

CHROM. 14,293

SELEKTIVE GRUPPENTRENNUNG VON PRIMÄREN UND SEKUNDÄREN BIOGENEN AMINEN MITTELS "REVERSED-PHASE" HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE MIT [18]KRONE-6 IN DER MOBILEN PHASE

MANFRED WIECHMANN

Universität Bayreuth, Lehrstuhl für Tierphysiologie, Postfach 3008, D-8580 Bayreuth (B.R.D.)

(Eingegangen am 12. August 1981)

SUMMARY

Selective group separation of primary and secondary biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography with 18-crown-6 in the mobile phase

A high-performance liquid chromatographic procedure is described for the selective group separation of primary and secondary biogenic amines. The procedure is based on the selective formation of complexes of primary amines with 18-crown-6 and the high affinity of the ammonium-18-crown-6 complexes on the hydrophobic phase in the two-phase system reversed phase/0.01 *N* hydrochloric acid-18-crown-6. It is shown that the degree of the group separation is dependent on the characteristics of the reversed phase and on the concentration of the crown ether.

EINLEITUNG

Die Chromatographie von nativen biogenen Aminen, insbesondere von Noradrenalin und Adrenalin, mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde wiederholt beschrieben¹⁻³². Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich im wesentlichen dadurch, dass verschiedene Phasen (Ionenaustauscher, Kieselgel, "Reversed-Phase", "Reversed-Phase"/Ionenpaar) in Kombination mit mehreren Messverfahren (UV-Spektroskopie^{3,4,6}, Fluorometrie^{1,2,7-16,18-20}, Elektrochemische Detektion^{17,21-32}) angewandt wurden. Dabei handelte es sich immer um eine chromatographische Trennung der verschiedenen biogenen Amine untereinander. Eine selektive chromatographische Gruppentrennung von primären und sekundären biogenen Aminen wurde unseres Wissens bisher nicht mitgeteilt.

In dieser Arbeit wird die selektive Gruppentrennung der sekundären biogenen Amine Adrenalin, Metanephrin, *p*-Synephrin, *m*-Synephrin, Epinin und N-Methylserotonin von den entsprechenden N-demethylierten primären biogenen Aminen Noradrenalin, Normetanephrin, *p*-Octopamin, *m*-Octopamin, Dopamin und Serotonin an einer Reversed-Phase-Säule mit [18]Krone-6* im wässrigen Eluenten demon-

* Beim Arbeiten mit [18]Krone-6 ist besondere Sorgfalt geboten, da die Substanz sehr toxisch ist⁷⁹.

striert. Diese Trennung beruht darauf, dass die relativen Retentionszeiten der primären und sekundären Amine zueinander durch [18]Krone-6 extrem verändert werden. Während normalerweise die polareren primären Amine vor den entsprechenden N-Methyl-Verbindungen eluiert werden, haben in Gegenwart von [18]Krone-6 im Eluenten die sekundären Amine die kürzeren Retentionszeiten.

Die starke Retardierung der primären biogenen Amine beruht auf der hohen Affinität eines [18]Krone-6-aminhydrochlorid-Komplexes zur Reversed-Phase, der sich ausschliesslich mit den primären und nicht mit den sekundären biogenen Aminhydrochloriden bildet. Die erhöhte Retention der primären Amine ist abhängig von der Lipophilie der Reversed-Phase und von der Konzentration des [18]Krone-6 im Eluenten. Entsprechend kann die Qualität der Gruppentrennung an den unterschiedlichsten analytischen Problemen gezielt orientiert werden.

MATERIAL UND METHODEN

Geräte

Das HPLC System bestand aus einer Altex-Pumpe (Modell 110 A), gekoppelt mit einem Pulsationsdämpfer (Altex, Modell 110-40), einem Einlassventil (Rheodyne Modell 71020) mit 100 μ l Probenschleife, einer Stahlchromatographiefertigsäule (Länge: 250 mm, I.D.: 4,6 mm, gefüllt mit RP-2- (10 μ m, Nr. 103.07.15) bzw. mit RP-8-Material (7 μ m, Nr. 103.07.13) (H. Knauer, Oberursel, B.R.D.) und einem Aminco-Bowman (SPF)-Fluorometer (J4-8960E) in Verbindung mit dem Mikrophotometer J10-222 A (American Instrument).

Die native Fluoreszenz der biogenen Amine wurde in einer 25- μ l Durchflussküvette (Nr. 176.70, Hellma, Mühlheim/Baden, B.R.D.) bei 285 nm (Anregung) und 325 nm (Emission) gemessen. Chromatographiert wurde bei Raumtemperatur (20–25 C). Die Fliessgeschwindigkeit des Eluenten ist bei den Abbildungen angegeben. Zur Aufzeichnung der Chromatogramme diente ein Linearkompensationsschreiber (Modell 385, Abimed, Düsseldorf, B.R.D.) und zur Bestimmung der Retentionszeiten ein Integrator (Modell 3380 A, Hewlett-Packard). Der Papiervorschub betrug 0,5 cm/min.

Chemikalien

Alle biogenen Amine wurden kommerziell erworben. Serotoninsulfat stammte von E. Merck (Darmstadt, B.R.D.), *m*-Synephrin (L- β -3-(Hydroxyphenyl)- β -hydroxyäthylmethylamin), *m*-Octopamin (L- β -3-(Hydroxyphenyl)- β -hydroxyäthylamin), N-Methylserotonin von Serva (Heidelberg, B.R.D.), und Adrenalin, Noradrenalinhydrochlorid, Dopaminhydrochlorid, Epinin (N-Methyldopamin)hydrochlorid, 3-O-Methyldopamin (3-Methoxytyramin)hydrochlorid, *p*-Synephrin, *p*-Octopaminhydrochlorid, Normetanephrinhydrochlorid, Metanephrinhydrochlorid von Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.).

Für die Chromatographie und zum Lösen der Substanzen wurde deionisiertes Wasser (Milli-Q; Millipore, Neu-Isenburg, B.R.D.) verwendet. Als Basiseluent diente 0,01 N Salzsäure (Titrisol, E. Merck); [18]Krone-6 stammte von Fluka (Buchs, Schweiz).

Das für die Lösungen der Amine und den Eluenten benötigte Wasser wurde 1 h am Wasserstrahlpumpenvakuum, die Lösungen vor Gebrauch im Ultraschallbad (Modell 58.000, H. Knauer) entgast.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Seit der grundlegenden Arbeit über die Komplexierung von Metallionen mit Kronenethern von Pedersen³³, und deren Einführung in die Phasentransfer-Katalyse (PTC) in verschiedene Bereiche der präparativen organischen Chemie zwischen 1972 und 1974 durch einige Arbeitsgruppen^{34–39}, hat die PTC eine stürmische Entwicklung genommen. Einige zusammenfassende Darstellungen informieren hierüber^{40–48}. In die Chromatographie wurden die Kronenether von Blasius und Mitarbeiter^{49–52} sowie Cram und Mitarbeiter^{53–55} eingeführt. Sie benutzen covalent an Kieselgel^{52,55}, Ionenaustauscher^{49,52} oder Polystyrolharze⁵⁴ gebundene Kronenether zur flüssigkeitschromatographischen Trennung von Alkali-, Erdalkali- und anderen Metallionen^{49–52}, zur Trennung einfacher alkylsubstituierter und strukturisomerer Ammoniumionen⁴⁹, zur Trennung verschiedener organischer Verbindungen (Halogenbenzole, Vitamine, Penicilline, Heterocyclusen und Digitalisglykosiden)⁵⁰ sowie zur Trennung der Enantiomere von racemischen α -Aminosäuren^{51,53–55} und α -Phenyläthylaminsalzen⁵⁵ in organischen Lösungsmitteln.

Bei der Trennung der Enantiomere in die optisch reinen Isomere wirken die covalent fixierten optisch aktiven Kronenether als chirale Molekülrezeptoren. Diese sogenannten abiotischen Rezeptoren sind als Modellsubstanzen zur Untersuchung des Erkennungsvermögens biologischer Rezeptoren bedeutungsvoll. Neuere Übersichten geben hierüber Auskunft^{56,57}.

Über die Verwendung monomerer Kronenether in organischen Lösungsmittelgemischen als Elutionsmittel in der Ionenaustauscherchromatographie⁵⁸ oder an Kieselgel⁵³ wurde gleichfalls berichtet. Horváth *et al.*⁵⁹ sowie Brugman und Kraak⁶⁰ erweiterten den Anwendungsbereich für monomere Kronenether in der Flüssigkeitschromatographie. Sie chromatographierten Kronenetheralkalikomplexe in Methanol an Reversed-Phase-Säulen⁵⁹ oder benutzten Kronenetherkaliumkomplexe zur Komplexierung der Anionen $R-SO_3^-$ (Lit. 60). Dadurch ist die Löslichkeit von Nitro- und Halogenbenzolsulfonsäuren in Methylenchlorid-Methanol-Gemischen für die Chromatographie an Kieselgel erhöht worden. Kürzlich berichteten Nakagawa *et al.*⁶¹ über das Retentionsverhalten von aromatischen primären Aminoverbindungen an einer Reversed-Phase-Säule mit wässrigem Methanol-Kronenether-Gemischen als mobiler Phase. In Abhängigkeit von der Kronenetherkonzentration ermittelten sie für isomere Aminobenzoesäuren, Benzoesäureamide, isomere Toluidine und einige α -Aminocarbonsäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan) die Kapazitätsfaktoren.

In dieser Arbeit berichten wir erstmals über die Komplexierung von primären biogenen Aminhydrochloriden und [18]Krone-6 aus rein wässriger Lösung in dem Zweiphasensystem Reversed-Phase/0,01 *N* Salzsäure-[18]Krone-6 und über die Anwendung dieses Systems zur selektiven chromatographischen Gruppentrennung von primären und sekundären biogenen Aminen.

Bereits Pedersen³³ zeigte, dass einfache primäre Alkylaminhydrochloride in Methanol mit Dibenzo-[18]Krone-6 zu komplexieren sind, während die Hydrochloride des cyclischen sekundären Amins Morpholin und der tertiären Amine Tetramethylamin, *N*-Methylmorpholin und 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan keine Komplexe mit dem verwendeten Kronenether bilden. Die Messungen von Izatt *et al.*⁶² stehen der Allgemeingültigkeit dieser Ergebnisse entgegen. Sie bestimmten die Stabilitätskonstanten von [18]Krone-6-ammoniumkomplexen und fanden, dass diese von Kom-

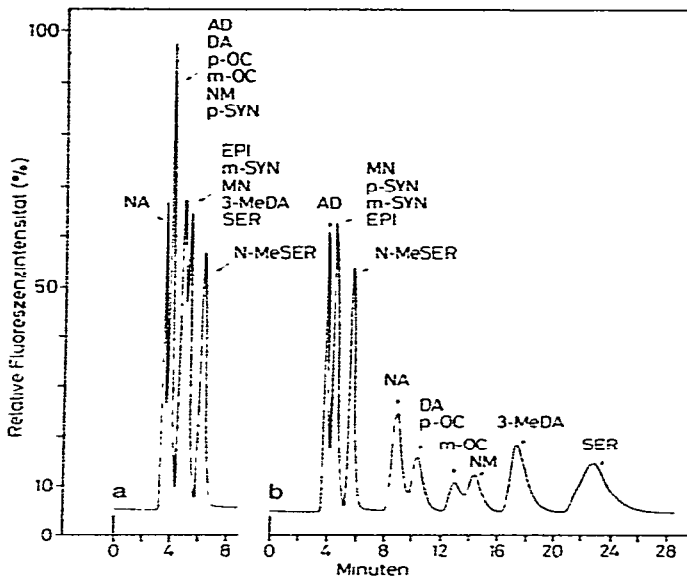


Fig. 1. Chromatogramme eines Standardgemisches von primären und sekundären Aminen: NA = Noradrenalin, AD = Adrenalin, NM = Normetanephrin, MN = Metanephrin, p-OC = *p*-Octopamin, p-SYN = *p*-Synephrin, m-OC = *m*-Octopamin, m-SYN = *m*-Synephrin, DA = Dopamin, 3-MeDA = 3-O-Methyldopamin, EPI = Epinin, SER = Serotonin, N-MeSER = N-Methylserotonin. Je 1 nMol/100 μ l Applikationslösung an einer RP-2-Säule. (a) Elutionsdiagramm mit 0.01 *N* Salzsäure. (b) Elutionsdiagramm mit 0.01 *N* Salzsäure-[18]Krone-6 (5 g/l). Die Säule wurde 4 h äquilibriert. Die Fließgeschwindigkeit betrug bei der Äquilibrierung und bei der Chromatographie 1.0 ml/min. Weitere Einzelheiten siehe Material und Methoden.

plexen mit sekundären Aminen (Pyrrolidinhydrojodid, Dimethylaminhydrojodid) in absolutem Methanol gegenüber Komplexen mit primären Alkylaminhydrojodiden (Methyl-, Äthyl-, Propyl- und *tert*-Butyl-) um *ca.* 1 bis 2 Größenordnungen kleiner sind.

Aus dem Vergleich der Chromatogramme in Fig. 1 ergibt sich, dass in dem Zweiphasensystem Reversed-Phase, rein wässrige Lösung die selektive Komplexbildung von [18]Krone-6 mit primären Aminhydrochloriden im Sinne Pedersens gilt. Fig. 1a zeigt, dass die Retentionszeiten der verschiedenen Amine mit ihrer Polarität korreliert sind, wenn sie an einer RP-2-Säule mit 0.01 *N* Salzsäure als Eluenten chromatographiert werden. In Gegenwart von [18]Krone-6 im Eluenten zeigt die Gruppe der primären Amine gegenüber der Gruppe der sekundären Amine ein extrem verändertes Retentionsverhalten (Fig. 1b). Die sekundären Amine Adrenalin, Metanephrin, *p*-Synephrin, *m*-Synephrin, Epinin und N-Methylserotonin werden generell etwas schneller eluiert. Wir führen dies auf den —gegenüber 0.01 *N* Salzsäure— stärkeren Eluenten 0.01 *N* Salzsäure-[18]Krone-6 zurück. Die primären Amine Noradrenalin, Normetanephrin, *p*-Octopamin, *m*-Octopamin, Dopamin und Serotonin —die jeweils N-demethylierten Substanzen der verwendeten sekundären Amine— sowie 3-O-Methyldopamin, haben dagegen eine wesentlich verlängerte Retentionszeit, die aus der Komplexbildung des primären Aminsalzes mit dem Kronenether resultiert. Für eine Komplexbildung der sekundären Amine ergibt sich aus dem Retentionsverhalten

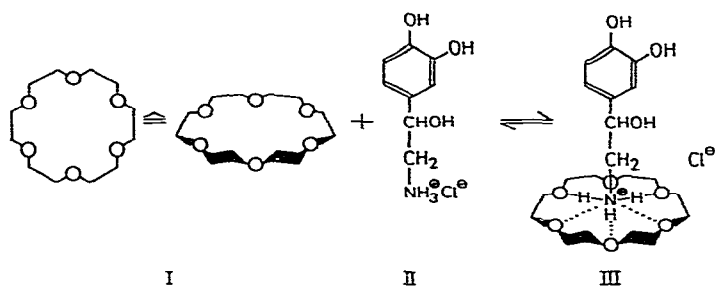


Fig. 2. Komplexbildung zwischen [18]Krone-6 und Noradrenalinhydrochlorid. Die Strukturen des [18]-Krone-6 (I) und des mit Noradrenalinhydrochlorid (II) gebildeten [18]Krone-6-noradrenalinhydrochlorid-Komplexes (III) sind idealisiert (vergl. hierzu Lit. 64, 65). Die punktierten Linien illustrieren die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen Aminkation und Sauerstoffatomen des Kronenethers —eine Kraftlinie ist durch die $-\text{CH}_2-\text{N}$ -Bindung in der Zeichnung verdeckt— sowie die drei Wasserstoffbrückenbindungen im Komplex.

dieser Substanzklasse kein Hinweis, und dies trotz der Tatsache, dass die stationäre Phase bei der Chromatographie gegenüber dem von Izatt *et al.*⁶² verwendeten absoluten Methanol eine wesentlich stärkere Lipophilie aufweist.

In Fig. 2 ist die idealisierte Struktur des [18]Krone-6-noradrenalin-Komplexes als Beispiel für die Kronenetherkomplexe der biogenen primären Amine wiedergegeben. Die Struktur entspricht den Vorstellungen von Pedersen³³, Cram und Cram⁵⁷, Kyba *et al.*⁶³ und Timko *et al.*⁶⁴ vom Aufbau der Kronenetherammoniumkomplexe und deren Bestätigung durch die Bestimmung der Kristallstruktur des [18]Krone-6-ammoniumhydrobromids durch Nagano *et al.*⁶⁵. Innerhalb des 1:1-Komplexes steht das komplexierte Aminhydrochlorid senkrecht auf dem annähernd plan liegenden Kronenether, wobei die NH_3^+ -Gruppe desamins über dem Zentrum der Kronenverbindung fixiert ist. Als punktierte Linien sind die elektrostatischen Anziehungskräfte eingezeichnet, die sich aufgrund der Dipol-Dipol- und Ionen-Dipol-Wechselwirkungen zwischen den Wasserstoffatomen der NH_3^+ -Gruppe sowie dem Aminkation und den einsamen Elektronenpaaren der Sauerstoffatome des Kronenethers ausbilden. Sie bedingen die Stabilität des Komplexes und halten das Aminkation in seiner Position. Das Volumen der NH_3^+ -Gruppe ist zu gross —Ionenradius von NH_4^+ (im Kristall) = 2.86 Å (Lit. 40)— um die Kronenetherhöhle vollständig auszufüllen, die im [18]Krone-6-ammoniumhydrobromid einen Durchmesser von 2.84 Å besitzt⁶⁵. Entsprechend steht das Aminkation in diesem Komplex 1.00 Å über dem plan ausgerichteten Polyätherring, der im komplexierten Zustand weitgehend symmetrisch ist⁶⁵. Weitere Einzelheiten über die Kristallstrukturen von Kronenetherkomplexen sind einer diesem Thema gewidmeten Zusammenfassung zu entnehmen⁶⁶.

Die Stabilität derartiger Kronenetherkationenkomplexe hängt allgemein ausser vom Verhältnis des Kationenvolumens zum Durchmesser des Kronenetherhohlraumes auch wesentlich von der Solvationsstärke des verwendeten Lösungsmittels ab. Aus diesem Grunde ist in wässrigen Lösungen das in Fig. 2 dargestellte Gleichgewicht, in dem die Dissoziation der Salze und des Komplexionspaares nicht berücksichtigt wurde, weitgehend nach links verschoben. Dies erklärt sich aus dem Bestreben des Aminkations, eine Hydrathülle auszubilden —ein Prozess, der der Komplexbildung wegen der grossen Volumenzunahme der NH_3^+ -Gruppe entgegensteht.

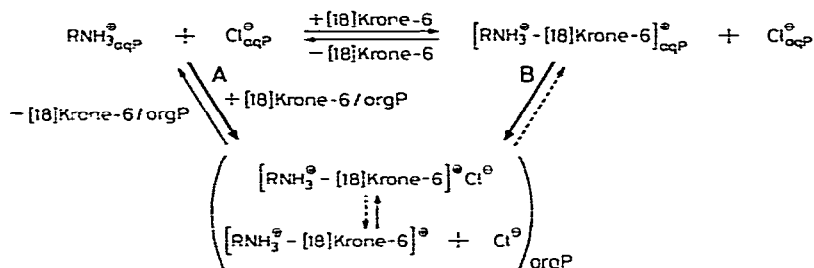


Fig. 3. Schematische Darstellung verschiedener Gleichgewichte in dem Zweiphasensystem Reversed-Phase 0.01 *N* Salzsäure-[18]Krone-6. Die Komplexbildung erfolgt aus dem Gleichgewicht in der wässrigen Phase (aqP). Über den Weg A verläuft die direkte Komplexbildung des protoniertenamins "in" der stationären organischen Phase (orgP), während über den Weg B der direkte Phasentransfer des [18]Krone-6 ammoniumkomplexes erfolgt. "Innerhalb" der stationären Phase ist die Dissoziation des Komplexes weitgehend zurückgedrängt.

Die Stabilitätskonstanten der [18]Krone-6-ammoniumkomplexe, die ein Maß für die Komplexbildung in Lösung darstellen, sind entsprechend in wässriger Lösung sehr klein. Sie wurden von Izatt⁶⁷ für den [18]Krone-6-methylammoniumkomplex (K_s ([18]Krone-6/MeNH₃⁺) in Wasser ≤ 5) und von Behr *et al.*⁶⁸ für den Ammoniumkomplex mit einem tetrasubstituierten Kronenether (K_s ([18]Krone-6-(CON(CH₃)₂)₄/NH₄⁺ in Wasser < 5) gemessen. Wurde Methanol als Lösungsmittel benutzt, das gegenüber Wasser eine wesentlich geringere Solvatationsstärke besitzt, erhöhen sich die Stabilitätskonstanten der Kronenetherkomplexe um mehrere Zehnerpotenzen⁴⁰. Zu einer weiteren Zunahme der Stabilitätskonstanten kommt es in Abhängigkeit von der Polaritätsabnahme des Lösungsmittels. Über die hieraus erwachsenden analytischen Möglichkeiten, mit unpolaren organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Benzol etc.) Kronenethermetallkationenkomplexe aus wässrigen Lösungen zu extrahieren, gab Kolthoff⁶⁹ eine zusammenfassende Darstellung.

Für die Komplexbildung der primären biogenen Amine in dem Zweiphasensystem Reversed-phase/0.01 *N* Salzsäure-[18]Krone-6 nehmen wir mehrere Reaktionswege an (Fig. 3). Danach erfolgt über den Weg A die Komplexbildung mit dem vollständig dissoziierten protonierten Amin direkt "in" der mit [18]Krone-6 äquilibrierten Reversed-Phase über das Gleichgewicht im Zweiphasensystem. Gleichzeitig wird dem Gleichgewicht im Eluenten, durch den Phasentransport des Komplexes "in" die Reversed-Phase über Weg B, ständig der [18]Krone-6-ammoniumkomplex entzogen, weil der Komplex wegen der starken Abschirmung der polaren Ammoniumgruppe des biogenen Amins durch die lipophilen Äthylenbrücken des Kronenethers eine hohe Affinität zu der lipophilen stationären Phase besitzt.

Fig. 4 zeigt, in welcher Zeit eine RP-8-Säule in Abhängigkeit von der Konzentration des Kronenethers mit dem Eluenten 0.01 *N* Salzsäure-[18]Krone-6 äquilibriert ist. Diese Zeit ist mit ca. 4 h für eine Kronenetherkonzentration von 20 mg/l relativ lang; sie verkürzt sich auf ca. 1.5 h bei einer Konzentration von 500 mg [18]Krone-6/l. Beim Vergleich der Fig. 1b und 4 ist der Einfluss zu erkennen, den die Art der Reversed-Phase auf die Retentionszeit der Kronenetherammoniumkomplexe hat. Denn für eine Erhöhung der Retentionszeit des Noradrenalins auf ca. 8.5 min wurden für die RP-2-Phase 5 g [18]Krone-6/l benötigt. Den gleichen Effekt er-

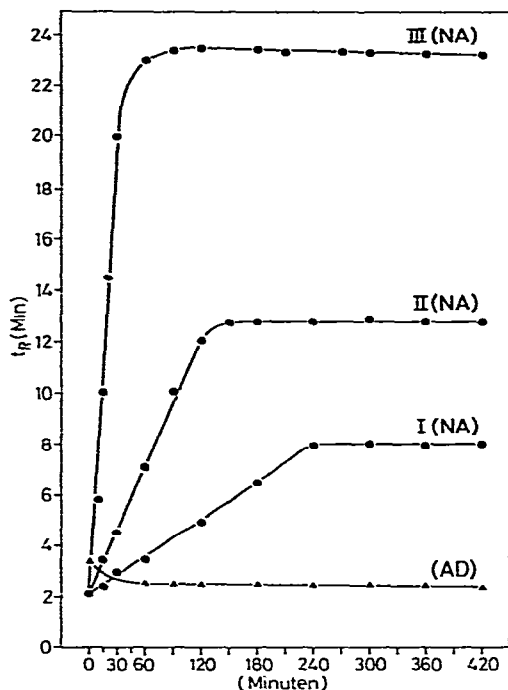


Fig. 4. Äquilibrierung einer RP-8-Säule in Abhängigkeit von verschiedenen [18]Krone-6-Konzentrationen in 0.01 *N* Salzsäure. Testamine: Adrenalin (AD) und Noradrenalin (NA). [18]Krone-6 = 20 mg/l (I), 100 mg/l (II), 500 mg/l (III). Für Adrenalin ist der Kurvenverlauf für die getesteten Kronenetherkonzentrationen angenähert identisch, weshalb aus Gründen einer besseren Übersichtlichkeit nur Werte für die höchste Konzentration eingezeichnet wurden. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2.0 ml/min. Weitere Einzelheiten siehe Material und Methoden.

zielt man an einer RP-8-Phase mit 100 mg [18]Krone-6/l.

Darüberhinaus verdeutlicht Fig. 4, in welchem Ausmass die Trennung von primären und sekundären Aminen gesteuert werden kann. Denn Adrenalin zeigt als Vertreter der sekundären Amine erwartungsgemäss auch an einer RP-8-Säule nur eine geringe Verkürzung der Retentionszeit. Noradrenalin wird dagegen mit steigender Konzentration von [18]Krone-6 in 0.01 *N* Salzsäure im untersuchten Bereich immer langsamer eluiert.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird die selektive Gruppentrennung von primären und sekundären biogenen Aminen mittels HPLC in dem Zweiphasensystem Reversed-Phase/0.01 *N* Salzsäure-[18]Krone-6 beschrieben. Es handelt sich um ein Verfahren, dass in der Analytik und der organischen Chemie allgemein anwendbar ist, denn die Vortrennung in Gruppen vereinfacht die Analyse komplexer Amingemische im Bereich der Biologie und der Medizin wesentlich. Für die präparative organische Chemie eröffnet das Verfahren die Möglichkeit, Reaktionsprodukte und Ausgangsverbindungen bei *N*-Alkylierungen von primären Aminoverbindungen einfach, schnell und sehr effektiv zu trennen.

DANK

Die Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durch Sachmittelfinanzierung gefördert. Für die Anfertigung der Zeichnungen sei Herrn Söllner, Universität Bayreuth, gedankt.

LITERATUR

- 1 K. Mori, *Jap. J. Ind. Health*, 12 (1974) 171.
- 2 K. Mori, *Jap. J. Ind. Health*, 17 (1975) 170.
- 3 J. H. Knox und A. Pryde, *J. Chromatogr.*, 112 (1975) 171.
- 4 J. H. Knox und J. Jurand, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 89.
- 5 I. Molnar und Cs. Horváth, *Clin. Chem.*, 22 (1976) 1497.
- 6 Cs. Horváth, W. Melander, I. Molnar und P. Molnar, *Anal. Chem.* 49 (1977) 2295.
- 7 J. P. Crombeen, J. C. Kraak und H. Poppe, *J. Chromatogr.*, 167 (1978) 219.
- 8 G. Schwedt, *Z. Anal. Chem.*, 293 (1978) 40.
- 9 G. Schwedt, *Angew. Chem.*, 91 (1979) 192.
- 10 Y. Yui, M. Kimura, Y. Itokawa und Ch. Kawai, *J. Chromatogr.*, 177 (1979) 376.
- 11 Y. Yui, Y. Itokawa und Ch. Kawai, *Anal. Biochem.*, 108 (1980) 11.
- 12 G. P. Jackman, V. J. Carson, A. Bobik und H. Skews, *J. Chromatogr.*, 182 (1980) 277.
- 13 N. Nimura, K. Ishida und T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, 221 (1980) 249.
- 14 T. Seki, *J. Chromatogr.*, 207 (1981) 286.
- 15 K. Imai, M. Tsukamoto und Z. Tamura, *J. Chromatogr.*, 137 (1977) 357.
- 16 K.-I. Okamoto, Y. Ishida und K. Asai, *J. Chromatogr.*, 167 (1978) 205.
- 17 C. R. Freed und P. A. Asmus, *J. Neurochem.*, 32 (1979) 163.
- 18 A. J. Cross und M. H. Joseph, *Life Sci.*, 28 (1981) 499.
- 19 T. Flatmark, S. Wahlström-Jacobsen und J. Haavik, *Anal. Biochem.*, 107 (1980) 71.
- 20 G. M. Anderson und J. G. Young, *Life Sci.*, 28 (1981) 507.
- 21 C. Refshage, P. T. Kissinger, R. Dreiling, L. Blank, R. Freeman und R. N. Adams, *Life Sci.*, 14 (1974) 311.
- 22 P. T. Kissinger, R. M. Roggins, R. L. Alcorn und D. L. Rau, *Biochem. Med.*, 13 (1975) 299.
- 23 M. Riggins und P. T. Kissinger, *Anal. Chem.* 49 (1977) 2109.
- 24 L. R. Hegstrand und B. Eichelman, *J. Chromatogr.*, 222 (1981) 107.
- 25 Th. P. Moyer und Nai-Siang Jiang, *J. Chromatogr.*, 153 (1978) 365.
- 26 J. Wagner, M. Palfreyman und M. Zraika, *J. Chromatogr.*, 164 (1979) 41.
- 27 J. F. Reinhard, jr., M. A. Moskowitz, A. F. Sved und J. D. Fernstrom, *Life Sci.*, 27 (1980) 905.
- 28 P. Kissinger, B. S. Craig und R. E. Shoup, *Life Sci.*, 28 (1981) 455.
- 29 D. S. Goldstein, G. Feuerstein, J. L. Izzo, Jr., I. J. Kopin und H. R. Keiser, *Life Sci.*, 28 (1981) 467.
- 30 I. N. Mefford, *J. Neurosci. Meth.*, 3 (1981) 207.
- 31 K. Rahman, T. Nagatsu und T. Koto, *Life Sci.*, 28 (1981) 485.
- 32 E. Watson, *Life Sci.*, 28 (1981) 493.
- 33 C. J. Pedersen, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86 (1967) 7017.
- 34 D. J. Sam und H. E. Simmons, *J. Amer. Chem. Soc.*, 94 (1972) 4024.
- 35 H. D. Durst, *Tetrahedron Lett.*, (1974) 2421.
- 36 D. Landini, F. Montanari und F. M. Piris, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1974) 879.
- 37 M. Makosza und M. Ludwikow, *Angew. Chem.*, 86 (1974) 744.
- 38 C. L. Liotto und H. P. Harris, *J. Amer. Chem. Soc.*, 96 (1974) 2250.
- 39 D. T. Sepp, K. V. Scherrer und W. P. Weber, *Tetrahedron Lett.*, (1974) 2983.
- 40 C. J. Pedersen und H. K. Frensdorff, *Angew. Chem.*, 84 (1972) 16.
- 41 E. V. Demlow, *Angew. Chem.*, 86 (1974) 187 und 89 (1977) 521.
- 42 S. L. Regen, *Angew. Chem.*, 91 (1979) 464.
- 43 F. Vögtle und E. Weber, *Angew. Chem.*, 91 (1979) 813.
- 44 F. Vögtle und E. Weber, in S. Patai (Herausgeber), *The Chemistry of Ethers, Crown Ethers, Hydroxyl Groups and their Sulphur Analogues*, Suppl. E. Part I, Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1980, p. 59.
- 45 W. P. Weber und G. W. Gokel, *Phase-Transfer Catalysis in Organic Synthesis*, Springer, Berlin, 1977.

- 46 G. W. Gokel und W. P. Weber, *J. Chem. Educ.*, 55 (1978) 350, 430.
- 47 C. M. Starks und C. Liotta, *Phase-Transfer Catalysis: Principles and Techniques*, Academic Press, New York, 1978.
- 48 M. Makosza, in A. F. Scott (Herausgeber), *Survey of Progress in Chemistry, Vol. IX*, Academic Press, New York, 1979.
- 49 E. Blasius, W. Adrian, K.-P. Janzen und G. Klautke, *J. Chromatogr.*, 96 (1974) 89.
- 50 E. Blasius, K.-P. Janzen, H. Luxenburger, V. B. Nguyen, H. Klotz und J. Stockemer, *J. Chromatogr.*, 167 (1978) 307.
- 51 E. Blasius, K.-P. Janzen, W. Adrian, G. Klautke, R. Lorscheider, P.-G. Maurer, V. B. Nguyen, T. Nguyen-Tien, G. Scholten und J. Stockemer, *Z. Anal. Chem.* 284 (1977) 337.
- 52 E. Blasius, K.-P. Janzen, W. Klein, H. Klotz, V. B. Nguyen, T. Nguyen-Tien, R. Pfeiffer, G. Scholten, H. Simon, H. Stockemer und A. Toussaint, *J. Chromatogr.*, 201 (1980) 147.
- 53 L. R. Sousa, D. H. Hoffman, L. Kaplan und D. J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.*, 96 (1974) 7100.
- 54 G. Dotsevi, Y. Sogah und D. J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.*, 98 (1976) 3038.
- 55 L. R. Sousa, G. D. Y. Sogah, D. H. Hoffman und D. J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.*, 100 (1978) 4569.
- 56 R. C. Hayward, *Nachr. Chem., Techn. Labor.*, 25 (1977) 15.
- 57 D. J. Cram und J. M. Cram, *Science*, 183 (1974) 803.
- 58 W. H. Delphin und E. P. Horwitz, *Anal. Chem.* 50 (1978) 84.
- 59 Cs. Horváth, W. Melander und A. Nahum, *J. Chromatogr.*, 186 (1979) 371.
- 60 W. J. T. Brugman und J. C. Kraak, *J. Chromatogr.*, 205 (1981) 170.
- 61 T. Nakagawa, H. Mizunuma, A. Shibukawa und T. Uno, *J. Chromatogr.*, 211 (1981) 1.
- 62 R. M. Izatt, N. E. Izatt, B. E. Rossiter und J. J. Christensen, *Science*, 199 (1978) 994.
- 63 E. P. Kyba, K. Koga, L. R. Sousa, M. G. Siegel und D. J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.*, 95 (1973) 2692.
- 64 J. M. Timko, R. C. Helgeson, M. Newcomb, G. W. Gokel und D. J. Cram, *J. Amer. Chem. Soc.*, 96 (1974) 7097.
- 65 O. Nagano, A. Kobayashi und Y. Sasaki, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, 51 (1978) 790.
- 66 I. Goldberg in S. Patai (Herausgeber), *The Chemistry of Functional Groups*, Suppl. E, Part 1, Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1980, p. 175.
- 67 R. M. Izatt: persönliche Mitteilung an J. M. Lehn, zitiert in Lit. 68.
- 68 J.-P. Behr, J.-M. Lehn und P. Vierling, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1976) 621.
- 69 I. M. Kolthoff, *Anal. Chem.* 51 (1979) 1R.
- 70 D. A. Laidler und J. F. Stoddart, in S. Patai (Herausgeber), *The Chemistry of Functional Groups*, Suppl. E, Part 1, Wiley, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, 1980, p. 51.