

모세관 전기영동법을 이용한 베타차단제 - 시클로덱스트린 포접화합물의 안정도상수 결정

박경래 · 임환미 · 뉴엔티퐁 · 김경호* · 강종성#

충남대학교 약학대학, *강원대학교 약학대학

(Received June 20, 2003; Revised August 3, 2003)

Determination of Stability Constants for β -Blocker and Carboxymethyl- β -cyclodextrin Complexes by Capillary Electrophoresis

Kyung Rae Park, Hwan Mi Lim, Nguyen Thi Phuong, Kyeong Ho Kim* and Jong Seong Kang#

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract — The stability constants for the inclusion complexes between carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM- β -CD) and five β -blockers, such as atenolol (ATE), bisoprolol (BIS), metoprolol (MET), pindolol (PIN) and propranolol (PRO) were determined by capillary electrophoresis. The magnitude of stability was decreased as following order; PRO>MET>BIS>ATE>PIN. Among them PRO showed the highest affinity towards CM- β -CD with stability constants of 383 and 371 M⁻¹ for (R)- and (S)-enantiomer, respectively. PIN enantiomers showed the lowest stability towards CM- β -CD, while the selectivity between (R)- and (S)-enantiomer was higher than any other tested β -blocker.

Keywords □ β -blocker, cyclodextrin, stability constant, capillary electrophoresis

베타차단제(β -blocker)는 고혈압, 협심증, 심부정맥 등의 심혈관계 질환에 사용되고 있으며, 최근까지 40개 이상의 유사한 구조를 갖는 약물이 개발되었다. 유효한 약리 작용은 주로 β_1 , β_2 -차단 효과이다. 이들은 β -수용체와 catecholamine의 결합을 차단하여 심박동수, 심수축성 등을 저하시켜 약효를 나타내는데, 운동이나 스트레스로 인하여 교감 신경계가 활성화되었을 때 더욱 효과가 크다. 근래에는 그 응용 범위가 확대되어 전신 혈압의 조절 및 안압을 낮추는 데에도 사용하고 있다. β -차단제는 aryloxyaminoalcohol 구조를 공통적으로 갖고 있다. 아릴기는 -OCH₂기를 매개로 알코올과 아미노기를 포함한 모핵에 연결되어 있으며 아미노기는 *i*-propyl, *t*-butyl 등으로 치환되어 있다. 또한, 아릴기 대신 다른 해테로 고리로 치환된 pindolol, timolol과 같은 약물도 사용되고 있다(Fig. 1).¹⁾ 이들은 모두 1개 이상의 부채탄소를 갖고 있는 키랄분자로 현재 (S)-timolol, (S)-penbutolol을 제외하고 모두 라세믹 혼합물 형태로 시판되고 있으며 일반적으로 (S)체가 (R)체보다 약리 효과가 크다. pro-

pranolol, metoprolol의 경우, (R)체에 대한 (S)체의 베타차단 효과는 각각 130배, 270배이다.²⁻⁴⁾ Sotalol은 (R)체와 (S)체가 비슷한 항부정맥 효과를 보이지만, (R)체만이 베타차단 효과가 있다. 이와 같이 광학 이성질체간의 약효, 독성, 대사, 분포 및 배설에 차이가 있음이 알려지면서 광학 이성질체 약물의 분석, 순수 이성질체의 합성, 생체에서의 모니터링 등이 주목을 받게 되었다. 약물의 거울상 이성질체를 분리하기 위해서는 HPLC, GC,

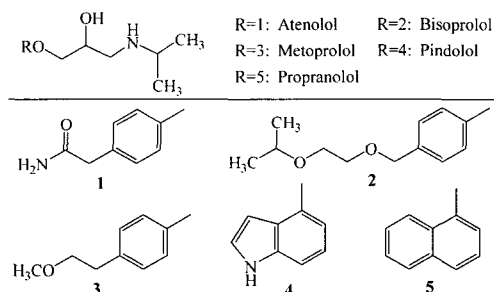


Fig. 1 – Five commercial β -blockers used in this work.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5928 (팩스) 042-823-6565
(E-mail) kangjss@cnu.ac.kr

TLC 등의 전통적인 크로마토그래피 방법외에도 모세관 전기영동법이 많이 사용되고 있다. 모세관 전기영동법(capillary electrophoresis, CE)은 전기영동법의 일종으로 내경 25~75 μm , 길이 50 cm 정도의 모세관을 분리 컬럼으로 하여 모세관 양단에 30 kV 정도의 고압을 걸어주어 이온성 및 비이온성 물질을 분석하는 방법으로 완충액에 적당한 키랄선택제를 가해주면 거울상 이성질체의 분석도 가능케 한다.⁵⁻⁸⁾ CE에 사용 가능한 키랄선택제는 cyclodextrin(CD), crown ether, bile salt 등을 들 수 있는데 그 중 CD 및 유도체화된 CD가 가장 일반적으로 사용되고 있다. CD는 6, 7, 8개의 글루코오스 단위로 구성되어 있는 비이온성 고리올리고당으로 각각 α , β , γ -CD라 불린다. CD의 직경은 글루코오스 수에 의해 결정되며 속이 빈, 위와 아래의 직경이 다른 원주모양을 가지는데, 그 외부는 이차 하이드록시기를 가지므로 친수성인데 반해 동공은 상대적으로 소수성을 띤다. CD의 키랄선택성은 CD 내부에 용질의 소수성 부분의 포접에 의하여 외에도 van der Waals 힘, 수소결합 등이 관여한다. 이들은 다양한 약물과 포접화합물을 형성하여 약물의 용해도, 생체 이용률, 안정성 등을 증가시키는 목적으로 제약 산업에 다양하게 응용되고 있다.⁹⁻¹¹⁾ 그 중 β -cyclodextrin(β -CD)은 약물을 포접하기에 가장 적당한 직경과 모양을 갖고 있어 CD 외부의 일차 또는 이차 하이드록시기에 하이드록시프로필기 혹은 메틸기 등을 붙여 그 수용성을 증가시킨 유도체 형태로 널리 사용되고 있다. CD는 키랄분석뿐 아니라 비키랄성 물질인 여러 고리방향족 탄화수소와 같은 물질을 분리하는데도 좋은 결과를 보이고 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 키랄선택제를 이용하여 광학이성질체를 분리하기 위해서는 이성질체 분자가 키랄선택제에 포함되거나 또는 상호작용을 가져야 하고 이러한 상호작용의 정도가 각각 이성질체 분자에 대해서 달라야 한다. 이성질체 분자와 키랄선택제간의 상호작용의 크기를 안정도상수, 결합상수, 포함상수 등의 용어로 나타내는데 이들의 크기는 키랄 분리에 있어 키랄선택제를 선택하는데 중요한 역할을 한다.¹⁵⁾ 안정도상수를 결정하는 방법으로 용해도법,¹⁶⁾ 분광광도법,¹⁷⁾ 크로마토그래피법,^{18,19)} NMR법²⁰⁾ 등이 소개되어 있고 대상물질에 따라 적당한 방법을 사용할 수 있다.

본 논문에서는 현재 라세믹 혼합물로 시판되고 있는 β -차단제 중 5개를 선정하여, 이를 양호하게 분리할 수 있는 CM- β -CD²¹⁾와 완충액 중에서 포접화합물을 형성시킨 후, 이 포접화합물의 안정도 상수를 CE를 이용하여 계산하였다. 또한, 안정도상수의 크기와 구조간의 상관관계에 대해서 평가하였다.

재료 및 실험방법

시약 및 기기

키랄선택제로 사용된 carboxymethyl(CM)- β -CD(MW 1420, DS 0.5)는 Wacker Chemie(Munich, Germany)로부터 구입하였

다. (RS), (S), (R)-metoprolol(MET) 및 (RS), (S), (R)-atenolol(ATE)은 기존의 방법에 의해 합성하여 순도를 확인하였고,²²⁾ (RS), (S), (R)-propranolol·HCl(PRO)는 Sigma(MI, USA)에서 구입하였다. (RS)-bisoprolol(BIS)과 (RS)-pindolol(PIN)은 국내제약회사로부터 제공 받았다. 그 외의 시약은 국내의 특급 및 일급 시약을 사용하였고, 물은 3차 증류수를 0.45 μm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

실험에 사용된 CE는 Biofocus 3000(Biorad, CA, USA)이었고, 용용 실리카 모세관은 총 길이가 47 cm인 것으로 검출기까지의 길이는 40 cm이고 내경은 75 μm 인 것을 사용하였다. 시료는 UV 210 nm에서 검출하였고, BioFocus 3000 Software(Biorad, CA, USA)를 이용하여 결과를 평가하였다. pH의 측정에는 ATI Model 370(Orion, MA, USA)을 3차 증류수의 제조에는 Milli-Q Apparatus(Millipore, MA, USA)를 사용하였다.

모세관 전기영동법

모세관 전기영동기의 모세관은 20°C로 유지시키고 매 시료 주입 전에 여과하여 가스가 제거된 0.1 M NaOH 용액으로 30초 동안 세척하여 모세관을 활성화한 후 3차 증류수로 300초 동안 세척하고, 이어서 실험에 사용된 전해질 용액으로 120초 동안 세척하여 안정화시켰다. 전원 공급은 inlet vial을 양극, outlet vial을 음극으로 하였다. 시료는 유체역학적인 방법으로 3 psi×s로 주입하였고, 10 kV의 전압으로 분리하였다. 모세관 및 자동 주입기 내부의 온도는 20°C로 유지시켰다.

시료액 및 전해질 용액의 제조

각각의 베타차단제를 메탄올에 1 mg/ml의 농도로 녹이고 물로 0.05 mg/ml의 농도로 희석시켰다. 초산나트륨 완충액(0.1 M, pH 4.0)에 유기변형제로 2-프로판올을 5%로 가하고, 키랄선택제인 CM- β -CD를 적당량(1~150 mM) 첨가해 주어 전해질용액으로 하였다. 전해질 용액은 사용 전 0.45 μm 나일론 필터로 여과하였다.

이동도의 계산

서로 다른 농도의 CD를 첨가한 각각의 전해질 용액에 대한 electropherogram을 얻고 각 피크의 이동시간으로부터 Eq. 1¹⁵⁾과 같이 베타차단제의 이동도(mobility)를 계산하였다. t_0 값은 electroosmotic flow EOF의 이동시간으로 electropherogram 상에 시료 용매에 의해 negative peak가 나타나는 시간으로 하였다. 시료 용매에 의한 피크를 인식하기 곤란한 경우는 1/10로 희석된 mesityl oxide를 주입하여 나타나는 피크의 이동시간을 t_0 값으로 하였다.

$$\mu = \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_0} \right) \frac{UL}{V} \quad (1)$$

μ : mobility
 t : migration time of analyte
 t_0 : time of EOF
 V : applied voltage
 L : total length of the capillary
 l : detection length of the capillary.

결과 및 고찰

CE에 의한 베타차단제의 키랄 분리

2-프로판올 5%를 함유하는 초산나트륨 완충액에 CM- β -CD을 키랄선택제로 첨가한 전해질로 5가지 베타차단제의 광학이성질체를 분리하였다. Fig. 2는 CM- β -CD의 농도가 각각 5, 30, 80, 100 mM인 경우의 MET 광학이성질체의 분리를 나타낸 것으로 80 mM 정도에서 가장 양호한 분리를 보였다. CM- β -CD의 농도가 증가 할수록 각 이성질체의 이동시간이 길어지는 것은 CM- β -CD의 카르복실기가 음전하를 띠어 EOF와 반대 방향으로 이동하기 때문이다. Fig. 3에 5가지 베타차단제에 대하여 (R)체와 (S)체간의 이동도 차이가 최대인 경우의 electropherogram을 제시하였다. CM- β -CD의 농도가 3~10 mM 정도에서 5가지 베타차단제의 (R)과 (S)체의 이동도 차이가 최대인 것으로 나타났다. 이동도의 차이와 분리도는 직접 연관지우기 어렵다. 일반적으로는 최상의 분리도를 보이는 CM- β -CD의 농도는 이동도 차이가 최대인 농도보다 높다. MET의 경우 (R)과 (S)체의 이동도 차이가 최대인 경우 CM- β -CD의 농도는 5 mM 정도이나 분리도가 최대인 경우는 30~80 mM 정도이다.

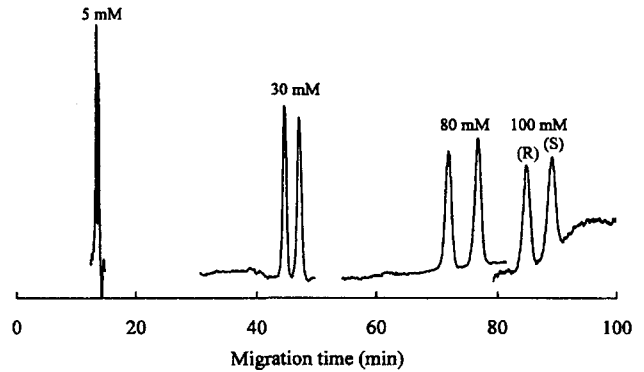


Fig. 2 – Effect of CM- β -CD concentration on enantioseparation of metoprolol. Fused silica capillary column 47 cm \times 75 μ m I.D., applied voltage; +10 kV, electrolyte; pH 4.0, 0.1 M NaOAc buffer containing 5% 2-propanol, detection; UV 210 nm, capillary temperature; 20°C.

안정도상수의 계산

모세관전기영동법에서 각각의 광학이성질체 (R)과 (S)는 전해질 용액 중의 키랄선택제 C와 작용하여 포접화합물 RC 혹은 SC를 형성한다. 이 때, R과 S에 대한 키랄선택제의 친화력(안정도)이 서로 다르고($K_{RC} \neq K_{SC}$), 용액 중에서 R과 포합체 RC, S와 포합체 SC의 이동도가 서로 다르면($\mu_R \neq \mu_{RC}$, $\mu_S \neq \mu_{SC}$) 키랄분리가 이루어진다. R과 S에 대한 안정도가 같은 경우라도($K_{RC} = K_{SC}$) 각 이성질체 포합체의 이동도가 서로 다르면($\mu_{RC} \neq \mu_{SC}$) 키랄분리가 이루어진다. 즉, 안정도상수는 키랄분리가 일어날 수 있는지의 여부 및 분리기전을 밝히는 중요한 인자가 된다. 안정도상수는 Eq. 1에서 구한 이동도를 이용하여 Eq. 2¹⁵⁾와 같

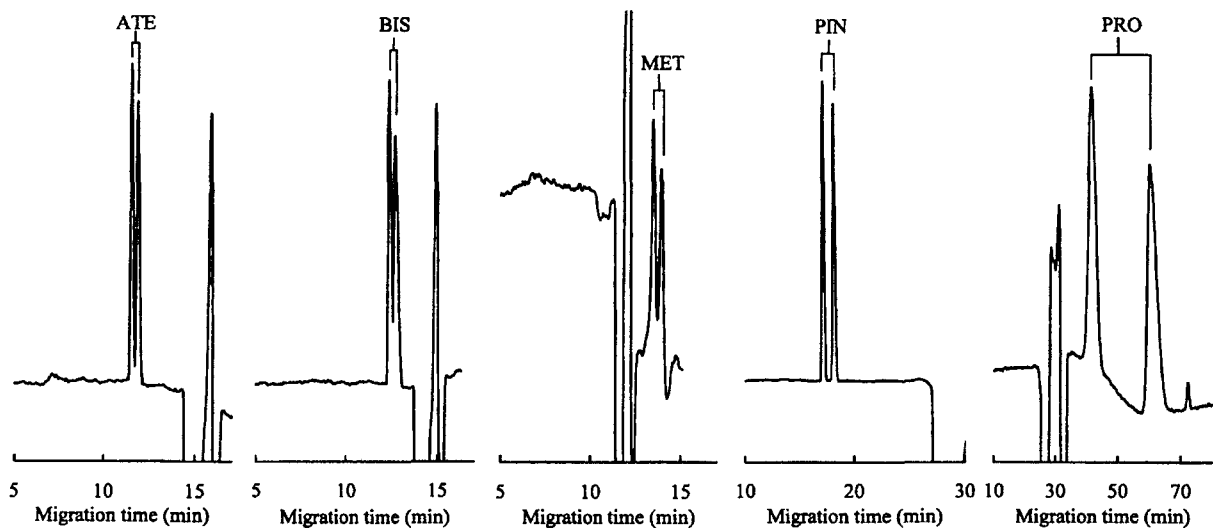


Fig. 3 – Electropherograms of β -blockers separated at a CM- β -CD concentration of maximum mobility difference between (R)- and (S)-isomer for atenolol (ATE), bisoprolol (BIS), metoprolol (MET), pindolol (PIN) and propranolol (PRO). Fused silica capillary column, 47 cm \times 75 μ m I.D., applied voltage; +10 kV, electrolyte; pH 4.0, 0.1 M NaOAc buffer containing 5% 2-propanol, detection; UV 210 nm, temperature; 20°C.

이 구할 수 있다. 키랄선택제가 전혀 없거나(μ_R, μ_S) 또는 어느 정도 있는 전해질 용액에서의 베타차단제의 이동도($\mu_{eff,R}, \mu_{eff,S}$)는 실험에 의해 쉽게 얻을 수 있지만, 무한한 농도의 키랄선택제를 포함한 전해질 용액에서의 베타차단제의 이동도(μ_{RC}, μ_{SC})는 실제 실험을 통해서 구하기 어렵다. 본 실험에서는 Lineweaver-Burk 변환을 이용하여 실험상으로 얻어진 점을 연결하는 곡선의 식을 구한 후 이것을 외연장하여 μ_{RC}, μ_{SC} 를 추정하고 이 값과 서로 다른 농도의 CM- β -CD에서 얻어진 이동도 값을 이용하여 안정도상수를 구하였다. Fig. 4에 CM- β -CD의 농도에 따른 베타차단제의 (R)체와 (S)체의 이동도 차이를 도시하였다. ATE, BIS, MET, PIN 및 PRO 광학이성질체에 대해 (R)체와 (S)체의 이동도의 차이가 가장 크게 나타나는 CM- β -CD 농도는 각각 3, 3, 5, 1, 10 mM로 나타났다. CM- β -CD의 농도가 이보다 증가할 경우 각 이성질체의 이동시간이 길어지게 되고 따라서 이동도의 차이는 감소하였다.

$$K_{RC} = \frac{1}{[C]} \frac{\mu_R - \mu_{eff,R}}{\mu_{eff,R} - \mu_{RC}} \quad (2)$$

- K_{RC} : stability constant of (R)-isomer-CD complex
- $[C]$: concentration of CD
- μ_R : mobility of free (R)-isomer
- $\mu_{eff,R}$: effective mobility of (R)-isomer
- μ_{RC} : mobility of (R)-isomer-CD complex

Eq. 2를 이용할 경우 이론적으로 하나의 CD 농도만으로도 안정도상수를 구할 수 있다. 하지만 하나의 CD 농도에서는 μ_{RC} 및 μ_{SC} 를 정확하게 추정하기 어려우므로 이를 가능하게 하기 위하

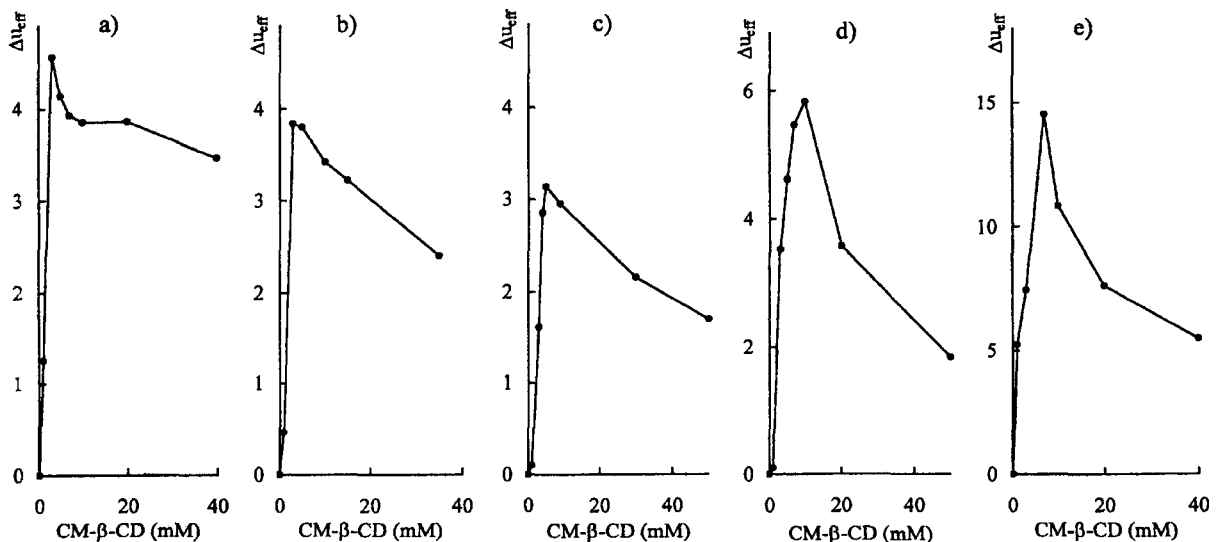


Fig. 4 – Illustrative comparison of the mobility differences between (R)- and (S)-isomer, $\Delta\mu_{eff} = \mu_{eff,S} - \mu_{eff,R}$, determined by CE as the function of CM- β -CD concentration for (a) ATE, (b) BIS, (c) MET (d) PIN and (e) PRO. Mobilities are given in $10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ units.

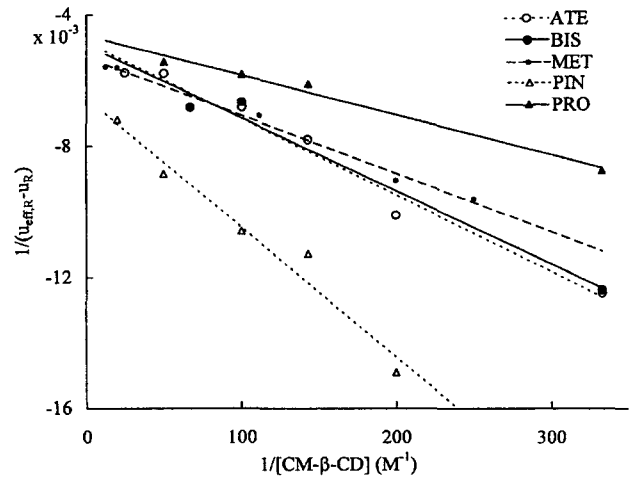


Fig. 5 – Linear double reciprocal plots for (R)-isomer of atenolol (ATE), bisoprolol (BIS), metoprolol (MET), pindolol (PIN) and propranolol (PRO).

여 서로 다른 농도에서의 실험이 필요하다. 본 실험에서는 서로 다른 CD 농도에서 안정도상수를 구하여 평균하였다. Eq. 2를 적당히 변형하여 Eq. 3²³⁾을 얻고 서로 다른 농도의 $1/[C]$ 에 대해 $1/(\mu_{eff,R} - \mu_R)$ 를 도시하는 이중역수법(double reciprocal method)을 사용하면 직선을 얻게 된다. 이 직선의 기울기와 절편을 이용하면 μ_{RC} 를 구하지 않고도 안정도상수(y축 절편/기울기)를 계산할 수 있다. Fig. 5는 $1/[C]$ 에 대해 각 베타차단제의 (R)체의 $1/(\mu_{eff,R} - \mu_R)$ 을 도시한 것이다.

$$\frac{1}{\mu_{eff,R} - \mu_R} = \frac{1}{(\mu_{RC} - \mu_R)K_{RC}[C]} + \frac{1}{\mu_{RC} - \mu_R} \quad (3)$$

안정도상수의 비교

Eq. 2와 3을 이용하여 구한 각 이성질체의 안정도 상수를 Table I에 나타내었다. ATE, MET, PRO의 경우 (R)체가 (S)체보다 더욱 안정한 포합체를 형성하는 것으로 나타났다. BIS와 PIN의 경우 단일 광학이성체 표준품을 구할 수 없어 (R)체와 (S)체의 피크를 확인할 수 없었으나 구조가 비슷한 타 베타차단제의 경우를 적용하여 CM- β -CD와 더욱 안정한 포합체를 형성하는 것을 (R)체로 가정하고 안정도상수를 계산하였다. 두 가지 식에 의해서 계산된 안정도상수는 그 크기 및 순서에 있어 약간의 차이를 보였다. 이것은 하나의 물질에 대해서 동일한 실험방법을 사용하더라도 계산 방식에 따라 안정도상수가 달라질 수 있다는 것으로 안정도를 제시하는 경우 계산법도 언급해야 한다는 것을 의미한다.

5개의 베타차단제 중 CM- β -CD와 포합체를 이루었을 때 안정도가 가장 큰 것은 PRO이었으며 다음으로 MET, BIS, ATE, PIN의 순으로 안정도가 낮아졌다. PRO이 가장 안정한 포접화합물을 형성하는 것은 소수성인 나프탈렌 고리가 소수성인 CD의 내부로 쉽게 들어가기 때문인 것으로 풀이된다. 한편 PIN은 구조상 인돌링이 CD 내부에 포접 되지만 친수성 NH기가 안정도에 불리하게 작용하므로 안정도상수가 가장 작게 나타나는 것으로 생각된다. MET, BIS, ATE는 벤젠고리가 CD 내부에 포접되고 부채탄소가 없는 쪽의 알킬기와 CD의 카르복실기 또는 소수성인 CD 내부와의 상호작용에 의해 안정성이 결정되는 것으로 생각된다. 그 중 MET은 BIS나 ATE 보다는 산소에 이르는 탄소의 수가 많아 친수성이 소수성인 CD 내부로부터 멀리 떨어져 있으므로 BIS나 ATE 보다는 약간 더 안정한 포접화합물을 형성하는 것으로 보인다.

K_{RC} 와 K_{SC} 의 비율인 선택성(α)은 CM- β -CD를 키랄선택제로 사용했을 때 광학이성질체의 분리효율을 나타낸다. 즉, 선택성이 1에서 멀수록 분리효율이 높아진다고 할 수 있다. 이중역수법에 의한 안정도상수값과 선택성을 비교하였을 때 역의 상관관계가 존재함을 알 수 있었다. 이것으로 보아 β -차단제 광학 이성질체의 분리에는 안정도가 큰 포접화합물을 형성하는 키랄선택제가

꼭 유리한 것만은 아님을 알 수 있다. 오히려 안정도가 낮더라도 선택성을 크게 할 수 있는 키랄선택제가 광학 이성질체의 분리에 유용할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

이 논문은 2002년도 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(2002-015-EP0146).

문헌

- 1) Wermuth, C. G. : *The Practice of Medicinal Chemistry*, Academic Press, p. 303 (1996).
- 2) Barrett, A. M. and Cullum, V. A. : The biological properties of the optical isomers of propranolol and their effects on cardiac arrhythmias. *Br. J. Pharmacol.* **34**, 43 (1968).
- 3) Aboul-Enein, H. Y. and Wainer, I. W. : *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, John Wiley & sons, p. 12 (1997).
- 4) Walle, T., Webb, J. G., Bagwell, E. E., Walle, U. K., Daniell, H. B. and Gaffney, T. E. : Stereoselective delivery and actions of beta receptor antagonists. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 115 (1988).
- 5) Gausepohl, C. and Blaschke, G. : Stereoselective determination of clenbuterol in human urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **713**, 443 (1998).
- 6) Fanali, S. : Identification of chiral drug isomers by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **735**, 77 (1996).
- 7) Pak, C., Marriott, P. J., Carpenter, P. D. and Amiet, R. G. : Enantiomer separation of propranolol selected metabolites by using capillary electrophoresis with hydroxy-propyl- β -cyclodextrin as chiral selector. *J. Chromatogr.* **793**, 357 (1998).
- 8) Wang, F. and Khale, M. G. : Chiral separation by nonaqueous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **16**, 3460 (1996).
- 9) Kuhn, R. and Hoffstetter-Kuhn, S. : Chiral separation by capillary electrophoresis. *Chromatographia* **34**, 505 (1992).
- 10) Fromming, K. H. and Szejtli, J. : Cyclodextrin in Pharmacy. In Davies, J. E. D. (Ed.) *Topics in Inclusion Science* Vol. 5, Kluwer, Dordrecht (1993).
- 11) Rajewski, R. A. and Stella, V. J. : Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. *In vivo* drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **85**, 1142 (1996).
- 12) Kranack, A. R. and Bowser, M. T. : Additives on the effect of a mixture of charged and neutral additives on analyte migration behavior in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 388 (1998).
- 13) Luong, J. H. and Nguyen, A. L. : Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **792**, 431 (1997).
- 14) Sercik, J., Stransky, Z., Zugelse, B. A. and Lemr, K. : Capillary

Table I - Stability constants of β -blocker and CM- β -CD complexes determined by capillary electrophoresis

β -blocker	Eq. 2			Eq. 3		
	K_{RC}	K_{SC}	α	K_{RC}	K_{SC}	α
ATE	227	209	1.09	187	170	1.10
BIS	214	201	1.07	241	224	1.08
MET	292	273	1.07	304	289	1.06
PIN	174	156	1.11	164	145	1.13
PRO	362	285	1.27	383	371	1.03

Stability constants are given in M^{-1} units and $\alpha = K_{RC}/K_{SC}$ for K_{RC} and K_{SC} , stability constants of (R)- and (S)-enantiomer, respectively.

- electrophoretic enantioseparation of selegiline, methamphetamine and ephedrine using a neutral β -cyclodextrin epichlorohydrin polymer. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1089 (1996).
- 15) Vespalec, R. and Boek, P. : Calculation of stability constants for the chiral selector-enantiomer interactions from electrophoretic mobilities, *J. Chromatogr. A* **875**, 431 (2000).
- 16) Ueno, N., Hirayama, F., Arima, H. and Uekama, K. : Determination of stability constant of β -cyclodextrin complexes using the membrane permeation technique and the permeation behavior of drug competing agent- β -cyclodextrin ternary systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **8**, 133 (1999).
- 17) Loukas, Y. L. : Evaluation of the methods for the determination of the stability constant of cyclodextrin-chlorambucil inclusion complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16**, 275 (1997).
- 18) Trapani, G., Latrofa, A., Franco, M., Lopodota, A., Sanna, E. and Liso, G. : Inclusion complexation of propofol with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. Physicochemical, nuclear magnetic resonance spectroscopic studies, and anesthetic properties in rat. *J. Pharm. Sci.* **87**, 514 (1998).
- 19) Kim, K. H. and Park, Y. H. : Enantioselective inclusion between terbutaline enantiomers and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* **175**, 247 (1998).
- 20) Chankvetadze, B., Endresz, G., Schulte, G., Bergenthal, D. and Blaschke, G. : Capillary electrophoresis and $^1\text{H-NMR}$ studies on chiral recognition of atropisomeric binaphthyl derivatives by cyclodextrin hosts. *J. Chromatogr. A* **732**, 143 (1996).
- 21) Lim, H. M., Linh, P. D. and Kang, J. S. : Analysis of β -blocker enantiomers by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Sci. (C.N.U.)* **16**, 25 (2000).
- 22) Jung, S. H., Linh, P. T., Lim, H. K., Kim, H. J., Kim, K. H. and Kang, J. S. : Enantioselective preparation of metoprolol and its major metabolites. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 226 (2000).
- 23) Rundlett, K. R. and Armstrong, D. W. : Examination of the origin, variation and proper use of expressions for the estimation of association constants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **721**, 173 (1996).