

Quantitative NMR-Spektroskopie zur Reinheitsbestimmung von Arzneistoffen

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

vorgelegt von
Ralph Deubner
aus Coburg

Würzburg 2004

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagungen

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

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

An dieser Stelle möchte ich ihr für die stets gewährte freundliche Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und Anregungen und das in mich gesetzte Vertrauen, das mir den Freiraum zur selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeit gab danken.

Für die HPLC-NMR-gekoppelten Messungen danke ich Herrn Dr. Markus Godejohann von Bruker Biospin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Curd Schollmayer für die Zusammenarbeit am NMR-Spektrometer, für Unterstützung beim Einstieg in die NMR-Spektroskopie, für viele interessante und für uns beide wertvolle Diskussionen darüber und nicht zuletzt für Hilfe bei vielen Textentwürfen.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen und Freunden für die schöne und angenehme Zeit, die wir miteinander verbracht haben.

Bei Holger Projahn, Ullrich Käßler, Jürgen Teichgräber, Daniela Ulmer, Anagnostis Valotis und Meike Timmermann bedanke ich mich für viele Diskussionen auf fachlichem Gebiet und auch für viele private Gespräche.

Bei Frank Wienen und Stefanie Laug bedanke ich mich darüber hinaus für die Zusammenarbeit im Rahmen der Untersuchungen von Gentamicin, bei den MEKC-Messungen dazu und den Diskussionen zu diesem Teil meiner Arbeit.

Bei Verena Hörr bedanke ich mich für die Bakterienkulturen für die Untersuchungen der Diffusionskoeffizienten und für die wertvollen Diskussionen zu diesem Teil meiner Arbeit.

Bei meinem Kollegen und Freund Andreas Heinze bedanke ich mich besonders auch für die sehr schöne Zeit im gemeinsamen Labor, die ich sehr genossen habe.

Bei meiner Kollegin und Freundin Claudia Kahle bedanke ich mich ganz besonders für die wunderbare Zusammenarbeit und Freundschaft in den letzten Jahren, für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung von Cyclodextrin-Aminosäuren-Komplexen und natürlich für die wertvollen Diskussionen im gemeinsamen Labor über meine und ihre Arbeit, über Wissenschaft, das Leben, das Universum und den ganzen Rest.

Diese Zeit mit Euch ist ein wichtiger Teil in meinem Leben.

Letztendlich möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für das sehr angenehme Klima bedanken.

Ich bedanke mich bei meinem Bruder Frank Deubner, der gerade als Fachfremder mir bei der Korrektur der Textentwürfe dieser Arbeit oftmals helfen konnte.

There is nothing like looking, if you want to find something. You certainly usually find something, if you look, but it is not always quite the thing you were after.

J. R. R. Tolkien, "The Hobbit"

Meinen Eltern

Teile der Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Originalarbeiten

- (1) Ralph Deubner, Ulrike Holzgrabe
Quantitative ¹H NMR spectroscopic determination of the E/Z isomer ratio of the antidepressant drug fluvoxamine for use in pharmaceutical analysis
Magnetic Resonance in Chemistry, 2002, **40**, 762-766
- (2) Ulrike Holzgrabe, Ralph Deubner, Nikolai Novatchev, Frank Wienen
Verunreinigung von Arzneistoffen
Deutsche Apothekerzeitung, 2003, **143**, 59-64
- (3) Frank Wienen, Ralph Deubner, Ulrike Holzgrabe
Composition and impurity profile of multisource raw material of gentamicin - a comparison
Pharmeuropa, 2003, **15**, 273-279
- (4) Ralph Deubner, Curd Schollmayer, Frank Wienen, Ulrike Holzgrabe
Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches
Magnetic Resonance in Chemistry, 2003, **41**, 589-598
- (5) Ralph Deubner, Ulrike Holzgrabe
Micellar electrokinetic capillary chromatography, high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance – three orthogonal methods for characterization of critical drugs
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, im Druck

Posterpräsentationen / Abstracta

- (1) Ralph Deubner, Curd Schollmayer, Ulrike Holzgrabe
Examination of lercanidipine and several phenothiazines by means of modern nuclear magnetic resonance (NMR)
für die DPhG-Jahrestagung 2001 in Halle, Archiv der Pharmazie, 2001 (Suppl. 2), **334**, 34
- (2) Ulrike Holzgrabe, Ralph Deubner, Frank Wienen
Composition and impurity profile of multisource bulkware of gentamicin – a comparison
für die DPhG-Jahrestagung 2002 in Berlin, Archiv der Pharmazie, 2002 (Suppl. 1), **335**, 26
- (3) Frank Wienen, Ralph Deubner, Ulrike Holzgrabe
Characterization of gentamicin sulphate by means of CE and ¹H-NMR
für die DPhG-Jahrestagung 2002 in Berlin, Archiv der Pharmazie, 2002 (Suppl. 1), **335**, 105
- (4) Frank Wienen, Ralph Deubner, Ulrike Holzgrabe
A comparison of the composition and impurities of multisource bulkware of gentamicin
für HPCE (16th International Symposium on Microscale Separations and Analysis) 2003 in San Diego
- (5) Ralph Deubner, Frank Wienen, Ulrike Holzgrabe
Composition of gentamicin sulphate determined by means of CE and ¹H-NMR
für die DPhG-Jahrestagung 2003 in Würzburg
- (6) Claudia Kahle, Ralph Deubner, Ulrike Holzgrabe
Studies on the chiral recognition of amino acids and dipeptide enantiomers by cyclodextrins using NMR spectroscopy
für die DPhG-Jahrestagung 2003 in Würzburg
- (7) Frank Wienen, Ralph Deubner, Ulrike Holzgrabe
Composition of different gentamicin sulphate batches determined by means of MEKC and ¹H-NMR
für HPCE (17th International Symposium on Microscale Separations and Analysis) 2004 in Salzburg

INHALT

1	Einleitung	1
1.1	Reinheit von Arzneistoffen	2
1.2	Methodik der NMR-Spektroskopie	5
1.2.1	Allgemeines	5
1.2.1.1	Historie	5
1.2.1.2	Aufbau eines NMR-Spektrometers	6
1.2.1.3	Entstehung der NMR-Signale	8
1.2.1.4	Chemische Verschiebung und Signalaufspaltung	15
1.2.2	NMR zur Strukturbestimmung.....	19
1.2.3	NMR als quantitative Messmethode	20
1.2.3.1	Grundlagen der quantitativen NMR-Spektroskopie	20
1.2.3.2	NMR-Spektroskopie als primäre Messmethode	21
1.2.3.3	Sendefrequenz und spektrale Bandbreite	23
1.2.3.4	Länge der Akquisitionszeit.....	25
1.2.3.5	Relaxationsverzögerung und Impulswinkel	25
1.2.3.6	Anzahl der Wiederholmessungen (Scans).....	28
1.2.3.7	Prozessieren der Spektren	29
1.2.3.8	Integration der Resonanzsignale	30
1.2.4	Diffusionskoeffizienten.....	34
1.2.4.1	Relaxationsmethode.....	35
1.2.4.2	Anwendung gepulster Feldgradienten (PFG)	36
1.3	Ziel der Arbeit.....	43
2	Allgemeiner Teil	45
2.1	Quantitative Bestimmungen	46
2.1.1	Fluvoxamin	46
2.1.1.1	Pharmakologie.....	46
2.1.1.2	Synthese.....	48
2.1.1.3	Quantifizierung der Isomere	49
2.1.1.4	Zusammenfassung	67
2.1.2	Perphenazin	68

2.1.2.1	Pharmakologie.....	68
2.1.2.2	Abbaureaktionen.....	70
2.1.2.3	Quantifizierung.....	70
2.1.2.4	Zusammenfassung	81
2.1.3	Chinin und Chinidin.....	83
2.1.3.1	Gewinnung.....	83
2.1.3.2	Pharmakologie.....	84
2.1.3.3	Quantifizierung.....	86
2.1.3.4	Zusammenfassung	97
2.2	Gentamicinsulfat.....	98
2.2.1	Pharmakologie	98
2.2.2	Herstellung / Gewinnung von Gentamicin.....	101
2.2.3	Problemstellung	102
2.2.4	Untersuchungen von Gentamicin-Proben	104
2.2.4.1	Gewinnung der Einzelkomponenten von Gentamicin	104
2.2.4.2	Zuordnung der NMR-Spektren.....	105
2.2.4.3	HPLC-UV-MS-NMR-Untersuchungen von Gentamicin.....	125
2.2.4.4	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen	131
2.2.4.5	Quantitative NMR-Untersuchungen	132
2.2.4.6	Vergleich verschiedener Gentamicin-Chargen	138
2.2.4.7	Ergebnis.....	142
2.3	Interaktionen von Antibiotika mit Erregerzellen und Veränderungen der Diffusionskoeffizienten dieser Antibiotika	144
2.3.1	Theoretische Überlegungen.....	144
2.3.2	Kalibrierungen des Spektrometers.....	145
2.3.2.1	Temperatur	146
2.3.2.2	Tatsächliche Temperatur in der Probe.....	146
2.3.2.3	Temperaturkonstanz.....	148
2.3.2.4	Gradientenstärke	149
2.3.3	Bestimmung von Diffusionskoeffizienten	150
2.3.3.1	Effekte verschiedener Erregerstämme	152
2.3.3.2	Effekte unterschiedlicher Konzentrationen.....	154
2.3.3.3	Ausblick	155
2.3.4	Zusammenfassung	159

2.4	Einschlusskomplexe von Cyclodextrinen mit Dipeptiden	160
2.4.1	Cyclodextrine als chirale Selektoren.....	160
2.4.2	Variationen der Messung und der Probenvorbereitung	161
2.4.2.1	Referenzierung	161
2.4.2.2	Methoden der Wasserunterdrückung	162
2.4.2.3	pH-Werte in Deuteriumoxid-Lösungen	164
2.4.3	Veränderungen der chemischen Verschiebung durch Komplexbildung	165
2.4.4	Zusammenfassung	167
3	Experimenteller Teil	169
3.1	Geräte und Methoden	170
3.1.1	Geräte.....	170
3.1.2	Standardmessbedingungen.....	172
3.2	Psychopharmaka	175
3.2.1	Fluvoxamin	175
3.2.1.1	Chemikalien.....	175
3.2.1.2	Spektrenzuordnung	175
3.2.1.3	Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten.....	176
3.2.1.4	Quantifizierungsmessungen	176
3.2.2	Perphenazin	178
3.2.2.1	Chemikalien.....	178
3.2.2.2	Spektrenzuordnung	178
3.2.2.3	Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten.....	178
3.2.2.4	Quantifizierungsmessungen	179
3.2.3	Chinin und Chinidin.....	180
3.2.3.1	Chemikalien.....	180
3.2.3.2	Spektrenzuordnung	180
3.2.3.3	Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten.....	180
3.2.3.4	Quantifizierungsmessungen	181
3.2.4	Gentamicin	182
3.2.4.1	Chemikalien.....	182
3.2.4.2	Spektrenzuordnung	183
3.2.4.3	HPLC-UV-MS-NMR-Kopplungen.....	184
3.2.4.4	Kapillarelektrophoretische Untersuchungen	186

3.2.4.5	Quantitative NMR-Messungen.....	186
3.2.5	Bestimmung von Diffusionskoeffizienten	187
3.2.5.1	Chemikalien	187
3.2.5.2	Kalibrierung des Spektrometers.....	187
3.2.5.3	Kultur der Bakterien	188
3.2.5.4	NMR-Messungen	189
3.2.6	Untersuchung von Cyclodextrin-Komplexen	190
3.2.6.1	Chemikalien	190
3.2.6.2	NMR-Messungen	190
4	Zusammenfassung.....	193
5	Summary.....	199
6	Literaturverzeichnis	205
7	Abkürzungen und Symbole	213
7.1	Abkürzungsverzeichnis	214
7.2	Symbolverzeichnis	216
8	Lebenslauf.....	219

1 Einleitung

"All you need to counterfeit drugs is a person with access to a small laboratory, a propensity for theft and a total disregard of human dignity."

(Milton Silverman)

1.1 Reinheit von Arzneistoffen

Zunehmend werden der Arzneimittelsektor und die Pharmaindustrie von Patienten, Krankenkassen und Politikern als „Preistreiber“ im Gesundheitswesen angesehen. Nicht nur werden neue Arzneimittel häufig pauschal als „Schein-Innovationen“ diskreditiert, sondern es wird auch nach billigeren Vertriebsstrukturen und geringeren Herstellungskosten gesucht. Aber dann muss man sich auch die Frage stellen, ob ein billiger Einkauf von Arzneistoffen wirklich einfach nur zu niedrigeren Abgabepreisen führt oder man sich das mit einem höheren Aufwand zur Sicherstellung der Qualität, zu mehr Eingangsanalytik und zu mehr Fahnden nach unbekanntem Verunreinigungen erkauft

Während anfangs die Arzneibücher eine Sammlung von Herstellungsvorschriften waren, so sind sie heute eine Sammlung von Prüfungsvorschriften um die Identität, die Reinheit und den Gehalt von Arzneistoffen, d. h. deren Qualität sicherzustellen. Deshalb sind ein besonders wichtiger Aspekt der Prüfungen in den Arzneibüchern die Reinheitsuntersuchungen. Mit diesen Prüfungen werden Verunreinigungen, Begleitstoffe aus der Isolierung oder Synthesenebenprodukte sowie Zersetzungsprodukte in ihrer Konzentration beschränkt bzw. ihre Abwesenheit kontrolliert.

Um billiger produzieren zu können, werden Arzneistoffe, künftig auch „active pharmaceutical ingredients“ (API) genannt, mehr und mehr aus dem asiatischen und indischen Raum bezogen. Werden von den dortigen Produzenten andere als die vom Innovator beschriebenen Synthesewege benutzt, dann können die in den Arzneibüchern beschriebenen Reinheitsuntersuchungen, die ja auf einen bestimmten Syntheseweg abzielen, diese neuen Verunreinigungen häufig nicht nachweisen und quantifizieren. Eigentlich müsste der Herstellungsweg auf dem jede Charge eines API begleitenden Zertifikat dokumentiert sein, aber da Zwischenhändler die Ware häufig umpacken – dies ist definitionsgemäß ein Herstellungsprozess – geht diese Information oftmals unterwegs verloren [1]. Das kann in letzter Konsequenz bedeuten, dass ein Arzneistoff zu einem Medikament verarbeitet wird, der toxische Begleitsubstanzen in letaler Konzentration enthält – aber gemäß der in den Arzneibüchern beschriebenen Prüfungen als „sauber“ gilt. Solange der Arzneimittelhersteller (und die Aufsichtsbehörden) die neuen Wege kennen, und die Analysemethoden diesen anpassen, ist dies in Ordnung und eine

sichere Arzneimittelversorgung kann garantiert werden. Problematisch und gefährlich wird es allerdings, wenn Synthesewege geändert werden und die Hersteller und Aufsichtsbehörden dies nicht erfahren, was letztendlich gesetzeswidrig ist.

Das gilt aber nicht nur für synthetisch hergestellte Arzneimittel, sondern auch für aus Drogen isolierte Reinstoffe. Bei diesen kann durch ein verändertes Extraktionsverfahren sich ebenfalls das Verunreinigungsprofil ändern. In besonders großem Ausmaß gilt dies für biotechnologisch hergestellte Arzneimittel. Bei diesen können sich bereits kleine Änderungen im Kulturmedium (Zusammensetzung des Nährmediums, Dauer und Bedingungen, Extraktion der Stoffe etc.) gravierend auf das Verunreinigungsprofil der Arzneistoffe auswirken.

Die zunehmende Internationalisierung des Handels mit Arzneistoffen und der Produktion von Arzneimitteln sowie der steigende Druck zur Minimierung der Arzneimittelkosten der Krankenkassen kann die Patienten in Gefahr bringen. Beispiele gibt es dafür viele. 1998 wurden im Zentrallaboratorium der Deutschen Apotheker zahlreiche Erythromycin-Chargen untersucht und dabei beträchtliche Mengen verschiedener Lösungsmittel festgestellt, obwohl alle untersuchten Chargen gemäß den Analysezertifikaten den Anforderungen des Arzneibuchs entsprachen [2]. Ein anderes Beispiel ist die Aminosäure Tryptophan, die nicht nur als Arzneimittel sondern auch in der Lebensmittelindustrie eine Rolle spielt. Ein japanischer Hersteller hatte den Produktionsprozess von einer Synthese auf einen fermentativen Prozess umgestellt. Nach zahlreichen Todesfällen nahm man die entsprechenden Produkte vom Markt. In Untersuchungen konnte man mittels HPLC eine Substanz finden, die durch die bis dahin üblichen Arzneibuchmethoden nicht erfasst werden konnte [3].

Ein weiteres Beispiel für einen solchen Vorgang stellt das Antibiotikum Gentamicin dar. Auslöser für zahlreiche Todesfälle war in diesem Fall ein „Off-Label-Use“ bei dem statt dreimal täglicher Gabe die gesamte Tagesdosis als Einmalgabe verabreicht wurde. Die Todesfälle werden mittlerweile mit geändertem Herstellungsverfahren des Arzneistoffes selbst in Verbindung gebracht. Diese führen zu einem veränderten Verunreinigungsprofil mit Substanzen, auf die gemäß der Arzneibuchmonographie bislang nicht ausreichend untersucht wurde. Durch den Einsatz geeigneter innovativer Analyseverfahren konnten diese zusätzlichen Verunreinigungen aufgespürt werden. Nun gilt es, die auch im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse umzusetzen.

Ziel muss einerseits sein, stets auf der Suche nach neuen, unbekanntem Verunreinigungen zu sein. Nur befinden sich so die Analytiker, die Arzneimittelbehörden, in der Situation der Polizei, denen Verbrecher stets einen Schritt voraus sind. Selbst den Schritt voraus zu sein, ist schwierig. Daher muss andererseits das Ziel auch sein, die vorhandenen analytischen Methoden weiterzuentwickeln. So kann auf geänderte Anforderungen schnell reagiert werden. Dazu gehört es auch, neue und ungewöhnliche Wege zu gehen.

Einer dieser ungewöhnlichen Wege in der pharmazeutischen Analytik ist die Anwendung der NMR-Spektroskopie. Obwohl seit über 50 Jahren bekannt und in der Strukturaufklärung von Substanzen nicht mehr wegzudenken, wird sie in der quantifizierenden Analytik nur sehr zurückhaltend eingesetzt. Das Arsenal der spektroskopischen Methoden zur Quantifizierung (direkt oder nach chromatographischer Trennung) beschränkt sich zumeist auf die UV/Vis-Spektroskopie, teilweise wird auch die Fluoreszenz-, die Infrarot- oder die Massenspektroskopie genutzt. Aber gerade das Beispiel Gentamicin zeigt, dass auch die NMR-Spektroskopie eine wichtige Methode für „Impurity-Profilings“ und für quantitative Analysen ist. Sie kann sowohl andere Methoden ergänzen als auch allein sehr leistungsfähig sein.

1.2 Methodik der NMR-Spektroskopie

1.2.1 Allgemeines

1.2.1.1 Historie

Die NMR-Spektroskopie ist noch eine sehr junge spektroskopische Methode. Erst im Jahr 1946 gelang es den Arbeitsgruppen um F. Bloch [4] und Purcell [5] erstmals, Kernresonanzsignale in Wasser (Bloch) bzw. Paraffin (Purcell) nachzuweisen.

Seitdem wuchs die Bedeutung und Anwendung dieser analytischen Methode ständig an. Auch wenn die NMR-Spektroskopie von Physikern entdeckt wurde, so wird sie heutzutage in so unterschiedlichen Feldern wie der Biologie, der Medizin, der Geologie oder den Materialwissenschaften genutzt. Ihre wichtigste Anwendung ist aber in chemischen Labors. Zu Beginn ihrer Entwicklung war dies in der Hauptsache der Fall bei Naturstoffchemikern und in der chemischen Synthese, um Informationen über die Struktur unbekannter Verbindungen bzw. über den Synthesefortschritt zu erhalten. Zunehmende Bedeutung gewinnt die NMR-Spektroskopie heutzutage mit ihren vielfältigen neuen Anwendungen – von quantitativen Auswertungen über Kopplungen mit chromatographischen Trennmethoden bis hin zu speziellen, gradientenunterstützten Messungen mit besonderem Informationsgehalt – als analytische Messmethode. Einen Überblick über historische und heutige Anwendungen gibt Tabelle 1.2-1.

Tabelle 1.2-1: Überblick über wichtige Ereignisse und Entwicklungen in der NMR-Spektroskopie (nach [6], Kap. 1)

1940er	<ul style="list-style-type: none">• Erstmaliger Nachweis von NMR-Signalen in Flüssigkeiten und Feststoffen (1945)
1950er	<ul style="list-style-type: none">• Entdeckung des Einflusses der chemischen Umgebung auf die Verschiebung sowie die gegenseitige Beeinflussung von Kernen. Von den Entdeckern erst als Nachteil und zusätzliche Verkomplizierung gesehen, wurde jedoch schnell erkannt, welche Möglichkeiten der Strukturaufklärung dies eröffnen kann.• Beschreibung des „Nuclear-Overhauser-Effektes“ (NOE).

1960er	<ul style="list-style-type: none"> • Mehrfachmessungen derselben „Continuous-Wave“ (CW-) Spektren und Mittelwertbildung erhöht die Empfindlichkeit. • Einführung der Puls-Fourier-Transformation (PFT) NMR-Spektroskopie, bei der <i>alle</i> Kerne gleichzeitig angeregt werden und aus dem Gesamtsignal das Spektrum mittels der Fouriertransformation errechnet wird. • Nutzung des NOEs zur Strukturaufklärung.
1970er	<ul style="list-style-type: none"> • Einführung supraleitender Magneten in der NMR-Spektroskopie ermöglicht höhere Feldstärken als die vorher verwendeten Elektromagneten und damit eine verbesserte Auflösung der Spektren. • Messungen von ^{13}C-Kernen werden dadurch zu Routinemessungen.
1980er	<ul style="list-style-type: none"> • Die bereits vorher begonnene Entwicklung von Multi-Impuls-Sequenzen wird verbessert; sie eröffnet den Zugang zu weiteren Eigenschaften der untersuchten Moleküle. • Zweidimensionale Techniken zeigen weitere Korrelationen zwischen einzelnen Kernen.
1990er	<ul style="list-style-type: none"> • Gepulste Feldgradienten werden zunehmend eingesetzt. Damit können einerseits bereits bekannte Messmethoden verbessert und verkürzt werden, andererseits gelingt hiermit der Zugang zu weiteren Eigenschaften.
2000er	<ul style="list-style-type: none"> • Magneten mit immer höherer Feldstärke werden entwickelt. • Gekoppelte Techniken mit chromatographischen Methoden werden entwickelt und halten Einzug in Routineuntersuchungen. • Systeme für hohen Probendurchsatz und automatisierte Auswertung werden entwickelt.

1.2.1.2 Aufbau eines NMR-Spektrometers

Wat issn NMR? Da stelle mer uns mal janz dumm. 'n NMR, dat is einfach 'ne Kühltank mit Strom drin und janz viel Kompjuter.

Frei nach „Die Feuerzangenbowle“

Ein NMR-System besteht im Wesentlichen aus einem Magnetsystem mit (Kryo-)Magnet, Probenkopf und Vorverstärker, einer Konsole, die die elektronische Hardware enthält und einer Bedienerkonsole mit Steuerungscomputer und Bedienelementen, wie in Abbildung 1.2-1 gezeigt.

Der rechte Teil dieser Abbildung (aus [7]) zeigt zugleich den schematischen Aufbau eines Kryomagneten. In dessen Inneren befindet sich in der zentralen Bohrung der Probenkopf, in den die Proben eingebracht werden: er ist sozusagen das „Herz“ eines NMR-Spektrometers. Der Probenkopf enthält Sender- und Empfängerspule für die zu beobachtenden Kerne und das Lock-Signal sowie Spulen zur Erzeugung von Feldgradienten. Außerdem befinden sich das Shimsystem konzen-

trisch um den Probenkopf innerhalb des Magneten und ein Vorverstärker, der zwischen den Probenkopf und Konsole geschaltet ist, in unmittelbarer Nähe. Als Magnet selbst wurden zu Beginn der NMR-Entwicklung Permanent- und Elektromagnete benutzt, die magnetische Flussdichten^a von bis zu 2,11 Tesla (entsprechend einer Protonenresonanzfrequenz von 90 MHz) erzeugten. Heutzutage werden ausschließlich Kryomagneten verwendet. Diese bestehen aus einer supraleitenden Spule und können in der Serienfertigung Feldstärken entsprechend einer magnetischen Flussdichte von bis zu 19 T (entsprechend 800 MHz) und mehr erzeugen. Um die Spule supraleitend zu halten, muss diese auf einer Temperatur in der Nähe des absoluten Nullpunktes (also bei 2 bis 4 Kelvin) gehalten werden. Dazu wird sie mit flüssigem Helium umspült. Um diesen Heliumdewar herum befinden sich zur Isolierung ein mit flüssigem Stickstoff gefüllter Dewar und eine Vakuumummantelung. Die Richtung des Magnetfeldes liegt in der Längsachse, d.h. von unten nach oben, der Messprobe (gleichzeitig die Längsachse des Dewars).

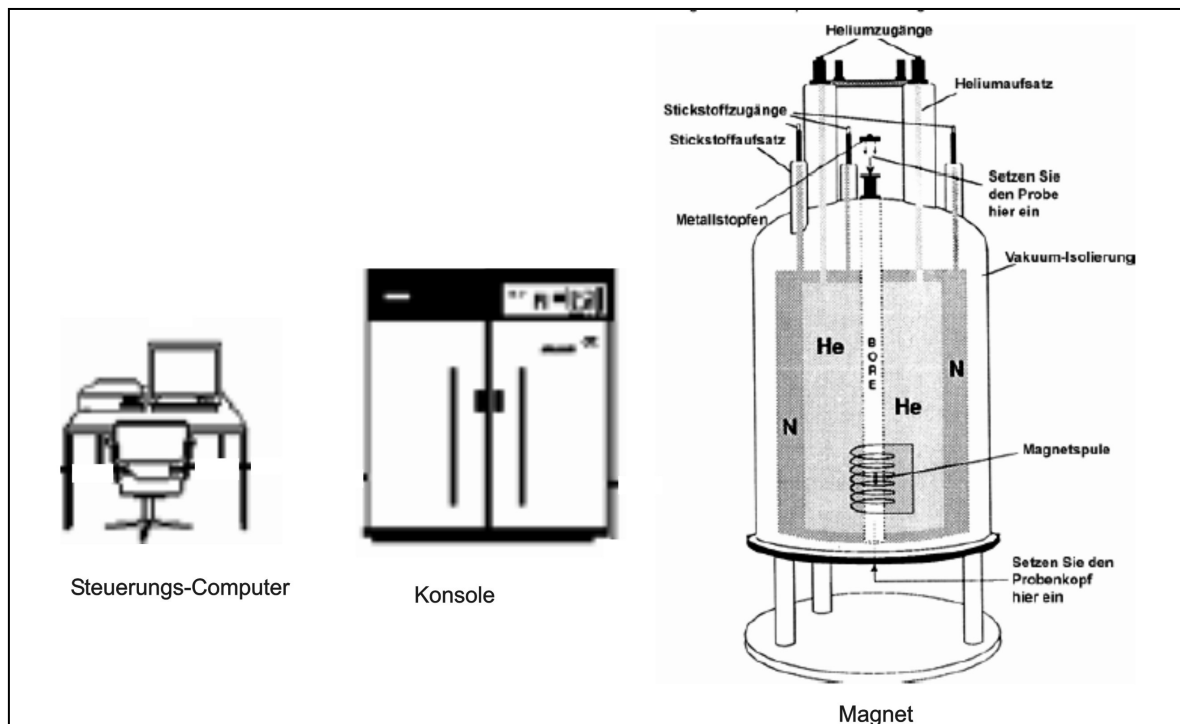


Abbildung 1.2-1: Grundlegender Aufbau eines NMR-Systems, bestehend aus supraleitendem Magneten mit dem Probenkopf, der Konsole, die die Elektronik enthält und die Radiofrequenz-Impulse erzeugt sowie dem Steuercomputer (Abbildung aus [7], überarbeitet).

^a Die magnetische Flussdichte (Synonym: magnetische Induktion) \mathbf{B} (in Tesla, T) ist mit der magnetischen Feldstärke \mathbf{H} (in Gauß, G; $1\text{T}=10^4\text{G}=\text{Vs}/\text{M}^2$) verknüpft: $\mathbf{B}=\mu_r\mu_0\mathbf{H}$. μ_0 ist die magnetische Feldkonstante, eine feste Größe, und μ_r ist die Permeabilitätszahl, eine materialabhängige Größe. Daher ist für ein gegebenes Material die magnetische Flussdichte \mathbf{B} der magnetischen Feldstärke \mathbf{H} direkt proportional. Beides sind vektorielle Größen.

In der Konsole ist die Hardware untergebracht. Kernstück der Konsole ist eine Einheit, bei NMR-Systemen der Firma Bruker „Acquisition Control Unit“ genannt, die der Erzeugung der Radiofrequenzsignale (RF-Signale) dient. Ein Radiofrequenzgenerator erzeugt eine Basisfrequenz, von der alle für die Messungen notwendigen Frequenzen (Beobachtungs-, Entkoppler-, Lockfrequenz) abgeleitet werden. Die RF-Signale werden über Kabel an die Spulen im Probenkopf übertragen. Anschließend werden die in der Empfängerspule im Probenkopf registrierten Signale über die gleichen Kabel an den Vorverstärker geleitet. Die so verstärkten Signale werden dann an eine Empfangseinheit in der Konsole übertragen. Mit den hier erzeugten RF-Impulsen werden die Kerne der Probe zur Resonanz angeregt, wie in Kapitel 1.2.1.3 beschrieben. Außerdem befindet sich hier die gesamte Hardware, die während der Messung für den korrekten Ablauf verantwortlich ist.

Die Bedienerkonsole schließlich besteht aus einem Steuercomputer, der die Elemente der Konsole steuert und überwacht. Außerdem werden hier die aufgenommenen Signale (in Form des „free induction decay“, FID) mittels Fouriertransformation in ein NMR-Spektrum umgerechnet. Näheres hierzu findet sich ebenfalls in Kapitel 1.2.1.3. Zur Bedienerkonsole gehören oftmals noch weitere Eingabegeräte, um beispielsweise einfach und direkt auf das Shimsystem zuzugreifen.

1.2.1.3 Entstehung der NMR-Signale

Fast alle Atomkerne besitzen einen Kern- oder Eigendrehimpuls \mathbf{P} . Dieser ist – wie viele atomare Größen – gequantelt:

Formel 1.2-1
$$\mathbf{P} = \sqrt{I(I+1)}\hbar$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und $\hbar = h/2\pi$. I bezeichnet in diesem Zusammenhang die Kernspinquantenzahl oder kurz den Kernspin und kann den Wert 0 oder ein positives Vielfaches von $\frac{1}{2}$ annehmen. Nur Kerne, deren Kernspin von 0 verschieden ist, sind der Kernresonanzspektroskopie zugänglich. Zu diesen gehören als wichtigste Vertreter Wasserstoff (^1H) und das Kohlenstoffisotop ^{13}C . Beide besitzen den Kernspin $\frac{1}{2}$. Warum nur Kerne mit $I \neq 0$ messbar sind, lässt sich folgendermaßen erklären:

Mit dem genannten Drehimpuls \mathbf{P} ist das magnetische Moment $\boldsymbol{\mu}$ über das gyromagnetische Verhältnis γ verknüpft:

Formel 1.2-2

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \cdot \boldsymbol{P}$$

Das magnetogyrische Verhältnis ist eine Konstante und gibt an, „wie stark magnetisch“ ein bestimmtes Isotop ist. Beispielsweise besitzt das Isotop ^1H ein γ von $26,7519 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und ist damit magnetisch sehr empfindlich, wohingegen das NMR-messtechnisch zugängliche Kohlenstoffisotop ^{13}C mit einem γ von $6,7283 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ wesentlich weniger empfindlich ist (ca. $\frac{1}{4}$ bezogen auf ^1H). Nimmt man Formel 1.2-1 und Formel 1.2-2 zusammen, so lässt sich das magnetische Moment errechnen als:

Formel 1.2-3

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \sqrt{I(I+1)} \hbar$$

Werden die Kerne nun in ein externes statisches Magnetfeld \boldsymbol{B}_0 (auch kurz als B_0 -Feld bezeichnet) gebracht, so orientiert sich der Kernimpuls im Raum. Aufgrund der Tatsache, dass dieser gequantelt ist, können nur diskrete Zustände m angenommen werden. Dabei sind $2I+1$ Zustände möglich. Für Kerne mit dem Spin $\frac{1}{2}$ (dies sind z. B. ^1H - und ^{13}C -Kerne) können die mit $m=+\frac{1}{2}$ und $m=-\frac{1}{2}$ bezeichneten Zustände angenommen werden. Bildlich gesprochen richten sich die Kerne entweder parallel (α) oder antiparallel (β) zum äußeren Magnetfeld aus. Dabei rotieren die Kerne einerseits um ihre Eigenachse und andererseits präzediert diese wie ein Kreisel um eine Achse in Richtung des B_0 -Feldes. Die Frequenz dieser Präzession wird als *Larmor-Frequenz* bezeichnet und ist der Stärke des äußeren Magnetfeldes direkt proportional:

Formel 1.2-4

$$\nu = -\frac{\gamma}{2\pi} \boldsymbol{B}_0$$

Ein Magnetfeld von 9,50 T ruft für ^1H -Kerne somit eine Präzessionsfrequenz von 400 MHz und für ^{13}C -Kerne eine von 100 MHz hervor. Die Magnetsysteme von NMR-Spektrometern werden anhand ihrer Protonen-Resonanzfrequenz klassifiziert. Man spricht daher in diesem Fall von „400 MHz-Spektrometern“. Den beiden genannten Zuständen entsprechen auch zwei unterschiedliche Energieniveaus, deren Größe beschrieben werden kann als:

Formel 1.2-5
$$E = -m \cdot \gamma \cdot \hbar \cdot \mathbf{B}_0$$

Die Differenz der beiden Zustände ist somit gegeben durch:

Formel 1.2-6
$$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot \mathbf{B}_0 = h \cdot \nu$$

Wie in allen anderen spektroskopischen Methoden auch, kann in der NMR-Spektroskopie ein Resonanzsignal beobachtet werden, wenn die in die Probe eingebrachte Energie absorbiert werden kann, das heißt, wenn die eingebrachte Energie ($h\nu$) gleich der Energiedifferenz zwischen zwei Energieniveaus ist. Das heißt, die eingestrahlte Frequenz muss der Larmor-Frequenz entsprechen. Daher rührt auch die Bezeichnung des Signals als Resonanzsignal.

Betrachtet man nun die Verteilung der Kerne auf die beiden Spin-Zustände α und β , so sind nicht gleich viele Kerne in den beiden Zuständen vorhanden, sondern im energieärmeren α -Zustand etwas mehr als im energiereicheren β -Zustand, entsprechend der Boltzmann-Verteilung:

Formel 1.2-7
$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{\Delta E}{RT}}$$

Dabei steht N_α bzw. N_β für die Anzahl der Kerne in den beiden Energieniveaus, R für die allgemeine Gaskonstante und T für die absolute Temperatur. Nimmt man Formel 1.2-6 und Formel 1.2-7 zusammen, so kann der Überschuss an Kernen im α -Zustand berechnet werden. Dieser liegt beispielsweise für Wasserstoffkerne bei einer magnetischen Flussdichte \mathbf{B}_0 von 1,41 T (Protonenresonanzfrequenz 60 MHz) bei 1,0000096 und bei einer von 9,40 T (entsprechend 400 MHz) bei 1,00006403. Dieser Überschuss des α -Zustandes bewirkt eine *makroskopische* Magnetisierung in Richtung des äußeren Magnetfeldes. Der nur sehr geringe Überschuss im energiereicheren Zustand im Bereich von 10^{-4} ist der Grund für die im Vergleich zu anderen spektroskopischen Methoden wie der UV- oder IR-Spektroskopie nur geringen Empfindlichkeit. Dieser makroskopische Magnetisierungsvektor spielt eine entscheidende Rolle im *Vektormodell* der NMR-Spektroskopie, mit dem eine Vielzahl grundlegender Phänomene erklärt werden kann. Die Effekte, die durch komplexere Impulsfolgen und gepulsten Feldgradien-

ten hervorgerufen werden, sind jedoch damit nicht mehr erklärbar; eine formale Erklärung dieser kann durch den Produktoperatorformalismus erreicht werden.

Der Aufbau des Koordinatensystems des Vektormodells ist gegeben durch die z-Richtung in Richtung des äußeren Magnetfeldes \mathbf{B}_0 und der xy-Ebene, in der sich die Sende- und Empfängerspule befinden. Die Berechnungen im Vektormodell werden einfacher, bedient man sich eines rotierenden Koordinatensystems, welches mit der Resonanzfrequenz um die z-Achse rotiert. D. h., die Präzession der Kerne um die z-Achse muss nicht berücksichtigt werden.

In Tabelle 1.2-1 wurden die beiden Verfahren „continuous wave“ (CW) und „Puls-Fourier-Transformation“ (PFT) der NMR-Spektroskopie angesprochen. Heutzutage wird die PFT-NMR-Spektroskopie angewendet. Bei diesem Impuls-Verfahren wird ein Hochfrequenzimpuls auf die Substanzprobe eingestrahlt, durch diesen werden alle Kerne einer Sorte (z. B. alle ^1H - oder alle ^{13}C -Kerne) gleichzeitig angeregt. Wird ein Hochfrequenzgenerator nur für kurze Zeit τ_p (im Bereich einiger μs) eingeschaltet, so erhält man *keinen* Impuls einer konstanten Frequenz ν , sondern ein kontinuierliches Frequenzband symmetrisch um diese Frequenz ν . Die nötige Frequenz ergibt sich aus der Größe des \mathbf{B}_0 -Feldes und muss der Resonanzfrequenz der anzuregenden Kerne entsprechen. Die Breite des Frequenzbandes ergibt sich aus der Dauer des zusätzlichen Feldes und ist in etwa τ_p^{-1} .

Dieses zusätzliche Magnetfeld (als \mathbf{B}_1 -Feld bezeichnet) bewirkt eine Auslenkung des makroskopischen Magnetisierungsvektors. Der Winkel, um den der Vektor gedreht wird, wird als Impulswinkel Θ bezeichnet. Für diesen gilt:

Formel 1.2-8

$$\Theta = \gamma \cdot \mathbf{B}_1 \cdot \tau_p$$

Man bezeichnet diese Impulse mit dem Impulswinkel und der Richtung, *um* die der makroskopische Magnetisierungsvektor gedreht wird. Ein „ 90°_x -Impuls“ meint entsprechend, dass der Vektor um 90° *um* die x-Achse gedreht wird, und somit (sofern er vor dem Impuls in z-Richtung ausgerichtet war) nach diesem Impuls *auf* der y-Achse zu liegen kommt. Für die Spins der einzelnen Kerne bedeutet ein solcher 90°_x -Impuls eine Angleichung der Spins im α - und β -Zustand hin zu einer exakten 1:1-Verteilung und *gleichzeitig* die Erzeugung einer „Phasenkohärenz“, d. h. die Spins präzedieren nicht mehr statistisch gleichmäßig verteilt um die z-Achse,

sondern ein Teil der Spins präzediert „in Phase“, ist also gebündelt und bewirkt die makroskopische Magnetisierung in y-Richtung.

Da die Empfängerspule in y-Richtung angeordnet ist, kann nur der Teil der Magnetisierung detektiert werden, der in y-Richtung liegt. Wird der Vektor um einen anderen Winkel als 90° (zwischen 0° und 180°) gedreht, so ist die Komponente in y-Richtung natürlich kleiner als bei einem exakten 90° -Winkel.

Nach Abschalten des Impulses ist also der makroskopische Magnetisierungsvektor aus seiner Gleichgewichtslage ausgelenkt, einige Spins zeigen Phasenkohärenz. Die Rückkehr in den Gleichgewichtszustand wird als Relaxation bezeichnet. Diese folgt einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung wie folgt:

Formel 1.2-9

$$\frac{d\mathbf{M}_z}{dt} = \frac{(\mathbf{M}_0 - \mathbf{M}_z)}{T_1}$$

Dabei bezeichnet \mathbf{M}_z die Magnetisierung in z-Richtung zum Zeitpunkt t, \mathbf{M}_0 die im Gleichgewichtszustand und T_1 wird als Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxationszeit bezeichnet (auch wenn T_1 tatsächlich eine Zeitkonstante und keine echte, messbare Zeit ist).

Man unterscheidet zwei Arten von Relaxation:

- Relaxation in Feldrichtung, charakterisiert durch die *longitudinale* oder *Spin-Gitter-Relaxationszeit* T_1 .
- Relaxation senkrecht zur Feldrichtung, charakterisiert durch die *transversale* oder *Spin-Spin-Relaxationszeit* T_2 .

Die Größe der T_1 -Relaxationszeit steht dabei in einem proportionalen Zusammenhang mit der als τ_c bezeichneten Korrelationszeit. Diese beschreibt die Zeit zwischen zwei Umorientierungen eines Moleküls. Dabei gilt, je schneller ein Molekül sich bewegt (also je kleiner τ_c ist), desto größer wird T_1 .

Auf die Bedeutung der Relaxation für die Spektroskopie wird in Kapitel 1.2.3.5 näher eingegangen werden.

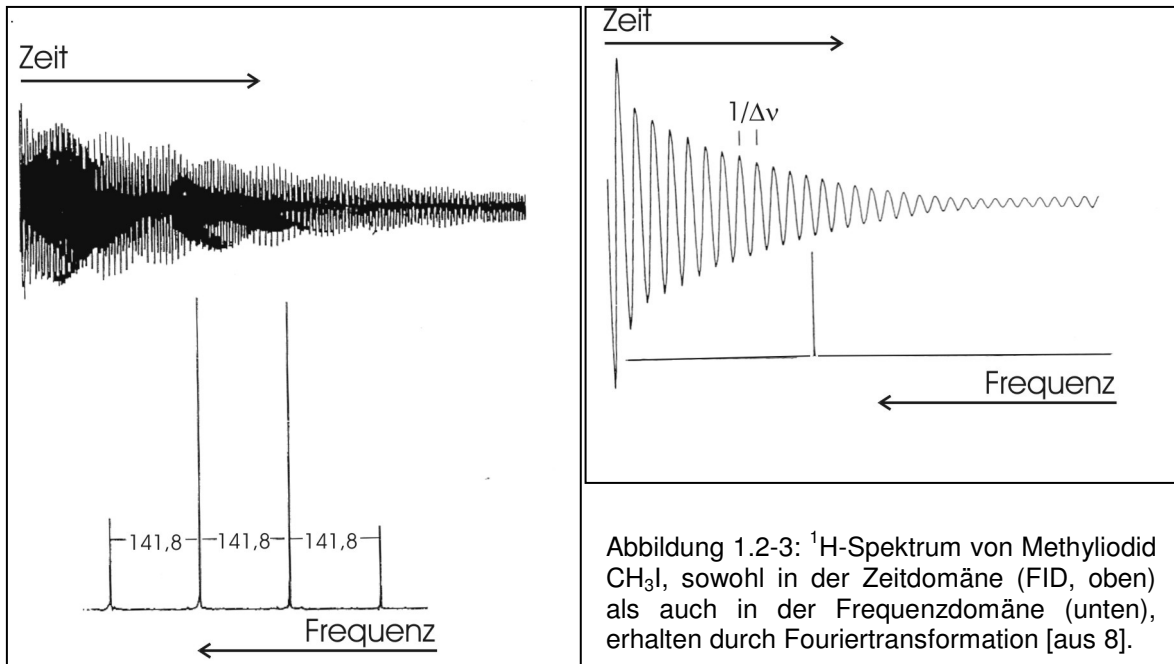


Abbildung 1.2-2: ^{13}C -Spektrum von Methanol $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$, sowohl in der Zeitdomäne (FID, oben) als auch in der Frequenzdomäne (unten), erhalten aus dem FID durch Fourier-Transformation. Da ohne Entkopplung gemessen wurde, besteht das Spektrum aus einem Quartett, da der ^{13}C -Kern mit den 3 ^1H -Kernen der Methylgruppe koppelt [aus 8].

Abbildung 1.2-3: ^1H -Spektrum von Methyljodid CH_3I , sowohl in der Zeitdomäne (FID, oben) als auch in der Frequenzdomäne (unten), erhalten durch Fouriertransformation [aus 8].

Das in einem PFT-NMR-Spektrometer detektierte Signal hängt also von der Quermagnetisierung in y -Richtung ab. Dabei wird für jeden Kern (bzw. für alle magnetisch äquivalenten Kerne) ein Signal detektiert, das einer Schwingung mit der jeweiligen Resonanzfrequenz entspricht, dessen Amplitude jedoch aufgrund der Relaxation mit der Zeit exponentiell abnimmt. Diese im Empfänger detektierte Abnahme der Quermagnetisierung wird als „freier Induktionsabfall“ oder „free induction decay“ (FID) bezeichnet (siehe auch Abbildung 1.2-2). Da magnetisch nicht-äquivalente Kerne unterschiedliche Resonanzfrequenzen besitzen, beobachtet man bei Molekülen eine Überlagerung der verschiedenen FIDs. Gleiches gilt, wenn ein Spektrum infolge von Spin-Spin-Kopplungen Multipletts enthält (siehe Abbildung 1.2-3). Das „Spektrum“ in der Zeitdomäne (also die Überlagerung der einzelnen FIDs, das Interferogramm dieser) kann durch die Fouriertransformation in das entsprechende Spektrum in der Frequenzdomäne, wie es die übliche Darstellung ist, umgerechnet werden:

Formel 1.2-10

$$g(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt$$

Dabei stellt $g(\omega)$ das Spektrum in der Frequenzdomäne und $f(t)$ das Spektrum in der Zeitdomäne dar. $g(\omega)$ ist eine komplexe Funktion. Ob man den Real- oder den Imaginärteil für die Darstellung verwendet, ist im Prinzip gleichgültig, sie sind lediglich um 90° phasenverschoben. Üblicherweise verwendet man für die Darstellung den Realteil und bildet reine Absorptionssignale ab [8].

Entsprechend der Unschärferelation muss man um zwei durch den Frequenzunterschied $\Delta\nu$ getrennte Signale zu unterscheiden mindestens $1/\Delta\nu$ Datenpunkte aufnehmen. Das *Nyquist-Theorem* besagt, dass die höchste im FT-NMR bestimmbare Resonanzfrequenz sich aus dem Abstand der aufgenommenen Datenpunkte (dwell time DW, „Verweilzeit“) ergibt. Dieser muss somit kleiner sein als die Frequenz der zu detektierenden Signale. Die höchste detektierbare Frequenz, als SW (spectral width, spektrale Bandbreite^a) bezeichnet, steht mit DW im Zusammenhang:

Formel 1.2-11

$$DW = \frac{1}{2 \cdot SW}$$

Unter Akquisitionszeit (acquisition time, AQ) versteht man die Zeit, während derer der FID aufgenommen wird. Die Akquisitionszeit setzt sich unmittelbar zusammen aus der „dwell time“ und Anzahl der Datenpunkt TD:

Formel 1.2-12

$$AQ = DW \cdot TD = \frac{TD}{2 \cdot SW}$$

Die digitale Auflösung R_d der NMR-Spektren ist direkt verknüpft mit der der Akquisitionszeit. Die digitale Auflösung gibt den Abstand (in Hertz) der Datenpunkte im Spektrum an. Da durch die Fouriertransformation zwei Datensätze (ein Realteil und ein Imaginärteil) erzeugt werden, enthält der für die Darstellung der Spektren verwendete Realteil nur halb so viele Punkte (SI, sofern durch „zero filling“ (siehe 1.2.3.4) keine Manipulation vorgenommen wurde) wie der ursprüngliche FID, also $TD/2$. Die digitale Auflösung ergibt sich somit als

^a Die Bezeichnung „spektrale Bandbreite“ rührt aus den Zeiten der CW-NMR-Spektroskopie her.

Formel 1.2-13
$$R_d = \frac{\text{gesamte Frequenzbreite}}{\text{Anzahl der Datenpunkte}} = \frac{SW}{SI} = \frac{2SW}{TD} = \frac{1}{AQ}$$

Für wiederholte NMR-Messungen, wie es die Regel ist, muss vor jedem erneuten Impuls wieder der Gleichgewichtszustand erreicht sein. Dieser ist umso schneller erreicht, je größer die Magnetisierung in z-Richtung nach dem Impuls ist. Bei einem 90° -Impuls ist diese jedoch 0. Um die Wartezeit bis zur nahezu vollständigen Relaxation möglichst kurz zu halten, wird in der Regel kein Impulswinkel von 90° sondern von lediglich 30° angewendet. Dies geht, wie oben bereits gesagt, mit einem kleineren Signal in y-Richtung einher. Da jedoch nur diese detektiert werden kann, geht auf diese Weise Intensität bei der Detektion verloren. Für normale NMR-Messungen ist das von geringer Bedeutung, nicht jedoch für quantitative Messungen. Näheres dazu in Kapitel 1.2.3.

1.2.1.4 Chemische Verschiebung und Signalaufspaltung

Auch wenn für alle Kerne in einem Molekül der Wert der magnetogyrischen Konstante gleich ist, so stellt man doch unterschiedliche Resonanzfrequenzen für die verschiedenen Atome fest. Der Grund hierfür liegt in der chemischen Umgebung der einzelnen Atomkerne, die einen Einfluss auf das lokale effektive Magnetfeld \mathbf{B}_{eff} , das auf einen bestimmten Kern einwirkt, haben. Es gilt:

Formel 1.2-14
$$\mathbf{B}_{\text{eff}} = \mathbf{B}_0 - \sigma \cdot \mathbf{B}_0 = (1 - \sigma)\mathbf{B}_0$$

Die Größe σ wird als „Abschirmungskonstante“ bezeichnet und gibt das Ausmaß wieder, um das das äußere \mathbf{B}_0 -Feld durch die Umgebung des betrachteten Kernes abgeschwächt wird. Unter Berücksichtigung von Formel 1.2-14 lautet die Resonanzbedingung (Formel 1.2-6) somit:

Formel 1.2-15
$$\Delta E = h \cdot \nu = \hbar \cdot \gamma \cdot (1 - \sigma) \cdot \mathbf{B}_0 = \frac{h\gamma}{2\pi} \cdot (1 - \sigma) \cdot \mathbf{B}_0$$

Das bedeutet, dass die Resonanzfrequenz von der chemischen Umgebung der Kerne abhängig ist und sich so die Resonanzfrequenzen für die unterschiedlichen, magnetisch nicht-äquivalenten Kerne in einem Molekül unterscheiden.

Während die Frequenz sehr exakt gemessen werden kann, gilt dies nicht in gleichem Maße für die Magnetfeldstärke. Daher wurde bereits sehr früh ein Konzept

von Referenzsubstanzen entwickelt, um die Größe von σ zu beschreiben. Als Referenzsubstanz wird seit 1958 [9] Tetramethylsilan (TMS) benutzt. Angegeben wird für die einzelnen Kerne in einem Molekül jedoch nicht die Änderung der Resonanzfrequenz gegenüber der der Referenzsubstanz, da letztere in ihrer Größe von der Stärke des äußeren Magnetfeldes abhängt, sondern die Änderung wird *bezogen* auf die Resonanzfrequenz der Referenzsubstanz. Im Jahr 1972 hat die IUPAC [10] zur Berechnung der so genannten *chemischen Verschiebung* δ für Kerne X festgelegt:

Formel 1.2-16

$$\delta_{X, \text{Probe}} = \left(\frac{\nu_{X, \text{Probe}} - \nu_{X, \text{Referenz}}}{\nu_{X, \text{Referenz}}} \right) \times 10^6$$

Daher sind die chemischen Verschiebungen der meisten Wasserstoffkerne, da sie schwächer abgeschirmt sind als in der Referenzsubstanz TMS, positiv bei zunehmender Frequenz (entsprechend abnehmender Feldstärke). Aus dieser Formel folgt aber auch, dass die chemische Verschiebung δ eine Größe ohne Einheit darstellt. Da dies jedoch seither ignoriert wurde, wurde 2001 von der IUPAC die chemische Verschiebung definiert als [11]

Formel 1.2-17

$$\delta_{X, \text{Probe}} = \left(\frac{\nu_{X, \text{Probe}} - \nu_{X, \text{Referenz}}}{\nu_{X, \text{Referenz}}} \right)$$

Durch das Weglassen des Faktors 10^6 ergibt sich so zur Berechnung der chemischen Verschiebung

Formel 1.2-18

$$\delta_{X, \text{Probe}} / \text{ppm} = \frac{(\nu_{X, \text{Probe}} - \nu_{X, \text{Referenz}}) / \text{Hz}}{\nu_{X, \text{Referenz}} / \text{MHz}}$$

Durch diese Definition erhält die chemische Verschiebung δ die „Einheit“ ppm.

Es sei erwähnt, dass in den eben genannten IUPAC-Empfehlungen eine „einheitliche Skala“ vorgeschlagen wird, die die heute gängige Praxis, die Verschiebungen verschiedener Kerne auf unterschiedliche Referenzsubstanzen zu beziehen^a, was gerade bei seltenen Kernen zu Problemen führen kann, umgeht. Dazu sind Ξ -Werte tabelliert [11], die wiedergeben, in welchem Maß sich die Resonanzfre-

^a So werden ^1H - und ^{13}C -Kerne auf TMS, bezogen, ^{14}N und ^{15}N auf CH_3NO_2 , ^{19}F auf CFCl_3 etc.

quenz der betreffenden Kerne von der von ^1H -Kernen unterscheidet. Somit wird eine rechnerische, genaue Angabe der chemischen Verschiebung ermöglicht.

Die chemische Umgebung erklärt in Formel 1.2-14, wie es zu den unterschiedlichen Resonanzfrequenzen der einzelnen Kerne kommt. In ähnlicher Weise kann die Aufspaltung der einzelnen Signale in Multipletts erklärt werden. Im Molekül benachbarte magnetische Kerndipole treten miteinander in Wechselwirkung, was als *Spin-Spin-Kopplung* bezeichnet wird. Man unterscheidet zwischen der *direkten Spin-Spin-Kopplung*, die zwischen Kerndipolen direkt durch den Raum wirkt und der *indirekten Spin-Spin-Kopplung*, die über Bindungen hinweg erfolgt. Während die direkte Spin-Spin-Kopplung bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie eine wichtige Rolle spielt, wird sie in Flüssigkeiten nicht wahrgenommen, da dieser Effekt im zeitlichen Mittel durch die Molekülbewegung zu Null wird.

Die indirekte Spin-Spin-Kopplung hingegen ist auch für die NMR-Spektroskopie in Flüssigkeiten wichtig und führt zu den bekannten Signalaufspaltungen. Betrachtet man zwei Kerne A und X^a, die miteinander koppeln, so beeinflussen diese sich gegenseitig. Wie schon zuvor erklärt, können die Spins der Kerne entweder parallel (α -Zustand, symbolisiert als $X\uparrow$ bzw. $A\uparrow$) oder antiparallel (β -Zustand, $X\downarrow$ bzw. $A\downarrow$) zum äußeren Magnetfeld (B_0) ausrichten. Am Ort des Kernes A wirkt daher zusätzlich zu dem äußeren Magnetfeld, ein weiteres, das durch den Kernspin der Kernes X erzeugt wird. Dieses kann das äußere Magnetfeld entweder verstärken (α -Zustand, also Ausrichtung *in* Feldrichtung) oder abschwächen (β -Zustand, also Ausrichtung *gegen* die Feldrichtung). Das heißt, das in Formel 1.2-6 beschriebene Magnetfeld B_0 muss nicht nur entsprechend Formel 1.2-15 um die Abschirmung aufgrund der chemischen Umgebung korrigiert werden, sondern zusätzliche um den Einfluss durch die koppelnden Kerne. Dementsprechend erscheint das Resonanzsignal eines Teiles aller A-Kerne in der Probe zu einer etwas höheren Frequenz verschoben und der andere Teil zu einer etwas niedrigeren Frequenz. Da in einer makroskopischen Probe in etwa gleich viele X-Kerne im α -Zustand wie im β -Zustand vorliegen, erscheint das Signal als Dublett aus zwei Signalen annähernd gleich großer Intensität. Analog gilt dies auch für die X-Kerne in der Probe. Der Abstand der beiden Linien ist für die beiden betrachteten Kerne gleich und außer-

^a Durch den Gebrauch von Buchstaben, die im Alphabet weit auseinander liegen, bringt man zum Ausdruck, dass die Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Kerne sehr viel größer ist als die Kopplungskonstante zwischen ihnen.

dem von der magnetischen Flussdichte B_0 unabhängig. Man gibt diese als Kopplungskonstante mit J bezeichnete Größe in Hz an.

In gleicher Weise können die Kopplungen eines Kernes A mit zwei äquivalenten Kernen X betrachtet werden. Hier können die beiden X-Kerne entweder beide parallel in Feldrichtung ($\uparrow\uparrow$), beide entgegen der Feldrichtung ($\downarrow\downarrow$), einer in Feldrichtung und einer entgegen ($\uparrow\downarrow$ und $\downarrow\uparrow$) ausgerichtet sein. Somit ergibt sich für den Kern A ein Triplett, wobei die mittlere Linie eine doppelt so große Intensität besitzt wie die beiden äußeren Linien, da sie sich durch die beiden Zustände $\uparrow\downarrow$ und $\downarrow\uparrow$ der X-Kerne ergibt.

Koppelt ein Kern mit einer Gruppe magnetisch äquivalenter Kerne, so ergeben sich mehrere Linien. Die Anzahl der Linien eines solchen Multipletts, die Multiplizität M , lässt sich aus der Kernspinquantenzahl I berechnen:

Formel 1.2-19

$$M = 2nI + 1$$

Bei Kernen mit $I=1/2$ entsprechen die Signalintensitäten den Koeffizienten der Binomialreihe die sich dem Pascalschen Dreieck entnehmen lässt.

Koppeln drei nicht-äquivalenten Kerne, als A, M und X bezeichnet^a, miteinander, so ergeben sich die Aufspaltungen aus den übereinander gelagerten Kopplungen und sie erscheinen in diesem Fall als Dubletts von Dubletts.

Für den Fall, dass der Frequenzabstand $\Delta\nu$ zwischen den koppelnden Kernen groß ist im Vergleich zur Kopplungskonstante J (größer als der zehnfache Betrag von J), lassen sich die Spektren auf die eben beschriebenen Effekte zurückführen und werden als Spektren 1. Ordnung bezeichnet. Gilt dies nicht, spricht man von Spektren höherer Ordnung; in diesen verändert sich Zahl und Intensität der Linien der Multipletts gegenüber Spektren 1. Ordnung und solche Spektren lassen sich oft nur schwer interpretieren. Mit zunehmender Feldstärke der verwendeten Magneten treten Spektren höherer Ordnung allerdings zunehmend seltener auf. Während die Kopplungskonstante J unabhängig von der Magnetfeldstärke ist, gilt dies nicht für die Resonanzfrequenzen: mit zunehmender Magnetfeldstärke nehmen

^a Durch den Gebrauch von drei Buchstaben, die gleichmäßig im Alphabet weit auseinander liegen, bringt man zum Ausdruck, dass die Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Kerne sehr viel größer ist als die Kopplungskonstante zwischen ihnen.

die Resonanzfrequenzen der einzelnen Kerne zu, was zu einem größeren Frequenzabstand $\Delta\nu$ koppelnder Kerne führt^a.

Eine Möglichkeit zur Interpretation dieser bietet die Spektren-Simulation^b. Die Qualität dieser hängt ab von der geeigneten Wahl der Ausgangsparameter für Frequenzen und Kopplungskonstanten. Besser als die reine Simulation ist daher eine Spektren-Iteration, bei der das berechnete Spektrum mit dem gemessenen verglichen wird und die Ausgangsparameter für eine weitere Berechnung angepasst werden, bis die Übereinstimmung mit dem gemessenen Spektrum möglichst gut ist [8].

1.2.2 NMR zur Strukturbestimmung

Wie zuvor schon angesprochen, können auf Grund der chemischen Verschiebung einzelner Signale Rückschlüsse auf die chemische Umgebung der entsprechenden Atomkerne gezogen werden. Anschließend lässt sich hieraus zumeist die Struktur der betreffenden Verbindung ableiten.

Diese Anwendung ist die häufigste Anwendung der NMR-Spektroskopie, sowohl für die chemische Synthese als auch in der Naturstoffchemie. Seit Entdeckung der NMR-Spektroskopie im vergangenen Jahrtausend haben sich natürlich auch in dieser „Standardanwendung“ große Umbrüche vollzogen. Konnte man in den Anfängen der NMR-Spektroskopie lediglich eindimensionale Spektren, in den entlang einer Achse der chemischen Verschiebung die Intensitäten der Resonanzsignale aufgetragen werden, zur Auswertung heranziehen, so steht heute eine große Auswahl an mehrdimensionalen, inversen, gradientenunterstützten, phasensensitiven, etc. Messmethoden zur Verfügung. Alle diese unterschiedlichen Methoden sind in der Lage, unterschiedliche Aspekte der Moleküle wiederzugeben und liefern so eine Fülle an Informationen über die Struktur einer unbekanntes Verbindung.

^a Zum Beispiel: zwei Kerne mit $\delta_A=3,0$ ppm, $\delta_B=3,2$ ppm (also einem Abstand von 0,2 ppm) und $J_{AB}=15$ Hz. Wird mit einem 60 MHz-Spektrometer gemessen, so beträgt der Frequenzabstand $\Delta\nu$ 12 Hz, bei Nutzung eines 400 MHz-Spektrometers dagegen 80 Hz. Für das 400 MHz-Spektrum erhält man somit ein Spektrum 1. Ordnung, für das 60 MHz-Spektrum nicht.

^b Beispielsweise mit dem Programm NMRSIM der Firma Bruker

1.2.3 NMR als quantitative Messmethode

1.2.3.1 Grundlagen der quantitativen NMR-Spektroskopie

Unter der Intensität eines Resonanzsignals versteht man die Fläche unter dem Signal. Diese Fläche wird von gebräuchlicher Spektrometer-Software direkt berechnet. In der Regel geschieht dies durch Addition der Intensitäten (in willkürlichen Einheiten) an jedem einzelnen Datenpunkt über das gesamte Signal hinweg. Dabei gilt, dass die Intensität I_A eines Signals der Anzahl N der Kerne, die diese Resonanz hervorrufen, direkt proportional ist. Aufgrund dieses Zusammenhanges können die Intensitäten von NMR-Signalen für quantitative Untersuchungen genutzt werden.

Für den Zusammenhang zwischen der Signalintensität I und der Anzahl N der beobachteten Kerne dieser Sorte gilt:

Formel 1.2-20
$$I = k_s \cdot N$$

Die Proportionalitätskonstante k_s ergibt sich dabei aus den Parametern des NMR-Systems und der Probe und wird als Spektrometerkonstante bezeichnet. Das heißt, es besteht ein *linearer Zusammenhang* zwischen der Signalintensität und der Anzahl der Atome, die dieses Resonanzsignal hervorrufen.

Diese Beziehung lässt sich aus der Beschreibung eines als Lorentzlinie dargestellten NMR-Signals $S(\omega)$ bei der Frequenz ω (was für die Linienform der NMR-Signale zutrifft, die als Absorptionssignale dargestellt werden, siehe Abbildung 1.2-4) herleiten [14], die von $-\infty$ bis $+\infty$ integriert wird.

Mit Ausnahme der Anzahl der zu dem Signal beitragenden Kerne sind alle Einflussgrößen innerhalb eines NMR-Systems konstant.

Ein Nachteil der NMR-Spektroskopie bei der Anwendung als quantitative Methode ist die geringe Empfindlichkeit. Da die NMR-Signale nur auf dem Besetzungsunterschied des α - und β -Zustandes beruhen, ist messtechnisch nur dieser geringe Anteil der Kerne zugänglich (vgl. Formel 1.2-7). Während in der UV-Spektroskopie Nachweisgrenze im Bereich von $1 \mu\text{M}$

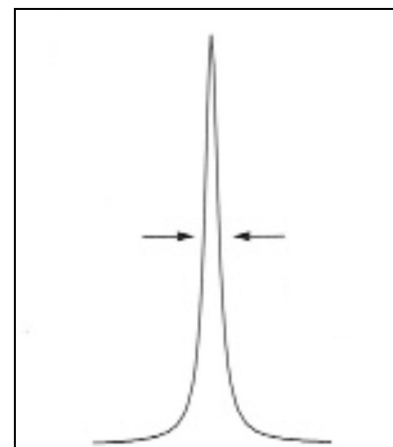


Abbildung 1.2-4: Reine Lorentzlinie eines NMR-Signals; gekennzeichnet ist die Breite an halber Höhe $\Delta\nu_{1/2}$ (aus [6]).

möglich sind, sind in der NMR-Spektroskopie Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 1 mM erforderlich. Außerdem ist eine Quantifizierung nur dann möglich, wenn die zu integrierenden Resonanzsignale ausreichend weit voneinander getrennt sind. Diese Trennung ist im Gegensatz zu chromatographischen Methoden jedoch nur gering beeinflussbar, da die chemische Verschiebung auf der Molekülstruktur beruht. Lediglich durch Wechsel des Lösungsmittels oder Zusatz von Hilfsreagenzien (sog. „Shiftreagenzien“) kann die Trennung der Resonanzsignale verändert werden. Dabei können jedoch Probleme hinsichtlich der Signalform auftreten, was wiederum einer guten Integration abträglich ist.

Diese Nachteile werden aber teilweise aufgewogen. Der entscheidende Vorteil der NMR-Spektroskopie gegenüber chromatographischen und elektrophoretischen Methoden ist die quasi nicht vorhandene Vorbereitungszeit. Während bei der HPLC ein oftmals großer Zeitbedarf zur Vorbereitung der Säule auf das entsprechende Fließmittel vonnöten ist, die Analyten derivatisiert werden müssen, um sie der angeschlossenen UV- oder Fluoreszenz-Detektion zugänglich zu machen, ist dies alles bei der NMR-Spektroskopie nicht nötig. Die ausgewogene Substanz muss lediglich im passenden deuterierten Lösungsmittel gelöst werden. Der Bedarf an deuterierten Lösemittel liegt bei ca. 0,7 ml je Messung (bei den am meisten verbreiteten 5mm-Probenköpfen), so dass angesichts der größeren Volumina bei chromatographischen Methoden die Kosten für deuterierte Lösemittel vertretbar bleiben.

1.2.3.2 NMR-Spektroskopie als primäre Messmethode

Ein weiterer Vorteil der NMR-Spektroskopie ist deren Anwendbarkeit als *primäre Messmethode*. Als Grundeinheit der Stoffmenge wurde 1971 das „Mol“ in das SI-System (Système International d'Unités) eingeführt. Das im Rahmen des Internationalen Komitees für Maß und Gewicht (CIPM, Comité International des Poids et Mesures) hierfür zuständige Gremium, das Beratende Komitee für die Stoffmenge (CCQM, Comité Consultatif pour la Quantité de Matière), hat als primäre Messmethode definiert:

„A primary method of measurement is a method having the highest metrological qualities, whose operation can be completely described and understood, for which a complete uncertainty statement can be written down in terms of SI units, and whose results are, therefore, accepted without reference to a standard of the quantity being measured.“ [12]

Praktisch bedeutet dies, bei einer primären Messmethode lässt sich die Stoffmenge direkt aus dem physikalischen Kontext, auf dem die Messung beruht, ermitteln *ohne* auf eine andere Substanz Bezug zu nehmen. Beispielsweise kann die Menge eines Stoffes coulometrisch bei konstanter Stromstärke und einem Ein-Elektronen-Übergang bestimmt werden nach $n=ItF^{-1}$. Werden die Stromstärke I und die Zeit t und die Faradaykonstante F in den jeweiligen SI-Einheiten A, s bzw. C mol⁻¹ ausgedrückt, so ergibt sich direkt die Stoffmenge n in [13]. Als primäre Messmethoden gelten die Coulometrie, die Gravimetrie, die Titrimetrie, die Gruppe der kolligativen Methoden^a sowie die Isotopenverdünnungs-Massenspektrometrie [12]. Die NMR-Spektroskopie kann diese Bedingungen ebenfalls erfüllen.

Für das Signal-Rausch-Verhältnis R in der NMR-Spektroskopie gilt:

Formel 1.2-21
$$R(\omega) = \frac{S_p(\omega)}{2N(\omega)}$$

wobei S_p das Absorptionssignal und N das Rauschen darstellt. Die Linienform der NMR-Signale stellt theoretisch, wie gesagt, in Absorptionsdarstellung eine reine Lorentzlinie dar. Sowohl das Signal als auch das Rauschen kann theoretisch aus Naturkonstanten und Proben- bzw. Geräteparametern hergeleitet werden [14]. Nach einigen Umformungen ergibt sich dann für Formel 1.2-21:

Formel 1.2-22
$$R(\omega) = \underbrace{\left[\frac{\hbar^2 I(I+1)}{24k^{3/2} \mu_0^{1/2}} \right]}_{\text{Grundkonstanten}} \cdot \underbrace{\left[\frac{N\omega^{3/2} (T_2^*)^{1/2}}{T^{3/2}} \right]}_{\text{Parameter der Probe}} \cdot \underbrace{\left[\frac{2\xi^2 \rho Q V_c}{\lambda F} \right]^{1/2}}_{\text{Parameter des Empfängers}} \cdot \sin \alpha$$

Auf die Bedeutung dieser Formel soll nicht im Detail eingegangen werden. Während die Grundkonstanten (wie das gyromagnetische Verhältnis γ und die Boltzmannkonstante k) und die Probenparameter (wie die Larmor-Frequenz ω oder die absolute Temperatur T) bekannt oder bestimmbar sind, gilt dies für die meisten Parameter des Empfängers (wie dem Verhältnis von effektiver zu gesamter Induktivität der Spule ρ , dem Füllfaktor der Empfängerspule ξ oder dem Qualitätsfaktor der Spule Q) nicht. Lediglich das von der Empfängerspule umschlossene Volumen V_c kann bestimmt werden.

^a Kolligative Eigenschaften sind solche, die nur von der *Anzahl*, nicht aber von der Art der gelösten Teilchen abhängen. Zu diesen gehören beispielsweise Siedepunktserhöhung und Gefrierpunktserniedrigung.

Aufgrund dieser Rückführbarkeit auf Naturkonstanten und proben- bzw. geräte-spezifische Parameter kann die NMR-Spektroskopie – wenn die in den folgenden Abschnitten erläuterten Bedingungen eingehalten werden – als primäre Messmethode fungieren [13].

Schon in Kapitel 1.2.1.3 wurde erwähnt, dass (entsprechend des dort beschriebenen Vektormodells) nur *der* Anteil der makroskopischen Magnetisierung detektiert werden kann, der in der y -Richtung der rotierenden Koordinatensystems liegt. Dessen Größe wiederum hängt erstens von der Größe des makroskopischen Magnetisierungsvektors in z -Richtung der unangeregten Probe (und damit von dem nur kleinen Unterschied der Anzahl der Kerne im α - und β -Zustand) und zweitens vom nach der Anregung in die y' -Richtung gelenkten Anteil des makroskopischen Magnetisierungsvektors (und damit vom Impulswinkel) ab.

An quantitative NMR-Messungen müssen weitergehende Anforderungen gestellt werden als an qualitative NMR-Messungen. Hauptziel ist, dass der detektierbare Anteil der Magnetisierung, also der in y -Richtung des rotierenden Koordinatensystems, möglichst groß ist. Um sicherzustellen, dass dies stets der Fall ist, müssen verschiedene Messparameter optimiert sein, auf die in den nächsten Abschnitten näher eingegangen wird.

1.2.3.3 Sendefrequenz und spektrale Bandbreite

Der Anregungsimpuls liegt, wie schon erwähnt, symmetrisch um die Anregungsfrequenz (Sendefrequenz) ν und besitzt eine Breite, die proportional τ^{-1} (τ ist die Impulslänge) ist. Dabei ist die Leistung am stärksten genau an der Frequenz ν , und sie fällt zu den Rändern hin ab. Der Anregungsimpuls stellt also *keinen* idealen Rechteckimpuls dar.

Wird mit nur einem Detektor der FID aufgenommen, so kann nicht unterschieden werden, ob die gemessenen Signale eine Resonanzfrequenz *über* oder *unter* der Sendefrequenz haben. Daher müsste die Sendefrequenz an den Rand des Spektrum platziert werden, was aber gleichzeitig bedeutet, dass die halbe Sendeleistung ungenutzt bleibt und der Bereich, der mit gleich hoher Sendeleistung erfasst wird, noch kleiner wird. Deswegen werden heutzutage *zwei phasensensitive* Detektoren eingesetzt, um gleichzeitig die \mathbf{M}_x - und die \mathbf{M}_y -Komponente des Magnetisierungsvektors zu erfassen. Durch dieses „Quadraturdetektion“ genannten Verfahren werden die eben genannten Nachteile vermieden. Da, der Impuls *kein* ech-

ter Rechteckimpuls ist, sollte die Sendefrequenz möglichst nah, falls möglich, äquidistant zu den zu integrierenden Signalen liegen.

Die spektrale Bandbreite muss so groß gewählt werden, dass der gesamte gewünschte Bereich erfasst wird. Wird die Bandbreite kleiner gewählt, als das Spektrum ist, so besteht die Gefahr der „Frequenzfaltung“. Das heißt, ein Signal mit einer Resonanzfrequenz über der Nyquist-Frequenz wird fälschlich als eine zu kleine Frequenz nach der Fouriertransformation erkannt. Bei modernen Spektrometern ist dies jedoch in der Regel nicht der Fall, da diese mit digitalen Filtern arbeiten. Das dahinter stehende Prinzip wird als „oversampling“ bezeichnet und bedeutet, dass der FID mit einer höheren Digitalisierungsrate aufgenommen wird als es der gewünschten spektralen Bandbreite entspricht. Die Signale außerhalb des gewünschten Bereiches werden anschließend mathematisch (digital) eliminiert (siehe Abbildung 1.2-5). Ein zusätzlicher Effekt dieser Methode ist die Minimierung des durch die Digitalisierung des FIDs entstehenden Rauschens [15]. Durch die Anwendung dieser digitalen Filter ist es möglich, das spektrale Fenster auf lediglich einen Teilbereich des Spektrums zu beschränken, ohne durch die Einfaltung von Signalen falsche Signale vorgetäuscht zu bekommen.

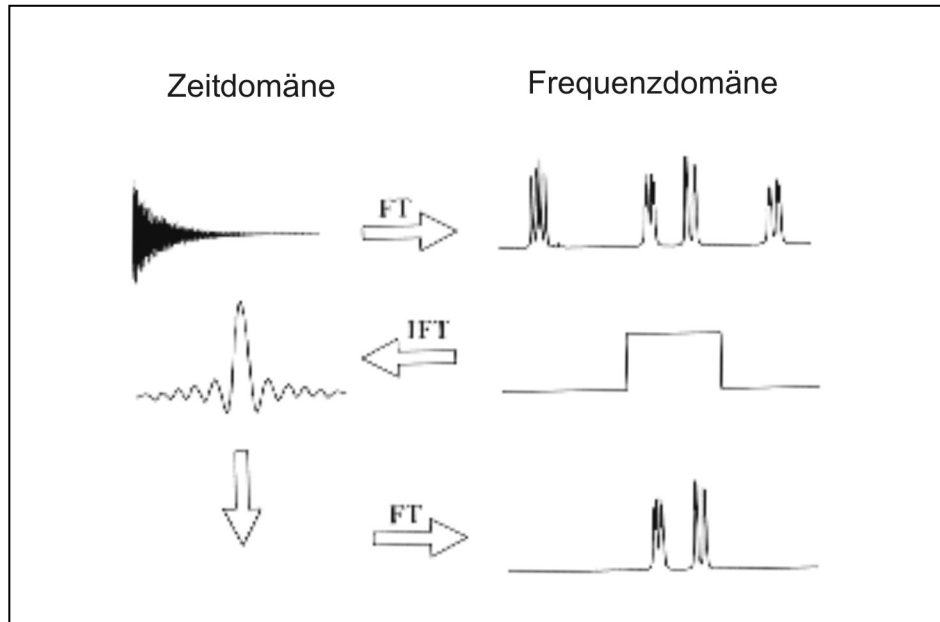


Abbildung 1.2-5: Prinzip der digitalen Filterung von NMR-Spektren: das gewünschte Filterprofil (Mitte) in der Frequenzdomäne wird einer inversen Fouriertransformation unterworfen. Das so erhaltene Profil in der Zeitdomäne wird mit dem FID verrechnet und der so erhaltene *modifizierte* FID der eigentlichen Fouriertransformation unterworfen: das so erhaltene Spektrum ist unten, das ungefilterte Spektrum oben rechts zu sehen (aus [6])

1.2.3.4 Länge der Akquisitionszeit

Der Zusammenhang zwischen Akquisitionszeit und digitaler Auflösung wurde bereits früher beschrieben, er soll der Vollständigkeit halber hier nur kurz wiederholt werden:

Formel 1.2-13
$$R_D = \frac{\text{gesamte Frequenzbreite}}{\text{Anzahl der Datenpunkte}} = \frac{SW}{SI} = \frac{2SW}{TD} = \frac{1}{AQ}$$

Der FID nimmt aufgrund der Relaxation mit der Zeit ab (siehe auch Kap. 1.2.3.5), das Rauschen bleibt aber konstant. Daher enthält mit zunehmender Aufnahmezeit das Interferogramm einen zunehmend höheren Anteil an Rauschen. Um Artefakte („Truncation effects“) zu vermeiden, sollte der FID mindestens soweit aufgenommen werden, bis er wieder nahezu auf Null gefallen und nur statistisches Rauschen gemessen wird. Eine längere Aufnahme birgt dann keinerlei weiteren Informationen über das Spektrum, es könnten allerdings Störungen durch den hohen Anteil an Rauschen auftreten. Die Auflösung kann künstlich verbessert werden, indem der aufgenommene FID um eine Anzahl an Nullen verlängert wird, ein Vorgang, der als „zero filling“ bekannt ist. In diesem Fall kann Formel 1.2-13 umgeschrieben werden, indem für SI die entsprechende vergrößerte Anzahl an Datenpunkten eingesetzt würde.

Die Länge der Akquisitionszeit muss also so groß gewählt werden, dass der gesamte FID aufgenommen und die gewünschte digitale Auflösung erreicht wird, Störungen durch Rauschen jedoch minimiert sind.

1.2.3.5 Relaxationsverzögerung und Impulswinkel

Da nur der Anteil der Magnetisierung, der in Richtung der y-Achse liegt, messtechnisch zugänglich ist, muss dieser für genaue Quantifizierungen möglichst groß sein. Das heißt, die *gesamte* makroskopische Magnetisierung muss aus der z-Richtung durch einen 90°_x -Impuls in die y-Richtung gedreht werden. Dies geht allerdings mit einem größeren Zeitbedarf bis zur vollständigen Relaxation einher. Wie bereits erwähnt, wird bei üblichen qualitativen NMR-Messungen daher normalerweise lediglich ein 30°_x -Impuls verwendet.

Bereits in Formel 1.2-9 wurde die Relaxationsgeschwindigkeit für die longitudinale Relaxation, also die in z-Richtung, wiedergegeben. Nach einigen wenigen Impul-

sen wird in der Probe ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem der Magnetisierungsvektor in z-Richtung nicht mehr \mathbf{M}_0 beträgt, sondern ein klein wenig weniger. Es soll angenommen werden, dass \mathbf{M}_z 99% von M_0 beträgt. Setzt man \mathbf{M}_0 gleich eins, dann erreicht man

Formel 1.2-23

$$\int_{M_z}^{0,99} \frac{d\mathbf{M}_z}{1 - \mathbf{M}_z} = \frac{1}{T_1} \int_0^{PR} dt$$

wobei PR die Wiederholungszeit der Impulse („pulse repetition period“), also die Zeit bis zum nächsten Impuls, darstellt.

Das Signal-Rausch-Verhältnis ist direkt proportional zu der Größe der Magnetisierung in der xy-Ebene. Außerdem ist das Signal-Rausch-Verhältnis nach n Wiederholungsmessungen gleich dem Signal-Rausch-Verhältnis nach einem Impuls multipliziert mit der Wurzel aus der Anzahl der Wiederholungen. Die Anzahl der Wiederholungen multipliziert mit der Wiederholungszeit ergibt die Gesamtzeit t_{tot} der Messung. Das Signal-Rausch-Verhältnis S/N kann also beschrieben werden als:

Formel 1.2-24

$$(S/N)_n = \frac{k \cdot \sqrt{t_{\text{tot}}} \cdot 0,99 \sin \alpha}{\sqrt{T_1 \cdot \ln[100 - 0,99 \cos \alpha]}}$$

Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu optimieren, kann diese Gleichung nach α differenziert werden (t_{tot} und T_1 werden konstant gehalten). Die so erhaltene Gleichung wird dann gleich Null gesetzt und numerisch gelöst. Man erhält als optimalen Impulswinkel einen Winkel von $82,865^\circ$ [16]. Um die angestrebten 99% an Magnetisierung in z-Richtung vor dem nächsten Impuls zu erhalten, benötigt man somit eine Wiederholungszeit von der 4,5fachen Größe der T_1 -Relaxationszeit [16]. Mit diesen Werten kann eine nur unwesentlich von der Integrationsgenauigkeit bei Anwendung eines 90° -Impulses und einer Wiederholungszeit von der 5fachen Größe der T_1 -Relaxationszeit erreicht werden [16].

Es kann auch ein Zusammenhang aufgezeigt werden zwischen dem Signal-Rausch-Verhältnis und dem Impulswinkel einerseits und der Genauigkeit der Integration andererseits. Hierbei zeigt sich, dass mit einer Verschlechterung der Integrationsgenauigkeit aufgrund kürzerer Wiederholungszeit und kleinerem Impulswinkel eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erreicht werden kann [17].

Um eine möglichst genaue quantitative Analyse durchführen zu können, ist es erforderlich, dass die Integrale der zu vergleichenden Resonanzsignale möglichst korrekt sind. Daher sollten quantitative Messungen mit einem Impulswinkel von 90° durchgeführt werden, was eine maximale detektierbare Magnetisierung in y -Richtung bewirkt. Bei einer T_1 -Relaxationszeit von einer Sekunde (eine Größe, die in der ^1H -NMR-Spektroskopie in der Regel nicht überschritten wird) geht dies mit einer Wiederholungszeit von mindestens fünfmal der T_1 -Relaxationszeit einher [17].

Um die T_1 -Relaxationszeit exakt zu bestimmen, wird die „Inversion-Recovery“-Pulssequenz (siehe Abbildung 1.2-6) benutzt [6]. Diese beginnt mit einem 180° - x -Impuls, der die Spinverteilung genau *invertiert*. Im Verlauf des Relaxationsprozesses

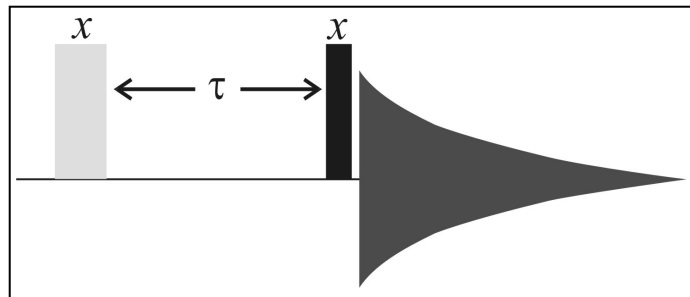


Abbildung 1.2-6: Schema der „Inversion-Recovery“-Pulssequenz

verläuft nun der makroskopische Magnetisierungsvektor von der ($-z$)-Richtung durch die xy -Ebene in die ($+z$)-Richtung. Mit einem 90° - x -Impuls wird der teilweise wiederhergestellte Magnetisierungsvektor in die xy -Ebene gedreht und so detektiert. Es werden mehrere solcher Experimente, mit unterschiedlichen Zeiten τ zwischen den beiden Impulsen durchgeführt. Da die Relaxation nach einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung abläuft, gilt für den Zusammenhang zwischen der ursprünglichen Magnetisierung im Gleichgewicht \mathbf{M}_0 und der Magnetisierung zum Zeitpunkt t \mathbf{M}_t (der Faktor 2 liegt daran, dass zum Beginn der Relaxation die Magnetisierung $-\mathbf{M}_0$ beträgt):

Formel 1.2-25

$$\mathbf{M}_t = \mathbf{M}_0 \left(1 - 2e^{-\tau/T_1} \right)$$

Man kann nun für die Intensitäten der Resonanzsignale zum Zeitpunkt t einen Formel 1.2-25 entsprechenden Zusammenhang aufstellen (dabei sind A und B Konstanten):

Formel 1.2-26

$$I_t = I_o - 2I_o e^{-t/T_1} \quad I_o = \text{const.} = A + B e^{-t/T_1}$$

Kurzum, es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem natürlichen Logarithmus der Signalintensität und dem Abstand zwischen den Impulsen. Die Steigung der entsprechenden Geraden entspricht gerade $1/T_1$. Diese Berechnung kann in der Regel direkt mit der zugehörigen Software durchgeführt werden.

Die transversale Relaxation beschreibt den Abbau der Magnetisierung in der xy-Ebene. Sie beeinflusst die Breite der Signale. Um die Breite von NMR-Signalen zu beschreiben, zieht man die Halbwertsbreite $b_{1/2}$ heran. Da ideale NMR-Signale durch Lorentzlinien beschrieben werden, kann man $b_{1/2}$ auch beschreiben durch:

Formel 1.2-27

$$b_{1/2} = \frac{1}{\pi \cdot T_2^*}$$

Dabei ist T_2^* die *beobachtete* transversale Relaxationszeit, die sich zusammensetzt aus der tatsächlichen Relaxationszeit T_2 und Einflüssen aus Feldinhomogenitäten.

Für den Zusammenhang zwischen T_1 und T_2 gilt, dass T_2 niemals größer als T_1 sein kann: die Quermagnetisierung – durch T_2 beschrieben – kann bereits vollständig abgebaut sein, während sich die Magnetisierung in Feldrichtung – durch T_1 beschrieben – noch nicht vollständig wieder aufgebaut hat. Andererseits kann die Magnetisierung in Feldrichtung erst dann wieder maximal sein, wenn die Quermagnetisierung vollständig abgebaut ist.

1.2.3.6 Anzahl der Wiederholmessungen (Scans)

Das Signal-Rausch-Verhältnis kann auf zwei Arten verbessert werden. Entweder auf Kosten der Genauigkeit der Integrale wie in Kapitel 1.2.3.5 dargelegt. Für genaue quantitative Messungen ist das aber selbstverständlich kein geeigneter Weg. Die andere Möglichkeit, das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, ist eine größere Anzahl an Wiederholungsmessungen. Dabei gilt für das Signal-Rausch-Verhältnis nach n Wiederholungen $(S/N)_n$, (dabei gibt (S/N) das Signal-Rausch-Verhältnis nach einer einzigen Messung wieder):

Formel 1.2-28

$$(S/N)_n = \sqrt{n} \cdot (S/N)$$

Das bedeutet, mit zunehmender Anzahl an Wiederholungen kann das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert werden. Da die Verbesserung lediglich mit der Wurzel der Anzahl der Wiederholungen wächst, bringt eine Steigerung von 16 auf 64 Wiederholungen eine Verdopplung, eine Steigerung von 64 auf 112 (ebenfalls um 48 Wiederholungen) lediglich eine Verbesserung um den Faktor 1,32 bei der gleichen Verlängerung der Messzeit (bei einer Wiederholungszeit zwischen den Impulsen von 5 Sekunden wären dies 3 Minuten).

Die Konzentration des Analyten in der Messprobe kann in der Regel groß genug gewählt werden (im Bereich von 10^{-3} M, von der genauen Problemstellung abhängig), so dass 128 bis 256 Wiederholmessungen ein adäquates Signal-Rausch-Verhältnis liefern können.

1.2.3.7 Prozessieren der Spektren

Bei der Umrechnung der in der Zeitdomäne aufgenommenen Spektren (dem FID) in Spektren in der Frequenzdomäne durch die Fouriertransformation können verschiedenen Methoden angewandt werden, um die erhaltenen Spektren zu verbessern.

Das einfachste und üblichste ist die Anwendung von Fensterfunktionen („window function“) auf den FID, bevor dieser der Fouriertransformation unterworfen wird. Da mit der Zeit der FID auf Null abfällt und nur noch Rauschen detektiert wird, kann durch Anwendung einer *exponentiellen* Fensterfunktion – also einer Funktion, die dem normalen Abfall des FID entspricht – der Abfall bis auf die Nulllinie künstlich erzwungen werden. Solcherart vorbehandelte Spektren zeigen eine Verbesserung der *Empfindlichkeit*, da der Einfluss des Rauschens auf die Fouriertransformation minimiert wird [6]. Diese Verbesserung geht allerdings einher mit einer Verbreiterung der Signale und somit einer Verschlechterung der Auflösung. Bei den meisten NMR-Bearbeitungsprogrammen ist als Einflussgröße nicht der Exponent der Funktion anzugeben, sondern direkt der Faktor, um den die Signale verbreitert werden.

Eine Verbesserung der *Auflösung* kann erreicht werden durch die Anwendung einer Lorentz-Gauß-Transformation [18]. Durch die Umformung der üblichen Lorentz-Linienform der NMR-Signale in eine Gauß-Form werden diese schmaler und

eng beieinander liegende Signal können besser getrennt werden. Die Einflussgrößen auf diese Funktion sind das Maximum der Funktion (das in der Regel als Anteil an der gesamten Akquisitionszeit angegeben wird) und ein Faktor, der die Linienverbreiterung – entsprechend der exponentiellen Funktion – wiedergibt.

1.2.3.8 Integration der Resonanzsignale

Wie schon beschrieben, liegt der Schlüssel für quantitative NMR-Messungen darin, dass die Flächen unter den Resonanzsignalen der *Anzahl* der bei der entsprechenden Frequenz in Resonanz tretenden Atomkernen entspricht.

Aufgrund der Linienform der NMR-Signale, die eine Lorentz-Linie darstellen, ist es – um mindestens 99% der gesamten Signalintensität zu integrieren – nötig, einen Bereich von der 20fachen Größen der Halbwertsbreite des Signals in beide Richtungen zu integrieren [19].

1.2.3.8.1 ¹³C-Satelliten

Bei ¹H-Spektren können Probleme durch heteronukleare Wechselwirkungen entstehen. Genauso wie Wasserstoffatome (mit dem Kernspin $I=1/2$) miteinander koppeln, so koppeln diese auch mit ¹³C-Kernen (nicht aber mit ¹²C-Kernen, deren Kernspin $I=0$ ist). Aufgrund der Isotopenverteilung des Kohlenstoffs von 98,9% ¹²C und 1,1% ¹³C findet nur in 1,1% aller Moleküle eine solche Wechselwirkung statt. Durch diese Kopplung werden die ¹H-Signale in Triplets aufspalten. Die beiden zusätzlichen Signale werden als ¹³C-Satelliten bezeichnet (die Signalhöhe der beiden äußeren Signale beträgt 0,56% der Höhe des Hauptsignals, der Abstand der beiden zum Hauptsignal entspricht der $J(\text{H}, \text{C})$ -Kopplungskonstanten von 209 Hz (0.5 ppm in einem 400 MHz-Spektrum, siehe Abbildung 1.2-7). Für die quantitative Auswertung ist es nun wichtig, entweder bei *allen* miteinander zu vergleichenden Signalen die ¹³C-Satelliten mit zu

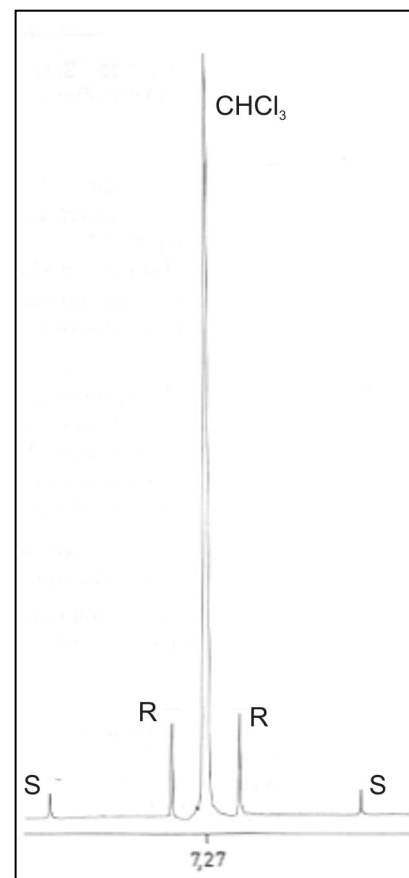


Abbildung 1.2-7: ¹H-NMR-Spektrum mit Rotationsseitenbanden (R) und ¹³C-Satelliten (S), aus [21].

berücksichtigen oder dies bei *allen* nicht zu tun.

Umgekehrt kann man auch die ^{13}C -Satelliten zur Quantifizierung von Verunreinigungen mit einem Anteil von weniger als 1% heranziehen. Die Größe entspricht aufgrund der natürlichen Häufigkeit der ^{13}C -Kerne stets 0,56% des Hauptsignals, so dass diese als Referenzsignale für Verunreinigungen in dieser Größenordnung genutzt werden können.

1.2.3.8.2 Rotationsseitenbanden

Ähnlich wie die ^{13}C -Satelliten die Intensität des Hauptsignals vermindern (sofern sie nicht mitintegriert werden), können Rotations-Seitenbanden dies tun. Rotations-Seitenbanden entstehen aufgrund der Rotation des Probenröhrchen (was zu einer im Mittel besseren Feldhomogenität in x- und y-Richtung führt) und haben einen Abstand entsprechend der Rotation des Röhrchen (beispielsweise 20 Hz, entsprechend 0,05 ppm in einem 400 MHz-Spektrum). Diese können leicht von ^{13}C -Satelliten unterschieden werden, lässt man das Probenröhrchen mit einer anderen Frequenz rotieren: der Abstand der Rotationsseitenbanden muss sich dann entsprechend der geänderten Frequenz geändert haben. Für gute Messungen dürfen solche Banden natürlich nicht vorhanden sein.

Gründe für die Entstehung von solchen Seitenbanden liegen zumeist in einer schlechten Feldkorrektur („Shim“) in x- und y-Richtung. Durch verbesserte Feldkorrektur können die Seitenbanden dann eliminiert werden. Ein anderer Grund zur Entstehung von solchen Seitenbanden kann in der Verwendung minderwertiger Probenröhrchen liegen. Um eine möglichst hohe Feldhomogenität über das gesamte Probenvolumen hinweg zu erhalten, müssen die Röhrchen perfekt gerade sein und über die gesamte Länge eine gleich bleibende Wanddicke besitzen. Es ist aus diesem Grund gefährlich, NMR-Probenröhrchen zum Trocknen in einen Becherglas in den Trockenschrank zu stellen, da bei diesem Prozess die Geradheit der Röhrchen leidet und diese für exakte Messungen unbrauchbar werden.

Bei modernen Spektrometern und wenn vor der Messung ausreichend Sorgfalt auf einen guten Shim gelegt wurde, kann und sollte auf die Rotation des Probenröhrchens verzichtet werden. Dadurch können die eben beschriebenen Einflussmöglichkeiten ausgeschlossen werden.

1.2.3.8.3 Phasenkorrektur

Die Referenzphase der Empfängerspule ist nicht exakt gleich der der Magnetisierungsvektoren. Dies führt zur Notwendigkeit, nach der Fouriertransformation eine Phasenkorrektur des Spektrums vorzunehmen. Hiermit wird erreicht, dass der üblicherweise dargestellte Realteil nach der Transformation ein reines Absorptionssignal zeigt. Wird die Phasenkorrektur nicht exakt durchgeführt, das heißt, das Signal ist kein reines Absorptionssignal, sind falsch integrierte Flächen die Folge. Eine sorgfältige Phasenkorrektur ist daher vor einer exakten quantitativen Auswertung nötig.

1.2.3.8.4 Basislinienkorrektur

Auch nach der Phasenkorrektur können noch Abweichungen in der Basislinie auftreten. Diese können nach der Fouriertransformation durch eine geeignete Basislinienkorrektur korrigiert werden. Im Normalfall wird hierzu eine polynomische Funktion zu dem Spektrum addiert und so die Basislinie ausgeglichen. Sollen zwei ähnlich große Signale integriert und miteinander verglichen werden, so führt eine globale Basislinienkorrektur über das gesamte Spektrum zum gewünschten Ziel. Bei sehr unterschiedlichen großen Signalen und nahe beieinander liegenden Signalen ist es besser, nur in dem Bereich, in dem die Signale liegen, die Basislinienkorrektur vorzunehmen. Sofern die zu vergleichenden Signale im Spektrum weit auseinander liegen, sollte darüber nachgedacht werden, in den beiden Bereichen getrennt voneinander eine Basislinienkorrektur vorzunehmen.

1.2.3.8.5 Korrektur der Integrale

Schließlich kann auch eine Korrektur der Integrale selbst vorgenommen werden, um Störungen (wie Schwankungen, Rauschen etc.) in der Basislinie *und* am Rand der Integrale (wie aufgelagerte Signale) zu korrigieren. Solche Fehler sind in einem nicht-geraden Auslaufen der Integralkurven zu erkennen. Mit den verschiedenen Korrekturfunktionen können diese ausgeglichen werden. Hierzu stellt die Software XWIN-NMR der Firma Bruker die Funktionen SLOPE und BIAS zur Verfügung. Mit der BIAS-Funktion wird eine Konstante zu dem Spektrum addiert, es wird also die Grundlinie in der Vertikalen beeinflusst. Mit der SLOPE-Funktion wird eine lineare Funktion zu dem Spektrum addiert, es wird also die Steigung beeinflusst [20].

Bei schlecht voneinander getrennten Signalen kann deren Trennung darüber hinaus durch eine als „deconvolution“ bekannte mathematische Operation verbessert werden, indem die überlappenden Signale in die Einzelsignale getrennt werden. Hierzu werden die experimentell erhaltenen Signale wahlweise der optimalen, theoretischen Linienform einer Lorentzlinie, der besser begrenzten Gaußlinie oder einer Mischung aus beiden angepasst [20]. So können kleine Signale neben großen Signalen besser integriert werden.

Bei einer Korrektur der Integrale besteht jedoch die große Gefahr, dass eine auf diese Weise erhaltene Integralfläche mehr dem gewünschten als dem tatsächlichen Wert entspricht. Diese muss zudem zumeist manuell ausgeführt werden, was den Einfluss des Benutzers stark vergrößert.

1.2.3.8.6 Besondere Probleme bei ^{13}C -Spektren

In Kapitel 1.2.3.5 wurde die Abhängigkeit der gemessenen Intensität von der Relaxationszeit der betreffenden Kerne beschrieben. Bei Wasserstoffkernen, deren T_1 -Relaxationszeit in der Regel (deutlich) unter einer Sekunde liegt, kann mit einer Pulswiederholungszeit von 5 bis 7 Sekunden von einer vollständigen Relaxation ausgegangen werden, so dass von *allen* Wasserstoffkernen stets die *maximale* Intensität gemessen werden kann.

Bei ^{13}C -Atomen liegen die T_1 -Zeiten jedoch deutlich höher, 10 bis 30 Sekunden sind normal, über 300 Sekunden bei quartären Kohlenstoffatomen möglich. Um auch hier eine vollständige Relaxation vor einem erneuten Impuls zu gewährleisten, wären Wartezeiten von bis zu 2,5 Minuten und mehr nötig, was zusammen mit einer üblichen Anzahl von Wiederholungsmessungen von mindestens 512 bis 1024 (die geringe natürliche Häufigkeit und das kleine magnetogyrische Verhältnis γ bedingen diese hohe Anzahl) zu einer Gesamtmessdauer von über 20 bis 40 Stunden führen würde. Beträgt die Dauer von Impuls zu Impuls nur wenige Sekunden (üblich bei Routinemessungen sind 1 bis 2 Sekunden), so sind die Kerne vor dem nächsten Impuls nur teilweise und je nach Kern unterschiedlich relaxiert. Die gemessenen Intensitäten sind somit für Kerne mit größeren T_1 -Zeiten relativ betrachtet kleiner als für die mit kürzeren T_1 -Zeiten.

Eine zusätzliche Komplikation tritt durch den Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect, NOE) auf: wird in den Frequenzbereich eines Kernes eingestrahlt, so erfolgt hierdurch eine Beeinflussung der Relaxation benachbarter Ker-

ne. Dies beeinflusst wie eben beschrieben die Signalintensität der betroffenen Kerne [21]. Zur Spektrenvereinfachung werden ^{13}C -Spektren „entkoppelt“ gemessen, d. h. die Kopplungen der ^{13}C -Kerne mit ^1H -Kernen werden eliminiert und die ^{13}C -Signale werden nicht aufgespalten und erscheinen als Singulets. Der dabei auftretende heteronukleare Kern-Overhauser-Effekt bewirkt deutliche Intensitätszunahmen. Dieser ist jedoch nicht für alle Kohlenstoffe gleich groß, für quartäre ist er fast gar nicht vorhanden. Um ^{13}C -Spektren dennoch quantitativ auswerten zu können, muss man durch geeignete Messbedingungen (z. B. Zugabe paramagnetischer Ionen oder spezielle Impulssequenzen) den NOE unterdrücken. In entkoppelten Spektren können nur gleiche Kohlenstoffe in Enantiomeren miteinander mit hinreichender Genauigkeit verglichen werden.

1.2.4 Diffusionskoeffizienten

Der wichtigste Transportmechanismus in Lösungen ist die freie Diffusion. Durch diese sind chemische Reaktionen überhaupt erst möglich, da Teilchen (Ionen, Moleküle) zuerst miteinander in Kontakt treten müssen, bevor sie miteinander reagieren können.

Die Größe der Diffusion hängt sehr eng mit der Teilchengröße zusammen. Beschrieben werden kann die Diffusion mit dem Diffusionskoeffizienten^a D , der nach der Stokes-Einstein-Gleichung bestimmt werden kann. Für sphärische Teilchen mit dem hydrodynamischen Radius („Stokes-Radius“) r_s lautet dieses:

Formel 1.2-29

$$D = \frac{R \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_s \cdot N_A}$$

Dabei ist R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität der Lösung, r_s der Stokes-Radius des betrachteten Teilchens und N_A die Avogadrozahl. Da Moleküle keine ideal kugelförmigen Teilchen sind, muss der Nenner in Formel 1.2-29 angepasst werden [22].

Zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten finden klassischerweise verschiedene Methoden Anwendung, beispielsweise die Kapillarmethode nach Andersen. Hier werden dünne, auf einer Seite geschlossene Kapillaren in eine größere Menge

^a Die Bezeichnung „Diffusionskonstante“ ist zwar auch gebräuchlich, aber nicht korrekt. Wie hier noch dargelegt werden wird, bestehen zahlreiche Einflussgrößen, so dass D keine stoffspezifische Konstante darstellt. Die Bezeichnung „Diffusionskoeffizient“ sollte daher gewählt werden.

Lösungsmittel eingebracht. Nach verschiedenen Zeiten wird dann die Restkonzentration in den Kapillaren bestimmt [23].

Auch die NMR-Spektroskopie kann zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten eingesetzt werden. Für diesen Einsatz existieren zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze: zum einen können Relaxationen zur Auswertung herangezogen werden und zum anderen können gepulste Feldgradienten („pulsed field gradients“, PFG) eingesetzt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Herangehensweise werden bei den beiden Methoden unterschiedliche Zeitskalen in Betracht gezogen. Bei der Betrachtung von Relaxationen können Bewegungen bzw. Veränderungen im Bereich von Pikosekunden bis Nanosekunden beobachtet werden. Dagegen können bei Anwendung von PFG solche im Millisekunden- bis Sekundenbereich beobachtet werden. Da sich Rotationsbewegungen in Bereich von 10^{-12} bis 10^{-9} Sekunden vollziehen, können mit der Relaxationsmethode diese beobachtet und daraus Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Die PFG-Methode beobachtet dagegen in einem Bereich, in dem sich translationale Bewegungen detektieren lassen [24].

1.2.4.1 Relaxationsmethode

Die Bestimmung von Diffusionsdaten über Relaxationsmechanismen wird üblicherweise nicht benutzt, daher soll hier nur äußerst kurz auf den theoretischen Hintergrund eingegangen werden.

Die Anwendbarkeit von Relaxationsdaten zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten beruht auf einem Zusammenhang zwischen D und der Korrelationszeit τ_c (auf den Zusammenhang zwischen τ_c und der Relaxation wurde bereits in Kapitel 1.2.1.3 hingewiesen). Aus Relaxationsexperimenten kann die Korrelationszeit bestimmt werden. Diese steht entsprechend der Debye-Gleichung in Zusammenhang mit der Viskosität der Lösung:

Formel 1.2-30

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r_s^3}{3kT}$$

Aus der mit den NMR-Experimenten bestimmten τ_c kann auf diese Weise die Viskosität η der Lösung berechnet werden. Mit dieser kann dann über die Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 1.2-29) D errechnet werden. Um diese Rechnungen berechtigterweise durchführen zu können, müssen einige Annahmen getroffen

werden. Nur wenn die betrachteten Moleküle ideal kugelförmig sind, kann eine einzige exakte Korrelationszeit angegeben werden. Außerdem muss, wie oben bereits erwähnt, der Stokes-Radius der betrachteten Moleküle bekannt sein, dessen Bestimmung nicht immer einfach ist.

1.2.4.2 Anwendung gepulster Feldgradienten (PFG)

Der Einsatz von PFGs in der NMR-Spektroskopie nimmt seit den 1990ern immer mehr zu und ermöglicht zahlreiche spezielle Messtechniken. Zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten sind auf dieser Methode beruhende Experimente heute Mittel der Wahl. Hierfür macht man sich einen Zusammenhang zwischen der Ortsveränderung der Moleküle und der Phasenänderung der NMR-Signale unter dem Einfluss von Feldgradienten zunutze.

Da es grundsätzlich möglich ist, Gradienten in alle drei Raumrichtungen anzulegen, können mit dieser Methode die Diffusionskoeffizienten in alle Raumrichtungen getrennt voneinander bestimmt werden. Im Folgenden soll nur der vereinfachte Fall, für einen Gradienten in z-Richtung, betrachtet werden.

1.2.4.2.1 Das grundlegende Stejskal-Tanner-Experiment

Die Grundlage für alle PFG-basierten Experimente zur Bestimmung von D wurde bereits 1965 von Stejskal und Tanner beschrieben [25].

Bei dieser Pulssequenz, die exakt als „PFG-spin-echo-Experiment“ zu bezeichnen ist, muss neben dem ^1H -Kanal, auf dem das Signal gemessen wird, auch der Gradientenkanal betrachtet werden. Außerdem sind zwei Zeitabstände, als δ und Δ bezeichnet, wichtig. Das zugehörige Schema ist in Abbildung 1.2-8 angegeben.

Diese Pulssequenz besteht aus einer Kombination des „normalen“ Spin-Echo-Experimentes mit zwei definierten Gradienten-Impulsen.

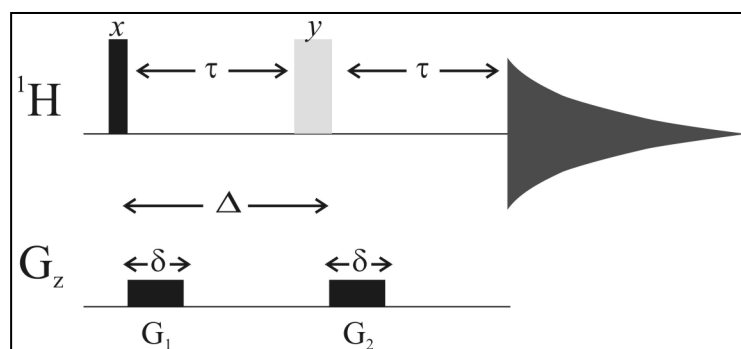


Abbildung 1.2-8: Die Pulssequenz des grundlegenden „Stejskal-Tanner-Experimentes“, für den ^1H - und den Gradientenkanal (für den Fall der Anwendung eines Gradienten in z-Richtung, G_z)

In der Zeitperiode τ nach dem 90° -x-Impuls können makroskopischen Magnetisierungsvektoren der Kerne in der xy-Ebene gegeneinander auffächern, entsprechend der Unterschiede ihrer Präzessionsfrequenzen. Die detektierbare Magnetisierung in der y-Richtung nimmt ab, man kann den üblichen FID detektieren. Der 180° -x-Impuls am Ende der Zeitperiode τ führt zu einer Spiegelung der Vektoren entlang der x' -Achse des rotierenden Koordinatensystems wobei die Drehrichtung der Vektoren in diesem gleich bleibt. Das heißt, die Vektoren, die vorher auseinander gelaufen sind, laufen jetzt aufeinander zu. In dieser Zeit nimmt die detektierbare Magnetisierung in y-Richtung zu, man kann einen gewissermaßen „inversen“ FID detektieren, der eben nicht abfällt sondern zunimmt. Nach einer Zeitperiode τ in gleicher Größe wie die erste ist der Unterschied zwischen den Vektoren wieder auf Null gefallen, alle Vektoren liegen nun exakt entlang der $-y'$ -Achse und das Signal ist maximal. Ab jetzt fächern die Vektoren wieder auf und es kann wiederum ein „normaler“ FID detektiert werden. Als „Spin-Echo“ wird das ansteigende Signal (der „inverse FID“) nach dem 180° -Impuls und der sich daran anschließende („normale“) FID bezeichnet.

Zu der eben erläuterten Impulsfolge des Spin-Echo-Experimentes kommen beim Stejskal-Tanner-Experiment Gradienten-Impulse hinzu. Unmittelbar nach dem 90° -x-Impuls wird ein erster Gradient der Stärke G_1 und der Dauer δ angelegt. Dieser führt zu einer „Markierung“ der Spins in Abhängigkeit von ihrer Position in z-Richtung. Durch den Gradienten in z-Richtung wird das lokale Magnetfeld geändert, und die Größe ist abhängig von der Position in z-Richtung. Das bedeutet, die Präzessionsfrequenz ist für die einzelnen Moleküle je nach Position etwas unterschiedlich. Während der Zeitperiode Δ diffundieren die Teilchen, die Moleküle frei durch die Lösung im NMR-Röhrchen. Der zweite Gradientenimpuls, in der gleichen Stärke wie der erste, ist daher für die einzelnen Moleküle *nicht* exakt gleich, da diese sich nunmehr an einer anderen Position in z-Richtung befinden als zuvor. Somit ergibt sich eine geringere Signalintensität als in einer unbeeinflussten Probe. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Signalintensität nach dieser Pulssequenz und der Stärke des angelegten Gradienten:

Formel 1.2-31

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\frac{\Delta - \delta}{3}\right)}$$

Dabei ist I_0 die unbeeinflusste Signalintensität, D der Diffusionskoeffizient, δ und Δ die Zeiten aus der Pulssequenz, g die Gradientenstärke und γ das gyromagnetische Verhältnis. Da sowohl die meisten Parameter für eine Messung gleich sind, kann man Formel 1.2-31 kurz fassen als:

Formel 1.2-32

$$I = I_0 \cdot e^{-D \cdot g^2 \cdot Q}$$

Man sieht, es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen $\ln(I/I_0)$ und der Gradientenstärke. Führt man nun eine Reihe von Experimenten mit unterschiedlicher Gradientenstärke aber ansonsten gleichen Parametern durch, so kann man den Diffusionskoeffizienten einer Substanz berechnen. Ein Beispiel für eine solche Messung ist in Abbildung 1.2-9 gezeigt.

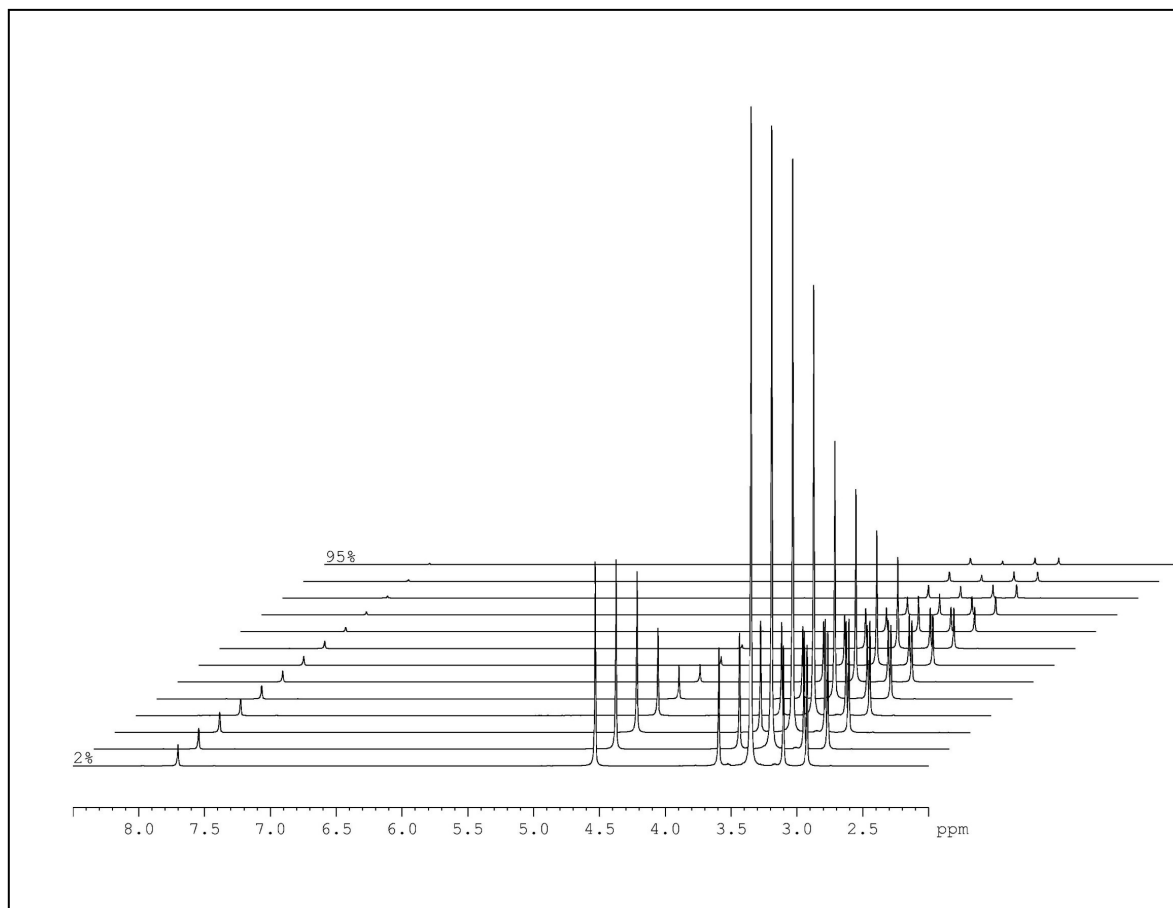


Abbildung 1.2-9: Einzelmessungen zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in einer Mischung aus Coffein und Ethylenglykol in D_2O . Die Gradientenstärke wurde in 16 Schritten linear von 2% auf 95% gesteigert (eigene Messungen).

Hier wurden die Diffusionskoeffizienten von Coffein und Ethylenglykol in Deuteriumoxid bestimmt. In der Abbildung sind die 16 Einzelspektren der Messung wiedergegeben. Für diese wurde die Gradientenstärke von 2% auf 95% der Maximalleistung in gleichen Schritten gesteigert. Wie man sieht, nimmt die Intensität der Signale gleichmäßig ab.

1.2.4.2.2 Modifizierte Impulssequenzen

1.2.4.2.2.1 *Stimulated Echo (STE)*

Bereits 1950 hat Hahn Pulssequenzen untersucht, die mehrere 90° -Impulse enthalten [26]. Dabei konnte er feststellen, dass nach eine Sequenz mit drei solchen Impulsen bis zu fünf Spin-Echos gemessen werden können. Für Diffusionsmessungen ist dabei das dritte Echo, das so genannte „stimulated echo“ von besonderer Bedeutung.

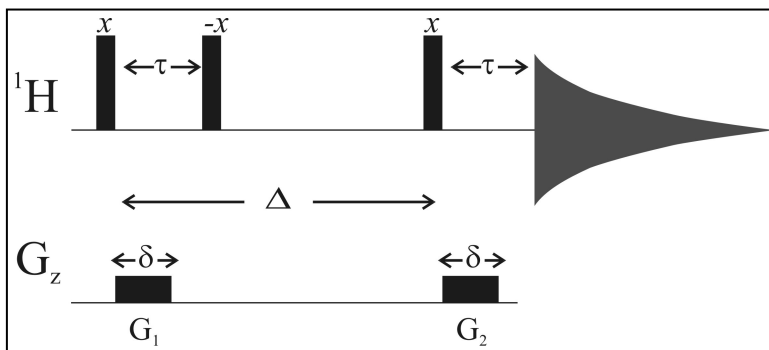


Abbildung 1.2-10: Die Pulssequenz für Diffusionsmessungen unter Anwendung des „stimulated-echo“-Experiments, für den ^1H - und den Gradienten-Kanal (für den Fall der Anwendung eines Gradienten in z-Richtung, G_z)

Die daraus abgeleitete Sequenz zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten hat einen entscheidenden Vorteil. Zu der oben beschriebenen Signalabschwächung durch Diffusion kommt natürlich auch die Abschwächung aufgrund von Relaxationsprozessen. Während bei der grundlegenden Stejskal-Tanner-Sequenz die makroskopische Magnetisierung in der xy-Ebene liegt, und somit nach T_2 relaxiert, liegt diese wegen des zweiten 90° -Impulses bei der STE-Sequenz in z-Richtung, relaxiert also nach T_1 (vgl. Kapitel 1.2.3.5). Je nach den Verhältnissen der beiden Relaxationskonstanten zueinander und dem Abstand des zweiten und dritten 90° -Impulses beim STE zu der T_1 -Relaxationskonstante können so Signalverstärkungen um einen Faktor von bis zu 200 gegenüber dem einfachen Experiment erreicht werden.

1.2.4.2.2.2 LED-Sequenzen

Ein Nachteil der PFGs ist, dass diese so genannte „Eddy-Ströme“ in dem Metall von Probenkopf und Magnet induzieren können. Diese rufen Magnetfelder hervor, die wiederum deutlich das Messergebnis stören können. Eine Möglichkeit, diese zu vermindern, ist der Einsatz von aktiv abgeschirmten Gradienten. Eine andere liegt in der Anwendung spezieller Pulssequenzen. Die als „longitudinal eddy current delay“, kurz als LED bezeichneten Sequenzen sind dazu in der Lage.

1.2.4.2.3 Berechnungsmethoden

1.2.4.2.3.1 Diffusion-ordered Spectroscopy (DOSY)

Unter DOSY versteht man eine Darstellung der Ergebnisse der NMR-Messungen in einer zweidimensionalen Grafik mit der chemischen Verschiebung entlang der x-Achse und den Diffusionskoeffizienten entlang der y-Achse. Dies ist gerade bei Mischungen verschiedener Substanzen interessant, da Signale der gleichen Substanz auch den gleichen Diffusionskoeffizienten besitzen. Mithilfe von DOSY kann also die Signale von Mischungen verschiedener Substanzen auftrennen und man kann dann die so getrennten Spektren weiter betrachten [27].

Die besondere Herausforderung hierin ist, dass die beobachteten Signalabschwächungen zu den verschiedenen Substanzen gehören. Es existiert eine Reihe verschiedener mathematischer Modelle, die in der Lage sind, aus den diskreten Werten der Abnahme der Signalintensität die DOSY-Grafiken zu berechnen. Zugrunde liegt die Tatsache, dass das gewünschte Spektrum die inverse Laplace-Transformation (ILT) der Funktion der Signalabnahme ist. Zu den Methoden gehört beispielsweise der „Levenberg-Marquardt-Algorithmus“, eine nicht-lineare „least squares“-Methode oder Maximum-Entropie-Methoden [28]. Eine ausführliche Betrachtung der mathematischen Hintergründe würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen. Ein Beispiel einer solchen Darstellung ist in Abbildung 1.2-11 zu sehen. Grundlage hierfür sind die bereits in Abbildung 1.2-9 dargestellten Messungen. In dieser Abbildung kann man sehr deutlich die getrennten Signale von Coffein (bei einem $\log(D)$ -Wert von etwa $-9,3^a$) und Ethylenglykol ($\log(D)$ -Wert et-

^a Eine genaue Bestimmung der Diffusionskoeffizienten ist in dieser Darstellung nicht möglich, da die Auflösung in der Regel zu ungenau ist. Daher können nur ungefähre Werte angegeben werden.

wa -9,0) sehen. Außerdem sieht man das Signal des Lösemittelrestsignals (log(D)-Wert etwa -8,75).

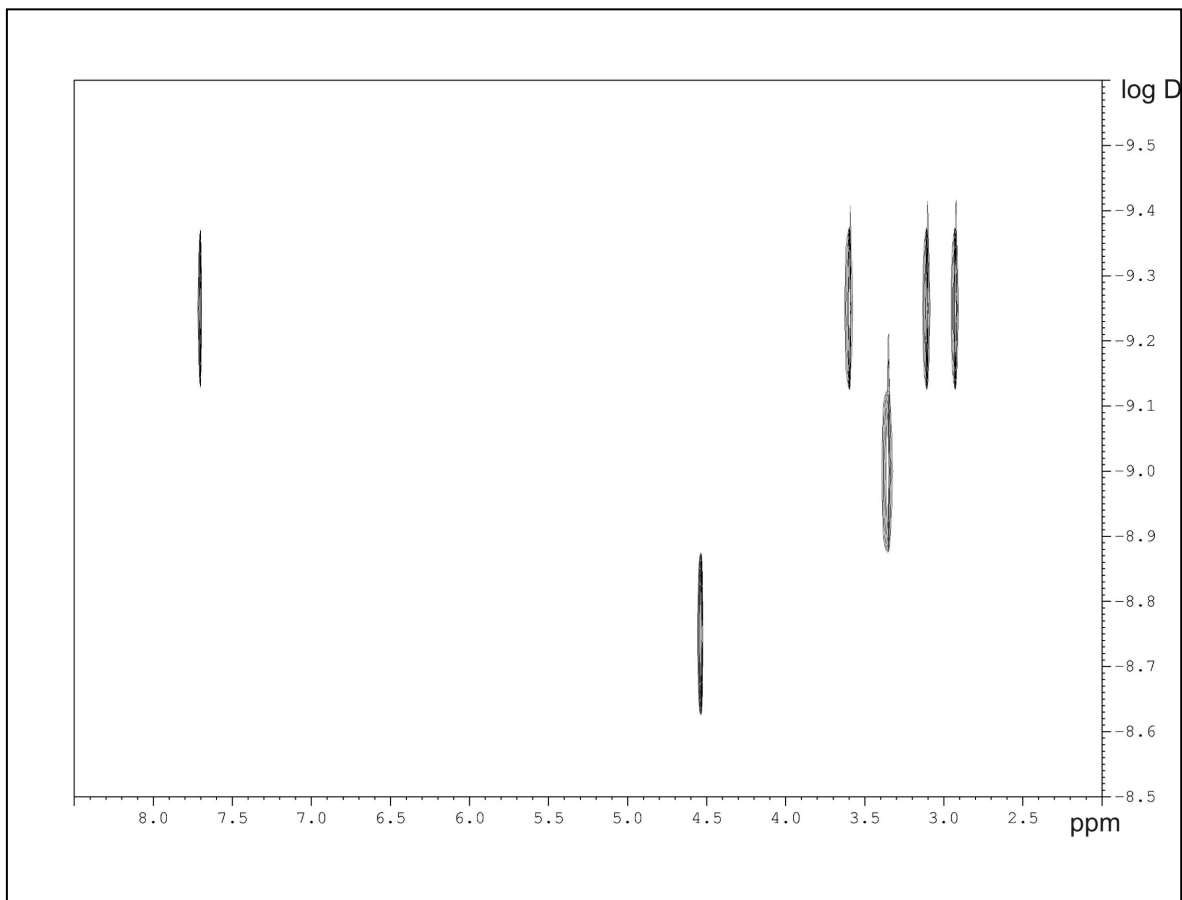


Abbildung 1.2-11: DOSY-Darstellung der in Abbildung 1.2-9 gezeigten Messungen. Auf der x-Achse ist die chemische Verschiebung in ppm, auf der y-Achse der Logarithmus des Diffusionskoeffizienten aufgetragen.

1.2.4.2.3.2 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten für einzelne Signale

Neben der Berechnung der DOSY-Diagramme ist es auch möglich für einzelne Signale gezielt den zugehörigen Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Hier sind die mathematischen Methoden einfacher, da unmittelbar auf den in Formel 1.2-32 angegebenen Zusammenhang zurückgegriffen werden kann. Eine Zuordnung der berechneten Diffusionskoeffizienten zu den einzelnen Substanzen ist für die Berechnung nicht nötig, da für jedes einzelne Signal der zugehörige Diffusionskoeffizient berechnet wird. Diese Vorgehensweise ist zum einen nötig, wenn Mischungen aus vielen Komponenten^a besteht. Zum anderen werden bei dieser Methode exakte Diffusionskoeffizienten erhalten. Als Beispiel ist dafür in Tabelle 1.2-2 die

^a Die Software XWIN-NMR limitiert die Auswertung über DOSY auf 3 Substanzen

Berechnung für die schon früher erwähnte Mischung aus Coffein und Ethylenglykol in Deuteriumoxid gezeigt.

Tabelle 1.2-2: Ergebnisse der direkten Berechnung von Diffusionskoeffizienten für die einzelnen Signale aus Abbildung 1.2-9

δ in ppm	Diffusionskoeffizient [m^2/s]	$\log(D)$	Zuordnung
7,7	$5,01 \cdot 10^{-10}$	-9,30025	Coffein
4,5	$1,84 \cdot 10^{-9}$	-8,73636	Wasser
3,6	$5,02 \cdot 10^{-10}$	-9,29956	Coffein
3,3	$9,21 \cdot 10^{-10}$	-9,03555	Glykol
3,1	$5,05 \cdot 10^{-10}$	-9,29697	Coffein
2,9	$5,04 \cdot 10^{-10}$	-9,29766	Coffein

Die Zuordnung zu den verschiedenen Komponenten der Mischung muss ggf. im Nachhinein von dem Benutzer selbst durchgeführt werden. Bei bekannten Mischungen, bei denen die chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale der einzelnen Komponenten bekannt sind, ist dies in der Regel sehr leicht. Bei der Untersuchung von unbekanntem Gemischen müssen die erhaltenen Diffusionskoeffizienten aufgrund von Ähnlichkeiten ihrer Diffusionskoeffizienten zugeordnet werden.

1.3 Ziel der Arbeit

Die NMR-Spektroskopie hat sich seit ihrer Entdeckung zu einer der wichtigsten – wenn nicht der wichtigsten – spektroskopischen Methode in der organischen Chemie entwickelt. Mithilfe der NMR-Spektroskopie gelang und gelingt die Struktur- aufklärung unzähliger Naturstoffe wie auch synthetischer Substanzen. Ihre Anwendung zur Reaktionskontrolle und somit zur Überprüfung der Identität ist in synthetischen Labors Routine.

Nur selten wird die NMR-Spektroskopie jedoch als analytische quantifizierende Messmethode eingesetzt. Mit dieser Arbeit sollen Anwendungsmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie aufgezeigt werden, die eben dies ermöglichen. So ist es bei geeigneten Substanzen möglich, quantitative Aussagen zur Isomerenzusammensetzung zu treffen. Es wird anhand der Isomerenzusammensetzung von Fluvoxamin gezeigt, dass dabei auch mit dieser Methode Verunreinigungen mit den Grenzen limitiert werden können, wie dies auch bei den anderen üblichen chromatographischen Methoden möglich ist. Allerdings in einer aufgrund geringen Aufwandes bei der System- und Probenvorbereitung deutlich kürzeren Zeit. Auch über das Ausmaß des Abbaus und über den Gehalt an Verunreinigungen können Aussagen getroffen werden. Ein Beispiel dafür ist der Abbau von Perphenazin- enantat durch Esterhydrolyse oder des Phenothiazingerüsts dieses Stoffes durch Oxidation.

Darüber hinaus wird anhand des Antibiotikums Gentamicinsulfat aufgezeigt, dass die NMR-Spektroskopie eine geeignete Methode ist, auch generell über die Reinheit von Arzneistoffen Aussagen zu treffen. Es wird an diesem Beispiel dargelegt, dass die NMR-Spektroskopie und die Kapillarelektrophorese zwei orthogonale und sich damit gegenseitig bestätigende Methoden darstellen, die in einem komplexen Fall – wie bei der Reinheitsüberprüfung eines biotechnologisch hergestellten Antibiotikums, das durch (bewusste oder unbewusste) Verschleierung der Herkunft zusätzliche Schwierigkeiten erzeugt – ideale Instrumente zur Reinheitsanalytik darstellen. Diese beiden Methoden sind in einem solchen Fall sehr gut geeignet, die Verunreinigungsprofile von Arzneistoffen zu beschreiben und so können auch Aussagen über die tatsächliche Quelle eines solchen Stoffes getroffen werden.

Darüber hinaus wird eine eher ungewöhnliche Anwendung der NMR-Spektroskopie, die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten auf ihre Leistungsfähigkeit hin untersucht, Interaktionen von Arzneistoffen (Antibiotika) mit Erregerzellen zu zeigen. Daraus kann sich eine Möglichkeit zu einer schnellen Abschätzung der potentiell antibiotischen Wirksamkeit eines Antiinfektivums entwickeln.

Schließlich wird eine Anwendung der NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Komplexe zwischen Cyclodextrinen und kleinen Peptiden gezeigt. Die besondere Herausforderung hierbei lag in der Vorgabe, dass diese Untersuchungen im wässrigen Medium bei bestimmten pH-Werten durchgeführt werden sollten.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Quantitative Bestimmungen

2.1.1 Fluvoxamin

2.1.1.1 Pharmakologie

Fluvoxamin ist ein Antidepressivum mit dem Grundgerüst eines Oximethers von Arylketonen. Der IUPAC-Name lautet (*E*)-5-Methoxy-4'-(trifluoromethyl)valerophenon-*O*-(2-aminoethyl)oxim. Im pharmazeutischen Gebrauch ist das Maleinsäure-Salz des *E*-Isomers, das *Z*-Isomer ist eine mögliche Verunreinigung.

In Abbildung 2.1-1 ist die Strukturformel gezeigt, die Nummerierung entspricht der künftig in dieser Arbeit verwendeten.

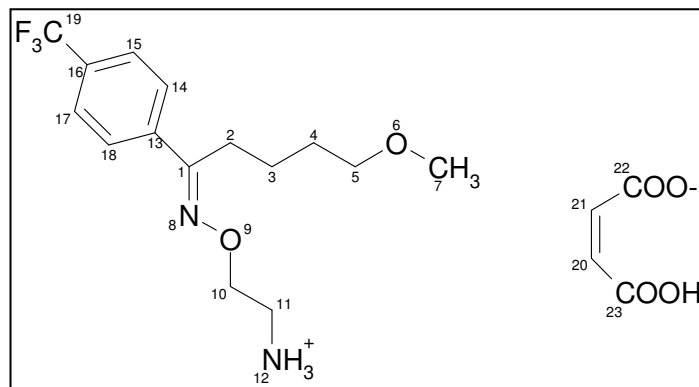


Abbildung 2.1-1: Strukturformal von *E*-Fluvoxamin, als Maleat, wie es pharmazeutisch im Gebrauch ist. Die Summenformel lautet $C_{15}H_{21}F_3N_2O_2 \cdot C_4H_4O_4$, die molekulare Masse beträgt 434,4.

Fluvoxamin ist offizinell in der British Pharmacopeia 1998 [29] als Fluvoxamin-Maleat, wobei die Bezeichnung „Fluvoxamin-

Hydrogenmaleat“ die Protonierungsverhältnisse besser wiedergäbe. Zur Übernahme dieser Monographie in das Europäische Arzneibuch wurde in Pharmeuropa [30] ein Monographieentwurf veröffentlicht. Im aktuell gültigen Europäischen Arzneibuch ist noch keine entsprechende Monographie aufgenommen worden.

Die antidepressive Wirkung von Pharmaka beruht auf der Hemmung der neuronalen Wiederaufnahme von Serotonin und/oder Noradrenalin. Durch diese Hemmung wird die noradrenerge bzw. die serotonerge synaptische Übertragung verstärkt. Dieser bekannte Wirkmechanismus und die Beobachtung, dass bei Behandlung von Hypertonie mit Reserpin – was die Aufnahmen von Noradrenalin, Serotonin und Dopamin in die Speichervesikel hemmt – depressive Symptome als Nebenwirkung ausgebildet werden können, sind die wichtigsten Stützen für die *Monoaminmangel-Hypothese der Depression*. Klassische Antidepressiva sind die

tricyclischen Antidepressiva (TCAs), zu denen beispielsweise Imipramin und Amitriptylin gehören. Diese hemmen relativ unselektiv sowohl die Wiederaufnahme von Noradrenalin als auch die von Serotonin. Während dieser Effekt sofort eintritt, tritt die antidepressive Wirkung erst binnen zwei Wochen ein. Daher wird angenommen, dass depressiven Erkrankungen zwar ein Mangel an den genannten Monoaminen zugrunde liegt, dieser aber zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit synaptischer Rezeptoren für diese Monoamine führt. Durch Gabe von Antidepressiva kann diese gestörte Neurotransmission wieder normalisiert werden [31].

Pharmakologisch gehört Fluvoxamin im Gegensatz zu den klassischen, trizyklischen Antidepressiva zu den „atypischen“ Antidepressiva [32]. Als ein Vertreter der selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI) hemmt es gezielt die neuronale Wiederaufnahme von Serotonin im ZNS [33]. Dabei besitzen die SSRIs nicht die bei den klassischen Antidepressiva stets mehr oder weniger stark ausgeprägten extrapyramidalen Nebenwirkungen. Seit der Einführung der SSRIs in die antidepressive Therapie wurden diese zunehmend zu den Arzneimitteln der ersten Wahl. Dies liegt an der besseren Verträglichkeit der SSRIs im Vergleich zu den Trizyklika. In einer im Jahr 2000 veröffentlichten Metaanalyse [34] von 102 Studien wird nachgewiesen, dass hinsichtlich der Effektivität kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen antidepressiver Wirkstoffe besteht. Jedoch besteht ein signifikanter Unterschied in der Zahl der Behandlungsunterbrechungen zugunsten der SSRIs insgesamt:

„The difference in overall discontinuation rate appears to be entirely accounted due to the side effects, suggesting that SSRIs are better tolerated.”

Jedoch gilt dieser Vorteil nicht für alle SSRIs. Gerade Fluvoxamin fällt aus diesem allgemeinen Vorteil etwas heraus:

„The overall tolerability advantage does not appear equally true for all SSRIs. Fluvoxamine did not demonstrate a significant improvement in overall drop outs or in those due to side effects compared with the TCAs.”

Insgesamt ist Fluvoxamin wie andere etablierte Antidepressiva jedoch ein gutes Instrument zur Therapie der Depression [35].

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet von Fluvoxamin ist die Therapie von Angststörungen bei Kindern und Jugendlichen sowie bei Erwachsenen. Hierzu hat sich bei Heranwachsenden gezeigt, dass Fluvoxamin nicht nur gut vertragen wird, sondern auch bei den Indikationen Zwangsneurosen und Angststörungen (wie Trennungsangst, Sozialphobien und generalisierte Angststörung) gut Behandlungser-

folge zeigt [36,37]. Auch bei Erwachsenen zeigt Fluvoxamin gute Erfolge in der Behandlung verschiedener Sozialphobien, posttraumatischem Stress und verschiedener Zwangsneurosen [38,39,40,41,42].

2.1.1.2 Synthese

Die ursprüngliche Fluvoxamin-Synthese wurde 1975 in den Niederlanden [43] und 1978 in den USA [44] zum Patent angemeldet. In diesen wird ein allgemeiner Syntheseweg zur Darstellung von „Oximethern mit antidepressiver Wirkung“ geschützt. Die allgemeine Struktur dieser Verbindungen ist in Abbildung 2.1-2 gezeigt.

In den Patenten werden verschiedene Synthesewege beschrieben, zwei mögliche Wege sind in Abbildung 2.1-3 gezeigt.

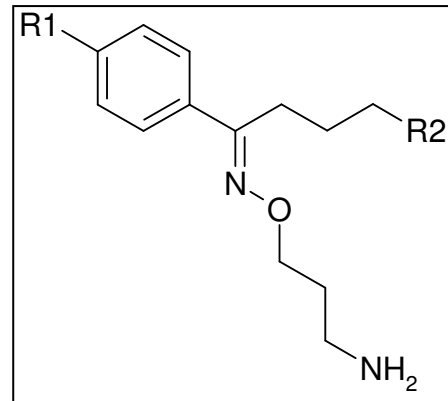


Abbildung 2.1-2: Allgemeine Struktur der antidepressiv wirkenden Oximether aus den genannten Patenten

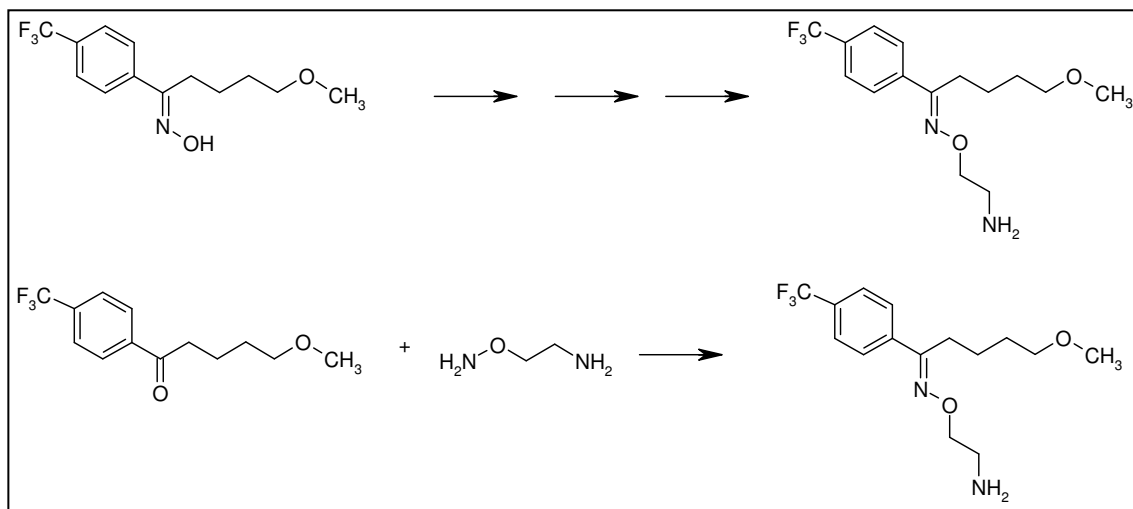


Abbildung 2.1-3: Möglicher Syntheseweg von Fluvoxamin.

Für den in Abbildung 2.1-3 oben gezeigten Weg gibt es verschiedene Synthesestrategien, um von dem Oxim zum Oximether Fluvoxamin zu gelangen. Die Isomerenreinheit des Fluvoxamins ist dabei stets abhängig von der Qualität des eingesetzten Oxims. Bei dem unten gezeigten Weg, bei dem das entsprechende Keton eingesetzt wird, ist die Reinheit des *E*-Fluvoxamins abhängig von den Synthesbedingungen und deren Aufarbeitung.

2.1.1.3 Quantifizierung der Isomere

Egal welcher Syntheseweg gewählt wird, es wird immer ein kleiner Anteil des entsprechenden Z-Isomers auftreten. Da die Wirksamkeit bei dem E-Isomer liegt, begrenzen die Arzneibücher den Anteil des „falschen“ Isomers.

2.1.1.3.1 Überblick über vorhandene Methoden

In einem 2002 in Pharmedien veröffentlichtem Entwurf für eine Fluvoxamin-Monographie [30] wird eine HPLC-Methode zur Reinheitskontrolle verwandter Substanzen vorgeschlagen, wie sie bereits in der BP 1998 [29] veröffentlicht war. Die Grenze für das Z-Isomer wurde allerdings von 0,5 % auf 0,2 % gesenkt.

In beiden Monographien wird eine Ionenpaarchromatographie vorgeschrieben. Das Fließmittel besteht aus einer Lösung von Ammoniumphosphat und Natriumheptansulfonatmonohydrat in Wasser (pH 3,5) und Methanol im Verhältnis 2:3. Als Säulenmaterial wird Octylsilyl-Kieselgel (5µm) vorgeschrieben. Die Testlösung hat eine Konzentration von 1,4 mg/ml, die Referenzlösung eine von 0,0028 mg/ml. Das Chromatogramm wird spektrophotometrisch bei der Wellenlänge 254 nm detektiert. Die Fläche für das Z-Isomer darf in der Testlösung maximal die Größe des Hauptpeaks in der Referenzlösung (also 0,2 %) betragen. In der BP-Monographie wird die Größe der Fläche für das Z-Isomer auf die 1,25fache Größe beschränkt (entsprechend 0,25 %) und es wurde ein relativer Responsfaktor von 0,5 unterstellt (also 0,5 % als Grenze). Außerdem war eine Auflösung von lediglich 1,0 gefordert. Diese Methode leidet jedoch an allgemeinen Problemen ionenpaarchromatographischer Trennungen, wie z. B. mangelnder Robustheit.

Eine Bestimmungsmethode der Isomere nebeneinander mittels mizellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) wurde von Hilhorst veröffentlicht [45]. Die Detektion war auch hier photometrisch, mit einem Diodenarray-Detektor. Es werden zwei Varianten der Trennung beschrieben. In der einen anionischen Variante dient 50 mM Natriumdodecylsulfat (SDS) als Mizellbildner in einer wässrigen Lösung (pH 9,3) mit 10 % Acetonitril. In der anderen kationischen Variante dient Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) 10 mM als Mizellbildner in einer wässrigen Lösung (pH 7,0) mit 10 % Acetonitril. In beiden Varianten konnten von Fluvoxamin das Keton und das Additionsprodukt abgetrennt werden. Die Trennung der beiden Fluvoxamin-Isomere gelang in der SDS-Variante jedoch nur mit einem hohen Zusatz eines organischen Modifiers (Methanol oder Acetonitril) während bei der

CTAB-Variante die beiden Isomere bereits ohne Modifier perfekt voneinander getrennt werden konnten. Die anionische Variante war auch Grundlage für eine Studie zur mathematischen Optimierung der Trennbedingungen [46].

Eine weitere Methode, und zwar die Elektrochromatographie, wurde ebenfalls von Hilhorst [47] veröffentlicht. Diese Trennung wurde an einer mit octadecyliertem Kieselgel gepackten Säule durchgeführt. Als mobile Phase diente eine Mischung eines Phosphatpuffers (pH 7) mit Acetonitril (3:2) unter Zusatz von Hexylamin (6 mM). Auf diese Weise konnten 0,1 % Z-Isomer in einer Lösung der Gesamtkonzentration von 5 mg/ml nachgewiesen werden. Validierungsdaten wurden jedoch nicht mitgeliefert.

Im Rahmen von Metabolisierungsstudien [48] wurde nicht nur ^{14}C -radioaktiv markiertes Fluvoxamin genutzt, sondern ebenfalls unmarkiertes Fluvoxamin gaschromatographisch bestimmt. Im Rahmen ähnlicher Untersuchungen wurden ^1H -NMR- sowie der Massen-Spektren von Fluvoxamin und Metaboliten veröffentlicht [49]. Die ^1H -NMR-Spektren wurden hierbei auf einem Bruker WP 200-Spektrometer in Methanol- d_4 vermessen. Als Referenz diente das Lösemittel-Restsignal.

Aufgrund dieser Vorarbeiten sollte auch für die Bestimmung des Isomerenverhältnisses mittels der NMR-Spektroskopie Methanol- d_4 als Lösungsmittel verwendet werden.

2.1.1.3.2 Ergebnisse der NMR-Messungen

2.1.1.3.2.1 Spektrenzuordnung

Um mit die Spektren quantitativ auszuwerten, ist es sinnvoll, vorher *alle* Signale der zu untersuchenden Stoffe den jeweiligen Atomen bzw. Atomgruppen zuzuordnen. In den Abbildung 2.1-5 bis Abbildung 2.1-7 sind die ^1H - und ^{13}C -Spektren der untersuchten Fluvoxamin-Isomere gezeigt. Referenzierung in allen Spektren erfolgte auf das Lösemittelrestsignal von Methanol- d_4 bei 3.31 ppm (in den ^1H -NMR-Spektren) bzw. bei 49.00 ppm (in den ^{13}C -NMR-Spektren). Da einerseits reines *E*-Fluvoxamin*maleat* und andererseits ein 1:1-Gemisch aus *E*- und *Z*-Fluvoxamin*fumarat* zur Verfügung standen, unterscheiden sich die Signale der Gegenionen in den Spektren. Die Signale des *Z*-Isomers können in den Spektren der Mischung durch einfachen Vergleich mit den Spektren des reinen *E*-Isomers bestimmt werden.

In Abbildung 2.1-4 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des *E*-Isomers gezeigt. Leicht zu erkennen sind die Signale der aromatischen Wasserstoffe als AA'XX'-System mit zwei Dubletts bei $\delta=7.7$ ppm und 7.9 ppm. Die Methoxygruppe (Pos. 7, vgl. Abbildung 2.1-1) erscheint erwartungsgemäß als Singulett bei $\delta=3.32$ ppm, ist jedoch überlagert von den Signalen der Methylengruppe an Position 11 und dem Lösungsmittelrestsignal. Die Wasserstoffe der Methylengruppe an Position 10 erscheinen als Triplett bei $\delta=4.42$ ppm. Die Methylengruppe an Position 2 zeigt ein Triplett bei $\delta=2.90$ ppm und die vier Wasserstoffe an Position 3 und 4 erscheinen als ein un aufgelöstes Multiplett zwischen 1.55 ppm und 1.69 ppm. Die Protonen an Position 5 erscheinen bei $\delta=3.35$ ppm als Triplett.

In der Mischung der beiden Isomere erscheinen zusätzliche Signale, die den jeweiligen Protonen des *Z*-Isomers zuzuordnen sind. Gerade die Protonen, die nahe bei der Oximgruppe liegen sowie die aromatischen Protonen, erscheinen deutlich verschoben. So wird das Triplett der Protonen an Position 10 hochfeldverschoben zu 4.23 ppm und das der Protonen an Position 2 zu 2.62 ppm (siehe Abbildung 2.1-4). Außerdem erscheint natürlich das Signal des Gegenions (Fumarat) bei 6.68 ppm statt bei 6.26 ppm (Maleat).

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (siehe Abbildung 2.1-6) des *E*-Fluvoxaminmaleats können die Signale des Aromaten bei 140.19 ppm (C13), 128.19 ppm (C14 und C18), 126.50 ppm (C15 und C16, als Quartett mit einer $^3\text{J}(\text{C},\text{F})$ -Kopplungskonstanten von 3.82 Hz aufgrund der Kopplung mit der Trifluormethylgruppe an C16) sowie 132.17 ppm (C16, ebenfalls als Quartett aufgrund der C-F-Kopplung, mit $J=32$ Hz) gefunden werden. Wie auch bei den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren gibt es beim Vergleich der ^{13}C -Spektren der Isomere bei Atomen, die sich nahe an der Oximgruppe befinden, besonders deutliche Veränderungen der chemischen Verschiebung aus. So sieht man das Signal von C2 um 8.88 ppm tieffeldverschoben bei 35.86 ppm, das der aromatischen Kerne C14 und C18 um 1.56 ppm tieffeldverschoben bei 129.75 ppm und das von C13 um 1.3 ppm tieffeldverschoben bei 138.89 ppm. Zusammenge stellt sind die Zuordnungen der Signale in Tabelle 2.1-1.

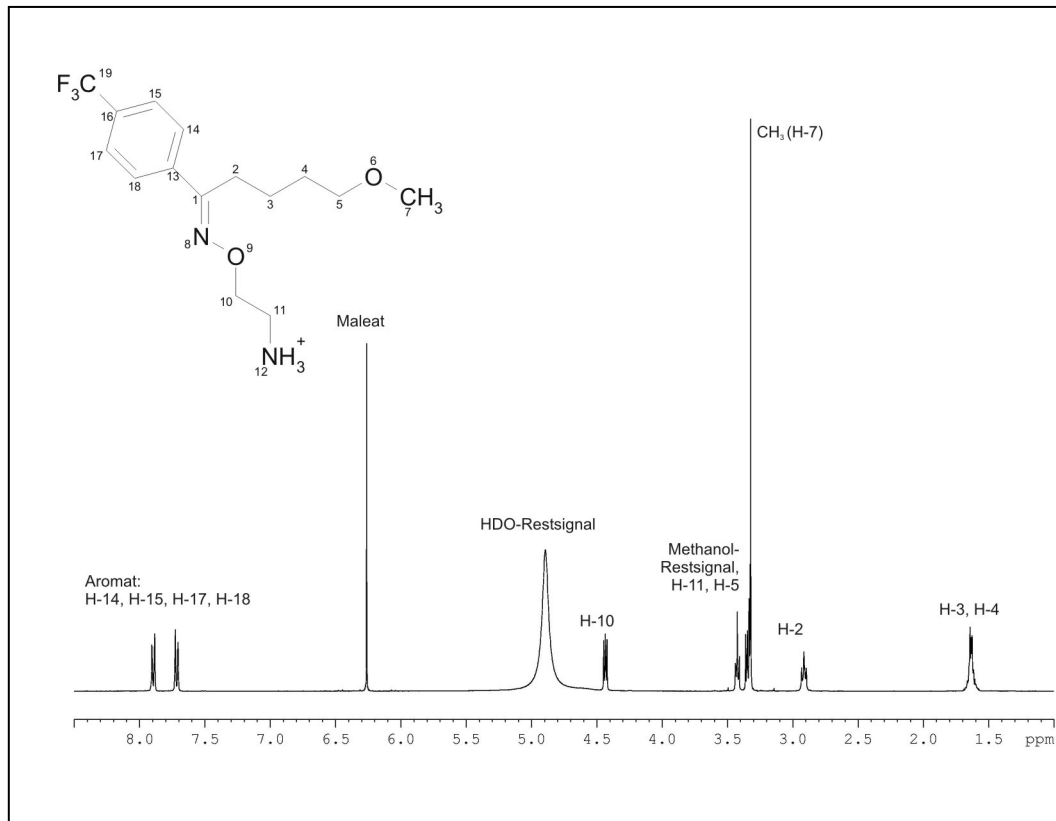


Abbildung 2.1-4: 400 MHz-¹H-NMR-Spektrum von *E*-Fluvoxamin, gemessen in CD₃OD, (14,0 mg/ml)

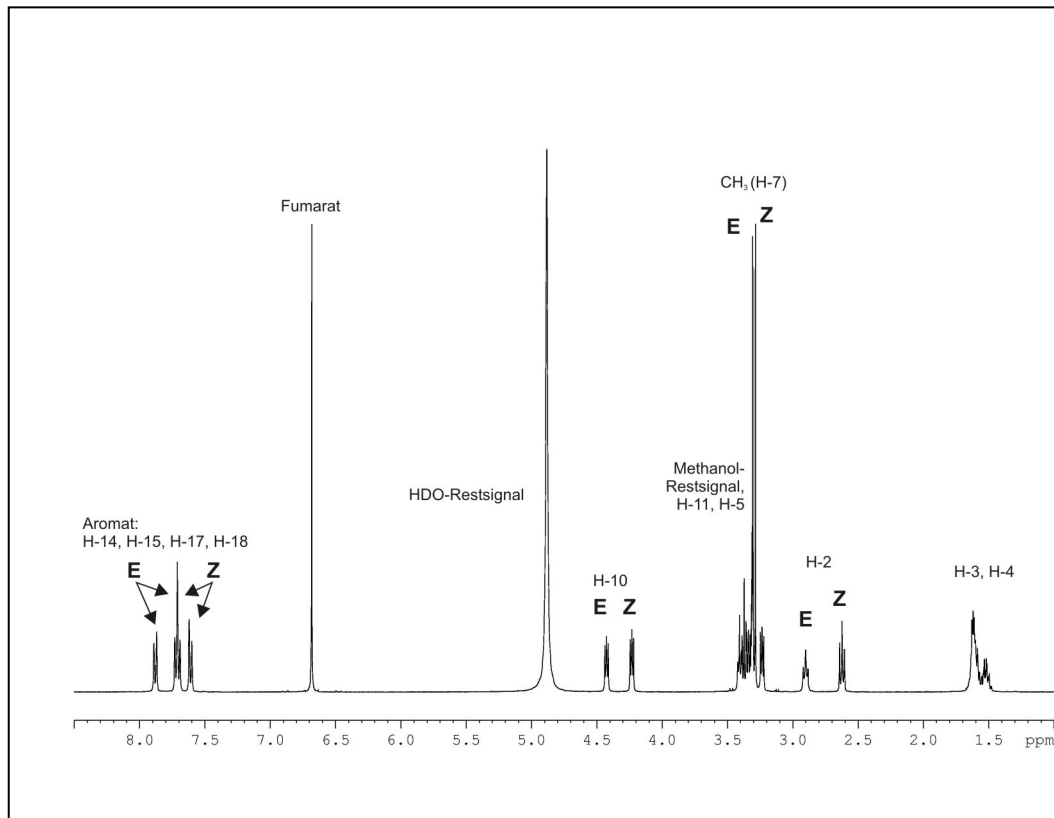


Abbildung 2.1-5: 400 MHz-¹H-NMR-Spektrum eines Gemisches von *E*-Fluvoxamin und -*Z*-Fluvoxamin, gemessen in CD₃OD (15,5 mg/ml)

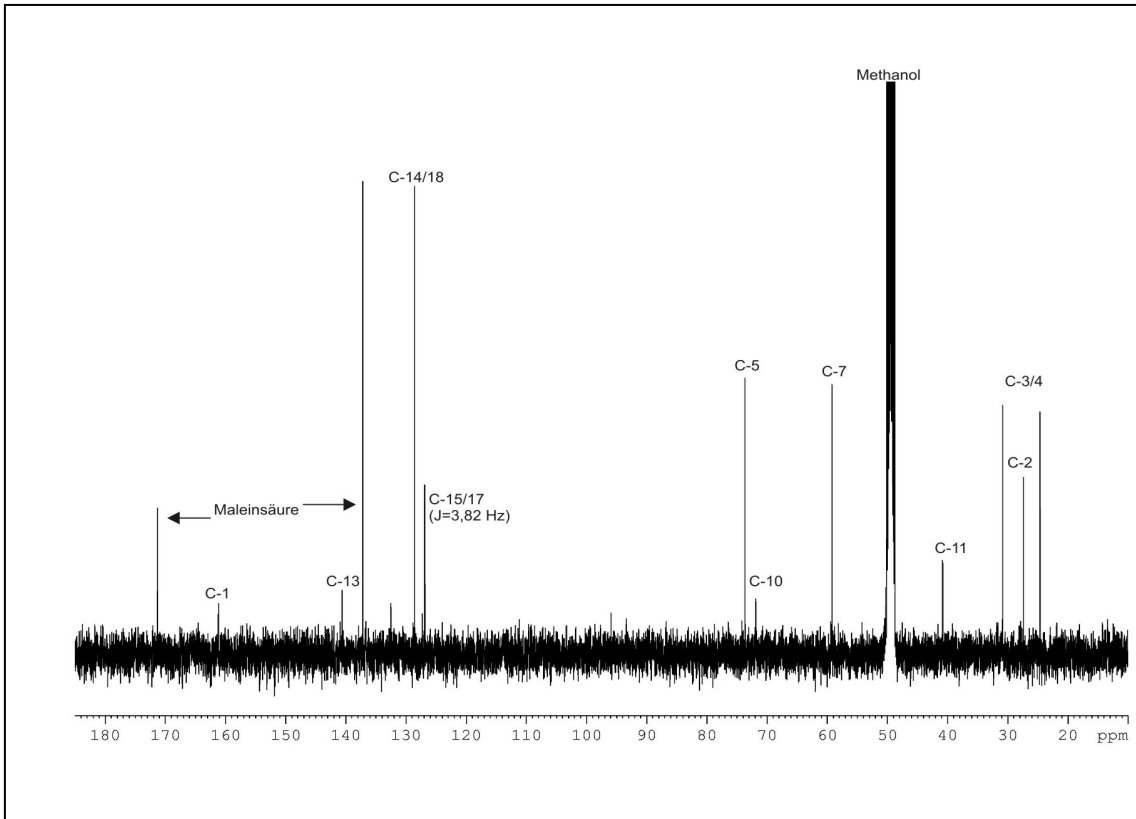


Abbildung 2.1-6: 100 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum von *E*-Fluvoxamin, gemessen in CD_3OD (14,0 mg/ml)

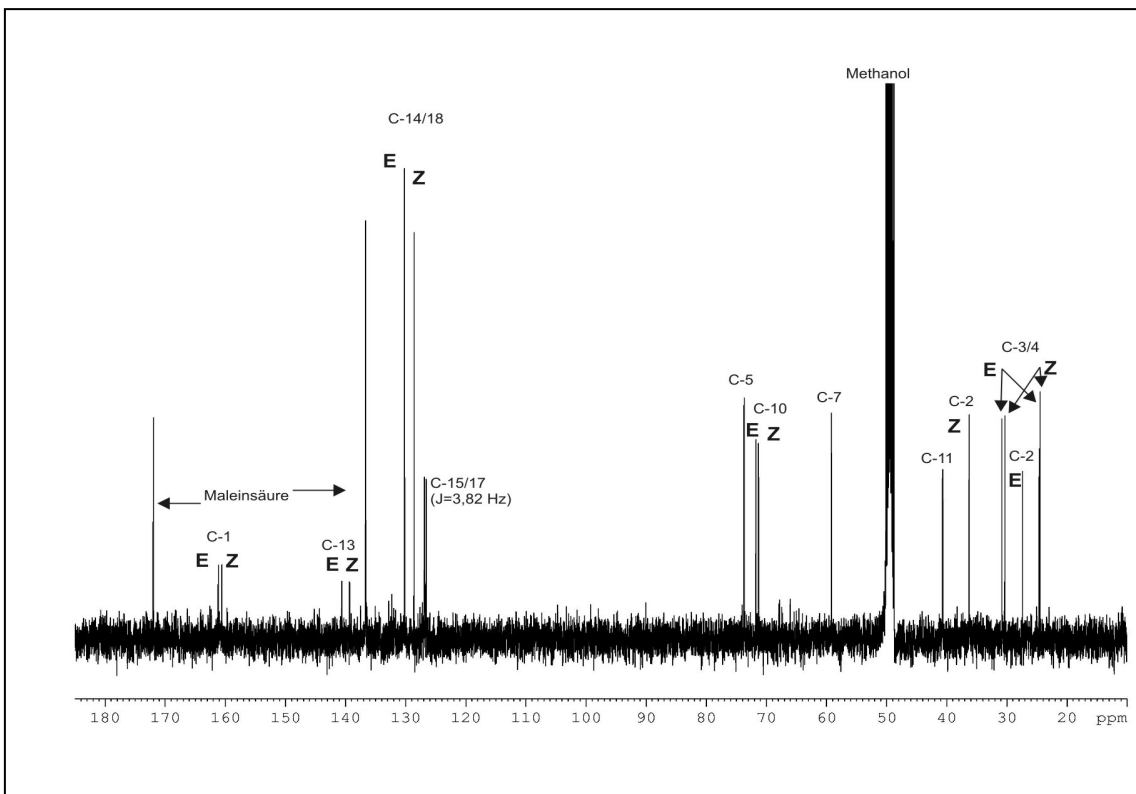


Abbildung 2.1-7: 100 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum eines Gemisches von *E*-Fluvoxamin und *Z*-Fluvoxamin, gemessen in CD_3OD (15,5 mg/ml)

E-Fluvoxamin			Z-Fluvoxamin		
	¹ H	¹³ C		¹ H	¹³ C
Pos.	δ [ppm]	J [Hz]	δ [ppm]	J [Hz]	δ [ppm]
1			160.76		160.13
2	2,90	7,45 (t)	26.98	2,62	1.33 (t)
3 / 4	1.55 – 1.69	m	24.19 / 30.42	1.46 – 1.58	m
5	3.41 (*)	5.94 (t)	73.27	3.38 (*)	6.14 (t)
7	3.31 (*)		58.78	3.29 (*)	
10	4.42	5.18 (t)	71.46	4.23	5.18 (t)
11	3.33 (*)		40.41	3.23 (*)	
13			140.19		138.89
14, 15, 17, 18	7.88 / 7.71	AA'XX', 8.2 (d)	128.19 / 126.50 (q, J _{CF} =3.82 Hz)	7.72 / 7.61	AA'XX, 8.0 (d)
16			132.17 (q, J _{CF} =32 Hz)		131.75 (q, J _{CF} =32 Hz)

(*) überlappen miteinander und mit dem Lösungsmittelsignal

Tabelle 2.1-1: NMR-Daten von *E*- und *Z*-Fluvoxamin, gemessen in d₄-Methanol, referenziert das Lösemittelrestsignal.

2.1.1.3.2.2 Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten

Wie in Kapitel 1.2.3.5 beschrieben, ist die Güte quantitativer Messungen insbesondere von der vollständigen Relaxation und damit vom Verhältnis der T₁-Relaxationszeit zur Wiederholungszeit zwischen zwei Impulsen abhängig. Daher wurde vor Beginn der eigentlichen Quantifizierungsmessungen die T₁-Relaxationszeit mittels der Inversion-Recovery-Sequenz bestimmt.

In Abbildung 2.1-8 ist ein solcher T₁-Plot von *E*-Fluvoxaminmaleat gezeigt. Hierzu wurden (vgl. Kapitel 1.2.3.5) 10 Experimente mit ansteigender Wartezeit zwischen dem 180°- und dem 90°-Impuls durchgeführt. Als grobe Abschätzung der T₁-Relaxationszeit gilt, dass diese etwa das 1,44fache der (interpolierten) Wartezeit, bei der die Signalintensität gleich Null ist, beträgt [50]. Die genaue Zeit kann mathematisch anhand des zugehörigen Geschwindigkeitsgesetzes ermittelt werden. Die Experimente zeigen, dass die T₁-Relaxationszeit für die Protonen der Methy-

lengruppe an Position 2 bei 562 ms und die für die Protonen der Methylengruppe an Position 10 bei 936 ms liegt. Um für die quantitativen Untersuchungen eine vollständige Relaxation der Probe vor dem nachfolgenden Impuls zu erreichen, wurde daher ein Abstand zwischen zwei Impulsen von 7 Sekunden gewählt.

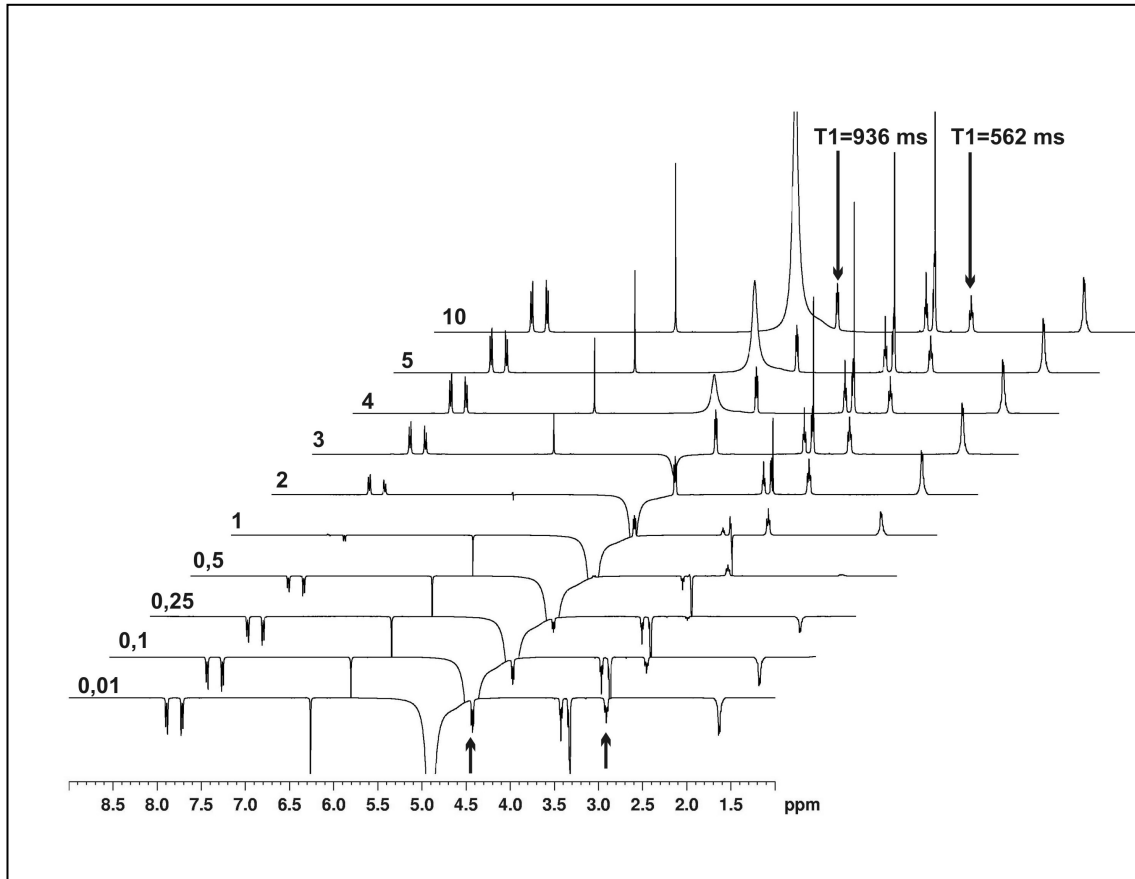


Abbildung 2.1-8: T_1 -Plot von *E*-Fluvoxamin. Am linken Rand der Spektren ist die jeweilige Wartezeit angegeben. Die T_1 -Relaxationszeiten der Protonen an Position 2 und 10 sind über den Spektren angegeben, diese Signale in dem oberen und unteren Spektrum markiert.

2.1.1.3.2.3 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Da immer noch verschiedentlich Unklarheit über die Begriffe Bestimmungs- und Nachweisgrenze vorherrscht, sollen diese beiden Begriffe zunächst definiert werden. In der entsprechenden Richtlinie Q2A [51] der ICH (International Conference on Harmonization) werden diese folgendermaßen definiert:

Detection limit: The detection limit of an individual analytical procedure is the lowest amount of an analyte in a sample which can be detected but not necessarily quantitated as an exact value.

Quantitation limit: The quantitation limit of an individual analytical procedure is the lowest amount of an analyte in a sample which can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy. The quantitation limit is a parameter of quantitative

assays for low levels of compounds in sample matrices, and is used for the determination of impurities and/or degradation products.

Diese Definitionen stehen im Einklang mit denen der entsprechenden deutschen DIN-Norm (DIN 32645). Nach Kromidas [52] definiert diese DIN-Norm die Nachweisgrenze als „die kleinste nachweisbare Menge“, gibt also die Entscheidung „Analyt vorhanden: ja/nein“ wieder. Die Bestimmungsgrenze ist „die kleinste quantifizierbare Menge“, also die Menge, die mit hinreichender (vorzuziehender) Richtigkeit und Präzision erfasst werden kann.

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze („Limit of Quantification“, LOQ) und der Nachweisgrenze („Limit of Detection“, LOD) gibt es verschiedene Herangehensweisen. In der entsprechenden Richtlinie der ICH ist eine Auswahl davon aufgezählt:

- nach visueller Beurteilung der Signalhöhe
Diese Möglichkeit ist natürlich mit deutlichen Fehlern auf Grund der subjektiven Beurteilung verbunden.
- nach dem Signal-Rausch-Verhältnis
Diese Möglichkeit wird insbesondere bei chromatographischen Methoden gerne verwandt.
- nach der Standardabweichung und der Steigung der Kalibriergeraden
 - entweder aufgrund der Standardabweichungen von Blindproben
 - oder aufgrund der KalibrierkurveMan errechnet dabei die Grenzen als $\sigma \cdot f / s$ wobei σ die Standardabweichung und s die Steigung der Kalibriergeraden ist. Der Faktor f beträgt für die Nachweisgrenze 3,3 und für die Bestimmungsgrenze 10,0.

Daneben sind auch noch weitere Methoden zur Ermittlung dieser Grenzen möglich und üblich, beispielsweise die „Menge in einer Verdünnungslösung (aus der Verdünnungsreihe einer Kalibrierprobe), deren sechsfache Bestimmung eine gerade noch akzeptierte Streuung aufweist“ [52]. Dabei können für LOD und LOQ unterschiedliche Limits gewählt werden.

Für die NMR-Spektroskopie ist diese Methode die geeignetste. Fehler durch die Messung selbst sind aufgrund des Messprinzips nahezu ausgeschlossen, so dass sich die Überprüfung von Messmethoden und Validierung auf Kontrollen des Spektrometers und der Probenzubereitung konzentrieren sollte. Aufgrund der in der NMR-Spektroskopie üblichen Spektrenakkumulation besteht ein unmittelbarer

Zusammenhang zwischen der Messzeit (bzw. der Anzahl der akkumulierten Einzelmessungen) und dem Signal-Rausch-Verhältnis. Eine Bestimmung von LOD und LOQ auf Basis dessen ist daher, im Gegensatz z. B. zur HPLC, nicht sinnvoll. Zur Ermittlung der Bestimmungs- und Nachweisgrenze wurde daher eine Verdünnungsreihe (im Sinne einer geometrischen Reihe) hergestellt. Da einerseits reines Z-Isomer nicht verfügbar war und andererseits der *Anteil* an Z-Isomer an der gesamten Probe bestimmt werden sollte, wurde eine Lösung hergestellt, die einen Anteil von 5,13 % Z-Isomer an der Gesamtmenge Fluvoxamin enthielt. Die Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenze soll als diejenige *absolute Menge* an Z-Isomer betrachtet werden, bei der die Abweichung des bestimmten Anteiles weniger als 5 % vom tatsächlichen Anteil beträgt (LOQ) bzw. die, bei der Z-Fluvoxamin noch erkennbar ist (LOD).

Es wurden insgesamt 7 Verdünnungen hergestellt und jeweils dreifach NMR-spektroskopisch vermessen (vgl. Tabelle 2.1-2).

	<i>E</i> -Fluvoxamin	<i>E/Z</i> -Fluvoxamin	<i>E</i> -Fluvoxamin, gesamt		<i>Z</i> -Fluvoxamin, gesamt	
	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/600 µl]	<i>Anteil</i>	[mg/600 µl]	<i>Anteil</i>
A	20,560	2,195	12,963	94,87%	0,701	5,13%
B	10,280	1,098	6,481	94,87%	0,350	5,13%
C	5,140	0,549	3,241	94,87%	0,175	5,13%
D	2,570	0,274	1,620	94,87%	0,088	5,13%
E	1,285	0,137	0,810	94,87%	0,044	5,13%
F	0,643	0,069	0,405	94,87%	0,022	5,13%
G	0,321	0,034	0,203	94,87%	0,011	5,13%

Tabelle 2.1-2: Gehalte der Lösungen zur Ermittlung von Bestimmungs- und Nachweisgrenze. Ausgegangen wurde von Lösungen mit 4,39 mg *E*-Fluvoxamin in 2 ml d_4 -Methanol und 41,12 mg *E/Z*-Fluvoxamin in d_4 -Methanol. Je 1,0 ml beider Lösungen wurde gemischt, 600 µl dieser Mischung wurden zur Messung eingesetzt und 1,0 ml dieser Mischung mit 1,0 ml d_4 -Methanol verdünnt. Mit dieser Verdünnung wurde ebenso verfahren.

Zur quantitativen Auswertung sind die Signale der Wasserstoffe an Position 2 besser geeignet als die der Wasserstoffe an Position 10. Letztere liegen sehr nahe bei dem HDO-Signal, so dass kleine Signale in der Flanke des starken HDO-Signals liegen und daher nur ungenügend integriert werden können. In jedem Spektrum wurden die Signale der Wasserstoffe an Position 2 der beiden Isomere einerseits zweifach manuell integriert und diese Ergebnisse beurteilt. Zusätzlich wurden die manuell erhaltenen Integrale mittels SLOPE- und BIAS-Korrektur (vgl. Kap. 1.2.3.8.5) bearbeitet und diese Integralwerte ebenfalls beurteilt. In Abbildung 2.1-9 sind die Mittelwerte dieser Ergebnisse graphisch und in Tabelle 2.1-3 tabellarisch dargestellt. Es ist unschwer zu erkennen, dass bei allen Methoden bis hinab zu

einer absoluten Menge von 0,29 mg/ml Z-Fluvoxamin die berechneten Gehalte nur wenig differieren. Ebenso sind die Abweichungen vom tatsächlichen Gehalt an Z-Fluvoxamin bis hin zu dieser Verdünnung recht gering. Ein Einfluss der Korrektur der Integralform ist offensichtlich nicht vorhanden.

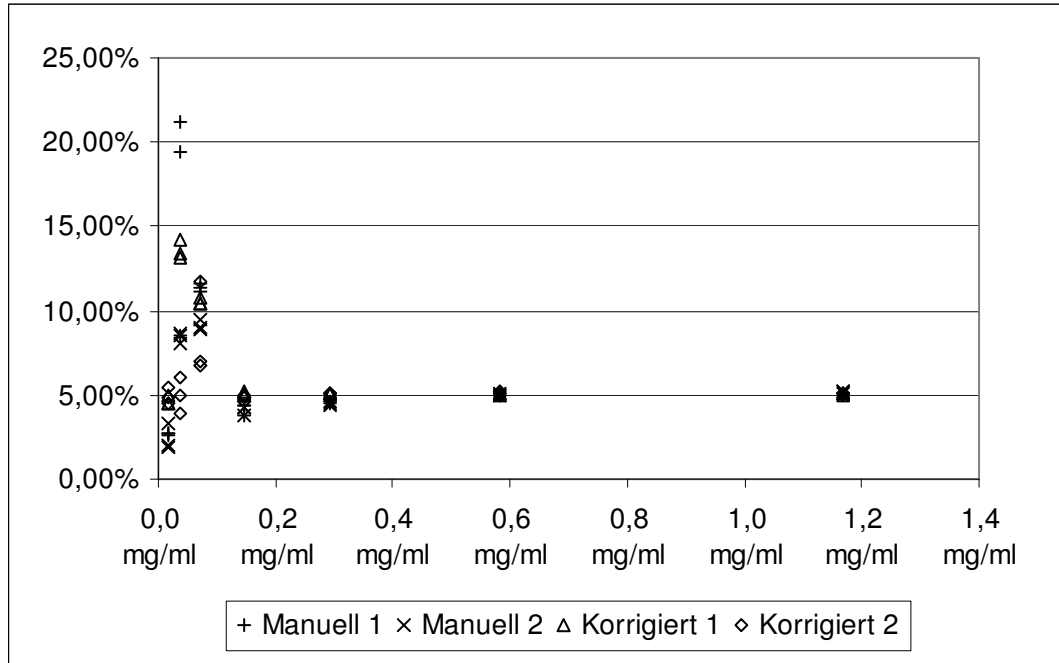


Abbildung 2.1-9: Darstellung des ermittelten Anteils an Z-Fluvoxamin in den Proben zur Bestimmung von LOD und LOQ in Abhängigkeit vom absoluten Gehalt an Z-Fluvoxamin und bei verschiedenen Integrationsmethoden. Der tatsächliche Anteil an Z-Isomer betrug 5,13 %.

Z-Fluvoxamin		Manuelle Integration, Mittelwerte			Korrigierte Integration, Mittelwerte		
Konzentration wie errechnet [mg/ml]	Gehalt [%]	Gehalt gefunden [%]	Differenz		Gehalt gefunden [%]	Differenz	
			errechnet ./.	bez. auf errechn. Gehalt [%]		errechnet ./.	bez. auf errechn. Gehalt [%]
1,168	5,13	5,15	0,02	0,45	5,07	-0,06	-1,24
0,584	5,13	5,02	-0,11	-2,13	5,07	-0,06	-1,08
0,292	5,13	4,55	-0,58	-11,33	5,10	-0,03	-0,67
0,146	5,13	4,16	-0,97	-18,89	5,00	-0,13	-2,63
0,073	5,13	10,26	5,13	100,07	9,51	4,38	85,48
0,036	5,13	12,39	7,26	141,61	9,28	4,15	80,81
0,018	5,13	2,55	-2,58	-50,31	4,81	-0,32	-6,31

Tabelle 2.1-3: Berechnete Gehalte der Lösungen der Ermittlung von Bestimmungs- und Nachweisgrenze, Vergleich einfacher manueller Integration und SLOPE/BIAS-korrigierter Integration mit dem tatsächlichen, aus Einwaage und Verdünnung errechnetem Gehalt.

Es wurde auch ein möglicher Einfluss der Basislinienkorrektur geprüft. Hierzu wurden die Spektren manuell integriert (wie eben erläutert), einerseits mit der Standard-Basislinienkorrektur über das gesamte Spektrum und andererseits wurde die in die Software integrierte Basislinienkorrektur im Bereich der zu integrierenden

Signale durchgeführt (zum Hintergrund siehe Kapitel 1.2.3.8.4). Es zeigt sich deutlich, dass bei den niedrigen Konzentrationen die mit der beschränkten Basislinienkorrektur ermittelten Werte deutlich besser sind. Dies liegt daran, dass bei so kleinen Signalen, wie sie bei solchen geringen Mengen anzutreffen sind, Schwankungen in der Basislinie einen relativ viel größeren Effekt haben als bei größeren absoluten Mengen. Anhand dieser Abbildung ist auch zu sehen, dass mit Hilfe der geeigneten Basislinienkorrektur mit hinreichender Genauigkeit der Gehalt auf dem 0,073 mg/ml-Niveau bestimmt werden kann. Auf diesem Niveau wurde ein Gehalt von 4,98 % gefunden, also eine Abweichung von 0,15 %-Einheiten (das entspricht einer relativen Abweichung von 2,93 % bezogen auf den tatsächlichen Anteil 5,13 %). Die Extremwerte bei den höheren Niveaus betragen 0,25 %-Einheiten bzw. 4,81 % relativ (bei dem 0,584 mg/ml-Niveau). Die durch Integration ermittelten Gehalte sind in Abbildung 2.1-10 und Tabelle 2.1-4 dargestellt.

Z-Fluvoxamin Konzentration wie errechnet [mg/ml]	Basislinienkorrektur gesamt		Basislinienkorrektur gezielt	
	Gehalt gefunden		Gehalt gefunden	
	Mittelwert	Standard- abweichung	Mittelwert	Standard- abweichung
1,168	5,14%	0,00028	4,91%	0,00015
0,584	5,18%	0,00547	4,88%	0,00040
0,292	4,57%	0,00155	4,95%	0,00038
0,146	4,42%	0,00120	4,89%	0,00115
0,073	9,65%	0,01396	4,98%	0,01483
0,036	8,70%	0,01082	3,04%	0,00110
0,018	3,22%	0,00244	4,02%	0,00522

Tabelle 2.1-4: Mittelwerte und Standardabweichungen zum Vergleich der verschiedenen Methoden der Basislinienkorrektur. Der tatsächliche Gehalt betrug 5,13 %.

Während bei den vier höheren Gesamtkonzentrationen sich die Ergebnisse nach den beiden Methoden zur Basislinienkorrektur kaum unterscheiden, treten bei den niedrigeren deutliche Unterschiede auf. Dies liegt daran, dass bei einer Korrektur der Basislinie über das gesamte Spektrum diese so optimiert wird, dass sie *insgesamt* möglichst gut ist. Das heißt, auch Signale, die weit von dem interessanten Spektrenausschnitt entfernt liegen, werden mitberücksichtigt. Dadurch können Abweichungen von der optimal korrigierten Basislinie für den interessanten Abschnitt auftreten und die Integrale – insbesondere die von kleinen Signalen – werden falsch berechnet. Wird die Basislinie nur für den interessanten Bereich optimiert, können diese Einflüsse vermieden werden.

Die Anwesenheit des Z-Isomers konnte bei allen Verdünnungen eindeutig erkannt werden, das heißt, die Nachweisgrenze liegt noch unter der Konzentration der hier betrachteten Lösung.

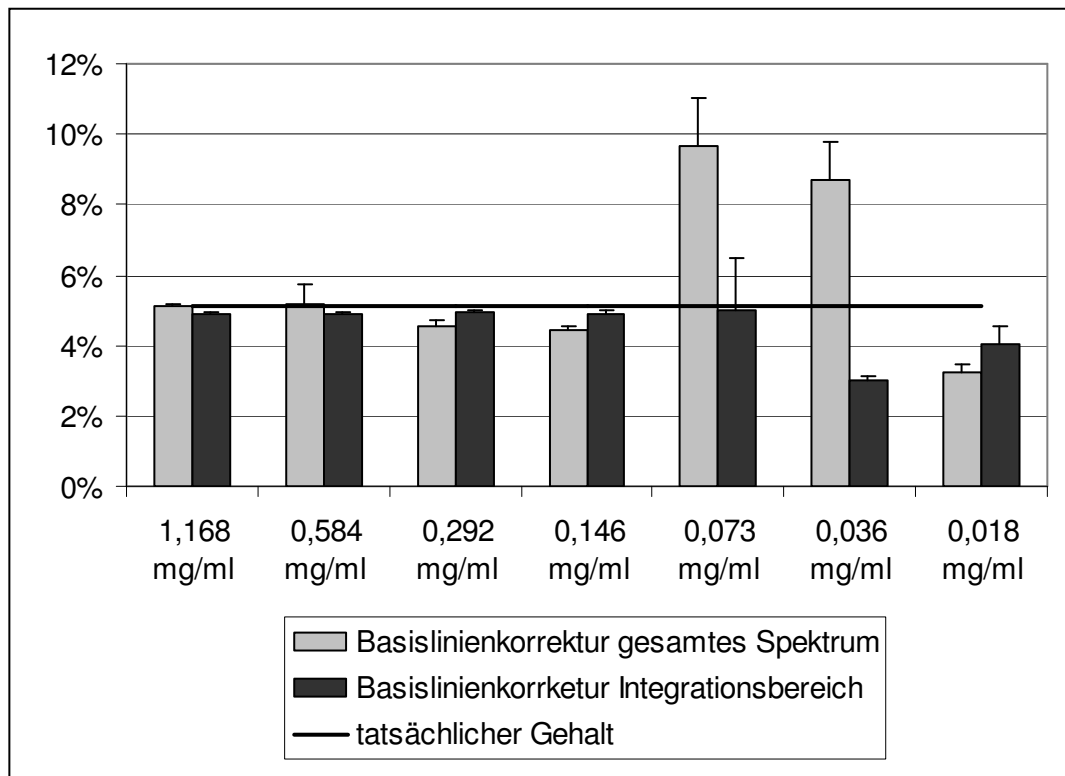


Abbildung 2.1-10: Vergleich des ermittelten Gehaltes an Z-Fluvoxamin mit verschiedenen Methoden der Basislinienkorrektur.

Zusammengenommen konnte somit die Bestimmungsgrenze bei einer Konzentration von 0,073 mg/ml Z-Fluvoxamin und die Nachweisgrenze als geringer als eine Konzentration von 0,018 mg/ml Z-Fluvoxamin bestimmt werden.

2.1.1.3.2.4 Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurden Untersuchungen des Gehaltes an Z-Isomer in dem Bereich zwischen 0 % und 10 % Z-Isomer an der Gesamtmenge Fluvoxamin durchgeführt.

Für eine erste Beurteilung der Linearität wurde ein großer Bereich gewählt, der auch deutlich über den vom aktuellen Arzneibuch geforderten Höchstanteil hinausgeht. Es wurden insgesamt acht Lösungen (je zwei Lösungen auf vier Niveaus) hergestellt und dann je dreifach vermessen. Um systematische Fehler bei der Herstellung der Lösungen zu vermeiden, wurden in diesem Fall die zu vermessenden Lösungen nicht aus zwei Stammlösungen gemischt, sondern jede der acht Lösungen unabhängig von den anderen hergestellt (siehe die ersten beiden

Spalten in Tabelle 2.1-5). Die erhaltenen Spektren wurden wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben bearbeitet und die Signale der Wasserstoffe an Position 2 jeweils dreifach integriert. Die in den letzten beiden Spalten der Tabelle 2.1-5 angegebenen Werte beziehen sich auf diese insgesamt neun Integralflächen.

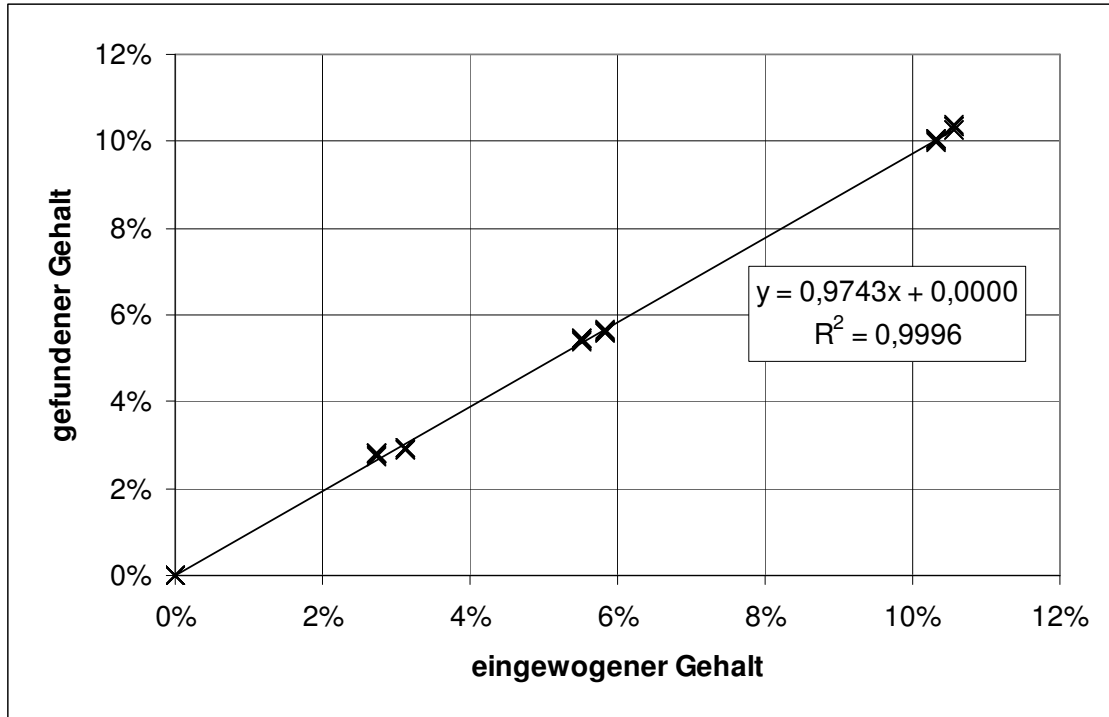


Abbildung 2.1-11: Zusammenhang zwischen gefundenem Gehalt und tatsächlich eingewogenem Gehalt an Z-Fluvoxamin in den Mischungen zur Überprüfung der Linearität im Bereich bis 10 %. An jedem Messpunkt wurden 3 Messungen durchgeführt und jedes Spektrum dreifach integriert. Die Geradengleichung bezieht sich auf diese 72 Datenpunkte.

Einwaagen		Tatsächliche Massen			Anteil Z-Fluvoxamin		
E/Z	E rein	insgesamt	E gesamt	Z gesamt	eingewogen	gefunden	
[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]		Mittelwerte	Stand.abw.
4,14	16,70	20,87	18,67	2,20	10,55%	10,32%	0,0607
3,83	15,88	19,74	17,70	2,04	10,32%	10,02%	0,0269
2,25	18,28	20,55	19,35	1,20	5,83%	5,62%	0,0234
2,13	18,40	20,55	19,41	1,13	5,51%	5,44%	0,0274
1,19	19,04	20,24	19,61	0,63	3,13%	2,91%	0,0160
1,05	19,30	20,36	19,80	0,56	2,74%	2,80%	0,0318
0,00	19,50	19,50	19,50	0,00	0,00%	0,00%	0,0000
0,00	22,04	22,04	22,04	0,00	0,00%	0,00%	0,0000

Tabelle 2.1-5: Eingewogene und gefundene Gehalte der Fluvoxamin-Lösungen zur Bestimmung der Linearität im Bereich von 0 bis 10 % Z-Fluvoxamin.

Die Güte der Wiederfindung kann anhand der Steigung einer Geraden beurteilt werden, die den Zusammenhang zwischen dem gefundenen Gehalt von Z-Fluvoxamin von dem tatsächlichen Gehalt angibt. Diese Gerade ist - zusammen

mit der zugehörigen Gleichung und dem Bestimmtheitsmaß in Abbildung 2.1-11 dargestellt. Diese Gerade ist berechnet worden unter Berücksichtigung aller ermittelten Integrale. Das heißt, wie oben zu Tabelle 2.1-5 erläutert, es wurden zu insgesamt vier Niveaus jeweils zwei Lösungen dreimal gemessen und jedes so erhaltene Spektrum dreimal nacheinander integriert. Die Gerade ist somit eine Ausgleichsgerade zu insgesamt 72 Datenpunkten.

Es ist deutlich zu sehen, dass in dem hier betrachteten Bereich der eingewogene Anteil des Z-Isomers sehr gut mittels der NMR-Spektroskopie wiedergefunden werden kann. Die Steigung der Geraden beträgt nahezu 1,0 und der Korrelationskoeffizient liegt ebenfalls fast bei 1,0.

Die Lösungen wurden zwei Tage später erneut auf die gleiche Weise vermessen. Das Ergebnis dieser Wiederholungsmessung ist grafisch – analog zu Abbildung 2.1-11 – dargestellt in Abbildung 2.1-12. Auch hier zeigen sich die gleichen Resultate wie bei der ersten Messung: eine exzellente Wiederfindung des eingesetzten Gehaltes des Z-Isomers, begründet durch eine Geradensteigung von nahezu 1,0 und einen Korrelationskoeffizienten, der ebenfalls fast bei 1,0 liegt.

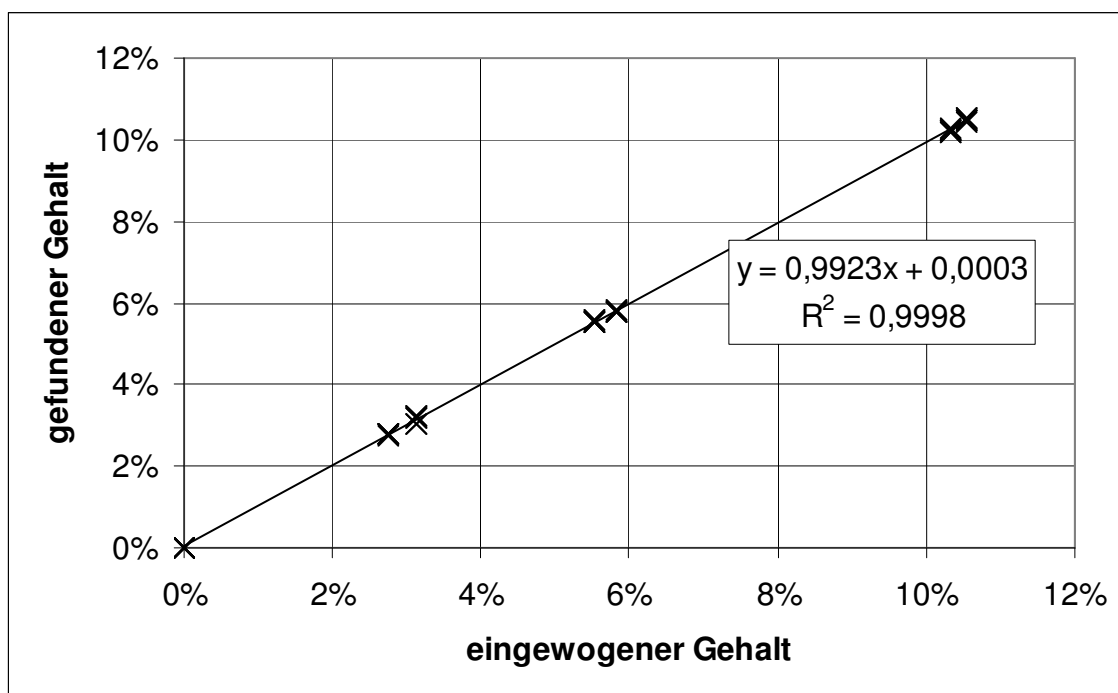


Abbildung 2.1-12: Zusammenhang zwischen gefundenem Gehalt und tatsächliche eingewogenem Gehalt an Z-Fluvoxamin bei der Wiederholungsmessung. Die Bedingungen sind identisch zu denen in Abbildung 2.1-11.

Auch der Vergleich dieser beiden Messungen zeigt eine gute Übereinstimmung. Zusammengestellt ist dies in Tabelle 2.1-6. Die gute Übereinstimmung zwischen

den beiden Messungen als auch mit den tatsächlichen Gehalten ist deutlich zu sehen.

Einwaagen		Tatsächliche Massen			Anteil Z-Fluvoxamin					
E/Z	E rein	insgesamt	E gesamt	Z gesamt	eingewogen	gefunden				
[mg]	[mg]					[mg]	[mg]	[mg]	erste Messung	zweite Messung
4,14	16,70	20,873	18,671	2,202	10,55%	10,32%	0,0607	10,50%	0,0361	
3,83	15,88	19,741	17,703	2,038	10,32%	10,02%	0,0269	10,23%	0,0349	
2,25	18,28	20,548	19,351	1,197	5,83%	5,62%	0,0234	5,80%	0,0369	
2,13	18,40	20,547	19,414	1,133	5,51%	5,44%	0,0274	5,56%	0,0313	
1,19	19,04	20,240	19,606	0,633	3,13%	2,91%	0,0160	3,15%	0,0941	
1,05	19,30	20,358	19,800	0,559	2,74%	2,80%	0,0318	2,77%	0,0203	
0,00	19,50	19,500	19,500	0,000	0,00%	0,00%	0,0000	0,00%	0,0000	
0,00	22,04	22,040	22,040	0,000	0,00%	0,00%	0,0000	0,00%	0,0000	
Steigung (gefunden gegen eingewogen):						0,97432		0,99228		

Tabelle 2.1-6: Gefundene Gehalte an Z-Fluvoxamin in den beiden Messreihen, im Vergleich zu den tatsächlichen Gehalten.

2.1.1.3.2.5 Überprüfung des im Arzneibuch geforderten Niveaus

Wie in der Einleitung zu diesem Kapitel erwähnt, schreibt die Monographie der British Pharmacopoeia einen maximalen Gehalt von 0,5 % und der PhEur-Entwurf für die Arzneibuchmonographie einen maximalen Gehalt des Z-Isomers von 0,2% vor. Um zu zeigen, dass dieser Gehalt mit der hier beschriebenen NMR-Methode erreicht werden kann, wurden Messungen auf diesen Niveau durchgeführt.

Hierzu wurden drei Lösungen hergestellt und vermessen, die einen Bereich des Gehaltes an Z-Fluvoxamin von 0,15 % bis 1,0 % abdeckten. Der absolute Gehalt an Z-Fluvoxamin war dabei dem der Bestimmungsgrenze angepasst: auf dem niedrigsten Niveau führte die zugesetzte Menge Z-Fluvoxamin zu einer Konzentration von 0,085 mg/ml. In Tabelle 2.1-7 sind die Einwaagen zur Herstellung der Lösungen sowie die gefundenen Gehalte des Z-Isomers angegeben. Eine grafische Darstellung dieser Werte ist in Abbildung 2.1-13 gezeigt. Zur Auswertung wurden die vier Lösungen jeweils dreifach gemessen und jedes erhaltene Spektrum dreimal manuell integriert. Da hier das Signal des Z-Isomers im Vergleich zu den übrigen Signalen sehr klein ist, versagt die software-integrierte Routine zur Phasenkorrektur der Spektren. Daher war es bei diesen Lösungen erforderlich, diese manuell durchzuführen. Ebenfalls wurde auch für diese Auswertungen eine Basislinienkorrektur nur für den relevanten Bereich durchgeführt, um Einflüsse, die sich durch die Korrektur des gesamten Spektrums ergeben hätten, zu verhindern (vgl. Abbildung 2.1-10).

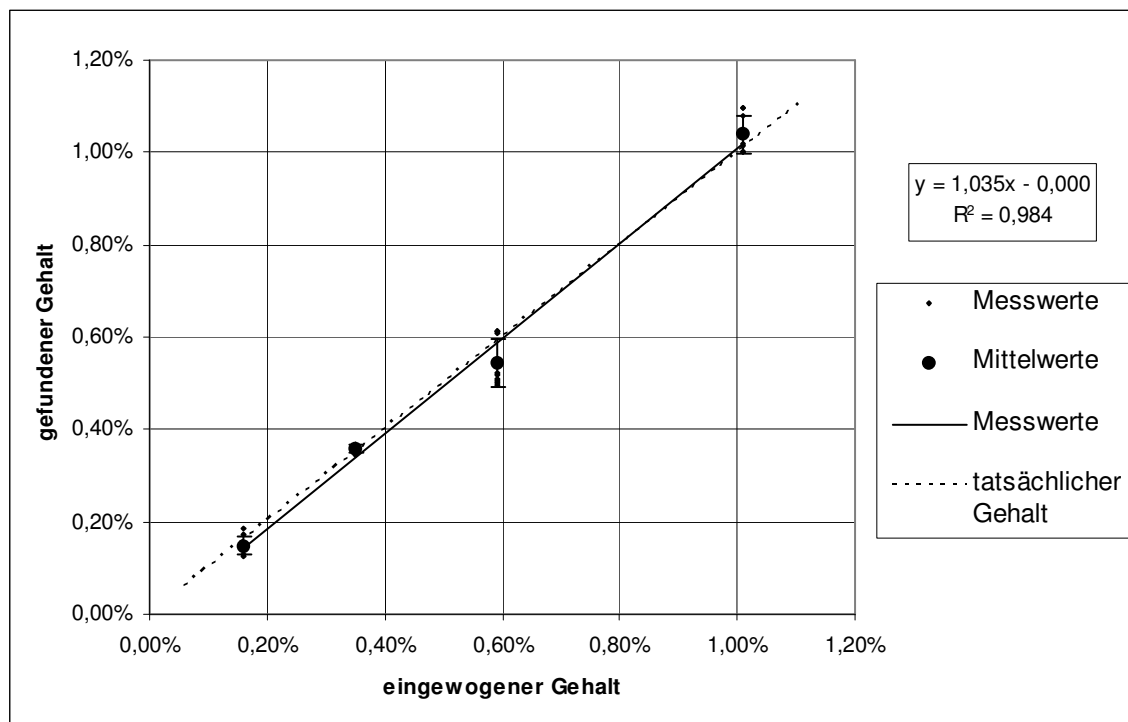


Abbildung 2.1-13: Zusammenhang zwischen dem gefundenen Gehalt an Z-Fluvoxamin und dem aus den Einwaagen errechneten Gehalt. Die Mittelwerte sind aus 9 Integrationen (vgl. Text) errechnet.

Einwaagen		Tatsächliche Massen			Anteil Z-Fluvoxamin		
E/Z	E rein	insgesamt	E gesamt	Z gesamt	eingewogen	gefunden	
[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]		Mittelwerte	Stand.abw.
1,06	54,87	55,938	55,375	0,564	1,01%	1,04%	0,0004
0,62	55,27	55,895	55,565	0,330	0,59%	0,54%	0,0005
0,36	54,59	54,953	54,761	0,192	0,35%	0,36%	0,0001
0,16	53,32	53,481	53,396	0,085	0,16%	0,15%	0,0002

Tabelle 2.1-7: Eingewogene und gefundene Gehalte der Fluvoxamin-Lösungen zur Beurteilung der Eignung auf dem geforderten Arzneibuch-Niveau.

Die in Abbildung 2.1-13 dargestellte Gerade gibt die Wiederfindungsrate wieder. Auch hier zeigt sich für diesen geringen Gehalt der Verunreinigung eine sehr gute Linearität und Wiederfindung, gegeben durch eine Geradensteigung von 1,03, einem y-Achsenabschnitt von 0,00 und einem Korrelationskoeffizienten von 0,98. Der tatsächliche Gehalt liegt in jedem Fall innerhalb der einfachen Standardabweichung der ermittelten Werte.

Um die oben ermittelte Bestimmungsgrenze von 0,07 mg/ml Z-Isomer auch auf diesem Niveau von 0,2 % zu überprüfen, wurde die Lösung mit 0,16 % Z-Fluvoxamin noch zweimal verdünnt, jede Verdünnung dreimal vermessen und jedes erhaltene Spektrum dreifach integriert. Die Ergebnisse dieser insgesamt neunfachen Bestimmungen sind in Tabelle 2.1-7 und Abbildung 2.1-14 gezeigt.

Bei allen drei Lösungen kann der tatsächliche Gehalt sehr gut wiedergegeben werden, allerdings ist die Standardabweichung bei der niedrigstkonzentrierten Lösung (mit 13,37 mg/ml Fluvoxamin, davon 0,02 mg/ml Z-Fluvoxamin) um den Faktor drei größer als bei den anderen beiden.

Gehalt (nach Verdünnung)		Tatsächliche Massen			Anteil Z-Fluvoxamin		
E/Z	E rein	insgesamt	E gesamt	Z gesamt	eingewogen	gefunden	
[mg]	[mg]	[mg]	[mg]	[mg]		Mittelwerte	Stand.abw.
0,16	53,32	53,481	53,396	0,085	0,159%	0,148%	0,0002
0,08	26,66	26,741	26,698	0,043	0,159%	0,144%	0,0002
0,04	13,33	13,370	13,349	0,021	0,159%	0,133%	0,0009

Tabelle 2.1-8: Mengen an E- und Z-Fluvoxamin der Verdünnung der 0,16%igen Lösung zur Überprüfung der Bestimmungsgrenze und die Mittelwerte der gefundenen Gehalte

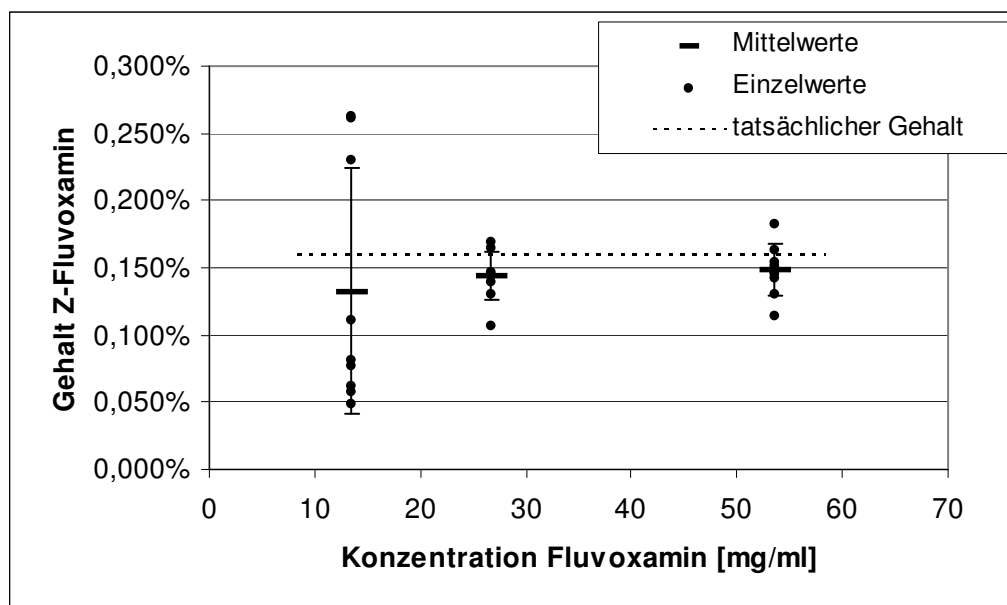


Abbildung 2.1-14: Gefundener und tatsächlicher Gehalt an Z-Fluvoxamin in der Verdünnungen zur Überprüfung der Bestimmungsgrenze auf dem 0,2 %-Niveau.

2.1.1.3.2.6 Überprüfung einer handelsüblicher Fluvoxamin-Probe

Mit der hier beschriebenen NMR-spektroskopischen Methode wurde eine Probe von handelsüblichen, arzneibuchkonformen Fluvoxamin-Maleat untersucht. In dieser konnten Spuren des Z-Isomere gefunden werden, diese lagen jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze dieser Methode. Das entsprechende ^1H -NMR-Spektrum ist in Abbildung 2.1-15 gezeigt. Aus den Integralflächen ergeben sich 0,11 % Z-Fluvoxamin. Die Einwaage betrug 25,6 mg, in 600 μl Methanol- d_4 gelöst, entsprechend der in den vorigen Abschnitten überprüften Gesamtkonzentration beider Isomere.

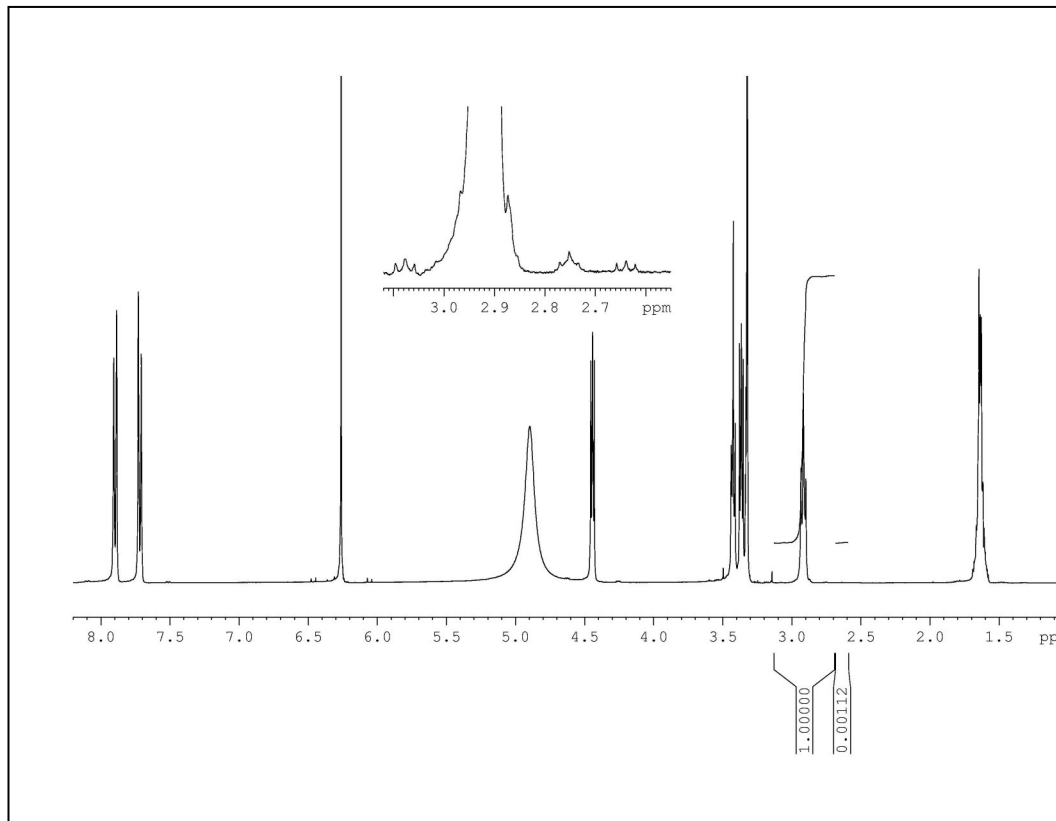


Abbildung 2.1-15: ^1H -NMR-Spektrum einer handelsüblichen Fluvoxamin-Probe.

2.1.1.3.3 Robustheit

Bei der NMR-Spektroskopie wird das Messsystem von den Proben nicht kontaminiert (im Gegensatz zu beispielsweise der Massenspektroskopie). Sofern das Spektrometer korrekt funktioniert, ergeben mehrfache Messungen *derselben* Probe praktisch identische Ergebnisse. Das Hauptaugenmerk bei der Validierung hinsichtlich der Robustheit von qNMR-Methoden ist daher auf die Probenvorbereitung zu legen. Dazu gehören beispielsweise die Zusammensetzung des Lösungsmittels, der pH-Wert der wässrigen Phase oder die Extraktion oder Derivatisierung des Analyten [52].

Bei der Bestimmung des Isomerenverhältnisses von Fluvoxamin ist aber weder eine aufwändige Probenvorbereitung noch eine Mischung des Lösungsmittels erforderlich. Daher wurden keine dahingehenden Untersuchungen durchgeführt.

Zur Validierung des Messgerätes wird in der NMR-Spektroskopie üblicherweise einer Performance-Validierung durchgeführt. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Spektrometers empfehlen Spektrometerhersteller im Rahmen der GLP-Richtlinien verschiedene Standardtests. Dazu gehören:

- Linienform (als „Lineshape-“ oder „Hump-Test“ bezeichnet): eine 3%ige Lösung von Chloroform in Aceton- d_6 wird vermessen. Dabei darf die Breite des Signals bei 0,55% und 0,11% der Signalhöhe die vom Hersteller vorgegebenen probenkopfspezifischen Werte nicht überschreiten
- Auflösung („Resolution“): eine 3%ige Lösung von Chloroform in Aceton- d_6 wird vermessen. Dabei darf die Halbwertsbreite den vorgegebenen probenkopfspezifischen Wert nicht überschreiten
- Empfindlichkeit („Sensitivity“): eine 0,1%ige Lösung von Ethylbenzol in Chloroform- d_1 wird vermessen und das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) aus dem Spektrum bestimmt. Auch hier müssen Werte eingehalten werden.

Diese Tests werden im Rahmen der regelmäßigen Wartung des Spektrometers durchgeführt. Dabei lagen die Werte stets innerhalb der Spezifikation (Sensitivity: $S/N \geq 200$, Lineshape $\leq 5 \text{ Hz} / 9 \text{ Hz}$ und Resolution $\leq 0,45 \text{ Hz}$).

2.1.1.4 Zusammenfassung

Die hier beschriebene NMR-Methode ist in der Lage, die Isomerenzusammensetzung von Fluvoxamin-Maleat auf einem Niveau von 0,2 % des Z-Isomers, der Verunreinigung, zu bestimmen, also auf dem Niveau, welches im Arzneibuch gefordert wird [53]. Für die quantitative Auswertung sind die Signale der Wasserstoffe beider Isomere an Position 2 gut geeignet. Im Gegensatz zur im Arzneibuch vorgeschriebenen Ionenpaar-HPLC-Methode gelingt die NMR-Messung allerdings in deutlich kürzerer Zeit. Für die HPLC-Methode wird eine Retentionszeit des Hauptpeaks von 7 bis 9 Minuten angegeben, dazu kommen eine Probenvorbereitung mit zwei Verdünnungsschritten sowie die Vorbereitung der HPLC-Anlage für diese Messung. Bei der NMR-Methode benötigt die Messung selbst (bei 128 Wiederholmessungen und einer Wiederholungszeit von 7 Sekunden zwischen zwei Impulsen) 15 Minuten. Zur Probenvorbereitung ist lediglich erforderlich, ca. 30 mg der Substanz in einem geeigneten NMR-Röhrchen (5 mm) in 600 μl Methanol- d_4 zu lösen (entsprechend 50 mg/ml). Als zusätzliche Information kann bei der NMR-Methode selbstverständlich eine Aussage zur Identität der Substanz getroffen werden, bzw. wenn zur potentiellen Identitätsprüfung mittels NMR die Bedingungen der Quantifizierungsmethode gewählt werden, kann die Isomerenreinheit zusammen mit der Identität geprüft werden.

2.1.2 Perphenazin und Perphenazinenantat

2.1.2.1 Pharmakologie

2.1.2.1.1 Allgemeines

Perphenazin gehört zur Arzneistoffgruppe der Neuroleptika. Darunter versteht man Arzneistoffe, die Halluzination, Wahn und psychomotorische Erregung beseitigen, affektive Erregbarkeit und Vigilanz sowie Antrieb, Spontanbewegungen und Ausdrucksmotorik dämpfen, während intellektuelle Fähigkeiten erhalten bleiben [54]. Haupteinsatzgebiet der Neuroleptika ist die Behandlung schizophrener Psychosen und der Manie. Deshalb werden sie in der englischsprachigen Literatur auch üblicherweise als „antipsychotische Arzneimittel“ („antipsychotic drugs“) bezeichnet.

Die neuroleptische Potenz kann bei gleichem Grundkörper durch verschiedene Substitutionen gesteigert werden. Das Grundgerüst ist in Abbildung 2.1-16 gezeigt. Die Aminogruppe in der Seitenkette ist tertiär, wobei sie auch Bestandteil eines Ringes sein kann. Die neuroleptische Potenz nimmt von Derivaten mit aliphatischer Seitenkette über solche mit einem Piperidinring zu denen mit einem Piperazinring hin zu, die sedative Wirkung gleichzeitig ab [55]. Durch Einfügen eines Chlor-Restes oder noch besser einer Trifluormethylgruppe an Position 2 (=R³) kann die neuroleptische Potenz ebenfalls gesteigert werden.

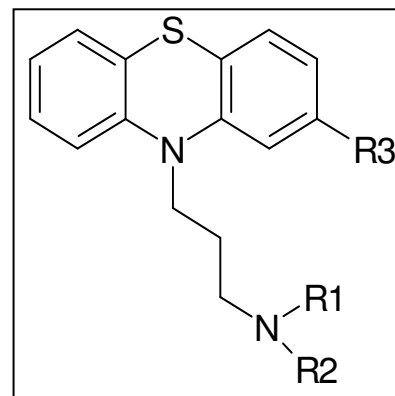


Abbildung 2.1-16: Grundgerüst der Phenothiazin-Neuroleptika.

Erst seit dem Beginn der 50er Jahre gibt es Medikamente, die erfolgreich in der Therapie psychischer Erkrankungen eingesetzt werden. Die Wirkung von Chlorpromazin, einem Phenothiazin, bei schizophrenen und manischen Psychosen wurde damals beschrieben. Auch heute noch sind Phenothiazine wichtige Neuroleptika.

2.1.2.1.2 Pharmakodynamik

Der wichtigste Wirkmechanismus der Neuroleptika ist ihre antagonistische Wirkung an Dopamin-Rezeptoren, genauer am D₂-Typ-Dopaminrezeptor. Auch wenn

die Pathogenese von Schizophrenien immer noch nicht genau bekannt ist, so gibt es doch eine Hauptthese, die eine Überaktivität dopaminerger Neuronensysteme der Schizophrenie zugrunde legt. Während die Rezeptorblockade quasi „sofort“ eintritt, nimmt der Beginn der antipsychotischen Wirkung einige Zeit in Anspruch. Der Grund hierfür wird in einer Hemmung sowohl postsynaptischer D₂-Rezeptoren als auch präsynaptischer D₂-Autorezeptoren gesehen: durch letztere wird die Dopaminfreisetzung gesteigert und es bedarf einiger regulatorischer Veränderungen bis die Hemmung der postsynaptischen Rezeptoren in den Vordergrund tritt.

Neben die beiden Hauptindikationen, dem Einsatz bei Schizophrenien und manischen Episoden, treten noch einige weitere. So werden Neuroleptika bei verschiedenen schizoaffektiven Erkrankungen in Kombination mit Antidepressiva [56] eingesetzt. Auch bei hirnorganisch begründbaren Psychosen können sie indiziert sein sowie als Mittel der zweiten Wahl bei Alkoholentzugsdelir [57]. Schließlich werden verschiedene Neuroleptika im Bereich der Psychiatrie bei chronischen organischen Psychosen in der Gerontopsychiatrie eingesetzt. Es gibt aber auch einige Indikationen außerhalb der Psychiatrie. So in der Neurologie zur Behandlung von Hyperkinesien bei dem Gilles-de-la-Tourette-Syndrom [58]. Auch zur Neuroleptanästhesie werden Neuroleptika in Kombination mit Fentanyl eingesetzt.

2.1.2.1.3 Pharmakokinetik

Die Resorption von Neuroleptika im Magen-Darm-Trakt ist zwar gut, aber aufgrund des ausgeprägten First-Pass-Effektes liegt die orale Bioverfügbarkeit bei nur etwa 30 bis 60 %. Schon seit Beginn der klinischen Anwendung gab es Neuroleptika sowohl in oraler als auch parenteraler Form. In den 1960er Jahren wurden Depot-Formulierungen in die Therapie eingeführt. Diese sind effektiv und können sicher angewendet werden, darüber hinaus haben sie Vorteile für den Patienten [59]. Gewöhnlich werden diese Depotformen durch Veresterung einer endständigen – OH-Gruppe mit einer langkettigen Fettsäure hergestellt und als Lösung in einem pflanzlichen Öl verabreicht [60]. So kann beispielsweise Perphenazin als Enantat oder Decanoat eingesetzt werden, was zu einem Dosierintervall von 2 Wochen bei einer Einzeldosis von 25 bis 200 mg führt [61]. Die Vorteile eines solchen Dosierungsschemas liegen generell ganz klar in der verbesserten Compliance und Bioverfügbarkeit. Diese Behandlung kann daher sehr gut als Dauerbehandlung nach der oralen Dosisanpassung angewendet werden.

2.1.2.2 Abbaureaktionen

Nach intramuskulärer Applikation wird das Prodrug Perphenazinenantat durch unspezifische Esterasen gespalten und auf diese Weise der eigentliche Wirkstoff Perphenazin freigesetzt. Eine Esterspaltung kann jedoch auch bereits vorher, bei unsachgemäßer Lagerung des Perphenazinenantats und Anwesenheit von katalytischen Mengen Säure oder Base stattfinden [62]. Wird Perphenazinenantat durch Veresterung von Perphenazin mit Heptansäure gewonnen, so können aufgrund schlechter Reinigung auch noch Reste an Perphenazin aus diesem Herstellungsprozess im Enantat zurückbleiben. Außerdem können andere Ester als Verunreinigung auftreten, die aus der Heptansäure, die mit anderen Fettsäuren verunreinigt sein kann, stammen.

2.1.2.3 Quantifizierung

2.1.2.3.1 Fertigarzneimittel und Analytik der Hersteller

In Deutschland ist sowohl Perphenazin (als Tabletten in Dosierungen von 4 und 8 mg und als Tropfen) als auch Perphenazinenantat (100 mg je ml ölige Lösung, entsprechend 76 mg Perphenazin) im Handel. Im europäischen und außereuropäischen Ausland sind darüber hinaus auch andere Dosierungen, Retardarzneiformen und Perphenazindecanoat als alternative Depotform im Handel [63]. In der Pharmazeutischen Stoffliste sind drei Hersteller von Fertigarzneimitteln mit Perphenazinenantat und zehn Hersteller von solchen mit Perphenazin aufgeführt. Methoden zur Reinheitsbestimmung von Perphenazinenantat sind – im Gegensatz zu solchen für Perphenazin – nicht publiziert. Der Hersteller von Fertigarzneimitteln, der für die hier vorliegende Arbeit Proben zur Verfügung stellte, benutzt eine nicht näher beschriebene HPLC-Methode zum Nachweise von Perphenazin in Perphenazinenantat. Die zur Verfügung gestellte Charge enthielt gemäß dieser Analyse weniger als 0,01% Perphenazin bei einem Gehalt von 99,6% Perphenazinenantat.

2.1.2.3.2 Ergebnisse der NMR-Messungen

2.1.2.3.2.1 *Spektrenzuordnung*

Um den Anteil Perphenazinenantat der hydrolysiert ist, zu quantifizieren, müssen zuerst die Spektren von Perphenazin und Perphenazinenantat aufgenommen und

interpretiert werden. Die Strukturformeln von Perphenazin (2-{4-[3-(2-Chlor-10-phenothiazinyl)propyl]piperazin}ethanol) und Perphenazinenantat, dem Heptansäureester, sind in Abbildung 2.1-17 wiedergegeben.

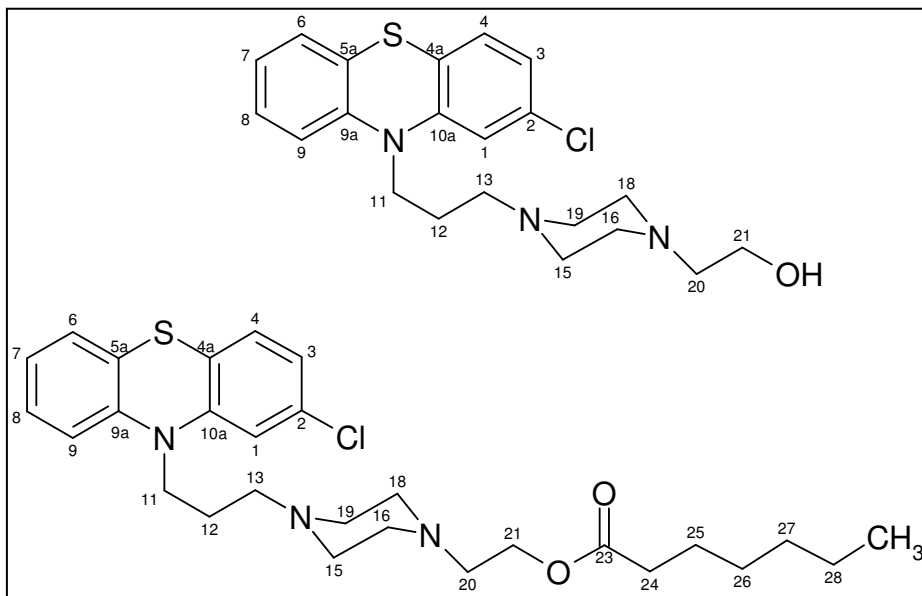
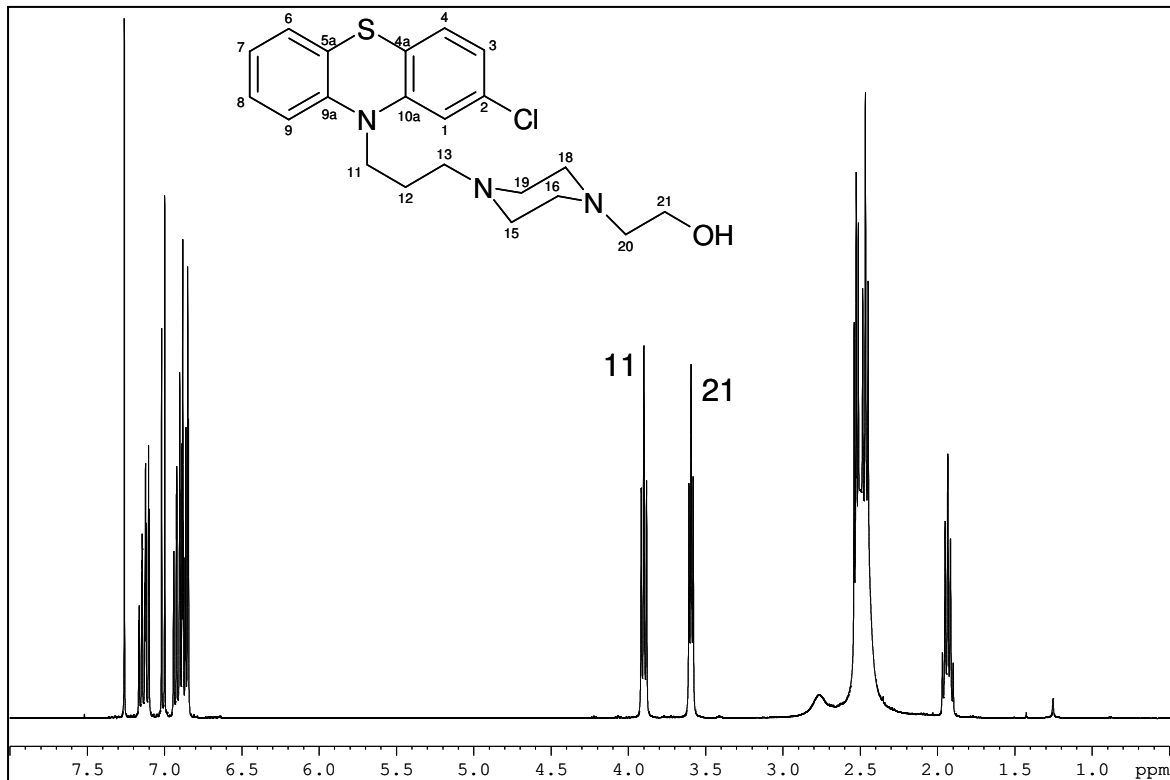
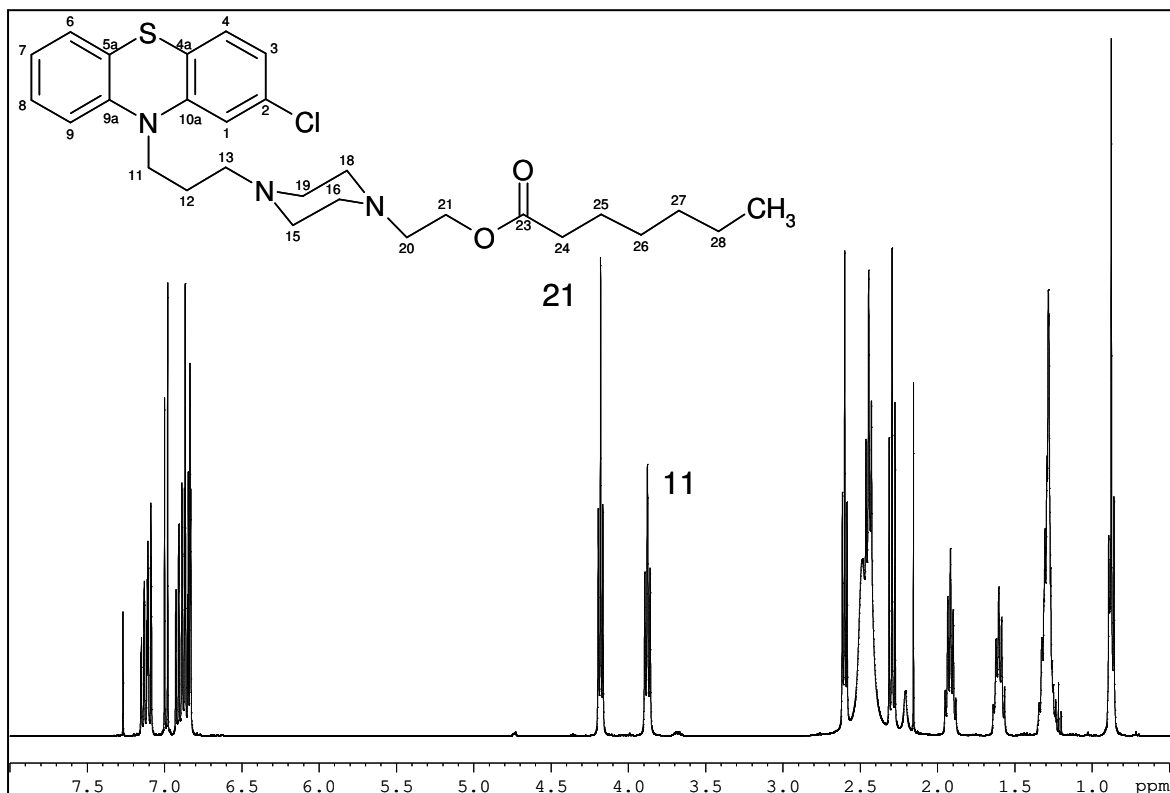


Abbildung 2.1-17: Strukturformel von Perphenazin (oben) und Perphenazinenantat (unten)

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Perphenazin (Abbildung 2.1-18) in Chloroform- d_1 zeigt erwartungsgemäß eine Reihe nicht weiter aufgelöster Signale im Bereich von etwa 7 ppm, dem Bereich der Wasserstoffe des Phenothiazinrings. Auch die Signale der Wasserstoffe des Piperazinrings erscheinen als wenig aufgelöstes Multiplett zusammen bei etwa 2.5 ppm. Zudem überlappt dieses mit dem Signal von H13 und H20. Eindeutig zuzuordnen sind dagegen die Signale von H11 bei 3.90 ppm, H12 bei 1.93 ppm und H21 bei 3.59 ppm. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Esters (Abbildung 2.1-19) kommen nicht nur die Signale der Fettsäure hinzu, sondern die Signale der Seitenkette erfahren zusätzlich eine teilweise sehr starke Verschiebung der chemischen Verschiebung hin zu tieferem Feld. Die Signale von H11 und H21 sind auch im Spektrum von Perphenazinenantat als deutliche Signale zu erkennen. Jedoch sind beide unterschiedlich stark verschoben.

Abbildung 2.1-18: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von Perphenazin, gemessen in CDCl₃.Abbildung 2.1-19: ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von Perphenazinenantat, gemessen in CDCl₃.

Das von H11 ist nur unwesentlich (um 0.03 ppm) auf 3.87 ppm hochfeldverschoben und das von H21 dagegen um 0.59 ppm deutlich tieffeldverschoben auf 4.18 ppm. Während im Spektrum von Perphenazin das Signal von H11 bei tieferem Feld als das von H21 erscheint, ist dies im Spektrum des Enantats umgekehrt, das Signal von H21 erscheint hier bei tieferem Feld.

Die chemischen Verschiebungen der übrigen Kerne sind in Tabelle 2.1-9 zusammengefasst.

Tabelle 2.1-9: NMR-Daten der beiden Substanzen Perphenazin und Perphenazinenantat, gemessen in CDCl₃, referenziert auf internes TMS.

Pos.	Perphenazin			Perphenazinenantat		
	¹ H		¹³ C	¹ H		¹³ C
	δ [ppm]	J [Hz]	δ [ppm]	δ [ppm]	J [Hz]	δ [ppm]
1 bis 9 (Aromat)	6.8 – 7.2 ^a		120 – 150 ^b	6.8 – 7.2 ^a		120 – 150 ^b
11	3.90	t, 6.95	45.33	3.90	t, 6.95	45.33
12	1.93	quin, 6.95	24.19	1.92	quin, 6.95	24.90
13	2.46	t, 6.95	55.45	2.44	t, 6.95	55.45
15/19		s	53.35	2.49	s	53.21
17/18			56.87			56.38
20	2.53	t, 5.37	59.17	2.60	t, 5.96	56.65
21	3.59	t, 5.37	57.68	4.18	t, 5.96	61.63
23	---			---		173.74
24	---			2.29	t. 7.52	34.31
25	---			1.60	multi	24.90
26/27/28	---			1.27 – 1.33	multi	31.43 / 28.76 / 22.46
29	---			0.89	t. 3.37	14.02

^a die Signale überlappen stark und können nicht exakt zugeordnet werden

^b einzelne Signale, die aber nicht exakt zugeordnet werden können

Wie man sieht, erscheinen die Signale von H11 des Enantats (3.87 ppm) und des freien Alkohols (3.90 ppm) so nahe beieinander, dass diese überlappen. Das Signal bei etwa 3.9 ppm in einer Mischung aus Ester und freiem Perphenazin kann daher als Maß für die Gesamtmenge Perphenazin *und* Perphenazinenantat herangezogen werden.

2.1.2.3.2.2 Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten

Um die quantitativen Messungen mit der größtmöglichen Sensitivität ausführen zu können, wurde die T_1 -Relaxationszeit der in Betracht zu ziehenden Wasserstoffe H11 und H21 bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen nach der Inversion-Recovery-Methode sind in Tabelle 2.1-10 zusammengefasst.

	Perphenazin		Perphenazinenantat	
	δ	T_1	δ	T_1
H-11	3.90 ppm	520 ms	3.87 ppm	290 ms
H-21	3.59 ppm	860 ms	4.18 ppm	660 ms
-CH₃			0.89 ppm	2440 ms

Tabelle 2.1-10: Zusammenfassung der ermittelten T_1 -Relaxationszeiten von Perphenazin und Perphenazinenantat.

Da die Integrale verschiedener Signale miteinander verglichen werden sollten, darunter auch das der endständigen Methylgruppe des Perphenazinesters, wurde zur Berechnung des Abstandes zwischen zwei Wiederholmessungen die T_1 -Zeit dieser Gruppe herangezogen. Mit der 7fachen T_1 -Zeit ergibt sich also als Impulsabstand eine Zeit von 12,5 Sekunden.

2.1.2.3.2.3 Bestimmung von Perphenazin in Perphenazinenantat und von Perphenazinenantat in Perphenazin

Es sollte eine Einschätzung des quantifizierbaren Anteils Perphenazinenantat in Perphenazin sowie des Anteils Perphenazin in Perphenazinenantat in einer Messreihe gewonnen werden. Hierzu wurden insgesamt 15 verschiedene Mischlösungen aus Stammlösungen mit Perphenazin und Perphenazinenantat hergestellt, die den gesamten Bereich von reinem Ester bis hin zum reinen Alkohol abdeckten.

Die Anteile in den unterschiedlichen Lösungen sind in Abbildung 2.1-20 dargestellt. Die Gesamtkonzentration Perphenazin zusammen mit dem Ester betrug in allen Lösungen etwa 50 mM in einem Volumen von 650 µl Chloroform-d₁, entsprechend einer Gesamtmasse der beiden Substanzen von etwa 13 bis 15 mg, je nach dem Anteil des schwereren Enantats.

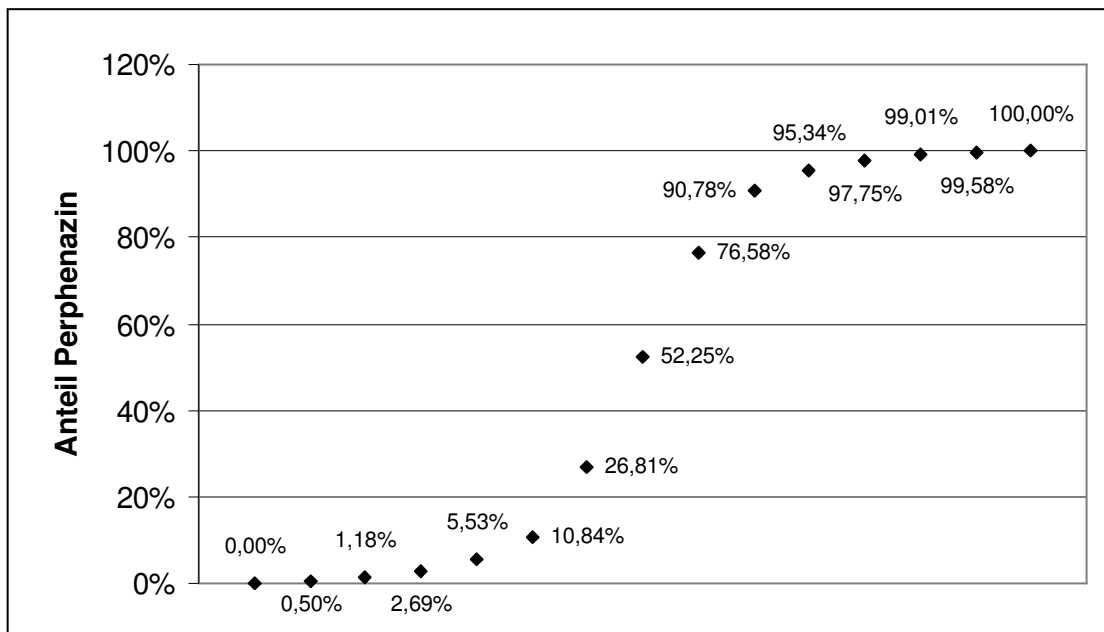


Abbildung 2.1-20: Tatsächliche Anteile Perphenazin (bezogen auf die Summe der Stoffmengen von Perphenazin und Perphenazinenantat) in den untersuchten Lösungen

Aus diesen Daten sollten nun die Bestimmungs- und die Nachweisgrenze sowohl für den freien Alkohol im Ester als auch für den Ester im Alkohol gefunden werden. Dazu wurden die gefundenen Gehalte mit den tatsächlichen verglichen. In Tabelle 2.1-11 sind unterschiedliche Vergleichsmethoden zur Bestimmung des freien Perphenazins im Enantat einander gegenübergestellt.

Ist-Gehalt Perphenazin	Signal von H21 des freien Alkohols bezogen auf							
	ges. Aromatenregion		H11 Ester + H11 Alkohol		H21 Ester + H21 Alkohol		Methylgruppe	
	gefunden	Differenz	gefunden	Differenz	gefunden	Differenz	gefunden	Differenz
0,00%	0,00%	0,00 [%]	0,00%	0,00 [%]	0,00%	0,00 [%]	0,00%	0,00 [%]
0,50%	0,00%	-0,50 [%]	0,00%	-0,50 [%]	0,00%	-0,50 [%]	0,00%	-0,50 [%]
1,18%	2,72%	1,54 [%]	2,79%	1,61 [%]	2,65%	1,47 [%]	2,64%	1,47 [%]
2,69%	2,93%	0,25 [%]	3,15%	0,46 [%]	3,03%	0,35 [%]	3,01%	0,32 [%]
5,53%	4,40%	-1,13 [%]	4,75%	-0,77 [%]	4,54%	-0,99 [%]	4,45%	-1,07 [%]
10,84%	8,92%	-1,92 [%]	9,56%	-1,28 [%]	9,24%	-1,60 [%]	9,26%	-1,58 [%]

Tabelle 2.1-11: Gefundene Anteile (in %) an Perphenazin in den Mischungen aus Perphenazin und Perphenazinenantat sowie die Differenzen zum tatsächlichen Wert in %-Punkten. Für die Berechnungen wurde jeweils die Signalintensität für Proton H21 von Perphenazin mit unterschiedlichen Signalintensitäten (bzw. Summen von Signalintensitäten) verglichen. H11 ist das zusammenfallende Gesamtsignal beider Verbindungen, H21 die Summe der Signale der beiden einzelnen Verbindungen.

Verglichen wurde stets das Signal von H21 des freien Perphenazins mit unterschiedlichen anderen Signalen. Dies waren: das Gesamtintegral aller aromatischen Wasserstoffe (also von beiden Substanzen); das zusammenfallende Signal der H11 beider Substanzen; die Summe der beiden Signale von H21; das Signal der Methylgruppe des Esters. In der Tabelle sind jeweils der wiedergefundene Anteil Perphenazin, als Anteil in Prozent ausgedrückt, sowie die Abweichung in %-Punkten zum tatsächlichen Anteil angegeben. Bei allen Berechnungsmethoden kann erst auf der 1,18% Perphenazin enthaltenden Stufe dieses gefunden werden. Die Nachweisgrenze liegt daher bei der bei dieser Lösung eingesetzten Perphenazin-Konzentration von 0,2 mg/ml. Auf dieser Stufe beträgt der aus dem Integralen errechnete Anteil Perphenazin mehr als das Doppelte des tatsächlichen, bei den höheren Stufen liegt diese Abweichung bei etwa einem Prozentpunkt. Die Bestimmungsgrenze liegt somit bei der 2,69%-Stufe (0,50 mg/ml). Bei den höheren Anteilen (über 10%) zeigen sich größere Abweichungen vom tatsächlichen Gehalt, was im Wesentlichen auf Probleme bei der Korrektur der Basislinie und der Integrale zurückzuführen ist (vgl. Kapitel 1.2.3.8). Stellt man grafisch die Wiederfindung dar (Abbildung 2.1-21), so kann man ebenfalls sehr gut sehen, dass der Anteil Perphenazin im Gemisch mit dem Ester gut wiedergefunden werden kann.

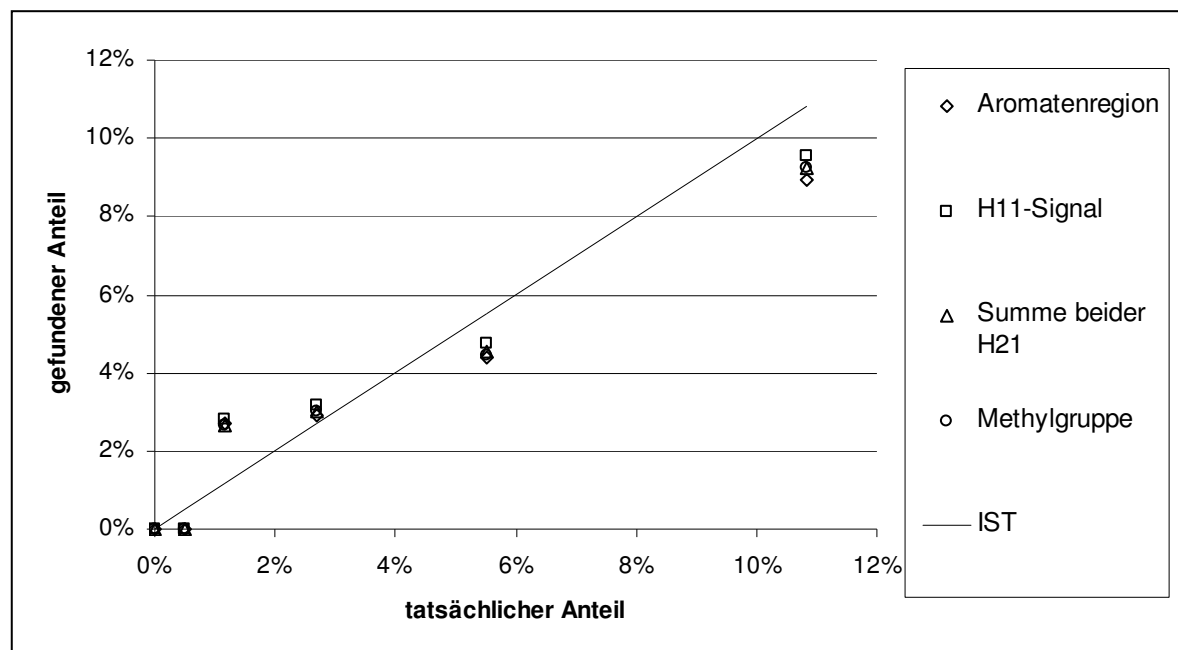


Abbildung 2.1-21: Gefundene Anteile an Perphenazin in den Mischungen aus Perphenazin und Perphenazinenantat. Aufgetragen sind die gefundenen Anteile der Proben nach den unterschiedlichen Berechnungsmethoden (vgl. Tabelle 2.1-11) sowie die Ist-Werte als Gerade.

<i>Ist-Gehalt Perphenazin- enantat</i>	<i>Signal von H21 des Esters bezogen auf</i>				<i>Signal der Methylgruppe bezogen auf</i>			
	<i>ges. Aromatenregion</i>		<i>H11 Ester + H11 Alkohol</i>		<i>ges. Aromatenregion</i>		<i>H11 Ester + H11 Alkohol</i>	
	<i>gefunden</i>	<i>Differenz</i>	<i>gefunden</i>	<i>Differenz</i>	<i>gefunden</i>	<i>Differenz</i>	<i>gefunden</i>	<i>Differenz</i>
0,00%	1,50%	1,50 [%]	1,60%	1,60 [%]	0,00%	0,00 [%]	0,00%	0,00 [%]
0,42%	1,72%	1,29 [%]	1,83%	1,41 [%]	0,87%	0,44 [%]	0,92%	0,50 [%]
0,99%	2,21%	1,23 [%]	2,37%	1,38 [%]	1,15%	0,16 [%]	1,23%	0,24 [%]
2,25%	3,22%	0,97 [%]	3,44%	1,19 [%]	3,36%	1,10 [%]	3,59%	1,33 [%]
4,66%	5,59%	0,93 [%]	5,98%	1,32 [%]	5,11%	0,45 [%]	5,47%	0,81 [%]
9,22%	10,69%	1,47 [%]	11,38%	2,16 [%]	9,72%	0,51 [%]	10,36%	1,14 [%]

Tabelle 2.1-12: Gefundene Anteile (in %) an Perphenazinenantat in den Mischungen aus Perphenazin und Perphenazinenantat sowie die Differenzen zum tatsächlichen Wert in %-Punkten. Für die Berechnungen wurde jeweils entweder die Signalintensität von Proton H21 oder der endständigen Methylgruppe von Perphenazinenantat mit dem Gesamtintegral aller aromatischen Wasserstoffe oder dem zusammenfallenden Gesamtsignal der H11 beider Verbindungen verglichen.

Auf entsprechendem Weg sollten diese Grenzen auch für den Anteil Perphenazinenantat in Perphenazin gefunden werden. In Tabelle 2.1-12 sind wiederum die gefundenen Anteile Perphenazinenantat den tatsächlichen gegenübergestellt. Es wurden auch hier verschiedenen Berechnungsmethoden miteinander verglichen. Als Größe für die Menge Perphenazinenantat wurden sowohl die Signalintensitäten von H21 des Esters als auch die der endständigen Methylgruppe herangezogen. Diese beiden Signale wurden jeweils einerseits mit dem Gesamtintegral der Aromatenregion und andererseits mit dem gemeinsamen Signal der Wasserstoffe H11 des Esters und des freien Perphenazins verglichen. Analog zu den oben ausgeführten Überlegungen liegt die Nachweisgrenze für Perphenazinenantat unterhalb der geringsten betrachteten Konzentration (0,11 mg/ml), die Bestimmungsgrenze für die Auswertung durch den Vergleich der Integrale der Methylgruppe mit dem Signal der H11-Wasserstoffe beider Substanzen bei 0,25 mg/ml (0,99%-Stufe). Grafisch ist dies in Abbildung 2.1-22 dargestellt.

Wie in dieser Abbildung zu sehen, liegen die gefundenen Anteile Perphenazinenantat bei allen vier benutzten Berechnungsmethoden stets oberhalb des tatsächlichen Anteils. Im der Monographie für Perphenazin des Europäischen Arzneibuches [64] werden verwandte Substanzen dünnschichtchromatographisch auf jeweils maximal 0,5% begrenzt. In dem Analysenzertifikat der benutzten Perphenazin-Charge sind entsprechend der Monographie diese Verunreinigungen nicht genauer spezifiziert oder quantifiziert. Da sich die chemischen Verschiebungen der Wasserstoffe in der Seitenkette bei den häufig auftretenden Abbauprodukten durch Oxidation nicht ändern, werden möglicherweise diese hier, im Gegensatz zu der dem Analysenzertifikat zugrunde liegenden Methode, mit erfasst. Die Abweichungen können auf derartige

Verunreinigungen zurückgeführt werden, die auf diese Weise einen erhöhten Anteil des Enantats vortäuschen.

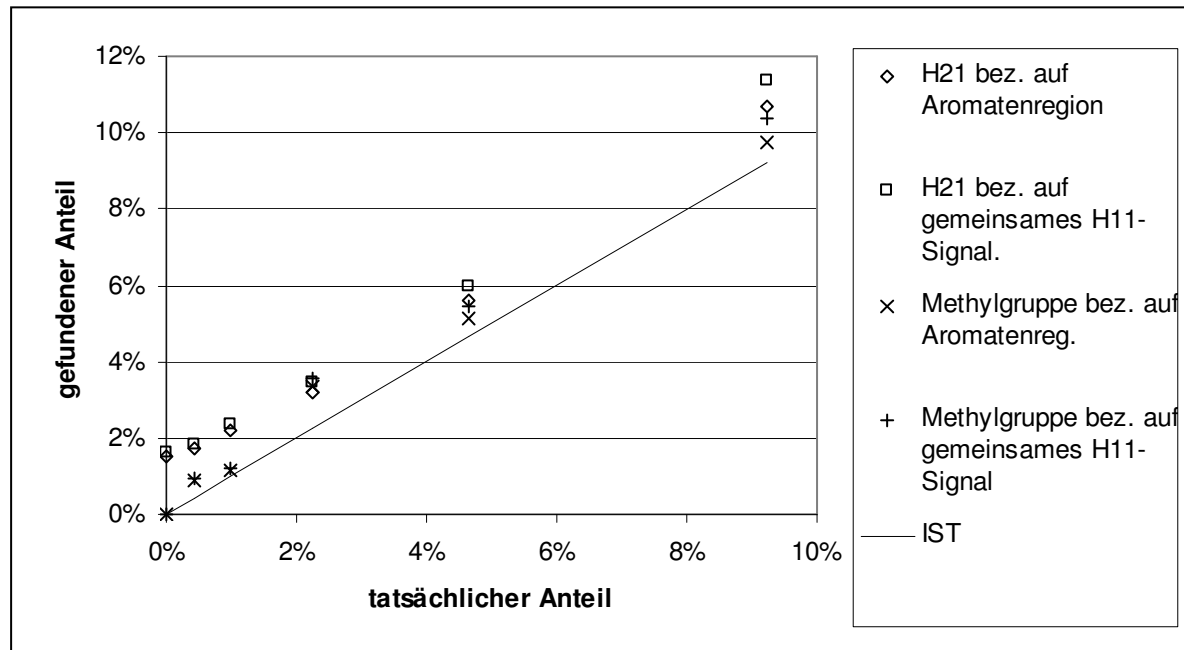


Abbildung 2.1-22: Gefundene Anteile an Perphenazinenantat in den Mischungen aus Perphenazin und Perphenazinenantat. Aufgetragen sind die gefundenen Anteile der Proben nach den unterschiedlichen Berechnungsmethoden (vgl. Tabelle 2.1-12) sowie die Ist-Werte als Gerade.

Aufgrund des möglichen Abbaus von Perphenazinenantat durch Esterhydrolyse ist die Bestimmung von Perphenazin im Ester von größerer Bedeutung als umgekehrt. Die für diese Untersuchung benutzten Berechnungsmethoden sind nicht alle gleich gut geeignet. Im Vergleich der Berechnungsmethoden sind aufgrund der Verunreinigung durch Oxidationsprodukte und des Verhältnisses der die Signale hervorrufenden Wasserstoffe (sieben für die Aromatenregion, zwei an Position 21) die Rechnungen, die auf die Aromatenregion Bezug nehmen, nicht gut geeignet. Im Vergleich der Abweichungen der tatsächlichen Anteile ist die Berechnung, die das Integral der H21-Wasserstoffe von Perphenazin mit der Summe der beiden Integrale der H21-Wasserstoffe von Perphenazin und Perphenazinantat vergleicht, schlechter als die anderen beiden.

2.1.2.3.2.4 Untersuchungen bei Raumtemperatur gelagerter Proben

Neun Monate später wurden diese Messungen wiederholt. Da die Bestimmung von Perphenazin in der veresterten Substanz von größerem Interesse ist als die Bestimmung von Perphenazinenantat in Perphenazin, wurden nur die ersten Messungen wiederholt. Berechnet werden die Anteile Perphenazin mit den beiden Me-

thoden, die sich als am besten erwiesen hatten, also dem Bezug des Integrals der Wasserstoffe an Position 21 des Perphenazins auf das Integral des Signals der endständigen Methylgruppe des Enantats bzw. auf das gemeinsame Signal der H11 beider Substanzen. Die Resultate sind in Abbildung 2.1-23 zusammengefasst. Die Wiederfindung liegt in einem ähnlichen guten Bereich wie bei den früher vermessenen Mischungen.

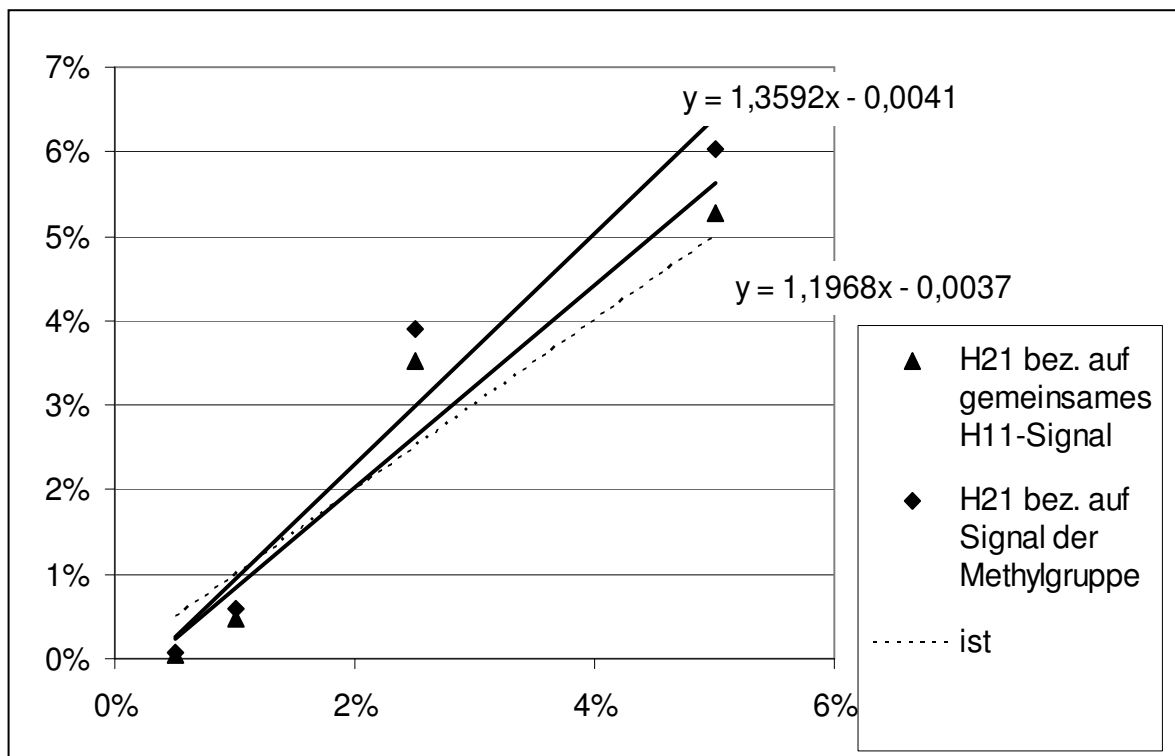


Abbildung 2.1-23: In den später vermessenen Proben gefundene Anteile Perphenazin in Mischungen aus Perphenazin und Perphenazinenantat. Angegeben sind die die Anteile Perphenazin, berechnet aus dem Integral des Signals von H21 bezogen auf des gemeinsame, überlappende Signal der beiden H11 oder bezogen auf das Signal der Methylgruppe des Esters sowie gegen die tatsächlichen Anteile, sowie die ist-Werte.

Die zu kleinen berechneten Anteile bei den beiden unteren Messpunkten (0,5%, 0,13mg/ml bzw. 1,0%, 0,26mg/ml) können durch die manuelle Integrationsweise erklärt werden. Bei diesen Mischungen wurde häufig als Integralwert „0“ angenommen, da die kleinen sichtbaren Signale Abbauprodukten zugeschrieben wurden und nicht den tatsächlich Gesuchten. Abbildung 2.1-24 zeigt exemplarisch den Bereich um das Signal von H21 des Perphenazins in einer etwa 5% Perphenazin beinhalteten Probe herum. Wie man sieht, liegen hier auch noch andere kleinere Signale in etwa gleicher Größe, so dass eine gute Integration dieses Signals sehr schwierig ist.

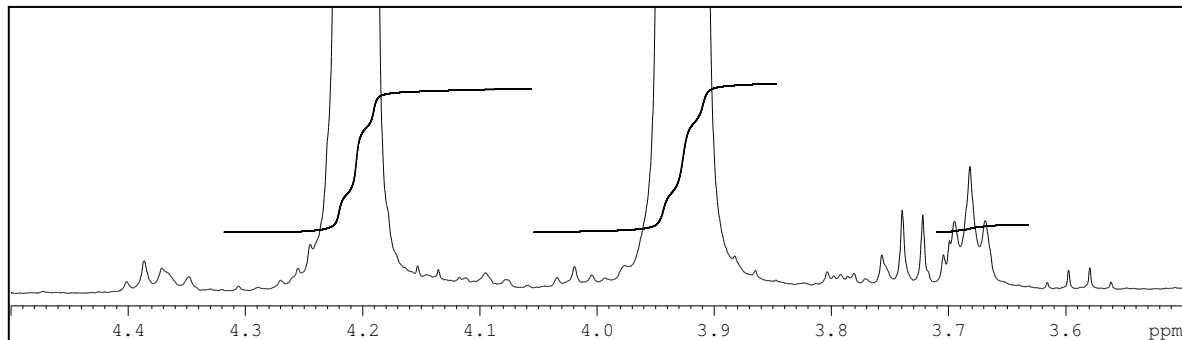


Abbildung 2.1-24: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum einer Mischung mit etwa 5% Perphenazin und 95% Perphenazinenantat mit dem Bereich der Signale der Protonen H11 und H21 beider Verbindungen.

Es ist davon auszugehen, dass dadurch, dass bei manchen Proben die kleinen Signale ausschließlich Verunreinigungen zugeschrieben wurden, auch das H21 des Perphenazins zugehörige Signal ignoriert wurde. Eine erneute Integration, die versucht, diese Fehler zu korrigieren, erscheint wenig zielführend, da die Entscheidung über die Integrationsgrenzen in einem solchen Fall außerordentlich stark vom Benutzer abhängig ist. Insgesamt steht dies in Übereinstimmung mit dem früheren Messungen, bei denen die Bestimmungsgrenze in vergleichbarer Größenordnung festgestellt wurde.

2.1.2.3.3 Oxidationsprodukte

Perphenazin ist wie alle Phenothiazine sehr empfindlich gegenüber Licht und Sauerstoff. Die typische Abbaureaktion ist eine Oxidation des Schwefel im Phenothiazinring über das Sulfoxid zum Sulfon [65]. Dies führt zu einer deutlichen Verschiebung der Signale im Aromatenbereich. Wie Abbildung 2.1-25 zeigt, finden sich bei den Oxidationsprodukten Signale bei chemischen Verschiebungen, an denen im Spektrum der Reinsubstanz keine Signale gefunden werden können. Aufgrund dieser zusätzlich auftauchenden Signale kann daher eine qualitative Beurteilung über den Abbau getroffen werden. Inwiefern auch eine Aussage über *Grad* des Abbaus, eine quantitative Aussage somit, getroffen werden kann, wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht.

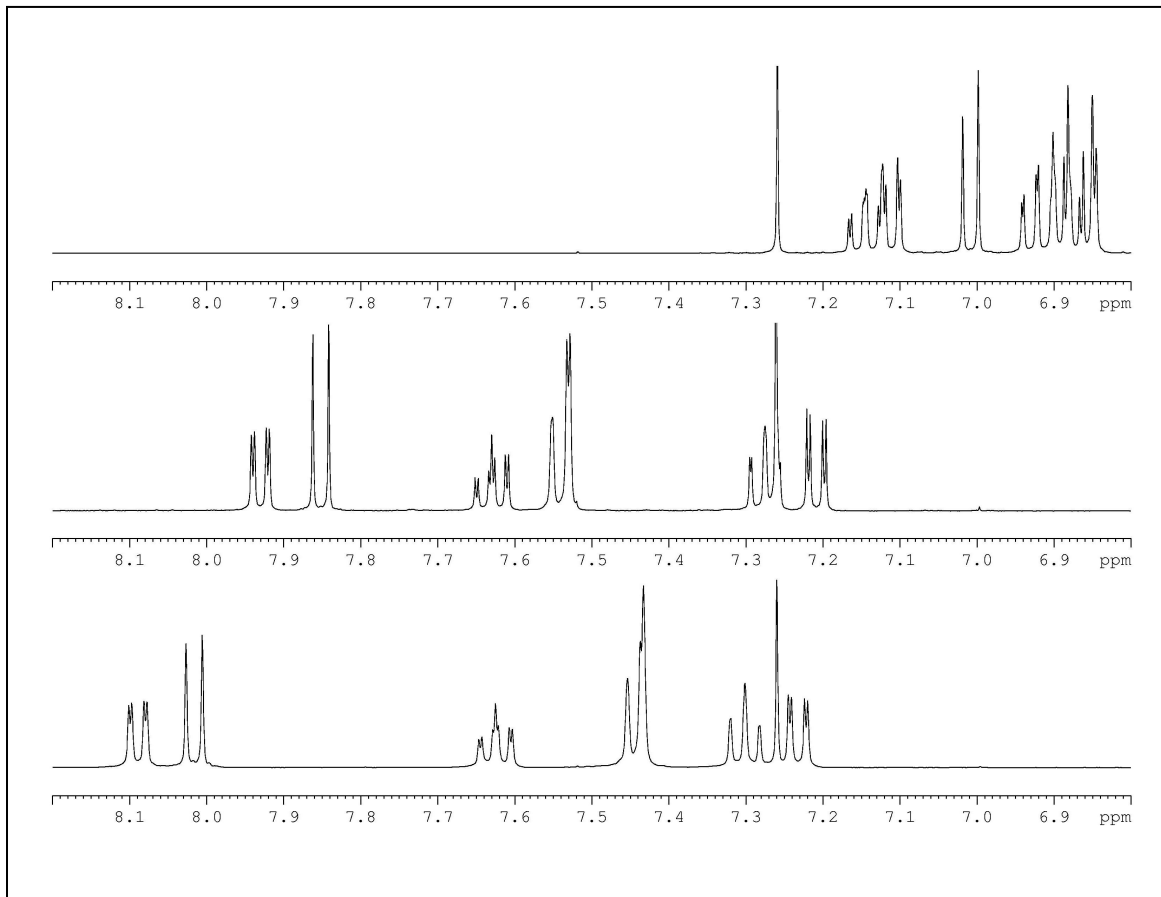


Abbildung 2.1-25: Ausschnitt aus den ¹H-NMR-Spektren (400 MHz, jeweils Bereich der aromatischen Wasserstoffe) von Perphenazin (oben), Perphenazinsulfoxid (Mitte) und Perphenazinsulfon (unten).

2.1.2.4 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zeigen am Beispiel des Perphenazins die grundsätzliche Eignung der NMR-Spektroskopie zum Einsatz in der Reinheitsanalytik von Phenothiazinen.

Es kann mit der NMR-Spektroskopie der Abbau der Depotform Perphenazinenantat durch Esterhydrolyse zum freien Perphenazin beobachtet werden. Der Anteil an entstandenem bzw. überhaupt vorhandenem Perphenazin kann durch Vergleich der Integrale von *eindeutig* dem Ester bzw. dem freien Perphenazin zuzuordnenden Signalen bestimmt werden. Als geeignet erwiesen haben sich hierfür zum einen das Signal von H₂₁ des Perphenazins und zum anderen das Signal der endständigen Methylgruppe des Enantats. Alternativ zu dem Signal der Methylgruppe kann auch das zusammenfallende Signal der Wasserstoffe an Position 11 der beiden Substanzen herangezogen werden. Der Bezug auf die Aromatenregion

ist nicht geeignet. Im diesem Bereich sind nicht nur die Signale der aromatischen Wasserstoffe von Perphenazinenantat und Perphenazin, sondern auch die anderer Verunreinigungen zu finden, die dadurch mit erfasst würden. Die auf diese Weise erhaltenen Werte geben daher nicht den Anteil durch Hydrolyse abgebauten Perphenazinenantats wieder.

Die Aromatenregion kann allerdings herangezogen werden zur Beurteilung des Abbaus durch Oxidation. Diese für alle Phenothiazine typische Abbaureaktion führt zu einer sehr deutlichen Änderung der chemischen Umgebung für die Wasserstoffe des Phenothiazinrings und so zu verschobenen Signalen dieser. Diese Verschiebungen, die sich im Spektrum als „zusätzliche“ Signale darstellen können zur Beurteilung des Oxidationszustandes benutzt werden.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Perphenazin bzw. Perphenazinenantat mit weiteren Phenothiazin-Neuroleptika bzw. deren Depotform als Ester mit Fettsäure kann sich die NMR-Spektroskopie auch zur Reinheitskontrolle anderer Phenothiazine eignen.

2.1.3 Chinin und Chinidin

2.1.3.1 Gewinnung

Bis heute wurden rund 30 verschiedene, chemisch aber sehr ähnliche Alkaloide aus der Rinde von *Cinchona pubescens* und deren Varietäten isoliert. Chinin und Chinidin sind die prominentesten Vertreter dieser und haben eine immer noch große Bedeutung in der Malariatherapie und bei der Behandlung von Arrhythmien.

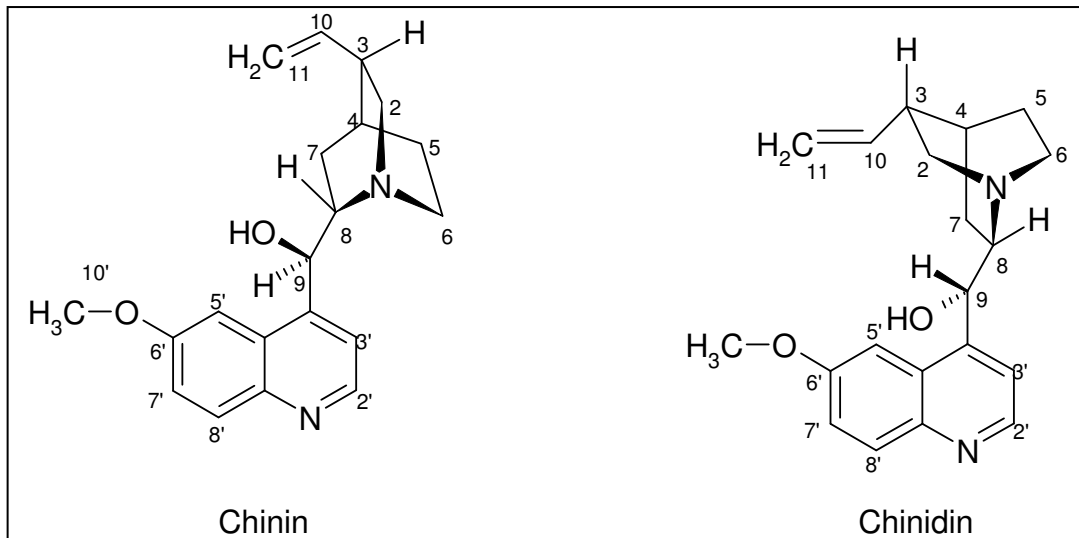


Abbildung 2.1-26: Strukturformeln von Chinin und Chinidin. Die beiden Diastereomere unterscheiden sich nur in der Konfiguration an Position 8 und 9.

Die Strukturformeln der beiden Substanzen sind in Abbildung 2.1-26 dargestellt. Die Bezifferung nimmt Bezug auf die beiden Molekülteile, den aromatischen Chinolinteil und den Chinuclidinring. Die beiden Diastereomere unterscheiden sich lediglich in der Konfiguration an Position 8 und 9: Chinin ist (8*S*, 9*R*)-6'-Methoxycinchonan-9-ol und Chinidin (8*S*, 9*R*)-6'-Methoxycinchonan-9-ol.

Chinaalkaloide können aus einer wässrigen, alkalischen Suspension von Chinarinde mit aromatischen Kohlenwasserstoffen extrahiert werden. Chinarinde enthält zwischen 0,8 und 4,0 % Chinin sowie zwischen 0,02 und 0,4 % Chinidin. Insgesamt sind in Chinarinde 5 bis 15 % Alkaloide enthalten [66]. Um aus diesem Gemisch Chinin zu isolieren werden die Rohalkaloide in die Sulfate überführt und anschließend fraktioniert mit Natronlauge gefällt und gereinigt [67]. Auf diese Weise erhält man Chinin als weißes, feinkristallines Pulver, das einen charakteristischen bitteren Geschmack aufweist. Eine Totalsynthese wurde bereits 1977 be-

schrieben, jedoch wird die Hauptmenge des sich im Handel befindlichen Chinins weiterhin aus Drogenmaterial extrahiert [68, 69].

Chinidin kann auf die gleiche Weise gewonnen werden. Die auf diese Weise verfügbare Menge reicht jedoch nicht aus, daher wird auf eine halbsynthetische Gewinnung aus Chinin zurückgegriffen. Chinin wird dazu mit Benzophenon zum Aminoketon oxidiert und mit Isopropanol/Methanolat zu dem Epimerengemisch aus Chinidin und Chinin reduziert. Auch hier erhält man nach entsprechender Aufarbeitung reines Chinidin [70]. Die Totalsynthese hat keine Bedeutung [71, 72, 73, 74].

2.1.3.2 Pharmakologie

Obwohl Chinin und Chinidin zueinander epimer sind, haben sie wie bereits oben erwähnt eine unterschiedliche Wirkung: während Chinin als Malariamittels eingesetzt wird, dient Chinidin als Antiarrhythmikum. Jedoch sind diese beiden Wirkkomponenten nicht vollständig voneinander zu trennen. Das Antiarrhythmikum Chinidin besitzt auch eine antiplasmodiale Wirkung, und ebenso besitzt das Malariamittel Chinin eine antiarrhythmische Wirkkomponente.

2.1.3.2.1 Chinin

Nach wie vor ist die Malaria eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten. Die Erreger der Malaria, verschiedene Plasmodium-Spezies, durchlaufen einen komplexen Entwicklungszyklus. Von der weiblichen Anophelesmücke als Überträger werden die Sporozoiten beim Stich in die menschliche Blutbahn übertragen. Im Infizierten verläuft dann die weitere Entwicklung in zwei Stufen. In der ersten bilden sich in der Leber so genannte „Gewebs-Schizonten“ und Merozoiten, die in die Blutbahn zurückgelangen. Diese entwickeln sich dann in der zweiten Stufe in den Erythrozyten weiter zu „Blut-Schizonten“ und können als Gametozyten durch einen erneuten Stich wieder in die weibliche Anophelesmücke zurückgelangen. Dort erfolgt die geschlechtliche Weiterentwicklung. Auf das klinische Krankheitsbild soll hier nicht weiter eingegangen werden.

Die Therapie der Malaria kann auf verschiedenen Stufen erfolgen. Ziele der verschiedenen Chemotherapeutika sind sowohl Gewebs-Schizonten, Blut-Schizonten als auch Gametozyten [75].

Chinin war über drei Jahrhunderte lang das einzige Mittel zur Therapie der Malaria. Seit Beginn des 17. Jahrhunderts wurde ein Auszug aus der Chinarinde eingesetzt, seit 1820 ist die Reindarstellung bekannt. Seit den 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts gibt es weitere, synthetische Malaria-Therapeutika, insbesondere Chloroquin. Diese haben den Einsatz von Chinin weit zurückgedrängt. Aufgrund des Auftretens von Chloroquin-resistenten Stämmen wird heute jedoch wieder vermehrt Chinin eingesetzt. Chinin wirkt auf die Blut-Schizonten. Allerdings gibt es mittlerweile auch Chinin-resistente Stämme. Indiziert ist es bei schweren Malariaformen, insbesondere bei Chloroquin-resistenten Stämmen und wird dann in der Regel in Kombination mit Doxycyclin eingesetzt [76].

Die Nebenwirkungen sind bei allen Chinaalkaloiden weitgehend gleich. Das Vergiftungsbild wird als „Cinchonismus“ bezeichnet. Sehr häufig treten gastrointestinale Beschwerden, wie Oberbauchbeschwerden und Diarrhoe, oft von Übelkeit begleitet auf. Schwerwiegender sind die neurotoxischen Erscheinungen, die sich in Seh- und Hörstörungen äußern. Insbesondere Tinnitus tritt auf. Zu dem komplexen Vergiftungsbild kommen meist noch Kopfschmerzen, Schwindel und Übelkeit hinzu, Delirien sind möglich.

2.1.3.2.2 Chinidin

Grundsätzlich kann man Herzrhythmusstörungen in bradykarde, also solche mit einer zu *geringen* Frequenz und in tachykarde, ein zu *schnelles* Schlagen, unterscheiden. Während bradykarde Rhythmusstörungen vorwiegend mit der Implantation von Schrittmachern unterdrückt werden, werden tachykarde Rhythmusstörungen medikamentös behandelt. Die Ursachen tachykarder Rhythmusstörungen sind vielfältig und eine ausführliche Erläuterung würde den Rahmen dieses Kapitels sprengen. Auch bei der Therapie gibt es verschiedene Ansätze und sehr unterschiedliche Arzneistoffgruppen [77]. Die früher gebräuchliche Einteilung in vier Wirkungsklassen (nach Vaughan-Williams) ist heute allerdings überholt.

Chinidin blockiert den schnellen Natriumeinstrom in den Herzmuskelzellen. Zusätzlich besitzt Chinidin auch einen anticholinergen Effekt, der die direkten Chinidin-Wirkungen antagonisiert. So kann nach Gabe von geringen Mengen Chinidin die Herzfrequenz *zunehmen*. In hohen Dosen dagegen blockiert Chinidin die Überleitung im Atrioventrikulär-Knoten [78]. Die Nebenwirkungen von Chinidin sind die gleichen wie bei Chinin und wurden dort bereits beschrieben.

2.1.3.3 Quantifizierung

2.1.3.3.1 Überblick über vorhandene Methoden

Im Europäischen Arzneibuch ist für beide Substanzen (Chinidin als Chinidinsulfat, Chinin als Chininhydrochlorid und als Chininsulfat) eine HPLC-Methode zur Prüfung auf „andere China-Alkaloide“ vorgeschrieben. Dabei wird Dihydrochinidin in Chinidin auf 15%, Dihydrochinin in Chinin auf 10%, Cinchonin und Cinchonidin auf jeweils 5% und alle weiteren Chinaalkaloide auf jeweils 2,5% limitiert [79, 80]. In den früheren Arzneibüchern, namentlich im DAB 9, war eine DC-Prüfung vorgeschrieben, die jedoch deutlich problematischer war als die jetzige HPLC-Prüfung. Darüber hinaus wurden in Literatur zahlreiche verschiedene Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Chinaalkaloiden beschrieben. Einen Überblick über chromatographische (HPLC, DC, GC) und kapillarelektrophoretische (CE, CEC) Methoden sowie über Extraktions- bzw. Reinigungsmethoden gibt ein 2000 veröffentlichter Übersichtsartikel [81].

2.1.3.3.2 Ergebnisse der NMR-Messungen

2.1.3.3.2.1 *Spektrenzuordnung*

Um ^1H -NMR-Spektren quantitativ auswerten zu können, müssen diese vollständig zugeordnet sein. Für die quantitative Bestimmung von Chinin in Chinidin bzw. von Chinidin in Chinin wurden die beiden Substanzen (bzw. deren Salze, Chindinsulfat-Dihydrat und Chininhydrochlorid-Dihydrat) in Dimethylsulfoxid- d_6 vermessen. Die ^1H -NMR-Spektren sind in Abbildung 2.1-27 und Abbildung 2.1-28 gezeigt, die Zuordnung aller Signale ist Tabelle 2.1-13 gegeben. Während die Signale des Chinolinringes, der Vinylgruppe und der Wasserstoffe H8 und H9 recht eindeutig bestimmbar sind, sind die Signale des Chinuclidinringes schwerer zuzuordnen. Aufgrund starker Überlappungen sind die Kopplungskonstanten oft nicht bestimmbar.

Man sieht deutliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Wasserstoffe an den unterschiedlich konfigurierten Kohlenstoffen (Position 8 und 9), sowie klare Unterschiede in den Verschiebungen der Wasserstoffe an Position 11, der endständigen Methylengruppe. Die Integrale sind auch ausreichend weit von anderen Signalen entfernt, so dass diese zur Quantifizierung, zur Bestimmung des Anteils Chinidin in Chinin und umgekehrt, herangezogen werden können.

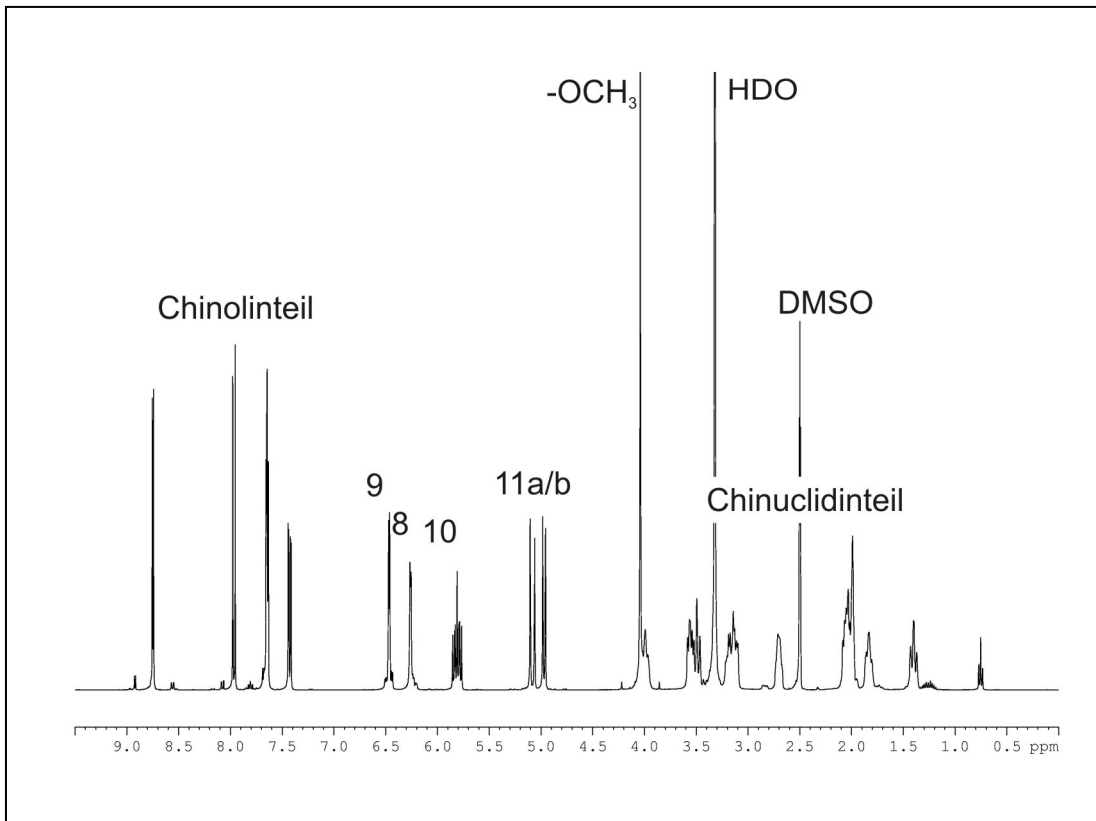


Abbildung 2.1-27: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von Chinin-Hydrochlorid in DMSO-d_6 .

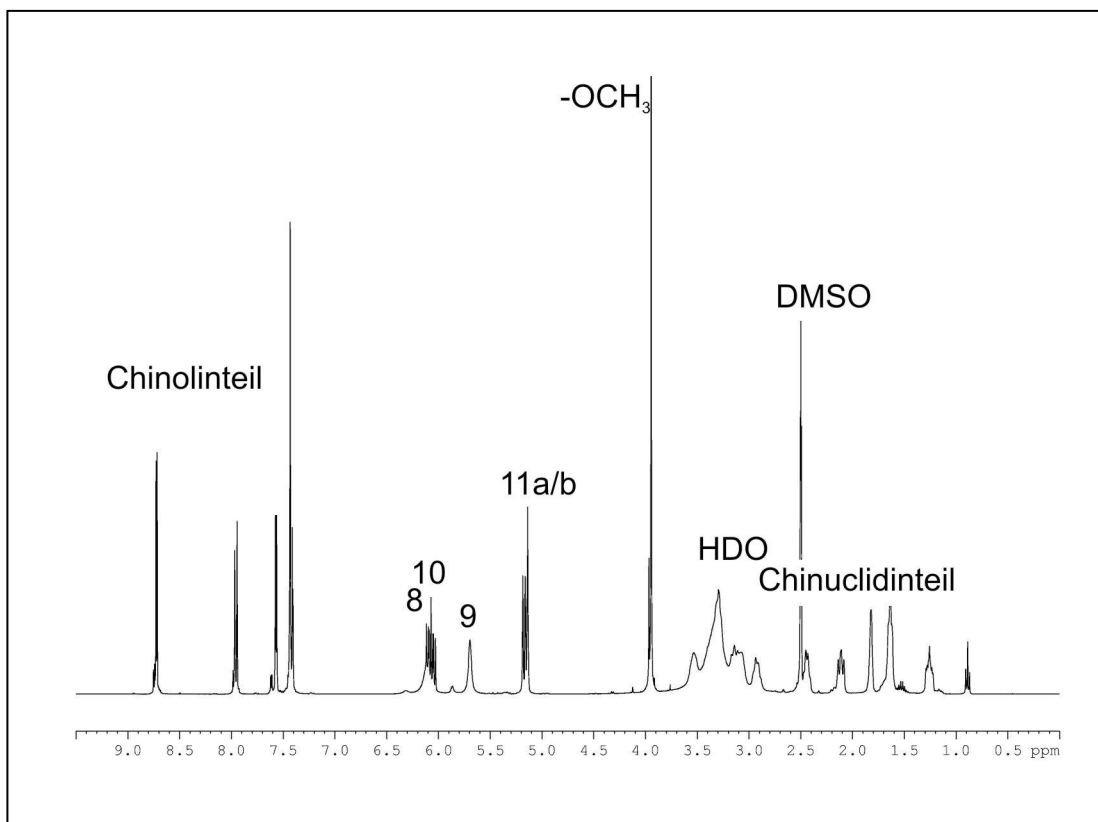


Abbildung 2.1-28: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von Chinidin-Sulfat in DMSO-d_6 . Die schlechte Auflösung ist auf das vorhandene Kristallwasser zurückzuführen.

Tabelle 2.1-13: Zuordnung der ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) von Chinidin und Chinin, gemessen jeweils bei 400 MHz in DMSO-d_6 .

Chinin-HCl * 2 H ₂ O			Chinidin * 1/2 H ₂ SO ₄ * H ₂ O	
Pos.	δ [ppm]	J [Hz]	δ [ppm]	J (Hz)
2'	8.75	d, 4.55	8.72	d, 4.55
3'	7.64	d, 4.55	7.58	d, 4.55
5'	7.67	d, 2.78	7.48	d, 2.78
7'	7.42	dd, 2.78 / 9.09	7.41	dd, 2.78 / 9.09
8'	7.96	d, 9.09	7.95	d, 9.09
10'	4.05	s	3.96	s
2a	3.47	d, 11s62	3.40	m
2b	3.16	m	3.14	m
4	2.02	m	2.13	m
5a	2.02	m	1.82	m
5b	1.84	m	1.65	m
6a/b	3.16	m	3.14	m
7a	3.54	m	3.61	m
7b	1.40	t, 11.87	1.21	m
8	6.29	d, 3.79	6.20	(s)
9	6.47	d, 3.79	5.80	(s)
10a/b	5.80	m	6.07	m
11a	5.08	17.18 (*)	5.15	18.44 (*)
11b	4.97	10.36 (*)	5.16	9.09 (*)

(*) es ist jeweils nur eine große Kopplung eines Dubletts eindeutig zu erkennen, die Signalstruktur macht aber deutlich, dass eine kleine, nicht aufgelöste Kopplung ebenfalls vorhanden ist.

2.1.3.3.2.2 Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten

Wie eingangs in Kapitel 1.2.3.5 erläutert ist es für optimale quantitative Auswertungen erforderlich, dass die Messungen mit einem 90° -Impulswinkel durchgeführt werden und der Abstand zwischen zwei Impulsen der T_1 -Relaxationszeit entsprechend angepasst wird. Daher wurden die T_1 -Relaxationszeiten der Wasserstoffe H11 sowohl von Chinidin als auch von Chinin ermittelt. Die T_1 -Relaxationszeiten dieser liegen zwischen 0,9 und 1,2 Sekunden. Als Abstand zwischen zwei Messungen wurde eine Zeit in Höhe der siebenfachen T_1 -Zeit, 8 Sekunden, gewählt.

2.1.3.3.2.3 Bestimmung von Chinin in Chinidin und von Chinidin in Chinin

Das Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war, eine qNMR-Methode zu entwickeln, die bei gleichen Bedingungen in der Lage ist, sowohl Chinin in Chinidin als auch Chinidin in Chinin zu bestimmen. Beide Bestimmungen sollten jeweils 2,5% Stoffmengenanteil des einen Isomers bei 97,5% des anderen Isomers quantifizieren können.

2.1.3.3.2.3.1 Bestimmung von LOD und LOQ

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde der Ansatz gewählt, dass der Anteil einer Chinin und Chinidin enthaltenden Lösung mit einer maximalen Abweichung von 5% wiedergefunden werden kann. Dazu wurde jeweils eine Lösung hergestellt, die die beiden Substanzen im Verhältnis 1:20 enthält. Diese Lösung wurde sukzessive im Sinne einer geometrischen Reihe verdünnt. Auf diese Weise bleibt das Verhältnis der beiden Substanzen zueinander gleich, die Konzentration beider nimmt jedoch ab. LOQ ist danach die Konzentration des niedriger konzentrierten Isomers in der Lösung, bei der die Abweichung des gefundenen Anteiles vom tatsächlichen die vorgegebene Grenze überschreitet. Die Nachweisgrenze (LOD) ist entsprechend die Konzentration des niedriger konzentrierten Isomers in der Lösung, in dieses noch nachgewiesen werden kann.

In beiden Fällen enthielt die Stammlösung etwa 100 mg/ml Chinin und Chinidin (in der Summe), davon jeweils etwa 1/20 des niedriger konzentrierten Isomers. Durch die Verdünnungsschritte wurden insgesamt jeweils neun Lösungen erhalten, die unter gleichen Bedingungen vermessen wurden. Die entsprechenden Signale der H11-Wasserstoffe wurden manuell integriert. In Abbildung 2.1-29 und Abbildung 2.1-30 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt.

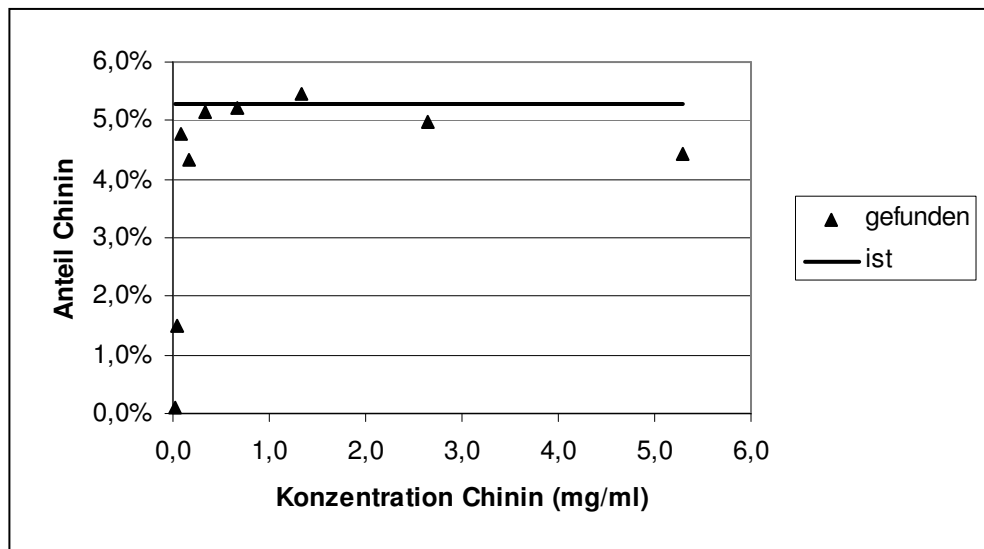


Abbildung 2.1-29: Gefundene Gehalte Chinin in den Lösungen zur Ermittlung von LOD und LOQ von Chinidin in Chinin. Angegeben sind der tatsächliche Anteil Chinin (ist) und der gefundene Anteil, dieser in Abhängigkeit von der absoluten Konzentration Chinin.

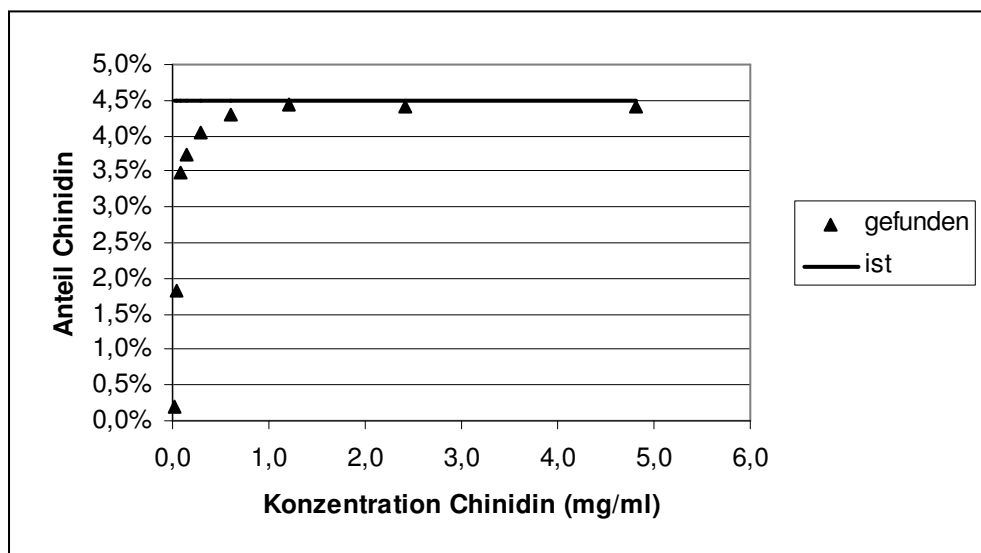


Abbildung 2.1-30: Gefundene Gehalte Chinidin in den Lösungen zu Ermittlung von LOD und LOQ von Chinidin in Chinin. Angegeben sind der tatsächliche Anteil Chinidin (ist) und der gefundene Anteil, dieser in Abhängigkeit von der jeweiligen absoluten Konzentration Chinidin.

Für die Bestimmung von Chinidin in Chinin liegen die Abweichungen vom tatsächlichen Anteil für die Lösungen mit 0,60 mg Chinidin je ml innerhalb der für LOQ vorgegebenen Grenzen. Für die umgekehrte Bestimmung gilt dies für die Lösungen mit 0,33 mg Chinin je ml und mehr. Aufgrund der Abstände zwischen den Messpunkten und dem Ziel, beide Bestimmungen mit gleichen Einwaagen durchführen zu können, kann für beide Bestimmungen mit einem LOQ von 0,5 mg/ml gearbeitet werden. Auch wenn die Methode dadurch etwas hinter den Möglichkei-

ten zurückbleibt, können so gleiche Messbedingungen für beide Bestimmungen formuliert werden.

In beiden Messreihen kann die niedriger konzentrierte Substanz bis zur geringsten Konzentration (etwa 0,02 mg/ml) nachgewiesen werden. Die Abweichung vom tatsächlichen Anteil liegt jedoch bei beiden Messreihen für die Lösung mit der jeweils geringsten Konzentrationen bei fast 100% und muss daher als Zufallsergebnis angesehen werden. Daher liegt die LOD in beiden Fällen bei 0,04 mg/ml. Auch bei den Messpunkten unterhalb der LOQ nehmen die ermittelten Anteile gegenüber den tatsächlichen deutlich ab. Dies liegt in der Hauptsache daran, dass das stets kleiner werdende Signal zunehmend durch Rauschen verfälscht wird. Eine Steigerung der Anzahl der Wiederholmessungen über 128 hinaus kann dies zwar verbessern, führt aber zu einer sehr deutlichen Verlängerung der Messzeit und ist deswegen nicht angebracht.

2.1.3.3.2.3.2 Hydrobasen (Dihydrochinin und Dihydrochinidin)

Bei den so genannten Hydrobasen ist die Vinylgruppe zur Ethylgruppe hydriert. Die Hydrobasen lassen sich nur sehr schwer von den Hauptalkaloiden abtrennen, was zu den oben erwähnten im Arzneibuch erlaubten Anteilen dieser Begleitalkaloide führt. Eine NMR-Methode zur Bestimmung des Anteils von Dihydrochinidin ist bereits 1988 publiziert worden [82]. Diese beruht auf einem Vergleich der Integrale der Signale von H9 (bei Dihydrochinidin identisch zu Chinidin) und H11 (nur bei Chinidin).

Die entsprechenden Messungen wurden auch für die beiden für diese Untersuchung benutzten Chinin- bzw. Chinidinproben durchgeführt. Es wurde auf diese Weise ein Anteil von 8,3% Dihydrochinin im Chinin bzw. 13,12% Dihydrochinidin im Chinidin gefunden, was in Übereinstimmung mit dem Analysenzertifikat ist. Diese werden bei der Berechnung der Gehalte der Messlösungen entsprechen berücksichtigt.

2.1.3.3.2.3.3 Ergebnisse der Quantifizierung

Für die Bestimmung des Anteils von Chinin als Verunreinigung in Chinidin und umgekehrt werden jeweils die Integrale der Signale der H11-Wasserstoffe der beiden Isomere miteinander verglichen (Abbildung 2.1-31).

2.1.3.3.2.3.3.1 *Chinidin in Chinin*

Zur Bestimmung von Chinidin in Chinin wurden Stammlösungen der beiden Substanzen hergestellt und so miteinander gemischt, dass fünf verschiedene Stufen mit unterschiedlichen Anteilen an Chinidin erhalten wurden. Der Anteil Chinidin sollte dabei bei 2,5% liegen, die Konzentration von Chinidin über 0,5mg/ml. Auf jeder Stufe wurden 3 Lösungen hergestellt und diese dann insgesamt dreimal (an drei Tagen) vermessen.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 2.1-14 tabellarisch und in Abbildung 2.1-33 grafisch zusammengefasst. Aus der Grafik ist zu erkennen, dass es kaum Unterschiede zwischen den drei getrennten Messreihen gibt. Auch lässt sich erkennen, dass es kaum Unterschiede zwischen den drei getrennt hergestellten und vermessenen Lösungen während der drei Messreihen gibt. Die geringe Wiederfindung bei der Messung M1 ist vermutlich auf Fehler beim Setzen der Integrationsgrenzen zurückzuführen. Der Vergleich der Mittelwerte aus allen Lösungen und Messungen einer Stufe mit dem tatsächlichen Anteil auf dieser Stufe zeigt, dass die Wiederfindung auf allen Stufen nie um mehr als rund 10% abweicht. Damit eignet sich diese Methode zur Bestimmung des Anteils von Chinidin in Chinin.

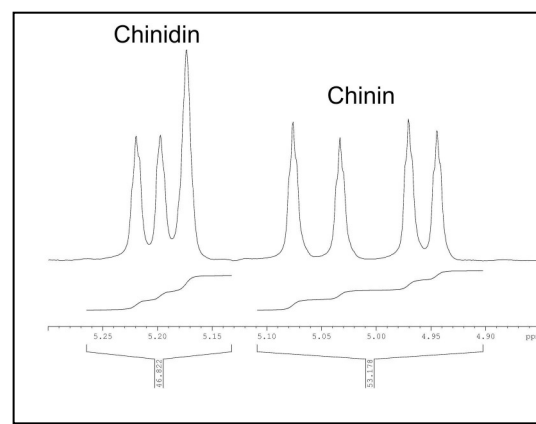


Abbildung 2.1-31: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, DMSO-d_6) einer Mischung von Chinin und Chinidin mit den H11-Wasserstoffen der beiden Verbindungen.

Stufe	ist-Anteil	gefundenener Anteil			Mittelwert	
		1. Mess.	2. Mess.	3. Mess.		
1	3,83%	3,33%	3,84%	3,90%	3,689%	Wiederfindung
		4,12%	4,59%	4,12%	4,277%	100,77%
		3,45%	3,87%	3,55%	3,625%	Standardabw.
		Mittelwert:	3,633%	4,099%	3,858%	3,863%
2	2,87%	2,27%	2,79%	2,37%	2,478%	Wiederfindung
		2,36%	2,64%	2,98%	2,661%	89,27%
		2,37%	2,75%	2,55%	2,558%	Standardabw.
		Mittelwert:	2,333%	2,729%	2,636%	2,566%
3	2,39%	1,95%	2,17%	2,34%	2,155%	Wiederfindung
		1,91%	2,22%	2,01%	2,046%	89,98%
		1,95%	2,40%	2,45%	2,264%	Standardabw.
		Mittelwert:	1,933%	2,262%	2,268%	2,155%
4	1,92%	1,82%	2,00%	1,89%	1,901%	Wiederfindung
		1,61%	1,83%	1,65%	1,697%	90,23%
		1,48%	1,51%	1,76%	1,587%	Standardabw.
		Mittelwert:	1,638%	1,782%	1,764%	1,728%
5	0,96%	0,64%	1,04%	1,12%	0,934%	Wiederfindung
		0,68%	1,08%	1,12%	0,961%	96,83%
		0,69%	0,96%	1,00%	0,886%	Standardabw.
		Mittelwert:	0,673%	1,028%	1,080%	0,927%

Tabelle 2.1-14: Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung des Gehaltes an Chinidin in Chinin.

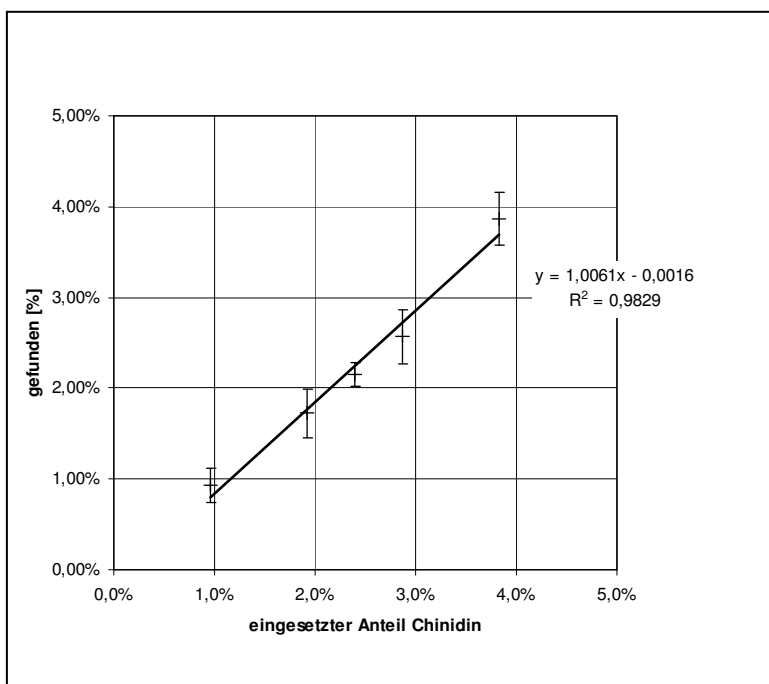


Abbildung 2.1-32:

Ausgleichsgerade der Messungen zur Bestimmung von Chinidin in Chinin.

Aufgetragen sind die Mittelwerte aller Bestimmungen gegen die tatsächlichen Anteile Chinidin sowie die Standardabweichungen.

Die ebenfalls angegebene Gleichung der Regressionsgeraden macht die gute Wiederfindung und Linearität deutlich.

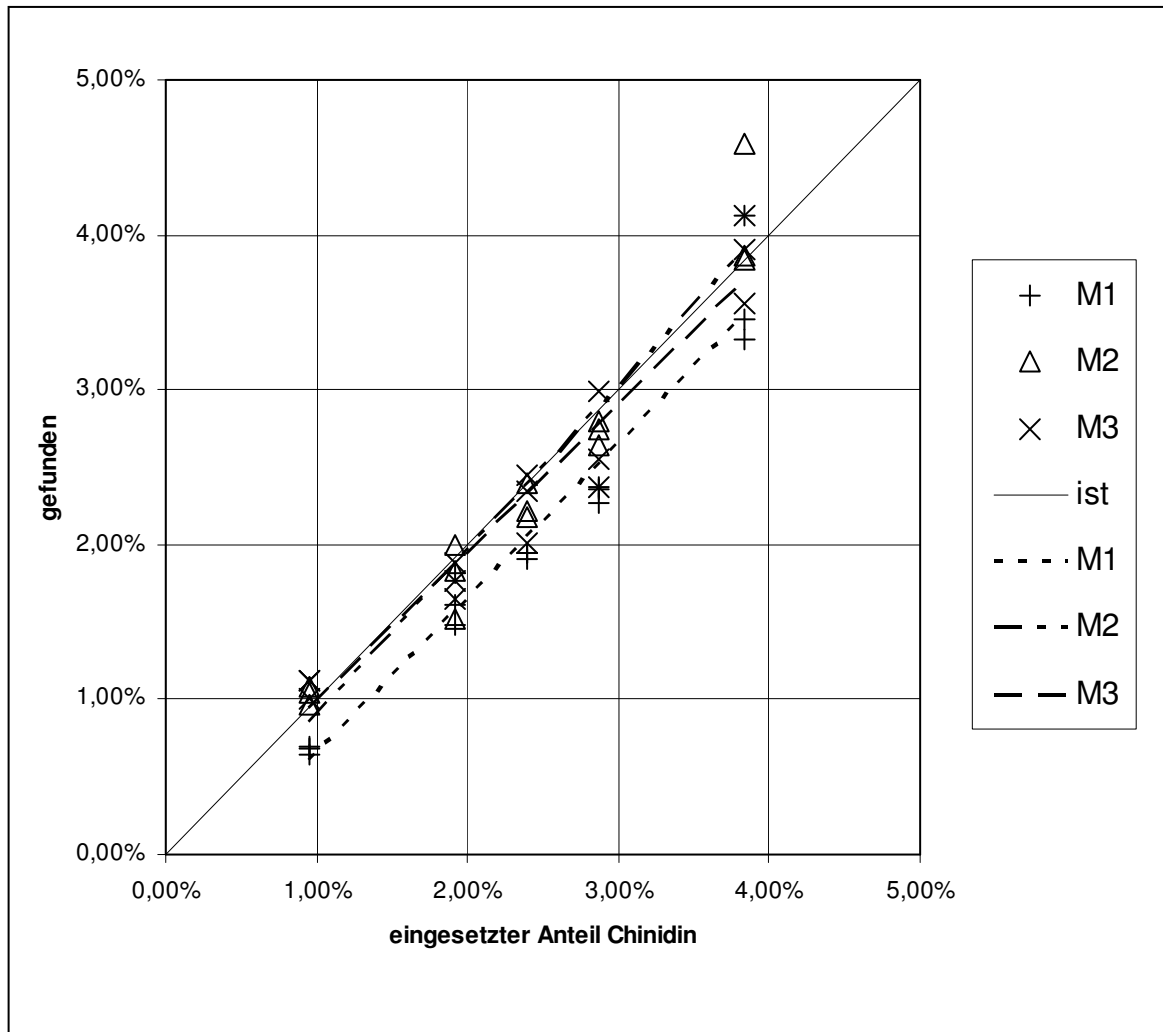


Abbildung 2.1-33: Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung des Gehaltes an Chinidin in Chinin. Abgebildet sind die gefundenen Anteile Chinidin gegen die tatsächlichen bei den drei Messungen (M1, M2, M3) sowie die dazugehörigen Ausgleichsgeraden und die Diagonale (Ist-Gehalt)

Trägt man die Ergebnisse aller Messungen gegen die tatsächlichen Gehalte auf, so kann man eine Regressionsgerade ermitteln, die die gute Wiederfindung über den untersuchten Bereich deutlich macht. Der geringe Achsenabschnitt und die Steigung, die sehr nahe bei 1 liegt, verdeutlichen dies. Die gute Linearität wird durch den Korrelationskoeffizienten von 0,983 bestätigt (Abbildung 2.1-32).

2.1.3.3.2.3.3.2 *Chinin in Chinidin*

In analoger Weise wurde die Quantifizierung von Chinin in Chinidin durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind tabellarisch in Tabelle 2.1-15 und grafisch in Abbildung 2.1-35 und Abbildung 2.1-34 dargestellt.

Auch hier bestehen keine Unterschiede zwischen den drei Messreihen. Das bedeutet, dass die spektroskopische Messung sehr gut reproduzierbar ist. Bei dieser Bestimmung weicht die Wiederfindung nur bei der niedrigstkonzentrierten Stufe um mehr als 10% ab. Der Chinin-Anteil liegt hier allerdings bei lediglich 1%. Auch hier sieht man, wenn die Ergebnisse aller Messungen gegen die tatsächlichen Gehalte aufgetragen werden, die gute Wiederfindung über den untersuchten Bereich. Dies wird durch den geringen Achsenabschnitt und die Steigung, die sehr nahe bei 1 liegt, verdeutlicht. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,991 und bestätigt die gute Linearität.

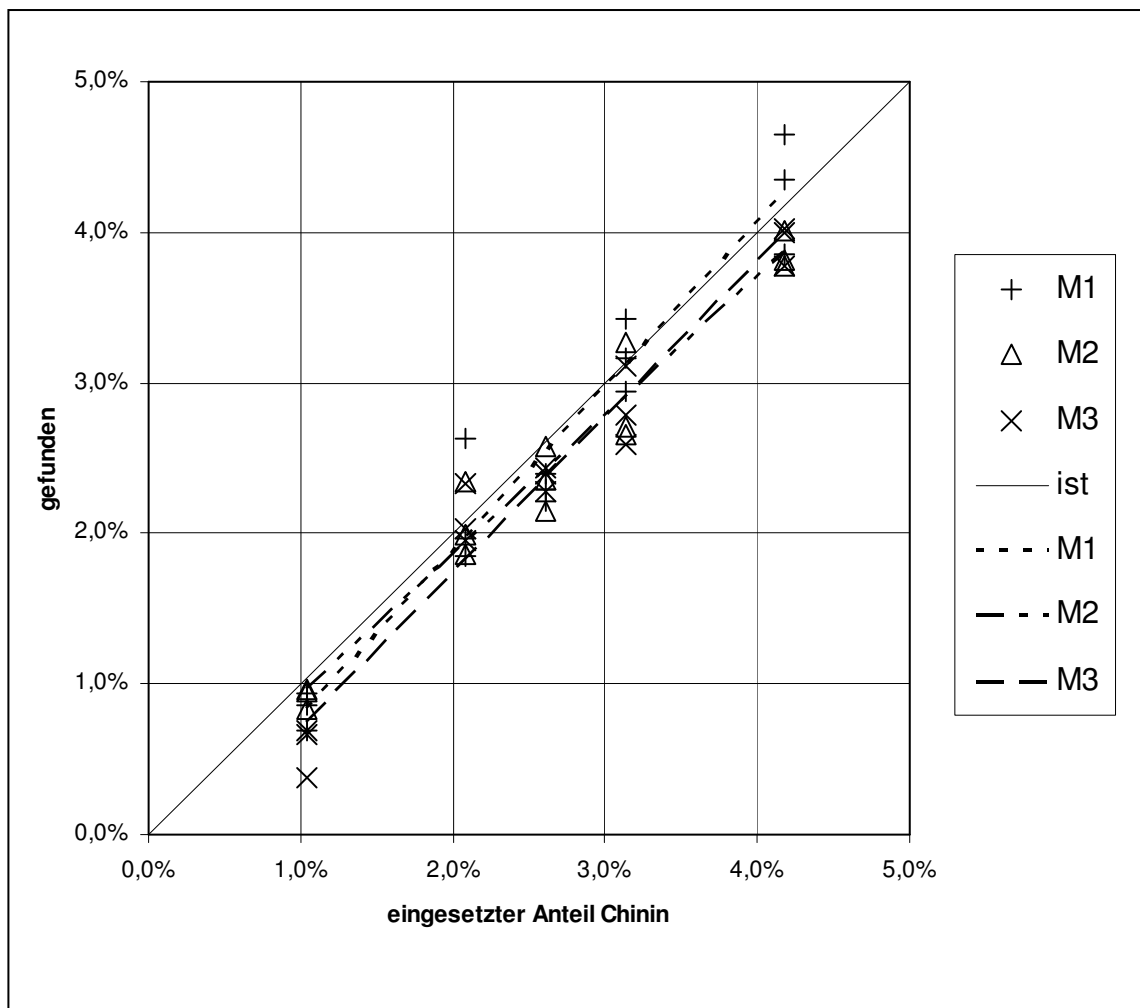


Abbildung 2.1-34: Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung des Gehaltes an Chinin in Chinidin. Abgebildet sind die gefundenen Anteile Chinin gegen die tatsächlichen bei den drei Messungen (M1, M2, M3) sowie die dazugehörigen Ausgleichsgeraden und die Diagonale (Ist-Gehalt)

Stufe	ist-Anteil	gefundenener Anteil			Mittelwert	
		1.Mess.	2. Mess.	3. Mess.		
1	4,17%	4,65%	3,81%	4,00%	4,155%	Wiederfindung
		4,34%	4,01%	4,02%	4,126%	96,51%
		3,86%	3,77%	3,78%	3,803%	Standardabw.
		Mittelwert:	4,284%	3,865%	3,935%	4,028%
2	3,13%	3,17%	2,66%	2,59%	2,805%	Wiederfindung
		3,42%	3,27%	3,11%	3,266%	94,52%
		2,94%	2,70%	2,78%	2,809%	Standardabw.
		Mittelwert:	3,175%	2,877%	2,827%	2,960%
3	2,61%	2,30%	2,36%	2,44%	2,366%	Wiederfindung
		2,40%	2,57%	2,39%	2,455%	89,79%
		2,21%	2,14%	2,28%	2,210%	Standardabw.
		Mittelwert:	2,302%	2,359%	2,369%	2,344%
4	2,09%	2,63%	2,34%	2,33%	2,436%	Wiederfindung
		1,85%	1,86%	1,95%	1,887%	100,79%
		1,96%	1,99%	2,03%	1,993%	Standardabw.
		Mittelwert:	2,145%	2,066%	2,104%	2,105%
5	1,04%	0,86%	0,95%	0,69%	0,833%	Wiederfindung
		0,70%	0,96%	0,67%	0,774%	74,05%
		0,93%	0,83%	0,38%	0,714%	Standardabw.
		Mittelwert:	0,830%	0,915%	0,576%	0,774%

Tabelle 2.1-15: Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung des Gehaltes an Chinin in Chinidin.

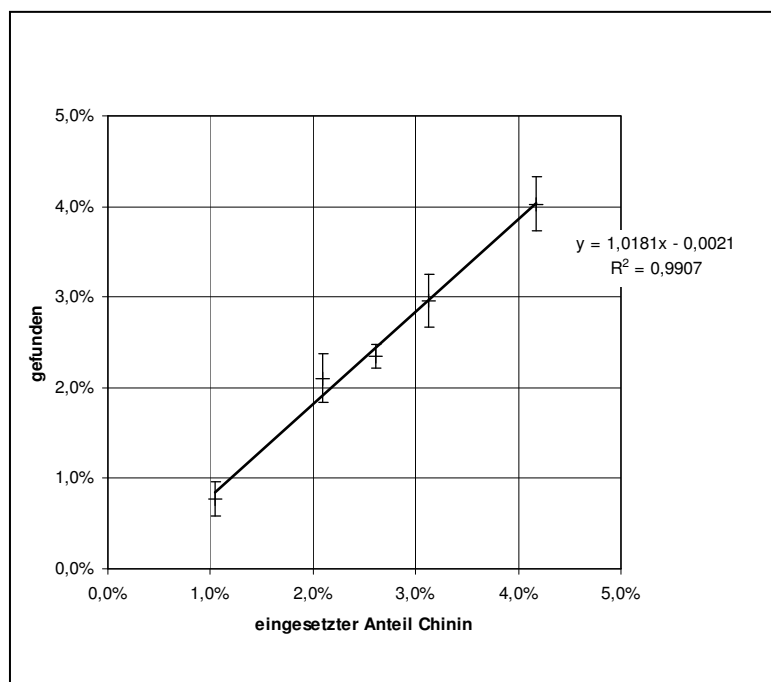


Abbildung 2.1-35:

Ausgleichsgerade der Messungen zur Bestimmung von Chinin in Chinidin.

Aufgetragen sind die Mittelwerte aller Bestimmungen gegen die tatsächlichen Anteile Chinin sowie die Standardabweichungen.

Auch hier macht die ebenfalls angegebene Gleichung der Regressionsgeraden die gute Wiederfindung und die gute Linearität deutlich.

2.1.3.4 Zusammenfassung

Die quantitative Auswertung von NMR-Spektren von Mischungen aus Chinin und Chinidin eignet sich, das Verhältnis der beiden Chinaalkaloide zueinander zu bestimmen. Dies ist möglich auf dem auch vom Europäischen Arzneibuch vorgeschriebenen Niveau von 2,5%, sowohl für die Bestimmung von Chinidin in Chinin als auch für Chinin in Chinidin.

In beiden Fällen ist diese Bestimmung möglich bei einer Konzentration von 30 mg/ml der zu bestimmenden Substanz. Die Messungen werden durchgeführt in DMSO-d₆, in einem Volumen von 600 µl in einen 5mm-Röhrchen. Es sind für die Messungen jeweils 128 Wiederholmessungen (Scans) nötig, bei einem Abstand von 8 Sekunden (davon 4 Sekunden Akquisitionszeit). Das heißt, die einzelne Messung benötigt eine Dauer von 17 Minuten. Die im europäischen Arzneibuch vorgeschriebene HPLC-Methode benutzt insgesamt sechs Lösungen (davon eine zur Überprüfung der Totzeit und zwei die durch Mischen bzw. Verdünnen von Stammlösungen hergestellt werden). Zusätzlich zu dieser Vorbereitungszeit der Lösungen ist auch noch Zeit zur Herstellung der mobilen Phase erforderlich, so dass die reine Vorbereitungszeit der Messungen die Dauer einer NMR-Messung bereits überschreitet. Die Dauer eines HPLC-Laufes wird weder in der Monographie noch im Arzneibuchkommentar näher spezifiziert, jedoch liegt in einem Übersichtsartikel über verschiedenen HPLC-Trennungen der Chinaalkaloide die Dauer bei vergleichbaren Säulen bei etwa 15 bis 20 Minuten [81].

Generell ist aufgrund des Messprinzips die Reproduzierbarkeit bei HPLC-Messungen schlechter als bei NMR-Messungen.

Auch diese Reinheitsbestimmung von Chinaalkaloiden ist ein Beispiel für die Leistungsfähigkeit der quantitativen NMR-Spektroskopie. Die Einschränkung für die Anwendbarkeit der qNMR liegt nur in der Eignung der Spektren, d. h. es müssen die miteinander zu vergleichenden Signale weit genug voneinander getrennt sein.

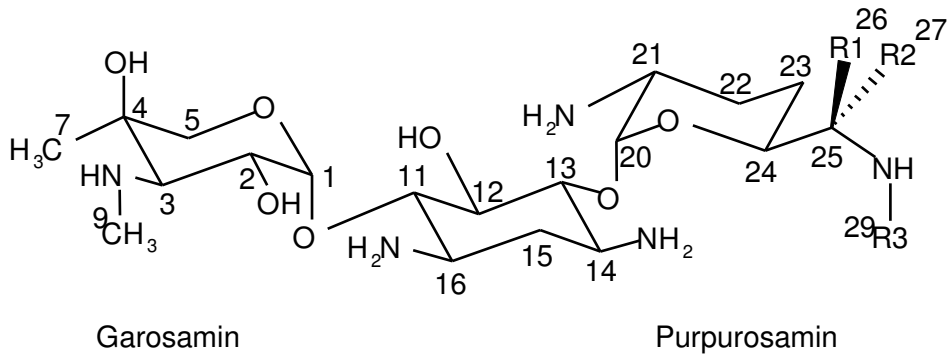
2.2 **Gentamicinsulfat**

Während die meisten Aminoglykosidantibiotika durch eine eindeutig definierbare Substanz als Hauptkomponente charakterisiert sind, besteht Gentamicin aus einer Reihe strukturell sehr ähnlicher Verbindungen. Die Grundstruktur ist eine trisaccharidartige Verbindung, zusammengesetzt aus den Aminozuckern Garosamin und Purpurosamin sowie dem zentralen Aminoalkohol 2-Desoxystreptamin, mit dem die beiden Zucker glykosidisch verknüpft sind.

Die verschiedenen Hauptkomponenten von Gentamicin, Gentamicin C1, C1a, C2 sowie C2a unterschieden sich nur durch das Substitutionsmuster in der Seitenkette des Purpurosaminteils. Neben diesen vier Hauptkomponenten kommt auch noch das strukturell ähnliche Gentamicin C2b vor. Als Verunreinigungen gelten die Vorstufen Garamin (Garosamin glykosidisch verknüpft mit 2-Desoxystreptamin) und 2-Desoxystreptamin. Außerdem können die Nebenprodukte Sisomicin und Netilmicin auftreten. In Abbildung 2.2-1 sind die Strukturen dieser Verbindungen zusammengefasst. Auf die in dieser Abbildung angegebene Bezifferung der einzelnen Atompositionen in den Molekülen wird im Folgenden stets Bezug genommen.

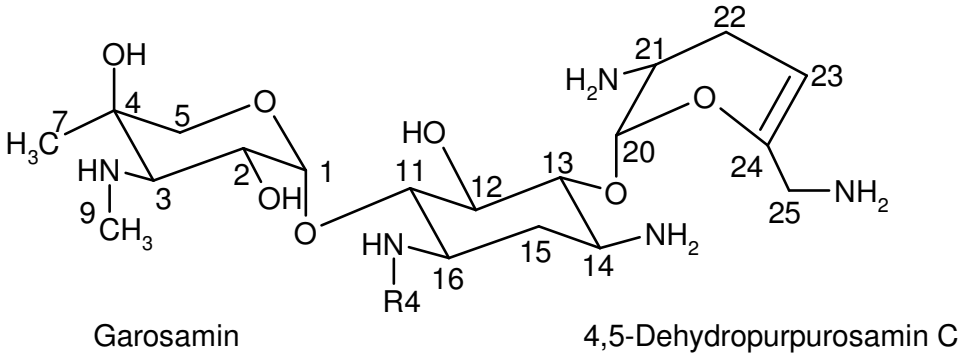
2.2.1 **Pharmakologie**

Während das älteste Aminoglykosid, Streptomycin, nur noch bei Tuberkulose eingesetzt wird, sind die anderen Aminoglykoside heute unentbehrliche Antibiotika bei schweren Infektionen [83]. Ursprünglich spielten Aminoglykoside eine dominierende Rolle in der Behandlung von schweren Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und resistenten Enterobacteriae. Zu den heute häufiger eingesetzten Aminoglykosiden gehören neben Gentamicin noch Tobramycin, Sisomicin, Netilmicin und Amikacin.



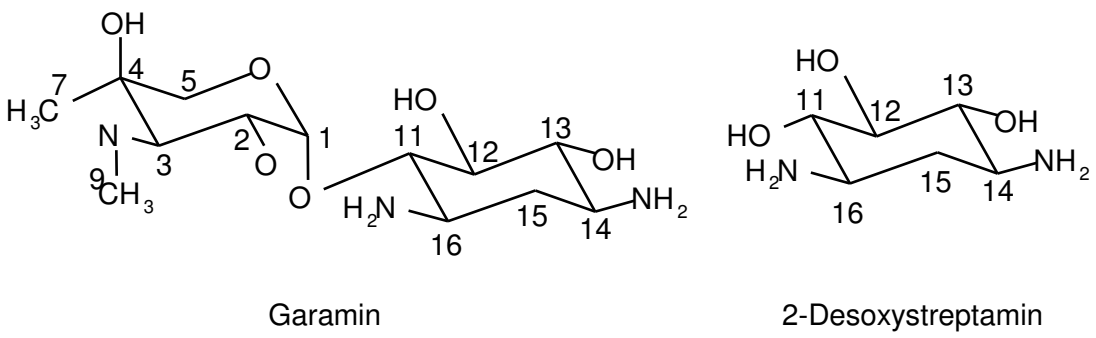
2-Desoxystreptamin

		R1	R2	R3
1	Gentamicin C1	-CH ₃	-H	-CH ₃
2	Gentamicin C1a	-H	-H	-H
3	Gentamicin C2	-CH ₃	-H	-H
4	Gentamicin C2a	-H	-CH ₃	-H
5	Gentamicin C2b	-H	-H	-CH ₃



2-Desoxystreptamin

		R4
6	Sisomicin	-H
7	Netilmicin	-CH ₂ -CH ₃ (Pos. 30, 31)



8	Garamin
9	2-Desoxystreptamin

Abbildung 2.2-1: Strukturformeln der Gentamicin-C-Komponenten, der Vorstufen Garamin und 2-Desoxystreptamin sowie der Nebenprodukte Sisomicin und Netilmicin.

Ihre Bedeutung liegt [nach 83] in

- ihrem breiten Wirkungsspektrum,
- ihrer primär bakteriziden Wirkung,
- ihrem raschen Wirkungseintritt,
- der synergistischen Wirkungssteigerung in Kombination mit β -Laktamen.

Diese Wirkung kommt besonders bei gramnegativen Stäbchenbakterien zum Tragen. Aminoglykoside gelangen ungeladen direkt durch die Membran ins Zellinnere. Nach der Passage durch die äußere Membran müssen die Aminogruppen der Aminoglykoside protoniert werden, so dass sie – bei ausreichend hohem Potentialgefälle (ca. -200 mV) – auch die innere Membran passieren können. Dies ist allerdings nur bei hoher aerober Stoffwechselaktivität der Bakterien der Fall. Bei anaerober Stoffwechsellage sind daher *alle* Bakterien unempfindlich gegenüber Aminoglykosiden. Dies ist beispielsweise im Herd einer Sepsis der Fall. Daher können sie zwar im strömenden Blut gegen die Septikämie wirken, als Monotherapie ist ihr Wert aber eingeschränkt.

Die Wirkung der Aminoglykoside beruht auf ihrer Bindung an die 30 S-Untereinheiten der Ribosomen. Diese führt zu einem Falsch-Ablesen („misreading“) der m-RNA und damit zur Synthese funktionsuntüchtiger Nonsense-Proteine [84].

Aminoglykoside sind nicht oral bioverfügbar, die übliche Verabreichungsform sind Kurzinfusionen von 30 bis 60 Minuten Dauer. Die Gefahr bei der Behandlung mit Aminoglykosiden liegt in der nur sehr geringen therapeutischen Breite. Über einer Plasmakonzentration von etwa 10 $\mu\text{g/ml}$ (Gentamicin-Gruppe) nimmt die Gefahr von Innenohrschäden beträchtlich zu. Aufgrund der elektrophysiologischen Gegebenheiten des Innenohrs werden selektiv die Haarzellen des Innenohrs irreversibel geschädigt, wahrscheinlich auf dem gleichen Weg wie die antibakterielle Wirkung. Die Aufnahme in diese Zellen erfolgt allerdings durch einen aktiven Transport, nicht durch passive Diffusion. So kommt es zu einem Sättigungsprozess in den betroffenen Zellen. Wird die Sättigungskonzentration überschritten, so kommt es zu keiner weiteren Akkumulation in diesen Zellen. Daher hat eine *einmalige* tägliche Gabe mit einer hohen Konzentration weniger derartige schädliche Nebenwirkungen als die dreimal tägliche Gabe einer entsprechend geringeren Menge. Die heutige Praxis der Gentamicin-Applikation ist daher die Einmalgabe der

Tagesdosis und nicht die Verteilung auf drei Einzeldosen. Die Einmalgabe der Tagesdosis ist jedoch nicht zugelassen, so dass dies einem „Off-label Use“ gleichkommt. Außerdem besteht das Risiko der Nephrotoxizität.

Haupteinsatzgebiete von Gentamicin sind systemisch schwere Infektionen (Sepsis, Endokarditis, Osteomyelitis) sowie lokal Augen- und Hautinfektionen. Speziell zur Anwendung bei Knochen- und Weichteilinfektionen gibt es besondere galenische Formen wie Knochenzement, Kollagenschwämme oder Polymethylacrylat-Kugeln [84]. Neben diesen bekannten Indikationen gibt es einige viel versprechende neue, potentielle Indikationsgebiete, wie die Duchenne-Muskeldystrophie, cystische Fibrose (Mukoviszidose) oder das Hurler-Syndrom [85, 86, 87].

2.2.2 Herstellung / Gewinnung von Gentamicin

Gentamicin wird – wie alle anderen Aminoglykoside auch – aus Fermentationslösungen bzw. Kulturfiltraten von Mikroorganismen gewonnen. Die Endsilbe der verschiedenen Aminoglykoside gibt einen Hinweis, welche Mikroorganismen diese produzieren. So werden Aminoglykoside, die von Micromonospora-Arten gebildet werden, mit der Endsilbe „-micin“, solche die von Streptomyces-Arten gebildet werden, mit „-mycin“ gekennzeichnet.

Gentamicin wird von Pilzen der Art *Micromonospora purpurea* und *Micromonospora echinospora* gebildet. Erstmals wurde Gentamicin bei Schering-Plough in den USA von M. Weinstein isoliert [88]. Schnell wurde klar, dass Gentamicin allen zu dieser Zeit bekannten Aminoglykosiden in seiner Wirksamkeit überlegen war.

In den letzten Jahren sind verschiedenen Publikationen erschienen, die über Verbesserungen in der Ausbeute von Gentamicin berichten [89, 90]. Über eine starke Bindung von Gentamicin an die Zellwand einer Sisomicin-produzierenden Spezies von *Micromonospora* (*Micromonospora inyoensis*) wurde berichtet [91]. Daraufhin wurde eine Behandlung der Zellen mit Ultraschall entwickelt, die in der Lage ist, die Ausbeute an Gentamicin aus dem Nährmedium deutlich zu steigern [92]. Auch eine viele Faktoren umfassende Studie zur Steigerung der Ausbeute von Gentamicin wurde veröffentlicht [93]. Diese Veränderungen der Stämme, des Nährmediums und des Reinigungsprozesses können zu einer veränderten Zusammensetzung von Gentamicin als Handelsprodukt führen.

2.2.3 Problemstellung

Erstmals wurde Gentamicinsulfat im DAB 9 monographiert [94]. In dieser Monographie wurde die NMR-Spektroskopie (60 MHz-Geräte) zur halbquantitativen Bestimmung der Zusammensetzung genutzt. Hierzu wurden die Verhältnisse der Signalhöhen der verschiedenen Komponenten von den N-Methylgruppen an Position 9 und 29 und den C-Methylgruppen an Position 7 sowie die der Seitenkette miteinander verglichen. Da Gentamicin aus verschiedenen Komponenten zusammengesetzt ist, lassen diese Vergleiche Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Gemisches zu. Allerdings waren bei den im Arzneibuch angegebenen 60 MHz-Spektrometern die Signale der Methylgruppe in der Seitenkette nicht aufgelöst, sondern erschienen jeweils als *ein breites* Multipllett. In dieser Monographie war gefordert, dass das Verhältnis der *Höhen* der beiden von den N-Methylgruppen herrührenden Signale zwischen 0,260 und 0,440 liegen und das der beiden von den C-Methylgruppen herrührenden zwischen 0,200 und 0,260 liegen soll [95]. Zu beachten ist, dass hierbei Signalhöhen und keine Integralflächen miteinander verglichen werden. Das Verhältnis der N-Methylgruppen gibt den Anteil von Gentamicin C1 an: eines der beiden Signale (Pos. 29) kann Gentamicin C1 zugeordnet werden^a, das andere den übrigen Komponenten in der Summe. Das Verhältnis der C-Methylgruppen wird von verschiedenen Komponenten beeinflusst. Verglichen wird das Signal der Methylgruppe an Pos. 7 (die bei allen Komponenten vorkommt) mit dem der Methylgruppen an Pos. 26 (die bei Gentamicin C1 und C2 vorkommt^b). Da Signalhöhen und keine Flächen betrachtet werden, wird die Signalaufspaltung in Dubletts (vgl. 2.2.4.1) nicht richtig berücksichtigt. Somit wird durch dieses Verhältnis nicht exakt der Anteil einer Komponente angegeben. Es kann aber eine Aussage über die Gleichwertigkeit verschiedener Chargen getroffen werden. Auch der Vergleich der Signalhöhen im ¹³C-NMR-Spektrum wurde zur Bestimmung der Zusammensetzung von Gentamicin in Betracht gezogen [96]. In einer späteren Publikation wird die Auswertung der Methyl-

^a Auch Gentamicin C2b hat an dieser Stelle eine N-Methylgruppe; wie in dieser Arbeit gezeigt wird, hat diese die gleiche chemische Verschiebung wie C1 von $\delta=2.77$ ppm. Gentamicin C2b kommt jedoch nur in geringer Konzentration vor und wurde daher in dieser Rechnung nicht berücksichtigt.

^b Gentamicin C2a besitzt eine Methylgruppe an Pos. 27, deren Signal bei der gleichen chemischen Verschiebung von $\delta=1.31$ ppm erscheint wie das von der Methylgruppe an Pos. 26 von C1 und C2. Jedoch galt zur Zeit des DAB 9 diese Komponente als Verunreinigung, die nur in geringer Menge vorkommt und wurde daher in diesen Rechnungen ebenfalls nicht berücksichtigt.

gruppen in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren verbessert. Zum einen werden 90 MHz-Spektrometer eingesetzt, zum anderen werden die Integrale berücksichtigt [97]. Außerdem werden hier Berechnungsformeln angegeben, die eine exaktere Bestimmung des Anteils von Gentamicin C1, C1a und C2 erlauben.

Seit dem DAB 10 wurde in diesem und in allen nachfolgenden Arzneibüchern eine HPLC-Methode eingesetzt, die seither nur wenig modifiziert wurde. Diese 1984 von Claes et al. [98] entwickelte Methode benutzt eine Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd und Mercaptoessigsäure, um Gentamicin einer UV/Vis-spektrometrische Detektion zugänglich zu machen. Mit dieser Methode, die bis einschließlich EuAB 4.4 gültig war, konnten die vier Hauptkomponenten Gentamicin C1, C1a, C2 und C2a gut voneinander getrennt werden [99]. Die Berechnung der Anteile erfolgte mit Hilfe eines Korrekturfaktors, der durch die Trennung einer zertifizierten chemischen Referenzsubstanz (CRS) unter gleichen Derivatisierungs- und Trennbedingungen ermittelt wurde, bezogen auf die Höhen der zu betrachtenden Peaks. In der Ausgabe 4.5 des EuAB wurde diese Methode durch eine andere HPLC-Methode ersetzt [100]. Die Detektion erfolgt nicht mehr UV/Vis-spektrometrisch nach Derivatisierung, sondern underivatisiert mit einem gepulsten amperometrischen Detektor [101]. Der Vorteil, nicht mehr derivatisieren zu müssen, wird allerdings mit mehreren Nachteilen erkauft. So wird bereits in der Originalarbeit die schlechte Robustheit angesprochen. Diese bezieht sich nicht nur auf den störungsanfälligen Detektor, sondern auch auf die Säule, die nur relativ wenige Läufe zulässt. Außerdem verbessert sich die Trennung nicht und die Laufzeit verlängert sich von 20 auf 60 Minuten, was dazu führt, dass der letzte Peak (Gentamicin C1) rund 10 Minuten zur Elution benötigt. Mit dem Wechsel der Bestimmungsmethode wurden auch die Gehaltsgrenzen geändert (siehe Tabelle 2.2-1). Im Jahr 2000 wurde von Kaale et al. eine CE-Methode veröffentlicht, die in der Lage ist, fast alle Bestandteile des Gentamicin-Komplexes voneinander zu trennen [102]. Eine Modifizierung dieser Methode wurde 2001 veröffentlicht [103]. Hiervon ausgehend wurde von Wienen und Holzgrabe eine MEKC (Mizellare Elektrokinetische Chromatographie)-Methode [104] entwickelt, die in der Lage ist, nicht nur alle in der EuAB-Monographie beschriebenen, sondern auch einige weitere Verunreinigungen sowie die Hauptkomponenten von Gentamicin zu trennen (vgl. Kap. 2.2.4.4).

Gentamicin-Komponente	Alte Methode (bis EuAB 4.4)	Neue Methode (EuAB 4.7)
C1	25-50 %	20-40 %
C1a	10-35 %	10-30 %
C2 + C2a	25-55 %	---
C2 + C2a + C2b	---	40-60 %

Tabelle 2.2-1: Vergleich der Grenzen der Gentamicin-Hauptkomponenten nach alter und neuer EuAB-Methode

2.2.4 Untersuchungen von Gentamicin-Proben

2.2.4.1 Gewinnung der Einzelkomponenten von Gentamicin

Es ist für die Zuordnung aller Signale in den NMR-Spektren und für die Entwicklung der CE-Methode vorteilhaft, die Haupt- und alle Nebenkomponten von Gentamicin als Einzelsubstanzen möglichst rein zur Verfügung zu haben. Die Nebenkomponten sowie Gentamicin C2b sind käuflich erwerbbar. Die fehlenden Hauptkomponenten wurden durch präparative Trennung gewonnen [105].

Zur Freisetzung der jeweiligen freien Basen aus den Sulfaten wurde der eigentlichen Trennung eine Ionenaustauschchromatographie vorangestellt. Als stationäre Phase diente der Kationenaustauscher Amberlite[®] und als mobile Phase 0,125 M Ammoniak-Lösung und sobald in einer Fraktion Gentamicin nachgewiesen werden konnte, 0,2 M Ammoniak-Lösung. Die Gentamicin-Base enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und die öligen Rückstände gefriergetrocknet. Die so erhaltenen Gentamicin-Basen wurden säulenchromatographisch getrennt. Als stationäre Phase diente hierbei Kieselgel, als mobile Phase die untere Phase einer Mischung von 2-Propanol/Chloroform/Ammoniak (26% m/V) im Verhältnis 1:2:1. Die Mischfraktionen, die noch mindestens zwei bzw. drei Bestandteile enthalten, wurden nach dieser Methode ein zweites Mal getrennt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden nach der in Kap. 2.2.4.4 beschriebenen MEKC-Methode auf ihre Reinheit kontrolliert. Es zeigt sich, dass die Substanzen Gentamicin C1 und Gentamicin C1a sehr rein vorliegen, das Gentamicin C2/C2a-

Gemisch noch mit einem Anteil C1 und C2b verunreinigt ist. Die Substanzen wurden ebenfalls NMR-spektrometrisch auf ihre Reinheit hin untersucht. Die Ergebnisse stimmen mit den CE-Daten überein.

2.2.4.2 Zuordnung der NMR-Spektren

Um Aussagen zur Reinheit verschiedener Chargen der verschiedenen Proben von Gentamicin zu treffen und um die Unterschiede klassifizieren zu können, ist es notwendig, die Signale der Spektren zuzuordnen. Aufgrund der Komplexität der Verbindung und der Tatsache, dass Gentamicin ein Gemisch aus mehreren sehr ähnlichen Verbindungen ist, ist dies schwierig.

Um die Zuordnung zu leisten, waren mehrere Teilschritte notwendig [106]. Die Schwierigkeiten in der Zuordnung ergeben sich aus der Überlagerung der Spektren der verschiedenen Komponenten, aus denen sich Gentamicin zusammensetzt. Hinzu kommt eine Überlagerung der Signale in den Spektren der Einzelkomponenten, da die chemischen Verschiebungen innerhalb einer Substanz sich für verschiedene Kerne oftmals nur geringfügig unterscheiden.

Die Auswertung von selektiven TOCSY-Spektren (zu dieser Messtechnik siehe weiter unten) des Gentamicin-Gemisches brachte erste Hinweise auf die Verteilung der zahlreichen Signale im ^1H -NMR-Spektrum auf die drei Teile der Gentamicin-Moleküle d. h. des Garosamin-, Purpurosamin- und 2-Desoxystreptamin-Teiles. Auch wenn die Anwendung dieser Messungen auf Gentamicin es ermöglicht, einen Teil der Signale einer Gruppe von Atomen zuzuordnen, so ist dies lediglich ein erster Schritt zur Zuordnung der Spektren. In Abbildung 2.2-2 ist ein typisches ^1H -NMR-Spektrum von Gentamicin gezeigt. Einige Signale können sehr leicht und schnell zugeordnet werden. Dies sind zum einen die Methyl- und die Aminomethylgruppen des Garosamin- und des Purpurosaminteiles von Gentamicin bei etwa $\delta=1.3$ ppm und $\delta=1.36$ ppm bzw. bei $\delta=2.77$ ppm und $\delta=2.95$ ppm.

Auch die Signale der anomeren Protonen dieser beiden Molekülteile sind bei $\delta=5.13$ (Garosaminteil) und $\delta=5.8$ ppm (Purpurosaminteil) leicht zu erkennen. Aufgrund der unterschiedlichen Größe dieser und der Tatsache, dass die Unterschiede zwischen den Komponenten im Purpurosaminteil liegen, ist auch klar, dass das einzelne Dublett bei etwa $\delta=5.13$ ppm zu H1 (Garosaminteil) und die vier Dubletts zwischen $\delta=5.8$ und $\delta=6.0$ ppm zu H20 (Purpurosaminteil) gehören. Für die übrigen Signale im Spektrum ist die Zuordnung schwierig.

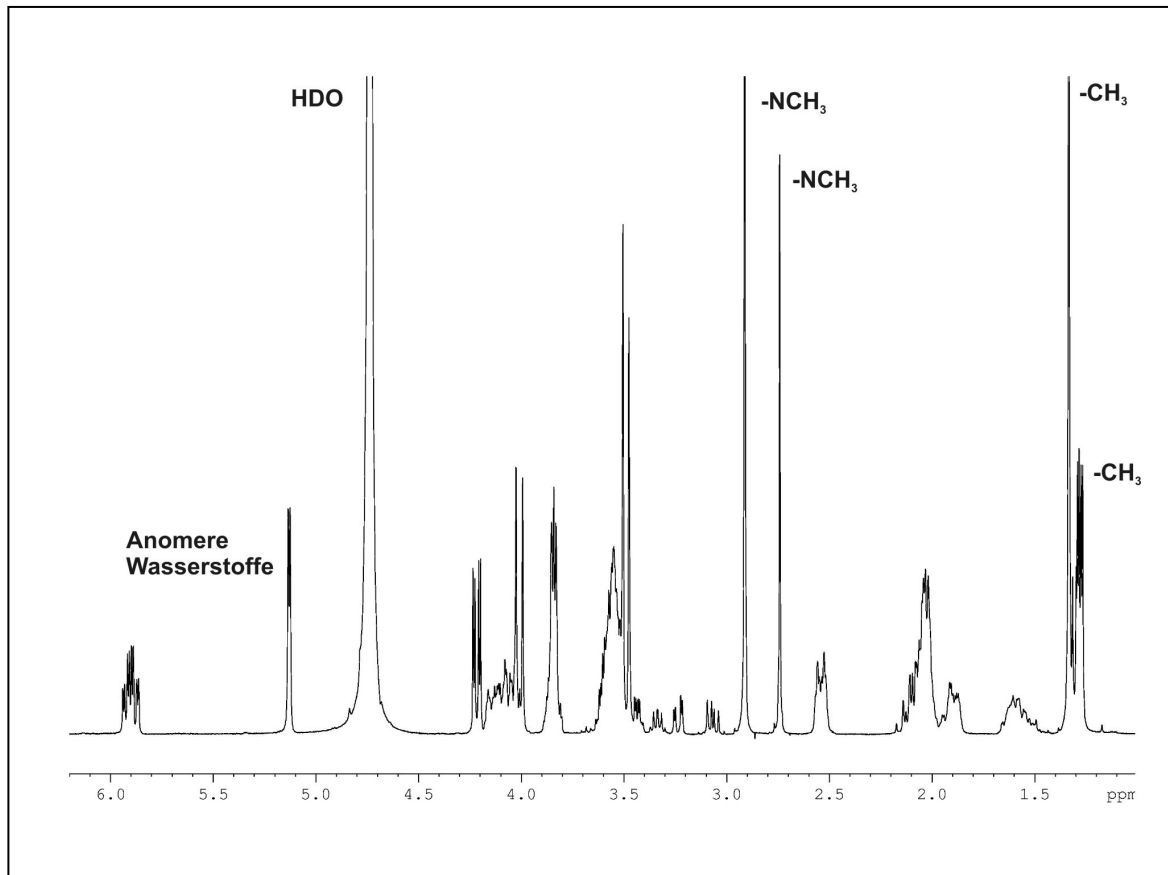


Abbildung 2.2-2: ^1H -NMR-Spektrum von Gentamicin, einem Gemisch verschiedener strukturell sehr ähnlicher Aminoglykoside, gemessen in D_2O bei 400MHz.

Auch im COSY-Diagramm (Abbildung 2.2-3) können nur einige wenige Signale zugeordnet werden. Ausgehend von den bereits bekannten Signalen sind dies die Signale von H2 als Dublett von Dubletts bei etwa $\delta=4.24$ ppm (korreliert mit dem anomeren Proton H1) und die Signale von H3 als Dublett bei etwa $\delta=3.52$ ppm (Korrelation mit H2).

Was für die ^1H -NMR-Spektren hier beschrieben wurde, gilt in noch stärker eingeschränktem Maße für die Auswertung der ^{13}C -NMR-Spektren, da die Zahl der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum sehr groß ist. Im Gegensatz zum ^1H -NMR-Spektrum überlappen hier die Signale einander entsprechender Kerne der verschiedenen Komponenten nicht und können als breites Multiplett zumindest grob charakterisiert werden. Obgleich sie klar voneinander abgetrennt sind, liegen sie nahe beieinander, dass weder direkte CH-Korrelationen (HMQC-Messungen) noch solche über mehrere Bindungen (HMBC-Messungen) weiterhelfen. Einen ersten Hinweis auf die Zusammensetzung der Spektren bringt der Einsatz von TOCSY-Messungen (*total correlation spectroscopy*).

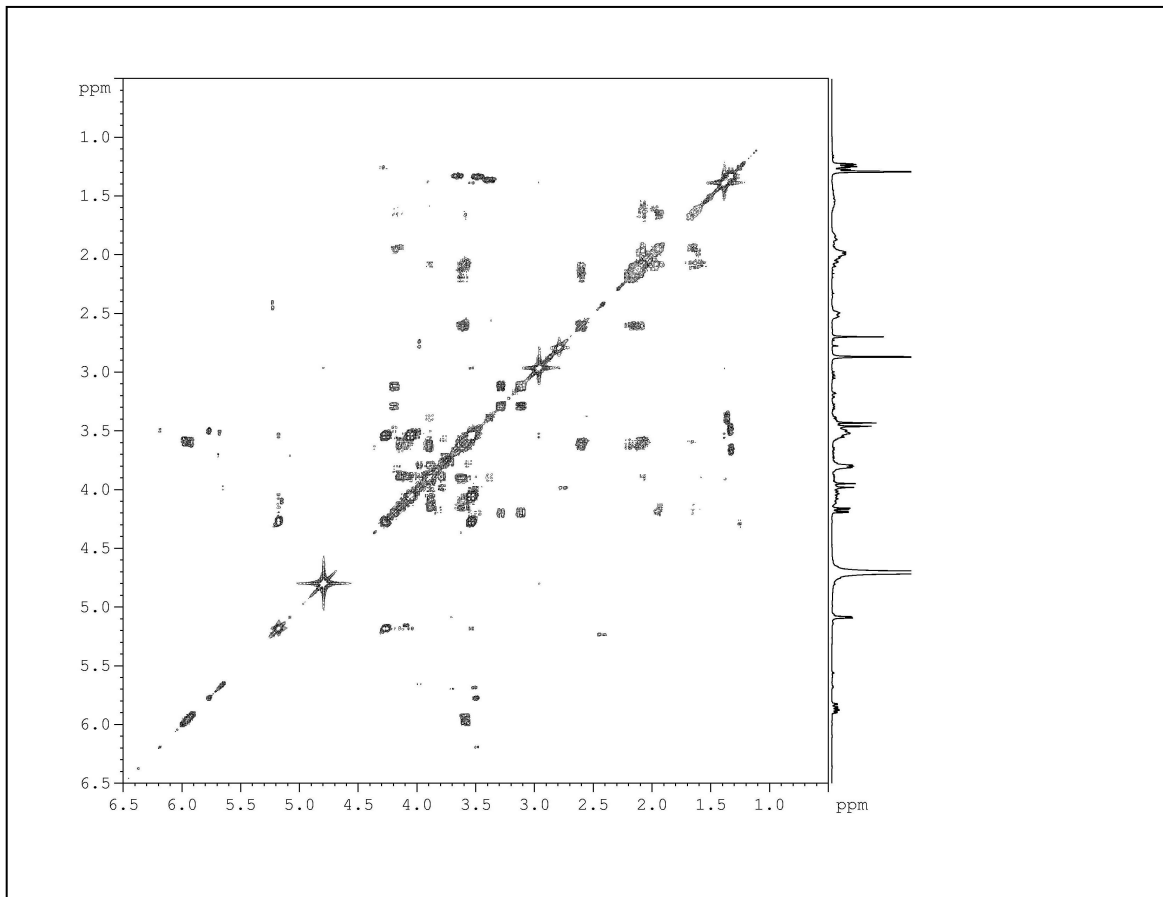


Abbildung 2.2-3: COSY-Diagramm von Gentamicin, einem Gemisch der verschiedenen Komponenten, gemessen in D_2O (400 MHz).

Während TOCSY normalerweise eine zweidimensionale Messtechnik darstellt, kann durch kleine Variationen des Pulsprogramms eine eindimensionale Variante erzeugt werden. Hierzu wird gezielt eine Resonanzfrequenz im gesamten Spektrum selektiv angeregt. Das Ergebnis ist ein eindimensionales Spektrum, in dem im Gegensatz zu normalen Protonenspektrum nur *die* Signale sichtbar sind, die zu dem gleichen Spinsystem gehören wie das angeregte. Auf diese Weise können die verschiedenen Spinsysteme voneinander abgegrenzt werden.

Zusammenhängende Spinsysteme in Gentamicin sind:

- H20 bis H27, also der gesamte Purpurosamin-Teil mit Ausnahme der ggf. vorhandenen N-Methylgruppe
- H11 bis H16, also der gesamte 2-Desoxystreptamin-Teil
- H1 bis H3 im Garosamin-Teil
- H5 im Garosamin-Teil (der Garosaminteil ist wegen des quartären Kohlenstoffes an Pos. 4 *kein* zusammenhängendes Spinsystem)

In Abbildung 2.2-4 sind die selektiv angeregten TOCSY-Spektren gezeigt, mit deren Hilfe eine erste Gruppierung der ^1H -NMR-Signale gelang. Bei Anregung des Signals des anomeren Wasserstoffes des Garosaminteils (H1, Abb. A) sind deutlich die Signale der mit diesem koppelnden Protonen H2 und H3 zu sehen. Die dem Purpurosaminteil zugehörigen Signale können leicht gefunden werden, regt man gezielt dessen anomere Wasserstoffe an. Da es in diesem speziellen Fall problemlos möglich ist, sowohl jedes Dublett getrennt anzuregen als auch alle Signale zusammen, erhält man auf diese Weise sehr viel Information über das Spektrum. Regt man die vier verschiedenen Resonanzfrequenzen der anomeren Protonen des Purpurosaminteiles an, so erhält man in allen vier Fällen ähnliche Subspektren. Die unterschiedliche Intensität der Signale in den vier Spektren kann einerseits zurückgeführt werden auf die unterschiedlichen Konzentrationen der Komponenten, die diese vier Signale hervorrufen.

Andererseits trägt auch die Messung selbst zu u. U. unterschiedlichen Intensitäten bei. Bei TOCSY-Messungen oszilliert die Magnetisierung zwischen den Atomen des koppelnden Spinsystems. Je nach Dauer der Mischzeit, in der sich die Magnetisierung über das Spinsystem entwickeln kann, können unterschiedliche Signale eine nicht der Zahl der Atome entsprechende Intensität haben. Dies führt dann auch dazu, dass in den Abbildungen B bis E in Abbildung 2.2-4 manche Signale kaum zu erkennen sind. Eine Auswertung ist daher auch anhand von ausgedruckten Spektren nicht möglich, sondern muss interaktiv am Rechner erfolgen.

Um die Verteilung der Signale des Purpurosaminteils auf das Spektrum zu beschreiben, ist es auch möglich mit einem etwas weniger selektiven Impuls *nicht* ein einzelnes Signal des anomeren Wasserstoffkerns *einer* Komponente von Gentamicin anzuregen, sondern alle vier Dubletts zusammen. Dieses ist in Abbildung 2.2-5 (A) gezeigt. Man kann nun die in den „Purpurosamin-Subspektren“ (A) und die in dem „Garosamin-Subspektrum“ (B) detektierten Signale zusammennehmen und mit dem kompletten ^1H -NMR-Spektrum von Gentamicin vergleichen (siehe (C) der Abbildung 2.2-5).

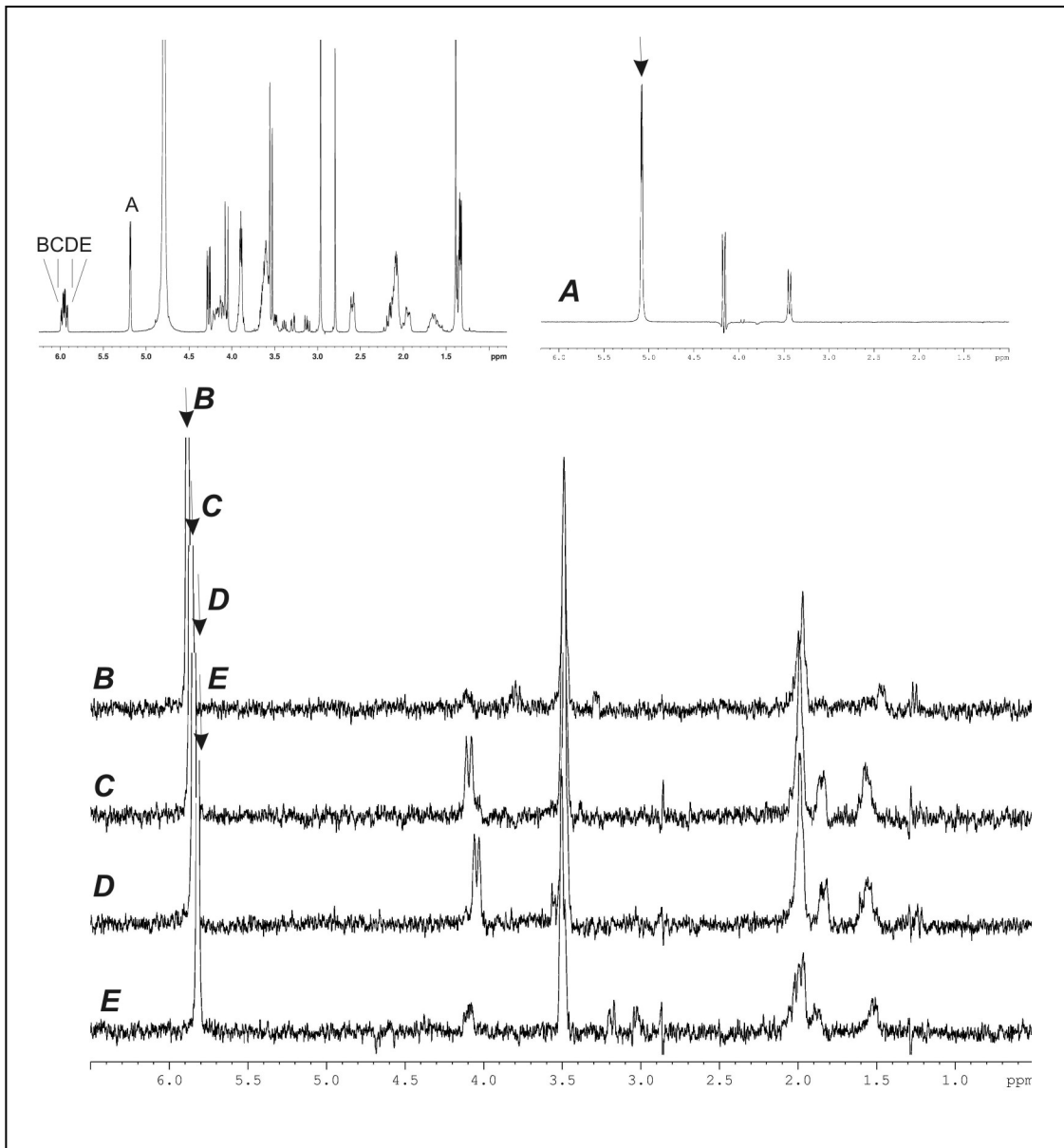


Abbildung 2.2-4: ^1H -NMR-Spektren und selektive TOCSY-Spektren einer Gentamicin-Probe, In der ersten Abbildung ist das gesamte Spektrum gezeigt, zusätzliche sind die Signale markiert, die für die anderen Abbildungen (A bis E). In (A) bis (D) sind jeweils das angeregte Signal markiert. Die Signale sind in diesen Abbildungen teilweise nur schlecht zu erkennen, was aber am Prinzip der TOCSY-Messungen liegt (vgl. Text).

Diejenigen Resonanzsignale, die aufgrund dieser Vorgehensweise dem Purpurosaminteil zugeordnet werden können, sind mit einem hellgrauen Balken, diejenigen, die dem Garosaminteil zugeordnet werden können, mit einem dunkelgrauen Balken unter dem Spektrum gekennzeichnet. Es können zwei Signale ausgemacht werden, die offensichtlich weder dem Garosaminteil noch dem Purpurosaminteil zuzuordnen sind. Es liegt nahe, dass diese dem mittleren Molekülteil (2-Desoxystreptamin) zuzuordnen sind. Aus der Molekülstruktur heraus ist aber klar, dass es in dem Spektrum noch weitere Signale geben muss, die zu diesem Mole-

külteil gehören. Regt man gezielt eines weder zu dem Garosamin- noch zu dem Purpurosaminteil gehörigen Signale an, so zeigt sich, dass auch unter dem unaufgelösten Multipllett bei 2.1 ppm sich ein Signal dieses Molekülteils verbirgt. Außerdem erscheinen zwei Signale bei etwa 4.0 ppm, die im Gesamtspektrum mit anderen Signalen zu dem breiten Signal zwischen 4.0 und 4.3 ppm verschmelzen.

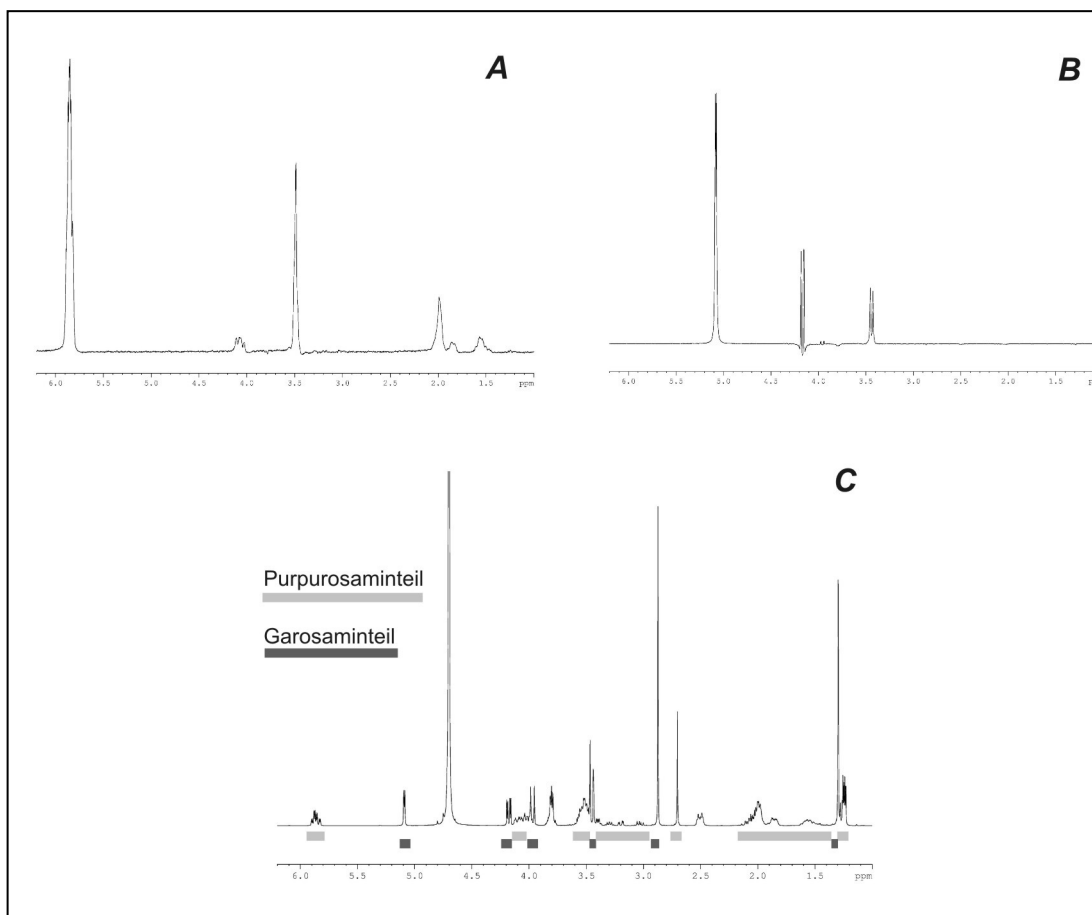


Abbildung 2.2-5: Zusammenfassung der selTOCSY-Subspektren des Gentamicin-Gemisches (einerseits unter Anregung am anomeren Proton des Purpurosaminteils *aller* Komponenten (A) und andererseits unter Anregung am anomeren Proton des Garosaminteils (B)) zu einer Zuordnung der Signale zu den Molekülteilen (C).

Für eine genaue Zuordnung wirklich aller Signale war die Trennung der Komponenten des Gentamicin-Komplexes (vgl. hierzu 2.2.4.1) sehr hilfreich. Mit Untersuchungen von verschiedenen Verunreinigungen zusammengenommen bestätigten die bislang skizzierten ersten Daten.

Während Gentamicin pharmazeutisch in Form des Sulfates eingesetzt wird, die Trennung in die Komponenten aber die freien Basen liefert, wurden von den Einzelkomponenten sowohl Messungen der freien Basen in Deuteriumoxid als auch Messungen unter Zusatz von Deuterioschwefelsäure gemacht, um die letzteren mit den Messungen kommerziellen Gentamicin-Sulfates vergleichen zu können.

Hierzu wurde von dem einfachsten Molekül, 2-Desoxystreptamin, ausgegangen. Diese Substanz ist identisch mit dem mittleren Teil der Gentamicin-Komponenten. In Abbildung 2.2-6 ist das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2-Desoxystreptamin-Dihydrochlorid in D_2O gezeigt. Die Signale von H15 (axial) und H15 (äquatorial) erscheinen als ein Dublett von Triplets bei $\delta=2.45$ ppm mit Kopplungskonstanten von $J=12.4$ Hz und $J=4.3$ Hz bzw. als ein Quartett mit einer Kopplungskonstanten von $J=12.4$ Hz bei $\delta=1.18$ ppm. Die chemischen Verschiebungen sind bezogen auf den internen Standard TSP.

Dies zeigt, dass die vicinale axial-axial-Kopplungskonstante zu H14 und H16 gleich der geminalen Kopplungskonstante zwischen den beiden Protonen H15 ist. Über die im COSY detektierte H-H-Korrelation können dann leicht die Signale der Protonen H14 und H16 als stark überlappende Multipletts zwischen 3.25 und 3.35 ppm erkannt werden. Die Signale von H11 und H13 haben die gleiche chemische Verschiebung und erscheinen im Spektrum zusammen als Dublett von Dubletts mit annähernd gleichen Kopplungskonstanten von jeweils 9.1 Hz sowohl zu H11/13 als auch zu H12. Das Signal von H12 ist ein Triplett bei 3.41 ppm mit einer aa-Kopplungskonstante zu H11/13 von $J=9.1$ Hz.

Etwas komplexer ist das Spektrum von Garamin, ein glykosidisch verknüpftes Molekül von 2-Desoystreptamin mit Garosamin. Das Spektrum ist in Abbildung 2.2-7 gezeigt. Im COSY-Diagramm von Garamin werden zwei fast völlig voneinander getrennte Kopplungsnetzwerke beobachtet, die einerseits zum 2-Desoxystreptamin-Molekülteil und andererseits zum Garosamin-Molekülteil gehören. Ausgehend vom anomeren Wasserstoff H1 können die Signale der Wasserstoffe an Position 2 und 3 leicht identifiziert werden. H1 gibt ein Dublett bei $\delta=5.08$ ppm mit einer Kopplungskonstanten von 3.5 Hz, die sich im Signal von H2, einem Dublett von Dubletts bei 4.21 ppm, wieder findet. Dem Spinsystem gehört noch H3 an, dessen Signal als Dublett bei $\delta=3.50$ ppm mit $J=10.9$ Hz erscheint.

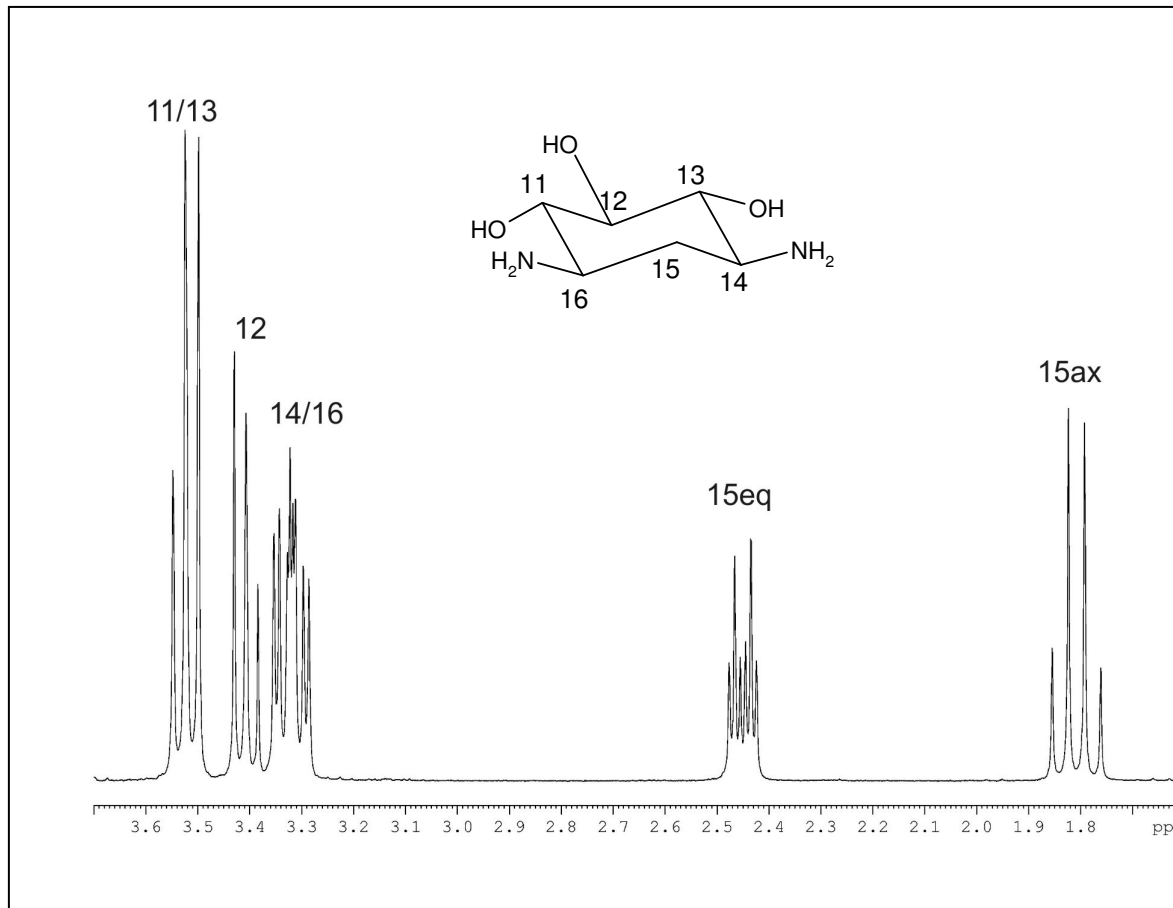


Abbildung 2.2-6: 400 MHz- ^1H -Spektrum von 2-Desoxystreptamin (Dihydrochlorid), in D_2O

Die Signale der beiden Protonen H5a und H5b können mit Hilfe der C,H-Korrelationssignale im HMQC-Diagramm gefunden werden ($\delta=4.01$ ppm bzw. $\delta=3.50$ ppm, $^2J=12.9$ Hz). Die Signale des 2-Desoxystreptaminteiles (H11 bis H16) finden sich annähernd bei den gleichen chemischen Verschiebungen wie im 2-Desoxystreptamin selbst. Jedoch zeigen sich starke Überlappungen der Signale von H3, H5a/b (Garosaminteil), H12 und H13 (2-Desoxystreptaminteil) zwischen 3.3 ppm und 3.5 ppm. Abgesichert werden kann die Zuordnung auch in diesem Multipllett durch Heranziehen selektiver TOCSY-Experimente, bei denen gezielt ein Signal des 2-Desoxystreptaminteils (H15eq bei $\delta=2.48$ ppm) bzw. das des anomeren H1 im Garosaminteil angeregt wurde.

Die Hauptkomponenten von Gentamicin, C1, C1a, C2 und C2a sowie die Nebenkomponekte C2b, beinhalten gegenüber Garamin einen weiteren Zucker, und zwar das auf verschiedene Weise substituierte Purpurosamin, das glykosidisch mit 2-Desoxystreptamin verknüpft ist.

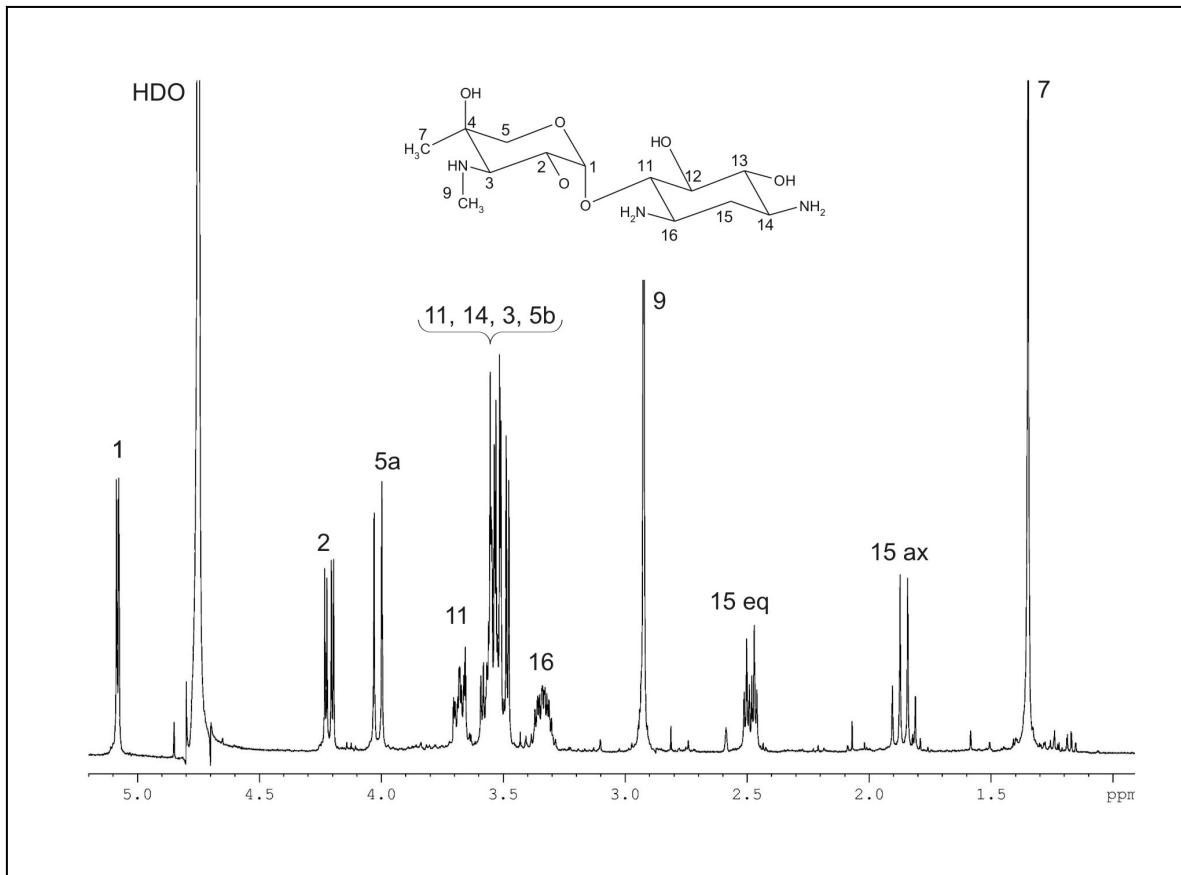


Abbildung 2.2-7: 400 MHz-¹H-Spektrum von Garamin (Hydrochlorid), in D₂O

Am Beispiel von Gentamicin C1 (Abbildung 2.2-9) soll das grundsätzliche Vorgehen bei der Zuordnung der Signale erläutert werden.

Da die Informationen über die einfacheren Molekülteile aus den Spektren der Salze gewonnen wurden, wurden die komplexeren Spektren der Hauptkomponenten zuerst für die mit Deuterioschwefelsäure versetzten Lösungen bearbeitet. Auf gleiche Weise wie für Garamin beschrieben, können die meisten Signale des Garaminteils und 2-Desoxystreptaminteils identifiziert werden.

Im COSY-Diagramm (Abbildung 2.2-8) können ausgehend vom anomeren H1 ($\delta=5.08$ ppm, $J=3.9$ Hz) die Signale von H2 ($\delta=3.78$ ppm, $J=3.9$ Hz, $J=10.6$ Hz) und H3 ($\delta=2.56$ ppm, $J=10.6$ Hz) bestimmt werden. Die Signale von H5a und H5b können wiederum unter Zuhilfenahme der HMQC-Daten erkannt werden als Dubletts bei $\delta=4.04$ bzw. 3.30 ppm ($^2J=12.6$ Hz). Um die Signale des Purpurosaminteils zu identifizieren, waren verschiedene Ansätze nötig. Das Signal von H21 kann leicht aus den COSY-Daten gefunden werden. Dies fällt mit weiteren Signalen zusammen und erscheint als erkennbares Dublett von Dubletts bei $\delta=2.81$ ppm

($J=3.5$ Hz, $J=7.8$ Hz) in einem Multipllett. Des Weiteren hilft ein selTOCSY-Experiment, bei dem das Signal des anomeren Protons (Dublett mit $J=3.5$ Hz bei $\delta=5.14$ ppm) angeregt wird. Man erhält so ein Subspektrum, in dem alle Protonen des Purpurosaminteils (H20 bis H26) erscheinen (Abbildung 2.2-10). Zusammen mit den COSY-Daten der H,H-Korrelation können so die Signale von H21, H22a/b und H23a/b gefunden werden. Zur Zuordnung der Signale von H24 und H25 dient das Signal der Methylgruppe (R1, Pos. 26). Um die Signale des 2-Desoxystreptamin-Molekülteiles zuzuordnen, werden die Daten der Spektren von 2-Desoxystreptamin-Hydrochlorid selbst und von Garamin kombiniert mit dem Subspektrum, das durch ein selTOCSY-Experiment aus dem Spektrum von Gentamicin C1 erhalten werden kann.

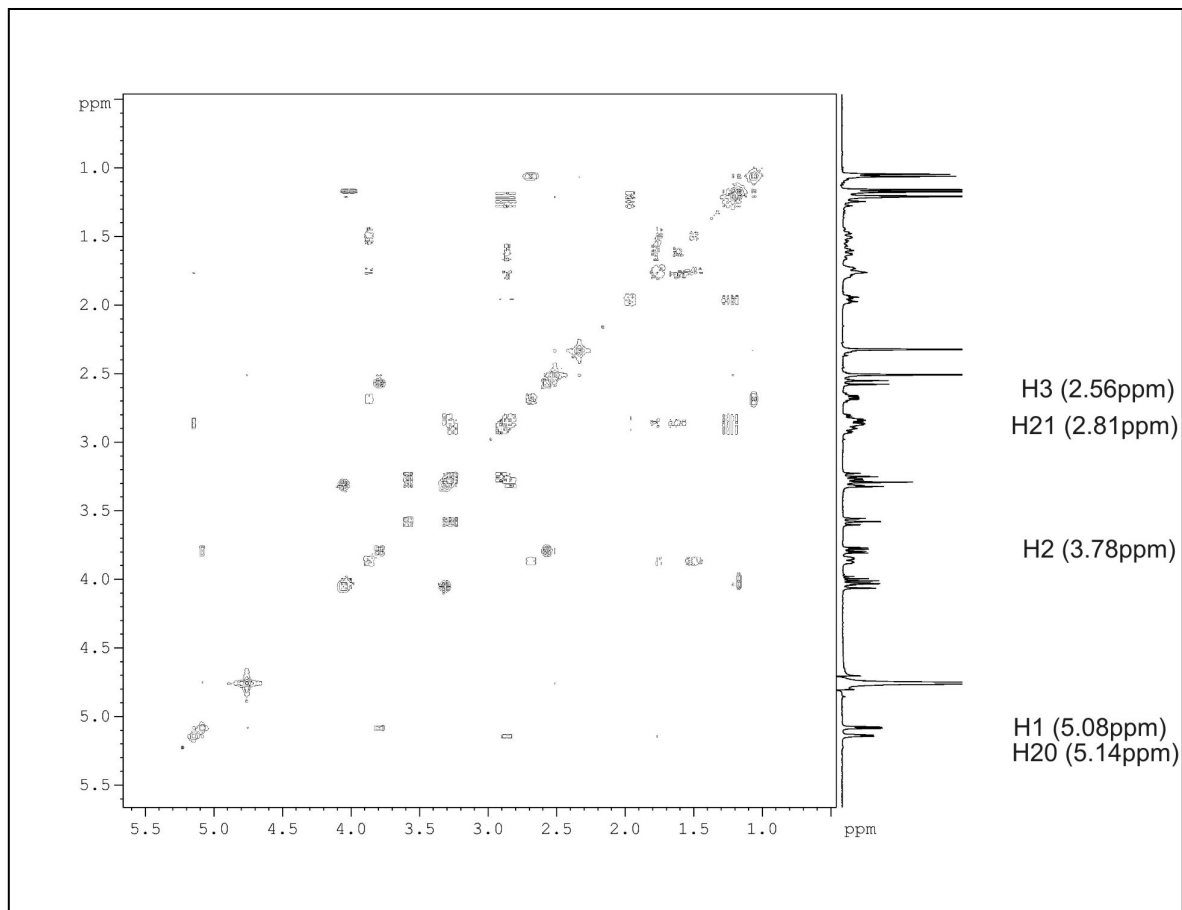


Abbildung 2.2-8: COSY-Diagramm von Gentamicin C1, gemessen in D₂O bei 400 MHz. Rechts ist das zugehörige ¹H-Spektrum gezeigt. Die unmittelbar aus diesem Diagramm zuordenbaren und im Text erwähnten Signale sind zusätzlich angegeben.

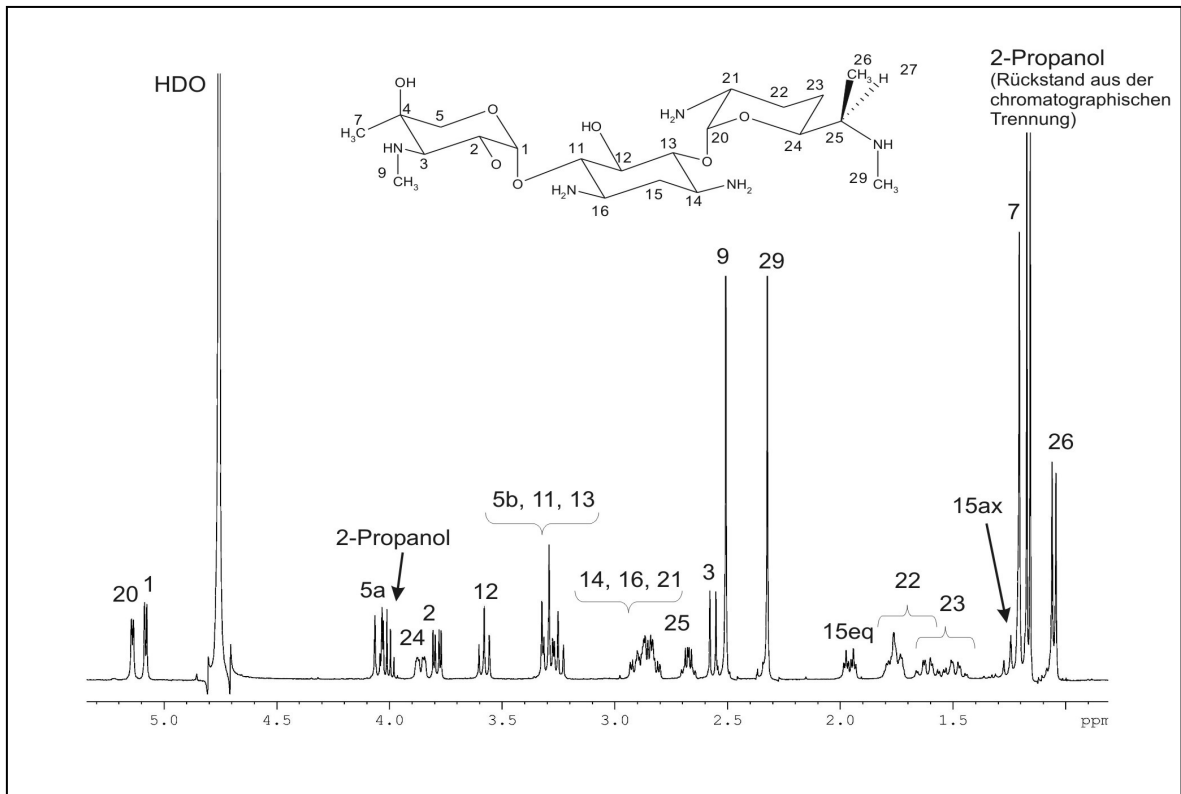


Abbildung 2.2-9: 400 MHz-¹H-Spektrum von reinem Gentamicin C1, gelöst in D₂O.

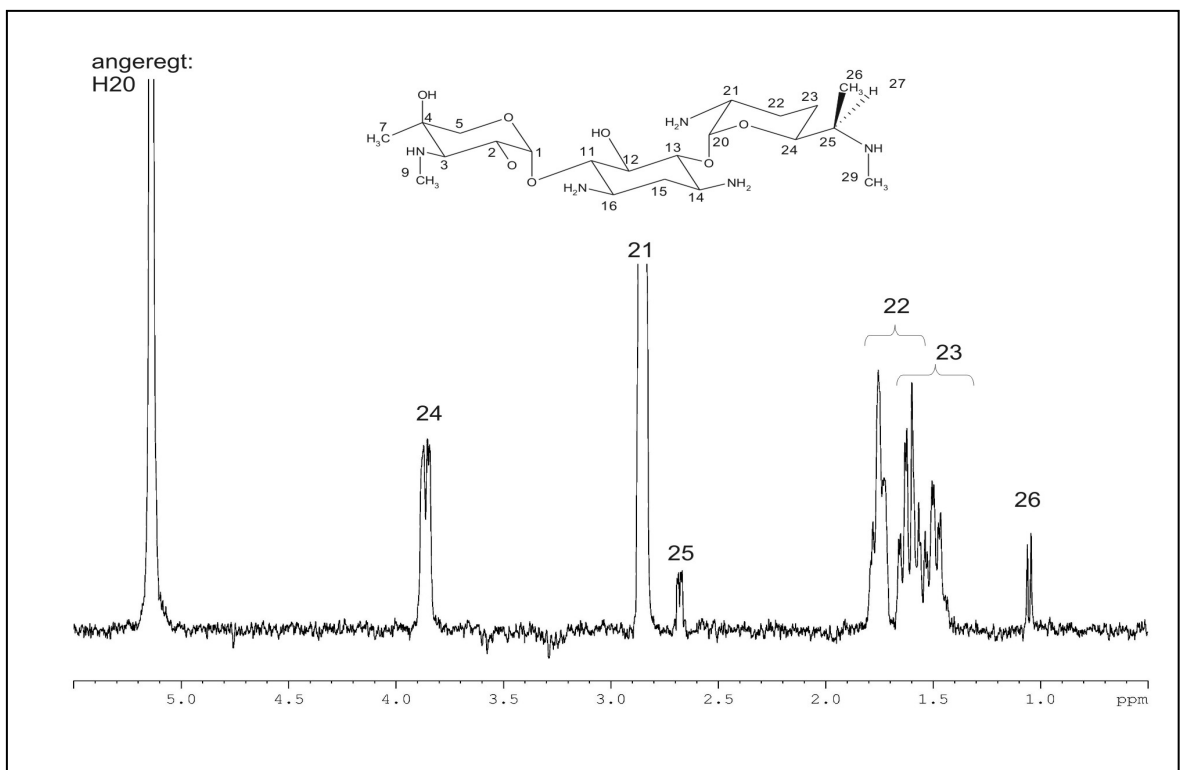


Abbildung 2.2-10: selTOCSY-Spektrum von Gentamicin C1. Angeregt wurde H₂O (anomer am Purpurosaminteil). In diesem Subspektrum sind die Signale aller Wasserstoffe des Purpurosamintails, H₂O bis H₂₆, zu sehen.

Auf entsprechende Weise konnten die Signale im Spektrum von Gentamicin C1a (Abbildung 2.2-11) zugeordnet werden. Um die Signale der beiden Protonen an Pos. 25 (R1 und R2) zu identifizieren, halfen darüber hinaus C,H-Korrelationen (HMQC und HMBC).

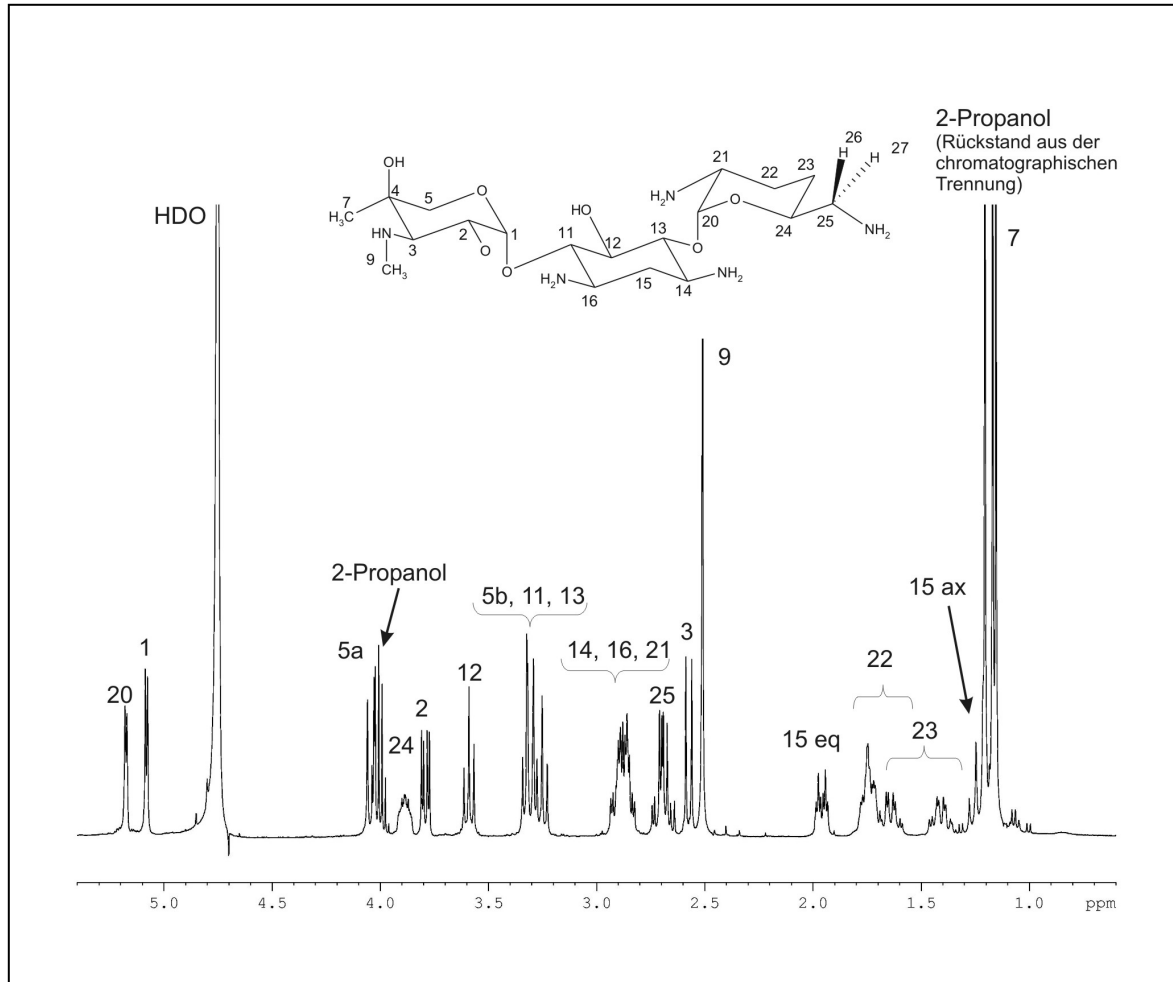


Abbildung 2.2-11: 400 MHz-¹H-Spektrum von reinem Gentamicin C1a, gelöst in D₂O.

Da die chromatographische Trennung von Gentamicin nicht in der Lage war, Gentamicin C2 und Gentamicin C2a voneinander zu trennen, musste die Zuordnung aus der Mischung heraus erfolgen. Die beiden Komponenten unterscheiden sich nur in der Konfiguration an C25 (Gentamicin C2: *R*, Gentamicin C2a: *S*). Daher sind erwartungsgemäß nur wenige Signale des Purpurosaminteils doppelt im Spektrum vorhanden. Um die beiden Signalsätze getrennt voneinander zu betrachten, wurden auch hier selTOCSY-Experimente durchgeführt. Bei diesen wurde jeweils eines der beiden den anomeren Wasserstoffe (bei $\delta=5.13$ ppm und $\delta=5.19$ ppm) angeregt. Auf diese Weise können zwei Subspektren erhalten werden (vgl. Abbildung 2.2-12), jeweils mit den Signalen einer der beiden Komponenten.

ten. Um die beiden Signalsätze der jeweiligen Komponenten zuordnen zu können, wurden die chemischen Verschiebungen mit den bereits zugeordneten Daten von Gentamicin C1 (das an C25 die gleiche Konfiguration wie Gentamicin C2 besitzt) verglichen.

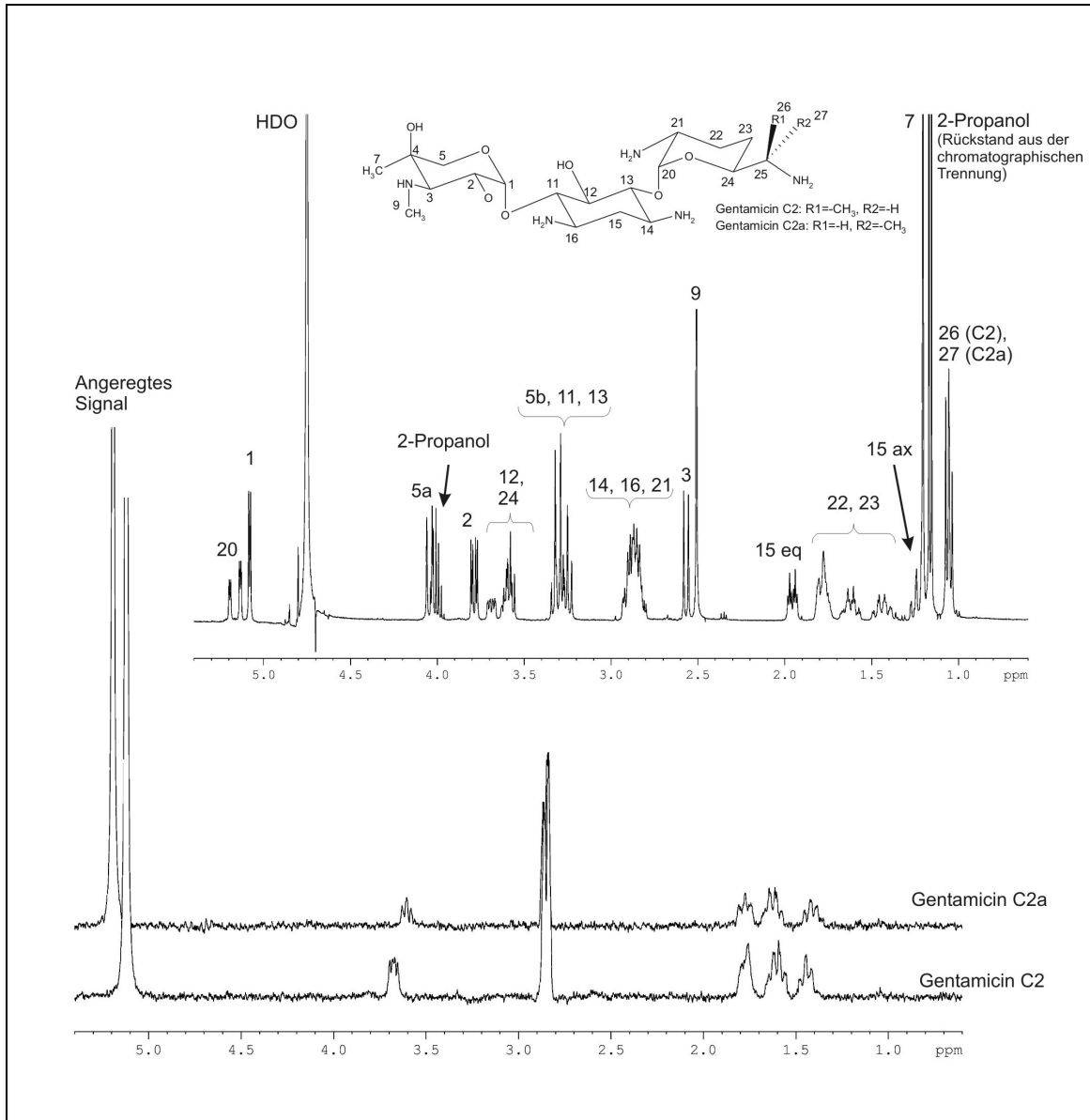


Abbildung 2.2-12: ^1H -Spektrum (400 MHz) einer Mischung von Gentamicin C2 und Gentamicin C2a (oben) sowie zwei durch selTOCSY-Messungen erhaltene Subspektren (unten). Für diese wurde jeweils eines der beiden H₂O-Signale (von C2 bzw. C2a) selektiv angeregt, die beiden Spektren zeigen also jeweils den zugehörigen Signalsatz des Purpurosaminteils einer der beiden Gentamicin-Komponenten.

Auf diese Weise wurden das Signal des anomeren Wasserstoffes mit einer chemischen Verschiebung von $\delta=5.13$ ppm und die im entsprechenden Subspektrum erscheinenden Signale Gentamicin C2 zugeordnet. Dementsprechend gehört das

Signal bei $\delta=5.19$ ppm und die in diesem Subspektrum erscheinenden Signale zu Gentamicin C2a. Erst im Nachhinein wurde mit den Anteilen von Gentamicin C2 und Gentamicin C2a des eingesetzten kommerziellen Gentamicins verglichen. Die Tatsache, dass dies mehr C2 als C2a enthielt, steht in Einklang mit der eben erläuterten Zuordnung.

Die beiden Nebenkomponten Gentamicin C2b, Sisomicin und Netilmicin lagen in reiner Form direkt als Sulfate vor. Gentamicin C2b, unterscheidet sich von Gentamicin C1 nur durch das Fehlen der Methylgruppe an Pos. 26 bzw. von Gentamicin C2a durch die zusätzliche N-Methylgruppe an Pos. 29. Das ^1H -NMR-Spektrum dieser Substanzen konnten daher leicht mit Hilfe der spektralen Daten von Gentamicin C1 und C1a zugeordnet werden.

Im handelsüblichen Gentamicin liegen die Hauptkomponenten als Sulfate vor. Durch die chromatographische Trennung wurden jedoch die freien Basen der Hauptkomponenten erhalten. Um die spektralen Daten aus den Messungen der Einzelsubstanzen mit denen von Gentamicin als Mischung und mit denen der als Salze vermessenen Nebenkomponten vergleichen zu können, wurden die freien Basen mit Schwefelsäure- d_2 versetzt erneut vermessen.

Die Signale der ^{13}C -NMR-Spektren der hier besprochenen Substanzen konnten – soweit nicht bereits Teilinformationen aus diesen zur Zuordnung der ^1H -Spektren genutzt wurden – leicht unter Zuhilfenahme der C,H-Korrelationen, wie sie in HMQC- und HMBC-Experimenten detektiert werden, den jeweiligen Atomen in den Molekülen zu geordnet werden.

In Tabelle 2.2-2 bis Tabelle 2.2-5 sind die Daten zu den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der hier besprochen Substanzen zusammengestellt.

Pos.	C1	C1a	C2	C2a
1	5.08 (d, 3.9)	5.08 (d, 4.0)	5.08 (d, 4.0)	5.08 (d, 4.0)
2	3.78 (dd, 3.9, 10.6)	3.80 (dd, 4.0, 10.6)	3.78 (dd, 4.0, 10.7)	3.78 (dd, 4.0, 10.7)
3	2.56 (d, 10.6)	2.57 (d, 10.6)	2.57 (d, 10.7)	2.57 (d, 10.7)
5a	4.04 (d, 12.6)	4.04 (d, 12.4)	4.04 (d, 12.4)	4.04 (d, 12.4)
5b	3.30 (d, 12.6) ^a	3.31 (d, 12.4) ^a	3.31 (d, 12.4) ^a	3.31 (d, 12.4) ^a
7	1.20 (s)	1.20 (s)	1.20 (s)	1.20 (s)
9	2.50 (s)	2.50 (s)	2.50 (s)	2.50 (s)
11 / 13	3.25 (t, 9.5) ^a / 3.29 (t, 9.5) ^a	3.25 (t, 9.5) ^a / 3.31 (t, 9.5) ^a	3.25 (t, 9.6) ^a / 3.30 (t, 9.6) ^a	3.25 (t, 9.6) ^a / 3.30 (t, 9.6) ^a
12	3.57 (t, 9.5)	3.59 (t, 9.5)	3.53 - 3.64 ^a	3.53 - 3.64 ^a
14 / 16	2.78 - 2.94 ^a	2.79 - 2.95 ^a	2.77 - 2.96 ^a	2.77 - 2.96 ^a
15 eq	1.95 (dt, 4.0, 13.1)	1.96 (dt, 4.0, 12.9)	1.96 (dt, 4.0, 12.9)	1.96 (dt, 4.0, 12.9)
15 ax	1.15 - 1.29 ^c	1.17 - 1.30 ^c	1.17 - 1.29 ^b	1.17 - 1.29 ^b
20	5.14 (d, 3.5)	5.14 (d, 3.5)	5.13 (d, 3.5)	5.19 (d, 3.5)
21	2.81 (dd, 3.5, 7.8) ^a	2.81 (dd, 3.5, 7.8) ^a	2.77 - 2.96 ^a	2.77 - 2.96 ^a
22 eq / 22 ax	1.55 - 1.83 ^b	1.55 - 1.83 ^b	1.33 - 1.51/ 1.55 - 1.69/ 1.71 - 1.85 ^b	1.33 - 1.51/ 1.55 - 1.69/ 1.71 - 1.85 ^b
23 eq / 23 ax	1.40 - 1.68 ^b	1.40 - 1.68 ^b	1.71 - 1.85 ^b	1.71 - 1.85 ^b
24	3.82 - 3.90	3.83 - 3.94	3.64 - 3.73	3.35 - 3.64
25a / 25b	2.67 (dd, 10.9, 6.6)	2.57 (dd, 10.7, 6.6)	2.77 - 2.96 ^a	2.77 - 2.96 ^a
26 (=CH₃)	1.05 (d, 6.8)		1.06 (d, 6.6)	
27 (=CH₃)				1.04 (d, 6.6)
29 (=CH₃)	2.32 (s)			

^a) die verschiedenen Multipletts konnten durch selTOCSY-Experimente zugeordnet werden

^b) die verschiedenen Multipletts konnten mit Hilfe von HMQC-Experimenten (C,H-Korrelationen) zu geordnet werden.

^c) Die Signale überlappen mit dem von H7 sowie mit dem von 2-Propanol (aus der Trennung)
Tabelle modifiziert aus [106]

Tabelle 2.2-2: ¹H-NMR Daten (400 MHz) für die Hauptkomponenten von Gentamicin (C1, C1a, C2 und C2a), gemessen als freie Basen in D₂O. Angegeben sind die chemischen Verschiebungen δ in ppm, und ggf. in Klammern die Multiplizität sowie die Kopplungskonstanten J in Hz.

Pos.	C1	C1a	C2	C2a	C2b	Sisomicin	Netilmicin	Garamin	DSA
1	5.13 (d, 3.8)	5.13 (d, 3.5)	5.13 (d, 3.8)	5.13 (d, 3.8)	5.13 (d, 3.5)	5.14 (d, 3.8)	5.14 (d, 3.8)	5.08 (d, 3.8)	
2	4.24 (dd, 3.8, 10.9)	4.24 (dd, 3.5, 10.9)	4.23 (dd, 3.8, 10.9)	4.23 (dd, 3.8, 10.9)	4.23 (dd, 3.5, 10.9)	4.22 (dd, 3.8, 10.9)	4.26 (dd, 3.8, 10.9)	4.21 (dd, 3.8, 10.9)	
3	3.52 (d, 10.9) ^a	3.52 (d, 10.9) ^a	3.52 (d, 10.9) ^b	3.52 (d, 10.9) ^b	3.51 (d, 10.9) ^a	3.50 (d, 10.9) ^b	3.50 (d, 10.9) ^b	3.50 (10.9) ^b	
5a	3.96 - 4.07 ^b	3.96 - 4.10 ^b	3.95 - 4.06 ^b	3.95 - 4.06 ^b	4.02 (d, 12.9)	4.00 (d, 12.9)	3.99 (d, 12.9)	4.01 (d, 12.9)	
5b	3.43 - 3.54 ^a	3.48 - 3.67 ^a	3.48 - 3.70 ^b	3.48 - 3.70 ^b	3.50 - 3.64 ^a	3.49 (d, 12.9) ^b	3.49 (d, 12.9) ^b	3.50 (d, 12.9) ^b	
7	1.36 (s)	1.36 (s)	1.36 (s)	1.36 (s)	1.35 (s)	1.35 (s)	1.35 (s)	1.35 (s)	
9	2.94 (s)	2.94 (s)	2.95 (s)	2.95 (s)	2.93 (s)	2.93 (s)	2.93 (s)	2.92 (s)	
11/13	3.82 (t, J=4.0) / 3.88 (t, J=4.0)	3.78 - 3.92	3.78 - 3.99 ^b	3.78 - 3.99 ^c	3.79 - 3.91	3.78 (t, 9.4) / 3.87 (t, J=3.8)	3.73 - 3.81 (t, J=9.4) / 3.88 - 3.96 (t, J=9.4)	3.63 - 3.73 ^b 3.46 - 3.61	3.53 (dd, J=9.1, 9.1)
12	3.96 - 4.07 ^b	3.96 - 4.10 ^b	3.95 - 4.06 ^b	3.95 - 4.06 ^b	4.11 (t, 9.1)	4.14 (t, 9.9)	4.14 (t, 9.9)	3.46 - 3.61 ^b	3.41 (t, 9.1)
14/16	3.43 - 3.54 ^a	3.48 - 3.67 ^a	3.48 - 3.70 ^b	3.48 - 3.70 ^b	3.50 - 3.64 ^a	3.51 - 3.67 ^b	3.46 - 3.59 ^b	3.27 - 3.39 3.46 - 3.61 ^b	3.26 - 3.37
15 eq	2.57 (dt, 4.3, 12.6)	2.57 (dt, 4.3, 12.4)	2.50 - 2.62	2.50 - 2.62	2.54 (dt, 4.3, 12.6)	2.63 (dt, 4.3, 12.4)	2.63 (dt, 4.3, 12.4)	2.48 (dt, 4.3, 12.4)	2.45 (dt, 12.4, 4.3)
15 ax	2.00 - 2.14 ^b	1.99 - 2.15 ^b	1.97 - 2.15 ^b	1.97 - 2.15 ^b	2.06 - 2.19 ^b	2.11 (q, 12.4)	2.11 (q, 12.4)	1.86 (q, 12.4)	1.18 (q, 12.4)
20	5.89 (d, 3.8)	5.85 (d, 4.5)	5.87 (d, 3.5)	5.91 (d, 3.5)	5.90 (d, 3.5)	5.63 (d, 1.3)	5.63 (d, 1.3)		
21	3.52 - 3.69 ^a	3.48 - 3.67 ^a	3.48 - 3.70 ^b	3.48 - 3.70 ^b	3.50 - 3.64 ^a	3.94 (t, 9.9)	3.91 (t, 9.9)		
22	1.50 - 1.69 (1H) / 1.87 - 2.14	1.54 - 1.69 (1H) / 1.86 -	1.48 - 1.69 / 1.87 - 1.97 /	1.48 - 1.69 / 1.87 - 1.97 /	1.47 - 1.66 (1H) /	2.73 / 2.39	2.73 / 2.37		
23	(3H) ^b	1.99 (3H) ^b	1.97 - 2.15 ^c	1.97 - 2.15 ^c	1.87 - 2.07 (3H) ^b	5.20 (t, 3.5)	5.20 (t, 3.5)		
24	4.15 (dt, 3.8, 12.6)	4.12 - 4.21	4.06 - 4.14	3.78 - 3.99 ^b	4.14 - 4.20				
25	3.42 - 3.52	3.27 (dd, 13.4, 3.0) / 3.11	3.48 - 3.70 ^b	3.32 - 3.43 ^b	3.26 (dd, 3.0, 12.9) / 3.04 - 3.17	3.64 - 3.75	3.63 - 3.74		

Pos.	C1	C1a	C2	C2a	C2b	Sisomicin	Netilmicin	Garamin	DSA
26 (=CH3)	1.31 (d, 6.3)		1.30 (d, 7.1)						
27 (=CH3)				1.33 (d, 6.8)					
29 (=CH3)	2.77 (s)				2.76 (s)				
30a							3.27 - 3.40		
30b							3.06 - 3.18		
31							1.32 (t, 7.1)		

^{a)} die Signale überlappen einander, die Zuordnung von H3 und H21 war möglich unter Zuhilfenahme von selTOCSY, die von H5b und den Multipletts mit Hilfe von HMQC-Experimenten

^{b)} die Multipletts wurden jeweils mit Hilfe von selTOCSY- und HMQC-Experimenten zugeordnet

^{c)} Dies sind drei voneinander getrennten Multipletts, die exakte Zuordnung (zu H22a, H22b, H23a und H23b) war nicht möglich; zusätzlich gibt es Überlappungen mit dem Signal von H15ax

Tabelle modifiziert aus [106]

Tabelle 2.2-3: ¹H-NMR Daten (400 MHz) für die Hauptkomponenten von Gentamicin (C1, C1a, C2 und C2a), gemessen in verdünnter Deuterioschwefelsäure, der Nebenkomponten Gentamicin C2b, Sisomicin und Netilmicin, gemessen als Sulfate in D₂O, der Nebenkomponten 2-Desoxystreptamin (DSA), gemessen als Hydrochlorid in D₂O und Garamin, gemessen als Dihydrochlorid in D₂O. Angegeben sind die chemischen Verschiebungen δ in ppm, und ggf. in Klammern die Multiplizität sowie die Kopplungskonstanten J in Hz.

Pos.	C1	C1a	C2	C2a
1	103.13	103.13	103.11	103.11
2	72.06	72.03	72.04	72.04
3	66.95	66.97	67.00	67.00
4	75.12	75.09	75.11	75.11
5	70.40	70.41	70.40	70.40
7	24.26	24.26	25.26	25.26
9	39.60	39.57	39.58	39.58
11 / 13	89.43 / 89.89	89.47 / 89.53	90.16 / 89.51 / 89.44 / 89.39 ^a	90.16 / 89.51 / 89.44 / 89.39 ^a
12	77.08	77.15	77.11	77.11
14 / 16	52.62 / 53.44	52.52 / 53.42	51.90 / 52.08 / 52.20 / 52.31 ^a	51.90 / 52.08 / 52.20 / 52.31 ^a
15	38.31	38.29	38.23 / 38.27 ^a	38.23 / 38.27 ^a
20	104.33	103.69	103.37	104.37
21	52.32	52.17	51.90 / 52.08 / 52.20 / 52.31 ^a	51.90 / 52.08 / 52.20 / 52.31 ^a
22	28.71	30.11	27.70 / 28.53 /	27.70 / 28.53 /
23	27.51	28.52	29.17 ^a	29.17 ^a
24	74.52	72.93	76.05	76.61
25	59.93	47.52	51.50 / 52.08 / 52.20 / 52.31 ^a	51.50 / 52.08 / 52.20 / 52.31 ^a
26 (=CH₃)	16.27		20.31	
27 (=CH₃)				20.17
29 (=CH₃)	35.07			

^a) exakte Zuordnung war nicht möglich, verschiedene Signale sind darin begründet, dass eine Mischung aus Gentamicin C2 und Gentamicin C2a untersucht wurde.

Tabelle modifiziert aus [106]

Tabelle 2.2-4: ¹³C-NMR Daten (100 MHz) für die Hauptkomponenten von Gentamicin (C1, C1a, C2 und C2a), gemessen als freie Basen in D₂O. Angegeben sind die chemischen Verschiebungen δ in ppm.

<i>Pos.</i>	<i>C1</i>	<i>C1a</i>	<i>C2</i>	<i>C2a</i>	<i>C2b</i>	<i>Sisomicin</i>	<i>Netilmicin</i>	<i>Garamin</i>	<i>DSA</i>
1	103.85	103.85	103.86	103.86	103.91	103.88	104.21	103.74	
2	69.01	68.72 / 68.97 ^a	68.96	68.96	68.34	69.06	69.33	69.10	
3	66.07	63.01	66.00	66.00	66.03	66.14	66.34	66.18	
4	72.72	72.65	72.60 / 72.63 ^b	72.60 / 72.63 ^b	72.61	72.65	72.62	72.65	
5	70.60	70.55	70.55	70.55	70.52	70.37	70.36	70.34	
7	23.67	23.63	23.61	23.61	23.62	21.80	21.79	23.63	
9	37.38	37.27	37.20	37.20	37.18	37.21	37.42	37.23	
11 / 13	77.12 / 86.40	77.09 / 86.36	77.09 / 86.36	77.09 / 86.36	77.22 / 86.31	76.35 / 85.84	76.35 / 48.79	75.25 / 86.06	75.08
12	79.33	79.28	79.38	79.38	78.51	81.80	81.56	76.53	77.46
14 / 16	51.41 / 51.53 / 52.37 ^a	45.35 / 51.43 / 53.40 ^a	52.30 / 51.53 / 51.45 ^b	52.30 / 51.53 / 51.45 ^b	52.48 / 51.31 ^a	52.70 / 50.89	50.91 / 58.97	52.50 / 52.84	52.82
15	30.41	30.37	30.32 / 30.37 ^b	30.32 / 30.37 ^b	30.43	30.17	28.05	30.55	30.90
20	97.83	97.47	97.82	97.86	99.00	99.97	99.97		
21	51.41 / 51.53 / 52.37 ^a	45.35 / 51.43 ^a / 52.40	51.30	52.30 / 51.53 / 51.45 ^b	52.48 / 51.31	48.81	86.57		
22						23.62	26.40		
23	23.28 / 25.30 ^a	23.16 / 28.10 ^a	22.92 / 23.28 / 25.25 / 27.91 ^b	22.92 / 23.28 / 25.25 / 27.91 ^b	28.29 / 23.12 ^a	103.13	103.13		
24	72.01	68.72 / 68.97 ^a	71.01	72.06 / 72.63 ^b	68.99	146.35	146.35		
25	60.43	45.36	53.82	53.82	54.92	43.31	43.78		
26 (=CH₃)	12.64		15.21						
27 (=CH₃)				16.88					
29 (=CH₃)	34.05				36.19				
30							43.90		
31							17.68		

a) eine exakte Zuordnung war nicht möglich ^b) eine exakte Zuordnung war nicht möglich; die Anzahl der Signale ist darin begründet, dass ein Gemisch von C2 und C2a untersucht wurde. (Tabelle modifiziert aus [106])

Tabelle 2.2-5: ¹³C-NMR Daten (100 MHz) die Hauptkomponenten von Gentamicin (C1, C1a, C2 und C2a), gemessen in verdünnter Deuterioschwefelsäure, der Nebenkompnenten Gentamicin C2b, Sisomicin und Netilmicin, gemessen als Sulfate in D₂O, der Nebenkompnenten 2-Desoxystreptamin (DSA), gemessen als Hydrochlorid in D₂O und Garamin, gemessen als Dihydrochlorid in D₂O. Angegeben sind die chemischen Verschiebungen δ in ppm.

In Abbildung 2.2-13 sind die Verschiebungen der chemischen Verschiebung zwischen den Messungen in D₂O und den Messungen nach Zusatz von Deuterioschwefelsäure aufgetragen. Man sieht deutlich die stärkeren Tieffeldverschiebungen von H2 und H3 im Garosaminteil verglichen mit den anderen Protonen dieses Molekülteils. Ebenso ist im 2-Desoxystreptaminteil die Verschiebung der chemischen Verschiebung am kleinsten für H12, dem am weitesten von den Aminogruppen entfernten Proton. Auch im Purpurosaminteil zeigt sich diese Tendenz, jedoch können aufgrund des unterschiedlichen Substitutionsmusters der Seitenkette keine sicheren Aussagen getroffen werden, da hier jede Komponente für sich betrachtet werden muss. Insgesamt zeigt sich sehr deutlich, dass die Unterschiede der chemischen Verschiebung in der unmittelbaren Nähe der fünf Aminogruppen größer sind als bei weiter entfernten Atomen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass tatsächlich alle Aminogruppen protoniert vorliegen.

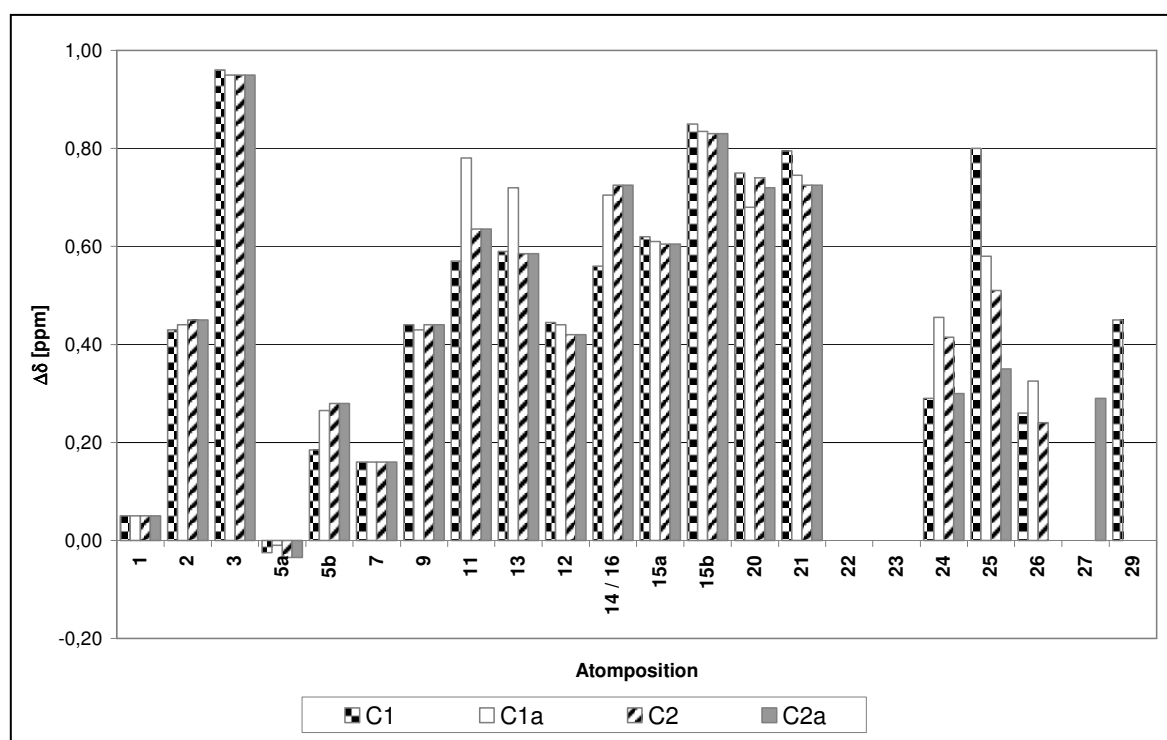


Abbildung 2.2-13: Unterschiede in den chemischen Verschiebung der einzelnen Wasserstoffe zwischen den freien Basen von Gentamicin C1, C1a, C2 und C2a und den korrespondierenden Sulfaten. Angezeigt sind nur die Positionen, an denen Wasserstoffe sitzen. Die δ -Werte der Positionen 22 und 23 konnten nicht genau zugeordnet werden. Sofern unaufgelöste Multipletts Protonen zugeordnet wurden (vgl. Tabelle 2.2-2 und Tabelle 2.2-3), wurde jeweils dessen Mitte als Bezugspunkt genommen.

2.2.4.3 HPLC-UV-MS-NMR-Untersuchungen von Gentamicin

Mit dem Ziel, Hinweise auf die unbekanntes Verunreinigungen der „schmutzigen“ Gentamicin-Proben zu erhalten, wurden HPLC-NMR-gekoppelte Untersuchungen durchgeführt.

Hierbei stellte sich das Problem, das jeglicher Gentamicin-Trennung innewohnt: die einander strukturell sehr ähnlichen Komponenten chromatographisch voneinander zu trennen. Die im EuAB beschriebene, von Adams et al. [101] veröffentlichte Methode ist zwar hinsichtlich der Trennung grundsätzlich für diese Zwecke brauchbar. Sie beruht allerdings auf einer Ionenpaarchromatographie, bei der Natrium-Oktansulfonat zugesetzt wird. Die Menge würde sowohl die massenspektrometrische Detektion zur Überwachung der Chromatographie unmöglich machen, als auch die NMR-Messungen stören.

Generell sind die Anforderungen an ein für die NMR-Spektroskopie taugliches Fließmittel vergleichsweise hoch. Selbstverständlich sollten nur *deuterierte* Komponenten verwendet werden. Wird aus Kostengründen darauf verzichtet, geht durch die Verwendung von Methoden zur Unterdrückung der Lösungsmittelsignale viel Information verloren [107]. Aber selbst bei Verwendung von deuterierten Lösungsmitteln ist es, aufgrund der geringen Konzentration der Probe im Eluat, immer noch notwendig, die (auf unvollständig deuteriertem Lösungsmittel beruhenden) Lösungsmittel-Restsignale mit geeigneten Pulsfolgen zu unterdrücken. Außerdem sollten jegliche organische Zusätze vermieden werden, da diese im Verhältnis zum Analyten in großen Mengen vorliegen und die Sensitivität des A/D-Wandlers beeinträchtigen, also die schwächeren Signale des Analyten noch kleiner erscheinen lassen. Somit kommen für die Chromatographie eigentlich nur Gemische aus D₂O und Acetonitril-d₃ oder D₂O und Methanol-d₄ in Frage. Selbst in der LC-MS gebräuchliche Zusätze zur pH-Einstellung wie Ameisensäure sind ungeeignet. Zur pH-Einstellung sind anorganische Puffer, idealerweise deuteriert, oder deuterierte Säuren und Laugen (NaOD, DCI etc.) heranzuziehen.

Eine Annäherung an eine geeignete HPLC-Trennung wurde von zwei veröffentlichten Methoden aus versucht. Zum einen die bereits erwähnte EuAB-Methode und zum anderen eine LC-MS-Methode von Getek [108]. Die Bedingungen der beiden Methoden sind in Tabelle 2.2-6 einander gegenübergestellt.

Parameter	EuAB-Methode (Adams et al. [101])	Methode von Getek et al. [108]
Säule	Poly(Styrol-Divinylbenzol), 1000 Å, 8µm, 250 * 4,6 mm I.D.	RP18, 100 * 4,6 mm I.D.
Fließmittel	Natriumsulfat (60 g/L), Natriumoktansulfonat (1,75 g/L), Tetrahydrofuran (8 ml/L), Phosphatpuffer pH 3,0, 0,2 M (50ml/L) in Wasser	94 Teile 0,11 M Trifluoressigsäure in Wasser, pH 3,6 (mit Ammoniumhydroxid eingestellt) und 6 Teile Methanol
Flußrate	1 ml/min	1 ml/min
Säulentemperatur	50 °C	k. A.
Detektion	Gepulster elektrochemischer Detektor	Massenspektrometrisch, mit Thermospray-Ionisation

Tabelle 2.2-6: Vergleich zweier HPLC-Methoden zur Trennung von Gentamicin

Ebenso wie in der Methode nach Getek werden bei anderen veröffentlichten LC-MS-Methoden zur Analytik von Gentamicin flüchtige Ionenpaarreagenzien dem Fließmittelgemisch zugesetzt [109, 110, 111]. Daher war es erforderlich, eine LC-Methode zu suchen, die eine brauchbare, wenn auch nicht perfekte Trennung, der Gentamicin-Komponenten liefern kann, ohne auf die publizierten Fließmittelzusätze zurückzugreifen. Ohne eine detaillierte Optimierung des Fließmittels durchzuführen, konnte mit einem ternären Fließmittel (15 % Wasser, 10 % Acetonitril und 75 % 0,1 M wässrige Natronlauge; protoniert für die Testläufe, deuteriert für die NMR-gekoppelten Messungen) eine ausreichende Trennung auf einer Divinylbenzol-Styrol-Copolymer-Säule erreicht werden.

In Abbildung 2.2-14 ist exemplarisch ein solches Chromatogramm gezeigt. Übereinander liegen die Graphen des Gesamtionenstromes (TIC, total ion current), das Signals des UV-Detektors (DAD) und der Verlauf der Flussrate. Deutlich sichtbar ist, dass das Fehlen chromophorer Gruppen eine UV/Vis-spektrometrische Detektion nicht erlaubt. Hingegen zeigt der Graph des TIC deutlich den Verlauf der chromatographischen Trennung.

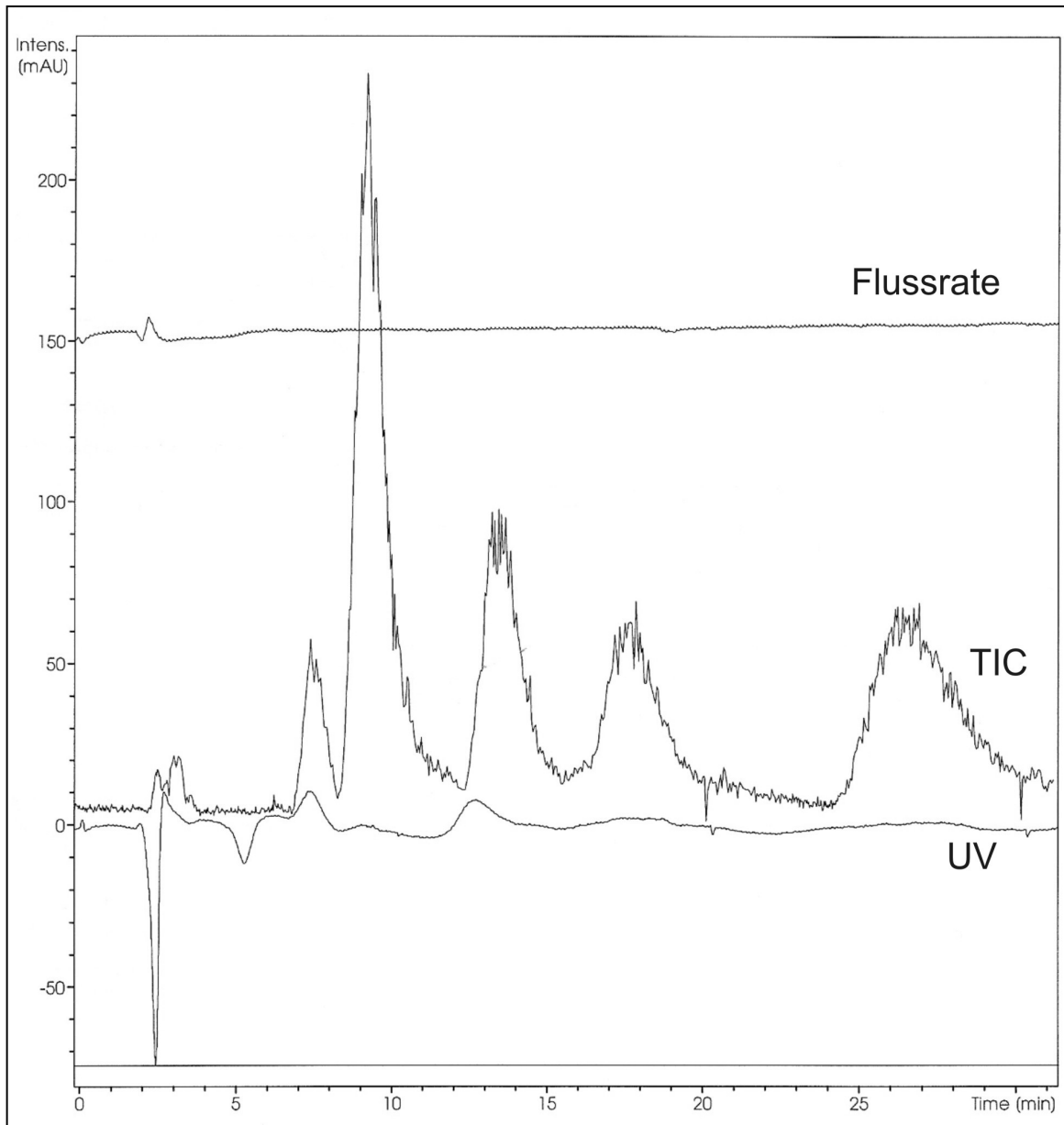


Abbildung 2.2-14: Chromatogramm der MS-NMR-gekoppelten HPLC-Trennung von Gentamicin. In der Grafik sind übereinander gelegt die Kurven der MS (TIC, „total ion current“), das Signal der UV-Spektrometrie (DAD, 200-400 nm) und die Flussrate zu sehen.

Zur Kopplung zwischen HPLC und NMR gibt es drei grundsätzlich verschiedene Varianten [107, 112]:

1) „On-flow“-Modus

Bei dieser Einstellung wird der Auslass des HPLC-Detektors (i. d. R. UV/Vis) direkt an den NMR-Probenkopf angeschlossen. Während eluiert wird, werden kontinuierlich Spektren aufgenommen.

Auf diese Weise ändert sich ständig die Zusammensetzung der gemessenen Lösung im Probenkopf, und das erhaltene Spektrum ist der

Durchschnitt der während eines bestimmten, vom Anwender definierten, Zeitabschnittes durch den Probenkopf geflossenen Lösung.

2) „Direct-stopped-flow“-Modus

Auch hier wird der Ausgang des HPLC-Detektors direkt an den NMR-Probenkopf angeschlossen, ein spezielles Interface ist nicht erforderlich. Im Unterschied zu 1) wird der chromatographische Prozess unterbrochen, sobald ein Peak den NMR-Probenkopf erreicht (der Zeitpunkt kann aus der Kapillarlänge zwischen Detektor und Probenkopf in Zusammenhang mit der Flussrate bestimmt werden). Der Vorteil gegenüber 1) ist hier, dass sich die Zusammensetzung der Lösung im Probenkopf nicht ändert und somit auch länger dauernden NMR-Experimente durchgeführt werden können. Der Nachteil bei dieser Variante ist allerdings, dass während der Wartezeit Diffusionen der Probe in der Säule stattfinden und so die Peaks breiter werden.

3) „Storage“-Modus

Für diese Variante ist im Unterschied zu dem „On-flow“- und „Direct-stopped-flow“-Modus ein Interface notwendig. Wenn ein Peak im HPLC-Detektor detektiert wird, wird das Eluat in Probenschleifen zwischengelagert. Nach dem Abschluss der Chromatographie wird das in den Schleifen gelagerte Eluat in den Probenkopf transferiert und kann so vermessen werden. Die Vorteile dieser Methode liegen auf der Hand, müssen jedoch mit einem deutlich erhöhten apparativen Aufwand erkaufte werden.

Die Messungen wurden nach der Variante 1) im „On-flow“-Modus durchgeführt. Die erhaltenen Daten sind pseudo-2D-Spektren, in denen jede Reihe ein normales ^1H -Spektrum darstellt: während das Eluat durch den Probenkopf strömt, wird kontinuierlich gemessen. Jeweils 32 aufeinander folgende Wiederholungsmessungen werden addiert und als *ein* Spektrum abgespeichert.

Der Vorteil der einfachen Messung hierbei wird durch das schlechte S/N der NMR-Spektren erkaufte. Nach einer passenden zweidimensionalen Fouriertransformation erhält man ein zweidimensionales Diagramm, das die jeweils gefundenen Signale in einer Reihe wiedergibt. Es kann wie andere zweidimensionale Messungen beispielsweise als Höhenlinien dargestellt werden. Dabei ist auf der F2-Achse (Reihen in x-Richtung) die chemische Verschiebung in ppm aufgetragen und auf der

F1-Achse (y-Richtung) der Zeitverlauf der Chromatographie. In Abbildung 2.2-15 sind zwei solcher Diagramme gezeigt, eines von einer „sauberen“ Probe und eines von einer „schmutzigen“ Probe. Die Reihen können einzeln betrachtet werden und sind unmittelbar die ^1H -NMR-Spektren der jeweils eluierenden Substanzen. In allen Proben sind Signale (sowohl bei der MS-Detektion als auch in den NMR-Spektren) nach etwa 9, 14, 18 und 25 Minuten zu sehen. Bei der „schmutzigen“ Probe kommen zusätzliche Signale nach ca. 3 Minuten dazu. Um nun die Signal-peaks bzw. NMR-Spektren den bereits bekannten Komponenten zuzuordnen, wurden zwei ergänzende Wege verfolgt.

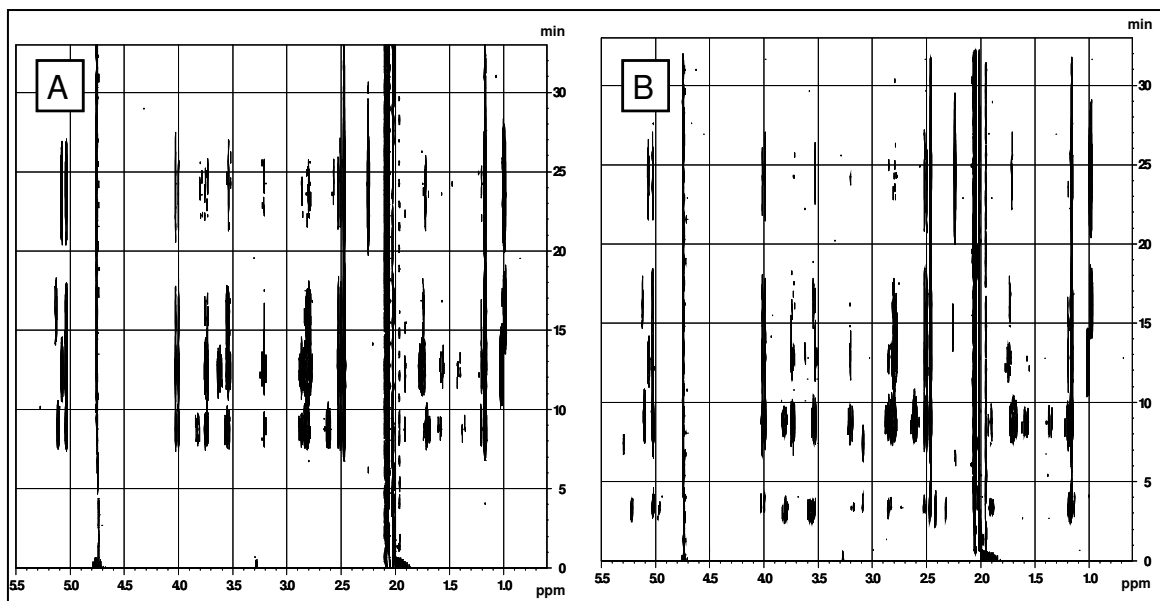


Abbildung 2.2-15: LC-NMR-Diagramm von zwei Gentamicin-Proben. Links (A) eine saubere Probe und rechts (B) eine stärker verunreinigte Probe. In dieser sind weiter Spuren, die Verunreinigungen entstammen aufzufinden [106].

Während die HPLC-NMR-gekoppelten Messungen mit deuterierten Lösungsmittel durchgeführt wurden, wurde die Entwicklung mit normalen Lösungsmitteln erreicht. Daher liegen sowohl MS-Daten für die Verbindungen mit Protonen (^1H) als auch für solche mit Deuterium (^2H) an entsprechenden (-OH, -NH) Gruppen vor. Aus den Unterschieden der $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Signale der einzelnen Substanzen kann auf die Zahl der austauschenden Protonen (und somit die Gesamtanzahl der -NH und -OH-Gruppen) geschlossen werden. Anschließend werden die jeweils ermittelnden Massen mit denen der Gentamicin-Komponenten verglichen. Um die so erreichte Zuordnung zu überprüfen, werden die ^1H -NMR-Spektren der einzelnen Komponenten mit den NMR-Spuren verglichen. Aufgrund des schlechten S/N-Verhältnisses bei der LC-NMR-Kopplung können hierbei allerdings nur die starken

Signale der N- und C-Methylgruppen sehr gut ausgewertet werden. Die übrigen Signale sind nur zum Teil in den Vergleich einbeziehbar. In der „schmutzigen“ Probe ist nach ca. 3,5 Minuten eine Substanz mit einem m/z-Wert von 518 und eine mit einem von 353 zu erkennen. Während der m/z-Wert 353 dem Garamin-Natriumaddukt zugeordnet werden kann, ist der Wert 518 mit keiner bekannten Gentamicin-Komponenten in Übereinstimmung zu bringen. Die NMR-Daten geben hierzu auch keine Hilfe. Während die Gentamicin-C-Komponenten mit Hilfe der NMR-Daten sicher zugeordnet werden können, bestünde allein aufgrund des Vergleichs der Spektren für das Signal bei etwa 8 Minuten noch Unsicherheit. Die NMR- und MS-Spektren zusammen lassen jedoch die Zuordnung zu Sisomicin zu. In Tabelle 2.2-7 sind die durch die NMR-Spektren den Spuren zugeordneten Gentamicin-Komponenten und die Resultate der MS-Auswertungen zusammengestellt.

Somit bietet auch die HPLC-NMR-Kopplung eine Möglichkeit zur detaillierten Untersuchung von Aminoglykosidantibiotika.

Elutionszeit (im deuteriertem Fließmittel)	m/z		Zugeordnete Gentamicin-Komponenten	
	des Hauptpeaks	Diff. zw. H ₂ O- und D ₂ O-Lauf		M _r
3.5 min	353	n.b.	Garamin-Na-Addukt?	353
3.5 min	518	n.b.	?	
8.0 min	482	n.b.	Sisomicin-Na-Addukt	482
9.5 min	484	12	C1a-Na-Addukt	484
13.5 min	498	12	C2a/C2-Na-Addukt	498
18.0 min	498	n.b.	C2a/C2-Na-Addukt	498
26.5 min	511	11	C1-Na-Addukt	511

Tabelle 2.2-7: Vergleich der massenspektrometrischen Daten der LC-MS-NMR-gekoppelten Untersuchungen einer Gentamicin-Probe in deuteriertem und nicht-deuteriertem Fließmittel sowie die Zuordnung zu den entsprechenden Gentamicin-Komponenten. Die Zuordnung wurde durch Vergleich der entsprechenden ¹H-NMR-Spektren abgesichert, vgl. Text.

Das schlechte S/N-Verhältnis in den einzelnen ¹H-NMR-Spektren könnte verbessert werden, wenn nach der oben beschriebenen Varianten 3) („Storage“-Modus) verfahren würde. Eine Alternative wäre eine HPLC-SPE-Kopplung („solid phase

extraction“), bei der mehrere HPLC-Läufe einer Probe gemacht werden und die eluierenden Substanzen jeweils identischer Peaks auf einer passenden Kartusche gesammelt würden. Auf diese Weise kann die Substanzmenge für die NMR-Messungen angereichert und bessere Spektren erhalten werden.

2.2.4.4 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen

Eine Trennung der Gentamicin-Komponenten mittels Mizellarer elektrokinetischer Chromatographie wurde entwickelt [104, 105] und mit dieser insgesamt über 40 verschiedene Gentamicin-Chargen verschiedener Hersteller und Händler untersucht. Der Hintergrundelektrolyt war dabei aus 100 mM Natriumtetraborat-Decahydrat (pH 10,0), 20 mM Natriumdesoxycholat und 15 mM β -Cyclodextrin zusammengesetzt. Die Trennung fand in einer unbeschichteten Quarzglas-Kapillare mit einer effektiven Länge von 24,5 cm, bei einer Temperatur von 25 °C und einer Trennungsspannung von 12 kV statt. Die Detektion erfolgte UV-spektroskopisch bei 340 nm. Hierzu wurde das Gentamicin-Gemisch mit *o*-Phthaldialdehyd und Thioglykolsäure vor der Injektion derivatisiert.

In Abbildung 2.2-16 sind zwei Elektropherogramme von zwei der mit dieser Methode untersuchten Gentamicin-Chargen gezeigt. Während die linke Abbildung (B) ein Beispiel für eine sehr saubere Probe darstellt, sind in der in der rechten Abbildung (A) gezeigten Probe zahlreichen Nebenkomponenten bzw. Verunreinigungen enthalten. Diese konnten, wie in der Abb. gezeigt, identifiziert werden. Die Buchstaben a bis h stehen für unbekannte Verunreinigungen. Die Zuordnung der Peaks ist in [105] beschrieben.

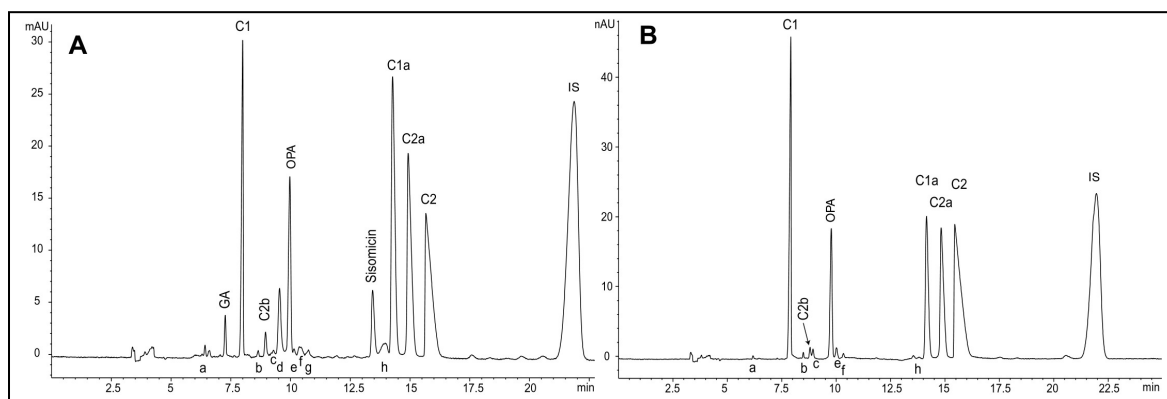


Abbildung 2.2-16: Elektropherogramme zweier kommerziellen Proben mit einem hohen Anteil (A) und sehr niedrigem Anteil an Nebenkomponenten (B) (aus [105])

Die Bestimmung der Verhältnisse der Komponenten zueinander kann nach verschiedenen Verfahren erfolgen.

Nach der der Monographie im EuAB 4.4 angelehnten Methode werden Responsefaktoren (RF) für jede Komponente (X) folgendermaßen aus der Peakhöhe H und dem deklarierten Anteil der CRS (F) ermittelt:

Formel 2.2-1

$$RF_x = \frac{H_x}{F_x}$$

Die Anteile A (in %) der einzelnen Komponenten können dann berechnet werden aus den Peakhöhen H' der Komponenten in der Untersuchungslösung und den Responsefaktoren RF als:

Formel 2.2-2

$$A_x = \frac{\frac{H'_x}{RF_x} \cdot 100}{\sum \frac{H'_i}{RF_i}}$$

In der Monographie des EuAB 4.4 werden nur die vier Hauptpeaks (C1, C1a, C2 und C2a) berücksichtigt, nicht jedoch auftretenden Nebenprodukte. In der im EuAB 4.5 gültigen Monographie wird nach dem Normalisierungsverfahren ausgewertet. Hierzu werden *alle* relevanten Peaks (Haupt- und Nebenkomponenten) aufaddiert und dann zueinander ins Verhältnis gesetzt. Überträgt man dieses Verfahren auf die CE, so müssen *korrigierte* Peakflächen (Fläche/Migrationszeit) verwendet werden. Aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten am Detektor ist diese Korrektur in der CE notwendig.

Vergleicht man diese beiden (auf die CE übertragenen) Auswertemethoden, so ist festzustellen, dass die Anteile der Hauptkomponenten über die beiden Methoden hinweg nicht vergleichbar ist: auf der einen Seite werden die Anteile durch den Bezug auf die CRS genau bestimmt, auf der anderen Seite werden lediglich Flächenanteile berechnet [105].

2.2.4.5 Quantitative NMR-Untersuchungen

Wie eingangs erwähnt (Kapitel 2.2.3) wurden bereits im DAB9 ¹H-NMR-Spektren (60 MHz) zu einer quantitativen Auswertung der Zusammensetzung des Gentamicin-Gemisches herangezogen. In dieser Monographie wurden die Höhen der Sig-

nale der Methylgruppen an den Positionen 7 und 26 bzw. 27 sowie an den Positionen 9 und 29 verglichen. Die Unterschiede in der chemischen Verschiebung zwischen den verschiedenen Gentamicin-Komponenten sind so gering, dass jedes im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sichtbare Signal mehreren Komponenten zuzuordnen ist. In den bei 400 MHz vermessenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sind im Bereich der anomeren Wasserstoffe nicht nur Signale verschiedener Verunreinigungen nachzuweisen, sondern es sind für die anomeren Wasserstoffe des Purpurosaminteils einzelne Signale zu sehen. Diese vier Dubletts konnten durch Vergleich der Daten aus den Messungen der getrennten Komponenten untereinander und mit den Signalen im Gemisch den Gentamicin-Komponenten C1, C1a, C2 und C2a zugeordnet werden. Die Zuordnung konnte durch Spiking-Experimente bestätigt werden. Für eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung des Gentamicin-Gemisches können daher diese herangezogen werden. Um NMR-Spektren verlässlich quantitativ auswerten zu können, ist eine jedoch ausreichende Trennung der zu integrierenden Signale von benachbarten Signalen erforderlich (Basislinientrennung), was jedoch nicht gegeben ist. Um die schlechte Trennung zu verbessern, gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen kann eine mathematische Verbesserung der Trennung erreicht werden, indem die experimentell erhaltenen Spektren der idealen Linienform mittels „Dekonvolution“ angepasst werden. Da aber das Signal von Gentamicin C2b nicht zu sehen ist, ist bei hierbei Vorsicht geboten. Zum anderen können die Proben mit einem Spektrometer, das eine höhere magnetische Flussdichte aufweist vermessen werden.

Beide Möglichkeiten wurden untersucht. In Abbildung 2.2-17 ist die Spektrenregion der anomeren Protonen des unbehandelten Spektrum derselben Region nach Behandlung mit zwei verschiedenen Algorithmen zur Dekonvolution gegenübergestellt. Zum einen wurden die experimentellen Daten einer reinen Lorentzlinie angepasst, zum anderen wurde sie einer reinen Gauß-Linieform angepasst. Eine deutliche Verbesserung der Trennung ist bei keiner der beiden zu sehen. Sowohl in den unbehandelten Spektren als auch in den behandelten wurde versucht, die vier Signale getrennt voneinander zu integrieren.

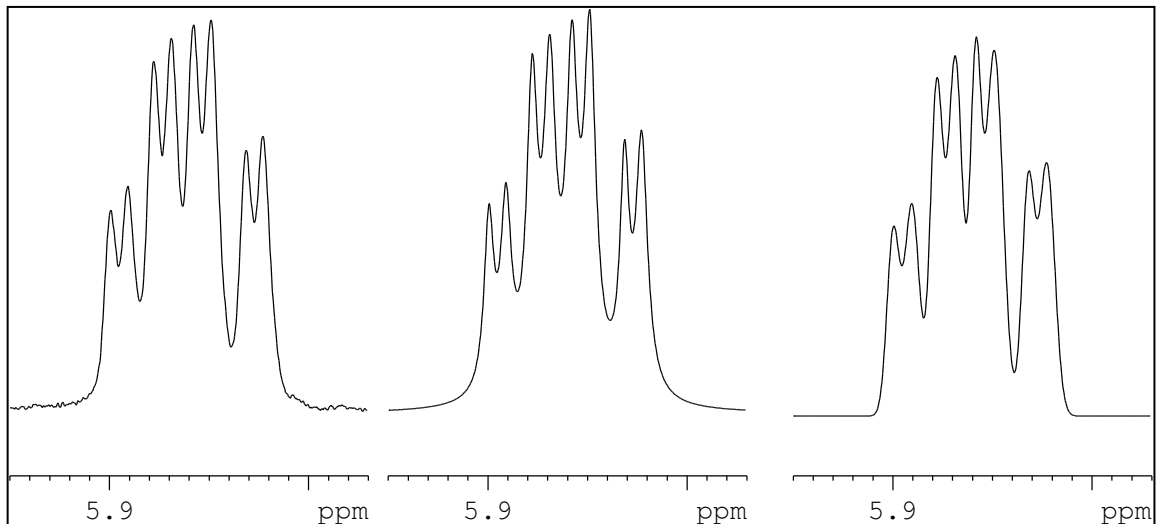


Abbildung 2.2-17: Ausschnitt aus dem ^1H -Spektrum von Gentamicin, abgebildet ist der Bereich der anomeren Protonen des Purpurosaminteils. Links zum Vergleich das normale Spektrum, in der Mitte nach Dekonvolution angepasst an eine Lorentzlinie und rechts nach Dekonvolution angepasst an eine Gausslinie.

Es wurden daraus dann jeweils die Anteile an Gentamicin C1, C1a, C2 und C2a, bezogen auf diese vier Komponenten errechnet. Hierfür wurden die Integralwerte des Signals des entsprechenden anomeren Wasserstoffs mit der Molmasse der entsprechenden Komponente multipliziert (um die Vergleichbarkeit mit den MEKC-Daten zu ermöglichen, siehe unten). Anschließend wurde der Anteil dieses Produktes an der Summe aller vier Produkte errechnet. Dies stellt dann unmittelbar den Massenanteil der betreffenden Komponente, bezogen auf alle vier Komponenten dar. Da auch bei Anwendung von Dekonvolutionsmethoden *keine* Basislinien-trennung erreicht werden konnte (vgl. Abbildung 2.2-17), sind erwartungsgemäß die Unterschiede zwischen den Berechnungsmethoden (ohne, mit Dekonvolution) nicht signifikant. Eine exakte quantitative Aussage ist allerdings in allen Fällen aufgrund der fehlenden Trennung der Signale nicht möglich. Außerdem ist kein Signal von Gentamicin C2b zu sehen. Auch wenn dies nur in geringen Mengen vorkommt, so führt dies doch zu falsche Ergebnissen, wenn das zu C2b gehörige Signal zusammen mit einem anderen Signal integriert wird.

Um eine mögliche Verbesserung durch höhere Feldstärken zu überprüfen, wurde eine Auswahl der Gentamicin-Chargen auf einem 600 MHz-Spektrometer vermessen. Um möglichst exakte Integralwerte zu erhalten, wurde die T_1 -Relaxationszeit dieser vier Wasserstoffe bestimmt und der Abstand zwischen zwei Impulsen mit 6,45 Sekunden dementsprechend gewählt. Die Anregungsfrequenz lag in der Mitte des in Abbildung 2.2-18 dargestellten Bereiches.

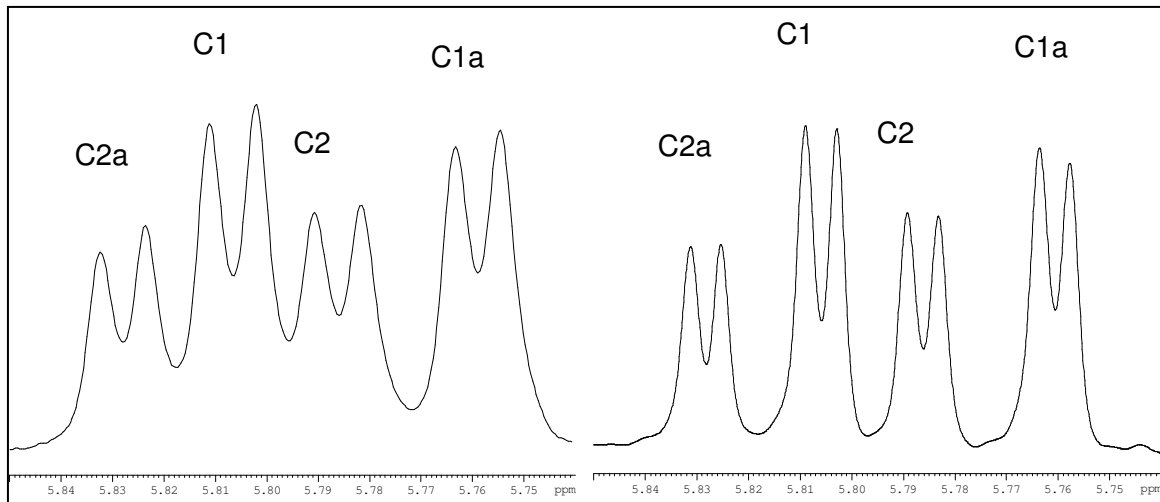


Abbildung 2.2-18: Vergleich der Region der anomeren Protonen des Purpurosaminteils, gemessen mit einem 400 MHz-Spektrometer (links) und einem 600 MHz-Spektrometer (rechts).

Wie Abbildung 2.2-18 deutlich zeigt, kann auf diese Weise eine Basislinientrennung der Signale annähernd erreicht werden. Die Trennung ist zwar nicht so groß, dass ein Bereich von der Größe der 20fachen Halbwertsbreite, wie es das Idealziel für quantitative Messungen ist, integriert werden kann. Die Verbesserung gegenüber den 400 MHz-Spektren ist aber deutlich. In den 400 MHz-Spektren überlappen die Signale und es ist so nicht möglich, die vier Signale getrennt voneinander zu integrieren. In den 600 MHz-Spektren dagegen können die vier verschiedenen Signale getrennt voneinander integriert werden. Ein Signal des entsprechenden anomeren Wasserstoffes von Gentamicin C2b ist allerdings auch in den so verbesserten Spektren nicht zu sehen.

In diesen Spektren wurden die vier Signale dann quantitativ ausgewertet und mit den MEKC-Daten verglichen. Hierzu wurden die Höhen der den Gentamicin-C-Komponenten zugehörigen Peaks folgendermaßen ausgewertet. Nach den in Kapitel 2.2.4.4 (Formel 2.2-1 und Formel 2.2-2) beschriebenen Methode wurden die Peakhöhen unter Berücksichtigung des entsprechenden Responsfaktors zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die Anteile von Gentamicin C1, C1a, C2 und C2a an der Gesamtsumme dieser vier Komponenten wurden berechnet. Durch die Bezugnahme auf die Responsfaktoren erhält man so die Massenverhältnisse dieser vier Komponenten. Die Integralwerte aus den NMR-Spektren wurden – unter Berücksichtigung der Molmasse der jeweiligen Komponenten – ebenfalls zueinander ins Verhältnis gesetzt. Nimmt man nun die auf diese Weise aus den Elektrophogrammen gewonnenen Anteile als die „wahren Anteile“, kann man bestimmen,

welcher Anteil davon mit Hilfe der Integrale aus den NMR-Spektren wiedergefunden werden kann.

In Abbildung 2.2-19 ist dieser Vergleich gezeigt. Die Abbildung gibt an, welcher Anteil (bezogen auf den Massenanteil wie aus den Elektropherogrammen bestimmt) durch die NMR-Spektren wiedergefunden werden kann. Der Marke von 100% in dieser Abbildung entspricht eine exakte Übereinstimmung des Anteils der jeweiligen Gentamicinkomponente in den beiden Methoden, NMR-Spektroskopie und MEKC. Bei den elf untersuchten Proben liegt der gefundene Anteil an Gentamicin C2a über dem in der MEKC bestimmten Anteil. Die in den Spektren gefundenen Anteile für Gentamicin C1 und C1a liegen im Mittel unter den in der MEKC gefundenen Anteilen. Da Gentamicin C2b zwar in der Regel in geringen – aber doch bestimmbar – Mengen vorkommt und auch in den 600 MHz-Spektren kein Signal für H₂O dieser Komponente zu sehen ist, liegt es nahe, dass das Signal des zugehörigen anomeren Protons unter dem Signal des anomeren Protons von Gentamicin C2a verdeckt liegt.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde der Vergleich zwischen den aus den MEKC- und NMR-Daten berechenbaren Anteilen erneut durchgeführt. Im Unterschied zur eben erläuterten Vorgehensweise wurden die in der MEKC gefundenen Gehalte von Gentamicin C2a und C2b zusammengefasst und mit dem zu dem Gentamicin C2a zugeordneten Signal verglichen. Dies ist in Abbildung 2.2-20 dargestellt. Man sieht hierbei sehr deutlich, dass nicht nur die Summe der Anteile von Gentamicin C2a und C2b sehr gut mit dem Anteil der entsprechenden Integralfläche der NMR-Spektren übereinstimmt, sondern auch die Integralflächen der anderen drei Komponenten stimmen auf diese Rechenweise ideal mit den Anteilen aus den Elektropherogrammen überein.

Eine Messung mit einer mit Gentamicin C2b gespikete Probe bestätigte die durch diese Berechnungen nahegelegte Annahme, dass das Signal des anomeren Wasserstoffs von C2b durch das des korrespondierenden Signals von C2a verdeckt wird.

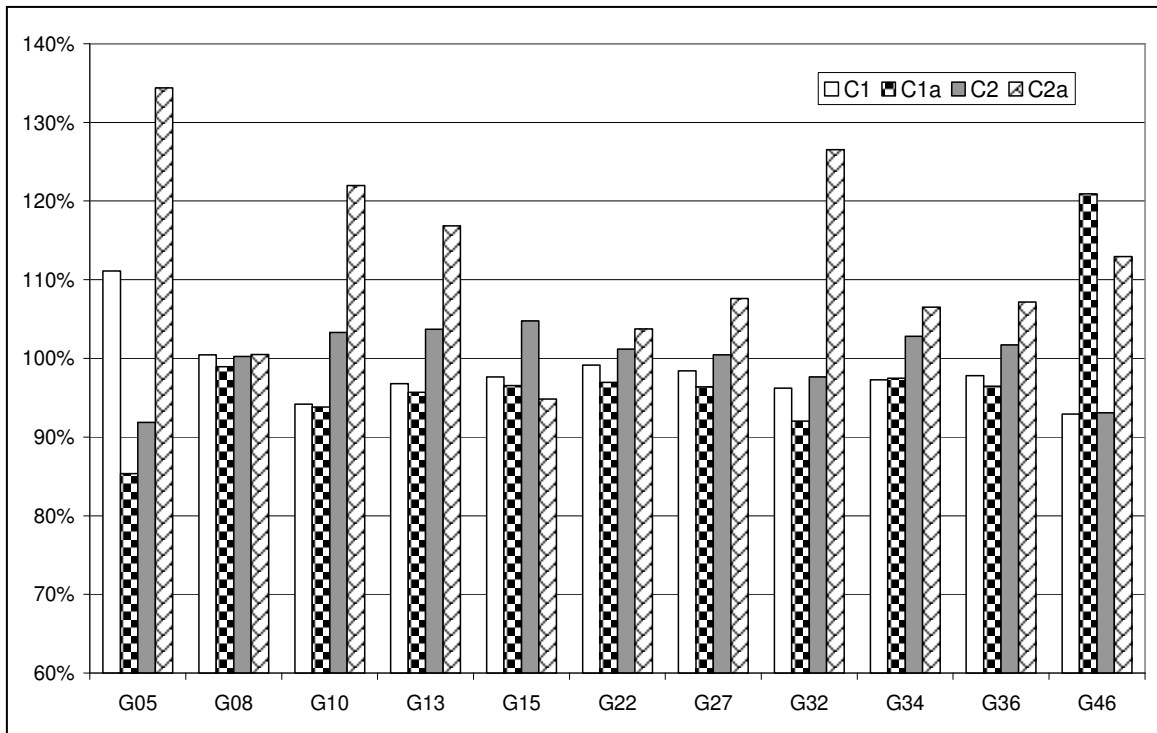


Abbildung 2.2-19: Vergleich der Anteile der Gentamicin-Hauptkomponenten von 11 unterschiedlichen Proben, wie sie aus den Integralen der NMR-Spektren gefunden wurden mit denen aus den Elektropherogrammen (diese als wahre Gehalte, 100 %, angenommen).

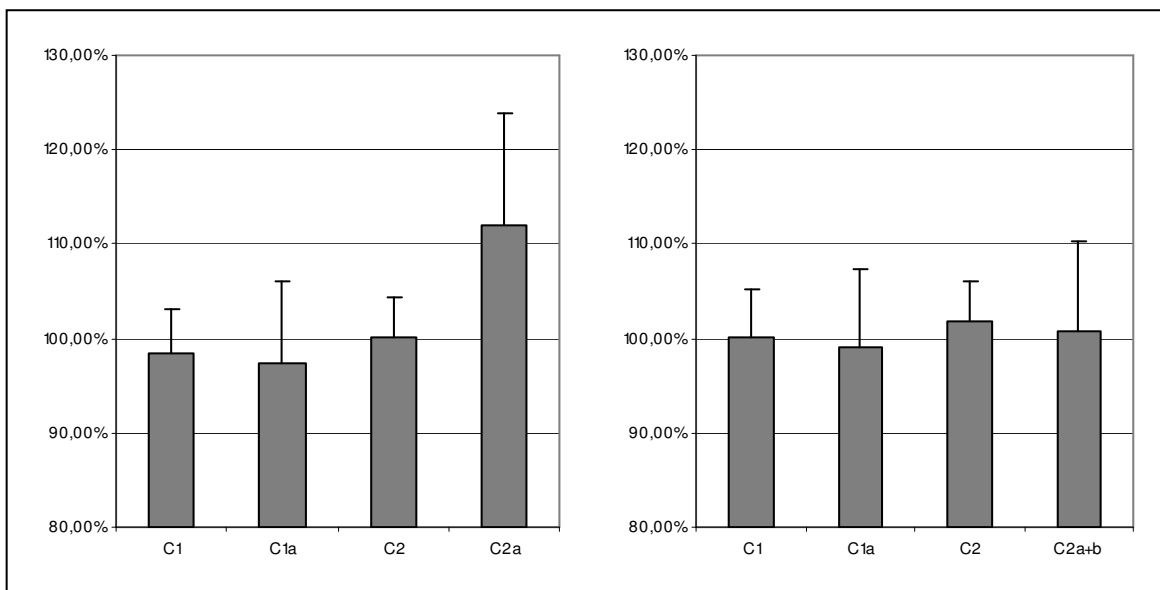


Abbildung 2.2-20: Vergleich der aus den Integralen der NMR-Spektren berechneten Anteile der Gentamicin-C-Komponenten mit den entsprechenden Anteilen aus den Elektropherogrammen: links der direkte Vergleich mit den zugeordneten Komponenten, rechts sind die Anteile von C2a und C2b aus den Elektropherogrammen zusammen genommen.

2.2.4.6 Vergleich verschiedener Gentamicin-Chargen

Insgesamt wurden 46 verschiedene Gentamicin-Chargen NMR-spektroskopisch untersucht. Diese stammten sowohl von verschiedenen Arzneimittelherstellern als auch von verschiedenen Lieferanten bzw. Herstellern des Gentamicins selbst.

Um die NMR-Spektren miteinander zu vergleichen, wurden verschiedene Aspekte berücksichtigt. Dies waren:

- 1) das Verhältnis der Signalhöhen im Bereich der anomeren Protonen zwischen 5.85 ppm und 5.92 ppm (die den verschiedenen Gentamicin-C-Komponenten zugeordnet werden konnten; vgl. Kapitel 2.2.4.1)
- 2) das Verhältnis der Höhen der N-Methylgruppen (Pos. 9 und 29) und der C-Methylgruppen (Pos.7 und Pos. 26/27) (analog zur Vorschrift des DAB 9, vgl. auch [95])
- 3) der Bereich zwischen den anomeren Protonen des Purpurosamin- und des Garosaminteils von 5.1 bis 5.9 ppm (einige der dort auftauchenden Signale konnten den Nebenkomponekte Sisomicin bzw. Netilmicin durch Spiken zugeordnet werden, eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Substanzen ist im NMR-Spektrum *nicht* möglich; vgl. Kapitel 2.2.4.1)
- 4) die Signale in unmittelbarer Nähe zu dem des anomeren Protons des Garosaminteils bei 5.08 ppm (diese Signale konnten der Nebenkomponekte Garamin zugeordnet werden; vgl. Kapitel 2.2.4.1)
- 5) der Bereich zwischen den Singulets der N-Methylgruppen zwischen 2.9 und 2.7 ppm (hier tauchen teilweise zusätzliche Singulets auf, die nicht genauer zugeordnet werden konnten)
- 6) der Bereich zwischen 2.1 und 2.5 ppm (hier tauchen teilweise zusätzliche Signale, Singulets, Dubletts, Triplets oder nicht näher charakterisierbare Multiplets, die alle nicht genauer zugeordnet werden konnten, auf).

Zwischen dem Bereich der anomeren Protonen des Purpurosaminteiles und des Garosaminteiles tauchen verschiedene Signale auf (siehe Abbildung 2.2-22). Die Zuordnung der Signale der Gentamicin-C-Komponenten im Purpurosamin- und im Garosaminteil sowie der Signale von Netilmicin, Sisomicin und Garamin wurde in Kapitel 2.2.4.1 beschrieben und konnte durch jeweiliges Spiken abgesichert werden. Die Signale des Wasserstoffes H₂O von Sisomicin und Netilmicin erscheinen im NMR-Spektrum allerdings bei gleicher chemischer Verschiebung. Somit kön-

nen allein aufgrund der NMR-Spektren keine Aussagen getroffen werden, welche dieser beiden Verunreinigungen in einer Probe gefunden wurde. Das Signal des anomeren Wasserstoffes von Garamin erscheint sehr nahe bei dem des anomeren Wasserstoffes des Garosaminteils der Gentamicin-C-Komponenten. Eine quantitative Bestimmung von Garamin wäre daher nicht möglich, der Unterschied in der chemischen Verschiebung ist aber ausreichend, um eine qualitative Aussage treffen zu können. Das Signal von JI-20B (Dihydroxy-C2a, Abbildung 2.2-21) konnte durch Vergleich mit den parallel zu den NMR-Messungen durchgeführten MEKC-Untersuchungen identifiziert werden [vgl. 105]. JI-20B und Sisomicin kommen zu meist in ähnlichen Anteilen in Gentamicin-Proben vor [101]. Vergleicht man in den Elektropherogrammen den Peak d, exemplarisch in Abbildung 2.2-16, mit dem Sisomicin-Peak, so kann Peak d mit großer Wahrscheinlichkeit der Verunreinigung JI-20B zugeordnet werden. Aufgrund der chemischen Verschiebung und der Größe im Vergleich zu dem Signal des anomeren Protons von Sisomicin, ist nahe liegend, dass das in Abbildung 2.2-22 entsprechend markierte Signal dem anomeren Proton von JI-20B zuzuordnen ist.

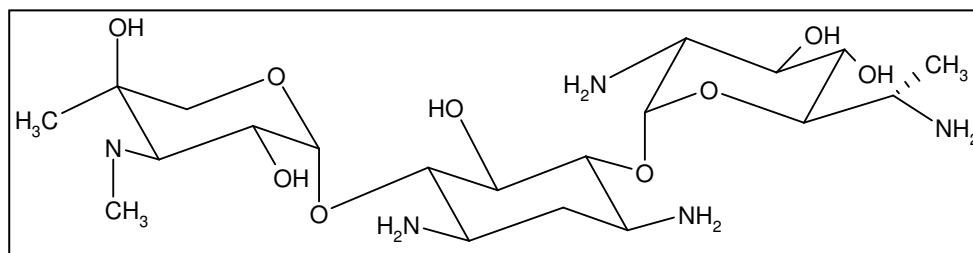


Abbildung 2.2-21: Struktur der Verunreinigung JI-20B (Dihydroxy-C2a)

Auf diese Weise konnten die verschiedenen Spektren der 46 Gentamicin-Proben in Gruppen eingeteilt werden. Eine grobe Unterteilung in zwei Obergruppen kann stattfinden in einerseits Sisomicin-haltige Proben und solche, in denen kein Sisomicin gefunden werden konnte. Weiterhin erhält man acht Hauptgruppen, die nochmals teilweise aufgrund kleinerer Unterschiede in Untergruppen eingeteilt werden können. Auch die Vergleiche der Elektropherogramme der 46 Gentamicin-Proben erlauben eine Gruppierung. Die Eingruppierung nach den NMR-Spektren deckt sich mit der, die mit Hilfe der Elektropherogrammen erreicht werden konnte. In Tabelle 2.2-8 ist diese Einteilung der 46 untersuchten Gentamicin-Chargen vorgenommen.

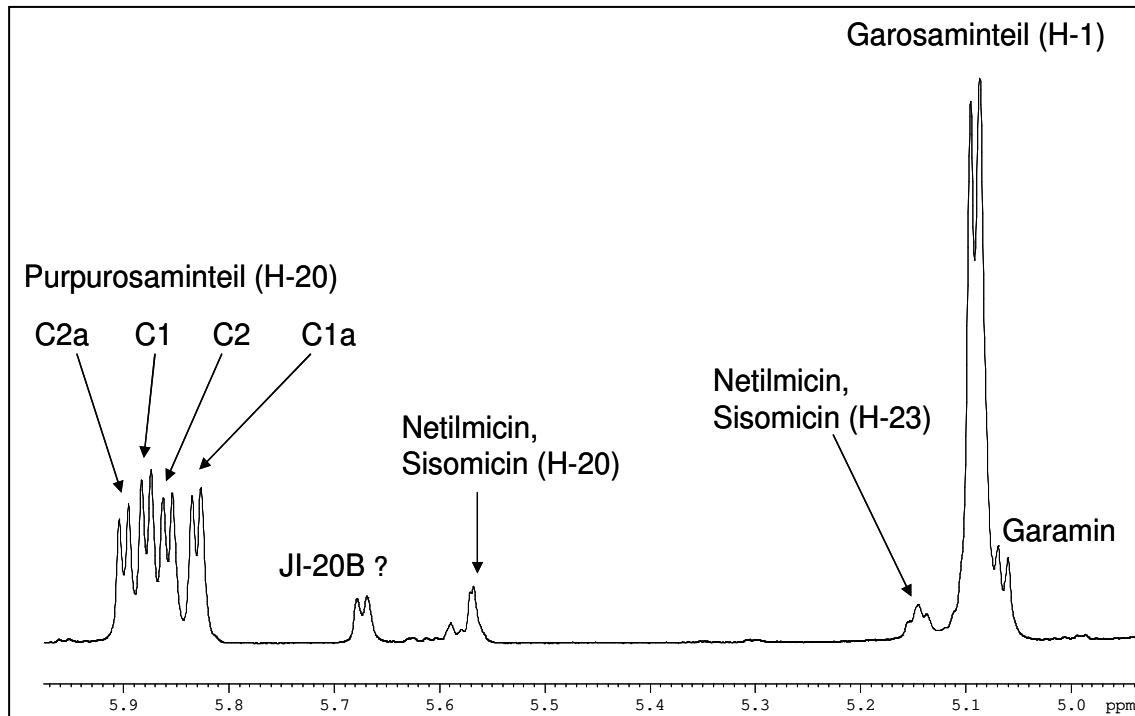


Abbildung 2.2-22: Bereich der anomeren Wasserstoffe von Gentamicin. Die Zuordnung der Signale des Purpurosaminteils zu den Gentamicin-C-Komponenten erfolgte mit Hilfe der Einzelsubstanzen, ebenso die der Signale von Netilmicin, Sisomicin und Garamin.

Auffällig dabei ist, dass sowohl in einer Gruppe verschiedene Lieferanten von Gentamicin auftauchen, was darauf hinweist, dass diese Lieferanten die gleiche Quelle haben, als auch dass Proben aus gleichen Quellen verschiedene Muster zeigen, d. h. von verschiedenen Herstellern stammen, was aufgrund der Zulassung nicht erlaubt ist.

Ober- gruppe	Haupt- gruppe	Unter- gruppe	Probencode	Vertreiber	Hersteller		
I	1	a	G05	F	VII		
			G16	A	I		
			G17, G18	A	II		
			G25		XI		
				b	G31, G32		XII
					G44	N	
				c	G20	G	IX
				d	G12	I	VIII
					G14	I	X
					G21	G	VIII
					G26		XI
					G41	N	
			2		G22		XI
	3		G46	N			
II	4	a	G01	E	VII		
			G07	H	III		
			G15	B	III		
			G40	N			
			b	G27, G28, G29, G30		XII	
			c	G03, G04	C	V	
			5		G36		XIV
				G45	N		
			6	a	G06	H	V
					G08, G09	L	V
					G39		XIV
				b	G19	K	V
					G34, G35, G37, G38		XIV
			7	a	G02	D	VI
					G10, G11	M	IV
				b	G23, G24		XI
					G42, G43	N	
	8		G13	I	X		
			G33		XIV		

Tabelle 2.2-8: Gruppeneinteilung der untersuchten Gentamicin-Chargen, ergänzt nach [113] und nach [105]

2.2.4.7 Ergebnis

Durch Anwendung verschiedener Routine-Messtechniken und spezieller Messtechniken war es möglich, sowohl das gesamte ^1H - als auch das gesamte ^{13}C -NMR-Spektrum der verschiedenen Gentamicin-Komponenten (Haupt- wie Nebenkomponten) sowie des Gentamicin-Gemisches zuzuordnen.

Der Vergleich der Spektren vieler verschiedener Chargen hat gezeigt, dass es möglich ist anhand des Verunreinigungsprofils solcherart biotechnologisch hergestellter Arzneistoffe deren Quelle zu bestimmen. Hierzu können sowohl charakteristische Signale in den NMR-Spektren als auch Peaks in den Elektropherogrammen herangezogen werden. Aus diesen Überlegungen resultiert die in Tabelle 2.2-8 wiedergegebenen Gruppeneinteilung. In der Regel erwerben die pharmazeutischen Hersteller den Arzneistoff Gentamicin bei Zwischenhändlern, die Chargen umfüllen, neu zertifizieren und etikettieren. Der pharmazeutische Hersteller kennt daher zumeist nur den Zwischenhändler, und ggf. dessen Quelle, oftmals aber nicht das eigentliche Labor, in dem die Gentamicin-Charge hergestellt wurde. Aufgrund der zunehmenden weltweiten Vernetzung der Handelsbeziehungen beinhaltet diese Praxis auch die Gefahr, dass absichtlich die Herkunft der API (active pharmaceutical ingredients) verschleiert wird. Dies macht die Notwendigkeit einer lückenlosen Nachverfolgbarkeit der Arzneistoffe vom Fertigarzneimittel in der Apotheke bzw. beim Patienten bis zum Produzenten des Wirkstoffs deutlich.

Im hier untersuchten Fall konnten im Nachhinein die Gentamicin-Proben die Sisomicin enthielten und die Gentamicin-Proben die in den USA zu den eingangs genannten Todesfällen führten verglichen werden. Es konnte festgestellt werden, dass die zu den Todesfällen führenden Proben stets auch Sisomicin enthielten [vgl. auch 105]. Der Schluss, dass Sisomicin für die Todesfälle verantwortlich war, kann daraus zwar nicht gezogen werden, da Sisomicin auch selbst als Antibiotikum Anwendung findet. Aber Sisomicin kann als Leitverunreinigung für stark verunreinigte Gentamicin-Proben betrachtet werden.

Der Vergleich der Integrale der Signale der anomeren Protonen des Purpurosaminteils der Hauptkomponenten mit den entsprechenden Werten aus den Elektropherogrammen macht zweierlei deutlich. Es gibt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den relativen Anteilen dieser Komponenten zwischen den beiden Methoden. Dies trifft aber nur zu, werden die Elektropherogramme nach

einer bestimmten Methode ausgewertet. Wertet man die korrigierten Peakflächen der Elektropherogramme aus, so findet man keine Übereinstimmung, bezieht man die Höhen mittels ermittelter Responsefaktoren auf eine CRS, so findet man diese. Nimmt man das Prinzip der quantitativen NMR-Spektroskopie, dass man hier direkt Molanteile bestimmt, ohne auf eine Referenz Bezug zu nehmen hinzu, wird klar dass

- Angaben über die Verhältnisse der Gentamicin-Komponenten aus der HPLC und MEKC sowohl von der Messmethode als auch von der Auswertungsmethode abhängig sind.
- Verhältnisse, die aus NMR-Spektren bestimmt werden, unmittelbar das Stoffmengenverhältnis und unter Berücksichtigung der molaren Massen das Massenverhältnis wieder geben.
- Wenn man über CRS Responsefaktoren für die MEKC-Messungen und danach die Massenanteile berechnet, diese mit den aus der NMR-Spektroskopie bestimmten Massenanteilen übereinstimmen.

Insgesamt zeigt sich an den Untersuchungen von Gentamicin nicht nur die bereits erwähnte Notwendigkeit der Rückverfolgbarkeit, sondern auch die sinnvolle Ergänzung verschiedener analytischer Methoden.

So ist die NMR-Spektroskopie eine wichtige Methode, um klassische chromatographische Methoden sowohl zu ergänzen als auch zu bestätigen. Aufgrund des unterschiedlichen Messprinzips in den beiden Methoden sind die so gewonnenen Ergebnisse unabhängig voneinander.

Die NMR-Spektroskopie kann daher als zunehmend wichtigere Methode angesehen werden, um auch analytische Aussagen über Gehalt, Zusammensetzung und Reinheit von Arzneistoffen zu treffen. Die Beschränkung auf Strukturaufklärung oder Identitätsprüfung ist eine Einschränkung der vielfältigen Möglichkeiten der NMR-Spektroskopie und es wäre sinnvoll diese aufzubrechen.

2.3 Interaktionen von Antibiotika mit Erregerzellen und Veränderungen der Diffusionskoeffizienten dieser Antibiotika

2.3.1 Theoretische Überlegungen

Unabhängig von der Art der antibiotischen Wirkung eines Pharmakons, muss dieses in eine Interaktion mit Erregerzellen treten, um eine Wirkung hervorrufen zu können.

Während ein in einem Lösungsmittel gelöstes Wirkstoffmolekül in diesem frei diffundieren und sich bewegen kann, gilt dies nicht für ein Molekül, das in eine Wechselwirkung mit einer Erregerzelle getreten ist. Wird der Wirkstoff in die Zelle inkorporiert oder bindet er an Zellstrukturen, so können die Moleküle nicht mehr frei in der Lösung diffundieren. Die Bewegung ist dann entweder auf den Raum im Inneren der Zelle beschränkt oder sie ist unmittelbar an die der Zelle gebunden. Die Interaktionen können auch als Komplex zwischen Strukturen der Zelle und dem Arzneistoffe aufgefasst werden. Dies führt zu Veränderungen der T_2 -Relaxationszeiten, was sich auch in der Messung von Diffusionskoeffizienten bemerkbar macht.

Diffusions-NMR-Experimente mit gepulsten Feldgradienten können grundsätzlich nicht nur zur Untersuchung von Stoffgemischen sondern auch zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren herangezogen werden [114]. Eine als „Affinity NMR“ bezeichnete Kombination aus Diffusionsmessungen mit gepulsten Feldgradienten und „total correlation spectroscopy“ (TOCSY) wurde zur Bestimmung von Interaktionen zwischen dem Vancomycin und Peptiden (als Modelle für relevante Strukturen von Bakterienzellwänden) eingesetzt [115, 116]. NMR-Untersuchungen von biologischen Flüssigkeiten sind nicht ungewöhnlich; beispielsweise wurde eine sehr ausführliche Untersuchung des überaus komplex zusammengesetzten menschlichen Blutplasmas unter Einsatz vieler verschiedener Messtechniken veröffentlicht [117]. Es ist mit speziellen Messköpfen auch möglich, mit Diffusions-NMR-Experimenten das Wasser innerhalb und außerhalb von Zellen zu unterscheiden [118], während dies für normale PFG-Messköpfe nur für größere Zellen beschrieben wurde [119, 120, 121].

Als Teilprojekt der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Voruntersuchungen durchgeführt, um Hinweise zu finden, ob und in welchem Ausmaß Interaktionen zwischen einem Antibiotikum und Erregerzellen sich in veränderten Diffusionskoeffizienten niederschlagen.

Als Antibiotikum wurde Ofloxacin gewählt, die benutzten Erregerzellen waren apathogene Stämme, nämlich *Micrococcus luteus*, *Streptococcus vestibularis* und *Pseudomonas fluoreszenz*. Ofloxacin hat als Gyrasehemmer eine relativ breite Wirksamkeit gegen zahlreiche klinisch relevante Erreger [122]. Alle drei Stämme sind empfindlich gegenüber Ofloxacin, die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) liegen für alle drei Bakterienstämme in einer vergleichbaren Größenordnung (*Micrococcus luteus* bei 2 µg/ml, *Streptococcus vestibularis* bei 4 µg/ml und *Pseudomonas fluoreszenz* bei 1-2 µg/ml) [123].

2.3.2 Kalibrierungen des Spektrometers

Gepulste Feldgradienten werden heutzutage für eine Vielzahl von Experimenten eingesetzt. Bei den meisten ist es nicht nötig, die absolute, tatsächliche Gradientenfeldstärke exakt zu kennen. Es genügt in der Regel, die relative Stärke des Gradienten bezogen auf die Maximalleistung exakt reproduzierbar angeben zu können. Dies ist notwendig, da bei den meisten Experimenten, bei denen gepulste Feldgradienten eingesetzt werden, an mehreren Stellen in der Impulsfolge diese zum Einsatz kommen und diese dann in einem definierten Verhältnis zueinander stehen müssen.

Bei der Bestimmung von Diffusionskoeffizienten ist es dagegen notwendig, die absolute Stärke des Feldgradienten zu kennen. Wie in Kapitel 1.2.4.2 erläutert, kann aus einer Serie von Stejskal-Tanner-Experimenten mit unterschiedlicher Gradientenstärke der Diffusionskoeffizient berechnet werden. Dazu muss aber die Stärke des Gradienten bei den einzelnen Experimenten bekannt sein.

Um die Gradientenstärke zu kalibrieren, wird der Diffusionskoeffizient einer bekannten Probe unter Anwendung des Standardwertes für die Gradientenstärke bestimmt und der Standardwert wird dem Ergebnis entsprechend korrigiert. Als Probe hierfür wird in der Regel Wasser benutzt.

Da Diffusionskoeffizienten, wie ebenfalls bereits dargelegt, auch von der Temperatur abhängig sind, muss vor diesen Messungen die exakte Temperatur in der Probe bekannt sein.

2.3.2.1 Temperatur

Üblicherweise besitzt jedes Spektrometer einen integrierten Temperaturfühler, der die Temperatur der Probe bestimmt und der auch zur Rückkopplung für die Heizung des Probenkopfes dient. Die von diesem gemessene Temperatur gibt aber nicht die tatsächliche Temperatur der Probe wieder. Der Fühler befindet sich normalerweise zwar in unmittelbarer Nähe zum Probenröhrchen, kann daher nur die Temperatur in unmittelbarer Nähe des Röhrchens, nicht aber die im Röhrchen angeben. Um die tatsächliche Temperatur im Probenröhrchen zu bestimmen, greift man auf Standardproben zurück, in denen eine Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung existiert und der Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen bekannt ist. Ist der Zusammenhang zwischen der vom Fühler gemessenen Temperatur und der Temperatur im Probenröhrchen bekannt, kann zur exakten Temperierung der Probe im Probenröhrchen die Heizung des Probenkopfes auf die korrigierte Temperatur eingestellt werden.

2.3.2.2 Tatsächliche Temperatur in der Probe

Zur Bestimmung der Temperatur in der Probe werden zwei verschiedene Standardproben für zwei verschiedene Temperaturbereiche benutzt. Für Temperaturen zwischen 170 und 300 Kelvin benutzt man eine 4%ige Lösung von Methanol (CH_3OH) in Deutero-Methanol (CD_3OD), für Temperaturen zwischen 290 und 420 Kelvin eine 80%ige Lösung von 1,2-Ethandiol in DMSO-d_6 .

Der zur Kalibrierung der Gradientenstärke heranzuziehende Diffusionskoeffizient von Wasser ist auf eine Temperatur des Wassers von 25 °C (298,15 K) bezogen. Die Messungen mit Bakterienzellen und Antibiotika sollen später bei 30 °C (303,15 K) durchgeführt werden. Für die Temperaturkalibrierung wird deswegen die Ethandiol-Standardprobe benutzt.

Bei dieser Probe ist der Abstand der beiden Signale (der Wasserstoffe der Hydroxygruppen einerseits und der Methylengruppen andererseits) im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum mit der Temperatur über folgende Gleichung verknüpft [124]:

Formel 2.3-1
$$T[\text{K}] = -108,33 \cdot \Delta\delta[\text{ppm}] + 460,41$$

Um den Zusammenhang zwischen der vom Temperaturfühler gemessenen Temperatur neben dem Probenröhrchen und der Temperatur im Röhrchen zu ermit-

teln, werden eine Reihe von ^1H -NMR-Spektren bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Aus diesen Spektren wird die Temperatur im Probenröhrchen nach Formel 2.3-1 berechnet und mit der von der Temperatursonde gemessenen verglichen.

Aus Vorversuchen konnte der Zusammenhang zwischen der vom Temperaturfühler gemessenen Temperatur und der Temperatur im Röhrchen annähernd bestimmt als:

$$T(\text{Temperaturfühler, in Kelvin}) = T(\text{tatsächlich, in Kelvin}) \cdot 0,94 + 18,39$$

Um im Probenröhrchen eine Temperatur von 25 °C (298,15 K) zu erreichen, muss die vom Fühler gemessene Temperatur also 299,17 K (26,06 °C) betragen. Für einen kleinen Temperaturbereich ist ein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Temperaturwerten gegeben und die Gleichung gültig. Um dies bei der exakten Zieltemperatur zu überprüfen, wurde noch eine Messreihe durchgeführt, bei der auf Grundlage dieser Daten die Temperatur im Probenröhrchen zwischen 25 °C und 27 °C variiert wurde. Hierzu wurden neun Messungen durchgeführt, für die die Temperatur abwechselnd 25,02 °C, 26,02 °C oder 27,02 °C betrug, wobei die Temperatur abwechselnd gesenkt und erhöht wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle in Abbildung 2.3-1 eingetragen. Diese Werte liefern die in der Grafik dieser Abbildung eingetragene Regressionsgleichung. Mit dieser kann berechnet werden, dass eine angezeigte Temperatur von 25,97 °C einer tatsächlichen von 25,00 °C entspricht. Entsprechend muss die Heizung des Probenkopfes auf diesen Temperaturwert eingestellt werden.

Auf die gleiche Weise wurde der Temperaturwert 30 °C überprüft. Hier wurde als einzustellende Temperatur 303,9 K (30,7 °C) ermittelt.

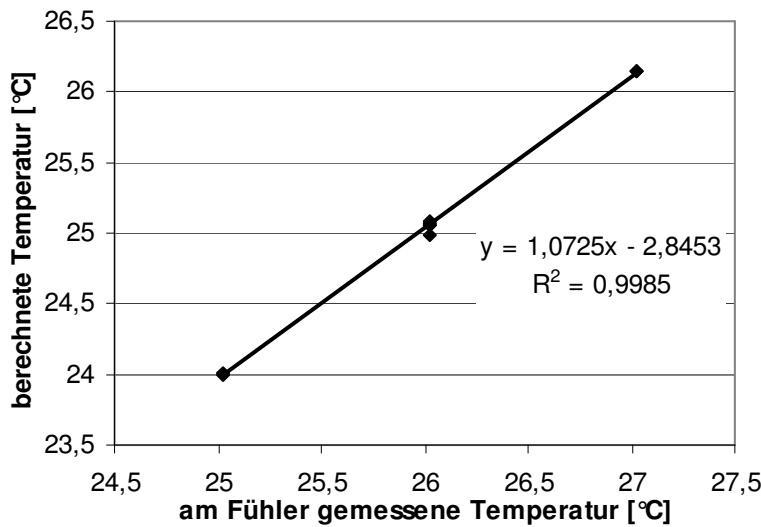
	Temperatur am Fühler	Abstand der beiden Signale	berechnete Temperatur	Differenz
1	26,02 °C	1,497 ppm	25,05 °C	0,97 °C
2	25,02 °C	1,507 ppm	24,01 °C	1,01 °C
3	26,02 °C	1,497 ppm	25,09 °C	0,93 °C
4	27,02 °C	1,487 ppm	26,14 °C	0,88 °C
5	26,02 °C	1,497 ppm	25,06 °C	0,96 °C
6	25,02 °C	1,507 ppm	23,99 °C	1,03 °C
7	26,02 °C	1,497 ppm	24,99 °C	1,03 °C
8	27,02 °C	1,497 ppm	26,15 °C	0,87 °C
9	26,02 °C	1,497 ppm	25,07 °C	0,95 °C

Abbildung 2.3-1:

Errechnete und gemessene Temperaturen zur Kalibrierung bei 25 °C.

In der Tabelle sind die Messungen in der tatsächlichen Reihenfolge (steigend und fallend) sowie die Abstände der beiden Signale im ¹H-NMR-Spektren und die daraus berechneten Temperaturen eingetragen.

In der Grafik sind die gemessenen und berechneten Temperaturen gegeneinander aufgetragen.



2.3.2.3 Temperaturkonstanz

Mit der so erhaltenen Temperatureinstellung wurde die Konstanz der Temperatur über einen Zeitraum von einer Stunde überprüft. Jeweils nach zwei Minuten wurde ein Spektrum der Ethandiol-Probe gemessen und daraus die Temperatur berechnet. Bei dem Wert 25 °C wurde dabei eine mittlere Temperatur von 25,003 °C bestimmt. Absolut schwankten die Werte um 0,06 °C zwischen 24,98 und 25,04 °C, ein Trend kann nicht festgestellt werden (vgl. Abbildung 2.3-2). Der letzte Wert in dieser Abbildung muss als Ausreißer betrachtet werden.

Die gleichen Messungen wurden für die Soll-Temperatur von 30 °C durchgeführt. Auch hier hat die Überprüfung der Konstanz keine starken Abweichungen von der gewählten Temperatur während der überprüften Zeitspanne ergeben.

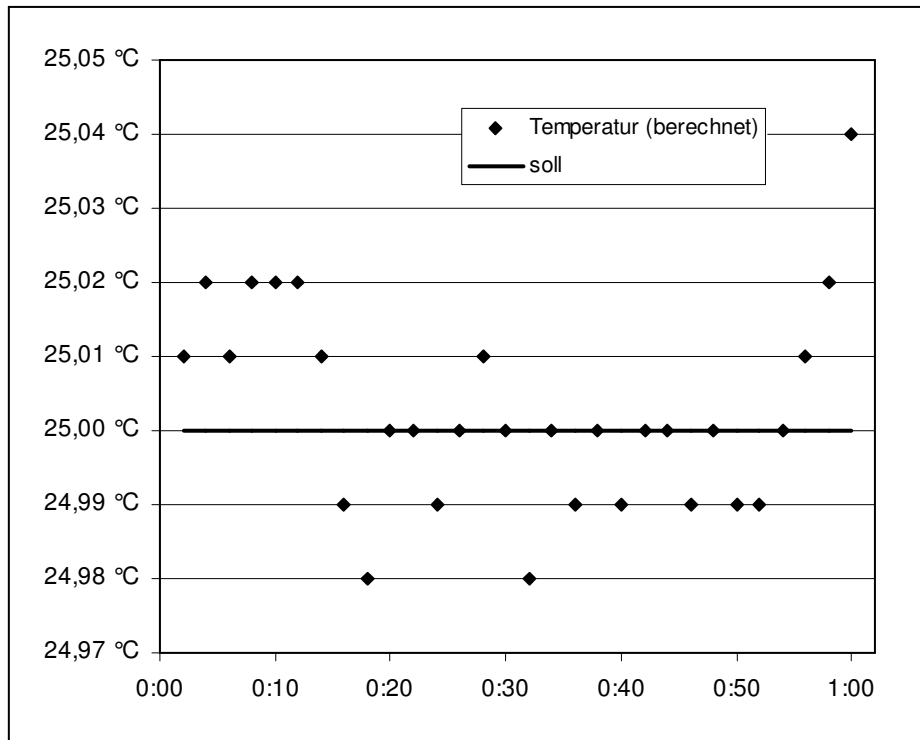


Abbildung 2.3-2: Überprüfung der Temperaturkonstanz bei 25°C über eine Stunde.

2.3.2.4 Gradientenstärke

Zur Kalibrierung der Gradientenstärke gibt es zwei Methoden. Die eine bereits oben erwähnte benutzt eine Standardprobe für die der Diffusionskoeffizient bekannt ist. Bei der anderen wird ein Teflonplättchen von 2 mm Dicke exakt in ein NMR-Röhrchen mit Wasser (H_2O) eingepasst; aus dem daraus resultierenden ^1H -Spektrum lässt sich dann die Gradientenstärke berechnen [124].

Die gängigere Methode ist jedoch der Einsatz einer definierten Standardprobe. Von den meisten Herstellern von NMR-Spektrometern wird hierfür eine als „Doped Water“ bezeichnete Probe empfohlen. Diese besteht aus 1 % H_2O in 99 % D_2O , dem 0,1 % TSP (3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure-Natrium, als 0-ppm-Referenz) und 0,1 mg/ml Gadoliniumchlorid zugesetzt sind. Das Gadolinium hilft, Relaxationseffekte zu unterdrücken, so dass nur Veränderungen aufgrund der Diffusion in die Messungen eingehen.

Die Größe des Diffusionskoeffizienten von Wasser ist verschiedentlich dokumentiert. Für die hier beschriebene Standardprobe ist allerdings noch anzumerken, dass die Größe des Diffusionskoeffizienten nicht nur von der Temperatur abhängt, sondern es auch Unterschiede zwischen den Diffusionskoeffizienten von Wasser und Deuteriumoxid gibt [125]. Der Diffusionskoeffizient von Wasser in einer Probe

mit Spuren von H₂O in D₂O, wie die hier benutzte, beträgt $1,902 \cdot 10^{-9}$ m²/s bei einer Temperatur von 25 °C [126, 127].

Bei dieser Temperatur wurde von der Probe unter Annahme verschiedener Gradientenstärken der Diffusionskoeffizient bestimmt und mit dem Literaturwert verglichen. Auf diese Weise konnte die maximale Gradientenstärke des benutzten NMR-Spektrometers zu 5,50 G/mm bestimmt werden.

2.3.3 Bestimmung von Diffusionskoeffizienten

Zur Beantwortung der Frage, ob es Veränderungen im Diffusionsverhalten – und damit in der Größe des Diffusionskoeffizienten – von Antibiotika bei Wechselwirkungen mit Erregerzellen gibt, wurden einige Voruntersuchungen im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit unternommen.

Hierzu wurden die drei eingangs erwähnten Stämme mit Ofloxacin zwischen 1 und 24 Stunden inkubiert und die Diffusionskoeffizienten von Ofloxacin und von Wasser bestimmt. Die Veränderung des Diffusionskoeffizienten von Wasser kann einen Hinweis geben, ob die Veränderung des Diffusionskoeffizienten des Antibiotikums auf eine Interaktion oder auf andere Gründe zurückgeführt werden kann: wenn sich beide Diffusionskoeffizienten gleichermaßen ändern, sind andere Effekte als Interaktionen zwischen den Bakterienzellen und dem Antibiotikum wahrscheinlich.

Der Transport von Fluorchinolonen, wie zum Beispiel Ofloxacin, in Bakterienzellen kann auf zwei Arten erfolgen. Zum einen können diese Stoffe aufgrund ihrer Lipophilie direkt durch die Zellmembran hindurch diffundieren, zum anderen können sie in der Regel als Komplexe mit Mg²⁺ mit Hilfe spezieller Proteine (Porine) die äußere Membran überwinden [128]. Mit zunehmender Lipophilie nimmt die Menge an Fluorchinolon ab, die von den Bakterienzellen akkumuliert wird. Ein Resistenzmechanismus von Bakterien ist die Expression einer speziellen Efflux-Pumpe, durch die Fluorchinolone wieder aus der Zelle heraus gepumpt werden. Während empfindliche Stämme von *Streptococcus pneumoniae* Ofloxacin bis zu 40ng/mg Bakterientrockengewicht akkumulieren können, sinkt diese Menge in Efflux-Mutanten auf etwa 10ng/mg Bakterientrockengewicht. Dagegen können Ciprofloxacin und Norfloxacin in empfindlichen Stämmen bis zu 80ng/mg akkumuliert werden und in den Efflux-Mutanten immer noch bis zu 50ng/mg [129]. Exakte Angaben über den Transport von Ofloxacin in die drei hier untersuchten Bakterien-

stämme können leider nicht gemacht werden. Die für diese Untersuchungen verwendeten Bakterien sind allesamt apathogen und von daher für die medizinische Wissenschaft von keinem weiteren Interesse. Deshalb gibt es keine weiteren Daten über die Wirkungen von Fluorchinolonen auf diese Bakterienstämme. Dennoch sollen diese Stämme als Modellorganismen für die Entwicklung einer einfachen NMR-Messtechnik herangezogen werden, um Hinweise auf Interaktionen erhalten zu können.

Nach der Aufnahme von Ofloxacin in die Zellen innerhalb der Inkubationszeit kann man einen scheinbaren Diffusionskoeffizienten D_{sch} messen. Dieser setzt sich aus dem Diffusionskoeffizienten D_{frei} des freien Ofloxacins, also dem in der Lösung ungehindert diffundierenden, und dem Diffusionskoeffizienten D_{geb} des in bzw. an den Bakterienzellen gebundenen Ofloxacins zusammen.

Es gilt [nach 114]:

Formel 2.3-2

$$D_{sch} = D_{geb}f_{geb} + D_{frei}f_{frei}$$

Dabei sind f_{geb} und f_{frei} die Anteile gebundenen bzw. freien Ofloxacins an der Gesamtmenge Ofloxacin. Wenn also der Anteil mit den Zellen in Wechselwirkungen tretenden Ofloxacins groß genug ist, sollte sich der Diffusionskoeffizient von Ofloxacin in einer Suspension von Bakterienzellen gegenüber dem in einer wässrigen Ofloxacinlösung ändern. Da die Diffusion in den Zellen gehindert ist im Vergleich zu der in der Lösung, sollte diese kleiner werden.

Die Diffusionskoeffizienten von Ofloxacin werden in dieser Arbeit in der Regel angegeben als die Mittelwerte der für verschiedene Signale des Spektrums ermittelte Diffusionskoeffizienten. Die dafür berücksichtigten Signale sind H5 und H8 sowie die beiden Methylgruppen (vgl. Abbildung 2.3-3).

Die MHK von Ofloxacin für die drei untersuchten Bakterienstämme lag zwischen 1 µg/ml und 4 µg/ml, die Konzentration von Ofloxacin in den Messlösungen bei etwa 1 mg/ml, also deutlich über der MHK.

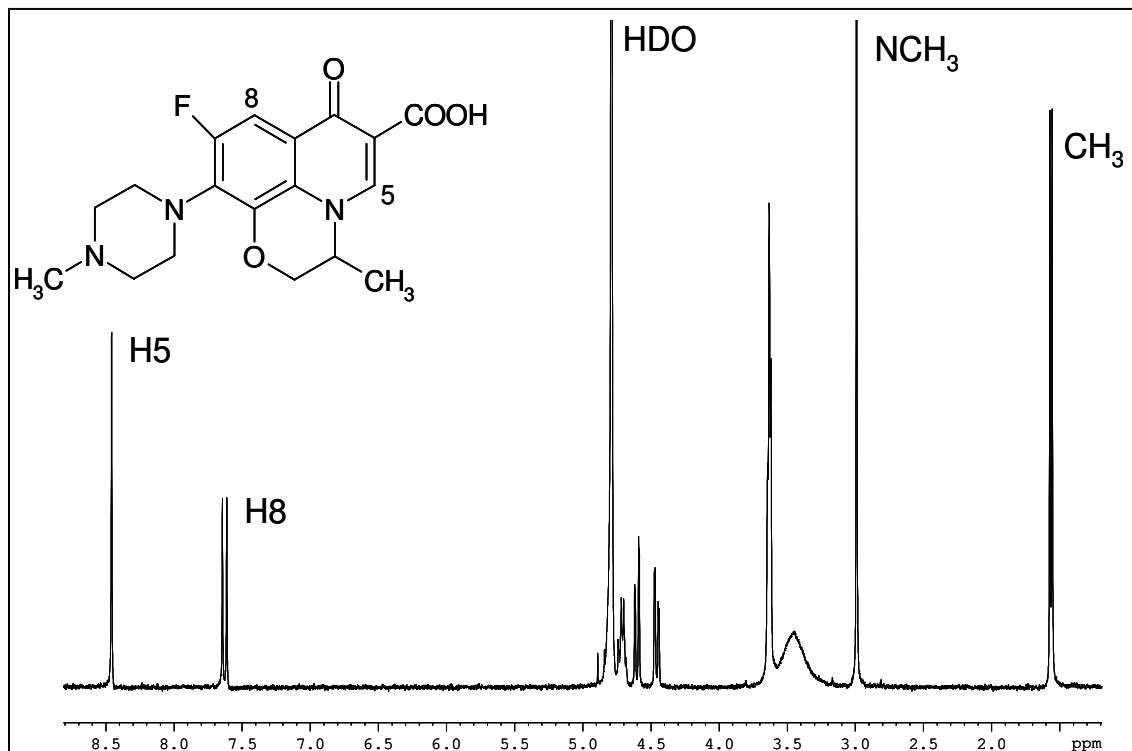


Abbildung 2.3-3: Strukturformel und ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, in D₂O mit 0,9% NaCl) von Ofloxacin. In dem Spektrum sind die für die Auswertung des Diffusionskoeffizienten herangezogenen Signale markiert.

2.3.3.1 Effekte verschiedener Erregerstämme

Zuerst sollte untersucht werden, ob sich Unterschiede zwischen den drei verschiedenen Erregerstämmen feststellen lassen. Zu diesem Zweck wurden die gezüchteten Bakterienzellen von ihrem Flüssigmedium abzentrifugiert, danach wurden sie dreimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung in D₂O aufgenommen und abzentrifugiert. Die so gewonnene Bakterienzellsuspension wurde anschließend mit dem gleichen Volumen einer Ofloxacinlösung (2mg/ml) in 0,9%iger Kochsalzlösung in D₂O versetzt und gut geschüttelt. In den so erhaltenen Lösungen wurden jeweils die Diffusionskoeffizienten sowohl von Ofloxacin als auch von Wasser bestimmt. Dabei werden die Diffusionskoeffizienten von Ofloxacin als Mittelwerte der berechneten Diffusionskoeffizienten für die Signale von H5, H8 und der beiden Methylgruppen angegeben.

In Abbildung 2.3-4 sind die so erhaltenen Diffusionskoeffizienten eingetragen. Zum Vergleich sind auch die entsprechenden Diffusionskoeffizienten sowohl von Wasser als auch von Ofloxacin in einer reinen Ofloxacinlösung (0,9% NaCl in D₂O) angegeben.

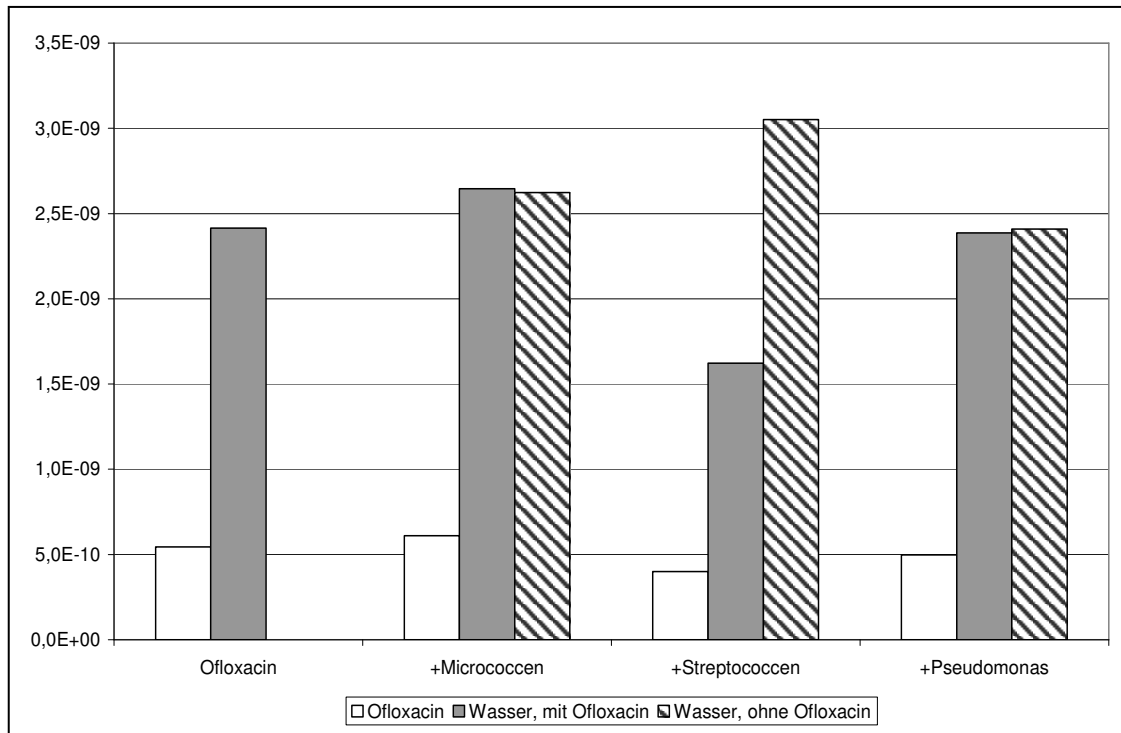


Abbildung 2.3-4: Unterschiede in den Diffusionskoeffizienten (in m^2/s) von Ofloxacin und von Wasser in Suspensionen mit den verschiedenen Bakterienzellen. In dem ersten Block sind die Vergleichsdaten einer reinen Ofloxacinlösung aufgetragen. Die letzte Säule gibt jeweils den Diffusionskoeffizienten von Wasser in der reinen Bakteriensuspension, ohne Ofloxacin, an.

Der Vergleich mit dieser Lösung sowie der Vergleich mit dem Diffusionskoeffizienten von Wasser in der Suspension der entsprechenden Bakterien ohne Ofloxacin zeigt zweierlei. Bei den Mikrokokken nehmen beide Diffusionskoeffizienten um rund 10% gegenüber dem jeweils entsprechenden in der Ofloxacinlösung zu. Auch der Diffusionskoeffizient von Wasser in der Bakteriensuspension ist um rund 10% gegenüber dem in der Ofloxacinlösung erhöht. Bei den Pseudomonaden ist der Diffusionskoeffizient von Wasser sowohl in der Suspension mit Ofloxacin als auch in der ohne nahezu identisch mit dem in der Ofloxacinlösung. Der Diffusionskoeffizient von Ofloxacin selbst liegt allerdings in der Mischung mit den Bakterien um rund 10% unter dem der Ofloxacinreferenz. Am auffälligsten sind die Veränderungen in der Streptokokken-Lösung. Die Diffusionskoeffizienten von Ofloxacin und von Wasser liegen um ein Viertel bis ein Drittel unter dem jeweiligen Referenzwert. Der Diffusionskoeffizient von Wasser in der Bakteriensuspension dagegen liegt um etwa ein Viertel über dem Referenzwert in der Ofloxacinlösung. Diese Abweichung in unterschiedliche Richtung kann einen Hinweis auf eine durch veränderte Diffusionskoeffizienten nachweisbare Interaktion zwischen Ofloxacin und den Streptokokken sein. Die gleichartige Veränderung der bei den beiden anderen

Bakterienstämmen gemessenen Diffusionskoeffizienten dagegen kann unter Umständen auf reine Viskositätsänderungen zurückzuführen sein. Bekannterweise ist der Diffusionskoeffizient auch von der Viskosität der Lösung abhängig. Wenn durch die Zugabe von Bakterien sich die Viskosität der untersuchten Lösung ändert, dann muss auch dieses einen Effekt auf die Größe der in dieser Lösung bestimmten Diffusionskoeffizienten haben. Dieser sollte – wie auch die Viskosität der Lösung – von der Menge der Bakterien in der Lösung abhängig sein.

2.3.3.2 Effekte unterschiedlicher Konzentrationen

Um die am Ende von Kapitel 2.3.3.1 erwähnte Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität in ihrer Auswirkung zu überprüfen, wurden Bestimmungen von Diffusionskoeffizienten mit unterschiedlichen Mengen an Bakterienzellen durchgeführt. Eine Streptokokken-Kultur wurde wie oben beschrieben in 2.5 ml 0.9%iger Kochsalzlösung in D₂O suspendiert. Zu 600 µl Ofloxacinlösung (2mg/ml) wurden 200 µl, 400 µl oder 600 µl dieser Zellsuspension gegeben und mit Kochsalzlösung zu 1200 µl aufgefüllt. Als Vergleich dienten die reine Ofloxacinlösung und eine unbehandelte Zellsuspension (jeweils 1+1 mit Kochsalzlösung verdünnt). Daneben wurde noch eine Lösung mit jeweils 200 µl Ofloxacin bzw. Streptokokken-Suspension untersucht.

In diesen Lösungen wurden Diffusionskoeffizienten nach einer Inkubationszeit von etwa 60 Minuten und nach etwa 24 Stunden ermittelt. Zu der Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Ofloxacin in der Lösung mit nur 200µl Ofloxacin-Stammlösung konnten aufgrund der geringen Signalintensität der übrigen Signale nur die der beiden Methylgruppen herangezogen werden.

Die bei diesen Messungen ermittelten Diffusionskoeffizienten sind in Abbildung 2.3-5 als Säulendiagramm dargestellt. Ähnliche starke Effekte wie in den vorausgegangenen Messungen wurden hier nicht festgestellt. Aber auch eine Abhängigkeit der Größe des Diffusionskoeffizienten von der Konzentration an Zellen kann bei diesen Messungen nicht festgestellt werden. Deutliche Unterschiede ergeben sich jedoch, vergleicht man die beiden Messblöcke nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten der identischen Lösungen.

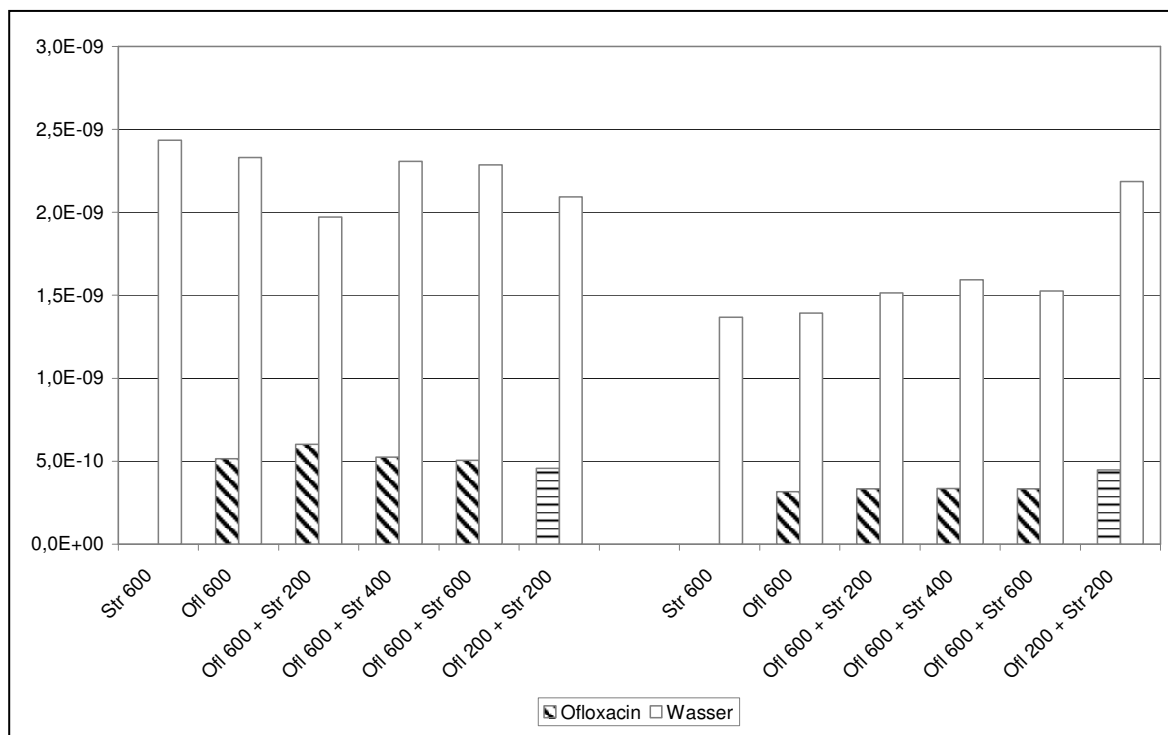


Abbildung 2.3-5: Diffusionskoeffizienten (in m^2/s) von Ofloxacin und Wasser in Mischungen mit einem unterschiedlichen Anteil einer Stammsuspensionen von Streptokokken. Den waagrecht schraffierten Säulen liegen weniger ermittelte Diffusionskoeffizienten einzelner Signale zugrunde. Der erste Block wurde nach einer Inkubationszeit von etwa 60 Minuten, der zweite Block nach einer von etwa 24 Stunden gemessen.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden sind alle Diffusionskoeffizienten deutlich kleiner als nach einer Inkubationszeit von lediglich einer Stunde. Es ist bekannt, dass bereits nach fünf Minuten die Aufnahme von verschiedenen Chinolonen in Bakterienzellen abgeschlossen sein kann [130]. Auch wenn die Umgebungsbedingungen dieser Untersuchungen andere waren als hier mit einer Kochsalzlösung, so kann doch angenommen werden, dass die Akkumulation in die Zellen nach einer Stunde weitgehend abgeschlossen war. Die Abnahme der Diffusionskoeffizienten im Laufe der 24stündigen Inkubation kann daher nicht nur auf weitergehende Akkumulation zurückgeführt werden, sondern kann als Hinweis auf eine echte Interaktion zwischen dem Antibiotikum und den Bakterienzellen gewertet werden.

2.3.3.3 Ausblick

Um mit der hier beschriebenen Methodik der NMR-Spektroskopie gestützten Bestimmung von Diffusionskoeffizienten tatsächliche Hinweise auf – oder gar sichere Aussagen über – eine antibiotische Wirksamkeit von neuen Arzneistoffen zu erhal-

ten muss eine Validierung der Methode mit Hilfe von verschiedenen Stämmen und von verschiedenen resistenten Stämme einer Bakterienart (hierfür bietet sich *Escherichia coli* an) durchgeführt werden.

Vorher sind aber noch verschiedene Fragen zu klären. Diese gehören zwei verschiedenen Fragenkomplexen an: zum einen solche, die unmittelbar mit der Messung zusammenhängen und zum anderen solche, die mit der antibiotischen Wirkung der Chinolone zu tun haben. So können die hier aufgeführten Arbeiten nur als Vor-Arbeiten gesehen werden, die weiter untersucht werden müssen. Die entstehenden Fragen sollen im Folgenden angerissen und mögliche Lösungswege diskutiert werden.

2.3.3.3.1 T_2 -Relaxationszeit

Eingangs in Kapitel 2.3.1 wurde bereits erwähnt, dass durch Wechselwirkungen zwischen zwei Stoffen sich die T_2 -Relaxationszeiten dieser Stoffe verändern. Je nach verwendeter Pulssequenz machen sich Veränderungen der T_2 -Relaxationszeit unterschiedlich stark bemerkbar (vgl. Kapitel 1.2.4.1). Die in dieser Arbeit verwendete STE-Sequenz vermindert diese Effekte schon gegenüber dem grundlegenden Stejskal-Tanner-Experiment. Auch die andere übliche Sequenz (LED) vermindert derartige Einflüsse.

Durch die Bestimmung der T_2 -Relaxationszeit von Ofloxacin in wässriger Lösung und von Ofloxacin in der Gegenwart von Bakterienzellen kann ermittelt werden, wie stark diese Veränderung ist. Dadurch kann eine Aussage getroffen werden, wieweit die beobachteten Diffusionskoeffizienten durch Veränderung der T_2 -Zeit beeinflusst werden. Die Bestimmung dieser T_2 -Relaxationskonstante erfolgt mit einem einfachen Spin-Echo-Experiment, also der gleichen Sequenz wie für die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten, jedoch *ohne* zusätzliche Feldgradienten.

2.3.3.3.2 Variationen der Pulssequenz

In der Pulssequenz (beispielsweise für das STE-Experiment, Abbildung 2.3-6) sind drei Größen variabel. Dies sind die Gradientenstärke G , die Gradientendauer δ und die Diffusionszeit Δ . Die Gradientenstärke wird zwischen etwa 95% und 2% der Maximalleistung variiert. Die Gradientendauer δ wird in ihrer Größe so angepasst, dass bei einer Gradientenstärke von 95% die Signalintensität ausreichend

weit zurückgeht im Vergleich zu den 2% der maximalen Gradientenstärke. Die Dauer der Diffusionszeit Δ wird normalerweise nicht variiert.

Durch unterschiedliche Dauer der Diffusionszeit Δ können Stoffe mit gleicher chemischer Verschiebung und unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten voneinander unterschieden werden,

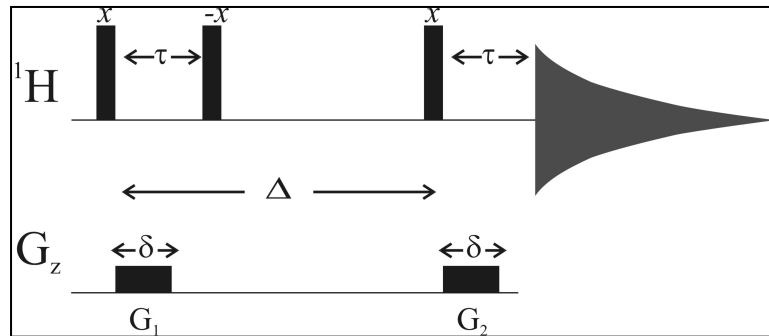


Abbildung 2.3-6: Die Pulssequenz für Diffusionsmessungen nach dem STE-Experiment (stimulated echo)

den, wie dies in einer Untersuchung zum Wassertransport durch Zellmembranen gezeigt wurde [118]. Auch wenn für diese Untersuchung ein spezieller Messkopf mit deutlich höherer Gradientenstärke benutzt wurde, sollten auch weitere Experimente mit verschiedenen Zeiten Δ bei ansonsten unveränderten Einstellungen durchgeführt und verglichen werden.

2.3.3.3.3 Einfluss des Mediums

Für die NMR-Messungen ist ein Medium wie die physiologische Kochsalzlösung ideal, da diese keine Substanzen beinhaltet, die selbst im ^1H -NMR-Spektrum Resonanz zeigen. Für die Bakterien ist diese jedoch unter Umständen nicht ideal. Das gewählte Medium sollte zwar so gewählt werden, dass die Vermehrung der Bakterien möglichst minimal ist, eine Aufnahme von Ofloxacin muss aber dennoch stattfinden. D_2O -Lösungen mit anderen Salzen (beispielsweise Magnesiumsalzen) sollten untersucht werden.

2.3.3.3.4 Dauer der Inkubationszeit

Die in Kapitel 2.3.3.2 präsentierten Daten zeigen eine Veränderung der Diffusionskoeffizienten sowohl von Wasser als auch von Ofloxacin nach 24stündiger Inkubation im Vergleich zu nur einstündiger Dauer. Weitere Zeiteffekte – nach zwei, drei, vier Tagen beispielsweise – sollten ebenfalls untersucht werden. Dies kann Hinweise auf eine zeitabhängige Veränderung der Diffusion und damit eine Veränderung in der Art der Wechselwirkung zwischen den Bakterien und dem Ofloxacin geben.

2.3.3.3.5 Ofloxacin-Konzentration und Zellzahl

Die eingesetzte Ofloxacin-Konzentration in den Mischungen mit 600µl Stammlösung (entsprechend 1 mg/ml) war gerade ausreichend um unter den gewählten Bedingungen (16 Scans) auswertbare Spektren zu erhalten. Bei einer eingesetzten Bakterienmenge von etwa 10^7 bis 10^8 Zellen ist diese Menge jedoch deutlich über der MHK und sicherlich auch deutlich über der akkumulierbaren Menge. Wie schon erwähnt, sind die verwendeten Zellen apathogen und daher sind keine Daten über diese Bakterien publiziert (man kann die bereits oben erwähnte Veröffentlichung [130] zur Abschätzung heranziehen). Bei dieser Menge an Ofloxacin ist der Einfluss des freien Ofloxacins auf den gemessenen, scheinbaren Diffusionskoeffizient von Ofloxacin sehr groß. Eine Herabsetzung der Ofloxacin-Konzentration oder eine größere Menge an Zellen würden diesen Einfluss verringern, da sich das Verhältnis von freiem zu gebundenem (bzw. akkumuliertem) Ofloxacin zugunsten des gebundenen verschiebt. Die Herabsetzung der Ofloxacin-Konzentration bedingt aber auch mehr Scans, um zu auswertbaren Spektren zu kommen, was die Messdauer verlängert. Inwiefern während einer solcherart verlängerten Messdauer veränderliche Interaktionen zwischen den Bakterien und dem Antibiotikum auftreten, kann hier nicht abgeschätzt werden.

2.3.3.3.6 Unterdrückung des Wassersignals

Die für die hier beschriebenen Versuche benutzte STE-Pulssequenz wird von Bruker auch in einer Variante mit Wasserunterdrückung (nach der WATERGATE-Methode) angeboten. Da auch die Diffusionskoeffizienten von Wasser ermittelt und zum Vergleich herangezogen wurden, wurde diese Variante nicht eingesetzt. Der Anteil H_2O ist zwar nicht verschwindend klein, da das intrazelluläre Wasser nur zum Teil gegen Deuteriumoxid ausgetauscht wurde, aber doch noch nicht so groß, dass auf eine Wasserunterdrückung zurückgegriffen werden musste. Die Unterdrückung des Wassersignals macht eine Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Wasser natürlich unmöglich. Wenn jedoch die Ofloxacin-Konzentration noch weiter verringert wird, muss eine Wasserunterdrückung eingebaut werden, um die kleinen Signale von Ofloxacin überhaupt erfassen zu können.

2.3.3.3.7 Messung von ^{19}F

Für die beschriebenen Versuche wurden stets ^1H -NMR-Spektren gemessen und ausgewertet. Ofloxacin besitzt jedoch auch einen Fluor-Substituenten, der NMR-spektroskopisch zugänglich ist. Die beschriebenen Pulssequenzen zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten sind grundsätzlich unabhängig vom beobachteten Kern und daher kann auch über diesen Fluor-Substituenten der Diffusionskoeffizienten von Ofloxacin bestimmt werden. Auf diese Weise ist die Wahl des Mediums weitgehend frei und störende Einflüsse durch ein starkes Wassersignal oder durch dessen Unterdrückung können umgangen werden.

2.3.4 Zusammenfassung

Die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten mit der NMR-Spektroskopie ist grundsätzlich möglich und einfach durchzuführen. Probleme treten jedoch auf, wenn nur kleine Mengen an Analyten vorhanden sind und/oder zwei Stoffe mit sehr ähnlichem Spektrum voneinander unterschieden werden sollen. Für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Antibiotika, die mit Bakterienzellen interagieren, trifft leider beides zu.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten unter diesen Bedingungen möglich ist und dass es Veränderungen gegenüber den Diffusionskoeffizienten der Reinsubstanz gibt. Das größte noch zu lösende Problem besteht in dem Verhältnis ungebundenen zu gebundenen Antibiotikums und der kleinen Menge die insgesamt in der Lösung für die Spektroskopie zur Verfügung steht. Es muss eine Möglichkeit gefunden werden, dass die Menge Antibiotikum und die Zahl der Zellen so gewählt wird, dass der Anteil freien Antibiotikums möglichst klein wird, die Messungen aber noch möglich sind. Danach kann eine Validierung mit verschiedenen Stämmen mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber bekannter Antibiotika vorgenommen werden. Dies dient nicht zuletzt dazu, eine Veränderung der Diffusionskoeffizienten aufgrund einer Wechselwirkung mit der Zellwand, ohne ein Eindringen in das Zellinnere, auszuschließen. Und wenn eine Korrelation zwischen der Veränderung der Diffusionskoeffizienten und der antibiotischen Wirksamkeit gefunden wird, kann dieser Ansatz zu Screening-Untersuchungen neuer Substanzen benutzt werden.

2.4 *Einschlusskomplexe von Cyclodextrinen mit Di-peptiden*

2.4.1 Cyclodextrine als chirale Selektoren

Cyclodextrine sind ringförmige Oligosaccharide, die aus sechs bis acht α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch verknüpften α -D-Glucopyranosemonomeren zusammengesetzt sind. Nach der Anzahl der Monomere unterscheidet man α - (sechs), β - (sieben) und γ - (acht) Cyclodextrine [131]. Aufgrund der Sesselkonfiguration der Glucosemonomere haben sie die Form eines Kegelstumpfes, der innen hohl ist (Abbildung 2.4-1). An dessen größerer Öffnung befinden sich die Hydroxylgruppen von Position 2 und 3 der Monomere, an der engeren die an Position 6. In das Innere ragen die CH-Gruppen an Position 3 und 5. Während die Außenseite hydrophil ist, ist die Innenseite hydrophob [132].

Die Struktur der Cyclodextrine mit dem inneren Hohlraum und ihre Chiralität macht sie zu idealen chiralen Reagenzien zur analytischen Trennung von Racematen. Sie können Moleküle geeigneter Größe komplexieren. Dabei bilden sich für unterschiedliche Enantiomere unterschiedlich starke Komplexe aus. Dies kann analytisch ausgenutzt werden. So ergeben sich

beispielsweise in der Kapillarelektrophorese für die Komplexe von zwei Enantiomeren unterschiedliche Migrationszeiten. Auch in der NMR-Spektroskopie können Unterschiede zwischen zwei solchen Komplexen beobachtet werden. Generell führt die Komplexierung zu Verschiebungen der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$) für die Wasserstoffe des Liganden und des Cyclodextrins. Bei Enantiomeren unterscheiden sich diese $\Delta\delta$ -Werte der beiden Enantiomeren [133].

Schon lange wurden Cyclodextrine zur Analytik von chiralen Arzneistoffen benutzt [134]. Dazu werden nicht nur die nativen Cyclodextrine, sondern auch synthetische Derivate wie z. B. acetylierte β -Cyclodextrine, benutzt [135].

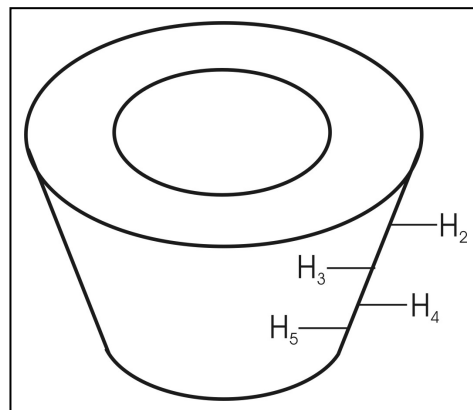


Abbildung 2.4-1: Schematische Darstellung von Cyclodextrinen.

2.4.2 Variationen der Messung und der Probenvorbereitung

Es wurde eine Umkehr der Migrationsreihenfolge bei einer kapillarelektrophoretischen Trennung der DD- und LL-Enantiomere von Dipeptiden mit β -Cyclodextrin als chiralem Selektor bei einem Wechsel des pH-Wertes von 2.5 auf 3.5 festgestellt [136, 137]. Um die Komplexbildung genauer zu untersuchen, sollten NMR-Studien durchgeführt werden. Hierzu wurden Aminosäuren und Dipeptide allein und in Komplexen mit β -Cyclodextrin untersucht. Die Komplexe sollten auch bei den verschiedenen pH-Werten untersucht werden.

Seit langem ist bekannt, dass Glaselektroden in normalen Wasser (H_2O) und Deuteriumoxid (D_2O) unterschiedliches Verhalten zeigen. Daher ist die Einstellung des pH-Wertes in D_2O schwierig und die Messungen wurden in H_2O durchgeführt. Auch der Bezug auf ein Referenzsignal zur Bestimmung von $\Delta\delta$ -Werten von Cyclodextrinkomplexen ist nicht immer einfach.

Aufgrund der geringen Löslichkeit von β -Cyclodextrin in Wasser ist bei einem 1:1-Stoffmengenverhältnis von β -Cyclodextrin und Ligand auch die Konzentration der Liganden in der Messlösung entsprechend gering. Die einander entsprechenden Wasserstoffe aller sieben Monomere des β -Cyclodextrins weisen die gleiche chemische Verschiebung auf, deshalb sind diese Signale im Vergleich zu denen der Liganden siebenfach stärker. Um dennoch 1H -NMR-Spektren mit ausreichender Auflösung und auswertbaren Signalen zu erhalten, mussten verschiedenen Messmethoden getestet werden.

2.4.2.1 Referenzierung

Um die Veränderung der chemischen Verschiebung zwischen komplexiertem und freiem Ligand bestimmen zu können, ist ein Referenzsignal in beiden Lösungen notwendig. Der Bezug auf das Lösungsmittelrestsignal scheidet ebenso aus wie die Bezugnahme auf die automatische Referenzierung durch die Spektrometer-Software. Letztere geschieht über das Lock-Signal, also das Signal des deuterierten Lösungsmittels. In beiden Fällen werden kleine Änderungen der Resonanzfrequenz, die durch die leicht unterschiedliche Zusammensetzung der Messlösung und eine Komplexbildung von Lösungsmittelmolekülen durch Cyclodextrine bedingt sind, nicht berücksichtigt. Auch der Bezug auf einen internen Standard (TSP in

D₂O) ist nicht möglich. Nicht nur die Resonanzfrequenzen und die chemische Verschiebung der Liganden ändern sich, wenn Cyclodextrine der Lösung zugegeben werden, sondern auch die von TSP. Dies scheint darin begründet zu liegen, dass durch Wasserstoffbrückenbindung mit den Glucosemonomeren sich die magnetische Suszeptibilität der Lösung ändert. Die andere These, dass TSP als Ligand von Cyclodextrinen komplexiert wird, kann diesen Effekt ebenso begründen [133].

Als Referenzsignal, das in keiner Weise durch die Zugabe von Cyclodextrinen beeinflusst wird, eignet sich daher das einer externen Referenzierung. Bei dieser wird ein exakt passenden Innenröhrchen koaxial in das NMR-Röhrchen eingebracht (Abbildung 2.4-2). In den Koaxialeinsatz wird eine Lösung mit der Referenzsubstanz, in den Raum zwischen den beiden Röhrchen die eigentliche Messlösung gegeben.

Als Referenzsubstanz kann prinzipiell jede Substanz gewählt werden. Dabei sind zwei Dinge zu beachten. Wenn chemische Verschiebung der Substanzen im äußeren Röhrchen angegeben werden sollen, muss die

chemische Verschiebung der Referenzsubstanz exakt bekannt sein. Wenn lediglich Änderungen der chemischen Verschiebung zwischen einer Lösung mit und ohne Komplexbildner angegeben werden sollen, ist es weniger wichtig, die chemische Verschiebung exakt zu kennen. Hier ist die Lage des Signals der Referenzsubstanz wichtiger: durch das Signal dürfen keine anderen Signale überdeckt werden.

Die von Matsui vorgeschlagene Benutzung von Tetramethylammoniumchlorid als interne Referenz [138] erscheint nicht gangbar. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Benutzung der internen Referenz Ligand und Referenzsubstanz die gleichen Effekte durch Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Cyclodextrin erfahren und so die reinen Komplexierungseffekte nachgewiesen werden. Bei der Benutzung einer externen Referenz würde man laut Matsui fälschlicherweise die Summe dieser Effekte nachweisen.

2.4.2.2 Methoden der Wasserunterdrückung

Es gibt eine Reihe verschiedener Ansätze zur Unterdrückung von starken Lösungsmittelsignalen, namentlich von Wassersignalen, in ¹H-NMR-Spektren. Insbe-



Abbildung 2.4-2:
NMR-Röhrchen
mit koaxialem
Einsatz (Innen-
röhrchen) zur ex-
ternen Referenzie-
rung.

sondere durch die Etablierung von gepulsten Feldgradienten (PFG) hat sich die Zahl der Methoden stark vergrößert. Eine gute Übersicht über die Methoden liefert W. Price [139].

Für die hier angestrebten Untersuchungen von wässrigen Lösungen wurden zwei Methoden zur Wasserunterdrückung verglichen. Zum einen die schon lange etablierte „Presaturation“, zum anderen die WATERGATE^a genannte Methode, die PFG benutzt [6].

Bei der Presaturation-Methode wird vor dem Messimpuls ein schwacher, selektiver Impuls mit der Resonanzfrequenz des Lösungsmittelsignals eingestrahlt. Dies führt zu einer Absättigung der entsprechend Kerne, die dadurch in der Messung nicht nachweisbar sind.

Die WATERGATE-Methode ist ähnlich dem in Kapitel 1.2.4.2 beschriebene Experiment zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten. Nach dem Messimpuls wird ein Gradient angelegt und unmittelbar darauf folgt eine Serie von Impulsen auf dem ¹H-Kanal. Diese Serie führt dazu, dass mit Ausnahme des Lösungsmittelsignals alle Spins um 180° invertiert werden. Darauf folgt wieder der gleiche Gradientenimpuls wie vorher. Insgesamt führt diese Sequenz zu einer Dephasierung des Lösungsmittelsignals, was dadurch unbeobachtbar wird, während alle anderen Spins durch den zweiten Gradientenimpuls refokussiert, und so detektiert werden. Je nach Wahl der Parameter werden auch die Signale in der Nähe des Lösungsmittelsignals beeinflusst und abgeschwächt.

Die Abbildung 2.4-3 zeigt Messungen eines Komplexes von β-Cyclodextrin mit Phenylalanin nach den beiden Methoden. In den beiden ¹H-NMR-Spektren sieht man deutliche Unterschiede. In den Teilen der Abbildung ist jeweils die Größe des Wasser-Restsignals gleich groß. Nutzt man die Presaturation-Methode (im linken Bild), erscheinen die beiden Signale von β-Cyclodextrin (A) und Phenylalanin (B) in einem Verhältnis von etwa 1:7, wie aufgrund der Einwaage zu erwarten ist. Im Fall der Anwendung der WATERGATE-Methode (im rechten Bild) ist dies nicht der Fall. Da bei WATERGATE auch die Signale in der Nähe des Lösungsmittelsignals sehr stark abgeschwächt werden, wurden die Messungen in H₂O-Lösungen mit der Presaturation-Methode vermessen.

^a Water suppression by gradient-tailored excitation

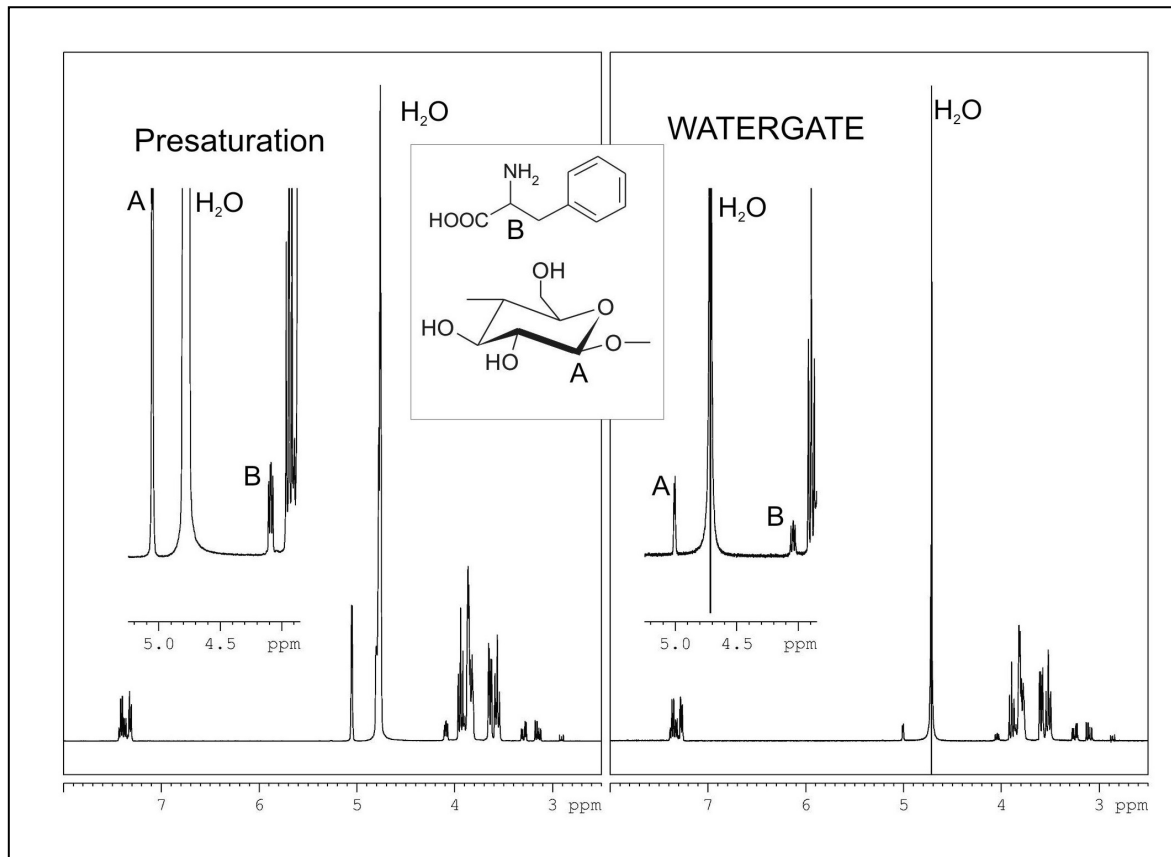


Abbildung 2.4-3: Vergleich der Messung eines Phenylalanin- β -Cyclodextrin-Komplexes in H_2O mit den beiden Methoden zur Unterdrückung des Wassersignals. In beiden Abbildungen ist das Wassersignal gleich hoch, die Vergrößerung ist jeweils achtfach. Die wichtigen Signale sind mit A und B markiert.

2.4.2.3 pH-Werte in Deuteriumoxid-Lösungen

Wie oben erwähnt, zeigen Glaselektroden in normalen Wasser (H_2O) und Deuteriumoxid (D_2O) unterschiedliches Verhalten. Wird in beiden Lösungsmitteln die gleiche Konzentration HCl bzw. DCl oder NaOH bzw. NaOD gelöst und der pH-Wert mit der gleichen, mit in H_2O hergestellter Pufferlösung kalibrierten Elektrode, bestimmt, so unterscheiden sich die abgelesenen Werte [140]. Aus experimentellen Daten wurden Korrekturterme δ_{Glas} abgeleitet, um die die abgelesenen, scheinbaren Werte (pH^D) verändert werden müssen, um die tatsächlichen pD-Werte zu erhalten [141]:

Formel 2.4-1
$$pD = pH^D + \delta_{Glas}$$

Wie gezeigt werden konnte, korrespondieren die in D_2O stattfindenden Prozesse an der Glaselektrode mit denen in H_2O . Die Veränderungen des abzulesenden

pH-Wertes können auf den Isotopenaustausch an der Oberfläche der Elektrode zurückgeführt werden [142].

Da die Einschlusskomplexe von β -Cyclodextrin mit Aminosäuren und Dipeptiden in Puffern bei exakten pH-Werten untersucht werden sollten, müsste zur Puffereinstellung also das pH-Meter entsprechend umkalibriert bzw. die abgelesenen Werte entsprechend geändert werden. Die Korrekturterme hierfür wurden aber nur empirisch ermittelt. Eine Alternative zu dieser Umrechnung ist ein vollständiger Austausch von H_2O in den Untersuchungslösungen gegen D_2O , was durch mehrfache Lyophilisation der Lösungen und Aufnahmen in D_2O erreicht werden kann. Da bei der Benutzung beider Wasserunterdrückungsmethoden stets auch ein interessierendes Signal mit abgeschwächt wurde, wurden zusätzlich Messungen nach vollständigem $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austausch durchgeführt. Dafür wurden die Untersuchungslösungen in H_2O hergestellt, in denen problemlos der exakte pH-Wert eingestellt werden kann. Diese Lösungen wurden gefriergetrocknet und der Rückstand, also das Cyclodextrin, der Ligand und die Puffersalze im richtigen Verhältnis in D_2O aufgenommen. Nach erneuter Gefriertrocknung wurde noch zweimal in D_2O aufgenommen. Auf diese Weise bleibt das Stoffmengenverhältnis der Substanzen zueinander gleich, alle austauschbaren Protonen ($^1\text{H}^+$) werden gegen D^+ ausgetauscht.

2.4.3 Veränderungen der chemischen Verschiebung durch Komplexbildung

Es wurden die Komplexbildung von β -Cyclodextrin mit dem DD- und LL-Enantiomer des Dipeptids Alanyl-Tyrosin (Ala-Tyr) untersucht. Dabei konnten Verschiebungen der chemischen Verschiebung sowohl bei Wasserstoffen des jeweiligen Liganden als auch des beteiligten Cyclodextrins beobachtet werden. In Abbildung 2.4-4 sind die Spektren von reinem β -Cyclodextrin und reinem Alanyl-Tyrosin dem Komplex der beiden Substanzen gegenübergestellt. Für diese Messungen wurden die Substanzen im Puffer in H_2O gelöst und nach der unter 2.4.2.3 beschriebenen Methode in D_2O überführt.

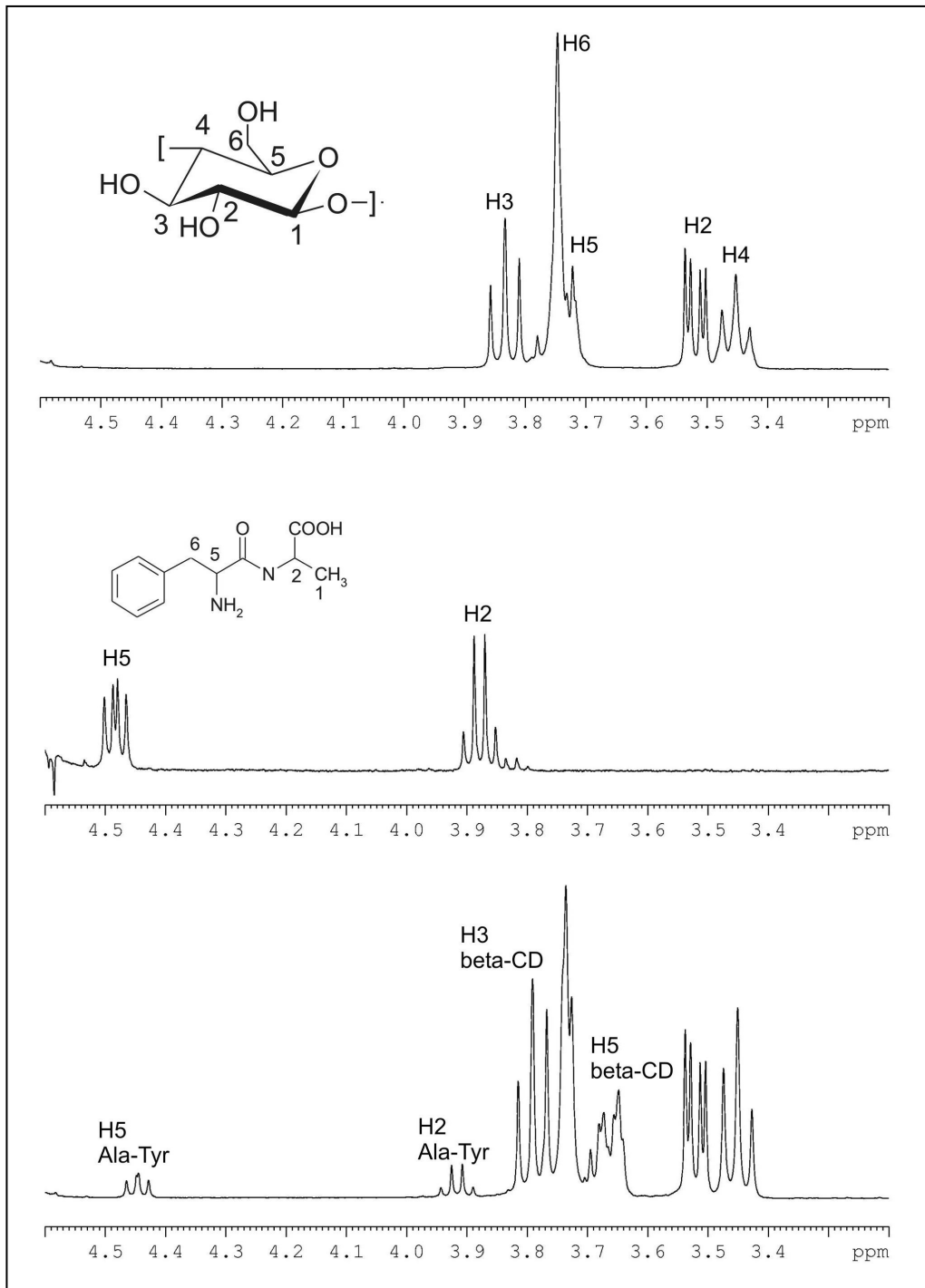


Abbildung 2.4-4: ¹H-NMR-Spektren von β-Cyclodextrin (oben), Alanyl-Tyrosin (Mitte) und dem Komplex dieser beiden Substanzen (unten), gemessen in D₂O bei pH 2,5. In dem Spektrum des Komplexes sind die Signale mit deutlicher Verschiebung der chemischen Verschiebung gekennzeichnet.

In dem gezeigten Ausschnitt sieht man deutliche Verschiebungen der chemischen Verschiebung für die Wasserstoffe an Position 2 und 5 des Dipeptides sowie für die an den Positionen 3 und 5 des β-Cyclodextrin. Bezogen wurden die chemischen Verschiebungen bei allen Messungen auf Maleinsäure als externe Referenz wie in 2.4.2.1 beschrieben. Dieses Muster der Verschiebungen der chemischen

Verschiebung ist ein Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen zur Komplexbildung von Cyclodextrinen mit Aminosäuren und Dipeptiden. Das unterschiedliche Verhalten von Enantiomeren bei der Komplexbildung ist in Abbildung 2.4-5 gezeigt. In dieser Grafik sind die Unterschiede in den Verschiebungen der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$ -Werte) für die Wasserstoffe des β -Cyclodextrins und für das DD- bzw. das LL-Enantiomer des Dipeptids Ala-Tyr gezeigt. Die $\Delta\delta$ -Werte der Wasserstoffe des Cyclodextrins unterscheiden sich nur wenig zwischen den Komplexen mit beiden Enantiomeren. Deutliche Unterschiede sieht man dagegen für die $\Delta\delta$ -Werte der Wasserstoffe von Ala-Tyr. Diese sind für D-Ala-D-Tyr stets größer als für L-Ala-L-Tyr, was auf eine stärkere Bindung von D-Ala-D-Tyr hinweist.

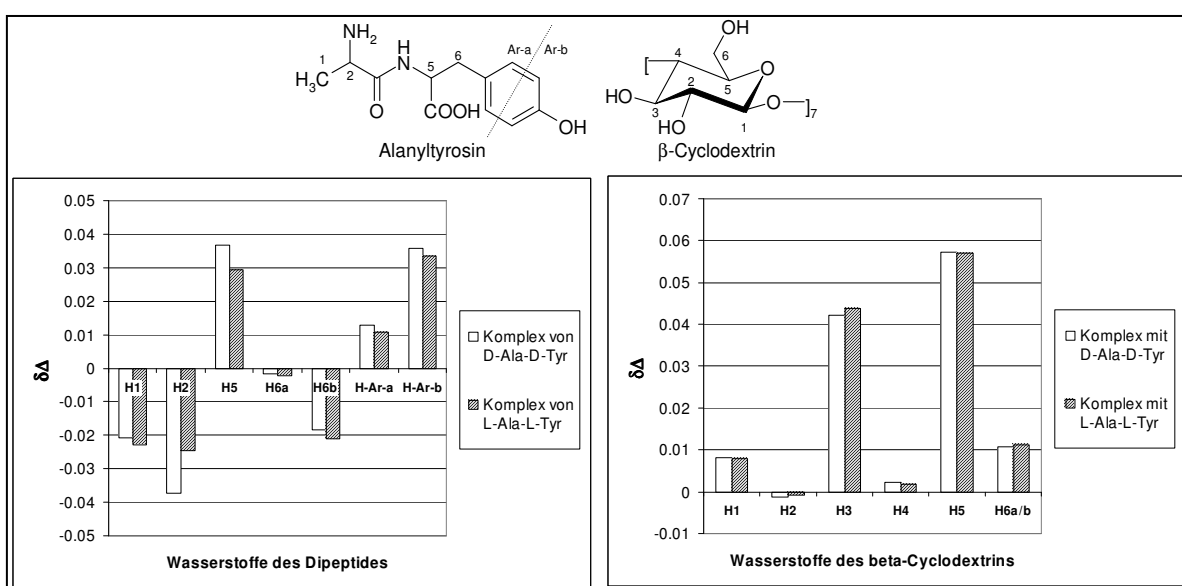


Abbildung 2.4-5: Veränderungen der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$ -Werte) der Wasserstoffe von β -Cyclodextrin und des LL- bzw. DD-Enantiomers von Ala-Tyr in Komplexen des Cyclodextrins mit jeweils einem Dipeptid-Enantiomer.

2.4.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie kann Komplexbildung beobachtet werden. Die dafür benötigte Messgröße, die Verschiebung der chemischen Verschiebung, wird als CICS („complexation induced chemical shift“) bezeichnet. Die unterschiedliche Größe dieser CICS für die verschiedenen Wasserstoffe von Ligand und Komplexbildner gibt Hinweise auf die Art des Komplexes. Zur genauen Beschreibung dieser Komplexe sind allerdings weitere NMR-Messungen nötig, die Auskunft über die intermolekularen räumlichen Abstände zwischen den Wasserstoffen geben (NOESY, ROESY). Dies ist Gegenstand einer weiteren Doktorarbeit.

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte und Methoden

3.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Bemerkung
<u>NMR-Spektrometer</u>		
<i>Bruker Avance 400 MHz</i>	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	400,13 MHz (¹ H) 100,61 MHz (¹³ C) <u>Messköpfe:</u> 5 mm BBO, 5 mm BBI
<i>Bruker Avance 500 MHz</i>	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	500,13 MHz (¹ H) <u>Messkopf:</u> Spezialmesskopf für „On-Flow“-HPLC-NMR-Kopplungen
<i>Bruker DMX 600 MHz</i>	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	600,13 MHz (¹ H) <u>Messkopf:</u> 5mm Triple
<u>Software für die NMR-Messungen</u>		
<i>XWIN-NMR</i>	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	Version 3.0 b bis Version 3.5
<i>WIN-1D</i>	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	
<i>WIN-2D</i>	Bruker Biospin, Rheinstetten, D	
<i>Windows NT</i>	Microsoft, Unterschleißheim, D	Betriebssystem
<u>Kapillarelektrophorese</u>		
<i>HP^{3D}-CE</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, D	50 µm I.D., 375 µm O.D.
<i>UV-Photodiodenarray-Detektor (PDA)</i>	Integriert	
<i>Quarzglaskapillare</i>	Polymicro, Schloßböckelheim, D	

Software für die Kapillarelektrophorese

<i>Chemstation</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, D	Rev. A 08.03
--------------------	---------------------------------------	--------------

HPLC, MS (zur NMR-Kopplung)

<i>HP 1100</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, D	HPLC-System
<i>HP DAD G1315B</i>	Agilent Technologies, Waldbronn, D	UV-Photodiodenarray- Detektor
<i>Esquire Series</i>	Bruker Daltonik, Bre- men, D	Massenspektrometer

Software für die HPLC-MS-NMR-Kopplung

<i>HyStar PP Version 2.0</i>	Bruker Daltonik, Bre- men, D	LC-NMR-MS-Kopplung
------------------------------	---------------------------------	--------------------

Sonstige Laborgeräte

<i>NMR-Röhrchen, 5 mm</i>	Schott, Mainz, D	Qualitätsstufen „Econo- mic“ und „Professional“
<i>NMR-Röhrchen, 5 mm</i> <i>Coxial Inserts 5mm</i>	Wilmad Wilmad	Typ 527-PP Passen zu Wilmad- NMR-Röhrchen
<i>Zentrifuge EBA 12</i> <i>Radiometer Copenha- gen, Lyon, F</i> <i>pH-Meter PHM220</i>	Hettrich, Tuttlingen, D Radiometer Copenha- gen, Lyon, F Radiometer Copenha- gen, Lyon, F	Radiometer Copenha- gen, Lyon, F
<i>Elektrode pH3359</i>	Radiometer Copenha- gen, Lyon, F	Spezialelektrode für kleine Volumina
<i>Research Mikroliter- Pipetten</i>	Eppendorf, Hamburg, D	Luftpolster-Pipetten, verschiedene Größen, 1 bis 5000 µl
<i>Multipette plus, Mikroli- terpipette</i>	Eppendorf, Hamburg, D	Kolbenhubpipette, ver- schiedene Größen, 1 bis 200 µl
<i>Gefriertrocknung Alpha II-12</i> <i>Waage Kern 770-60</i>	Christ, Osterode am Harz, D Kern, Balingen- Frommern, D	Elektronische Präzisionswaage

3.1.2 Standardmessbedingungen

Zur Aufnahme von Routine-Spektren wurden typischerweise folgende Parameter genutzt.

Parameter	¹H	¹³C	DEPT
Aufnahme			
<i>Datenpunkte</i>	64 k	64 k	64 k
<i>Anzahl der Scans</i>	128	2 k	1 k
<i>Anzahl der Dummyscans</i>	2	4	4
<i>Spekt. Bandbreite</i>	20 ppm	240 ppm	240 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,25 Hz/Pkt.	0,73 Hz / Pkt.	1,73 Hz / Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	3,958 s	1,366 s	1,366 s
<i>Impulsabstand</i>	4,95 s	3,37 s	3,37 s
<i>Impulswinkel</i>	30°	30°	
<i>90°-Impulsdauer</i>	10,20 µs	7,30 µs	7,30 µs
<i>Relative Pulsleistung</i>	-0,50 dB	-2,00 dB	-2,00 dB
<i>DEPT-Impulswinkel</i>	---	---	135° oder 90°
<i>Entkopplersequenz</i>	---	Waltz16	Waltz16
Prozessierung			
<i>Datenpunkte</i>	32 k	32 k	32 k
<i>Fensterfunktion</i>	Exponentiell	Exponentiell	Exponentiell
<i>LB-Faktor</i>	0,30 Hz	1,00 Hz	1,00 Hz

Parameter	COSY (mit Gradientenunterstützung)	HMQC (mit Gradientenunterstützung)	HMBC (mit Gradientenunterstützung)
Aufnahme			
<u>F2-Dimension</u>			
Datenpunkte	2 k	1 k	1 k
Anzahl der Scans	16	8	8
Anzahl der Dummiscans	2	16	16
Spekt. Bandbreite	(angepasst entsprechend des zugehörigen ¹ H-Spektrums)	(angepasst entsprechend des zugehörigen ¹ H-Spektrums)	(angepasst entsprechend des zugehörigen ¹ H-Spektrums)
Digitale Auflösung			
Aufnahmezeit			
Impulsabstand			
90°-Impulsdauer	10,20 µs	10,20 µs	10,20 µs
Relative Pulsleistung	-0,50 dB	-0,50 dB	-0,50 dB
<u>F1-Dimension</u>			
Inkrementanzahl	128	128	128
Spekt. Bandbreite	(angepasst entsprechend des zugehörigen ¹ H-Spektrums)	(angepasst entsprechend des zugehörigen ¹ H-Spektrums)	angepasst entsprechend des zugehörigen ¹ H-Spektrums)
Digitale Auflösung			
Entkopplersequenz	---	garp	(keine)
90°-Impulsdauer	---	7,30 µs	7,30 µs
Relative Pulsleistung	---	-2,00 dB	-2,00 dB
<u>Gradient</u>			
Impulsform	Sinus	Sinus	Sinus
Impulsdauer	1 ms	1 ms	1 ms
Verhältnis	---	50:30:40	50:30:40
Prozessierung			
Datenpunkte	1 k	1 k	1 k
Fensterfunktion (F2)	Sinus	Sinus	Sinus
Fensterfunktion (F1)	Sinus	Sinus	Sinus

Experimenteller Teil

Normale Bedingungen für die T_1 -Bestimmung nach der Inversion-Recovery-Methode waren:

Parameter	Inversion-Recovery
Pulsprogramm	t1ir (Bruker-Standard-Pulsprogramm)
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	16 k
<i>Anzahl der Scans</i>	16
<i>Anzahl der Dummiscans</i>	4
<i>Spekt. Bandbreite</i>	20 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,50 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	0,99 s
<i>Impulsabstand</i>	11 s
<u><i>Einzelne Messungen</i></u>	
<i>Anzahl der Einzelmessungen</i>	10
<i>Wartezeiten</i>	10 / 5 / 4 / 3 / 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,10 / 0,01 s
Prozessierung	
<i>Datenpunkte</i>	32 k
<i>Fensterfunktion</i>	Exponentiell
<i>LB-Faktor</i>	0,30 Hz

Die Auswertung erfolgte durch die Softwareroutine zur T_1/T_2 -Bestimmung.

3.2 Psychopharmaka

3.2.1 Fluvoxamin

3.2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
<u>Pharmazeutisch wirksame Substanzen</u>		
<i>E-Fluvoxamin-Maleat</i>	Solvay, Weesp, NL	≥ 99,5%
<i>E/Z-Fluvoxamin-Fumarat</i>	Solvay, Weesp, NL	Z-Isomer 53,2 % E-Isomer 47,6 %
<i>Kommerzielles Fluvoxamin</i>	Salutas, Barleben, D	Arzneibuch
<u>Chemikalien für die NMR-Spektroskopie</u>		
<i>Methanol-d₄</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	Deuterierung ≥ 99,8 %

3.2.1.2 Spektrenzuordnung

3.2.1.2.1 Probenbereitung

Für die Messungen zur Spektrenzuordnung wurden jeweils ca. 15 mg *E*-Fluvoxamin bzw. *E/Z*-Fluvoxamin in 650 µl Deuteromethanol gelöst. Referenzierungen wurden vorgenommen auf das Signal von TSP bei 0,00 ppm (¹H und ¹³C).

3.2.1.2.2 Messungen

Die ¹H-, ¹³C-, DEPT135-, COSY-, HMQC und HMBC-Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt

3.2.1.3 Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten

3.2.1.3.1 Probenbereitung

Zur Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten wurden 14 mg einer kommerziellen Fluvoxamin-Probe in 650 µl Deuteromethanol gelöst. Eine Entgasung hinsichtlich des gelösten Sauerstoffs wurde nicht vorgenommen, wie dies auch in den Untersuchungslösungen geschehen sollte.

3.2.1.3.2 Messung

Die Messung wurde nach der *Inversion-Recovery*-Methode unter Standardbedingungen durchgeführt.

3.2.1.4 Quantifizierungsmessungen

3.2.1.4.1 Herstellung der Lösungen

Zur Herstellung der Untersuchungslösungen wurden Stammlösungen hergestellt. Die beiden Stammlösungen wurden direkt in den NMR-Röhrchen gemischt. Hierzu wurden die benötigten Mengen der beiden Stammlösungen mit Mikroliterpipetten (nach Einstellung des Volumens mit Methanol und nach dem Prinzip des „reversen Pipettierens“ um dem Dampfdruck von Methanol entgegenzuwirken) in die Röhrchen transferiert und dort gut gemischt.

3.2.1.4.2 Messung

In Abweichung von den Standardbedingungen wurden für die Messungen folgenden Bedingungen gewählt:

Parameter	^1H
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	38460
<i>Anzahl der Scans</i>	128
<i>Anzahl der Dummiscans</i>	4
<i>Spekt. Bandbreite</i>	8 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,17 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	6,000 s
<i>Impulsabstand</i>	7,0 s
<i>Impulswinkel</i>	90°
<i>90°-Impulsdauer</i>	8,00 μs
<i>Relative Pulsleistung</i>	2,00 dB
Prozessierung	
<i>Datenpunkte</i>	32 k
<i>Fensterfunktion</i>	Exponentiell
<i>LB-Faktor</i>	0,30 Hz

3.2.2 Perphenazin

3.2.2.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
<u>Pharmazeutisch wirksame Substanzen</u>		
<i>Perphenazin</i>	Merck, Darmstadt, D	99,5 %
<i>Perphenazinenantat</i>	Merck, Darmstadt, D	99,6 %
<i>Perphenazinsulfon</i>	Merck, Darmstadt, D	99,7 %
<i>Perphenazinsulfoxid</i>	Merck, Darmstadt, D	99,9 %
<u>Chemikalien für die NMR-Spektroskopie</u>		
<i>Chloroform-d₁</i>	Merck, Darmstadt, D	Deuterierung >99,8 %
<i>Tetramethylsilan (TMS)</i>	Merck, Darmstadt, D	99,7 %

3.2.2.2 Spektrenzuordnung

3.2.2.2.1 Probenbereitung

Für die Messungen zur Spektrenzuordnung wurden jeweils ca. 15 mg Perphenazin bzw. Perphenazinenantat in 650 µl Chloroform-d₁ gelöst. Referenzierungen wurden vorgenommen auf das Signal von TMS bei 0,00 ppm (¹H und ¹³C).

3.2.2.2.2 Messungen

Die ¹H-, ¹³C-, DEPT135-, COSY-, HMQC und HMBC-Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

3.2.2.3 Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten

3.2.2.3.1 Probenbereitung

Zur Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten wurden 15 mg Perphenazinenantat in 650 µl Chloroform-d₁ gelöst. Eine Entgasung hinsichtlich des gelösten Sauerstoffs wurde nicht vorgenommen, da dies auch den Untersuchungslösungen zur qNMR nicht geschieht.

3.2.2.3.2 Messung

Die Messung wurde nach der *Inversion-Recovery*-Methode unter Standardbedingungen durchgeführt.

3.2.2.4 Quantifizierungsmessungen

3.2.2.4.1 Herstellung der Lösungen

Zur Herstellung der Untersuchungslösungen wurden Stammlösungen hergestellt. Die beiden Stammlösungen wurden direkt in den NMR-Röhrchen gemischt. Hierzu wurden die benötigten Mengen der beiden Stammlösungen mit Mikroliterpipetten (nach dem Prinzip des „reversen Pipettierens“ um dem Dampfdruck von Chloroform entgegenzuwirken) in die Röhrchen transferiert und dort gut gemischt.

3.2.2.4.2 Messung

In Abweichung von den Standardbedingungen wurden für die Messungen folgenden Bedingungen gewählt:

Parameter	¹H
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	64 k
<i>Anzahl der Scans</i>	128
<i>Anzahl der Dummyscans</i>	4
<i>Spekt. Bandbreite</i>	10 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,12 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	8,179 s
<i>Impulsabstand</i>	12,18 s
<i>Impulswinkel</i>	90°
<i>90°-Impulsdauer</i>	10,20 µs
<i>Relative Pulsleistung</i>	-0,50 dB
Prozessierung	
<i>Datenpunkte</i>	32 k
<i>Fensterfunktion</i>	Exponentiell
<i>LB-Faktor</i>	0,30 Hz

3.2.2.4.3 Untersuchungen bei Raumtemperatur gelagerter Proben

Die Lösungen wurden wie unter 3.2.2.4.1 beschrieben hergestellt und unter den Bedingungen wie unter 3.2.2.4.2 beschrieben gemessen.

3.2.2.4.4 Oxidationsprodukte

Zur Messung der ¹H-NMR-Spektren wurden 10 mg Perphenazinsulfoxid bzw. Perphenazinsulfon in 650 µl Chloroform-d₁ gelöst und unter Standardbedingungen vermessen.

3.2.3 Chinin und Chinidin

3.2.3.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
<u>Pharmazeutisch wirksame Substanzen</u>		
<i>Chinidin-Sulfat</i>	Boehringer Mannheim, Mannheim, D	99,2 %
<i>Chinin-Hydrochlorid</i>	Boehringer Mannheim, Mannheim, D	99,9 %
<u>Chemikalien für die NMR-Spektroskopie</u>		
<i>Dimethylsulfoxid-d₆</i>	Deutero, Kastellaun, D	99,9 % deuteriert
<i>Tetramethylsilan</i>	Merck, Darmstadt, D	99,7 %

3.2.3.2 Spektrenzuordnung

3.2.3.2.1 Probenbereitung

Für die Messungen zur Spektrenzuordnung wurden jeweils ca. 15 mg Chinin bzw. Chinidin in 650 µl DMSO-d₆ gelöst. Referenzierungen wurden vorgenommen auf das Signal von TMS bei 0,00 ppm (¹H und ¹³C).

3.2.3.2.2 Messungen

Die ¹H-, ¹³C-, DEPT135-, COSY-, HMQC- und HMBC-Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

3.2.3.3 Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten

3.2.3.3.1 Probenbereitung

Zur Bestimmung der T₁-Relaxationszeiten wurden 15 mg Chinin bzw. Chinidin in 650 µl DMSO-d₆ gelöst. Eine Entgasung hinsichtlich des gelösten Sauerstoffs wurde nicht vorgenommen, wie dies auch in den Untersuchungslösungen geschehen sollte.

3.2.3.3.2 Messung

Die Messung wurde nach der *Inversion-Recovery*-Methode unter Standardbedingungen durchgeführt.

3.2.3.4 Quantifizierungsmessungen

3.2.3.4.1 Herstellung der Lösungen

Zur Herstellung der Untersuchungslösungen wurden Stammlösungen hergestellt. Die beiden Stammlösungen wurden direkt in den NMR-Röhrchen gemischt. Hierzu wurden die benötigten Mengen der beiden Stammlösungen mit Mikroliterpipetten in die Röhrchen transferiert und dort gut gemischt.

3.2.3.4.2 Messung

In Abweichung von den Standardbedingungen wurden für die Messungen folgenden Bedingungen gewählt:

Parameter	^1H
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	32 k
<i>Anzahl der Scans</i>	128
<i>Anzahl der Dummiscans</i>	8
<i>Spekt. Bandbreite</i>	11 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,27 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	3,722 s
<i>Impulsabstand</i>	9,72 s
<i>Impulswinkel</i>	90°
<i>90°-Impulsdauer</i>	9,10 µs
<i>Relative Pulsleistung</i>	-1,00 dB
Prozessierung	
<i>Datenpunkte</i>	32 k
<i>Fensterfunktion</i>	ohne

3.2.4 Gentamicin

3.2.4.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
<u>Pharmazeutisch wirksame Substanzen</u>		
<i>2-Desoxystreptamin</i>	Von Merck, Darmstadt, D zur Verfügung gestellt	
<i>Garaminhydrochlorid</i>	Von Merck, Darmstadt, D zur Verfügung gestellt	
<i>Gentamicin C1</i>	Aus kommerzieller Probe hergestellt nach Lit. [106]	Bulk
<i>Gentamicin C1a</i>	Aus kommerzieller Probe hergestellt nach Lit. [106]	Bulk
<i>Gentamicin C2 / C2a</i>	Aus kommerzieller Probe hergestellt nach Lit. [106]	Bulk
<i>Gentamicinsulfat</i>	Verschiedene Hersteller und Lieferanten, vom BfArM zur Verfügung gestellt	Bulk
<i>Netilmicin</i>	Essex Pharma, München, D	Bulk
<i>Sisomicin</i>	Promochem, Wesel, D	CRS
<u>Chemikalien für die NMR-Spektroskopie und die NMR-Kopplungen</u>		
<i>Deuteriumoxid</i>	Deutero, Kastellaun, D	Deuterierung 99,9 %
<i>3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonäure-Natrium (TSP)</i>	Fluka / Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	≥ 99,9 %
<i>Schwefelsäure-d₂ (98% in D₂O)</i>	Deutero, Kastellaun, D	Deuterierung 99,5 %
<i>Acetonitril-d₆</i>	Deutero, Kastellaun, D	Deuterierung 99,8 %
<u>Chemikalien für die MEKC</u>		
<i>o-Phthaldialdehyd</i>	Fluka/Sigma-Aldrich Taufkirchen, D	Für die Fluoreszenz, ≥ 99,0 %
<i>Methanol</i>	Merck, Darmstadt, D	99,8%
<i>Borsäure</i>	Fluka/Sigma-Aldrich Taufkirchen, D	≥ 99,5 %
<i>Thioglykolsäure</i>	Merck, Darmstadt	≥ 99,0 %
<i>Natriumtetraborat</i>	Fluka/Sigma-Aldrich Taufkirchen, D	≥ 99,5 %
<i>Desoxycholsäure</i>	Fluka/Sigma-Aldrich Taufkirchen, D	
<i>Pikrinsäure (int. Stand.)</i>	Institutsversorgung	Arzneibuchqualität
<i>β-Cyclodextrin</i>	Wacker-Chemie, Burghausen, D	

3.2.4.2 Spektrenzuordnung

3.2.4.2.1 Probenbereitung

Für die Messungen zur Spektrenzuordnung wurden jeweils ca. 15 mg einer kommerziellen Gentamicin-Probe oder ca. 10 mg der Einzelsubstanzen in 650 µl Deuteriumoxid gelöst.

Zu den getrennten Einzelsubstanzen Gentamicin C1, C1a und dem C2-C2a-Gemisch wurden nach den Messungen 25 µl Deuterioschwefelsäure hinzugefügt und diese angesäuerten Proben erneut vermessen.

Referenzierungen wurden vorgenommen auf das Signal von TSP bei 0,00 ppm (^1H und ^{13}C).

3.2.4.2.2 Messungen

Die ^1H -, ^{13}C -, DEPT135-, COSY-, HMQC- und HMBC-Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

Für die selektiven TOCSY-Experimente wurden die notwendigen Parameter der selektiven Impulse jeweils vor den Messungen bestimmt. Dies geschah vermittels der Kalibrierung des zugehörigen 180° -Impulses an den selektiv anzuregenden Signalen. Dabei waren typische Parameterkombinationen (die Impulsform war stets gaussförmig):

<i>Gewünschte Anregungsbreite</i>	<i>Impulsdauer</i>	<i>Relative Impulsleistung</i>
8 Hz	265 ms	75,5 dB
12 Hz	175 ms	72,0 dB
26 Hz	80 ms	64,0 dB
36 Hz	58 ms	62,5 dB
54 Hz	38 ms	59,0 dB

Experimenteller Teil

Typische Bedingungen für die selTOCSY-Experimente waren dann:

Parameter	selTOCSY
Pulsprogramm	selmlgp (Bruker-Standard-Pulsprogramm)
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	64 k
<i>Anzahl der Scans</i>	64
<i>Anzahl der Dummyscans</i>	2
<i>Spekt. Bandbreite</i>	20 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,25 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	3,958 s
<i>Impulsabstand</i>	5,95 s
<i>90°-Impulsdauer</i>	10,20 µs
<i>Relative Pulsleistung</i>	-0,50 dB
<i>Spin-Lock-Sequenz</i>	MLEV17
<i>TOCSY-Mischzeit</i>	Variiert zwischen 20 und 140 ms
<i>Selektive Anregung</i>	Siehe Tabelle oben
<u><i>Gradient</i></u>	
<i>Impulsform</i>	Sinus
<i>Impulsdauer</i>	1 ms
<i>z-Filter</i>	Vor Aufnahme des FID, variable Wartezeit
Prozessierung	
<i>Datenpunkte</i>	32 k
<i>Fensterfunktion</i>	Exponentiell
<i>LB-Faktor</i>	0,30 Hz

3.2.4.3 HPLC-UV-MS-NMR-Kopplungen

3.2.4.3.1 Probenbereitung

Für die Messungen wurden jeweils ca. 100 mg einer Gentamicin-Probe in 1 ml Deuteriumoxid gelöst.

3.2.4.3.2 HPLC-UV-MS-NMR-Messungen**HPLC-Trennung**

<i>Gerät</i>	HP 1100, Hewlett-Packard	
<i>Säule</i>	Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer, Partikelgröße 4 μm , Porosität 40 Å, 100 mm Länge, 4,6 mm Innendurchmesser Polysphere Technologies Inc., Ontario, Canada	
<i>Fließmittel</i>	H ₂ O bzw. D ₂ O	15 %
	0,1 M NaOH in H ₂ O bzw. D ₂ O	75 %
	Acetonitril bzw. d ₃ -Acetonitril	10 %
<i>Flußrate</i>	0,40 ml/min	
<i>Säulentemperatur</i>	40 °C	
<i>Injektionsvolumen</i>	10 μl	

UV-Detektion

<i>Gerät</i>	HP DAD G1315B, Hewlett-Packard
<i>Messwellenlänge</i>	Photodiodenarray, 200 – 400 nm

MS-Detektion

<i>Gerät</i>	Esquire Series, Ion Trap, Bruker Daltonics
<i>Ionenquelle</i>	ESI
<i>Polarität</i>	Positiv
<i>Scan-Bereich</i>	50 m/z – 1000 m/z

NMR-Detektion

<i>Gerät</i>	Bruker Avance 500, Bruker Biospin, Rheinstetten
<i>Modus</i>	On-flow
<i>Pulsprogramm</i>	lc2wetdcus (Bruker-Standard-Pulsprogramm) Lösungsmittelunterdrückung: WET (für D ₂ O und CD ₃ CN), ¹³ C-Entkopplung, Gradientenunterstützung

Pseudo-F2-Dimension (¹H-Spektren)

<i>Datenpunkte</i>	8 k
<i>Anzahl der Scans</i>	16
<i>Spekt. Bandbreite</i>	6,3 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,77 Hz/Punkt
<i>Aufnahmezeit</i>	1,298 s
<i>Impulsabstand</i>	2,30 s
<i>Impulswinkel</i>	90°
<i>90°-Impulsdauer</i>	8,40 μs
<i>Relative Pulsleistung</i>	3,00 dB

Software

<i>Kopplung</i>	HyStar PP Version 2.2, Bruker Daltonic
<i>MS</i>	Bruker Daltonics Data Analysis
<i>NMR</i>	XWIN-NMR; Bruker Biospin

3.2.4.4 Kapillarelektrophoretische Untersuchungen

Diese wurden durchgeführt wie in [104] beschrieben.

3.2.4.5 Quantitative NMR-Messungen

Die zur quantitativen Auswertung herangezogenen Messungen wurden auf einem Bruker DMX 600 MHz-Spektrometer durchgeführt. Es wurden jeweils etwa 20 mg (genau gewogen) Substanz für jede Messung in Deuteriumoxid gelöst.

Die Messparameter dabei waren:

Parameter	¹H
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	64 k
<i>Anzahl der Scans</i>	256
<i>Anzahl der Dummiscans</i>	8
<i>Spekt. Bandbreite</i>	10 ppm
<i>Einstrahlfrequenz entspricht</i>	5,5 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,18 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	5,453 s
<i>Impulsabstand</i>	6,45 s
<i>Impulswinkel</i>	90°
<i>90°-Impulsdauer</i>	7,15 µs
<i>Relative Pulsleistung</i>	0,00 dB
Prozessierung	
<i>Datenpunkte</i>	128 k
<i>Fensterfunktion</i>	Exponentiell
<i>LB-Faktor</i>	0,30 Hz

3.2.5 Bestimmung von Diffusionskoeffizienten

3.2.5.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
<u>Pharmazeutisch wirksame Substanzen</u>		
<i>Ofloxacin</i>	Hoechst, Frankfurt, D	99,5 %
<u>Chemikalien für die NMR-Spektroskopie</u>		
<i>Deuteriumoxid</i>	Deutero, Kastellaun, D	Deuterierung 99,9 %
<i>Natriumchlorid</i>	Institutsversorgung	p. a.
<i>3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonäure-Natrium (TSP)</i>	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D	≥ 99,9 %
<i>Kalibrierprobe für die Temperatur (80% 1,2-Ethandiol in DMSO)</i>	Rototec-Spintec, Remshalden, D	
<i>Kalibrierprobe für die Temperatur (1% H₂O in D₂O, 0,1% TSP, 0,1 mg/ml GdCl₃)</i>	Rototec-Spintec, Remshalden, D	
<u>Bakterienstämme</u>		
<i>Micrococcus luteus (DSM-Nummer 5636)</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D	
<i>Streptococcus vestibularis (DSM-Nummer 20030)</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D	
<i>Pseudomonas fluorescens (DSM-Nummer 50090)</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, D	
Mueller-Hinton-Nährboden	Oxoid, Wesel, D	
<i>Hirn-Herz-Glucose-Bouillon</i>	Oxoid, Wesel, D	

3.2.5.2 Kalibrierung des Spektrometers

3.2.5.2.1 Temperatur

Von der entsprechenden Standardprobe wurden Standard-Protonenspektren gemessen. Zur Temperierung der Probe wurde der Heizgasfluss auf 535 L/h erhöht.

Experimenteller Teil

3.2.5.2.2 Gradientenstärke

Von der entsprechenden Standardprobe wurden Diffusionskoeffizienten gemessen. Zur Temperierung der Probe wurde der Heizgasfluss auf 535 L/h erhöht.

Bedingungen des Diffusionsexperimentes:

Parameter

Pulsprogramm	stebp1s (Bruker-Standard-Pulsprogramm; stimulated echo)
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	64 k
<i>Anzahl der Scans</i>	8
<i>Anzahl der Dummyscans</i>	4
<i>Spekt. Bandbreite</i>	20 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,25 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	3,958 s
<i>Impulsabstand</i>	4,96 s
<i>90°-Impulsdauer</i>	9,10 μ s
<i>Relative Pulsleistung</i>	-1,00 dB
<i>Diffusionszeit (Δ)</i>	50 ms
<i>Gradientendauer (δ)</i>	1 ms
<u><i>Gradient / Einzelmessungen</i></u>	
<i>Anzahl der Messungen</i>	32
<i>Höchste Gradientenstärke</i>	95 %
<i>Geringste Gradientenstärke</i>	2 %

Die Diffusionskoeffizienten und die zugehörigen DOSY-Plots wurden mit der softwareseitig integrierte Routine (T1/T2-Berechnung, für die Berechnung von Diffusionskoeffizienten geeignet bzw. die Routine „dosy2d“ für die zweidimensionale Darstellung; Bruker XWIN-NMR, Version 3.5) berechnet.

3.2.5.3 Kultur der Bakterien

Die Bakterien wurden auf Mueller-Hinton-Nährboden kultiviert und einmal wöchentlich überimpft. Für die Messungen wurden jeweils eine Flüssigkultur in Hirn-Herz-Glucose-Bouillon angelegt und diese 12-24 Stunden bei 30°C kultiviert. Aus der Flüssigkultur wurden die Bakterien abzentrifugiert und dann dreimal mit 0,9%iger Kochsalzlösung in D₂O gewaschen. Abschließend wurden diese dann wieder in dieser Kochsalzlösung aufgenommen.

3.2.5.4 NMR-Messungen

3.2.5.4.1 Spektrenzuordnung

Für die Messungen zur Spektrenzuordnung wurden jeweils ca. 2 mg Ofloxacin in 650 μ l Deuteriumoxid gelöst. Referenzierungen wurden vorgenommen auf das Signal von TSP bei 0,00 ppm.

3.2.5.4.2 Diffusionsmessungen

Die Messungen wurden mit einem „Stimulated-Echo-Experiment“ durchgeführt. Die Bedingungen der Messungen waren folgende:

Parameter	Stimulated echo
Pulsprogramm	stebppg1s (Bruker-Standard-Pulsprogramm; stimulated echo with bipolar gradients)
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	32 k
<i>Anzahl der Scans</i>	16
<i>Anzahl der Dummyscans</i>	2
<i>Spekt. Bandbreite</i>	10 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,25 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	4,089 s
<i>Impulsabstand</i>	5,09 s
<i>90°-Impulsdauer</i>	9,10 μ s
<i>Relative Pulsleistung</i>	-1,00 dB
<i>Diffusionszeit (Δ)</i>	50 ms
<i>Gradientendauer (δ)</i>	2 ms
<u>Gradient / Einzelmessungen</u>	
<i>Anzahl der Messungen</i>	16
<i>Höchste Gradientenstärke</i>	75 % bis 95 %, individuell angepasst
<i>Geringste Gradientenstärke</i>	2 %

Die Berechnungen der Diffusionskoeffizienten und die DOSY-Plots wurden mit der Software XWIN-NMR, Version 3.5, Bruker, durchgeführt.

3.2.6 Untersuchung von Cyclodextrin-Komplexen

3.2.6.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Reinheitsgrad
<i>L-Phenylalanin</i>	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%
<i>L-Alanyl-L-Tyrosin x 3 H₂O</i>	Bachem, Weil am Rhein, D	82%
<i>Deuteriumoxid</i>	Deutero, Kastellaun, D	Deuterierung 99,9 %
<i>Maleinsäure</i>	Aldrich, Steinheim, D	99%
<i>Natriumdihydrogenphosphat</i>	Fluka, Buchs, CH	≥ 99%
<i>Phosphorsäure 10%</i>	Institutsversorgung	Bulk

3.2.6.2 NMR-Messungen

3.2.6.2.1 Lösungsmittelunterdrückung

Die Bedingungen der Messungen zu den beiden Methoden zur Lösungsmittelunterdrückung waren:

Parameter	Presaturation	WATERGATE
Pulsprogramm	zgpr (Bruker-Standard-Pulsprogramm)	p3919gp (Bruker-Standard-Pulsprogramm)
Aufnahme		
<i>Datenpunkte</i>	38312	38312
<i>Anzahl der Scans</i>	64	64
<i>Anzahl der Dummyscans</i>	4	4
<i>Spekt. Bandbreite</i>	12 ppm	12 ppm
<i>Sendefrequenz</i>	entsprechend dem Wassersignal	entsprechend dem Wassersignal
<i>Digitale Auflösung</i>	0,25 Hz/Pkt.	0,25 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	4,000 s	4,000 s
<i>Impulsabstand</i>	6,50 s	6,00 s
<i>90°-Impulsdauer</i>	9,20 μs	9,20 μs
<i>Relative Pulsleistung</i>	2,00 dB	2,00 dB
<i>Relative Pulsleistung für Presaturation bzw. WATERGATE</i>	angepasst zu 60,00 dB	angepasst zu 2,00 dB
<i>Verzögerung für Binominal-Wasserunterdrückung</i>	---	208μs (entsprechend Nullstellen ±6ppm zur Sendefrequenz)

3.2.6.2.2 Messungen lyophilisierter Proben

Es wurde 12 mM Lösungen des Dipeptides und 12mM von β -Cyclodextrin in einem Phosphat-Puffer (50mM, pH 2,5) hergestellt. Eine Mischung von je 2 ml jeder einzelnen Lösung und 2 ml Puffer bzw. eine Mischung von jeweils 2 ml beider Lösungen wurden gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in 4 ml D₂O aufgenommen. Die Gefriertrocknung wurde insgesamt dreimal wiederholt.

Die Messungen wurden in WILMAD 527-PP NMR-Röhrchen mit passendem Innenröhrchen vorgenommen. Referenzsubstanz war Maleinsäure gelöst in D₂O.

Bedingungen für die Messungen waren folgenden:

Parameter	¹H
Aufnahme	
<i>Datenpunkte</i>	49152
<i>Anzahl der Scans</i>	128
<i>Anzahl der Dummyscans</i>	4
<i>Spekt. Bandbreite</i>	10 ppm
<i>Digitale Auflösung</i>	0,16 Hz/Pkt.
<i>Aufnahmezeit</i>	6,134 s
<i>Impulsabstand</i>	8,6 s
<i>Impulswinkel</i>	30°
<i>90°-Impulsdauer</i>	9,50 μ s
<i>Relative Pulsleistung</i>	2,00 dB
Prozessierung	
<i>Datenpunkte</i>	32768
<i>Fensterfunktion</i>	Exponentiell
<i>LB-Faktor</i>	0,30 Hz

4 Zusammenfassung

Zusammenfassung

Allgemeines

Auch wenn die NMR-Spektroskopie eine etablierte Routinetechnik zur Strukturaufklärung ist, so wird sie als quantitative analytische Methode nur selten berücksichtigt, da ihr eine mangelnde Empfindlichkeit nachgesagt wird. Diese kann häufig durch geeignetes Experimentdesign überwunden werden. Die Vorteile der qNMR-Spektroskopie zur Quantifizierung von Verunreinigungen im Vergleich zu chromatographischen Methoden liegen in der in der Regel weitaus geringeren Vorbereitungszeit für die Probe sowie der Messdauer selbst. Auch ist die NMR-Spektroskopie von einer deutlich höheren Robustheit gekennzeichnet als dies für alle trennenden Methoden gilt. Bei der qNMR sind die Ursachen für mangelnde Robustheit in der Regel in der Probenvorbereitung zu suchen. Wenn einfache NMR-Experimente zur Anwendung kommen, beispielsweise übliche ^1H -NMR-Spektren zur quantitativen Auswertung herangezogen werden, müssen einige Vorgaben beachtet werden. So ist unter anderem wichtig, dass die maximal detektierbare Intensität auch detektiert wird, d. h. es müssen 90° -Impulse verwendet werden. Damit einher geht die Forderung nach ausreichend langen Relaxations- und Akquisitionszeiten. Werden komplexere Pulsfolgen, beispielsweise zur Unterdrückung von Lösungsmittelsignalen benutzt, können hierin mögliche Quellen für falsche Ergebnisse oder unzureichende Robustheit liegen.

Sind die Spektren für eine quantitative Auswertung geeignet, d. h. ist eine Basislignentrennung der miteinander zu vergleichenden Signale gegeben, dann ist die NMR-Spektroskopie eine ideale und schnelle Methode zur Quantifizierung von Verunreinigungen und auch zur Gehaltsbestimmung von Arzneistoffen.

Quantitative Bestimmungen

Anhand verschiedener Substanzen konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die NMR-Spektroskopie in der Lage ist, Verunreinigungen von Arzneistoffen zu quantifizieren.

Für das Antidepressivum *Fluvoxamin* ist im Arzneibuch eine Ionenpaarchromatographie vorgeschrieben, um die Verunreinigung des wirksamen *E*-Isomers durch das *Z*-Isomer zu quantifizieren. Ionenpaarchromatographischen Methoden man-

gelt es häufig an der Robustheit. Eine quantitative Auswertung der NMR-Spektren einer Mischung beider Isomere ist ohne aufwändige Probenvorbereitung möglich. In den ^1H -NMR-Spektren der Mischung (Abbildung 4-1) sind die Signale der Wasserstoffe beider Isomere an Position 2 gut voneinander getrennt. Werden diese quantitativ ausgewertet, dann ist

es nach Optimierung insbesondere hinsichtlich der T_1 -Relaxationszeit möglich, den Anteil des *Z*-Isomers auf 0,2 % zu begrenzen.

Auch für die Bestimmung der Abbauprodukte des *Perphenazinenantats* konnte gezeigt werden, dass die qNMR eine geeignete Methode darstellt. *Perphenazine*-nantat kann durch Esterhydrolyse gespalten werden. Zur Auswertung der ^1H -NMR-Spektren wird der Vergleich der Integralfächen der Signale der Wasserstoffe an Position 21 des *Perphenazins* mit dem zusammenfallenden Signal der Wasserstoffe an Position 11 beider Substanzen herangezogen (Abbildung 4-2).

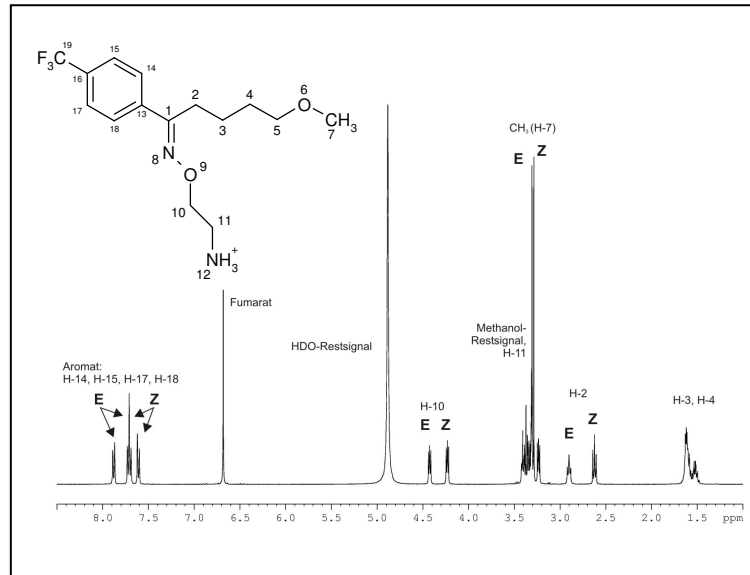


Abbildung 4-1: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) einer Mischung von *E*- und *Z*-Fluvoxamin, gemessen in Methanol- d_4 .

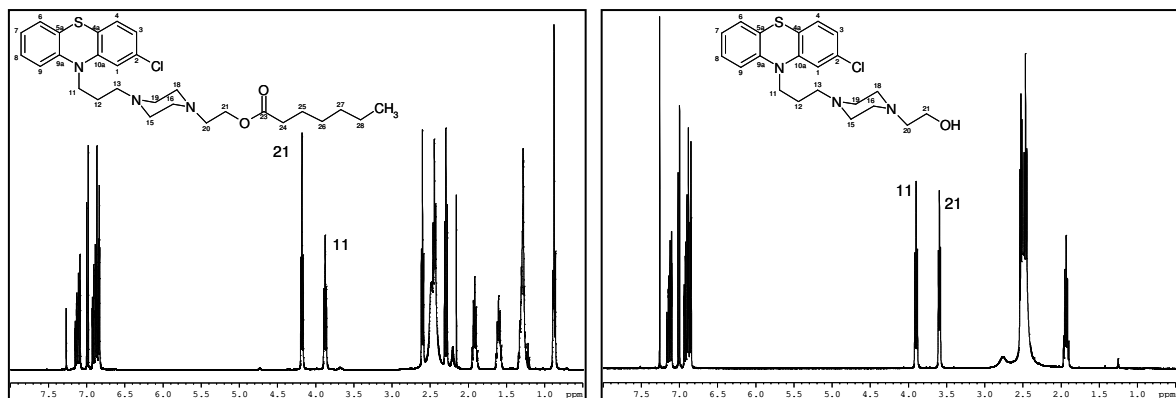


Abbildung 4-2: ^1H -NMR-Spektren (400 MHz) von *Perphenazin* und *Perphenazine*-nantat, gemessen in CDCl_3 .

Zusammenfassung

Es konnte sowohl Perphenazin als Abbauprodukt des Esters als auch Perphenazin-antat in Perphenazin quantifiziert werden. Zusätzlich kann der Bereich der aromatischen Wasserstoffe zu einer Aussage über die Oxidation genutzt werden. Bei der Oxidation des Schwefels im Phenothiazinring zum Sulfoxid und zum Sulfon ändern sich die chemischen Verschiebungen der Wasserstoffkerne in diesem Ringsystem. Dadurch wird eine halbquantitative Aussage ermöglicht.

Schließlich konnten die beiden Epimere *Chinin* und *Chinidin* jeweils als Verunreinigung des anderen Chinaalkaloides quantifiziert werden. Auch in diesem Fall liegen in den ^1H -NMR-Spektren in DMSO-d_6 von Mischungen dieser beiden Verbindungen Signale weit genug auseinander, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. In beiden Fällen, der Bestimmung von Chinidin in Chinin und von Chinin in Chinidin konnte dies auf einem Niveau von 2,5% geschehen, was den Anforderungen der Arzneibücher entspricht.

Gentamicinsulfat

Die ^1H -NMR-Spektroskopie wurde ebenfalls zur Charakterisierung der Zusammensetzung des Antibiotikums Gentamicin eingesetzt. Gentamicin, das fermentativ aus *Micromonospora purpurea* gewonnen wird, besteht aus verschiedenen Haupt- und Nebenkomponenten, deren Zusammensetzung je nach Fermentationsbedingungen schwankt.

Nach einer Reihe von Todesfällen im Zusammenhang mit der Anwendung des Antibiotikums Gentamicin in den USA wurde vermutet, dass diese auf verschiedene Verunreinigungen zurückzuführen sind. In der aktuellen Arzneibuch-Monographie wird eine HPLC-Methode beschrieben, die zwar die Hauptkomponenten quantifizieren kann, aber nicht alle Nebenkomponenten gut abtrennt. Auch ist die gesamte Elutionszeit sehr lang, so dass spät eluierende Substanzen breite Peaks zeigen. Außerdem ist der benutzte gepulste amperometrische Detektor sehr empfindlich und die Methode insgesamt daher wenig robust.

Unter Zuhilfenahme von ein- und zweidimensionalen Standardmesstechniken sowie selektiver TOCSY-Messungen konnten alle Signale in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der Haupt- und Nebenkomponenten von Gentamicin vollständig zuge-

ordnet werden. Dabei zeigte sich, dass der Bereich der anomeren Wasserstoffe sehr gut geeignet ist, Aussagen über die Reinheit und über das Verhältnis der Hauptkomponenten zueinander treffen zu können (Abbildung 4-3). In dem in der

Abbildung gezeigten Ausschnitt aus einem 400 MHz- ^1H -NMR-Spektrum ist eine Integration der H20-Signale der Hauptkomponenten aufgrund mangelnder Trennung nicht möglich. Diese ist jedoch in 600 MHz-Spektren möglich. Auf diese Weise können die Verhältnisse der Hauptkomponenten zueinander

bestimmt werden. Die so erhaltenen Ergebnisse zeigen eine sehr gute

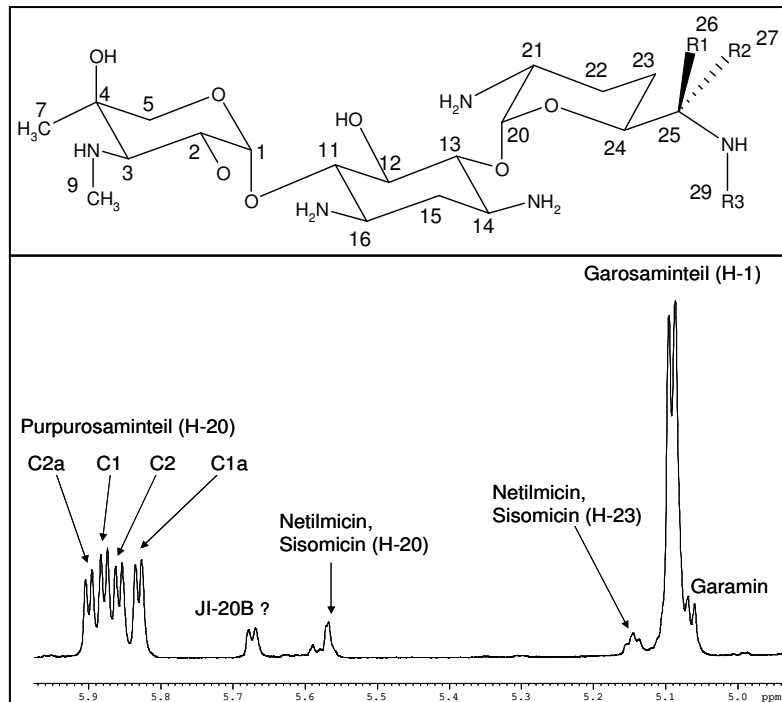


Abbildung 4-3: Allgemeine Strukturformel der Hauptkomponenten (C1 bis C2b) von Gentamicin und der Bereich der anomeren Wasserstoffe von Gentamicin im ^1H -NMR-Spektrum (in D_2O)

Übereinstimmung mit den aus einer MEKC-Trennung erhaltenen Daten. Das zeigt die sehr gute Ergänzung dieser beiden Methoden.

Insgesamt wurden für diese Arbeit über 40 Gentamicin-Proben verschiedener Hersteller untersucht, miteinander verglichen und in verschiedene Gruppen eingeteilt. Als Leitverunreinigung hat sich dabei Sisomicin erwiesen. Daneben konnte der Vergleich der Verunreinigungsprofile Hinweise auf Handelswege geben. Unter den untersuchten Proben waren auch diejenigen, zu den Todesfällen führten. Diese konnten den stark verunreinigten Gruppen zugeordnet werden.

Bestimmung von Diffusionskoeffizienten

Mit der NMR-Spektroskopie ist es möglich, Diffusionskoeffizienten von Stoffen zu bestimmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das genutzt, um Hinweise auf Interaktionen zwischen Antibiotika und Bakterienzellen zu erhalten.

Zusammenfassung

Wenn Antibiotika wirken, müssen sie in eine Interaktion mit den Bakterienzellen treten. Während ungebundene, nicht-interagierende Arzneistoff-Moleküle in der Lösung frei diffundieren können, gilt dies nicht für Interagierende. Daher verändern sich die Diffusionskoeffizienten, wenn ein Teil der Antibiotikamoleküle an Zellstrukturen gebunden wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundlegende Untersuchungen dazu gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass sich Veränderungen des Diffusionskoeffizienten von Ofloxacin ohne und mit Bakterienzellen nachweisen lassen. Die Veränderung ist für verschiedene Bakterienarten unterschiedlich. Ein Einfluss der Bakterienmenge auf die Viskosität der Lösung und damit auf die Diffusionskoeffizienten konnte nicht nachgewiesen werden. Langfristig kann dieser Ansatz eine schnelle Möglichkeit für Screening-Untersuchungen zur antibiotischen Wirksamkeit neuer Substanzen darstellen.

Es konnten allerdings auch einige Probleme erkannt werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht gelöst werden konnten. Beispielsweise die geringe von den Bakterien akkumulierte Stoffmenge des Ofloxacins im Vergleich zu der noch ungebundenen und ein möglicherweise nicht ideales Medium für die Bakterien während der Messungen. Dies kann u. U. durch Messung von ^{19}F statt ^1H verbessert werden.

Komplexe zwischen Cyclodextrinen und Peptiden

Durch Komplexierung verändert sich die chemische Umgebung sowohl von den Kernen des Liganden als auch des Komplexbildners. Daraus resultieren Verschiebungen der chemischen Verschiebung, die als „CICS“ (complexation induced chemical shifts) bezeichnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die CICS in Komplexen von β -Cyclodextrin mit dem Dipeptid Alanyl-Tyrosin untersucht. Für diese Messungen, die bei bestimmten pH-Werten durchgeführt wurden, wurden die Lösungen in H_2O bereitete und durch mehrfache Gefriertrocknung und Rekonstitution mit D_2O konnten ein vollständiger $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austausch erreicht werden. So war keine Unterdrückung des Lösungsmittelsignals notwendig. Als Referenz diente Maleinsäure, in einer Lösung in einem koaxialen Innenröhrchen als externe Referenz.

Dabei konnten deutliche Verschiebungen der chemischen Verschiebung für die in der Kavität des Cyclodextrins liegenden Wasserstoffe gefunden werden. Dies macht klar, dass es sich um Inklusionskomplexe handelt.

5 Summary

Summary

General

Although NMR spectroscopy is a well established routine technique for structure determination, it is only rarely used as a quantitative analytical method because of an assumed lack of sensitivity. This problem can be overcome by adequate experimental design. In contrast to chromatographic methods advantages of qNMR for quantification of impurities are the usually less time-consuming sample preparation and the smaller measuring time. Furthermore, qNMR shows a better robustness than the separation techniques. Reasons for bad robustness in qNMR in most cases are due to sample preparation. If simple NMR experiments, e. g. usual ^1H -NMR-spectra are used for the quantitative analysis, some points have to be taken in account. It is important to detect the maximum of the detectable intensity, which means 90° -pulses have to be used. That requires sufficient time for relaxation and acquisition. Complex pulse sequence (e. g. for solvent suppression) could also be a source for wrong results or lacking robustness.

If a baseline separation of the signals being evaluated is given, the spectra are suitable for quantitative analysis. Under this condition NMR spectroscopy is an ideal and quick method for the quantification of impurities and the assay of active pharmaceutical ingredients.

Quantitative analysis

It could be shown on the basis of different substances that the NMR spectroscopy is able to quantify impurities of pharmaceuticals.

For the quantification of impurities of the antidepressive drug *fluvoxamine* the pharmacopoeia describes an ion-pair chromatographic method. Since the antidepressive activity resides on the *E*-isomer the content of the *Z*-isomer has to be limited. Since ion-pair chromatography often lacks of robustness, qNMR is an alternative.

The quantitative evaluation of ^1H NMR spectra of a mixture of the two isomers is possible without extensive sample preparation. The signals of the hydrogens at position 2 of both isomers are well separated in the spectrum (see Figure 5-1). If these are quantitatively evaluated, under optimized conditions, e.g. with respect to T_1 -relaxation time, it is possible to limit the content of the *Z*-isomer to 0.2%.

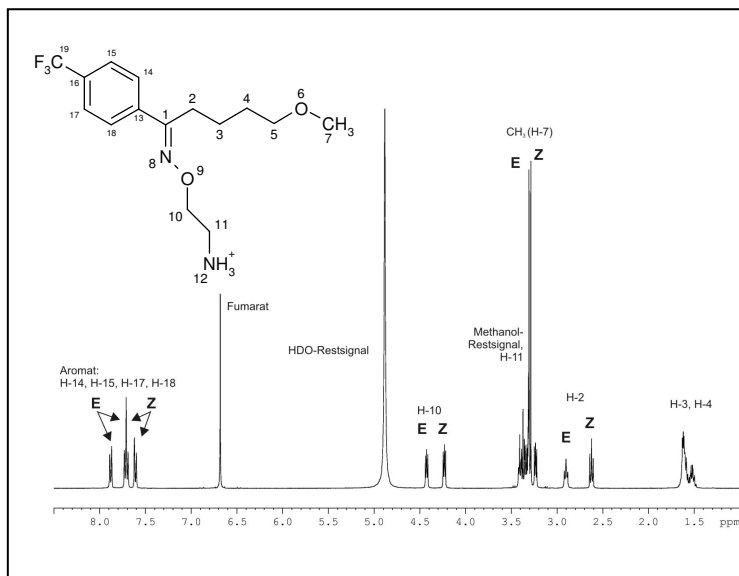


Figure 5-1: ^1H -NMR-spektrum (400 MHz) of the mixture of *E*- and *Z*-fluvoxamine, measured in methanol- d_4 .

For analysis of degradation products of *perphenazine enantate* qNMR is a suitable method. *Perphenazine enantate* can be cleaved by ester hydrolysis (see Figure 5-2). Using the integral area of the signal of the hydrogens at position 21 of perphenazine in comparison to the integral area of the overlapping signals of the hydrogens at position 11 of both substances perphenazine and perphenazine enantate it was possible to quantify perphenazine as a degradation product of perphenazine as well perphenazine enantate in perphenazine.

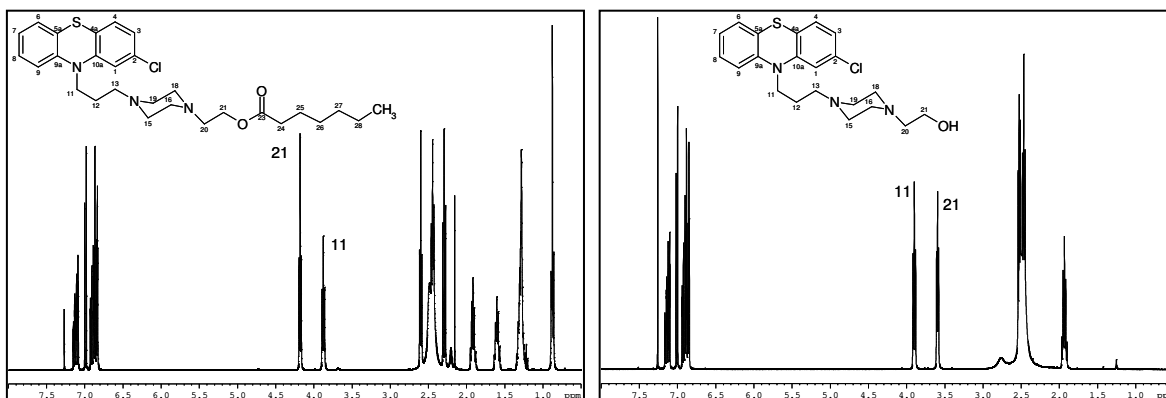


Figure 5-2: ^1H -NMR-spektra (400 MHz) of perphenazine and perphenazine enantate, measured in CDCl_3 .

Summary

Additionally the area of the aromatic hydrogens can be used for the analysis of the oxidation. The oxidation of the sulfur of the the phenothiazine-moiety to the sulfoxide and the sulfone changes the chemical shifts of the corresponding hydrogens. This enables a half-quantitative assessment.

Finally it was possible to quantify the two epimers *quinine* and *quinidine* as an impurity in either drug. Again signals of both substances could be identified to be used for quantification. In both cases quinine as impurity of quinidine and *vice versa* the impurity can be limited to 2.5 per cent as required by the pharmacopeias.

Gentamicin sulfate

¹H-NMR spectroscopy was also used as an analytical method to characterize the composition of gentamicin. Gentamicin is produced from *Micromonospora purpurea* by fermentation and consists of different main and side components. The composition varies when applying different fermentation conditions.

A number of deaths in connection with the application of the antibiotic drug gentamicin in the USA were reported. Different impurities were suspected to be responsible for these deaths. In the current pharmacopoeia monograph an HPLC method is described which is able to quantify all main components but does not separate all side components. In addition, the total elution time is long. Thus late eluting substances show very broad peaks. Furthermore the used pulsed amperometric detector is very sensitive and the method is not very robust over all.

Using one- and two-dimensional routine NMR techniques and selective TOCSY experiments it was possible to assign all signals in the ¹H- and ¹³C-NMR spectra of all main and side components. The area of the anomeric hydrogens is appropriate to evaluate the purity of gentamicin and the proportions between the main components.

In the part of the 400 MHz ¹H-NMR spectrum shown in Figure 5-3 integration of the H₂₀ signals of the main components is impossible due to the missing baseline separation. However, using 600 MHz spectra integration is possible. In this way the proportions between the main components can be determined. The results

achieved in this way show good accordance to the results obtained with an MEKC separation.

More than 40 gentamicin samples from different manufactures were studied, compared and divided into several groups, based on their impurity profile. As a lead impurity sisimocin has been identified. Besides that, the comparison of the impurity profiles enables to trace the trade ways. Some of the

samples which led to the deaths were among the samples being classified in the impure groups.

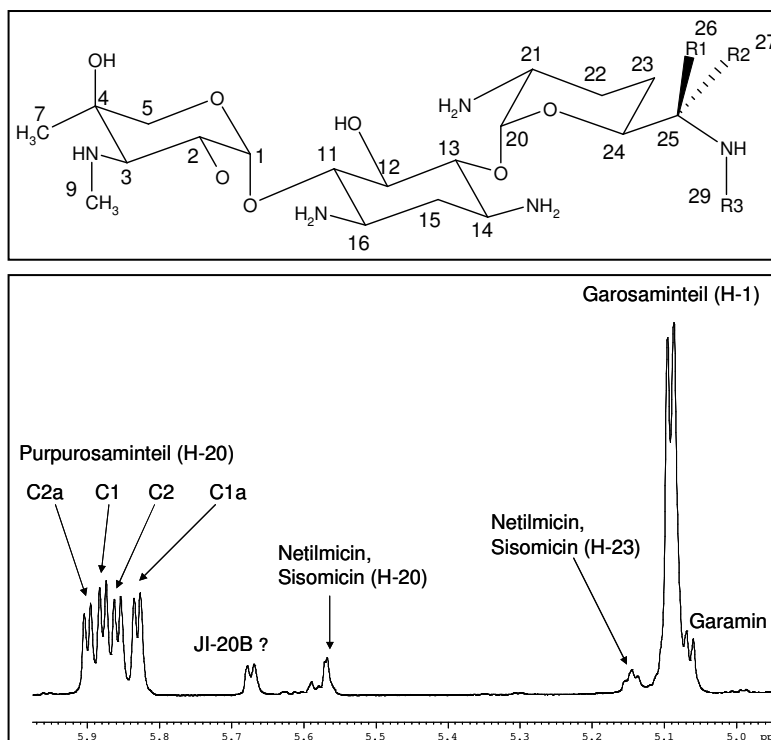


Figure 5-3: Structure of the main components (C1 to C2b) of gentamicin and the area of the anomeric hydrogens of gentamicin in the ¹H-NMR-spektrum (in D₂O)

Determination of diffusion coefficients

With NMR spectroscopy it is possible to determine diffusion coefficients of substances. This technology was used to obtain information about the interaction of antibiotics with bacteria cells.

Antibiotics showing effect on the bacteria have to interact with them. Non-interacting antibiotic-molecules can freely diffuse in the solution; this is not the case for interacting molecules. Thus diffusion coefficients change upon binding to cell structures.

In this work fundamental studies were performed. It was possible to show that changes of the diffusion coefficient of ofloxacin in absence and in presence of bacteria cells can be observed. The changes are different for different bacteria species. An influence of the amount of bacteria on the viscosity of the solution and

Summary

with that on the diffusion coefficient was not found. This attempt may be a possibility for quick screening of the antibiotic activity of new substances.

Some problems occurred which could not be solved in this work. For example the little amount of ofloxacin accumulated by the bacteria in contrast to the amount of unbound ofloxacin. Also the media used (0.9% saline solution) might be not ideal for the bacteria. Maybe this could be improved by observing ^{19}F instead of ^1H .

Complexes of cyclodextrins and peptides

By complexation the chemical environment of nuclei of both the ligand and the host changes. This results in changes of the chemical shifts which are named complexation induced chemical shifts ("CICS").

Within the frame of this work CICS observed in complexes of β -cyclodextrin and the enantiomers of the dipeptide alanyl-tyrosine were studied. These experiments were performed at varying pH-values. Therefore solutions were prepared in H_2O , repeatedly lyophilised and reconstituted in D_2O to achieve a complete $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -exchange. Hence no solvent suppression was needed. For referencing the signal of maleic acid was used as external reference.

Significant shifts of the chemical shift for the hydrogens inside of the cyclodextrin cavity were found, indicating inclusion complexation of the dipeptide in the cyclodextrin cavity.

6 Literaturver- zeichnis

Einleitung

- 1 U. Holzgrabe, R. Deubner, N. Novatchev, F. Wiene, *Verunreinigungen von Arzneistoffen*, Dt. Apotheker Ztg., 2003, **143**, 3221-3228
- 2 S. L. Ali, *Lösungsmittelreste in Erythromycin*, Pharm. Ztg., 1998, **143**, 3343 und S. L. Ali, *Nochmals Erythromycin*, Pharm. Ztg., 1998, **143**, 3694-3695
- 3 A. N. Mayeno, F. Lin, C. S. Foote, D. A. Loegering, M. M. Ames, C. W. Hedberg, G. J. Gleich, *Characterization of 'peak E', a novel amino acid associated with eosinophilia-myalgia syndrome*, Science, 1990, **250**, 1707-1708
- 4 F. Bloch, W. W. Hansen, M. E. Packard, *Nuclear induction*, Phys. Rev., 1946, **69**, 127
- 5 E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid*, Phys. Rev., 1946, **69**, 37-38
- 6 T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR techniques in organic chemistry*, Pergamon Amsterdam, 1999
- 7 E. Butler, U. Ackermann, F. Decker, *Avance SGU based frequency generation, beginners guide (german version)*, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, 2003
- 8 H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley VCH, Weinheim, 1999, 3. Auflage
- 9 G. V. D. Tiers, *Proton nuclear resonance spectroscopy I. Reliable shielding values by "internal referencing" with tetramethylsilane*, J. Phys. Chem., 1958, **62**, 1151-1152
- 10 Commission on Molecular Structure and Spectroscopy, *Recommendations for the presentation of NMR data for publication in chemical journals*, Pure Appl. Chem., 1972, **29**, 627-628
- 11 R. K. Harris, E. D. Becker, S. M. Cabral de Menezes, R. Goodfellow, P. Granger, *NMR nomenclature. Nuclear spin properties and conventions for chemical shifts (IUPAC Recommendations 2001)*, Pure Appl. Chem., 2001, **73**, 1795-1818
- 12 T. J. Quinn, *Primary methods of measurement and primary standards*, Metrologia, 1997, **34**, 61-65
- 13 H. Jancke, *NMR als primäre analytische Messmethode*, Nachr. Chem. Tech. Lab., 1998, **46**, 720-722
- 14 R. Freeman, *A handbook of nuclear magnetic resonance*, Longman Scientific, Harlow, 1988
- 15 M. A. Delsuc, J. Y. Lallemand, *Improvement of dynamic range in NMR by oversampling*, J. Magn. Reson., 1986, **69**, 504-507
- 16 D. D. Traficante, *Optimum tip angle and relaxation delay for quantitative analysis*, Concepts Magn. Reson., 1992, **4**, 153-160
- 17 D. D. Traficante, L. R. Steward, *The relationship between sensitivity and integral accuracy*, Concepts Magn. Reson., 1994, **6**, 131-135
- 18 A. G. Ferrige, J. C. Lindon, *Resolution enhancement in FT NMR through the use of a double exponential function*, J. Magn. Reson., 1978, **31**, 337-340
- 19 A. E. Derome, *Modern NMR techniques for chemistry research*, Pergamon, Oxford, 1987
- 20 NMRGuide 3.5, *XWINNMR-Manual Part 1: General features and data processing*, Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten
- 21 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Stuttgart, 1995, 5. Auflage
- 22 C. S. Johnson, *Diffusion measurements by magnetic field gradient methods*, in D. M. Grant, R. K. Harris (Eds.), *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, Wiley, Chichester, 1996, 1626-1644
- 23 A. N. Martin, *Physikalische Pharmazie: pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen*, Wiss. Verl.-Gess., Stuttgart, 2002

- 24 W. S. Price, *Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: part I, basic theory*, Concepts Magn. Reson., 1997, **9**, 299-336
- 25 E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *Spin diffusion measurements: spin echos in the presence of a time-dependent field gradient*, J. Chem. Phys., 1965, **42**, 288-292
- 26 E. L. Hahn, *Spin echos*, Phys. Rev., 1950, **80**, 580-597
- 27 A. M. Dixon, C. K. Larive, *NMR spectroscopy with spectral editing for the analysis of complex mixtures*, Appl. Spec., 1999, **53**, 426A-440A
- 28 C. S. Johnson, *Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications*, Prog. Nuc. Mag. Res. Spec., 1999, **34**, 203-256

Fluvoxamin

- 29 British Pharmacopoeia 1998, Monographie *Fluvoxamine maleate*, Stationary Office, London
- 30 Pharmeuropa, 2002, **14**, 351-352
- 31 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München, 2001, 348
- 32 F. v. Bruchhausen, G. Dannhardt, S. Ebel, A. W. Frahm, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, *Fluvoxamin-Monographie*, in *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Springer, Berlin, 2003, CD-ROM
- 33 V. Claassen, J.E. Davies, G. Hertting, P. Placheta, *Fluvoxamine, a specific 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor*, Br. J. Pharmacol., 1977, **60**, 505-516
- 34 I. M. Anderson, *Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability*, J. Affective Disorders, 2000, **58**, 19-36
- 35 J. C. Nelson, *A review of the efficacy of serotonergic and noradrenergic inhibitors for treatment of major depression*, Biol. Psychiatry, 1999, **46**, 1301-1308
- 36 S. M. Cheer, D. P. Figgitt, *Spotlight on fluvoxamine in anxiety disorders in children and adolescents*, CNS Drugs, 2002, **16**, 139-144
- 37 S. M. Cheer, D. P. Figgitt, *Fluvoxamine: A review of its therapeutic potential in the management of anxiety disorders in children and adolescents*, Paediatric Drugs, 2001, **3**, 763-781
- 38 D. P. Figgitt, K. J. McClellan, *Fluvoxamine: An updated review of its use in the management of adult anxiety disorders*, Drugs, 2000, **60**, 925-954
- 39 M. R. Ware, *Fluvoxamine: A review of the controlled trials in depression*, J. Clin. Psychiatry, 1997, **58 (suppl. 5)**, 15-23
- 40 P. T. Ninan, *Issues in the assessment of treatment response in panic disorders with special reference to fluvoxamine*, J. Clin. Psychiatry, 1997, **58 (suppl. 5)**, 24-31
- 41 W. K. Goodman, H. Ward, A. Kablinger, T. Murphy, *Fluvoxamine in the treatment of obsessive-compulsive disorders and related conditions*, J. Clin. Psychiatry, 1997, **58 (suppl. 5)**, 32-49
- 42 M. E. Tancer, T. W. Uhde, *Role of serotonin drugs in the treatment of social phobia*, J. Clin. Psychiatry, 1997, **58 (suppl. 5)**, 50-54
- 43 H. B. A. Welle, V. Claassen, *Verbindingen met antidepressieve werking*, 18.04.1978, Patenschrift NL 7503310
- 44 H. B. A. Welle, V. Claassen, *Oxime ethers having anti-depressive activity*, 18.04.1978, United States Patent US 4085225
- 45 M. J. Hilhorst, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *Choice of capillary electrophoresis systems for the impurity profiling of drugs*, J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, **16**, 1251-1260

Literaturverzeichnis

- 46 P. V. van Zomeren, M. J. Hilhorst, P. M. J. Coenegracht, G. J. de Jong, *Resolution optimization in micellar electrokinetic chromatography using empirical methods*, J. Chromatogr. A, 2000, **867**, 247-259
- 47 M. J. Hilhorst, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *Capillary electrochromatography of basic compounds using octadecyl-silica stationary phases with an amine-containing mobile phase*, J. Chromatogr. A, 2000, **872**, 315-321
- 48 H. de Bree, J. B. van der Schoot, L. C. Post, *Fluvoxamine maleate: disposition in man*, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 1983, **8**, 175-179
- 49 H. M. Ruijten, H. de Bree, A. J. M. Borst, N. de Lange, P. M. Scherpenisse, W. R. Vincent, L. C. Post, *Fluvoxamine: metabolic fate in animals*, Drug Metabol. Dispos., 1984, **12**, 82-92
- 50 S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, *150 and more basic NMR experiments*, Wiley VCH Weinheim, 1998, 2. erw. Auflage, 155
- 51 ICH Topic Q 2 A, *Validation of analytical methods: definitions and terminology*, CPMP/ICH/381/95, 1. Juni 1995, www.emea.eu.int/pdfs/human/ich/038195en.pdf (Internetlink letztmals überprüft am 03.02.2004)
- 52 S. Kromidas, *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley VCH Weinheim, 2000
- 53 R. Deubner, U. Holzgrave, *Quantitative ¹H NMR spectroscopic determination of the E/Z isomer ratio of the antidepressant drug fluvoxamine for use in pharmaceutical analysis*, Magn. Reson. Chem., 2002, **40**, 762-766

Perphenazin

- 54 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München, 2001, 335
- 55 H. Auterhoff, J. Knabe, H. D. Höltje, *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*, 14. neu bearb. Auflage, Wiss. Verl.-Gesell., Stuttgart, 1999, 303
- 56 R. E. Clark, S. J. Bartels, T. A. Mellman, W. J. Peacock, *Recent trends in antipsychotic therapy of schizophrenia and schizoaffective disorder: implications for state mental health policy*, Schizophrenia Bull., 2002, **28**, 75-84
- 57 M. B. Gatch, H. Lal, *Pharmacological treatment of alcoholism*, Prog. Neuro.-Psychoph., 1998, **22**, 917-944
- 58 F. Riederer, M. Stamenkovic, S. D. Schindler, S. Kasper, *Das Tourette-Syndrom, Eine Übersicht*, Nervenarzt, 2002, **73**, 805-819
- 59 C. E. Adams, M. K. P. Fenton, S. Quraishi, A. S. David, *Systematic meta-review of depot antipsychotic drugs for people with schizophrenia*, Brit. J. Psychiat., 2001, **179**, 290-299
- 60 T. R. E. Barnes, D.A. Curson, *Long-term depot antipsychotics – a risk-benefit assessment*, Drug Safety, 1994, **10**, 464-479
- 61 A. C. Altamura, F. Sassella, A. Santini, C. Montresor, S. Fumagalli, E. Mundo, *Intramuscular preparations of antipsychotics – uses and relevance in clinical practice*, Drugs, 2003, **63**, 493-512
- 62 H. Roth, K. Eger, R. Troschütz, *Arzneistoffanalyse*, 4. Aufl., Dt. Apotheker Verl., Stuttgart, 1999
- 63 *Pharmazeutische Stoffliste*, ABDATA Pharma-Daten-Service, Eschborn/Taunus, 13. Auflage, **2003**
- 64 Perphenazin-Monographie, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, 2002, Deutsche Apotheker-Verlag, Stuttgart, 2636
- 65 J. Blazek, A. Dymes, Z. Stejskal, *Analysis of phenothiazines derivatives*, Pharmazie, 1976, **31**, 681-703

Chinin und Chinidin

- 66 K. Hartke, H. Hartke, E. Mutschler, D. Rücker, M. Wichtl, *Chinarinde-Monographie in Kommentar zum Europäischen Arzneibuch*, Wiss. Verl.-Gesell., Stuttgart, 2002, 11. Erg.-Lief.
- 67 F. v. Bruchhausen, G. Dannhardt, S. Ebel, A. W. Frahm, E. Hackenthal, U. Holzgrabe, *Chinin- und Chinidinmonographien*, in *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, Springer, Berlin, 2003, CD-ROM
- 68 R. B. Woodward, W. E. Doering, *The total synthesis of quinine*, J. Am. Chem. Soc., **66**, 1944, 849
- 69 R. B. Woodward, W. E. Doering, *The total synthesis of quinine*, J. Am. Chem. Soc., **67**, 1945, 860-874
- 70 W. Doering, G. Cortes, L. H. Knox, *Partial racemization of quinine*, J. Am. Chem. Soc., **69**, 1947, 1700-1710
- 71 M. R. Uskokovic, T. Henderson, C. Reese, H. L. Lee, G. Grethe, J. Gutzwiller, *The synthesis of cinchona alkaloids 1: synthesis of meroquinene*, J. Am. Chem. Soc., **100**, 1978, 571-576
- 72 J. Gutzwiller, M. R. Uskokovic, *The synthesis of cinchona alkaloids 2: stereoselective total synthesis of quinine and quinidine*, J. Am. Chem. Soc., **100**, 1978, 576-581
- 73 G. Grethe, H. L. Lee, T. Mitt, M. R. Uskokovic, *The synthesis of cinchona alkaloids 3: synthesis of quinuclidine intermediates*, J. Am. Chem. Soc., **100**, 1978, 581-588
- 74 G. Grethe, H. L. Lee, T. Mitt, M. R. Uskokovic, *The synthesis of cinchona alkaloids 4: synthesis via quinuclidine precursors*, J. Am. Chem. Soc., **100**, 1978, 589-593
- 75 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München, 2001, 912
- 76 E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage, WVG, Stuttgart, 2001, 857
- 77 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München, 2001, 439
- 78 E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage, WVG, Stuttgart, 2001, 546
- 79 Chinidinsulfat-Monographie, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, 2002, Deutsche Apotheker-Verlag, Stuttgart, 1481
- 80 Chininhydrochlorid-Monographie, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, 2002, Deutsche Apotheker-Verlag, Stuttgart, 1483
- 81 D. V. McCalley, *Analysis of the cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques*, J. Chromatogr. A, **967**, 2002, 1-19
- 82 G. M. Hanna, C. A. Lau-Cam, *Application of ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopic method for quinidine to simultaneous determination of quinidine and dihydroquinidine in quinidine sulfate tablets*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **71**, 1988, 1118-1121

Gentamicinsulfat

- 83 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München, 2001, 828
- 84 E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen*, 8. Auflage, WVG, Stuttgart, 2001, 801
- 85 K. R. Wagner, S. Hamed, D. W. Hadley, A. L. Gropman, A. H. Burstein, D. M. Escolar, E. P. Hoffman, K. H. Fischbeck, *Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations*, Ann. Neurol., 2001, **49**, 706-711

Literaturverzeichnis

- 86 M. Wilschanski, C. Famini, H. Blau, J. Rivlin, A. Augarten, A. Avital, B. Kerem, E. Kerem, *A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations*, Am. J. Respir. Crit. Care, 2000, **161**, 860-865
- 87 K. M. Keeling, D. A. Brooks, J. J. Hopwood, P. Li, J. N. Thompson, D. M. Bedwell, *Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of α -L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation*, Hum. Mol. Genet. 2001, **10**, 291-299
- 88 M. J. Weinstein, G. M. Luedemann, E. M. Oden, G. H. Wagman, J. P. Rosselet, J. A. Marquez, C. T. Coniglio, W. Charney, H. L. Herzog, J. Black, *Gentamicin, a new antibiotic complex from Micromonospora*, J. Med. Chem., 1963, **6**, 463-464
- 89 W. R. Hong, *Studies on the fermentation conditions of maximum productivity for gentamicin*, Chin. J. Pharma., 1994, **25**, 1-3
- 90 Y. S. Hu, Z.Y. Wang, *Studies on the breeding of gentamicin producing strain by mutagenesis*, Weishengwu Zazhi, 1989, **9**, 46-47
- 91 D. H. Kim, J. H. Suh, J. Y. Ju, S. K. Yum, C. S. Shin, *Analysis of sisomicin binding sites in micromonospora inyoensis cell wall*, FEMS Microbiol. Lett., 1998, **166**, 9-13
- 92 J. Chu, B. Li, S. Zhang, Y. Li, *On-line ultrasound stimulates the secretion and production of gentamicin by micromonospora echinospora*, Proc. Biochem., 2000, **35**, 569-572
- 93 J. Chu, S. Zhang, Y. Zhuang, J. Chen, Y. Li, *Factors affecting the biosynthesis and secretion of gentamicin*, Proc. Biochem., 2002, **38**, 815-820
- 94 K. Hartke, E. Mutschler, *DAB 9-Kommentar, Deutsches Arzneibuch 9. Ausgabe 1986 mit wissenschaftlichen Erläuterungen*, Wiss. Verl.-Gesellschaft, Stuttgart, 1987, Band 2, 1761
- 95 D. H. Calam, J. N. T. Gilbert, J. W. Lightbown, J. W. Powell, A. H. Thomas, *Control of the composition of gentamicin sulphate by proton magnetic resonance spectrometry*, J. Pharm. Pharmacol., 1978, **30**, 220-232
- 96 J. Kountourellis, R. T. Parfitt, A. F. Casy, *Studies of carbon-13 n. m. r. spectroscopy in pharmaceutical analysis: the composition of commercial samples of gentamicin sulphate*, J. Pharm. Pharmacol., 1983, **35**, 279-283
- 97 N. P. Reuter, A. C. Hanke, E. Lewis, T. G. Alexander, E. Mazzola, A. Aszalos, *Modified nuclear Magnetic Resonance Assay of Gentamicins*, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1982, **65**, 1413-1416
- 98 P. J. Claes, R. Busson, H. Vanderhaeghe, *Determination of the component ratio of commercial gentamicins by high-performance liquid chromatography using pre-column derivatization*, J. Chrom., 1984, **298**, 445-457
- 99 Gentamicin Sulfat-Monographie, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, 2002, Deutsche Apotheker-Verlag, Stuttgart, 1941-1943
- 100 Gentamicin Sulfat-Monographie, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, 5. Nachtrag, 2003, Deutsche Apotheker-Verlag, Stuttgart
- 101 E. Adams, W. Roelants, R. De Paep, E. Roets, J. Hoogmartens, *Analysis of gentamicin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection*, J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, **18**, 689-698
- 102 E. Kaale, S. Leonard, A. v. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmaartens, *Capillary electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid*, J. Chromatogr. A, 2000, **895**, 67-79
- 103 E. Kaale, E. v. Goidsenhoven, A. v. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmaartens, *Electrophoretically mediated microanalysis of gentamicin with in-capillary derivatization and UV detection*, Electrophoresis, 2001, **22**, 2746-2754
- 104 Wienen, F., Holzgrabe, U., *A new micellar electrokinetic capillary electrophoresis chromatography method for separation of the components of the aminoglycoside antibiotics*, Electrophoresis, 2003, **24**, 2948-2957

- 105 Wiene, F., *Kapillarelektrophoretische Trennung und Quantifizierung von Aminoglykosiden und Clotrimazol*, Dissertation, Würzburg, 2004
- 106 Deubner, R., Schollmayer C., Wiene, F., Holzgrabe, U., *Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches*, Magn. Reson. Chem., 2003, **41**, 589-598
- 107 D. A. Jayawickrama, J. V. Sweedler, *Hyphenation of capillary separations with nuclear magnetic resonance spectroscopy*, J. Chromatogr. A, 2003, **1000**, 819-840
- 108 T. A. Getek, M. L. Vestak, T. G. Alexander, *Analysis of gentamicin sulfate by high-performance liquid chromatography combined with thermospray mass spectrometry*, J. Chrom., 1991, **554**, 191-203
- 109 W. M. A. Niessen, *Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1998, **812**, 53-75
- 110 M. Cherlet, S. De Baere, P. De Backer, *Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry*, J. Mass Spectrom., 2000, **35**, 1342-1350
- 111 D. N. Heller, S. B. Clark, H. F. Righter, *Confirmation of gentamicin and neomycin in milk by weak cation-exchange extraction and electrospray ionization/ion trap tandem mass spectrometry*, J. Mass Spectrom., 2000, **35**, 39-49
- 112 U. Braumann, *Bruker LC-NMR*, Bruker, Rheinstetten
- 113 Wiene, F., Deubner, R., Holzgrabe, U., *Composition and impurity profile of multisource raw material of gentamicin – a comparison*, Pharmeuropa, 2003, **15**, 273-279

Bestimmung von Diffusionskoeffizienten

- 114 J. S. Gounarides, A. Chen, M. J. Shapiro, *Nuclear magnetic resonance chromatography: Applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interactions*, J. Chromatogr. B., 1999, **725**, 79-90
- 115 K. Bleicher, M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *Diffusion edited NMR: Screening compound mixtures by affinity NMR to detect binding ligands to vancomycin*, J. Org. Chem., 1998, **63**, 8486-8490
- 116 M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *Diffusion edited NMR – affinity NMR for direct observation of molecular interactions*, J. Am. Chem. Soc., 1997, **119**, 5249-5250
- 117 J. K. Nicholson, P. J. D. Foxall, M. Spraul, R. D. Farrant, J. C. Lindon, *750 MHz ^1H and ^1H - ^{13}C -NMR spectroscopy of human blood plasma*, Anal. Chem., 1995, **67**, 793-811
- 118 S. M. Schoberth, N. K. Bär, R. Krämer, J. Kärger, *Pulsed high-field gradient in vivo NMR spectroscopy to measure diffusional water permeability in *Corynebacterium glutamicum**, Anal. Biochem., 2000, **279**, 100-105
- 119 J. C. Mathai, S. Mori, B. L. Smith, G. M. Preston, N. Mohandas, M. Collins, P. C. M. van Zijl, M. L. Zeidel, P. Agre, *Functional analysis of aquaporin-1 deficient red cells*, J. Biol. Chem., 1996, **271**, 1309-1313
- 120 A. R. Waldeck, M. H. Nouri-Sorkhabi, D. R. Sullivan, P. W. Kuchel, *Effects of cholesterol on transmembrane water diffusion measured using pulsed field gradient NMR*, Biophys. Chem., 1995, **55**, 197-208
- 121 A. R. Waldeck, P. W. Kuckel, A. J. Lennon, B. E. Chapman, *NMR diffusion measurements to characterize membrane transport and solute binding*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 1997, **30**, 39-68
- 122 W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer, München, 2001, 841
- 123 K. Ohlsen, persönliche Mitteilung

Literaturverzeichnis

- 124 S. Braun, H. O. Kalinowski, S. Berger, *150 and more basic NMR experiments*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, 2. Auflage
- 125 R. Mills, *Self-diffusion in normal and heavy water in the range of 1 to 45 °C*, J. Phys. Chem., 1973, **77**, 685-688
- 126 H. Weingärtner, *Self diffusion in liquid water. A reassessment*, Z. Phys. Chem. (Neue Folge), 1982, **132**, 129-149
- 127 M. Holz, H. Weingärtner, *Calibration in accurate spin-echo self-diffusion measurements using ^1H and less-common nuclei*, J. Magn. Reson., 1991, **92**, 115-125
- 128 H. Nikaido, D. G. Thanassi, *Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples*, Antimicrob. Agents Chemother., 1993, **37**, 1393-1399
- 129 L. J. V. Piddock, M. M. Johnson, *Accumulation of 10 fluoroquinolones by wild-type or efflux mutant *Streptococcus pneumoniae**, Antimicrob. Agents Chemother., 2002, **46**, 813-820
- 130 C. McCaffrey, A. Bertasso, J. Pace., N. H. Georgopapadakou, *Quinolone accumulation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus**, Antimicrob. Agents Chemother., 1992, **36**, 1601-1605

Cyclodextrin-Komplexe

- 131 F. Cramer, W. Dietsche, *Spaltung von Racematen mit Cyclodextrinen*, Chem. Berichte, 1959, **308**, 378-384
- 132 K. A. Connors, *The stability of cyclodextrin complexes in solution*, Chem. Rev., 1997, **97**, 1325-1357
- 133 H. J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda, *NMR Studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes*, Chem. Rev., 1998, **98**, 1755-1785
- 134 A. F. Casy, A. D. Mercer, *Application of cyclodextrins to chiral analysis by ^1H NMR spectroscopy*, Magn. Reson. Chem., 1988, **26**, 765-774
- 135 S. K. Branch, U. Holzgrabe, T. M. Jeffries, H. Mallwitz, F. J. R. Oxley, *Effect of β -cyclodextrin acetylation on the resolution of phenethylamines with capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance spectroscopy*, J. Chromatogr. A, 1997, **758**, 277-292
- 136 J. Li, K. C. Waldron, *Estimation of pH-independent binding constants of alanylphenylalanine and leucylphenylalanine stereoisomers with β -cyclodextrin in the presence of urea*, Electrophoresis, 1999, **20**, 171-179
- 137 S. Sabbah, G. K. E. Scriba, *Influence of the structure of cyclodextrins and amino acid sequence of dipeptides and tripeptides on the pH-dependent reversal of the migration order in capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A, 2000, **894**, 267-272
- 138 Y. Matsui, S. Tokunaga, *Internal reference compounds available for the determination of binding constants for cyclodextrin complexes by ^1H NMR spectrometry*, Bull. Chem. Soc. Jpn. 1996, **69**, 2477-2480
- 139 W. S. Price, *Water signal suppression in NMR spectroscopy*, Ann. Rep. NMR Spectr., 1999, **38**, 291-354
- 140 P. K. Glasoe, F. A. Long, *Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide*, J. Phys. Chem., 1960, **64**, 188-190
- 141 A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson, R. G. Bates, *Use of glass electrode in deuterium oxide and the relation between the standardized pD (p_{aD}) scale and the operational pH in heavy water*, Anal. Chem., 1968, **40**, 700-706
- 142 F. G. K. Baucke, *Further insight the dissociation mechanism of glass electrodes. The response in heavy water*, J. Phys. Chem. B, 1998, **102**, 4835-4841

7 Abkürzungen und Symbole

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	ggf. deutsche Übersetzung oder Anmerkungen
A/D	Analog-digital	A/D-Wandler
API	active pharmaceutical ingredients	künftige Bezeichnung für Arzneistoffe
AQ	Acquisition time	Akquisitionszeit, Aufnahmezeit des FID
B ₀ -Feld	das statische, permanente Magnetfeld	
B ₁ -Feld	das zusätzliche Magnetfeld, durch die RF-Impulse erzeugt	
CCQM	Comité Consultatif pour la Quantité de Matière	Beratendes Komitee für die Stoffmenge
CE	Capillary electrophoresis	Kapillarelektrophorese
CICS	Complexation induced chemical shifts	Durch Komplexbildung verursachte Verschiebung der chemischen Verschiebung
CIPM	Comité International des Poids et Mesures	Internationales Komitee für Maß und Gewicht
COSY	Correlation spectroscopy	Korrelationen zwischen zwei ¹ H über eine Bindung
CRS	chemische Referenzsubstanz	
CW	continuous wave	Messmethode, bei der kontinuierlich auf die Probe eingestrahlt wird, im Gegensatz zum Impuls-Verfahren
d	Dublett	
DAB	Deutsches Arzneibuch	
DC	Dünnschichtchromatographie	
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy	
DW	dwel time	„Verweilzeit“, Abstand zweier Datenpunkte bei der Aufnahme des FID
EuAB	Europäisches Arzneibuch	
FID	Free induction decay	Freier Induktionsabfall
(F)FT	(Fast) Fourier transformation	(Schnelle) Fouriertransformation
GC	Gaschromatographie	
GLP	Good laboratory praxis	
HPLC	High-performance liquid chromatography	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Messung von Korrelationen zwischen ¹ H und ¹³ C über mehrere Bindungen

Abkürzungen und Symbole

HMQC	H eteronuclear m ultiple q uantum c oherence	Messung von Korrelationen zwischen ^1H und ^{13}C über eine Bindung
ICH	I nternational C onference on H armonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use	
IR	I nfrarot	
IUPAC	I nternational u nit of p ure and a ppplied chemistry	
LED	longitudinal e ddy current d elay	Effekt, der u. a. bei der Bestimmung von Diffusionskoeffizienten relevant ist
LOD	L imit o f D etection	Nachweisgrenze
LOQ	L imit o f Q uantification	Bestimmungsgrenze
m	Multiplett	
MEKC	M izellare e lektrokinetische C hromatographie	
MS	M assenspektroskopie	
NMR	N uclear m agnetic resonance	magnetische Kernresonanz(spektroskopie)
NOE	N uclear o verhauser e ffect	Kern-Overhauser-Effekt
NOESY	N uclear o verhauser e ffect s pectroscopy	Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie
PRP	p ulse r epetion p eriod	Abstand zweier Wiederholmessungen (Zeit zwischen dem jeweils ersten Impuls einer Sequenz)
q	Quartett	
qNMR	q uantitative N uclear M agnetic R esonance	quantitative magnetische Kernresonanz(spektroskopie)
quin	Quintett	
RF	radio frequency	Radiofrequenz
ROESY	R otating frame nuclear o verhauser e ffect s pectroscopy	
s	Singulett	
S/N	signal-to-noise	Signal-Rausch-Verhältnis
selTOCSY	s elective t otal c orrelation s pectroscopy	1D-Variante von TOCSY
SI	s ize	Anzahl der Datenpunkte im Realteil des prozessierten Spektrums
STE	s timulated e cho	
SW	s pectral w idth	spektrale Bandbreite
t	Triplet	
TMS	T etramethylsilan	
TOCSY	T otal c orrelation s pectroscopy	2D-Messmethode, die das gesamte Spinsystem als Kreuzsignale wiedergibt

Abkürzungen und Symbole

TSP	3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonäure-Natrium	Wasserlösliche 0,00-ppm-Referenzsubstanz
UV	Ultraviolett(spektroskopie)	
PFPG	pulsed field gradients	gepulste Feldgradienten

7.2 Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung	Einheit
μ	magnetisches Moment	rad T ⁻¹ J
B	magnetische Flussdichte (=magnetische Induktion)	Tesla, T
B _{1/2}	Halbwertsbreite eines Signals	Hz
δ	chemische Verschiebung	Ppm
D	Diffusionskoeffizient	m ² /s
δ	Impulsdauer des Gradienten bei Diffusionsexperimenten	μ s
Δ	Abstand zwischen den zwei Gradienten bei Diffusionsexperimenten	Ms
γ	gyromagnetisches Verhältnis	rad T ⁻¹ s ⁻¹
h	Plancksches Wirkungsquantum (6,6256*10 ⁻³⁴ Js)	Js
\hbar	$\hbar = h/2\pi$	Js
H	magnetische Feldstärke	Gauß, G
I	Kernspinquantenzahl	
I	Intensität von NMR-Signalen	
J	Kopplungskonstante	Hz
M	Magnetisierungsvektor (ggf. in x-, y- oder z-Richtung)	
M	Molarität	
v	Frequenz	Hz
P	Kernimpuls	Js
τ	Impulslänge	μ s
T ₁	Spin-Gitter-Relaxationszeit (=longitudinale Relaxationszeit)	s ⁻¹
T ₂	Spin-Spin-Relaxationszeit (=transversale Relaxationszeit)	s ⁻¹
T ₂ [*]	beobachtete T ₂ -Zeit	s ⁻¹
T	absolute Temperatur	K
τ_c	Korrelationszeit	μ s

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ralph Heinz Deubner
Geburtsdatum	27. Oktober 1974
Geburtsort	Coburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Bildungsweg

09/1981 bis 07/1985	Grundschule Untermerzbach
09/1985 bis 07/1994	Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1994 bis 03/1995	Studium der Mathematik (Diplom) mit Nebenfach Informatik an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
04/1995 bis 10/1999	Studium der Pharmazie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
11/1999 bis 04/2000	Pharmaziepraktikum in der Mathilden-Apotheke Würzburg
05/2000 bis 10/2000	Pharmaziepraktikum an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrave
12/2000	Approbation als Apotheker
05/2000 bis 01/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für pharmazeutische Chemie der Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrave