

**Enantiomerentrennung regioisomerer
Methylenedioxyamphetamine mittels
chiral modifizierter HPLC**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Karsten Wiethoff

Kiel 2001

Referent:

Prof. Dr. W. Hänsel

Korreferent:

Prof. Dr. D. Heber

Tag der mündlichen Prüfung:

19.12.2001

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 19.12.2001

gez. Prof. Dr. Th. Bauer

Dekan

*Für Sandra,
Friederike
und Katharina*

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. UNTERSUCHTE SUBSTANZEN.....	1
1.2. EIGENSCHAFTEN VON PHENYLALKYLAMINEN	4
1.2.1. Enantioselektive Eigenschaften von Stimulanzien und Halluzinogenen.....	5
1.2.2. Enantioselektive pharmakologische Eigenschaften von Entactogenen	8
1.2.3. Enantioselektive Biotransformation von Entactogenen	10
1.3. CHIRALE STATIONÄRE PHASEN IN DER HPLC.....	12
1.4. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	19
2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	20
2.1. WICHTIGE VORAUSSETZUNGEN	20
2.1.1. Chromatographische Kenngrößen	20
2.2. β -CYCLODEXTRIN - CSP.....	24
2.2.1 Ammoniumacetat – Puffer.....	24
2.2.1.1. Ammoniumacetat - Puffer mit Methanol	24
2.2.1.2. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Methanol.....	32
2.2.1.3. Ammoniumacetat-Puffer mit Acetonitril	33
2.2.1.4. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Acetonitril.....	41
2.2.1.5. Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril	42
2.2.2. Kaliumphosphat – Puffer.....	43
2.2.2.1. Kaliumphosphat - Puffer mit Methanol	43
2.2.2.2. Ergebniszusammenfassung der Trennungen mit Methanol	45
2.2.2.3. Kaliumphosphat-Puffer mit Acetonitril	47
2.2.2.4. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Acetonitril.....	60
2.2.2.5. Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril	61
2.2.3. Natriumphosphat - Puffer mit Ionenpaarzusatz.....	64
2.2.3.1. Natriumphosphat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Methanol	64
2.2.3.2. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Methanol.....	71

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.3.3.	Natriumphosphat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Acetonitril	72
2.2.3.4.	Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Acetonitril.....	73
2.2.3.5.	Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril	74
2.2.4.	Ammoniumacetat - Puffer mit Ionenpaarzusatz	75
2.2.4.1.	Ammoniumacetat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Methanol.....	75
2.2.4.2.	Ammoniumacetat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Acetonitril.....	78
2.2.4.3.	Ergebniszusammenfassung.....	79
2.2.5.	Triethylammoniumphosphat - Puffer.....	80
2.2.5.1.	Triethylammoniumphosphat-Puffer mit Methanol	80
2.2.5.2.	Ergebniszusammenfassung der Trennungen mit Methanol	83
2.2.5.3.	Triethylammoniumphosphat - Puffer mit Acetonitril	84
2.2.5.4.	Ergebniszusammenfassung der Trennungen mit Acetonitril	85
2.2.5.5.	Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril	86
2.2.6.	Natriumacetat - Puffer.....	86
2.2.7.	Kalibrierung der Enantiomere.....	87
2.2.7.1.	Fluoreszenzdetektion	87
2.2.7.2.	UV - Detektion.....	88
2.2.7.3.	Ergebniszusammenfassung.....	88
2.2.8.	On-line Detektion des Cirkulardichroismus.....	89
2.2.8.1.	Cirkulardichroismus.....	89
2.2.8.2.	Messung des Cirkulardichroismus	91
2.2.8.3.	Ergebniszusammenfassung.....	97
2.3.	POLYMER GEBUNDENE β -CYCLODEXTRIN - CSP	99
2.3.1.	Natriumacetatpuffer	99
2.3.2.	Phosphatpuffer	99
2.2.3.	Ergebniszusammenfassung.....	102
2.4.	MODIFIZIERTE β -CYCLODEXTRIN - CSP	103
2.4.1.	Acetylderivat des β -Cyclodextrin	104
2.4.2.	Naphthylethylcarbamaterivat des β -Cyclodextrin	106
2.4.3.	Permethylierte β -Cyclodextrin - CSP	109

2.4.4. Ergebniszusammenfassung	109
2.5. α -CYCLODEXTRIN UND MODIFIZIERTE PHASEN	109
2.6. γ -CYCLODEXTRIN UND MODIFIZIERTE PHASEN	110
2.7. $^1\text{H-NMR}$ – UNTERSUCHUNGEN	111
2.7.1. $^1\text{H-NMR}$ in D_2O	111
2.7.2. Ergebniszusammenfassung	113
2.8. GC/MS - UNTERSUCHUNGEN.....	114
2.8.1. PCI – Technik.....	114
2.7.2. Diastereomerenbildung mit S-(-)-N-(Trifluoroacetyl)-L-prolylchlorid.....	115
2.8.3. Ergebniszusammenfassung	120
3. ZUSAMMENFASSUNG	122
4. MATERIAL UND METHODEN.....	124
4.1. GERÄTE	124
4.2. SOFTWARE.....	125
4.3. REAGENZIEN	125
4.4. REFERENZSUBSTANZEN.....	126
4.5. HPLC-SÄULEN	127
4.6. PUFFER FÜR DIE HPLC	127
4.7. HPLC - BEDINGUNGEN	129
4.8. GC/MS - BEDINGUNGEN	129
5. ANHANG.....	130
5.1. FIRMENVERZEICHNIS	130
5.2. TRENNUNGEN AN β -CYCLODEXTRIN - CSP	131
5.3. DIASTEREOMERENTRENNUNGEN MITTELS GC/MS	132
5.4. PCI - MS - SPEKTREN	133
6. LITERATURVERZEICHNIS	139

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

δ	chemische Verschiebung [ppm]
[M+H] ⁺	Protoniertes Molekül
2,3-BDB	1-(1,3-Benzodioxol-4-yl)-2-butanamin; 1-(2,3-Methylendioxyphenyl)-2-butanamin
2,3-AcBDB	N-Acetyl-1-(1,3-Benzodioxol-4-yl)-2-butanamin; N-Acetyl-1-(2,3-methylendioxyphenyl)-2-butanamin
2,3-EBDB	N-Ethyl-1-(1,3-Benzodioxol-4-yl)-2-butanamin; N-Ethyl-1-(2,3-methylendioxyphenyl)-2-butanamin
2,3-MBDB	N-Methyl-1-(1,3-Benzodioxol-4-yl)-2-butanamin; N-Methyl-1-(2,3-methylendioxyphenyl)-2-butanamin
2,3-MMBDB	N,N-Dimethyl-1-(1,3-Benzodioxol-4-yl)-2-butanamin; N,N-Dimethyl-1-(2,3-methylendioxyphenyl)-2-butanamin
2,3-MDA	2,3-Methylendioxyamphetamin; 1-(2,3-Methylendioxyphenyl)-2-propanamin
2,3-MDMA	2,3-Methylendioxymethamphetamin; N-Methyl-1-(2,3-methylendioxyphenyl)-2-propanamin
3,4-BDB	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-butanamin; 1-(3,4-Methylendioxyphenyl)-2-butanamin
3,4-EBDB	N-Ethyl-1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-butanamin; N-Ethyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin
3,4-MBDB	N-Methyl-1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-butanamin; N-Methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin
3,4-MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin; 1-(3,4-Methylendioxyphenyl)-2-propanamin
3,4-MDE	3,4-Methylendioxyethamphetamin; N-Ethyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-propanamin
3,4-MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin; N-Methyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-propanamin
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HT _{2A}	5-Hydroxytryptamin- 2A-Rezeptorsubtyp
5-HT _{2C}	5-Hydroxytryptamin- 2C-Rezeptorsubtyp
Abb.	Abbildung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CD	Cirkulardichroismus
CI	Chemische Ionisierung
CSP	Chirale Stationäre Phase
CTA	Cellulosetriacetat
DAD	Dioden-Array-Detektor, Multiwellenlängendetektor
DMA	3,4-Dimethoxyamphetamin
DMCPA	trans-2-(2,5-Dimethoxy-4-methylphenyl)-cyclopropylamin
DOB	2,5-Dimethoxy-4-bromamphetamin
DOET	2,5-Dimethoxy-4-ethylamphetamin
DOI	1-(2,5-Dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropan
DOM	2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamin
DON	2,5-Dimethoxy-4-nitroamphetamin
FLD	Fluoreszenzdetektor
GC/MS	Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HMA	4-Hydroxy-3-methoxyamphetamin
HME	4-Hydroxy-3-methoxyethamphetamin
HMM	4-Hydroxy-3-methoxymethamphetamin
LSD	Lysergsäurediethylamid
M	Molmasse
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
on-line	direkte Kopplung eines Detektors an eine HPLC
PCI	Positive chemische Ionisierung
PMA	4-Methoxyamphetamin
Tab.	Tabelle
TEA	Triethylamin
TIC	Total Ion Count = Totalionenstrom
TPC	N-(Trifluoroacetyl)-L-prolylchlorid

1. Einleitung

1.1. UNTERSUCHTE SUBSTANZEN

Zur Untersuchung sind in der vorliegenden Arbeit vor allem Substanzen gekommen, die in Zusammenarbeit des Pharmazeutische Institutes der Christian-Albrechts-Universität mit dem Landeskriminalamt Kiel synthetisiert und massenspektrometrisch vermessen worden sind [1].

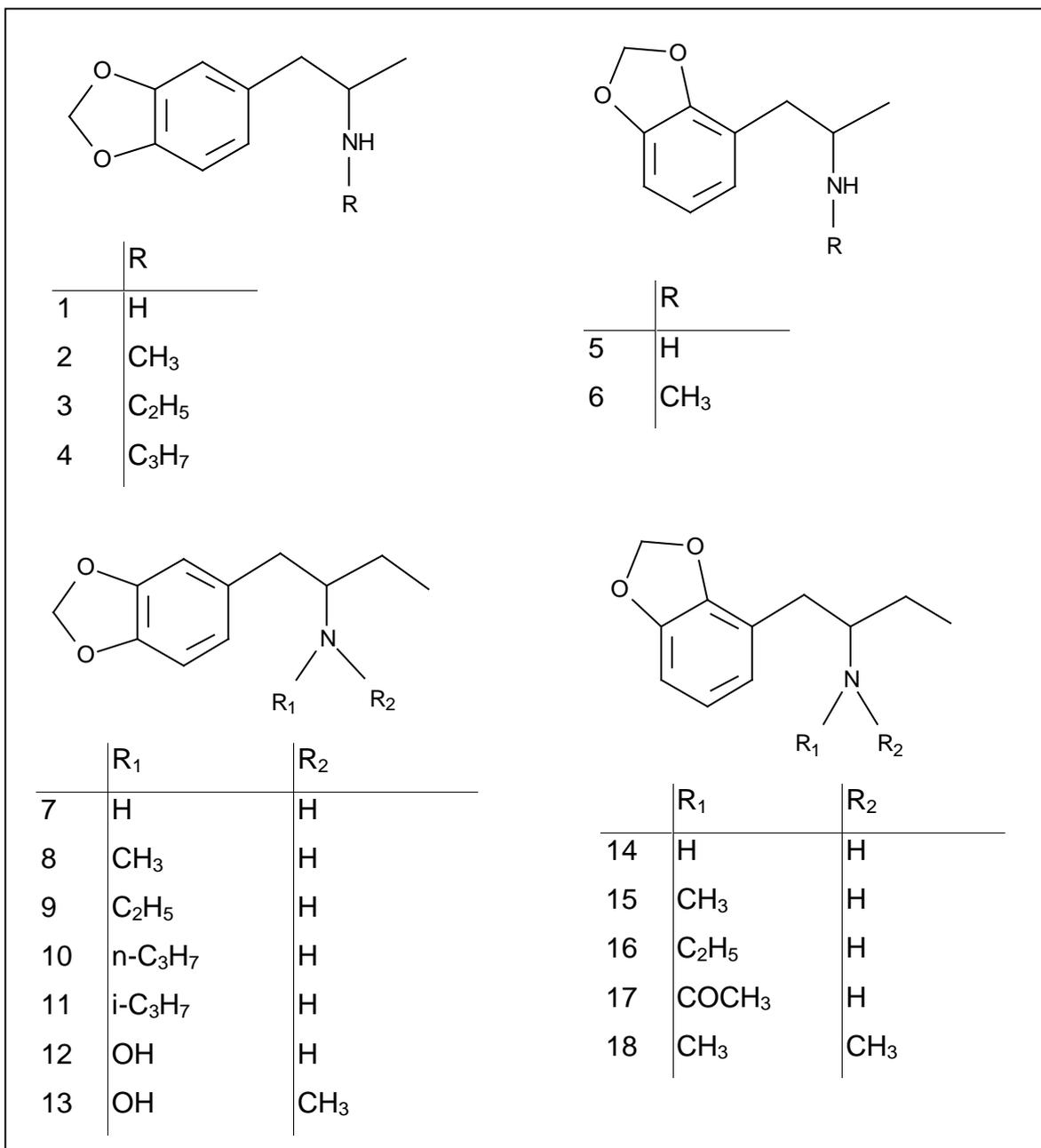
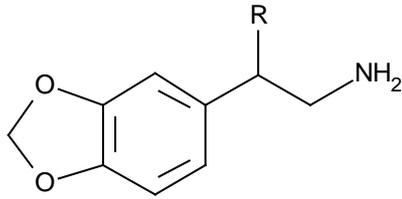
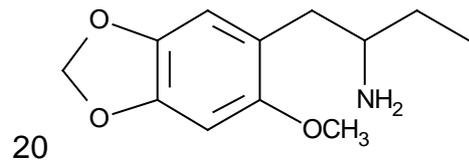
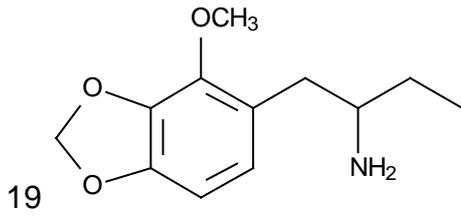
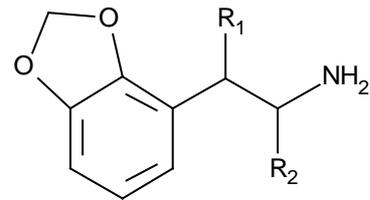


Abb. 1.1.: Untersuchte Substanzen

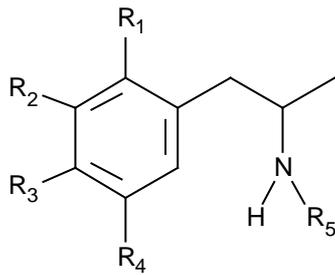
EINLEITUNG



	R
21	CH ₃
22	C ₂ H ₅



	R ₁	R ₂
23	CH ₃	H
24	C ₂ H ₅	H
25	C ₂ H ₅	CH ₃



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
26	H	OH	OCH ₃	H	H
27	H	OH	OCH ₃	H	CH ₃
28	H	H	OCH ₃	H	H
29	H	H	OH	H	CH ₃
30	H	H	Cl	H	H
31	OCH ₃	H	Br	OCH ₃	H
32	H	H	H	H	H
33	H	H	H	H	CH ₃

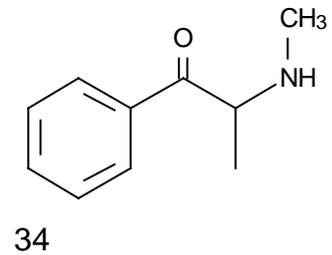


Abb. 1.1.: Untersuchte Substanzen (Fortsetzung)

Die Verbindungen **26** und **27** sind Metabolite von 3,4-MDE bzw. 3,4.MDA.

Die meisten der untersuchten Verbindungen haben ein Assymetriezentrum an dem zum Stickstoff α -ständigen Kohlenstoffatom. Ausnahmen bilden hier die 3,4-Methylenedioxy-Derivate **21** und **22** sowie die 2,3-Methylenedioxy-Derivate **23** und **24**, deren Chiralitätszentrum sich am β -ständigen Kohlenstoff befinden.

Die Verbindung **25** liegt wegen ihrer zwei Assymetriezentren als Diastereomerenpaar vor.

EINLEITUNG

1.2. EIGENSCHAFTEN VON PHENYLALKYLAMINEN

Die Phenylalkylamine lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften in 3 Gruppen einteilen. Zum einen in die Gruppe der Amphetamin-Derivate, die den Neurotransmittern Adrenalin und Noradrenalin ähnlich sind, zum anderen in die Gruppe der Mescaline-Derivate und zum dritten in die Gruppe der Entactogene (Abbildung 1.2).

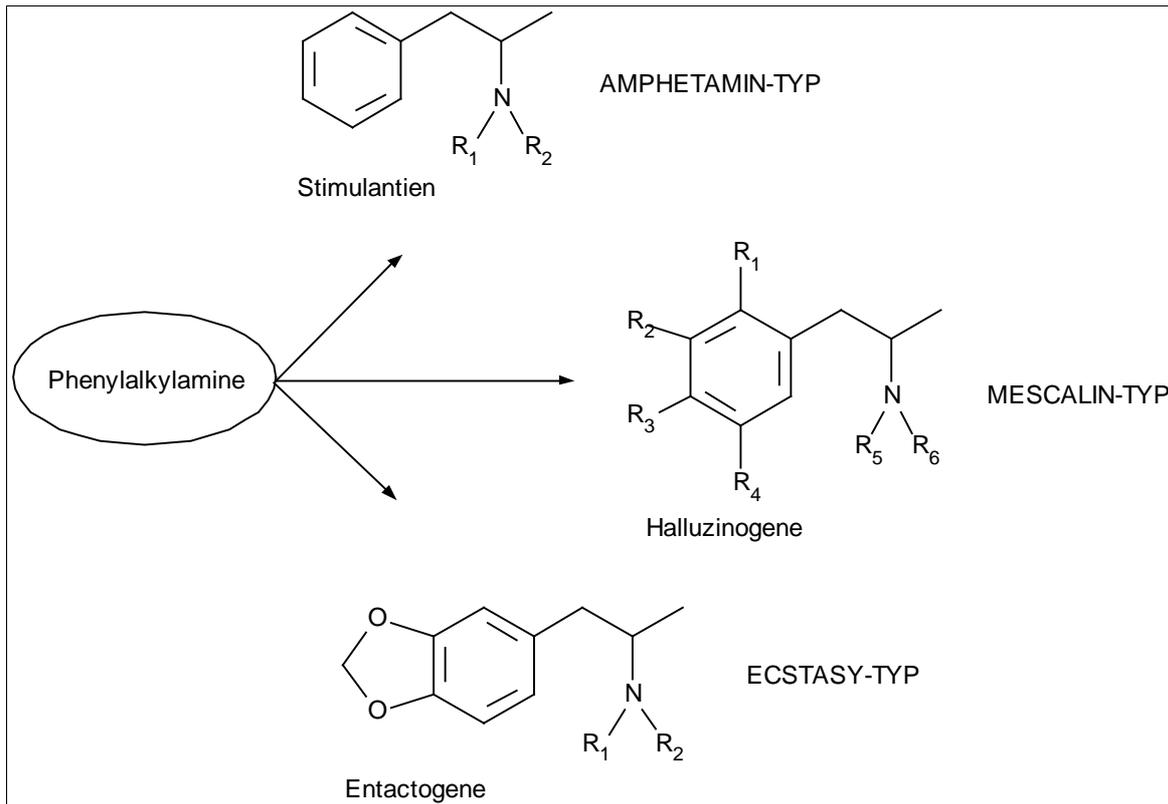


Abb. 1.2.: Pharmakologische Klassifizierung der Phenylalkylamine aufgrund ihrer chemischen Struktur

Während die Amphetamine durch ihre zentralstimulierenden Eigenschaften leistungssteigernd wirken, lösen die Derivate der Mescaline-Gruppe halluzinogene Wirkungen, ähnlich dem LSD, aus. Mescaline (3,4,5-Trimethoxyphenylethylamin) als Leitsubstanz dieser Gruppe ist der Hauptinhaltsstoff des sogenannten Peyotl. Als Peyotl werden die getrockneten oberirdischen Teile von *Lophophora williamsii* (Fam. Cactaceae) bezeichnet [2]. Die Entactogene hingegen „erzeugen im Inneren ein Gefühl“. Dies ist die direkte Übersetzung des Wortstammes Entactogen ($en_{\text{griech.}}$ = von innen, $tactus_{\text{lat.}}$ = das Gefühl, $gen_{\text{griech.}}$ = erzeugen), der 1986 von Nichols [3] geprägt worden ist. Die Verbindungen

3,4-BDB und 3,4-MBDB sind die Prototypen dieser Verbindungsklasse, während die Verbindungen 3,4-MDA und 3,4-MDMA zu der entactogenen Wirkung auch noch stimulierende Eigenschaften aufweisen.

1.2.1. Enantioselektive Eigenschaften von Stimulanzien und Halluzinogenen

Shulgin zeigte 1973 [4], daß eine Dosis von $8\mu\text{g kg}^{-1}$ R-(-)-2,5-Dimethoxy-4-methylamphetamin am Menschen die gleiche Wirksamkeit besitzt wie die zweifache Menge des Razemates. Das S-(+)-Isomer zeigte über weite Dosisbereiche keine zentralwirksamen Effekte. Auch bei $30\mu\text{g kg}^{-1}$ konnte keine sympathomimetischer Effekt wie Mydriasis, Bluthochdruck und Tachykardie beobachtet werden. Shulgin weist dabei auf die Strukturähnlichkeit der Isomeren R-(-)-DOM mit dem Halluzinogen (5R,8R)-(+)-LSD hin (Abbildung 1.3.). Damit ist erstmals ein Zusammenhang zwischen Wirksamkeit und Konfiguration der Phenylalkylamine hergestellt worden.

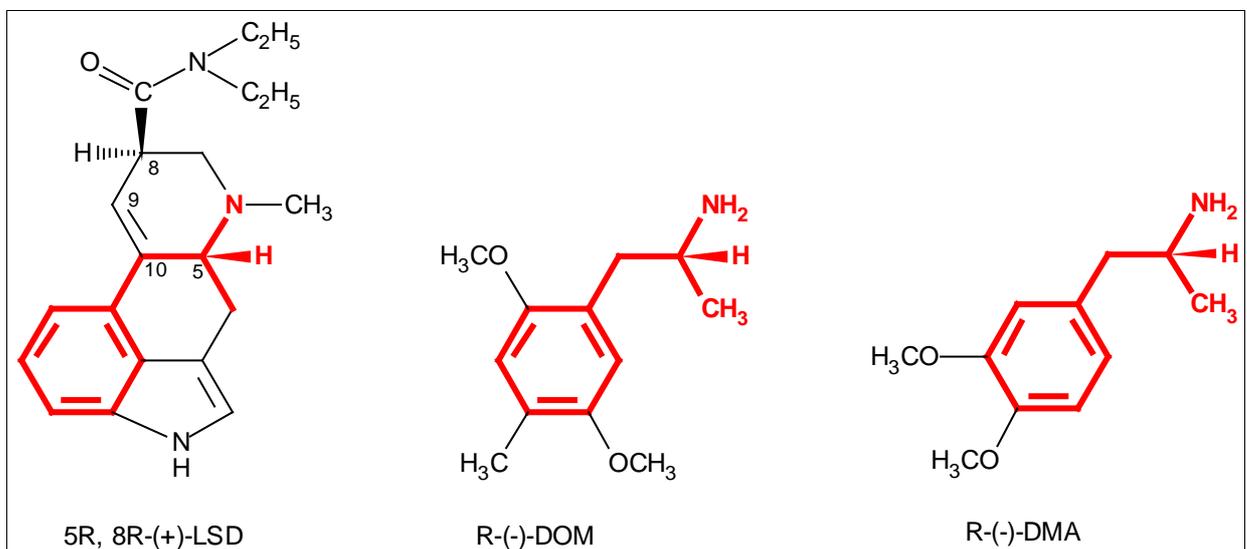


Abb. 1.3.: Stereochemie und Ähnlichkeiten von LSD, DOM und DMA

In einer späteren Studie konnten Nichols et al. 1978 [5] diese Hypothese bestätigen.

EINLEITUNG

Auch Harris et al. [6] konnten im Tierversuch zeigen, daß R-(-)-DOM wirksamer ist als S-(+)-DOM. Barfknecht und Nichols [7] haben dem R-(-)-Enantiomer von DMA die mescalinische Wirkung zugeordnet. Sowohl R-(-)-DOM wie auch R-(-)-DMA haben damit deutliche strukturelle Ähnlichkeiten mit (5R,8R)-LSD hinsichtlich ihres Stereozentrums, wenn man die Wirkungen dieser Enantiomere betrachtet (Abbildung 1.3.).

An Nabelschnurarterien von Schafen kann der agonistische Effekt am 5-HT-Rezeptor beobachtet werden, indem die Kontraktion der Arterie gemessen wird. Dieser Effekt korreliert mit einer halluzinogenen Wirkung. Aus der Beobachtung der Kontraktion kann also ein gewisser halluzinogener Effekt abgeleitet werden. Es zeigte sich, daß die R-(-)-Isomere der untersuchten Phenylalkylamine DOB, DOET, DOM 2,5-DMA und PMA die größere Aktivität besitzen [8, 9]. Dieser Befund konnte auch mit anderen Testsystemen wie der Hyperthermie an Hasen an zahlreichen Phenylalkylaminen bestätigt werden. Die R-(-)-Isomere der hier untersuchten Phenylalkylamine waren hier 2 bis 12 mal aktiver als ihre S-(+)-Isomere [9, 10]. An Testsystemen mit Ratten und Katzen sind das R-(-)-DOM und das 1R,2S-(-)-DMCPA als wirksamere Isomere identifiziert worden [5, 11].

Affinität zum 5-HT-Rezeptor

Bei der Ermittlung der Rezeptoraffinität konnten Glennon, Young, Benington und Morin 1982 [12] zeigen, daß die R-(-)-Enantiomere der Phenylalkylamine DOB, DOI und DON eine größere Affinität zu 5-HT-Rezeptoren haben. 1984 zeigte Glennon, Titeler und McKenney [13], daß R-(-)-DOB sowohl zum 5-HT₁ wie auch zum 5-HT₂-Rezeptorsubtyp eine größere Affinität besitzt als sein S-(+)-Enantiomer. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen der experimentell ermittelten ED₅₀ durch Bindungsstudien am 5-HT₁ und 5-HT₂-Rezeptorsubtyp und der halluzinogenen Wirkung im Menschen hergestellt werden.

Freisetzung von Serotonin

Die Serotonin-Speicherentleerung durch die Isomere des p-Chloramphetamins ist an Rattenhirnen untersucht worden. Beide Enantiomere reduzieren den Serotoninspiegel im Rattenhirn. Das R-(-)-4-Chloramphetamin induziert jedoch eine schnellere Entleerung der Serotoninspeicher als sein S-(+)-Isomer [14].

Wiederaufnahmehemmung von Dopamin

S-(+)-Amphetamin (D-Amphetamin) ist in striatalen Synapsen des Rattenhirns ein etwa 5 mal stärkerer Wiederaufnahmehemmer für Dopamin als das R-(-)-Isomer. Mit den Enantiomeren des DOM konnte keine Hemmung beobachtet werden [15].

Wiederaufnahmehemmung von Norepinephrin

Beide Enantiomere des Amphetamins sind starke Wiederaufnahmehemmer für Norepinephrin in hypothalamischen Synapsen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Amphetamin-Enantiomeren [15]. Auch DOM hat keinen Effekt auf die Wiederaufnahmehemmung von Norepinephrin [15]. An isoliertem Rattenhirn ist S-(+)-Amphetamin im Kleinhirn, Hypothalamus, Thalamus und Mittelhirn stärker wirksam als das R-(-)-Enantiomer [16].

Wiederaufnahmehemmung von Serotonin

S-(+)-Amphetamin ist ein Wiederaufnahmehemmer von Serotonin, jedoch ist dieser Effekt schwächer als die Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin und Norepinephrin. R-(-)-Amphetamin hemmt nicht die Wiederaufnahme von Serotonin. Auch die Enantiomere von DOM sind keine Wiederaufnahmehemmer von Serotonin [15].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die R-(-)-Enantiomere der diskutierten Phenylalkylamine vom Mescalintyp in den jeweiligen Testsystemen in stärkerem Maße Effekte auslösten, während die S-(+)-Enantiomere weniger wirksam sind. Die Stimulanzien von Amphetamin-Typ repräsentieren ihre Eigenschaften vornehmlich durch ihr S-(+)-Enantiomer.

EINLEITUNG

1.2.2. Enantioselektive pharmakologische Eigenschaften von Entactogenen

An optisch reinem 3,4-Methylenedioxyamphetamin ist gezeigt worden, daß das R-(-)-Enantiomer im Tierversuch eher halluzinogene Effekte auslöst, während das S-(+)-Enantiomer amphetaminartige Wirkungen zeigt [17, 18]. Beide Isomere des 3,4-MDA sind biologisch aktiv, jedoch unterscheiden sie sich hinsichtlich Ihrer Effekte [19]. Das R-(-)-Enantiomer ist den klassischen halluzinogenen Substanzen ähnlich. Das S-(+)-Enantiomer ist in annähernd derselben Dosis aktiv. Es hat jedoch keine halluzinogenen Wirkungen, sondern Effekte auf Gefühl und Einfühlungsvermögen, also auf entactogene Eigenschaften, in etwa der gleichen Konzentration wie das Razemat [20]. S-(+)-MDMA ist stärker aktiv als R-(-)-MDMA. An mit (R,S)-(±)-MDA trainierten Ratten wurde das S-(+)-Enantiomer des 3,4-MDA als das wirksamere identifiziert [18].

Rezeptor-Affinität

R-(-)-MDMA und R-(-)-MDA bindet mit etwa dreifach höherer Affinität als ihre S-(+)-Isomere an Serotonin 5-HT₂- und 5-HT₁- Rezeptoren [21].

Freisetzung von Serotonin

Nichols et al. zeigten 1982 [22], daß S-(+)-MDA sowie S-(+)-MDMA ähnliche Potenz besitzen, die R-(-)-Enantiomere jedoch weniger Serotonin freisetzen. Johnson, Andrew et al. fanden 1986 [23] keine signifikante Erhöhung der Serotoninfreisetzung für die Enantiomere des 3,4-MDA und 3,4-MDMA. Lediglich für 3,4-BDB konnte eine signifikant stärkere Freisetzung von Serotonin durch das S-(+)-Isomer beobachtet werden.

Neurotoxizität

Schmidt beschrieb 1987 [24], daß nach Gabe der 3,4-MDMA – Enantiomere zunächst eine reversible Serotonin – Freisetzung durch beide Enantiomere zu beobachten ist. In der Langzeitbeobachtung zeigt sich, daß nur das S-(+)-Enantiomer eine Reduktion der Serotonin – Konzentrationen verursacht, welches mit einem Untergang von Serotonin Neuronen oder Nervenzellen zu erklären ist.

Freisetzung von Dopamin

3,4-BDB und 3,4-MBDB sind nicht an einer Dopaminfreisetzung beteiligt. Für 3,4-MDA und 3,4-MDMA konnte die Freisetzung von Dopamin durch das Razemat sowie durch die Enantiomere im Tierversuch nachgewiesen werden. Beide S-(+)-Isomere der Verbindungen stellten sich dabei als die wirksameren Enantiomere heraus [23]. Da die Vorbehandlung mit dem Serotonin Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin die Freisetzung von Dopamin durch S-(+)-MDMA abschwächt, kann vermutet werden, daß die Dopaminfreisetzung indirekt auf einer Serotonin-Freisetzung beruht [25].

Wiederaufnahmehemmung von Dopamin

Die Wiederaufnahme von Dopamin in die striatalen Synapsen des Rattenhirns ist von Steele et al. 1987 [15] untersucht worden. Die S-(+)-Isomere des 3,4-MDA und 3,4-MDMA sind wirksamere Wiederaufnahmehemmer als ihre R-(-) Enantiomere. Kein Unterschied in der Wiederaufnahme von Dopamin konnte für R-(-)- und S-(+)-3,4-MBDB beobachtet werden.

Wiederaufnahmehemmung von Norephedrin

Die Wiederaufnahmehemmung von Norephedrin in hypothalamische Rattenhirnsynapsen ist bei den S-(+)-Enantiomeren des 3,4-MDA, 3,4-MDMA und 3,4-MBDB intensiver als bei ihren R-(-)-Isomeren [15].

Wiederaufnahmehemmung von Serotonin

Auch bei der Wiederaufnahmehemmung von Serotonin in hippocampale Synapsen des Rattenhirns sind die S-(+)-Enantiomere von Amphetamin, 3,4-MDA, 3,4-MDMA und 3,4-MBDB wirksamer [15].

Stereotype Verhaltensweisen

Die Beobachtung stereotyper Verhaltensweisen werden auf dopamin- bzw. serotoninabhängige Mechanismen zurückgeführt [26]. S-(+)-MDMA verursacht bei Ratten ein 5 bis 10 mal stärkeres stereotypes Verhalten als das R-(-)-Enantiomer [26].

In den aufgeführten Studien konnte also generell für die S-(+)-Enantiomere der Methylenedioxyamphetamin-Derivate eine stärkere Wirksamkeit hinsichtlich ihrer entactogenen Eigenschaft beobachtet werden.

1.2.3. Enantioselektive Biotransformation von Entactogenen

Lim und Foltz fanden 1993 [27] in Rattenurin nach Fütterung von racemischen 3,4-MDMA mehr R-(-)-MDMA und mehr R-(-)-HMM, der an der 3,4-Methylenedioxy-Gruppe geöffnete Metabolit des 3,4-MDMA, als die entsprechenden S-(+)-Isomere. Nach Fütterung von racemischen 3,4-MDA fand die Arbeitsgruppe mehr S-(+)-MDA und S-(+)-HMA, der entsprechende ringgeöffnete Metabolit des 3,4-MDA, im Rattenurin. Ebenfalls ist in dieser Arbeit die Enantiomerenverteilung in verschiedenen Regionen des Rattenhirns untersucht worden. Qualitativ wurde auch hier mehr R-(-)-MDMA und mehr S-(+)-MDA gefunden. Nach intraperitonealer Injektion von 3,4-MDE konnte ein derartig deutlicher Unterschied zwischen den Enantiomeren nicht beobachtet werden [28]. Nach 1 Stunde wurde etwas mehr R-(-)-MDA nachgewiesen, nach 2 Stunden wurde mehr S-(+)-MDE und R-(-)-MDA im Rattenhirn gefunden. Nach Fütterung von (R,S)-3,4-MDA konnten Matsushima, Nagai und Kamiyana 1998 [29] nachweisen, daß das R-(-)-Enantiomer in stärkerem Maße ausgeschieden wird als das S-(+)-Enantiomer (R/S-Verhältnis für Methylenedioxyamphetamin: 1,2). Gleiches konnte die Arbeitsgruppe für 3,4-Methylenedioxyamphetamin nach Fütterung von 3,4-Methylenedioxyamphetamin nachweisen (R/S-Verhältnis für Methylenedioxyamphetamin 1,95). Bei der Analyse des Rattenurins auf die Enantiomere des 3,4-Methylenedioxyamphetamin nach 3,4-Methylenedioxyamphetamin – Gabe wurde das S-(+)-Enantiomer in verhältnismäßig größeren Mengen gefunden (R/S-Verhältnis

Methylendioxyamphetamin 0,6). Plasmauntersuchungen von mit 3,4-MDMA intravenös [30] vorbehandelten Ratten und mit 3,4-MDMA gefütterten Ratten [31] sind durchgeführt worden. Auch hier ist mehr R(-)-MDMA und mehr S(+)-MDA gefunden worden. Nach Gabe des S(+)-Enantiomers von 3,4-MDMA konnten Cho et al. [32] in vivo an Ratten zeigen, daß die Plasmakonzentration von 3,4-MDA signifikant höher war. Anhand von Rattenlebermikrosomen wurde in vitro von den Autoren das genau gegenteilige Ergebnis gefunden. Hier war die Elimination nach Gabe des R(-)-Enantiomers größer.

An acht männlichen Probanden konnte der Befund aus den Tierversuchen für eine stereoselektive Biotransformation im Menschen durch Fallon et al. 1999 [33] bestätigt werden. Die Plasma- und Urinkonzentration für R(-)-3,4-MDMA war nach 40mg oraler Gabe des racemischen 3,4-MDMA größer. Nach Gabe von (R,S)-3,4-MDA waren die Konzentrationen des S(+)-Enantiomers größer. Ebenfalls mehr R(-)-MDMA nach Gabe von (R,S)-3,4-MDMA konnten Lanz, Brenneisen und Thormann [34] im Humanurin nachweisen. Die N-Demethylierung kann damit als ein stereoselektiver Mechanismus bezeichnet werden.

Nach Gabe von 140 mg (R,S)-3,4-MDE konnten Brunnenberg und Kovar [35] zeigen, daß weniger S(+)-3,4-MDE im Serum zu finden war. Andererseits war mehr S(+)-Enantiomer des Hauptmetaboliten HME im Serum nachweisbar. Zusammen mit den in vitro Untersuchungen von Hiramatsu et al. 1990 [36], die nach Gabe von S(+)-3,4-MDMA mehr Metabolit N-methyl- α -methyldopamin (3,4-Dihydroxymethamphetamin) als nach Gabe von R(-)-3,4-MDMA gefunden haben, kann eine bevorzugte Metabolisierung des S(+)-Enantiomers von 3,4-MDE vermutet werden. Gleiche Ergebnisse sind durch eine Studie an 6 männlichen Probanden von Brunnenberg [37] ermittelt worden. Nach Gabe von 140mg MDE-HCl p.o. sind weniger R(-)-MDE bzw. weniger Metabolit R(-)-MDA gefunden worden, jedoch war die Konzentration des Phase II-Metaboliten S(+)-HME im Serum größer als das jeweilige Enantiomer.

Die Zusammenstellung der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Daten zeigen den enormen Bedarf an einer enantioselektiven Analytik von regioisomeren Methylendioxymethamphetaminen. Besonders die Erforschung der

EINLEITUNG

unterschiedlichen Wirksamkeit der Enantiomere setzt eine chirale Analytik voraus. Denkbar ist auch der arzneiliche Einsatz eines Enantiomers, welches eine chirale Analytik der Substanzen voraussetzt.

1.3. CHIRALE STATIONÄRE PHASEN IN DER HPLC

Chirale stationäre Phasen lassen sich zum Beispiel aufgrund der Wechselwirkung des Analyten mit der stationären Phase in 5 Gruppen einteilen [38, 39] (Tab. 1.1.).

Typ	Trennprinzip	Chemie
I Bürsten- oder Pirklephasen	Anziehende Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Charge-Transfer-Komplexe	Verschiedene chirale Selektoren, ionisch und kovalent gebunden
II Polymere Helices	Anziehende Wechselwirkungen, Wirt-Gast-Komplexe	Cellulosederivate, Amylosederivate
III Kavitäten	Einschlußverbindungen, Wirt-Gast-Komplexe	Cyclodextrine, Kronenether, Polyacrylamide, Polymethacrylate
IV Liganden- austausch	Ligandenaustausch	Aminosäure-Metall Komplex
V Proteine	Hydrophobe und polare Protein-Wechselwirkungen, Mesophasenwechselwirkungen	α_1 -saures Glycoprotein (AGP) Rinderserumalbumin

Tab. 1.1.: Klassifizierung chiraler stationärer Phasen

Typ I (Bürsten- oder Pirkle-Phasen)

Die chiralen Phasen vom Typ I werden auch nach ihrem Erfinder „Pirkle-Phasen“ genannt. Dabei handelt es sich um chirale Monomere, die kovalent oder ionisch an Kieselgel gebunden sind [40, 41, 42, 43]. Hauptvertreter dieser Gruppe von stationären Phasen sind vor allem Derivate des Dinitrobenzoyls der Aminosäuren Phenylglycin und Leucin, die auf Silicagel aufgebracht wurden. Diese zunächst ionischen Phasen zeigten eine hervorragende Selektivität, sind jedoch nur für relativ unpolare Fließmittel geeignet. Die Weiterentwicklung dieser Säulen zu kovalent gebundenen Phasen [41] erlaubte den Einsatz einer größeren Anzahl an Fließmitteln [44]. Abbildung 1.4. zeigt die Struktur der „Pirkle-Phasen“.

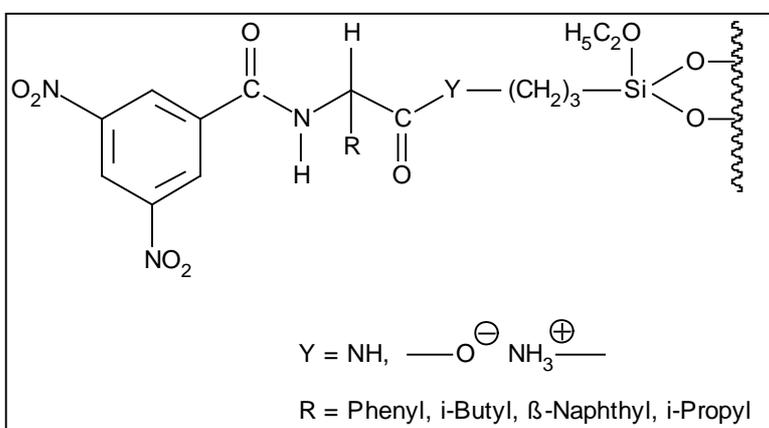


Abb. 1.4.: Struktur von „Pirkle-Phasen“

Dalgliesh beschrieb in einer „Dreipunktregel“ [45], zu welchen Wechselwirkungen es zwischen Analyt und CSP bei der Enantiomerentrennung an diesen Phasen kommen muß, damit eine Enantiomerendiskriminierung erfolgen kann (Abbildung 1.5.).

EINLEITUNG

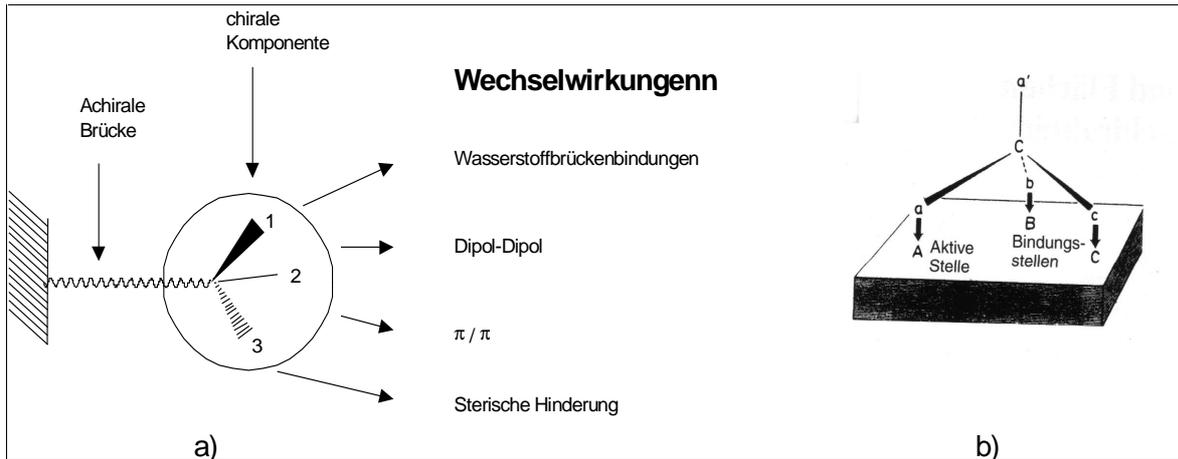


Abb. 1.5.: a) Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Typ I CSP
b) Dreipunktkontaktmodell [46]

Typ II (Polymere Helices)

Die Typ II – Phasen nutzen ebenfalls die anziehenden Wechselwirkungen der Typ I Phasen. Sie erzielen jedoch ebenfalls eine Trennung der Enantiomere durch Bildung von Einschlußkomplexen. Vor allem Derivate der Cellulose und Amylose werden verwendet [47, 48, 49, 50, 51], die unter dem Namen CHIRALPAK[®] für

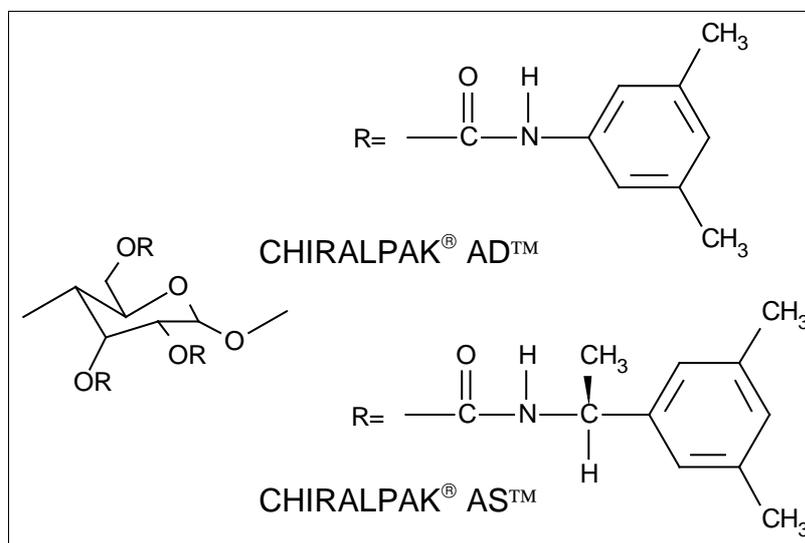


Abb. 1.6.: Beispiele von Daicel-CSP auf Cellulosebasis

Amylose-Derivate (Abbildung 1.6.) und CHIRALCEL[®] für Cellulose-Derivate (Abbildung 1.7.) der Firma Daicel im Handel sind. Andere Polysaccharide wie Chitosan, Xylan Curdulan, Dextran und Inulin sind als Phenylcarbamaterivat

getestet worden [52]. Die Polysaccharidphasen werden wegen ihrer sehr guten Trenneigenschaften sowohl auf Basis der Amylose [53] als auch auf Basis der Cellulose [54] ständig weiterentwickelt.

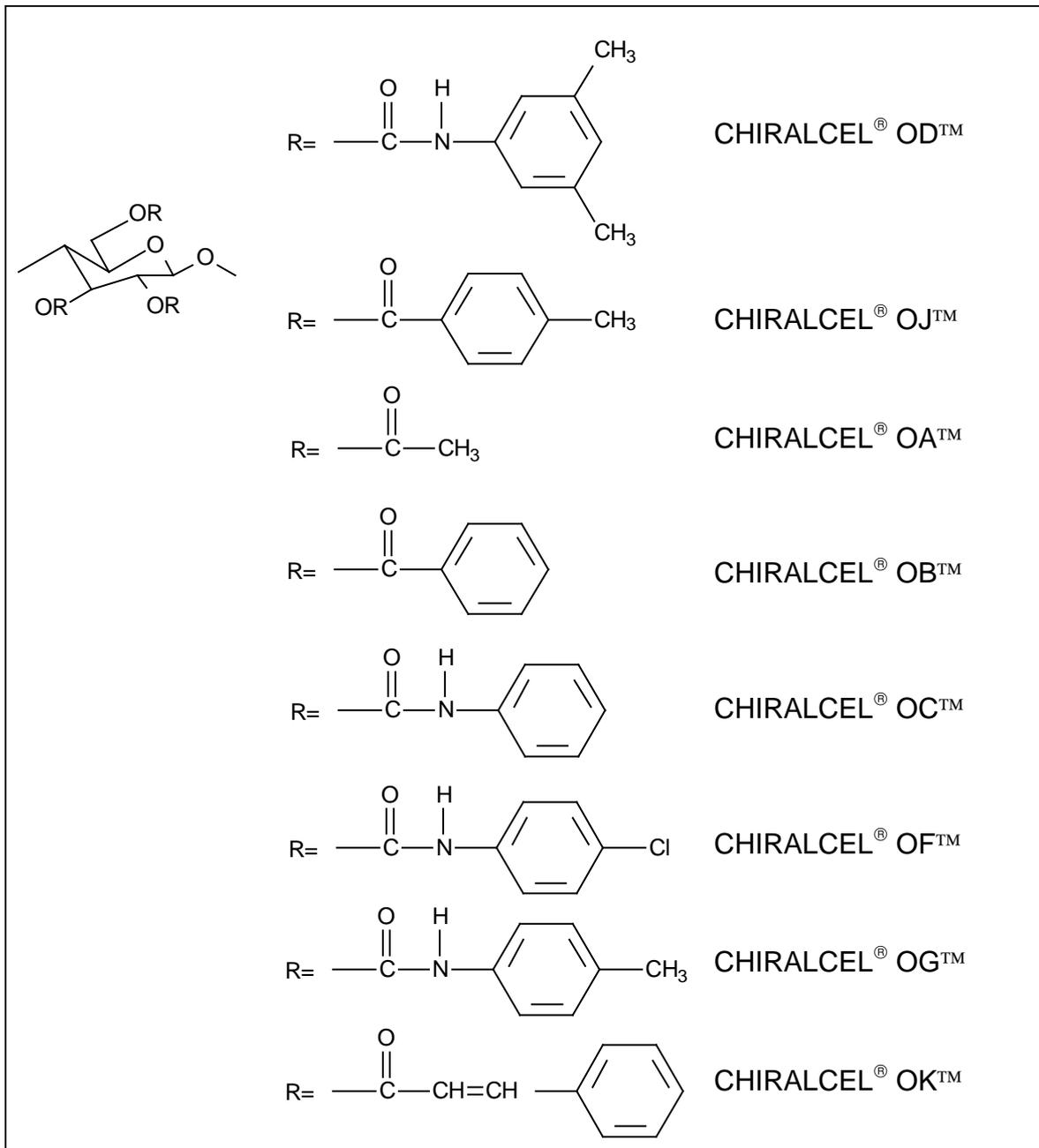


Abb. 1.7.: Beispiele von Daicel-CSP auf Amylosebasis

Typ III (Inclusionsphasen)

Chirale Phasen vom Typ III sind solche Phasen, die eine Trennung von Racematen erreichen, indem selektiv Enantiomere in ihre chirale Kavität eingeschlossen werden können. Dazu gehören die Polysaccharide, Kronenether und synthetische Polymere. Mikrokristallines Cellulosetriacetat (CTA) ist erstmals von Hesse und Hagel zur Enantiomerentrennung eingesetzt worden [55].

Cyclodextrine sind α -1,4-glycosidisch verknüpfte Ringstrukturen aus D-Glucopyranose-Einheiten. 6 Glucoseeinheiten verknüpft bilden das α -Cyclodextrin, 7 das β -Cyclodextrin und 8 das γ -Cyclodextrin. Das zylindrische Molekül besitzt einen hydrophilen Rand sowie eine hydrophobe Kavität. Die Größe des α -, β - und γ -Cyclodextrin - Ringes ist in Abbildung 1.8. wiedergegeben. Cyclodextrine sind sowohl für die Hochleistungsflüssigchromatographie [56] wie auch die Dünnschichtchromatographie geeignet [57].

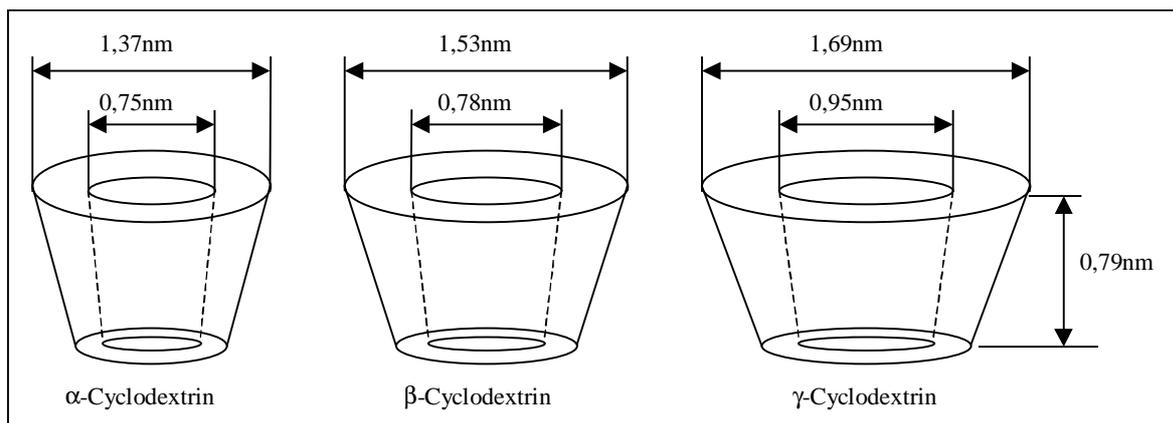


Abb. 1.8.: Kavitäten von α -, β -, und γ - Cyclodextrin

Cyclodextrin-Phasen eignen sich nicht nur zur Enantiomerentrennung, sondern auch zur Diskriminierung von Diastereomeren und Strukturisomeren [58, 59, 60].

Kronenether sind macrocyclische Polyether, die aufgrund von Ionen-Dipol-Wechselwirkungen zu starken Komplexbildungen mit Ammonium-Ionen fähig sind. Abbildung 1.9. zeigt das chirale Derivat des Polyethers 18-Krone-6 mit komplexiertem Amin. Entsprechend diesem Mechanismus werden insbesondere Trennungen von Aminen, Aminoalkoholen und Aminosäuren beschrieben [61, 62]. Unter dem Handelsnamen CROWNPAK[®] CR (+) und CROWNPAK[®] CR (-) sind diese Säulen kommerziell erhältlich. Ein Vorteil dieser Phasen ist, daß die

Analyten underivatisiert getrennt werden können [61]. Auch diese Phasen werden ständig weiterentwickelt, so daß eine noch größere Anzahl an Substanzen getrennt werden können [63].

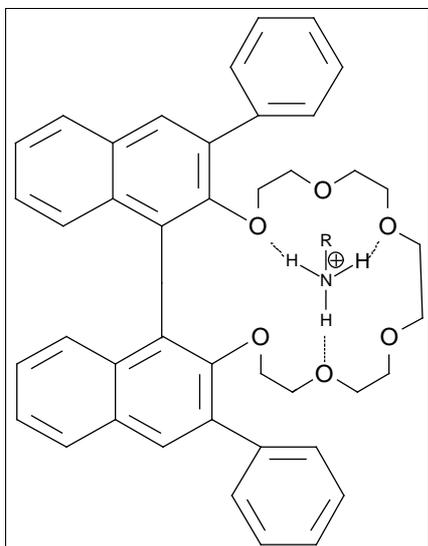


Abb. 1.9.: Struktur von 18-Krone-6 mit Amin

Die von Blaschke [64] erstmals hergestellten Polyacrylamide und Polymethacrylamide werden ebenfalls zu den helikalen Phasen des Typs III gezählt (siehe Abbildung 1.10.).

Eine weitere synthetische Phase diesen Typs ist das von Okamoto 1979 [65] hergestellte (+)-Poly(triphenylmethyl)-methacrylat (siehe Abbildung 1.11.).

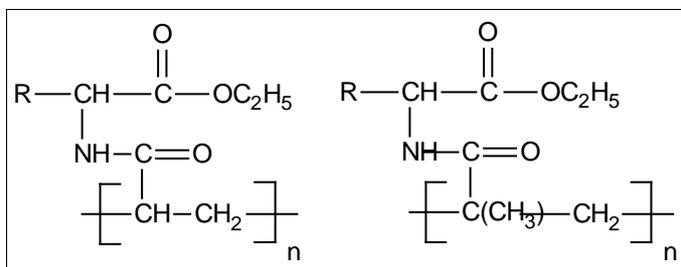


Abb. 1.10.: Polyacrylamid und Polymethacrylamid

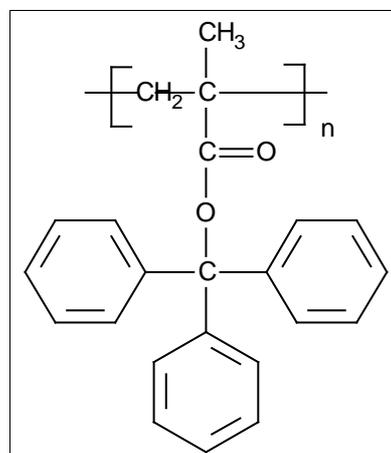


Abb. 1.11.: (+)-Poly(triphenylmethyl)-methacrylat

EINLEITUNG

Typ IV (Ligandenaustausch – Phasen)

Optisch aktive Aminosäuren, meist L-Prolin, sind bei dieser Art von Phasen über einen Spacer an Kieselgel gebunden. Durch Beladung mit Schwermetallionen, z.

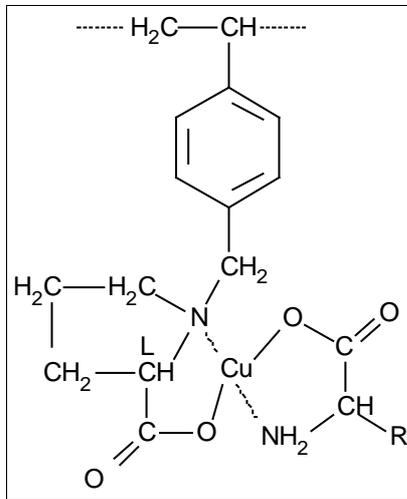


Abb.1.12.: L-Prolin – Kupfer – Komplex mit einer Aminosäure

B. Kupfer, werden Metallkomplexe mit den Aminosäuren gebildet (Abbildung 1.12.).

Bei einer Enantiomerentrennung werden diese Aminosäurenliganden aus den Komplexen verdrängt. Das Prinzip ist demnach eine unterschiedliche Stabilität der entstehenden Komplexe, wobei der Komplex mit dem unterschiedlich konfigurierten Teilen stabiler ist [66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73]. Die Ligandenaustauschchromatographie eignet sich auch zur präparativen Enantiomerentrennung [73].

Typ V (Proteinphasen)

Vor allem Rinderserumalbumin [74, 75, 76], α_1 -saures Glycoprotein [77, 78, 79] oder das Eiprotein Ovomuroid [80] werden für diese Art von Säulen verwendet. Immobilisierte Cellulase ist für die Trennung von Propanolol eingesetzt worden [81]. Die Proteinphasen sind hoch selektiv, haben aber eine geringe Kapazität. Großen Einfluß auf die Trennleistung und Stabilität der Retentionszeit haben pH, Ionenstärke, verwendeter Puffer, Ionenpaarreagenz und organischer Modifizier [19].

Chirale Selektoren als Zusatz zu achiralen Trennsystemen

An achiralen Phasen kann unter Zusatz von Selektoren, wie z. B. Kupfersulfat an Ionenaustausch-HPLC-Säule [82], Cyclodextrin [83, 83, 85, 86, 87] oder auch Kronenether [97] eine Enantiomerentrennung durchgeführt werden. Auch Stellungsisomere wurden an achiralen Phasen unter Zusatz von α - bzw. β -Cyclodextrin getrennt [89, 90, 91].

1.4. PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

HPLC - Methoden zur enantioselektiven Analytik von Methylen-dioxyamphetaminen sind für 3,4-Methylen-dioxyamphetamin (3,4-MDA), 3,4-Methylen-dioxymethamphetamin (3,4-MDMA) und 3,4-Methylen-dioxyethylamphetamin (3,4-MDE) [29, 92, 93] sowie dem Butanamin-Derivaten 1-(3,4-Methylen-dioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-BDB) bekannt [94]. Hashimoto, Hirai und Goromaru [92] beschreiben die direkte Enantiomerentrennung von 3,4-MDMA an der kovalent gebundenen Pirkle-Phase Sumichiral® OA-4600 ((S)-tert-Leucin und (S)-1-(α -Naphthyl)-ethylamin). Die Enantiomerentrennung wird im Normalphasen-Modus durchgeführt. Matsushima, Nagai und Kamiyama [29] beschreiben die Enantiomerentrennung von 3,4-MDA, 3,4-MDMA sowie 3,4-MDE an der Typ II-CSP Chiralcel OB-H® ebenfalls im Normalphasen-Modus. Direkt an β -Cyclodextrin chiralen stationären Phasen sind 3,4-MDA, 3,4-MDMA, 3,4-MDE [35, 93, 94] sowie 3,4-BDB im Umkehrphasen-Modus getrennt worden [50].

Eine systematische Untersuchung der vorliegenden Substanzen zur Enantiomerentrennung an Cyclodextrinphasen ist nicht bekannt.

Mit der vorliegende Arbeit soll dargestellt werden, wie eine Enantiomerentrennung der zur Verfügung stehenden regioisomeren Methylen-dioxyamphetamine an mit Cyclodextrin chiral modifizierten HPLC - Phasen erreicht werden kann. Dabei war ein wichtiges Ziel, eine Methode zu erarbeiten, die auf Basis der Umkehrphasenchromatographie beruht, um gegebenenfalls direkt aus Körperflüssigkeiten oder Asservaten eine Analytik gestalten zu können. Desweiteren sollte systematisch der Einfluß von Puffern, Temperatur und Modifiern auf die Trennung der Substanzen untersucht werden. Ein Vergleich mit einer alternativen Enantiomerentrennung durch Diastereomerenbildung wird diskutiert.

2. Ergebnisse und Diskussion

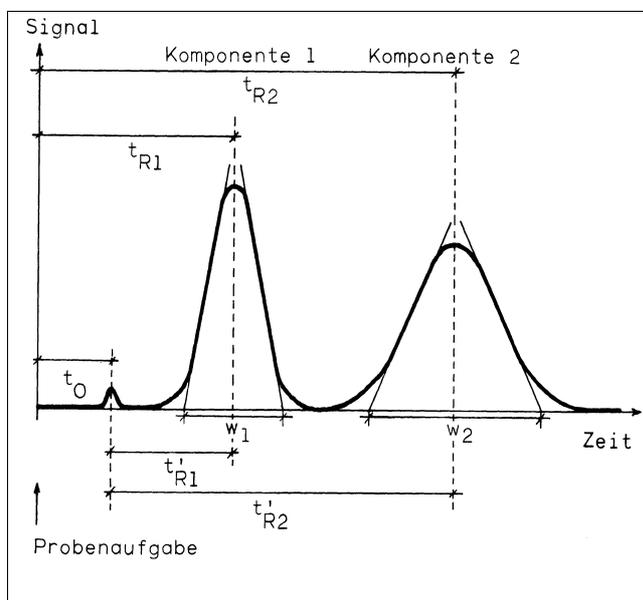
2.1. WICHTIGE VORAUSSETZUNGEN

2.1.1. Chromatographische Kenngrößen

Die Qualität einer Trennung lässt sich durch zwei Größen darstellen:

1. **Auflösung R** und
2. **Trennfaktor α .**

Abbildung 2.1 zeigt ein Chromatogramm mit zwei Peaks und deren Kenngrößen [95]:



- t_{R1} = Retentionszeit Komponente 1
- t_{R2} = Retentionszeit Komponente 2
- t'_{R1} = relative Retentionszeit Komponente 1
- t'_{R2} = relative Retentionszeit Komponente 2
- t_0 = Totzeit
- w_1 = Fußbreite Komponente 1
- w_2 = Fußbreite Komponente 2

Abb. 2.1.: Parameter eines HPLC - Chromatogrammes

Aus der Retentionszeit der Komponenten und der Fußbreite der Peaks lässt sich die **Auflösung R** ermitteln.

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2}$$

Formel 1

Unter Einbeziehung der Halbwertsbreite $w_{1/2}$ ergibt sich dann für R

$$R = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/21} + w_{1/22}} \quad \text{Formel 2}$$

$w_{1/21}$ = Peakbreite auf halber Höhe der Komponente 1

$w_{1/22}$ = Peakbreite auf halber Höhe der Komponente 2

Die sich daraus ergebenden Trennungen sind zur Orientierung schematisch in Abbildung 2.2. wiedergegeben.

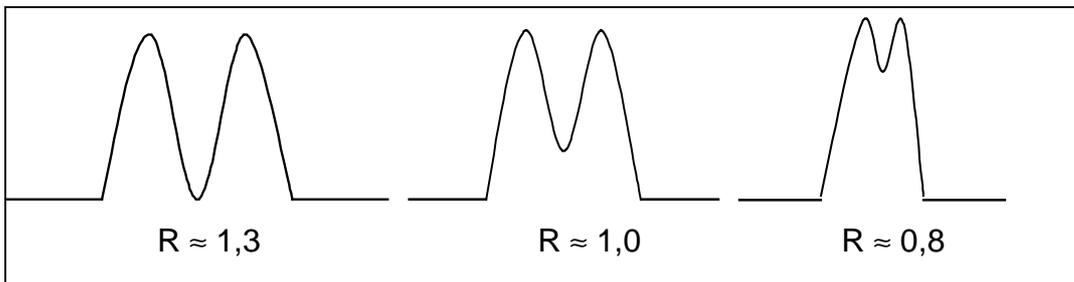


Abb. 2.2.: Schematische Darstellung von unterschiedlichen Auflösungen R

Für die sichere Quantifizierung zweier Peaks genügt eine Auflösung von 1,25 [95].

Trennungen mit $R < 0,5$ gelten in dieser Arbeit als nicht getrennt oder angetrennt. Dieses ist zu den einzelnen Substanzen dann beschrieben worden. Als eine gute Trennung werden Auflösungen von $R > 1,2$ beschrieben.

Die relative Retention oder der **Trennfaktor** α wird aus den Kapazitätsfaktoren k' berechnet [95].

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Formel 3}$$

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Trennfaktor ist der Quotient aus den k' -Werten der getrennten Komponenten.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad \text{Formel 4}$$

k' = Kapazitätsfaktor

k'_1 = Kapazitätsfaktor Komponente 1

k'_2 = Kapazitätsfaktor Komponente 2

t_R = Retentionszeit

t_0 = Totzeit

k'_1 = Kapazitätsfaktor Komponente 1

k'_2 = Kapazitätsfaktor Komponente 2

Die relative Retention ist ein Maß für die Selektivität der stationären Phase. Es liegt keine Trennung vor, wenn $\alpha = 1$ ist.

Die Qualität eines detektierten Peaks läßt sich an seiner Gauß - Verteilung erkennen. Häufig ist die Verbreiterung der hinteren Flanke des Peaks, dem „**Tailing**“. Seltener ist die Vorderseite des Peaks flacher. Diese Erscheinung wird als „**Fronting**“ bezeichnet [95]. Die **Peaksymmetrie T** wird bei 10 % der gesamtem Peakhöhe ermittelt:

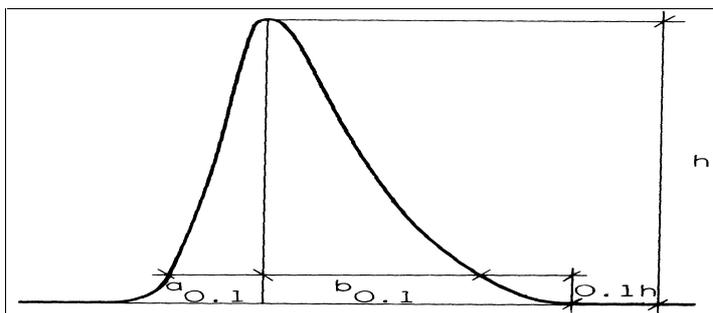


Abb. 2.3.: Parameter für die Berechnung der Symmetrie

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}} \quad \text{Formel 5}$$

T sollte nicht größer als 2,5 sein [95]. Überschreitet das Tailing einen Wert von 3, so wird die quantitative Flächenmessung fehlerhaft, weil der Nulldurchgang ungenau erkennbar ist [95]. Bei Peaks mit Fronting ist $T < 1$ [95].

Die **Bodenzahl N** ist ein Maß für die Güte der Packung der Trennsäule bei nicht retardierten Peaks. Bei den übrigen Peaks ist die Bodenzahl Kennzeichen für die zahlreichen Austauschvorgänge [93].

$$N = 16 \frac{t_R}{w} \quad \text{Formel 6}$$

Bei Einbeziehung der Halbwertsbreite erhält man für N:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Formel 7}$$

Die Kenntnis der chromatographischen Kenngrößen ist im Weiteren wichtig für die Beurteilung einer Trennung und für einen signifikanten Vergleich der Trennungen mit Literaturangaben. In den Tabellen wird die zuerst eluierte Verbindung als Peak 1 und die zuletzt eluierte Verbindung als Peak 2 bezeichnet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2. β -CYCLODEXTRIN - CSP

2.2.1 Ammoniumacetat – Puffer

2.2.1.1. Ammoniumacetat - Puffer mit Methanol

Einen 0,1 molaren Ammoniumacetat - Puffer pH 7,0 (Puffer 1) mit 5% Methanol als Modifier haben Rizzi, Hirz, Cladrowa-Runge und Jonsson 1994 [93] unter Verwendung der β -Cyclodextrinphase Chiradex[®] vorgeschlagen.

Die vorgestellten Trennungen sind mit einem Fluß von 0,8ml/min und bei einem Injektionsvolumen von zunächst 10 μ l durchgeführt worden. Die HPLC – Säule ist auf 30°C temperiert worden. Alle Prozentangaben verstehen sich als Volumenprozent.

N-Methyl-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA)

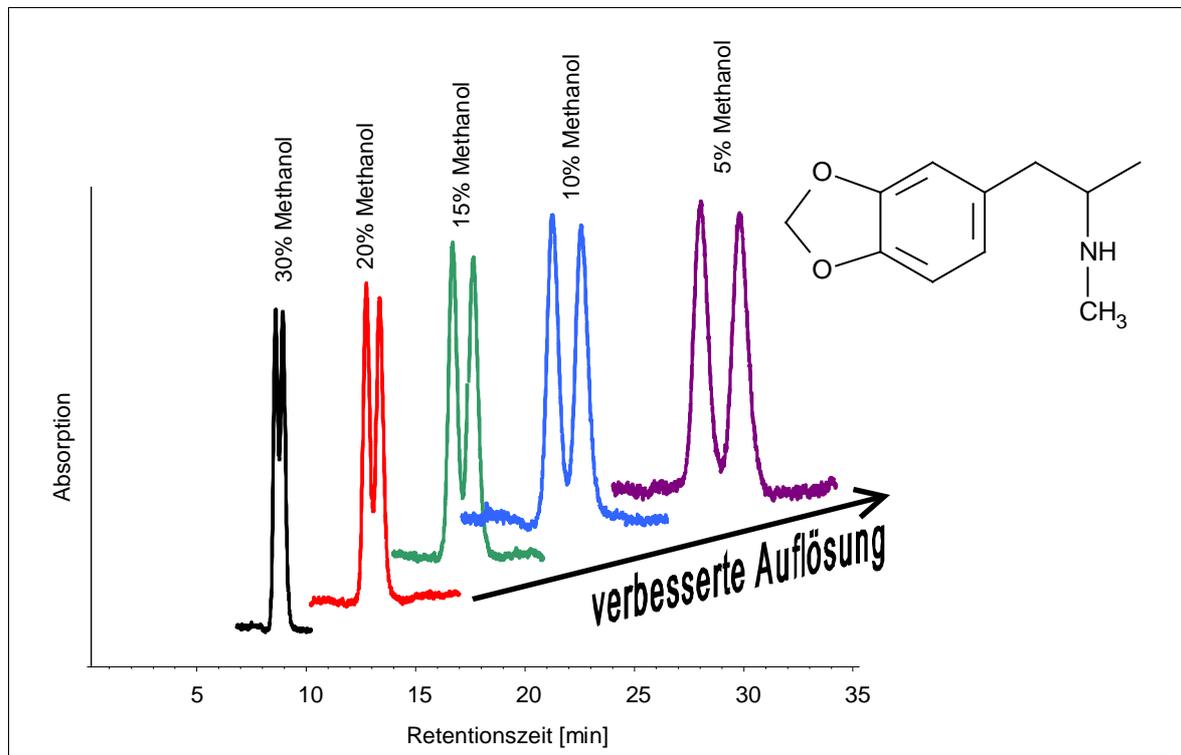


Abb. 2.4.: Trennung von 3,4-MDMA **2** mit unterschiedlichem Methanolanteil, Chiradex[®]; 70-95% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 5-30% Methanol

Anteil Methanol [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	5	27,90	29,66	0,82	0,81	0,73	0,78	8166		
10	20,98	22,21	0,95	0,82	0,57	0,61	7594	7425	1,23	1,06
15	16,35	17,26	0,84	0,96	0,44	0,48	7539	7063	1,15	1,06
20	12,78	13,38	0,90	0,86	0,34	0,36	7822	7512	1,01	1,05
30	8,60	0,93	0,99	0,83	0,27	0,29	5496	5065	0,67	1,04

Tab. 2.1.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 2

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteil ist in Abbildung 2.5. dargestellt.

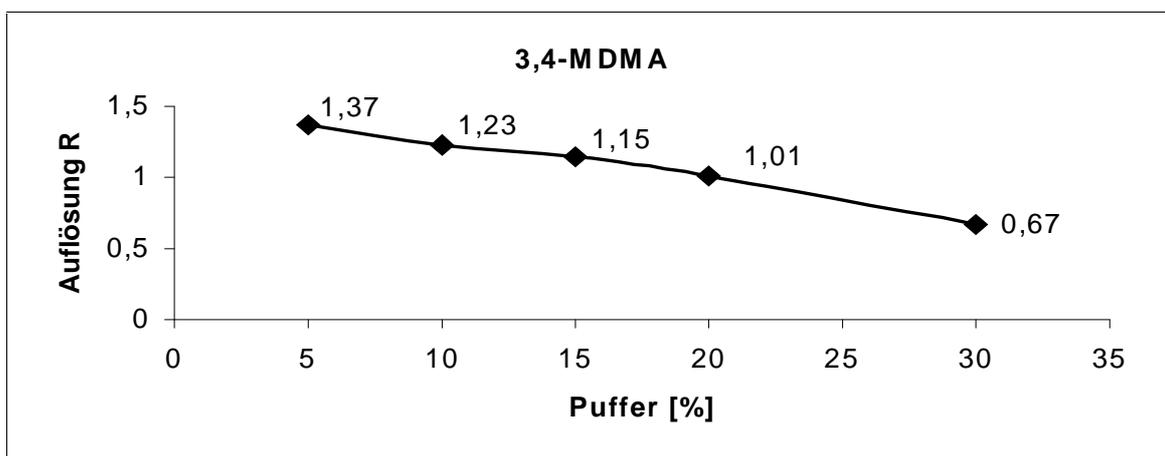


Abb.: 2.5.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

Da im allgemeinen eine niedrige Temperatur die Trennung günstig beeinflusst [84, 96, 97], ist der Einfluß der Temperatur auf die Retentionszeit und die Trennung im folgenden untersucht (Abbildung 2.5. und Tabelle 2.1.) worden.

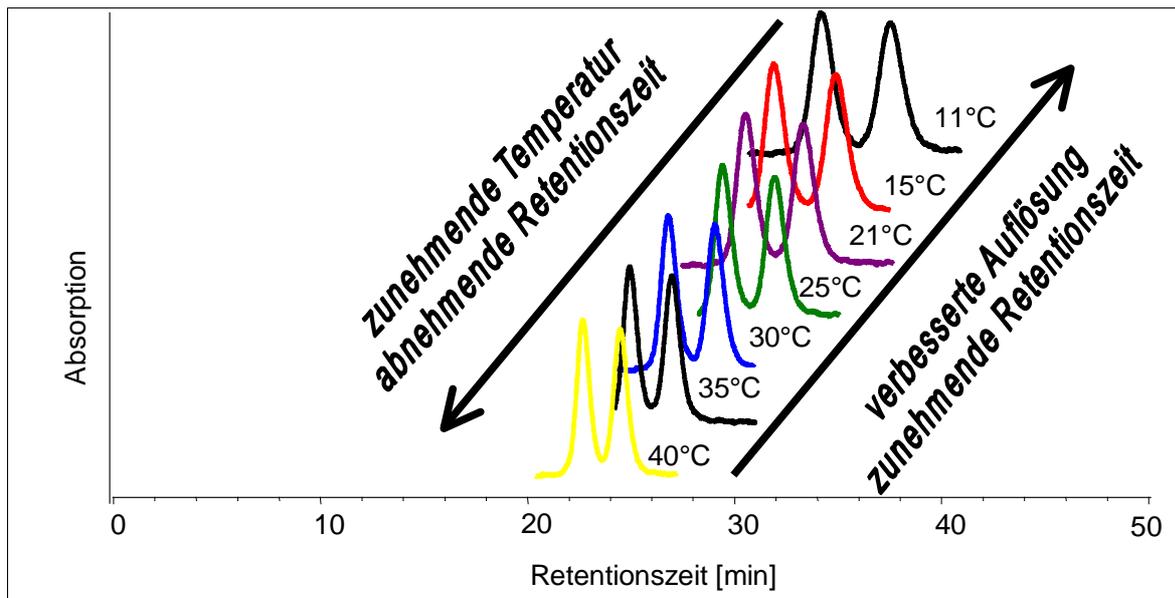


Abb. 2.6.: Trennung von 3,4-MDMA 2 bei unterschiedlichen Säulentemperaturen Chiradex®; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Methanol

Säulentemperatur [°C]	Retentionszeit [min]		Peakbreite bei halber Höhe [min]		R
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	
11	34,09	37,46	1,21	1,33	1,56
15	31,84	34,84	1,07	1,19	1,56
21	30,31	33,08	1,02	1,12	1,54
25	28,38	30,91	0,91	0,99	1,56
30	26,44	28,67	0,85	0,91	1,54
35	24,56	26,59	0,78	0,85	1,46
40	22,61	24,46	0,70	0,75	1,46

Tab. 2.2.: Retentionszeit und Auflösung für die Trennung von 2

Mit zunehmender Temperatur wird die Retentionszeit kürzer. Das heißt, die Interaktion der Verbindung mit der Cyclodextrinphase ist kürzer. Entsprechend verbessert sich die Auflösung bei abnehmender Temperatur.

Der von Rizzi, Hirz, Cladrowa-Runge und Jonsson 1994 [93] vorgeschlagene Puffer enthält für derivatisierte Amphetamine noch 0,1% Triethylamin (TEA). Auch

die Säulenspezifikationen schlagen zur Verbesserung der Trennung den Zusatz von Triethylamin vor [96, 97]. TEA wird auch in der Chromatographie an Cyclodextrinphasen zur Absättigung der freien Silanolgruppen verwendet [94]. Die Ergebnisse der TEA-Zugabe bei diesem Fließmittel sind exemplarisch an 3,4-MDMA untersucht worden.

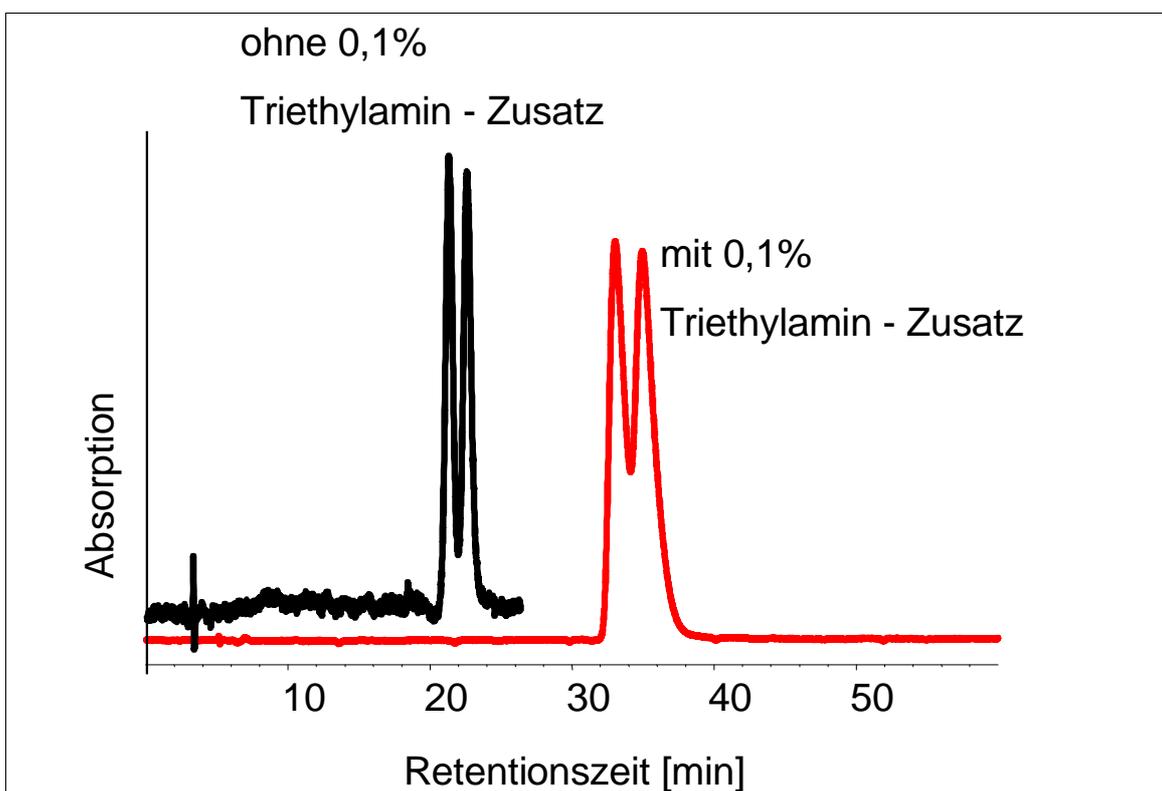


Abb. 2.7.: Trennung von 3,4-MDMA **2** mit und ohne 0,1% Triethylamin-Zusatz Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Methanol

TEA [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
0,1	33,04	34,91	0,67	0,52	1,31	1,55	3541	2798	0,77	1,06
-	20,98	22,21	0,95	0,82	0,57	0,61	7594	7425	1,23	1,06

Tab. 2.3.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **2**

Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde im weiteren grundsätzlich bei 21°C gearbeitet, da die Temperatur eine sehr gute Trennung bei angemessener Peakbreite mit 3,4-MDMA ergeben hat. Diese Temperatur ist durch den

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Säulenthermostaten reproduzierbar einzustellen. Es ist zu bedenken, daß eine höhere Temperatur auch eine größere Belastung für die Säule darstellt. Auf den Zusatz von Triethylamin ist bei diesem Fließmittel verzichtet worden, da er offensichtlich keine Verbesserung darstellt (Abbildung 2.7.). Das Injektionsvolumen wurde zur Verbesserung der Empfindlichkeit auf 20µl erhöht.

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDA)

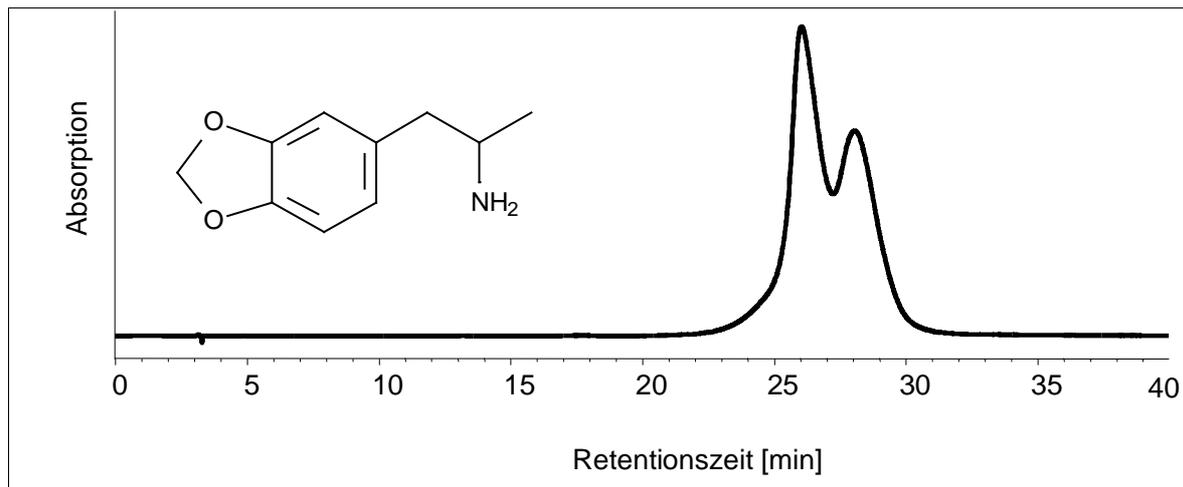


Abb. 2.8.: Trennung von 3,4-MDA 1
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
26,21	28,24	0,82	0,55	1,07	1,43	3302	2150	0,95	1,08

Tab. 2.4.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 1

N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA)

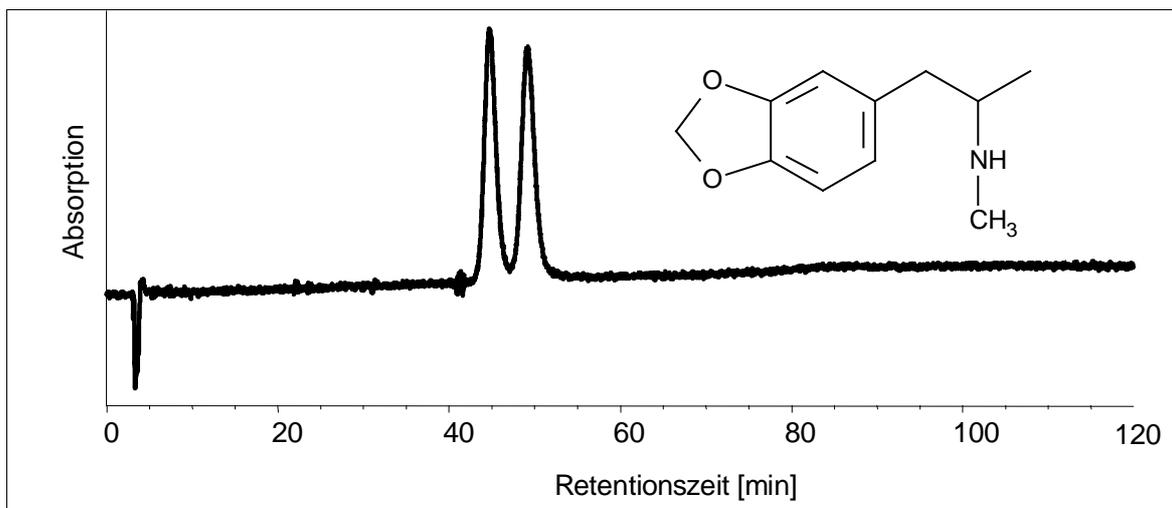


Abb. 2.9.: Trennung von 3,4-MDMA **2**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
44,68	49,18	0,74	0,92	1,47	1,64	5142	4981	1,70	1,10

Tab. 2.5.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **2**

N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

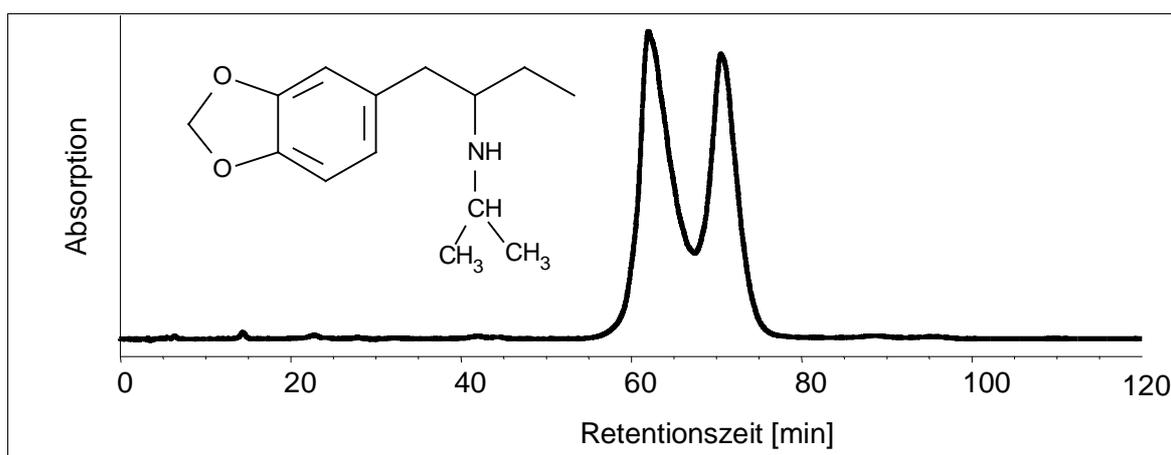


Abb. 2.10.: Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Methanol

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
61,99	70,51	0,46	0,77	4,13	3,53	1246	2214	1,31	1,14

Tab. 2.6.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **11**

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteil ist in Abbildung 2.10. dargestellt.

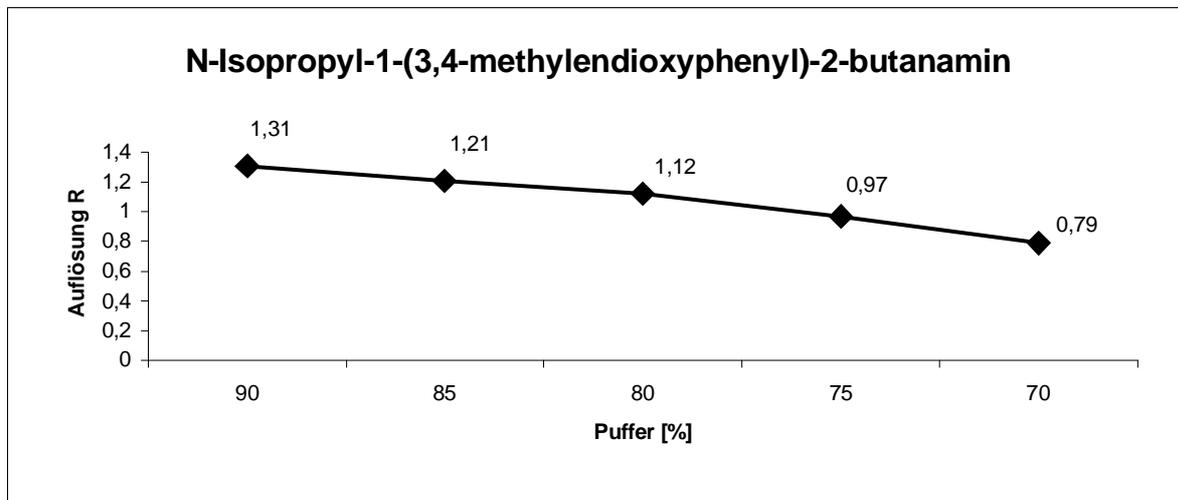


Abb. 2.10.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

1-(2,3-Methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-BDB)

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
11,27	12,73	0,72	0,69	1,20	0,99	485	917	0,78	1,13

Tab. 2.7.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **14**

N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-AcBDB)

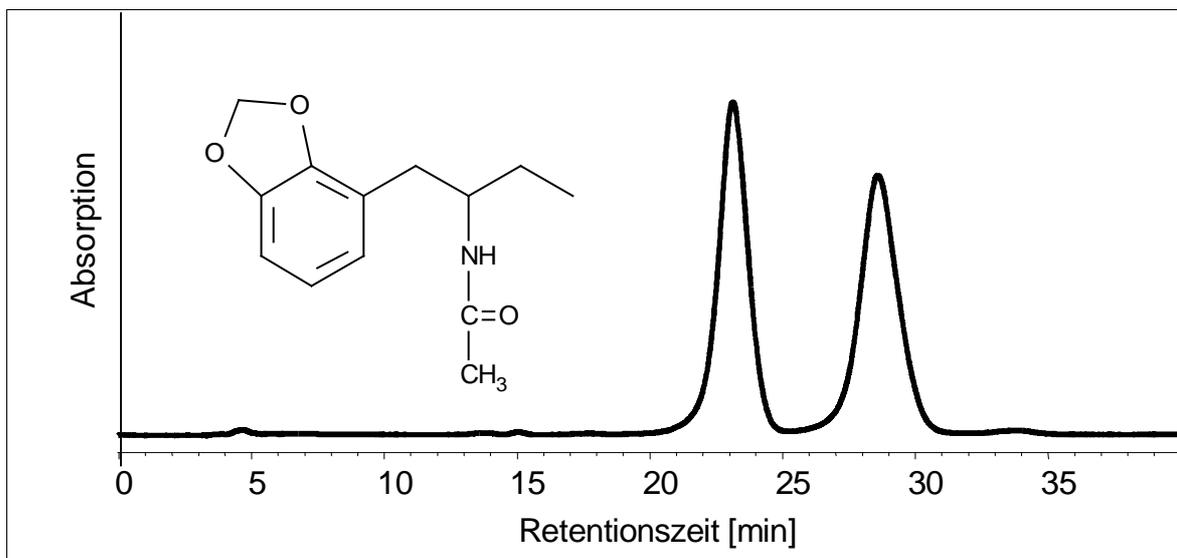


Abb. 2.12.: Trennung von 2,3-AcBDB **17**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
23,13	28,60	1,00	0,90	1,17	1,53	2153	1944	2,38	1,24

Tab. 2.8.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **17**

N-Methyl-1-(4-hydroxyphenyl)-2-propanamin (para-Hydroxymethamphetamin)

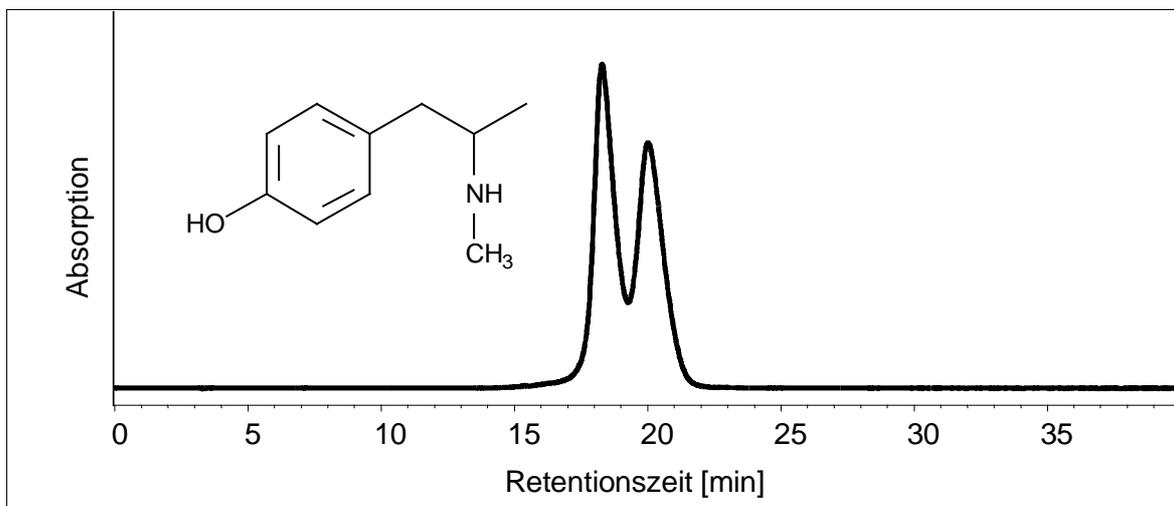


Abb. 2.13.: Trennung von para-Hydroxymethamphetamin **29**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0.1M pH 7.0 / 10% Methanol

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
18,28	20,01	0,69	0,69	0,86	1,10	2503	1833	1,03	1,09

Tab. 2.9.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **29**

2.2.1.2. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Methanol

Die Trennung von 3,4-MDMA nach Rizzi, Hirz, Cladrowa-Runge und Jonsson [93] wurde nachvollzogen (Abbildung 2.4., 30°C). Durch Einstellung der Temperatur ist die Trennung optimiert worden (Abbildung 2.6.). Die Unterschiede in der Auflösung R von 1,54 (Tabelle 2.2., 21°C) und 1,70 (Tabelle 2.4., 21°C) bei der Trennung von 3,4-MDMA müssen mit Veränderungen der Säule nach längerem Einsatz erklärt werden. Die Trennung von 3,4-MDMA (Abbildung 2.9.) bei 21°C erfolgte mit einer neuen Säule, die lediglich mit dem Fließmittel konditioniert wurde. Dagegen ist die Trennung aus Abbildung 2.6. in einer Serie entstanden, die mit einer etwas älteren Säule erarbeitet worden ist. Die Säule war ungefähr 3600 Minuten (2,5 Tage Dauerbetrieb) im Einsatz.

Mit diesem optimalen Fließmittel sind wichtige chromatographische Bedingungen festgesetzt worden. Die Säulentemperatur von 21°C ist ein Kompromiß zwischen einer optimalen Trennung, einer noch angemessenen Retentionszeit und einer akzeptablen Peakbreite. Die Fließgeschwindigkeit ist bei 0,8ml/min belassen worden. Die Injektion von 20µl erhöht die absolute Menge an Substanz auf der Säule, ohne daß dabei Überladungen zu beobachten sind.

Als weitere Verbindungen sind lediglich N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (Abbildung 2.10.), 2,3-BDB (Tabelle 2.7.), 2,3-AcBDB (Abbildung 2.12.) und para-Hydroxymethamphetamin (Abbildung 2.13.) mit Methanol als Modifier getrennt oder angetrennt worden.

Da ebenfalls die Wahl des Modifiers eine große Rolle spielt [96, 97], ist als nächstes Methanol gegen Acetonitril ausgetauscht worden.

2.2.1.3. Ammoniumacetat-Puffer mit Acetonitril

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDA)

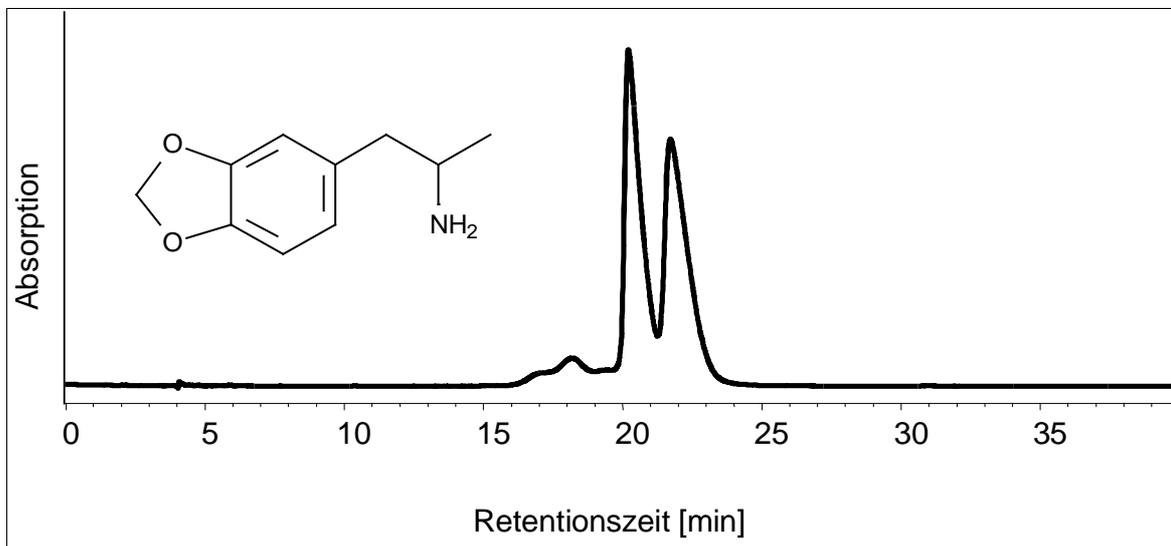


Abb. 2.14.: Trennung von 3,4-MDA **1**
Cyclobond I 2000®; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
22,22	21,72	0,32	0,36	0,62	0,88	5954	3376	1,18	1,07

Tab. 2.10.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **1**

Die Trennung von 3,4-MDA (Abbildung 2.14.) ist mit einer Auflösung von $R = 1,18$ nicht basisliniengetrennt. Die Peaks bei 16 bis 18 Minuten im Chromatogramm sind unbekannte Verbindungen oder Systempeaks, die auch im Chromatogramm dieser Verbindung von Brunnenberg, Kovar [35] zu beobachten sind.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA)

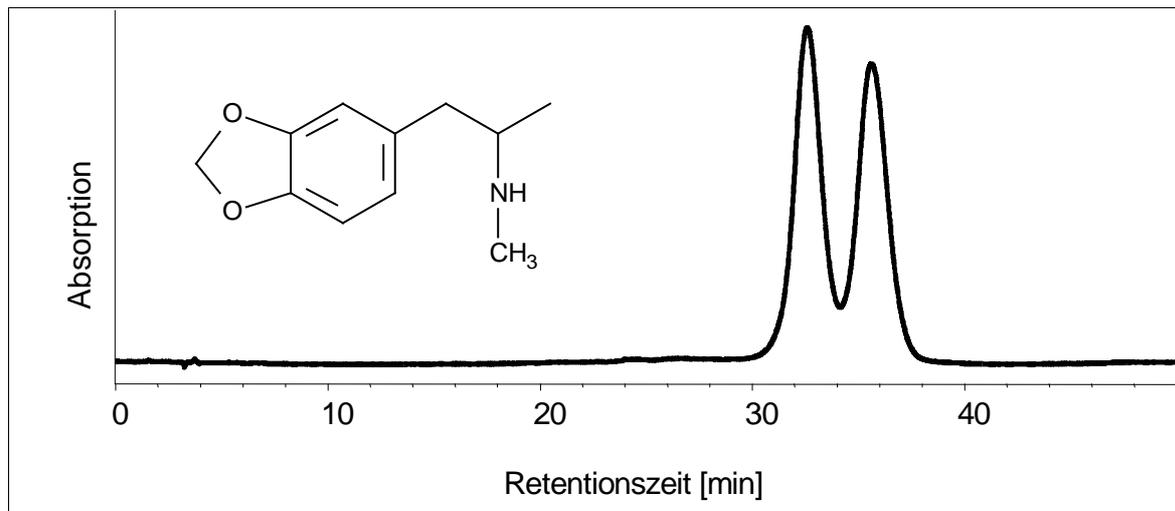


Abb. 2.15.: Trennung von 3,4-MDMA **2**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
32,59	35,60	0,97	0,86	1,39	1,55	3031	2910	1,20	1,09

Tab. 2.11.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **2**

N-Ethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDE)

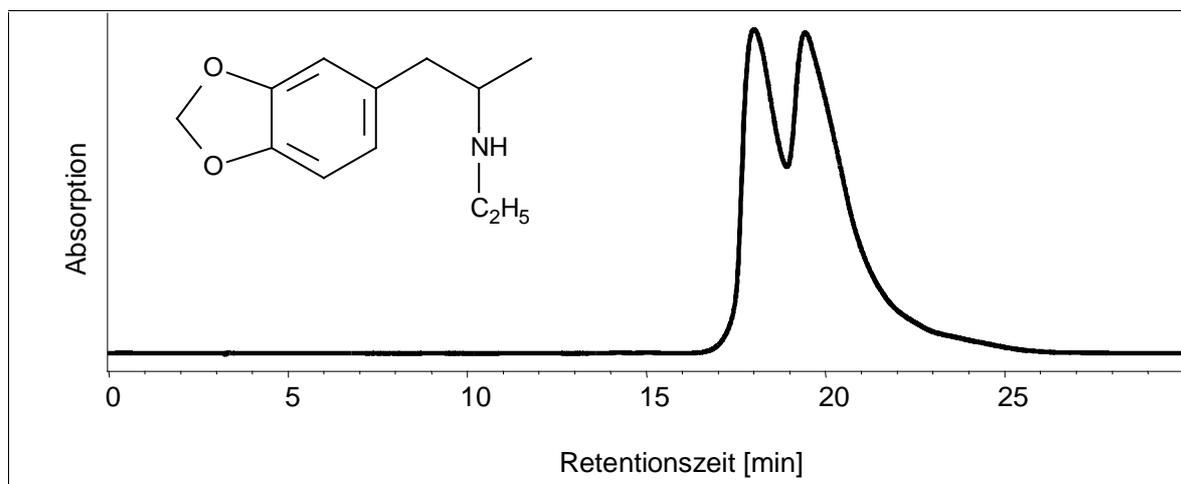


Abb. 2.16.: Trennung von 3,4-MDE **3**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
18,00	19,42	0,55	0,29	1,27	1,64	1114	774	0,57	1,09

Tab. 2.12.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **3**

N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDPA)

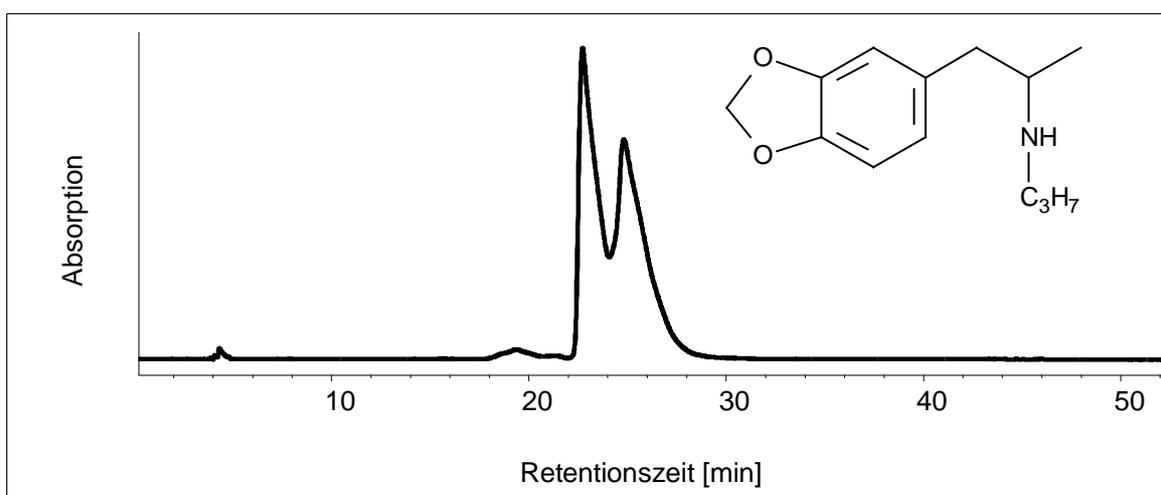


Abb. 2.17.: Trennung von ; 3,4-MDPA **4**
Cyclobond I 2000[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 /
10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
22,73	24,81	0,28	0,38	1,08	1,89	2454	957	0,82	1,09

Tab. 2.13.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **4**

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-MBDB) und N-Ethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-EBDB)

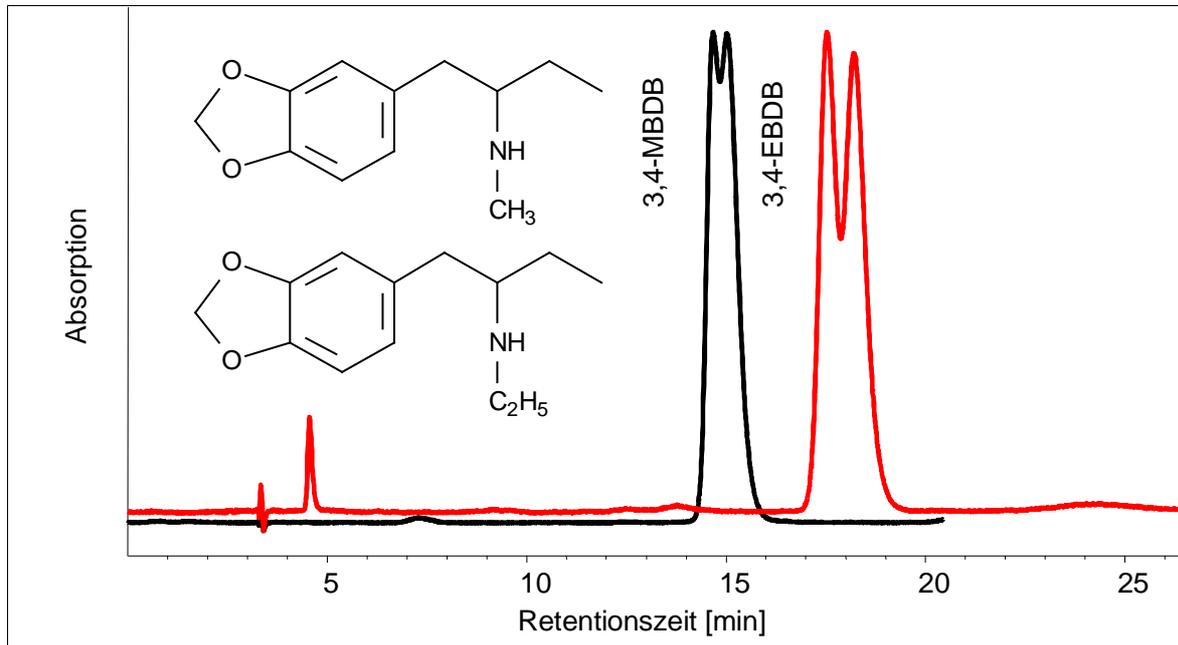


Abb. 2.18.: Trennung von 3,4-MBDB **8** und 3,4-EBDB **9**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

Substanz	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
8	14,67	15,02	1,17	0,52	0,35	0,48	9958	5462	0,50	1,02
9	17,53	18,20	0,84	0,69	0,58	0,63	5075	4563	0,65	1,04

Tab. 2.14.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **8** und **9**

Eine Antrennung oder Trennung von 3,4-BDB **7** konnte unter diesen Bedingungen nicht erreicht werden.

N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

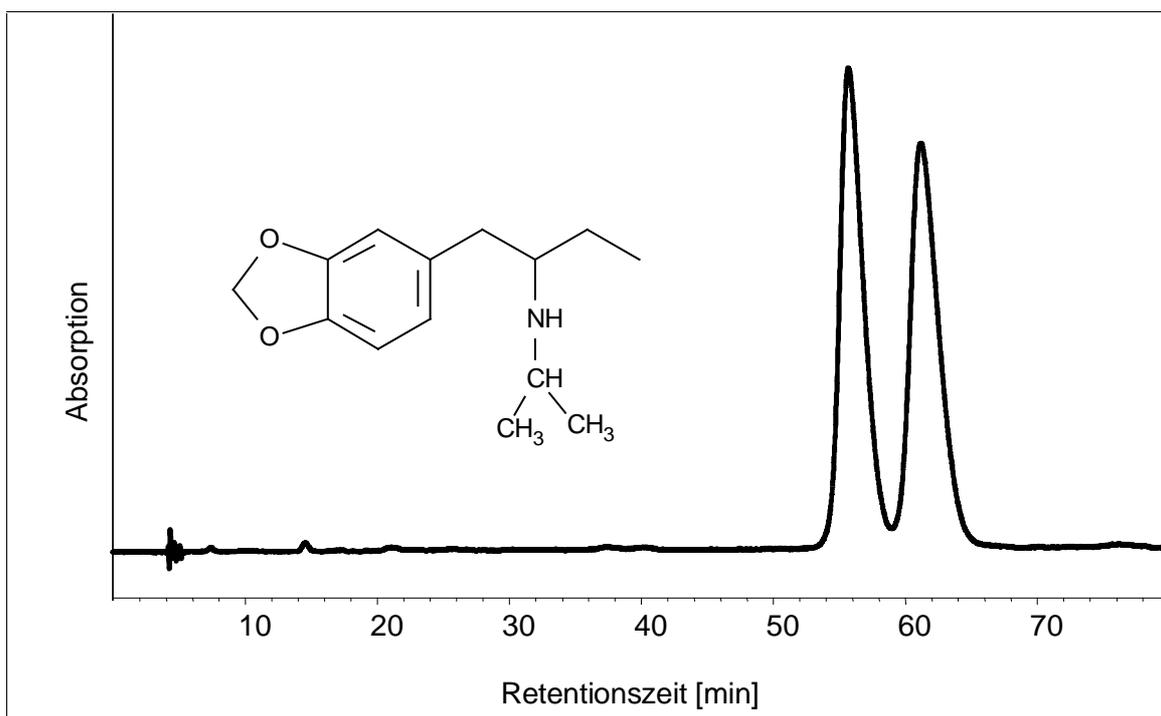


Abb. 2.19.: Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11**, Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
55,70	61,18	0,55	0,50	1,94	2,35	4567	3766	1,51	1,10

Tab. 2.15.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **11**

Die Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin ist mit $R = 1,51$ basisliniengetreunt, jedoch mit nahezu 70 Minuten Gesamtlaufzeit sehr lang.

Das N-Propyl-Derivat dieser Verbindung konnte mit den vorliegenden chromatographischen Bedingungen nicht getrennt werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-AcBDB)

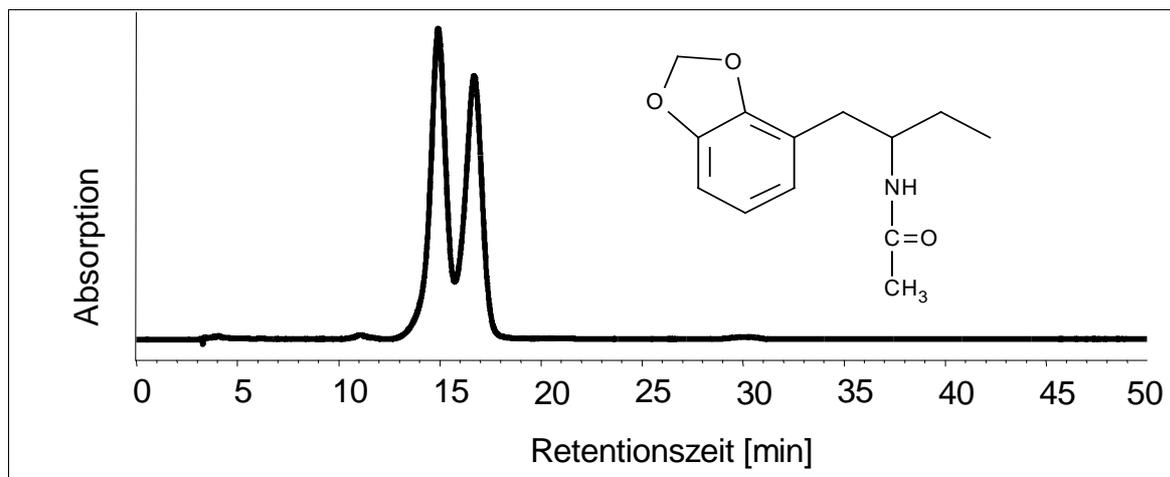


Abb. 2.20.: Trennung von 2,3-AcBDB **17**
Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
14,91	16,68	1,10	1,15	0,80	0,90	1924	1904	1,23	1,12

Tab. 2.16.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **17**

2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin

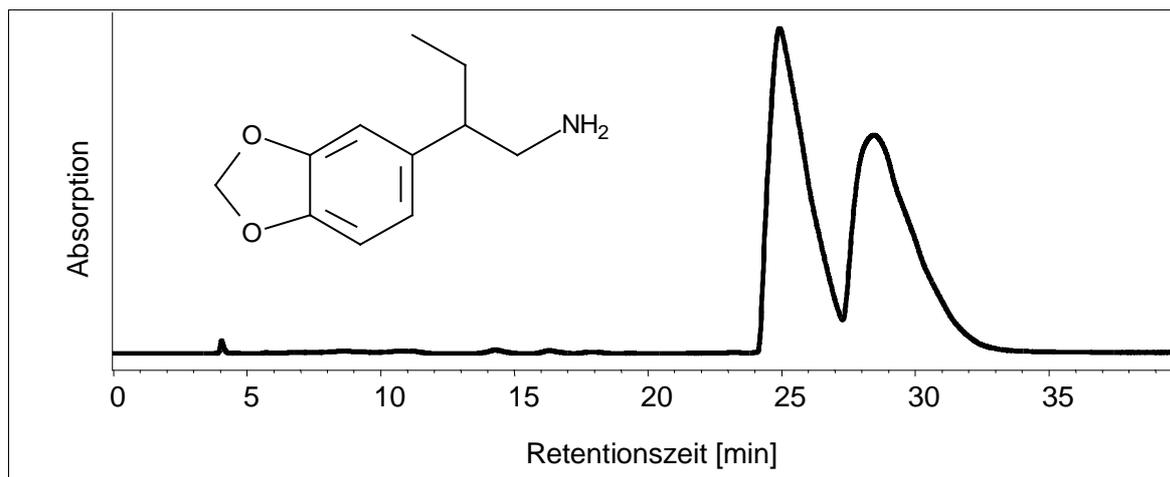


Abb. 2.21.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin **22**
Cyclobond I 2000[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
24,92	28,45	0,38	0,48	1,60	2,46	1344	741	1,02	1,14

Tab. 2.17.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **22**

Auffallend bei der Trennung von **22** sind die sehr breiten Peaks, sowie deren starkes Tailing.

1-(4-Methoxy)-2-propanamin (para-Methoxyamphetamin)

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
29,83	31,67	0,62	0,61	1,50	1,86	2199	1602	0,65	1,06

Tab. 2.18.: Chromatographische Parameter für die Trennung von para-Methoxyamphetamin **28**

N-Methyl-1-(4-hydroxyphenyl)-2-propanamin (para - Hydroxymethamphetamin)

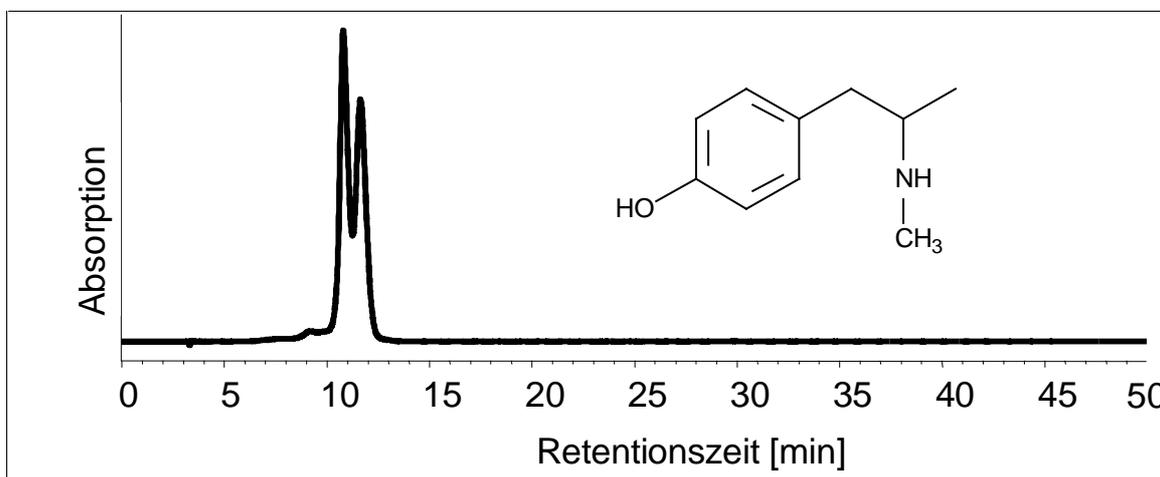


Abb. 2.22.: Trennung von para-Hydroxymethamphetamine **29**
Cyclobond I 2000®; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 /
10% Acetonitril

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
10,62	11,62	0,75	0,85	0,45	0,70	3177	1529	0,86	1,08

Tab. 2.19.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **29**

Zur Überprüfung, ob der richtige pH-Wert gewählt wurde, sind beispielhaft drei unterschiedliche Einstellungen gewählt worden. Die erfolgreiche Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11** wurde als Modellverbindung getestet. Der untersuchte pH-Bereich ist auch nach der Säulenspezifikation [94, 95] ausgewählt worden. Aus diesem Grunde ist das Fließmittel nicht saurer als pH 4,0 und nicht alkalischer als pH 7,0 eingestellt worden. An dem Beispiel des N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (Abbildung 2.23.) zeigte sich ein optimaler pH bei neutralem Puffer. Nicht nur die Trennung ist hier offensichtlich besser, sondern es konnte auch eine ruhigere Basislinie beobachtet werden. Aus diesem Grunde ist zunächst im neutralen Bereich gemessen worden.

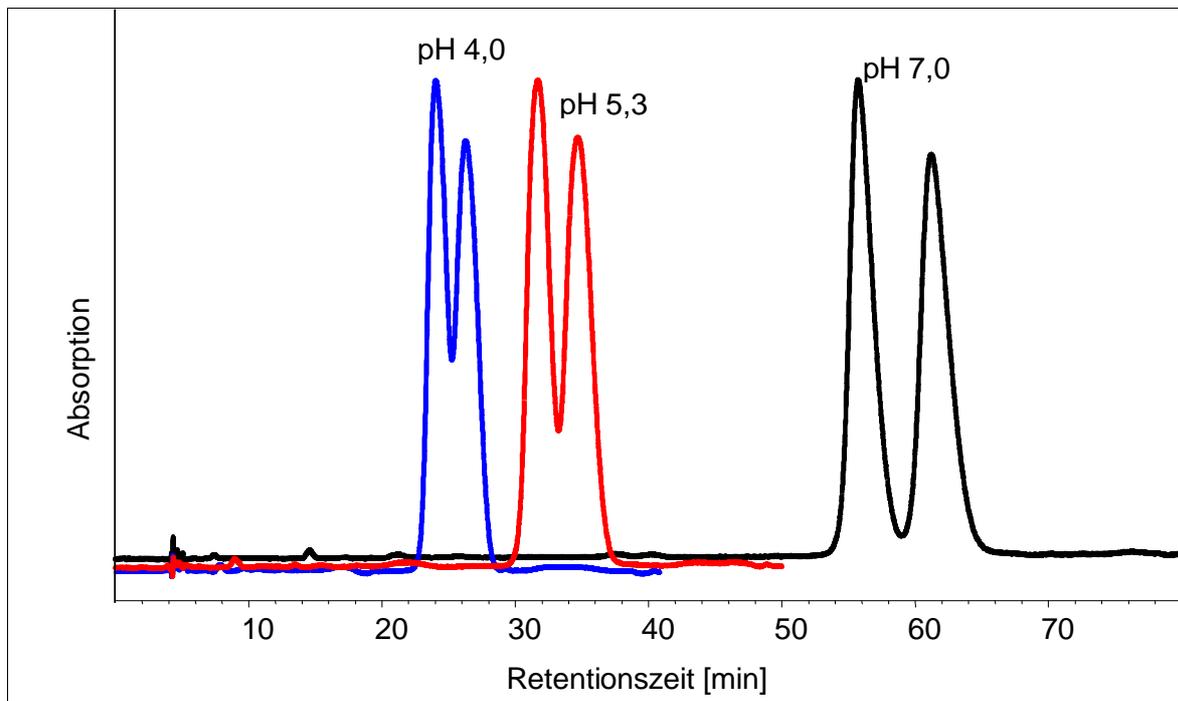


Abb. 2.23.: Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11**, Chiradex[®]; 90% Ammoniumacetat 0,1M pH 7,0 / 10% Acetonitril

pH	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
4,0	24,05	26,29	0,76	0,72	1,96	1,94	832	1012	0,67	1,09
5,3	31,69	34,70	0,89	0,83	1,89	2,17	1574	1421	0,87	1,09
7,0	55,70	61,18	0,58	0,51	1,95	2,33	4536	3809	1,50	1,10

Tab. 2.20.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **11**

2.2.1.4. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Acetonitril

3,4-MDA (Abbildung 2.14.) konnte mit diesem Fließmittel getrennt werden.

Eine Trennung von 3,4-MDMA wurde, auch unter Zusatz von Acetonitril, beobachtet (Abbildung 2.15.). Die Homologe 3,4-MDE (Abbildung 2.16.) und N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (Abbildung 2.17.) konnten mit einer sehr viel schlechteren Auflösung lediglich angetrennt werden (Tabelle 2.12. und 2.13.).

Durch Einsatz von Acetonitril ließen sich auch 3,4-Methylenedioxy-Butanaminderivate antrennen. Eine Enantiomerentrennung von N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-BDB) wurde zwar nicht erreicht, jedoch trennten sich 3,4-MBDB und 3,4-EBDB an (Abbildung 2.18.). N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11** konnte mit einem hervorragenden R-Wert von 1,51 innerhalb von 70 Minuten getrennt werden (Abbildung 2.19.).

Von den 2,3-Methylenedioxybutanaminderivaten ließ sich lediglich 2,3-AcBDB trennen (Abbildung 2.20.). Die Verbindungen **22** ließ sich mit einem R - Wert von 1,02 zwar trennen, jedoch sind die Peaks mit ungefähr 3 Minuten sehr breit (Abbildung 2.21.) Ähnliches gilt für die Verbindung **28**. Auch diese Peaks sind breit und zudem ist die Trennung schlechter (Tabelle 2.18.).

Der optimale pH-Wert für die Trennung ist mit diesem Fließmittelgemisch beispielhaft getestet worden (Abbildung 2.23.). Eindeutig ist der verwendete Puffer im neutralen pH-Bereich zu bevorzugen. Bei diesem pH ist weiter gearbeitet worden, da die Lebensdauer der CSP vom eingestellten pH des Fließmittels abhängig ist und dieser pH Wert im Bereich pH 3,5 bis 7,5 der Säulenspezifikation

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

[94, 95] liegt. Bei Verwendung von alkalischen Eluenten kann es zur Hydrolyse des Silicagels kommen, bei sauren Eluenten kann wegen der Instabilität des Cyclodextrins die CSP zerstört werden.

2.2.1.5. Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril

	1	2	3	4	8	9	11	17	22	28	29
Methanol	0,95	1,70	-	-	-	-	1,31	2,38	-	-	1,03
Acetonitril	1,18	1,20	0,57	0,82	0,50	0,65	1,51	1,23	1,02	0,65	0,86

Tab. 2.21.: Auflösung R der mit je 10% Methanol und Acetonitril getrennten Verbindungen

Unter Acetonitril sind mehr Substanzen getrennt worden als mit Methanolzusatz (Tabelle 2.21.). Die Retentionszeiten unter Einsatz von Acetonitril sind, soweit die Verbindungen unter Methanol getrennt werden konnten, kürzer. Die Peaks sind unter Acetonitril symmetrischer. Die Trennungen unter Acetonitril sind hinsichtlich ihrer Auflösung für die Verbindungen **2**, **17** und **29** schlechter. Die Substanz **1** und **11** trennen sich jedoch besser. Die Trennung wird aber auch deshalb besser, da die Peakbreite um die Hälfte kleiner wird.

Trotz zum Teil verschlechterter Trennung werden mit Acetonitril mehrere Substanzen zumindest angetrennt. Dies lässt auf eine zunehmende Affinität der Substanzen zum β -Cyclodextrin unter diesem Modifier schließen. Der Acetonitrilzusatz hat also die Affinität der Enantiomere zur β -Cyclodextrinphase erhöht. Dies ist auch an der Anzahl der getrennten oder angetrennten Substanzen zu erkennen. Desweiteren verbessert er die Peaksymmetrie erheblich.

Neben dem Modifier und der Temperatur, wie oben beschrieben, ist ebenfalls der pH - Wert des Fließmittels von Wichtigkeit (Abbildung 2.23.).

Die gefundenen Trennungen mit diesem Fließmittel stellen eine weitgehende Optimierung der in der Literatur bislang bekannten Trennungen dar.

2.2.2. Kaliumphosphat – Puffer

2.2.2.1. Kaliumphosphat - Puffer mit Methanol

Sadeghipour und Veuthey haben 1998 eine Trennung an β -Cyclodextrin von 3,4-MDA, 3,4-MDMA, 3,4-MDE und 3,4-MBDB veröffentlicht [94]. Als Puffer diente den Autoren ein Kaliumphosphat-Puffer, 0,1M, pH 6,5 (Puffer 2). Als Modifizier wurde Acetonitril verwendet. Um die oben begonnene Systematik beizubehalten, werden hier zunächst die Trennungen an Methanol beschrieben. Der Puffer besteht aus Kaliumdihydrogenphosphat/ Dikaliumhydrogenphosphat 0,1M, versetzt mit 1% TEA, eingestellt auf pH 6,5.

Substanz	Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl			
	[min]				halber Höhe [min]					
	Peak 1	Peak2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	R	α
1	52,29	56,39	1,04	1,25	2,17	2,26	3207	3449	1,09	1,08
2	58,23	64,80	1,00	1,16	2,03	2,31	4543	4372	1,78	1,11
3	67,67	75,09	1,00	0,96	2,58	2,93	3812	3630	1,58	1,11
4	68,29	75,73	0,70	0,61	3,75	4,32	1834	1702	1,08	1,11
7	24,23	25,32	0,22	0,12	0,95	2,08	3578	821	0,42	1,04
8	80,71	83,93	0,96	0,47	3,24	3,72	3428	2817	0,54	1,04
9	99,48	104,97	1,24	1,00	5,22	4,67	2011	2788	0,65	1,06
11	Retentionszeit > 120 min									
16	10,31	11,00	0,81	0,71	0,51	0,65	2264	1611	0,71	1,07
18	9,97	10,46	1,14	0,8	0,71	0,49	3217	2529	0,64	1,05
22	71,21	81,36	1,01	0,85	3,98	4,73	1774	1637	1,37	1,14
28	26,86	28,23	1,02	0,70	1,28	1,41	2458	2238	0,61	1,05
29	29,53	32,72	1,03	1,03	1,09	1,21	4092	4029	1,63	1,11
30	52,47	55,66	0,85	0,59	2,94	3,31	1762	1566	0,60	1,06
32	17,41	18,28	1,14	0,37	0,93	1,42	1925	923	0,44	1,05
33	20,10	21,51	0,85	0,54	1,23	1,23	1480	1684	0,67	1,07
34	14,12	14,93	0,87	0,60	0,69	0,77	2296	2066	0,65	1,06

Tab. 2.22.: Chromatographische Parameter für die Trennung an Chiradex[®] mit 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 / 10% Methanol

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Daten in Tabelle 2.22. zeigen, daß sich mit diesem Puffer zwar zusätzliche Methylenedioxyamphetamin-Derivate trennen lassen, die sich mit Ammoniumacetat nicht trennen ließen (Substanz **7**, **16**, **18**, **30**, **32**, **33**, **34**), jedoch die Qualität der Trennung meistens schlecht geworden ist. Entweder sind die Retentionszeiten sehr groß (Trennung von 3,4-MDMA **2** oder 3,4-MDE **3**), oder die Trennung erfolgt nur mit einer geringen Auflösung (Trennung von 3,4-BDB **7**). Kommen beide Faktoren gleichzeitig zum Tragen (Trennung von 3,4-MBDB **8** oder para-Chloramphetamin **30**), kann nicht davon ausgegangen werden, daß diese Bedingungen zu einer Routinemethode führen. Bei genauerer Analyse der Peakbreite fällt auf, daß einige Derivate (3,4-MDA **1**, 3,4-MDMA **2**, 3,4-MDE **3**) sehr gute Symmetriewerte aufweisen, einige jedoch wegen eines starken Frontings (3,4-EBDB **9**) oder Tailings (3,4-BDB **7** oder N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin **4**) sehr schlecht sind. Eine Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11** konnte zwar erzielt werden, jedoch war die Retentionszeit mit mehr als 120 Minuten ausgesprochen lang. Die einzelnen Peaks waren mit mehr als 10 Minuten ungewöhnlich breit.

Als nächstes ist die Menge des Modifiers Methanol erhöht worden (Tabelle 2.23.).

Substanz	Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	[min]		Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	Peak 1	Peak 2								
1	11,84	12,41	1,37	0,95	0,54	0,52	2652	3129	0,63	1,05
2	17,41	18,80	0,50	0,32	0,61	0,79	4561	3163	1,17	1,08
3	47,53	53,22	0,57	0,68	2,15	2,48	2700	2551	1,44	1,12
4	50,22	56,19	1,15	1,12	1,95	2,22	3662	3550	1,68	1,12
11	26,60	29,13	0,65	0,59	0,89	1,06	4913	4185	1,52	1,10
22	44,85	51,10	1,05	0,86	2,45	2,67	1862	2024	1,43	1,14
29	9,00	9,33	0,39	0,21	0,28	0,56	5589	1565	0,47	1,04
33	15,74	16,54	1,28	0,65	0,74	1,01	2487	1472	0,54	1,05
34	7,05	7,20	0,86	0,30	0,13	0,27	16619	4037	0,44	1,02

Tab. 2.23.: Chromatographische Parameter für die Trennung an Chiradex[®] mit 80% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 / 20% Methanol

Dies führte bei den meisten Verbindungen **7, 8, 9, 16, 18, 28, 30, 33, 34** dazu, daß eine Trennung nicht mehr eintrat. Bei allen Verbindungen verkürzte sich die Retentionszeit um etwa 20 Minuten. 3,4-MDMA **2** und N-Isopropyl-1-(3,4-methyldioxyphenyl)-2-butanamin **11** werden nun in einer zufriedenstellenden Zeit getrennt. N-Propyl-1-(3,4-methyldioxyphenyl)-2-propanamin **4** weist ein Fronting auf. Die Trennung dieser Substanz erfolgt zwar mit einer guten Auflösung R, ist jedoch mit einer Laufzeit von ca. 60 Minuten noch sehr lang.

Methanol als Modifier verbesserte die Trennungen. Diese Versuche sind in Tabelle 2.24. wiedergegeben. Die Pufferkonzentration wurde von 0,1 M auf 1 M angehoben. Diese für die HPLC sehr konzentrierten Puffer bereiten jedoch erhebliche Schwierigkeiten. Insbesondere das Erzielen einer guten Basislinie war äußerst schwierig. Desweiteren muß mit Auskristallisationen des Puffers in der Anlage gerechnet werden. Auch die Belastung der Säule ist erheblich, so daß sich die Lebensdauer stark verkürzt.

Substanz	Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl			
	[min]				halber Höhe [min]					
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	R	α
11	22,80	25,30	0,85	0,88	1,31	1,59	1678	1401	1,01	1,11
22	15,51	17,58	0,60	0,57	0,71	0,87	2622	2255	1,54	1,13

Tab. 2.24.: Chromatographische Parameter für die Trennung der Substanzen **11** und **22** an Chiradex[®] mit 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 1,0M + 1% TEA pH 6,5 / 10% Methanol

2.2.2.2. Ergebniszusammenfassung der Trennungen mit Methanol

Methanol hat sich mit diesem Phosphatpuffer als problematisch herausgestellt. Insbesondere das Peaktailing oder Peakfronting muß hier als Nachteil erwähnt werden, da eine Quantifizierung nur schwer möglich wird. Aber auch die lange Retentionszeit der Trennungen sind von Nachteil. Insbesondere ist die Trennung von **11** hervorzuheben. Dennoch ist diese Trennung als bemerkenswert zu benennen, da sie die Affinität der Verbindung zum β -Cyclodextrin mit dem verwendeten Fließmittel unter Beweis stellt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Einige Trennungen lassen sich mit einem höheren Methanolanteil in kürzerer Zeit noch gut trennen. Dies gilt insbesondere für die Verbindungen **2**, **3**, **4**, **11** und **22** (Tabelle 2.19.).

Die Erhöhung der Pufferkonzentration von 0,1 auf 1,0 M hat zu keinen weiteren Trennungen geführt. Lediglich **22** konnte mit einer größeren Auflösung von $R=1,54$ (Tabelle 2.24.) getrennt werden. Die Verbindung ist jedoch schon vorher mit einer sehr guten Trennung von $R=1,43$ (Tabelle 2.23.) und $R=1,37$ (2.22.) getrennt worden. Die Erhöhung des Pufferanteils ist somit für diese Verbindungen nicht sinnvoll. Durch den hohen Puffergehalt kommt es erfahrungsgemäß zu Schwierigkeiten, eine ruhige Basislinie in der Chromatographie zu erreichen. Wahrscheinlich ist dies auf die Volumenkontraktion beim Mischen von Methanol mit Wasser zurückzuführen. Dieser nachteilige Effekt wird durch die hohe Pufferkonzentration noch verstärkt, da es möglicherweise zu Kristallisationen in der HPLC – Anlage kommen könnte. Optimal ist folglich eine Pufferkonzentration von 0,1M für dieses Fließmittel.

Eine Gesetzmäßigkeit hinsichtlich der Abhängigkeit des Alkylierungsgrades am Stickstoffatom der 3,4-Methylenedioxyamphetamine von dem Grad der Trennung kann beobachtet werden (Tabelle 2.22.): Für die 3,4-Methylenedioxyverbindungen der Propanaminreihe ist eine Methyl- **2** oder Ethyl- **3** N-Alkylierung für eine Basislinientrennung entscheidend. Die 3,4-Methylenedioxy-Butanamine **7 - 9** lassen sich mit zunehmendem Alkylierungsgrad besser trennen, wobei die nicht alkylierte Verbindung 3,4-BDB lediglich angetrennt wird. Die N-Propyl-, N-Hydroxy und N-Hydroxy-N-methyl- Derivate **10**, **12**, **13** lassen sich jedoch nicht trennen. Die Trennungen der Propanamin-Reihe sind jedoch im Vergleich zu denen der Butanamin-Reihe deutlich besser in ihrer Auflösung (Tabelle 2.22.). Bei Betrachtung von Amphetamin **32** und Methamphetamin **33** fällt ebenfalls auf, daß das sekundäre Amin besser getrennt wird als das primäre Amin. Als einzige 2,3-Methylenedioxy – Derivate konnten die Verbindungen **18** und **22** getrennt werden. Auch bei den Verbindungen **28**, **29** und **30** ist die N-Methylverbindung besser getrennt worden.

2.2.2.3. Kaliumphosphat-Puffer mit Acetonitril

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDA)

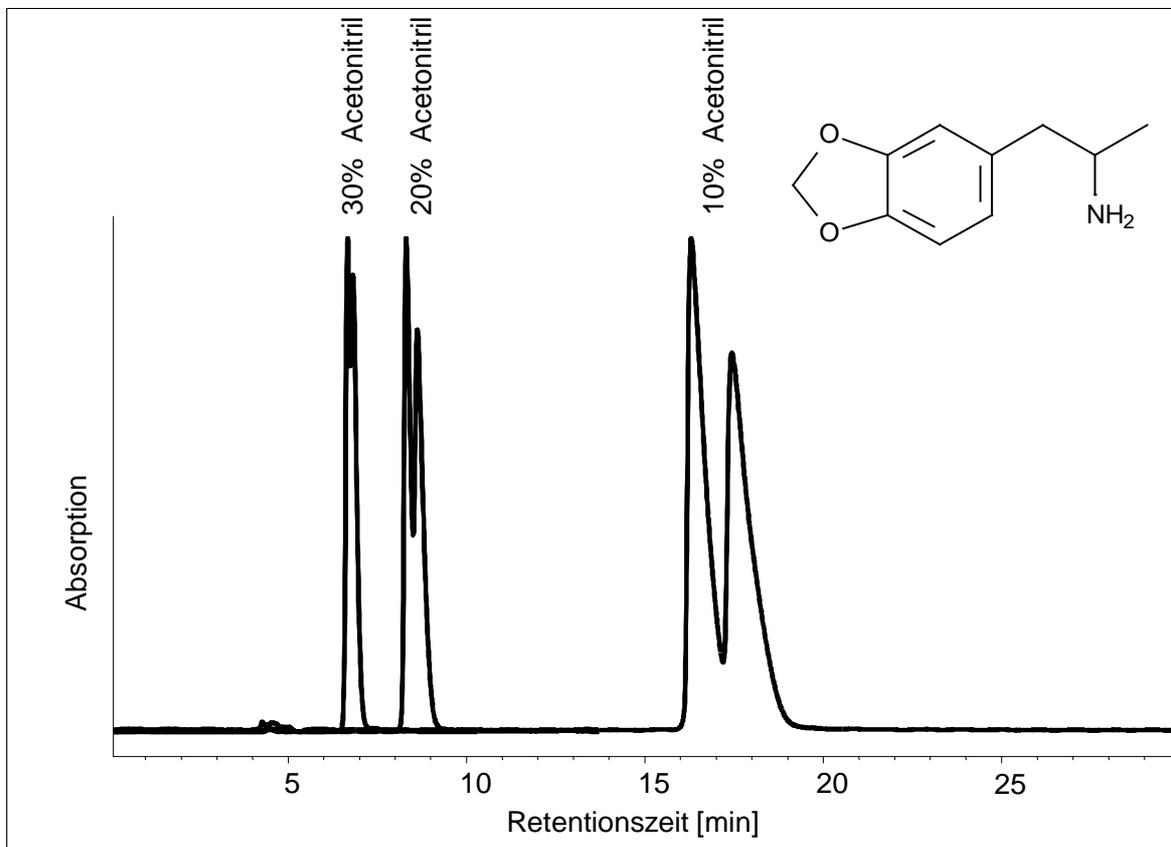


Abb. 2.24.: Trennung von 3,4-MDA **1**
 Cyclobond I 2000[®]; 90-70% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10-30% Acetonitril

Anteil Acetonitril [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	10	16,30	17,44	0,25	0,23	0,53	0,69	5304		
20	8,31	8,62	0,51	0,46	0,21	0,30	9065	4518	0,73	1,04
30	6,66	6,82	0,86	0,52	0,26	0,18	3535	7686	0,40	1,02

Tab. 2.25.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **1** bei unterschiedlichem Acetonitrilanteil

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteils ist in Abbildung 2.25. dargestellt.

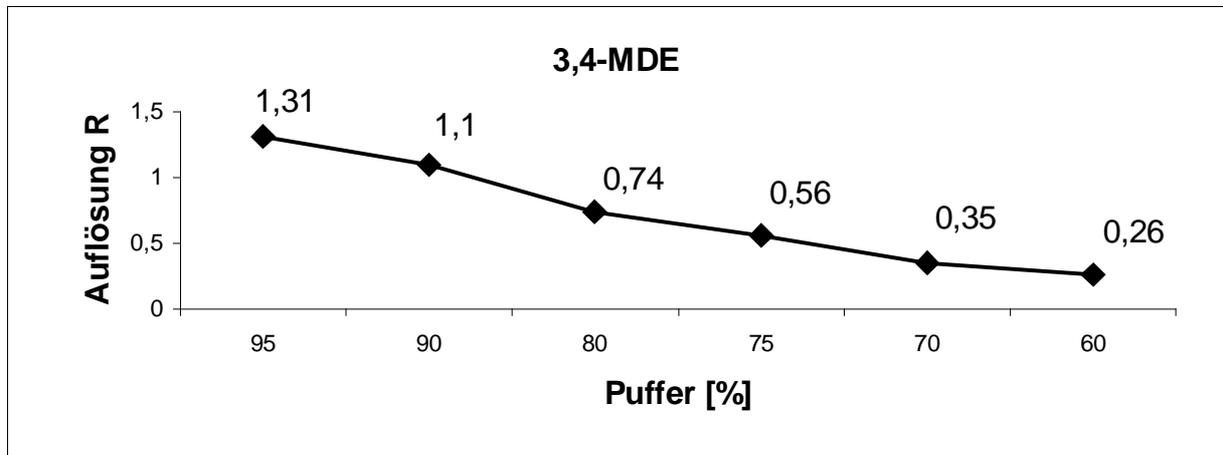


Abb.: 2.25.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA)

Da für 3,4-MDMA ein Enantiomer zur Verfügung stand, konnte die Enantiomerenreihenfolge festgestellt werden (Abbildung 2.24.).

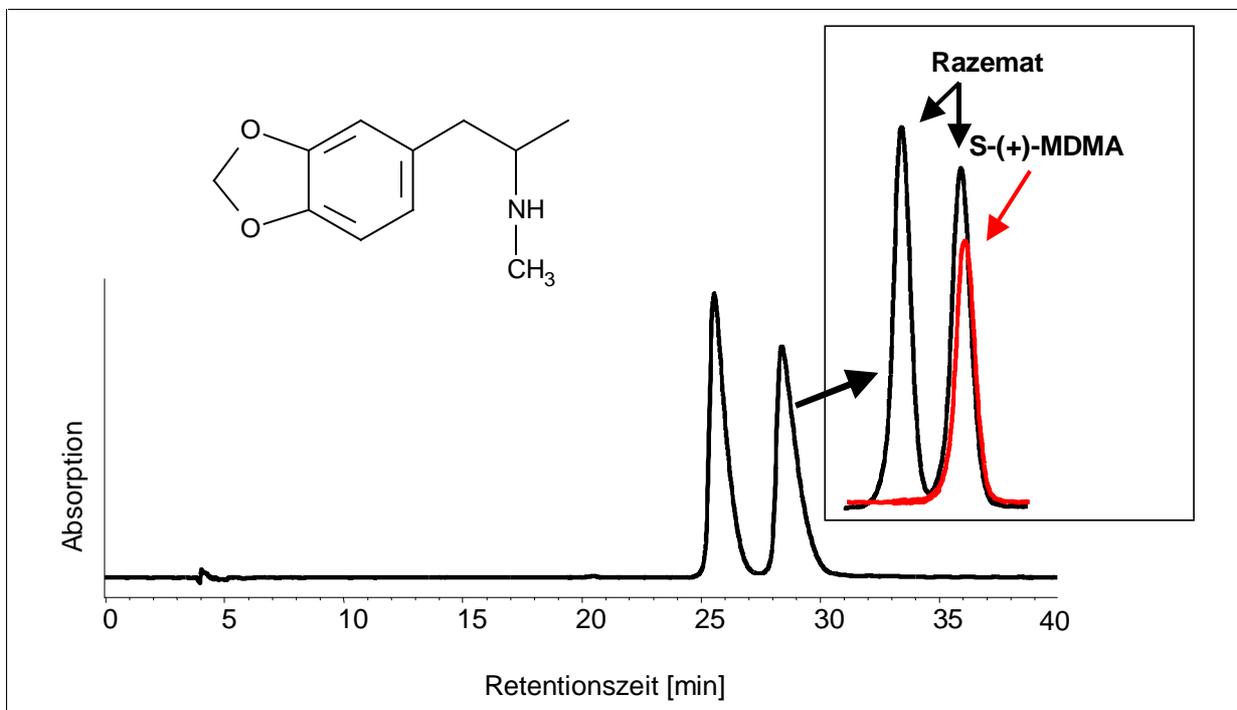


Abb.2.26.: Trennung von 3,4-MDMA 2
Chiradex®; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl			
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	R	α
25,55	28,39	0,40	0,36	0,71	0,89	7105	5680	2,09	1,11

Tab. 2.26.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 2

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteils ist in Abbildung 2.27. dargestellt.

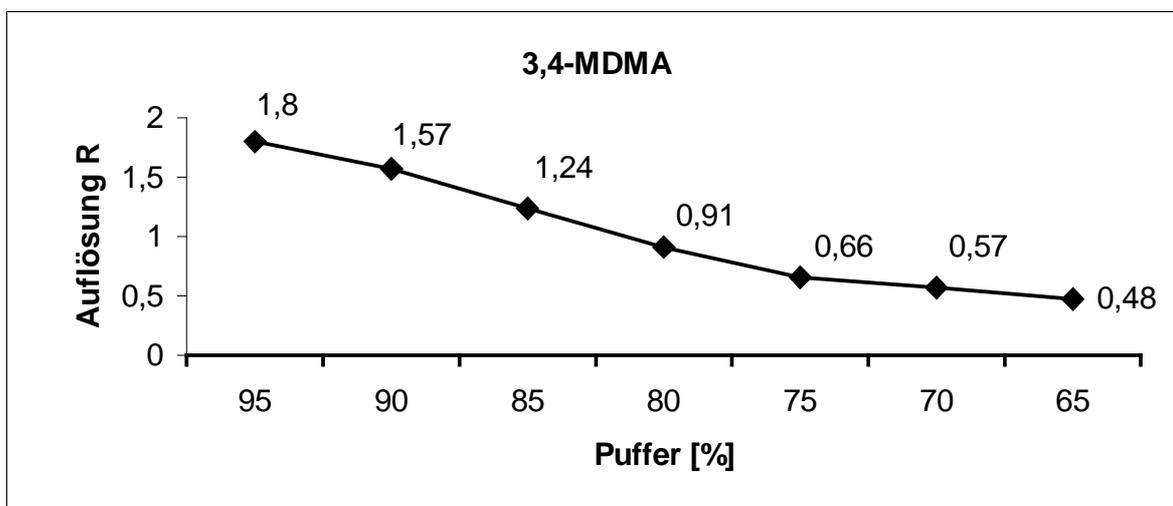


Abb.: 2.27.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

N-Ethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDE)

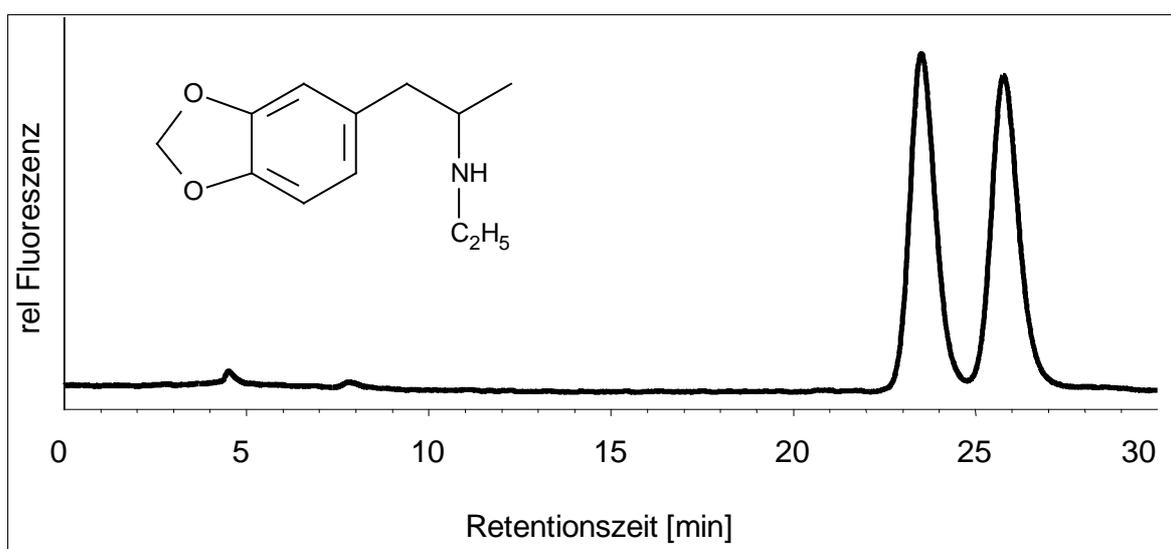


Abb. 2.28.: Trennung von 3,4-MDE 3

Cyclobond I 2000®; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 / 10% Acetonitril

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
23,51	25,76	0,82	0,82	0,75	0,80	5460	5757	1,71	1,10

Tab. 2.27.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 3

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteils ist in Abbildung 2.29. dargestellt.

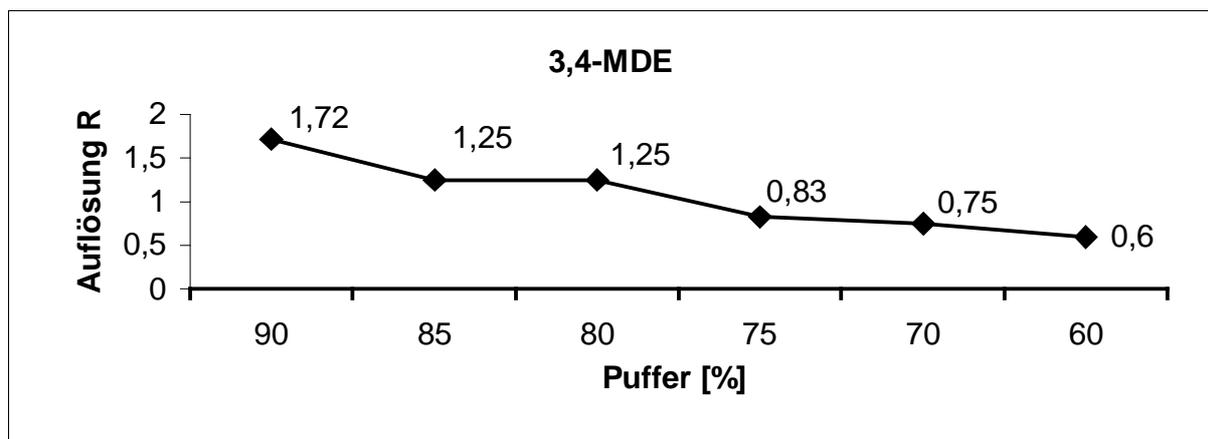


Abb.: 2.29.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDPA)

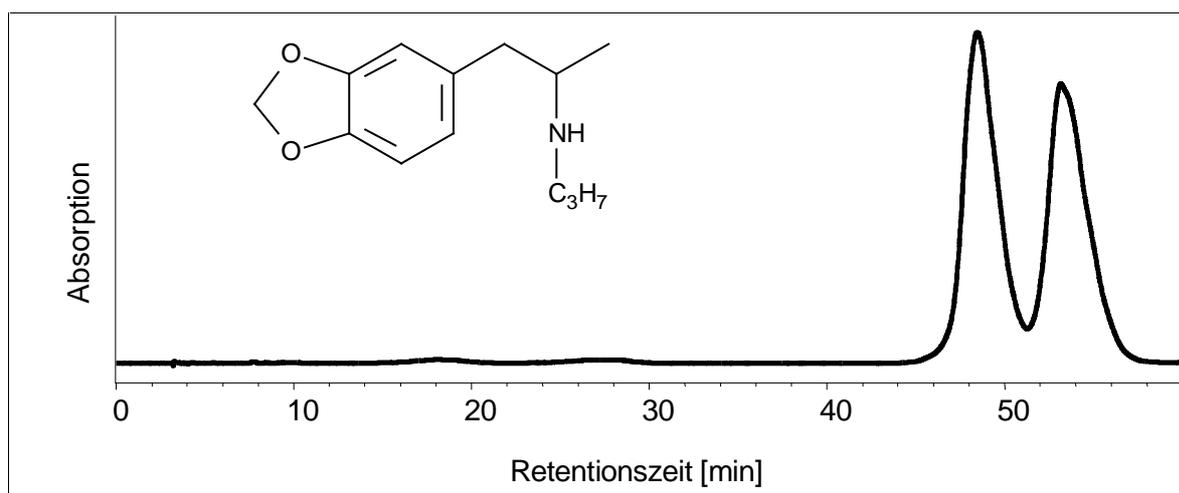


Abb. 2.30.: Trennung von 3,4-MDPA 4,
Chiradex[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
48,44	53,13	0,71	0,52	2,09	2,41	2986	2685	1,22	1,10

Tab. 2.28.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **4**

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteil ist in Abbildung 2.31. dargestellt.

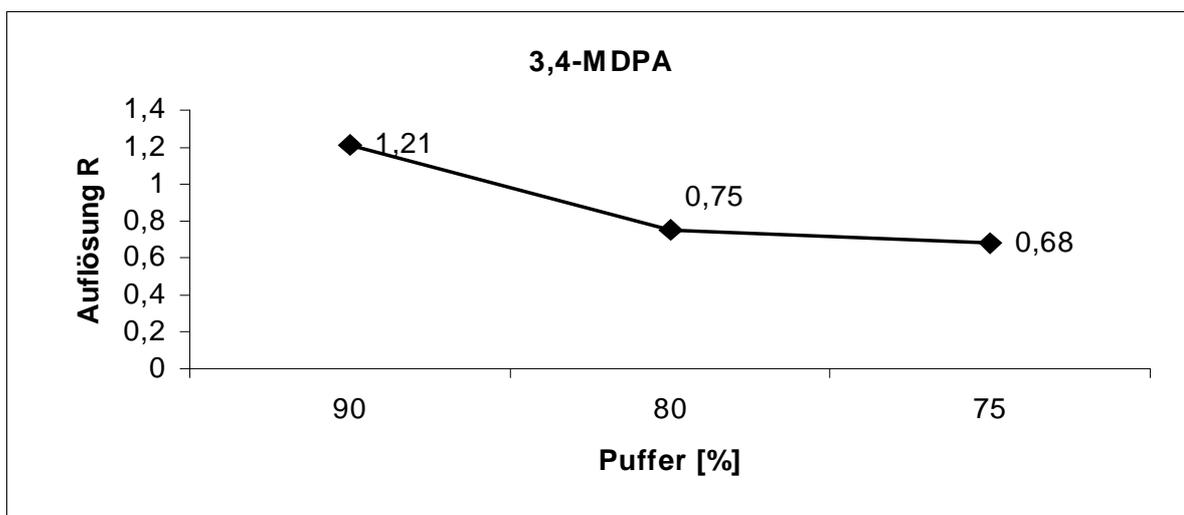


Abb. 2.31.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

N-Methyl-1-(3,4-methyldioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-MBDB) und N-Ethyl-1-(3,4-methyldioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-EBDB)

Substanz	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	8	36,81	38,07	1,03	0,54	1,32	1,43	4287		
9	43,95	46,06	1,25	1,12	1,61	1,95	4112	3087	0,70	1,05

Tab. 2.29.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **3,4-MBDB 8** und **3,4-EBDB 9**; Chiradex[®], 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 / 10% Acetonitril

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

Da für die Routineanwendung eine stabile Retentionszeit von großer Bedeutung ist, wird in Abbildung 2.32. beispielhaft eine dreifache Injektion der Standardlösung abgebildet. Tabelle 2.30. zeigt die ermittelten chromatographischen Parameter.

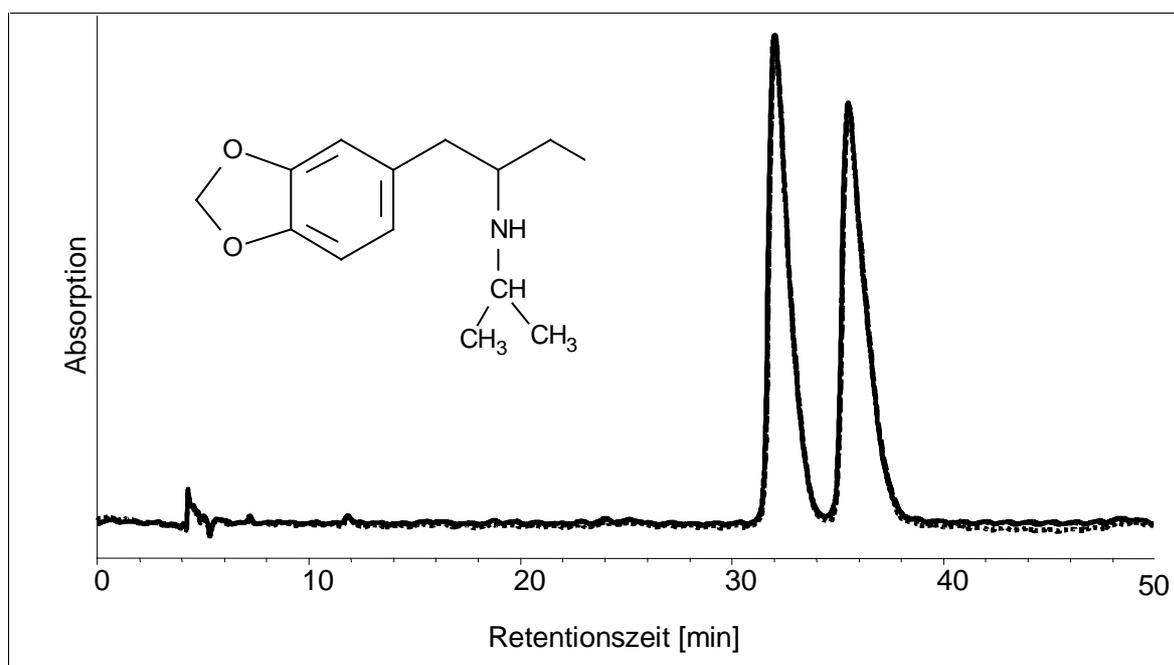


Abb. 2.32.: Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11**, drei übereinandergelegte Läufe
Cyclobond I 2000®; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 / 10% Acetonitril

	Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl		R	α
	[min]		Peak 1	Peak 2	halber Höhe [min]		Peak 1	Peak 2		
	Peak 1	Peak 2			Peak 1	Peak 2				
Lauf 1	32,03	35,50	0,38	0,33	0,99	1,20	5838	4849	1,87	1,11
Lauf 2	32,04	35,53	0,39	0,36	0,99	1,20	5841	4856	1,88	1,11
Lauf 3	32,00	35,50	0,39	0,37	1,01	1,19	5598	4957	1,87	1,11

Tab. 2.30.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **11**

Die Auswertung der Retentionszeit des zuerst eluierenden Peaks mit einer relativen Standardabweichung von lediglich 0,2% zeigt die Stabilität der HPLC-Säule (Tabelle 2.31.).

Mittelwert [min]	32,02
Standardabweichung [min]	0,02
relative Standardabweichung [%]	0,06

Tab. 2.31.: Statistische Parameter der Retentionszeit für die Dreifachinjektion von 11

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteils ist in Abbildung 2.33. dargestellt.

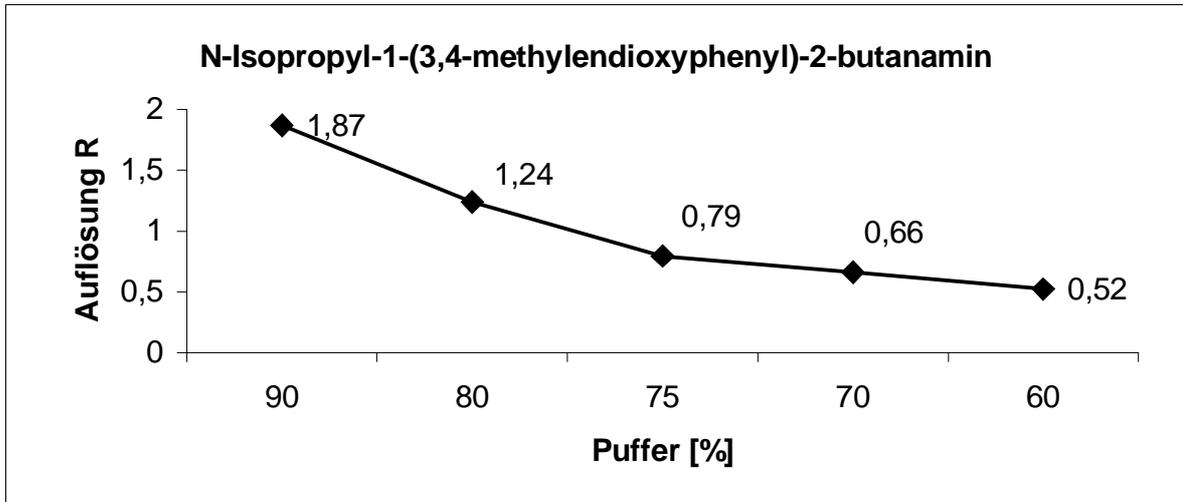


Abb.: 2.33.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N,N-Dimethyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-MMBDB), N-Ethyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-EBDB) und N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-AcBDB)

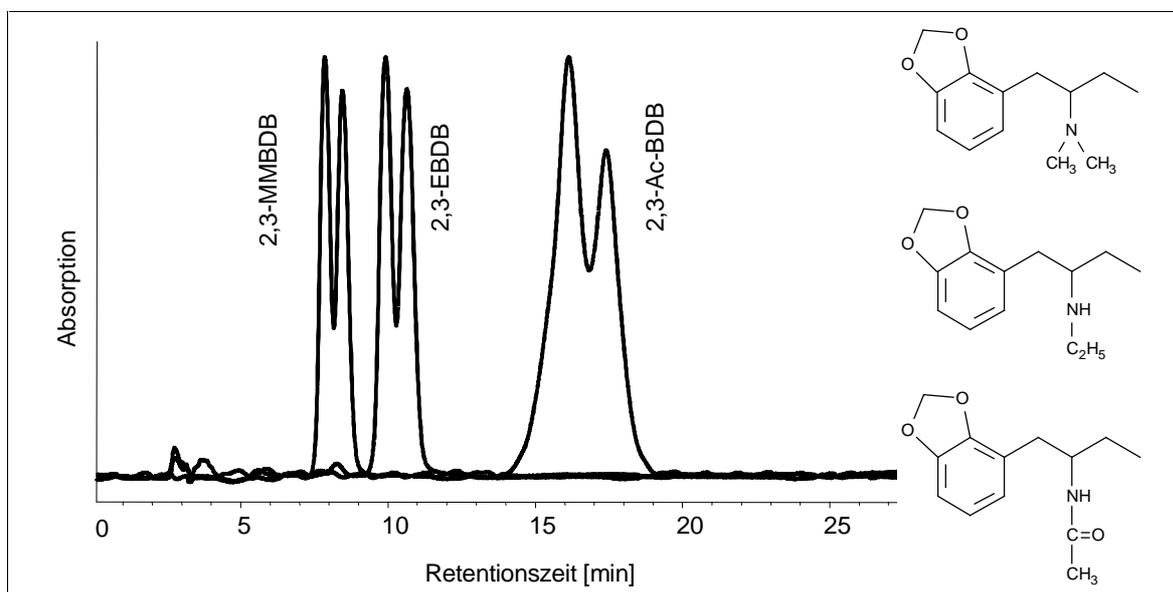


Abb. 2.34.: Trennung von 2,3-EBDB **16**, 2,3-AcBDB **17** und 2,3-MMBDB **18**
Chiradex[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

Substanz	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
16	7,856	8,454	0,92	0,85	0,39	0,44	2210	2045	0,84	1,08
17	16,14	17,41	1,34	0,78	1,26	1,05	912	1527	0,65	1,08
18	9,92	10,64	0,96	0,91	0,48	0,53	2333	2207	0,84	1,07

Tab. 2.32.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **16**, **17** und **18**

Wie hier gezeigt wurde besteht für diese 3 Razemate der 2,3-Methylenedioxy-Verbindungen aus der Butanamin-Reihe eine Affinität zu der β-Cyclodextrinkavität. Bemerkenswert ist, daß die Verbindungen **14** und **15**, also die am Stickstoff nicht substituierte Verbindung 2,3-BDB und die am Stickstoff methylierte Verbindung 2,3-MBDB, nicht angetrennt werden konnten.

2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin

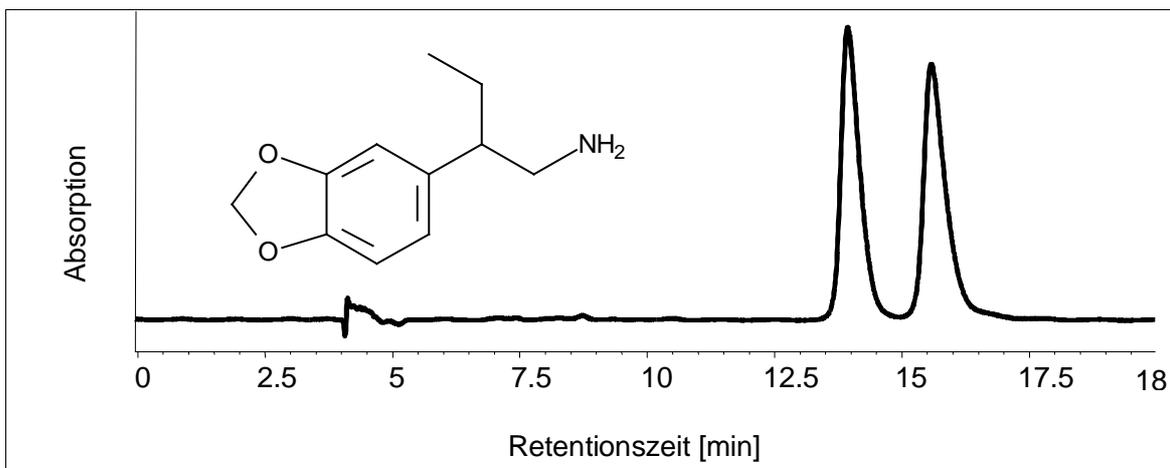


Abb. 2.35.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin **22**
 Cyclobond I 2000®; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10% Acetonitril

Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl			
[min]				halber Höhe [min]					
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	R	α
13,93	15,57	0,57	0,53	0,39	0,45	7071	6736	2,31	1,12

Tab. 2.33.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **22**

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteils ist in Abbildung 2.36. dargestellt.

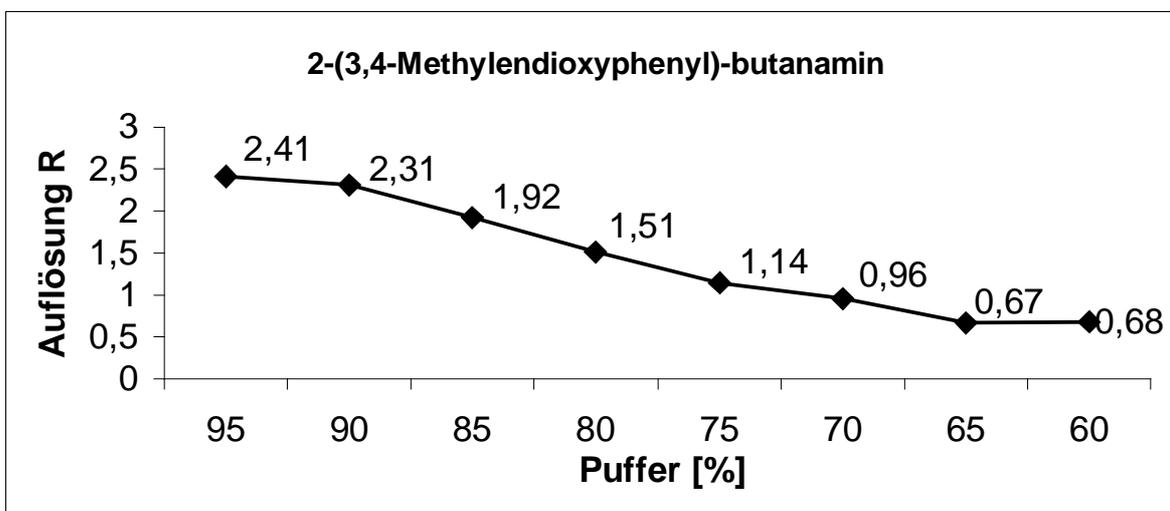


Abb.: 2.36.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Abhängigkeit der Trennung und der Auflösung von der Konzentration zeigen Abbildung 2.37. und Tabelle 2.34..

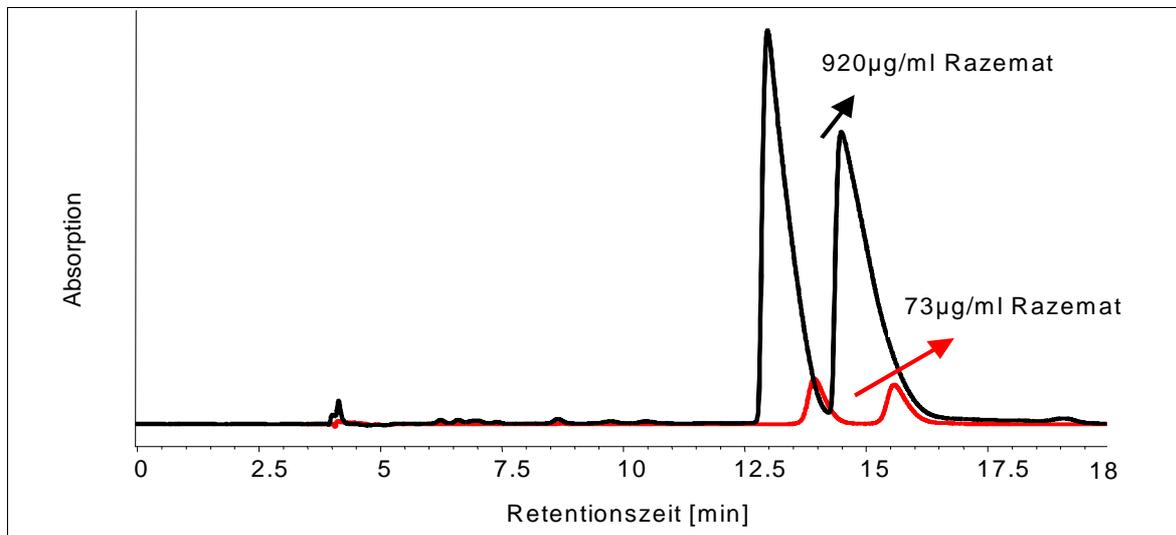


Abb.: 2.37.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin **22** unterschiedlicher Konzentrationen
Cyclobond I 2000®; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 / 10% Acetonitril

Gehalt [µg/ml]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	920	12,97	14,49	0,23	0,19	0,58	0,77	2771		
73	13,93	15,57	0,57	0,53	0,39	0,45	7071	6736	2,31	1,12

Tab. 2.34.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **22** unterschiedlicher Konzentrationen

Bei einer ausgesprochen guten Trennung, wie sie hier für die Verbindung 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin **22** vorliegt, läßt sich der Einsatz der β-Cyclodextrinphase für eine semipräparative Trennung diskutieren. Wie aus Abbildung 2.37. hervorgeht, so ist auch bei 920µg/ml Razemat die Säule noch in der Lage, eine Basislinientrennung zu erreichen. In Verbindung mit der kurzen Laufzeit in diesem Fall könnten die Enantiomeren bei entsprechender Fraktionierung gut gesammelt werden.

1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (para-Methoxyamphetamin)

Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl		R	α
[min]				halber Höhe [min]					
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
21,96	23,02	0,93	0,74	0,93	1,08	3094	2512	0,62	1,05

Tab. 2.35.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **28**

N-Methyl-1-(4-hydroxyphenyl)-2-propanamin (para-Hydroxymethamphetamin)

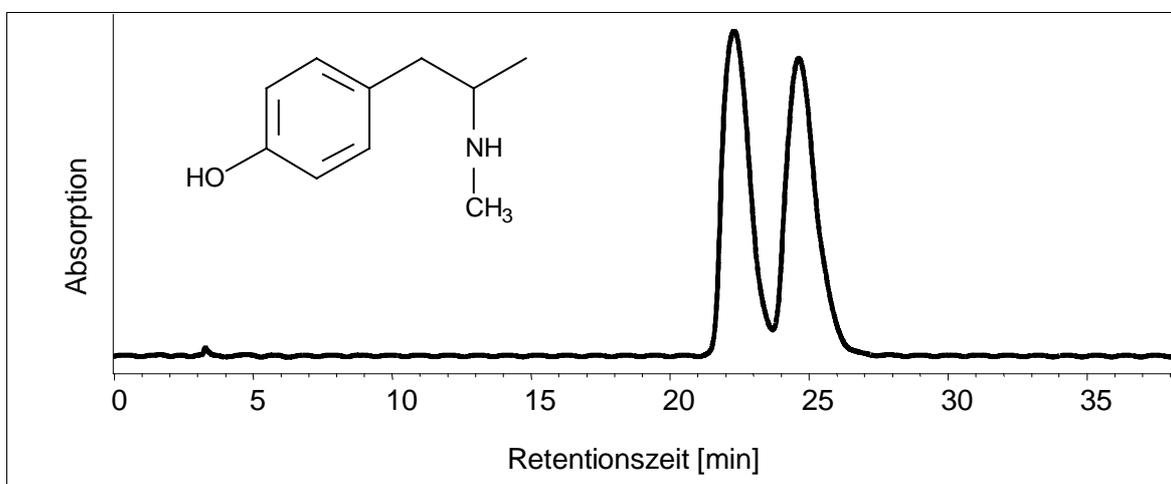


Abb. 2.38.: Trennung von para-Hydroxymethamphetamin **29**
Chiradex®; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl		R	α
[min]				halber Höhe [min]					
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
22,30	24,62	0,73	0,72	1,09	1,15	2306	2525	1,21	1,10

Tab. 2.36.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **29**

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Auflösung R in Abhängigkeit vom Pufferanteils ist in Abbildung 2.39. dargestellt.

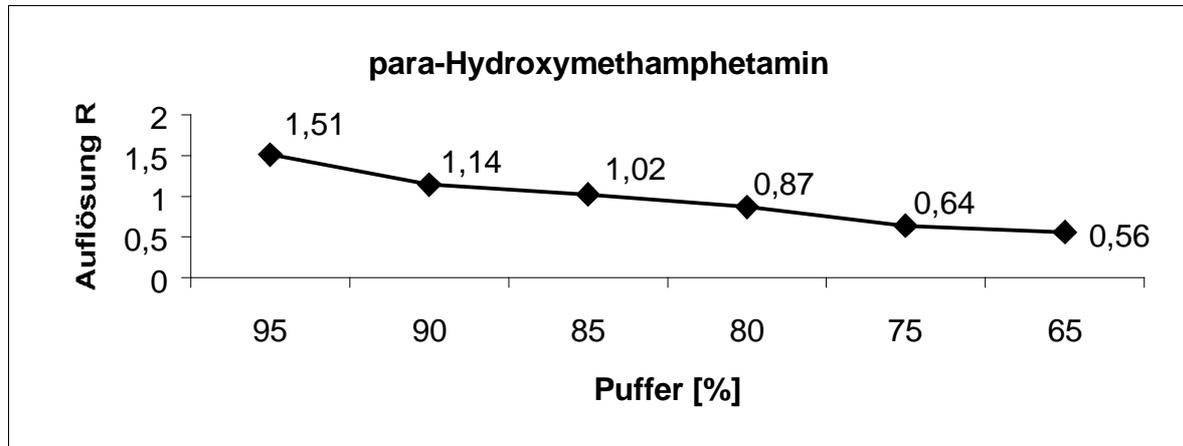


Abb. 2.39.: Auflösung R bei unterschiedlichem Pufferanteil

1-(4-Chlorphenyl)-2-propanamin (para-Chloramphetamin)

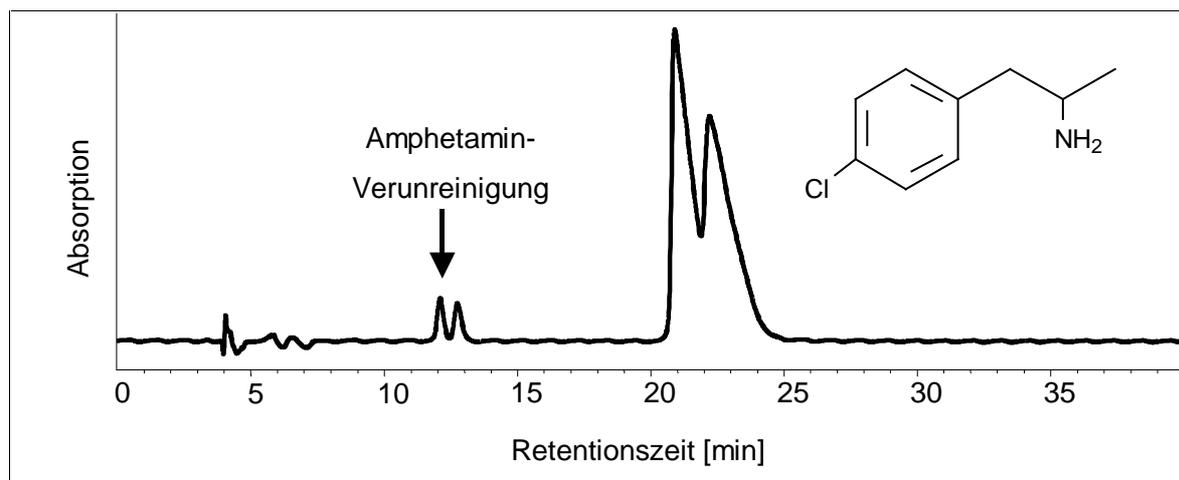


Abb. 2.40.: Trennung von para-Chloramphetamin **30**
Cyclobond I 2000®; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
20,89	22,20	0,22	0,24	0,83	1,27	3539	1693	0,73	1,06

Tab. 2.37.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **30**

1-(Phenyl)-2-propanamin (Amphetamin) und N-Methyl-1-(phenyl)-2-propanamin (Methamphetamin)

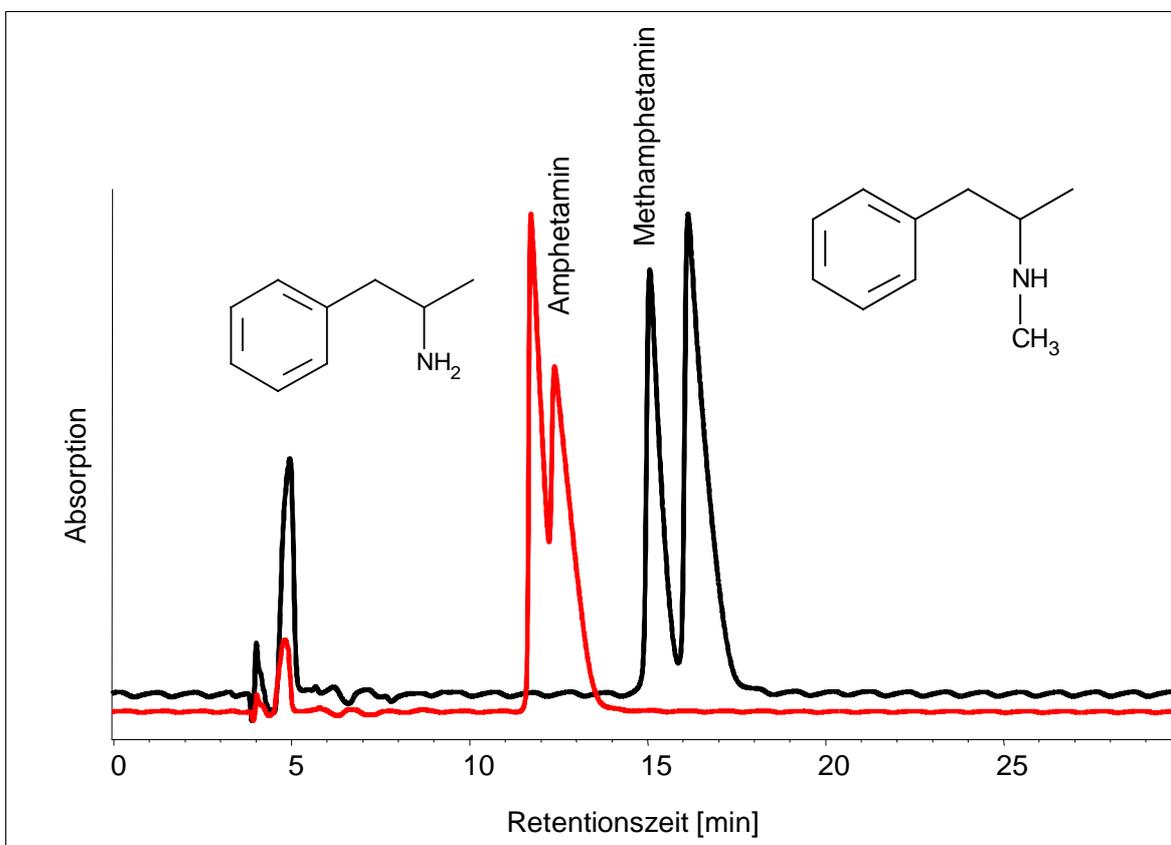


Abb. 2.41.: Trennung von Amphetamin **32** und Methamphetamin **33**
 Cyclobond I 2000[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10% Acetonitril

Substanz	Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl		R	α
	[min]		Peak 1	Peak 2	halber Höhe [min]		Peak 1	Peak 2		
	Peak 1	Peak 2			Peak 1	Peak 2				
32	11,72	12,39	0,23	0,21	0,42	0,68	4249	1837	0,70	1,06
33	15,06	16,13	0,33	0,21	0,42	0,61	7010	3918	1,22	1,07

Tab. 2.38.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **32** und **33**

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2-(Methylamino)-propiophenon (Methcathinon)

Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl		R	α
[min]				halber Höhe [min]					
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
9,22	9,69	0,80	0,67	0,3831	0,4569	3208	2492	0,66	1,05

Tab. 2.39.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **34**

2.2.2.4. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Acetonitril

Alle untersuchten 3,4-Methylenedioxyamphetamine vom Propanamin-Typ konnten mit Acetonitril gut getrennt werden. Es trennt sich auch hier das primäre Amin 3,4-MDA am schlechtesten. Auch N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin trennt sich wie schon unter Methanol beobachtet etwas schlechter innerhalb dieser homologen Reihe. Die Elutionsreihenfolge für 3,4-MDMA konnte mit Hilfe der enantiomerenreinen Verbindung S-(+)-MDMA ermittelt werden (Abbildung 2.26.). Das R-(-)-Enantiomer eluiert vor dem S-(+)-Enantiomer. Die Enantiomerenreihenfolge ist damit gleich der in der Literatur für β -Cyclodextrin chiralen stationären Phasen beschriebenen [35, 94].

Die gefundene Elutionsreihenfolge der Verbindungen 3,4-MDA, 3,4-MDMA und 3,4-MDE ist analog der von Sadeghipour und Veuthey an der Cyclobond I 2000[®] gefundenen Elution der Enantiomerenpaare [94]. Da in der veröffentlichten Arbeit keine genaue Auflösung R für die Enantiomerentrennung angegeben ist, kann die Auflösung der Peaks lediglich abgeschätzt werden. Die Auflösung der hier getrennten Verbindungen sind unter Abschätzung etwas besser als die in der Literatur beschriebenen [94]. Der Vergleich mit den Trennungen von 3,4-MDA und 3,4-MDE an Chiradex[®] [35] zeigen die gleiche Elutionsreihenfolge der Enantiomerenpaare. Ein Unterschied zwischen den Säulen, die beide Arbeitsgruppen verwendet haben, scheint nicht zu bestehen. Die Säulen Cyclobond I 2000 und Chiradex[®] unterscheiden sich nicht in ihren Trenneigenschaften oder ihrer Elutionsreihenfolge. Auch die Stabilität der beiden Phasen sind gleich. Aus diesem Grunde sind die hier präsentierten Trennungen sowohl auf Cyclobond I 2000[®] wie auch Chiradex[®] entstanden.

Die literaturbekannten Trennungen der 3,4-Methylendioxypropanamine mit diesem Fließmittel [35, 94] wurden hinsichtlich der Auflösung verbessert.

Die 3,4-Methylendioxybutanamine 3,4-MBDB **8** und 3,4-EBDB **9** konnten nur angetrennt werden (Tabelle 2.29.). N-Isopropyl-1-(3,4-methylendioxyphenyl)-2-butanamin **11** wurde mit R = 1,8 ausgezeichnet getrennt (Tabelle 2.30.).

Verbindungen des 2,3-Methylendioxybutanamin-Typs ließen sich antrennen (Abbildung. 2.34.).

Para-Methoxyamphetamin **28** konnte nur angetrennt werden (Tabelle 2.35.), wohingegen die paraständig hydroxylierte und am Stickstoff methylierte Verbindung **29**, para-Hydroxymethamphetamin, sich sehr gut trennen ließ (Abbildung 2.38.)

Vergleicht man die Trennungen von Amphetamin und Methamphetamin (Abbildung 2.40.) sowie die Amphetaminderivate para-Hydroxymethamphetamin (Abbildung 2.38.), para-Methoxyamphetamin (Tabelle 2.35.) und para-Chloramphetamin (Abbildung 2.40.), so fällt auf, daß wie auch bei den 3,4-Methylendioxyamphetaminen vom Propanamin-Typ die primären Amine besser getrennt werden als die sekundären Amine.

Die Trennung von Amphetamin und Methamphetamin ist ähnlich der von Makino und Suzuki 1996 [93] vorgestellten Trennung auf einer Ultron-ES-CD – Phase ebenfalls einer native β -Cyclodextrinphase [95, 98].

2.2.2.5. Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril

	Substanzen von Propanamin-Typ				Substanzen von Butanamin-Typ			
	1	2	3	4	7	8	9	11
Methanol	1,09	1,78	1,58	1,08	0,42	0,54	0,65	-
Acetonitril	1,10	2,09	1,71	1,22	-	0,54	0,70	1,87

Tab. 2.40.: Auflösung R der mit Methanol und Acetonitril getrennten 3,4-Methylendioxy-Verbindungen

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

	Substanzen von Butanamin-Typ		
	16	17	18
Methanol	0,71	-	0,64
Acetonitril	0,84	0,65	0,84

Tab. 2.41.: Auflösung R der mit Methanol und Acetonitril getrennten 2,3-Methylendioxy-Verbindungen

	22
	Methanol
Acetonitril	1,32

Tab. 2.42.: Auflösung R der mit Methanol und Acetonitril getrennten Verbindung

	Substanzen vom Amphetamin-Typ				
	28	29	30	32	33
Methanol	0,61	1,63	0,60	0,44	0,67
Acetonitril	0,62	1,21	0,73	0,70	1,22

Tab. 2.43.: Auflösung R der mit Methanol und Acetonitril getrennten Amphetamin-Derivate

	34
	Methanol
Acetonitril	0,66

Tab. 2.44.: Auflösung R der mit Methanol und Acetonitril getrennten Verbindung

Der Phosphat-Puffer ist als Fließmittel weitaus erfolgreicher als das Ammoniumacetat-Fließmittel. Die Trennungen sind mit $R > 1,3$ ausgesprochen gut. Methanol ist als Modifier für dieses Fließmittel offensichtlich nicht so gut geeignet. Die Auflösungen und Symmetriewerte für die angetrennten und getrennten Substanzen sind unter Acetonitril meistens besser. Ausnahmen bilden hier das 3,4-BDB **7** sowie das para-Hydroxymethamphetamin **29**, deren Auflösungen R unter Methanol besser sind. Für die Beurteilung der Modifier kommt hinzu, daß trotz kürzerer Retentionszeit mit Acetonitril die Trennungen besser sind. Damit ist Acetonitril im vorliegenden Fall zu bevorzugen.

Die Lebensdauer einer β -Cyclodextrinsäule mit Phosphat-Puffer ist deutlich kürzer. Dieses ist zunächst daran zu erkennen, daß der Gegendruck der Säule ansteigt und die Trennungen schlechter werden. Desweiteren kann bei einer defekten Säule keine ruhige Basislinie erzeugt werden. Die beschriebene drastische Verschlechterung der Trennung nach 100 Injektionen [94] kann

bestätigt werden. Der Unterschied in den Trennleistungen einer neuen und einer alten Säule ist in Tabelle 2.45. aufgezeigt.

		Substanz					
		1	2	3	4	8	22
neue Säule	Auflösung R	1,35	2,09	1,76	1,15	0,65	1,86
	Retentionszeit	21,99	25,55	28,71	28,27	31,96	25,70
	[min]	23,71	28,39	31,80	31,25	33,83	29,74
gebrauchte Säule	Auflösung R	1,09	1,74	1,71	1,22	0,54	1,32
	Retentionszeit	16,30	41,65	23,51	48,44	36,81	12,97
	[min]	17,44	46,10	25,76	53,13	38,07	14,49

Tab. 2.45.: Vergleich von Trennungen auf einer neuen und einer gebrauchten CSP.

Die Trennungen auf der neue Phase haben bessere Auflösungen und längere Retentionszeiten. Aber es gibt auch Ausnahmen. So wird Verbindung **4** nicht mit einer schlechteren, sondern mit einer besseren Auflösung getrennt.

Eine Abschätzung über die Anzahl der Injektionen, die mit dem Fließmittel auf einer Säule möglich sind, ist schwer zu treffen, da im vorliegenden Fall viel ausprobiert worden ist und Puffer gewechselt wurden. Derartige Erhebungen lassen sich aber leicht bei der Routineanwendung machen, wenn eine entsprechend gute Dokumentation vorhanden ist. Unbedingt ist dieses bei Enantiomerentrennungen zu empfehlen, um beurteilen zu können, ob eine CSP noch regeneriert werden kann oder entsorgt werden muß. Auch die Fehlersuche ist bei derartiger Dokumentation erleichtert, da Abnutzungen objektiv beurteilt werden können.

Ein Unterschied zwischen der Cyclobond I 2000[®] und der Chiradex[®] wurde nicht beobachtet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2.3. Natriumphosphat - Puffer mit Ionenpaarzusatz

2.2.3.1. Natriumphosphat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Methanol

Den Applikationssammlungen zu chiralen Trennungen von Merck ist ein Fließmittel zu entnehmen, welches das in der RP-Chromatographie übliche Ionenpaarreagenz Tetrabutylammoniumphosphat [99] enthält. Literatur zu Trennungen an Cyclodextrinphasen mit Ionenpaarreagenzien ist nicht verfügbar. Analog den Applikationsbeispielen von Merck ist ein Puffer aus Natriumdihydrogenphosphat 0,025 M mit Tetrabutylammoniumphosphat 0,005 M auf pH 3,5 (Puffer 3) eingestellt worden. Dieser Puffer ist mit 2 und 10% Methanol eingesetzt worden.

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDA)

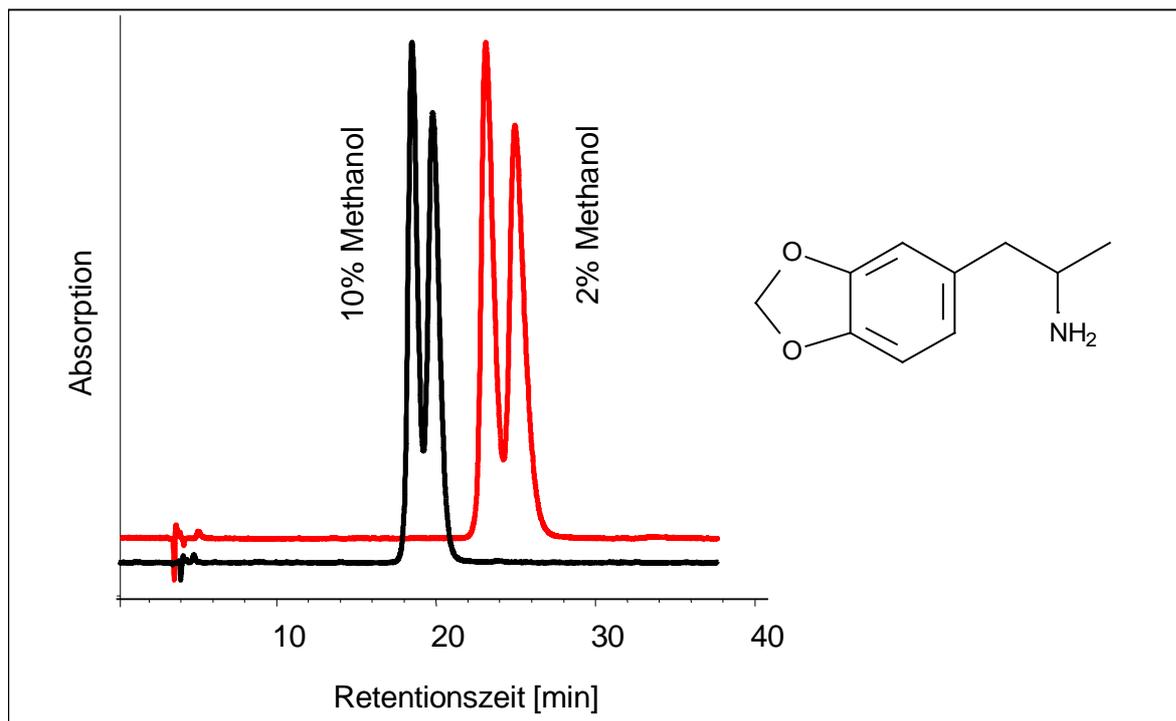


Abb. 2.42.: Trennung von 3,4-MDA 1
Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5
mit 2 und 10% Methanol

Methanol [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	2	22,94	24,77	0,57	0,56	0,84	1,03	4132		
10	18,32	19,62	0,72	0,68	0,65	0,79	4399	3446	1,07	1,07

Tab. 2.46.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 1

N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA)

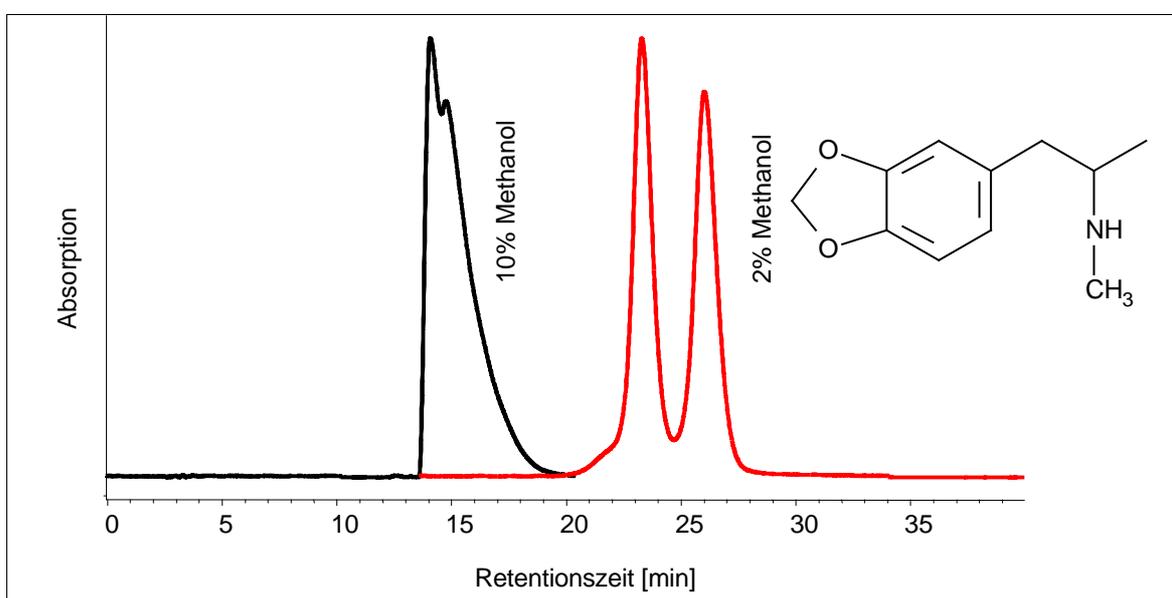


Abb. 2.43.: Trennung von 3,4-MDMA 2
Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5 mit 2 oder 10% Methanol

Methanol [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	2	23,28	26,02	0,89	0,88	0,91	1,04	3653		
10	14,06	14,75	0,56	0,13	0,75	1,38	1959	633	0,38	1,05

Tab. 2.47.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 2

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei der Trennung von 3,4-MDMA (Abbildung 2.43.) fällt auf, daß der Methanol-Anteil im Gegensatz zu der Trennung von 3,4-MDA (Abbildung 2.42.) von entscheidender Bedeutung ist. Während sich bei 10% Methanolanteil bei der Trennung von 3,4-MDA nur eine unwesentliche Verschlechterung ergibt, ist die Änderung bei 3,4-MDMA erheblich.

N-Ethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDE)

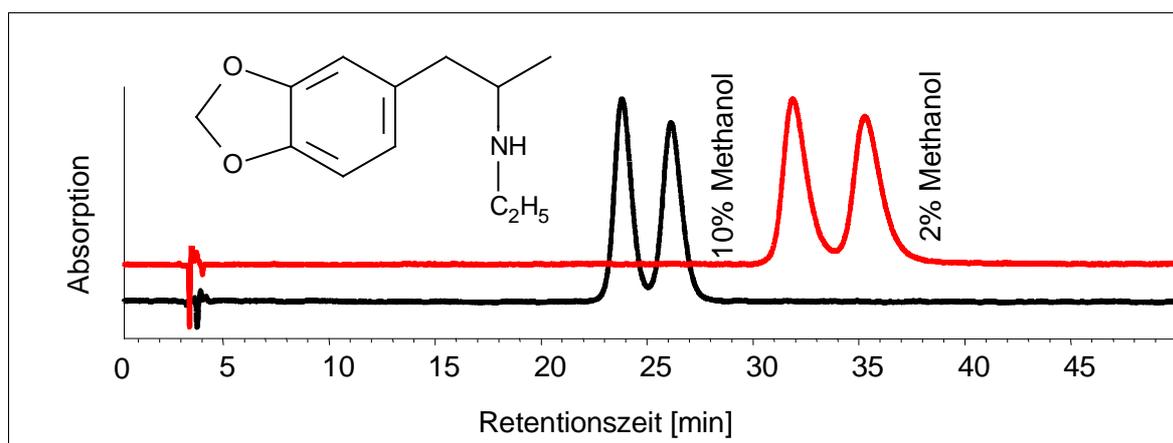


Abb. 2.44.: Trennung von 3,4-MDE **3**
Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5
mit 2 oder 10% Methanol

Methanol [%]	Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl		R	α
	[min]		Peak 1	Peak 2	halber Höhe [min]		Peak 1	Peak 2		
	Peak 1	Peak 2			Peak 1	Peak 2				
2	31,89	35,27	0,69	0,69	1,21	1,38	3826	3620	1,53	1,11
10	23,80	26,13	0,75	0,77	0,89	0,99	3991	3885	1,46	1,10

Tab. 2.48.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **3**

N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDPA)

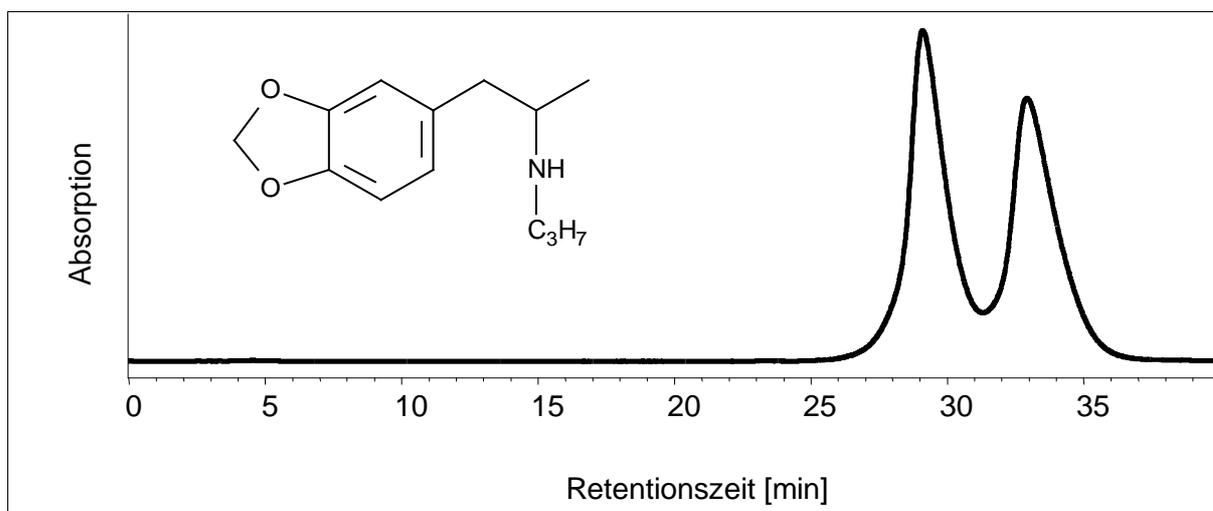


Abb. 2.45.: Trennung von N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin **4** Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5 mit 2% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
29,10	32,62	0,66	0,59	1,41	1,73	2348	1998	1,43	1,13

Tab. 2.49.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **4**

Eine Trennung mit 10% Methanolanteil konnte nicht erzielt werden. Hier liegt der gleiche Effekt der starken Verschlechterung der Trennung vor wie bei der oben beschriebenen Trennung von 3,4-MDMA.

3,4-BDB **7**, 3,4-MBDB **8**, 3,4-EBDB **9** und N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin **10** konnten lediglich angetrennt werden, was auf eine entsprechende Selektivität der CSP auch mit diesem Fließmittel hinweist.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

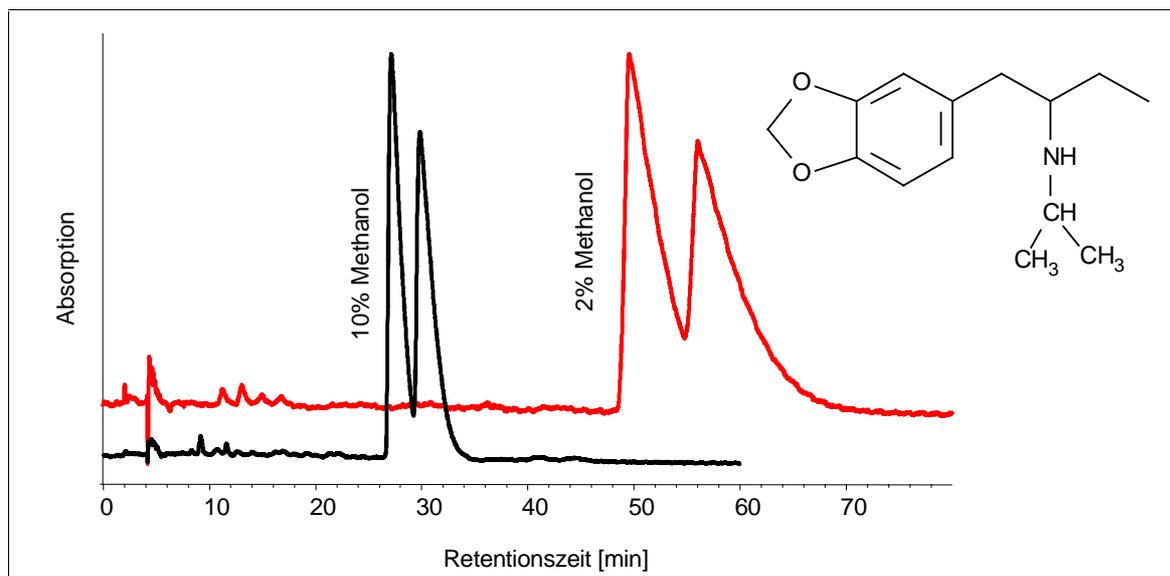


Abb. 2.46.: Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11**, Cylobond I 2000[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammonium-phosphat pH 3.5 mit 2 oder 10% Methanol

Methanol [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	2	49,56	56,00	0,18	0,17	3,23	4,37	1302		
10	27,13	29,84	0,29	0,24	1,24	1,57	2652	2009	1,13	1,10

Tab. 2.50.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **11**

Bei dieser Trennung eine Verbesserung der Auflösung mit 10% Methanolanteil zu beobachten. Wesentlichen Einfluß auf die Güte der Trennung hat natürlich die Peakbreite (Formel 1 und 2), die sich hier mit Einsatz von 10% Methanol wesentlich verbessert, was sicher auch in diesem Fall zu einer verbesserten Auflösung führt.

N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-AcBDB)

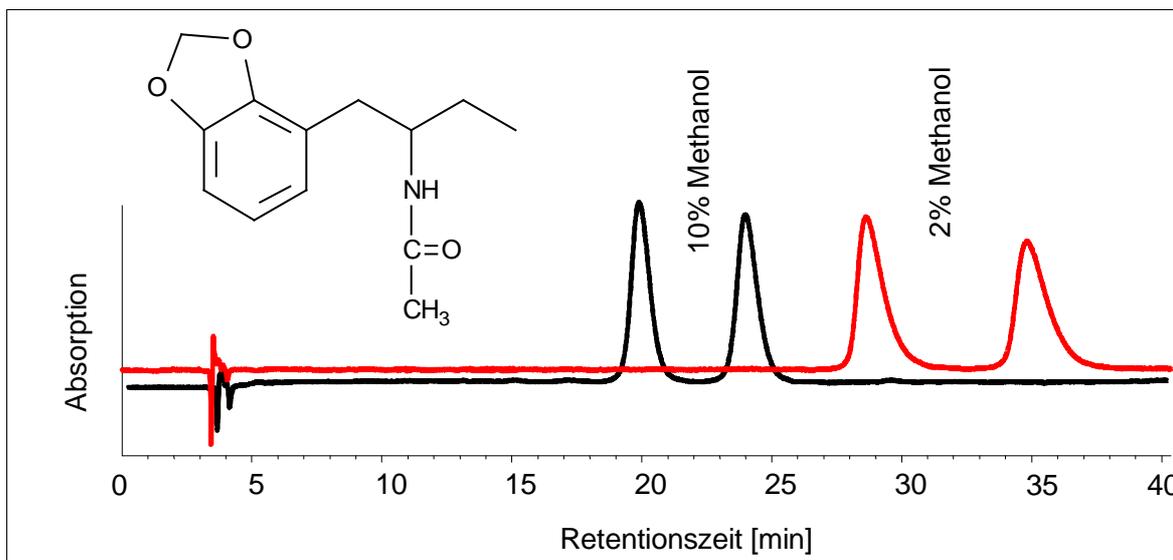


Abb. 2.47.: Trennung von 2,3-AcBDB **17**
Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat
pH 3,5 mit 2 oder 10% Methanol

Methanol [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
2	28,63	34,83	0,48	0,54	1,07	1,27	3941	4145	3,10	1,22
10	19,64	23,73	0,72	0,66	0,77	0,86	03574	4217	2,94	1,21

Tab. 2.51.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **17**

Wird der R-Wert betrachtet, so ist die Trennung mit 2% Methanol besser. Unter Berücksichtigung der Gesamtretentionszeit bietet sich in diesem Fall der Einsatz von 10% Methanol an, da die Trennung dann schon nach etwa 26 Minuten abgeschlossen ist.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin

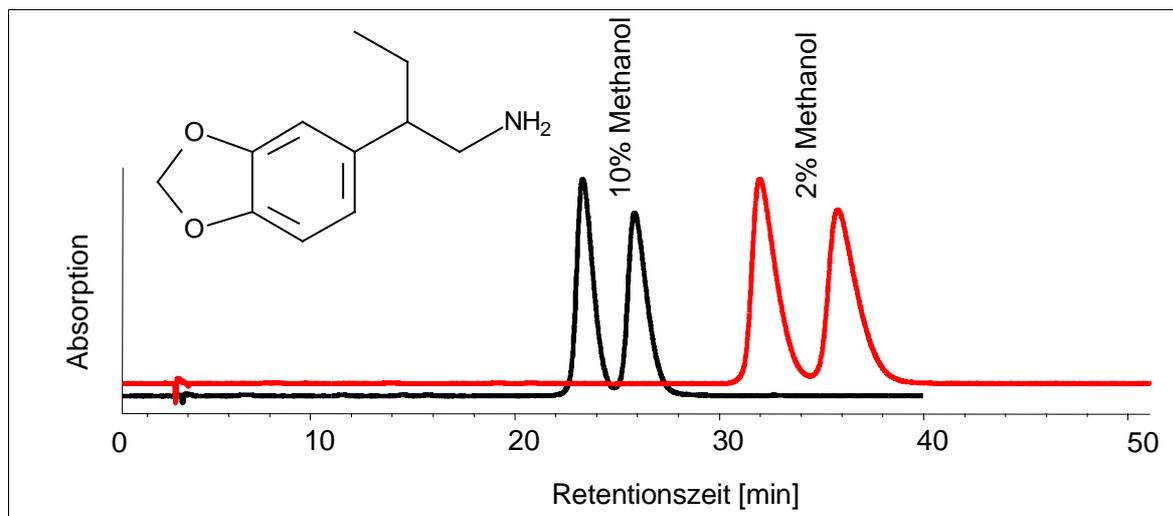


Abb. 2.48.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin **22**
Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5
mit 2 oder 10% Methanol

Methanol [%]	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	2	31,98	35,79	0,48	0,50	1,28	1,51	3459		
10	23,32	25,85	0,58	0,54	0,87	1,01	3949	3653	1,58	1,11

Tab. 2.52.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **22**

N-Methyl-1-(4-hydroxyphenyl)-2-propanamin (para - Hydroxymethamphetamin)

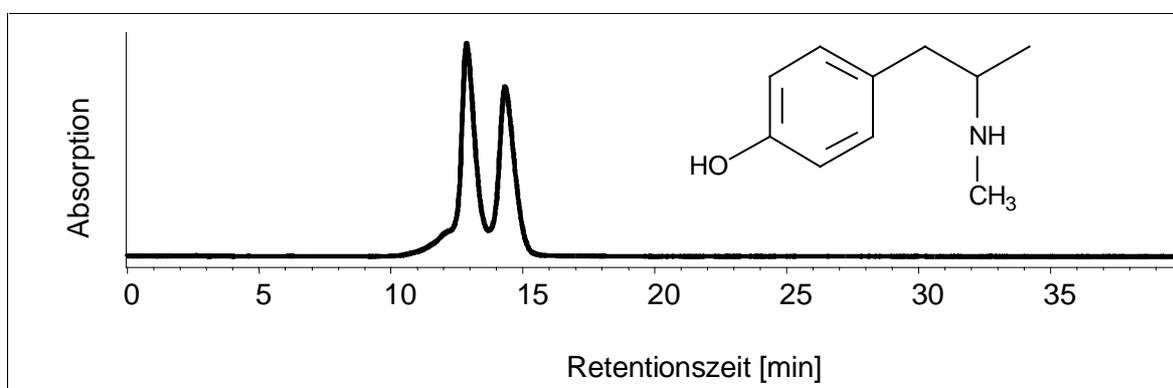


Abb. 2.49.: Trennung von para-Hydroxymethamphetamin **29**
Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5
mit 2 % Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
12,86	14,32	0,84	0,70	0,53	0,62	3222	2957	1,49	1,11

Tab. 2.53.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **29**

1-Phenyl-2-propanamin (Amphetamin), N-Methyl-1-Phenyl-2-propanamin (Methamphetamin)

Substanz	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	32	7,67	8,16	0,73	0,67	0,29	0,42	3848		
33	8,61	9,23	0,81	0,70	0,33	0,34	3747	4000	1,07	1,07

Tab. 2.54.: Chromatographische Parameter für die Trennung von Amphetamin **32** und Methamphetamin **33**, Chiradex[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5 mit 2 % Methanol

2.2.3.2. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Methanol

Die Trennungen mit diesem Fließmittel sind durch große R-Werte, das heißt sehr gute Auflösungen, gekennzeichnet. Insbesondere die Trennung von 2,3-AcBDB mit R=3,10 bei 2% und R =2,94 bei 10% Methanol (Abbildung 2.47.) ist die größte Auflösung der hier vorgestellten Trennungen. Eine Erhöhung des Methanolanteils über 10% ist hier noch auszuprobieren, sollte ein schnelle Analytik für diese Verbindung notwendig sein. Diese Erhöhung wird die Gesamtretentionszeit verkürzen, aber eine Basislinientrennung ist noch zu erwarten.

Allgemein kann gesagt werden, daß mit Erhöhung des Methanolanteiles sich die Trennung verschlechtert. Die Retentionszeiten der Verbindungen werden kürzer, wie die dargestellten Trennungen zeigen.

Wie auch schon bei den vorher beschriebenen Fließmitteln ist die Trennung von 3,4-MDA (Abbildung 2.42.) bei den 3,4-Methyldioxyamphetaminderivaten vom Propanamin-Typ im Vergleich der N-Methyl- (Abbildung 2.43.) und N-Propyl-Homologe (Abbildung 2.45.) die schlechteste. Auffallend ist, daß sich die Retentionszeiten dieser Verbindungen nicht so stark unterscheiden wie mit dem

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Kaliumphosphat – Fließmittel (Kapitel 2.2.2.). Eher befinden sich die Peaks hier in einem „Zeitfenster“ von 16 - 36 Minuten, wohingegen die Verbindungen **1 – 4** mit Puffer 2 und Methanol in einem „Fenster“ von 50 – 78 Minuten eluieren. Obwohl die Interaktionen mit der CSP wegen der längeren Retentionszeiten mit Puffer 2 größer sind, sind die Trennungen mit diesem hier beschriebenen Puffer besser.

2.2.3.3. Natriumphosphat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Acetonitril

Acetonitril ist mit diesem Fließmittel ebenfalls als Modifier getestet worden. Ein Anteil von 98% des Puffers wie bei Methanol konnte jedoch nur schwer erreicht werden, da bei dieser Konzentration die Säule nicht konditioniert werden konnte bzw. schnell ihre Kapazität verlor. Bei einem Anteil von 10% Acetonitril war eine Trennung für lediglich zwei Substanzen möglich.

N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

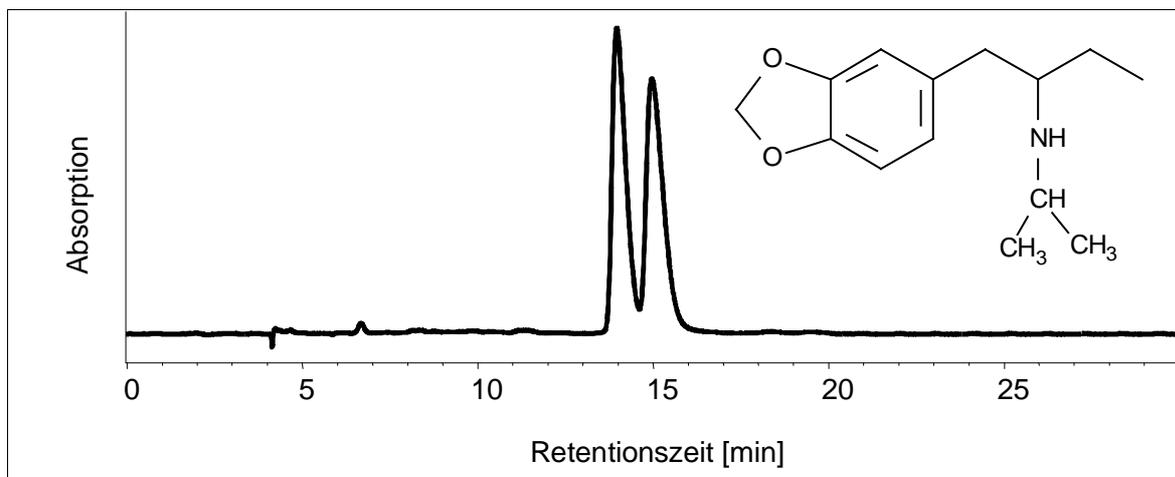


Abb. 2.50.: Trennung von 3,4-iPropBDB **11**
Cyclobond I 2000®; 90% NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5 mit 10% Acetonitril

Retentionszeit		Symmetrie		Peakbreite bei		Bodenzahl			
[min]				halber Höhe [min]					
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	R	α
13,96	14,96	0,51	0,49	0,43	0,53	5929	4414	1,23	1,07

Tab. 2.55.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **11**

2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin

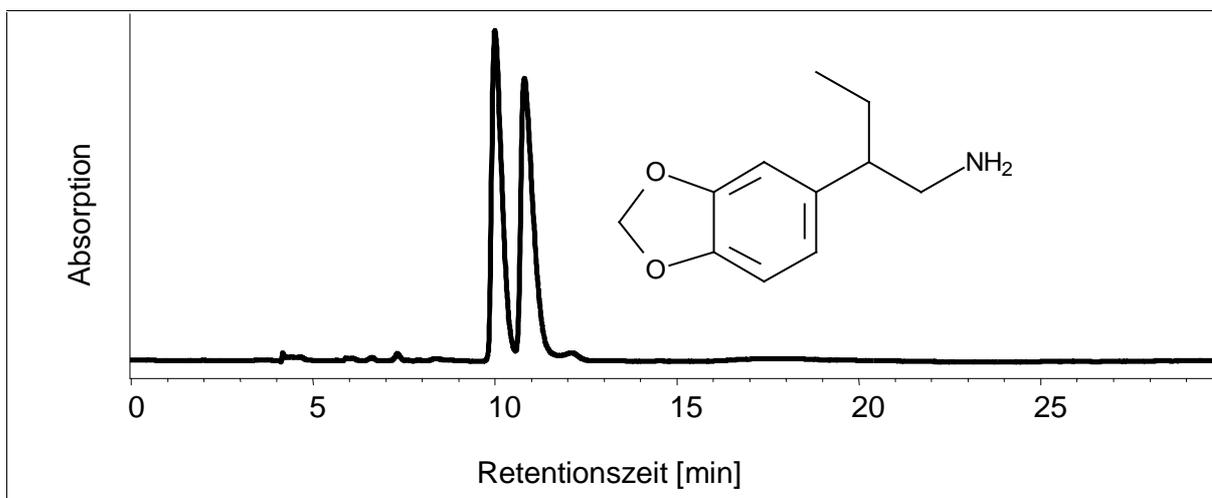


Abb. 2.51.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin **22**
 Cyclobond I 2000[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat
 pH 3,5 mit 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
10,00	10,81	0,46	0,42	0,30	0,36	5973	4993	1,44	1,08

Tab. 2.56.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **22**

2.2.3.4. Ergebniszusammenfassung der Trennung mit Acetonitril

Die erfolgreichen Trennungen der Substanzen **11** und **22** sind beide mit 10% Acetonitril entstanden. Sie zeichnen sich vor allem durch scharfe Peaks aus mit einer Peakbreite bei halber Höhe von ungefähr 0,4 min und dennoch sehr guten R - Werten sowie kurzen Retentionszeiten (Tabelle 2.55. und 2.56.). Schmale Peaks bedeuten in chromatographischen Verfahren eine Verbesserung der Empfindlichkeit, da im Bereich der Nachweisgrenze ein ungünstiges Signal zu Rausch - Verhältnis erst später erreicht wird als bei breiteren Peaks. Somit ist das Ziel in der HPLC, möglichst schmale Peaks zu erreichen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2.3.5. Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril

	1	2	3	4	11	17	22	29	32	33
Methanol 2 %	1,15	1,65	1,53	1,43	0,99	3,10	1,61	1,49	0,81	1,07
Methanol 10 %	1,07	0,38	1,46	-	1,10	2,94	1,58	-	-	-
Acetonitri 10 %	-	-	-	-	1,23	-	1,44	-	-	-

Tab. 2.57.: Auflösung R der mit Methanol und Acetonitril getrennten Substanzen

Methanol ist für dieses Fließmittel offensichtlich besser geeignet. Mit Acetonitril konnten längst nicht die Trennungen erreicht werden wie mit Methanol. Liegt jedoch eine ausgezeichnete Selektivität für eine Verbindung vor, wie es für N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11** und 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin **22** der Fall ist, kann auch mit Acetonitril getrennt werden. Die Retentionszeiten sind unter Acetonitril kürzer.

2.2.4. Ammoniumacetat - Puffer mit Ionenpaarzusatz

2.2.4.1. Ammoniumacetat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Methanol

Analog dem Phosphat-Fließmittel mit Tetrabutylammoniumphosphat ist auch ein Amminiumacetat-Fließmittel 0,1M mit Tetrabutylammoniumphosphat 0,005M bei einem pH von 4,2 (Puffer 4) eingestellt und mit Methanol und Acetonitril getestet worden.

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDA), N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA) und N-Ethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDE)

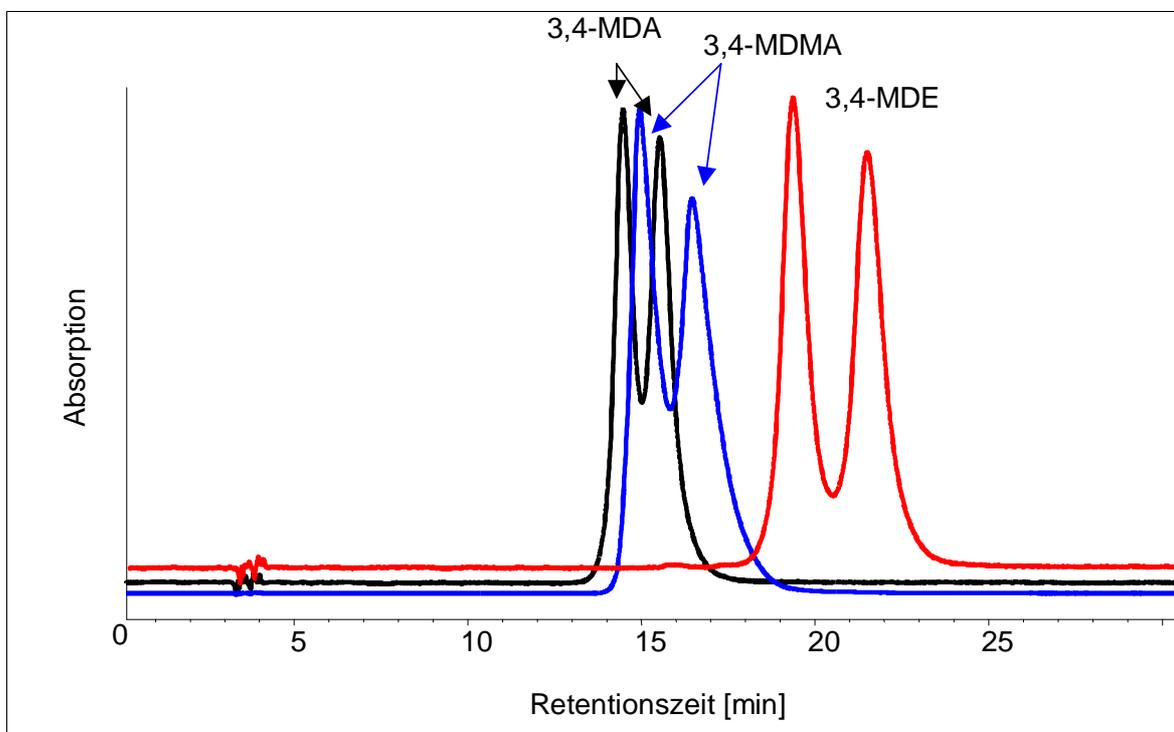


Abb. 2.52.: Trennung von 3,4-MDA **1**, 3,4-MDMA **2** und 3,4-MDE **3**
Chiradex[®]; Ammoniumacetat 0,1M + Tetrabutylammoniumphosphat
0,005M pH 4,2 mit 2% Methanol

Substanz	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
1	14,47	15,54	0,84	0,71	0,61	0,71	3085	2628	0,94	1,07
2	14,95	16,46	0,54	0,52	0,85	1,32	1726	868	0,82	1,10
3	19,26	21,40	0,78	0,78	0,78	0,91	3379	3041	1,48	1,11

Tab. 2.58.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **1**, **2** und **3**

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDPA)

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
50,22	56,19	1,14	1,12	1,95	2,22	3687	3550	1,69	1,12

Tab. 2.59.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **4**

Bei diesen Trennungen der 3,4-Methylenedioxyamphetamine ist, wie auch schon bei einigen oben diskutierten Fließmitteln, interessant, daß mit zunehmendem Substitutionsgrad am Stickstoff eine bessere Enantiomerendiskriminierung eintritt. Während bei den oben beschriebenen Fließmitteln im Falle des 3,4-MDPA die Trennung wieder schlechter wurde, so wird sie hier noch besser. Das N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin **4** hat offensichtlich die größte Affinität zum β -Cyclodextrin, zu erkennen an der sehr langen Retentionszeit (Tabelle 2.58.) bei gleichzeitig sehr guter Enantiomerendiskriminierung, jedoch sehr breiter Peaks (Tabelle 2.59.).

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-BDB), N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-MBDB) und N-Ethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (3,4-EBDB)

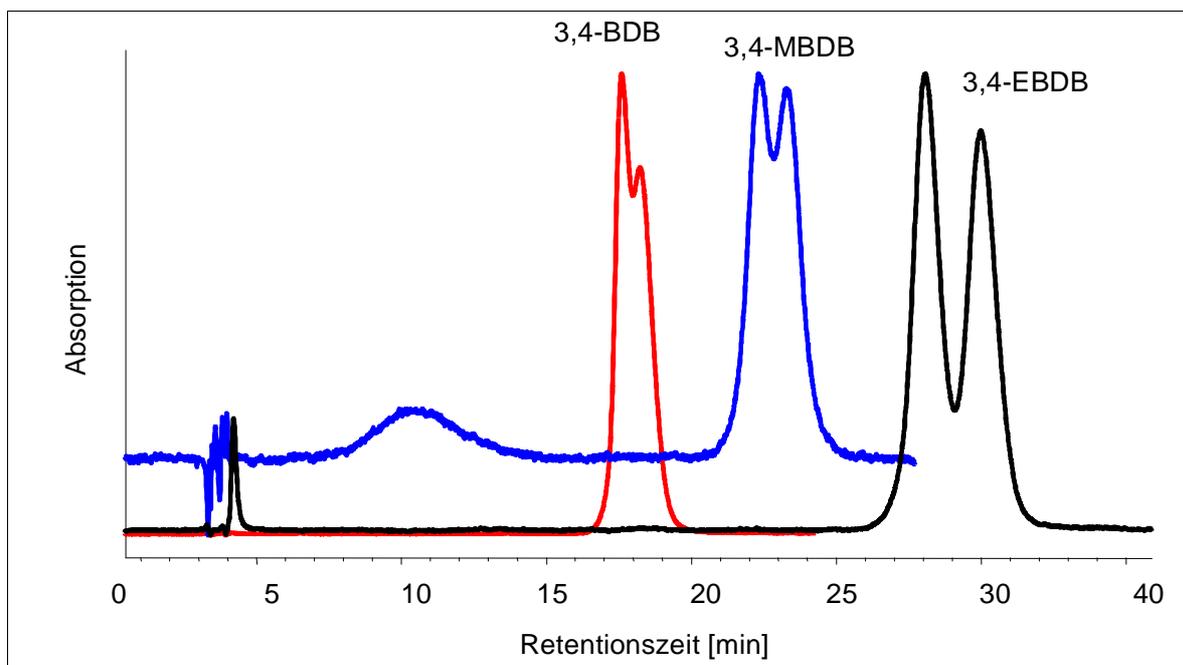


Abb. 2.53.: Trennung von 3,4-BDB **7**, 3,4-MBDB **8** und 3,4-EBDB **9**
Chiradex[®]; Ammoniumacetat 0,1M + Tetrabutylammoniumphosphat 0,005M pH 4,2 mit 2% Methanol

Substanz	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
7	17,60	18,24	0,84	0,50	0,62	0,73	4432	3482	0,56	1,04
8	22,32	23,29	1,01	0,52	0,93	0,98	3184	3138	0,60	1,04
9	28,08	29,99	0,81	0,83	1,02	1,14	4198	3833	1,04	1,07

Tab. 2.60.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 7, 8 und 9

Auch bei den Verbindungen des 3,4-Methylenedioxybutanamin – Typs ist die zunehmende Verbesserung der Trennung gut in Abhängigkeit des Substituenten am Stickstoffatom zu beobachten (Tabelle 2.60.).

N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin und N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

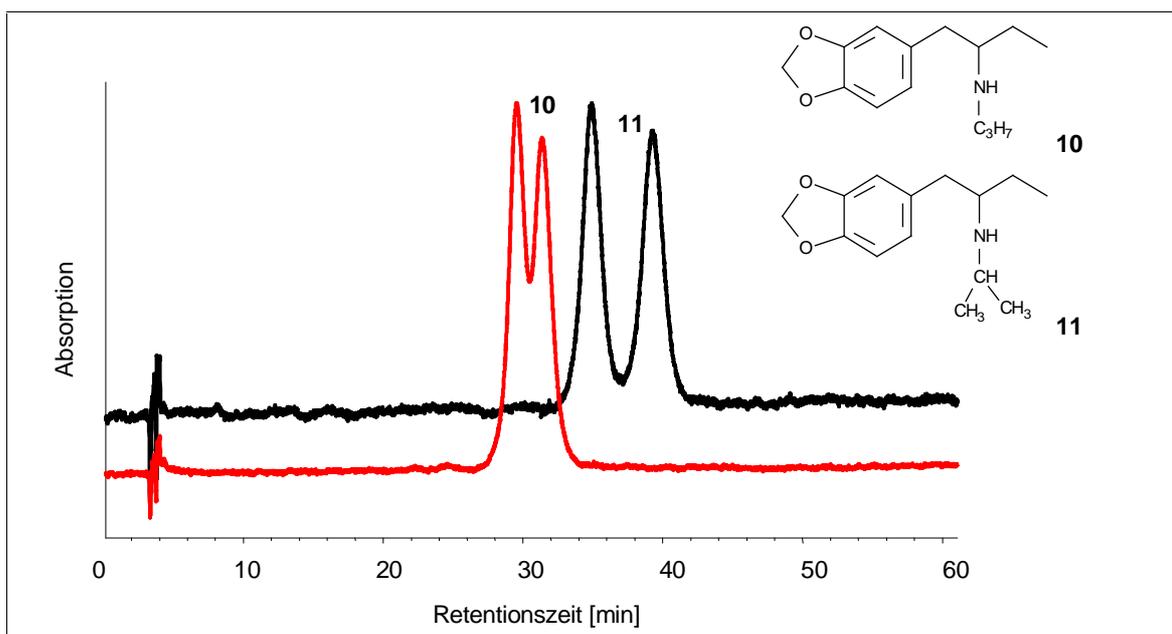


Abb. 2.54.: Trennung von N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin 10 und N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin 11
Chiradex[®]; Ammoniumacetat 0,1M + Tetrabutylammoniumphosphat 0,005M pH 4,2 mit 2% Methanol

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Substanz	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	10	29,55	31,36	0,93	0,79	1,54	1,61	2039		
11	34,92	39,29	0,98	1,03	1,47	1,65	3112	3153	1,64	1,12

Tab. 2.61.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **10** und **11**

2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-propanamin

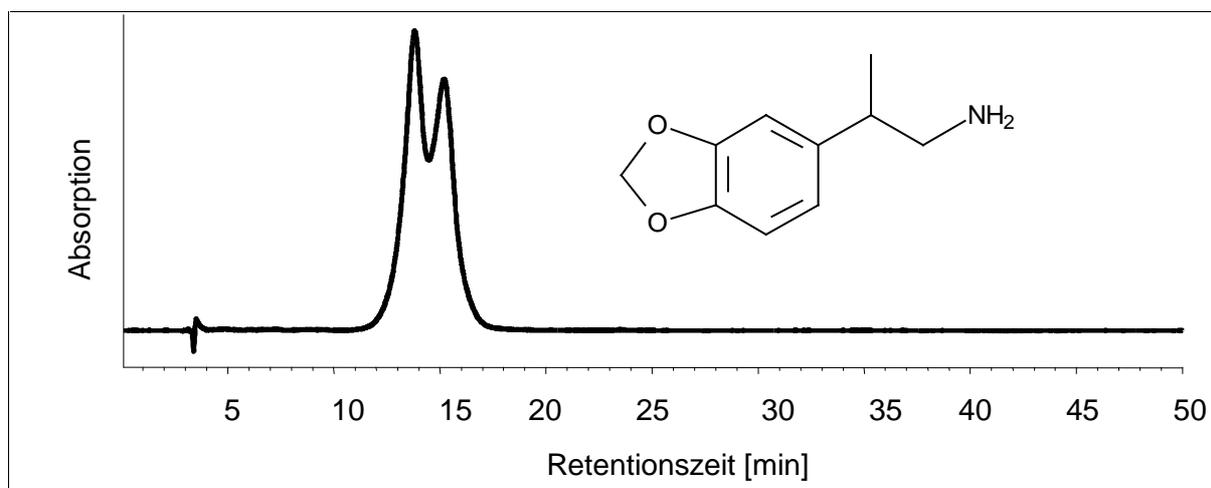


Abb. 2.55.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-propanamin **21**
Chiradex[®]; Ammoniumacetat 0,1M + Tetrabutylammoniumphosphat
0,005M pH 4,2 mit 2% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
13,80	15,19	1,36	0,96	1,16	1,29	783	773		

Tab. 2.62.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **21**

2.2.4.2. Ammoniumacetat - Puffer mit Ionenpaarzusatz und Acetonitril

Eine Trennung mit Acetonitril als Modifier konnte nicht erreicht werden.

2.2.4.3. Ergebniszusammenfassung

Die Verbesserung der Trennung mit zunehmendem Substitutionsgrad ist bei diesem Fließmittel sowohl bei den 3,4-Methylenedioxypropanamin- wie auch bei den 3,4-Methylenedioxybutanaminderivaten deutlich zu beobachten.

Die Enantiomere des N-Propyl-Derivates der 3,4-Methylenedioxyamphetamine aus der Butanamin-Reihe haben eine nicht so starke Affinität zu der β -Cyclodextrinphase, wie das N-Propyl-Derivat der 3,4-Methylenedioxyamphetamine aus der Propanamin-Reihe.

Bemerkenswert ist auch, daß sich mit diesem Fließmittel erstmals N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **10** und 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-propanamin **21** antrennen ließen. Dies ist mit den vorher beschriebenen Fließmitteln nicht möglich gewesen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2.5. Triethylammoniumphosphat - Puffer

Der einmolare Triethylammoniumphosphat - Fertigpuffer der Firma Merck ist 1:100 verdünnt worden und mit Methanol und Acetonitril getestet worden. Die eingesetzte Endkonzentration ist 0,001M Triethylamin mit ortho-Phosphorsäure auf pH 3,0 (Puffer 5) eingestellt.

2.2.5.1. Triethylammoniumphosphat-Puffer mit Methanol

N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA)

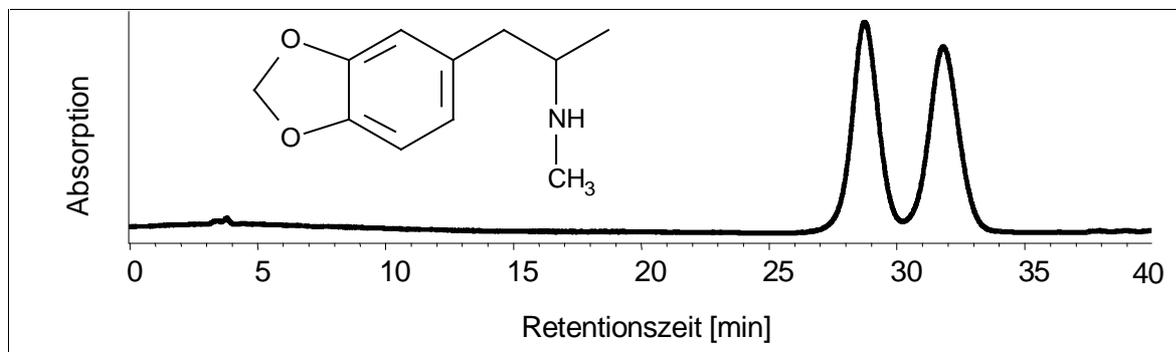


Abb. 2.56.: Trennung von 3,4-MDMA 2
Chiradex[®]; 90% Triethanolammoniumphosphat 0,01 M, pH 3,0 /
10% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
28,73	31,81	0,93	0,92	1,09	1,25	3826	3567	1,54	1,11

Tab. 2.63.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 2

N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDPA)

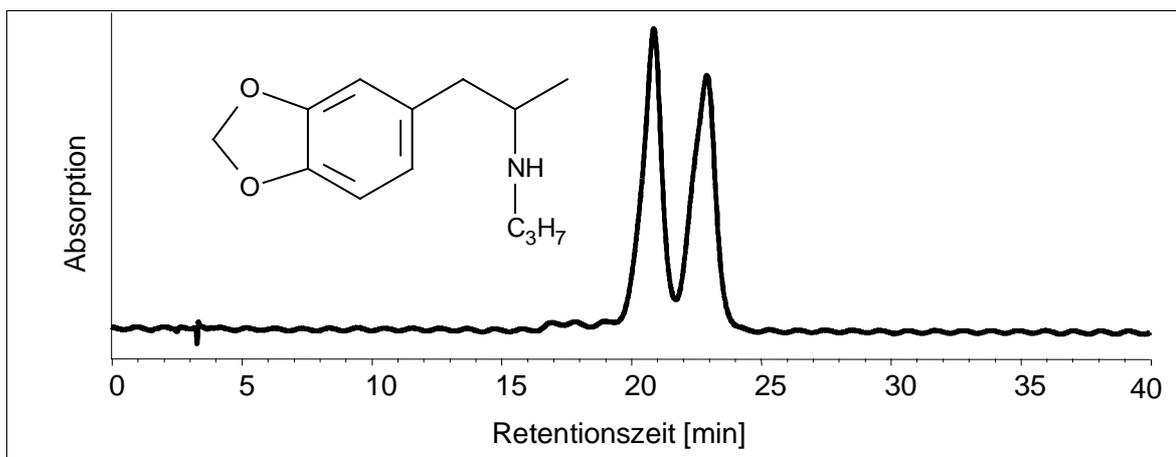


Abb. 2.57.: Trennung von N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin **4** Chiradex®; 90% Triethanolammoniumphosphat 0,01 M, pH 3,0 / 10% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
20,85	22,90	1,38	1,56	0,77	0,99	4096	2944	1,37	1,10

Tab. 2.64.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **4**

N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-AcBDB)

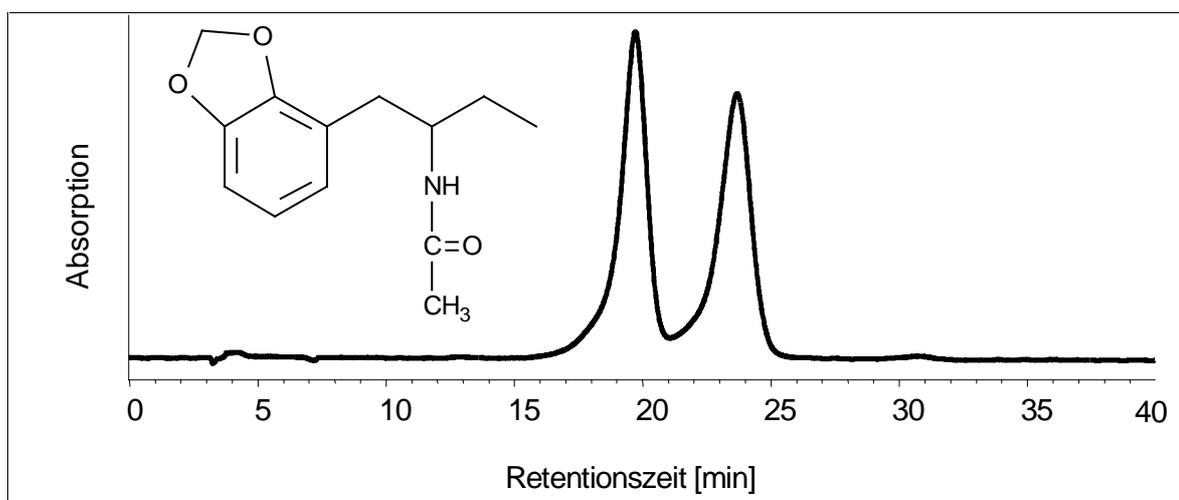


Abb. 2.58.: Trennung von 2,3-AcBDB **17** Chiradex®; 90% Triethanolammoniumphosphat 0,01 M, pH 3,0 / 10% Methanol

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
19,71	23,67	1,39	1,42	1,05	1,32	1940	1783	1,96	1,20

Tab. 2.65.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **17**

2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)butanamin

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
6,33	6,80	1,47	0,65	0,49	0,55	919	838	0,52	1,07

Tab. 2.66.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **22**

1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (para-Methoxyamphetamin)

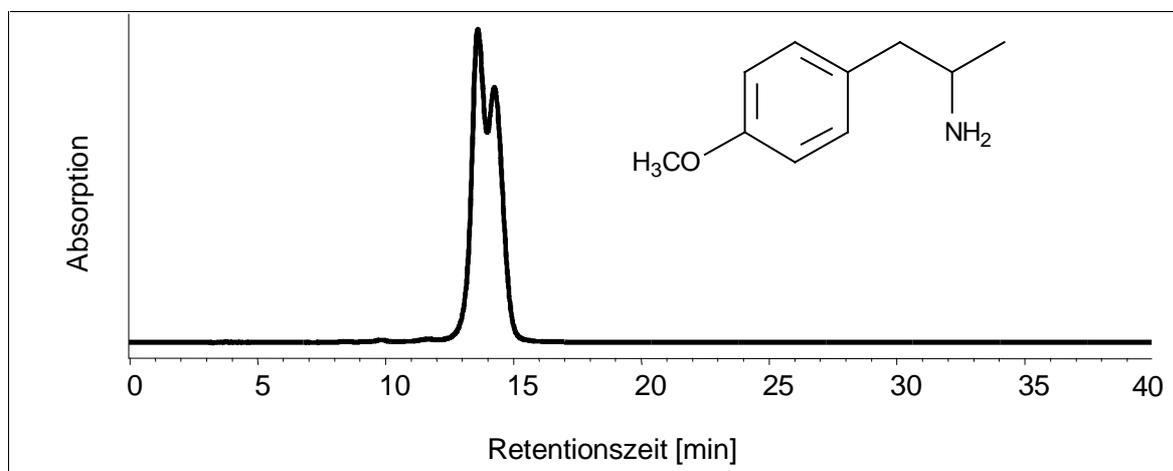


Abb. 2.59.: Trennung von para-Methoxyamphetamin **28**
Chiradex®; 90% Triethanolammoniumphosphat 0,01 M, pH 3,0 /
10% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
13,60	14,25	1,01	0,65	0,62	0,65	2643	2683	0,60	1,05

Tab. 2.67.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **28**

1-(4-Hydroxyphenyl)-2-propanamin (para - Hydroxymethamphetamin)

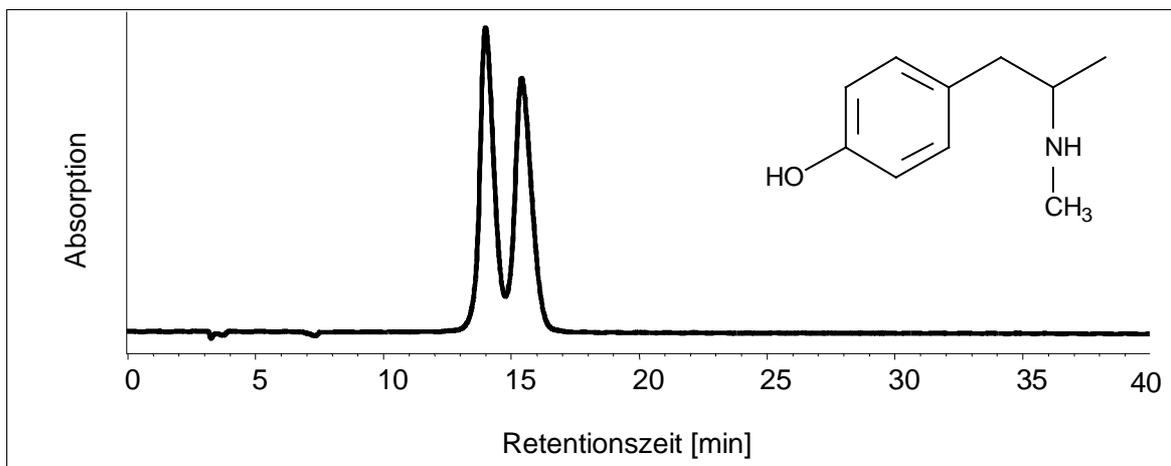


Abb. 2.60.: Trennung von para-Hydroxymethamphetamin **29**
Chiradex[®]; Triethanolammoniumphosphat 0,01 M, pH 3,0 /
10% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
13,98	15,40	0,71	0,71	0,58	0,70	3184	2682	1,30	1,10

Tab. 2.68.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **29**

2.2.5.2. Ergebniszusammenfassung der Trennungen mit Methanol

Trotz der Kenntnis, daß ein saurer pH-Wert sich eher nachteilig auswirkt (Kapitel 2.2.1.3.), wurde nochmal mit einem Phosphatpuffer bei pH 3,0 gearbeitet, da mit Phosphat-Puffern sehr gute Trennungen erzielt wurden (Kapitel 2.2.2. und 2.2.3.). 3,4-MDMA konnte hervorragend getrennt werden (Abbildung 2.56.). Auch die chromatographischen Parameter (Tabelle 2.63.) sind ausgesprochen gut. Nach knapp 35 Minuten ist die Trennung abgeschlossen. 3,4-MDPA **4** ließ sich gut trennen (Abbildung 2.57.). Aber auch schon bei dieser Trennung ließ sich ein Peakfronting beobachten, das bei 2,3-AcBDB (Abbildung 2.58.) besonders ausgeprägt ist. Möglicherweise werden durch das saure Fließmittel bereits Hydroxy - Gruppen des β -Cyclodextrin protoniert, die ihrerseits das Eindringen einiger Verbindung in die Kavität verhindern. 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

butanamin **22**, welches sich immer gut trennen ließ, konnte mit diesem Fließmittel lediglich angetrennt werden (Tabelle 2.66.). Para – Methoxyamphetamin ist angetrennt worden (Abbildung 2.59.). Das para – Hydroxymethamphetamin konnte mit $R = 1,30$ (Tabelle 2.68.) basislinien getrennt werden.

2.2.5.3. Triethylammoniumphosphat - Puffer mit Acetonitril

N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-AcBDB)

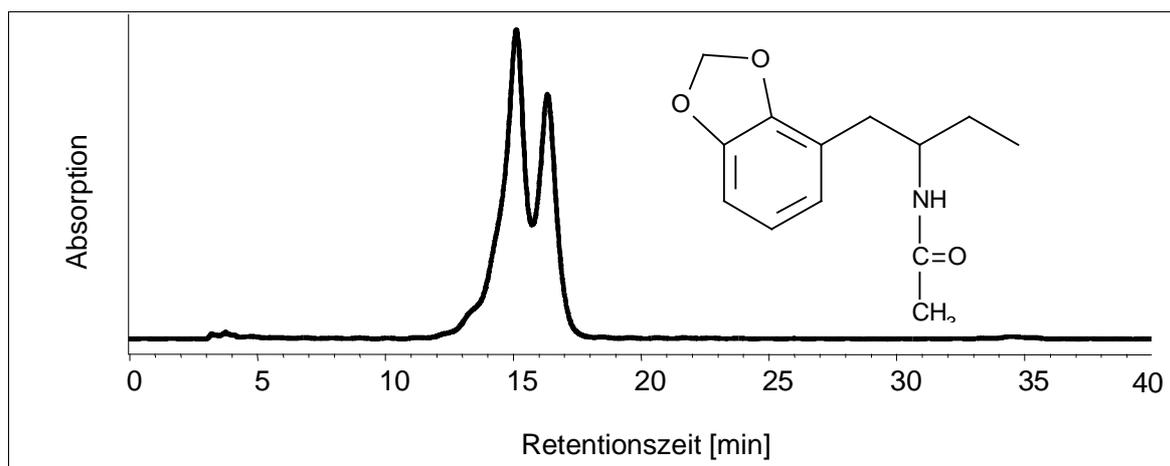


Abb. 2.61.: Trennung von 2,3-AcBDB **17**
Chiradex[®]; Triethanolammoniumphosphat 0,01 M, pH 3,0 / 10%
Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
15,11	16,33	1,74	0,93	0,85	0,83	1738	2162	0,85	1,08

Tab. 2.69.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **17**

1-(4-Methoxyphenyl)-2-propanamin (para - Methoxyamphetamin)

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
8,96	9,28	1,12	0,55	0,32	0,37	4276	3540	0,54	1,04

Tab. 2.70.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **28**

N-Methyl-1-(4-hydroxyphenyl)-2-propanamin (para - Hydroxymethamphetamin)

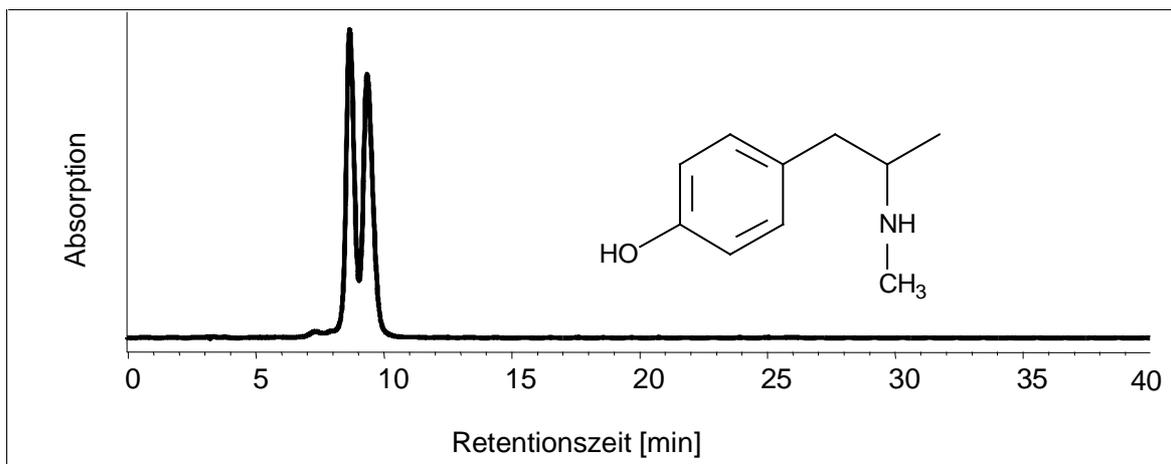


Abb. 2.62.: Trennung von para - Hydroxyamphetamin **29**
 Chiradex[®]; Triethanolammoniumphosphat 0,01 M, pH 3,0 / 10%
 Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
8,65	9,34	0,78	0,66	0,34	0,41	3685	2921	1,08	1,08

Tab. 2.71.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **29**

2.2.5.4. Ergebniszusammenfassung der Trennungen mit Acetonitril

Eine Trennung von 3,4-MDMA und 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-butanamin konnte mit Acetonitril nicht erreicht werden. Das sich andeutende Peakfronting bei der Verbindung **17** ist mit Acetonitril noch schlechter geworden. Die übrigen Trennungen sind unter Acetonitril ebenfalls schlechter geworden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2.5.5. Vergleich der Modifier Methanol und Acetonitril

	2	4	17	22	28	29
Methanol	1,54	1,37	1,96	0,52	0,60	1,30
Acetonitril	-	-	0,85	-	0,54	1,08

Tab. 2.72.: Auflösung der mit Methanol und Acetonitril getrennten Verbindungen

Der Einsatz von Acetonitril mit diesem Puffer hat eine deutliche Verschlechterung der Trennung gebracht. Bei den getrennten Verbindungen ist die Retentionszeit gegenüber den Methanol – Trennungen kürzer geworden. Bemerkenswert ist hier der Unterschied in der Trennung der Verbindung **28** und **29**, die sich lediglich darin unterscheiden, daß eine Methylgruppe als N-Methyl-Gruppe bei Verbindung **29** und als Methoxy-Gruppierung in Verbindung **28** vorliegt.

2.2.6. Natriumacetat - Puffer

Natriumacetat 0,025M pH 4,4 (Puffer 6) ist mit 10% Methanol und 10% Acetonitril an einer Chiradex getestet worden. Keine der Verbindungen konnte getrennt werden.

2.2.7. Kalibrierung der Enantiomere

2.2.7.1. Fluoreszenzdetektion

Methylendioxyamphetamine besitzen native Fluoreszenzeigenschaften. Zahlreiche Autoren nutzen diese Eigenschaft, da der Nachweis dieser Verbindungen damit spezifischer und empfindlicher erfolgen kann [35, 37, 94, 100, 101, 102]. Tabelle 2.73. zeigt die in der Literatur verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Literatur	Fluoreszenzdetektion	
	Anregungswellenlänge [nm]	Emissionswellenlänge [nm]
35 / 37	286	320
94	285	320
100	285	320
101	288	324
102	285	320
×	285	320

Tab. 2.73.: In der Literatur verwendete Anregungs- und Emissionswellenlänge für 3,4-Methylendioxyderivate (× in dieser Arbeit verwendete Wellenlängen)

Mit den Verbindungen **2** und **22** sind exemplarisch Kalibrierungen mit Fließmittel 2 (10% Acetonitril) und anschließender Fluoreszenzdetektion vorgenommen worden. (Tabelle 2.74.).

Verbindung	Arbeitsbereich [ng/ml]	Geradengleichung
2 (R-(-)-Enantiomer)	0,026 – 0,545	y=8887,0x + 64,9
2 (S-(+)-Enantiomer)		y=8563,6x + 88,7
22 (R-(-)-Enantiomer)	0,106 – 0,800	y=6097,1x + 895,7
22 (S-(+)-Enantiomer)		y=5965,1x + 960,3

Tab. 2.74.: Arbeitsbereich und Geradengleichung der Enantiomeren von Verbindung **2** und **22** unter Fluoreszenzdetektion

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2.7.2. UV - Detektion

Die Enantiomere der Verbindungen **2** und **22** sind bei 288nm kalibriert worden (Tabelle 2.75.)

Verbindung	Arbeitsbereich [ng/ml]	Geradengleichung
2 (R-(-)-Enantiomer)	2,5 – 108,0	$y=13,1x + 36,6$
2 (S-(+)-Enantiomer)		$y=13,9x + 34,9$
22 (R-(-)-Enantiomer)	0,8 – 217,5	$y=12,4x + 23,7$
22 (S-(+)-Enantiomer)		$y=12,7x + 20,8$

Tab. 2.75.: Arbeitsbereich und Geradengleichung der Enantiomeren von Verbindung **2** und **22** unter UV-Detektion

2.2.7.3. Ergebniszusammenfassung

Die dargestellten Kalibrierungen im Fluoreszenzkanal zeigen die gute Empfindlichkeit dieser Detektionsart. Substanzmengen von 0,52 pg (absolut) der Verbindung **2** sowie 2,12 pg (absolut) der Verbindung **22** sind gut detektierbar. Damit liegt auch für die enantioselektive Detektion ein hochempfindliches Verfahren vor, das sich sowohl für die forensische Analytik wie auch für eine pharmakodynamische Forschungsarbeit eignet.

2.2.8. On-line Detektion des Cirkulardichroismus

2.2.8.1. Cirkulardichroismus

Natürliches Licht ist eine transvasale Welle. Die Lage der Schwingungsebenen dieser Welle ändern sich ständig, erfolgen aber senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung. Linear polarisiertes Licht schwingt nur in einer Ebene. Erzeugt wird linear polarisiertes Licht durch Doppelbrechung oder Reflexion. Optisch aktive Substanzen (Enantiomere) vermögen die Schwingungsebene dieses Lichtstrahles um einen Winkel α zu drehen. Das Verfahren wird als Polarimetrie bezeichnet. Der Drehwert α wird Grad angegeben (Formel 8).

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{c \cdot l} \quad \text{Formel 8}$$

- α Drehwinkel in Grad
- l Schichtdicke in dm
- c Konzentration in $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$

Da die optische Drehung außer von der Chiralität der Verbindung noch von der Wellenlänge und der Temperatur abhängt, wird üblicherweise bei der Natrium D-Linie (589,3 nm) bei 20°C gemessen. Dieses wird als hoch- bzw. tiefgestellte Indices bei der spezifischen Drehung angegeben. Mit Hilfe der molaren Drehung lassen sich Verbindungen besser vergleichen (Formel 9).

$$[\Phi]_D^{20} = \frac{100 \cdot \alpha}{l \cdot c} = \frac{[\alpha]_D^{20} \cdot M_G}{100} \quad \text{Formel 9}$$

- Φ, α Drehwinkel in Grad
- l Schichtdicke in dm
- c Konzentration in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
- M_G Molekulargewicht

Linear polarisiertes Licht läßt sich in eine rechts- und eine linkscirkulare Welle gleicher Frequenz, Geschwindigkeit und Intensität zerlegen. Die einzelnen

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

elektrischen Feldvektoren des Lichtstrahles, die sich in einer Cosinusfunktion fortbewegen, beschreiben in Fortpflanzungsrichtung eine Schraubenlinie. Der Betrag der Feldstärke bleibt zu jedem Zeitpunkt gleich. Betrachtet man diesen Verlauf des Vektors zum Beispiel in Richtung seiner Fortpflanzung so beschreibt eine Welle eine Linksdrehung (linkscirkulare Welle), während die andere eine Rechtsdrehung (rechtscirkulare Welle) beschreibt. Der Cirkulardichroismus tritt an der Stelle auf, an der die optisch aktive Verbindung elektromagnetische Strahlung absorbiert. Die beiden cirkular polarisierten Lichtstrahlen werden durch die chirale Verbindung unterschiedlich stark gebrochen und unterschiedlich stark absorbiert (Formel 10).

$$\Delta A = A_L - A_R \quad \text{Formel 10}$$

$\Delta A =$	zirkulardichroistische Absorption
$A_L =$	Absorption des linksdrehenden polarisierten Lichtes
$A_R =$	Absorption des rechtsdrehenden polarisierten Lichtes

Der Cirkulardichroismus kann dann berechnet werden mit Formel 11.

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c \cdot l} \quad \text{Formel 11}$$

$\Delta \varepsilon =$	molarer Zirkulardichroismus oder molarer differenzdichroistischer Absorptionskoeffizient in $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
$\varepsilon_L =$	molarer Absorptionskoeffizient des linksdrehenden polarisierten Lichtes
$\varepsilon_R =$	molarer Absorptionskoeffizient des rechtsdrehenden polarisierten Lichtes
$c =$	Konzentration der Untersuchungslösung in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$l =$	Schichtdicke der Küvette in cm

2.2.8.2. Messung des Cirkulardichroismus

Ein HPLC – Detektor (Jasco Model CD-1595) zur Detektion des Cirkulardichroismus stand für eine Woche zur Verfügung. Zunächst ist das CD-Spektrum von 3,4-MDEA aufgenommen worden (Abbildung 2.63.), um eine

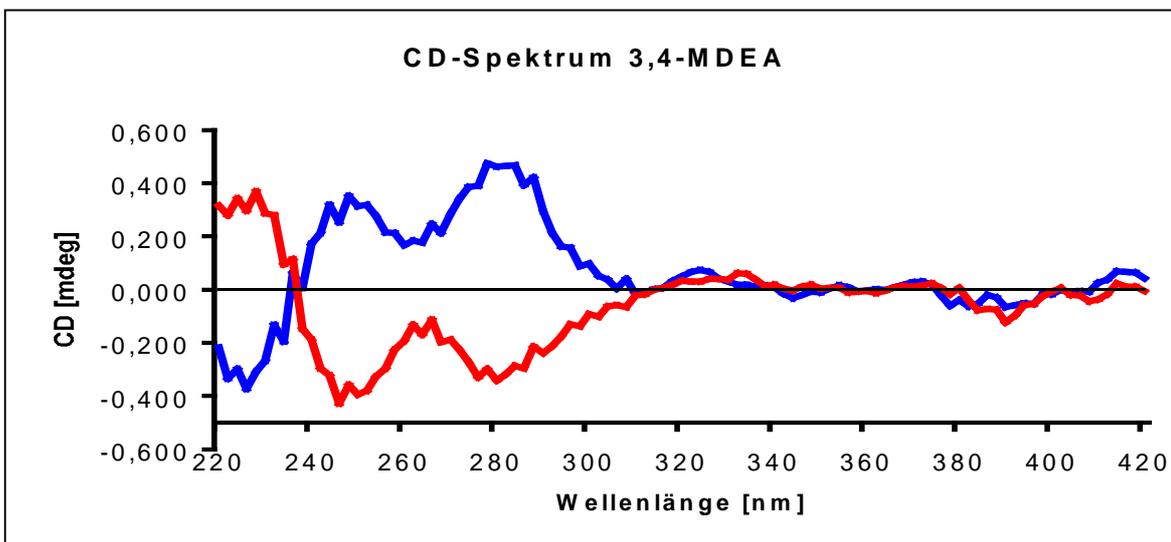


Abb. 2.63.: CD – Spektrum von 3,4-MDEA (Peak 1 blau, Peak 2 rot)

geeignete Wellenlänge für die Beobachtung herauszufinden. Die Messung ist am HPLC – Gerät während der Trennung erfolgt. Der Fluß ist dabei im Peakmaximum zur Messung des Spektrums angehalten worden. Gleichzeitig ist auch ein UV-Spektrum aufgezeichnet worden (Abbildung 2.64.).

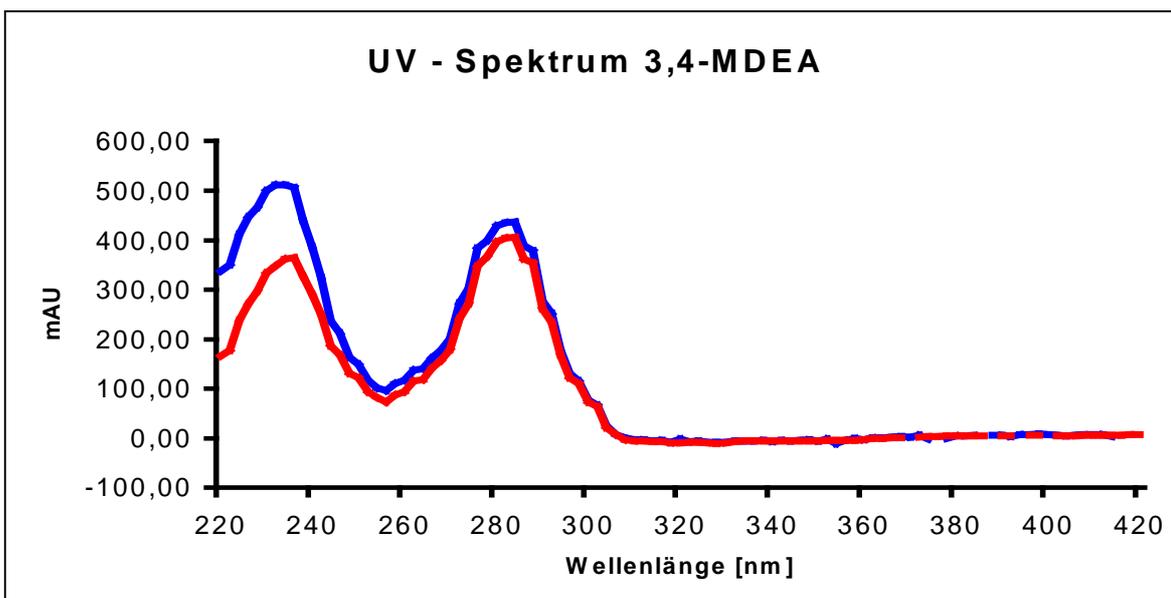


Abb.: 2.64.: UV – Spektrum von 3,4-MDEA (Peak 1 blau, Peak 2 rot)

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Der Cirkulardichroismus wurde bei 288nm gemessen.

Abbildung 2.65. bis Abbildung 2.74. zeigen die gemessenen Trennungen.

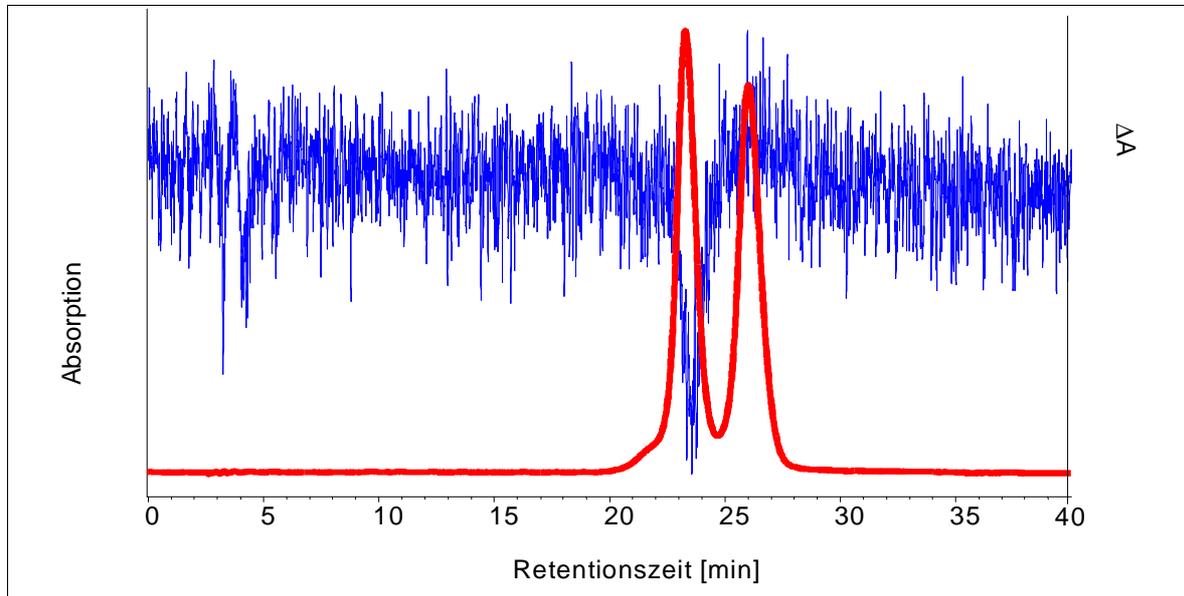


Abb. 2.65.: Trennung von 3,4-MDMA **2**
Cyclobond I 2000[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat
pH 3,5 / mit 2% Methanol

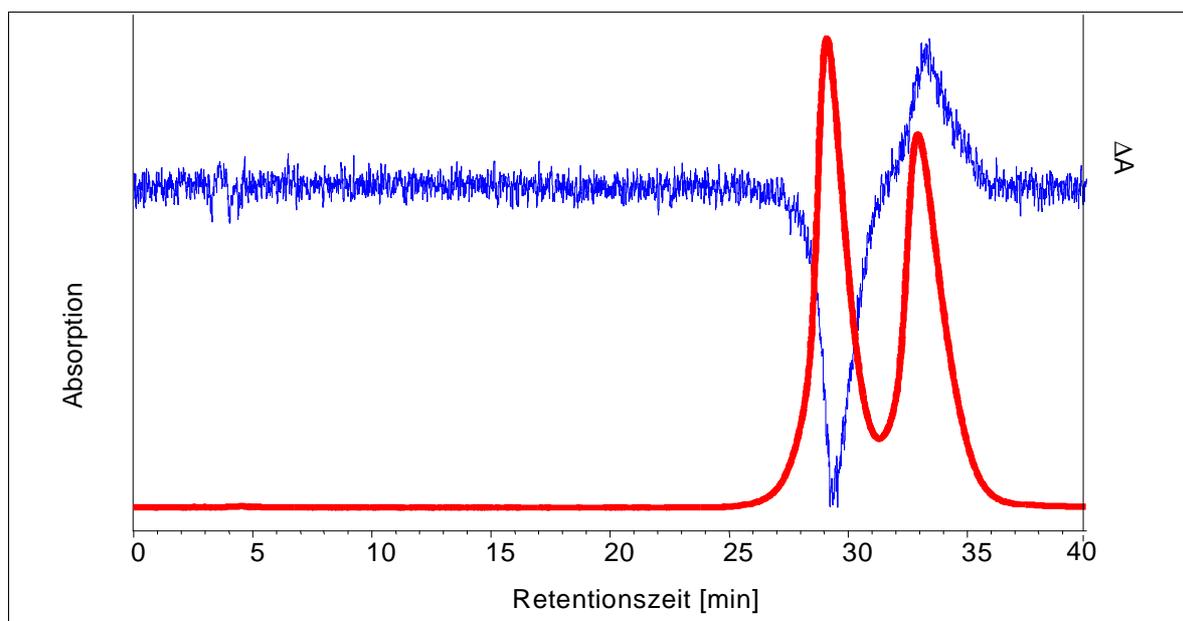


Abb. 2.66.: Trennung von ; N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **10**
Cyclobond I 2000[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat
pH 3,5 / mit 2% Methanol

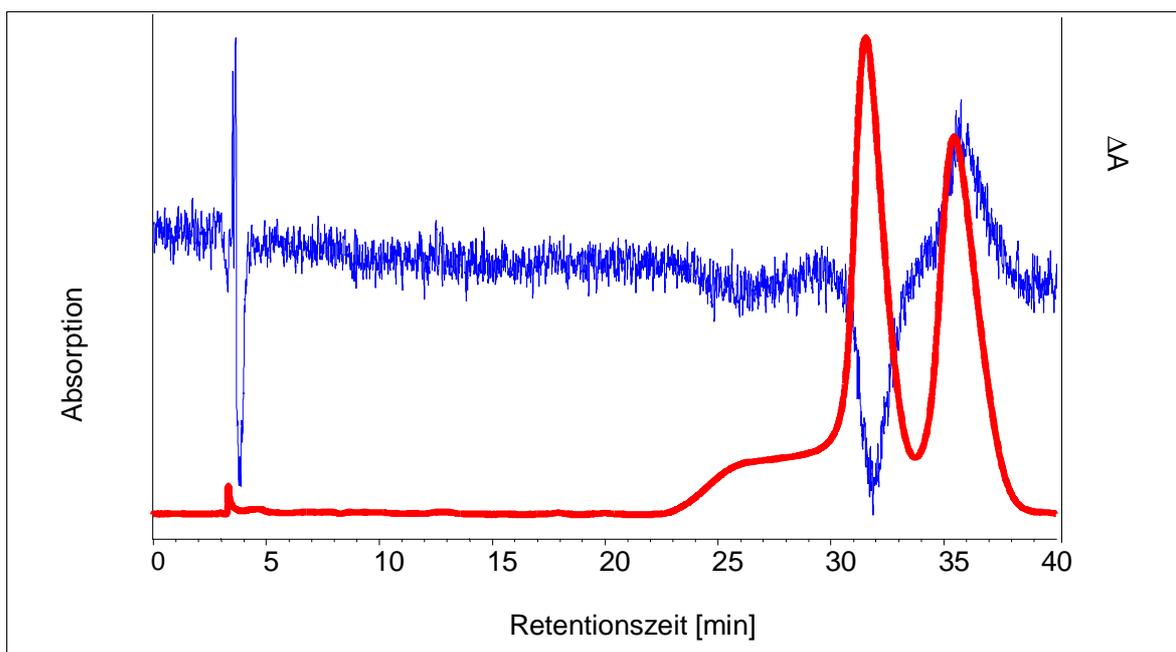


Abb. 2.67.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)butanamin **22**
 Cyclobond I 2000[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat
 pH 3,5 / 2% Methanol

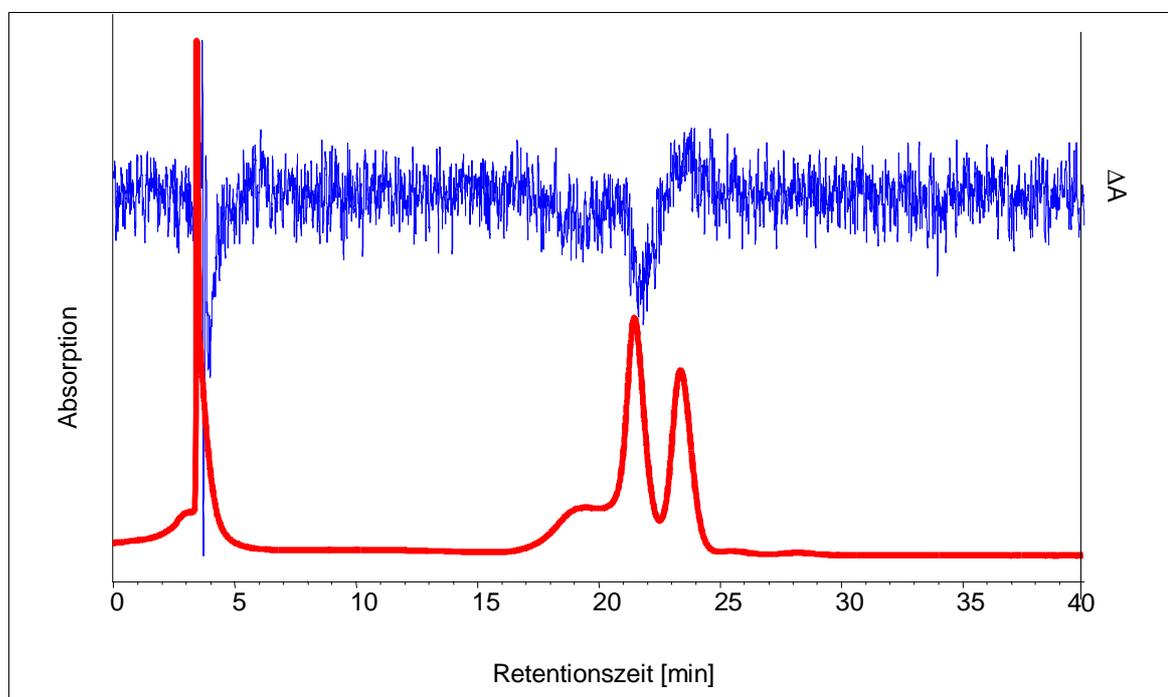


Abb. 2.68.: Trennung von 3,4-MDA **1**
 Cyclobond I 2000[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10% Acetonitril

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

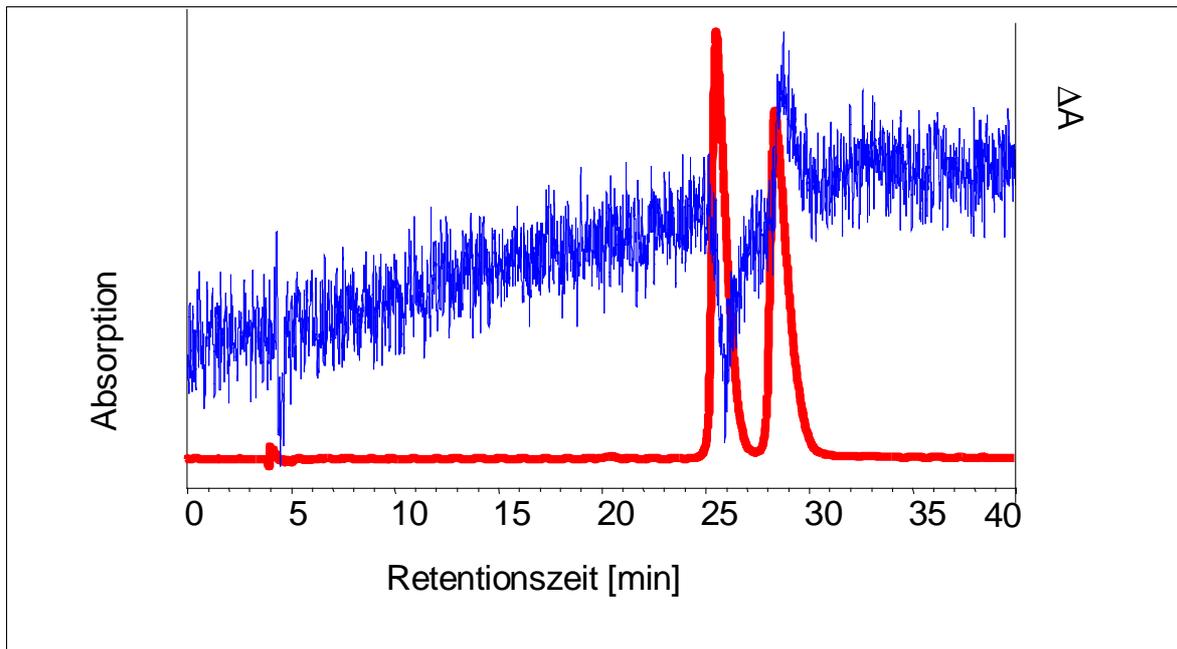


Abb. 2.69.: Trennung von 3,4-MDMA **2**
Cyclobond I 2000[®]; 90-70% $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

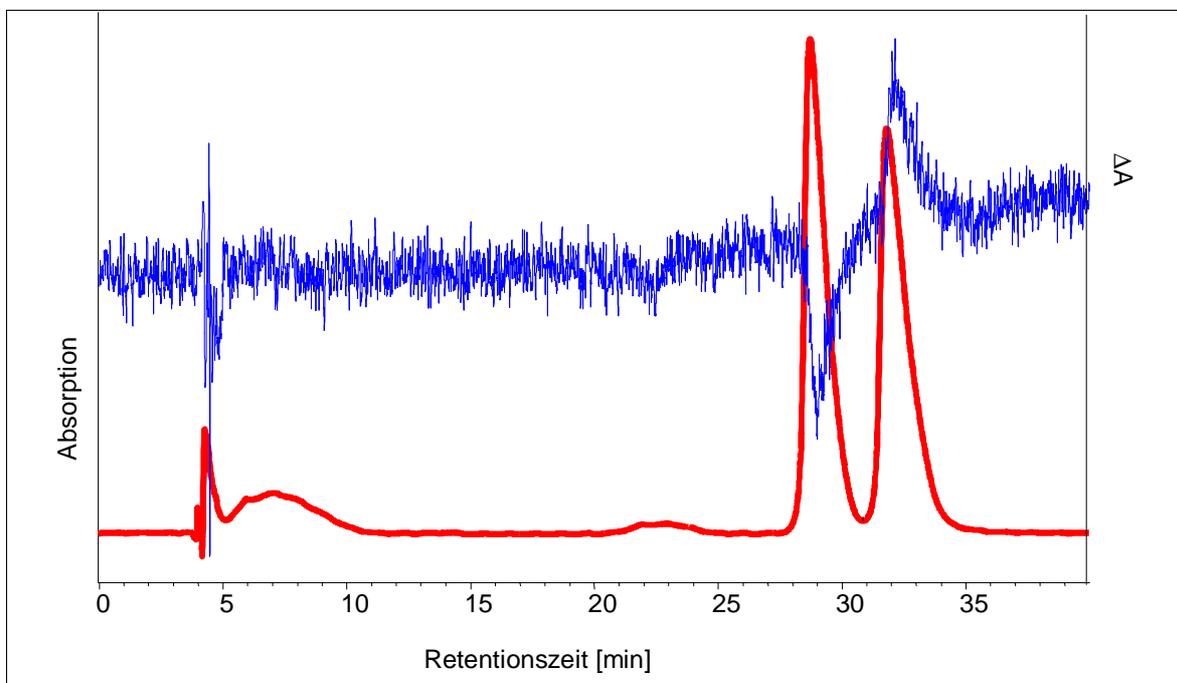


Abb. 2.70.: Trennung von 3,4-MDE **3**
Cyclobond I 2000[®]; 90-70% $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

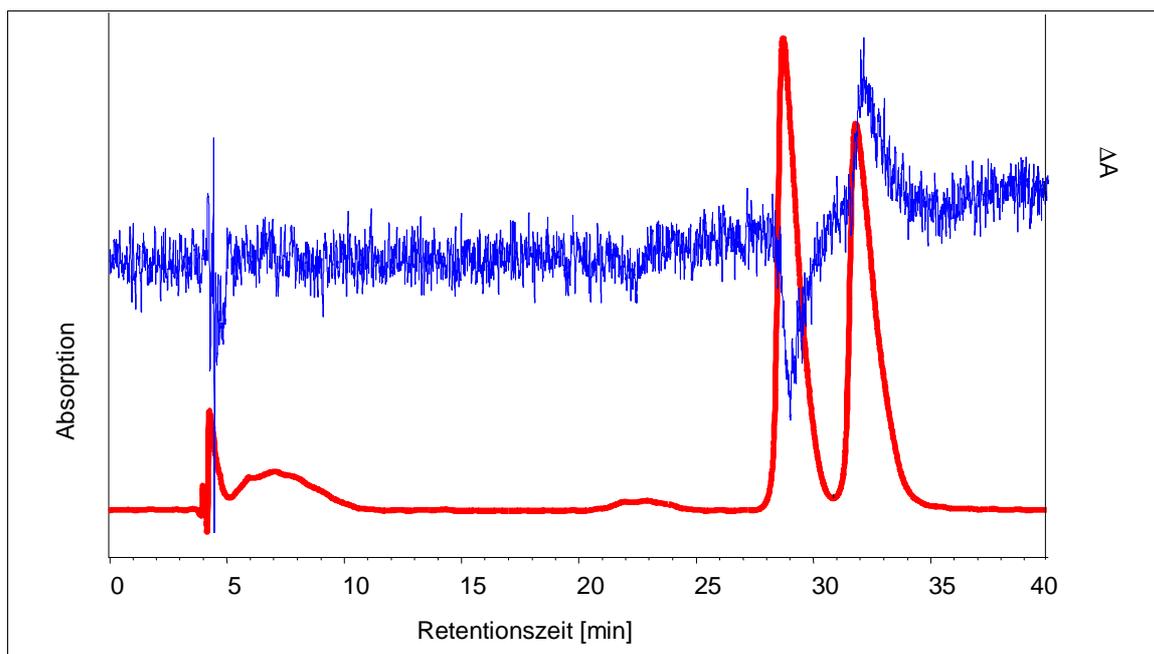


Abb. 2.71.: Trennung von ; N-Propyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **10**
 Cyclobond I 2000[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10% Acetonitril

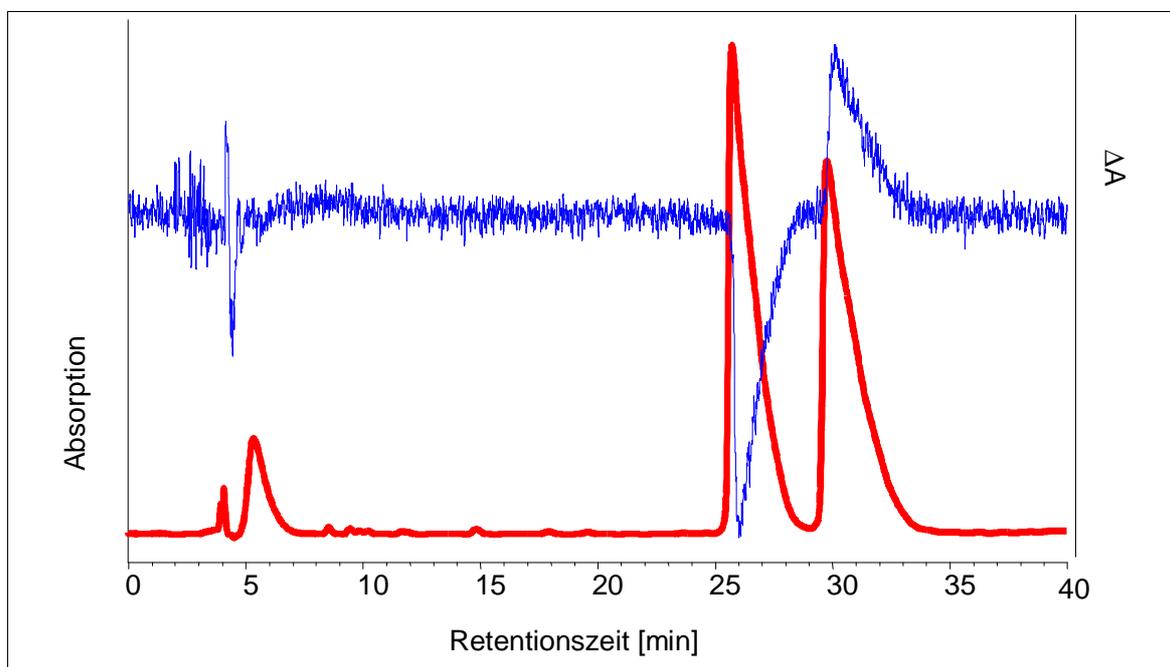


Abb. 2.72.: Trennung von 2-(3,4-Methylenedioxyphenyl)butanamin **22**
 Cyclobond I 2000[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10% Acetonitril

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

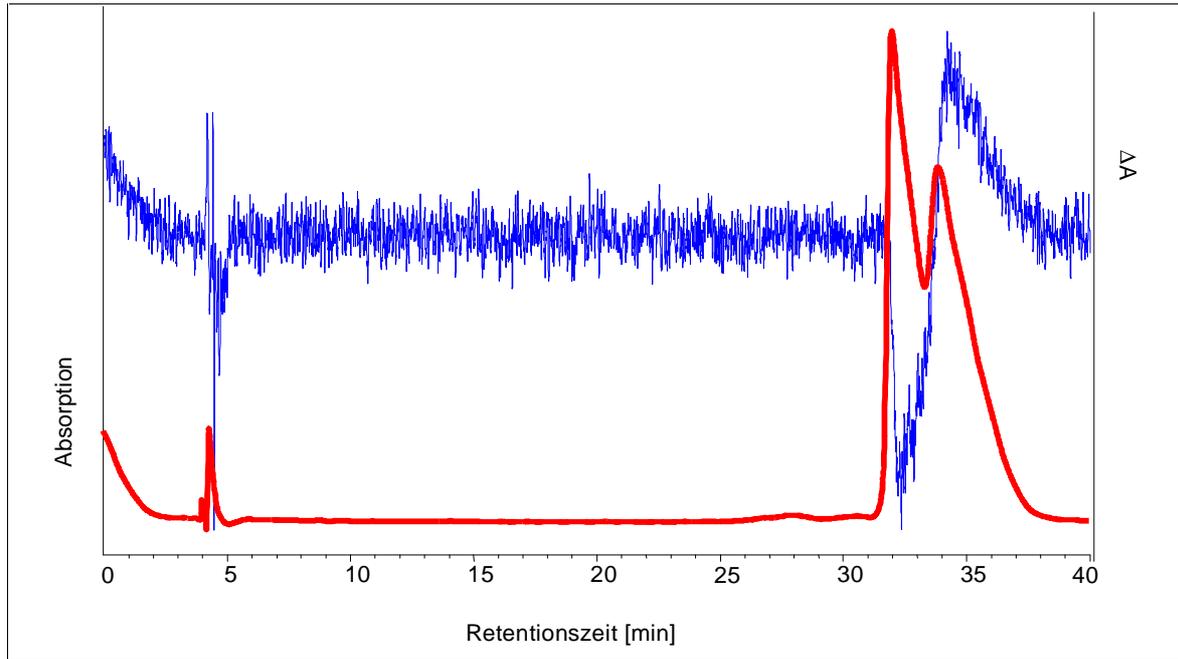


Abb. 2.73.: Trennung von 3,4-MBDB **8**
Cyclobond I 200[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

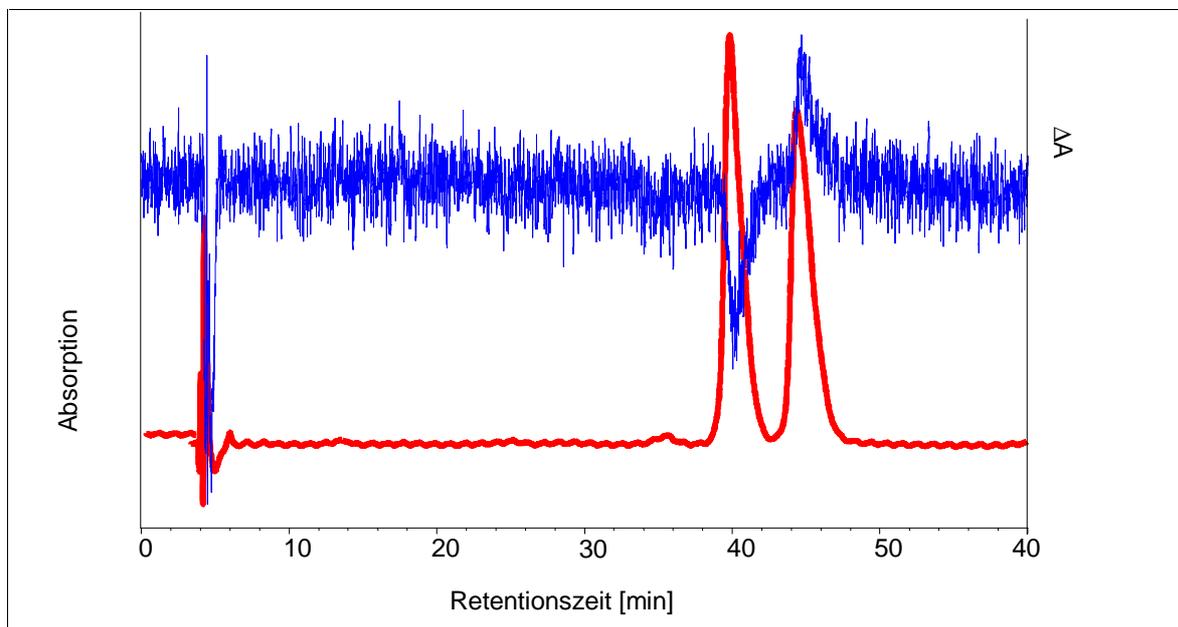


Abb. 2.74.: Trennung von N-Isopropyl-1(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11**
Cyclobond I 200[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

2.2.8.3. Ergebniszusammenfassung

Die abgebildeten Chromatogramme zeigen, daß eine Zuordnung der Enantiomere mit Hilfe des Cirkulardichroismus möglich wird. In Verbindung mit der Kenntnis, daß das S-(+)-Enantiomer des 3,4-MDMA als letzter Peak eluiert, läßt sich postulieren, daß die Elution in der Reihenfolge R-(-)- vor S(+)- Enantiomer bei den Methylenedioxyamphetaminen erfolgt.

Auch chirale Verbindungen, die chromatographisch nicht getrennt werden, können als solche erkannt werden. Die Abbildungen 2.75. und 2.76. zeigen die nicht getrennten Verbindungen 2,3-BDB **14** und 2,3-EBDB **16**; mit der Detektion des Cirkulardichroismus können diese Verbindungen als chiral erkannt werden..

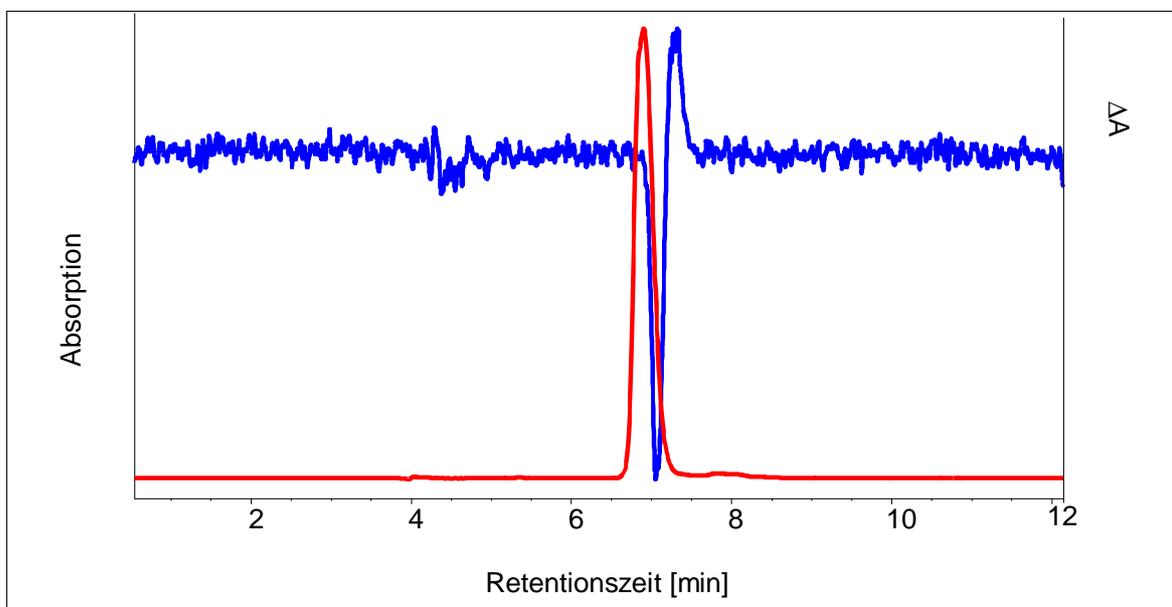


Abb. 2.75.: Trennung von 2,3-BDB **14**
 Cyclobond I 2000[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10% Acetonitril

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

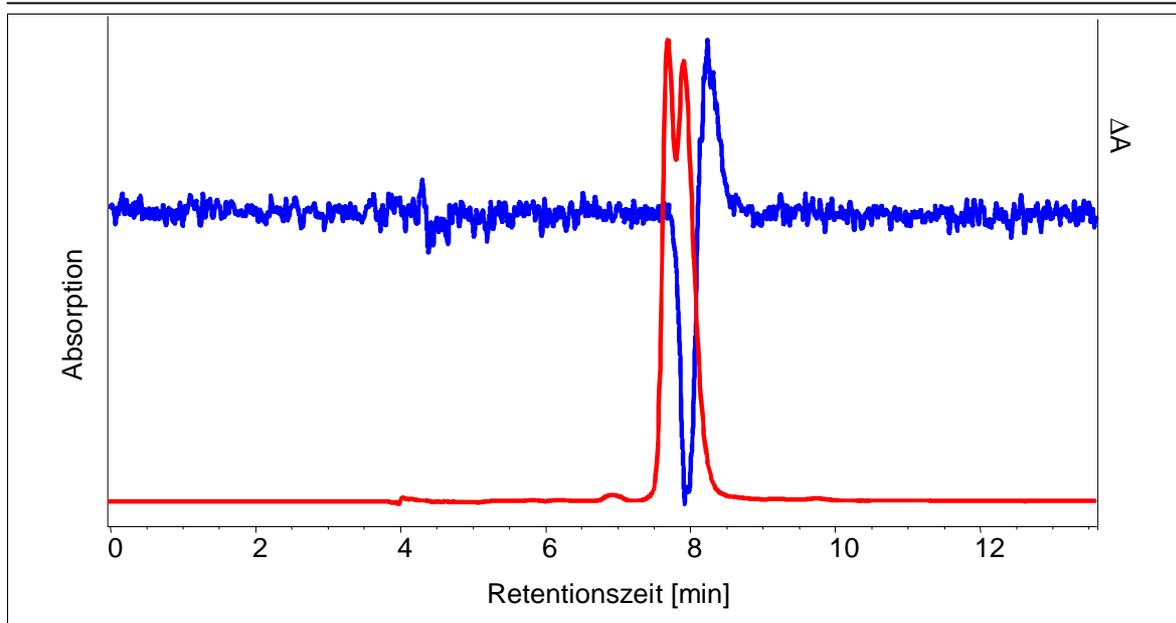


Abb. 2.76.: Trennung von 2,3-EBDB **16**
Cyclobond I 2000[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

Der Cirkulardichroismus kann folglich eine weitere zusätzliche wichtige Informationsquelle für neue Substanzen sein. Da die Kopplung mit der HPLC kein Problem darstellt, könnte der Detektor bei entsprechenden Fragestellungen schnell zusätzlich eingebaut werden.

Weitere Hinweise hinsichtlich der Konfiguration der Moleküle können hier nicht getroffen werden, da die spezielle Software zur Berechnung nicht vorlag.

2.3. POLYMER GEBUNDENE β -CYCLODEXTRIN - CSP

Eine polymer gebundene β -Cyclodextrin-CSP ist von der Firma Showa Denko im Handel [103]. Es handelt sich dabei um eine an Polymethacrylat gebundene

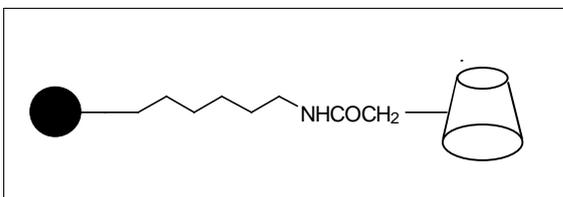


Abb. 2.77.: Bindung von β -Cyclodextrin an der polymeren Matrix

Phase [104] (Abbildung 2.77.). Diese Phase hat einen pH-Arbeitsbereich von 3-10 [103]. Der Vorteil dieser Phase liegt also in der Verwendbarkeit von alkalischen Puffern zur Trennung.

2.3.1. Natriumacetatpuffer

Mit einem leicht alkalischen Fließmittel Natriumacetat 0,005M pH 8,0 ist eine Trennung der Verbindungen versucht worden. Keine der Verbindung ließ sich trennen oder antrennen.

Da nicht einmal eine Antrennung beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, daß auch bei noch stärker alkalischer Lösungen keine Trennungen eintreten werden. Umgekehrt läßt sich postulieren, daß ein saures Fließmittel für die Trennung von Amphetamin-Derivaten an β -Cyclodextrinphasen notwendig ist, denn auch an dieser polymer gebundenen Phase konnten mit dem Puffer 2 eine enantioselektive Trennung beobachtet werden (Kapitel 2.3.2.).

2.3.2. Phosphatpuffer

Der Phosphatpuffer (Puffer 3) ist als Fließmittel wie oben beschrieben eingesetzt worden. Jedoch ist mit 2% Methanol gearbeitet worden, da mit dieser Zusammensetzung die besten Ergebnisse erzielt wurden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDA)

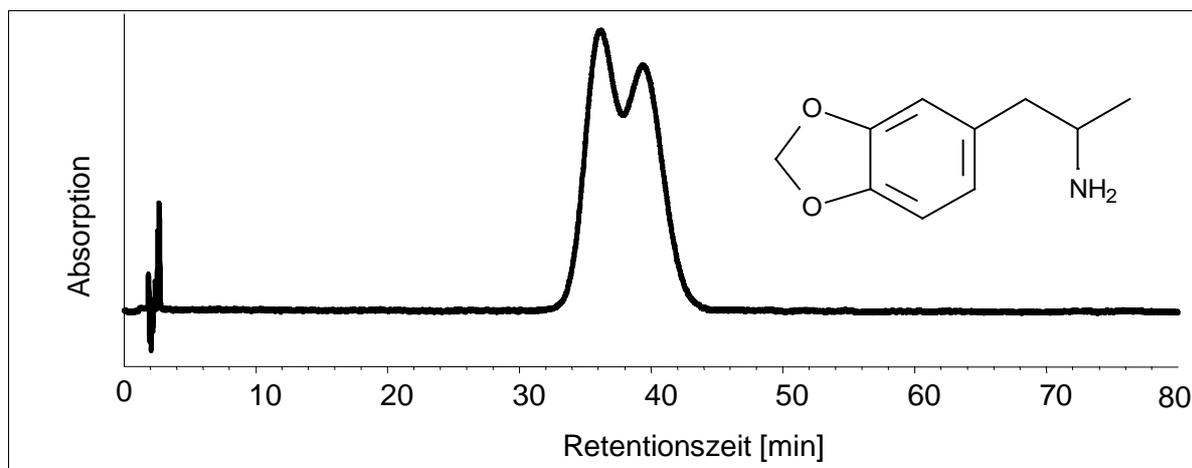


Abb. 2.78.: Trennung von 3,4-MDA 1
Shodex CDB-435-HQ[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
2% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
36,206	39,331	0,86	0,69	3,07	3,18	771	845	0,59	1,09

Tab. 2.76.: Chromatographische Parameter für die Trennung von 1

1-N-Methyl (3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDMA)

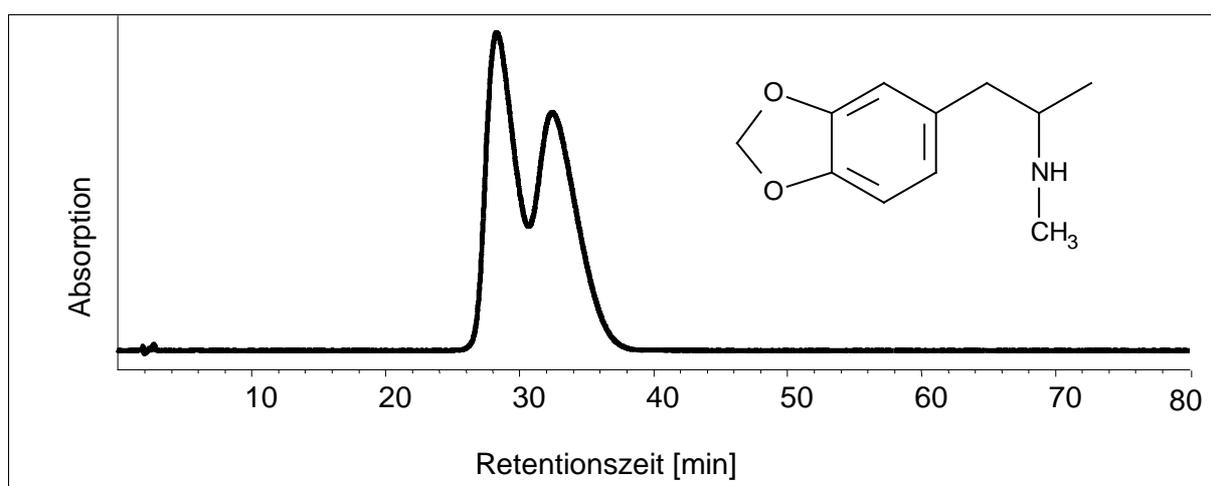


Abb. 2.79.: Trennung von 3,4-MDMA 2
Shodex CDB-435-HQ[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
2% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
28,28	32,41	0,55	0,59	2,62	3,76	645	412	0,76	1,15

Tab. 2.77.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **2**

1-N-Ethyl (3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin (3,4-MDE)

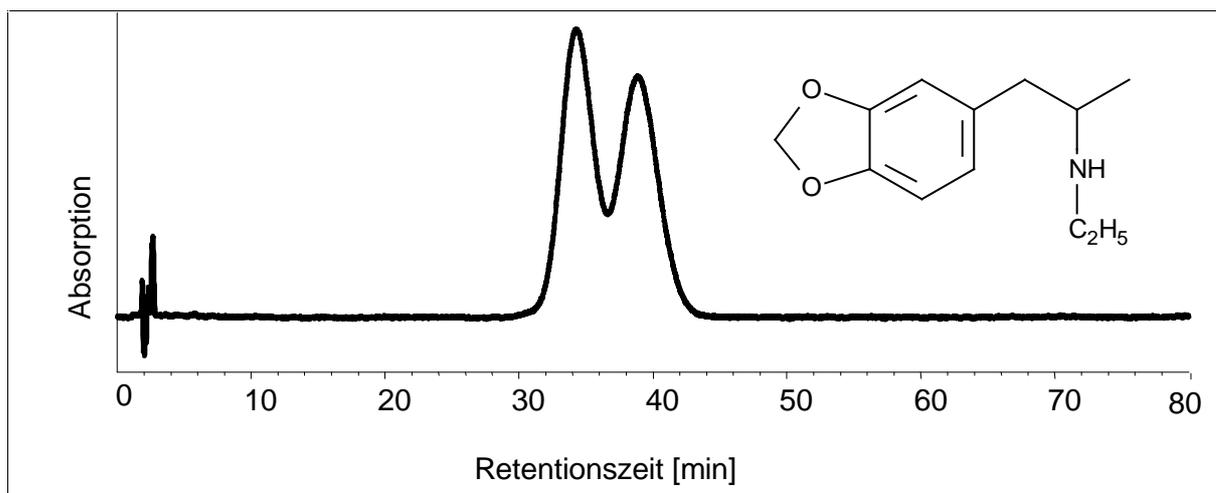


Abb. 2.80.: Trennung von 3,4-MDE **3**

Shodex CDB-435-HQ[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 / 2% Methanol

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
34,30	38,82	0,90	0,82	2,85	3,41	804	719	0,85	1,13

Tab. 2.78.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **3**

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.2.3. Ergebniszusammenfassung

Der Einsatz einer polymer gebundenen β -Cyclodextrin CSP mit leicht alkalischem Fließmittel ergab keine Trennung oder Antrennung der untersuchten Verbindungen. Dagegen konnte mit dem Puffer 2, der bei den auf Kieselgel immobilisierten β -Cyclodextrin CSP erfolgreich eingesetzt werden konnte, enantioselektive Effekte beobachtet werden. Die Trennungen sind jedoch im Vergleich wesentlich schlechter (Tabelle 2.79.). Daß Trennungen auf diesen Phasen schlechter sind, ist bekannt [103].

Substanz	Trennung mit polymer gebundener β -Cyclodextrin CSP*	Trennung mit an Kieselgel gebundener β -Cyclodextrin CSP**
1	0,59	1,09
2	0,76	1,78
3	0,85	1,58

Tab. 2.79.: Auflösung R der an einer polymer und einer an Kieselgel gebundenen β -Cyclodextrin CSP mit Puffer 2

*2% Methanol

**10% Methanol

Das Ausbleiben einer enantioselektiven chromatographischen Trennung im alkalischen Milieu läßt den Schluß zu, daß für die Trennungen an β -Cyclodextrin für die hier untersuchten Verbindungen ein saures bzw. neutrales Fließmittel eine notwendige Bedingung darstellt.

2.4. MODIFIZIERTE β -CYCLODEXTRIN - CSP

Zahlreiche derivatisierte β -Cyclodextrinphasen sind z. B. von der Firma Astec verfügbar [105] (Abbildung 2.81.).

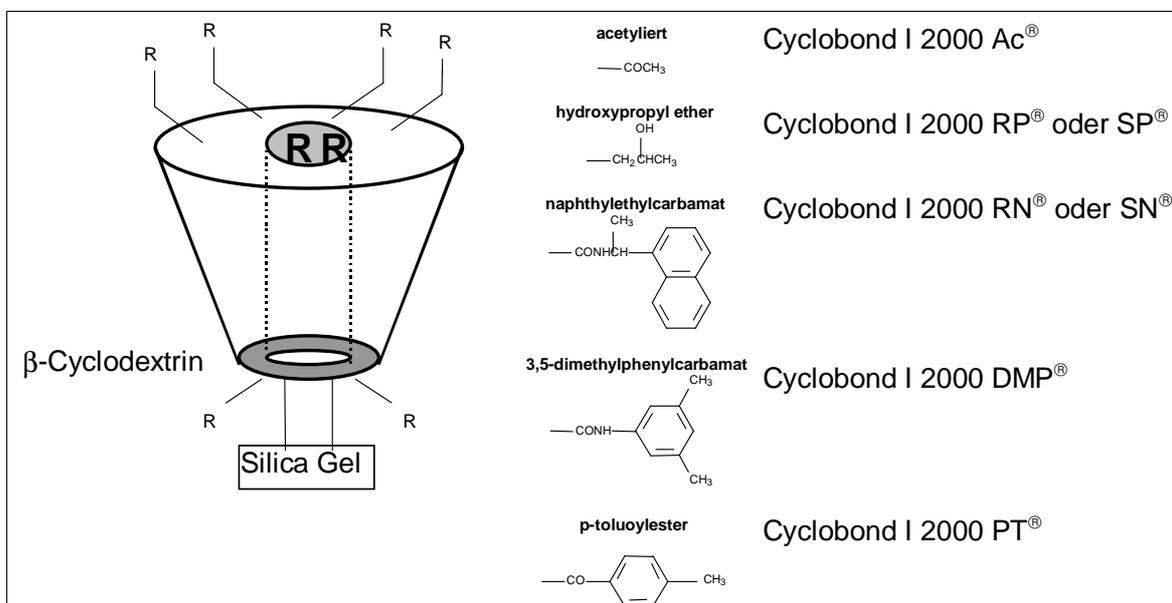


Abb. 2.81.: Derivate des β -Cyclodextrin als CSP

Sofern mit chiralen Resten derivatisiert worden ist, sind beide möglichen Konfigurationen verfügbar (Cyclobond I 2000[®] RP, SP und RN und SN). Der Einsatz dieser Phasen ist dann sinnvoll, wenn Reinheitsprüfungen von Enantiomeren durchgeführt werden müssen. Die Minorkomponente muß dabei vor dem Hauptenantiomer eluieren, damit eine sachgemäße Quantifizierung bei der Reinheitsprüfung erfolgen kann. Bei Phasen, die in verschiedenen Konfigurationen vorliegen, sollten sich die Elutionsreihenfolgen bei einem Wechsel umdrehen.

Die derivatisierten β -Cyclodextrin - Phasen Cyclobond I 2000 Ac[®] und Cyclobond I 2000 SN[®] sind im folgenden verwendet worden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.4.1. Acetylderivat des β -Cyclodextrin

1-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-propanamin (3,4-MDA)

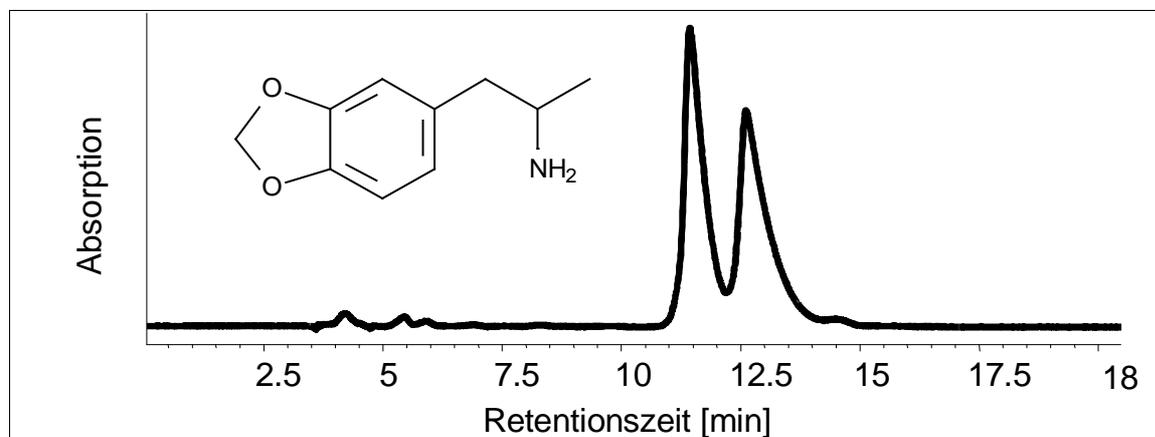


Abb.2.82.: Trennung von 3,4-MDA **1**
Cyclobond I 2000 Ac[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
11,42	12,60	0,46	0,39	0,43	0,59	3972	2557	1,37	1,10

Tab. 2.80.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **1**

Die acetylierte Phase ist offensichtlich für die Enantiomere des 3,4-MDA sehr spezifisch. Die Trennung ist mit einem guten R-Wert (Tabelle 2.80.) schon nach 15 Minuten beendet. Leider konnten nur wenige Verbindungen getrennt werden. 2,3-BDB **14** wurde nicht getrennt, jedoch wird die Verbindung unter diesen Bedingungen retiniert. Der bei 17 Minuten erscheinende Peak weist eine geringe Antrennung, ersichtlich aus der Peakform, auf. Bei 2,3-EBDB **16** konnte ebenfalls bei 25 Minuten eine leichte Peakdeformation beobachtet werden. Verbindungen, die nicht getrennt sind, erscheinen erfahrungsgemäß in unmittelbarer Nähe des Injektionspeaks. Die sehr geringen Effekte für 2,3-BDB und 2,3-EBDB deuten auf eine Selektivität der Phase für diese Verbindungen hin.

N,N-Dimethyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin (2,3-MMBDB)

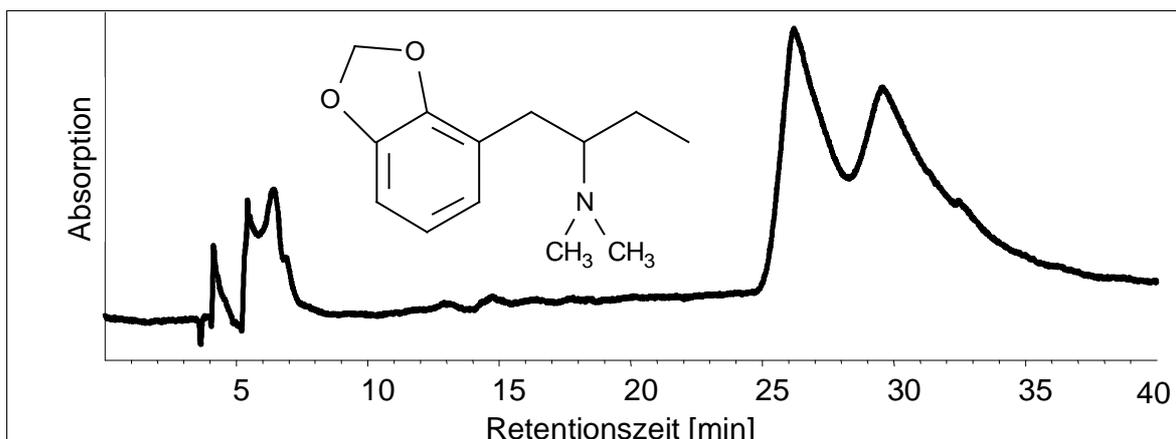


Abb. 2.83.: Trennung von 2,3-MMBDB **18**
 Cyclobond I 2000 Ac[®]; 90% KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,1M + 1% TEA pH 6,5 /
 10% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
26,20	29,57	0,42	0,36	2,12	2,39	846	423	0,72	1,13

Tab. 2.81.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **18**

Das starke Tailing dieser Trennung von 2,3-MMBDB (Tab. 2.83.), die Tatsache, daß keines der vorhergehenden Trennsysteme eine Enantiomerendiskriminierung dieser Substanz erlaubten und keine weiteren Trennungen zeigen die veränderten Verhältnisse für diese stationäre Phase. Die Acetylierung der Hydroxyfunktionen des β-Cyclodextrin haben die Kavität derartig verändert, daß die zuvor mit diesem Fließmittel getrennten Verbindungen nun nicht mehr getrennt werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.4.2. Naphthylethylcarbamatderivat des β -Cyclodextrin

Mit verschiedenen Fließmitteln konnten nachfolgende Verbindungen getrennt werden.

N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

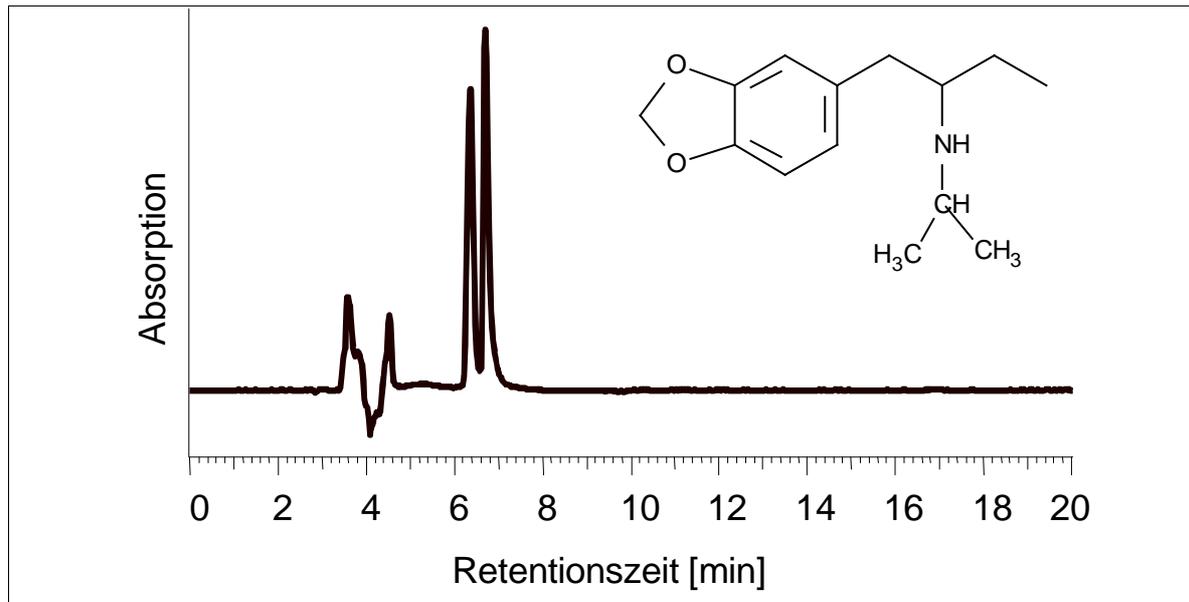


Abb. 2.84.: Trennung von N-Isopropyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **11** Cyclobond I 2000[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5 / 20% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
6,36	6,70	12950	23993	1,73	0,39

Tab. 2.82.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **11**

N-Hydroxy-N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

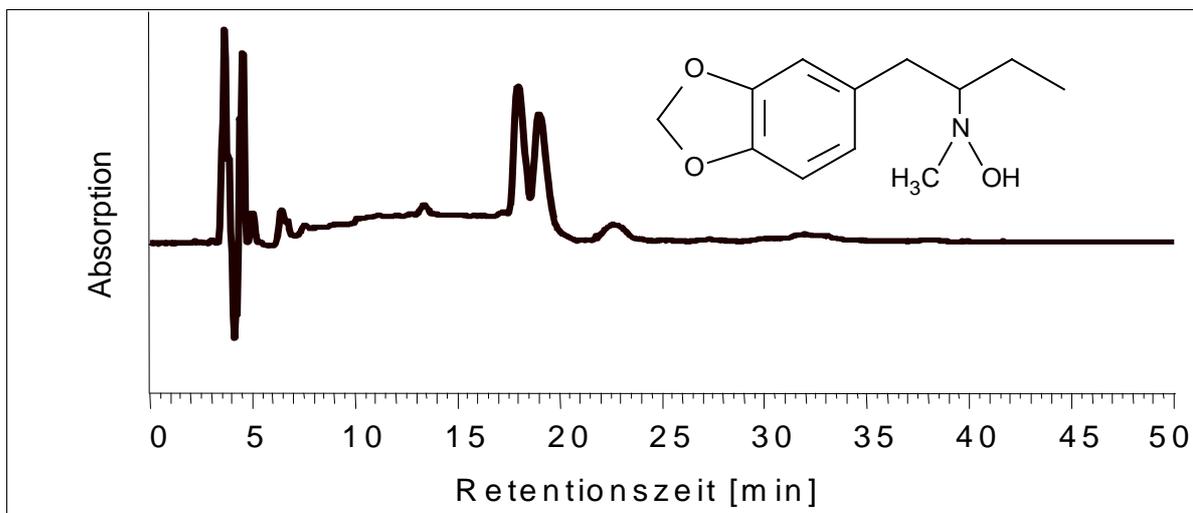


Abb. 2.85.: Trennung von N-Hydroxy-N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **13**; Cyclobond I 2000 SN[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5 / 20% Acetonitril

Retentionszeit [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
17,96	19,01	7100	5529	1,12	1,06

Tab. 2.83.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **13**

N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin

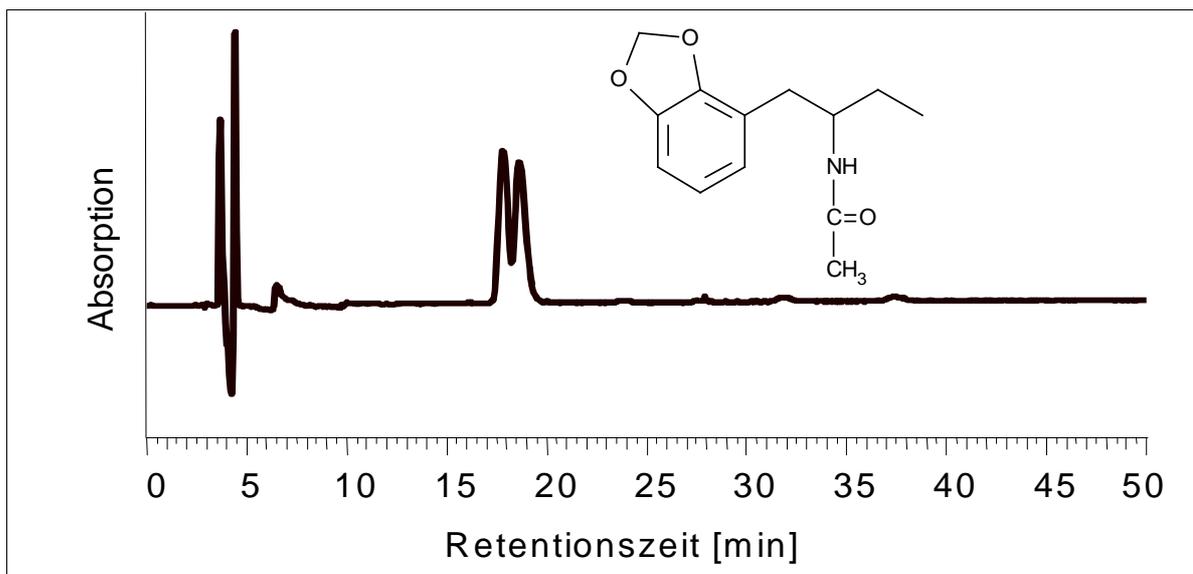


Abb. 2.86.: Trennung von N-Acetyl-1-(2,3-methylenedioxyphenyl)-2-butanamin **17** Cyclobond I 2000 SN[®]; NaH₂PO₄ 0,025M + Tetrabutylammoniumphosphat pH 3,5 / 20% Acetonitril

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Retentionszeit [min]		Bodenzahl		R	α
Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
17,88	18,65	6385	5243	0,80	1,05

Tab. 2.84.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **17**

2-(Methylamino)-propiophenon (Methcathinon)

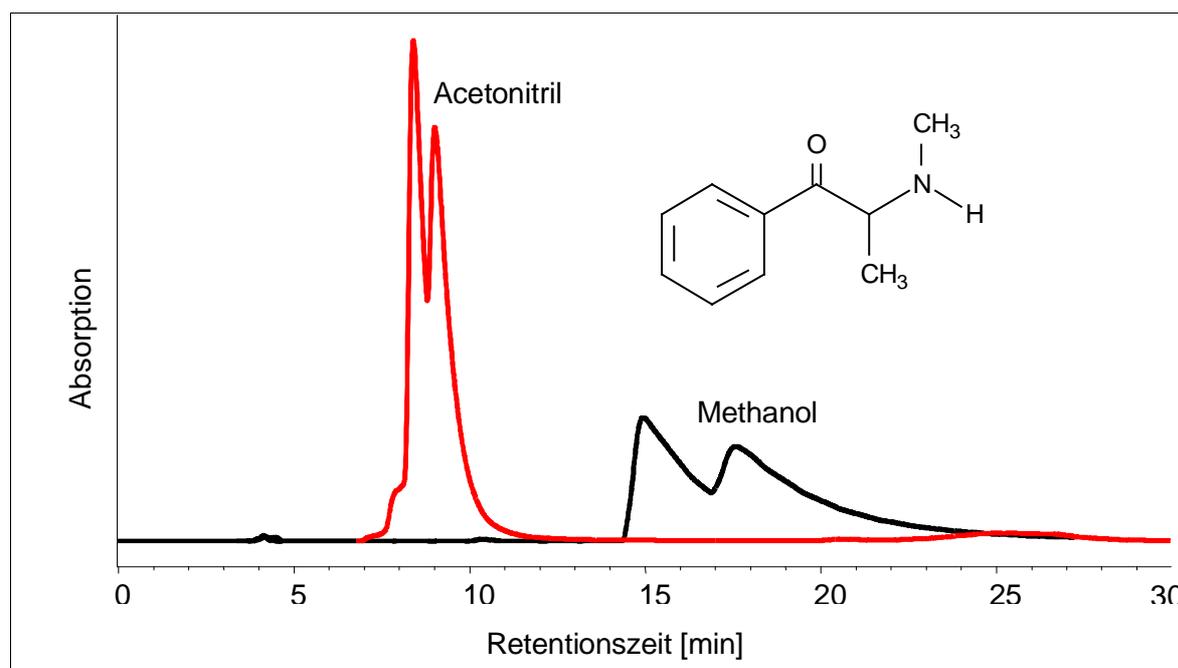


Abb. 2.87.: Trennung von Methcathinon **34**

Cyclobond I 2000 SN[®]; 90% NH₄Ac 0,1M + pH 7,0 /
10% Acetonitril bzw. Methanol

Modifier	Retentionszeit [min]		Symmetrie		Peakbreite bei halber Höhe [min]		Bodenzahl		R	α
	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2	Peak 1	Peak 2		
	Acetonitril	8,39	9,00	0,63	0,31	1,21	0,63	267		
Methanol	14,94	17,57	0,24	0,20	1,74	2,66	408	243	0,70	1,18

Tab. 2.85.: Chromatographische Parameter für die Trennung von **34**

Anschaulich ist auch bei dieser Trennung wieder der Einfluß des Modifiers zu erkennen. Die Enantiomertrennung mit Acetonitril ist auch mit dieser Phase durch annähernd symmetrische Peaks und kürzere Retentionszeit

gekennzeichnet. Durch Injektion des R-(+)-Enantiomers ist die Elutionsreihenfolge der Enantiomere bekannt. Der zuerst eluierte Peak ist das R-(+)-Enantiomer von Methcathinon.

2.4.3. Permethylierte β -Cyclodextrin - CSP

Eine Trennung an der permethylierten β -Cyclodextrinphase Nucleodex β -PM[®] konnte nicht erreicht werden.

2.4.4. Ergebniszusammenfassung

Die Trennungen an derivatisierten β -Cyclodextrinphasen hat in nur wenigen Fällen funktioniert. Wenn jedoch eine Enantiomerentrennung eingetreten ist, dann sind die Verbindungen innerhalb kurzer Zeit getrennt worden. Die Tatsache, daß einige Verbindungen nicht getrennt werden, jedoch auf der CSP reteniert werden und eine Peakdeformation in Richtung Antrennung aufweisen, zeigt, daß die Phase für eine Enantiomerentrennung geeignet sein könnte. Antrennungen konnten mit den Verbindungen **9**, **16**, und **22** erreicht werden.

Die vollkommen unterschiedlichen Eigenschaften dieser derivatisierten Phasen zeigen, daß sich die Polaritäten geändert haben. Damit sind die Wechselwirkungen des Analyten mit der CSP unterschiedlich, und natürlich gelangen andere Enantiomere in die Kavität der β -Cyclodextrinphase.

Um eine Basislinientrennung zu erreichen, sollte mit anderen Fließmitteln, die den Polaritäten dieser Phase entsprechend, gearbeitet werden.

2.5. α -CYCLODEXTRIN UND MODIFIZIERTE PHASEN

Eine Trennung an einer α -Cyclodextrinphase (Cyclobond III[®]) konnte nicht erreicht werden.

Auch die permethylierte α -Cyclodextrinphase Nucleodex α -PM[®] führte zu keiner Trennung.

2.6. γ -CYCLODEXTRIN UND MODIFIZIERTE PHASEN

Eine Trennung an γ -Cyclodextrinphasen (Cyclobond II[®] und Chiradex GAMMA[®]) und der polymer gebundene ODC-435 HQ[®] konnte nicht erreicht werden.

Auch die permethylierte γ -Cyclodextrinphase Nucleodex α -PM[®] führte zu keiner Trennung.

2.7. $^1\text{H-NMR}$ – UNTERSUCHUNGEN

Anhand von $^1\text{H-NMR}$ – Untersuchungen können die Einlagerungen von Substanzen in die Cyclodextrin – Kavität, auch im wässrigen System, beobachtet werden [106, 107]. Die Unterscheidung von Enantiomeren anhand von $^1\text{H-NMR}$ – Spektren ist beschrieben worden [108]. Unterschiede zwischen α -, β - und γ -Cyclodextrine sind beobachtet worden [109]. Die chemische Verschiebung der Signale ist bei den untersuchten Verbindungen unterschiedlich ausgeprägt.

2.7.1. $^1\text{H-NMR}$ in D_2O

Mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ sollte versucht werden, eine Korrelation zwischen der HPLC– Trennung und der Einschlußkomplexierung in die Cyclodextrinkavität herzustellen. Zu diesem Zweck sind einige der Verbindungen in Form ihrer Hydrochloride in D_2O $^1\text{H-NMR}$ - spektroskopisch mit Unterdrückung des Lösungsmittelsignales untersucht worden. Die Zumischungen der Cyclodextrine erfolgte im Verhältnis 1:1. Als gut beobachtbar stellten sich die diastereotopen Protonen der Methylendioxygruppe $\delta=5,9\text{ppm}$ heraus. Abbildung 2.88. zeigt das $^1\text{H-NMR}$ – Spektrum von 3,4-BDB mit der Ausschnittsvergrößerung der Methylendioxyregion.

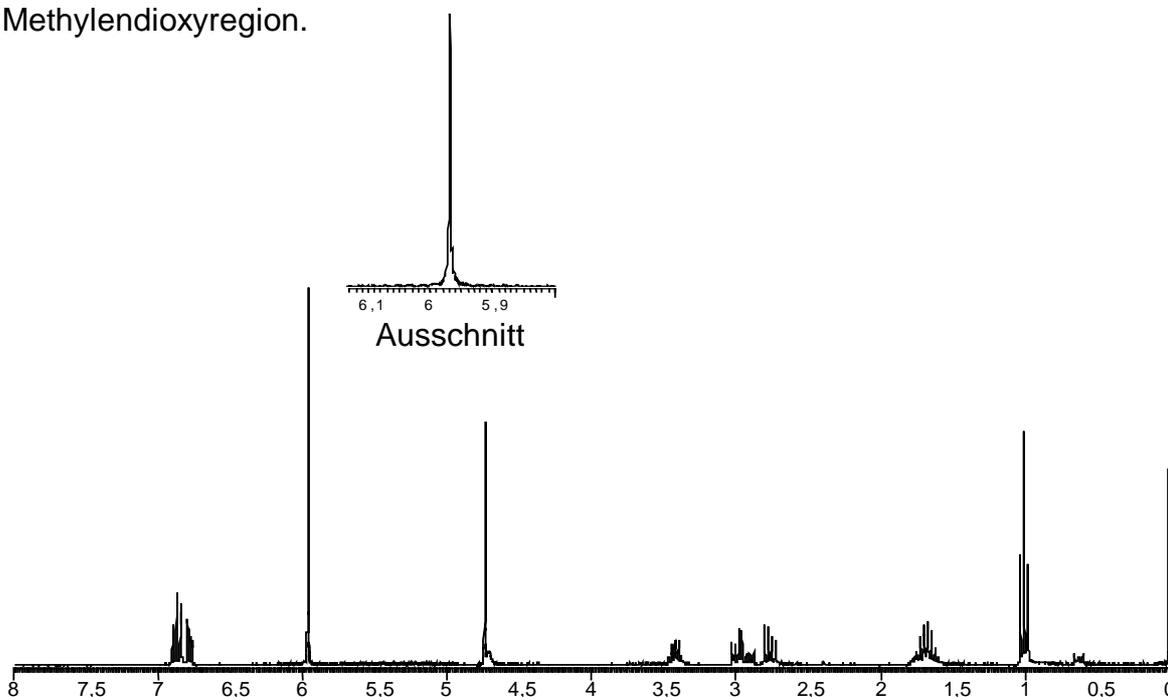


Abb. 2.88.: Ausschnitt aus $^1\text{H-NMR}$ – Spektrum von 3,4-BDB-HCl in D_2O

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Abbildung 2.89. zeigt das $^1\text{H-NMR}$ – Spektrum von 3,4-BDB-HCl mit β -Cyclodextrin.

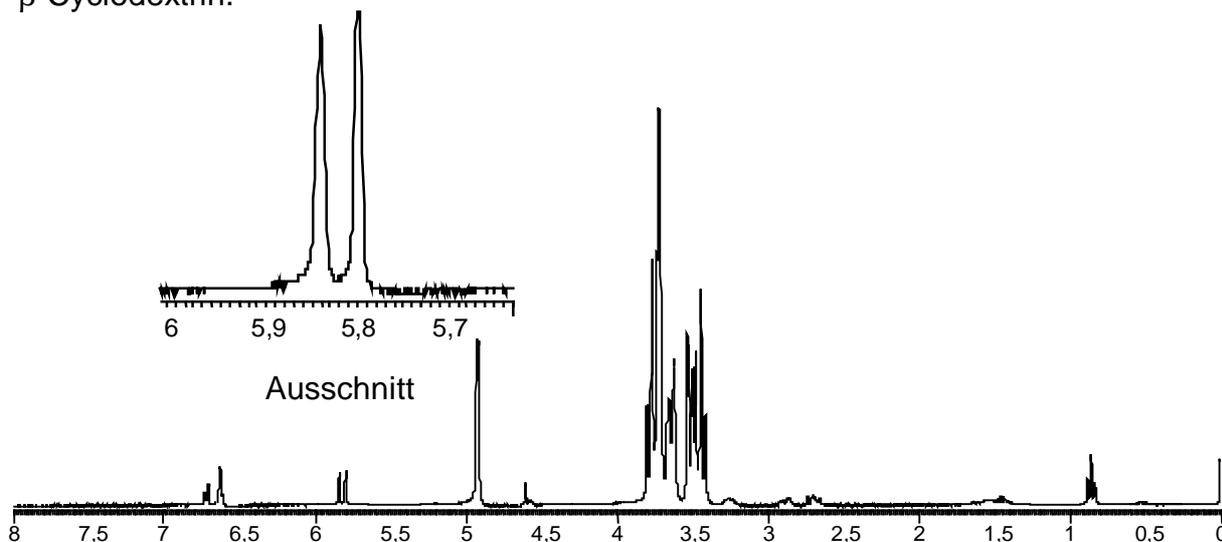


Abb. 2.89.: Ausschnitt aus $^1\text{H-NMR}$ – Spektrum von 0,5mg 3,4-BDB-HCl mit 0,5mg β -Cyclodextrin in D_2O

Die diastereotopen Protonen der 3,4-Methylenedioxygruppe erscheinen in Gegenwart der chiralen Umgebung als Dublett. In Gegenwart von α - oder γ -Cyclodextrin ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Aus der Tatsache heraus, daß ein Dublett beobachtet wird und daß bei α - und γ -Cyclodextrin keine Aufspaltungen der Methylenedioxyprotonen zu beobachten sind, darf geschlossen werden, daß das Molekül mit seiner aromatischen Seite in die Kavität des β -Cyclodextrin gelangt (Abbildung 2.90.).

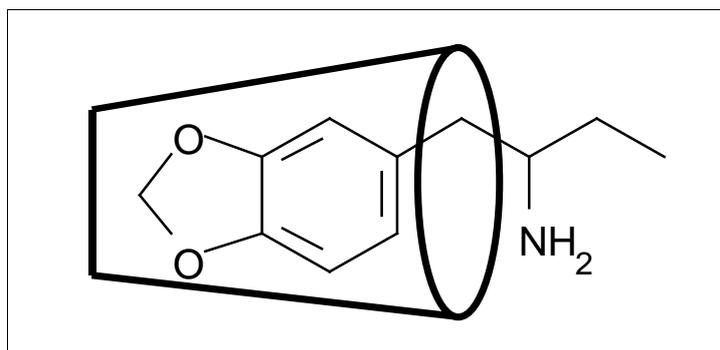


Abb. 2.90.: Einschluß von 3,4-BDB in die β -Cyclodextrinkavität

Tabelle 2.86. zeigt die $^1\text{H-NMR}$ – spektroskopisch untersuchten Methylenedioxyderivate mit Dublett-Bildung (Spalte 1) in Korrelation mit den HPLC-Trennungen (Spalte 2).

Verbindung	Dublett der 3,4-Methylenedioxyprotonen	HPLC-Trennung an Cyclodextrin CSP
3,4-BDB + α -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-BDB + β -Cyclodextrin	ja	ja
3,4-BDB + γ -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-MBDB + α -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-MBDB + β -Cyclodextrin	ja	ja
3,4-MBDB + γ -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-EBDB + α -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-EBDB + β -Cyclodextrin	ja	ja
3,4-EBDB + γ -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-MDMA + α -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-MDMA + β -Cyclodextrin	ja	ja
3,4-MDMA + γ -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-MDE + α -Cyclodextrin	nein	nein
3,4-MDE + β -Cyclodextrin	ja	ja
3,4-MDE + γ -Cyclodextrin	nein	nein
2,3-MDE + β -Cyclodextrin	nein	nein

Tab. 2.86.: $^1\text{H-NMR}$ untersuchte Verbindungen mit α -, β - oder γ -Cyclodextrin

2.7.2. Ergebniszusammenfassung

Die Einlagerung der Methylenedioxy – Verbindung in die β -Cyclodextrinkavität kann beobachtet werden. Die Aufspaltung der diastereotopen Protonen an der 3,4-Methylenedioxy – Gruppe kann nur mit dem Cyclodextrinen beobachtet werden, welches auch eine HPLC – Trennung hervorruft. Folglich kann die $^1\text{H-NMR}$ –

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Untersuchung dazu dienen, eine geeignete CSP für die HPLC zu finden. Denn wenn eine Einlagerung der zu untersuchenden Verbindung in die Cyclodextrinkavität über ein $^1\text{H-NMR}$ – Experiment durch Zumischen des Cyclodextrins zu der Probe beobachtet werden kann, so ist eine Trennung auf einer entsprechenden HPLC-Säule sehr wahrscheinlich (Tabelle 2.86.). Ein solches Experiment hat ebenfalls den Vorteil, daß es einfacher und kostengünstiger durchzuführen ist.

2.8. GC/MS - UNTERSUCHUNGEN

Eines der am häufigsten verwendeten Verfahren, die Enantiomere von 3,4-Methylenedioxyamphetaminen zu trennen, ist die Bildung von Diastereomeren mit anschließender massenselektiver Detektion [30, 110, 111, 112, 113]. Dabei werden S-(-)-N-(Trifluoroacetyl)-L-prolylchlorid [30, 110, 111, 112] und N-Heptafluorobutyl-(S)-prolylchlorid [113] als Derivatisierungsreagenzien benutzt. Als Ionisierungsverfahren ist in den genannten Arbeiten meistens die Elektronenstoß - Ionisierung (EI) zum Einsatz gekommen [30, 110, 111, 112]. Die positive chemische Ionisierung (PCI) ist bei de Boer et al. [113] mit N-Hepta-fluorobutyl-(S)-prolylchlorid beschrieben.

2.8.1. PCI – Technik

Bei der PCI mit Methan als Reaktandgas handelt es sich um eine sogenannte „weiche“ Ionisierung, das heißt dass intensive Peaks von protonierten Molekülen vorherrschen. Aus diesem Grunde wird die Methode auch zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen. Methan ist das am häufigsten verwendete Reaktandgas. Es werden weiterhin Propan, Isobutan oder Ammoniak als Reaktanden verwendet. Nach Elektronenstoß mit Methan kommt es zunächst zu Methanradikalkationen, die mit Methan protoniertes Methan bilden. Die weiteren Reaktionen sind in Abbildung 2.91. dargestellt

Als charakteristische Peaks sind in PCI – Massenspektren häufig die Addukte des Moleküls mit protonierten Ethylen (C_2H_5^+ : $m/z=29$) und Propadien (C_3H_5^+ : $m/z=41$) zu beobachten. Die gebildeten CH_5^+ -Kationen reagieren als starke Säuren mit

dem Probenmolekül. Die Ionisierung des Probenmoleküls erfolgt dann durch Protonentransfer (Abbildung 2.92.).

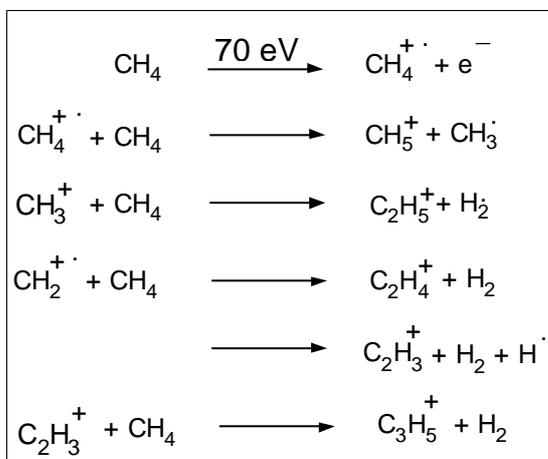


Abb. 2.91.: Reaktionen nach Elektronenstoß
Mit dem Reaktandgas Methan

Neben dem Protonentransfer kann bei der PCI aber auch die Hydridabstraktion $[\text{M-H}]^+$ beobachtet werden (Abbildung 2.93.).



Abb. 2.92.: Ionisierung des Probenmoleküls

2.7.2. Diastereomerenbildung mit S-(-)-N-(Trifluoroacetyl)-L-prolylchlorid

Nach Extraktion der Base mit Natronlauge (4 mol L^{-1}), Ausschütteln mit Dichlormethan und Waschen mit Wasser ist die Verbindung bei Raumtemperatur 15 Minuten mit S-(-)-N-(Trifluoroacetyl)-L-prolylchlorid (TPC), 0,1M umgesetzt worden. Die Diastereomeren wurden direkt für die GC/MS eingesetzt.

Die Verbindungen **1 - 4**, **7 - 11**, **13 - 16**, **19**, **20**, **25**, **28**, **31 - 34** konnten in Form ihrer Diastereomeren getrennt werden. Für die Verbindungen **21** und **22** konnte lediglich eine Antrennung erreicht werden. Die übrigen Verbindungen zeigten keine Reaktion zu den Diastereomerenderivaten oder haben sich möglicherweise im Injektorblock zersetzt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Identifizierung der TPC – Derivate erfolgte anhand des typischen protonierten Molpeaks sowie der Addukte mit protonierten Ethylen (Molmasse + 29) und Propadien (Molmasse + 41). Tabelle 2.87. zeigt die entsprechenden Molmassen sowie die m/z – Werte der Addukte aller getrennten und angetrennten Verbindungen. Alle Massenspektren dieser Verbindungen sind im Anhang abgebildet (Kapitel 5.4.). Verbindung **31** ist mit je zwei Massenpeaks in der Tabelle aufgeführt, da Brom als Isotop mit der Molmasse 79 und 81 in nahezu der gleichen Häufigkeit auftritt. Daher zeigt das Massenspektrum die Isotopenverteilung von Brom auch bei den entsprechenden Peaks der Addukte und Fragmente, sofern sie Brom enthalten.

Substanz	M TPC - Derivat	m/z [M+H] ⁺ - Kation	m/z [M+C ₂ H ₅] ⁺ - Kation	m/z [M+C ₃ H ₅] ⁺ - Kation
1	372	373	401	413
2	386	387	415	427
3	400	401	429	441
4	414	415	443	455
7	386	387	415	427
8	400	401	429	441
9	414	415	443	455
10	428	429	457	469
11	428	429	457	469
14	386	387	415	427
15	400	401	429	441
16	414	415	443	455
19	416	417	445	457
20	416	417	445	457
21	372	373	401	413
22	386	387	415	427
25	400	401	429	441
28	358	359	387	399
31	466/468	467/469	495/497	507/509
32	328	329	357	369
33	342	343	371	383
34	356	357	385	397

Tab. 2.87.: Molmasse und m/z - Werte der Addukte der getrennten Diastereomere

Abbildung 2.94. zeigt das Massenspektrum des 3,4-MDA – TPC – Derivates.

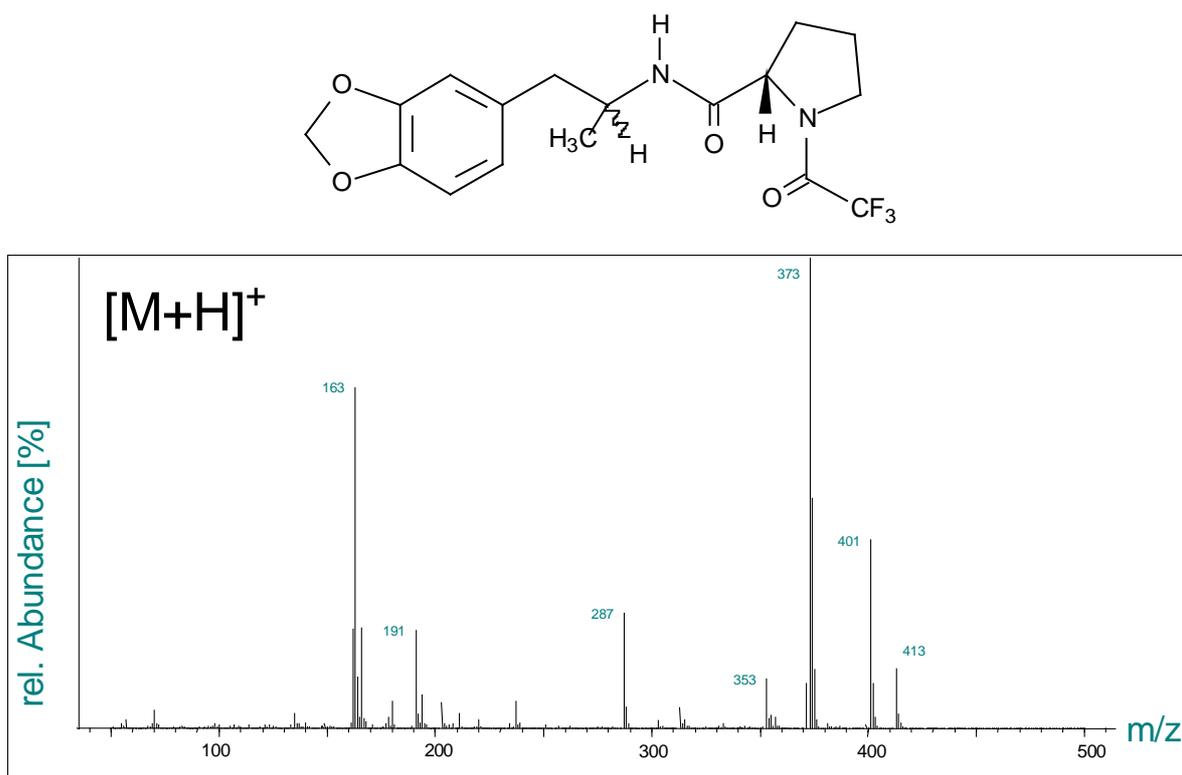
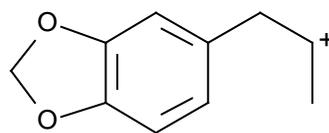


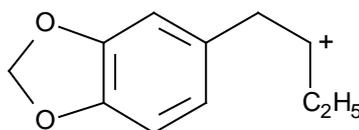
Abb. 2.94.: Cl - Massenspektrum des 3,4-MDA – TPC – Derivates

Einige der Fragmente konnten identifiziert werden. Ausgehend von der Molmasse sind bei allen untersuchten Verbindungen die Ethylen und Propadien – Addukte zu identifizieren. Der Verlust von 20 Masseneinheiten vom protonierten Molpeak aus gesehen ist wahrscheinlich auf den Verlust von HF ($m/z=20$) zurückzuführen. Der Peak mit $m/z=163$ wird aus der homolytischen Spaltung einer C-N – Bindung hervorgegangen sein dessen Fragment diese Masse aufweist.



$m/z=163$

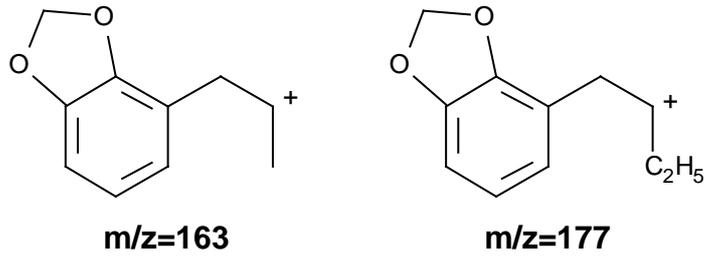
Analog konnte das entsprechende Fragment auch bei den 3,4-Methylen-dioxyverbindungen vom Butanamin – Typ mit $m/z=177$ identifiziert werden.



$m/z=177$

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In den Massenspektren der isomeren 2,3-Derivate können diese Peaks ebenfalls beobachtet werden.



Zur massenspektrometrischen Untersuchung ist auch ein deuteriertes Derivat von 3,4-MDMA, das 3,4-Methylenedioxyamphetamin-d₂-(N-methyl-d₃), gekommen, da diese deuterierte Verbindung in der forensischen Analytik gerne zur Quantifizierung bei massenspektrometrischer Detektion eingesetzt werden. Die m/z-Werte der protonierten Verbindung und der Addukte zeigen erwartungsgemäß eine um 5 Dalton erhöhte Masse.

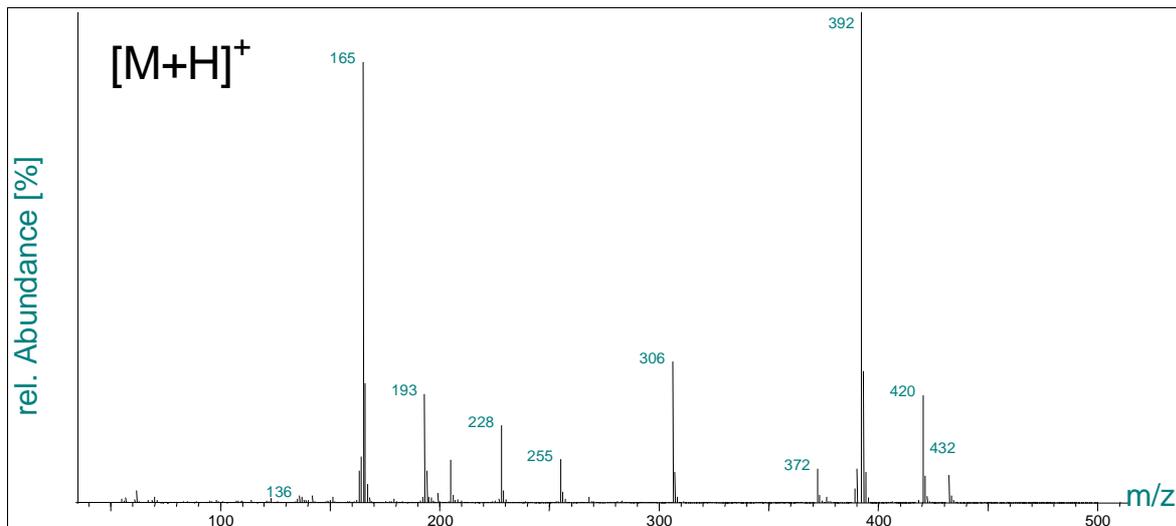


Abb. 2.95.: CI - Massenspektrum des (R,S)-3,4-Methylenedioxyamphetamin-d₂-(N-methyl-d₃)- TPC - Derivates

Zu einigen der übrigen, nicht identifizierten Peaks kann aufgrund der Massenunterschiede zum nicht deuterierten Derivat (Abbildung 2.95.) vermutet werden, aus welchen Molekülteilen diese Fragmente stammen. Obwohl die Lage der Wasserstoffisotope nicht genau bekannt ist, darf aus dem Namen geschlossen werden, daß sich 2 Deuteriumatome im 3,4-Methylen-dioxyamphetamin - Teil und die übrigen 3 im N-Methyl - Teil der Verbindung befinden. Folglich muß das

Fragment mit $m/z=163$ in der deuterierten Verbindung bei $m/z=165$ erscheinen. Dieses ist auch der Fall (Abbildung 2.96.).

Abbildung 2.60. zeigt das Massenspektrum des nicht deuterierten 3,4-MDMA-Derivates.

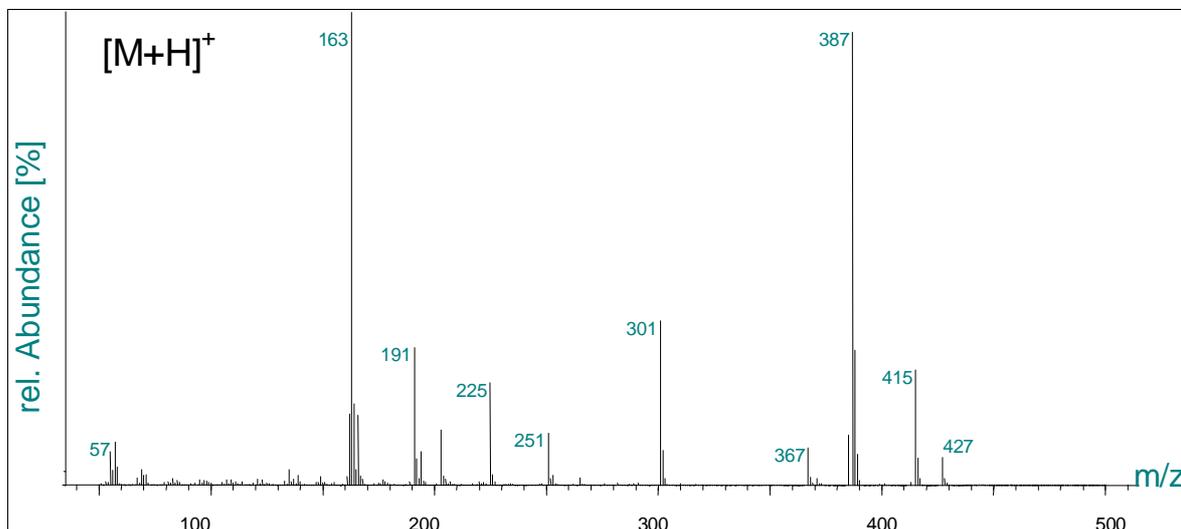


Abb. 2.96.: CI - Massenspektrum des 3,4-MDMA – TPC – Derivates

So sind die Fragmente mit $m/z > 300$ Molekülteilen zuzuordnen, die 3,4-MDMA enthalten, da diese Fragmente in den Spektren der deuterierten, um 5 Dalton erhöht, und dem nicht deuterierten Massenspektrum vorhanden sind.

Sicherheit über die genaue Struktur der Fragmente zwischen $m/z=191$ und $m/z=301$ und dem Mechanismus ihrer Entstehung können weitere Experimente sowie MS/MS – Untersuchungen geben, die zukünftigen Arbeiten vorbehalten sind.

Für 3,4-MDMA konnte die Elutionsreihenfolge der Diastereomerenpaare durch Chromatographie des S-(+)-3,4-MDMA-S-(-)-TPC - Derivates bestimmt werden (Abbildung 2.97.). Vereinfacht wird in Abbildung 2.97. das Diastereomerderivat als S-(+)-3,4-MDMA bezeichnet.

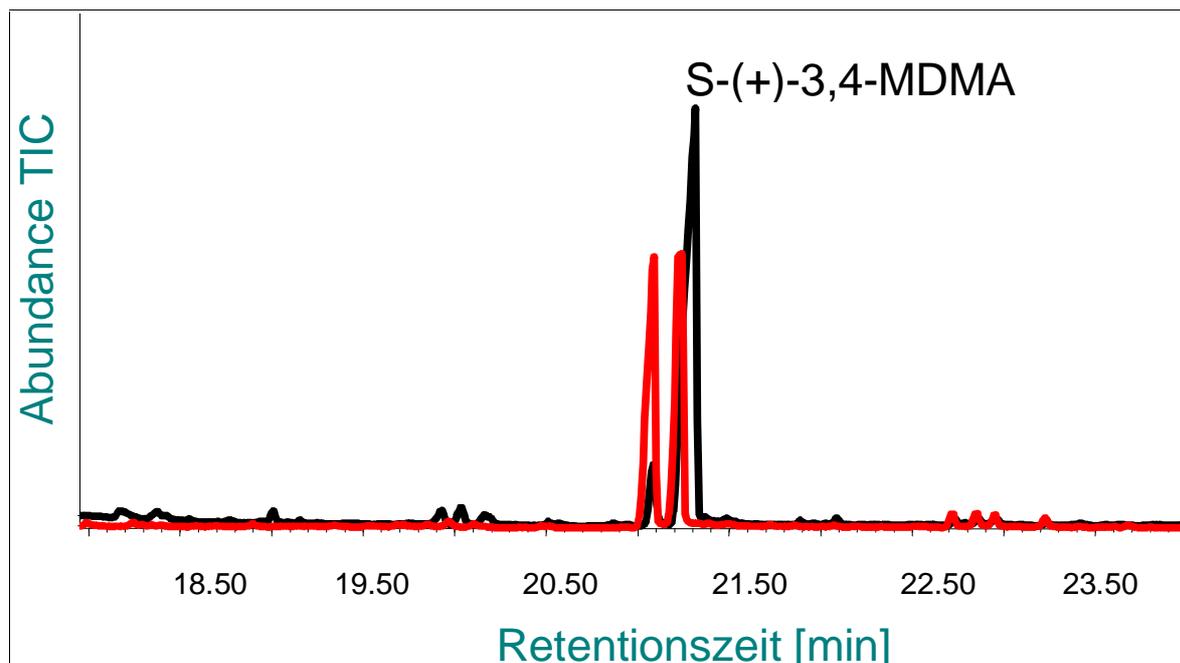


Abb. 2.97.: Diastereomerentrennung des 3,4-MDMA – TPC –Derivates mit Overlay des S-(+)-MDMA-Enantiomer

Nicht alle der untersuchten Verbindungen konnten in Form ihrer Diastereomeren gaschromatographisch getrennt werden. Im Anhang sind die Ergebnisse der Trennungen zusammengestellt (Abschnitt 5.3.). Die ausgesprochene Polarität einiger Verbindungen (zum Beispiel Verbindung **26** und **27**) werden die gaschromatographische Bestimmung verhindert haben, möglicherweise könnten aber auch ungeeignete Derivatisierungsbedingungen hier Grund für das Versagen der Methode sein. Hier ist weiterer Optimierungsbedarf, der zum Beispiel die Konzentration des Derivatisierungsreagenzes, das Freisetzen der Base seitens der Probenvorbereitung oder eine schonendere Injektion der Probe oder ein anderes Temperaturprogramm während der gaschromatographischen Trennung betreffen kann.

2.8.3. Ergebniszusammenfassung

Diastereomere sind Verbindungen mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften. Daher ist deren Trennung ohne Einsatz chiraler Medien möglich. Es werden keine teuren chiralen stationären Phasen benötigt, für deren Handhabung unter Umständen ein erfahrener Analytiker benötigt wird.

Nachteilig ist die Notwendigkeit der Derivatisierung. Bei der Derivatisierung könnte es zu einer Razemisierung kommen, was natürlich ein Analysenergebnis verfälschen würde. Die Derivatisierung wird meistens mit einem Überschuß des Reagenzes erfolgen. Das heißt, daß der Reagenzpeak von den Diastereomeren auch getrennt werden muß. Idealerweise wäre das überschüssige Reagenz aus der Probe zu entfernen. Auch die Ausbeute der Reaktion kann ein entscheidender Faktor sein, wenn am Detektionslimit bestimmt werden soll.

Bei Reinheitsuntersuchungen stellt sich die Frage nach der Enantiomerenreinheit des Derivatisierungsreagenzes, denn ein nicht enantiomerenreines Reagenz führt zur Bildung von 4 Isomeren, und eine genaue Identifizierung der Enantiomere ist nicht mehr möglich.

Die hier untersuchte Diastereomerenbildung zeigt, daß eine Trennung relativ schnell und sicher erreicht werden kann.

Für die Auswahl der Methodik muß überlegt werden, welchen Zweck eine derartige Bestimmung hat und welche Geräte eingesetzt werden sollen und können. Der Einsatz der GC/MS sichert das Ergebnis natürlich hinsichtlich seiner Spezifität durch den massenselektiven Detektor ab. Für die forensische Analytik ist dieses unabdingbar. Wenn jedoch eine Probe im Rahmen eines Screenings untersucht werden soll, kann die apparativ etwas weniger aufwendige HPLC mit einer UV- oder Fluoreszenzdetektion genutzt werden.

3. Zusammenfassung

Der Einsatz chiral modifizierter Phasen in der HPLC erfordert ein großes Maß an Experimentierfreudigkeit hinsichtlich der Auswahl eines geeigneten Fließmittels. Die vorliegende Arbeit zeigt, daß bei einer erfolgreichen Enantiomertrennung einer Substanz nicht davon ausgegangen werden kann, daß auch die homologe Verbindung in dem System getrennt wird. Jede Verbindung ist einzeln zu betrachten und eine Trennung entsprechend zu optimieren.

Der Einfluß der Temperatur, des pH - Wertes, der Art und Menge des Modifiers sowie der Pufferkonzentration sind in den Kapiteln ausführlich dargestellt und diskutiert worden. Als wichtige Trends sind für die Cyclodextrinphasen eine möglichst niedrige Temperatur, einen auf die Phase und die Verbindung abgestimmten pH – Wert sowie eine nicht zu hohe Pufferkonzentration zu nennen. Da vor allem pH – Wert und Pufferkonzentrationen Auswirkungen auf die Haltbarkeit der CSP haben, liegt es nicht nur im analytischen, sondern auch monetären Interesse, ein System zu finden, mit dem eine Trennung schnell und robust, das heißt unter möglichst langer Lebensdauer der Säule, durchgeführt werden kann. Desweiteren zeigt die Arbeit, daß eine Trennung schon durch den Einsatz eines anderen Modifiers optimiert werden kann.

Es ist gezeigt worden, daß durch Einsatz der Fluoreszenzdetektion sehr empfindlich detektiert werden kann. Der Einsatz eines Dioden-Array-Detektors erlaubt wiederum die Aufnahme eines UV-Spektrums.

Die Darstellungen der CD-Spektren und CD- Chromatogramme zeigen, daß die Aussagen, die bei dieser Detektionsart getroffen werden können, sehr wertvolle Hinweise auf die Struktur der Substanz geben können. Zunächst erhält man die grundsätzliche Information, daß die untersuchte Substanz chiral ist. Bei entsprechender Extrapolation und gegebenenfalls Vergleichsmessung mit einer ähnlichen Substanz läßt sich auch eine Aussage über die Konfiguration der Substanz treffen.

Entscheidend für die Beurteilung und Auswahl einer Trennung ist die Fragestellung, die bearbeitet werden muß. Zunächst ist zu eruieren, wieviel Zeit

eine Trennung in Anspruch nehmen darf. Hier sind natürlich Haltbarkeit des Probenextraktes und Verfügbarkeit des Ergebnisses die wichtigsten Argumente für die Auswahl der Methode. Bei klinischer Fragestellung muß häufig möglichst schnell ein Ergebnis vorliegen. Entscheidend ist aber auch die Aussage, die getroffen werden soll. Unter Umständen reicht es aus, einen Trend festzustellen, der zum Beispiel das Vorhandensein von mehr Enantiomer 1 oder mehr Enantiomer 2 beschreibt. Dann kann auch durchaus eine Trennung gewählt werden, die schnell abgeschlossen ist und eine Auflösung vielleicht von nur 0,8 hat.

Die Diastereomerentrennungen mittels Gaschromatographie zeigen, daß eine Identifizierung der Enantiomeren schnell erreicht werden kann, ohne eine chirale Trennung zu benutzen. Die Detektion durch einen massenselektiven Detektor ist äußerst spezifisch. Bei dieser Methodik liegen sicher die Probleme in der Derivatisierung, dem apparativen Aufwand und der Reinheit der Reagenzien, sofern Reinheitsbestimmungen durchgeführt werden müssen. Aber die massenselektive Detektion stellt natürlich ein Verfahren dar, welches sich in der forensischen Analytik anbietet, um sogar gerichtsrelevante Ergebnisse erzielen zu können.

Die Trennung der Enantiomere der Amphetamin - Derivate im Umkehrphasenmodus und ohne Derivatisierung hat den Vorteil, daß die als Salz vorliegenden Substanzen direkt in das HPLC – System injiziert werden können. Eine Überführung in die Basen oder in andere Verbindungen ist somit nicht mehr notwendig. Eine entsprechende Analytik aus Urin und Serum oder anderen Körperflüssigkeiten, in denen diese Verbindungen als Salze vorliegen, kann somit schnell erstellt werden. Ein weiterer Vorteil der Umkehrphasenchromatographie ist durch die Benutzung von überwiegend wässrigen Medien die unproblematischere Entsorgung und der Umgang mit weniger toxischen Fließmitteln.

Die Hochleistungsflüssigchromatographie mit chiral modifizierten Phasen stellt ein in der Methodenentwicklung aufwendiges Verfahren dar. Liegt jedoch eine Trennung vor, so ist sie bei entsprechender Detektion gut durchzuführen. Zusätzliche Detektoren (CD-Detektor) können die Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen.

4. Material und Methoden

4.1. GERÄTE

Hewlett Packard Series 1050 HPLC

Entgaser Series 1050, G1303 A

Autosampler Series 1050, G03712

Quarternäre Pumpe Series 1050, G9852 AX

Säulenthermostat Spark Holland, Mistral

Dioden–Array–Detektor Series 1050, G1306 AX

Fluoreszenzdetektor Series 1100, G1321

Auswertesoftware: HP Chemstation Rev. A.07.01 [682]

Hewlett Packard Series 1100 HPLC

Entgaser Series 1100, G1322 A

Autosampler Series 1100, G1313 A

Binäre Pumpe Series 1100, G1312 A

Säulenthermostat Series 1100, G1316 A

Dioden – Array – Detektor Series 1100, G1315 A

Fluoreszenzdetektor Series 1100, G1321 A

CD – Detektor Jasco, CD-1595

Auswertesoftware: HP Chemstation Rev. A.07.01 [682]

Merck Series 7000 HPLC

Entgaser, L-7612

Autosampler, L-7250

Quarternäre Pumpe, L-7100

Säulenthermostat, L-7360

Dioden–Array–Detektor, L-7450

Fluoreszenzdetektor, L-7480

Auswertesoftware: HPLC System Manager, Version 3.1

Agilent GC/MS

GC: HP 6890 Series

MSD: HP 5973

¹H-NMR-Spektroskopie

Bruker-Kernresonanzspektrometer ARX 300 (Meßfrequenz 300,13 MHz)

4.2. SOFTWARE

Chemograph 6.2[®]

Word für Windows 97[®]

Excel für Windows 97[®]

4.3. REAGENZIEN

Acetonitril, gradient grade für die Flüssigchromatographie, Merck Art. Nr. 100030

Ammoniumacetat, zur Analyse, Merck Art. Nr. 101116

α-Cyclodextrin, Fluka Art. Nr. 28705

β-Cyclodextrin, Fluka Art. Nr. 28707

γ-Cyclodextrin, Fluka Art. Nr. 28708

Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, zur Analyse, Merck Art. Nr. 105099

Dichlormethan, für die organische Spurenanalyse, Merck Art. Nr. 106054

Essigsäure 96%, zur Analyse, Merck Art. Nr. 100062

Kaliumdihydrogenphosphat, zur Analyse, Merck Art. Nr. 104877

Methanol, gradient grade für die Flüssigchromatographie, Merck Art. Nr. 106007

Natriumacetat, zur Analyse, Merck Art. Nr. 106268

Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, reinst, Merck Art. Nr. 106345

Natronlauge-Maßlösung, Merck Art. Nr. 109956

ortho-Phosphorsäure 85%, zur Analyse, Merck Art. Nr. 100573

PIC A Ionenpaarreagenz (Tetrabutylammoniumphosphat), Waters Art. Nr.

WAT085101

S-(-)-N-(Trifluoracetyl)-L-prolylchlorid, Sigma-Aldrich Art. Nr. 24,850-9

MATERIAL UND METHODEN

Triethylammoniumphosphat (TEAP) – Fertigpuffer pH 3,0, 1M, Merck Art. Nr. 9282

Triethylamin, Puffersubstanz, Merck Art. Nr. 1.08217

Wasser, HPLC-Qualität, hauseigene Entmineralisierung Destimat Bi 18 E,
Heraeus oder Milli-Q Plus, Millipore

4.4. REFERENZSUBSTANZEN

3,4-Methylenedioxypropylamphetaminhydrochlorid, **4**, Alltech Art. Nr. 01471

4-Hydroxy-3-methoxyamphetaminhydrochlorid, **26**, Lipomed Art. Nr. HMA-85-HC-10

4-Hydroxy-3-methoxymethamphetaminhydrochlorid, **27**, Lipomed Art. Nr. HMMA-417-HC-10

p-Methoxyamphetaminhydrochlorid, **28**, Sigma-Aldrich Art. Nr. M-3404

p-Hydroxymethamphetaminhydrochlorid, **29**, Sigma-Aldrich Art. Nr. H-9645

p-Chloramphetaminhydrochlorid, **30**, Sigma-Aldrich Art. Nr. C-9635

2,5-Dimethoxy-4-bromamphetaminhydrochlorid, **31**, Sigma-Aldrich Art. Nr. D-7412

Methcathionhydrochlorid, **34**, Sigma-Aldrich Art. Nr. M-5037

R-(+)-Methcathinonhydrochlorid, Sigma-Aldrich Art. Nr. M-061

S-(+)-Methylenedioxyamphetaminhydrochlorid, Sigma-Aldrich Art. Nr. M 139

3,4-Methylenedioxyamphetamin-d₂-(N-methyl-d₃)-hydrochlorid, Lipomed Art. Nr. MDM-324-HC

Von allen Verbindungen, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, ist eine methanolische Lösung (1 mg/ml) des Salzes hergestellt worden. Aus dieser Stammlösung sind mit Hilfe von Verdrängungspipetten (Microman Classic der Firma Abimed) Verdünnungen hergestellt worden.

4.5. HPLC-SÄULEN

Chiradex[®], Art. Nr. 1.51333.0001, Merck KGaA

Chiradex gamma[®], Art. Nr. 1.50174.0001, Merck KGaA

Cyclobond I 2000[®], Art. Nr. 20024, Astec

Clobond I 2000 Ac[®], Art. Nr. 20124, Astec

Clobond I 2000 SN[®], Art. Nr. 20224, Astec

Clobond II[®], Art. Nr. 410020, Astec

Clobond III[®], Art. Nr. 410030, Astec

Nucleodex α -PM[®], Art. Nr. 721643.40, Macherey-Nagel

Nucleodex β -OH[®], Art. Nr. 721459.40, Macherey-Nagel

Nucleodex β -PM[®], Art. Nr. 721461.40, Macherey-Nagel

Nucleodex γ -PM[®], Art. Nr. 721465.40, Macherey-Nagel

Shodex β -Cyclodextrin polymer gebunden, Art. Nr. ODB-435 HQ, Showa Denko

Shodex γ -Cyclodextrin polymer gebunden, Art. Nr. ODC-435 HQ, Showa Denko

4.6. PUFFER FÜR DIE HPLC

Puffer 1: NH_4 -Acetat 0,1 M pH 7,0

7,708g Ammoniumacetat werden in 500ml Wasser gelöst und mit Essigsäure 96% auf pH 7,0 eingestellt. Anschließend wird mit Wasser auf 1000,0ml aufgefüllt.

Puffer 2: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1M + 1% TEA pH 6,5

6,8g Kaliumdihydrogenphosphat und 11,4g Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat werden in 500ml Wasser gelöst. 10,0ml Triethylamin werden zugegeben, vermischt und mit ortho-Phosphorsäure 85% auf pH 6,5 eingestellt. Mit Wasser wird auf 1000,0 ml aufgefüllt.

MATERIAL UND METHODEN

- Puffer 3: NaH_2PO_4 0,025M + PIC A Ionenpaarreagenz, Waters (Tetrabutylammoniumphosphat 0,005M) pH 3,5
3,9g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat werden in 500ml Wasser gelöst, mit PIC A Ionenpaarreagenz versetzt und mit ortho-Phosphorsäure 85% auf pH 3,5 eingestellt. Mit Wasser wird auf 1000,0 ml aufgefüllt.
- Puffer 4: NH_4 -Acetat 0,1 M + PIC A Ionenpaarreagenz, Waters (Tetrabutylammoniumphosphat 0,005M) pH 4,2
7,708g Ammoniumacetat werden in 500ml Wasser gelöst, mit PIC A Ionenpaarreagenz versetzt und mit Essigsäure 96% auf pH 4,2 eingestellt. Mit Wasser wird auf 1000,0 ml aufgefüllt.
- Puffer 5: Triethylammoniumphosphat (TEAP) - Fertigpuffer 0,01M, pH 3,0
10,0ml TEAP-Fertigpuffer werden mit Wasser zu 1000,0ml aufgefüllt.
- Puffer 6: Natriumacetatlösung 0,02 M, pH 4,4
1,64g Natriumacetat werden in 500ml Wasser gelöst und mit Essigsäure 96% auf den pH 4,4 eingestellt. Mit Wasser wird auf 1000,0 ml aufgefüllt.

4.7. HPLC - BEDINGUNGEN

Wenn nichts anderes angegeben worden ist, sind sämtliche Trennungen unter nachfolgenden Bedingungen chromatographiert worden:

Fließgeschwindigkeit:	0,8ml/ml
Injektion:	20µl
Säulentemperatur:	21°C
UV – Detektion:	Methylendioxy-Verbindungen 288nm Amphetamin-Derivate 210nm Methcathinon 254nm
CD – Detektion:	288nm
Fluoreszenzdetektion:	Anregungswellenlänge 288nm Emissionswellenlänge 320nm

4.8. GC/MS - BEDINGUNGEN

Gaschromatographie: Hewlett Packard Series 6890, Fused Silica Kapillarsäule HP 1 (25m x 0,20mm; 0,33µm Filmdicke), Initialtemperatur: 60°C, für 0,75min, lineare Steigerung bis 300°C mit 10°C/min, Trägergas: Helium, Injektortemperatur: 220°C, Druck:115,9 kPa, Injektion: 1µl; Injektion bei geschlossenem Split, nach 0,75min 1:50.

Massenspektrometrie (PCI): 70 eV, Quelltemperatur: 250°C, Quadrupoltemperatur: 106°C Reaktandgas: Methan, 6,76 scans/s, Scanbereich 50-500 Dalton

5. Anhang

5.1. FIRMENVERZEICHNIS

Abimed Analysen – Technik GmbH, 40736 Langenfeld, Deutschland

Agilent Technologies (Hewlett Packard), 22297 Hamburg, Deutschland

Astec, ICT Handels-GmbH, 61352 Bad Homburg, Deutschland

Alltech Applied Science Labs, State College PA, USA

Daicel, Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland

Heraeus, 63405 Hanau, Deutschland

Jasco, Labor und Datentechnik GmbH, 64823 Groß-Umstadt, Deutschland

Lipomed AG, 4144, Arlesheim, Schweiz

Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, 52313 Düren, Deutschland

Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland

Millipore GmbH, 65760 Eschborn, Deutschland

Showa Denko, Phenomenex, 63741 Aschaffenburg, Deutschland

Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, 89552 Steinheim, Deutschland

Waters GmbH, 65760 Eschborn, Deutschland

5.2. TRENNUNGEN AN β -CYCLODEXTRIN - CSP

Substanz	Puffer 1		Puffer 2		Puffer 3		Puffer 4	Puffer 5		Puffer 6	
	M	A	M	A	M	A	M	M	A	M	A
1	0,95	1,18	1,09	1,10	1,15	-	0,94	-	-	-	-
2	1,70	1,20	1,78	2,09	1,65	-	0,82	1,54	-	-	-
3	-	0,57	1,58	1,71	1,53	-	1,48	-	-	-	-
4	-	0,82	1,08	1,22	1,43	-	1,69	1,37	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	0,42	-	-	-	0,56	-	-	-	-
8	-	0,50	0,54	0,54	-	-	0,60	-	-	-	-
9	-	0,65	0,65	0,70	-	-	1,04	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	0,68	-	-	-	-
11	1,31	1,51	-	1,87	0,99	1,23	1,64	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	0,71	0,84	-	-	-	-	-	-	-
17	2,38	1,23	-	0,65	3,10	-	-	1,96	0,85	-	-
18	-	-	0,64	0,84	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	0,67	-	-	-	-
22	-	1,02	1,37	2,31	1,61	1,44	-	0,52	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	0,65	0,61	0,62	-	-	-	0,60	0,54	-	-
29	1,03	0,86	1,63	1,21	1,49	-	-	1,30	1,08	-	-
30	-	-	0,60	0,73	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	0,44	0,70	0,81	-	-	-	-	-	-
33	-	-	0,67	1,22	1,07	-	-	-	-	-	-
34	-	-	0,65	0,66	-	-	-	-	-	-	-

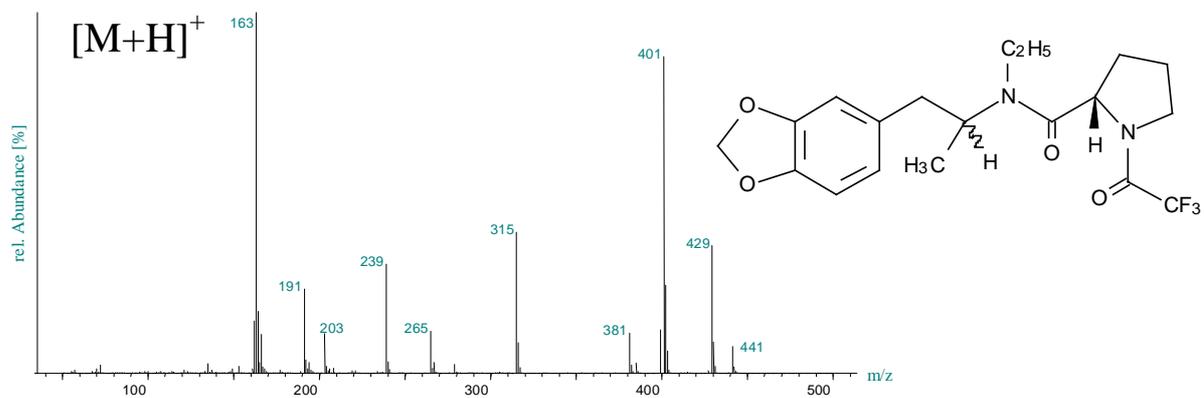
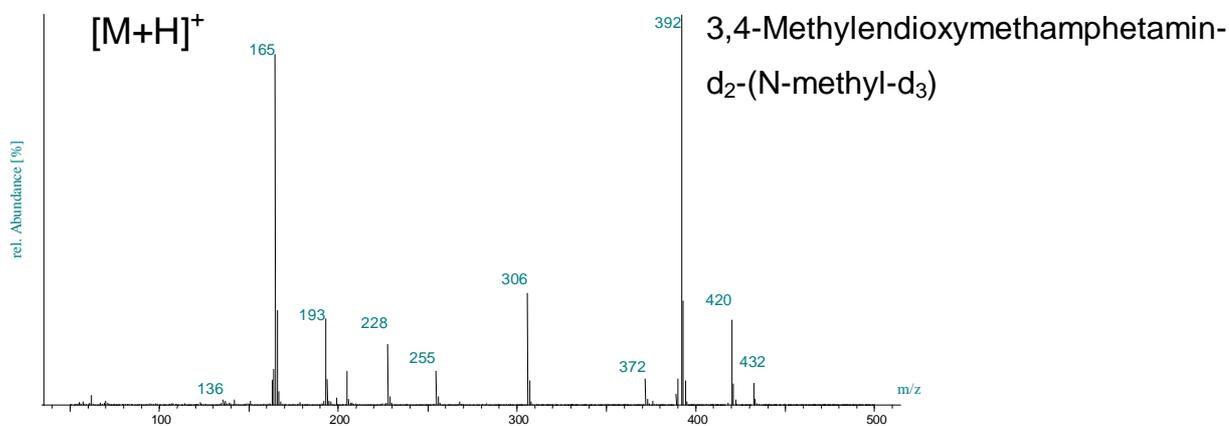
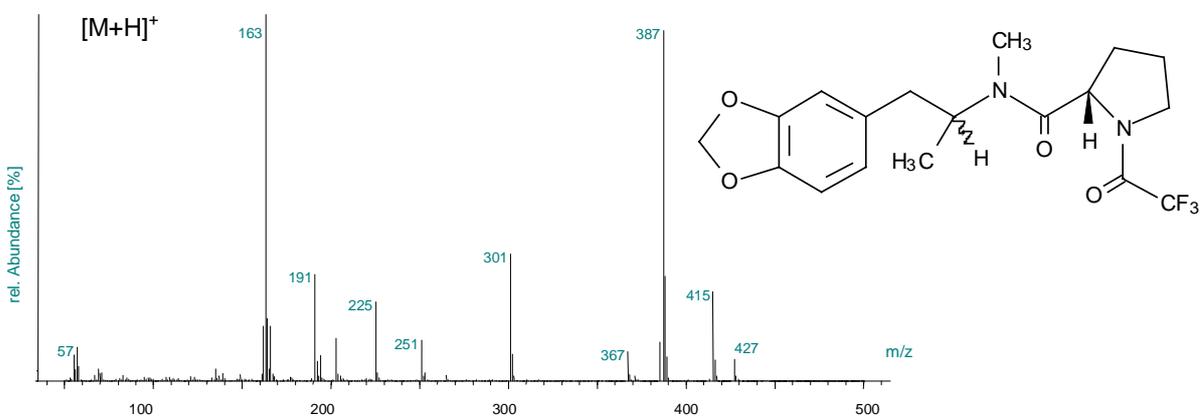
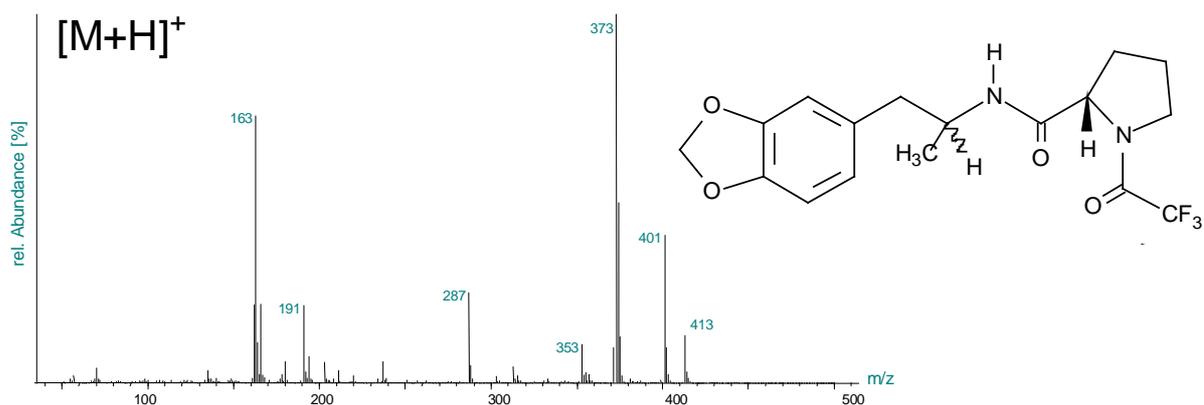
Tab. 5.1.: Gesamttabelle der an β -Cyclodextrin getrennten Verbindungen (M= Methanol, A= Acetonitril)

5.3. DIASTEREOMERENTRENNUNGEN MITTELS GC/MS

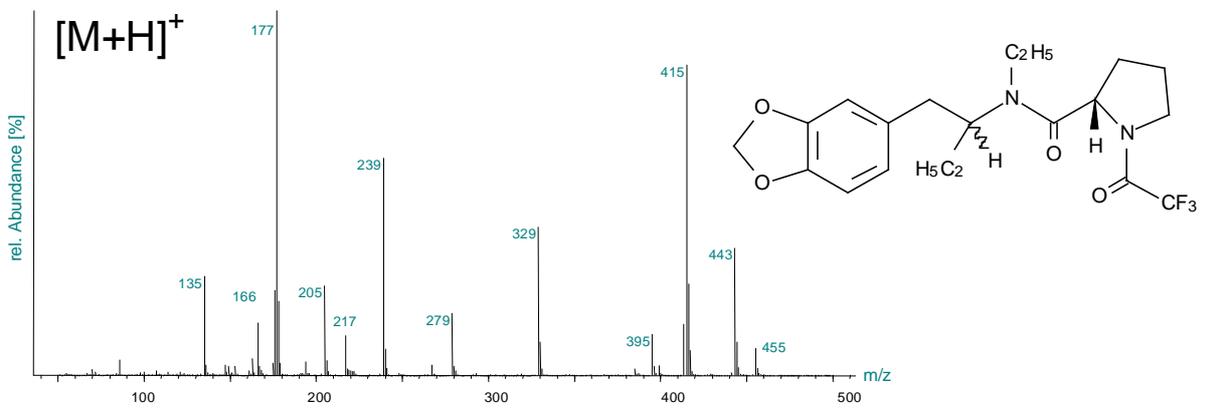
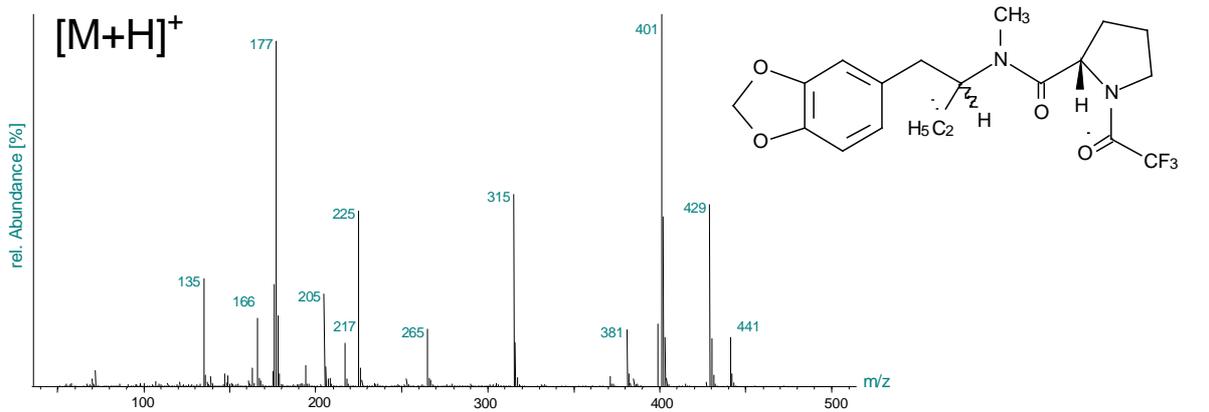
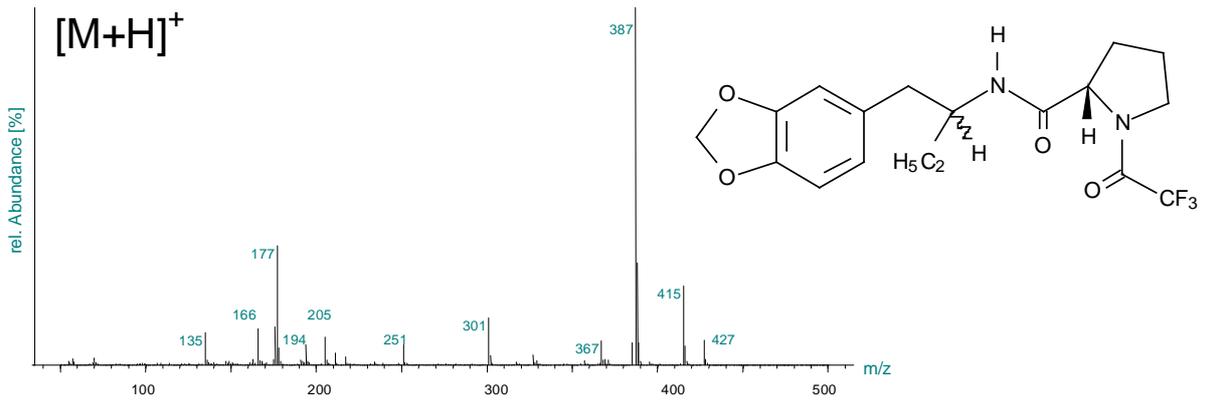
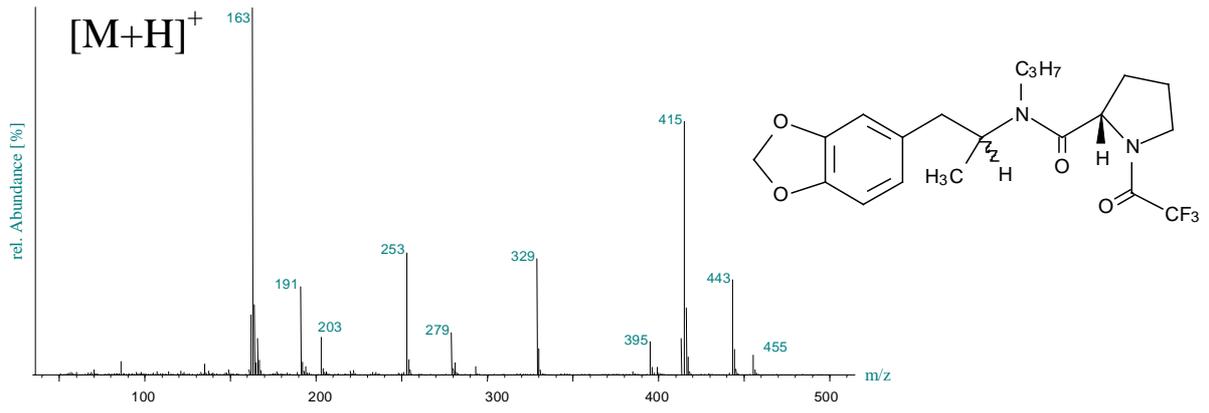
Substanz	Diastereomere
1	Trennung
2	Trennung
3	Trennung
4	Trennung
5	keine Derivatisierung
6	keine Derivatisierung
7	Trennung
8	Trennung
9	Trennung
10	Trennung
11	Trennung
12	keine Derivatisierung
13	keine Derivatisierung
14	Trennung
15	Trennung
16	Trennung
17	keine Derivatisierung
18	keine Derivatisierung
19	Trennung
20	Trennung
21	Antrennung
22	Antrennung
23	keine Derivatisierung
24	keine Derivatisierung
25	Trennung (3 Peaks)
26	keine Derivatisierung
27	keine Derivatisierung
28	Trennung
29	keine Derivatisierung
30	keine Messung
31	Trennung
32	Trennung
33	Trennung
34	Trennung

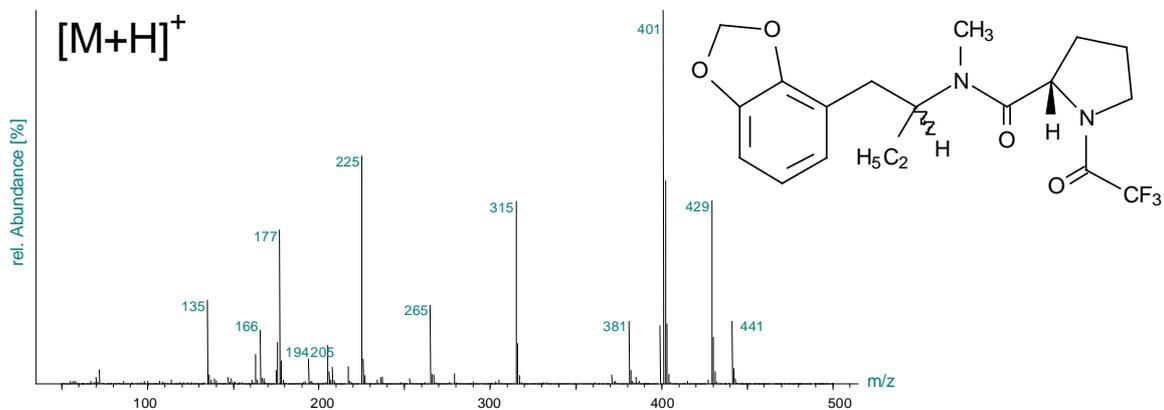
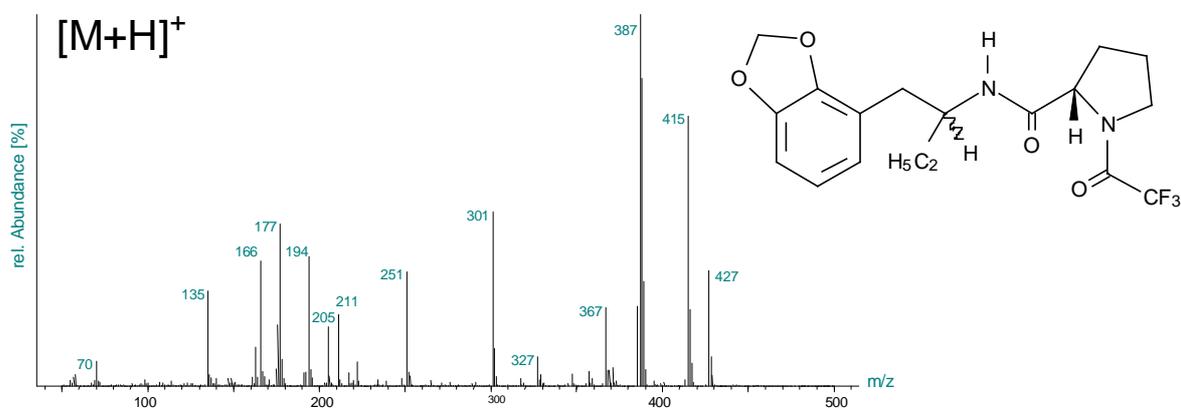
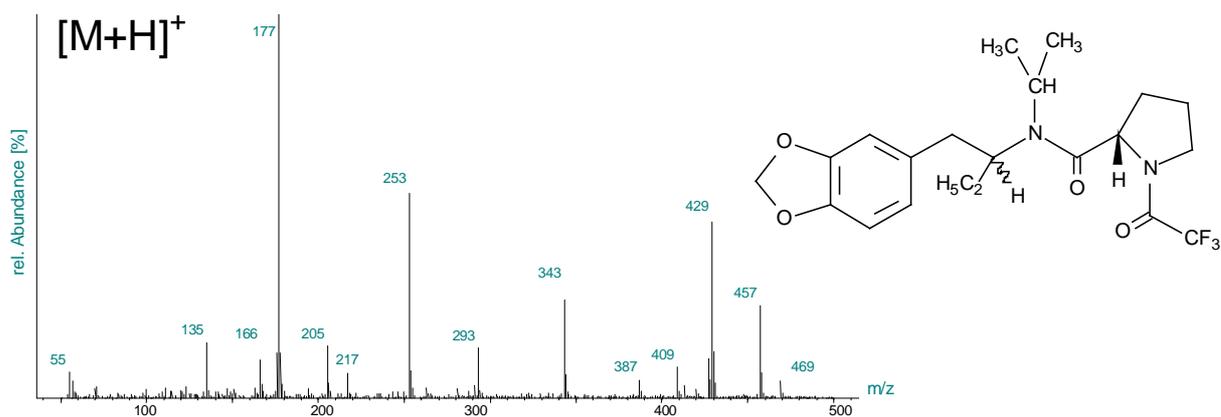
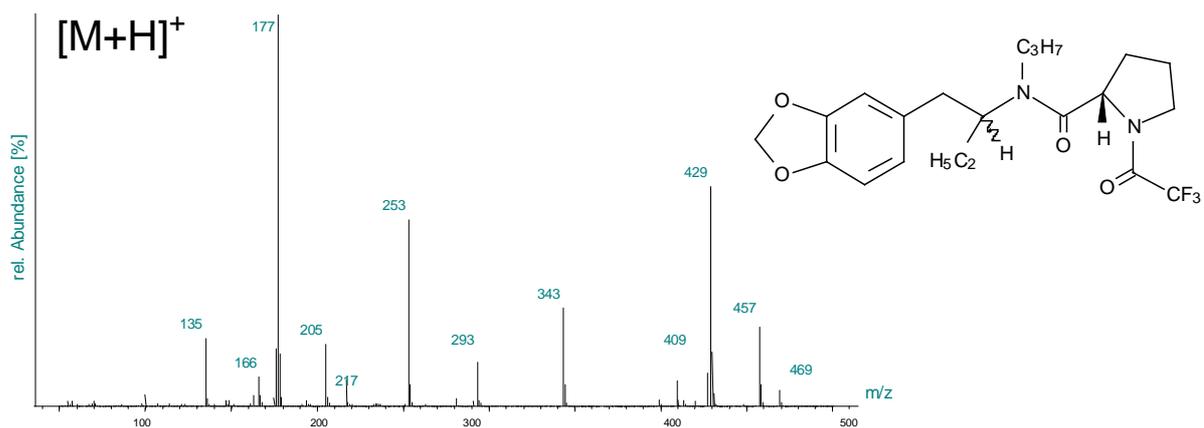
Tab. 5.2.: Diastereomerenbildung und GC/MS-Bestimmung

5.4. PCI - MS - SPEKTREN

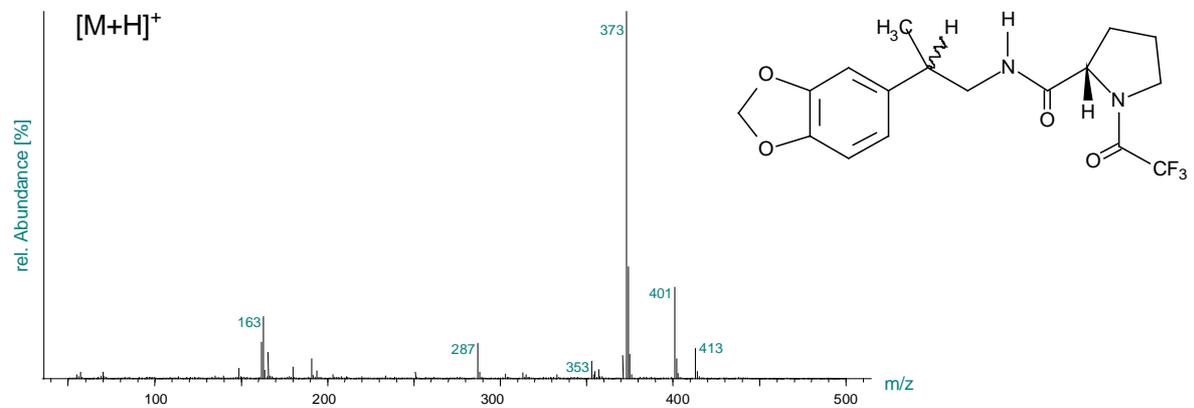
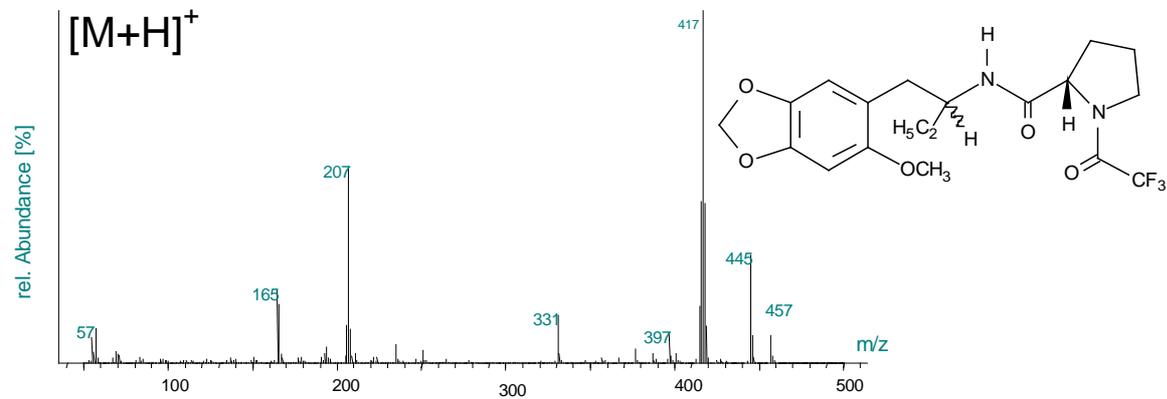
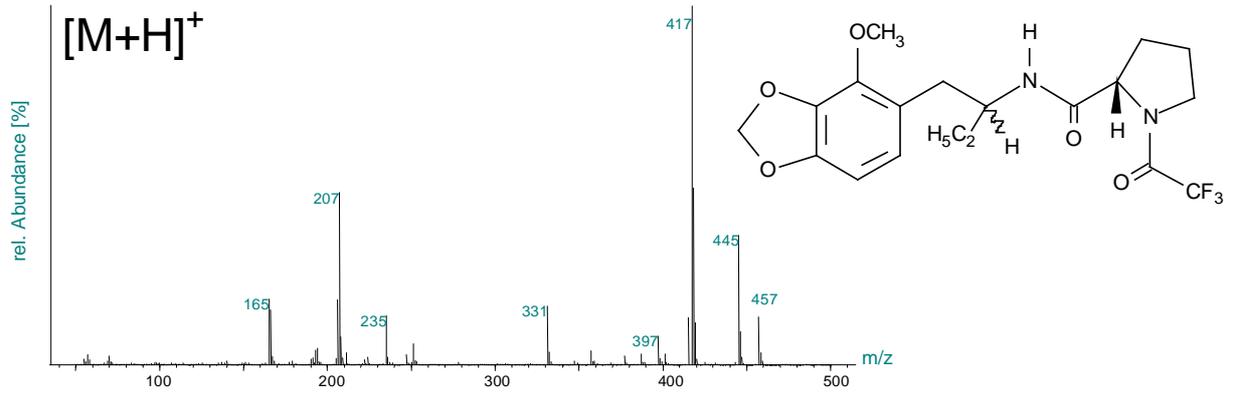
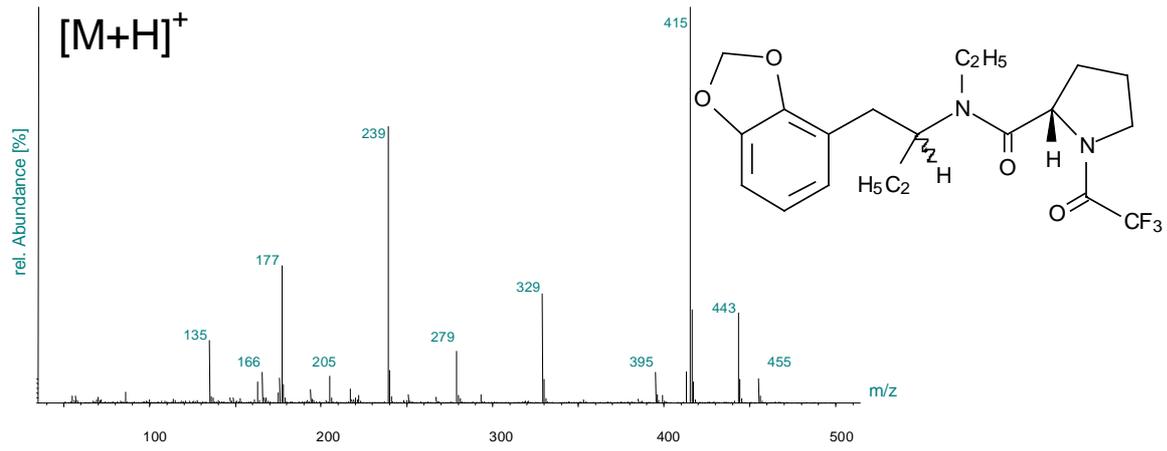


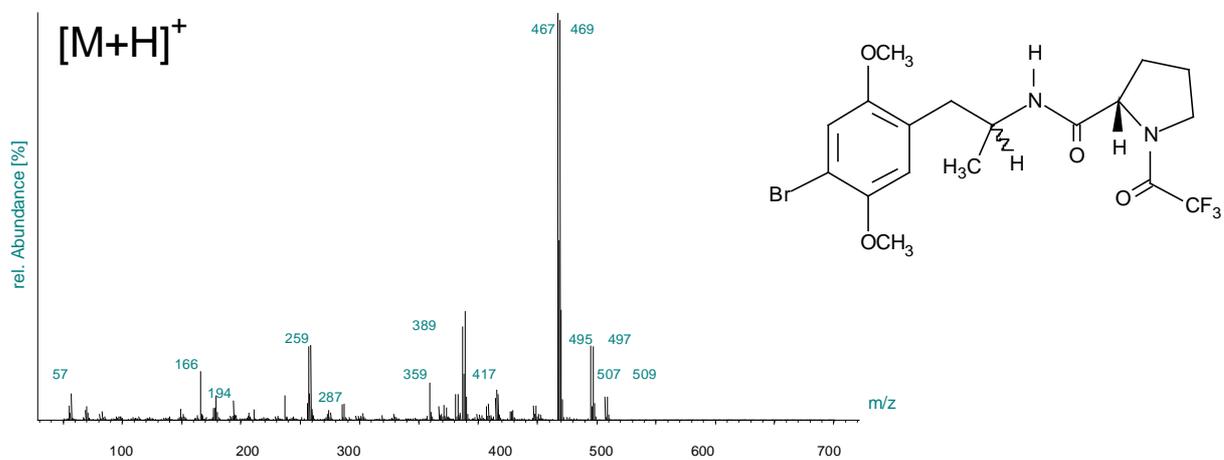
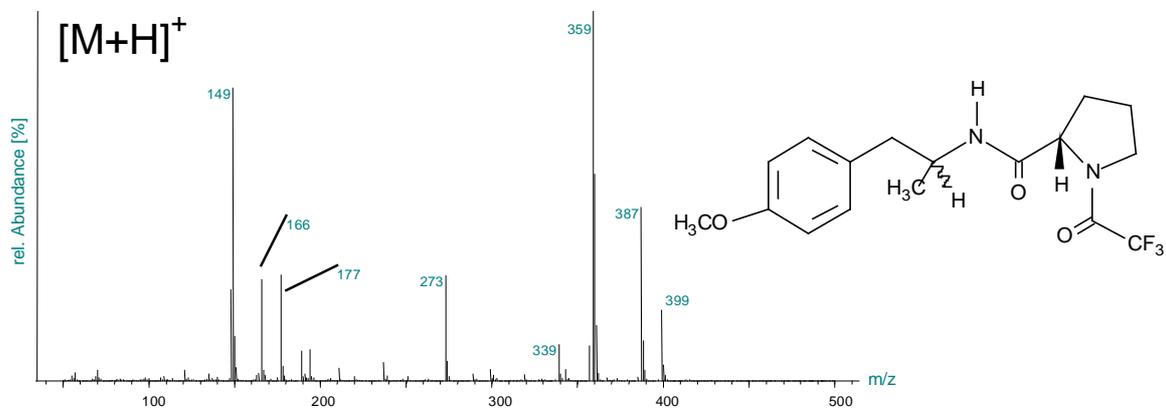
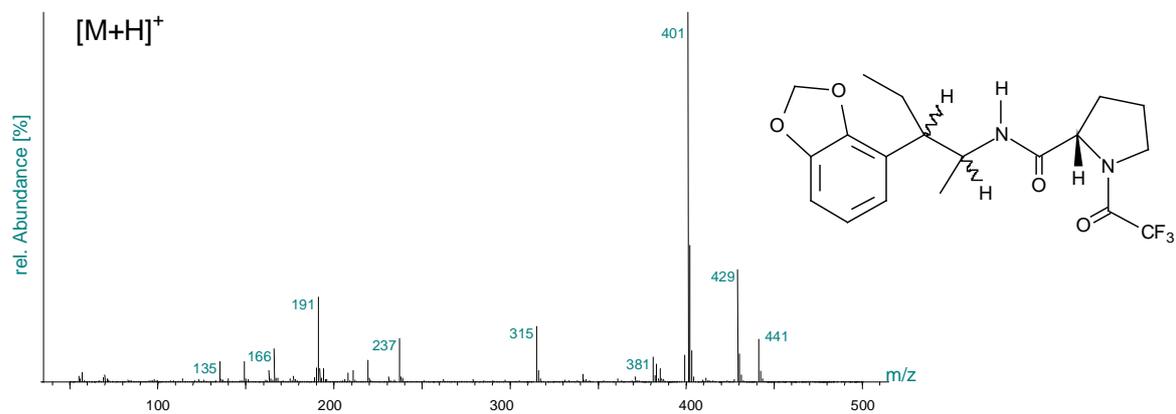
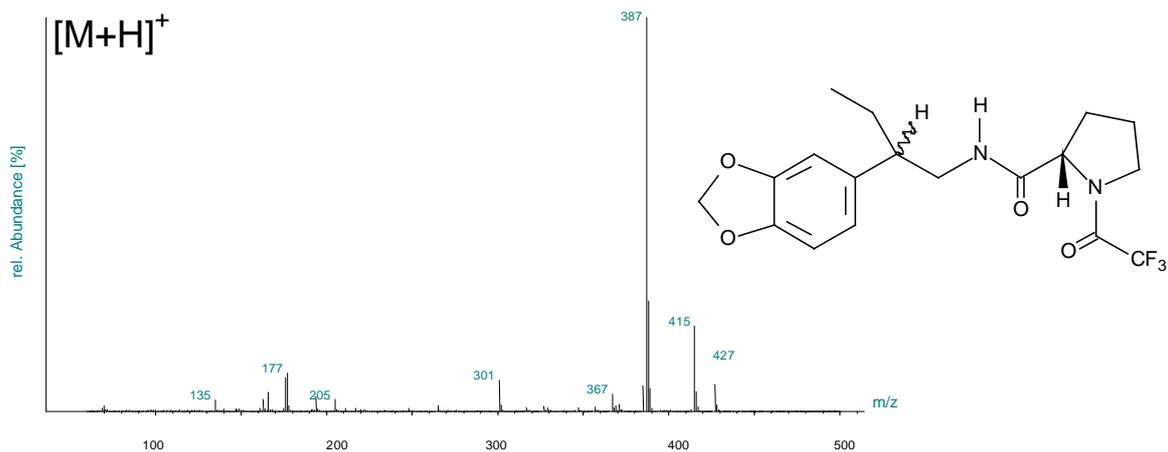
ANHANG



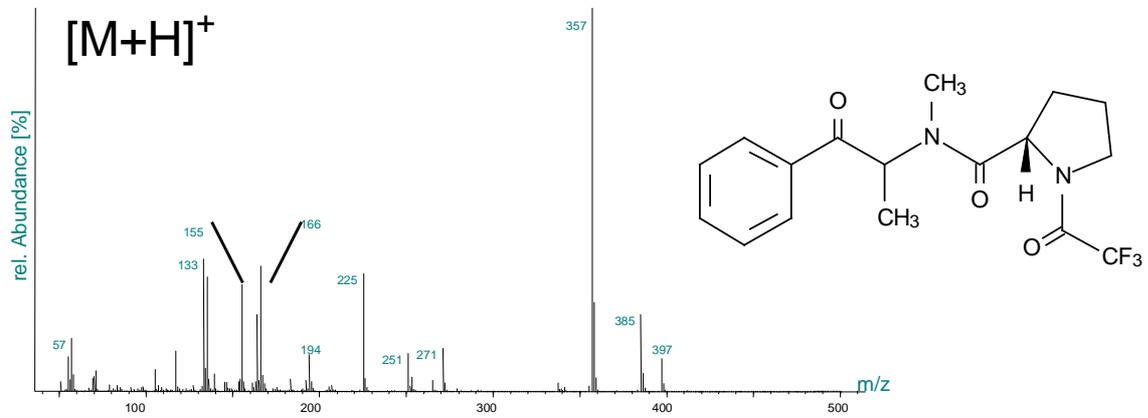
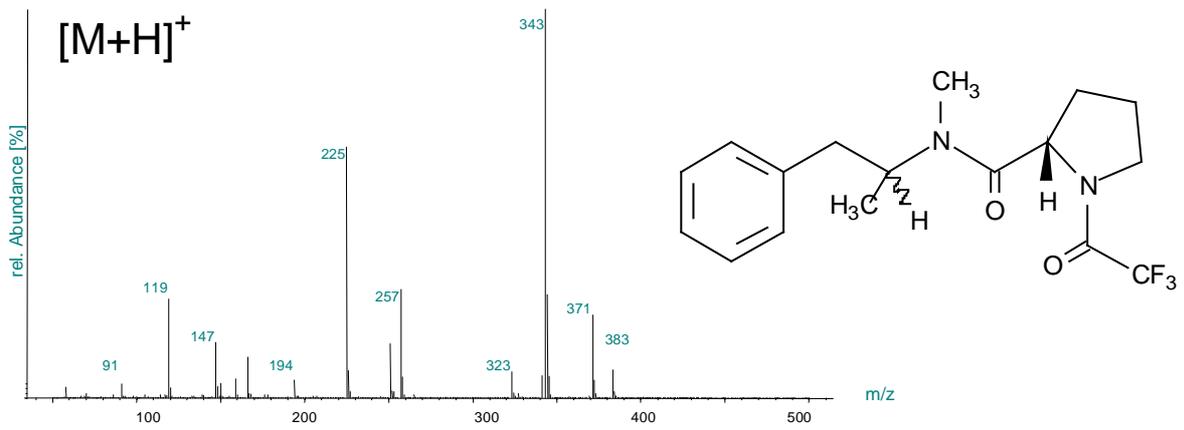
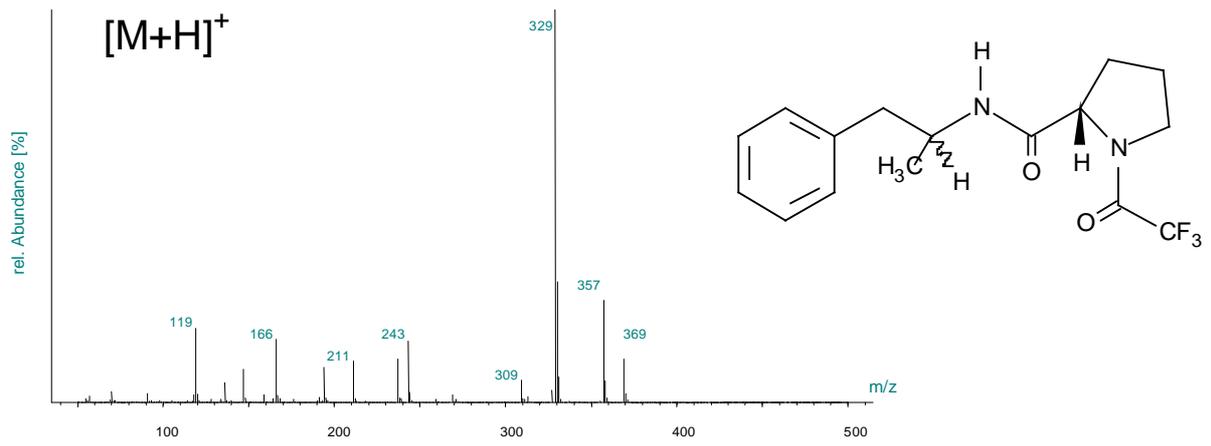


ANHANG





ANHANG



6. Literaturverzeichnis

- [1] Borth, S., Synthese, massenspektrometrische Untersuchungen und in vitro-Testungen von regioisomeren Methylenedioxyphenylalkylaminen, Dissertation, Christian-Albrechts-Universität Kiel (2000)
- [2] Steinegger, E., Hänsel, R., Lehrbuch der Pharmakognosie und Phytopharmazie, Springer Verlag, 4. Auflage, 449 - 450 (1988)
- [3] Nichols, D. E., Differences between the metabolism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogenes. Identification of a new therapeutic class: Entactogens, *J. Psychoact. Drugs*, **18**, 305 - 313 (1986)
- [4] Shulgin, A. T., Stereospecific requirements for hallucinogenesis, *J. Pharm. Pharmacol.*, **25**, 271 - 272 (1973)
- [5] Nichols, D. E., Pfister, W. R., Yim, G. K. W., LSD and phenethylamine hallucinogens: New structural analogy and implications for receptor geometry, *Life Sci.*, **22**, 2165 - 2170 (1978)
- [6] Harris, R. A., Snell, D., Loh, H. H., Stereoselective effects of 1-(2,5-dimethoxy-4-methylphenyl)-2-aminopropane (DOM) on schedule-controlled behavior, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **7**, 307 - 310 (1977)
- [7] Barfknecht, C. F., Nichols, D. E., Effects of S-(+)-and R-(-)-3,4-dimethoxyphenylisopropylamines in the rat, *J. Med. Chem.*, **15**, 109 - 110 (1972)
- [8] Dyer, D. C., Nichols, D. E., Rusterholz, D. B., Barfknecht, C.F., Comparative effects of stereoisomers of psychotomimetic phenylisopropylamines, *Life Sci.*, **13**, 885 - 896 (1973)
- [9] Standridge, R. T., Howell, H. G., Gylys, J. A., Partyka, R. A., Shulgin, A. T., Phenylalkylamines with potetial psychotherapeutic utility. 1. 2-Amino-1-(2,5-dimethoxy-4-methylphenyl)-butane, *J. Med. Chem.*, **19**, 1400 - 1404 (1976)

LITERATURVERZEICHNIS

- [10] Aldous, F. A. B., Barrass, B. C., Brewster, K., Buxton, D. A., Green, D. M., Pinder, R. M., Rich, P., Skeels, M., Tutt, K. J., Structur-activity relationships in psychotomimetic phenylalkylamines, *J. Med. Chem.*, **17**, 1100 - 1111 (1974)
- [11] Yim, G. K. W., Prah, T. E., Pfister, W. R., Nichols, D. E., An economical screen for phenethylamine type hallucinogens: Mouse ear scatering, *Commun. Psychopharmacol.*, **3**, 173 - 178 (1979)
- [12] Glennon, R. A., Young, R., Benington, F., Morin, R. D., Behavioral and serotonin receptor properties of 4-substituted derivatives of the hallucinogen 1-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-aminopropane, *J. Med. Chem.*, **25**, 1163 - 1168 (1982)
- [13] Glennon, R. A., Titeler, M., McKenney, J. D., Evidence for 5-HT₂ involvement in the mechanism of action of hallucinogenic agents, *Life Sci.*, **35**, 2505 - 2511 (1984)
- [14] Smith, H. E., Burrows, E. P., Miano, J.D., Mount, C.D., Sanders-Bush, E., Sulser, F, Action of (S)- and (R)-para-substituted amphetamine hydrochlorides and (alphaS)- and (alphaR)-p-chloronorephedrine and (alphaS)- and (alphaR)-p-chloronorpseudoephedrine hydrochlorides on the level of 5-hydroxytryptamine and the activity of tryptophan hydroxylase in rat brain, *J. Med. Chem.*, **17**, 416 - 421 (1974)
- [15] Steele, T. D., Nichols, D. E., Yim G. K. W., Stereochemical effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and related amphetamine derivatives on inhibition of uptake of [³H]monoamines into synaptosomes from different regions of rat brain, *Biochem. Pharmacology*, **36**, 2297 - 2303 (1987)
- [16] Taylor, K. M., Snyder, S. H., Amphetamine: Differentiation by d and l isomers of behavior involving brain norepinephrin or dopamine, *Science*, **168**, 1487 - 1489 (1970)

- [17] Nichols, D. E., Hoffmann, A. J., Oberlender, R. A., Jacob, P., and Shulgin, A.T., Derivatives of 1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine. Representatives of a novel therapeutic class., *J. Med. Chem*, **29**, 2009 - 2015 (1986)
- [18] Glennon, R. A., Young, R. Y., Further Investigation of the discriminative stimulus properties of MDA., *Pharm. Biochem. Behav*, **20**, 501 - 505 (1984)
- [19] Nichols, D. E., Glennon, R. A., Medicinal chemistry and structure-activity relationships of hallucinogens, in: Jacobs, B. L., (Hrg.). *Hallucinogenes: Neurochemical, behavioral and clinical Perspectives*, New York: Raven Press, 95 - 142 (1984)
- [20] Shulgin, A. T., Psychotomimetic drugs: Structure-activity relationship, in Iversen, L. L.; Iversen, S. D. & Snyder, S. H. (Hrg.) *Handbook of Psychopharmacology*, **11**, New York 243 – 333 (1978)
- [21] Lyon, R. A. Glennon, R. A., Titler, M., 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA): Stereoselective interactions at 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors, *Psychopharmacology*, **88**, 525 - 526 (1986)
- [22] Nichols, D. E., Lloyd, D. H., Hoffmann, A. J., Nichols, M. B., Yim, G. K. W., Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [3H]-serotonin from rat brain synaptosomes, *J. Med. Chem.*, **25**, 530 - 534 (1982)
- [23] Johnson, M.P., Andrew, J., Nichols, H., Nichols, D. E., Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [³H]serotonin and [³H]dopamine release from superfused rat brain slices, *Eur. J. Pharmacol.*, **132**, 269 - 276 (1986)
- [24] Schmidt, C. J., Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxyamphetamine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **240**, 1 - 7 (1987)
- [25] Callaway, C. W., Johnson, M. P., Gold, L. H., Nichols, D. E., Geyer, M. A., Amphetamine derivatives induce locomotor hyperactivity by acting as indirect serotonin agonist, *Psychopharmacology*, **104**, 293 - 301 (1991)

LITERATURVERZEICHNIS

- [26] Hiramatsu, M., Nabeshima, T., Kameyama, T., Maeda, Y., Cho, A. K., The effect of optical isomers of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on stereotyped behaviour in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **33**, 343 - 347 (1989)
- [27] Lim, H. K., Su, Z., Foltz, R. L., Stereoselective disposition: Enantioselective quantitation of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine and three of its metabolites by gas chromatography / electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Biol. Mass. Spectrom.*, **22**, 403 - 411 (1993)
- [28] Hegadoren, K. M., Baker, G. B., Coutts, R.T., Analysis of the enantiomers of 3,4-methylenedioxy-N-ethylamphetamine (MDE, „Eve“) and its metabolite 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in rat brain, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **34**, 117 - 23 (1995)
- [29] Matsushima, K., Nagai, T., Kamiyama, S., Optical isomer analysis of 3,4-methylenedioxyamphetamine analogues and their stereoselective disposition in rats, *J. Anal. Toxicol.*, **16**, 33 - 39 (1998)
- [30] Fitzgerald, R. L., Blanke, R. V., Poklis, A., Stereoselective pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the rat, *Chirality*, **2**, 241 - 248 (1990)
- [31] Fitzgerald, R. L., Blanke, R. V., Rosecrans, J. A., Glennon, R. A., Stereochemistry of the metabolism of MDMA to MDA, *Life Sci.*, **45**, 295 - 301 (1989)
- [32] Cho, A. K., Hiramatsu, M., Distefano, E. W., Chang, A. S., Jenden, D. J., Stereochemical differences in the metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in vivo and in vitro: A pharmacokinetic analysis, *Drug Metab. Disp.*, **18**, 686 - 691 (1990)
- [33] Fallon, J. K., Kicman, A. T., Henry J. A., Milligan P. J., Cowan, D. A., Hutt A. J., Stereospecific analysis and enantiomeric disposition of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) in humans, *Clin. Chem.*, **45**, 1058 - 1069 (1999)

- [34] Lanz, M., Brenneisen, R., Thormann, W., Enantioselective determination of 3,4-methylenedioxyamphetamine and two of its metabolites in human urine by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, **18**, 1035-1043 (1997)
- [35] Brunnenberg, M., Kovar, K. A., Stereospecific analysis of ecstasy-like N-ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamine and its metabolites in humans, *J. Chromatogr. B*, **751**, 9 - 18 (2001)
- [36] Hiramatsu, M., Kumagai, Y., Unger, S. E., Cho, A. K., Metabolism of methylenedioxyamphetamine: Formation of dihydroxy-methamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**, 521 - 527 (1990)
- [37] Brunnenberg, M., Die Bestimmung der Racemate und Enantiomere von N-Ethyl-3,4-methylenedioxyamphetamin (MDE) und seinen Metaboliten in Humanplasma mittels HPLC-FL/ECD Kopplung, Dissertation Tübingen 1998
- [38] Wainer, I. W., Proposal for the classification of high-performance liquid chromatographic stationary phases: how to choose the right column, *Trends Anal. Chem.*, **6**, 125 - 134 (1987)
- [39] Eliel, E. L., Wilen, S. H., *Organische Stereochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 157 - 167 (1998)
- [40] Pirkle, W. H., House, D. W., Chiral high-pressure liquid chromatographic stationary phases. 1. Separation of the enantiomers of sulfoxides, amines, amino acids, alcohols, hydroxy acids, lactones, and mercaptans, *J. Org. Chem.*, **44**, 1957-1960 (1979)
- [41] Pirkle, W. H., Welch, C. J., Chromatographic separation of the enantiomers of acylated amines on chiral stationary phases, *J. Org. Chem.*, **49**, 138 - 140 (1984)
- [42] Pirkle, W. H., Finn, J. M., Preparative resolution of racemates on a chiral liquid chromatography column, *J. Org. Chem.*, **47**, 4037 - 4040 (1982)

LITERATURVERZEICHNIS

- [43] Pirkle, W. H., Hyun, M. H., Banks, B., A rational approach to the design of highly-effective chiral stationary phases, *J. Chromatogr.*, **316**, 585 - 604 (1984)
- [44] White, C. A., Subramanian, G., An introduction to enantioseparation by liquid chromatography, in: *A practical approach to chiral separation by liquid chromatography*, Hrg. Subramanian, G., VCH Weinheim. 1 - 17 (1994)
- [45] Dalgliesh, C. E., The optical resolution of aromatic amino-acids on paper chromatograms, *J. Chem. Soc.*, **137**, 3940 - 3942 (1952)
- [46] Eliel, E.L., Wilen, S.H., *Organische Stereochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, Seite 392
- [47] Okamoto, Y., Aburatani, R., Fukumoto, T., Hatada, K., Useful chiral stationary phases for HPLC. Amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) supported on Silica Gel, *Chem. Lett.*, 1857 – 1860 (1987)
- [48] Okamoto, Y., Senoh, T., Nakane, H., Hatada, K., Optical resolution of β -lactams by chiral HPLC on tris(phenylcarbamate)s of cellulose and amylose, *Chirality*, **1**, 216 - 222 (1989)
- [49] Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K., Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel, *J. Chromatogr.*, **363**, 173 - 186 (1986)
- [50] Ichida, A., Shibata, T., Okamoto, I., Yuki, Y., Namikoshi, H., Toga, Y., Resolution of enantiomers by HPLC on cellulose derivatives, *Chromatographia*, **19**, 280 - 284 (1984)
- [51] Okamoto, Y., Aburatani, R., Kaida, Y., Hatada, K., Direct Optical resolution of carboxylic acids by chiral HPLC on tris(3,5-dimethylphenylcarbamate)s of cellulose and amylose, *Chemistry Letters*, 1125 - 1128 (1988)
- [52] Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K., Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers:

- Phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 5357 - 5359 (1984)
- [53] Chankvetadze, B., Yashima, E., Okamoto, Y., Dimethyl-, dichloro- and chloromethylphenylcarbamates of amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **694**, 101 - 109 (1995)
- [54] Chankvetadze, B., Yashima, E., Okamoto, Y., Chloromethylphenylcarbamate derivatives of cellulose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **670**, 39 - 49 (1994)
- [55] Hesse, G., Hagel, R., Eine vollständige Racemattrennung durch Elutions-Chromatographie an Cellulose-tri-acetat, *Chromatographia*, **6**, 277 - 280 (1973)
- [56] Cabrera, K., Lubda, D., Chemisch gebundenes β -Cyclodextrin als chirale stationäre Phase für die Enantiomerentrennung von Pharmawirkstoffen, *GIT Spezial Chromatographie*, **2**, 77 - 79 (1992)
- [57] Armstrong, D. W., Faulkner Jr., J. R., Han, S. M., Use of hydroxypropyl- and hydroxyethyl-derivatized β -cyclodextrins for the thin-layer chromatographic separation of enantiomers and diastereomers, *J. Chromatogr.*, **452**, 323 - 330 (1988)
- [58] Armstrong, D. W., DeMond, W., Alak, A., Hinze, W. L., Riehl, T. E., Bui, K. H., Liquid chromatographic separation of diastereomers and structural isomers on the cyclodextrin-bonded phases, *Anal. Chem.*, **57**, 234 - 237 (1985)
- [59] Fujimura, K., Ueda, T., Ando, T., Retention behavior of some aromatic compounds on chemically bonded cyclodextrin silica stationary phase in Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, **55**, 446 - 450 (1983)
- [60] Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Nakae, M., Funazo, K., Shono, T., Chemically bonded cyclodextrin stationary phases for liquid chromatographic separation of aromatic compounds, *Anal. Chem.*, **55**, 1852 - 1857 (1983)

LITERATURVERZEICHNIS

- [61] Firmenschrift Daicel: Crownpack
- [62] Hyun, M. H., Jin, J. S., Koo, H. J., Lee, W., Liquid chromatographic resolution of racemic amines and amino alcohols on a chiral stationary phase derived from crown ether, *J. Chromatogr. A*, **837**, 75 - 82 (1999)
- [63] Hyon, M. H., Han, S. C., Lipshutz, B. H., Shin, Y.-J., Welch, C. J., New chiral crown ether stationary phase for liquid chromatographic resolution of α -amino acid enantiomers, *J. Chromatogr. A*, **910**, 359 - 365 (2001)
- [64] Blaschke, G., Chromatographie racemischer Mandelsäure an Polyacrylsäureestern und -amiden optisch aktiver Ephedrinderivate, *Chem. Ber.*, **107**, 237 - 252 (1974)
- [65] Okamoto, Y., Suzuki, K., Ohta, K., Hatada, K., Yuki, H., Optically active poly(triphenylmethyl methacrylate) with one-handed helical conformation, *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 4766 – 4765 (1979)
- [66] Davankov, V. A., Rogozhin, S. V., Semechkin, A. V., Sachkova, T. P., *J. Chromatogr.*, Ligand-exchange chromatography of racemates - influence of the degree of saturation of the asymmetric resin by metal ions on ligand exchange, *J. Chromatogr.*, **82**, 359 – 365 (1973)
- [67] Davankov, V. A., Resolution of racemates by ligand-exchange chromatography, *Adv. Chromatogr.*, **18**, 139 – 195 (1980)
- [68] Gübitz, G., Jellenz, W., Löfler, G., Santi, W., Chemically bonded chiral stationary phases for the separation of racemates by high performance liquid chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **2**, 145 – 146 (1979)
- [69] Gübitz, G., Jellenz, W., Santi, W., Resolution of the optical isomers of underivatized amino acids on chemically bonded chiral phases by ligand exchange chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 701 – 712 (1981)
- [70] Gübitz, G., Jellenz, W., Santi, W., Separation of the optical isomers of amino acids by ligand-exchange chromatography using chemically bonded chiral phases, *J. Chromatogr.*, **203**, 377 – 384 (1981)

- [71] Gübitz, G., Direct separation of enantiomers by high performance ligand exchange chromatography on chemically bonded chiral phases, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 519 (1986)
- [72] Gübitz, G., Jellenz, W., Santi, W., Separation of the optical isomers of amino acids by ligand-exchange chromatography using chemically bonded chiral phases, *J. Chromatogr.*, **203**, 377 - 384 (1981)
- [73] Dawankow, W., Ligandenaustauschchromatographie und Gewinnung optisch aktiver Verbindungen, *Ideen des exakten Wissens*, 319 - 325 (1972)
- [74] Hermansson, J., Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using α_1 -acid glycoprotein as chiral stationary phase, *J. Chromatogr.*, **269**, 71 - 80 (1983)
- [75] Allenmark, S., Bomgren, B., Boren, H., Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases III. Optical resolution of a series of N-acyl D,L-amino acids by high-performance liquid chromatography on bovine serum albumin covalently bound to silica, *J. Chromatogr.*, **264**, 63 - 68 (1983)
- [76] Domenici, E., Bertucci, C., Salvadori, P., Wainer, I. W., Immobilized serum albumin: Rapid HPLC probe of stereoselective protein-binding interactions, *Chirality*, **263**, 263 - 268 (1990)
- [77] Hermansson, J., Resolution of racemic aminoalcohols (β -blockers), amines and acids as enantiomeric derivatives using a chiral α_1 -acid glycoprotein column, *J. Chromatogr.*, **325**, 379 – 384 (1985)
- [78] Schill, G., Wainer, I. W., Barkan, S. A., Chiral separation of cationic and anionic drugs on an α_1 -acid glycoprotein-bonded stationary phase (Enantiopak[®]) - II. Influence of mobile phase additives and pH on chiral resolution and retention, *J. Chromatogr.*, **365**, 73 - 88 (1986)

LITERATURVERZEICHNIS

- [79] Hermansson, J., Enantiomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with α_1 -acid glycoprotein, *Trends Anal. Chem.*, **8**, 251 – 259 (1989)
- [80] Miwa, T., Miyakawa, T., Kayano, M., Application of an ovomucoid-conjugated column for the optical resolution of some pharmaceutically important compounds, *J. Chromatogr.*, **408**, 316 - 322 (1987)
- [81] Erlandsson, P., Marle, I., Hansson, L., Isaksson, R., Petterson, C., Petterson, G., Immobilized cellulase (CBH I) as a chiral stationary phase for direct resolution of enantiomers, *J. Amer. Chem. Soc.*, **112**, 4573 - 4574 (1990)
- [82] Hare, P. E., Gil-Av, E., Separation of D and L amino acids by liquid chromatography: Use of chiral eluents, *Science*, **204**, 1226 – 1228 (1979)
- [83] Cabrera, K., Schwinn, G., Cyclodextrine als chirale Selektoren für die Enantiomerentrennung in der HPLC (Teil 1): Dynamische Belegung der RP-Phasen, *Kontakte (Darmstadt)*, **3**, 3 - 8 (1989)
- [84] Cabrera, K., Lubda, D., Influence of temperature on chiral high-performance liquid chromatographic separations of oxazepam and prominal on chemically bonded β -cyclodextrin as stationary phase, *J. Chromatogr. A*, **666**, 433 - 438 (1994)
- [85] Pawlowska, M., Zukowski, J., Dynamic generation of chiral stationary phases in HPLC systems, *J. High Resolut. Chromatogr.*, **14**, 138 - 140 (1991)
- [86] Debowski, J., Jurczak, J., Sybilska, D., Resolution of some chiral mandelic derivatives into enantiomers by reversed-phase high-performance liquid chromatography via α - and β -cyclodextrin inclusion complexes, *J. Chromatogr.*, **282**, 83 - 88 (1983)
- [87] Shimada, K., Oe, T., Hirose, Y., Komine, Y., Retention behaviour of cardiac steroids using cyclodextrin in the mobile phase in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **478**, 339 - 347 (1997)

- [88] Sousa, L. R., Hoffmann, G. D., Y., Cram, D. J., Host - Guest complexation. 12. Total optical resolution of amine and amino ester salts by chromatography, *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 4569 - 4576 (1978)
- [89] Zukowski, J., Sybilska, D., Jurczak, J., Resolution of ortho, meta, and para isomers of some disubstituted benzene derivatives via α - and β -cyclodextrin inclusion complexes, using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **57**, 2215 - 2219 (1985)
- [90] Debowski, J., Syblaska, D., Separation of isomeric alkylbenzenes in reversed-phase high-performance liquid chromatography through α - and β -cyclodextrin inclusion complexes, *J. Chromatogr.*, **353**, 409 - 416 (1986)
- [91] Sybilska, D., Debowski, J., Jrzak, J., Zukowski, J., α - and β - Cyclodextrin complexation as a tool for the separation of o-, m-, and p- nitro- cis- and trans- cinnamic acids by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, **286**, 163 - 170 (1984)
- [92] Hashimoto, K., Hirai, K., Goromaru, T., Synthesis of racemic, S(+)- and R(-)- N-[methyl-³H]3,4-methylenedioxymethamphetamine, *J. Lab. Comp. and Radiopharm.*, **28**, 465 - 469 (1990)
- [93] Rizzi, A. M., Hirz, R., Cladrowa-Runge, S., Jonsson, H., Enantiomeric separation of amphetamine, methamphetamine and ring substituted amphetamines by means of a β -cyclodextrin-chiral stationary phase, *Chromatographia*, **39**, 131 - 137 (1994)
- [94] Sadeghipour, F., Veuthey, J.-L., Enantiomeric separation of four methylenedioxyated amphetamines on β -cyclodextrin chiral stationary phases, *Chromatographia*, **47**, 285 - 290 (1998)
- [95] Meyer, V. R., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Salle und Sauerländer, 7. Auflage, 14 – 43, Frankfurt a. M. (1992)
- [96] Cyclobond I 2000 Series HPLC column operating instructions, Astec Whippany, NJ 07981 USA

LITERATURVERZEICHNIS

- [97] Chiradex[®] Säulenspezifikation, Art. Nr. 7.91513.3391, Merck Darmstadt
- [98] Makino, Y., Suzuki, Y., Enantiomeric separation of amphetamines in human urine by high-performance liquid chromatography to differentiate the intake of (-)-deprenyl in Parkinsonian from abuse of methamphetamine, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **42**, 433 - 436 (1996)
- [99] Meyer, V. R., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, Salle und Sauerländer, 7. Auflage, 162 – 167, Frankfurt a. M. (1992)
- [100] Sadeghipour, F., Veuthey, J.L., Sensitive and selective determination of methylenedioxyated amphetamines by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection, *J. Chromatography A*, **787**, 137 - 143 (1997)
- [101] Clauwaert, K. M., Van Bocxlaer, J. F., De Letter E. A., Van Calenbergh, S., Lambert, W. E., De Leenheer, A. P., Determination of the designer drugs 3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyethyl-amphetamine, and 3,4-methylenedioxyamphetamine with HPLC and fluorescence detection in whole blood, serum, vitreous humor, and urine, *Clin. Chem.*, **46**, 1968 - 1977 (2000)
- [102] Tagliaro, F., De Battisti, Z., Groppi, A., Nakahara, Y., Scarcella, D., Valentini, R., Marigo, M., High sensitivity simultaneous determination in hair of the major constituents of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine) by high-performance liquid chromatography with direct fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, **723**, 195 - 202 (1999)
- [103] Säulenspezifikation, Showa Denko
- [104] Katalog der Firma Phenomenex
- [105] Das Cyclobond Handbuch, Astec Whippany, NJ 07981 USA

- [106] Otagiri, M., Uekama, K., Ikeda, K., Inclusion complexes of β -cyclodextrin with tranquilizing drugs phenothiazines in aqueous solution, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 188 - 195 (1975)
- [107] Masson, M., Loftsson, T., Jonsdottir, S., Fridriksdottir, H., Petersen, D.S., Stabilization of ionic drugs through complexation with non-ionic and ionic cyclodextrins, *Int. J. Pharm.*, **164**, 45 - 55 (1998)
- [108] Lipkowitz, K.B., Raghothma, Yang, J., Enantioselective binding of tryptophan by α -cyclodextrin, *J. Amer. Chem. Soc.*, **114**, 1554 – 1562 (1992)
- [109] Greatbanks, D., Pickford, R., Cyclodextrins as chiral complexing agents in water, and their application to optical purity measurements, *Magn. Reson. Chem.*, **25**, 208 - 215 (1987)
- [110] Hensley, D., Cody, J. T., Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS, *J. Anal. Tox.*, **23**, 518 - 523 (1999)
- [111] Tetlow, V. A., Merrill, V.A., Rapid determination of amphetamines stereoisomer ratio in urine by gas chromatography - mass spectroscopy, *Ann. Clin. Biochem.*, **33**, 50 - 54 (1996)
- [112] Fitzgerald, R. L., Blanke, Glennon, R. A., Yousif, M. Y., Rosecrans, J. A., Poklis, A., Determination of 3,4-methylenedioxyamphetamine enantiomers in whole blood, *J. Chromatogr.*, **490**, 59 - 69 (1989)
- [113] de Boer, D., Tan, L. T., Gorter, P., van de Wal, R. M. A., Kettenes-van den Bosch, J. J., de Bruijin, E. A., Maes, R. A. A., Gas chromatographic / mass spectrometric assay for profiling the enantiomers of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its chiral metabolites using positive chemical ionisation ion trap mass spectrometry, *J. Mass. Spec.*, **32**, 1236 - 1246 (1997)

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Mai 1998 und September 2001 in enger Zusammenarbeit des Zentralen Institutes des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel (ZInstSanBw KIE), Laborabteilung III, und des Pharmazeutischen Institutes der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von Professor Dr. W. Hänsel.

Zuerst und vor allem danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Hänsel, für die Bereitschaft, eine Dissertation in Zusammenarbeit mit dem ZInstSanBw KIE durchzuführen sowie für die Überlassung dieses wissenschaftlich hochinteressanten Themas, bei dessen Bearbeitung ich großen wissenschaftlichen Freiraum hatte. Die Diskussionen, die ich mit Prof. Hänsel haben durfte, seine Anregungen Empfehlungen und Ermutigungen waren immer eine große Hilfe in der Fortführung der Arbeit.

Herrn Oberstapotheker Dr. H. Rottsahl danke ich für die Unterstützung, diese Thematik im ZInstSanBw KIE, Laborabteilung III, bearbeiten zu dürfen sowie den mir dafür zugestandenen Freiraum.

Frau Dr. Swantje Borth danke ich für die Überlassung der von ihr synthetisierten Substanzen. Auch die Entwicklung eines Seminars für das 5. Fachsemester an der CAU Kiel ging auf unsere intensive Zusammenarbeit zurück.

Für die interessanten Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen von Herrn Dr. P. Rösner und Herrn Junge bedanke ich mich ganz herzlich.

Für die Anregungen der Durchführung der NMR Experimente und das damit verbundene große Interesse an dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. U. Girreser.

Bei der Firma Jasco bedanke ich mich für die zur Verfügungstellung des CD-Detektors.

Meinen Kollegen OSAP d. R. Dr. Joachim Bauer, OSAP Dr. Jürgen Landshuter und OSAP Dr. Kornelia Eggert-Bury danke ich für die regen Diskussionen und die große Unterstützung, die sie mir entgegengebracht haben. Insbesondere Jürgen stand mir in den letzten Tagen der Arbeit mit vielen Anregungen zur Seite.

Frau Muehlenberg danke ich für die loyale Hilfsbereitschaft, wenn es darum ging, immer noch eine HPLC – Serie für das Wochenende vorzubereiten.

Meinen Eltern und meinem Bruder Stefan danke ich für das „Querlesen“ der Arbeit und die seelische Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Sandra, da ohne sie diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Denn nur ihre Hilfe und Unterstützung haben mir den Rücken freigehalten, jede freie Minute für die Bearbeitung dieses Themas zu nutzen. Auch meine Töchter Friederike und Katharina haben meine häufige Abwesenheit zu spüren bekommen, als sie häufig ohne ihren Vater zu Bett gehen mußten.

LEBENS LAUF

Name:		Karsten Wiethoff
Geburtstag:	08.12.1967	in Marl / Westfalen
Familienstand:		verheiratet, zwei Kinder
Eltern:		Ursula Wiethoff, geb. Hühne Wilhelm Wiethoff
Schulausbildung:	1974 - 1975	Grundschule an der Max-Reger-Str. in Marl
	1975 - 1978	Grundschule an der Westfalenstr. in Marl
	1978 - 1987	Gymnasium im Loekamp in Marl, Abitur
Studium:	WS 87/88	Studium der Chemietechnik an der Universität Dortmund
	SS 88 - SS 92	Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
	September 1990	I. Staatsexamen
	Oktober 1992	II. Staatsexamen
	01.11.1992 bis 30.04.1993	1. Teil des Pharmaziepraktikums Arkaden-Apotheke Marl
	01.05.1993 bis 31.10.1993	2. Teil des Pharmaziepraktikums Wyeth Pharma GmbH Münster (Qualitätskontrolle)
	Dezember 1993	III. Staatsexamen
	01.12.1993 bis 30.06.1994	Wissenschaftlicher Angestellter am Pharmazeutischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität
Wehrdienst/ Soldat auf Zeit:	01.07.1994 bis 30.08.1995	SanMatKp 100 Dülmen, Leiter der Bundeswehrapotheke und stv. Kompaniechef
	seit 01.09.1995	Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel, Laborleiter HPLC und GC
Weiterbildung:	01.09.1995 bis 03.06.1999	Weiterbildung zum Apotheker für Pharmazeutische Analytik

Seit Mai 1998 fertigte ich am Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr Kiel in Zusammenarbeit mit dem Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter Leitung von Prof. Dr. W. Hänsel die vorliegende Arbeit an.