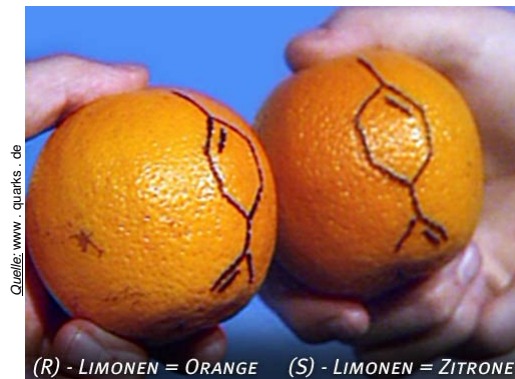


Enantiomerenanalytik und CE



Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

Enantiomerentrennung von Arzneistoffen

- Geschichte
- Nomenklatur
- Eigenschaften von chiralen Arzneistoffen
- „enantiomeric excess“
- Beispiele von chiralen Arzneistoffen
- Anforderung an die Enantiomerenanalytik
- Trennung durch Kristallisation als Diastereomerensalze
- Chromatographische Trennung (Bsp.: HPLC, GC)
- Kapillarelektrophoretische Trennung

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

Geschichte

1815 J.B. Libout

Rotation von polarisiertem Licht in α -Quarz

1848 L. Pasteur

Trennung von Natrium-ammoniumtartrat

1874 Van't Hoff / Le Bel

Asymmetrisches C-Atom, Tetraedermodell

1938 E. Fischer

Konfiguration der (+)-Glucose

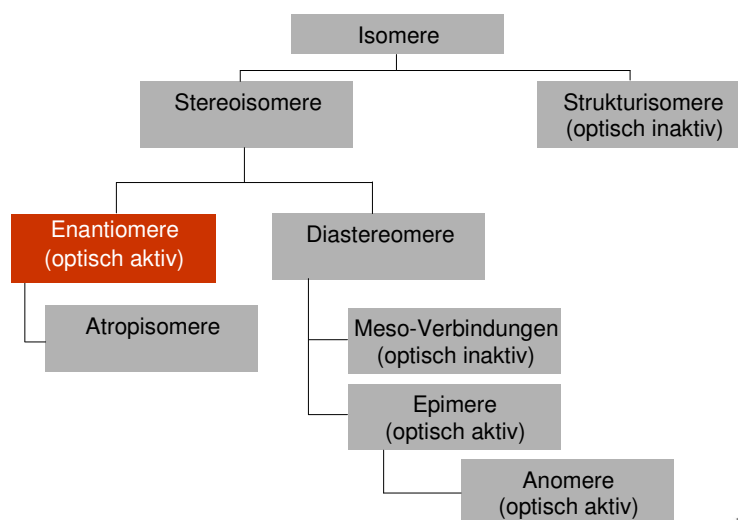
1966 R.S. Cahn, C. Ingold, V. Prelog

R/S Nomenklatur

Gil-Aviv

Gaschromatographische Trennung

Nomenklatur von Isomeren



Eigenschaften von Enantiomeren

- **Gleiche** chemische und physikalische Eigenschaften gegenüber achiralen Medien
 - Schmelzpunkt
 - spektroskopische Eigenschaften (UV, IR, Fluoreszenz, MS)
 - pK_a/pK_b -Werte, Redoxpotential, Nucleophilie...
- **Unterschiedliche** Eigenschaften gegenüber chiralen Medien
 - linear polarisiertes Licht ($\Rightarrow$ Drehwertbestimmung im Polarimeter)
 - chemische Umsetzungen mit chiralen Reagenzien
 - **Wichtig für Arzneistoffe:** Wechselwirkungen mit Proteinen



Chirale Arzneistoffe

- **Pharmakodynamische Unterschiede**
(Wechselwirkungen mit Enzymen, Rezeptoren, Ionenkanälen...)
- **Pharmakokinetische Unterschiede**
(Proteinbindung, Metabolisierung und Verteilung)
- ca. 80 % der synthetischen chiralen Arzneistoffe sind als Racemat im Handel
- 98% der semisynthetischen oder natürlich vorkommenden AS sind enantiomerenrein im Handel

WWU Münster SoSe 2009 Enantiomerenanalytik und CE		
Chirale Arzneistoffe		
Wirkstoff	(R)-Enantiomer	(S)-Enantiomer
<i>Asparagin</i>	süß	bitter
<i>Adrenalin</i>	30x aktiver als (S)	
<i>Chloramphenicol</i>	(R,R) antibakteriell	(S,S) inaktiv
<i>Thalidomid</i>	nicht (?) teratogen	teratogen
<i>Ethambutol</i>	(R,R) Erblindung	(S,S) tuberkulostatisch
<i>Dopa</i>	passive Diffusion	aktive Diffusion
<i>Ibuprofen</i>	(R) inaktiv, aber Inversion zu (S)	
<i>Tranylcypromin</i>	(+) MAO-Hemmer, (-) NA-Reuptakehemmer (antidepressiv)	

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

WWU Münster

SoSe 2009

Enantiomerenanalytik und CE

Enantiomerenüberschuß

(enantiomeric excess, "ee")

$$ee (\%) = \frac{(E_1 - E_2)}{(E_1 + E_2)} \times 100$$

E₁ = Konzentration des Enantiomers 1
E₂ = Konzentration des Enantiomers 2

Was sagt mir eine „ee“ – Angabe?

ee = 0% bedeutet Es liegt ein Racemat (50:50) vor!

ee = 100% bedeutet Die Substanz ist enantiomerenrein!

ee = 90% bedeutet Es liegt ein 95:5 – Gemisch zweier Enantiomere vor!

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Chirale Zentren (außer vierbindiger Kohlenstoff)

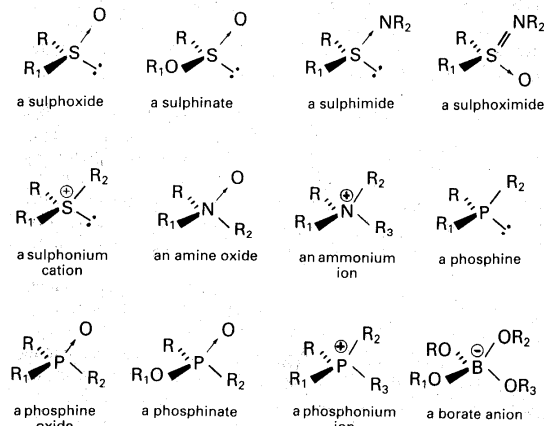


Fig. 1-2. Examples of stable chiral molecules with chiral centres other than carbon atoms.

G. Subramanian (ed.): A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography, VCH Weinheim (1994) p2

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

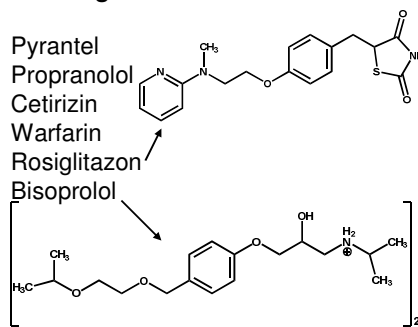
Chirale Arzneistoffe mit einem chiralen Zentrum

Als Racemat werden eingesetzt:

Ibuprofen
 Methadon
 Thiopental
 Chloroquin
 Promethazin
 Oxazepam
 Metoprolol
 Verapamil
 Phenprocoumon
 Salbutamol
 Ofloxacin
 Omeprazol
 Cyclophosphamid
 Ifosfamid

Pyrantel
 Propranolol
 Cetirizin
 Warfarin
 Rosiglitazon
 Bisoprolol

(chiraler Schwefel)
 (chiraler Phosphor)
 (chiraler Phosphor)



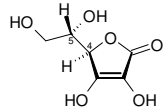
Als reines Enantiomer werden eingesetzt:

Acetylcystein (R)
 Cetirizin (R)
 Levodopa (S)
 Pramipexol (S)
 Folsäure (S)
 Ibuprofen (S)
 Methotrexat (S)
 Levomethadon (R)
 Levofloxacin (S)
 Adrenalin (R)
 Omeprazol (S)

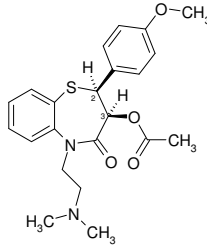
Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

Chirale Arzneistoffe mit zwei chiralen Zentren (I)

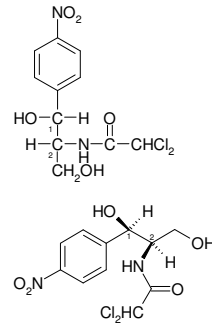
Ascorbinsäure (4R,5S)



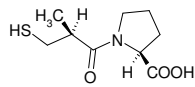
Diltiazem (2S,3S)



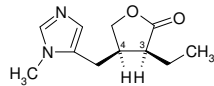
Chloramphenicol (1R,2R)



Captopril (S,S)



Pilocarpin (3S,4R)

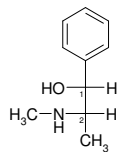
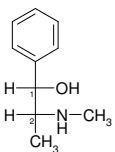
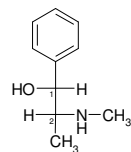
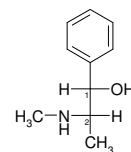


Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Chirale Arzneistoffe mit zwei chiralen Zentren (II)

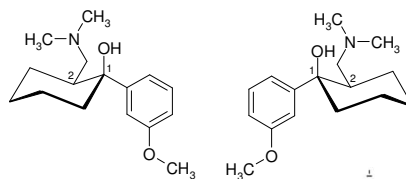
Ephedrin (1R,2S)

1R,2S
L-(-)-Ephedrin1S,2R
D-(+)-Ephedrin1R,2R
L-(-)-Pseudoephedrin1S,2S
D-(+)-Pseudoephedrin

erythro-Reihe

threo-Reihe

Tramadol (1S,2S + 1R,2R / Z-Racemat)



Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Anforderungen an die Enantiomerenanalytik

- hohe Empfindlichkeit (Nachweisgrenze $\ll 1\%$)
- gute Reproduzierbarkeit
- kostengünstig (Geräte, Durchführung der Messung)
- geringer Substanzbedarf
- geringer Zeitaufwand
- Messung ohne aufwändige Probenvorbereitung
- keine Artefaktbildung (v.a. keine Racemisierung)

Anwendungen von Enantiomerentrennungen in Industrie und Forschung

präparativ:

- Isolierung des enantiomerenreinen Arzneistoffes nach der Synthese

analytisch:

- Bestimmung der Enantiomerenreinheit während der Produktion
- Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus *in-vitro* und *in-vivo*

Trennung von Enantiomeren mittels Kristallisation als Diastereomerensalze

Prinzip: Zum Racemat ($R+S$) wird ein *enantiomerenreines* (R oder S) Fällungsreagenz gegeben

für Basen: Äpfelsäure, Mandelsäure, Weinsäure und -derivate, Camphersulfonsäure

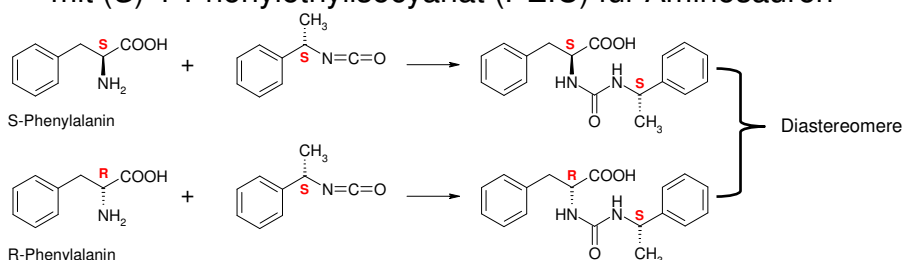
Base (R,S) + Säure (R) $\Rightarrow$ diastereomere Salze
(Kation (R), Anion (R) und
Kation (S), Anion (R))

für Säuren: Ephedrin, Brucin, Chinin, Phenylethylamin

Nachteile: zeitaufwändig,
nicht für analytische Anwendungen geeignet

Chromatographische Trennung von Enantiomeren (Ia)

1. Trennung als Diastereomere nach Derivatisierung zu
mit (S)-1-Phenylethylisocyanat (PEIC) für Aminosäuren

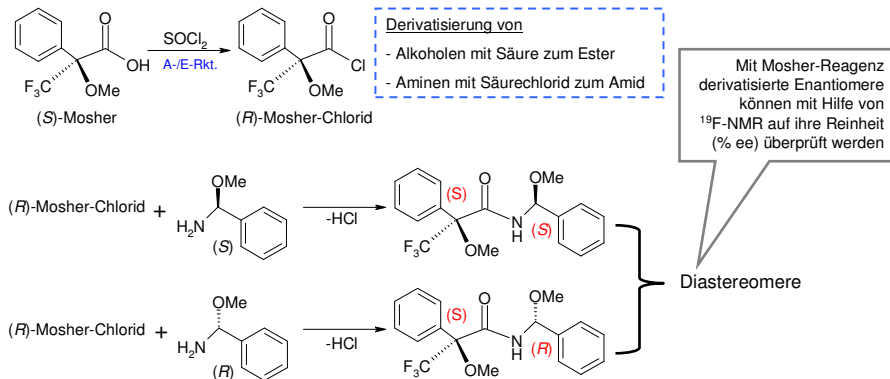


Trennung bspw. an RP-18 möglich

Nachteile: quantitative Umsetzung notwendig
Reagenz muss sehr rein sein
zeitaufwändig, nur für analytische Anwendungen

Chromatographische Trennung von Enantiomeren (Ib)

1. Trennung als Diastereomere nach Derivatisierung mit enantiomerenreiner/m Mosher-Säure/-Chlorid



Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

Chromatographische Trennung von Enantiomeren (II)

2. Direkte Trennung an chiralen (pseudo-)stationären Phasen

Methoden: HPLC, GC, CE

Prinzip: Unterschiedlich starke Wechselwirkungen (WW) der Enantiomere in einer chiralen Umgebung (π - π -, ionisch-, Wasserstoffbrücken-, Dipol-WW)

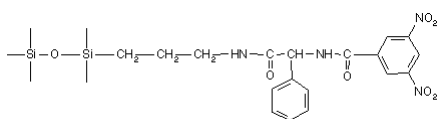
Vorteil: analytisch und präparativ nutzbar

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

Chirale stationäre Phasen (CSP's) für die HPLC

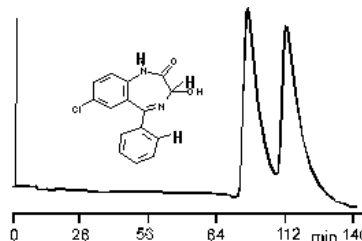
Typ	Autor	Jahr	Chiraler Selektor	Interaktion	Fließmittel	Substrate	Bemerkungen
I	Pirkle	1979	N-3,5-dinitrobenzoylphenylglycin und andere AS-Derivate	Wasserstoffbrücken π - π - Wechselwirkungen	Organisch	elektronenreiche Aromaten	enges Einsatzgebiet
II	Okamoto	1986	Polysaccharid-Derivate	Wasserstoffbrücken, Inklusionskomplexe	Organisch oder wässrig mit Ionenzusatz	viele Substrate	auch chemische Selektivität hohe Probenkapazität
III	Armstrong u.a.	1984	Cyclodextrine	Inklusionskomplexe	wässrig	einige A's, AS	hohe Probenkapazität
	Blaschke	1974	Polacryl- und metacrylamide	Inklusionskomplexe	Organisch	einige A's	
	Cram	1975	Kronenether	Inklusionskomplexe	Organisch	wenige	
IV	Davankow u.a.	1971	Prolin	Ligandenaustausch mit Metallkomplexen	wässrig mit Cu^{2+}	Aminosäuren	
V	Allenmark u.a.	1982	Protein (α -AGP, BSA, Ovomuroid)	hydrophobe und Wasserstoffbrücken	wässrige Puffer	viele Substrate	geringe Probenkapazität geringe Stabilität

Beispiele für *direkte* Enantiomerentrennungen: Pirkle-Säulen (Typ I)



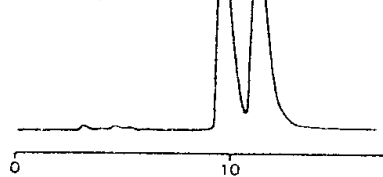
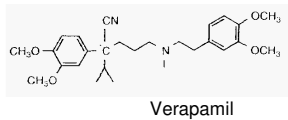
Chiraler Selektor:
R-(-)-N-(3,5-Dinitrobenzoyl) phenylglycin
(DNBPG)

Mobile Phase: n-Hexan / 2-Propanol 80/20 (V/V)
Flussrate: 1 ml/min
Detection: UV 254 nm
Probe: Oxazepam (0.5mg/ml)



Beispiele für *direkte* Enantiomerentrennungen: Polysaccharid-Derivate (Typ II)

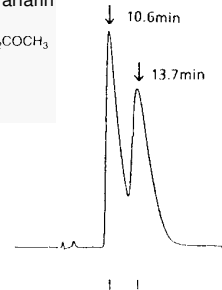
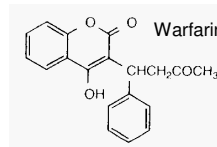
Chiralpak AD: Amylosederivat



Mobile Phase: n-Hexan/2-Propanol/
Diethylamin = 90:10:0.1 (V:V:V)

Flussrate: 1.0 ml/min

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring
und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)



Mobile Phase: n-Hexan/Ethanol/
Diethylamin = 50:50:0.1 (V:V:V)

Flussrate: 0.7 ml/min

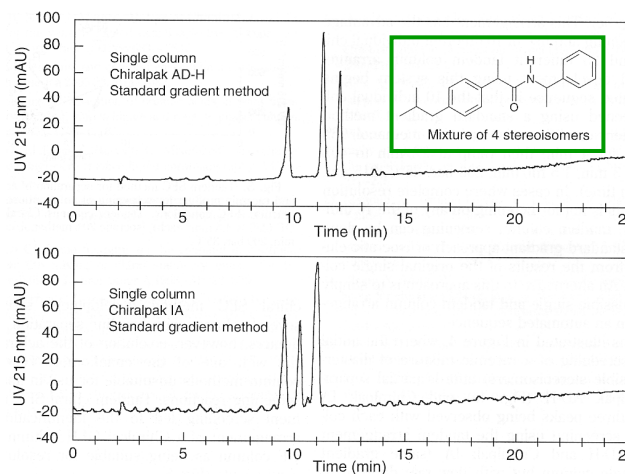
WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Beispiele für *direkte* Enantiomerentrennungen: Polysaccharid-Derivate (Typ II)

CHIRAL SEPARATION BY SFC TANDEM SCREENING TOOL

SFC = supercritical fluid chromatography

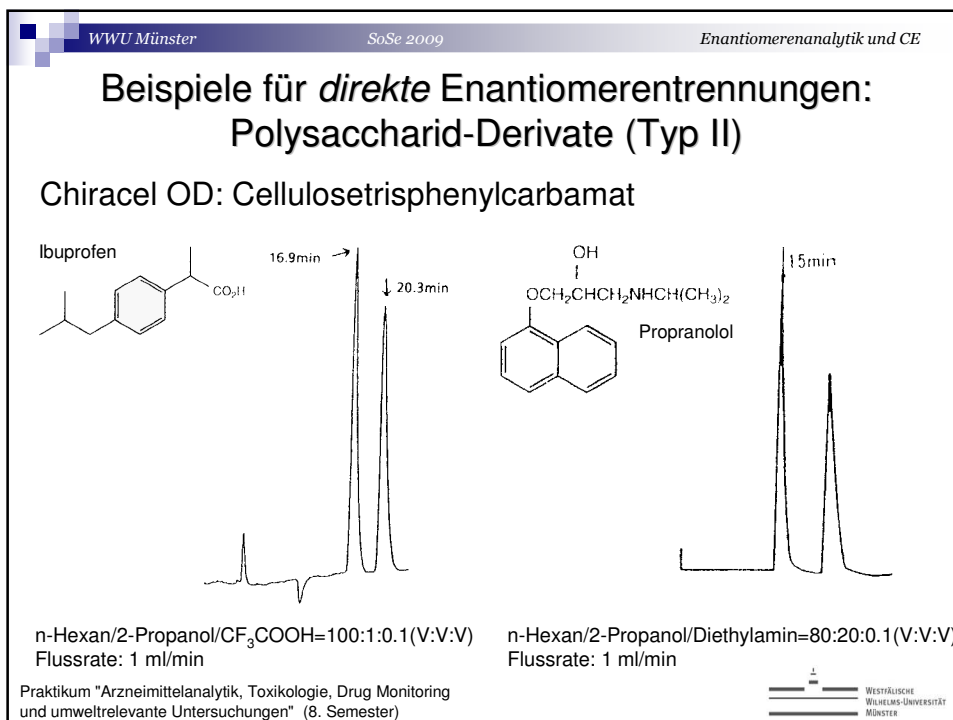
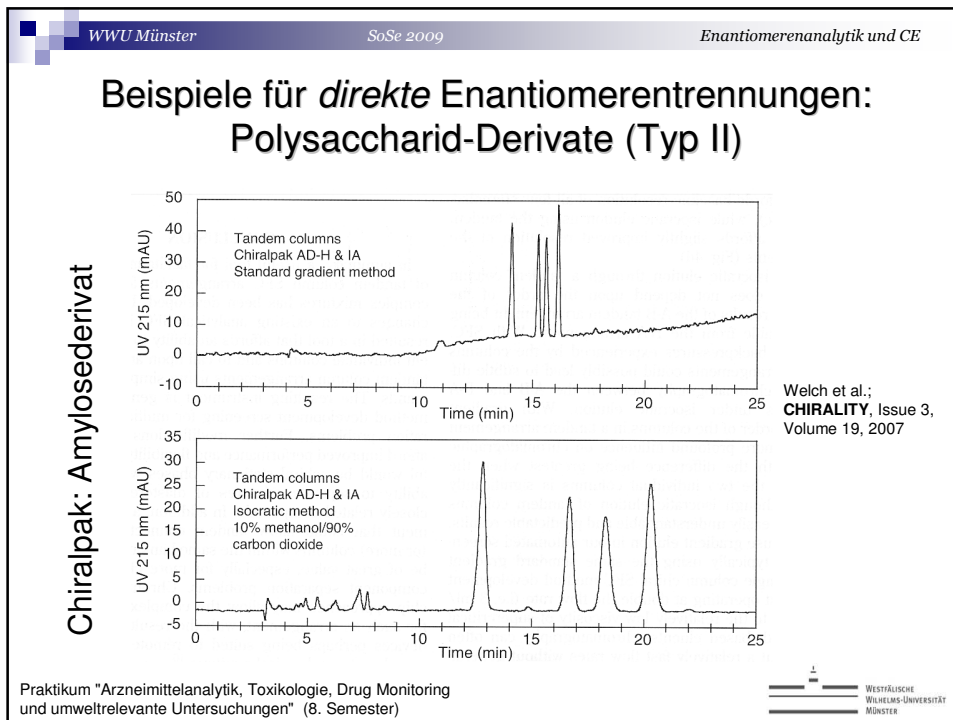
Chiralpak: Amylosederivat



Welch et al.;
CHIRALITY, Issue 3,
Volume 19, 2007

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring
und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

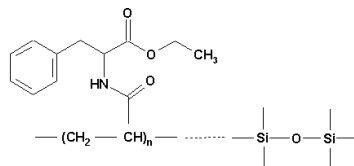
WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER



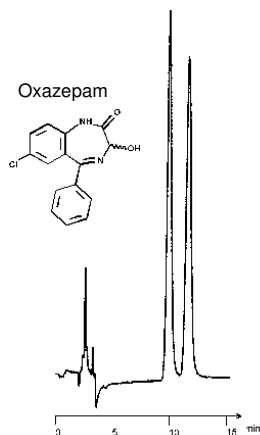
Beispiele für *direkte* Enantiomerentrennungen: Polyacrylamide (Typ III)

Chiraspher NT:

poly-(N-acryloyl-S-phenylalanine ethyl ester)



Mobile Phase: n-Heptan/Tetrahydrofuran 50/50 (V/V)
Flussrate: 1.0 ml/min



Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring
und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Beispiele für *direkte* Enantiomerentrennungen: Aminosäurederivate (Typ IV)

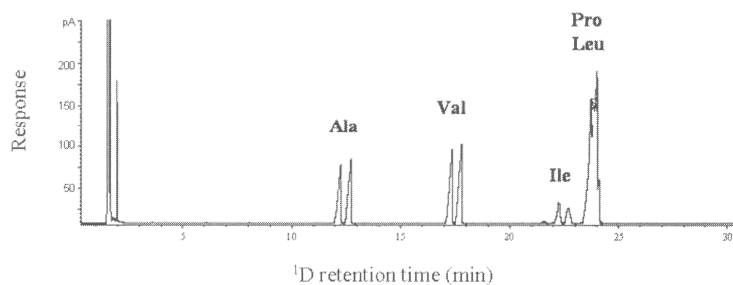


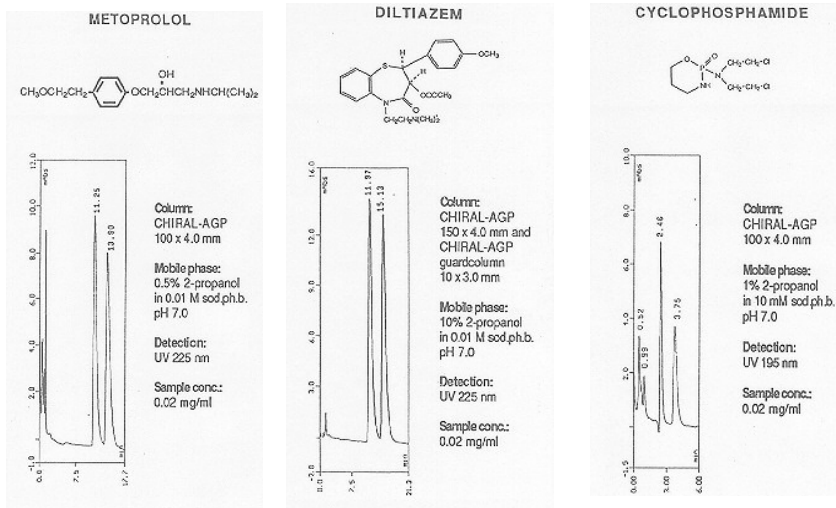
Fig. 1. 1D GC Separation of alanine, valine, isoleucine, leucine, and proline derivatised with ethyl chloroformate on Chirasil-L-Val.

Jung et al.; CHIRALITY, Issue 3, Vol. 19, 2007
Enantiomeric Analysis of Aminoacids by Using GCxGC

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring
und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

Enantiomerentrennung an Proteinphasen (Typ V): α 1-Glycoprotein (AGP)

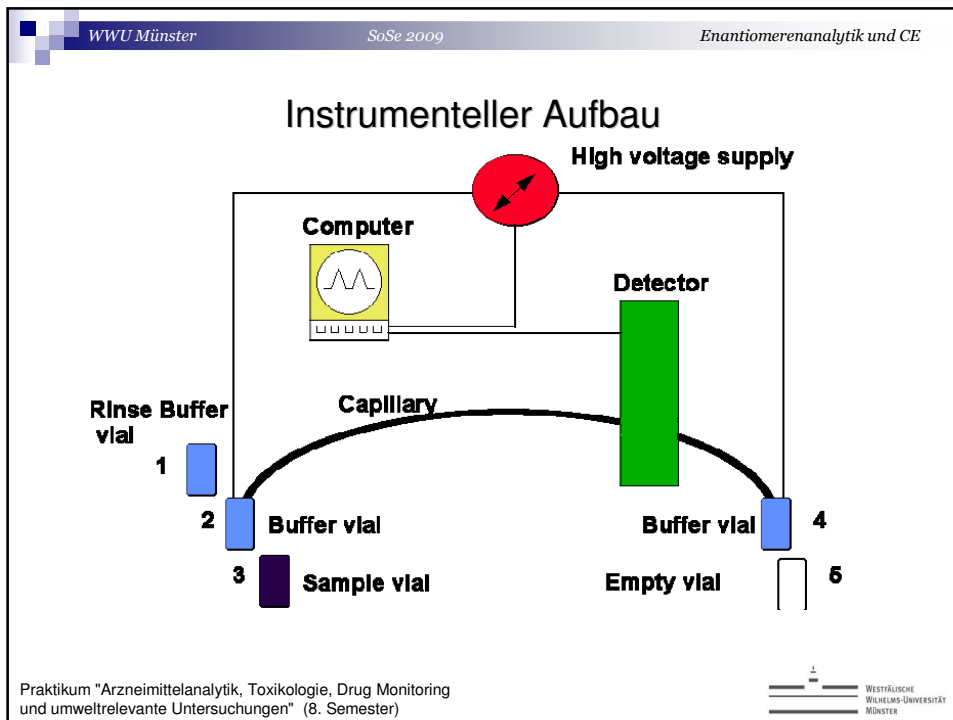


Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

Kapillar-

elektrophorese

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)



WWU Münster SoSe 2009 Enantiomerenanalytik und CE

Die Elektrophoretische Mobilität

ANNAHME: Die Kapillarwand hat keinen Einfluß

→ Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit der Analyten sind nur von der Ladung und der elektrophoretischen Mobilität abhängig

$$v_{\text{eff}} = \frac{z \cdot e}{6 \pi \eta r} E$$

z · e eff. Ladung

E Feldstärke

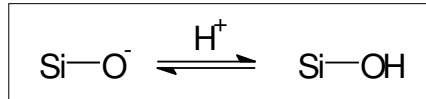
η Viskosität

r Ionenradius

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

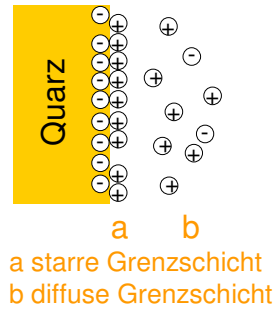
WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

Der Elektroosmotische Fluss



pH-Abhängigkeit des EOF

→ Deprotonierung der Silanolgruppen



$$v_{\text{EOF}} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta} E$$

E	Feldstärke
ζ	Zeta-Potential
η	Viskosität
ϵ	Dielektrizitätskonstante LM

Der Elektroosmotische Fluss

Definition:

Durch Dissoziation der Silanolgruppen der inneren Oberfläche der Quarzkapillare wird die Kapillarwand negativ aufgeladen und die Pufferlösung im Inneren der Kapillare erhält einen Überschuss an positiven Ladungsträgern (Kationen). Durch elektrostatische Anziehung lagern sich die Kationen der Pufferlösung an die Kapillarwand an, und zwar zum einen in Form einer starren (unbeweglichen) Grenzschicht direkt an der Kapillaroberfläche und zum anderen in einer diffusen (beweglichen) Grenzschicht in weiterem Abstand zur Kapillarwand.

Bei Anlegen einer Spannung beginnen sich die Kationen der diffusen Grenzschicht in Richtung Kathode zu bewegen. Infolge eines osmotischen Effektes bewegt sich auch das sie umgebende Lösungsmittel mit und es kommt zu einem Nettostrom der Pufferlösung in Richtung der Kathode. Diesen Effekt bezeichnet man als elektroosmotischen Fluss (EOF).

WWU Münster SoSe 2009 Enantiomerenanalytik und CE

Elektrophoretische und Elektroosmotische Mobilität

Stempelförmiges Flussprofil

pH-Abhängigkeit von v_{EOF} und v_{EFF}

- Deprotonierung der Silanolgruppen
- Protonierungsgrad der Analyten

$$V = v_{EOF} + v_{EFF}$$

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

WWU Münster SoSe 2009 Enantiomerenanalytik und CE

Möglichkeiten zur Beeinflussung des EOF

Veränderung des Trennsystems	Auswirkungen auf den EOF
pH-Wert des Puffers	EOF ↑ wenn pH ↑
Pufferkonzentration	EOF ↑ wenn Pufferkonz. ↓
Temperatur	Viskositätsveränderung, evtl. auch Selektivitätsänderung
Org. Lösungsmittel (ACN, MeOH...)	Komplexe Veränderungen, meist Änderung der Selektivität
Chem. Veränderung der Kapillarwand (lin. Polyacrylamid, Methylcellulose)	Reduzierung / Umkehr des EOF

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)

WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

Chirale Selektoren in der CE

Cyclodextrine

native (α -, β -, γ -CD)

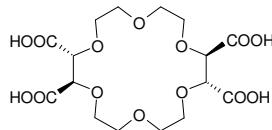
substituierte CD

nichtionische (Methyl-, Hydroxypropyl-, Hydroxyethyl-.....)

anionische (Carboxymethyl-, Sulfobutyl-, Sulfoethyl-.....)

kationische (Trimethylammoniumhydroxypropyl-.....)

Chirale Kronenether



18-Krone-6-Tetracarbonsäure

Chirale Mizellbildner (SDS-Digitonin, Gallensäuren,.....)

Glykopeptide (Vancomycin, Rifamycin)

Proteine (HSA, BSA, AGP)

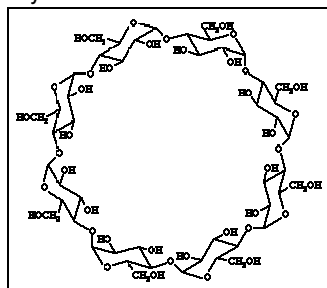
Native Cyclodextrine als chirale Selektoren

- 62% aller Enantiomerentrennungen in der CE mit Cyclodextrinen als chirale Selektoren -

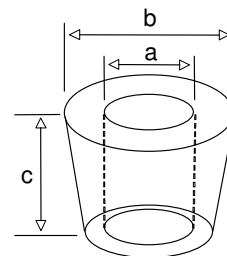
α - Cyclodextrin $\Rightarrow$ 6 α -D-Glucose-Einheiten

β - Cyclodextrin $\Rightarrow$ 7 α -D-Glucose-Einheiten

γ - Cyclodextrin $\Rightarrow$ 8 α -D-Glucose-Einheiten



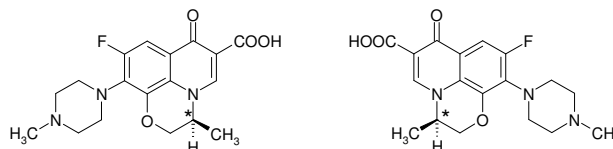
Durch die chirale Information in der Struktur
der Zucker wird im Cyclodextrin eine chirale
Umgebung erzeugt!



CD	Dimension			Kavitäts- volumen Å ³
	a	b	c	
α	5.7	13.7	7.8	174
β	7.8	15.3	7.8	262
γ	9.5	16.9	7.8	427

Ofloxacin

Formel:



Chemische Eigenschaften:

- Zwitterion (saure Carboxylfunktion, basischer Stickstoff am Piperazinring); IEP = 7,4
- ein Chiralitätszentrum (*)
(Das S-(-)-Enantiomer ist je nach Keimart 8-128 mal stärker wirksam als das R-(+)-Enantiomer)

Handelsnamen:

- Tarivid®: R,S-(±)-Ofloxacin (1984)
- Tavanic®: S-(-)-Ofloxacin (Levofloxacin, 1998)

Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)



Praktikumsaufgabe

Qualitative Bestimmung von Ofloxacin-Enantiomeren in Humanurin mit Hilfe der Kapillarelektrophorese

Elektrophoretische Bedingungen:

Laufpuffer: 100mM H₃PO₄ mit Triethylamin auf pH 2,0 eingestellt

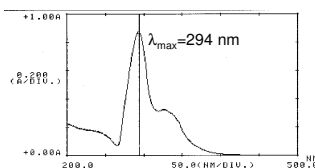
Chiraler Selektor: 45mM Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin (D.S.=0,8)

Kapillare: fused silica; 20/27 cm
50 µm I.D. x 375 µm O.D.

Spannung: 20kV

Injektion: hydrodynamisch; 5 sec (Urinproben) bzw.
10 sec (wässrige Standardlösung) bei 0,5 psi

Detektion: UV-Detektion, 280 nm



Praktikum "Arzneimittelanalytik, Toxikologie, Drug Monitoring und umweltrelevante Untersuchungen" (8. Semester)



Literaturhinweise CE



Grundlagen:

- H. Engelhardt: Kapillarelektrophorese
- F. Tagliaro, G. Manetto, F. Crivellente, F.P. Smith: „A brief introduction to capillary electrophoresis“, Forensic Science International, 92 (1998), 75-88
- H. Wätzig: „Grundlagen der Kapillarelektrophorese“, PZ Prisma, 3 (1996), 126-136

Chirale Trennungen:

- S. Fanali, Z. Aturki, C. Desiderio: „New strategies for chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis“, Forensic Science International, 92 (1998), 137-155