



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Kapillarelektrophoretische Trennung chiraler
Aminoalkohole“

Verfasser

Josef Stefan Schweiger

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof., Dr. rer.nat., Mag. Pharm. Ernst Urban

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof., Dr. rer. nat., Mag. pharm. Ernst Urban für die Betreuung dieser Arbeit und die Aufnahme von NMR – Spektren bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Martin Kratzel für die Aufnahme von NMR – Spektren, sowie die Hilfe bei der Interpretation derselben, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Bodo Lachmann für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, die Betreuung während der praktischen Arbeit und des Schreibens, sowie für die Hilfe bei Problemen, die sich Dank seines großen Wissens um einiges leichter lösen ließen. Auch für die Aufnahme des Massenspektrums möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Nicht unerwähnt lassen möchte ich die Mithilfe von Herrn Dipl. Chem. Martin Walter, der mir die Substanzen zur Verfügung stellte und mir in analytischen und chemischen Fragen mit Ratschlägen sehr behilflich war. Dafür ein sehr herzliches Dankeschön.

Herrn Dr. Simon Eppacher möchte ich für den Rat in chemischen Fragen ebenfalls sehr herzlich danken.

Auch meinem Studien- und Laborkollegen Herrn Bernhard Reich möchte ich für die tolle Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima während des praktischen Arbeitens danken.

Ein abschließender Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Allgemeiner Teil	5
1.1 Allgemeine Einführung in die Kapillarelektrophorese	5
1.1.1 Aufbau und Trennprinzip einer Kapillarelektrophorese am Beispiel der Kapillaronenelektrophorese	5
1.1.2 Geschichtlicher Überblick und Arten der Kapillarelektrophorese	8
1.2 Überblick und Verwendung von Cyclodextrinen in chiralen Kapillarelektrophoresemethoden	9
1.2.1 Aufbau der Cyclodextrine	9
1.2.2 Verwendung der Cyclodextrine zur Trennung von chiralen Substanzen	11
1.3 Allgemeiner Überblick über die Aminoalkohole	12
1.3.1 Die in der Diplomarbeit behandelten Aminoalkohole und deren Vorkommen in Arzneistoffen	12
1.4 Nebivolol	13
1.4.1 Stereoisomere von Nebivolol	13
1.4.2 Wirkungen der Stereoisomere von Nebivolol	14
2 Spezieller Teil	15
2.1 Aminoalkohole	15
2.1.1 Einleitung	15
2.1.2 Die Substanz MW 143	18
2.1.3 Die Substanz MW 139	34
2.1.4 Die Substanz MW 141	51
2.1.5 Die Substanz MW 140	69
2.1.6 Die Substanzen MW 178 und MW 35	89
2.2 Nebivolol	89
2.2.1 Herkunft und Extraktion von Nebivolol	89
2.2.2 Vorversuche zur Trennung der beiden Enantiomere	90
2.2.3 Am besten geeignete Methode	95
3 Experimenteller Teil	96
3.1 Puffer und Extraktionen und Stammlösungen	96
3.1.1 Puffer	96
3.1.2 Stammlösungen	100
3.1.3 Extraktionen	101
3.1.4 Mischungen	101
3.2 Verwendete Materialien	102
3.3 Verwendete Geräte	102
4 Zusammenfassung	103
5 Abstract	104
6 Anhang	105
6.1 Berechnungen	105
6.2 Massenspektrum von Nebivolol	106
6.3 Literaturangaben	107

1 Allgemeiner Teil

1.1 Allgemeine Einführung in die Kapillarelektrophorese

1.1.1 Aufbau und Trennprinzip einer Kapillarelektrophorese am Beispiel der Kapillarzonenelektrophorese

Der Aufbau einer Kapillarelektrophorese ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. Die Trennung erfolgt in einer Kapillare, die an jedem Ende in ein mit Puffer gefülltes Gefäß eintaucht. Um eine Trennung durchführen zu können, muss die Kapillare bereits mit Puffer gefüllt sein. Darum wird jedem Trennvorgang ein Spülschritt mit Puffer vorgeschaltet. Die Kapillare besteht meist aus amorphem Siliziumdioxid (Quarz), welches zum Schutz vor mechanischer Belastung außen meist mit einer Polyimidschicht überzogen ist. Die Länge der Kapillare kann bei einem Durchmesser von 25 bis 100 Mikrometer zwischen 20 und 100 Zentimeter variieren. Damit sich der Puffer in der Kapillare nicht zu sehr erhitzt, während man für den Trennvorgang Spannung anlegt, ist ein Kühlsystem notwendig. Das Kühlsystem, welches aus einer geeigneten Flüssigkeit oder Luft bestehen kann, umgibt die Kapillare in einem geschlossenen System.

Die Spannung entstammt einer Hochspannungsquelle, die mittels zweier Platinelektroden, welche in die Puffergefäße eintauchen, mit dem Puffer verbunden ist. Moderne Geräte können eine Spannung von bis zu 30 kV anlegen. Da ein Puffersystem die Fähigkeit besitzt Strom zu leiten, entsteht in der Kapillare ein Stromfluss. Wird nun Spannung angelegt wandern positiv geladene Teilchen zur Kathode und negativ geladene Teilchen zur Anode

und zwar mit unterschiedlicher Geschwindigkeit je nach Molekülgröße und Stärke ihrer Ladung. Ein zusätzliches Phänomen, das für die Wanderung der Moleküle von großer Bedeutung ist, ist der elektroosmotische Fluss, der durch die dissoziierten und damit negativ geladenen Silanolgruppen der Siliziumdioxidwand entsteht. An diese negativ geladenen Gruppen lagern sich Kationen an, die die so genannte Sternschicht bilden. Je näher sich die Kationen an der Kapillarwand befinden, desto starrer ist diese Anlagerung. Es bildet sich eine starre Grenzschicht, in der sich durch die Ladungsverteilung ein elektrisches Potential aufbaut. Neben dieser starren Grenzschicht befindet sich zur Kapillarmitte hin eine diffuse Grenzschicht aus Elektrolyten, in der das elektrische Potential sehr stark abnimmt. Diese Abnahme ist für die Elektroosmose verantwortlich und bewirkt einen Fluss des Puffers zur Kathode hin. [20. Jimidar] Da dieser Fluss abhängig davon ist, wie viele Silanolgruppen dissoziieren, ändert er sich mit dem pH – Wert. Bei hohen pH – Werten ist er so stark, dass er der geschwindigkeitsbestimmende Faktor ist, während er bei einem niedrigen pH - Wert eine untergeordnete Rolle spielt.

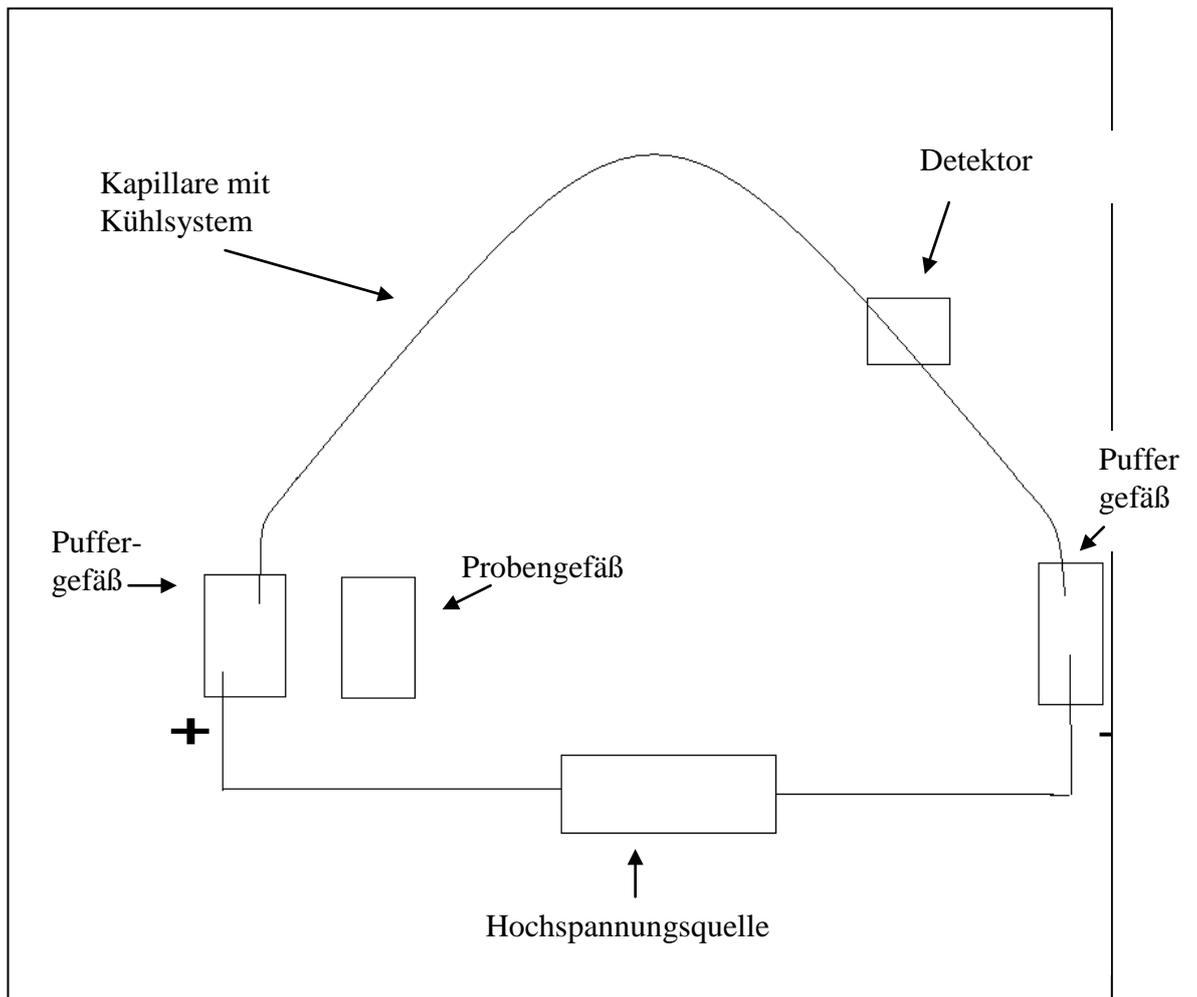
Die Injektion der Probe erfolgt zumeist aus einem Probengefäß an der Anodenseite bevor die Trennung gestartet wird. Hierzu wird die mit Puffer gefüllte Kapillare in das Probengefäß getaucht und die Injektion wird durchgeführt. Es werden nur 10 - 20 Nanoliter injiziert, wobei unterschiedliche Injektionsarten verwendet werden können. [21. Tagliaro] Am häufigsten wird mit Druck injiziert; es kann jedoch auch mittels Vakuum oder Spannung injiziert werden. Die Dauer der Injektion beträgt meist 3 – 10 Sekunden und ist abhängig davon, ob man versucht eher bessere Trennergebnisse (niedrige Injektionsdauer) oder eine höhere Gleichmäßigkeit der Peakflächen (hohe Injektionsdauer) zu erreichen. Nach der Injektion wird die Kapillare wieder in das Puffergefäß eingetaucht.

Hierauf wird die Trennung gestartet und die Moleküle bewegen sich in Richtung Kathode. Dabei passieren sie das so genannte Detektorfenster, in dem die Quarzkapillare, ohne von einer Polyimidschicht oder der Kühlflüssigkeit umgeben zu sein, direkt an ein Glasfaserkabel des jeweiligen Detektors anliegt. Hier werden die Substanzen detektiert und die gewonnenen Informationen an ein Gerät zur Auswertung dieser Daten –

heute meist ein Computer – weitergeleitet. Die Migrationszeit die auf dem Elektropherogramm sichtbar wird bezieht sich demnach nur auf die Zeit vom Start bis zum Detektorfenster, weshalb bei einer verwendeten Kapillare in der Regel sowohl die Gesamtlänge als auch die Länge bis zum Detektorfenster angegeben wird. Die Gesamtlänge ist insofern von Bedeutung, als das der elektrische Widerstand mit der Länge der Kapillare zunimmt und somit Auswirkungen auf den Stromfluss hat.

Abbildung 1.1

Aufbau einer Kapillarelektrophorese



1.1.2 Geschichtlicher Überblick und Arten der Kapillarelektrophorese

Die Basis zur Entwicklung der Kapillarelektrophorese wurde von Kohlrausch gelegt. Er beschrieb die unterschiedliche Migration der Teilchen in einem geladenen elektrischen Feld und die hierzu notwendigen physikalischen Grundlagen. [3.Engelhard] Die erste Möglichkeit zur Anwendung dieses Phänomens wurde von Tiselius entdeckt, der die Unterschiede von geladenen Teilchen im Wanderungsverhalten nutzte um diese in einer Gelelektrophorese aufzutrennen. [3.Engelhard] Der Erste, der diese Technik in einer Säule verwendete war Hjerten, der die Trennung der Substanzen in einer offenen Glasröhre vollzog. [4.Hjerten] Diese Technik wurde im Laufe der Zeit durch Verwendung von unterschiedlichen Kapillaren, Beschichtungen und Trenntechniken so weit verbessert, dass heute die Kapillarelektrophorese ein fixer Bestandteil der modernen Analytik ist. So können heute durch unterschiedliche Arten der Anwendung sowohl einzelne Ionen als auch ungeladene Teilchen und Makromoleküle wie DNS - Moleküle getrennt werden. Speziell in Hinblick Makromoleküle ist hier die Kapillargelelektrophorese (CGE) zu nennen. Hierbei handelt es sich um eine mit Gel gefüllte Kapillare, in der sich die Makromoleküle je nach Größe und Ladung unterschiedlich schnell bewegen. Eine weitere Möglichkeit ist die isoelektrische Fokussierung (IEF), bei der die Trennung mittels pH Gradienten erfolgt. Die Elektrophorese bedient sich – ähnlich der HPLC – Kapillaren mit stationären Phasen, in welchen die Moleküle durch den elektroosmotischen Fluss (EOF), der eine durch Elektroosmose hervorgerufene Bewegung des Puffers zur Kathode ist, bewegt werden. In der Isotachophorese (ITP) bewegen sich alle Zonen mit der gleichen Geschwindigkeit und sind nicht, wie in den meisten anderen Verfahren, durch Elektrolyte getrennt. Um nichtionische Stoffe trennen zu können, verwendet man meist die micellare elektrokinetische Chromatographie (MECK). Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, in dem mit Hilfe von Detergenzien Mizellen gebildet werden, in denen sich die Stoffe unterschiedlich lange aufhalten und damit sich mit verschiedenen Geschwindigkeiten bewegen. Die Methode, die in dieser Diplomarbeit verwendet wurde, ist die

Kapillarzonenelektrophorese (CZE). [3. Engelhardt] Hierbei wird die Kapillare nur mit Puffer gefüllt. Da in unserem speziellen Fall eine Enantiomerentrennung erreicht werden sollte, wurden diesem Puffer zusätzlich noch Cyclodextrine beigefügt. Die Cyclodextrine werden im folgenden Kapitel 1.2 noch ausführlicher behandelt.

1.2 Überblick und Verwendung von Cyclodextrinen in chiralen Kapillarelektrophoresemethoden

1.2.1 Aufbau der Cyclodextrine

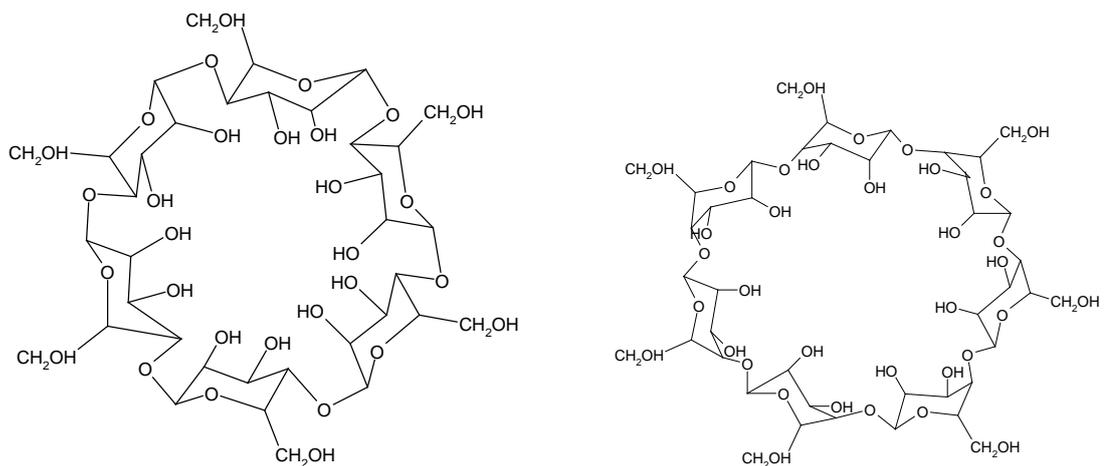
Cyclodextrine sind Oligosaccharide mit einer unterschiedlichen Anzahl an Glucosebausteinen, die ringförmig angeordnet und α - 1,4 verknüpft sind. Im dreidimensionalen Raum erscheinen sie als konischer Zylinder mit einem Hohlraum in der Mitte. Die Hydroxylgruppen sind so angeordnet, dass sich alle primären Hydroxylgruppen auf der einen und alle sekundären Hydroxylgruppen auf der anderen Seite befinden. Im industriellen Maßstab hergestellt und verwendet werden heute 3 Arten von Cyclodextrinen. [13 Fanali S] Es wurden auch größere Arten entdeckt; [6.French] allerdings sind diese Arten kaum in Verwendung. Die Cyclodextrine sind nach ihrer Anzahl an Glucosebausteinen eingeteilt, wobei von den drei am häufigsten verwendeten Gruppen das kleinste Cyclodextrin mit 6 Glucosebausteinen als Alpha - Cyclodextrin, das nächstgrößere mit 7 Glucosebausteinen als Beta - Cyclodextrin und das größte mit 8 Glucosebausteinen als Gamma - Cyclodextrin bezeichnet wird. Größere Cyclodextrine werden je nach Anzahl der Glucosebausteine mit den griechischen Buchstaben Delta, Epsilon und so weiter versehen. [7.S.Fanali] Der Durchmesser des Hohlraums variiert von 4,7-5,3 Ångström bei einem Alpha - Cyclodextrin bis 7,5-8,3 Ångström bei einem Gamma - Cyclodextrin. Dass der Durchmesser in einem Bereich angegeben ist, ergibt sich aus der Tatsache, dass der konische Zylinder an

einem Ende einen größeren Radius hat als am anderen. Die Höhe des Zylinders ist mit 7,9 Ångström - logischerweise unabhängig von der Anzahl der Glucosebausteine - konstant. [5.Szejtli]

Auf Grund der unterschiedlichen Grundfläche des Zylinders interagieren die unterschiedlichen Arten der Cyclodextrine unterschiedlich gut mit den jeweiligen Substanzen. Eine weitere Möglichkeit um die Palette an Substanzen zu erweitern, die mit Cyclodextrinen aufgetrennt werden können, ist eine Derivatisierung der unterschiedlichen Cyclodextrine. Ein weiterer Vorteil einer Derivatisierung besteht auch darin, dass man die derivatisierten Cyclodextrine auf Grund ihrer unterschiedlichen Löslichkeiten in verschiedensten Lösungsmitteln und Puffersystemen verwenden kann. Deshalb werden in der Praxis derivatisierte Cyclodextrine häufiger als die nicht derivatisierten Cyclodextrine verwendet. [14. Juvancz] So kann nicht nur die Selektivität erhöht werden, sondern auch Parameter wie die Wasserlöslichkeit und die Ladung zugunsten der Methode beeinflusst werden.

Abbildung 1.2

Auf der linken Seite ist ein Beta - Cyclodextrin und auf der rechten ein Gamma - Cyclodextrin abgebildet



1.2.2 Verwendung der Cyclodextrine zur Trennung von chiralen Substanzen

Im Gegensatz zur indirekten Trennung, die mittels einer Derivatisierung und Diastereomerenbildung erfolgt, gehört die Enantiomerentrennung mit Cyclodextrinen zu den direkten Trennmethoden. [12. Van Eackhaut A.] Die unterschiedliche Migrationsgeschwindigkeit beruht auf der Bildung eines Komplexes der Analyten mit den Cyclodextrinen. Dieser Komplex wandert wegen der neutralen Cyclodextrine deutlich langsamer. Hat man Enantiomere so wird im Idealfall eines der beiden eine höhere Affinität zum Cyclodextrin aufweisen. Wenn der Unterschied in der Affinität hoch genug ist, wird, bedingt durch die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten, eine Trennung erfolgen. [3.Engelhardt] Um das richtige Cyclodextrin für eine Enantiomerenmischung zu wählen, sind sehr oft viele Versuche notwendig. Eine Methode, die immer häufiger verwendet wird, ist auch die Mischung zweier unterschiedlicher Cyclodextrine in einem Chromatographischen System. So kommt es zur Ausbildung unterschiedlicher Komplexe mit verschieden hoher Stabilität, was die Trennung zusätzlich verbessern kann. Aber nicht nur die Art sondern auch die Konzentration des Cyclodextrins sind von entscheidender Bedeutung, da einerseits bei einer Erhöhung derselben eine Verlängerung der Analysezeit eintritt. Andererseits kann eine zu hohe ebenso wie eine zu niedrige Cyclodextrinkonzentration die Trennung der Peaks negativ beeinflussen. [3.Engelhardt] Des Weiteren sind die Trennergebnisse nicht nur von der richtigen Wahl des Cyclodextrins beziehungsweise dessen Konzentration abhängig. So spielt auch der Zusammensetzung des Puffers, dessen Konzentration, der pH - Wert und die Temperatur der Kapillare, die Einfluss auf die Viskosität des Puffers hat, eine entscheidende Rolle. [7.S.Fanali]

1.3 Allgemeiner Überblick über die Aminoalkohole

1.3.1 Die in der Diplomarbeit behandelten Aminoalkohole und deren Bedeutung als Synthesebausteine

Die in der Diplomarbeit behandelten Aminoalkohole sind im Kapitel 2.1 in den Tabellen 1.1 und 1.2 aufgelistet. Diese Aminoalkohole werden zwar nicht als Arzneistoffe eingesetzt, kommen aber als „chiral tool“ Bausteine in verschiedenen Arzneistoffen vor. Da bei den meisten Arzneistoffen nur eine stereochemische Form des Aminoalkohols zugelassen ist, werden im speziellen Teil Methoden vorgestellt um die Reinheit des benötigten Enantiomers zu bestimmen. Der erste Aminoalkohol ist das 3-Piperidinol. Diese Verbindung ist unter anderem ein Strukturelement des Benidipines. Dies ist ein Kalzium - Kanal - Blocker der bei Bluthochdruck eingesetzt wird. [8. Yao] Derzeit ist das Benidipine nur im Süd - Ost asiatischen Raum auf dem Markt [22. ABDA]. Des Weiteren wurde auch das 1-Methyl-3-piperidinol analysiert. Dieses findet sich unter anderem in den laut ABDA nicht mehr vertriebenen Mepenzolats, welches zur Behandlung von Magen - Darm Geschwüren und Spasmen des Magen - Darm Traktes verwendet wurde. [9. Bruchhausen] Ein weiterer Stoff dieser Wirkstoffgruppe, der diesen Aminoalkohol enthält, aber noch im Handel ist, ist das Pipenzolat. Die dritte untersuchte Substanz ist das 1-Methyl-3-pyrrolidinol. Diese ist unter anderem in der als retardierte Arzneiform im Handel befindliche Barnidipin, welches ein vasoselektiver Kalzium - Antagonist ist, enthalten. Ein weiterer Arzneistoff, der diesen Aminoalkohol enthält ist der muskarinische Rezeptorantagonist Glykopyrroniumbromid. Der vierte verwendete Aminoalkohol ist das 1-Azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol, welches zum Beispiel im Solifenacin, einem weiteren muskarinischen Rezeptorantagonist [10. Abrams] verwendet wird. Ein weiterer muskarinischer Rezeptorantagonist, der eine 1-Azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol Teilstruktur enthält, ist das Acridinium bromid. [11. Alagha]

1.4 Nebivolol

1.4.1 Stereoisomere von Nebivolol

Nebivolol ist ein Stoff mit 4 chiralen Kohlenstoffatomen. Hieraus ergibt sich eine rechnerische Anzahl von 16 Stereoisomeren, wobei es in der Realität 10 verschiedene Stereoisomere gibt. Der Unterschied zwischen der Anzahl der möglichen und der Anzahl der tatsächlich existierenden Stereoisomere ist durch die Symmetrieebene, die durch den Stickstoff verläuft, begründet. [15. Siebert] Diese Symmetrieebene bewirkt, dass nominell unterschiedliche Konfigurationen gleiche Moleküle ergeben. Weiters gibt es auch 2 so genannte Mesoverbindungen; das sind Verbindungen, die kein Spiegelbild besitzen, da ihre Spiegelung wieder die Ausgangskonfiguration ergibt. [16. Siebert] Das Produkt welches sich derzeit am Markt befindet, ist ein Racemat aus den Enantiomeren mit der Konfiguration „RSSS“ genannt L - Nebivolol (siehe Abbildung 1.3) und „SRRR“ genannt D - Nebivolol (siehe Abbildung 1.4). [17. Peeters]

Abbildung 1.3

L - Nebivolol

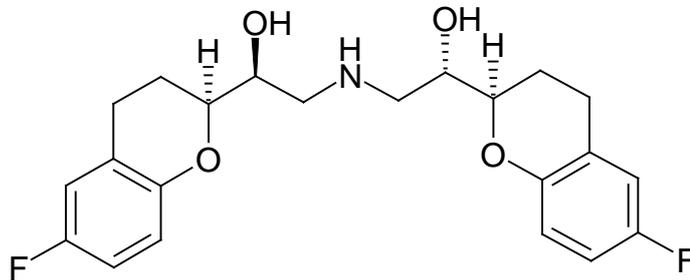
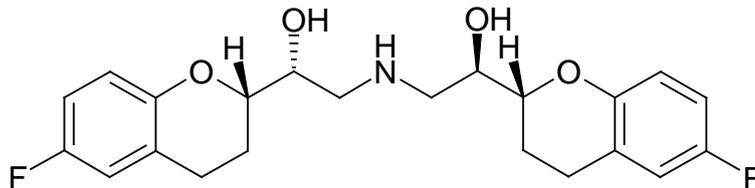


Abbildung 1.4

D - Nebivolol



1.4.2 Wirkungen der Stereoisomere von Nebivolol

Nebivolol ist ein β - Blocker der 3. Generation, der keinerlei Affinität zu einem α - Adrenozeptor aufweist. [18.Toblli] Des Weiteren besitzt Nebivolol auch eine vasodilatorische Wirkung und wird deshalb zur Vermeidung von kardiovaskulären Ereignissen bei Hypertonie eingesetzt. Der Grund für diesen synergistischen Effekt liegt darin, dass der Wirkstoff Nebivolol im Arzneimittel als Racemat vorliegt. Die Wirkmechanismen der einzelnen Enantiomere D - und L - Nebivolol sind unterschiedlich, bewirken jedoch zusammen den oben erwähnten Synergismus. Während das D - Nebivolol den β - Adrenozeptor blockiert, hat das L - Nebivolol einen vasodilatorischen Effekt, der wahrscheinlich mittels NO - Freisetzung erzielt wird. [19. Griffin]

2 Spezieller Teil

2.1 Aminoalkohole

2.1.1 Einleitung

2.1.1.1 Die untersuchten Aminoalkohole

Wie im Kapitel 1.3 bereits angeführt, sind Aminoalkohole als Ausgangsstoffe oder Zwischenprodukte in der Arzneistoffsynthese von Bedeutung. Meistens ist eine gewisse stereochemische Reinheit der Verbindung von Nöten. Aus diesem Grund werden im Anschluss kapillarelektrophoretische Trennmethode beschrieben, die eine Trennung der Enantiomere ermöglichen, um die prozentuelle Verunreinigung der Aminoalkohole durch das Diastomer nachweisen zu können. Die verwendeten Aminoalkohole sind in der Tabelle 1.1 am Ende des Kapitels aufgelistet. Um die jeweiligen Aminoalkohole im UV - Bereich detektieren zu können, wurden sie - von Herrn Martin Walter - mit einem Chromogen versehen. [2. Noe C, Walter M]. Herr Walter stellte unterschiedliche Derivate der Aminoalkohole her, um festzustellen, mit welchem Derivat eine möglichst optimale Trennung und Detektion möglich ist. Die Aminoalkohole wurden mit achiralen Aromaten substituiert. Um zu vermeiden, dass eines der beiden Enantiomere - wie es bei optisch aktiven Verbindungen der Fall sein kann - vermehrt mit dem Chromogen reagiert und so einen höheren Anteil in der UV - Detektion vortäuscht, wurden keine chiralen Chromogene verwendet. Die Liste der verwendeten Derivate befindet sich in der Tabelle 1.2.

Tabelle 1.1

Verwendete Aminoalkohole

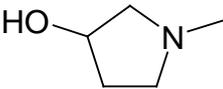
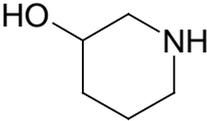
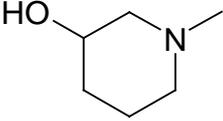
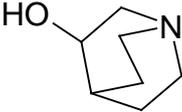
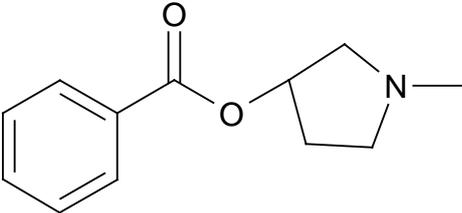
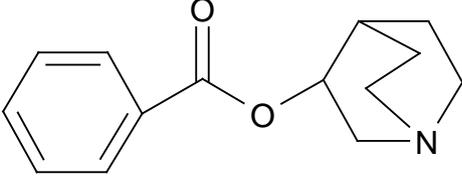
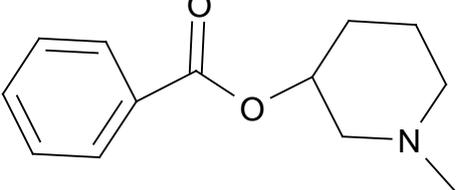
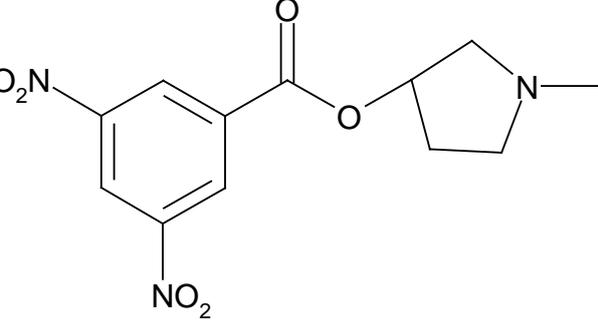
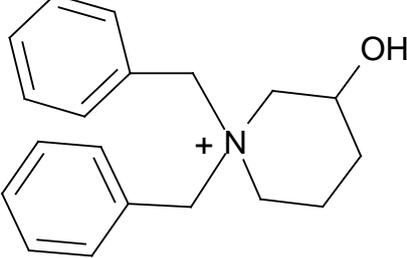
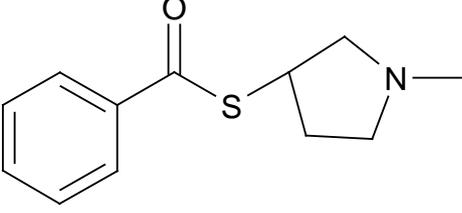
1-Methyl-3-pyrrolidinol Name der Substanzen mit Chromogen: MW35/Mw141/Mw178	
3 - Piperidinol Name der Substanz mit Chromogen: MW 143	
1-Methyl-3-piperidinol Name der Substanz mit Chromogen: MW139	
1-Azabicyclo[2.2.2]octan-3-ol Name der Substanz mit Chromogen: MW140	

Tabelle 1.2

Die verwendeten Aminoalkohole nach der Derivatisierung

MW 141	 <p>Chemical structure of N-methyl-1-(benzoyloxy)pyrrolidine. It consists of a benzoyl group (a benzene ring attached to a carbonyl group) linked via an oxygen atom to the 1-position of a pyrrolidine ring. The nitrogen atom of the pyrrolidine ring is substituted with a methyl group.</p>
MW 140	 <p>Chemical structure of N-methyl-1-(benzoyloxy)azabicyclo[2.2.1]heptane. It features a benzoyl group connected to the 1-position of an azabicyclo[2.2.1]heptane ring system. The nitrogen atom is substituted with a methyl group.</p>
MW 139	 <p>Chemical structure of N-methyl-1-(benzoyloxy)piperidine. It shows a benzoyl group attached to the 1-position of a piperidine ring. The nitrogen atom is substituted with a methyl group.</p>
MW 35	 <p>Chemical structure of N-methyl-1-(3,5-dinitrobenzoyloxy)pyrrolidine. It consists of a 3,5-dinitrobenzoyl group (a benzene ring with nitro groups at the 3 and 5 positions, attached to a carbonyl group) linked via an oxygen atom to the 1-position of a pyrrolidine ring. The nitrogen atom is substituted with a methyl group.</p>
MW 143	 <p>Chemical structure of N-methyl-1-(2-phenylethyl)pyrrolidine-2-ol. It shows a 2-phenylethyl group (a benzene ring attached to a two-carbon chain) and a hydroxyl group (-OH) attached to the 2-position of a pyrrolidine ring. The nitrogen atom is substituted with a methyl group.</p>
MW 178	 <p>Chemical structure of N-methyl-1-(benzoylsulfanyl)pyrrolidine. It features a benzoyl group (a benzene ring attached to a carbonyl group) linked via a sulfur atom to the 1-position of a pyrrolidine ring. The nitrogen atom is substituted with a methyl group.</p>

2.1.1.2 Das verwendete Gerät

Die Methode zur Trennung der Aminoalkohole wurde mit Hilfe der Kapillarelektrophorese entwickelt, da dies folgende Vorteile bietet:

- Die Enantiomerentrennung kann mit Hilfe von Cyclodextrinen und einer 50 cm langen Standardkapillare mit 50 Mikrometer Durchmesser erfolgen, die in unserem Fall wesentlich kostengünstiger sind als zum Beispiel eine Amylose beschichtete Säule, wie sie in der HPLC z. B. zur Enantiomerentrennung verwendet werden kann.
- Der Verbrauch an Laufmittel ist deutlich geringer als an der HPLC

2.1.2 Die Substanz MW 143

2.1.2.1 Herkunft der Substanz MW143

Die Enantiomere von 3-Piperidinol wurden von Herrn Martin Walter getrennt und für die Analytik dibenzyliert, wobei die R konfigurierte Verbindung rein ist und die S konfigurierten Probe mit 0,6 % des R–Enantiomers verunreinigt ist.. Dies kam dadurch zustande, dass die die in den Arzneistoffen verwendeten Aminoalkohole fast ausschließlich R konfiguriert sind R – konfigurierte Verbindung weiter zu Testsubstanzen umgesetzt werde sollte. [2. Noe C, Walter M]

2.1.2.2 Methodenentwicklung zur Enantiomerentrennung

2.1.2.2.1 Zu diesem Thema bereits von Herrn Walter durchgeführte Versuche

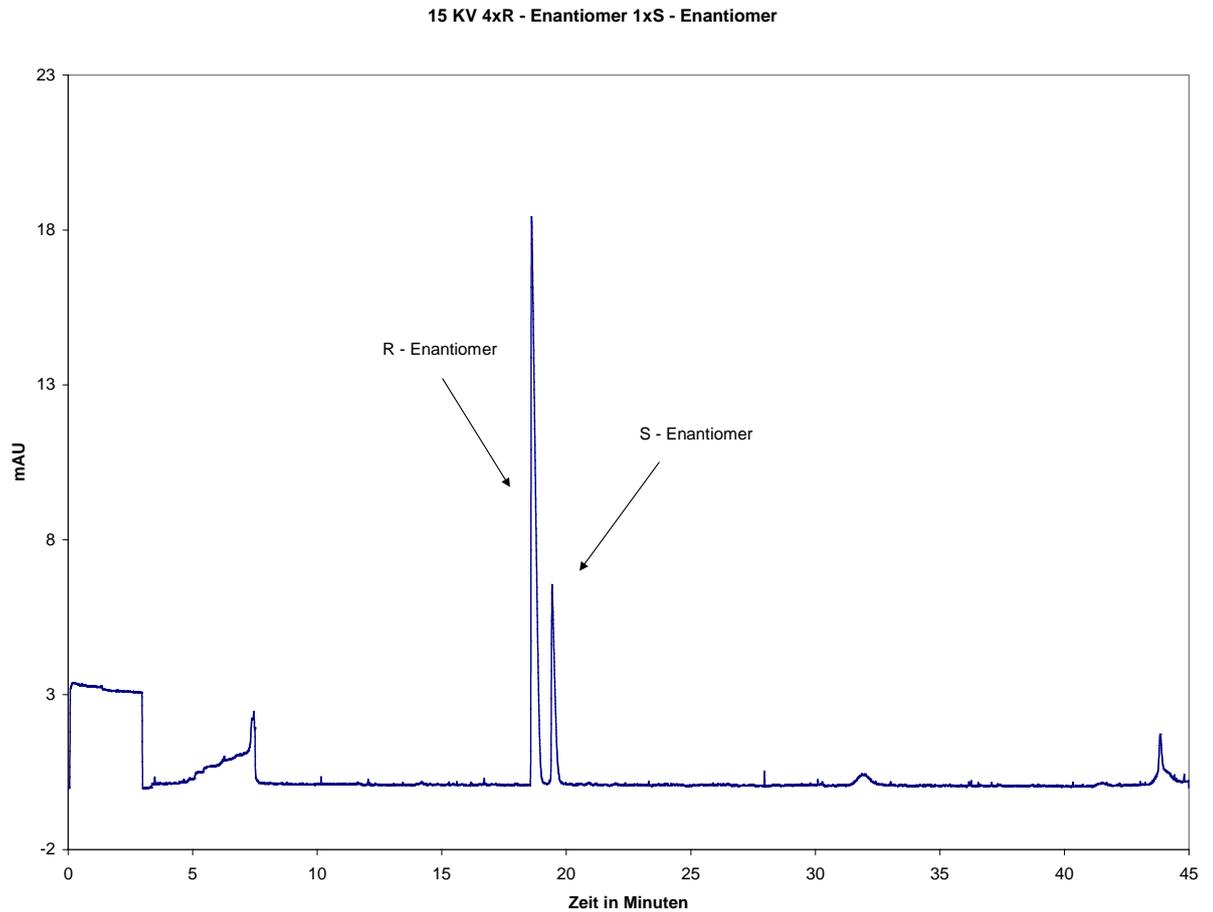
Um die Enantiomere der Substanz MW143 auf der Kapillarelektrophorese trennen zu können, verwendete Herr Walter Carboxymethyl - β - Cyclodextrine in einer Konzentration von 2,0 beziehungsweise 3,3 Mol pro Liter. Der verwendete Puffer war ein 100 mM (mM) TRIS/Phosphat - Puffer, der auf den pH - Wert von 3,5 eingestellt wurde. [2. Noe C, Walter M]

2.1.2.2.2 Versuche zur Verbesserung der Enantiomerentrennung mittels Variation der Cyclodextrin Konzentration

Die Trennung der Substanz MW 143 wurde mit den bereits erprobten Bedingungen - also 100mM TRIS/Phosphat - Puffer mit pH 3,5 und 3.3 beziehungsweise 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrine - getestet. Die Trennung erfolgte mittels konstanter Spannung, wobei die ersten Versuche mit 15 kV gemacht wurden. Bei den Proben handelt es sich um eine Mischung aus 80 % R - Enantiomer und 20 % S - Enantiomer, die mit 100 mM TRIS/Phosphat - Puffer pH 3,5 zu einer Endkonzentration von 50mg/100ml gelöst wurden. Es zeigte sich bei der Verwendung 3.3mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrine eine sehr gute Trennleistung mit passablen Migrationszeiten (siehe Elektropherogramm 2.1). Bei einer 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin Konzentration kam es zu einer ausreichenden - wenn auch nicht symmetrischen - Basislinientrennung der Peaks. Daher wurde versucht, die Trennung mit 5,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin zu verbessern, was jedoch nicht gelang. Die Migrationszeiten sind in der Tabelle 2.1, die sich am Ende des folgenden Kapitels befindet, angeführt. Da die Konzentration mit 3.3 mM ohnehin befriedigende Trennergebnisse erbrachte, wurde nun versucht die Migrationszeit zu verkürzen.

Elektropherogramm 2.1

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 15 kV Spannung. Die Enantiomere wurden im Verhältnis 4xR zu 1xS eingesetzt. Die Temperatur betrug 16 °C.



2.1.2.2.3 Versuche zur Verbesserung der Migrationszeiten mittels Variation der Spannung

Um die Migrationszeiten zu verkürzen, wurden alle 3 Cyclodextrinkonzentrationen mit einer Spannung von 20 kV getestet. Die Migrationszeiten, die in der Tabelle 2.1, die sich mit den anderen Tabellen am Ende dieses Kapitels befindet, aufgelistet sind, sanken erwartungsgemäß. Die Trennung der beiden Enantiomere war fast so deutlich wie bei 15 Kilovolt (kV). So kann man auch den Abstand zwischen den Peaks noch als ausreichend bezeichnen. Das Problem war, dass,

obwohl die rechnerische Auflösung der Peaks höher war, der erste Peak ungewöhnlich breit wurde (siehe Elektropherogramm 2.2). Dies hatte zur Folge, dass die Trennung unvollständiger wirkte. Die Auflösungen werden sowie die Breite in der Tabelle 2.2.1 angegeben; die Formel zur Berechnung der Auflösung sieht man unter Formel 2.1 [1. Dr. Oliver J. Schmitz], die sich wie die Tabelle 2.2 am Ende des Kapitels befindet. Diese Formel wurde aus einem bestimmten Grund der in dem Arzneibuch angeführten Formel $R_s = 1,18 * (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{h1} + W_{h2})$ vorgezogen. Da in dieser Formel die Breite an der Peak - Hälfte gemessen wird, kann das Ergebnis eine gute Trennung vortäuschen, wenn die Peaks ein Tailing beziehungsweise ein Leading, das sind Peakformen, die an der Basis asymmetrisch sind, aufweisen. Da dies bei den später angeführten Aminoalkoholen der Fall ist und die Berechnung mit einer einheitlichen Formel durchgeführt werden sollte, wurde die unter „Formel 2.1“ angeführte Formel vorgezogen, weil man hier die Breite an der Basislinie verwendet. Auch hier gibt es natürlich Unterschiede zwischen den einzelnen Cyclodextrinkonzentrationen, wobei sich die Auflösung analog mit jener bei 15 kV verhält. So zeigte die 2.0 mM Cyclodextrinkonzentration, eine etwas schlechtere Trennung als jene bei 5.0 und 3.3 mM. Anhand der in der Tabelle 2.1 gezeigten Migrationszeiten kann man den Einfluss der Cyclodextrinkonzentration auf die Migrationszeit erkennen.

Elektropherogramm 2.2

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere wurden im Verhältnis 4xR zu 1xS angeordnet eingesetzt. Die Temperatur betrug 16 °C.

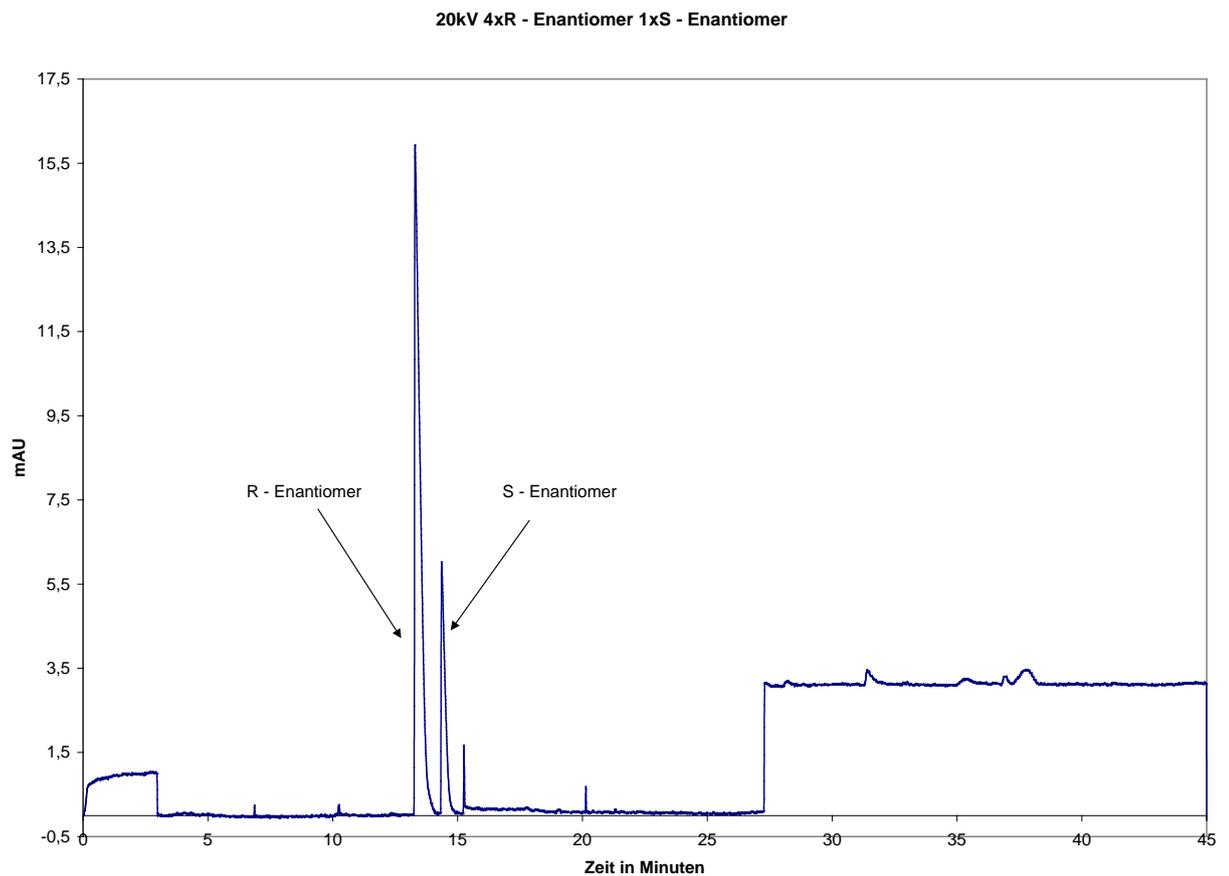


Tabelle 2.1

Migrationszeiten (min) bei unterschiedlicher Spannung

	R - Enantiomer	S - Enantiomer
15 kV 3,3 mM	18,61	19,43
20 kV 2,0 mM	11,14	11,63
20 kV 3,3 mM	13,30	14,36
20 kV 5.0 mM	13,55	14,85

Formel 2.1

Berechnung der Auflösung

$$R = \frac{2 * (t_1 - t_2)}{W_1 + W_2}$$

R... Auflösung

t... Migrationszeit der jeweiligen Substanz

W... Peakbreite der jeweiligen Substanz

Tabelle 2.2.1

Auflösung unter Verwendung 100 mM TRIS Puffer

	Breite 2	Breite 1	Migration2	Migration1	Auflösung
3,3 mM 15 kV	0,63	0,64	18,61	19,43	1,29
2,0 mM 20 kV	0,46	0,35	11,14	11,63	1,21
3,3 mM 20 kV	0,84	0,46	13,30	14,36	1,63
5,0 mM 20 kV	0,92	0,68	13,55	14,85	1,63

2.1.2.2.4 Versuche zur Verbesserung der Methode mittels Variation der Pufferkonzentration

Um die Trennung und die Form der Peaks verbessern zu können, wurde versucht die Probe mit 75 mM TRIS/Phosphat - Puffer mit einem pH - Wert von 3,5 zu trennen. Es wurden - der Vollständigkeit halber - wieder alle 3 Cyclodextrinkonzentrationen, mit welchen bereits in den vorigen Kapiteln gearbeitet wurde getestet. Die Trennung mit der 2 mM Cyclodextrinkonzentration war allerdings unvollständig. Die Versuche mit 5 beziehungsweise 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration lieferten gewohnt gute Trennungen. Wie in der Tabelle 2.2.2 am Ende dieses Kapitels zu sehen ist, ist auch die Auflösung mit den Werten im vorangegangenen Kapitel vergleichbar. Der Index Rep 1 und Rep 2 steht für die jeweilige Wiederholung der Trennung.

Tabelle 2.2.2

Auflösung bei 75 mM TRIS Puffer

	Breite 2	Breite 1	Migration2	Migration1	Auflösung
3,3 mM 15 kV Rep 1	0,70	0,74	10,68	11,50	1,14
3,3 mM 15 kV Rep 2	0,82	0,43	10,68	11,51	1,33
5,0 mM 15 kV Rep1	0,85	0,51	11,03	12,00	1,43
5,0 mM 15 kV Rep2	0,75	0,43	10,99	11,95	1,63

2.1.2.3 Die Parameter der endgültigen Methode

Die Methode, die für die weiteren Kalibrierungsschritte herangezogen wurde, sieht nun folgendermaßen aus. Als Puffer wird ein 100 mM TRIS - Puffer verwendet, der mit Phosphorsäure auf den pH 3,5 eingestellt wird und in dem sich eine Carboxymethyl - β - Cyclodextrinkonzentration von 3,3 mM befindet. Die Spannung beträgt 15 kV. Detektiert wurde mit einer Wellenlänge von 214 nm. Es wurde eine Kapillare mit einer Gesamtlänge von 60 cm (50 cm bis zu Detektor) verwendet. Die Injektionsdauer betrug 5 Sekunden und wird mit einem Druck von 0,5 psi - das sind 3,45 Kilopascal - injiziert. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit beträgt wie die Temperatur des Umgebungsraums des Puffers 16 Grad Celsius. Nach 3 Minuten wird ein Autozero durchgeführt. Die Gesamtlaufzeit beträgt 20 Minuten. Der Methode werden 2 Spülschritte vorangestellt. Zuerst wird mit 0.1 normaler Natronlauge eine halbe Minute und anschließend mit dem Puffer zwei Minuten lang gespült.

2.1.2.4 Erstellen einer Kalibrationsgerade

Um eine Kalibrationsgerade erstellen zu können, wurden Mischungen der beiden Enantiomere hergestellt, wobei zu beachten ist, dass das S Enantiomer mit zirka 0.6 % R Enantiomer verunreinigt ist. Die einzelnen Mischungen, deren Name ihrem prozentuellen Gehalt an R Enantiomer

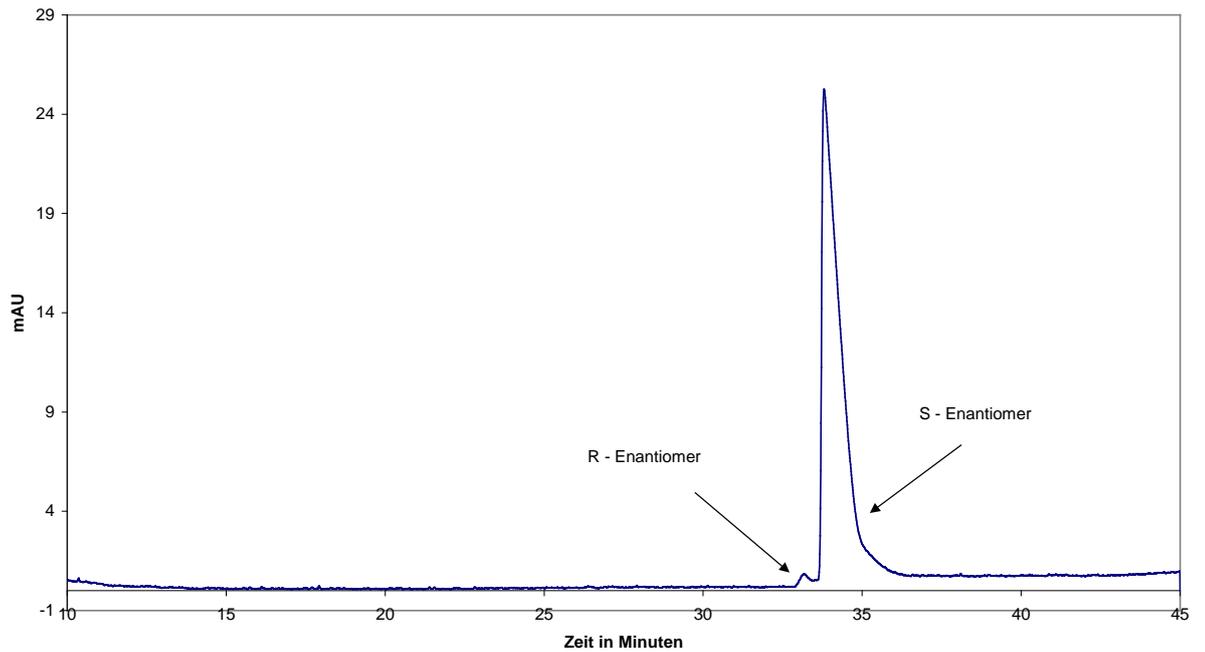
entsprechen, sind in der Tabelle 2.3 am Ende dieses Kapitels angegeben. Sämtliche Mischungen – auch jene für die Richtigkeit und Wiederholpräzision – stammen von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/100ml. Auf eine jeweils separate Einwaage wurde verzichtet, da das mengenmäßige Verhältnis zwischen den Enantiomeren und nicht deren absolute Stoffmenge für diese Versuchsreihe von Bedeutung ist. Von jeder Mischung wurden 3 Wiederholungen gemacht. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander befinden sich in der Tabelle 2.4 am Ende dieses Kapitels, wobei die angegebene Zahl den prozentuellen Anteil der Substanz R wiedergibt. 2 Werte sind hier nicht angegeben, da diese wegen einer Verschmutzung des Puffers, die die Peaks teilweise überlagerte, nicht integrierbar waren. Aufgrund der deutlich sichtbaren Peaks bei der Konzentration 99,5 und 0,5 wurden auch Trennungen von 99,8 und 0,2 % R Enantiomergehalt versucht, allerdings waren die erhaltenen Peaks des jeweils in geringerer Konzentration vorliegenden Enantiomers nicht mehr integrierbar.

Die Kalibrationsgerade ist am Ende dieses Kapitels mit der Funktionsgleichung und dem Bestimmtheitsmaß (R^2), welches mit 0.9995 sehr gut war, als Graphik 2.1 zu sehen. Im Anschluss an diesen Text wird eine Trennung mit der endgültigen Methode mit den Verhältnissen von 0,5 % R - Enantiomer und 99,5 % S - Enantiomer gezeigt, um die Abdeckung des unteren Bereichs (siehe Elektropherogramm 2.3) zu demonstrieren. Im Anschluss daran befindet sich noch ein Lauf mit den Enantiomer - Verhältnissen 50 % zu 50 % (siehe Elektropherogramm 2.4), um das Trennvermögen der Methode zu zeigen.

Elektropherogramm 2.3

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 15 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 0,5 % R - Enantiomer und 99,5 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

0,5% R - Enantiomer 99,5% S - Enantiomer



Elektropherogramm 2.4

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 15 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 50 % R - Enantiomer und 50 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

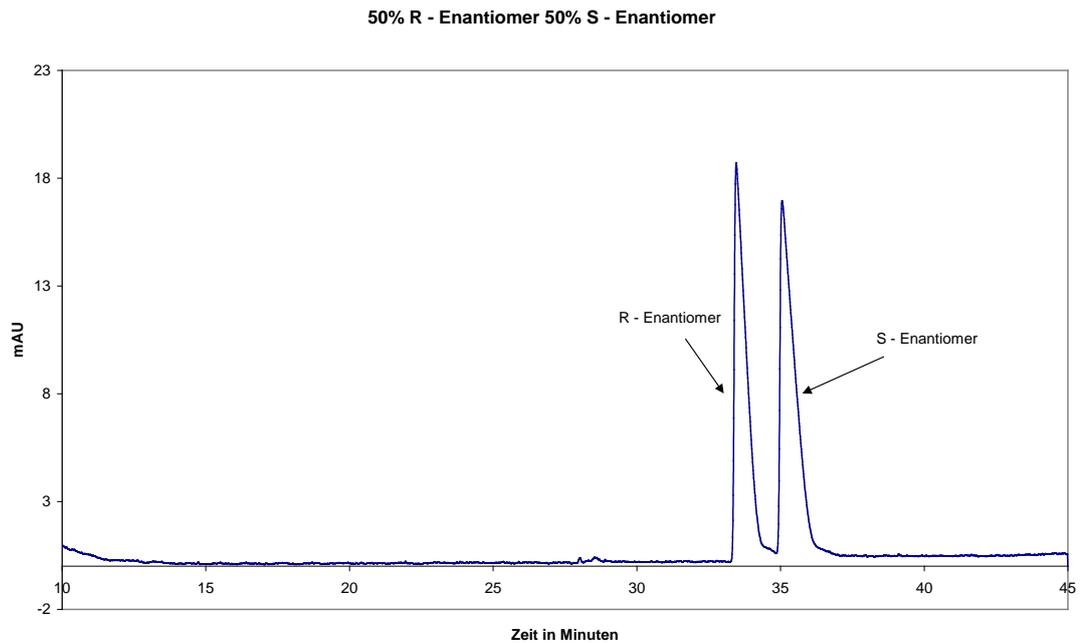


Tabelle 2.3

Einwaagen der Substanz MW143 in Milligramm zur Erstellung der Kalibrationsgerade

Einwaagen				
Soll R[%]	Soll S[%]	ist R mg	ist S mg	% R
90	10	906,36	98,88	90,16
92,5	7,5	929,04	75,78	92,46
95	5	954,91	50,77	94,95
97,5	2,5	974,61	25,69	97,43
99	1	995,04	10,15	98,99
99,5	0,5	1014,1	4,92	99,52
75	25	752,9	225,59	76,95
50	50	500,3	510,91	49,48
25	75	224,1	760,41	22,76
10	90	101,37	903,65	10,09
7,5	92,5	75,446	928,31	7,52
5	95	50,47	959,57	5,00
2,5	97,5	24,97	981,80	2,48
1	99	9,458	997,53	0,94
0,5	99,5	5,02	1002,26	0,50

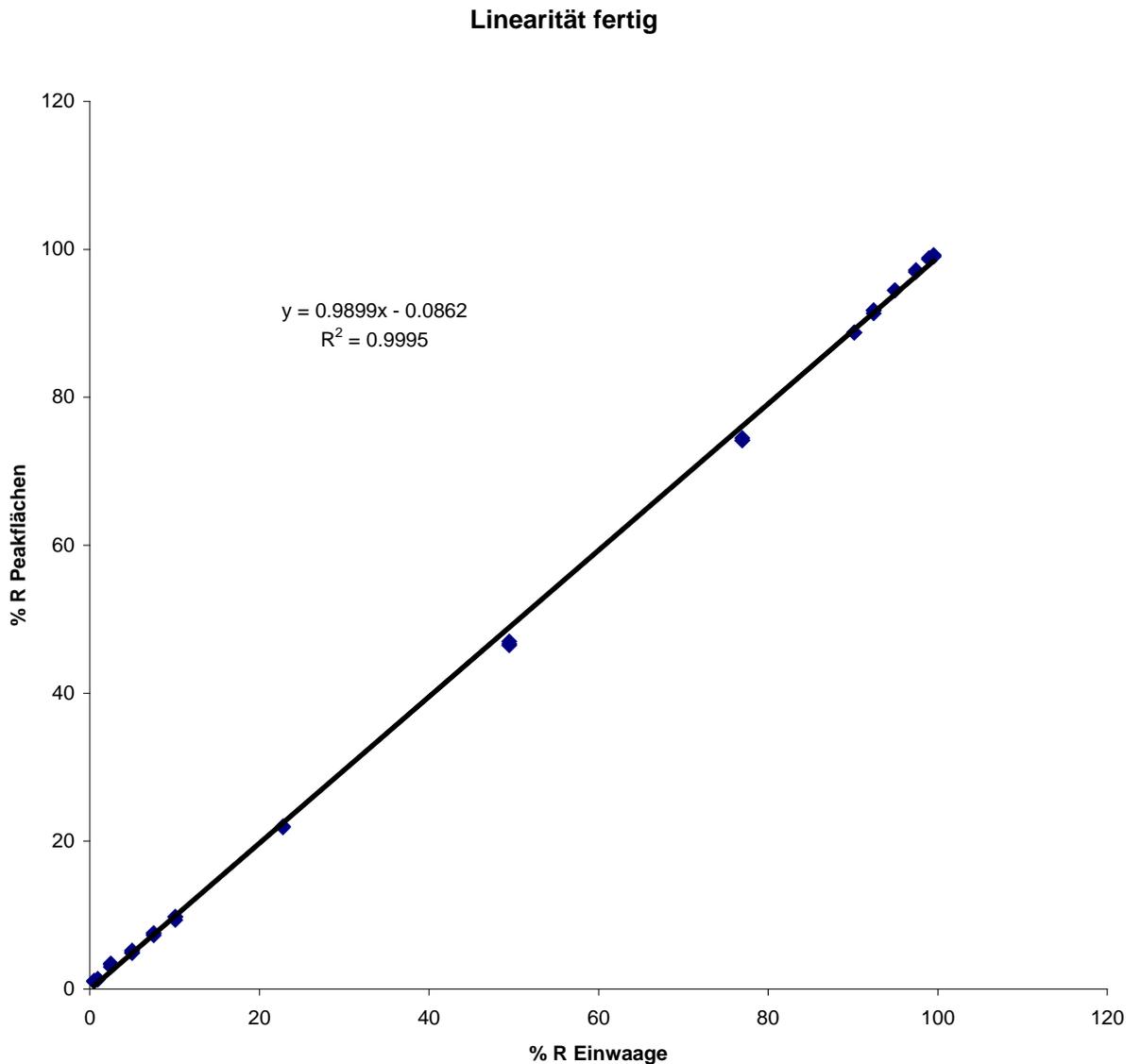
Tabelle 2.4

Flächenverhältnisse der Peaks der Substanz MW143 zur Erstellung der Kalibrationsgerade (EW steht für Einwaage in Milligramm, W steht für Wiederholung; MW für Mittelwert)

EW	1 W	2 W	3 W	MW
90,16	88,76	88,74	88,79	88,76
92,46	91,34	91,7	91,81	91,62
94,95	94,44	94,48	94,49	94,47
97,43	96,91	97,2	97,02	97,04
98,99	98,68	98,84	98,69	98,74
99,52	99,24	99,01	99,1	99,12
76,95	74,52	74,18	74,2	74,30
49,48	47	46,66	46,45	46,70
22,76	22,03	21,83	nicht integrierbar	21,93
10,09	9,34	9,73	9,79	9,62
7,52	7,44	7,24	7,58	7,42
5,00	4,87	5,22	5,02	5,04
2,48	2,98	3,46	3,3	3,25
0,94	1,37	1,27	1,35	1,33
0,50	1,14	0,98	nicht integrierbar	1,06

Graphik 2.1

Kalibrationsgerade mit Funktionsgleichung und Bestimmtheitsmaß



2.1.2.5 Überprüfung der Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden 3 Mischungen hergestellt. Die Angaben zu den Einwaagen befinden sich in Tabelle 2.5 am Ende dieses Kapitels. In Tabelle 2.6 befinden sich die prozentuellen Anteile der Peakflächen und in der Tabelle 2.7 sind diese Anteile mittels der Kalibrationsgerade korrigiert. Die Wiederfindung der Substanz befindet sich

in Tabelle 2.8.1 Die Werte sind eigentlich sehr nah an jenen der Einwaage, allerdings gibt es bei der ersten und der dritten Wiederholung einen leichten Ausreißer mit einer Abweichung von 4,5 % beziehungsweise 3,6 %. Alle Werte liegen jedoch zwischen den geforderten 95 - 105 % Wiederfindung. Die Variationskoeffizienten der einzelnen Konzentrationen, sind wie deren Mittelwert und Standardabweichung, in der Tabelle 2.8.2 angegeben. Die erhaltenen Werte des Variationskoeffizienten liegen alle unter 2 % und entsprechen somit den Vorgaben. Auch der Variationskoeffizient für alle 9 Werte (mit Mittelwert und Standardabweichung in Tabelle 2.8.3) liegt mit 1,89 % deutlich unter den geforderten 5 %.

Tabelle 2.5

Einwaagen zur Richtigkeit in Milligramm

% R soll	Ist in R mg	Ist in S mg	% R
10	100,94	906,48	10,02
75	751,69	257,39	74,49
90	890,14	104,96	89,45

Tabelle 2.6

Prozentueller Flächengehalt der Substanz MW143 (in % des R Enantiomers), die oberste Zeile bezieht sich auf 10,02 %, die Mittlere auf 74,49 % und die Unterste auf 89,45 % Gehalt an R –Enantiomer.

1. Wiederholung	2. Wiederholung	3. Wiederholung
10,28	10,16	10,19
73,60	73,45	73,81
89,10	89,05	89,13

Tabelle 2.7

Mittels der Kalibrationsgerade korrigierte Werte der Substanz MW143 (in % des R Enantiomers) die oberste Zeile bezieht sich auf 10,02 %, die Mittlere auf 74,49 % und die Unterste auf 89,45 % Gehalt an R –Enantiomer.

1. Wiederholung	2. Wiederholung	3. Wiederholung
10,47	10,35	10,38
74,44	74,29	74,65
90,10	90,05	90,13

Tabelle 2.8.1

Wiederfindung der Substanz MW 143 in %, die oberste Zeile bezieht sich auf 10,02 %, die Mittlere auf 74,49 % und die Unterste auf 89,45 % Gehalt an R –Enantiomer.

1. Wiederholung	2. Wiederholung	3. Wiederholung
104,51	101,40	103,61
99,93	98,60	100,21
100,72	99,55	100,75

Tabelle 2.8.2

Mittelwert, Standartabweichung und Wiederfindung der einzelnen Konzentrationen (RSD steht für relative Standartabweichung (relative standard deviation) = Variationskoeffizient)

% Gehalt an R	Mittelwert	Standartabweichung	RSD
10,02	103,17	1,6013	1,552
74,49	99,58	0,8598	0,8635
89,45	100,34	0,6852	0,6829

Tabelle 2.8.3

Mittelwert, Standardabweichung und Wiederfindung der der gesamten Richtigkeit (RSD steht für relative Standardabweichung (relative standard deviation) = Variationskoeffizient)

Mittelwert	Standardabweichung	RSD
101,03	1,91	1,89

2.1.2.6 Wiederholpräzision der Substanz MW143

Die Wiederholpräzision der Substanz MW143 wurde mit 6 verschiedenen Einwaagen, die jeweils 90 % R - und 10 % S Enantiomer enthielten, durchgeführt. Mit jeder Einwaage wurden 3 Messungen durchgeführt. Vier Einwaagen wurden speziell für die Wiederholpräzision zubereitet und jeweils eine Einwaage (die mit 90 % R - und 10 % S Enantiomer) wurde von der Richtigkeit und von der Linearität verwendet. Die Einwaagen befinden sich in der Tabelle 2.9 am Ende des Kapitels, wobei zu beachten ist, dass die Proben für die Linearität mit a - d, die Probe der Richtigkeit mit „R“ und die Probe der Linearität mit „L“ gekennzeichnet sind. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander sind in der Tabelle 2.10 zu sehen, die sich im Anschluss an die Tabelle 2.9 befindet. Weiters enthält diese Tabelle auch den Mittelwert, die Standardabweichung und vor allem die relative Standardabweichung (RSD), die mit 0,59 % für eine Kapillarelektrophorese exzellent ist. Allerdings dürfte dieser Wert nicht zuletzt deswegen so gut sein, da nur ein Verhältnis zweier Substanzen zueinander gemessen werden muss und nicht die Peakflächen an sich. Damit fallen Unterschiede im Injektionsvolumen der Kapillarelektrophorese nicht weiter ins Gewicht.

Tabelle 2.9

Einwaagen für die Wiederholpräzision in Milligramm

Name	ist R mg	ist S mg	% R
1.)L	906,36	98,88	90,16
2.)a	914,98	99,40	90,20
3.)R	890,14	104,96	89,45
4.)b	912,91	98,24	90,28
5.)c	906,95	100,21	90,05
6.)d	911,31	98,35	90,26

Tabelle 2.10

Verhältnisse der Enantiomer bei der Wiederholpräzision

Name	1. Wiederholung	2. Wiederholung	3. Wiederholung
1.)L	88,76	88,74	88,79
2.)a	89,21	89,97	89,77
3.)R	89,10	89,05	89,13
4.)b	90,31	89,77	90,08
5.)c	89,61	89,41	89,73
6.)d	90,16	89,31	90,31
	Mittelwert gesamt		89,51
	Standardabweichung gesamt		0,53
	Relative Standardabweichung		0,59 %

2.1.3 Die Substanz MW 139

2.1.3.1 Herkunft der Substanz MW139

Die Enantiomere der Substanz MW 139 wurden von Herrn Martin Walter präparativ getrennt, anschließend methyliert und für die Analytik benzoyliert,

wobei die Reinheit beim Enantiomer R über 99,0 % und beim Enantiomer S über 98 % lag. [2. Noe C, Walter M]

2.1.3.2 Methodenentwicklung der Substanz MW139

2.1.3.2.1 Zu diesem Thema bereits von Herrn Walter durchgeführte Versuche

Um die Enantiomere auf der Kapillarelektrophorese trennen zu können, verwendete Herr Walter ein Carboxymethyl - β - Cyclodextrin in einer Konzentration von 2,0 beziehungsweise 3,3 Mol pro Liter. Der verwendete Puffer war ein 100 mM TRIS/Phosphat - Puffer, der auf den pH - Wert von 3,5 eingestellt wurde. [2. Noe C, Walter M]

2.1.3.2.2 Versuche zur Verbesserung der Enantiomerentrennung mittels Variation der Cyclodextrin Konzentration

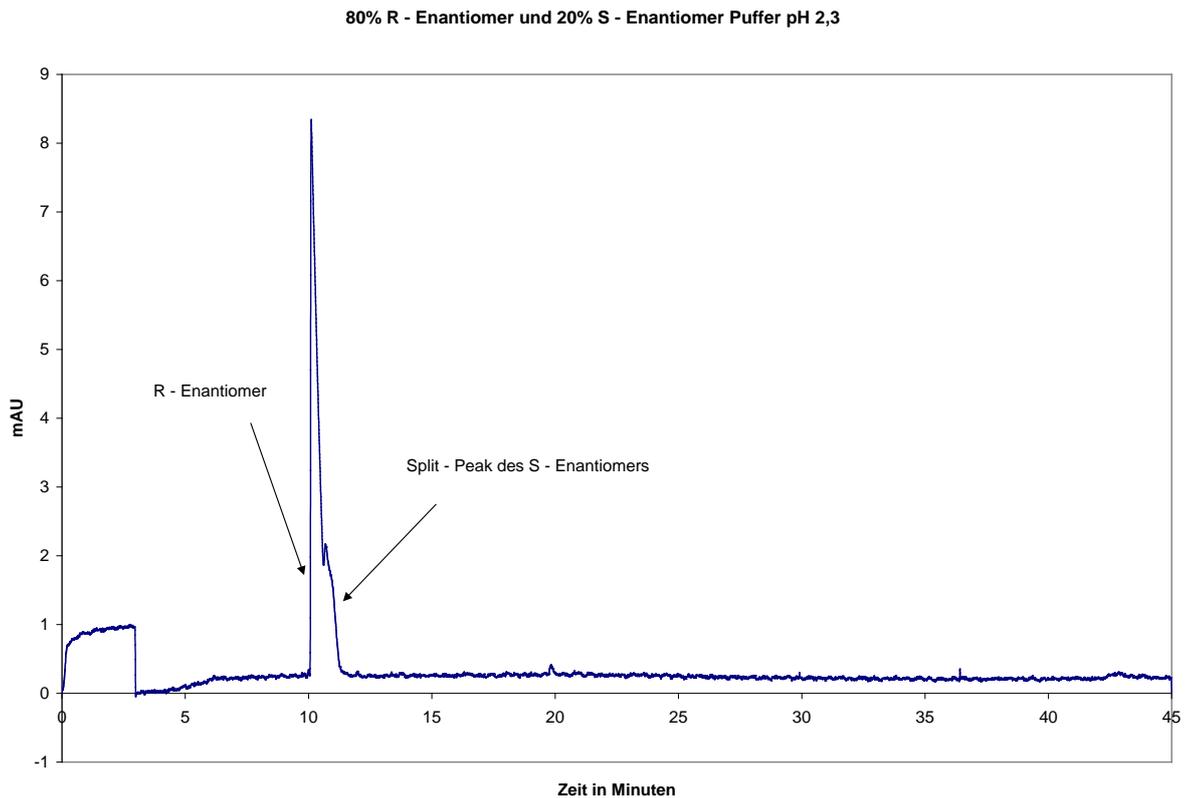
Die Trennung der Substanz MW 139 wurde mit den bereits erprobten Bedingungen - also 100mM TRIS/Phosphat - Puffer mit pH 3,5 und 3.3 beziehungsweise 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrine - getestet. Die Probe war eine Mischung von 80 % R und 20 % S Enantiomer, welche mit dem oben genannten Puffer zu einer Konzentration von 50 mg pro 100 Milliliter gelöst wurde. Die Trennung erfolgte mittels konstanter Spannung, wobei die ersten Versuche mit 15 kV durchgeführt wurden. Es zeigte sich bei der Verwendung 3.3mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrine eine sehr gute Trennung mit allerdings relativ langen Migrationszeiten. Die das R - Enantiomer konnte bei ca. 30 min und das S-Enatiomer bei ca. 35 Minuten. Eine genauere Angabe ist nicht möglich, da die Migrationszeiten relativ stark variierten. Des Weiteren ist zu sagen, dass sowohl Peakbreite als auch die Form der Peaks sehr unbefriedigend waren. Deshalb wurde der Versuch mit 5 mM Cyclodextrinkonzentration durchgeführt. Leider bewirkte dies eine zusätzliche Verschlechterung der Ergebnisse. Auf Grund der generell schlechten Ergebnisse wurde nun auf Versuche mit 2mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrinen verzichtet und versucht die Methode durch Variation anderer Parameter zu verbessern.

2.1.3.2.3 Versuche zur Optimierung der Methode mittels pH - Wert des Puffers

Der pH - Wert des Puffers 100 mM Puffers wurde auf 2,3 gesenkt. Die Spannung wurde mit 15 kV beibehalten um nicht zu viele Parameter auf einmal zu ändern und somit eine Aussagekraft über den Einfluss der einzelnen Parameter treffen zu können. Die Versuche wurden mit den drei im vorigen Kapitel genannten Cyclodextrinkonzentrationen durchgeführt. Die pH - Wert Veränderung hatte zur Folge, dass der Stickstoff stärker protoniert wurde und sich die Retentionszeiten somit äußerst stark verkürzten. Sowohl die Form als auch die Breite der Peaks verbesserten sich. Allerdings war die Trennung unzureichend, da beim ersten Versuch eine Trennung nur angedeutet wird und bei den anderen Versuchen auch nicht mehr als eine Antrennung erzielt wurde. (siehe Elektropherogramm 3.1) Da man nun sah, dass eine schnellere Flussrate die Ergebnisse verbessern kann, eine pH - Wert Änderung von 3,5 auf 2,3 aber zu viel ist, kehrten wir zum pH 3,5 zurück und versuchten die Ergebnisse mit einer Erhöhung der Spannung zu verbessern.

Elektropherogramm 3.1

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 2,3. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 80 % R - Enantiomer und 20 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.



2.1.3.2.4 Versuche zur Verbesserung der Migrationszeiten mittels Variation der Spannung

Die Spannung wurde nun auf 20 kV erhöht um die Migrationsgeschwindigkeit zu beschleunigen. Die übrigen Bedingungen des Trennvorganges waren ident mit jenen, die unter Punkt 1.3.2.2 beschrieben wurden. Bei 5,0 mM Cyclodextrinkonzentration war die Trennung genauso unvollständig wie jene mit einem pH von 2,3. Die Trennung bei einer 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration von war jedoch ausreichend. (siehe Elektropherogramm 3.2) Des Weiteren waren die Peaks in ihrer Form sehr schmal und auch relativ symmetrisch. Bei 2.0 mM Cyclodextrin -

Konzentration war so gut wie keine Trennung zu erkennen. Zusätzlich zu diesem Problem waren die Migrationzeiten derartig unkonstant, dass diese Konzentration nicht weiter verfolgt wurde und der Versuch hier nur der Vollständigkeit halber angeführt ist. Die Migrationszeiten der Peaks sind im Anschluss in der Tabelle 3.1 angegeben.

Elektropherogramm 3.2

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 80 % R - Enantiomer und 20 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

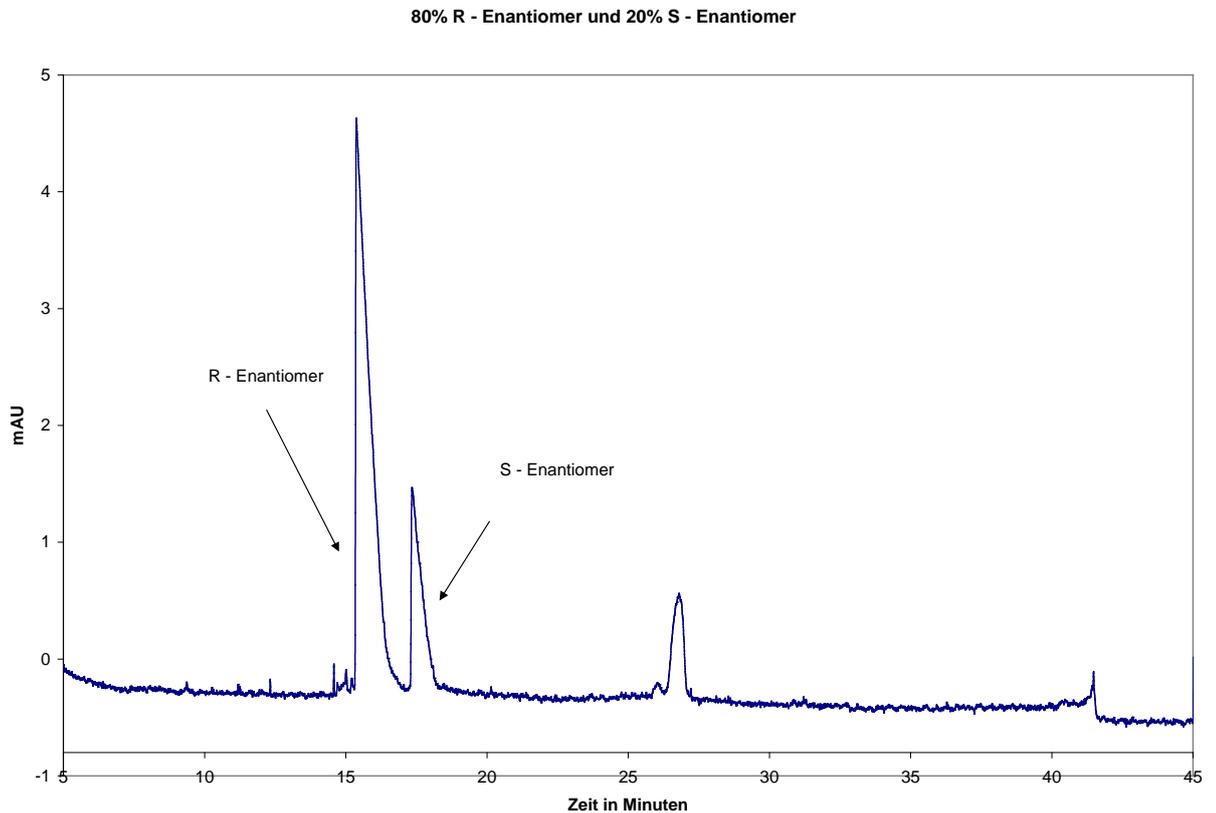


Tabelle 3.1

Migrationszeiten in Minuten

	Wiederholung 1 R Enantiomer	Wiederholung 1 S Enantiomer	Wiederholung 2 R Enantiomer	Wiederholung 2 S Enantiomer
15 kV 3,3 mM	15,37	17,34		
20 kV 2,0 mM	35,31	35,40	40,42	40,83
20 kV 3,3 mM	15,37	17,34	16,30	18,35
20 kV 5,0 mM	27,52	28,18	26,44	27,13

2.1.3.2.5 Versuche zur Verbesserung der Methode mittels Variation der Pufferkonzentration

Um die Migrationszeiten zu verkürzen, wurde die TRIS Konzentration von 100 mM auf 75 mM reduziert. Der Versuch mit 5,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrinkonzentration brachte eine wunderschöne Trennung mit passablen Peaks, jedoch stieg die Laufzeit bei dieser Cyclodextrinkonzentration sehr deutlich an, obwohl auch in dieser Versuchsreihe mit 20kV und gleichen Bedingungen wie im vorherigen Kapitel gearbeitet wurde. Es war allerdings auch bei dem 100mM Puffer zu beobachten, dass nur eine Cyclodextrinkonzentration von 3,3 mM eine geringere Migrationszeit bewirkt. Dieses Phänomen trat auch teilweise hier auf. Die Cyclodextrinkonzentrationen von 2,0 beziehungsweise 3,3 mM ergaben deutlich (um bis zu 10 Minuten) kürzere Retentionszeiten, wobei die Form der Peaks bei 3,3 mM den Erwartungen in keinster Weise gerecht wurde. Die Peaks waren zwar an und für sich relativ schmal, ihre Form war jedoch nicht zufriedenstellend. Bei einer Konzentration von 2,0 Millimol an Carboxymethyl - β - Cyclodextrinen pro Liter ergab sich das Problem, dass die Basislinientrennung nicht vollständig war. Eine anschauliche Darstellung der

Migrationszeiten und der Auflösung der Peaks befindet sich in den Tabellen 3.2 und 3.3 im Anschluss.

Tabelle 3.2

Auflistung der Migrationszeiten mit 75 mM TRIS/Phosphat - Puffer

75 mM Puffer	Migrationszeit1	Migrationszeit2
2,0mM Rep1	13,40	15,38
2,0mM Rep2	13,39	15,48
3,3mM Rep1	14,80	17,09
3,3mM Rep2	14,28	17,01
5,0mM Rep1	23,63	28,35
5,0mM Rep2	23,92	29,86
100 mM Puffer	Migrationszeit1	Migrationszeit2
3,3mM Rep1	15,371	17,34
3,3mM Rep2	16,30	18,35

Tabelle 3.3

Auflistung der Auflösung mit 100mM bzw. 75 mM TRIS/Phosphat - Puffer

75 mM Puffer	Migrationszeit1	Breite1	Migrationszeit2	Breite2	Auflösung
2,0 mM Rep1	13,40	1,90	15,38	1,60	1,131
2,0 mM Rep2	13,39	1,99	15,48	1,45	1,216
3,3 mM Rep1	14,80	1,27	17,09	1,28	1,795
3,3 mM Rep2	14,28	1,45	17,01	0,95	2,278
5,0 mM Rep1	23,63	2,35	28,35	1,39	2,525
5,0 mM Rep2	23,92	3,40	29,86	2,61	1,976
100 mM Puffer	Migrationszeit1	Breite1	Migrationszeit2	Breite2	Auflösung
3,3mM Rep1*	15,371	1,73	17,34	0,99	1,449
3,3mM Rep2*	16,30	1,47	18,35	1,22	1,524

*Die Cyclodextrinkonzentrationen von 5,0 und 2,0 wurden nicht ausgewertet, da die Trennung und Peakform sehr schlecht waren.

2.1.3.3 Die Parameter der endgültigen Methode

Nach den oben beschriebenen Optimierungsversuchen, wurden für die Kalibration folgende Parameter verwendet/festgelegt:

Unter Verwendung eines 100 mM TRIS-Phosphat Puffers pH 3,5, einer Cyclodextrin Konzentration von 3,3 mM wurde mit einer konstanten Spannung von 20 kV bei einer Temperatur von 16 °C gearbeitet. Die Detektion erfolgte bei 214 nm. Die Kapillarlänge betrug 60 cm, respektive effektive 50 cm bis zum Detektorfenster. Für die Injektion wurde standardmäßig ein Zeitraum von 5 s bei einem Druck von 0,5 psi verwendet. Desweiteren wurde vor jeder Trennung die Kapillare für 0,1 N NaOH sowie anschließend für 2 min mit dem Trennpuffer gespült. Die Gesamtdauer der Trennung betrug 25 min, hierbei erfolgte ein Autozero nach 3 min.

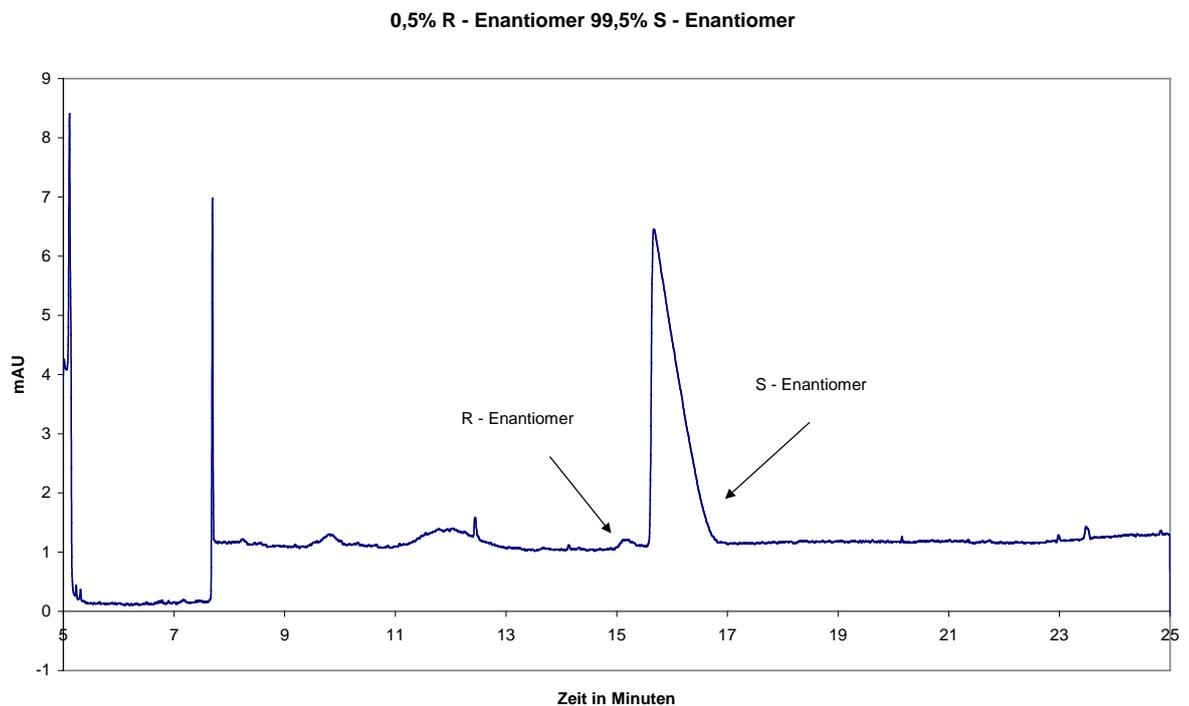
2.1.3.4 Erstellen einer Kalibrationsgerade

Um eine Kalibrationsgerade erstellen zu können, wurden Mischungen der beiden Enantiomere hergestellt. Die einzelnen Mischungen, deren Name ihrem prozentuellen Gehalt an R Enantiomer entsprechen, sind in der Tabelle 3.4 am Ende dieses Kapitels angegeben. Sämtliche Mischungen - auch jene für die Richtigkeit und Wiederholpräzision - stammen von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/100ml. Auf eine jeweils separate Einwaage wurde verzichtet, da nicht die Peakfläche an sich, sondern nur das Verhältnis der Peakflächen zueinander von Bedeutung ist. Von jeder Mischung wurden 3 Wiederholungen gemacht. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander - wobei die angegebene Zahl den prozentuellen Anteil des R - Enantiomers wiedergibt - befinden sich in der Tabelle 3.5 am Ende dieses Kapitels. 2 Werte des Konzentrationsverhältnisses 2,5 % Substanz R und 97,5 % S sind hier nicht angegeben, da hier kein Peak der Substanz R sicht- beziehungsweise integrierbar war. Die Kalibrationsgerade

ist am Ende dieses Kapitels mit der Funktionsgleichung und dem Bestimmtheitsmaß (R^2), welches mit 0.999 ausreichend war, als Graphik 3.1 zu sehen. Unten wird eine Trennung mit der endgültigen Methode mit den Verhältnissen von 0,5 % R - Enantiomer und 99,5 % S - Enantiomer gezeigt, um die Abdeckung des unteren Bereichs (siehe Elektropherogramm 3.3) zu demonstrieren. Weiters wird noch eine Trennung mit den Verhältnissen 50 % zu 50 % (siehe Elektropherogramm 3.4) gezeigt, um das Trennvermögen der Methode zu zeigen.

Elektropherogramm 3.3

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 0,5 % R - Enantiomer und 99,5 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.



Elektropherogramm 3.4

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 50 % R - Enantiomer und 50 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

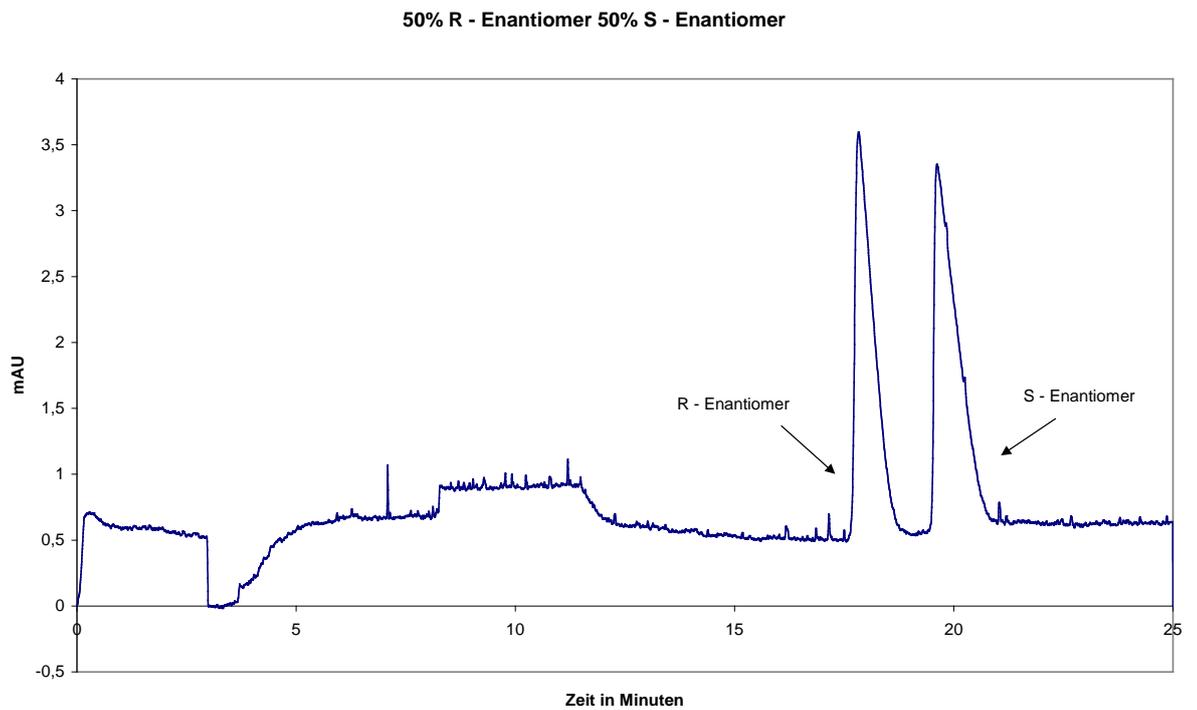


Tabelle 3.4.

Einwaagen des Mischungsverhältnisses für die Kalibrationsgerade in Milligramm

soll % R	ist R	Ist S	ist %
90	904,01	100,232	90,02
92,5	929,704	74,042	92,62
95	957,142	50,044	95,03
97,5	982,97	23,83	97,63
99	987,324	8,78	99,12
99,5	1000,01	4,502	99,55
75	756,49	255,632	74,74
50	504,292	502,56	50,09
25	252,504	755,346	25,05
10	99,518	901,544	9,94
7,5	75,302	929,156	7,50
5	51,074	953,606	5,08
2,5	26,2	975,672	2,62
1	10,214	988,706	1,02
0,5	5,328	994,112	0,53

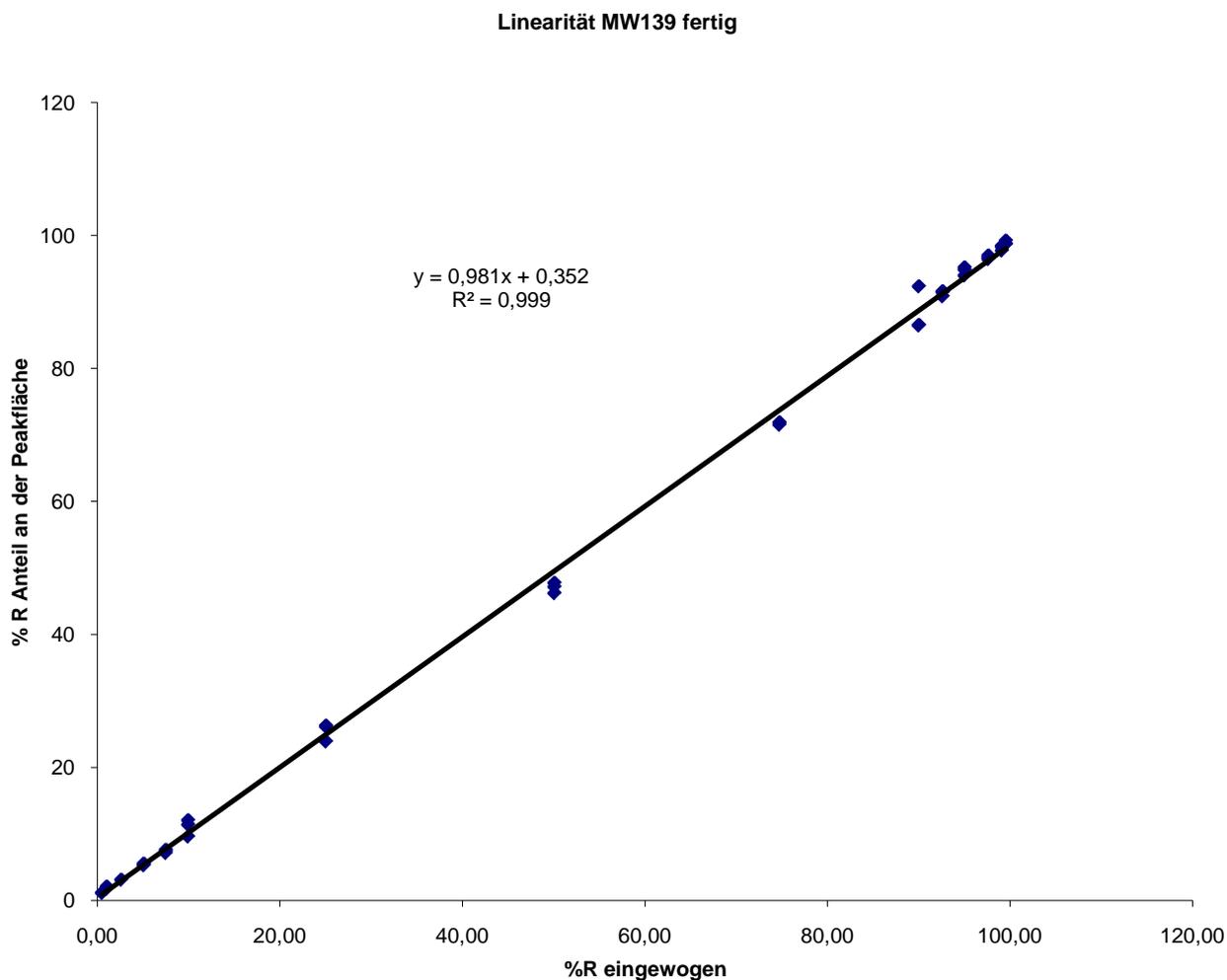
Tabelle 3.5

Verhältnisse der Peakflächen zueinander in % der Substanz R (die Abkürzungen Rep 1-3 stehen für die einzelnen Wiederholungen)

ist %	Rep1	Rep2	Rep3	MW
90,02	86,48	86,53	92,34	88,45
92,62	91,61	90,84	91,45	91,30
95,03	95,2	93,98	94,87	94,68
97,63	96,69	96,44	96,99	96,71
99,12	98,3	97,74	98,45	98,16
99,55	99,23	98,65	98,75	98,88
74,74	71,81	71,89	71,53	71,74
50,09	46,19	47,15	47,74	47,03
25,05	26,27	26,14	23,88	25,43
9,94	12,04	11,38	9,58	11,00
7,50	7,4	7,11	7,59	7,37
5,08	5,52	5,37	5,25	5,38
2,62	3,09	Nicht integrierbar	Nicht integrierbar	3,09
1,02	2,06	1,71	1,87	1,88
0,53	1,16	1,13	1,1	1,13

Graphik 3.1.

Kalibrationsgerade mit der Funktionsgleichung und dem Bestimmtheitsmaß



2.1.3.5 Überprüfung der Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden 3 Mischungen mit 90 %, 75 % und 10 % Anteil an Substanz R hergestellt. Die Angaben zu den Einwaagen befinden sich in Tabelle 3.6 am Ende dieses Kapitels. In Tabelle 3.7 befinden sich die prozentuellen Anteile der Peakflächen und in der Tabelle 3.8 sind diese Anteile mittels der Kalibrationsgerade korrigiert. Die Wiederfindung der Substanz befindet sich in Tabelle 3.9.1. Die Standardabweichungen der Werte liegen alle innerhalb von 3 Prozent, wobei die Wiederfindung bei 90 %

und 75 % besser war als bei 10 %. Die Variationskoeffizienten der einzelnen Konzentrationen sind, wie deren Mittelwert und Standardabweichung, in der Tabelle 3.9.2 angegeben. Die erhaltenen Werte des Variationskoeffizienten liegen alle deutlich unter 2 % und entsprechen somit den Vorgaben. Auch der Variationskoeffizient für alle 9 Werte, der mit dem Mittelwert und der Standardabweichung in Tabelle 3.9.3 zu sehen ist, liegt mit 1,72% deutlich unter den geforderten 5 %.

Tabelle 3.6

Einwaagen der Substanzen in Milligramm

soll % R	ist R	ist S	ist %
90	902,612	98,166	90,19
75	744,104	254,832	74,49
10	100,098	904,606	9,96

Tabelle 3.7

Prozentuelle Anteile der detektierten Peakflächen (Angaben in % Anteil R)

ist %	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
90,19	86,26	87,2	92,24
74,49	73,43	73,82	72,62
9,96	8,02	9,56	8,51

Tabelle 3.8

Mittels Kalibrationsgeradengleichung korrigierte prozentuelle Anteile der Peakflächen (Angaben in % Anteil R)

ist %	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
90,19	87,51	88,47	93,60
74,49	73,29	73,69	72,47
9,96	7,81	9,38	8,31

Tabelle 3.9.1

Wiederfindung der Substanz R in %

ist %	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
90,19	101,45	101,45	101,48
74,49	100,51	100,49	100,55
9,96	97,38	98,11	97,64

Tabelle 3.9.2

Mittelwert, Standardabweichung und Wiederfindung der einzelnen Konzentrationen (RSD steht für relative Standardabweichung = Variationskoeffizient)

Mittelwert	Standardabweichung	RSD	Gehalt an % R
101,46	0,01	0,01	90,19
100,52	0,03	0,03	74,49
97,71	0,37	0,37	9,96

Tabelle 3.9.3

Mittelwert, Standardabweichung und Wiederfindung der der gesamten Richtigkeit (RSD steht für relative Standardabweichung = Variationskoeffizient)

Mittelwert	Standardabweichung	RSD
99,781	1,72	1,72

2.1.3.6 Überprüfung der Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision der Substanz MW139 wurde mit 6 verschiedenen Einwaagen, die jeweils 90 % R - und 10 % S Enantiomer enthielten, durchgeführt. Mit jeder Einwaage wurden 3 Läufe durchgeführt. Vier Einwaagen wurden speziell für die Wiederholpräzision zubereitet und jeweils eine Einwaage (jene mit 90 % R - und 10 % S Enantiomer) wurde von der Richtigkeit und von der Linearität verwendet. Die Einwaagen befinden sich in der Tabelle 3.10 am Ende des Kapitels, wobei zu beachten ist, dass die Proben für die Linearität mit a - d, die Probe der Richtigkeit mit „R“ und die Probe der Linearität mit „L“ gekennzeichnet sind. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander sind in der Tabelle 3.11 im Anschluss an die Tabelle 3.10 zu sehen. Die mit der Einwaage korrigierten Wiederfindungen in der Tabelle 3.12 befinden sich am Ende dieses Kapitels. Im Anschluss an diese Tabelle befindet sich die Tabelle 3.13 die den Mittelwert, die Standardabweichung und vor allem die relative Standardabweichung (RSD) der korrigierten Verhältnisse der Peakflächen enthält. Die relative Standardabweichung befindet sich mit knapp 3 % zwar noch deutlich unter den geforderten 5 %, allerdings konnten die Werte der Substanz MW 143 nicht mehr erreicht werden. Einer der Gründe dafür liegt sicher in der höheren Peakbreite und der runderen Peakform, sodass die Integration nicht mehr so exakt sein kann.

Tabelle 3.10

Einwaagen für die Wiederholpräzision in Milligramm

soll % R	ist R	Ist S	ist %
a90	906,694	101,168	89,96
b90	902,038	97,62	90,23
c90	907,41	100,41	90,04
d90	904,28	100,064	90,04
L90	904,01	100,232	90,02
R90	902,612	98,166	90,19

Tabelle 3.11

Verhältnisse der Peakflächen zueinander (in % Anteil der Substanz R)

ist %	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
89,96	89,01	88,5	88,6
90,23	90,95	89,5	88,88
90,04	88,99	89,63	91,99
90,04	82,23	85,77	85,92
90,02	86,26	87,2	92,24
90,19	86,48	86,53	92,34

Tabelle 3.12

Korrigierte Verhältnisse der Peakflächen

ist %	Rep1	Rep2	Rep3
89,96	98,9416	98,3747	98,4859
90,23	100,793	99,1858	98,4987
90,04	98,8372	99,5481	102,169
90,04	91,3292	95,261	95,4276
90,02	95,8241	96,8683	102,467
90,19	95,8854	95,9408	102,383

Tabelle 3.13

Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung der Tabelle 3.12

Mittelwert	98,12
Standardabweichung	2,90
relative Standardabweichung	2,96 %

2.1.4 Die Substanz MW 141

2.1.4.1 Herkunft der Substanz MW 141

Die Enantiomere von 1-Methyl-3-pyrrolidinol wurden von Herrn Walter präparativ getrennt und für die Analytik mit Benzoesäure verestert. Die

stereochemische Reinheit der Enantiomere betrug beim Enantiomer R 100 % und beim Enantiomer S 98,1 %. [2. Noe C, Walter M]

2.1.4.2 Zu diesem Thema bereits von Herrn Walter durchgeführte Versuche

Die Vorversuche zur Substanz MW141 verliefen analog zu den Substanzen MW 143 und MW 139. [2. Noe C, Walter M]

2.1.4.3 Versuche zur Methodenentwicklung

2.1.4.3.1 Versuche zur Verbesserung der Enantiomerentrennung mittels Variation der Cyclodextrin Konzentration

Die Trennung der Substanz MW 141 wurde mit den bereits erprobten Bedingungen - also 100mM TRIS/Phosphat - Puffer mit pH 3,5 und 3.3 beziehungsweise 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrine - getestet. Die ersten Versuche wurden mit 15 kV Spannung gemacht. Im Gegensatz zu den vorherigen Substanzen wurde auf einen Puffer mit einer Cyclodextrinkonzentration von 5,0 mM verzichtet, da die Peaks bei 3,3 mM Carboxymethyl sehr unsymmetrisch und breit waren. Bei 2,0 mM Konzentration an Cyclodextrinen war keine Trennung zu erkennen.

2.1.4.3.2 Versuche zur Verbesserung mittels Modifikation der Spannung

Um die Methode zu verbessern, wurden alle 2 Cyclodextrinkonzentrationen und die Konzentration von 5,0 mM an Carboxymethyl - β - Cyclodextrin mit einer Spannung von 20 kV getestet. Die Migrationszeiten, die in der Tabelle 4.1, die sich mit den anderen Tabellen am Ende dieses Kapitels befindet, aufgelistet sind, sanken erwartungsgemäß. Die Trennung der beiden Enantiomere war bei 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration nicht mehr so deutlich wie bei 15 Kilovolt. Der klare Vorteil bei 20 kV war allerdings, dass

die Peakform bedeutend besser war als jene bei 15 kV. Die 2 mM Cyclodextrinkonzentration zeigte überraschender Weise eine Trennung der Substanzen, obwohl diese Cyclodextrinkonzentration bei 15 kV enttäuschende Ergebnisse lieferte. Ein Grund für dieses Phänomen könnte darin liegen, dass die Puffer nach der Methode mit 15 kV neu angesetzt wurden. Auch die 5 mM Cyclodextrinkonzentration wurde getestet, zeigte aber keine Trennung. Ein Problem, welches immer deutlicher zu Tage trat war, dass die Migrationszeiten von Lauf zu Lauf mehr oder minder stark variierten, was die Findung einer geeigneten Methode zusätzlich erschwerte. Die Erschwernis lag vor allem darin, dass sich mit den schwankenden Migrationszeiten auch die Trennergebnisse und die Peakform veränderten. So wurde bei einer Verkürzung der Migrationszeit, die Peakform schöner, die Trennung wurde allerdings oft wesentlich verschlechtert. Dies zeigt sich auch in den unterschiedlichen Auflösungen, die im Anschluss in der Tabelle 4.2 aufgelistet werden.

Elektropherogramm 4.1

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere wurden in einem Verhältnis von 80 % R - Enantiomer zu 20 % S - Enantiomer verwendet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

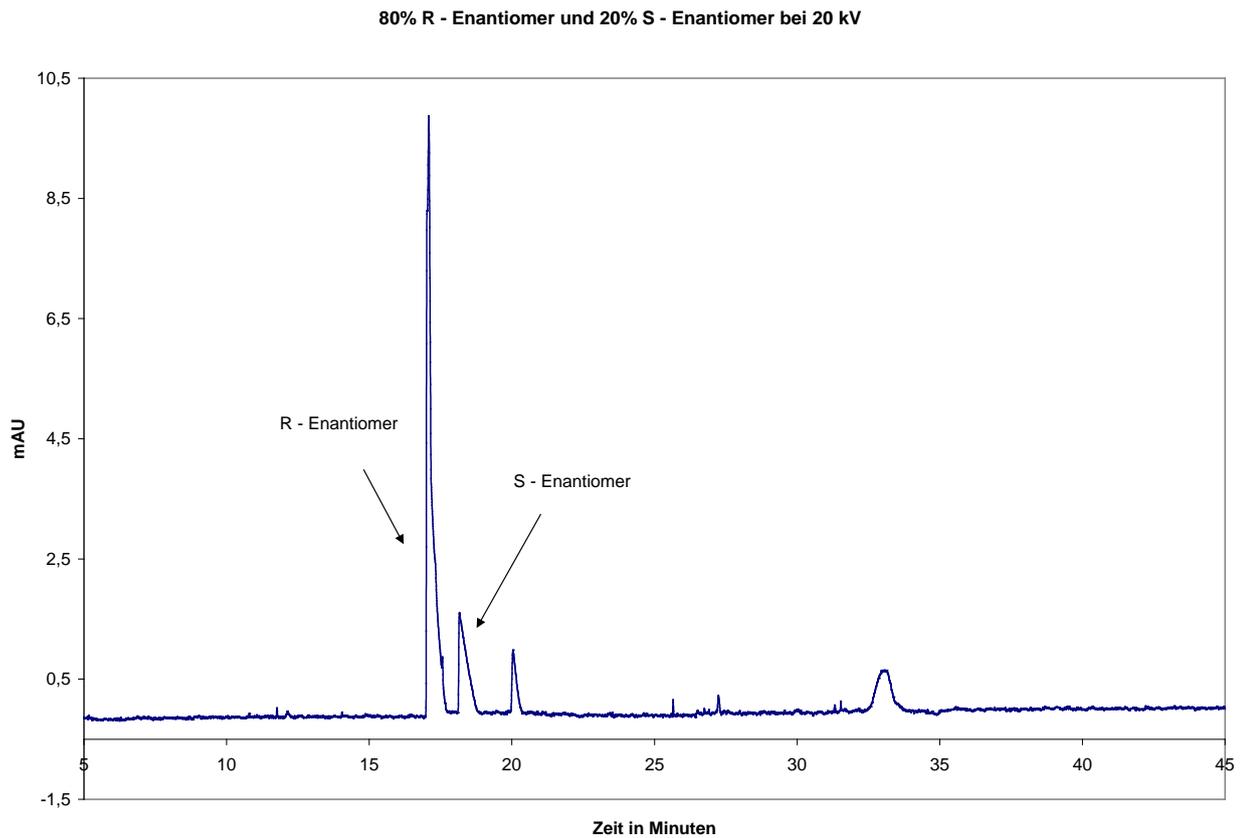


Tabelle 4.1

Migrationszeiten der einzelnen Peaks (Der Name entspricht der verwendeten Methode, wobei die kV für die angelegte Spannung in Kilovolt und das mM für die verwendete Cyclodextrinkonzentration in Millimol steht.)

Name	Migrationszeit R	Migrationszeit S
15 kV 3,3 mM	26,11	28,95
15 kV 2,0 mM	16,29	16,29
20 kV 2,0 mM	13,34	14,59
20 kV 3,3 mM	17,09	18,16
20 kV 5,0 mM	23,54	23,54

Tabelle 4.2

Auflösung der Peaks (Name wie Tabelle 3.1)

Name	Migrationszeit R	Migrationszeit S	Peakbreite R	Peakbreite S	Auflösung
15 kV 3,3 mM	26,11	28,95	1,80	1,10	1,959
15 kV 2,0 mM	16,29	16,29	3,03		0,000
20 kV 2,0 mM	13,34	14,59	1,05	0,80	1,351
20 kV 3,3 mM	17,09	18,16	0,78	0,75	1,407
20 kV 5,0 mM	23,54	23,54	0,9		0,000

2.1.4.3.3 Versuche mit 75 mM TRIS/Phosphat Puffer

Weitere Versuche wurden mit einer TRIS Konzentration von 75 mM und einer Spannung von 20 kV gemacht, da manche der bisherigen Versuche eine sehr gute Auflösung zeigten. Deshalb wurde nun versucht die Migrationszeit mittels niedrigerer Pufferkonzentration zu verkürzen. Der Versuch mit 5,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrinkonzentration brachte - wie zu erwarten war - keine ausreichende Trennung der Enantiomere. Die Cyclodextrinkonzentrationen von 2,0 beziehungsweise 3,3 mM ergaben kürzere Retentionszeiten, wobei die Auflösung um einiges schlechter wurde. Eine anschauliche Darstellung der Migrationszeiten und der Auflösung der Peaks befindet sich in den Tabellen 4.3 und 4.4 im Anschluss, wobei die Versuche mit 5 mM Cyclodextrinkonzentration in diesen Tabellen nicht berücksichtigt. Obwohl noch eine Basislinientrennung erreicht wurde, wurden die Versuche mit 2,0 beziehungsweise 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration nicht als endgültige Methode verwendet, da durch die nicht allzu konstanten Migrationszeiten eine Veränderung der Trennung zu Tage treten und daraus eine unvollständige Trennung resultieren könnte. Zur Veranschaulichung der Differenz in den Migrationszeiten ist in den Tabellen 4.3 und 4.4 immer eine zweite Wiederholung angeführt. Die hohe rechnerische Auflösung, die in diesen Versuchen herauskommt täuscht in diesem Fall allerdings sehr stark, da jeweils der erste Peak ein relativ starkes Tailing aufweist und somit die rechnerische Auflösung der eigentlichen Trennung nicht entspricht. Man sieht auch im Elektropherogramm 4.2 im Anschluss an diesen Text, dass die Trennung relativ knapp ist, was bei einer Konzentration von 50 % R zu 50 % S - Enantiomer wahrscheinlich zu einer unvollständigen Trennung geführt hätte. Im Vergleich dazu sieht man im Elektropherogramm 4.4 im Kapitel 2.1.4.5, dass sich die Enantiomere mit der endgültigen Methode auch bei dieser Konzentration auftrennten.

Elektropherogramm 4.2

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 75 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 80 % R - Enantiomer und 20 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

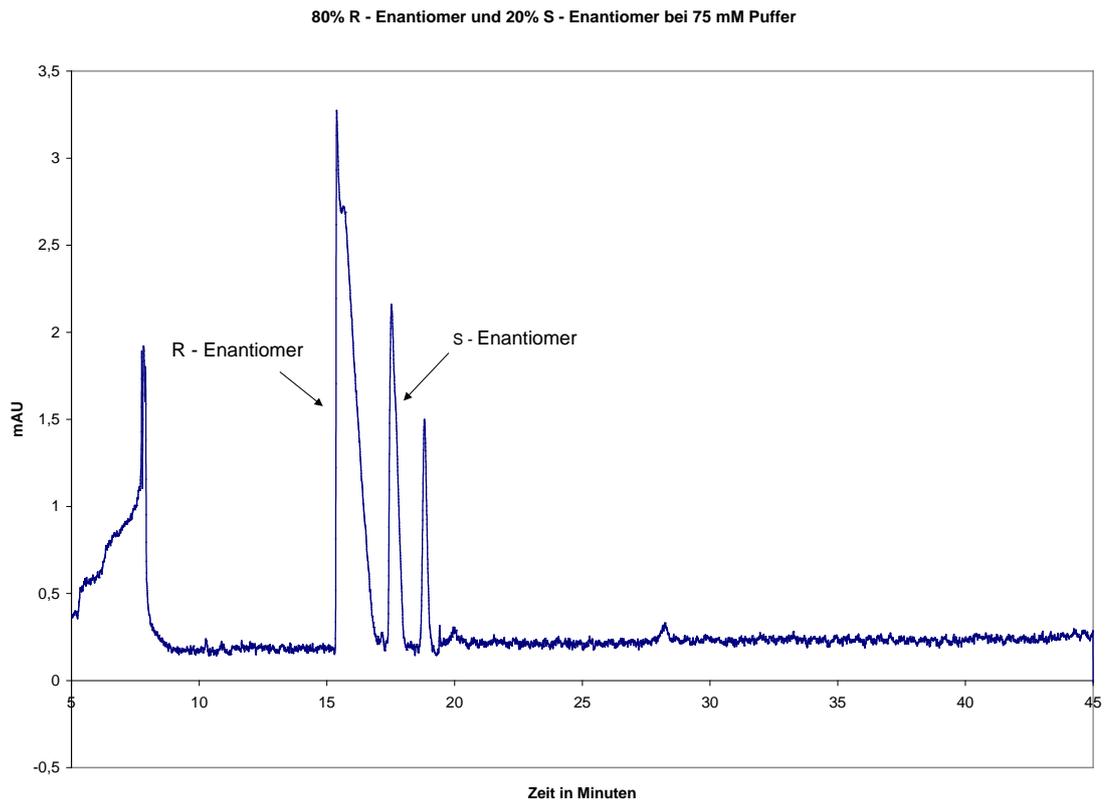


Tabelle 4.3

Migrationszeiten bei einer Spannung von 20 kV und einem 75 mM TRIS/Phosphat Puffer (Die mM im Namen bezeichnen die Konzentration des Carboxymethyl - β - Cyclodextrins und das Rep1 beziehungsweise das Rep2 steht für die jeweilige Wiederholung des Laufs)

75mM Puffer 20 kV	Migrationszeit R	Migrationszeit S
2,0 mM Rep1	13,32	14,24
2,0 mM Rep2	12,83	13,99
3,3 mM Rep1	15,21	17,28
3,3 mM Rep2	15,39	17,53

2.1.4.4 Die Parameter der endgültigen Methode

Die Methode, die für die weiteren Kalibrierungsschritte herangezogen wurde, sieht nun folgendermaßen aus. Als Puffer wird ein 100 mM TRIS - Puffer verwendet, der mit Phosphorsäure auf den pH 3,5 eingestellt wird und in dem sich eine Carboxymethyl - β - Cyclodextrinkonzentration von 3,3 mM befindet. Detektiert wurde mit einer Wellenlänge von 214 Nanometer. Die verwendete Kapillare ist bis zum Detektionsfenster 40 cm und insgesamt 50 cm lang und der Durchmesser beträgt 50 Mikrometer. Die angelegte Spannung während der Trennung beträgt 20 kV. Die Injektionsdauer beträgt 5 Sekunden und wird mit einem Druck von 0,5 psi - das sind 3,45 Kilopascal - injiziert. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit beträgt wie die Temperatur des Umgebungsraums des Puffers 16 Grad Celsius. Nach 3 Minuten wird ein Autozero durchgeführt. Die Gesamtlaufzeit beträgt 20 Minuten, wobei die Peaks, infolge der unkonstanten Retentionszeiten, zwischen 12 und 16 Minuten zu erwarten sind. Die Stoffkonzentration beträgt 50 mg/ 100ml. Der Methode werden 2 Spülschritte vorangestellt. Zuerst wird mit 0.1 normaler Natronlauge eine halbe Minute und anschließend mit dem Puffer zwei Minuten lang gespült.

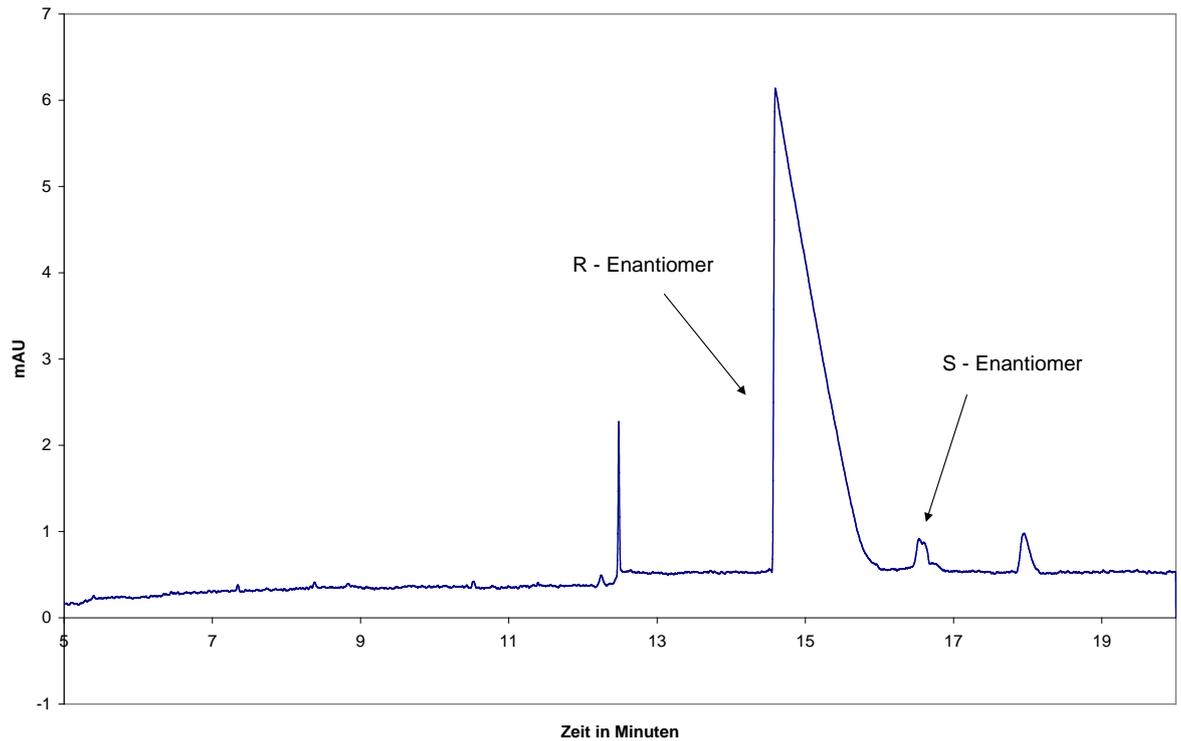
2.1.4.5 Erstellen einer Kalibrationsgerade

Um eine Kalibrationsgerade erstellen zu können, wurden Mischungen der beiden Enantiomere hergestellt. Die einzelnen Mischungen, deren Name ihrem prozentuellen Gehalt an R Enantiomer entsprechen, sind in der Tabelle 4.4 am Ende dieses Kapitels angegeben. Sämtliche Mischungen - auch jene für die Richtigkeit und Wiederholpräzision - stammen von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/100ml. Auf eine jeweils separate Einwaage wurde verzichtet, da nicht die Peakfläche an sich sondern nur das Verhältnis der Peakflächen zueinander von Bedeutung ist. Von jeder Mischung wurden 3 Wiederholungen gemacht. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander - wobei die angegebene Zahl den prozentuellen Anteil der Substanz R wiedergibt - befinden sich in der Tabelle 4.5 am Ende dieses Kapitels. Der mit 1,94 recht hohe Wert bei 0 % Substanz R zeigt die Verunreinigung des S - Enantiomers. Die Kalibrationsgerade ist am Ende dieses Kapitels mit der Funktionsgleichung und dem Bestimmtheitsmaß (R^2), welches mit 0.9992 ausreichend war, als Graphik 4.1 zu sehen. Im Anschluss an diesen Text wird eine Trennung mit der endgültigen Methode mit den Verhältnissen von 99 % R - Enantiomer und 1 % S - Enantiomer gezeigt, um die Abdeckung des unteren Bereichs (siehe Elektropherogramm 3.3) zu demonstrieren. Weiters wird noch eine Trennung mit den Verhältnissen 50 % zu 50 % (siehe Elektropherogramm 3.4) gezeigt, um das Trennvermögen der Peaks zu zeigen.

Elektropherogramm 4.3

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 99 % R - Enantiomer und 1 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

99% R - Enantiomer und 1 % S - Enantiomer



Elektropherogramm 4.4

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 50 % R - Enantiomer und 50 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

50% R - Enantiomer und 50% S - Enantiomer

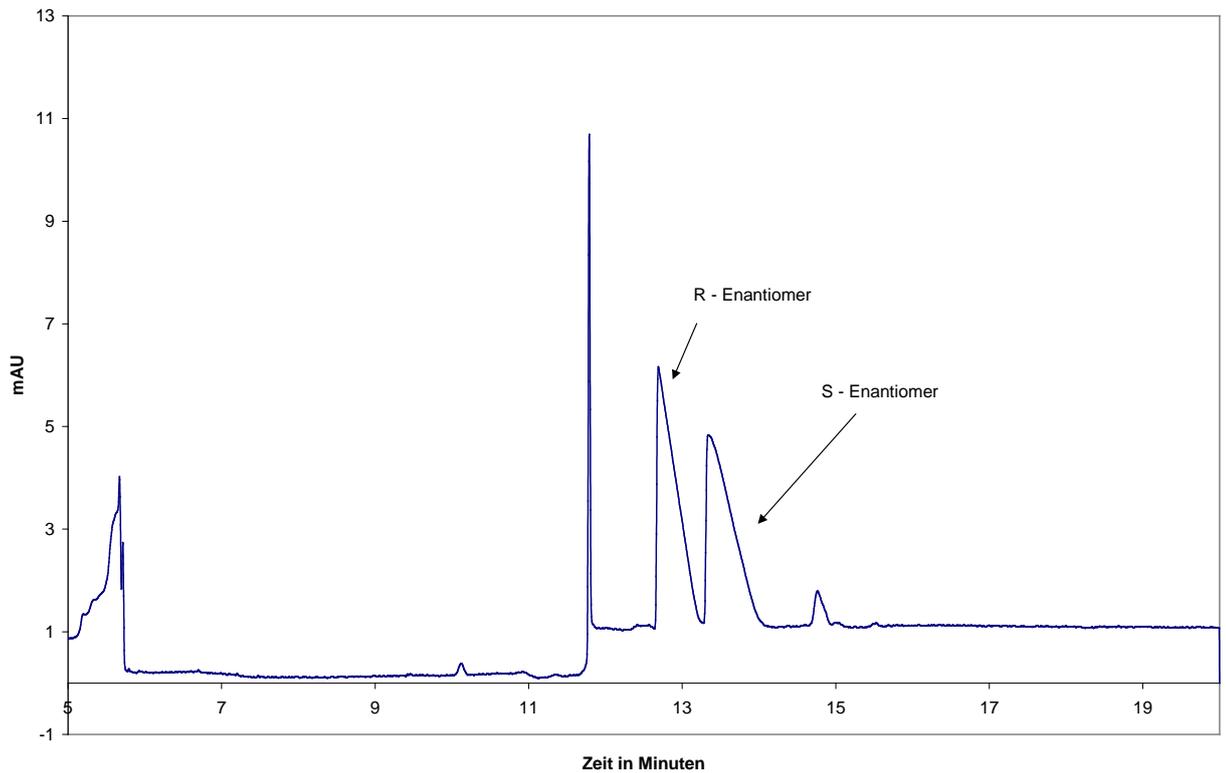


Tabelle 4.4

Einwaage der einzelnen Mischungen in Milligramm

soll % R	ist R	Ist S	ist %
100	1000	0	100
90	905,59	99,826	90,07
92,5	921,37	74,8	92,49
95	944,72	50,03	94,97
97,5	971,36	24,504	97,54
99	993,63	10,256	98,98
99,5	1002	4,226	99,58
75	744,53	254,4	74,53
50	498,91	504,07	49,74
25	252,88	754,44	25,10
10	100,09	908,17	9,93
7,5	75,198	930,57	7,48
5	48,972	959,41	4,86
2,5	24,848	979,66	2,47
1	9,988	1025,5	0,96
0,5	4,884	1004,5	0,48
0	0	1000	0

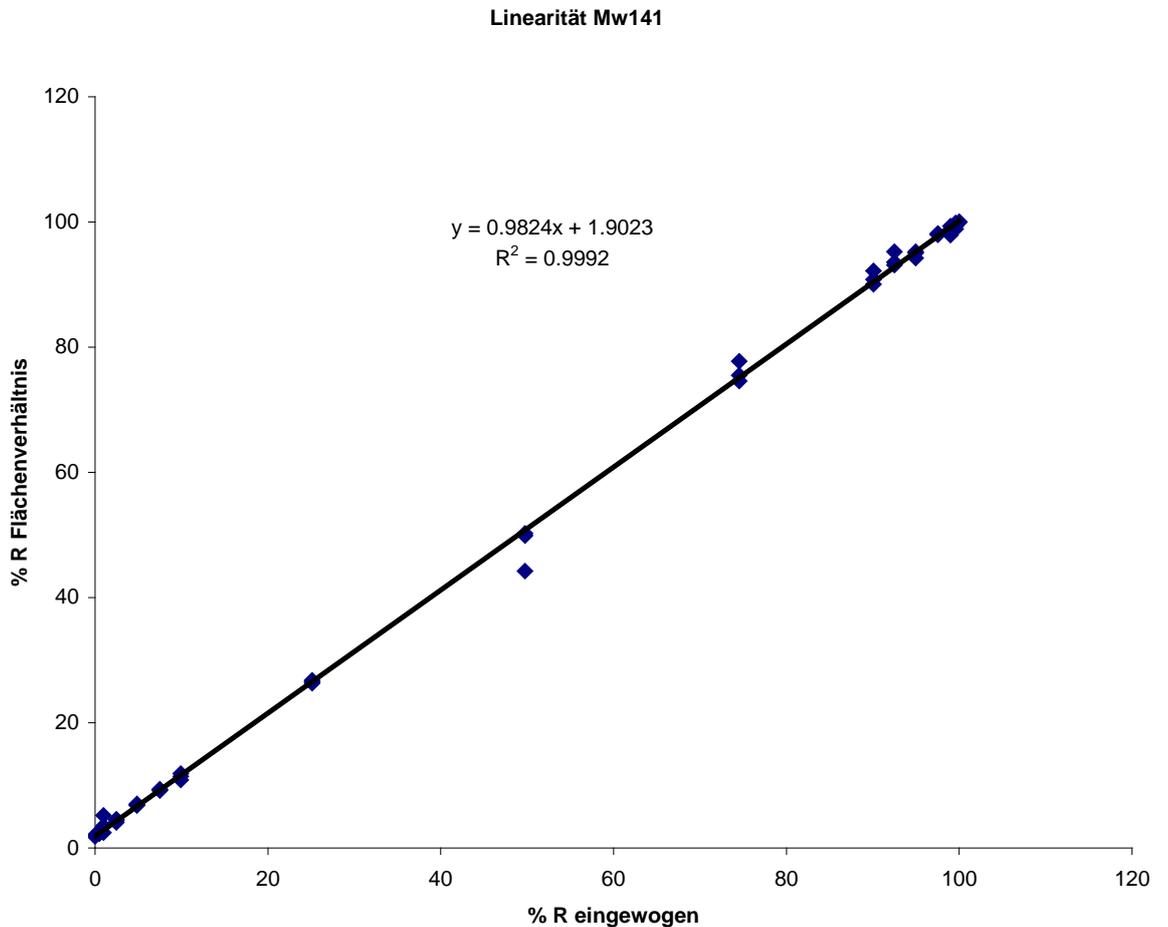
Tabelle 4.5

Verhältnisse der Peakflächen zueinander in % der Substanz R (die Abkürzungen Rep 1-3 stehen für die einzelnen Wiederholungen)

ist %	Rep1	Rep2	Rep3	Mittelwert
100	100	100	100	100,00
90,07	90,03	92,19	90,8	91,01
92,49	95,24	93,09	93,57	93,97
94,97	94,22	95,24	95,05	94,84
97,54	98,17	98,07	97,95	98,06
98,98	98,85	97,91	99,34	98,70
99,58	98,89	99,34	99,85	99,36
74,53	74,57	77,78	75,51	75,95
49,74	44,21	50,27	49,92	48,13
25,10	26,56	26,33	26,81	26,57
9,93	10,88	11,9	11,41	11,40
7,48	9,37	9,3	9,19	9,29
4,86	6,88	7,02	6,8	6,90
2,47	4,37	4,61	4,06	4,35
0,96	3,52	5,2	2,44	3,72
0,48	2,37	2,59	2,3	2,42
0	2,02	1,91	1,9	1,94

Graphik 3.1.

Kalibrationsgerade mit der Funktionsgleichung und dem Bestimmtheitsmaß



2.1.4.6 Überprüfung der Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden 3 Mischungen mit 90 %, 75 % und 10 % Anteil an Substanz R hergestellt. Die Angaben zu den Einwaagen befinden sich in Tabelle 4.6 am Ende dieses Kapitels. In der Tabelle 4.7 befinden sich die prozentuellen Anteile der Peakflächen und in der Tabelle 4.8 sind diese Anteile mittels der Kalibrationsgerade korrigiert. Als problematisch erwies sich die Tatsache, dass die Migrationszeiten bei der Richtigkeit deutlich sanken, was die Trennung so verschlechterte, dass Split - Peaks entstanden. Die Wiederfindung der Substanz befindet sich in Tabelle 4.9.1. Die Werte liegen, mit Ausnahme der dritten Wiederholung der Probe mit 10 % R Anteil, alle innerhalb von 5 Prozent Abweichung vom

tatsächlichen Gehalt. Allgemein ist zu sagen, dass die Wiederfindung bei den Proben mit einem Anteil von 90 % und 75 % Anteil an R - Enantiomer eher dem tatsächlichen Gehalt entsprechen als bei jener mit 10 %. Die Variationskoeffizienten der einzelnen Konzentrationen sind, wie deren Mittelwert und Standardabweichung, in der Tabelle 4.9.2 angegeben. Die erhaltenen Werte des Variationskoeffizienten lagen bis auf jenen mit 75 % alle unter 2 % und entsprechen somit den Vorgaben. Der Wert bei 75 % entsprach mit einem Variationskoeffizienten von 2.01 knapp nicht den Vorgaben. Auch der Variationskoeffizient für alle 9 Werte, der mit dem Mittelwert und der Standardabweichung in Tabelle 4.9.3 zu sehen ist, liegt mit 2,44 % deutlich unter den geforderten 5 %.

Tabelle 4.6

Einwaage der Mischungen für die Richtigkeit in Milligramm

soll % R	ist R	istS	ist R %
90	896,21	100,68	89,90
75	749,41	254,33	74,66
10	99,912	908,77	9,91

Tabelle 4.7

Prozentuelle Anteile der detektierten Peakflächen (Angaben in % Anteil R)

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
90	90,46	90,23	90,81
75	72,58	74,67	75,37
10	11,24	11,2	11,12

Tabelle 4.8

Mittels Kalibrationsgeradengleichung korrigierte prozentuelle Anteile der Peakflächen (Angaben in % Anteil R)

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
90	90,14	89,91	90,50
75	71,94	74,07	74,78
10	9,51	9,46	9,38

Tabelle. 4.9

Wiederfindung der Substanz R in %

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
90	100,27	100,01	100,67
75	96,36	99,21	100,16
10	95,96	95,55	94,73

Tabelle 3.9.2

Mittelwert, Standardabweichung und Wiederfindung der einzelnen Konzentrationen (RSD steht für relative Standardabweichung = Variationskoeffizient)

Mittelwert	Standardabweichung	RSD	ist R %
100,32	0,3307	0,33	89,9
98,578	1,979	2,01	74,66
95,411	0,6279	0,66	9,91

Tabelle 3.9.3

Mittelwert, Standardabweichung und Wiederfindung der gesamten Richtigkeit (RSD steht für relative Standardabweichung = Variationskoeffizient)

Mittelwert	Standardabweichung	RSD
98,10	2,40	2,44

2.1.4.7 Überprüfung der Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision der Substanz MW141 wurde mit 6 verschiedenen Einwaagen, die jeweils 90 % R - und 10 % S Enantiomer enthielten, durchgeführt. Mit jeder Einwaage wurden 3 Läufe durchgeführt. Vier Einwaagen wurden speziell für die Wiederholpräzision zubereitet und jeweils eine Einwaage (jene mit 90 % R - und 10 % S Enantiomer) wurde von der Richtigkeit und von der Linearität verwendet. Die Einwaagen befinden sich in der Tabelle 4.10 am Ende des Kapitels, wobei zu beachten ist, dass die Proben für die Linearität mit a - d, die Probe der Richtigkeit mit „R“ und die Probe der Linearität mit „L“ gekennzeichnet sind. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander sind in der Tabelle 4.11 im Anschluss an die Tabelle 4.10 zu sehen. Die mit der Einwaage korrigierten Wiederfindungen in der Tabelle 4.12 befinden sich am Ende dieses Kapitels. Im Anschluss an diese Tabelle befindet sich die Tabelle 4.13 die den Mittelwert, die Standardabweichung und vor allem die relative Standardabweichung (RSD) der korrigierten Verhältnisse der Peakflächen enthält. Auch hier trat das Problem der kürzeren Migrationszeit in Verbindung mit den Split - Peaks auf. Daher erwies sich die Integration als teilweise schwierig und musste manuell integriert werden. Zum Glück war deutlich zu erkennen wo ein Peak aufhört und der andere beginnt. Obwohl sich die Peaks nicht sehr schön trennten, blieb die relative Standardabweichung mit 2,50 im Rahmen.

Tabelle 4.10

Einwaagen für die Wiederholpräzision in Milligramm

soll % R	ist R	Ist S	ist %
a90	899,67	100,61	89,94
b90	897,68	101,05	89,88
c90	896,8	100,99	89,88
d90	895,99	100,76	89,89
L90	905,59	99,826	90,07
R90	896,21	100,68	89,90

Tabelle 4.11

Verhältnisse der Peakflächen zueinander (in % Anteil der Substanz R)

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
a90	87,92	85,45	91,93
b90	87,8	89,53	94,35
c90	92,97	89,16	92,66
d90	92,06	93,76	92,19
L90	90,03	92,19	90,8
R90	90,46	90,23	90,81

Tabelle 4.12

Korrigierte Verhältnisse der Peakflächen

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
a90	97,75	95,01	102,21
b90	97,68	99,54	104,90
c90	103,44	99,13	103,02
d90	102,41	104,25	102,50
L90	99,95	102,50	100,95
R90	100,62	100,32	100,97

Tabelle 4.13

Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung der Tabelle 4.12

Mittelwert	100,95
Standardabweichung	2,53
Relative Standardabweichung	2,50

2.1.5 Die Substanz MW 140

2.1.5.1 Herkunft der Substanz MW140

Die Enantiomere 1- Azabicyclo [2.2.2]octan-3-ol wurden von Herrn Martin Walter präparativ getrennt und für die Analytik benzyliert, wobei die R konfigurierte Verbindung rein ist und sich in der S konjugierten Verbindung die Verunreinigungen des 2. Enantiomers unter der Nachweisgrenze liegen.

[2. Noe C, Walter M]

2.1.5.2 Methodenentwicklung zur Enantiomerentrennung

2.1.5.2.1 Zu diesem Thema bereits von Herrn Walter durchgeführte Versuche

Um die Enantiomere auf der Kapillarelektrophorese trennen zu können, verwendete Herr Walter Carboxymethyl - β - Cyclodextrine in einer Konzentration von 2,0 beziehungsweise 3,3 Mol pro Liter. Der verwendete Puffer war ein 100 millimolarer (mM) TRIS/Phosphat - Puffer, der auf den pH - Wert von 3,5 eingestellt wurde. [2. Noe C, Walter M]

2.1.5.2.2 Versuche zur Verbesserung der Enantiomerentrennung mittels Variation der Cyclodextrin Konzentration

Die Trennung der Substanz MW 140 wurde mit den bereits erprobten Bedingungen - also 100mM TRIS/Phosphat - Puffer mit pH 3,5 und 3.3 beziehungsweise 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrine - getestet. Die Spannung lag bei 15 kV und das Enantiomerenverhältnis lag wie bei den restlichen Substanzen bei 4 Teilen R -Enantiomer zu einem Teil S - Enantiomer. Die Stoffmenge war - sofern es nicht anders angegeben wird - 50 mg/ 100ml. Es wurden bei keiner Cyclodextrinkonzentration Trennergebnisse erzielt. Zurückzuführen ist dies wahrscheinlich auf die mangelnde Konstanz der Migrationszeiten. Es zeigte sich speziell bei der Erstellung der Kalibrationsgerade, dass die Peaks dieser Substanz abhängig vom Zeitpunkt des Laufs zu komplett unterschiedlichen Zeitpunkten erscheinen können. Später durchgeführte Läufe variierten - in einer Sequenz mit den immer gleichen Bedingungen - bei der Laufzeit um mehr als 20 (!) Minuten. Es zeigte sich das die Migrationszeit umso kürzer war, je mehr Läufe mit derselben Methode durchgeführt wurden. Dieses Phänomen ist insofern interessant, als dass dem Trennschritt immer ein Spülschritt mit 0.1 N NaOH und ein Spülschritt mit dem Trennpuffer vorgeschaltet waren. Dadurch könnte es auch der Fall sein, dass bei der 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration eine Laufzeit von 45 Minuten nicht ausreichte um die Substanz zu detektieren, obwohl bei einer 2,0 mM Cyclodextrinkonzentration der Peak bei zirka 13 Minuten erschien. Der Peak der für die Substanz gehalten wurde

könnte eine Verunreinigung sein, die zufällig in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie die Probe vorlag. Die Vermutung liegt deshalb nahe weil der Lauf mit 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration sich am Anfang einer Sequenz mit Aminoalkoholen befand, während der Lauf mit 2 mM Cyclodextrinkonzentration nach einigen Läufen mit gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Bei einer Cyclodextrinkonzentration von 2 mM konnte, wie bereits erwähnt, bei 13 Minuten ein Peak gefunden werden, der allerdings keinerlei Anzeichen einer Auftrennung der Substanz zeigte. Im Lauf mit der Konzentration von 5,0 mM an Cyclodextrin zeigte sich wie bei der 3,3 mM Konzentration kein Peak, den man einem oder beiden Enantiomeren zuordnen könnte.

2.1.5.2.3 Versuche zur Verbesserung der Migrationszeiten mittels Variation der Spannung

Um eventuell später kommende Peaks identifizieren zu können, wurde die Spannung auf 20 kV erhöht. Die restlichen Parameter der Methode sind gleich jenen, die im Kapitel 2.1.5.2.2 angeführt wurden. Bei einer Cyclodextrinkonzentration von 5 mM wurden erneut keine Peaks gefunden. Die 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration brachte eine erstmalige Trennung der Enantiomere, wobei die Peaks zwischen 25 und 30 Minuten erschienen. Allerdings war der zweite Peak mit einer Breite von 2,14 doch relativ breit. Im Unterschied zu den bisher untersuchten Aminoalkoholen ist bei dieser Substanz das S - Enantiomer jenes, welches zuerst erscheint. In der 2. Wiederholung dieses Laufs war die Migrationszeit wieder um 2 Minuten langsamer, was untypisch ist da die Migrationszeit in der Regel dazu tendierte mit Fortdauer einer Sequenz kürzer zu werden. Die Verwendung der 2,0 mM Cyclodextrinkonzentration zeigte eine schöne Trennung zwischen 22 und 27 Minuten, was auf Grund der Tatsache, dass die Substanz beim Versuch mit 15 kV bei 13 Minuten erschien, verwunderlich ist. Die 2 Wiederholungen zeigten jedoch die Migrationszeiten betreffend eine geringe Abweichung. Die Peakbreite des 2. Peaks war jedoch mit einer gemittelten Breite von 3 noch höher als bei einer Cyclodextrinkonzentration von 3,3 mM.

2.1.5.2.4 Versuche mit einem 75 mM TRIS/Phosphat Puffer

Um die Peakbreite zu verkleinern wurde, anstatt des 100 mM TRIS/Phosphat Puffers ein Puffer mit einer Konzentration von 75 mM verwendet. Die restlichen Parameter der Methode sowie die verwendeten Cyclodextrinkonzentrationen waren analog Kapitel 2.1.5.2.3. Bei der 5 mM Cyclodextrinkonzentration wurde erstmals ein Peak bei 45 Minuten identifiziert, der allerdings keine Zeichen einer Antrennung der Enantiomere zeigte. Die 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration brachte eine Trennung der Enantiomere, wobei die Peaks zwischen 26 und 31 Minuten erschienen. Die Breite der Peaks war allerdings höher als in den vorangegangenen Versuchen. Bei der 2,0 mM Cyclodextrinkonzentration war keine Trennung zu erkennen. Die Migrationszeiten sowie die Peakflächen und die Auflösung finden sich in Tabelle 5.1 am Ende dieses Kapitels.

Elektropherogramm 5.1

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 75 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 4 Teile R - Enantiomer und 1 Teil S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

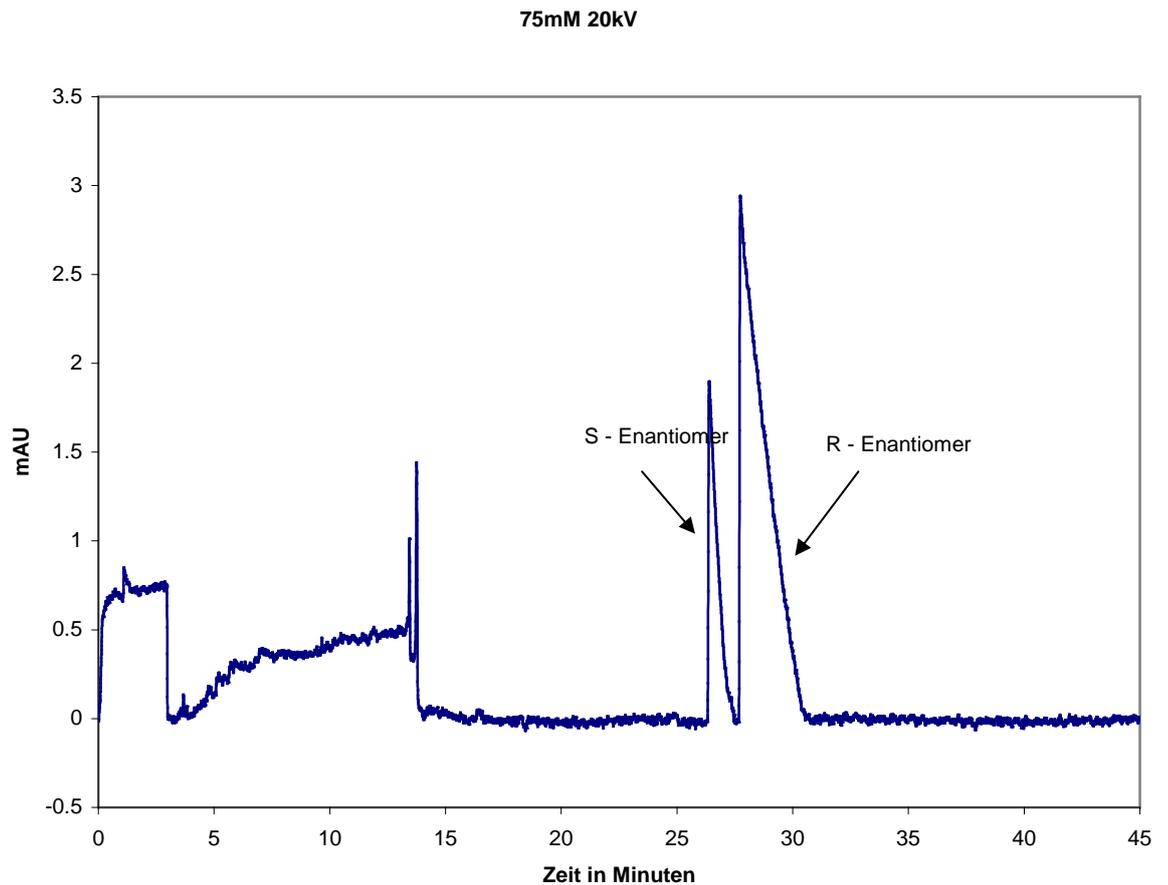


Tabelle 5.1

Migrationszeiten, Peakbreiten und Auflösung (die erste Konzentration zeigt die TRIS/Phosphat - Pufferkonzentration in mM an, die zweite die Konzentration des Cyclodextrins)

Name	Migrationszeit S	Migrationszeit R	Peakbreite S	Peakbreite R	Auflösung
75 mM 20kV 3,3mM	26,392	27,738	1,17	2,72	0,692
100 mM 20kV 2,0mM	22,337	23,325	0,97	3,38	0,454
100 mM 20kV 3,3mM	26,708	27,267	0,62	2,14	0,405

2.1.5.2.5 Versuche mit einem 100 mM TRIS/Phosphat Puffer pH 2,3

Da die Peakbreite und die Dauer der Trennungen noch immer unbefriedigend waren, wurde der Puffer auf einen pH Wert von 2,3 eingestellt. Ziel dieses Versuchs war es durch eine stärkere Protonierung der Substanz MW140 eine kürzere Migrationszeit zu erreichen. Da eine kürzere Migrationszeit in der Regel auch die Trennung der Peaks verschlechtert, wurde die Stammlösung von 50 mg/ 100 ml auf 25 mg / 100 ml verdünnt. Dies führt zu kleineren und somit auch schmäleren Peaks, wodurch die Auflösung verbessert wird. Da bislang nur mit der 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration gute Ergebnisse erzielt wurden wurde bei diesem Versuch auf eine 2,0 und 5,0 mM Cyclodextrinkonzentration verzichtet. Die Breite der Peaks sowie deren Migrationszeiten waren sehr zufrieden stellend, allerdings konnte trotz niedriger Konzentration der Stammlösung keine Basislinientrennung erreicht werden.

2.1.5.2.6 Versuche mit 10 mM γ - Cyclodextrin

Um einen neuen Ansatz zur Methodenfindung zu versuchen, wurde anstatt des Carboxymethyl - β - Cyclodextrins ein γ - Cyclodextrin verwendet. Dieser Versuch wurde gestartet, da sich ob der schlechten Ergebnisse der Verdacht aufdrängte die Ethylen-Gruppe am Piperidinol bewirke eine Art sterisches

Hindernis. Dadurch könnte sein, dass die Moleküle zuwenig mit dem Cyclodextrin interagieren. Deshalb wurde ein nicht substituiertes γ - Cyclodextrin in einer Konzentration von 10 mM verwendet. Die restlichen Versuchsbedingungen entsprachen jenen aus Kapitel 2.1.5.2.4. Die Ergebnisse waren jedoch sehr eindeutig. Der Peak der für den Stoff in Frage käme war derartig schmal ohne jegliche Zeichen von Antrennung, dass diese Idee nicht weiter verfolgt wurde.

2.1.5.2.7 Versuche zur endgültigen Findung der Methode

Um die Methode noch weiter zu verbessern, wurden weitere Versuche gestartet. Da eine neue Kapillare in Verwendung war, wurde der Versuch mit 3,3 mM Cyclodextrinkonzentration aus dem Kapitel 2.1.5.2.3 aus Gründen der Reproduzierbarkeit wiederholt. Die Ergebnisse stimmten in etwa überein, wobei diese Versuche eine leicht verbesserte Peakform aufwiesen. (siehe Elektropherogramm 5.2 im Anschluss an diesen Text) Anschließend wurde derselbe Versuch mit einer Konzentration der Stammlösung von 25 mg/ 100 ml durchgeführt. Die Migrationszeiten blieben konstant, die Auflösung und die Peakbreiten waren erwartungsgemäß leicht verbessert. Eine Erhöhung der Spannung auf 25 kV brachte zwar eine deutliche Verkürzung der Migrationszeiten, aber bereits bei einer Stoffkonzentration von 25 mg/ 100 ml eine äußerst knappe Basislinientrennung. Bei einer Stoffkonzentration von 50 mg / 100 ml konnte bei dieser Spannung keine Basislinientrennung mehr erreicht werden. Um eine eventuelle deutlichere Trennung zu erzielen wurde noch ein Versuch mit 15 kV durchgeführt. Er brachte eine ähnliche Auflösung wie der Versuch mit 20 kV, zusätzlich hatten jedoch die Peaks in etwa die gleiche Breite. Die Migrationszeiten der Versuche dieses und des letzten Kapitels sowie deren Auflösungen und die Breiten der Peaks befinden sich in Tabelle 5.3 am Ende dieses Kapitels.

Elektropherogramm 5.2

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 20 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im

Verhältnis 4 Teile R - Enantiomer und 1 Teil S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.

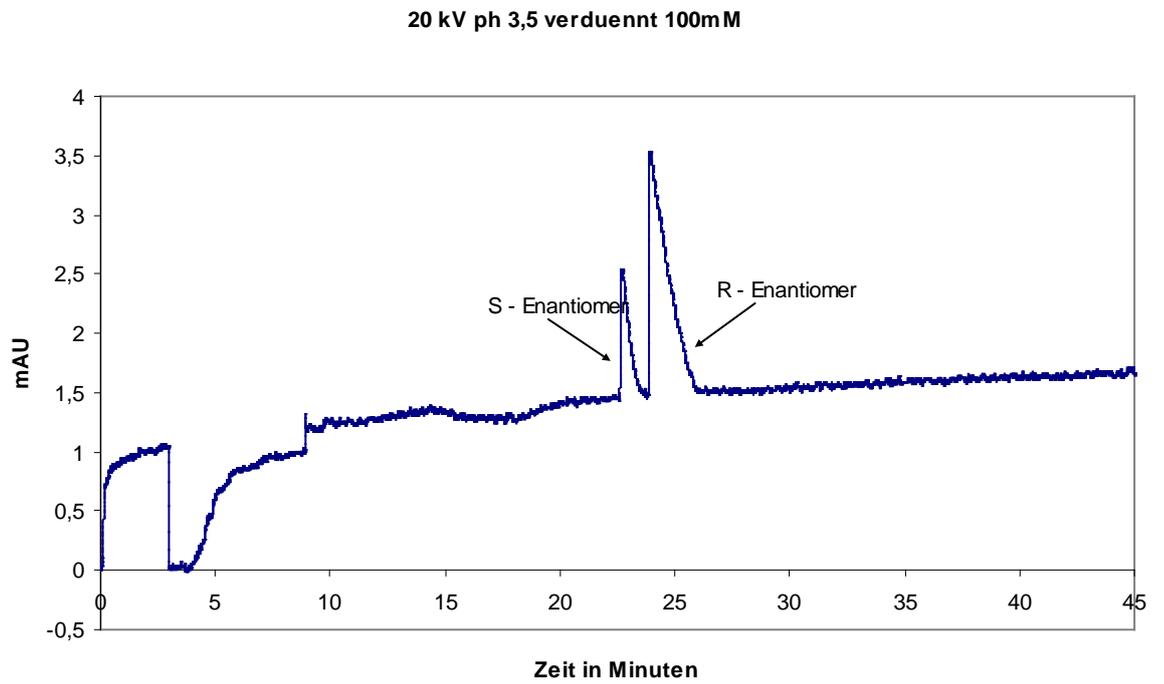


Tabelle 5.3

Migrationszeiten, Peakbreiten und Auflösungen der jeweiligen Versuche (der Puffer war ein 100 mM TRIS/Phosphat Puffer mit dem angegebenen pH Wert; die Cyclodextrinkonzentration betrug 3,3 mM; die Bezeichnung verdünnt bedeutet eine Konzentration der Stammlösung von 25mg/ 100ml, die Bezeichnung unverdünnt bedeutet 50mg/ 100ml)

Name	Migrationszeit		Peakbreite		Auflösung
	S	R	S	R	
pH 2,3 20 kV verdünnt	12,31	12,50	0,19	0,99	0,322
pH 3,5 20 kV unverdünnt	20,83	21,77	0,88	2,20	0,610
pH 3,5 20 kV verdünnt	22,68	23,89	1,05	2,23	0,738
pH 3,5 25 kV unverdünnt	13,75	14,21	0,45	1,21	0,554
pH 3,5 25 kV verdünnt	13,72	14,21	0,55	1,06	0,609
pH 3,5 15 kV verdünnt	25,804	26,446	0,84	0,94	0,721

2.1.5.3 Die Parameter der endgültigen Methode

Die Methode, die für die weiteren Kalibrierungsschritte gewählt wurde, sieht nun folgendermaßen aus. Als Puffer wird ein 100 mM TRIS - Puffer verwendet, der mit Phosphorsäure auf den pH 3,5 eingestellt wird und in dem sich eine Carboxymethyl - β - Cyclodextrinkonzentration von 3,3 mM befindet. Detektiert wurde mit einer Wellenlänge von 214 Nanometer und die Spannung während der Trennung beträgt 15 kV. Die verwendete Kapillare ist bis zum Detektionsfenster 40 cm und insgesamt 50 cm lang und der Durchmesser beträgt 50 Mikrometer. Die Injektionsdauer beträgt 5 Sekunden und wird mit einem Druck von 0,5 psi - das sind 3,45 Kilopascal - injiziert. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit beträgt wie die Temperatur des

Umgebungsraums des Puffers 16 Grad Celsius. Nach 3 Minuten wird ein Autozero durchgeführt. Die Gesamtlaufzeit beträgt 60 Minuten, wobei die Peaks, infolge der unkonstanten Retentionszeiten, zwischen 50 und 23 Minuten zu erwarten sind. Die Dauer der Methode wurde nach Stabilisation der Migrationszeiten auf einen gewissen Bereich dem Erscheinen der Peaks angepasst. Die Stoffkonzentration der Substanz beträgt 25 mg/ 100 ml. Der Methode werden 2 Spülschritte vorangestellt. Zuerst wird mit 0.1 normaler Natronlauge eine halbe Minute und anschließend mit dem Puffer zwei Minuten lang gespült. Zusätzlich wurde, nach anfänglichen Fehlversuchen bei der Kalibration, bei einer langen Sequenz nach 9 Läufen ein Spülschritt mit 0,1N Salzsäure durchgeführt.

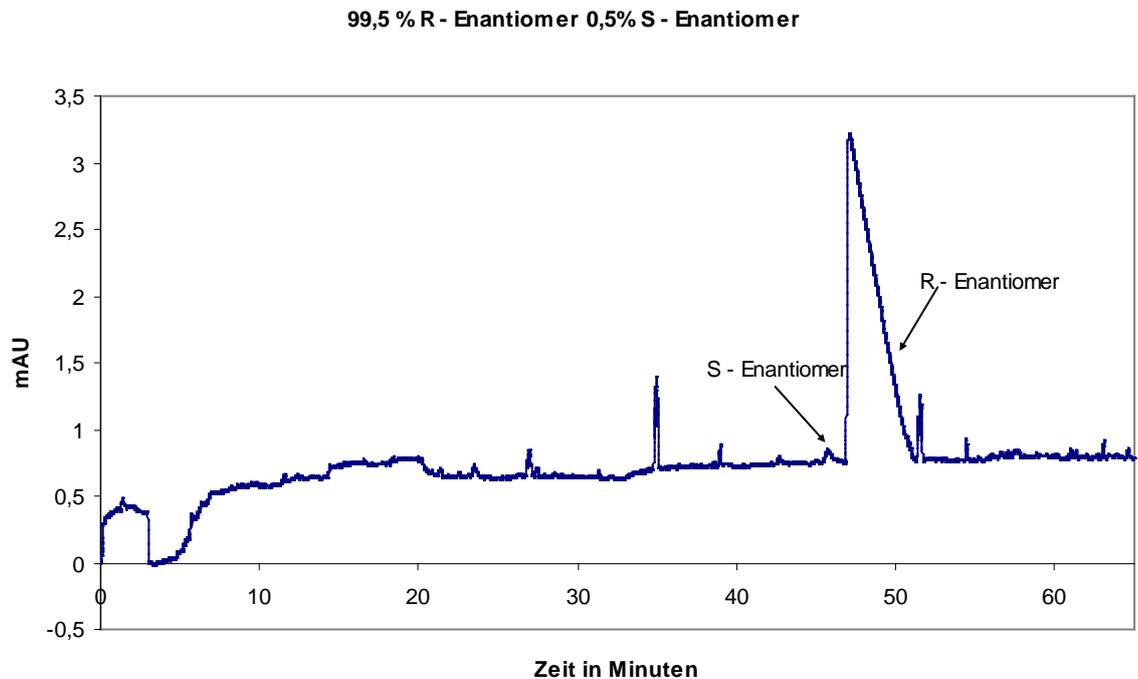
2.1.5.4 Erstellen einer Kalibrationsgerade

Um eine Kalibrationsgerade erstellen zu können, wurden Mischungen der beiden Enantiomere hergestellt. Die einzelnen Mischungen, deren Name ihrem prozentuellen Gehalt an R Enantiomer entsprechen, sind in der Tabelle 5.3 am Ende dieses Kapitels angegeben. Sämtliche Mischungen - auch jene für die Richtigkeit und Wiederholpräzision - stammen von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 25 mg/100ml. Auf eine jeweils separate Einwaage wurde verzichtet, da nicht die Peakfläche an sich sondern nur das Verhältnis der Peakflächen zueinander von Bedeutung ist. Von jeder Mischung wurden 3 Wiederholungen gemacht. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander - wobei die angegebene Zahl den prozentuellen Anteil der Substanz R wiedergibt - befinden sich in der Tabelle 5.4 am Ende dieses Kapitels. Eine Wiederholung bei 99 % Anteil an dem R - Enantiomer konnte nicht ausgewertet werden und wurde daher nicht in die Kalibrationsgerade aufgenommen. Weiters konnte das S - Enantiomer nur bis zu einer Konzentration von 2,5 % nachgewiesen werden. Da in diesem Fall eher das R - Enantiomer die für Arzneimittel verwendete Form ist, wurde dieses Manko der Methode akzeptiert. Die Kalibrationsgerade ist am Ende dieses Kapitels mit der Funktionsgleichung und dem Bestimmtheitsmaß (R^2), welches mit 0.9989 ausreichend war, als Graphik 5.1 zu sehen. Im Anschluss an diesen Text wird eine Trennung mit der endgültigen Methode

mit den Verhältnissen von 99 % R - Enantiomer und 1 % S - Enantiomer gezeigt, um die Abdeckung des unteren Bereichs (siehe Elektropherogramm 5.3) zu demonstrieren. Weiters wird noch eine Trennung mit den Verhältnissen 50 % zu 50 % (siehe Elektropherogramm 5.4) gezeigt, um das Trennvermögen der Methode zu zeigen.

Elektropherogramm 5.3

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 15 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 99 % R - Enantiomer und 1 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C.



Elektropherogramm 5.4

Trennung mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin 100 mM TRIS/Phosphat pH 3,5 und 15 kV Spannung. Die Kapillarlänge beträgt 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 cm Gesamtlänge. Die Enantiomere sind im Verhältnis 50 % R - Enantiomer und 50 % S - Enantiomer angeordnet. Die Temperatur beträgt 16 °C

50 % R - Enantiomer 50 % S - Enantiomer

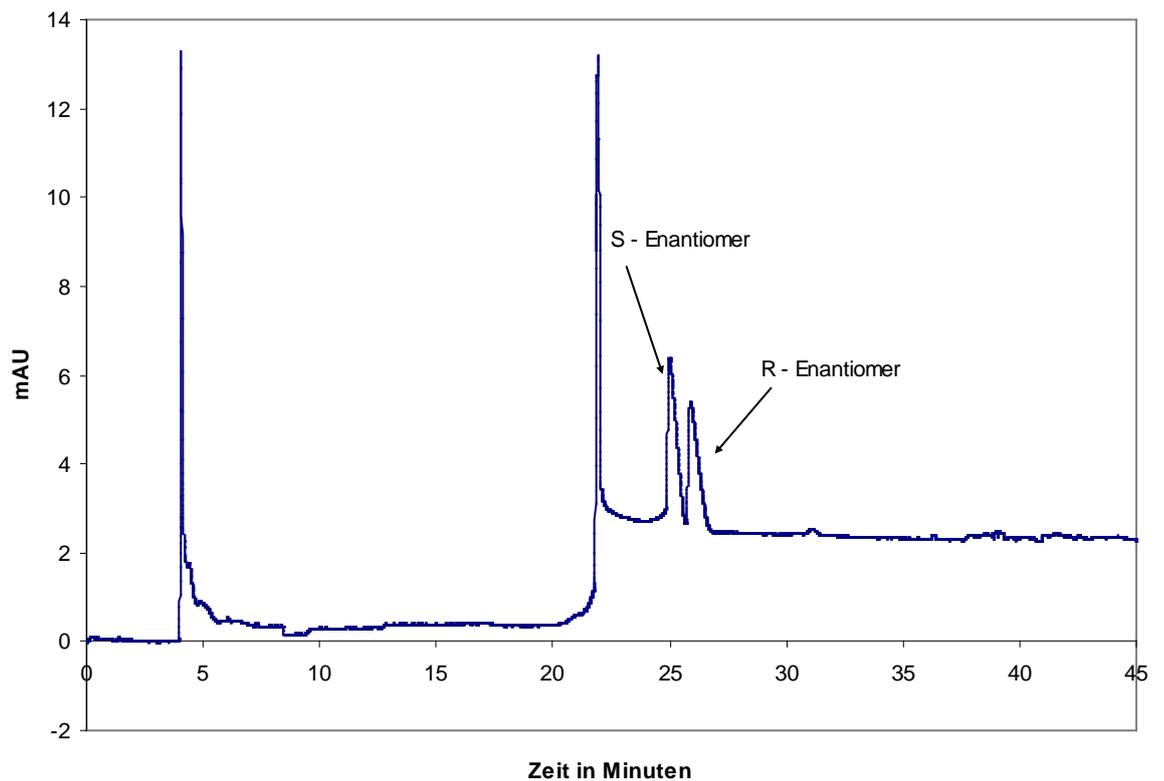


Tabelle 5.3

Einwaage der einzelnen Mischungen in Milligramm. (Das „Ist R % ext.“ steht für das exakte Verhältnis der beiden Enantiomere, da bei dieser Substanz die Stammlösungen der beiden Enantiomere nicht genau dieselbe Einwaage aufwiesen)

soll % R	Ist R	Ist S	Ist %	Ist % ext.
100	100	0	100,00	100
90	292,35	33,342	89,76	89,21
92,5	315,83	25,332	92,57	92,16
95	313,16	16,542	94,98	94,69
97,5	319,62	7,856	97,60	97,46
99	332,57	3,636	98,92	98,85
99,5	331,32	1,088	99,67	99,65
75	253,73	83,14	75,32	74,20
50	165,5	167,28	49,73	48,26
25	83,742	251,17	25,00	23,91
10	34,084	300,18	10,20	9,67
7,5	24,306	309,76	7,28	6,89
5	18,162	319,2	5,38	5,09
2,5	9,544	327,21	2,83	2,68
1	3,672	331,56	1,10	1,03
0,5	2,382	341,21	0,69	0,65
0	0	100	0,00	0

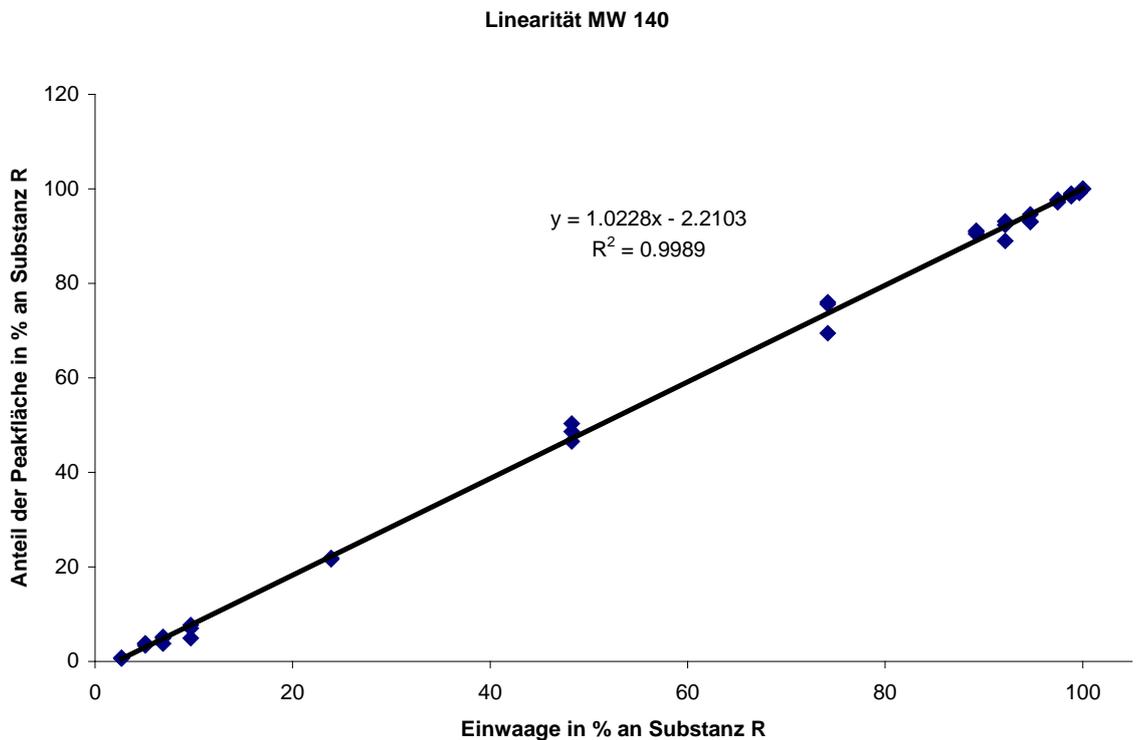
Tabelle 5.4

Verhältnisse der Peakflächen zueinander in % der Substanz R (die Abkürzungen Rep 1-3 stehen für die einzelnen Wiederholungen)

Ist % ext.	Rep1	Rep2	Rep3	Mittelwert
100	100	100	100	100,00
89,21	90,84	90,49	91,18	90,84
92,16	92,39	88,97	93,13	91,50
94,69	93,1	94,62	92,95	93,56
97,46	97,17	97,54	97,73	97,48
98,85	98,98	98,71	98,47	98,72
99,65	Nicht integrierbar	99,19	99,2	99,20
74,20	76,03	69,49	75,61	73,71
48,26	48,65	46,53	50,37	48,52
23,91	21,64	21,73	21,9	21,76
9,67	7,73	4,93	7,04	6,57
6,89	3,76	4,93	5,17	4,62
5,09	3,38	3,85	3,66	3,63
2,68	0,73	0,76	0,62	0,70

Graphik 5.1

Kalibrationsgerade mit der Funktionsgleichung und dem Bestimmtheitsmaß



2.1.5.5 Überprüfen der Richtigkeit

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden 3 Mischungen mit 90 %, 75 % und 10 % Anteil an Substanz R hergestellt. Die Angaben zu den Einwaagen befinden sich in Tabelle 5.5 am Ende dieses Kapitels. In der Tabelle 5.6 befinden sich die prozentuellen Anteile der Peakflächen und in der Tabelle 5.7 sind diese Anteile mittels der Kalibrationsgerade korrigiert. Die in der Kalibrationsgerade erwähnte Problematik mit einem niedrigen Anteil an R - Enantiomer war auch in der Richtigkeit zu sehen, da im Gegensatz zu den anderen Konzentrationen die prozentuellen Anteile der Flächen der Peaks sehr stark schwanken und sehr weit von den tatsächlichen Mischungsverhältnissen entfernt sind. Die Wiederfindung der Substanz befindet sich in Tabelle 5.8. Die Werte liegen, mit Ausnahme der Probe mit 10 % R - Enantiomer Anteil, alle innerhalb von 2,5 Prozent Abweichung. Der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung mit

und ohne Berücksichtigung der Probe befinden sich in der Tabelle 5.9.1. Die Variationskoeffizienten der einzelnen Konzentrationen sind, wie deren Mittelwert und Standardabweichung, in der Tabelle 5.9.2 angegeben. Aufgrund der beschriebenen Probleme ist es nicht verwunderlich, dass hier die Werte nicht der geforderten Norm entsprachen. Auffällig ist allerdings, dass sich die groben Abweichungen alle in der Konzentration von 10 % Anteil des R Enantiomers befinden. Die Proben der Mischungen mit hohem R - Enantiomer - Anteil (also 75 und 90 Prozent) weisen mit Variationskoeffizienten von 0.62 beziehungsweise 0,04 sehr gute Werte auf. Die Wiederfindung liegt bei diesen Proben auch nicht allzu weit vom tatsächlichen Wert entfernt. Die Probe mit den 10 % R - Enantiomer - Anteil liegt mit einem Variationskoeffizient von über 11 % allerdings deutlich über den erlaubten Abweichungen. Dies legt, ebenso wie die Tatsache, dass man bei Proben mit einem Gehalt unter 2,5 % Anteil an R - Enantiomer keine Peaks des R - Enantiomers findet, die Vermutung nahe, dass diese Methode zur Detektion von niedrigen Anteilen an Enantiomer R absolut ungeeignet ist. Auch der Variationskoeffizient für alle 9 Werte, der mit dem Mittelwert und der Standardabweichung in Tabelle 5.9.3 zu sehen ist, liegt mit 5,96 % deutlich über den geforderten 5 %. Würde man die Läufe mit den 10 % Anteil an R - Enantiomer jedoch nicht berücksichtigen würde man mit 0,80 einen ausgezeichneten Wert erhalten. Allerdings hat man anstatt der 9 geforderten Werte nur noch 6 zur Verfügung.

Tabelle 5.5

Einwaagen in Milligramm mit korrigierten prozentuellen Verhältnissen. (Das „Ist R % ext.“ steht für das exakte Verhältnis der beiden Enantiomere, da bei dieser Substanz die Stammlösungen der beiden Enantiomere nicht genau dieselbe Einwaage aufwiesen)

soll % R	Ist R	Ist S	Ist R %	Ist R % ext.
90	305,06	32,618	90,34	89,81
75	250,53	82,4	75,25	74,13
10	33,042	302,71	9,84	9,33

Tabelle 5.6

Prozentuelle Anteile der detektierten Peakflächen (Angaben in % Anteil R)

Ist R % ext.	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
89,81	89,63	90,66	90,6
74,13	75,09	75,15	75,15
9,33	8,26	6,46	8,52

Tabelle 5.7

Mittels Kalibrationsgeradengleichung korrigierte prozentuelle Anteile der Peakflächen (Angaben in % Anteil R)

Ist R % ext.	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
89,81	89,79	90,80	90,74
74,13	75,58	75,64	75,64
9,33	10,24	8,48	10,49

Tabelle 5.8

Wiederfindung des Enantiomers R (Angaben in % Anteil R)

Ist R % ext.	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
89,81	99,98	101,10	101,03
74,13	101,95	102,03	102,03
9,33	109,73	90,87	112,46

Tabelle 5.9.1

Mittelwert, Standardabweichung und relative Standardabweichung der Wiederfindung (mit steht für Daten inklusive der 10 % Anteil R und ohne steht für Daten exklusive der 10 % Anteil R; RSD steht für relative Standardabweichung)

	Mittelwert	Standardabweichung	RSD
Mit	102,35	6,10	5,96
Ohne	101,35	0,81	0,80

Tabelle 5.9.2

Mittelwert, Standardabweichung und Wiederfindung der einzelnen Konzentrationen (RSD steht für relative Standardabweichung = Variationskoeffizient)

Mittelwert	Standardabweichung	RSD
100,70	0,63	0,62
102,00	0,05	0,04
104,35	11,76	11,27

Tabelle 5.9.3

Mittelwert, Standardabweichung und Wiederfindung der gesamten Richtigkeit (RSD steht für relative Standardabweichung = Variationskoeffizient)

	Mit	ohne
MW	102,35	101,35
Standardabweichung	6,10	0,81
RSD	5,96	0,80

2.1.5.6 Überprüfung der Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision der Substanz MW140 wurde mit 6 verschiedenen Einwaagen, die jeweils 90 % R - und 10 % S Enantiomer enthielten, durchgeführt. Mit jeder Einwaage wurden 3 Läufe durchgeführt. Vier Einwaagen wurden speziell für die Wiederholpräzision zubereitet und jeweils eine Einwaage (jene mit 90 % R - und 10 % S Enantiomer) wurde von der Richtigkeit und von der Linearität verwendet. Die Einwaagen befinden sich in der Tabelle 5.10 am Ende des Kapitels, wobei zu beachten ist, dass die Proben für die Linearität mit a - d, die Probe der Richtigkeit mit „R“ und die Probe der Linearität mit „L“ gekennzeichnet sind. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander sind in der Tabelle 5.11 im Anschluss an die Tabelle 5.10 zu sehen. Die mit der Einwaage korrigierten Wiederfindungen in der Tabelle 5.12 befinden sich am Ende dieses Kapitels. Im Anschluss an

diese Tabelle befindet sich die Tabelle 5.13 die den Mittelwert, die Standardabweichung und vor allem die relative Standardabweichung (RSD) der korrigierten Verhältnisse der Peakflächen enthält. Da bei der Wiederholpräzision eine Konzentration mit einem hohen Anteil an R - Enantiomer verwendet wurde, waren die RSD mit einem Wert von unter 1 % sehr gut. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Methode bei einem geringen Anteil an S - Enantiomer funktionieren dürfte.

Tabelle 5.10

Einwaagen zur Wiederholpräzision in Milligramm (Das „Ist R % ext.“ steht für das exakte Verhältnis der beiden Enantiomere, da bei dieser Substanz die Stammlösungen der beiden Enantiomere nicht genau dieselbe Einwaage aufwiesen)

soll % R	ist R	ist S	ist %	ist % ext.
a90	304,75	34,226	89,90	89,35
b90	303,33	34,058	89,91	89,36
c90	300,24	28,45	91,34	90,87
d90	303,34	28,45	91,43	90,95
L90	292,35	33,342	89,76	89,21
R90	305,06	32,618	90,34	89,81

Tabelle 5.11

Verhältnisse der Peakflächen zueinander (in % Anteil der Substanz R)

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
a90	91,53	90,49	91,41
b90	91,44	91,67	91,65
c90	93,07	93,56	93,22
d90	92,56	92,11	92,5
L90	90,84	90,49	91,18
R90	89,63	90,66	90,6

Tabelle 5.12

Korrigierte Verhältnisse der Peakflächen

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
a90	91,65	90,63	91,53
b90	91,56	91,79	91,77
c90	93,16	93,64	93,30
d90	92,66	92,22	92,60
L90	90,98	90,63	91,31
R90	89,79	90,80	90,74

Tabelle 5.13

Wiederfindung der Substanz (in % Anteil R)

soll % R	Wiederholung 1	Wiederholung 2	Wiederholung 3
a90	102,57	101,43	102,44
b90	102,47	102,72	102,70
c90	102,52	103,05	102,68
d90	101,88	101,39	101,81
L90	101,98	101,60	102,36
R90	99,98	101,10	101,03

Tabelle 5.14

Mittelwert, Standartabweichung und relative Standartabweichung der Tabelle 5.13

Mittelwert	101,98
Standartabweichung	0,78
RSD	0,77

2.1.6 Die Substanzen MW 178 und MW 35

Die Substanzen MW 178 und MW 35 sind Derivatisierungsprodukte des 1-Methyl 3- Pyrrolidinols. Diese Substanzen zeigten in den Vorversuchen entweder keine Peaks beziehungsweise keine Trennung. Im Falle des MW 178 könnte die geringere Stabilität des Thioesters dafür verantwortlich sein. Die Substanz MW 35 ist wahrscheinlich für ein β - Cyclodextrin zu groß, da die Nitrogruppen am Aromat eine sterische Hinderung darstellen. Da das 1-Methyl 3- Pyrrolidinol auch mittels der Substanz MW 140 nachgewiesen werden kann, die in den Vorversuchen viel bessere Ergebnisse zeigte, wurden die Versuche mit diesen Substanzen relativ schnell eingestellt.

2.2 Nebivolol

2.2.1 Herkunft und Extraktion von Nebivolol

Nebivolol wurde aus „Nebilet“® - Tabletten, die 5 Milligramm des Wirkstoffs enthielten extrahiert. Hierzu wurden sechs Tabletten mit einem Gesamtgewicht von 1,3873 Gramm mit dem Mörser pulverisiert. Extrahiert wurde zwei Mal mit jeweils 5 Millilitern Methanol, die durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 45 μm gepresst wurden. Da diese Filter relativ schnell verstopfen, wurde nach der Hälfte ein neuer Spritzenfilter verwendet um eine Verstopfung zu vermeiden. Die zwei verwendeten Filter wurden jeweils mit 1 Milliliter gewaschen. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von zirka 12 Millilitern. Die Flüssigkeitsmenge wurde deshalb nicht so genau bestimmt, da diese Extraktion nur den Vorversuchen zur Entwicklung einer Methode diente, die darauf abzielt die Enantiomere zu trennen. Deshalb ist auch die genaue Stoffmenge von sekundärer Bedeutung, da die Methode noch nicht dazu dient, den Gesamtgehalt an Nebivolol in einer Tablette zu bestimmen. Eine zweite Extraktion, in der 1,3678 Gramm mit derselben Vorgehensweise in ein Flüssigkeitsvolumen

von insgesamt 7 Millilitern extrahiert wurde, wurde für die Versuche mit γ Cyclodextrin verwendet.

2.2.2 Vorversuche zur Trennung der beiden Enantiomere

2.2.2.1 Versuche mit 50 mM Ammoniumacetatpuffer, der mit Essigsäure auf pH 4,0 eingestellt wurde

2.2.2.1.1 Versuche ohne Cyclodextrine

Am Anfang wurde die Substanz ohne Cyclodextrine mit dem in der Überschrift genannten Puffer durch die Kapillare geschickt, um zu sehen ob die Extraktion erfolgreich verlaufen war. Des Weiteren dienten diese Versuche dazu festzustellen, ob die Migrationszeiten der Peaks konstant sind. Es zeigte sich, dass die Peaks bei einer Spannung von 15 kV bei 34, bei einer Spannung von 20 kV bei 21 Minuten erschienen. Die Peaks waren erwartungsgemäß sehr schmal und entsprachen in ihrer Höhe in etwa dem geforderten Bereich von 0.02 AU. Dies zeigte, dass die Extraktion erfolgreich verlaufen war, da ansonsten keine Peaks vorhanden gewesen wären. Zusätzlich war die Peakhöhe eine Bestätigung, dass die Konzentration der extrahierten Substanz für die Entwicklung einer Methode geeignet ist.

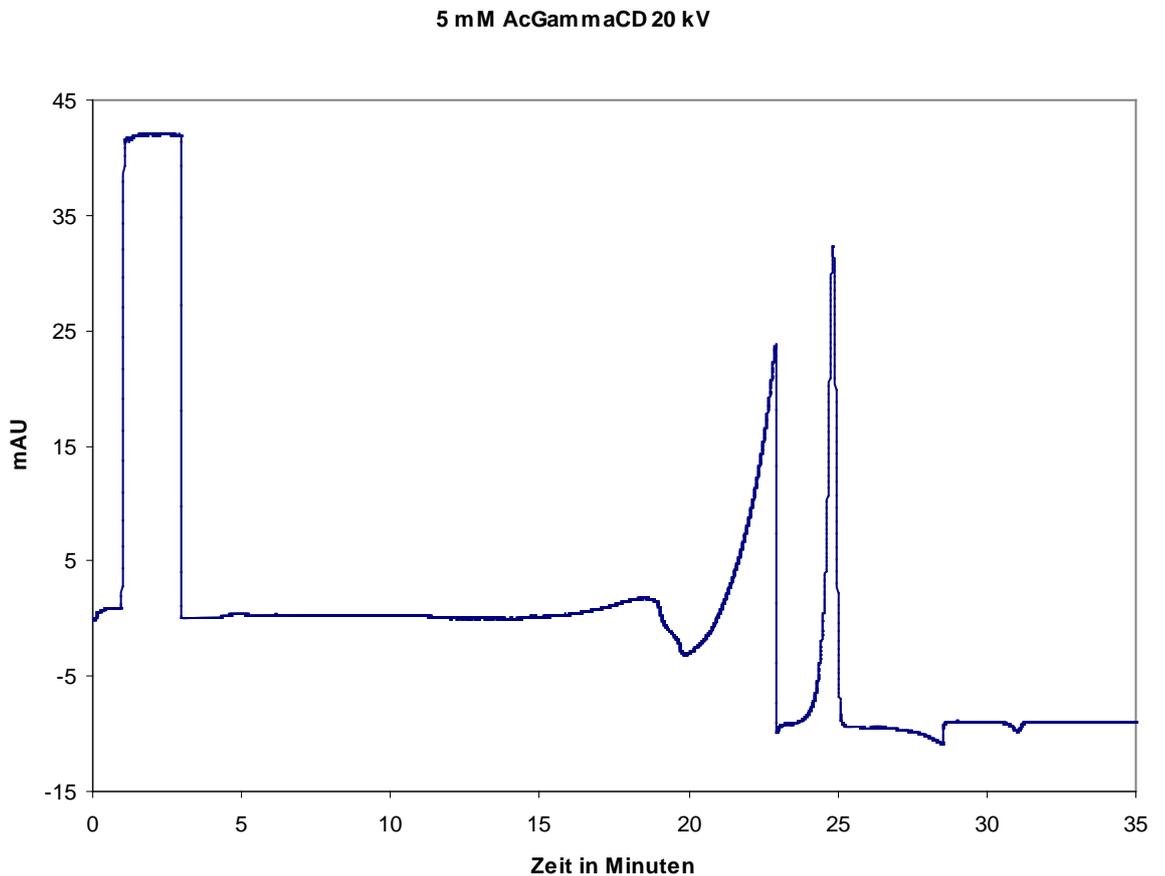
2.2.2.1.2 Versuche mit acetyliertem γ - Cyclodextrin

Wie bereits in der Überschrift angekündigt wird, war der Puffer mit welchen in diesem Kapitel gearbeitet wurde eine wässrige 50 mM Ammoniumacetat - Lösung, die mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH von 4,0 eingestellt wurde. Das verwendete Cyclodextrin war ein Acetyl - γ - Cyclodextrin, welches in 3,0 mM und 5,0 mM Konzentration verwendet wurde. Zuerst wurde eine Spannung von 20 kV angelegt. Bei einer Cyclodextrinkonzentration von 3,0 mM war bei dieser Spannung keine Trennung zu sehen. Bei 15 kV war eine Trennung der Peaks zwischen 30

und 40 Minuten sichtbar. Bei 10 kV fand diese Trennung um 40 Minuten statt. Alle Läufe hatten gemeinsam, dass der erste Peak ein sehr starkes Leading aufwies. Eine weitere Überraschung war, dass die Trennung bei 15 kV deutlicher war als bei 10 kV. Allerdings war bei 15 kV das Leading des ersten Peaks auch größer. Bei einer Cyclodextrinkonzentration von 5,0 mM zeigten die Läufe schon bei 25 kV eine schöne Trennung auf. Das Problem des Leadings des ersten Peaks blieb allerdings bestehen, was zur Folge hatte, dass die Breite 3,45 Minuten betrug. Die Peaks erschienen bei dieser Methode allerdings schon zwischen 20 und 25 Minuten. Die Versuche mit 5 mM Cyclodextrinkonzentration wurden noch mit 20 kV (siehe Elektropherogramm 6.1), 15 und 10 kV getestet, was auf die Trennung jedoch kaum einen Einfluss hatte. Einzig die Migrationszeiten stiegen erwartungsgemäß an.

Elektropherogramm 6.1

50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4 mit 5 mM acyliertem γ - Cyclodextrinkonzentration. Länge der Kapillare bis zum Detektorfenster 50 Zentimeter bei einer Gesamtlänge von 60 Zentimeter mit 50 μ m Durchmesser. Spannung bei der Trennung 20 kV



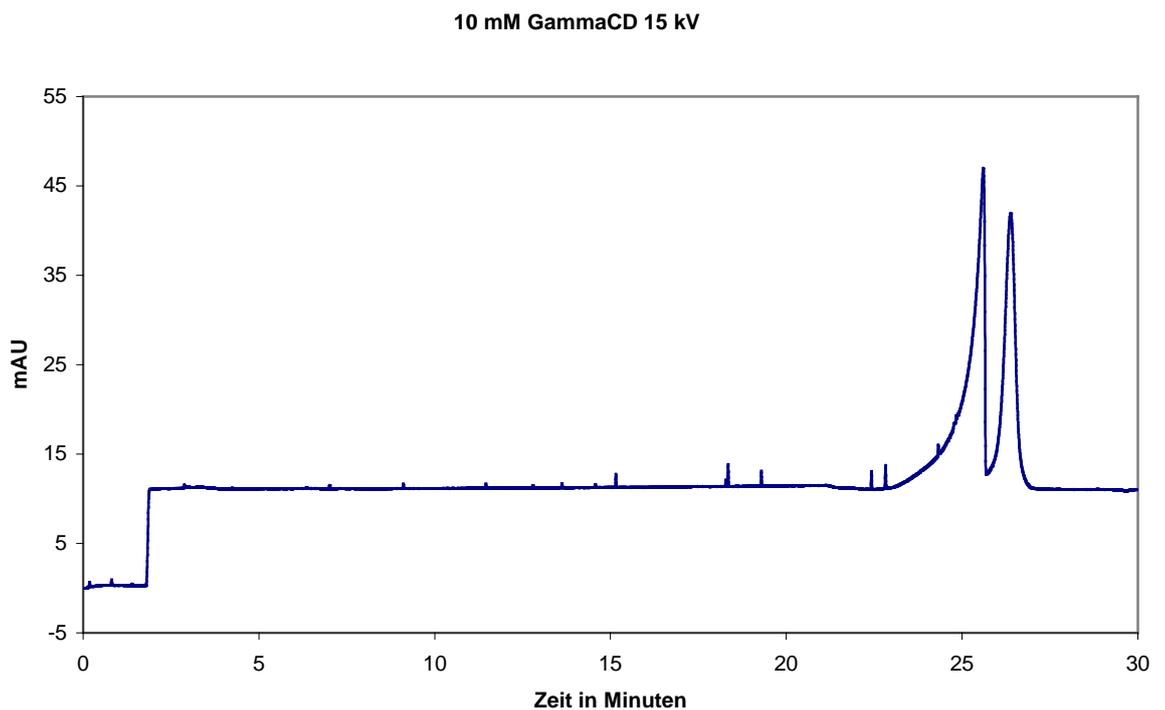
2.2.2.1.3 Versuche mit γ - Cyclodextrin

Da trotz teilweiser guter Trennergebnisse sowohl die Peakform als auch die Migrationszeiten nicht den gewünschten Resultaten entsprachen, wurde nun mit γ - Cyclodextrin ein etwas hydrophileres Cyclodextrin verwendet. Die Cyclodextrinkonzentration, die in dieser Versuchsreihe getestet wurde, war die oben genannten 5,0 mM. Zusätzlich wurde auch noch eine 10 mM Cyclodextrinlösung ausprobiert. Auf Versuche mit einer 3 mM Cyclodextrinlösung wurde wegen der schlechten Ergebnisse mit acetyliertem γ - Cyclodextrin verzichtet. Mit einer Spannung von 15 kV zeigte die 10 mM

Cyclodextrinkonzentration bereits viel versprechende Ergebnisse, da trotz erhöhter Stoffmenge bei 26 Minuten eine Basislinientrennung zu erkennen war. Zusätzlich konnte bei diesen Peaks kaum ein Leading beobachtet werde. Wenn man die Cyclodextrinkonzentration auf 5 mM reduzierte, war die Trennung bei gleichen Bedingungen nicht mehr so vollständig. Trotzdem waren die Peaks gut integrierbar und die Peaks erschienen bereits 5 Minuten früher.

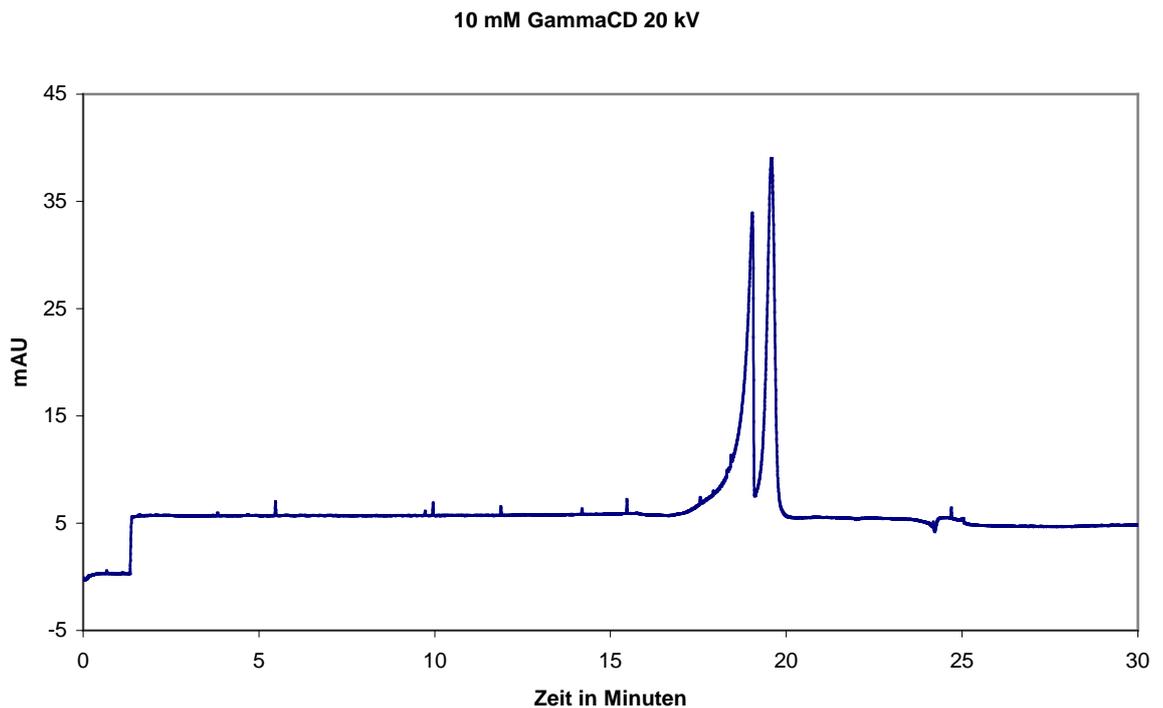
Elektropherogramm 6.2

50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4 mit 10 mM γ - Cyclodextrinkonzentration. Länge der Kapillare bis zum Detektorfenster 50 Zentimeter bei einer Gesamtlänge von 60 Zentimeter mit 50 μ m Durchmesser. Spannung bei der Trennung 15 kV



Elektropherogramm 6.3

50 mM Ammoniumacetatpuffer pH 4 mit 10 mM γ -Cyclodextrinkonzentration. Länge der Kapillare bis zum Detektorfenster 50 Zentimeter bei einer Gesamtlänge von 60 Zentimeter mit 50 μm Durchmesser. Spannung bei der Trennung 20 kV



2.2.2.2 Versuche mit 40 mM Ammoniumacetatpuffer, welcher mit Essigsäure auf einen pH von 4 eingestellt wurde

Um das Leading zu minimieren und die Migrationszeiten zu verkürzen wurde die Pufferkonzentration erniedrigt. Die Versuche wurden mit denselben 2 Cyclodextrinen wie im Kapitel 2.2.2.1 durchgeführt. Auch die Konzentrationen wurden nicht verändert. Es wurden allerdings nicht alle Konzentrationen ausprobiert, da mit dem niedriger konzentrierten Puffer zwar das Leading entfiel, allerdings auch in keinem der gestarteten Versuche eine Trennung erzielt werden konnte. Deshalb wurde diese Versuchsreihe abgebrochen.

2.2.2.3 Versuche mit 40 mM Ammoniumacetatpuffer, welcher mit Essigsäure auf einen pH von 3 eingestellt wurde

Dieser Puffer wurde nur mit 10 mM γ - Cyclodextrinlösung getestet. Die verwendeten Spannungen betragen 10, 15 und 20 kV. Um eine Trennung zu erzielen wurde die Nebivololextraktion aus Kapitel 2.2.1, bei der ein Gesamtvolumen von 12 Millilitern Methanol verwendet wurde, mit Puffer 1:4 verdünnt. Auch hier konnte keine Trennung festgestellt werden, weshalb keine weiteren Versuche mit diesem Puffer gestartet wurden.

2.2.3 Am besten geeignete Methode

Da sich die Migrationszeiten nicht weiter verkürzen ließen ohne an Trennschärfe zu verlieren, wurde die Methode aus Kapitel 2.2.2.1.3 mit einer Spannung von 15 kV verwendet. Die Bedingungen der Methode waren wie folgt: Als Trennmedium wird ein mit Essigsäure auf pH 4 eingestellter 50 mM Ammoniumacetatpuffer mit 10 mM γ - Cyclodextrinkonzentration verwendet. Die Länge der Kapillare bis zum Detektorfenster beträgt 50 Zentimeter bei einer Gesamtlänge von 60 Zentimeter mit 50 μ m Durchmesser. Die angelegte Spannung während der Trennung liegt bei 15 kV. Detektiert wurde bei 214 nm. Der Trennung wurde jeweils ein Spülschritt mit 0,1 N Natronlauge und ein Spülschritt mit dem verwendeten Trennmedium vorangestellt.

3 Experimenteller Teil

3.1 Puffer und Extraktionen und Stammlösungen

3.1.1 Puffer

- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5:** Es wurden 2,423g TRIS in 200 mL Hplc Grade Wasser gelöst. Die Abweichung von der oben genannten Einwaage betrug maximal 0,001g. Das Wasser wurde in 6 Portionen mit einer 50 mL Vollpipette, deren Fehlergrenze bei $\pm 0,035$ mL ist, hinzugefügt. Die Homogenisierung des Puffers erfolgte mittels Rühren mit einem Magnetrührstäbchen. Während des Rührens wurde Phosphorsäure zugegeben bis das pH - Meter den Wert 3,50 anzeigte. Die maximale Abweichung von diesem Wert betrug 0,02.
- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 2,3:** Es wurden 1,211g TRIS in 100 mL Hplc Grade Wasser gelöst. Die Abweichung von der oben genannten Einwaage betrug maximal 0,001g. Das Wasser wurde in 2 Portionen mit einer 50 mL Vollpipette, deren Fehlergrenze bei $\pm 0,035$ mL ist, hinzugefügt. Die Homogenisierung des Puffers erfolgte mittels Rühren mit einem Magnetrührstäbchen. Während des Rührens wurde Phosphorsäure beigemischt bis der pH - Meter den Wert 2,30 anzeigte. Die maximale Abweichung von diesem Wert betrug 0,01.
- **75 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5:** 50,0 mL des *100 mM TRIS/Phosphatpuffers pH 3,5* wurden mit 25 mL Hplc Grade Wasser versetzt. Das Wasser wurde mit einer 25 mL Vollpipette, deren Fehlergrenzen bei $\pm 0,03$ mL liegen, hinzugefügt.
- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** 10,0 mL des *100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5* wurden mit 23,9 mg des Carboxymethyl - β - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage betrug $\pm 0,2$ mg. Um das Cyclodextrin

in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 20 Minuten am Ultraschallbad behandelt.

- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5 mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *100 mM TRIS/Phosphatpuffers pH 3,5 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 39,4 mg mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,2$ mg.
- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5 mit 5,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *100 mM TRIS/Phosphatpuffers pH 3,5 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 59,8 mg mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,2$ mg.
- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 2,3 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** 10,0 mL des *100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 2,3* wurden mit 23,9 mg des Carboxymethyl - β - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage betrug $\pm 0,2$ mg. Um das Cyclodextrin in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 20 Minuten am Ultraschallbad behandelt.
- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 2,3 mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *100 mM TRIS/Phosphatpuffers pH 2,3 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 39,4 mg mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,2$ mg.
- **100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 2,3 mit 5,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *100 mM TRIS/Phosphatpuffers pH 3,5 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 59,8 mg mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ mg.
- **75 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** 10,0 mL des *75 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5* wurden mit 23,8 mg des Carboxymethyl - β - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage betrug $\pm 0,1$ mg. Um das Cyclodextrin

in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 20 Minuten am Ultraschallbad behandelt.

- **75 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5 mit 3,3 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *75 mM TRIS/Phosphatpuffers pH 3,5 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 39,4 mg mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,2$ mg.
- **75 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5 mit 5,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *100 mM TRIS/Phosphatpuffers pH 3,5 mit 2,0 mM Carboxymethyl - β - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 59,8 mg mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,2$ mg.
- **50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0:** Es wurden 0,771g Ammoniumacetat in 200 mL Hplc Grade Wasser gelöst. Die Abweichung von der oben genannten Einwaage betrug maximal 0,001g. Das Wasser wurde in 2 Portionen mit einer 50 mL Vollpipette, deren Fehlergrenze bei $\pm 0,035$ mL liegt, hinzugefügt. Die Homogenisierung des Puffers erfolgte mittels Rühren mit einem Magnetrührstäbchen. Während des Rührens wurde Essigsäure beigemischt bis der pH - Meter den Wert 4,00 anzeigte. Die maximale Abweichung von diesem Wert betrug 0,02.
- **40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0:** 10,0 mL des *50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0* wurden mit 2,5 mL Hplc Grade Wasser versetzt. Die 2,5 mL Hplc Grade Wasser wurden mit einer 2,5 mL Kolbenhubpipette hinzugefügt.
- **40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 3,0:** 10,0 mL des *40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0* wurden mit Essigsäure unter Rühren mit einem Magnetrührstäbchen auf den pH von 3,00 eingestellt. Die maximale Abweichung vom pH Wert betrug 0,02.
- **50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 3,0 mM Acetyl - γ - Cyclodextrin:** 10,0 mL des *50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0* wurden mit 0,0406 g des Acetyl - γ - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage

betrug $\pm 0,1$ mg. Um das Cyclodextrin in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 25 Minuten am Ultraschallbad behandelt.

- **50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 5,0 mM Acetyl - γ - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 3,0 mM Acetyl - γ - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 0,0677 g mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ mg.
- **50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 10,0 mM γ - Cyclodextrin:** 10,0 mL des 50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0 wurden mit 0,1297 g des γ - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage war $\pm 0,1$ mg. Um das Cyclodextrin in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 25 Minuten am Ultraschallbad behandelt.
- **50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 5,0 mM γ - Cyclodextrin:** 4,0 mL des 50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0 mit 10 mM γ - Cyclodextrin wurden mit 4,0 mL des 50 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0 versetzt. Die Lösungen wurden in 2 Pipettiervorgängen mittels einer 2,5 mL Kolbenhubpipette entnommen beziehungsweise hinzugefügt.
- **40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 3,0 mM Acetyl - γ - Cyclodextrin:** 10,0 mL des 40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0 wurden mit 0,0406 g des Acetyl - γ - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage betrug $\pm 0,1$ mg. Um das Cyclodextrin in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 25 Minuten am Ultraschallbad behandelt.
- **40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4 mit 5,0 mM Acetyl - γ - Cyclodextrin:** Die Zubereitung des Puffers verlief analog zu jener des *40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 3,0 mM Acetyl - γ - Cyclodextrin*. Die Einwaage betrug allerdings 0,0677 g mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,2$ mg.

- **40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 10,0 mM γ - Cyclodextrin:** 10,0 mL des 40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0 wurden mit 0,1297 mg des γ - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage betrug $\pm 0,2$ mg. Um das Cyclodextrin in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 25 Minuten am Ultraschallbad behandelt.
- **40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 4,0 mit 5,0 mM γ - Cyclodextrin:** 4,0 mL des 40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0 mit 10 mM γ - Cyclodextrin wurden mit 4,0 mL des 40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 4,0 versetzt. Die Lösungen wurden in 2 Pipettiervorgängen mittels einer 2,5 mL Kolbenhubpipette entnommen beziehungsweise hinzugefügt.
- **40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer pH 3,0 mit 10,0 mM γ - Cyclodextrin:** 10,0 mL des 40 mM Ammoniumacetat/Essigsäurepuffers pH 3,0 wurden mit 0,1297 g des γ - Cyclodextrins versetzt. Die Fehlergrenze der Einwaage betrug $\pm 0,2$ mg. Um das Cyclodextrin in Lösung zu bringen, wurde die Suspension zuerst am Vortex homogenisiert und im Anschluss zirka 25 Minuten am Ultraschallbad behandelt.

3.1.2 Stammlösungen

- **Stammlösung MW 143 R - Enantiomer:** Konzentration 50 mg/100mL von Herrn Martin Walter zur Verfügung gestellt.
- **Stammlösung MW 143 S - Enantiomer:** Konzentration 50 mg/100mL von Herrn Martin Walter zur Verfügung gestellt.
- **Stammlösung MW 139 R - Enantiomer:** Konzentration 50 mg/100mL von Herrn Martin Walter zur Verfügung gestellt.
- **Stammlösung MW 139 S - Enantiomer:** Konzentration 50 mg/100mL von Herrn Martin Walter zur Verfügung gestellt.

- **Stammlösung MW 141 R - Enantiomer:** Konzentration 50 mg/100mL von Herrn Martin Walter zur Verfügung gestellt.
- **Stammlösung MW 141 S - Enantiomer:** Konzentration 50 mg/100mL von Herrn Martin Walter zur Verfügung gestellt.
- **Stammlösung MW 140 R - Enantiomer:** Konzentration 50 mg/100mL von Herrn Martin Walter zur Verfügung gestellt.
- **Stammlösung MW 140 S - Enantiomer:** Konzentration 49,24 mg/100mL. 4,924 mg des S - Enantiomer MW 140 wurden in 10,0 mL 100 mM TRIS/Phosphatpuffer pH 3,5 gelöst. Der Puffer wurde mittels 10 mL Vollpipette, die eine Fehlergrenze von $\pm 0,03$ mL besitzt, hinzugefügt. Anschließend wurde die Mischung am Vortex homogenisiert und zirka 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt.
- **Stammlösung MW 140 R - Enantiomer:** Konzentration 52,24 mg/100mL. Herstellung analog dem MW 140 S - Enantiomer. Die Einwaage betrug allerdings 5,224 mg.

3.1.3 Extraktionen

- **Nebivolol Extraktion 1:** siehe Kapitel 2.2.1
- **Nebivolol Extraktion 2:** siehe Kapitel 2.2.1

3.1.4 Mischungen

Sämtliche Mischungen der Enantiomere, die aus Stammlösungen, die im Kapitel 3.1.2 angeführt sind, zusammengesetzt sind, wurden nach folgenden Arbeitsschritten gemacht. Der Stammlösung wurde, je nach Mischungsverhältnis, ein Volumen zwischen 1000 und 5 μ L entnommen, wozu eine Kolbenhubpipette der geeigneten Größe verwendet wurde. Das entnommene Volumen wurde in ein bereits gewogenes Eppendorfggefäß injiziert und mittels einer Analysenwaage gewogen. Dieser Wert wurde notiert und ist in den jeweiligen Kapiteln unter „Einwaage“ tabellarisch festgehalten. Hierauf wurde tariert und das zweite Volumen wie oben

beschrieben hinzugefügt und gewogen. Auch der zweite Wert ist in den jeweiligen Tabellen vorhanden. Für die Berechnung des prozentuellen Wertes wurde die Einwaage des R - Enantiomers durch die Summe der Einwaagen des R - und des S - Enantiomers dividiert.

3.2 Verwendete Materialien

- Hplc Grade Wasser: Fisher Scientific Code: W01/06/ Batch:1086627
- Hplc Grade Methanol: Fisher Scientific Code: M4058/17 Batch: 1002265
- Essigsäure 96 % zur Analyse: Merck, K26194162
- Ammoniumacetat: Merck, A701260
- Nebilet® Tabletten: Berlin - Chemie Ch. –B.: 14552
- Spritzenfilter: Satorius Chargen Nummer: 17765
- TRIS: Serva Electrophoresis Nr: 14155
- Phosphorsäure, extra pure, 85 % in Wasser: Across Organics Lot: AO246500
- Carboxymethyl - β - Cyclodextrin: Advanced Separation Technologies Lot: 259
- γ - Cyclodextrin: Cyclolab Batch No.: 403/03
- Acetyliertes - γ - Cyclodextrin, DS = 0,95 : Consortium für elektrochemische Industrie GMBH BM

3.3 Verwendete Geräte

- Kapillarelektrophorese: Beckman Coulter P/ACE MDQ
- pH - Meter: WTW, inoLab
- Vortex: Vortex Genie 2, Scientific Industries
- Ultraschallbad: Starsonic 60, Liarre
- Waage: Satorius A200S

- Analysenwaage Satorius LE26P
- Kolbenhubpipetten 0,5-2500 µL: eppendorf Reference
- Vollpipetten 1-50 mL: Herka Intercolor,
- Massenspektrometer: Finnigan LCQ Deca
- Kapillare mit 50 cm Gesamtlänge und 40 cm bis zum Detektorfenster und 50 µm Durchmesser: Polymicro Technologies Batch Nr: AEUY03A
- Kapillare mit 60 cm Gesamtlänge und 50 cm bis zum Detektorfenster und 50 µm Durchmesser: Polymicro Technologies Batch Nr: AEUY03A

4 Zusammenfassung

Die 4 in dieser Diplomarbeit beschriebenen Aminoalkohole sind, wie im Kapitel 2.1.1.1 beschrieben, Synthesebaustein von Arzneistoffen. Sie alle besitzen ein Chiralitätszentrum. Da ihre stereochemische Reinheit sehr oft von Bedeutung ist, wurde in dieser Diplomarbeit versucht, geeignete Trennmethode für die Enantiomere an der Kapillarelektrophorese zu entwickeln, um die stereochemische Reinheit der Aminoalkohole bestimmen zu können. Aus Gründen der Detektierbarkeit wurden die Aminoalkohole von Herrn Walter mit mindestens einem aromatischen System versehen, so dass man sie bei einer Wellenlänge von 214 Nanometern detektieren werden konnte. [2. Noe C., Walter M.]

Die Methode, die für die Substanz MW 143 verwendet wurde, ist im Kapitel 2.1.2 beschrieben. Diese Methode übertraf die Anforderungen in den Punkten Linearität, Richtigkeit und Wiederholpräzision sehr deutlich. Die Peaks sind relativ schmal und gut integrierbar. Der Arbeitsbereich sollte in einem Bereich von 0,5 bis 99,5 % Anteil an Enantiomer R ausreichend sein.

Die Methode, die für die Substanz MW 139 verwendet wurde, ist im Kapitel 2.1.3 beschrieben. Auch diese Methode übertraf die Anforderungen in den Punkten Linearität, Richtigkeit und Wiederholpräzision sehr deutlich. Die

Peaks sind nicht mehr so schmal und gut integrierbar wie bei der Substanz MW 143, allerdings sind sowohl Form als auch Integrierbarkeit ausreichend. Der Arbeitsbereich sollte in einem Bereich von 0,5 bis 99,5 % Anteil an Enantiomer R ausreichend sein.

Die Methode, die für die Substanz MW 141 verwendet wurde, ist im Kapitel 2.1.4 beschrieben. Diese Methode übertraf die Anforderungen in den Punkten Linearität, Wiederholpräzision sehr deutlich. Einzig bei der Richtigkeit lag bei einem Konzentrationsniveau der Variationskoeffizient knapp (0,01 %) über den geforderten 2 %. Die Peaks sind relativ breit und es treten - selten aber doch - Split Peaks auf, die eine Integration zwar noch zulassen aber erschweren. Der Arbeitsbereich sollte in einem Bereich von 0,5 bis 99,5 % Anteil an Enantiomer R ausreichend sein.

Die Methode, die für die Substanz MW 140 verwendet wurde, ist im Kapitel 2.1.5 beschrieben. Diese Methode dürfte sich in einer praktischen Anwendung als unzuverlässig erweisen, da es nicht gelungen ist, die Retentionszeiten konstant zu halten. Des Weiteren zeigten sich in Proben mit einem hohen Anteil an S - Enantiomer deutliche Abweichungen im Punkt Richtigkeit.

Die für Nebivolol entwickelte Methode, zeigt eine ausreichende Trennleistung mit passablen Migrationszeiten. Diese liegen zwar über jenen von vergleichbaren HPLC - Methoden [23. Othman], besitzen allerdings den Vorteil, dass das Equipment im Vergleich zu einer chiralen HPLC - Säule nicht so teuer ist.

5 Abstract

Aminoalcohols are "chiral tools" in lots of drugs. All of the aminoalcohols have a chiral centre. In the paper mentioned above we explored method to separate 4 of them. Subsequently, an enantiomeric separation of the Nebivolol enantiomers is presented. A list of the treated aminoalcohols is presented in chapter 2.1.1.1.

In order to detect the aminoalcohols the aminoalcohols were derivatized with aromatic compounds. [2. Noe, Walter] A list of the derivatized aminoalcohols is in chapter 2.1.1.1.

All these separations have been developed for capillary electrophoresis. The background electrolyte is a TRIS/ phosphoric - buffer, that is regulated to a pH of 3,5. We used Carboxymethyl - β - Cyclodextrins as a chiral selector. Concentration of the buffer and the cyclodextrin were adapted to the aminoalcohols. The same holds true for the voltage used to separate the enantiomers. The wavelength used to detect the aminoalcohols was 214 nanometres. The temperature we used was 16 °C.

The nebivolol racemate was separated in 50 mM ammonium acetate - buffer, which is regulated to a pH 4 using acetic acid. The chiral selector was 10 mM γ - cyclodextrin. Detection - wavelength and temperature are the same as they were used at the aminoalcohols.

6 Anhang

6.1 Berechnungen

- **Auflösung:** siehe Kapitel 2.1.2.2.3 Formel 2.1

- **Mittelwert:**
$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- **Standartabweichung:**
$$s = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

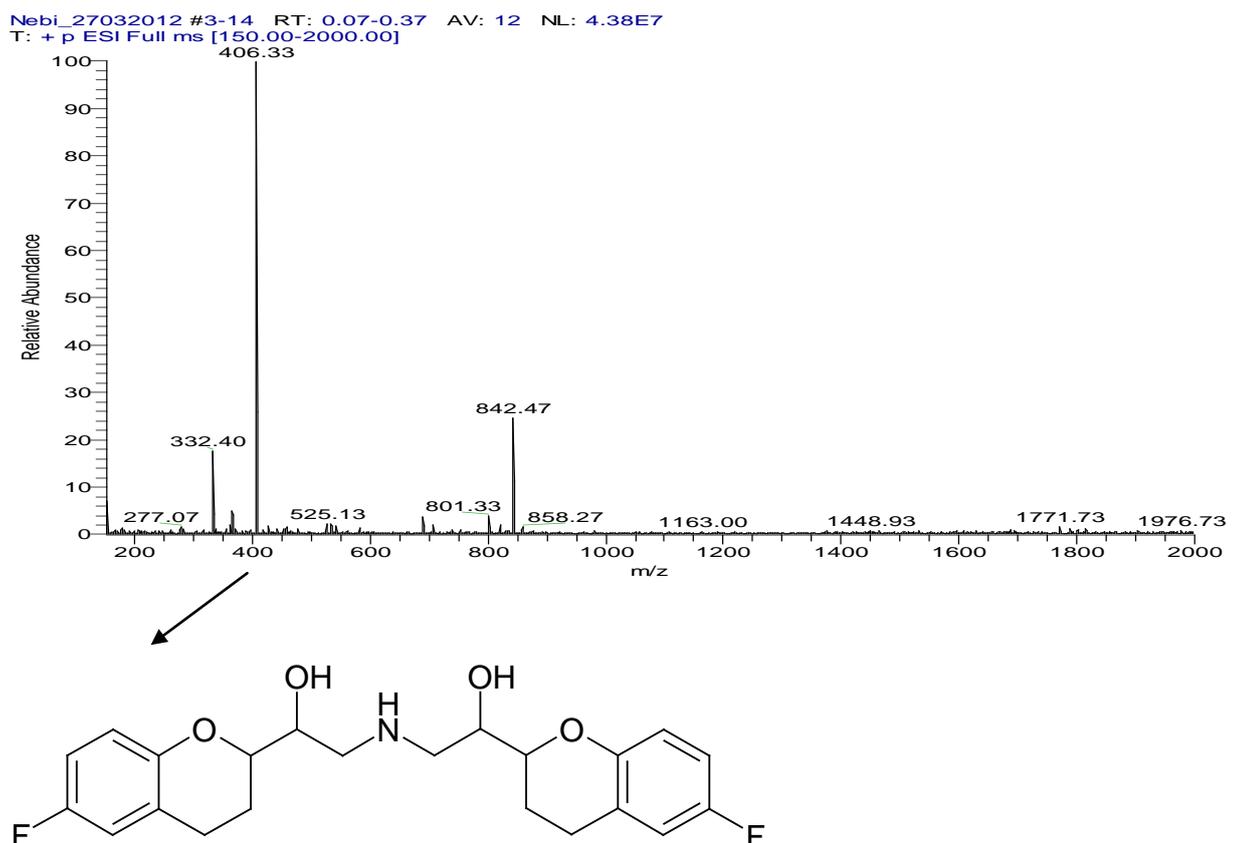
- **Funktionsgleichung:**
$$y = kx + d$$

- **Steigung:**
$$k = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

- **Achsenabschnitt:** $d = \bar{Y} - k\bar{X}$
- **Variationskoeffizient = relative Standardabweichung:** $v = \frac{\bar{x}}{s} * 100$
- **% Anteil der Fläche:** $\% \text{ Anteil} = \frac{\text{Fläche} * 100}{\text{Gesamtfläche}}$
- **% Anteil der Einwaage:**

$$\% \text{ Anteil} = \frac{\text{EinwaageEnantiomerR} * 100}{\text{EinwaageEnantiomerR} + \text{EnantiomerS}}$$
- **Werte extrapoliert:** $x = \frac{y - d}{k}$

6.2 Massenspektrum von Nebivolol



6.3 Literaturangaben

1. http://www.analytik.uni-wuppertal.de/Capillary_Electrophoresis.htm; Dr. Oliver J. Schmitz, Dienstag, 21. Februar 2012
2. Verfahren zur Herstellung der R, R oder S, S konfigurierten Glykopyrrolonium-Isomere. Pat-Appl.: A 1896/2002 and Walter M, PhD Thesis in Progress; Noe C, Walter M
3. Kapillarelektrophorese, vieweg Analytische Chemie, Heinz Engelhardt, Wolfgang Beck, Thomas Schmitt
4. Free zone elektrohporesis; Chromatographic reviews (1967), 9(2), 122-219 Hjerten S.
5. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry ; Chemical reviews 1998, 98, 1743-1753 J. Szejtli
6. The Schardinger dextrans; Advances in carbohydrate chemistry (1957), 12, 189-260 D. French
7. Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors, Journal of Chromatography A, 875 (2000) 89–122 S. Fanali
8. Pharmacological, Pharmacokinetic, and Clinical Properties of Benidipine Hydrochloride, a Novel, Long-Acting Calcium Channel Blocker; Journal of Pharmacological Sciences Vol. 100 (2006) No. 4 P 243-261; Kozo Yao, Ken Nagashima, Hiroyuki Miki
9. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Band 5; Springer Verlag; Franz v. Bruchhausen, Hermann Hager, Siegfried Ebel
10. Muscarinic receptor antagonists for overactive bladder; B.J.U. Interational | 1 0 0 , 9 8 7 - 1 0 0 6 | doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07205.; Paul Abrams and Karl-Erik Andersson

11. An update on the efficacy and safety of acclidinium bromide in patients with COPD; *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* (2011) 5(1) 19_28; Khuder Alagha, Arnaud Bourdin, Céline Tummino and Pascal Chanez
12. Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications *Electrophoresis* 2006, 27, 2880-2895, Van Eackhaut A., Michotte Y.
13. Controlling enantioselectivity in chiral capillary electrophoresis with inclusion-complexation *Journal of chromatography. A* (1997), 792(1-2), 227-67, Fanali Salvatore
14. The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 2008, 29, 1701–1712, Juvancz, Z., Bodáné Kendrovics, R., Iványi, R., Szente, L
15. Stereochemical Comparison of Nebivolol with other β -Blockers, *Chirality* 20:103–109 (2008), Carsten D. Siebert et al.
16. Die räumliche Betrachtung und Beschreibung von Nebivolol, *Pharm. Unserer Zeit*, Carsten D. Siebert
17. Structure and Absolute Configuration of Nebivolol (+)- $(R^*\{S^*[S^*-(S^*)]\})-\alpha$, $\acute{\alpha}$ [Iminobis(methylene)]bis(6-fluoro-3,4-dihydro-2H-l-benzopyran-2-methanol) (Nebivolol) Hydrochloride (I)~f and (+)- $(S\{R[R-(R)]\})$ -Nebivolol Hydrobromide Dihydrate, *Acta Cryst.* (1993). C49, 2154-2157, O. M. Peeters, N. M. Blaton C. J. Deranter
18. Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility, *Vascular Health and Risk Management*, Jorge Eduardo Toblli, Federico DiGennaro, Jorge Fernando Giani, Fernando Pablo Dominici
19. Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren, *Pharm. Unserer Zeit*, Perry P. Griffin, Manfred Schubert-Zsilavec, Holger Stark
20. Theoretical considerations in performance of various modes of CE, *Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis*, M. Ilias Jimidar

21. A brief introduction to Capillary Electrophoresis, Forensic Science International, F. Tagliaro , G. Manetto , F. Crivellente , F.P. Smith
22. <http://www.justscience.de> 22. November 2012, Datenbank der ABDA (Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände)
23. Rapid and economic chiral-HPLC method of nebivolol enantiomers resolution in dosage formulation; Biomedical Chromatography; Zeid A. Al-Othman, Imran Ali

6.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Josef Stefan Schweiger

Geburtsdatum: 03.01.1984

Staatsbürgerschaft: Österreich

Adresse: 8854 Krakaudorf, Krakaudorf 16b/6

Schulbildung

1990-1994: Volksschule in Krakaudorf

1994-2002: Gymnasium in Tamsweg

seit 2003: Pharmaziestudium in Wien

Sonstiges:

Präsenzdienst: 2002-2003