

1. Einleitung

1.1 Chiralität

1.1.1 Enantiomere und Diastereomere



Chiralität oder Händigkeit wird in der Stereochemie (griech. stereos=starr) als Gebiet der Organischen Chemie behandelt, die sich mit Strukturen im dreidimensionalen Raum beschäftigt. Die Stereochemie befaßt sich mit Stereoisomeren, Substanzen mit unterschiedlicher räumlicher Anordnung (Konfiguration) von Atomen um ein stereogenes Zentrum (Chiralitätszentrum, zentrale Chiralität) im Molekül, die nur durch Bindungsspaltung interkonvertieren können. Die molekulare Asymmetrie ist ursächlich in der tetrahedralen geometrischen Natur von Atomen wie Kohlenstoff, Schwefel, Phosphor und Stickstoff zu finden, die stereogene Zentren bilden können. Am häufigsten tritt Chiralität infolge asymmetrischer Kohlenstoffatome auf. Darüber hinaus kann das Auftreten von Chiralität auch durch das Vorhandensein von Chiralitätsachsen (axiale Chiralität) oder Chiralitätsebenen (planare Chiralität) verursacht werden.

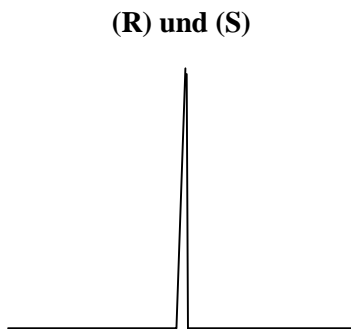
Abb.1. Helicale Chiralität (griech. cheir=Hand) bei der Windungsrichtung des Gehäuses der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*).

Enantiomere (griech. enantion=Gegenteil) sind solche Moleküle, die sich zueinander wie Bild und Spiegelbild verhalten und nicht miteinander zur Deckung zu bringen sind. Sie besitzen identische physikochemische Eigenschaften wie z.B. gleiche Schmelzpunkte, Dichten, IR- und UV-Spektren. Sie sind in ihren chiroptischen Eigenschaften unterscheidbar, wenn es zum Auftreten optischer Aktivität kommt. Diese Fähigkeit einer Drehung der Ebene linear polarisierten Lichts wird in der Polarimetrie genutzt, wobei sich Enantiomere nur durch die Drehrichtung, nicht aber im Betrag der Drehung unterscheiden.

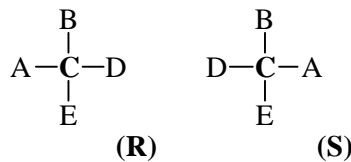
Diastereomere (griech. dia=auseinander) als Stereoisomere wiederum besitzen mehrere stereogene Zentren und kommen dementsprechend als Enantiomere (Spiegelbilder, deckungsgleich) und Diastereomere (Spiegelbilder, nicht deckungsgleich) vor (Abb.2). Da jedes stereogene Zentrum in der einen oder der anderen von 2 möglichen Konfigurationen auftreten kann, gibt es 2^n Stereoisomere für n Chiralitätszentren. Da jedes Stereoisomer ein Enantiomer besitzt, treten 2^n Stereoisomere in Form von 2^{n-1} Paaren von Enantiomeren auf, wobei jedes Enantiomeren-Paar diastereomer zu jedem anderen Paar ist. Die Anzahl der Stereoisomere kann weniger als 2^n betragen, wenn durch immanente Symmetrieelemente ein Stereoisomer achiral ist oder ein Zentrum seine Stereogenität verliert. Ein typischer Fall findet sich bei der Weinsäure. Hier tritt ein Diastereomer als Enantiomeren-Paar auf, während das andere zwei zueinander spiegelbildliche Stereozentren besitzt und damit achiral ist (*meso*-Form). Es resultieren anstelle von 4 nur 3 Stereoisomere.

Diastereomere haben unterschiedliche physikochemischen Eigenschaften und sind so relativ leicht trennbar.

Achirale Chromatographie



← Enantiomere →



Chirale Chromatographie

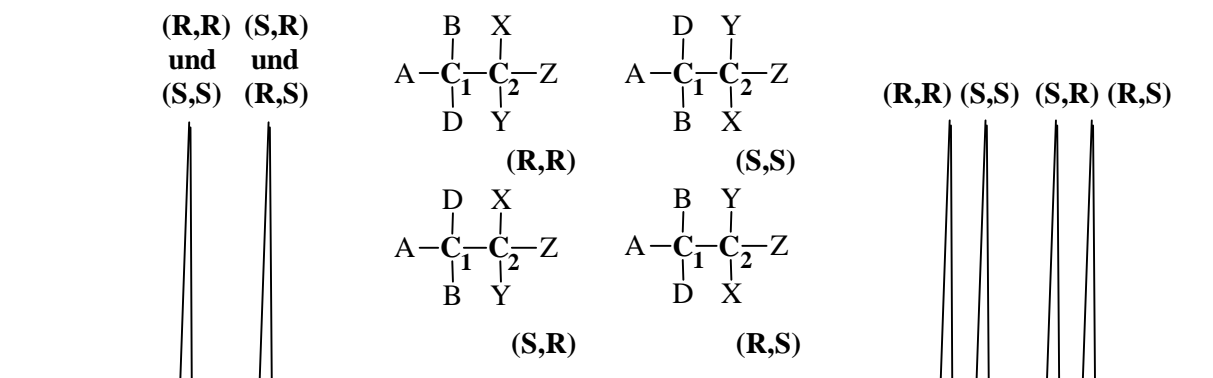
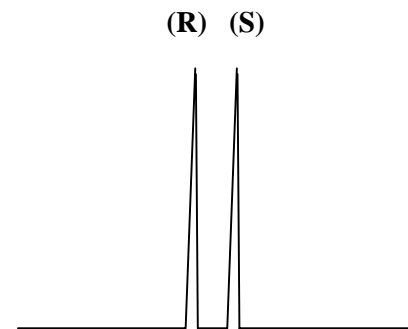


Abb.2. Chirale Trennung auf chromatographischen Säulen. Oben: ein Asymmetriezentrum (C-Atom) im Molekül: es treten 2 Stereoisomere auf, die Enantiomere sind, d.h. Spiegelbilder mit identischen physikochemischen Eigenschaften; unten: zwei Asymmetriezentren (C₁- und C₂-Atome) im Molekül: es treten maximal 4 Stereoisomere auf, d.h. zwei Diastereomere mit nichtidentischen physikochemischen Eigenschaften, die jeweils als Enantiomeren-Paar vorliegen (nach Wainer, 1987).

1.1.2 Nomenklatur

Bei Aminosäuren, Zuckern und verwandten Substanzen sind immer noch die D- und L-Konfigurationszuweisungen der Enantiomere gebräuchlich. Dieses von Emil Fischer eingeführte System leitet diese Zuweisungen von der Konfiguration des Glycerinaldehyds ab. Willkürlich wies er das (+)-Isomer als D-Isomer aus. Die D- und L- Zuweisungen orientieren sich an der Drehrichtung linear polarisierten Lichtes (Natrium d-Linie). Wird dieses Licht nach rechts verschoben, dann erhält das Isomer die D- oder (+)-Zuweisung. Alle natürlich vorkommenden Aminosäuren besitzen beispielsweise die L-Konfiguration.

Aussagen zur absoluten Konfiguration einer chiralen Substanz werden erst mit den (R,S)-Konfigurationszuweisungen nach Cahn, Ingold und Prelog möglich. Mit Hilfe von Sequenzregeln werden die vier Liganden eines jeden Chiralitätszentrums geordnet. Der Ligand mit dem niedrigsten Rang zeigt räumlich nach hinten in den Raum. Wandert das Auge vom Substituenten der höchsten Priorität nach dem mit der zweiten und dann nach dem mit der dritten Priorität in Richtung des Uhrzeigersinns, wird die Konfiguration als (R) bezeichnet. (R) steht als Abkürzung für *rectus* (lat.: rechts oder im Uhrzeigersinn). Die (S)-Konfiguration am chiralen Zentrum steht für *sinister* (lat.: links oder entgegen dem Uhrzeigersinn).

1.1.3 Biologische Relevanz

Trotz ihrer identischen physikochemischen Eigenschaften können sich Enantiomere in biologischen Systemen sehr unterschiedlich verhalten. Optisch aktive Substanzen treten als integraler Teil biologischer Systeme fast ausschließlich in einer Enantiomeren-Form auf. So finden sich in allen Lebewesen auf der Erde bis auf wenige Ausnahmen nur L-Aminosäuren und D-Zucker. Die verschiedenartigen Interaktionen von Enantiomeren mit Enzymen (Pharmakologie, Toxikologie), Rezeptoren (Geruch, Pheromon-Wirkung) und Transportproteinen zeichnen verantwortlich für stereospezifische Unterschiede in ihrer biologischen Aktivität (Tab.1), ihrer Verteilung, ihrem Metabolismus und ihrer Ausscheidung.

Wirkstoff	Stereoisomer	Effekt
Thalidomid	(S)-Isomer (R)-Isomer	fruchtschädigend schlaffördernd, Antinausa
Opiate	(R,S)-Isomer (S,R)-Isomer	Narkotika (Abhängigkeit!) Hustenmittel
Penicillamin	D-Isomer L-Isomer	Antiarthritikum toxisch
Limonen	(R)-Isomer (S)-Isomer	Orangengeruch Lemonengeruch
Aspartam	(R,R)-Isomer (S,R)-Isomer	süßer Geschmack bitterer Geschmack

Tab.1. Beispiele chiraler Wirkstoffe und ihrer biologischen Effekte (nach White und Subramanian, 1994)

Bei mehr als der Hälfte der organischen Arzneistoffe, die in der European Pharmacopoeia 1997 enthalten waren, handelt es sich um chirale Substanzen (Roth, 1997). Aus pharmakologischer Sicht unterteilt man die Enantiomere eines Arzneistoffes, die unterschiedliche Wirkung zeigen, in das Eutomer, welches die beabsichtigte Wirkung hervorruft, und das unwirksame bzw. das für unerwünschte Nebenwirkungen verantwortliche Enantiomer, das Distomer. Im Fall der Applikation eines Racemates (äquimolares Enantiomerengemisch), von dem nur ein Enantiomer die erwünschte pharmakologische Wirkung hat, wären also fünfzig Prozent als Verunreinigung (Belastung des biologischen Systems) zu betrachten.

Der Einsatz racemischer Gemische ist dementsprechend unerwünscht und kann wie am Beispiel des Thalidomids verheerende Wirkungen haben (Tab.1). Dieses als Contergan 1956 auf den Markt gebrachte Medikament diente als Schlaf- und Beruhigungsmittel. Da es sich als besonders wirksam gegen die morgendliche Übelkeit von schwangeren Frauen erwies, wurde es bevorzugt von diesen eingenommen. Es kam in mehreren tausend Fällen zu Wachstumsstörungen an den Gliedmaßen ansonsten gesunder Kinder, was auf die Wirkung des (S)-Enantiomers zurückzuführen war (Brunner, 1999). Nur das (R)-Enantiomer hatte die gewünschten therapeutischen Wirkungen.

Es ist deshalb unerlässlich, bei der Bioanalyse chiraler Wirkstoffe oder deren Metaboliten zwischen den Stereoisomeren unterscheiden zu können.

1.1.4 Gewinnung von Enantiomeren

Die Erkenntnis differentieller Wirkungen von Xenobiotika-Enantiomeren (Pharmaka, Pestizide, Nahrungs- und Genußmittel, Duft- und Riechstoffe) führte in den entsprechenden Industriezweigen zu einer intensiven Erforschung der Möglichkeiten der Gewinnung von Enantiomeren. Allgemein sind nach Tietze und Eicher (1991) neben der Verwendung optisch reiner Edukte aus der Natur unter anderem folgende Wege beschreibbar:

- ◆ Mechanische Trennung: Dafür sind optimale Bedingungen zur Kristallisation erforderlich. Die erste Enantiomeren-Trennung wird Pasteur zugeschrieben, der 1848 die Kristalle von Natriumammoniumtartrat aufgrund ihrer distinkten kristallinen Erscheinung (rechts- und linkshemiedrisch) bei Temperaturen $<26^{\circ}\text{C}$ manuell sortieren konnte (Brunner, 1999).
- ◆ Biochemische Prozesse: Diese umfassen die Umsetzung prochiraler Verbindungen in biologischen Systemen (Organismen, zellfreie Enzymsysteme oder reine Enzyme), um selektiv ein Enantiomer zu verändern.
- ◆ Differentielle Reaktivität: Der Begriff der asymmetrischen Synthese ist in der Literatur häufig zu finden für Synthesen mit diastereoselektiven Reaktionen (unter Verwendung optisch reiner Hilfsstoffe, die nach Umsetzung wieder abgespalten werden) und enantioselektiven Reaktionen (Umsetzung einer prochiralen Verbindung mit einem optisch aktiven Reagenz, in einem optisch aktiven Lösungsmittel oder mit einem optisch aktiven Katalysator). Traditionell wurden in der chiralen Synthese aus Kostengründen natürliche Quellen genutzt. Neuerdings ist eine Reihe chiraler Agenzien verfügbar, die nicht natürlich gewonnen werden und bei denen daher die Analyse ihrer chiralen Zusammensetzung notwendig wird, um die Industrienormen einer hohen Stoffendproduktreinheit zu erfüllen.
- ◆ Synthese einer racemischen Verbindung mit nachfolgender Racemat-Spaltung.

1.1.5 Chirale HPLC und Kapillarelektrophorese-Trennungen

Das Interesse an der Trennung optischer Isomere (chirale Trennung) ist enorm. Die Anwendung chiraler Trenntechniken ist in so unterschiedlichen Gebieten wie der Analyse von Enantiomeren-Verunreinigung in chiralen Katalysatoren und der Produktcharakteristik zur Bestimmung der Enantiomer-Reinheit bei der Synthese racemischer Verbindungen, in der forensischen Analytik, bei der Erfassung des Gehalts von Wirkstoffen und anderen Xenobiotika in biologischen Flüssigkeiten und Geweben zum Drugmonitoring oder zur Bestimmung der relativen Metabolismusraten und der Verteilung individueller Enantiomere in biologischen Systemen anzutreffen.

Dadurch ergibt sich ein Bedarf an leistungsfähigen Methoden zur Enantiomeren-Analytik.

Neben der Gaschromatographie ist es die Nutzung verschiedener Trennfunktionen der HPLC und Kapillarelektrophorese, die im Laborbetrieb ihren Platz als Routinetechniken gefunden haben.

Die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (englisch: High Performance Liquid Chromatography; **HPLC**) ist im Bereich der Spurenanalytik für nichtflüchtige Substanzen bis heute die Methode der Wahl, die mit hoch empfindlichen Detektoren (z.B. Fluoreszenz- und elektrochemische Detektoren, sowie Massenspektrometer) ausgestattet werden kann. Sie wird u.a. zur Routineanalytik von Arzneimitteln genutzt, hat ihre aber noch größere Bedeutung in der Analytik biologischer Proben.

Die Kapillarelektrophorese (CE) bietet gegenüber der HPLC eine Reihe von Vorteilen. So werden sehr hohe Effizienzen erreicht. Das Trennsystem ist automatisierbar und leicht variierbar. Es sind Trennungen erreichbar für polare ionisierte Verbindungen, deren Analyse in der Umkehrphasen-HPLC Probleme bereitet, aber auch für ungeladene Stoffe.

Viele der in der Kapillarelektrophorese verwendeten Mechanismen der chiralen Trennung konnten aus anderen Techniken wie der HPLC übernommen werden.

Die sich in den letzten Jahren rasch entwickelnde High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE) stellt somit eine Ergänzungstechnik zur HPLC dar. Mit der CE sind aber durch ihre systemimmanente photometrische Detektionsschwäche (sehr kurze Lichtwege; 20-100 μm) keine so geringen Konzentrationen bestimmbar wie in der HPLC. Genau diese niedrigen Nachweisgrenzen sind aber für quantitative Aussagen in der Biologie, Medizin und Pharmakologie von großem Wert.

1.1.6 Pharmakon Fenoterol

Von therapeutischer Relevanz sind β_2 -Adrenozeptor-Agonisten aufgrund ihrer glattmuskulär erschlaffenden Wirkung. Fenoterol ((\pm)-1-(3,5-dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy- α -methylphenethylamino)-ethanol), Abb.3) wird bei chronischen Atemwegserkrankungen (Asthma bronchiale), zur Erweiterung der Bronchien (Broncholytikum) und zur Erschlaffung der Uterus-Muskulatur bei vorzeitig einsetzenden Wehen (Tocolytikum) eingesetzt (Forth et al., 1992; Gleiter, 1999). Das chirale Fenoterol kommt therapeutisch als (*RR,SS*)-Racemat zum Einsatz, ist es doch 9-20fach effektiver als das (*RS,SR*)-Enantiomerenpaar (Beale und Stephenson, 1972). In Analogie zu anderen direkt wirkenden β -Sympathikomimetika repräsentiert das (*RR*)-(-)-Enantiomer die pharmakologisch aktive Komponente (Ruffolo, 1991).

Die kennzeichnende Grundstruktur von β -Adrenorezeptor-Agonisten besteht in einem mit einer Ethylaminogruppe substituierten Benzenring, wie er auch bei den natürlich vorkommenden sympathischen Neurotransmittern Adrenalin und Noradrenalin anzutreffen ist. Wie auch das wirksamere synthetische Äquivalent Isoprenalin zeigt Adrenalin eine unselektive Stimulierung von β_1 - und β_2 -Rezeptoren. Um die unerwünschten Nebeneffekte bei Stimulierung von β_1 -Sympathikomimetika am Herzen (Erhöhung der Herzschlagfrequenz und des Pumpvolumens) zu vermeiden, wurde die Gruppe der β_2 -Sympathikomimetika entwickelt. Mit der Umwandlung der Catechol- in eine Resorcinol-Struktur und der Einführung sperriger Aminosubstituenten (tertiäre Butylgruppe bei Salbutamol und Terbutalin sowie *p*-Hydroxyphenyl-Isopropylrest bei Fenoterol) kommt es zu einer β_2 -Rezeptor-Spezifität (Hochhaus und Möllmann, 1992). In-vitro-Vergleiche verschiedener β_2 -Sympathikomimetika an isolierten Meerschwein-Heerden (β_1 -Adrenozeptoren) und -tracheen (β_2 -Adrenozeptoren) zeigten zum Beispiel, daß Isoproterenol gleiche Affinität zu β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren besitzt, Orciprenalin schon selektiver für β_1 -Adrenozeptoren, Fenoterol (dem 4-hydroxyphenyl-Derivat von Orciprenalin) aber 59fach und Salbutamol 107fach selektiver

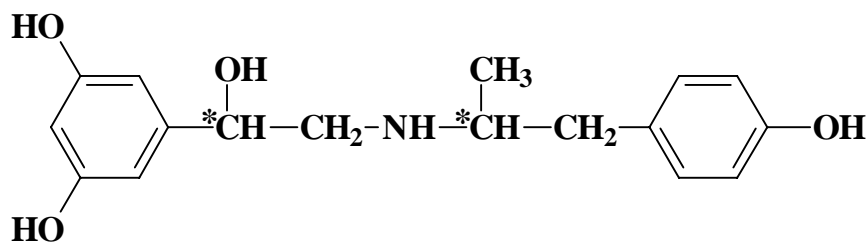


Abb.3. Strukturformel des Fenoterols. * Chiralitätszentren.

für β_2 -Adrenozeptoren ist. Heute scheint die Entwicklung in Richtung hydrophober β_2 -Sympathikomimetika wie Formoterol, Salmeterol und Bambuterol mit länger anhaltender Wirkung zu gehen (Handley et al., 1998).

Im Vergleich zu Parasympathikolytika, Theophyllin und Glucocorticosteroiden (z.B. fördert Cortisol die Bildung von Dopa aus Tyrosin (Tyrosinhydroxylase-Aktivität) und Adrenalin aus Noradrenalin (Phenylethanolamin-N-Methyl-Transferase-Aktivität)) als therapeutischen Mitteln besitzen Sympathikomimetika den Vorteil der sofortigen Wirkungsentfaltung, was bei Erkrankungen der Luftwege lebenserhaltend sein kann.

Das geklonte menschliche β_2 -Adrenozeptor-Gen auf Chromosom 5 kodiert ein Protein, das aus 413 Aminosäuren besteht (wobei nur 54 % auch bei β_1 -Adrenozeptoren vorzufinden sind). β_2 -Adrenozeptoren gehören einer Rezeptor-Superfamilie an, die durch das Auftreten von 7 lipophilen Transmembrandomänen charakterisiert ist. Die Agonisten passen sich in eine Lücke zwischen den Transmembransegmenten des Rezeptors ein und interagieren mit den Transmembran-Helices II und IV. Das intrazelluläre Segment wiederum interagiert mit einem G-Protein (stimulierendes guaninnukleotidbindendes Protein), welches die Verbindung von Rezeptoraktivierung zur Adenylatcyclase herstellt. Über die Wirkung von cAMP wird die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration durch Steigerung des Efflux in den Extrazellularraum und wahrscheinlich auch durch Hemmung der Aufnahme sowie durch Aktivierung der endoplasmatischen Ca^{2+} -Transport-ATPase gesenkt. Die Folge ist ein verminderter Phosphorylierungsgrad des Leichtketten-Myosins; die glatte Muskulatur (vaskular, gastrointestinal, broncheal und tracheal sowie genitourinal) erschlafft.

Am Cardiomyozyten, an der glatten Muskelzelle und Skelettmuskelzelle steigern β_2 -Sympathikomimetika, über cAMP-abhängige Proteinkinase vermittelt, die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase. Die Folge ist ein erhöhter Na^+ -Gradient, der über einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration vermindert. Dies wirkt an Herz- und glatter Muskelzelle zusätzlich erschlaffend. Der gleiche Effekt an der Skelettmuskulatur führt wegen deren großer Masse zu Hypokaliämie (Forth et al., 1992). Die metabolischen Folgereaktionen einer Stimulierung von β_2 -Sympathikomimetika in anderen Zellen (gesteigerte Lipolyse und Glykoneogenese) sind letztlich Ausdruck einer β -sympathomimetisch induzierten Bereitstellung chemischer Energie.

1.1.7 Analyt Fenoterol

In der Fachliteratur finden sich nur in begrenztem Rahmen pharmakokinetische Informationen, hauptsächlich aufgrund der geringen therapeutischen Konzentrationen von unter 300 pg/mL, die in der Humanmedizin zum Einsatz kommen (Leferink et al., 1982).

Bis heute ist der von Rominger et al. (1990) entwickelte **Radioimmuntest (RIA)** zur Bestimmung der Konzentration von rac. Fenoterol in biologischen Proben von bis zu 10 pg/mL die nachweisempfindlichste Methode.

Darüber hinaus gibt es noch einige Arbeiten zur Erfassung von Fenoterol mit massenspektrometrischer Detektion gekoppelt mit **Gaschromatographie (GC)** (Leferink et al., 1982; Brandts et al., 1982; Leyssens et al., 1991; Montrade et al., 1993; André et al., 1994; Couper und Brunner, 1996; Russo und Neri, 1997; Montrade et al., 1997; Ternes et al., 1998; Black und Hansson, 1999; Bakhtiar, 1999), **superkritischer Fluid-Chromatographie (SFC)** (Jones et al., 1999) und **HPLC** (Doerge et al., 1995, Ternes et al., 1998).

Achirale Methoden zur Fenoterol-Erfassung in der HPLC mit elektrochemischer Detektion (Tan und Soldin, 1984; Koster et al., 1985), UV-Detektion (Koster et al., 1986; Ackermans et al., 1992; Jacobson und Peterson, 1994; Hamoir et al., 1994; Poletini et al., 1995; Basly und Bernard, 1997; Hanna et al., 1998) und Fluoreszenzdetektion (Kuhlmann, 1998; Kramer und Blaschke, 2001) sind zahlreich.

Im Gegensatz dazu sind stereoselektive Methoden zur Erfassung der (*RR,SS*)-Enantiomere des Fenoterols erst in jüngerer Zeit in den Applikationslisten einiger Firmen zu finden. Die Firma Astec Inc. entwickelte eine Säule, bei der das Antibiotikum Vancomycin an Kieselgel gebunden ist (Chirobiotic V; Beesley, 1999), bei der von Chromtech Inc. angebotenen Säule handelt es sich um das Cellobiohydrolase-Enzym gebunden an Kieselgel (Chiral-CBH; Hermansson, 2001).

In der **Kapillarelektrophorese (CE)** wurden mittels Kapillarzonenlektrophorese (CZE) und Isotachophorese (Ackermans et al., 1992) sowie micellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) (Hanna et al., 1998) die Racemate des Fenoterols erfassbar. Durch den Einsatz chiraler Selektoren gelang auch die Enantiomeren-Trennung (anionisches Cyclodextrin (CD)-Derivat Sulfobutylether- β -CD und γ -CD-Phosphat, Tanaka et al., 1996; AGP, Tanaka und Terabe, 1997; HP- β -CD immobilisiert in PEG-Gel, de Boer et al., 1999).

1.1.8 Derivatisierungstarget Fenoterol

Chirale Trenntechniken lassen sich formal in zwei Gruppen teilen:

- ◆ Trennung der Enantiomere auf einer chiralen stationären Phase (CSP) oder auf achiralen Phasen mit chiralen Additiven in der mobilen Phase durch **temporäre Diastereomerenbildung** und
- ◆ Trennung der nach Synthese mit einem anderen Enantiomer durch Einführung eines weiteren Chiralitätszentrums entstandenen **stabilen Diastereomere** auf achiralen Phasen.

Für Studien der Arzneistoff-Wirkung in biologischen Systemen sind hochempfindliche Trennverfahren notwendig, die den spurenanalytischen Nachweis der Substanzen erlauben.

Die Detektierbarkeit von Substanzen kann durch Vor- oder Nachsäulen-Derivatisierung verbessert werden. Bei der Nachsäulenderivatisierung wird in der HPLC das Eluat einer Säule vor dem Eintritt in den Detektor mit einer Lösung des Derivatisierungsreagenzes durch Zupumpen gemischt. Das erfordert eine schnelle und quantitative Reaktion, um eine durch Verdünnungseffekte hervorgerufene Peakverbreiterung und damit Verschlechterung der Trennleistung zu vermeiden (Wintersteiger, 1988).

Zu Trennmethoden, die auf indirekter Trennung von Enantiomeren durch Vorsäulenderivatisierung, d.h. der Derivatisierung vor dem chromatographischen Prozeß mit chiralen Reagenzien beruhen, sind mehrfach Übersichtsartikel veröffentlicht worden (Ahnhoff und Einarssen, 1989; Skidmore, 1993). Aber auch der Einsatz achiraler Reagenzien erfordert das Vorhandensein derivatisierbarer Gruppen. Zahlreiche Reagenzien stehen zur Umsetzung an den hauptsächlich in Wirkstoffen gefundenen Amino-, Hydroxyl- und Carboxylgruppen zur Verfügung (Imai und Toyooka, 1988; Nocter, 1994; Bardelmeijer et al., 1998).

Fenoterol und andere Aminoalkohole als bifunktionale Substanzen besitzen mit der Aminogruppe eine leicht zu derivatisierende Gruppe.

Fluorogene achirale und chirale Vertreter der hohe Reaktivität aufweisenden Derivatisierungsreagenzienklassen der Chloroformiate und Isocyanate wurden für die stereoselektive und sensitive Detektion von Fenoterol nach Vorsäulenderivatisierung ausgewählt.

1.2 Pharmakokinetische Modelle

Die in der Pharmakologie behandelten Wechselwirkungen zwischen körperfremden Stoffen (Pharmaka, Wirkstoffe) und Organismen (biologische Systeme) lassen sich je nach Gesichtspunkt in zwei Aspekte aufschlüsseln. Während die Einflüsse des Pharmakons auf den Organismus unter dem Begriff **Pharmakodynamik** zusammengefaßt werden, beschreibt die **Pharmakokinetik**, wie das biologische System mit dem Wirkstoff umgeht (Forth et al., 1992).

Mit Hilfe verschiedener pharmakokinetischer Modelle wird versucht, die vielfältigen und komplexen Funktionen des Organismus in einer vereinfachten Form darzustellen und so einer kinetischen Betrachtungsweise zugänglich zu machen. Die Darstellung des Körpers erfolgt dabei im Sinne unterschiedlicher hypothetischer Verteilungsräume (**Verteilungsvolumen, V**) mit verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweberäumen (Rietbrock und Weiss, 1996; Gugeler und Klotz, 2000).

Das Verteilungsvolumen ist eine hypothetische Größe, um physiologische Verteilungsvorgänge von Pharmaka einer mathematischen Beschreibung und Berechnung zugänglich zu machen (Klotz, 1984). Das scheinbare Verteilungsvolumen eines Wirkstoffs vermittelt als Proportionalitätskonstante den Zusammenhang zwischen der im Körper vorhandenen Menge und der gemessenen Plasmakonzentration.

Das Verteilungsvolumen ist das Volumen, in dem sich die Wirkstoffmenge verteilen müßte, um diese Konzentration zu erzeugen. Daraus ergibt sich die fiktive Natur dieser Größe. Aufgrund der Dynamik der Verteilung im Körper ist V eine Funktion der Zeit.

Konstante Werte werden nach Bolusinjektion nur in der terminalen Gleichgewichtsphase der Verteilung erreicht, in der $A(t)$ und $c(t)$ exponentiell mit der gleichen Abklingkonstanten abfallen, so daß V_z (terminales Verteilungsvolumen) konstant bleibt:

$$V_z = A(t)/c(t)$$

und im stationären Zustand nach Dauerinfusion (steady state-Verteilungsvolumen V_{ss}), da im steady state die Menge im Körper (A_{ss}) und die Konzentration (c_{ss}) zeitlich konstant sind:

$$V_{ss} = A_{ss}/c_{ss}$$

Das Verteilungsvolumen V_{ss} ist durch das Blutvolumen V_b , die Organvolumina V_i und die Gewebe-Plasma-Verteilungskoeffizienten k_i bestimmt:

$$V_{ss} = V_b + \sum_i k_i V_i$$

So wird bei einem Wirkstoff, der stark an Blutbestandteile bindet, V klein, während ein großes V meist dann vorliegt, wenn diese Bindung gering ist. V ergibt sich aus dem Produkt der Flußrate (Q) des Blutes und der **mittleren Transitzeit (MTT)**:

$$V = MTT Q$$

Die mittlere Verweildauer drückt die Zeit aus, in der im statistischen Mittel die Wirkstoffmoleküle im Körper verweilen.

Die MTT kann bei beliebiger Applikationsart aus der Konzentrations-Zeit-Kurve berechnet werden:

$$MTT = AUMC/AUC$$

AUMC wird auch als 1. Kurvenmoment bezeichnet und ist definiert als die Fläche unter der Momentkurve $tc(t)$

$$AUMC = \int_0^{\infty} c(t) dt$$

MTT ist modellunabhängig. Die statistische Definition der mittleren Verweildauer wird verständlich, wenn man hypothetisch nur eine kleine Zahl von Molekülen betrachtet. Werden z.B. 10 Moleküle appliziert und besitzt jedes Molekül eine zufällige Verweilzeit t_i , dann wäre die mittlere Verweildauer:

$$MTT = (t_1+t_2+t_3+\dots+t_{10})/10$$

Sowohl die mittlere Verweildauer (MTT) als auch die Varianz (VTT) stellen die wichtigsten Maßzahlen der Verweilzeitverteilung dar (Weiss, 1990). Das Quadrat des Variationskoeffizienten (CV^2) wird als relative Dispersion bezeichnet und ist als Streuungsmaß von Bedeutung (Weiss, 1990, 1997):

$$CV^2 = VTT/MTT^2$$

Die zur Berechnung der pharmakokinetischen Grundparameter benötigten modellunabhängigen Größen AUC und AUMC können im Prinzip durch numerische Integration berechnet werden (**Trapezregel**).

Das Konzentrations-Zeit-Profil besteht aus Konzentrationsmeßwerten c_i ($i=1,2,\dots,n$), die zu den Zeitpunkten t_i gemessen werden, d.h. $c_i=c(t_i)$. Dabei sei t_1 der Zeitpunkt der ersten und t_n der letzten Probenahme. Für Trapeze zwischen zwei aufeinanderfolgenden Punkten t_i und t_{i+1} gilt:

$$AUC_{t_i,t_{i+1}} = 1/2(c_i+c_{i+1})(t_{i+1}-t_i)$$

woraus man die Fläche unter der Kurve von t_1 bis t_n erhält:

$$AUC_{0,t_n} = \sum_{i=1}^{n-1} 1/2(c_i + c_{i+1})(t_{i+1} - t_i)$$

Man erhält die Restfläche unter der Kurve von t_n bis ∞ z.B. aus der terminalen Dispositionskonstanten λ_z und damit die $AUC_{0,\infty}=AUC$:

$$AUC = AUC_{0,t_n} + c_n/\lambda_z.$$

Für AUMC gilt entsprechend:

$$AUMC_{0,t_n} = \sum_{i=1}^{n-1} 1/2(c_i t_i + c_{i+1} t_{i+1})(t_{i+1} - t_i) + c_n(t_n / \lambda + 1 / \lambda z^2)$$

Die terminale Dispositionskonstante λ_z wird durch lineare Regression zwischen den logarithmisch transformierten Konzentrationen und der Zeit bestimmt. Man nimmt dazu mindestens die drei letzten Konzentrations-Zeit-Werte (über dem Detektionslimit der Analytik für die Konzentrationsbestimmungen).

Es gibt Computerprogramme, die diese Arbeit erledigen. Gleichzeitig können solche Computerprogramme die Dispositionskurven an bestimmte Funktionen mittels nichtlinearer Regression anpassen, d.h. die Parameter der Funktion abschätzen.

Bei einem Einkompartimentmodell wird der Körper als ein einziges Kompartiment mit dem Verteilungsvolumen V behandelt, in dem sich der Wirkstoff nach Bolusinjektion augenblicklich verteilt und dabei die Initialkonzentration c_0 erzeugt. Die Konzentration fällt dann monoexponentiell ab. Obwohl das in den meisten Fällen eine unzulässige Vereinfachung darstellt, da es den Einfluß der Verteilung im Körper auf die Form der Dispositionskurve völlig vernachlässigt, wird dieses Modell wegen seiner einfachen Beschreibung oft angewendet.

Für die **monoexponentielle Dispositionskurve** im Falle des Einkompartimentsystems gilt also:

$$c(t) = c_0 \exp(-\lambda t)$$

Generell entspricht die Anzahl der Kompartimente der Anzahl der Exponentialterme in den beobachteten Dispositionskurven. Letztlich ist das Kompartimentkonzept nur ein theoretisches Hilfsmittel zur Charakterisierung der Verteilungsdynamik; deshalb könnte man anstelle von Ein- und Mehrkompartimentmodellen auch von Modellen mit augenblicklicher und verzögerter Einstellung der Gleichgewichtsverteilung sprechen.

Monoton fallende Dispositionskurven nach Bolusinjektion lassen sich durch eine Summe von Exponentialfunktionen beschreiben:

$$c(t) = \sum_{i=1}^n B_i \exp(-\lambda_i t)$$

In den meisten Fällen ist der Vorgang schon mit einer **Biexponentialfunktion**:

$$c(t) = A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t), \quad \alpha > \beta,$$

ausreichend charakterisiert, weshalb diese Funktion als Standardfunktion für die Auswertung von Dispositionskurven gilt. Dabei ist die Abklingkonstante $\lambda_z = \beta$ und die Halbwertszeit $t_{1/2,z} = 0,693/\beta$. Die terminale Phase wird deshalb auch als β -Phase bezeichnet.

Über die Optimierung der Modellierungen für einzelne Organe (**Organmodell**) soll der Körper als Gesamtheit besser verstanden werden. Die experimentelle Grundlage auf diesem Weg bilden neben Arbeiten mit Zellkulturen häufig perfundierte Organe. Diese sind entweder ganz vom Körper isoliert (isoliert perfundierte Organe) oder aber, im Körper verbleibend, nur von zu- und ableitenden Gefäßen getrennt (*in situ*-perfundierte Organe). Die Flußraten (Q) des Perfusats durch die Organe, die zu verabreichende Dosis (D) und der resultierende Konzentrations-Zeit-Verlauf $c(t)$ lassen sich so einfach kontrollieren (Abb. 4).



Abb.4. Schematische Darstellung der theoretischen Grundlagen für perfundierte Organe.

Die verschiedenen Organmodelle versuchen die Ereignisse zwischen dem Verabreichen einer definierten Dosis (Bolusinjektion; Input) und dem zu messenden Output $c(t)$ zu modellieren (Abb. 5). Die Modelle unterscheiden sich dabei in der Vorstellung des zu untersuchenden Systems und der daraus resultierenden mathematischen Umsetzung.

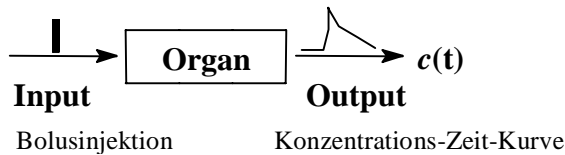


Abb.5. Grundlagen der Organmodelle.

Von einfachen Modellen ausgehend wurden immer komplexere entwickelt, die die Abläufe im Körper zunehmend besser beschreiben. Das „well-stirred“- Einkompartimentmodell geht davon aus, daß es zu einer sofortigen Verteilung des Wirkstoffs im Kompartiment kommt, was als Vereinfachung unzulässig ist. Im Lebermodell der „parallelen Röhren“ wird dem Konzentrationsgefälle innerhalb der Sinusoiden, die wiederum aus einschichtigen Hepatozyten umgeben sind, Rechnung getragen. Der Konzentrationsausgleich auch zwischen den Sinusoiden schließlich fließt im Dispersionsmodell mit ein. Um Hepatozyten-Bindungsstellen, die für das nichtsteroidale Antiphlogistikum Diclofenac gefunden worden sind (Kuhlmann, 1998), einer mathematischen Beschreibung zugänglich zu machen, wurde das Bindungsmodell (Weiss et al., 1998) entwickelt, das sich an der perfundiert isolierten Leber als Organmodell als vorteilhaft erwiesen hat.

Für das chiral vorliegende β_2 -Sympathikomimetikum Fenoterol sollte eine sensitive Analytik etabliert werden, die es erlaubt, pharmakokinetische Untersuchungen in einem stereoselektiven Kontext durchführen zu können. Die Entwicklung dieser Methode war dabei primär auf eine experimentelle Anwendung am isoliert-perfundierte Rattenherz ausgerichtet. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit der Analyse in Plasmaproben zu geplanten Untersuchungen der plazentalen Enantiomeren-Verteilung aufgezeigt werden.