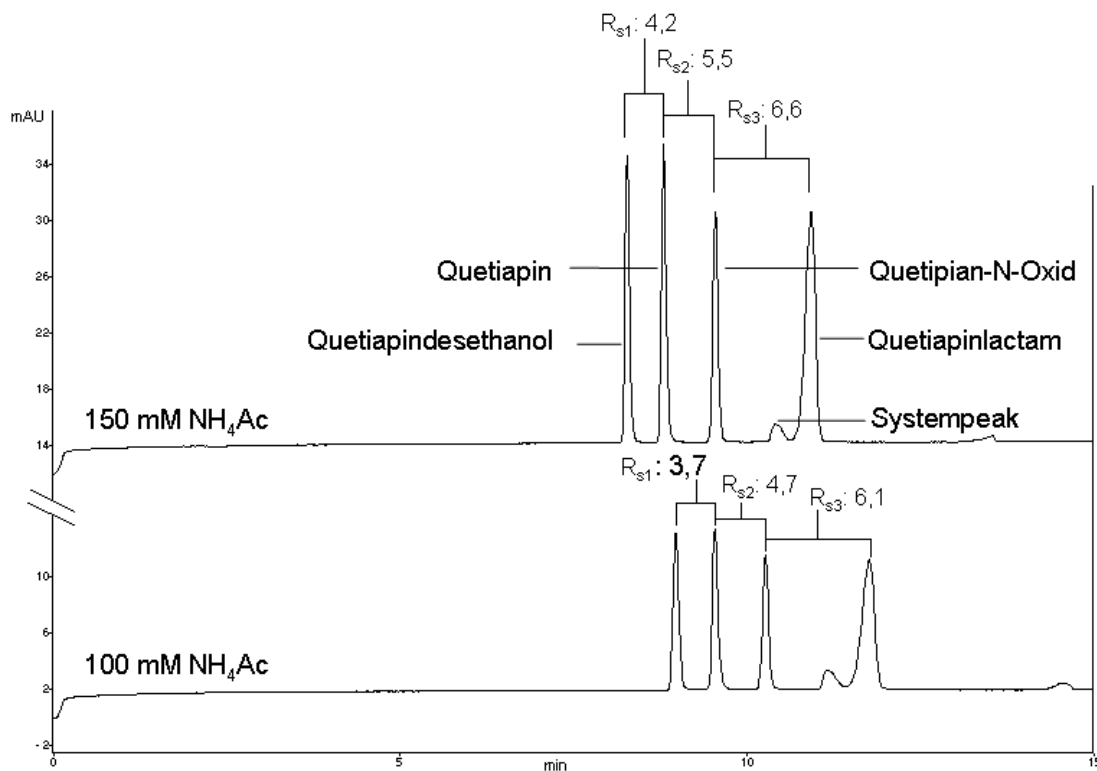
**Abbildung 41: NACE-Methode für Quetiapin und verwandte Substanzen mit HGE aus MeOH/ACN/AcOH (49:49:2, v/v/v) mit 100 mM NH<sub>4</sub>Ac.**

Zusätzlich stieg der Stromfluss von 28 und 35  $\mu$ A bis auf 43  $\mu$ A (bei 200 mM Ammoniumacetat) an. Die Migrationsreihenfolge Quetiapindesethanol (339.5 g/mol) < Quetiapin (383.5 g/mol) < Quetiapin-*N*-Oxid (399.5 g/mol) < Quetiapinlactam (227.1 g/mol) kann anhand des Masse-Ladungs-Verhältnisses der einzelnen Substanzen erklärt werden. Abgesehen von Quetiapinlactam liegen alle Substanzen im sauren Milieu am N1-Atom des Piperazinringes positiv geladen vor. Quetiapindesethanol, das die geringste Masse aufweist, migriert zuerst. Es folgen Quetiapin und Quetiapin-*N*-Oxid, die sich in ihrer Struktur nur um einen Sauerstoff unterscheiden. Als letzte Substanz wird Quetiapinlactam detektiert, das ungeladen ist und daher mit dem EOF wandert.



Jedoch wiesen alle Peaks eine asymmetrische Form auf mit Symmetriefaktoren um 2.2 und waren außerdem sehr breit (Quetiapinlactam erstreckt sich über 5 min), was eine Basislinientrennung erschwerte. Da durch keine Variation der Methode die Problematik der Peakform oder der Instabilität des Stromflusses entgegen gewirkt werden konnte, wurde für alle weiteren Messungen ein Beckman-CE-Gerät benutzt. Die Gerätebedingungen wie Temperatur, Spannung und effektive Kapillarlänge wurden beibehalten.

Nach dem Gerätewechsel war das Problem der Peakform behoben, so dass sich zwei gute Trennungen aufzeichnen ließen. Als HGE wurden hier 100 bzw. 150 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  in gleichen Anteilen von Methanol und Acetonitril gelöst und zusätzlich mit 1% Essigsäure versetzt. Bei diesen Trennungen ist auffällig, dass gegen die Erwartungen und gegen die Beobachtung am Agilent-CE-Gerät die Migrationszeiten bei 150 mM Salzkonzentration kürzer sind als bei 100 mM (s. Abbildung 42). Der erhöhte Stromfluss hat hier scheinbar einen größeren Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit als die Viskositätserhöhung. Durch die schnellere Migration bilden die Substanzen außerdem schmalere, höhere und symmetrischere Peaks, so dass sich die Auflösung zwischen den einzelnen Komponenten verbessert. Die Symmetriefaktoren liegen für alle Substanzen zwischen 1.0 und 1.2, lediglich Quetiapinlactam weist leichtes Fronting auf ( $A_s$ : 0.8).



**Abbildung 42: NACE-Methode für Quetiapin und verwandte Substanzen mit HGE aus MeOH/ACN/AcOH (49.5:49.5:1, v/v/v).**

Ein ähnlicher Effekt ist zu beobachten, wenn die Konzentration an Essigsäure von 1 auf 2% verdoppelt wird. Die Migrationszeit verringert sich um mehr als 2 min, während sich die Peakhöhe verdoppelt. Dabei verlieren die beiden

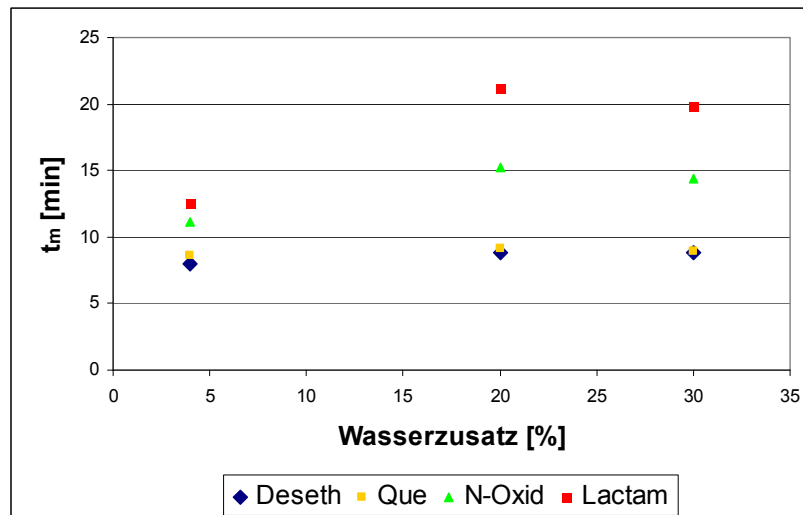
erstmigrierenden Peaks jedoch ihre Symmetrie ( $A_s$ : 1.9 und 2.0) und die Trennleistung sinkt von durchschnittlich 60000 auf 35000 theoretische Böden. Diese starke Zunahme der Geschwindigkeit hat außerdem den Nachteil, dass die einzelnen Substanzen in sehr kurzen Abständen detektiert werden, was die Auflösung verschlechtert. Verändert man dagegen die Verhältnisse der Lösungsmittel von Methanol und Acetonitril von 1:1 auf 1:3, steigt die Migrationszeit um mehr als 9 min an, was eine starke Peakverbreiterung mit einer reduzierten Auflösung mit sich führt. Quetiapin desethanol und Quetiapin trennen sich mit  $R_s$  1.8, aber Quetiapin kann vom *N*-Oxid nicht mehr basisliniengetrennt werden. Das Lactam dagegen trennt sich weiterhin gut mit  $R_s$  5.6. Bei der inversen Zusammensetzung des HGE, d. h. Methanol und Acetonitril im Verhältnis 3:1, verlängert sich Migrationszeit in geringerem Ausmaß, dafür können die Substanzen nicht mehr basisliniengetrennt werden. Für eine Mischung der Lösungsmittel zu gleichen Teilen konnten die besten Trennungen beobachtet werden. Die ermittelten  $R_s$ -Werte sind den Elektropherogrammen in Abbildung 42 zugeordnet. Jedoch arbeiteten die verschiedenen wasserfreien Systeme an dem Beckman-CE-Gerät in Hinblick auf den Stromfluss ebenso instabil wie an dem Agilent-CE-Gerät. Deshalb mussten einige Variationen an der Methode vorgenommen werden.

Bei den soeben beschriebenen Messungen wurde die Kapillare vor der Injektion mit HGE, nach dem Lauf mit methanolischer Natronlauge und abschließend mit reinem Methanol und Acetonitril gespült. Von *Altria* und *Bryant* wird eine Spülmethode beschrieben, die alle wässrigen Spuren aus der Kapillare entfernen soll [187]: Darin wird die Kapillare zuerst mit wässriger Natronlauge und anschließend mit Wasser und Acetonitril konditioniert. Diese Spülschritte wurden statt der vorherigen genutzt; es konnte aber keine Verbesserung der Stromstabilität erreicht werden.

Um die regelmäßigen Stromabbrüche zu unterbinden, wurde im nächsten Schritt der Kapillardurchmesser von 50 auf 75  $\mu\text{m}$  erhöht. Falls entstandene Gasbläschen für den unterbrochenen Stromfluss verantwortlich wären, könnte durch den vergrößerten Innendurchmesser das Problem umgangen werden. Diese Variation lieferte aber keinen Beitrag zur Stabilitätserhöhung des Stromflusses.

Danach wurde das Leitsalz Ammoniumacetat gegen Lithiumchlorid ausgetauscht. Dies bewirkte eine schnellere Migration von Quetiapindesethanol, Quetiapin und Quetiapin-*N*-Oxid, wobei die Substanzen nicht mehr basisliniengetreunt wurden. Auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Quetiapinlactam hatte diese Änderung keinen Einfluss. Jedoch wiesen die Peaks insgesamt leichtes Tailing auf. Die Symmetriefaktoren von Quetiapin und seinen Derivaten lagen zwischen 1.3 und 1.6. Die Stabilität des Stroms wurde durch die veränderte Salzkomponente allerdings nicht verbessert. Auch Ansätze mit Natriumacetat als Leitsalz führten nicht zur erwünschten Stabilität des Stroms. Im Gegenteil, die Messungen mit Natriumacetat konnten nicht ausgewertet werden, da überhaupt kein Stromfluss zustande kam.

Zur Lösung des Problems wurde deshalb im Anschluss das Lösungsmittelgemisch (150 mM NH<sub>4</sub>Ac mit 3% AcOH in ACN/MeOH 1:1, v/v) mit verschiedenen Anteilen an Wasser versetzt, um die Leitfähigkeit des bis dahin rein organischen HGE zu erhöhen. Wie erwartet stieg die Stromstärke mit zunehmendem Wasseranteil an, was gleichzeitig einen positiven Effekt auf die Stabilität des Stromflusses hatte. Allerdings wirkte sich der Wasseranteil im HGE nachteilig auf die Auflösung von Quetiapindesethanol und Quetiapin aus. Mit steigendem Anteil liefen die Migrationszeiten der beiden Substanzen schrittweise zusammen, so dass keine Trennung mehr möglich war. Im Gegensatz dazu nahmen die Migrationszeiten und damit auch die Auflösung von Quetiapin-*N*-Oxid und Quetiapinlactam stark zu (s. Abbildung 43).



**Abbildung 43: Untersuchung der Migrationszeiten bei unterschiedlichen prozentualen Wasserzusätzen.**

Des Weiteren sorgte die schon erwähnte schlechte Wasserlöslichkeit des Quetiapinlactams für Probleme, denn mit steigendem Wasseranteil verschlechterte sich die Peakform des Lactams so stark, dass schon bei einem Zusatz von 5% das Elektropherogramm kaum noch auswertbar war. Obwohl der Peak gute Symmetriewerte aufwies ( $A_s$ : 0.9 – 1.1), wurde er mit zunehmendem Wasseranteil flacher und breiter. Während die Höhe abnahm, vergrößerte sich die Breite bis auf über 3 min, was mehr als dem 10-fachen der Breite der übrigen Peaks entsprach. Letztenendes konnte der Wasserzusatz im HGE zwar die Methode stabilisieren, aber keinen effektiven Beitrag zur Lösung des Trennproblems leisten.

Abschließend wurde versucht, Quetiapinlactam in einem Tensid-haltigen, wässrigen Puffer in Lösung zu bringen, indem SDS als Mizellbildner zugesetzt wurde. Dieser HGE hätte in einer MEKC-Methode Einsatz finden sollen. Bedauerlicherweise konnten aber weder Mizellen noch Mikroemulsionen die Wasserunlöslichkeit von Quetiapinlactam überwinden.

## 5.5 CZE-Methode

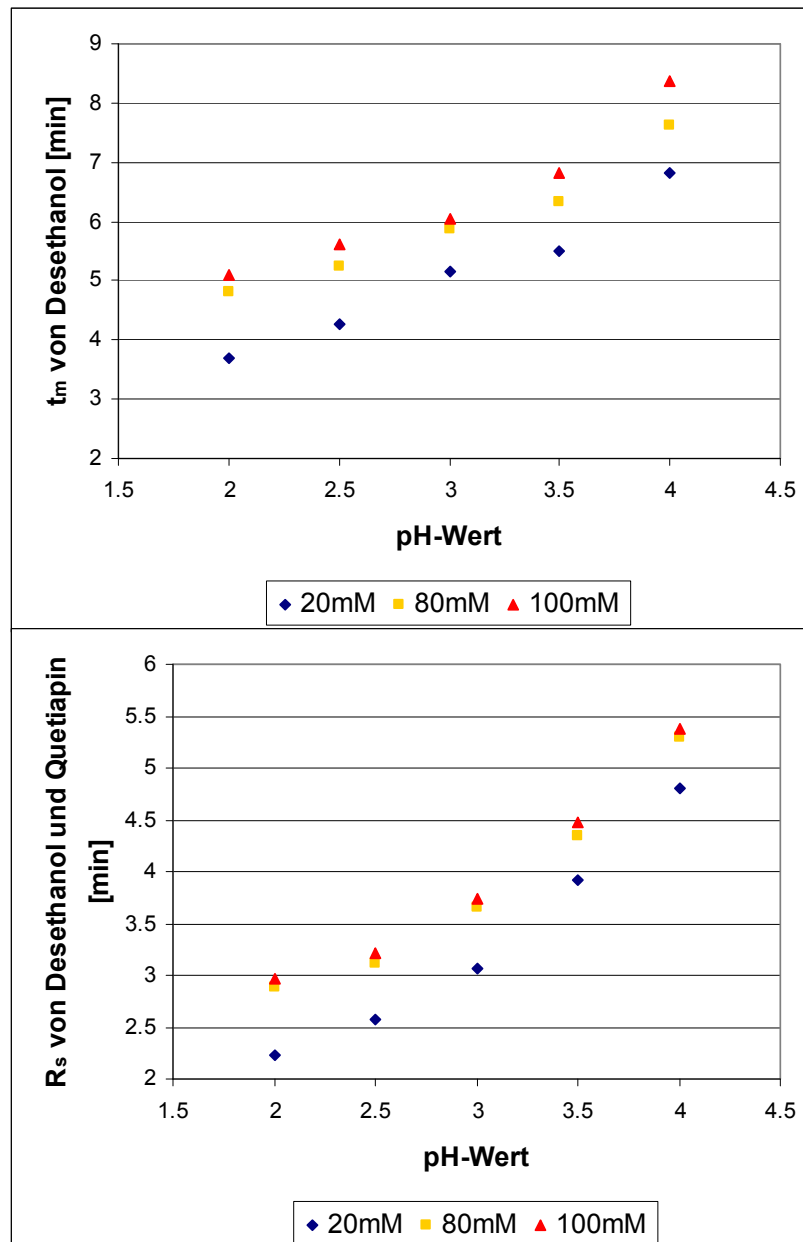
Da die wasserfreie Methode keine robusten Ergebnisse erzielen konnte, wurde im Anschluss eine wässrige CZE-Methode entwickelt. Hiermit konnten Quetiapin und die zwei wasserlöslichen verwandten Substanzen Quetiapin-*N*-

Oxid und Quetiapindesethanol untersucht werden. Diese Methode wurde abschließend validiert und zusätzlich wurden die Detektionsgrenzen der drei Analyten bestimmt.

### **5.5.1 Methodenentwicklung**

Für die CZE-Methode wurde ein Phosphatpuffer verwendet, um die Migrationszeiten zu bestimmen und die Auflösung der drei Analyten zu optimieren. Die Konzentration an Natriumdihydrogenphosphat wurde im Bereich von 20 – 100 mM und der pH-Wert von 2.0 – 4.0 variiert (s. Abbildung 44). Um die Veränderung des Migrationsverhaltens der Substanzen zu überprüfen, wurde die Zeit des ersten Peaks (Quetiapindesethanol) beobachtet. Weiterhin wurde für die Entwicklung der Methode die Auflösung untersucht. Da in den ersten Messungen der  $R_s$ -Wert von Quetiapin und Quetiapin-*N*-Oxid weit über 15 lag und somit ohnehin eine sehr gute Trennleistung anzeigte, wurde lediglich die Auflösung zwischen den ersten beiden Peaks (Quetiapindesethanol und Quetiapin) ausgewertet.

Wie aus Abbildung 44 zu entnehmen ist, stieg mit zunehmendem pH-Wert sowohl die Migrationszeit als auch die Auflösung zwischen den Peaks an. Die beste Auflösung wurde mit 80 und 100 mM Phosphatpuffer, pH 4.0 erhalten. Da sich die  $R_s$ -Werte hier kaum unterschieden, die Migrationszeit mit 100 mM jedoch im Gegensatz zu 80 mM um 0.8 min verlängert war, wurde für die nachfolgenden Messungen ein 80 mM Phosphatpuffer, pH 4.0 verwendet. Bei 20 °C Kapillartemperatur und mit einer Spannung von 20 kV konnte Quetiapin von seinen verwandten Substanzen Quetiapindesethanol und Quetiapin-*N*-Oxid innerhalb von 12 min getrennt werden ( $R_{s1}$ : 5.3,  $R_{s2}$ : 19.8).



**Abbildung 44: Untersuchung von Migrationszeit und Auflösung durch Variation von pH-Wert und Salzkonzentration für die Methodenentwicklung**

Die Migrationsreihenfolge der CZE-Methode gleicht der der NACE-Methode. Die Substanzen werden aufgrund ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses voneinander getrennt. Alle drei Analyten liegen einfach positiv geladen vor. Dagegen unterscheiden sich die molaren Massen voneinander. Quetiapindesethanol, als kleinstes Molekül, migriert am schnellsten, gefolgt von Quetiapin. Zuletzt wird Quetiapin-N-Oxid detektiert, das durch den zusätzlichen Sauerstoff die höchste Masse aufweist.

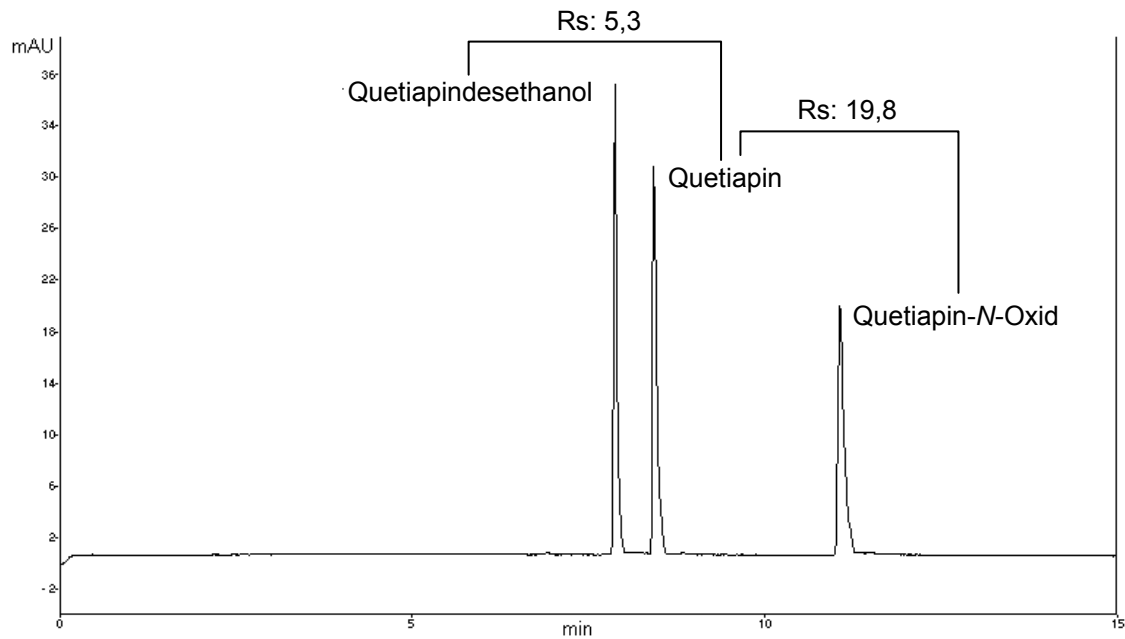


Abbildung 45: CZE-Methode für Quetiapin und verwandte Substanzen.

### 5.5.2 Validierung

Die für Quetiapin und seine zwei verwandten Substanzen entwickelte wässrige CZE-Methode wurde im Hinblick auf Wiederholpräzision und Detektionsgrenzen validiert.

#### 5.5.2.1 Wiederholpräzision

Die Analysenlösung enthielt 0.2 mg/ml von jeder der drei Substanzen und wurde sechsmal injiziert. Die CE-Bedingungen wie Geräteparameter und Spül- und Konditionierungsschritte wurden zwischen den einzelnen Läufen nicht verändert. Der HGE wurde nach jeder Messung gewechselt, um einer Pufferdepletion vorzubeugen. Die Zusammensetzung des HGE blieb dabei unverändert. Die Migrationszeiten, die prozentualen Peakflächen und die Auflösung zwischen den drei Analyten sind in Tabelle 19 gegenübergestellt.



Tabelle 19: Werte der Untersuchungen der Wiederholpräzision

		Desethanol- Quetiapin	Quetiapin	Quetiapin- <i>N</i> - Oxid
<b>Migrationszeit</b>	[min]	7.61	8.18	11.42
	RSD	0.16	0.18	0.32
	RSD [%]	2.13	2.26	3.23
<hr/>				
<b>prozentuale Peakfläche</b>		34.79	29.52	35.69
	RSD	0.33	0.23	0.53
	RSD [%]	0.95	0.78	1.49
<hr/>				
<b>Auflösung</b>		6.86		28.05
	RSD	0.17		0.72
	RSD [%]	2.55		2.58

Anhand der prozentualen, relativen Standardabweichung kann die Methode beurteilt werden. Die Standardabweichungen der Peakflächen liegen deutlich unter 3%, die Werte der Migrationszeiten und der Auflösung liegen unter bzw. knapp über 3%. Diese niedrigen RSD-Werte machen deutlich, dass die Methode präzise Ergebnisse liefert.

### 5.5.2.2 Detektionsgrenzen

Die Detektionsgrenzen für Quetiapin, Quetiapindesethanol und Quetiapin-*N*-Oxid wurden gemäß den Bestimmungen des Ph. Eur. 7 (Signal-Rausch-Verhältnis 3:1) ermittelt. Für alle drei Substanzen ergab sich ein Wert von 0.4 µg/ml.

Die Arbeitsgruppe um *DeVane et al.* hat die Plasmakonzentration von Quetiapin bei Patienten untersucht, deren Dosis bei 25 mg lag. 1.5 h nach Gabe wurden maximale Konzentrationen von 53 – 117 µg/ml gemessen [158]. Demnach ist die entwickelte CZE-Methode sehr gut geeignet um *In-vivo*-Proben hinsichtlich der Quetiapin-Konzentration zu analysieren.

## 5.6 Ergebnisse der Reinheitsanalytik von Quetiapin

Insgesamt gesehen ließ sich für Quetiapin und seine verwandten Substanzen Quetiapindesethanol, Quetiapin-*N*-Oxid und Quetiapinlactam eine wasserfreie CE-Methode entwickeln, bei der die Salzkonzentration in vorgegebenen Grenzen variabel gewählt werden konnte. Für Quetiapin und zwei seiner verwandten Substanzen, Quetiapindesethanol und Quetiapin-*N*-Oxid, wurde zusätzlich eine einfache, wässrige CZE-Methode entwickelt, die abschließend validiert werden konnte. Bei beiden Methoden wurde als HGE ein saures Milieu gewählt, in dem drei der untersuchten Substanzen positiv geladen vorliegen. Die positive Ladung lässt die Analyten vor dem EOF zum Detektor wandern, der aufgrund der Normalspannung in diesem Teil der Arbeit auf Seiten der Kathode zu finden war. Das Trennprinzip basiert in beiden Fällen einzig auf den unterschiedlichen Masse-Ladungs-Verhältnissen der Stoffe und der daraus resultierenden ungleichen Wanderungsgeschwindigkeiten.

Im wasserfreien HGE konnte Quetiapin mit hoher Auflösung von den drei untersuchten verwandten Substanzen getrennt werden. Die Elektropherogramme zeigen annähernd symmetrische Peaks, die eine hohe und schmale Form aufweisen. Obwohl diese NACE-Methode sehr gute Ergebnisse lieferte, konnte sie nicht validiert werden. In dem organischen Lösungsmittelgemisch kam trotz des hohen Salzgehaltes in vielen Fällen kein stabiler Stromfluss zustande. Der Strom brach oft schon nach wenigen Minuten ab, so dass ein großer Teil der Messungen nicht vollendet werden konnte. Somit war eine Validierung nicht durchführbar.

Ein wichtiger Vorteil des wasserfreien HGE war die Tatsache, dass Quetiapinlactam nur in organischen Lösungsmitteln löslich war. Schon geringe Mengen an Wasser oder wässrigem Puffer verschlechterten die Löslichkeit des Lactams so stark, dass eine Analyse nicht mehr möglich war. Um dennoch eine Validierung für Quetiapin durchführen zu können, wurde eine wässrige CZE-Methode entwickelt, mit der die beiden wasserlöslichen verwandten Substanzen bestimmt werden konnten. Diese Methode wurde anhand der Wiederholpräzision und der Detektionsgrenzen validiert. Die geringen Werte der prozentualen Standardabweichung geben an, dass die Methode präzise Ergebnisse liefert.

Außerdem zeigen die niedrigen, ermittelten Detektionsgrenzen, dass die Methode auch für *In-vivo*-Proben angewendet werden kann.



## **6 ZUSAMMENFASSUNG**

Die Kapillarelektrophorese (CE), deren Trennprinzip auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld basiert, ist eine Methode, die in verschiedenen Techniken angewandt werden kann. Sowohl die wässrige Kapillarzonenelektrophorese (CZE) als auch die wasserfreie CE (NACE), aber auch die elektrokinetische Chromatographie mittels Mikroemulsion (MEEKC) wurden in dieser Arbeit für die Reinheitsanalytik der im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Wirkstoffe Ethambutol, Quetiapin, Ephedrin sowie Levodopa und deren jeweils strukturverwandter Substanzen benutzt.

Der Wirkstoff Ethambutol wird in der (*S,S'*)-Form verwendet, die im Ph. Eur. 7 als Dihydrochlorid aufgeführt ist. Um eine Trennmethode für (*S,S'*)-Ethambutol, sein Enantiomer und die achirale *meso*-Verbindung entwickeln zu können, wurden die beiden stereoisomeren Verunreinigungen aus 2-Amino-1-butanol und Diethyloxalat synthetisiert. Zur Trennung dieser drei Ethambutol-Isomere wurde CZE als Methode gewählt. In saurem Phosphatpuffer musste eine hohe Probenkonzentration von 1 mg/ml verwendet werden, um die Substanzen mit UV detektieren zu können ( $\lambda$ : 200 nm). In alkalischem Tetraboratpuffer war das Chromophor dank der freien Elektronenpaare der Stickstoff-Moleküle besser ausgeprägt und die Intensität der Peaks deutlich intensiver. Als chirale Selektoren wurden die nativen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextine (CDs) und verschiedene derivatisierte  $\beta$ -CDs eingesetzt. Die Methode wurde vielfach in Bezug auf Molarität und pH-Wert der Puffer, Konzentration der verschiedenen chiralen Selektoren, Spannung und Temperatur modifiziert. Jedoch konnte keine Trennung der Stereoisomere erreicht werden.

Eine CD-modifizierte MEEKC-Methode wurde herangezogen, um die Racemate der Aminosäuren Dopa, Methyldopa, Tyrosin und Phenylalanin voneinander zu trennen. Dazu wurde eine Mikroemulsion (ME) aus Ethylacetat, SDS, 1-Butanol, Phosphatpuffer, sulf.  $\beta$ -CD und, wenn nötig, aus dem organischen Modifizier 2-Propanol eingesetzt. Für jede DL-Aminosäure wurde die Zusammensetzung der ME als auch die Geräteeinstellungen (Spannung, Temperatur) optimiert. Die Trennung von DL-Dopa konnte ohne Zugabe eines organischen Modifiers durchgeführt werden. Auf Grundlage dieser individuellen Methoden wurden zwei CD-modifizierte MEEKC-Methoden entwickelt, mit denen alle vier untersuchten Racemate getrennt werden konnten. Die

abschließende Validierung in Bezug auf Wiederholpräzision (Auflösung, Migrationszeiten, Verhältnis der korrigierten Peakflächen und Anzahl der theoretischen Böden) und Detektionsgrenzen zeigte, dass die Methoden präzise Ergebnisse liefern.

Die Technik der MEEKC wurde auch zur Trennung von Ephedrin-Derivaten genutzt. *Wedig et al.* [145, 146] konnten die Racemate von Ephedrin, Pseudoephedrin, *N*-Methylephedrin und Norephedrin mit einer HDAS- $\beta$ -CD-modifizierten CZE-Methode in einem Lauf basislinientrennen, indem ein 50 mM Phosphatpuffer, pH 3,0 als HGE eingesetzt wurde. Aus diesem HGE und den organischen Bestandteilen, die zur Trennung der Aminosäuren führten, wurde eine ME hergestellt. Entgegen der Methode von *Wedig et al.* [145, 146] konnte mittels HDAS- $\beta$ -CD keine zufriedenstellende Trennleistung erreicht werden. Durch Austausch des chiralen Selektors gegen sulf.  $\beta$ -CD und Modifizierung des Phosphatpuffers in Ionenstärke und pH-Wert konnte für alle vier Ephedrin-Derivate eine Basislinientrennung erzielt werden. Diese MEEKC-Methode wurde auf weitere Ephedrin-Derivate angewandt, wodurch das racemische 2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol partiell, die Racemate von Adrenalin, 2-Amino-1-phenylethanol und Diethylnorephedrin vollständig voneinander getrennt werden konnten. Während mit der HDAS- $\beta$ -CD-modifizierten CZE-Methode alle vier Ephedrin-Derivaten in einem Lauf getrennt werden konnten, hat die MEEKC-Methode den Vorteil mit dem kostengünstigeren sulf.  $\beta$ -CD auszukommen.

Schlussendlich wurde eine Reinheitsanalytik von Quetiapin und seinen verwandten Substanzen Quetiapin-desethanol, Quetiapin-*N*-Oxid und Quetiapinlactam entwickelt. Die Struktur des in der Literatur noch nicht beschriebenen Quetiapinlactam wurde durch massenspektrometrische (MS) als auch Infrarot (IR)- und NMR-spektroskopische Untersuchungen aufgeklärt: Dibenzo[b,f][1,4]thiazepin-11(10H)-on. Da Quetiapinlactam fast ausschließlich in organischen Lösungsmitteln löslich ist, sollte eine wasserfreie CE-Methode (NACE) eingesetzt werden. Zwar konnte eine Methode entwickelt werden, deren HGE aus Methanol, Acetonitril, Ammoniumacetat und Essigsäure bestand, und mit der Quetiapin und seine drei verwandten Substanzen sehr gut getrennt werden konnten. Allerdings konnte sie aufgrund von Stromabbrüchen

nicht validiert werden. Alternativ wurde eine wässrige, gut reproduzierbare CZE-Methode gefunden, deren Elektrolytlösung aus einem 80 mM Phosphatpuffer, pH 4.0 bestand. Aufgrund der Wasserunlöslichkeit von Quetiapinlactam konnten so nur Quetiapin und die Verunreinigungen Quetiapindesethanol und Quetiapin-*N*-Oxid erfasst werden. Abschließend wurde die CZE-Methode validiert, wodurch die hohe Präzision der ermittelten Werte gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verwendeten CZE- als auch MEEKC-Methoden gute und präzise Ergebnisse geliefert haben. Besonders die CD-modifizierte MEEKC stellte sich als zuverlässige und vielseitig einsetzbare Technik für chirale Trennungen heraus.



## **7 SUMMARY**

The separation mechanism of capillary electrophoresis (CE) is based on the mobility of ions in an electric field. CE is a versatile technique, which can be operated in different modes. In this work, both aqueous capillary zone electrophoresis (CZE) and nonaqueous CE (NACE) and microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) were investigated. Using these CE methods, impurity analysis was accomplished for several pharmaceuticals, which are described in the European Pharmacopoeia (Ph. Eur.): ethambutol, quetiapine, ephedrine, levodopa and correspondingly related substances.

The active agent ethambutol is used in the (*S,S'*)-configuration and in Ph. Eur. 7 the monograph describes the dichloride of the substance. In order to develop a separation method for (*S,S'*)-ethambutol, its enantiomer and the achiral *meso*-compound were synthesized by the reaction of 2-amino-1-butanol and diethyloxalate. For the separation of these ethambutol compounds the CZE technique was chosen. After using an acid phosphate buffer, the concentration of the sample solution had to be set at 1 mg/ml for an sufficient UV adsorption ( $\lambda$ : 200 nm). After using a basic tetraborate buffer, the chromophore was more sensitive due to the electron pair of the nitrogen molecule, which led to higher peak intensity. Native  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins (CDs) and some derivatives of  $\beta$ -CD were added to the background electrolyte (BGE) as chiral selectors. The CZE method was modified in many ways, e. g. in molarity and pH value of the BGE, in concentration of the chiral selectors, in voltage and in temperature. In spite of various variations, the separation of the stereoisomers was not successful.

A CD-modified MEEKC method was applied to separate the racemates of dopa, methyl dopa, tyrosine and phenylalanine. For this purpose, a microemulsion (ME) was employed, which consisted of ethyl acetate, SDS, 1-butanol, phosphate buffer, sulf.  $\beta$ -CD and 2-propanol, used as an organic modifier, if necessary. For each DL-amino acid the composition of the ME and the instrument settings (voltage, temperature) were optimized. The separation of DL-dopa was accomplished without an organic modifier. Based on the methods evolved individually, two CD-modified MEEKC methods were developed to separate all four racemates. The concluding validation of these methods with respect of repeatability (resolution, migration time, ratio of the corrected peak

areas, and number of theoretical plates) and limit of detection showed that the methods give precise results.

The technique of MEEKC was also used for the separation of ephedrine derivatives. By means of a HDAS- $\beta$ -CD-modified CZE method, *Wedig et al.* [145, 146] achieved baseline separation of racemic ephedrine, pseudoephedrine, *N*-methylephedrine and norephedrine in one run. In their experiment the BGE consisted of 50 mM phosphate buffer, pH 3.0. An ME was composed of this buffer as aqueous phase and the organic compounds, which formed the oil-phase of the ME for the amino acids. Contrary to the CZE method of *Wedig et al.* [145, 146], who used HDAS- $\beta$ -CD, no satisfying resolution was observed. Replacing the chiral selector HDAS- $\beta$ -CD with sulf.  $\beta$ -CD and modifying the phosphate buffer in ionic strength and pH value, led to baseline separation of the four mentioned ephedrine derivatives eventually. This MEEKC method was subjected to the separation of other ephedrine derivatives. So racemic 2-(dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol could partly be separated, whereas complete separation could be observed for racemic adrenaline, 2-amino-1-phenylethanol and diethylnorephedrine. Whereas the MEEKC method is much cheaper by using sulf.  $\beta$ -CD, the application of the HDAS-modified CZE method resulted in the separation of all four racemic ephedrine alkaloids in one run.

Finally, an impurity analysis of quetiapine and its related compounds quetiapine desethanol, quetiapine-*N*-oxide and quetiapine lactam was developed. The molecular structure of quetiapine lactam needed to be clarified, as this compound had not been described before. By using mass spectrometric (MS) as well as infrared (IR) and NMR investigations, the substance could be identified: Dibenzo[b,f][1,4]thiazepine-11(10H)one. As quetiapine lactam was found to be nearly insoluble in water and aqueous solutions, an NACE method had to be applied. Indeed, a method was developed with a BGE consisting of methanol, acetonitril, ammonium acetate and acetic acid. Thereby, the separation of quetiapine and its three mentioned impurities was observed with high resolution values. However, validation was impossible, because of numerous aborts of the current. Alternatively, an aqueous and highly reproducible CZE method was found with a BGE composed of 80 mM

phosphate buffer, pH 4.0. Due to the water insolubility of quetiapine lactam, only quetiapine desethanol and quetiapine-*N*-oxide could be analysed as impurities. Finally, the aqueous CZE method was validated; the high precision of the results could be verified.

Taken together, it can be summarized that both the applied CZE and MEEKC method showed good and precise results. Especially CD-modified MEEKC turned out to be a reliable and versatile method for chiral separations.

## **8 EXPERIMENTELLER TEIL**

## 8.1 Reagenzien und Materialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Substanzen, die zugehörigen Reinheitsgrade (sofern vom Hersteller angegeben) und die Bezugsquellen sind in den folgenden Tabellen aufgelistet.

### 8.1.1 Arzneistoffe, Derivate und verwandte Substanzen

Substanz	Reinheit	Hersteller / Lieferant *
(1R)-Adrenalin	≥ 98%	SA
(1RS)-Adrenalin-HCl	≥ 98%	SA
(1R)-2-Amino-1-phenylethanol	purum ≥ 97%	FL
(1S)-2-Amino-1-phenylethanol	purum ≥ 97%	FL
(1R,2S)-2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol	97%	SA
(1S,2R)-2-(Dibutylamino)-1-phenyl-1-propanol	95%	SA
(1R,2S)-Diethylnorephedrin	purum ≥ 95%	FL
(1S,2R)-Diethylnorephedrin-HCl	purum ≥ 95%	FL
(1RS)-Dipivefrin-HCl	k. A.	AP
DL-Dopa	purum ≥ 96%	FL
L-Dopa	≥ 99%	FL
(1R,2S)-Ephedrin	98%	SA
(1S,2R)-Ephedrinhemihydrat	98%	SA
(1S,2S)-Ethambutol	synthetisiert	PZLC
(1R,2R)-Ethambutol	synthetisiert	PZLC
(1RS,2RS)-Ethambutol	synthetisiert	PZLC
meso-Ethambutol	synthetisiert	PZLC
(1S,2S)-Ethambutol-2HCl	k. A.	SA
DL-Methyldopa	k. A.	TA
L-Methyldopasesquihydrat	≥ 99%	FL
(1R,2S)-N-Methylephedrin	99%	SA
(1S,2R)-N-Methylephedrin	purum ≥ 95%	FL

Substanz	Reinheit	Hersteller / Lieferant *
(1 <i>R</i> )-Noradrenalin-hydrogen-L-tartrat Monohydrat	≥ 99%	SA
(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )-Norephedrin	99%	SA
(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> )-Norephedrin	98%	SA
DL-Phenylalanin	puriss. ≥ 99%	FL
L-Phenylalanin	≥ 99%	FL
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-Pseudoephedrin	98%	SA
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-Pseudoephedrin	98%	SA
Quetiapin	k. A.	DCC
Quetiapindesethanol	k. A.	DCC
Quetiapinlactam	k. A.	DCC
Quetiapin- <i>N</i> -Oxid	k. A.	DCC
DL-Tyrosin	~ 99%	FL
L-Tyrosin	≥ 99%	FL

\* detaillierte Angaben zu Hersteller bzw. Lieferant:

AP = Allergan Pharmaceuticals, Westport, IRL

DCC = Prof. F. Belal, Kairo, ET; bezogen von „Drug Control Center“, Riyadh, KSA <sup>i</sup>

FL = Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH

PZLC = Institut für Pharmazie und LMC, Universität Würzburg, D

SA = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

TA = Torbjörn Arvidsson, Uppsala, S <sup>ii</sup>

<sup>i</sup> Herzlichen Dank an Herrn Prof. Fathalla Belal, der im Rahmen seiner Deutschlandreise Quetiapin und seine Derivate an der Universität Würzburg untersucht und anschließend die Substanzen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Holzgrave überlassen hat.

<sup>ii</sup> Vielen Dank an Torbjörn Arvidsson für die nette Spende der Reinsubstanz DL-Methyldopa.

**8.1.2 Puffer- und Hintergrundelektrolytsubstanzen**

Substanz	Reinheit	Hersteller / Lieferant *
1-Butanol	> 99.7%, GC	SA
Borsäure	p. a.	Chem
Ethylacetat	99.98%	FS
<i>n</i> -Heptan	99%	SA
Natriumdihydrogen-phosphat, wasserfrei	purum, p. a. $\geq$ 99%	FL
Natriumdodecylsulfat (SDS)	$\geq$ 99%	FL
0,1 M NaOH-Lösung		GR
Natriumtetraborat, Decahydrat	p. a. 99.5%	SA
<i>n</i> -Octan	98%	SA
Phosphorsäure 85%	p. a.	GR
2-Propanol	p. a.	FS
0,1 M HCl-Lösung		GR
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	ultrapure, $\geq$ 99%	SA

\* detaillierte Angaben zu Hersteller bzw. Lieferant:

Chem = Chemikalienausgabe, Universität Würzburg

FL = Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH

FS = Fisher Scientific, Nidderau, D

GR = Grüssing, Filsum, D

SA = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

**8.1.3 Substanzen für die Ethambutol-Synthese**

Substanz	Reinheit	Hersteller / Lieferant *
(-)-2-Aminobutanol	98%	AO
(±)-2-Aminobutanol	97%	AO
1,2-Dibromethan	99%	AO
Diethyloxalat	$\geq$ 99%	SA
5,5 N HCl in 2-Propanol		SA
Kaliumhydroxid	p. a.	Chem



Substanz	Reinheit	Hersteller / Lieferant *
2,3 M Lithiumaluminiumhydrid in THF		SA
Natriumhydroxid	p. a.	Chem

\* detaillierte Angaben zu Hersteller bzw. Lieferant:

AO = Acros Organics, Geel, B

Chem = Chemikalienausgabe, Universität Würzburg

SA = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

### 8.1.4 Cyclodextrine

Cyclodextrin	Hersteller / Lieferant *
Carboxymethyl- $\beta$ -CD	FL
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri- <i>O</i> -benzoyl)- $\beta$ -CD	FL
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl)- $\beta$ -CD	FL
<i>Heptakis</i> (2,3-di- <i>O</i> -acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD, Natriumsalz	RT
<i>Heptakis</i> (2,3-di- <i>O</i> -methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD, Natriumsalz	RT
<i>Heptakis</i> (2,6-di- <i>O</i> -methyl)- $\beta$ -CD	FL
<i>Heptakis</i> (6-sulfato)- $\beta$ -CD, Natriumsalz	RT
2-Hydroxypropyl- $\beta$ -CD	SA
2-Hydroxypropyl- $\gamma$ -CD	SA
phosphatiertes $\beta$ -CD	FL
sulfatiertes $\beta$ -CD, (Derivatisierungsgrad 7-11)	FL, SA
$\alpha$ -CD	WA
$\beta$ -CD	WA
$\gamma$ -CD	WA

\* detaillierte Angaben zu Hersteller bzw. Lieferant:

FL = Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH

RT = Regis Technologies Inc., Morton Grove, IL, USA

SA = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

WA = Wacker-Chemie, Burghausen, D

### 8.1.5 Lösungsmittel

Substanz	Reinheit	Hersteller / Lieferant *
Aceton	p. a.	RH
Acetonitril	HPLC grade 99.99%	FS
Diethylether	p. a.	SA
Ethanol	p. a.	FS
Methanol	HPLC grade 99.99%	FS
1-Propanol	HPLC grade 99.5%	SA
Tetrahydrofuran		SA
Wasser, demineralisiert		MC

\* detaillierte Angaben zu Hersteller bzw. Lieferant:

FS = Fisher Scientific, Nidderau, D

MC = hergestellt durch Filteranlage, Milli-Q, Millipore corporation, Bedford, MA, USA

RH = Riedel-de Haën, Seelze, D

SA = Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

### 8.2 Geräte und Software

Für die Messungen der vorliegenden Arbeit wurden zwei CE-Geräte verwendet.

Gerät	<i>Beckman Coulter CE</i>	<i>Agilent HP<sup>3D</sup> CE</i>
Detektor	UV- oder PDA	PDA
Software	P/ACE MDQ Version 2.3	Chem Station Rev. A 08.03
Hersteller	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA	Agilent Technologies, Waldbrunn, D
Kapillaren	unbeschichtete Quarzglas kapillaren, 50 oder 75 µm I.D., 375 µm O.D., Polymicro BGB-Analytik, Schlossböckelheim, D	

Außerdem wurden folgende Geräte und Labormaterialien benötigt:

Gerät	Beschreibung/Hersteller
CME-Filter (0.22 µm)	Cellulose-Misch-Ester (Celluloseacetat und –citrat) Membranfilter, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Eppendorf-Pipetten	10 – 100 µl, 100 – 1000 µl, 500 – 5000 µl, Eppendorf, Köln, D
IR-Spektrometer	Biorad-PharmalyzIR FT-IR-Spektrometer mit Diamant- ATR-Einheit, Fa. Digilab GmbH, München, D
Magnetrührer	MiniMR Ikamag, Ika Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Massenspektrometer	Gerät: Agilent 1100 LC/MSD Trap, Waldbrunn, D Spritzenpumpe: KD Scientific, Holliston, MA, USA
Mikrowelle	MileStone MLS Ethos 1600, Mikrowellen-Laborsysteme, Leutkirch, D
NMR-Spektrometer	Bruker Kernresonanzspektrometer AV 400, Fa. Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, D ( <sup>1</sup> H-NMR: 400,132 MHz, <sup>13</sup> C-NMR: 100,613 MHz)
pH-Meter	PHM 220, MeterLab, Radiometer, Copenhagen, Lyon, F
PVDF-Filter (0.22 µm)	Polyvinylidenfluorid Membranfilter, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Trockenschrank	Heraeus (Version T 20), Hanau, D
Ultraschallbad	2510-Branson-Sonicator, Heinemann, Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, D
Analysenwaage	Sartorius Research R 160, P, Sartorius, Göttingen, D

### 8.3 Herstellung der Lösungen und CE-Bedingungen

Im Folgenden werden die Beschreibung zur Herstellung der Probenlösungen und der Hintergrundelektrolyte, die Messbedingungen für die verschiedenen CE-Reinheitsbestimmungen und gegebenenfalls der weiteren Analysemethoden erläutert, thematisch geordnet nach den einzelnen Kapiteln der vorliegenden Arbeit.

### 8.3.1 Ethambutol – Synthese und Analytik

#### 8.3.1.1 NMR-Untersuchung zur Ethambutol-Synthese

Zur Beschreibung des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums werden folgende Abkürzungen verwendet: m = Multiplett, s = Singulett, t = Triplett.

Als interner Standard wird der Mittelpunkt des Signals des deuterierten Lösungsmittels verwendet ( $\text{D}_2\text{O}$ : 4.67 ppm). Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

Für *meso*-Ethambutol wurden folgende Werte ermittelt:

$^1\text{H}$ -NMR: ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\delta$  [ppm]): 0.93 (6H, t, J: 7.5,  $2\times\text{CH}_3$ ), 1.55-1.82 (4H, m,  $2\times\text{CH}_2$ ), 3.25-3.34 (2H, m,  $2\times\text{N-CH}$ ), 3.55 (4H, s,  $2\times\text{N-CH}_2$ ), 3.72-3.94 (4H, m,  $2\times\text{CH}_2\text{-OH}$ )

#### 8.3.1.2 CZE-Methoden für Ethambutol

##### PROBENVORBEREITUNG

Zur Herstellung der Probelösungen wurden jeweils Stammlösungen von (*S,S'*)-, (*R,R'*)- und *meso*-Ethambutol hergestellt. Von den einzelnen Ethambutol-Stereoisomeren wurden je 60.0 bzw. 30.0 mg abgewogen und auf 10.0 ml mit dem entsprechenden Lösungsmittel aufgefüllt. Für die Untersuchungen mit saurem HGE wurden die Substanzen in 0.1 M HCl gelöst, für die Untersuchungen mit basischem HGE erfolgte die Lösung der Substanzen im jeweils verwendeten Tetraboratpuffer. Im nächsten Schritt wurden die Stammlösungen mit 60 mg Substanz 1:10 verdünnt. So lag jede Substanz in einer Konzentration von 0.6 bzw. 3.0 mg/ml gelöst vor. Die drei jeweils gleich konzentrierten Substanzlösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt, um die fertigen Analysenlösungen von 0.2 bzw. 1.0 mg/ml von jeder Substanz zu erhalten. Vor Gebrauch wurden die Lösungen durch einen 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF-Filter filtriert und für 20 min im Ultraschallbad entgast.

##### HERSTELLUNG DES HINTERGRUNDELEKTROLYTEN

Für die Untersuchungen im sauren Milieu wurde je ein 60, 80 und 100 mM Phosphatpuffer, pH 2.0 und pH 2.5, hergestellt. Dafür wurden jeweils 7.20, 9.60

und 12.00 g Natriumdihydrogenphosphat mit ca. 980 ml demineralisiertem Wasser unter Rühren gelöst, der pH-Wert dieser Lösungen mit konzentrierter Phosphorsäure (85%) auf 2.00 oder 2.50 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nochmals kontrolliert und wenn nötig mit konzentrierter Phosphorsäure korrigiert.

Für die Untersuchungen im alkalischen Milieu wurde je ein 12.5 und 20 mM Tetraboratpuffer, pH 9, 9.5, 10, 11 und 12, hergestellt. Hierzu wurden je fünfmal 4.767 und 7.627 g Natriumtetraborat Decahydrat eingewogen, unter Rühren mit ca. 980 ml demineralisiertem Wasser gelöst und die geforderten pH-Werte mit 20 mM Borsäure eingestellt. Abschließend wurde mit destilliertem Wasser auf 1000.0 ml aufgefüllt, der pH-Wert erneut kontrolliert und wenn nötig mit 1 M NaOH-Lösung korrigiert.

Für die chiralen Trennungen wurden die verschiedenen CDs in den Konzentrationen 1, 5 und 25 mM in 6 ml HGE gelöst. Die exakten Einwaagen sind in Tabelle 20 aufgelistet. Für die CDs mit unterschiedlichem Derivatisierungsgrad wird in der Tabelle nur eine ungefähre Molmasse angegeben. Hier liegt der Mittelwert des Derivatisierungsgrades der Berechnung zugrunde.

Vor Gebrauch wurde der CD-versetzte HGE durch einen 0.22 µm CME-Membranfilter filtriert und für 20 min im Ultraschallbad entgast.

**Tabelle 20: Einwaagen der verschiedenen CDs in unterschiedlichen Konz. in 6 ml HGE**

<b>CD</b>	<b>M<sub>r</sub> [g/mol]</b>	<b>für 1 mM [mg]</b>	<b>für 5 mM [mg]</b>	<b>für 25 mM [mg]</b>
α-CD, nativ	973	5.8	29.2	146.0
β-CD, nativ	1135	6.8	34.1	170.3
γ-CD, nativ	1297	7.8	38.9	194,6
2-Hydroxypropyl-β-CD	~1419	8.5	42.6	212.9
Carboxymethyl-β-CD	~1855	11.1	55.7	278,3
HDAS-β-CD	2438	14.6	73.1	365.7
HDMS-β-CD	2046	12.3	61.4	306.9
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri-O-benzoyl)-β-CD	3321	19.9	99.6	498.2
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri-O-methyl)-β-CD	1429	8.6	42.9	214.4

Fortsetzung Tabelle 20

CD	$M_r$ [g/mol]	für 1 mM [mg]	für 5 mM [mg]	für 25 mM [mg]
<i>Heptakis</i> (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD	1331	8.0	39.9	200.0
HS- $\beta$ -CD	1850	11.1	55.5	277.5
phosphatiertes $\beta$ -CD	~2054	12.3	61.6	308.1
sulfatiertes $\beta$ -CD	~2054	12.3	61.6	308.1

CE-BEDINGUNGEN

Die Geräteeinstellungen und Messbedingungen während Entwicklung der CZE-Methode sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 21: CE-Bedingungen der CZE-Methoden für Ethambutol

CE-Gerät	Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit UV-Detektor
Kapillare	Quarzglaskapillare: 50.2 cm Gesamtlänge, 40 cm effektive Länge, Innendurchmesser: 50 $\mu$ m
Temperatur (Variationen)	Kapillare: 15, 20, 25 °C Probenaufbewahrung: 8 °C
Spannung (Variationen)	10, 15, 20, 25 kV (bei neutralen CDs im Sauren und bei Messungen mit alkalischen HGE) -10, -15, -20, -25 kV (bei neg. geladenen CDs im Sauren)
HGE (Variationen)	60, 80 bzw. 100 mM Phosphatpuffer, pH 2.0 bzw. 2.5 für sauren HGE 12.5 bzw. 20 mM Tetraboratpuffer, pH 9, 9.5, 10, 11, 12 für basischen HGE
Injektion	hydrodynamisch: 34 mbar für 5 s
Detektion	200 nm
Konditionierung <i>neue Kapillare (25 °C)</i>	10 min – 2 bar – 1 M NaOH 5 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 10 min – 2 bar – dem. Wasser 5 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung <i>vor der 1. Mess. (Trenntemp.)</i>	5 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 3 min – 2 bar – dem. Wasser 6 min – 2 bar – HGE

Fortsetzung Tabelle 21

Konditionierung vor jeder Mess. (Trenntemp.)	3 min – 2 bar – 0.1 M NaOH
	3 min – 2 bar – dem. Wasser
	2 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	2 min – 2 bar – dem. Wasser
	5 min – 2 bar – HGE
Konditionierung nach der letzten Mess. (30 °C)	10 min – 2 bar – 0.1 M NaOH
	5 min – 2 bar – dem. Wasser

Mess. = Messung

### 8.3.2 Enantiomerentrennung mittels MEEKC

#### 8.3.2.1 Aminosäuren

Folgende CD-modifizierte MEEKC-Methoden wurden zur Enantiomerentrennung der racemischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin, Dopa und Methyl-dopa eingesetzt.

#### PROBENVORBEREITUNG

Für die Herstellung der Probelösungen wurden Stammlösungen aller Aminosäuren hergestellt. Hierfür wurden von jedem Enantiomer 20.0 mg oder entsprechend 40.0 mg des Racemats abgewogen, in 0.1 M HCl-Lösung gelöst und mit dem gleichen Lösungsmittel auf 10.0 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde mit 0.1 M HCl-Lösung 1:10 verdünnt, so dass jede Substanz in einer Konzentration von 0.2 mg/ml vorlag. Für die LOD-Bestimmungen mussten die Proben mit 0.1 M HCl-Lösung bis zu einer Konzentration von 0.2 µg/ml verdünnt werden. Alle Probelösungen wurden vor der Verwendung durch einen 0.22 µm CME-Membranfilter filtriert.

#### HERSTELLUNG DER MIKROEMULSION

Als wässrige Phase der ME wurde Phosphatpuffer (20 oder 40 mM, pH 2.0 oder 2.5) eingesetzt. Für 20 mM Puffer wurden 2.40 g, für 40 mM Puffer 4.80 g Natriumdihydrogenphosphat abgewogen und mit ca. 980 ml destilliertem Wasser unter Rühren gelöst. Der pH-Wert der jeweils erhaltenen Lösung wurde mit konzentrierter Phosphorsäure (85%) auf 2.00 oder 2.50 eingestellt und mit

destilliertem Wasser auf 1000.0 ml aufgefüllt. Danach wurde der pH-Wert überprüft gegebenenfalls mit konzentrierter Phosphorsäure korrigiert.

Zur Herstellung von 50.0 g ME wurden die nachfolgend aufgeführten Substanzen (Reihenfolge: SDS, Phosphatpuffer, 1-Butanol, Ethylacetat und 2-Propanol) in den angegebenen Mengen (s. Tabelle 22 - Tabelle 28) abgewogen, unter Rühren gelöst und anschließend für 20 min im Ultraschallbad entgast, um eventuell gebildeten Schaum zu zerstören. Die jeweils entstandenen MEs waren farblos und transparent. Der chirale Selektor sulf.  $\beta$ -CD wurde in der entsprechenden Menge in den MEs gelöst. Vor Gebrauch wurden die CD-versetzten MEs durch einen 0.22  $\mu$ m PVDF-Membranfilter filtriert und nochmals im Ultraschallbad entgast.

#### INDIVIDUELL ENTWICKELTE METHODE: DOPA

<b>Substanz</b>	<b>Anteil</b>	<b>Einwaage für 50 g</b>
Ethylacetat	0.5% (w/w)	0.25 g
SDS	1.5% (w/w)	0.75 g
1-Butanol	3.0% (w/w)	1.5 g
Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5)	95.0% (w/w)	47.5 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. $\beta$ -CD	1.25% (w/v)	0.075 g in 6 ml HGE

**Tabelle 22: Zusammensetzung der ME für die Enantiomerentrennung von DL-Dopa**

#### INDIVIDUELL ENTWICKELTE METHODE: METHYLDOPA

<b>Substanz</b>	<b>Anteil</b>	<b>Einwaage für 50 g</b>
Ethylacetat	1.0% (w/w)	0.5 g
SDS	1.5% (w/w)	0.75 g
1-Butanol	3.0% (w/w)	1.5 g
2-Propanol	2.0% (w/w)	1.0 g
Phosphatpuffer (40 mM, pH 2.5)	92.5% (w/w)	46.25 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. $\beta$ -CD	4.0% (w/v)	0.24 g in 6 ml HGE

**Tabelle 23: Zusammensetzung der ME für Enantiomerentrennung von DL-Methyldopa**



INDIVIDUELL ENTWICKELTE METHODE: PHENYLALANIN

Substanz	Anteil	Einwaage für 50 g
Ethylacetat	1.0% (w/w)	0.5 g
SDS	1.4% (w/w)	0.7 g
1-Butanol	4.0% (w/w)	2.0 g
2-Propanol	2.8% (w/w)	1.4 g
Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.0)	90.8% (w/w)	45.4 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. $\beta$ -CD	4.0% (w/v)	0.24 g in 6 ml HGE

Tabelle 24: Zusammensetzung der ME für Enantiomerentrennung von DL-Phenylalanin

INDIVIDUELL ENTWICKELTE METHODE: TYROSIN

Substanz	Anteil	Einwaage für 50 g
Ethylacetat	0.4% (w/w)	0.2 g
SDS	1.4% (w/w)	0.7 g
1-Butanol	3.6% (w/w)	1.8 g
2-Propanol	2.8% (w/w)	1.4 g
Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.0)	91.8% (w/w)	45.9 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. $\beta$ -CD	1.5% (w/v)	0.09 g in 6 ml HGE

Tabelle 25: Zusammensetzung der ME für Enantiomerentrennung von DL-Tyrosin

ALLGEMEIN ANWENDBARE METHODE: ME I

Substanz	Anteil	Einwaage für 50 g
Ethylacetat	1.0% (w/w)	0.5 g
SDS	1.5% (w/w)	0.75 g
1-Butanol	3.0% (w/w)	1.5 g
Phosphatpuffer (20 mM, pH 2,5)	94.5% (w/w)	47.25 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. $\beta$ -CD	4.0% (w/v)	0.24 g in 6 ml HGE

Tabelle 26: Zusammensetzung von ME I

ALLGEMEIN ANWENDBARE METHODE: ME II

Substanz	Anteil	Einwaage für 50 g
Ethylacetat	1.0% (w/w)	0.5 g
SDS	1.4% (w/w)	0.7 g
1-Butanol	4.0% (w/w)	2.0 g
2-Propanol	2.8% (w/w)	1.4 g
Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5)	90.8% (w/w)	45.4 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. $\beta$ -CD	4.0% (w/v)	0.24 g in 6 ml HGE

Tabelle 27: Zusammensetzung von ME II

ALLGEMEIN ANWENDBARE METHODE: ME III

Substanz	Anteil	Einwaage für 50 g
Ethylacetat	0.5% (w/w)	0.25 g
SDS	1.5% (w/w)	0.75 g
1-Butanol	3.0% (w/w)	1.5 g
2-Propanol	2.0% (w/w)	1.0 g
Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5)	93.0% (w/w)	46.5 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. $\beta$ -CD	4.0% (w/v)	0.24 g in 6 ml HGE

Tabelle 28: Zusammensetzung von ME III

CE-BEDINGUNGEN

Die Geräteeinstellungen und Messbedingungen der CE-Methoden sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 29: CE-Bedingungen der MEEKC-Methoden für Aminosäuren

CE-Gerät	Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit UV-Detektor
Kapillare	Quarzglaskapillare: 40.2 cm Gesamtlänge, 30 cm effektive Länge, Innendurchmesser: 50 $\mu$ m
Temperatur	Kapillare: 20 °C (19 °C für Phenylalanin, individuell) Probenaufbewahrung: 8 °C

Fortsetzung Tabelle 29

Spannung	- 15 kV, Umkehrspannung (- 14 kV für Phenylalanin, individuell)
HGE	verschiedene Zusammensetzungen der MEs Zusatz von sulf. $\beta$ -CD in unterschiedlichen Konzentrationen (s. Tabelle 22 -Tabelle 28)
Injektion	hydrodynamisch: 34 mbar für 5 s
Detektion	200 nm
Konditionierung <i>neue Kapillare</i> (25 °C)	10 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 5 min – 2 bar – dem. Wasser 10 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung <i>vor der 1. Mess.</i> (Trenntemp.)	5 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 3 min – 2 bar – dem. Wasser 6 min – 2 bar – HGE
Konditionierung <i>vor jeder Mess.</i> (Trenntemp.)	3 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 3 min – 2 bar – MeOH 2 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2 min – 2 bar – dem. Wasser 5 min – 2 bar – HGE
Konditionierung <i>nach der letzten</i> <i>Mess. (30 °C)</i>	10 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 5 min – 2 bar – dem. Wasser 10 min – 2 bar – MeOH

Mess. = Messung

### 8.3.2.2 Ephedrin-Derivate

Folgende CD-modifizierte MEEKC-Methode wurde zur Untersuchung der Enantiomerentrennung von racemischen Ephedrin-Derivaten eingesetzt:

#### PROBENVORBEREITUNG

Zur Herstellung der Probelösungen wurden Stammlösungen aller Ephedrin-Derivate hergestellt. Hierfür wurden von jedem Enantiomer 20.0 mg bzw. 40.0 mg des Racemats abgewogen, in 0.1 M HCl-Lösung gelöst und mit dem gleichen Lösungsmittel auf 10.0 ml aufgefüllt. Diese Stammlösungen wurden mit 0.1 M HCl-Lösung 1:10 verdünnt, so dass jede Substanz in einer Konzentration von 0.2 mg/ml vorlag. Für die LOD-Bestimmungen mussten die

Analysen (0.2 mg/ml) bis zu einer Konzentration von 1.6 µg/ml verdünnt werden. Alle Probelösungen wurden vor der Verwendung durch einen 0.22 µm CME-Membranfilter filtriert.

### HERSTELLUNG DER MIKROEMULSION

Die Herstellung des Phosphatpuffers und der MEs erfolgte nach der gleichen Vorgehensweise wie unter 8.3.2.1 beschrieben. Die Anteile der einzelnen Komponenten der ME sind in Tabelle 30 aufgeführt. Der HGE wurde mit 4.0% sulf. β-CD versetzt.

<b>Substanz</b>	<b>Anteil</b>	<b>Einwaage für 50 g</b>
Ethylacetat	0.5% (w/w)	0.25 g
SDS	1.0% (w/w)	0.5 g
1-Butanol	4.0% (w/w)	2.0 g
2-Propanol	3.0% (w/w)	1.5 g
Phosphatpuffer (20 mM, pH 2.5)	91.5% (w/w)	45.75 g
<i>zur fertigen ME:</i>		
sulf. β-CD	4.0% (w/v)	0.24 g in 6 ml HGE

**Tabelle 30: Zusammensetzung der ME zur Untersuchung von Ephedrin-Derivaten**

### CE-BEDINGUNGEN

CE-Gerät	Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit UV-Detektor
Kapillare	Quarzglaskapillare: 60.2 cm Gesamtlänge, 50 cm effektive Länge, Innendurchmesser: 50 µm
Temperatur	Kapillare: 20 °C Probenaufbewahrung: 8 °C
Spannung	-15 kV (Umkehrspannung)
HGE	ME s. Tabelle 30 Zusatz von 4.0% sulf. β-CD
Injektion	hydrodynamisch: 34 mbar für 4 s
Detektion	200 nm

Konditionierung <i>neue Kapillare</i> (25 °C)	10 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 5 min – 2 bar – dem. Wasser 10 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung <i>vor der 1. Mess.</i> (Trenntemp.)	5 min – 2 bar i – 0.1 M NaOH 3 min – 2 bar – dem. Wasser 6 min – 2 bar – HGE
Konditionierung <i>vor jeder Mess.</i> (Trenntemp.)	3 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 3 min – 2 bar – MeOH 2 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2 min – 2 bar – dem. Wasser 5 min – 2 bar – HGE
<i>nach der Mess.</i>	2 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung <i>nach der letzten</i> <i>Mess. (30 °C)</i>	10 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 5 min – 2 bar – dem. Wasser 10 min – 2 bar – MeOH

Tabelle 31: CE-Bedingungen für MEEKC-Methode für Ephedrin-Derivate

### 8.3.3 Quetiapin und verwandte Substanzen

Im Folgenden werden die Untersuchungen zur Strukturaufklärung von Quetiapin beschrieben, sowie zwei NACE-Methoden, die Quetiapin von seinen verwandten Substanzen Quetiapindesethanol, Quetiapin-*N*-Oxid und Quetiapinlactam trennen konnte, und die validierte, wässrige CZE-Methode.

#### 8.3.3.1 Messungen zur Strukturaufklärung von Quetiapinlactam

##### NMR-Untersuchungen

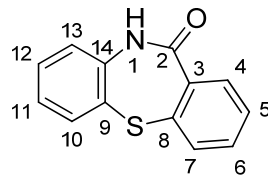
Zur Beschreibung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums werden folgende Abkürzungen verwendet: dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett.

Als interner Standard wird der Mittelpunkt des Signals des deuterierten Lösungsmittels verwendet (DMSO-d<sub>6</sub>: 2.50 ppm).

Zur Beschreibung des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums werden folgende Abkürzungen verwendet: Cq = quartärer Kohlenstoff.

Als interner Standard wird der Mittelpunkt des Signals des deuterierten Lösungsmittels verwendet (DMSO-d<sub>6</sub>: 39.52 ppm).

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.



$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

7.14 (1H, ddd,  $^3J=7.6$ ,  $^3J=7.5$ ,  $^4J=1.4$ , H-11); 7.22 (1H, dd,  $^3J=8.0$ ,  $^4J=1.2$ , H-13); 7.36 (1H, ddd,  $^3J=8.0$ ,  $^3J=7.5$ ,  $^4J=1.5$ , H-12); 7.44 (1H, ddd,  $^3J=7.5$ ,  $^3J=7.3$ ,  $^4J=1.6$ , H-5); 7.45 (1H, ddd,  $^3J=7.3$ ,  $^3J=7.3$ ,  $^4J=1.7$ , H-6); 7.52 (1H, dd,  $^3J=7.6$ ,  $^4J=1.5$ , H-7); 7.55 (1H, dd,  $^3J=7.8$ ,  $^4J=1.4$ , H-10); 7.67 (1H, dd,  $^3J=7.5$ ,  $^4J=1.5$ , H-4).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  [ppm]):

123.3 (CH, C-13); 125.7 (CH, C-11); 129.1 (CH, C-5); 129.1 (CH, C-5); 129.2 (Cq, C-9); 130.0 (CH, C-12); 131.4 und 131.6 (je CH, C-4 und C-7); 132.3 (CH, C-6); 132.7 (CH, C-10); 136.4 (Cq, C-8); 137.8 (Cq, C-3); 139.8 (Cq, C-14); 168.6 (Cq, C-2).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO)

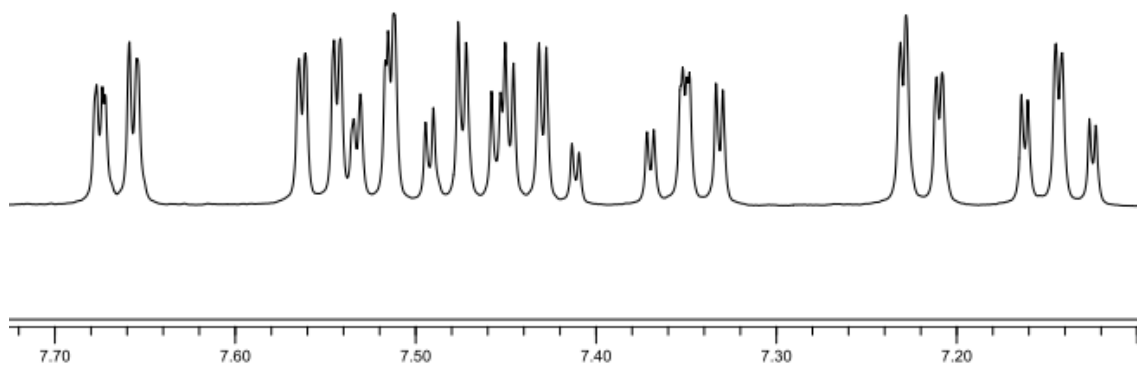


Abbildung 46:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Quetiapinlactam.

IR-Untersuchungen

IR [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 3165, 3035, 2956, 2900, 1643, 1577, 1560, 1477, 1439, 1425, 1373, 1256, 1234, 1138, 1034, 833, 781, 754, 742, 719, 690, 671.

PROBENVORBEREITUNG: ESI-MS-MESSUNGEN

Für die Herstellung der Untersuchungslösung wurden 10.0 mg Quetiapinlactam eingewogen, in Methanol gelöst und mit dem gleichen Lösungsmittel auf 10.0 ml aufgefüllt. 1.0 ml dieser Stammlösung wurde mit Methanol auf 10.0 ml verdünnt. Die entstandene Probenlösung von 100  $\mu\text{l}/\text{mg}$  wurde 1:10 verdünnt, so dass eine Probe von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in Methanol erhalten wurde.

GERÄTEEINSTELLUNGEN: ESI-MS-MESSUNGEN

MS-Gerät	Agilent 1100 LC/MSD Trap
Spritzenpumpe	KD Scientific, Flussrate: 0.6 ml/h
Temperatur der Ionenquelle	320 °C
Flussrate in der Ionenquelle	5.0 l/min
Druck des N <sub>2</sub> -Verneblergases	0.7 bar
Spannung der Kapillare	-3500 V
Trap-Parameter	Elektrospray-Ionisation, positiver Modus Scan-Bereich: 50-1000 m/z
Fragmentierungs-Parameter	Cut-Off Selection: 27%, Smart Frag: On Start-Amplit.: 30%, End-Amplit.: 200% Fragmentierungsamplitude: 1 V
Isolierungs-Parameter	Zeit: 40 ms, Weite: 10 m/z

**Tabelle 32: Messeinstellungen für die Massenspektrometrie**

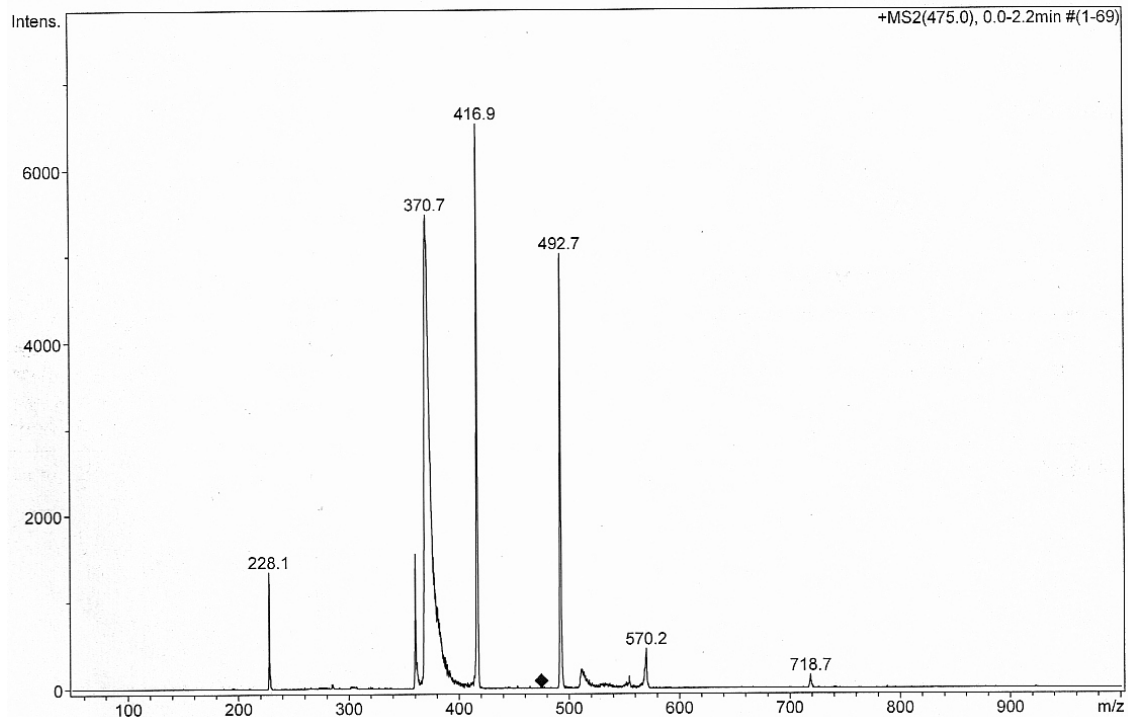


Abbildung 47: Totalionenstrom der Fragmentierung von  $[M+H]^+$  475,0.

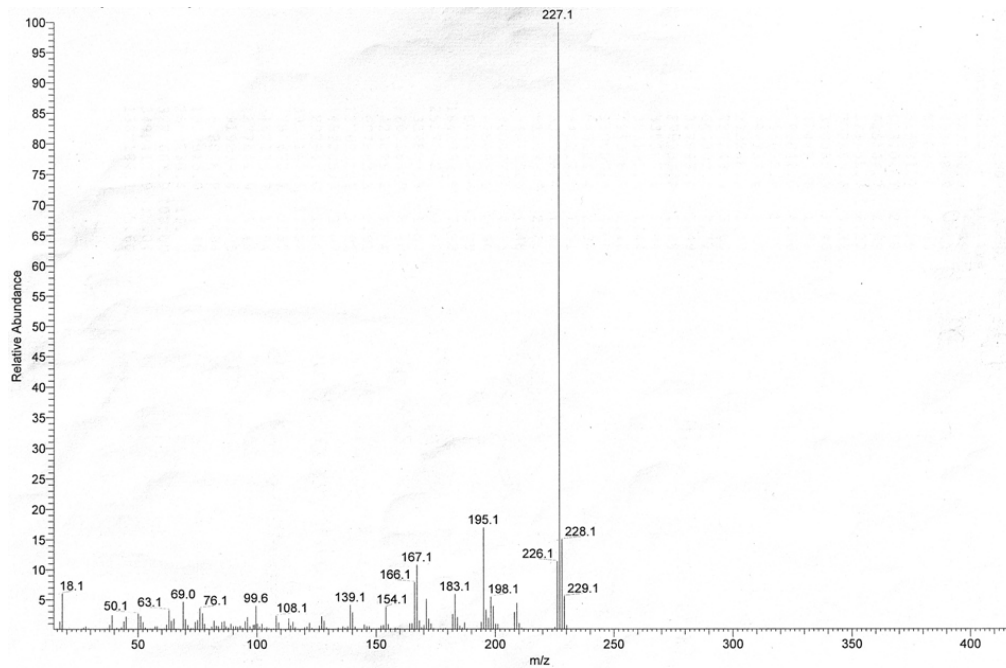
#### PROBENVORBEREITUNG: EI-MS-MESSUNGEN

Für die Strukturaufklärung mittels EI-MS-Messungen wurde lediglich eine Probe der Reinsubstanz verwendet.

#### GERÄTEEINSTELLUNGEN: EI-MS-MESSUNGEN

Die EI-MS-Untersuchungen wurden im Institut für Organische Chemie an der Universität Würzburg durchgeführt. Die genauen Geräteeinstellungen und die verwendeten Parameter sind nicht bekannt.





**Abbildung 48: Ergebnis der EI-MS-Untersuchung.**

### 8.3.3.2 NACE

#### PROBENVORBEREITUNG

Zur Herstellung der Probelösungen von Quetiapin und seinen verwandten Substanzen wurden zunächst von jeder Substanz 80.0 mg abgewogen, im verwendeten HGE (s. u.) gelöst und mit dem gleichen Lösungsmittel auf 10.0 ml aufgefüllt. Den so erhaltenen Stammlösungen wurde 1.0 ml entnommen und mit dem entsprechenden HGE auf 10.0 ml verdünnt, so dass jede Substanz in einer Konzentration von 0.8 mg/ml vorlag. Die vier Substanzlösungen wurden dann zu gleichen Teilen gemischt, so dass die fertige Analysenlösung 0.2 mg/ml von jeder Substanz enthielt. Vor Gebrauch wurde die Lösung durch einen 0.22 µm PVDF-Filter filtriert und für 20 min im Ultraschallbad entgast.

#### HERSTELLUNG DES HINTERGRUNDELEKTROLYTEN

Für die Trennung von Quetiapin und seinen verwandten Substanzen konnte der HGE aus Acetonitril, Methanol und Essigsäure sowohl mit 100 mM als auch mit 150 mM Ammoniumacetat versetzt werden. Aus den trockenen Lösungsmitteln ACN und MeOH, die unter Argonschutzgas gelagert werden, wurde eine Mischung aus gleichen Teilen hergestellt. Das stark hygroskopische Salz  $\text{NH}_4\text{Ac}$  wurde vor Verwendung in der Mikrowelle bei 80 °C getrocknet, bis alles

Wasser entwichen war. Nach Erkalten im Vakuum wurden 0.771 g (100 mM) bzw. 1.156 g (150 mM) der wasserfreien Substanz abgewogen und in ca. 80 ml des Lösungsmittelgemischs gelöst. Nach Zugabe von 1 ml AcOH wurde auf 100,0 ml aufgefüllt. Vor Gebrauch wurde der HGE durch einen 0.22 µm PVDF-Filter filtriert und für 20 min im Ultraschallbad entgast.

### CE-BEDINGUNGEN

**Tabelle 33: CE-Bedingungen für die NACE-Methodenentwicklung am Agilent-Gerät.**

CE-Gerät	Agilent HP <sup>3D</sup> CE, ausgestattet mit PDA-Detektor
Kapillare	Quarzglaskapillare: 48.5 cm Gesamtlänge, 40 cm effektive Länge, Innendurchmesser: 50 µm
Temperatur	Kapillare: 20 °C Probenaufbewahrung: Raumtemperatur
Spannung	20 kV
HGE	100 oder 150 mM NH <sub>4</sub> Ac in MeOH/ACN/AcOH (49.5:49.5:1, v/v/v)
Injektion	hydrodynamisch: 34 mbar für 6 s
Detektion	254 nm
Konditionierung <i>neue Kapillare</i> (25 °C)	20 min – 4 bar – 1 M NaOH 40 min – 4 bar – 0.1 M NaOH 5 min – 4 bar – dem. Wasser 10 min – 4 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5 min – 4 bar – dem. Wasser
Konditionierung <i>vor der 1. Mess.</i> (Trenntemp.)	7 min – 4 bar – 0.1 M NaOH (methanolisch) 5 min – 4 bar – MeOH 4 min – 4 bar – ACN
Konditionierung <i>vor jeder Mess.</i> (Trenntemp.)	10 min – 4 bar – HGE
<i>nach der Mess.</i> (Trenntemp.)	7 min – 4 bar – 0.1 M NaOH (methanolisch) 5 min – 4 bar – MeOH 4 min – 4 bar – ACN
Konditionierung <i>nach der letzten</i> <i>Mess. (30 °C)</i>	10 min – 4 bar – 0.1 M NaOH (wässrig) 5 min – 4 bar – dem. Wasser 10 min – 4 bar – MeOH

Mess. = Messung

**Gerätewechsel während der Methodenentwicklung:****Tabelle 34: CE-Bedingungen für die NACE- Methodenentwicklung am Beckman-Gerät.**

CE-Gerät	Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit PDA-Detektor
Kapillare	Quarzglaskapillare: 50.2 cm Gesamtlänge, 40 cm effektive Länge, Innendurchmesser: 50 µm
Temperatur	Kapillare: 20 °C Probenaufbewahrung: 8 °C
Spannung	20 kV
HGE	100 oder 150 mM NH <sub>4</sub> Ac in MeOH/ACN/AcOH (44.5:44.5:1, v/v/v)
Injektion	hydrodynamisch: 30 mbar für 5 s
Detektion	254 nm
Konditionierung <i>neue Kapillare</i> (25 °C)	20 min – 2 bar – 1 M NaOH 40 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 5 min – 2 bar – dem. Wasser 10 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung <i>vor der 1. Mess.</i> ( <i>Trenntemp.</i> )	7 min – 2 bar – 0.1 M NaOH (wässrig) 5 min – 2 bar – dem. Wasser 4 min – 2 bar – ACN
Konditionierung <i>vor jeder Mess.</i> ( <i>Trenntemp.</i> )	3 min – 2 bar – HGE
<i>nach der Mess.</i> ( <i>Trenntemp.</i> )	3 min – 2 bar – 0.1 M NaOH (wässrig) 3 min – 2 bar – dem. Wasser 3 min – 2 bar – ACN
Konditionierung <i>nach der letzten</i> <i>Mess. (30 °C)</i>	10 min – 2 bar – 0.1 M NaOH (wässrig) 5 min – 2 bar – dem. Wasser 10 min – 2 bar – MeOH

Mess. = Messung

**8.3.3.3 CZE****PROBENVORBEREITUNG**

Für die Herstellung der Probelösungen von Quetiapin und seinen verwandten Substanzen wurden von jeder Substanz 60.0 mg abgewogen, in 0.1 M HCl-

Lösung gelöst wiederum auf 10.0 ml aufgefüllt. In Analogie zur NACE-Methode wurden die Stammlösungen auch hier 1:10 verdünnt, so dass jede Substanz in einer Konzentration von 0.6 mg/ml vorlag. Die drei Substanzlösungen wurden erneut zu gleichen Teilen gemischt. Die Analysenlösung enthielt damit 0.2 mg/ml jeder Substanz.

Für die LOD-Bestimmungen mussten die Proben bis zu einer Konzentration von 0.4 µg/ml verdünnt werden. Dafür wurden entsprechenden Volumina der 0.2 mg/ml Substanz enthaltenden Probelösung und der 0.1 M HCl-Lösung wurden gemischt. Alle Probelösungen wurden vor der Verwendung durch einen 0.22 µm CME-Membranfilter filtriert und für 20 min im Ultraschallbad entgast.

### HERSTELLUNG DES HINTERGRUNDELEKTROLYTEN

Als HGE wurde ein 80 mM Phosphatpuffer pH 4.0 eingesetzt. Zur Herstellung des Puffers wurden 9.60 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> abgewogen und mit ca. 980 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter Phosphorsäure (85%) auf 4.00 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1000.0 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde nochmals kontrolliert und wenn nötig mit konzentrierter Phosphorsäure korrigiert. Vor Gebrauch wurde der HGE durch einen 0.22 µm CME-Membranfilter filtriert und für 20 min im Ultraschallbad entgast.

### CE-BEDINGUNGEN

CE-Gerät	Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit UV-Detektor
Kapillare	Quarzglaskapillare: 50.2 cm Gesamtlänge, 40 cm effektive Länge, Innendurchmesser: 50 µm
Temperatur	Kapillare: 20 °C Probenaufbewahrung: 8 °C
Spannung	20 kV
HGE	80 mM Phosphatpuffer, pH 4.0
Injektion	hydrodynamisch: 30 mbar für 5 s
Detektion	254 nm
Konditionierung <i>neue Kapillare</i> (25 °C)	20 min – 2 bar – 1 M NaOH (wässrig) 40 min – 2 bar – 0.1 M NaOH (wässrig)

	5 min – 2 bar – dem. Wasser 10 min – 2 bar – 0.1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung vor der 1. Mess. (Trenntemp.)	3 min – 2 bar – 0.1 M NaOH 3 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung vor jeder Mess. (Trenntemp.)	3 min – 2 bar – HGE
nach der Mess. (Trenntemp.)	3 min – 2 bar – 0.1 M NaOH (wässrig) 3 min – 2 bar – dem. Wasser
Konditionierung nach der letzten Mess. (30 °C)	10 min – 2 bar – 0.1 M NaOH (wässrig) 10 min – 2 bar – MeOH 10 min – 2 bar – dem. Wasser

**Tabelle 35: CE-Bedingungen für die CZE-Methode**



## **9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CH	Schweiz
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
D	Deutschland
dem.	demineralisiert
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
HDAS- $\beta$ -CD	<i>Heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)-<math>\beta</math>-Cyclodextrin, Natriumsalz</i>
HDMS- $\beta$ -CD	<i>Heptakis(2,3-di-O-methyl-6-sulfato)-<math>\beta</math>-Cyclodextrin, Natriumsalz</i>
HGE	Hintergrundelektrolyt
HPLC	high performance liquid chromatography
HS- $\beta$ -CD	<i>Heptakis(6-sulfato)-<math>\beta</math>-CD, Natriumsalz</i>
IR	Infrarot
LOD	limit of detection (Detektionsgrenze)
ME	Mikroemulsion
MEEKC	elektrokinetische Chromatographie mittels Mikroemulsion
MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
Mess.	Messung
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NACE	wasserfreie Kapillarelektrophorese
neg.	negativ
NMR	Kernspinresonanz ( <i>engl.: nuclear magnetic resonance</i> )
PEA	Phenylethylamin
rac.	racemisch



---

$R_s$	Auflösung
RSD	relative Standardabweichung
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sulf. $\beta$ -CD	sulfatiertes $\beta$ -Cyclodextrin
Temp.	Temperatur
$t_m$	Migrationszeit
UPLC	ultra performance liquid chromatography
vgl.	vergleiche



# **10 LITERATURVERZEICHNIS**

- <sup>1</sup> *Einleitung, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>2</sup> *Allgemeine Vorschriften 1.4, Monographien, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>3</sup> *Allgemeine Texte 5.10, Verunreinigungen in Substanzen zur pharmazeutischen Anwendung*, Europäisches Arzneibuch, 6. Ausgabe, 5. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2010.
- <sup>4</sup> Guideline Q3A(R2), *Impurities in New Drug Substances*, International Conference on Harmonisation 2006, [www.ich.org](http://www.ich.org).
- <sup>5</sup> *Allgemeine Methoden 2.2, Methoden der Physik und der physikalischen Chemie, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>6</sup> *Allgemeine Methoden 2.2.29 Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>7</sup> *Allgemeine Methoden 2.2.55 Peptidmustercharakterisierung, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>8</sup> *Allgemeine Methoden 2.6.21 – Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>9</sup> H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, *Kapillarelektrophorese – Methoden und Möglichkeiten*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig / Wiesbaden, 1994.
- <sup>10</sup> *Allgemeine Methoden 2.2.47, Kapillarelektrophorese, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>11</sup> D.R. Baker, *Capillary electrophoresis – Techniques in analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.
- <sup>12</sup> F. Fei, P. Britz-McKibbin, *Direct analysis of polyols using 3-nitrophenylboronic acid in capillary electrophoresis: thermodynamic and electrokinetic principles of molecular recognition*, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 1349-1356.
- <sup>13</sup> O. Rodionova, A. Pomerantsev, L. Houmøller, A. Shpak, O. Shpigun, *Noninvasive detection of counterfeited ampoules of dexamethasone using NIR with confirmation by HPLC-DAD-MS and CE-UV methods*, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1927-1935.
- <sup>14</sup> X. Ren, F. Qu, L. Zhang, J. Ding, Q. Liu, *Continuous intact cell detection and viability determination by CE with dual-wavelength detection*, *Electrophoresis* 31 (2010) 324-330.

- <sup>15</sup> L. Zhou, N. Yan, H. Zhang, X. Zhou, Q. Pu, Z. Hu, *Microwave-accelerated derivatization for capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: A case study for determination of histidine, 1- and 3-methylhistidine in human urine*, *Talanta* 82 (2010) 72-77.
- <sup>16</sup> N. Zhang, H.-S. Zhang, H. Wang, *Separation of free amino acids and catecholamines in human plasma and rabbit vitreous samples using a new fluorogenic reagent 3-(4-bromobenzoyl)-2-quinolinecarboxaldehyde with CE-LIF detection*, *Electrophoresis* 30 (2009) 2258-2265.
- <sup>17</sup> A.M. Rojano-Delgado, J. Ruiz-Jiménez, M.D. Luque de Castro, R. De Prado, *Determination of glyphosate and its metabolites in plant material by reversed polarity CE with indirect absorptiometric detection*, *Electrophoresis* 31 (2010) 1423-1430.
- <sup>18</sup> A. Rodat, P. Gavard, F. Couderc, *Improving detection in capillary electrophoresis with laser induced fluorescence via a bubble cell capillary and laser power adjustment*, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 42-47.
- <sup>19</sup> S.E. Moring, R.T. Reel, R.E.J. van Soest, *Optical Improvements of a Z-shaped cell for high-sensitivity UV absorbance detection in capillary electrophoresis*, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3454-3459.
- <sup>20</sup> G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001.
- <sup>21</sup> R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*, 2. Auflage, Academic Press, San Diego, CA, 2000.
- <sup>22</sup> K. Altria, *Consumables for CE*, LC-GC Europe, 23 (2010) 34-43.
- <sup>23</sup> H.J. Issaq, *A decade of capillary electrophoresis*, *Electrophoresis* 21 (2000) 1921-1939.
- <sup>24</sup> N.H.H. Heegaard, *Affinity in electrophoresis*, *Electrophoresis* 30 (2009) S229-S239.
- <sup>25</sup> J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries*, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298-1302.
- <sup>26</sup> S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries*, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111-113.
- <sup>27</sup> M.-L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I.E. Valkó, H. Sirén, *Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media*, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 13-35.

- <sup>28</sup> A. Van Eeckhaut, Y. Michotte, *Chiral separations by capillary electrophoresis*, Chromatographic Science Series, Band 100, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 2010.
- <sup>29</sup> [www.applichem.com/produkte/biochemica/detergenzien-tenside](http://www.applichem.com/produkte/biochemica/detergenzien-tenside)
- <sup>30</sup> T.P. Hoar, J.H. Schulman, *Transparent water-in-oil dispersion: the oleopathic hydro-micelle*, Nature 152 (1943) 102-103.
- <sup>31</sup> K.D. Altria, P.-E. Mahuzier, B.J. Clark, *Background and operating parameters in microemulsion electrokinetic chromatography*, Electrophoresis 24 (2003) 315-324.
- <sup>32</sup> E. Nürnberg, P. Surmann (Hrsg.), *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Band 2: Methoden*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1991.
- <sup>33</sup> C.-D. Herzfeldt, J. Kreuter (Hrsg.), *Grundlagen der Arzneiformenlehre, Galenik 2*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1999.
- <sup>34</sup> H. Watarai, *Microemulsion capillary electrophoresis*, Chem. Lett. 20 (1991) 391.
- <sup>35</sup> Y. Walbroehl, J.W. Jorgenson, *On-column UV absorption detector for open tubular capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A 315 (1984) 135-143.
- <sup>36</sup> F. Steiner, M. Hassel, *Nonaqueous capillary electrophoresis: A versatile completion of electrophoretic separation techniques*, Electrophoresis 21 (2000) 3994-4016.
- <sup>37</sup> L. Geiser, J.-L. Veuthey, *Nonaqueous capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis*, Electrophoresis 28 (2007) 45-57.
- <sup>38</sup> L. Geiser, J.-L. Veuthey, *Non-aqueous capillary electrophoresis 2005-2008*, Electrophoresis 30 (2009) 36-49.
- <sup>39</sup> A.P.F. Catai, E. Carrilho, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, *Fast separation of selective serotonin reuptake inhibitors antidepressants in plasma sample by nonaqueous capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5779-5782.
- <sup>40</sup> A. Psurek, S. Feuerstein, D. Willbold, G.K.E. Scriba, *Nonaqueous versus aqueous capillary electrophoresis of  $\alpha$ -helical polypeptides: Effect of secondary structure on separation selectivity*, Electrophoresis 27 (2006) 1768-1775.
- <sup>41</sup> Y.M. Li, D. Vanderghinste, D. Pecanac, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Analysis of cefadroxil by micellar electrokinetic capillary chromatography: Development and validation*, Electrophoresis 19 (1998) 2890-2894.

- <sup>42</sup> M.T. Bowser, A.R. Kranack, D.D.Y. Chen, *Analyte-additive interactions in nonaqueous capillary electrophoresis: a critical review*, Trends Anal. Chem. 17 (1998) 424-434.
- <sup>43</sup> R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Alvarez, J. Hernández-Méndez, *Capillary zone electrophoresis in nonaqueous solvents in the presence of ionic additives*, Anal. Chem. 69 (1997) 4437-4444.
- <sup>44</sup> A. Rousseau, P. Chiap, R. Ivanyi, J. Crommen, M. Fillet, A.-C. Servais, *Validation of a nonaqueous capillary electrophoretic method for the enantiomeric purity determination of R-flurbiprofen using a single-isomer amino cyclodextrin derivative*, J. Chromatogr. A 1204 (2008) 219-225.
- <sup>45</sup> I. Fradi, A.-C. Servais, M. Pedrini, P. Chiap, R. Ivanyi, J. Crommen, M. Fillet, *Enantiomeric separation of acidic compounds using single-isomer amino cyclodextrin derivatives in nonaqueous capillary electrophoresis*, Electrophoresis 27 (2006) 3434-3442.
- <sup>46</sup> K.P.C. Vollhardt, N.E. Schore, *Organische Chemie*, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2000.
- <sup>47</sup> H.J. Roth, *Dex-, Lev-, Ar-, Es-, Rac-, neue „reine“ Arzneistoffe*, Deutsche Apotheker Zeitung, 66 (2009) 3182-3186.
- <sup>48</sup> *Allgemeine Methoden 2.2.7, Optische Drehung, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2008.
- <sup>49</sup> A.M. Barrett, V.A. Cullum, *The biological properties of the optical isomers of propranolol and their effects on cardiac arrhythmias*, Br. J. Pharmacol. 34 (1968) 43-55.
- <sup>50</sup> P. Baumann, D.F. Zullino, C.B. Eap, *Enantiomers' potential in psychopharmacology - a critical analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram*, Eur. Neuropsych. 12 (2002) 433-444.
- <sup>51</sup> P. Mikuš, K. Maráková, I. Valášková, E. Havránek, *Enantiomeric purity control of levocetirizine in pharmaceuticals using anionic cyclodextrin mediated capillary electrophoresis separation and fiber-based diode array detection*, Pharmazie 64 (2009) 423-427.
- <sup>52</sup> H. Takahashi, H. Echizen, *Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications*, Clin. Pharmacokinet. 40 (2001) 587-603.
- <sup>53</sup> D.J. Cordato, L.E. Mather, G.K. Herkes, *Stereochemistry in clinical medicine: a neurological perspective*, J. Clin. Neurosci. 10 (2003) 649-654.
- <sup>54</sup> R. Gotti, R. Pomponio, V. Andrisano, V. Cavrini, *Analytical study of penicillamine in pharmaceuticals by capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A 844 (1999) 361-369.

- <sup>55</sup> C. Kumaresan, *(S)-(+)-Ibuprofen (Dexibuprofen): the superior non steroidal anti-inflammatory agents for development of pharmaceuticals*, Internat. J. Curr. Pharm. Res. 2 (2010) 1-3.
- <sup>56</sup> U. Schmitt, S.K. Branch, U. Holzgrabe, *Chiral separations by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis – determination of the enantiomeric excess*, J. Sep. Sci. 25 (2002) 959-974.
- <sup>57</sup> L.G. Blomberg, H. Wan, *Determination of enantiomeric excess by capillary electrophoresis*, Electrophoresis 21 (2000) 1940-1952.
- <sup>58</sup> J. Cheng, J. Kang, *An on-column derivatization method for the determination of the enantiomeric excess of chiral primary amines via indirect enantioseparation by micellar electrokinetic chromatography*, Electrophoresis 27 (2006) 865-871.
- <sup>59</sup> B. Chankvetadze, W. Lindner, G.K. E. Scriba, *Enantiomer separations in capillary electrophoresis in the case of equal binding constants of the enantiomers with a chiral selector: Commentary on the feasibility of the concept*, Anal. Chem. 76 (2004) 4256-4260.
- <sup>60</sup> B. Chankvetadze, G. Blaschke, *Selector-selectand interactions in capillary electrophoresis*, Electrophoresis 20 (1999) 2592-2604.
- <sup>61</sup> H. Wätzig, M. Degenhardt, A. Kunkel, *Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications*, Electrophoresis 19 (1998) 2695-2752.
- <sup>62</sup> H.P.T Ammon, C. Hunnius, *Hunnius – Pharmazeutisches Wörterbuch*, 8. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1998).
- <sup>63</sup> S. Hauff, L. Rilfors, G. Hottinger, W. Vetter, *Structure and absolute configuration of an unsaturated anteiso fatty acid from Bacillus megaterium*, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 1683-1687.
- <sup>64</sup> S.A.M. Ismail, O.H. El-Sayed, S.A. Helmy, Y. Mohammad, N.R. Mohammad, *Production, purification and biochemical characterization of cyclodextrin glucanotransferase from Bacillus cereus N1*, Res. J. Agri. Biol. Sci. 6 (2010) 370-377.
- <sup>65</sup> M.E. Brewster, T. Loftsson, *Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers*, Adv. Drug Deliv. Rev. 59 (2007) 645-666.
- <sup>66</sup> S. Klein, T. Zöller, *Cyclodextrine – Wundertüten in Pharmazie und Alltag*, Pharm. Zeitung 153 No. 28 (2008) 16-25.
- <sup>67</sup> S. Klein, T. Zöller, *Cyclodextrine – Molekulare Zuckertüten für Arzneistoffe*, Pharm. Zeitung 153 No. 26 (2008) 18-23.



- <sup>68</sup> B.A. Williams, G. Vigh, *Dry look at the CHARM (charged resolving agent migration) model of enantiomer separations by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 777 (1997) 295-309.
- <sup>69</sup> S. Fanali, Z. Aturki, C. Desiderio, *New strategies for chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis*, For. Sci. Internat. 92 (1998) 137-155.
- <sup>70</sup> M. Blanco, I. Valverde, *Choice of chiral selector for enantioseparation by capillary electrophoresis*, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 428-439.
- <sup>71</sup> F. Yang, Y. Du, B. Chen, Q. Fan, G. Xu, *Enantiomeric separation of nefopam hydrochloride by affinity electrokinetic chromatography using chondroitin sulfate A as chiral selector and its chiral recognition mechanism*, Chromatographia 72 (2010) 489-493.
- <sup>72</sup> H. Nishi, Y. Kuwahara, *Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing carboxymethyl derivatives of polysaccharides as chiral selectors*, J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 577-585.
- <sup>73</sup> C. Simó, A. Gallardo, J. San Román, C. Barbas, A. Cifuentes, *Fast and sensitive capillary electrophoresis method to quantitatively monitor ibuprofen enantiomers released from polymeric drug delivery systems*, J. Chromatogr. B 767 (2002) 35-43.
- <sup>74</sup> Z. Wang, J. Wang, Z. Hu, J. Kang, *Enantioseparation by CE with vancomycin as chiral selector: Improving the separation performance by dynamic coating of the capillary with poly(dimethylacrylamide)*, Electrophoresis 28 (2007) 938-943.
- <sup>75</sup> Y. Jin, A.M. Stalcup, *Application of heparin to chiral separations of anti-histamines by capillary electrophoresis*, Electrophoresis 19 (1998) 2119-2123.
- <sup>76</sup> A.F. Prokhorova, E.N. Shapovalova, O.A. Shpigun, *Chiral analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selectors*, J. Pharm. Biomed. Anal. 53 (2010) 1170-1179.
- <sup>77</sup> J.H. Aiken, C.W. Huie, *Use of a microemulsion system to incorporate a lipophilic chiral selector in electrokinetic capillary chromatography*, Chromatographia 35 (1993) 448-450.
- <sup>78</sup> J. Threeprom, *(S)-(+)-2-Octanol as a chiral oil core for the microemulsion electrokinetic chromatographic separation of chiral basic drugs*, Anal. Sci. 23 (2007) 1071-1075.
- <sup>79</sup> J. Threeprom, *Separation of enantiomeric basic drugs by microemulsion, electrokinetic chromatography with chiral 2-octanol as the oil core*, Chromatographia 65 (2007) 569-573.

- <sup>80</sup> K.A. Kahle, J.P. Foley, *Two-chiral component microemulsion EKC – chiral, surfactant and chiral oil. Part 2. Diethyl tartrate*, *Electrophoresis* 28 (2007) 2644–2657.
- <sup>81</sup> K.A. Kahle, J.P. Foley, *Two-chiral-component microemulsion electrokinetic chromatography-chiral surfactant and chiral oil. Part 1. Dibutyl tartrate*, *Electrophoresis* 28 (2007) 1723–1734.
- <sup>82</sup> K.A. Kahle, J.P. Foley, *Chiral microemulsion electrokinetic chromatography with two chiral components: Improved separations via synergies between a chiral surfactant and a chiral cosurfactant*, *Electrophoresis* 27 (2006) 896–904.
- <sup>83</sup> M.D. Mertzman, J.P. Foley, *Effect of surfactant concentration and buffer selection on chromatographic figures of merit in chiral microemulsion electrokinetic chromatography*, *Electrophoresis* 25 (2004) 3247–3256.
- <sup>84</sup> Z.-X. Zhen, J.-M. Lin, W.-H. Chan, A.W.M. Lee, C. Huie, *Separation of enantiomers in microemulsion electrokinetic chromatography using chiral alcohols as cosurfactants*, *Electrophoresis* 25 (2004) 3263–3269
- <sup>85</sup> N. Mofaddel, A.A. Adoubel, C.J. Morin, P.-L. Desbène, G. Dupas, *Molecular modeling of complexes between two amino acids and copper(II): Correlation with ligand exchange capillary electrophoresis*, *J. Molecul. Struct.* 975 (2010) 220-226.
- <sup>86</sup> T.J. Ward, K.D. Ward, *Chiral separations: Fundamental review 2010*, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4712-4722.
- <sup>87</sup> S. Chandran, R.S.P. Singh, *Comparison of various international guidelines for analytical method validation*, *Pharmazie* 62 (2007) 4-14.
- <sup>88</sup> M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis*, *Pure Appl. Chem.* 74 (2002) 835-855.
- <sup>89</sup> S. Kromidas, *Handbuch – Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2008.
- <sup>90</sup> *Guideline Q2(R1), Validation of analytical procedures: Text and methodology*, International Conference on Harmonisation 2005, [www.ich.org](http://www.ich.org).
- <sup>91</sup> *Technical guide for the elaboration of monographs*, 4. Ausgabe, European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, Straßburg, 2005.
- <sup>92</sup> Center for Drug Evaluation and Research, *Reviewer Guidance – Validation of chromatographic methods*, 1994.

- <sup>93</sup> E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2008).
- <sup>94</sup> K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 9. Auflage, Urban & Fischer, Elsevier GmbH, München, 2005.
- <sup>95</sup> R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes, P. Petocz, *The use of the Box-Behnken experimental design in the optimization and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation*, J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 995-1007.
- <sup>96</sup> A.F. Faria, M.V.N. de Souza, R.E. Bruns, M.A.L. de Oliveira, *Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs by capillary zone electrophoresis using direct UV detection*, Talanta 82 (2010) 333-339.
- <sup>97</sup> A.F. Faria, M.V.N. de Souza, R.E. Bruns, M.A.L. de Oliveira, *Optimization of an electrolyte system for analysis of ethambutol in pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis using complexation with copper(II)*, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 224-228.
- <sup>98</sup> J.A. Fracassi da Silva, N. Vitorazzi de Castro, D. Pereira de Jesus, A.F. Faria, M.V.N. De Souza, M.A. Leal de Oliveira, *Fast determination of ethambutol in pharmaceutical formulations using capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*, Electrophoresis 31 (2010) 570-574.
- <sup>99</sup> Y.-C. Hsieh, C.-W. Whang, *Analysis of ethambutol and methoxyphenamine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection*, J. Chromatogr. A 1122 (2006) 279-282.
- <sup>100</sup> X. Lin, C. Zhu, A. Hao, *Enantioseparation in capillary electrophoresis using 2-O-(2-hydroxybutyl)- $\beta$ -CD as chiral selector*, Electrophoresis 26 (2005) 3890-3896.
- <sup>101</sup> R.G. Wilkinson, R.G. Shepherd, J.P. Thomas, C. Baughn, *Stereospecificity in a new type of synthetic antituberculous agent*, J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 2212-2213.
- <sup>102</sup> R.G. Wilkinson, M.B. Cantrall, R.G. Shepherd, *Antituberculous agents. III. (+)-2,2-(ethylenediimino)-di-1-butanol and some analogs*, J. Med. Pharm. Chem. 5 (1962) 835-845.
- <sup>103</sup> A.M. Kritsyn, A.M. Likhosherstov, T.V. Protopopova, A.P. Skoldinov, *Ethambutol and related compounds synthesis and stereochemical relations*, Dokl. Chem. 145 (1962) 597-600.

- <sup>104</sup> S.P. Kotkar, A. Sudalai, *Enantioselective synthesis of (S,S)-ethambutol using proline-catalyzed asymmetric  $\alpha$ -aminooxylation and  $\alpha$ -amination*, *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 1738-1742.
- <sup>105</sup> G.W.A. Milne, *Drugs: Synonyms and Properties*, Wiley-Interscience, 2. Auflage, New York, 2000.
- <sup>106</sup> L. Qi, G. Yang, *Enantioseparation of dansyl amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis with zinc(II)-L-phenylalaninamide complex*, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3209-3214.
- <sup>107</sup> B. Wu, Q. Wang, L. Guo, R. Shen, J. Xie, L. Yun, B. Zhong, *Amino-substituted  $\beta$ -cyclodextrin copper(II) complexes for the electrophoretic enantioseparation of dansyl amino acids: Role of dual chelate-inclusion interaction and mechanism*, *Anal. Chim. Acta* 558 (2006) 80-85.
- <sup>108</sup> Z. Chen, M. Niitsuma, T. Nakagama, K. Uchiyama, T. Hobo, *Enantioseparation of dansyl amino acids by capillary electrophoresis using Cu(II) complexes with L-amino acylamides as chiral selectors in electrolytes*, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 1197-1201.
- <sup>109</sup> Z. Chen, T. Hobo, *Chemically L-phenylalaninamide-modified monolithic silica column prepared by a sol-gel process for enantioseparation of dansyl amino acids by ligand exchange-capillary electrochromatography*, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3348-3357.
- <sup>110</sup> L. Qi, J. Qiao, G. Yang, Y. Chen, *Chiral ligand-exchange CE assay for separation of amino acid enantiomers and determination of enzyme kinetic constant*, *Electrophoresis* 30 (2009) 2266-2272.
- <sup>111</sup> A.A. Adoubel, C.J. Morin, N. Mofaddel, G. Dupas, P.-L. Desbène, *Enantioseparation of underivatized amino acids by ligand exchange capillary electrophoresis in a counter-electroosmotic mode*, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 597-608.
- <sup>112</sup> S. Zhao, Y.-M. Liu, *Enantioseparation of underivatized amino acids by capillary electrophoresis using copper(II)-(S)-3-aminopyrrolidine-L-histidine ternary complexes as the chiral selector*, *Anal. Chim. Acta* 426 (2001) 65-70.
- <sup>113</sup> M.G. Schmid, R. Rinaldi, D. Dreveny, G. Gubitz, *Enantioseparation of  $\alpha$ -amino acids and dipeptides by ligand-exchange capillary electrophoresis of various L-4-hydroxyproline derivatives*, *J Chromatogr. A* 846 (1999) 157-163.
- <sup>114</sup> D.L. Kirschner, M. Jaramillo, T.K. Green, *Enantioseparation and stacking of cyanobenz[f]isoindole-amino acids by reverse polarity capillary electrophoresis and sulfated  $\beta$ -cyclodextrin*, *Anal. Chem.* 79 (2007) 736-743.

- <sup>115</sup> W.-H. Tang, I.W. Muderawan, T.-T. Ong, S.-C. Ng, *Enantioseparation of dansyl amino acids by a novel permanently positively charged single-isomer cyclodextrin: Mono-6-N-allylammonium-6-deoxy- $\beta$ -cyclodextrin chloride by capillary electrophoresis*, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 119-125.
- <sup>116</sup> L.L. Yang, Z.B. Yuan, *Comparison of enantioseparation of amino acid derivatives in aqueous and mixed aqueous-organic media by capillary zone electrophoresis*, *J. Anal. Chem.* 365 (1999) 541-544.
- <sup>117</sup> S. Cladrowa-Runge, A. Rizzi, *Enantioseparation of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate-derivatized amino acids by capillary electrophoresis using native and substituted  $\beta$ -cyclodextrins as chiral additives. II. Evaluation of complexation constants*, *J. Chromatogr. A* 759 (1997) 167-175.
- <sup>118</sup> C. Borst, U. Holzgrabe, *Enantioseparation of dopa and related compounds by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography*, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 191-196.
- <sup>119</sup> S. La, S. Ahn, J.-H. Kim, J. Goto, O.-K. Choi, K.-R. Kim, *Enantioseparation of chiral aromatic amino acids by capillary electrophoresis in neutral and charged cyclodextrin selector modes*, *Electrophoresis* 23 (2002) 4123-4131.
- <sup>120</sup> C. Simó, A. Rizzi, C. Barbas, A. Cifuentes, *Chiral capillary electrophoresis-mass spectrometry of amino acids in foods*, *Electrophoresis* 26 (2005) 1432-1441.
- <sup>121</sup> S. Zhao, X. Lin, J. Shen, S. Li, *Enantiomeric separation of underivatized aromatic amino acids by capillary electrophoresis*, *Fenxi Ceshi Xuebao* 22 (2003) 8-11.
- <sup>122</sup> H.-J. Park, Y. Choi, W. Lee, K.-R. Kim, *Enantioseparation of aromatic amino acids and amino acid esters by capillary electrophoresis with crown ether and prediction of enantiomer migration orders by a three-dimensional quantitative structure-property relationship/comparative field analysis model*, *Electrophoresis* 25 (2004) 2755-2760.
- <sup>123</sup> A. Taga, Y. Du, S. Suzuki, S. Honda, *Capillary electrophoretic separation of drug enantiomers in human serum*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1587-1593.
- <sup>124</sup> V. Piette, M. Fillet, W. Lindner, J. Crommen, *Non-aqueous capillary electrophoretic enantioseparation of N-derivatized amino acids using cinchona alkaloids and derivatives as chiral counter-ions*, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 353-360.
- <sup>125</sup> S. Fanali, M. Crucianelli, F. De Angelis, C. Presutti, *Enantioseparation of amino acid derivatives by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector*, *Electrophoresis* 23 (2002) 3035-3040.

<sup>126</sup> E. Tesařová, Z. Bosáková, I. Zusková, *Enantioseparation of selected N-tert.-butyloxycarbonyl amino acids in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis with a teicoplanin chiral selector*, J. Chromatogr. A 879 (2000) 147-156.

<sup>127</sup> K. H. Ekborg-Ott, G.A. Zientara, J. M. Schneiderheinze, K. Gham, D.W. Armstrong, *Avoparcin, a new macrocyclic antibiotic chiral run buffer additive for capillary electrophoresis*, Electrophoresis 20 (1999) 2438-2457.

<sup>128</sup> M. Zhang, Z. El Rassi, *Enantiomeric separation by capillary electrochromatography. II. Chiral separation of dansyl amino acids and phenoxy acid herbicides on sulfonated silica having surface-bound hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin*, Electrophoresis 21 (2000) 3135-3140.

<sup>129</sup> M. Sinibaldi, M. Vinci, F. Federici, M. Flieger, *Electrokinetic separation of enantiomers using a capillary coated with poly-terguride*, Biomed. Chromatogr. 11 (1997) 307-310.

<sup>130</sup> S. Zhao, H. Wang, R. Zhang, L. Tang, Y.-M. Liu, *Degradingdehydro-abietylisothiocyanate as a chiral derivatizing reagent for enantiomeric separations by capillary electrophoresis*, Electrophoresis 27 (2006) 3428-3433.

<sup>131</sup> G. Löffler, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 4. Auflage, Springer Verlag GmbH, Berlin, Heidelberg, New York (2000).

<sup>132</sup> Y. Zhao, X.-B. Yang, R. Jiang, X.-L. Sun, X.-Y. Li, W.-M. Liu, S.-Y. Zhang, *Analysis of optical purity and impurity of synthetic D-phenylalanine products using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector by reversed-polarity capillary electrophoresis*, Chirality 18 (2006) 84-90.

<sup>133</sup> X.Y. Gong, P. Kubáň, J. Tanyanyiwa, P.C. Hauser, *Separation of enantiomers in capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*, J. Chromatogr. A 1082 (2005) 230-234.

<sup>134</sup> J. B. Vincent, A.D. Sokolowski, T.V. Nguyen, G. Vigh, *A family of single-isomer chiral resolving agents for capillary electrophoresis. 1. Heptakis(2,3-diacetyl-6-sulfato)- $\beta$ -cyclodextrin*, Anal. Chem. 69 (1997) 4226-4233.

<sup>135</sup> W. Maruszak, M. Trojanowicz, M. Margasińska, H. Engelhardt, *Application of carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis for enantiomer separation of selected neurotransmitters*, J. Chromatogr. A 926 (2001) 327-336.

<sup>136</sup> V. Cucinotta, A. Giuffrida, G. Maccarrone, M. Messina, G. Vecchio, *Ligand exchange capillary electrophoresis by cyclodextrin derivatives, a powerful tool for enantiomeric separations*, Electrophoresis 27 (2006) 1471-1480.

- <sup>137</sup> F. Wang, M. G. Khaledi, *Capillary electrophoresis chiral separation of basic pharmaceutical enantiomers with different charges using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin*, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 11-21.
- <sup>138</sup> N. Grobuschek, M.G. Schmid, J. Koidl, G. Gübitz, *Enantioseparation of amino acids and drugs by CEC, pressure supported CEC, and micro-HPLC using a teicoplanin aglycone stationary phase*, J. Sep. Sci. 25 (2002) 1297-1302.
- <sup>139</sup> M. Dolezalová, S. Fanali, *Enantiomeric separation of dihydroxyphenylalanine (DOPA), methyl-dihydroxyphenylalanine (MDOPA) and hydrazinomethyl-dihydroxyphenylalanine (CDOPA) by using capillary electrophoresis with sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector*, Electrophoresis 21 (2000) 3264-3269.
- <sup>140</sup> Y. Bitar, U. Holzgrabe, *Impurity profiling of atropine sulfate by microemulsion electrokinetic chromatography*, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 623-633.
- <sup>141</sup> [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de), Fachinformation von ISICOM<sup>®</sup> 250 mg / 25 mg
- <sup>142</sup> M. Marvola, P. Jokila, L. Niittyraute, M. Komulainen, H.R. Marjaana, *Pharmacokinetics of methyl-dopa after oral administration in three different tablet formulations*, Act. Pharm. Fennica 89 (1980) 109-114.
- <sup>143</sup> Y.-M. Liu, S.-J. Sheu, *Determination of ephedrine alkaloids by capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A 600 (1992) 370-372.
- <sup>144</sup> N. Okamura, H. Miki, T. Harada, S. Yamashita, Y. Masaoka, Y. Nakamoto, M. Tsuguma, H. Yoshitomi, A. Yagi, *Simultaneous determination of ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine and methylephedrine in kampo medicines by high-performance liquid chromatography*, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 363-372.
- <sup>145</sup> M. Wedig, U. Holzgrabe, *Resolution of ephedrine derivatives by means of neutral and sulfated heptakis(2,3-di-O-acetyl)- $\beta$ -cyclodextrins using capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Electrophoresis 20 (1999) 2698-2704.
- <sup>146</sup> M. Wedig, S. Laug, T. Christians, M. Thunhorst, U. Holzgrabe, *Do we know the mechanism of chiral recognition between cyclodextrins and analytes?* J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 531-540.
- <sup>147</sup> M. Shalaeva, J. Kenseth, F. Lombardo, A. Bastin, *Measurement of dissociation constants ( $pK_a$  values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers*, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 2581-252606.

<sup>148</sup> W. Blaschek, U. Hilgenfeldt, U. Holzgrabe, J. Reichling, P. Ruth, V. Schulz (Hrsg.), *HagerROM 2009. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen*, 7. Auflage, Springer-Verlag GmbH, Heidelberg, 2009.

<sup>149</sup> L.-B. Liu, Z.-X. Zheng, J.-M. Lin, *Application of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis for enantiomer separation of ephedrine and related compounds in some drugs*, Biomed. Chromatogr. 19 (2005) 447-453.

<sup>150</sup> J. Vanakoski, C. Strömberg, T. Seppälä, *Effects of a sauna on pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam and ephedrine in healthy young women*, Eur. J. Clin. Pharmacol. 45 (1993) 377-381.

<sup>151</sup> L.M. White, S.F. Gardner, B.J. Gurley, M.A. Marx, P.-L. Wang, M. Estes, *Pharmacokinetics and cardiovascular effects of ma-huang (ephedra sinica) in normotensive adults*, J. Clin. Pharmacol. 37 (1997) 116-122.

<sup>152</sup> J.H. Kou, *Stable extended release oral dosage composition*, US-Patent, US 2003/0086971 A1

<sup>153</sup> [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de) Reactine duo<sup>®</sup>

<sup>154</sup> S.M. Cheer, A.J. Wagstaff, *Quetiapine: A review of its use in management of schizophrenia*, CNS Drugs 18 (2004) 173-199.

<sup>155</sup> S. Kasper, F. Müller-Spahn, *Review of quetiapine and its clinical applications in schizophrenia*, Expert. Opin. Pharmacother. 1 (2000) 783-801.

<sup>156</sup> [www.fachinfo.de](http://www.fachinfo.de) Seroquel<sup>®</sup>

<sup>157</sup> A. Pelander, E. Tyrkkö, I. Ojanperä, *In silico methods for predicting metabolism and mass fragmentation applied to quetiapine in liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry urine drug screening*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23 (2009) 506-514.

<sup>158</sup> C.L. DeVane, C.B. Nemeroff, *Clinical pharmacokinetics of quetiapine – an atypical antipsychotic*, Clin. Pharmacokinet. 40 (2001) 509-522.

<sup>159</sup> C.O. Knowles, *Metabolism of two acaricidal chemicals, N'-(4-chloro-o-tolyl)-N,N-dimethylformamidine (chlorphenamidine) and m-[(dimethylamino)-methylene]amino]phenyl methylcarbamate hydrochloride (formetanate)*, J. Agr. Food Chem. 18 (1970) 1038-1047.

<sup>160</sup> N.C. Niphade, A.C. Mali, B.S. Pandit, K.M. Jagtap, S.A. Jadhav, M.N. Jachak, V.T. Mathad, *An improved and single pot process for the production of quetiapin hemifumarate substantially free from potential impurities*, Org. Proc. Res. Dev. 13 (2009) 792-797.



- <sup>161</sup> G. Dixit, A.S. Khile, J.L. Patel, N.S. Pradhan, J. Valgeirsson, *A process for the preparation of aminodiphenylsulfide*, Indisches Patent (2009) IN 2007CH00365 A 20090206.
- <sup>162</sup> European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare, *Pharmeuropa* 22.1 (2010) 61-63.
- <sup>163</sup> V. Pucci, R. Mandrioli, A. Ferranti, S. Furlanetto, M.A. Raggi, *Quality control of commercial tablets containing the novel antipsychotic quetiapine*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 1037-1044.
- <sup>164</sup> R.A. Fursule, D.K. Rupala, M.G.M. Khan, A.A. Shirkhedkar, S.J. Surana, *Determination of quetiapine fumarate and cilostazol in bulk and tablet by UV-spectrophotometry*, *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* 5 (2008) 461-463.
- <sup>165</sup> S.A. Ozkan, B. Dogan, B. Uslu, *Voltammetric analysis of the novel atypical antipsychotic drug quetiapine in human serum and urine*, *Microchim. Acta* 153 (2006) 27-35.
- <sup>166</sup> N. El-Enany, A. El-Brashy, F. Belal, N. El-Bahy, *Polarographic analysis of quetiapine in pharmaceuticals*, *Portug. Electrochim. Acta* 27 (2009) 113-125.
- <sup>167</sup> R. Skibiński, L. Komsta, I.J. Kosztyła, *Comparative validation of quetiapine determination in tablets by NP-HPTLC and RP-HPTLC with densitometric and videodensitometric detection*, *J. Planar. Chromatogr. – Mod. TLC* 21 (2008) 289-294.
- <sup>168</sup> D.T. Anderson, K.L. Fritz, *Quetiapine (Seroquel) concentrations in seven postmortem cases*, *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000) 300-304.
- <sup>169</sup> D.D. Flammia, T. Valouch, S. Venuti, *Tissue distribution of quetiapine in 20 cases in Virginia*, *J. Anal. Toxicol.* 30 (2006) 287-292.
- <sup>170</sup> M.M. McMullin, *Development of a gas chromatographic method for the determination of quetiapine in human serum and a report of patient values*, *Therap. Drug. Monitor.* 21 (1999) 459.
- <sup>171</sup> R. Mandrioli, S. Fanali, A. Ferranti, M.A. Raggi, *HPLC analysis of the novel antipsychotic drug quetiapine in human plasma*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 969-977.
- <sup>172</sup> C. Frahnert, M.L. Rao, K.J. Grasmäder, *Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring*, *J. Chromatogr. B.* 794 (2003) 35-47.
- <sup>173</sup> J. Sachse, J. Köller, S. Härter, C. Hiemke, *Automated analysis of quetiapine and other antipsychotic drugs in human blood by high performance*

*liquid chromatography with column-switching and spectrophotometric detection*, J. Chromatogr. B. 830 (2006) 342-348.

<sup>174</sup> H. Xu, D. Wang, C. Sun, Y. Pan, M. Zhou, *Identification of an unknown trace-level impurity in bulk drug of Seroquel by high-performance liquid chromatography combined with mass spectrometry*, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 414-420.

<sup>175</sup> M.A. Saracino, L. Mercolini, G. Flotta, L.J. Albers, R. Merli, M.A. Raggi, *Simultaneous determination of fluvoxamine isomers and quetiapine in human plasma by means of high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. B. 843 (2006) 227-233.

<sup>176</sup> J. Hasselstrøm, K. Linnet, *Fully automated online quantification of quetiapine in human serum by solid phase extraction and liquid chromatography*, J. Chromatogr. B 798 (2003) 9-16.

<sup>177</sup> K.Y. Li, Z.N. Cheng, X. Li, X.L. Bai, B.K. Zhang, F. Wang, H.D. Li, *Simultaneous determination of quetiapine and three metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*, Acta Pharmacol. Sin. 25 (2004) 110.

<sup>178</sup> L. Mercolini, M. Grillo, C. Bartoletti, G. Boncompagni, M.A. Raggi, *Simultaneous analysis of classical neuroleptics, atypical antipsychotics and their metabolites in human plasma*, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 235-243.

<sup>179</sup> Z. Zhou, X. Li, K. Li, Z. Xie, Z. Cheng, W. Peng, F. Wang, R. Zhu H. Li, *Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 802 (2004) 257-262.

<sup>180</sup> S.N. Lin, Y. Chang, D.E. Moody, R.L. Foltz, *A liquid chromatographic–electrospray–tandem mass spectrometric method for quantitation of quetiapine in human plasma and liver microsomes: application to a study of in vitro metabolism*, J. Anal. Toxicol. 28 (2004) 443-448.

<sup>181</sup> K.Y. Li, Y.G. Zhou, H.Y. Ren, F. Wang, B.K. Zhang, H.D. Li, *Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of atypical antipsychotics and some metabolites in in vitro samples*, J. Chromatogr. B 850 (2007) 581-585.

<sup>182</sup> J.Y. Tu, P. Xu, D.H. Xu, H.D. Li, *UPLC–MS–MS analysis of quetiapine and its two active metabolites, 7-hydroxyquetiapine and 7-hydroxy-N-desalkylquetiapine, in rat plasma and cerebrospinal fluid*, Chromatographia 68 (2008) 525-532.

<sup>183</sup> B. Barrett, M. Holčapek, J. Huclová, V. Bořek-Dohalský, P. Fejt, B. Němec, I. Jelínek, *Validated HPLC–MS/MS method for determination of quetiapine in human plasma*, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 498-505.

<sup>184</sup> H. Kirchherr, W.N. Kühn-Velten, *Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level, single-sample approach*, J. Chromatogr. B 843 (2006) 100-113.

<sup>185</sup> S. Hillaert, L. Snoeck, V.D. Bosche, *Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the simultaneous analysis of four atypical antipsychotics*, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 357-362.

<sup>186</sup> S.A. Bellomarino, A.J. Brown, X.A. Conlan, N.W. Barnett, *Preliminary evaluation of monolithic column high-performance liquid chromatography with tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) chemiluminescence detection for the determination of quetiapine in human body fluids*, Talanta 77 (2009) 1873-1876.

<sup>187</sup> K.D. Altria, S.M. Bryant, *Highly selective and efficient separations of a wide range of acidic species in capillary electrophoresis employing non-aqueous media*, Chromatographia 46 (1997) 122-130.