

# ENTWICKLUNG VEREINFACHTER FLÜSSIGCHROMATOGRAPHISCHER UNTERSUCHUNGSMETHODEN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE ESSENTIELLER ANTIMALARIA-MEDIKAMENTE IN ENTWICKLUNGS- UND SCHWELLENLÄNDERN

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von  
Ludwig Höllein  
aus  
Lichtenfels

Würzburg 2015



**Eingereicht bei der Fakultät für Chemie  
und Pharmazie am:** \_\_\_\_\_

**Gutachter der schriftlichen Arbeit:**

1. Gutachter: \_\_\_\_\_

2. Gutachter: \_\_\_\_\_

**Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:**

1. Prüfer: \_\_\_\_\_

2. Prüfer: \_\_\_\_\_

3. Prüfer: \_\_\_\_\_

**Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:** \_\_\_\_\_

**Doktorurkunde ausgehändigt am:** \_\_\_\_\_



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Oktober 2010 bis März 2015 am  
Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
auf Anregung und unter der Anleitung von  
**Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe**  
angefertigt.

Ihr möchte ich besonders für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, das entgegengebrachte  
Vertrauen, die stets überaus konstruktiven Diskussionen und Anregungen zu  
jeglichen Problemstellungen sowie die Möglichkeit zur  
selbstständigen und eigenverantwortlichen  
Anfertigung dieser Arbeit danken.



Nicht unerwähnt sollen alle diejenigen bleiben, die mich während der gesamten Zeit stets unterstützt und die Promotion zu einem sehr erinnerungswerten Lebensabschnitt gemacht haben:

Die Büro-Truppe 01.012:

**Johannes, David, Olli, Miri, Christine, Jogi, Christiane und Steffi**

**Michael, Raphael und Nina**

**Prof. Dr. Eliangiringa Kaale und  
Dr. Danstan Hipolite**

**Bernd**

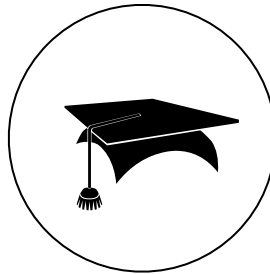
**Silke und Renate**

**Jens**

**Lina**

**Steffi Neis**

**Marco**



**Edith**

**Prof. Dr. August Stich und das Team des  
Missionsärztlichen Institutes**

**Frau Möhler, Frau Ebner und  
Frau Kosikors**

**Prof. Dr. Harald Hamacher**

**Alex, Ines, Jan, Flo, Anna H., Regina, Daniela, Nils, Vanessa, Markus**

...sowie alle, die im Hintergrund (oder bereits im Studium) „dabei“ waren und mir stets die nötige Kraft und Motivation gegeben haben:

**Yvonne, Sabrina** und **Christian, Annika** und **Christian**,  
die Hamburger **Stefan** und **Stefan, Ajnure, Karina, Kristin, Anne, Susanne, Birgit**,  
natürlich **Caro, Julia** und unsere schöne Stadt **Würzburg**,  
sowie last but not least meine lieben **Eltern** und **Großeltern**,  
ohne deren fortwährende Unterstützung diese Arbeit vermutlich niemals entstanden wäre.

**DANKE!**





# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung .....</b>   | <b>2</b>  |
| 1.1. Arzneimittelfälschungen .....   | 2         |
| 1.2. Arzneimittelqualität in Entwicklungsländern.....  | 6         |
| 1.2.1. Probleme und Herausforderungen .....  | 6         |
| 1.2.2. Pharmazeutische Qualitätskontrolle am Beispiel Tansania .....   | 8         |
| 1.2.3. Das GPHF-Minilab® .....   | 10        |
| 1.3. Malaria und Wirkstoffe zu ihrer Behandlung.....   | 12        |
| 1.3.1. Die Erkrankung und ihre Pathogenese.....  | 12        |
| 1.3.2. 4-Aminochinoline .....  | 14        |
| 1.3.3. 8-Aminochinoline .....  | 15        |
| 1.3.4. Arylaminoalkohole .....   | 16        |
| 1.3.5. Artemisinininderivate.....  | 17        |
| 1.3.6. Antifolate, Hemmstoffe der Atmungskette und weitere Antibiotika .....   | 17        |
| <b>2. Reinheitsanalytik und Qualitätskontrolle von Arzneistoffen .....</b>   | <b>22</b> |
| 2.1. Visuelle Prüfungen.....   | 23        |
| 2.2. Nasschemische Reaktionen .....  | 24        |
| 2.3. Galenische Prüfungen: Zerfall, Wirkstofffreisetzung, Gleichförmigkeit von Masse und Gehalt .....                          | 25        |
| 2.4. Dünnschichtchromatographie .....  | 25        |
| 2.5. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....  | 27        |
| 2.6. Validierung analytischer Methoden und Verfahren .....   | 29        |
| 2.6.1. Überblick .....   | 29        |
| 2.6.2. Selektivität, Spezifität .....  | 30        |
| 2.6.3. Richtigkeit.....  | 30        |
| 2.6.4. Präzision.....  | 30        |
| 2.6.5. Nachweis- und Bestimmungsgrenze .....   | 31        |
| 2.6.6. Linearität.....   | 31        |
| 2.6.7. Robustheit .....  | 32        |
| 2.6.8. Eignungsprüfungen .....   | 32        |
| <b>3. Motivation und Zielsetzung .....</b>   | <b>34</b> |
| 3.1. Entwicklung vereinfachter flüssigchromatographischer Methoden zur Qualitätsanalytik wichtiger Antimalariawirkstoffe ..... | 34        |
| 3.2. Stabilitätsanalytik von Noradrenalin.....   | 35        |
| <b>4. Material und Methoden.....</b>   | <b>38</b> |
| 4.1. Arzneistoffe.....   | 38        |
| 4.2. Verunreinigungen.....   | 39        |
| 4.3. Fertigarzneimittel.....   | 40        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.4. Chromatographische Säulen .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>4.5. Chemikalien, Lösungsmittel, Dünnschichtchromatographie-Folien .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>4.6. Geräte .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.7. Wasser für die Chromatographie.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>4.8. Verbrauchsmaterialien.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>4.9. Stabilitätsanalytik von Noradrenalin.....</b>   | <b>44</b> |
| 4.9.1. Mobile Phase.....  | 44        |
| 4.9.2. HPLC-Methodenparameter.....  | 44        |
| 4.9.3. Untersuchungs- und Kalibrierlösungen.....  | 44        |
| <b>4.10. Entwicklung vereinfachter flüssigchromatographischer Methoden für<br/>    Amodiaquin, Mefloquin, Proguanil, Artemether/Lumefantrin .....</b> | <b>46</b> |
| 4.10.1. Lösungen zur Einstellung des pH-Wertes .....  | 46        |
| 4.10.2. Pufferlösungen .....  | 46        |
| 4.10.3. Stammlösungen für die HPLC.....   | 48        |
| 4.10.4. Arbeitslösungen für die HPLC.....   | 49        |
| 4.10.5. Amodiaquin .....  | 50        |
| 4.10.5.1. Mobile Phase .....  | 50        |
| 4.10.5.2. Chromatographische Parameter .....  | 50        |
| 4.10.5.3. Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC.....  | 50        |
| 4.10.6. Bestimmung von Amodiaquin nach USP .....  | 51        |
| 4.10.7. Mefloquin .....   | 52        |
| 4.10.7.1. Mobile Phase .....  | 52        |
| 4.10.7.2. Chromatographische Parameter .....  | 52        |
| 4.10.7.3. Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC.....  | 52        |
| 4.10.8. Bestimmung von Mefloquin nach Ph. Eur. ....   | 53        |
| 4.10.9. Proguanil .....   | 54        |
| 4.10.9.1. Mobile Phase .....  | 54        |
| 4.10.9.2. Chromatographische Parameter .....  | 54        |
| 4.10.9.3. Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC.....  | 54        |
| 4.10.10. Artemether/Lumefantrin .....   | 55        |
| 4.10.10.1. Mobile Phase .....   | 55        |
| 4.10.10.2. Chromatographische Parameter .....   | 55        |
| 4.10.10.3. Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC.....   | 55        |
| <b>4.11. Dünnschichtchromatographie .....</b>   | <b>57</b> |
| 4.11.1. Fließmittel und Entwicklung .....   | 57        |
| 4.11.2. Allgemeine Hinweise zur Herstellung der Probe- und Kalibrierlösungen.....   | 58        |
| 4.11.3. Amodiaquin .....  | 58        |
| 4.11.4. Mefloquin .....   | 59        |
| 4.11.5. Proguanil .....   | 60        |
| 4.11.6. Artemether/Lumefantrin .....  | 60        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.12. Flüssigchromatographie .....</b>  | <b>62</b>  |
| 4.12.1. Amodiaquin .....   | 62         |
| 4.12.2. Mefloquin .....  | 62         |
| 4.12.3. Proguanil .....  | 63         |
| 4.12.4. Artemether/Lumefantrin .....   | 64         |
| <b>5. Ergebnisse und Diskussion .....</b>  | <b>66</b>  |
| 5.1. Generelle Aspekte der Methodenentwicklung und -optimierung .....                            | 66         |
| 5.2. Stabilitätsanalytik von Noradrenalin .....  | 71         |
| 5.2.1. Stabilität von Katecholaminen .....   | 71         |
| 5.2.2. Stabilisierungsmaßnahmen und Konservierungsstoffe .....                                   | 76         |
| 5.2.3. Flüssigchromatographische Methoden zur Bestimmung von Adrenalin und<br>Noradrenalin ..... | 78         |
| 5.2.4. HPLC-Methodenentwicklung und Quantifizierung von Noradrenalin .....                       | 80         |
| 5.2.5. Methodvalidierung .....   | 81         |
| 5.2.6. Stabilität 0.1 %iger Noradrenalin-Lösungen .....  | 84         |
| 5.3. Amodiaquin .....  | 86         |
| 5.3.1. Syntheseweg und Pharmakologie .....   | 86         |
| 5.3.2. Methodenentwicklung und -optimierung .....  | 87         |
| 5.3.3. Methodvalidierung .....   | 90         |
| 5.4. Proguanil .....   | 95         |
| 5.4.1. Syntheseweg und Pharmakologie .....   | 95         |
| 5.4.2. Methodenentwicklung und -optimierung .....  | 95         |
| 5.4.3. Methodvalidierung .....   | 99         |
| 5.5. Mefloquin .....   | 104        |
| 5.5.1. Syntheseweg und Pharmakologie .....   | 104        |
| 5.5.2. Methodenentwicklung und -optimierung .....  | 106        |
| 5.5.3. Methodvalidierung .....   | 109        |
| 5.6. Artemether/Lumefantrin .....  | 114        |
| 5.6.1. Gewinnungs- bzw. Synthesewege und Pharmakologie .....                                     | 114        |
| 5.6.2. Methodenentwicklung und -optimierung .....  | 116        |
| 5.6.3. Methodvalidierung .....   | 119        |
| 5.7. Quantifizierung der Wirkstoffe aus Fertigarzneimitteln und<br>Methodenvergleich .....       | 125        |
| 5.7.1. Dünnschichtchromatographie .....  | 125        |
| 5.7.2. Flüssigchromatographie .....  | 132        |
| 5.8. Schlussfolgerungen und Ausblick .....   | 134        |
| <b>6. Zusammenfassung .....</b>  | <b>142</b> |
| <b>7. Summary .....</b>  | <b>146</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>8. Literaturverzeichnis .....</b>                     | <b>150</b> |
| <b>9. Anhang .....</b>                                   | <b>162</b> |
| <b>9.1. Publikationsverzeichnis .....</b>                | <b>162</b> |
| 9.1.1. Originalarbeiten .....                            | 162        |
| 9.1.2. Posterbeiträge .....                              | 163        |
| 9.1.3. Vorträge .....                                    | 163        |
| <b>9.2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>     | <b>164</b> |
| <b>9.3. Abkürzungen.....</b>                             | <b>170</b> |
| <b>9.4. Chromatogramme und Methodenübersichten .....</b> | <b>171</b> |
| 9.4.1. Amodiaquin .....                                  | 171        |
| 9.4.2. Proguanil .....                                   | 175        |
| 9.4.3. Mefloquin .....                                   | 181        |
| 9.4.4. Artemether/Lumefantrin .....                      | 187        |



# 1

Einleitung

# **1 Einleitung**

## **1.1 Arzneimittelfälschungen**

Arzneimittelfälschungen sowie die zunehmende Verbreitung qualitativ minderwertiger Medikamente stellen insbesondere in den Entwicklungs- und Schwellenländern eine wachsende Gefahr für die Gesundheit der Bevölkerung dar [1]. Abweichungen in Menge und/oder Zusammensetzung der Inhaltsstoffe führen entweder zu Therapieverzögerungen, schweren Intoxikationen, lebensbedrohlichen Zuständen durch komplettes Therapieversagen oder im Fall von Antibiotika zur Resistenzentwicklung einer Vielzahl von Erregerstämmen. Die zusätzliche Krankheitslast stellt letztendlich eine große Belastung für die ohnehin schon überforderten Gesundheitssysteme in diesen Ländern dar.

Nationale Arzneimittelkontrollbehörden (National Medicine Regulatory Authorities, NMRAs) sind oftmals nicht in der Lage, den Arzneimittelmarkt flächendeckend zu überwachen und die entsprechenden regulatorisch notwendigen Schritte umzusetzen. Dies liegt vor allem in der eingeschränkten Verfügbarkeit technischer Geräte, der häufig undurchsichtigen und strukturlosen Verteilungslogistik der Arzneimittel sowie der häufig zentral organisierten Verwaltungsstruktur der Behörden begründet [2].

Bis heute wurden zahlreiche international verknüpfte Programme und Initiativen zur Bekämpfung von Arzneimittelfälschungen ins Leben gerufen, etwa die von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) gegründete „International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce“ (IMPACT) oder die von Interpol nahezu jährlich durchgeführten „Operation Pangea“. Vor allem die Verbreitung von Arzneimittelfälschungen und der Bezug illegaler Plagiate über das Internet waren Gegenstand dieser Interventionen [3, 4].

Die WHO erarbeitet und aktualisiert seit den frühen 1990er Jahren eine umfassende, als allgemein gültig angesehene Definition gefälschter Medikamente und Medizinprodukte (siehe Tabelle 1.1-1). Arzneimittelfälschungen werden demnach als solche Produkte beschrieben, die „hinsichtlich ihrer Identität und/oder Herkunft vorsätzlich und in betrügerischer Absicht falsch gekennzeichnet wurden“ [5-9]. Obwohl diese Definition im Laufe der Zeit mehrmals abgeändert und durch weitere Aspekte ergänzt wurde, ist die Kernaussage jedoch dieselbe geblieben. Auch andere Organisationen bzw. Verbände, die im Bereich der pharmazeutischen Qualitätskontrolle tätig sind, veröffentlichten in analoger Weise entsprechende Begriffserklärungen (siehe Tabelle 1.1-2) [10-16].

Heute wird ein Arzneimittel nicht nur dann als Fälschung angesehen, wenn der deklarierte Inhaltsstoff nicht oder in ungenügender Menge enthalten ist. Vielmehr muss zur Beurteilung der



Qualität eine detaillierte Charakterisierung stattfinden und es können die folgenden Arten von Arzneimittelfälschungen unterschieden werden:

1. Es ist der korrekte Arzneistoff in der angegebenen Menge enthalten, aber das Präparat stammt nicht von einem lizenzierten Hersteller (Plagiate);
2. Es ist ein anderer als der deklarierte Inhaltsstoff enthalten (versehentlich durch Verwechslung oder absichtlich);
3. Es ist keinerlei Wirkstoff enthalten;
4. Es ist entweder zu viel oder zu wenig des deklarierten Arzneistoffes enthalten (versehentlich oder absichtlich);
5. Die Produkte enthalten einen hohen Anteil an bekannten und/oder unbekanntem Verunreinigungen (*Verwandte Substanzen*), oder andere Beimischungen.

**Tabelle 1.1-1:** Entwicklung der WHO-Definition des Begriffes „Arzneimittelfälschung“ von 1992 bis heute.

| Jahr | Beschreibung   |
|------|--|
| 1992 | „A counterfeit medicine is one which is deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source. Counterfeiting can apply to both branded and generic products and counterfeit products may include products with correct ingredients, wrong ingredients, without active ingredients, with insufficient quantity of active ingredient or with fake packaging.“ [9]   |
| 2003 | „Counterfeit medicines are part of the broader phenomenon of substandard pharmaceuticals. The difference is that they are deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source. Counterfeiting can apply to both branded and generic products and counterfeit medicines may include products with the correct ingredients but fake packaging, with the wrong ingredients, without active ingredients or with insufficient active ingredients.“ [6]  |
| 2006 | „Counterfeit medicines are part of the broader phenomenon of substandard pharmaceuticals. (...) They are deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source. Counterfeiting can apply to both branded and generic products and counterfeit medicines may include products with the correct ingredients but fake packaging, with the wrong ingredients, without active ingredients or with insufficient active ingredients.“ [5]   |
| 2009 | „A counterfeit medicine is one which is deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source. Counterfeiting can apply to both branded and generic products and counterfeit products may include products with the correct ingredients or with the wrong ingredients, without active ingredients, with insufficient active ingredients or with fake packaging.“ [8]   |
| 2012 | „Spurious/false-labelled/falsified/counterfeit (SFFC) medicines are medicines that are deliberately and fraudulently mislabeled with respect to identity and/or source. Use of SFFC medicines can result in treatment failure or even death. Public confidence in health systems may be eroded following use and/or detection of SFFC medicines. Both branded and generic products are subject to counterfeiting. All kinds of medicines have been counterfeited, from medicines for the treatment of life-threatening conditions to inexpensive generic versions of painkillers and antihistamines. SFFC medicines may include products with the correct ingredients or with the wrong ingredients, without active ingredients, with insufficient or too much active ingredient, or with fake packaging. SFFC medicines are found everywhere in the world. They range from random mixtures of harmful toxic substances to inactive, ineffective preparations. Some contain a declared, active ingredient and look so similar to the genuine product that they deceive health professionals as well as patients. But in every case, the source of a SFFC medicine is unknown and its content unreliable. SFFC medicines are always illegal. They can result in treatment failure or even death. Eliminating them is a considerable public health challenge.“ [7] |

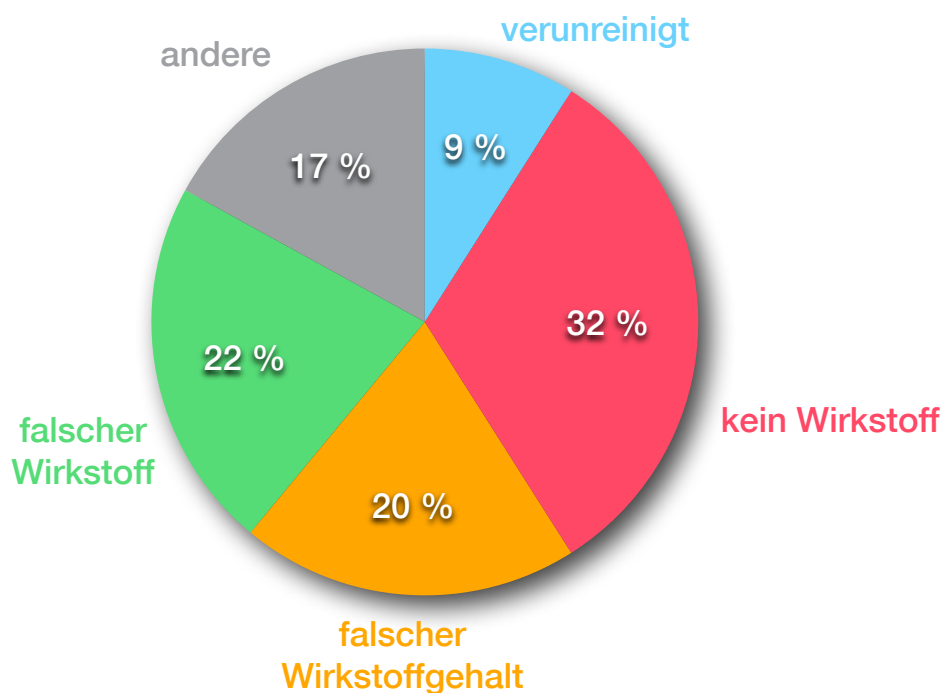
**Tabelle 1.1-2:** Definition des Begriffs „Counterfeit Medicines“ verschiedener Organisationen.

| Organisation   | Definition  |
|--|---|
| <b>TRIPS Agreement, 1994</b>   | „(Counterfeit trademark goods) shall mean any goods, including packaging, bearing without authorization a trademark which is identical to the trademark validly registered in respect of such goods, or which cannot be distinguished in its essential aspects from such a trademark, and which thereby infringes the rights of the owner of the trademark in question under the law of the country of importation.“ [16]   |
| <b>International Pharmaceutical Federation, 2003</b>                                   | „Counterfeiting in relation to medicinal products means the deliberate and fraudulent mislabeling with respect to the identity, composition and/or source of a finished medicinal product, or ingredient for the preparation of a medicinal product. Counterfeiting can apply to both branded and generic products and to traditional remedies. Counterfeit products may include products with the correct ingredients, wrong ingredients, without active ingredients, with insufficient quantity of active ingredient or with false or misleading packing; they may also contain different, or different quantities of, impurities both harmless and toxic.“ [12]  |
| <b>IMPACT, 2008</b>  | „The term counterfeit medical product describes a product with a false representation of its identity and/or source. This applies to the product, its container or other packaging or labelling information. Counterfeiting can apply to both branded and generic products.<br>Counterfeits may include products with correct ingredients/components, with wrong ingredients/components, without active ingredients, with incorrect amounts of active ingredients, or with fake packaging. (...)<br>Substandard batches of, or quality defects or non-compliance with Good Manufacturing Practices/Good Distribution Practices (GMP/GDP) in legitimate medical products must not be confused with counterfeiting.“ [14] |
| <b>Médecins Sans Frontières, 2009</b>  | „Counterfeit medicines are products that are presented in such a way as to look like a legitimate product although they are not that product. In legal terms this is called trademark infringement. They are the result of deliberate criminal activity that has nothing to do with legitimate pharmaceutical producers – be it generic or brand producers.“ [13]   |
| <b>International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations, 2010</b> | „Counterfeit medicines threaten the full spectrum of legitimate medicines. They can be falsified versions of patented medicines, generic medicines or over-the-counter medicines and exist in all therapeutic areas (even traditional medicine). They range from medicines with no active ingredients to those with dangerous adulterations.“ [11]  |
| <b>World Medical Association, 2012</b>   | „Counterfeit medicines are drugs manufactured below established standards of safety, quality and efficacy and therefore create serious health risks, including death.“ [15]   |

Das unerlaubte Kopieren im Markt etablierter Markenprodukte und Generika (z. B. durch Reproduktion von Logos, Schriftzügen, Hologrammen oder der Umverpackung im Allgemeinen) ist eine gängige Praxis und ermöglicht es den Fälschern, ihre Plagiate auf besonders leichte Art und Weise in den Markt einzuschleusen [17]. Medikamente großer, etablierter Marken-Hersteller genießen in der Regel bei den Patienten ein hohes Maß an Vertrauen und werden daher bevorzugt gekauft und eingenommen. Allerdings sind meistens nur Experten in der Lage, den Unterschied zwischen einem Originalprodukt und einer Fälschung auszumachen.

Zwar enthalten immerhin 20 % der weltweit vorzufindenden Arzneimittelfälschungen auch wirklich den deklarierten Arzneistoff, allerdings in der falschen Menge, wohingegen in über 30 % der durch die WHO untersuchten Fälle überhaupt kein Wirkstoff nachweisbar war (siehe Abbildung 1.1-1).

## EINLEITUNG



**Abbildung 1.1-1:** Anteile der verschiedenen Arten von Arzneimittelfälschungen. Quelle: WHO (2014).

Obwohl die Prävalenz von Arzneimittelfälschungen in Entwicklungs- und Schwellenländern immer noch besonders hoch ist, bleiben Industrienationen trotz streng kontrollierter Produktions-, Import- und Distributionsmechanismen heute ebenso wenig wie Entwicklungsländer von groß angelegten Fälschungsoffensiven verschont und es gelangen immer größere Mengen an Plagiaten und qualitativ minderwertigen Produkten in die Versorgungskette. Mittlerweile sind nicht nur klassische Arzneistoffe, sondern auch die sogenannten „Biologicals“ und in immer höherem Maße auch Hilfsstoffe betroffen. In Tabelle 1.1-3 sind wichtige, innerhalb der letzten Jahre bekannt gewordene Fälle zusammengestellt, die eindrucksvoll zeigen, dass das Problem längst nicht mehr alleine auf Entwicklungs- und Schwellenländer begrenzt ist [18-20].

Der Handel mit Arzneimitteln über das Internet bietet ebenfalls eine gute und schnelle Möglichkeit, Fälschungen und qualitativ minderwertige Präparate zu verbreiten. Zwar gelten die vom „Deutschen Institut für Medizinische Dokumentation und Information“ (DIMDI) registrierten und geprüften Versandapotheken, über die in Deutschland seit 2004 legal Arzneimittel und Medizinprodukte vertrieben werden dürfen, als ebenso sicher wie die eingessenen Apotheken vor Ort. Durch die Fülle und Unübersichtlichkeit des Marktes ist es allerdings für den Endverbraucher oftmals nicht ersichtlich, ob er seine Medikamente von einem vertrauenswürdigen Händler oder von einer nicht autorisierten Quelle bezieht. Leider ist aber gerade der digitale Handel eine effektive und ertragreiche Möglichkeit, über die Kriminelle ihre Ware schnell in den Markt schwemmen können. Viele Kunden nutzen zudem bevorzugt die überaus bequeme und diskrete Möglichkeit, Medikamente ohne vorherigen Arztbesuch von zu Hause aus bestellen zu

können, was sich in den steigenden Umsatzzahlen verschreibungspflichtiger *Lifestyle*-Medikamente wie Potenzmittel (Viagra, Cialis) oder Antiadiposita (Sibutramin, Rimonabant) widerspiegelt [21]. Sie sind über zahllose Internetshops in der Regel ohne Vorlage eines Rezeptes erhältlich.

**Tabelle 1.1-3:** Fälle von Arzneimittelfälschungen in Europa bzw. den USA. Quelle: [19, 20].

| Jahr    | Präparat    | Wirkstoff(e)                           | Art der Fälschung                                  |
|---------|-------------|--|--|
| 2008/09 | -           | unfraktionierte Heparine               | hohe Mengen an übersulfatiertem Chondroitinsulfat  |
| 2012    | Avastin     | Bevacizumab                            | kein Wirkstoff enthalten                           |
| 2012    | Adderall    | Amphetamin- und Dextroamphetamin-Salze | Austausch durch Paracetamol und Tramadol           |
| 2013    | Sutent      | Sunitinib                              | kein Wirkstoff enthalten                           |
| 2014    | Herceptin   | Trastuzumab                            | kein Wirkstoff enthalten                           |
| 2013    | Pegasys     | pegyliertes Interferon                 | kein Wirkstoff enthalten                           |
| 2014    | Norditropin | humanes Somatotropin                   | keine Garantie von Gehalt, Reinheit und Sterilität |
| 2014    | Xanax       | Alprazolam                             | kein Wirkstoff enthalten                           |
| 2014    | Aspirin     | Acetylsalicylsäure                     | Plagiate   |

## 1.2 Arzneimittelqualität in Entwicklungsländern

### 1.2.1 Probleme und Herausforderungen

Entwicklungs- und Schwellenländer mit schlecht ausgebildeten Infrastrukturen sowie fehlenden oder ungenügend implementierten Kontrollorganen stehen vor andersartigen Problemen und Herausforderungen. Da es kaum geregelte Vertriebswege gibt, lässt sich der Ursprung eines Arzneimittels selten sicher ermitteln. Medikamentenlieferungen müssen oftmals über große Distanzen und Umwege transportiert werden, um an das eigentliche Ziel zu gelangen. Hierdurch bilden sich an vielen Stellen Lücken, über die Plagiate und qualitativ schlechte Waren in die Zirkulation eingeschleust werden können.

Neben den wirtschaftlichen Folgen treten, wie bereits in Abschnitt 1.1 erläutert, besonders die direkten Gefahren für die Gesundheit der Patienten in den Vordergrund. Eine konstante, flächendeckende und an internationalen Standards ausgerichtete pharmazeutische Qualitätskontrolle stellt für die meisten Entwicklungs- und Schwellenländer eine große Herausforderung dar [22]. Anders als beispielsweise in Europa oder Nordamerika sind regulatorische Strukturen (Zulassungsbehörden, Gesundheitsministerien, *Official Medicines Control Laboratories* (OMCLs) oder ein daran angeknüpftes Qualitätsmanagement) in der Regel gar nicht, oder nur in geringem

## EINLEITUNG

Ausmaß, etabliert. Die zumeist jungen Gesundheitssysteme sind oftmals nicht in der Lage, den durch die steigende Verbreitung von Arzneimittelfälschungen entstehenden Herausforderungen gerecht zu werden [23].

In der Literatur sind zahlreiche Untersuchungen zur Arzneimittelqualität in Entwicklungsländern zu finden, in denen große Mengen an Proben gesammelt und eingehend untersucht wurden [24-34]. Solche Publikationen liefern wertvolle Informationen und zeigen immer wieder die wachsende Problematik der Arzneimittelfälschung auf. Es muss allerdings gesagt werden, dass sie in der Regel nur als eine Momentaufnahme gesehen werden können, denn Studien dieser Art beschränken sich zumeist auf einen sehr engen zeitlichen und räumlichen Rahmen. In Tabelle 1.2.1-1 sind exemplarisch Untersuchungsergebnisse verschiedener Publikationen zur Arzneimittelqualität in ausgewählten Afrikanischen Ländern zusammengefasst.

**Tabelle 1.2.1-1:** Verschiedene Studien zur Arzneimittelqualität in Afrika.

| Ort                                   | Stoffe#              | Ergebnis   | Quelle                         |
|---------------------------------------|----------------------|--|--------------------------------|
| <b>Tansania</b>                       | CQ                   | Alle Proben enthielten die deklarierte Menge CQ, nur wenige erfüllten die Anforderungen an die Wirkstofffreisetzung  | Abdi <i>et al.</i> [24]        |
| <b>Kenia</b>                          | SP<br>AQ             | 40.5 % (SP) bzw. 33 % (AQ) der Proben entsprachen nicht der Deklaration; schlechte Ergebnisse bei der Wirkstofffreisetzung   | Amin <i>et al.</i> [26]        |
| <b>Kamerun</b>                        | CQ<br>CH<br>SP       | 38 % (CQ), 74 % (CH) und 12 % (SP) der Proben enthielten keinen oder den falschen Wirkstoff  | Basco <i>et al.</i> [27]       |
| <b>Kongo,<br/>Burundi,<br/>Angola</b> | CQ<br>CH<br>MQ       | Nur 88.6 % Gehalt an CQ; sehr hohe Menge an Verunreinigungen;<br>z. T. weder Primär- noch Sekundärverpackung vorhanden   | Gaudio <i>et al.</i> [28]      |
| <b>Ruanda,<br/>Tansania</b>           | CH<br>SP             | Alle Proben entsprachen der Spezifikation, jedoch erfüllten 24 % die Kriterien des Dissolutiontests nicht; schlechte Haltbarkeit unter tropischen Klimabedingungen | Kayumba <i>et al.</i> [30]     |
| <b>Uganda</b>                         | CQ                   | 30 % der Proben (Tabletten, Injektionslösungen) enthielten zu viel, ca. 30 % zu wenig Wirkstoff  | Ogwal-Okeng <i>et al.</i> [32] |
| <b>Tansania</b>                       | SP<br>CQ             | 44 % (SP) erfüllten weder die Gehalts- noch Zerfallsprüfung; sehr schlechte Wirkstofffreisetzung   | Minzi <i>et al.</i> [31]       |
| <b>Nigeria</b>                        | CQ<br>CH<br>MQ<br>SP | 48 % der Proben enthielten nicht den deklarierten Wirkstoffgehalt  | Taylor <i>et al.</i> [33]      |
| <b>Nigeria</b>                        | CQ                   | Einige Proben enthielten den deklarierten Wirkstoff nur in Spuren; bei drei Proben lag der Gehalt unter 50 %   | Taylor <i>et al.</i> [33]      |

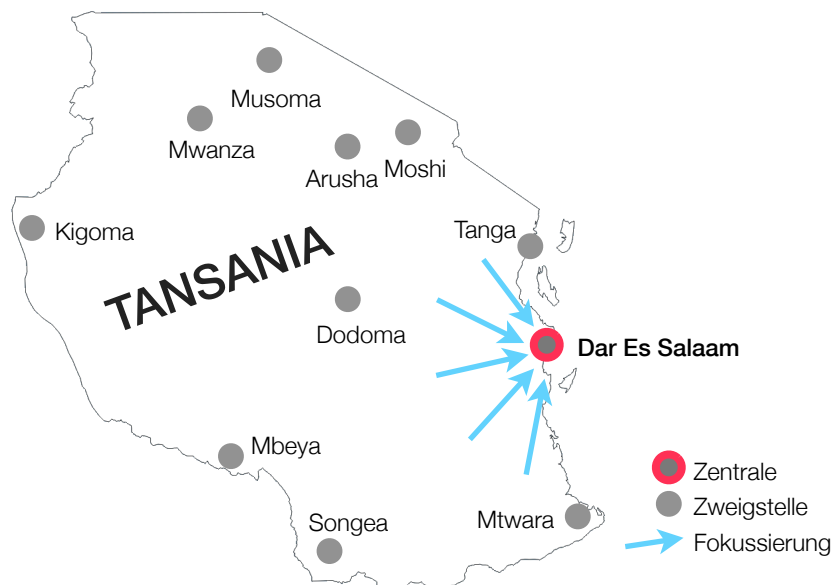
#: CQ=Chloroquin, CH=Chinin, SP=Sulfadoxin/Pyrimethamin, ST=Sulfamethoxazol/Trimethoprim, AQ=Amodiaquin, AS=Artesunat, AE=Artemether, MQ=Mefloquin.

Selbst die jeweiligen nationalen Kontrollbehörden können die Warenbewegungen im eigenen Land nicht vollständig nachvollziehen und kontrollieren, wodurch viele Schwachstellen in der Versorgungskette entstehen [34]. Hierfür ist zum einen der dünne Besiedlungsgrad der zumeist großflächigen Länder und die schlechte infrastrukturelle Erschließung entlegener Landesteile,

zum anderen die stark zentralisierte Organisationsstruktur vieler Behörden verantwortlich. Ausführliche Kontrollen sind meistens nur im direkten Einzugsgebiet der jeweiligen Zentrale möglich.

### 1.2.2 Pharmazeutische Qualitätskontrolle am Beispiel Tansania

Die in Tansania zuständige Zulassungs- und Kontrollbehörde, die „Tanzania Food and Drugs Authority“ (TFDA), verfügt zwar bereits über gut entwickelte und auf nationaler Ebene implementierte Strukturen, dennoch fokussiert sich das Arbeitspensum vor allem auf den in Dar Es Salaam ansässigen Hauptsitz. Die Laboratorien dort wurden bereits zur Liste der WHO-präqualifizierten Einrichtungen hinzugefügt und erlauben die Durchführung eines breiten Spektrums an instrumentellen Verfahren, die heute in der pharmazeutischen Analytik als Goldstandard gelten [35].



**Abbildung 1.2.2-1:** Zentralisierte Organisationsstruktur der Tansanischen Arzneimittelbehörde TFDA mit den „Zone Offices“.

Die TFDA betreibt in allen Regionen Tansanias Zweigstellen, sogenannte *Zone Offices*, die für die lokale Verteilung von Medikamenten sowie für die Überwachung der Arzneimittelqualität zuständig sind (siehe Abbildung 1.2.2-1). Weiterhin dienen sie der Bevölkerung als Ansprechpartner bei allen Fragen bezüglich der Medikamentensicherheit. Obwohl die TFDA netzwerkartig strukturiert ist, werden alle Anfragen in der Regel in die Zentrale in Dar es Salaam weitergeleitet und dort bearbeitet. Die Mitarbeiter stehen zusätzlich vor der Herausforderung, zahlreiche Untersuchungen für internationale Testlaboratorien zu bearbeiten, die aufgrund der Präqualifizierung vor allem aus benachbarten Ländern angefragt werden. Die Flut der Analysen kann letztendlich nicht zeitnah bearbeitet werden.

Die im Folgenden angeführten Faktoren schwächen die nationalen Kontrollmechanismen während der Arzneimittelüberwachung und tragen oftmals in einem sehr hohen Ausmaß dazu bei, dass qualitativ minderwertige bzw. gefälschte Arzneimittel besonders in Entwicklungsländern eine zunehmende Verbreitung finden:

1. Testlabore verfügen in der Regel nicht über die entsprechende technische und instrumentelle Ausstattung, um eine umfassende Analytik entsprechend den Monographien der wichtigsten Arzneibücher durchzuführen. Die im Europäischen Arzneibuch (*Ph. Eur.*) oder im Amerikanischen Arzneibuch (*United States Pharmacopoeia, USP*) beschriebenen Methoden erfordern oftmals moderne und teure Instrumente, die in den Industrienationen zwar zur Standardausrüstung gehören, für Labore in ressourcenlimitierten Ländern jedoch unerschwinglich bzw. dort überhaupt nicht erhältlich sind. Des Weiteren ist eine gewisse Infrastruktur notwendig, damit sie betrieben werden können, beispielsweise eine konstante Strom- und Wasserversorgung. Da die meisten Laboratorien nicht entsprechend ausgestattet sind, ist der Routinebetrieb solcher Geräte erheblich erschwert.

Im Rahmen einer *Fact Finding Mission* und des damit verbundenen Besuches verschiedener Laboratorien in Tanzania konnten diese Umstände bestätigt werden (siehe Abbildung 1.2.2-2).



**Abbildung 1.2.2-2:** Sehr einfach ausgestatteter HPLC-Arbeitsplatz in einem Labor in Tanzania. Quelle: Privat.

2. Betrieb und Wartung der Analysengeräte müssen durch ausreichend geschultes und qualifiziertes Personal erfolgen. Entwicklungsländer stehen hier besonders durch den vorherrschenden Fachkräftemangel (pharmazeutisch-technisches Laborpersonal, Apotheker) nicht selten vor großen Problemen. In Tanzania ist es beispielsweise notwendige gängige

Praxis, dass die zur Reparatur bzw. Wartung einer HPLC-Anlage erforderlichen Servicekräfte aus dem Ausland rekrutiert werden, was mit enormen Kosten und zeitlichen Verzögerungen verbunden ist.

3. Komplexe und undurchsichtige Vertriebsstrukturen innerhalb der betroffenen Länder erlauben es kaum, den Weg eines Arzneimittels vom Hersteller über Zwischenhändler bis hin zum Patienten lückenlos verfolgen zu können.
4. Die Abhängigkeit von Arzneimittelimporten aus dem Ausland, vor allem aus China und Indien, ist einer der Hauptgründe für die Überschwemmung der Afrikanischen Märkte mit qualitativ minderwertigen Medikamenten und die zusätzliche Rückdrängung der lokalen Arzneimittelproduktion. Innerhalb der letzten Jahre ist es zudem zur traurigen Praxis geworden, dass unterschiedliche Rohstoff- und Arzneimittelqualitäten an Industrienationen und Entwicklungsländer geliefert werden [36].

Auch in Europa werden Arzneimittel bzw. -stoffe häufig aus dem Ausland importiert. Im Jahr 2006 schätzte die Europäische Zollbehörde, dass bis zu 80 % der weltweiten Produktfälschungen, nicht nur im pharmazeutischen Sektor, aus China stammen [37].

### **1.2.3 Das GPHF-Minilab®**

In den 1990er Jahren wurde ausgehend von einer Initiative des Global Pharma Health Fund (GPHF) und der Firma Merck nach einer Möglichkeit gesucht, Arzneimittel unter einfachsten „Feldbedingungen“ schnell und kostengünstig untersuchen zu können. Die Identifizierung eines Arzneistoffes sowie die ungefähre Bestimmung des Gehaltes sollten auf sehr schnellem Wege möglich und ohne Laboratorium bzw. komplexe Ausstattung durchführbar sein. Die Charakterisierung eines Arzneimittels anhand dieser Kriterien gilt bis heute als ein integraler Bestandteil der pharmazeutischen Qualitätskontrolle aller Arzneistoffe (siehe Kapitel 2).

Das Ergebnis der Entwicklungsarbeiten wurde in Form des sogenannten „Minilab®“ vorgestellt, einem mobilen Testlabor in zwei leicht transportablen Koffern (vgl. Abbildung 1.2.3-1). Darin sind alle relevanten Utensilien, z. B. Reagenzgläser, Pipetten, Chemikalien und Dünnschichtchromatographieplatten zur Identifizierung und semiquantitativen Bestimmung von mittlerweile 70 Arzneistoffen der „WHO Essential Medicines List“ enthalten [38, 39]. Dem Minilab® liegen außerdem zwei ausführliche Handbücher bei, in denen die einzelnen Tests anhand von Text und Bildern sehr genau beschrieben sind, wodurch auch weniger gut ausgebildete bzw. wenig erfahrene Anwender damit arbeiten können. Viele Afrikanische Staaten haben es bereits in ihre nationalen Kontrollprogramme aufgenommen, so beispielsweise auch Tansania, wo es von der TFDA flächendeckend zur Qualitätsprüfung von Medikamenten eingesetzt wird [40]. Mit dem Minilab® kann eine hohe Anzahl an Proben schnell und kostengünstig untersucht werden. Der



große Vorteil, besonders während der Anwendung in ländlicheren Gebieten, besteht darin, dass keinerlei zusätzliche Laborausstattung sowie keine externe Stromversorgung benötigt wird. Dies macht es zu einem idealen Hilfsmittel für schnelle Untersuchungen vor Ort, bei denen keine anderweitige Möglichkeit zur Verfügung steht.

Die Identifizierung eines Arzneistoffes wird mit Hilfe von Farbreaktionen durchgeführt, die Quantifizierung erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie (DC; siehe Kapitel 2.2 und 2.4). Alle Ergebnisse der quantitativen Bestimmung hängen allerdings stark von der Erfahrung und dem Geschick des jeweiligen Analytikers ab und müssen daher stets kritisch bewertet werden. Da die Auswertung der Platten nicht instrumentell mit Hilfe eines Densitometers sondern rein visuell erfolgt, unterliegen die Ergebnisse einer gewissen Unsicherheit und weisen eine nur sehr geringe Reproduzierbarkeit auf. Die Substanzflecken unterscheiden sich oftmals nur marginal in Größe bzw. Intensität, was vom menschlichen Auge nicht gut wahrgenommen werden kann. Letztendlich wird hierbei der Wirkstoffgehalt falsch bestimmt, beispielsweise als der Deklaration entsprechend, obwohl er eigentlich viel niedriger ist [41]. In einer groß angelegten Studie der WHO zur Qualität verschiedener Antimalariamedikamente in Afrika konnte durch den Vergleich mit validierten flüssigchromatographischen Verfahren gezeigt werden, dass mit dem Minilab® nur bei etwa 40 % der Proben tatsächlich korrekte Ergebnisse ermittelt werden konnte. Im Fall der übrigen 60 % wurde zwar ebenfalls die deklarierte Menge des Wirkstoffes gefunden, allerdings handelte es sich hierbei um falsch positive Ergebnisse, denn die Gehalte lagen in Wirklichkeit wesentlich niedriger [42]. Informationen aus solchen schnell durchgeführten Untersuchungen können zwar durchaus wertvoll sein, beispielsweise wenn die Qualität eines Arzneimittels schnell und unter einfachsten Bedingungen abgeschätzt werden soll. Heute handelt es sich allerdings bei einem Großteil der Arzneimittelfälschungen nicht mehr nur um Medikamente, die keinerlei Wirkstoff enthalten, sondern meist um komplexe Kopien der Originalpräparate mit geringen Anteilen des jeweiligen Arzneistoffes oder mit einem Arzneistoff ungenügender Reinheit. Dies kann jedoch mit einfachen Untersuchungsmethoden wie Farbreaktionen nicht eindeutig nachgewiesen werden, denn oftmals genügen bereits Spuren des betroffenen oder eines eng verwandten Arzneistoffes, um während solcher Untersuchungen ein falsch positives Ergebnis zu generieren.

Die im Minilab® eingesetzte DC ist zudem nur bedingt geeignet, um das Verunreinigungsprofil eines Arzneistoffes zu bestimmen, weshalb stets die Anwendung empfindlicherer, flüssigchromatographischer Verfahren empfehlenswert ist. Mit dem Minilab® sind außerdem nur Untersuchungen von Tabletten und Kapseln, nicht jedoch von anderen Arzneiformen möglich (z. B. flüssige Zubereitungen). Es ist dann stets unausweichlich, zusätzliche Untersuchungen zur detaillierten Ermittlung der Zusammensetzung einer Probe durchzuführen [43, 44].



Abbildung 1.2.3-1: Die zwei Koffer des GPHF-Minilab® (Foto: Privat).

### 1.3 Malaria und Wirkstoffe zu ihrer Behandlung

#### 1.3.1 Die Erkrankung und ihre Pathogenese

Die Malaria ist eine der bedeutendsten Tropenkrankheiten, an der jährlich bis zu eine Million Menschen sterben [45]. Bedingt durch den Lebensraum des Überträgers, der weiblichen *Anopheles*-Mücke, ist sie in den gemäßigten Breiten kaum, in tropischen Gebieten der Erde dagegen sehr weit verbreitet. In Deutschland werden pro Jahr zwischen 500 und 1000 (2013: 637) Fälle registriert, die meistens durch die Einschleppung aus einem Urlaubsland herrühren [46, 47]. In Afrika ist die Erkrankung hingegen allgegenwärtig, besonders in den tropischen Gebieten der Länder südlich der Sahara, wo der Vektor ideale Lebensvoraussetzungen vorfindet [48]. Man unterscheidet drei verschiedene Arten der Malaria, die sich im zugrunde liegenden Erreger und in der späteren klinischen Symptomatik unterscheiden: Die Malaria *tertiana*, die Malaria *quartana* und die Malaria *tropica*. Ausgelöst werden alle drei Formen durch einzellige Blutparasiten, den Plasmodien, die sowohl den Menschen als auch die *Anopheles*-Mücke als Wirtsorganismus ausnutzen und in ihnen unterschiedliche Entwicklungsstufen durchlaufen.

Die Übertragung auf den Menschen findet durch den Stich einer infizierten Mücke statt, wobei die Erreger über den Speichel des Mückenweibchens in die menschliche Blutbahn gelangen.

## EINLEITUNG

Sie setzen sich in der Leber fest und reifen dort über die Stufe der Merozoiten zu Schizonten heran. Diese wechseln ihren Aufenthaltsort im Körper und befallen die Erythrozyten, was den entscheidenden Schritt während der Erkrankung darstellt: Durch die plötzlich stattfindende exponentielle Vermehrung der Parasiten und die dadurch bedingte Lyse der Blutkörperchen werden die charakteristischen, zeitlich unterschiedlich auftretenden Fieberschübe verursacht. Bei der Malaria *tertiana* treten sie alle drei, bei der Malaria *quartana* alle vier Tage auf. Obwohl dies keine trivialen Infektionen sind, sind sie dennoch mit den verfügbaren Medikamenten behandelbar und die Prognosen sind in der Regel gut. Im Gegensatz hierzu führen die bei der Malaria *tropica* unregelmäßig und in sehr starkem Umfang auftretenden Fieberschübe sowie die dadurch bedingte rapide Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Patienten unbehandelt schnell zu einem Multiorganversagen und zum Tod. Die Spezies *Plasmodium falciparum* zerstört nicht nur die roten Blutkörperchen im menschlichen Organismus, sondern ist durch spezielle Proteine auch in der Lage, sich an Blutgefäße anderer Organe zu heften und dort zu persistieren. Die feinen Blutkapillaren können verstopfen und die daraus resultierende Sauerstoffmangelversorgung in Verbindung mit der ohnehin schon manifesten Anämie schädigt massiv das umliegende Gewebe [49].

Der Mensch dient während des Entwicklungszyklus lediglich als Zwischenwirt und die Plasmodien können durch einen erneuten Mückenstich einer *Anopheles*-Mücke wieder in ihren Ausgangswirt zurückwandern. Dort entwickeln sich dann weibliche und männliche Geschlechtsformen, die Gameten, welche zu einer Zygote verschmelzen und durch einen Stich erneut auf den Menschen übertragen werden können.

**Tabelle 1.3.1-1:** Wirkprinzipien der aktuell verfügbaren Malariamedikamente.

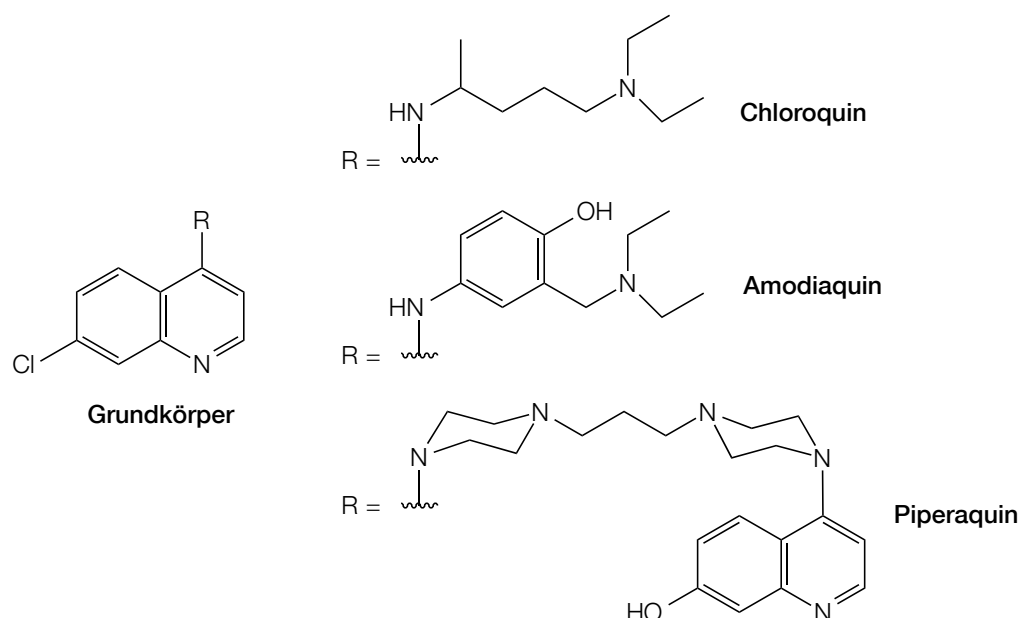
| Substanzklasse                     | Beispiele                        | Vermuteter Wirkmechanismus   |
|------------------------------------|----------------------------------|--|
| <b>4-Aminochinoline</b>            | Chloroquin<br>Piperaquin         | Hemmung der Hämoglobinverwertung im Erreger durch Blockade der Hämozoin-Agglomeration  |
| <b>8-Aminochinoline</b>            | Primaquin                        | nicht bekannt  |
| <b>Arylaminoalkohole</b>           | Lumefantrin<br>Mefloquin         | wie 4-Aminochinoline   |
| <b>Artemisininderivate</b>         | Dihydroartemisinin<br>Artemether | (i) Spaltung des Endoperoxides und Bildung reaktiver Kohlenstoffradikale;<br>(ii) Schädigung essentieller Proteine im Erreger;<br>(iii) Hemmung einer membranständigen Calcium-ATPase und langfristige Störung der Calciumhomöostase |
| <b>Folsäureantagonisten</b>        | Sulfadoxin<br>Pyrimethamin       | Hemmung der Folsäurebildung durch Inhibition der Dihydropteroat-Synthase bzw. der Dihydrofolat-Reduktase   |
| <b>Hemmstoffe der Atmungskette</b> | Atovaquon<br>Proguanil           | Blockade des Ubichinon-vermittelten Elektronentransportes  |
| <b>Antibiotika</b>                 | Doxycyclin<br>Clindamycin        | Störung der RNA-Translation im Apikoplasten  |

Der Stoffwechsel der Parasiten ist im Wesentlichen durch die Verwertung des Hämoglobins während der Persistenz in den menschlichen Erythrozyten geprägt. Es werden große Mengen des Stoffes aufgenommen und der Proteinanteil zur Energiegewinnung in einer Nahrungsvakuole verstoffwechselt.

Das übrig gebliebene Häm wird dabei durch Oxidationsprozesse am zentralen Eisenatom ( $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$ ) in das toxische Ferriprotoporphyrin IX (FPIX) umgewandelt. Die anschließende Agglomeration zum Hämozoinpigment dient der Entgiftung und kann gleichzeitig zu diagnostischen Zwecken verwendet werden: Unter dem Mikroskop sind dunkle Partikel erkennbar.

Nach dem Nachweis der Plasmodien, der Bestimmung der Subspezies sowie ihrer Quantifizierung muss unmittelbar mit der Gabe antiplasmodial wirksamer Medikamente begonnen werden. In vielen Teilen der Erde haben sich bereits manifeste Resistenzen gegenüber den gebräuchlichen Wirkstoffen bzw. Wirkstoffkombinationen ausgebildet. Insgesamt stehen heute sieben verschiedene Substanzgruppen mit unterschiedlichen Wirkprinzipien zur Verfügung, die in Tabelle 1.3.1-1 zusammengestellt sind. Deshalb ist die Auswahl der Arzneistoffe sowie ihre Kombination von grundlegender Bedeutung für eine erfolgreiche Therapie und stellt die Ärzte weltweit immer wieder vor neue Herausforderungen [50].

### 1.3.2 4-Aminochinoline



**Abbildung 1.3.2-1:** Strukturformeln der 4-Aminochinoline Chloroquin, Amodiaquin und Piperaquin.

Alle Vertreter dieser Substanzklasse verfügen über ein Chinolingrundgerüst, das einen Chlorsubstituenten in Position 7 sowie einen Aminoalkylrest in Position 4 trägt. Wichtige Vertreter dieser Stoffklasse sind Chloroquin, Amodiaquin und Piperaquin (siehe Abbildung 1.3.2-1). Obwohl

zahlreiche Resistenzen, besonders gegenüber dem häufig angewendeten Chloroquin, beschrieben sind, stellen sie immer noch wichtige und weit verbreitete Wirkstoffe dar, die in vielen afrikanischen Ländern bevorzugt zur Prophylaxe und Therapie der Malaria angewendet werden [51].

### 1.3.3 8-Aminoquinoline

Alle Vertreter dieser Gruppe tragen eine Methoxygruppe an Position 6 des Chinolinringes und sind am Stickstoffatom in Position 8 mit einer Aminoalkyl-Seitenkette substituiert. Ihr Wirkmechanismus ist nicht genau bekannt, man vermutet jedoch unter anderem einen Antagonismus zum Ubichinon in der Atmungskette [51]. Wichtige Verbindungen dieser Substanzklasse sind Pamaquin und Primaquin, welches auch in der Lage ist, die in der Leber persistierenden Formen der Plasmodien abzutöten. Das durch einen Trifluormethylphenyl-Substituenten weiter strukturell abgewandelte Tafenoquin wurde innerhalb der Gruppe um Shanks synthetisiert und befindet sich zur Zeit in Phase III der klinischen Studien [52]. Die Strukturformeln der Arzneistoffe sind in Abbildung 1.3.3-1 dargestellt.

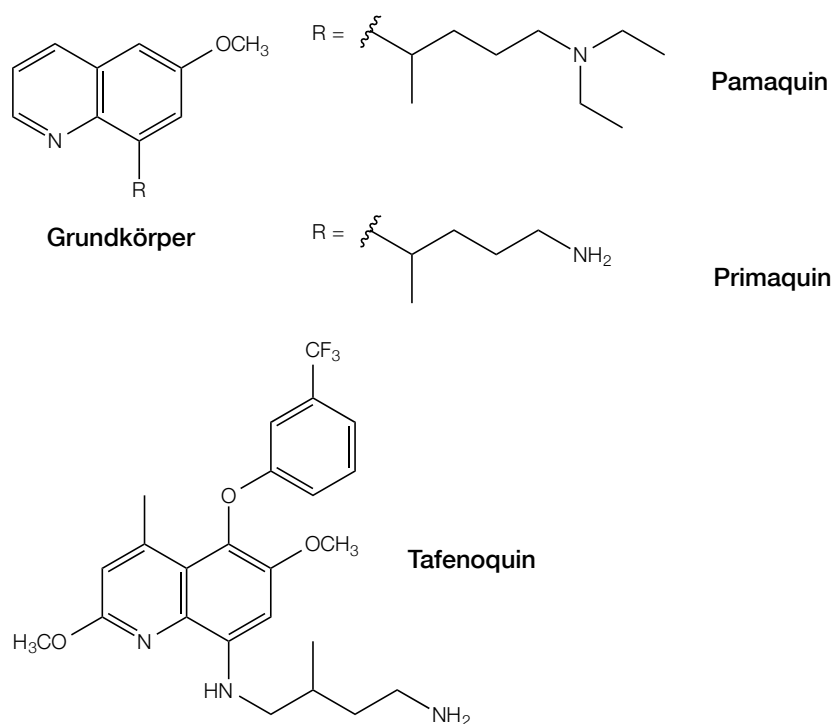
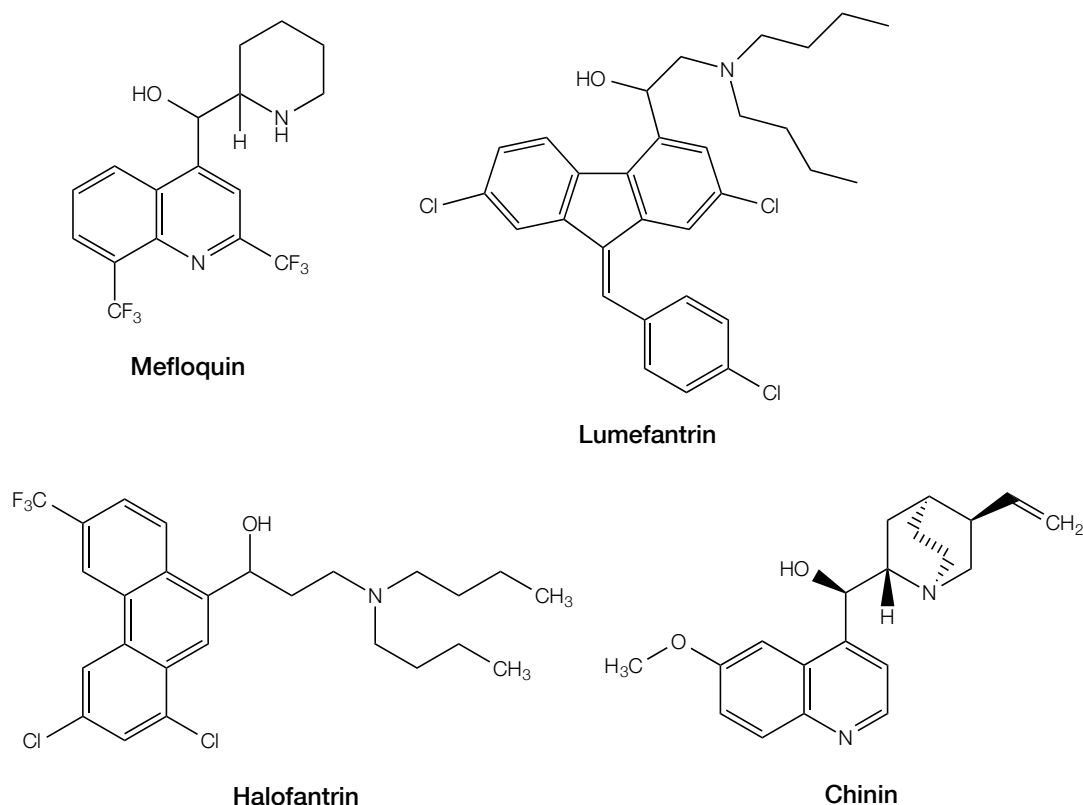


Abbildung 1.3.3-1: Strukturformeln der 8-Aminoquinoline Pamaquin, Primaquin und Tafenoquin.

### 1.3.4 Arylaminoalkohole

Mefloquin, Lumefantrin und Halofantrin sind Arzneistoffe aus der Gruppe der Arylaminoalkohole. Sie besitzen, analog dem Chinin, eine aliphatische Seitenkette mit einer Alkohol- sowie einer Aminofunktion, die an ein lipophiles aromatisches Grundgerüst geknüpft ist (siehe Abbildung 1.3.4-1). Im Lumefantrin und im Halofantrin wurde der Chinolinkern durch ein Fluoren- bzw. Anthracengerüst ersetzt. Es handelt sich um sehr lipophile Substanzen, die aufgrund des fehlenden zweiten basischen Zentrums nur als einfach geladenes Ion vorliegen können [53]. Chinin selbst ist das älteste bekannte Antimalariamittel. Es wurde schon vor über 500 Jahren in Form von Chinarinde (*Cinchonae cortex*) angewendet, aus der es allerdings erst 1820 isoliert werden konnte [54]. 1940 schließlich gelang die Totalsynthese [55]. Aufwand und Ausbeute stehen allerdings in keinerlei Relation, sodass sie bis heute unbedeutend geblieben ist. Die Bedeutung in der Malariabehandlung ist zudem sehr stark zurück gegangen, nicht zuletzt aufgrund ausgeprägter Resistenzen und damit einhergehender Wirkungslosigkeit.



**Abbildung 1.3.4-1:** Strukturformeln der Arylaminoalkohole Mefloquin, Lumefantrin und Halofantrin sowie des strukturverwandten Alkaloids Chinin.

### 1.3.5 Artemisininderivate

Ähnlich der Chinarinde wurden bereits vor mehr als 2000 Jahren Beifuß-Extrakte (*Artemisia annua*) in Asien gegen Fieber und fieberhafte Erkrankungen eingesetzt. 1971 konnte der für die Wirksamkeit verantwortliche Stoff in Form des Sesquiterpenlactons Artemisinin identifiziert und isoliert werden [56]. Die Struktur konnte bereits kurz nach der Entdeckung aufgeklärt werden, was die Voraussetzung zur Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen war [57].

Durch Reduktion der Lactonfunktion im Artemisinin erhält man das Dihydroartemisinin, dessen Veretherung an der Hydroxylfunktion die Verbindung Artemether liefert. Durch Veresterung mit Bernsteinsäure wird Artesunat (siehe Abbildung 1.3.5-1) gebildet. Letzteres ist vermutlich ein Prodrug, das durch unspezifische Esterasen wieder in Dihydroartemisinin überführt wird.

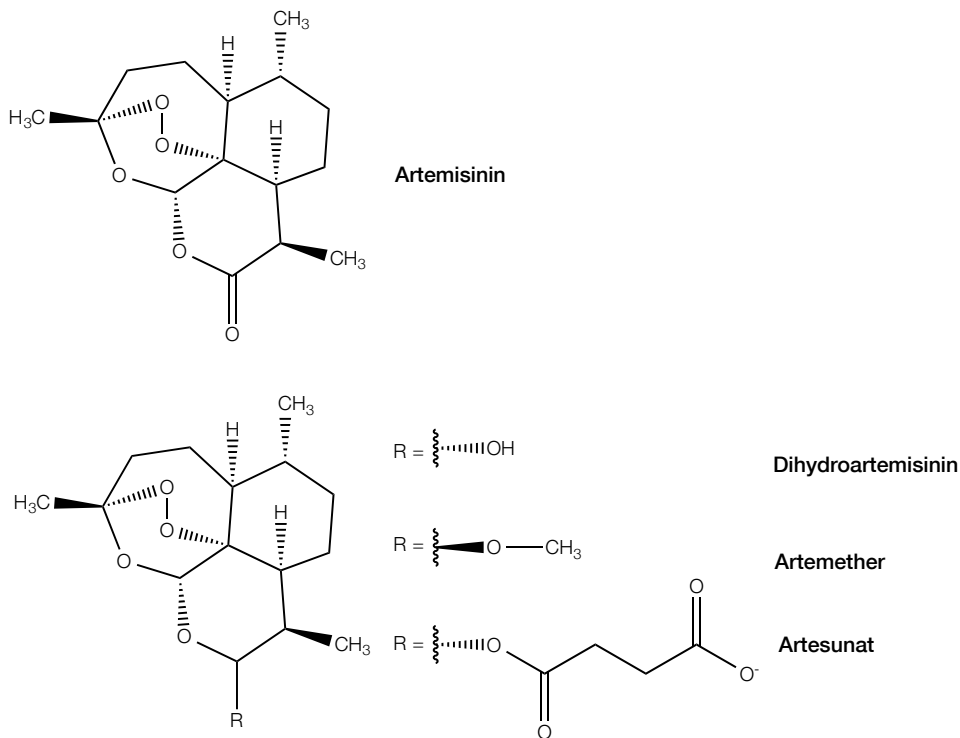


Abbildung 1.3.5-1: Strukturformeln von Artemisinin, Dihydroartemisinin, Artemether und Artesunat.

### 1.3.6 Antifolate, Hemmstoffe der Atmungskette und weitere Antibiotika

#### Antifolate

Eine bereits in der Behandlung bakterieller Infektionen sehr erfolgreiche Strategie ist die gezielte Inhibition der am Folsäuremetabolismus beteiligten Enzyme. Folsäure ((2S)-N-(4-(((2-Amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)benzoyl)glutaminsäure) ist für den Menschen essentiell, muss also mit der Nahrung aufgenommen werden. Bakterien und auch Protozoen sind hingegen in der Lage, sie endogen in drei Schritten aus der Vorstufe Hydroxymethyldihydropteridin-

## EINLEITUNG

diphosphat aufzubauen. Dieses wird durch das Enzym Dihydropteroat-Synthase (DHPS) mit 4-Aminobenzoessäure gekoppelt und dann mit Glutamat zur Dihydrofolsäure umgesetzt. Die entstandene Verbindung wird schließlich durch die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) zur Tetrahydrofolsäure reduziert (siehe Abbildung 1.3.6-1). Durch Substratanaloga wie Sulfadoxin wird die Kopplung der 4-Aminobenzoessäure an das Dihydropteroatmolekül verhindert, Pyrimethamin oder Proguanil hemmen das Enzym DHFR und verhindern somit die Bildung der Tetrahydrofolsäure (Strukturformeln siehe Abbildung 1.3.6-2) [58]. Durch Kombination der Arzneistoffe lassen sich synergistische Wirkeffekte erzielen, da in diesem Fall beide Enzyme des Folsäurestoffwechsels gleichzeitig inhibiert werden [59].

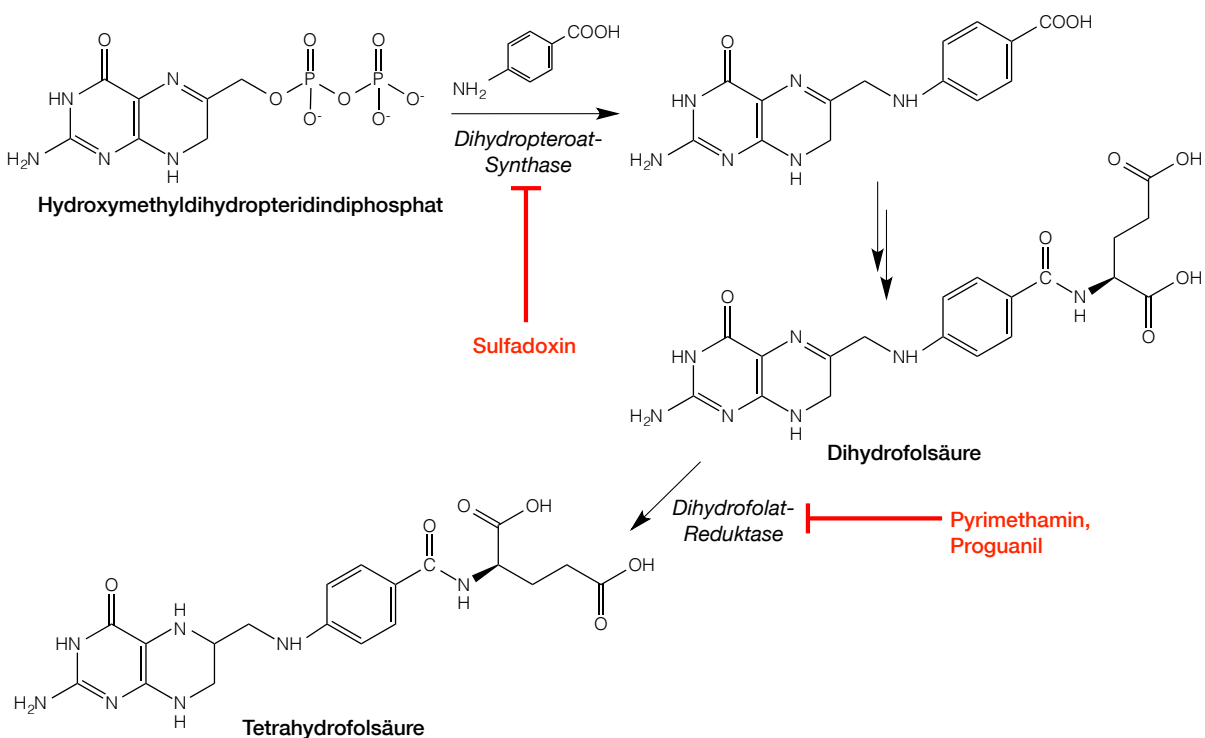


Abbildung 1.3.6-1: Der Folsäure-Metabolismus.

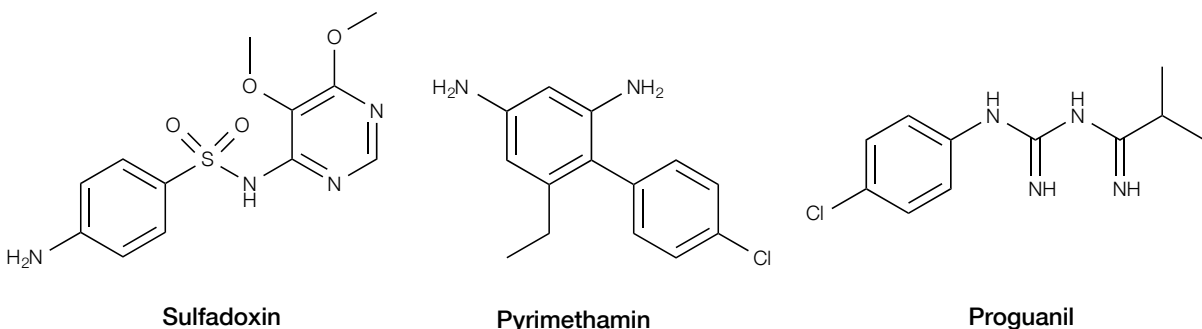
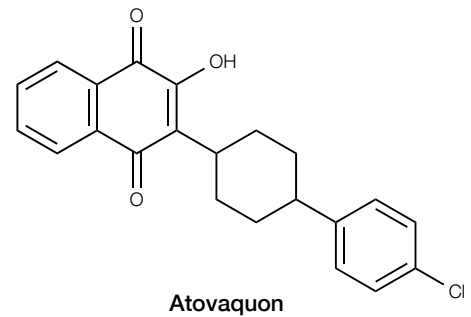


Abbildung 1.3.6-2: Strukturformeln von Sulfadoxin, Pyrimethamin und Proguanil.



Hemmstoffe der Atmungskette

Atovaquon (siehe Abbildung 1.3.6-3) ist die einzige Verbindung, die während der Zellatmung in die Elektronentransportkette der plasmodialen Mitochondrien eingreift. Das in Position 2 und 3 substituierte Naphthochinon kann durch einen Antagonismus zum Ubichinon den Prozess des Elektronentransportes blockieren, wodurch im Mitochondrium die zur Energiegewinnung notwendigen Membranpotentiale zusammenbrechen und die Produktion zellulärer Energie unmöglich wird



**Abbildung 1.3.6-3:** Strukturformel von Atovaquon.

[60]. Die Kombination aus Atovaquon und Proguanil gilt als Mittel der Wahl zur Behandlung einer therapieresistenten *Malaria tropica* und weist zudem ein als gering eingestuftes Nebenwirkungspotential auf [61]. Es sind entsprechende Fertigarzneimittel zugelassen [62].

Weitere Antibiotika

Die Arzneistoffe Doxycyclin (ein Tetracyclin) und Clindamycin (ein Lincosamid) können ebenfalls zur Therapie bzw. im Rahmen eines *Off-Label-Uses* zur Prophylaxe der Malaria eingesetzt werden. Sie zählen zu den klassischen Antibiotika, mit denen vornehmlich bakterielle Infektionen behandelt werden und sollen zur Vollständigkeit an dieser Stelle mit angeführt werden. Sie können über eine Störung der Proteinbiosynthese die Vermehrung der Erreger hemmen, werden aber in der Regel mit weiteren Wirkstoffen aus den bereits beschriebenen Gruppen kombiniert.



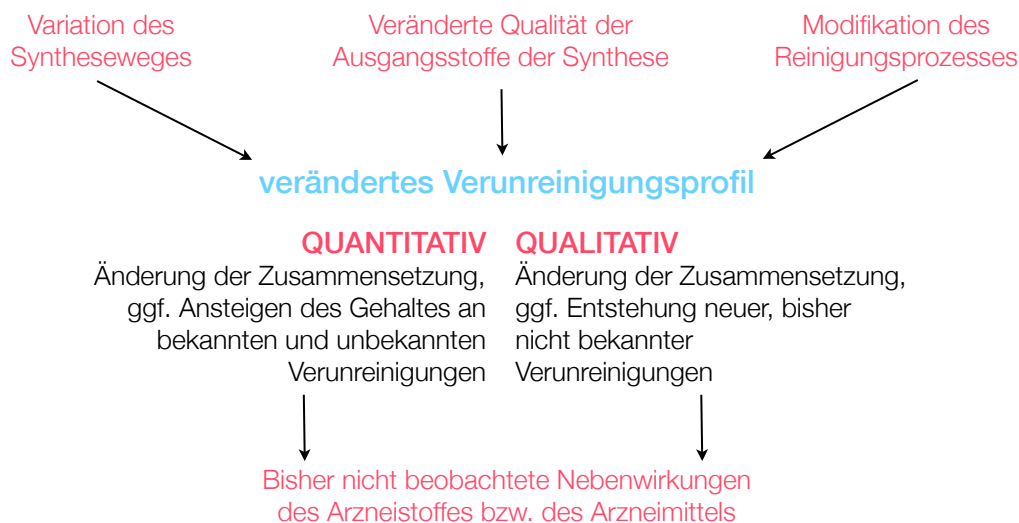
# Reinheitsanalytik und Qualitätskontrolle von Arzneistoffen



## 2 Reinheitsanalytik und Qualitätskontrolle von Arzneistoffen

Während der Produktion, Reinigung, Verarbeitung und Lagerung pharmazeutischer Wirk- und Hilfsstoffe können verschiedenste Neben- und Abbauprodukte entstehen. Ihre Anwesenheit in einem Fertigarzneimittel sollte zwar möglichst ausgeschlossen sein, dies kann allerdings nur in den seltensten Fällen vollständig erreicht werden, sodass stets mit einem gewissen Anteil an Verunreinigungen zu rechnen ist. Wirksamkeit und Unbedenklichkeit eines Produktes dürfen allerdings hiervon nicht beeinträchtigt werden [63]. Aus diesem Grund ist es notwendig, einen Arzneistoff hinsichtlich seiner Reinheit ausreichend zu charakterisieren.

In der ICH-Richtlinie Q3A(R2) zur Kontrolle von Verunreinigungen in neuen Arzneistoffen wird zwischen organischen, aus Herstellung, Reinigung oder Lagerung stammenden Verbindungen (Edukte, Zwischen-, Neben- und Abbauprodukte sowie Reagenzien, Liganden und Katalysatoren) und anorganischen Verunreinigungen (Reagenzien, Liganden, Katalysatoren, Schwermetalle und anorganische Salze) unterschieden, auf welche dann beispielsweise in den jeweiligen Monographien der Arzneibücher geprüft wird [64, 65].



**Abbildung 2-1:** Einflussfaktoren auf die Entstehung von Verunreinigungen in Wirk- und Hilfsstoffen (modifiziert nach [64]).

Die Bestimmung des individuellen Verunreinigungsmusters einer Substanz in Bulkwaren bzw. in Fertigarzneimitteln ist ein wichtiger Schritt in der Qualitätsprüfung und lässt sich sowohl zur Bewertung der Qualität als auch zur Aufdeckung und Nachverfolgung von Arzneimittel-fälschungen heranziehen. Das Verunreinigungsmuster einer Probe lässt in der Regel Rückschlüsse auf ihre Quelle zu, denn jeder Hersteller setzt individuelle Produktions- und Reini-

gungsprozesse ein, die zu unterschiedlichen Verunreinigungsmustern führen können.

Die Abänderung eines bekannten Produktionsprozesses ist nicht trivial und muss stets geplant, genau verfolgt, dokumentiert und der Zulassungsbehörde gemeldet werden. Am Beispiel der Umstellung des Herstellungsverfahrens von Tryptophan lässt sich dies gut verdeutlichen: In Japan wurde in den 1990er Jahren der bisherige, etablierte chemisch-synthetische Herstellungsweg durch ein gentechnologisches Verfahren ersetzt. Es entstanden Nebenprodukte, die bis zu diesem Zeitpunkt weder bekannt noch beschrieben waren, darunter das äußerst toxische 1,1-Ethylidenbistryptophan. Etwa 1500 Patienten erkrankten nach der Einnahme der so hergestellten Präparate am *Eosinophilie-Myalgie-Syndrom* und letztendlich waren über 30 Todesfälle zu beklagen [66]. Durch die bisherige, im *Ph. Eur.* beschriebene Reinheitsanalytik unter Verwendung der DC war man nicht in der Lage das Nebenprodukt nachzuweisen, weshalb die Chargen fälschlicherweise freigegeben wurden. Später wurde eine flüssigchromatographische Methode zur Kontrolle dieser und weiterer Verunreinigungen zur Monographie im *Ph. Eur.* erarbeitet und in dieses aufgenommen [67].

Ein weiteres Beispiel, welches die Bedeutung der Reinheitsanalytik gut illustriert, ist die Beimischung toxischen übersulfatierten Chondroitinsulfates zu kommerziellen unfraktionierten Heparinen. Erst nach einem Wechsel der analytischen Methode (Kernresonanzspektroskopie) konnte die Verunreinigung erkannt und quantifiziert werden. Die toxischen Nebenwirkungen forderten bis zu diesem Zeitpunkt zahlreiche Todesfälle [68-70].

## **2.1 Visuelle Prüfungen**

Für die erste Einschätzung der Qualität spielt neben aufwändigen chemisch-analytischen Methoden die visuelle Begutachtung eines Fertigarzneimittels eine wichtige Rolle. Sie sollte stets der klassischen Analytik im Labor vorausgehen, denn durch eine sorgfältige Untersuchung der Primär- bzw. Sekundärverpackung und der einzelnen Arzneiform selbst können bereits wichtige Rückschlüsse auf ihre Beschaffenheit bzw. die Echtheit gezogen werden (siehe Abbildung 2.1-1).

Jedes Arzneimittel verfügt über individuelle, herstellerspezifische Merkmale, sodass es sowohl anhand der Sekundärverpackung (z. B. Position und Form von Klebestellen, Typographie, Herstellerlogo, Hologramme), anhand des Primärpackmittels (z. B. Art der Verblisterung, Position und Aussehen des Chargenaufdruckes) oder der Beschaffenheit der einzelnen Arzneiform (Farbe, Form, Art der Ummantelung, Größe bzw. Abmessungen, Gewicht, Prägungen) charakterisiert werden kann [71]. Eine umfangreiche Übersicht solcher Merkmale wurde von der WHO veröffentlicht [72].

Der Umgang mit rein visuell ermittelten Merkmalen und den daraus abzuleitenden Schlussfolgerungen setzt jedoch einen großen Erfahrungsschatz voraus und erfordert zwingend genuine Referenzprodukte, mit denen die zu untersuchenden Proben verglichen werden können. Die Fähigkeiten und Techniken der Fälscher werden allerdings immer ausgereifter, so dass dieses Vorgehen heute nur noch bedingt zur Identifikation von Plagiaten geeignet ist [73].



Abbildung 2.1-1: Original (links) und Fälschung (rechts) eines Eisen-Folsäure-Präparates in Afrika. Die unterschiedliche Farbe der Tabletten ist deutlich zu erkennen (Foto: Privat).

## 2.2 Nasschemische Reaktionen

Bei der Identifizierung von Arzneistoffen spielt selbst in modernen Monographien die klassische Nasschemie in Form von Farb- und Fällungsreaktionen bis heute eine wichtige Rolle. Solche Tests sind in allen Arzneibüchern beschrieben und ermöglichen es, ohne aufwändige technische Laborausstattung eine schnelle Identifizierung eines Arzneistoffes durchzuführen. Auch in Apotheken werden zur gesetzlich vorgeschriebenen Eingangsprüfung der Rezepturstoffe noch häufig nasschemische Nachweismethoden durchgeführt.

Das Prinzip ist stets die Umsetzung funktioneller Gruppen mit speziellen Reagenzien, wodurch farbige Reaktionsprodukte oder Präzipitate gebildet werden, z. B. Azofarbstoffe, Polymethine

mit ausgeprägten Chromophoren, Komplexverbindungen oder schwer lösliche Salze. Das *Ph. Eur.* fasst im Kapitel „2.3.1: Identitätsreaktionen auf Ionen und funktionelle Gruppen“ wichtige solcher Tests zusammen, die auf den genannten Prinzipien beruhen und entsprechend zur Identifizierung von Arznei- und Hilfsstoffen herangezogen werden [74]. Wie bereits erwähnt, sind in den Protokollen des Minilab® zur qualitativen Bestimmung der Arzneistoffe Farbreaktionen mit einfachen Reagenzien beschrieben [75].

Weaver *et al.* versuchten, nasschemische Tests noch universeller zugänglich zu machen und entwickelten ein Testsystem, mit dem sich die wichtigsten Identitätsprüfungen schnell durchführen lassen. Die eigentlichen Reaktionen finden auf Papierstreifen statt, die zuvor mit den entsprechenden Nachweisreagenzien imprägniert wurden und auf die eine Lösung der zu untersuchenden Probe aufgebracht werden muss [76]. Ein großer Nachteil ist allerdings, dass sie überaus ungenau sind und dass sich die individuellen Analyseergebnisse mehrerer Arzneistoffe kaum voneinander unterscheiden lassen [77, 78].

### **2.3 Galenische Prüfungen: Zerfall, Wirkstofffreisetzung, Gleichförmigkeit von Masse und Gehalt**

Die pharmazeutische Qualität eines Arzneimittels kann neben der Bestimmung der Identität und der Reinheit des Wirkstoffes auch durch spezielle Methoden der pharmazeutischen Technologie beurteilt werden. Hier sind insbesondere die Prüfung auf Zerfall und Wirkstofffreisetzung sowie die Gleichförmigkeit von Masse und Gehalt der einzelnen Arzneiform zu nennen [79].

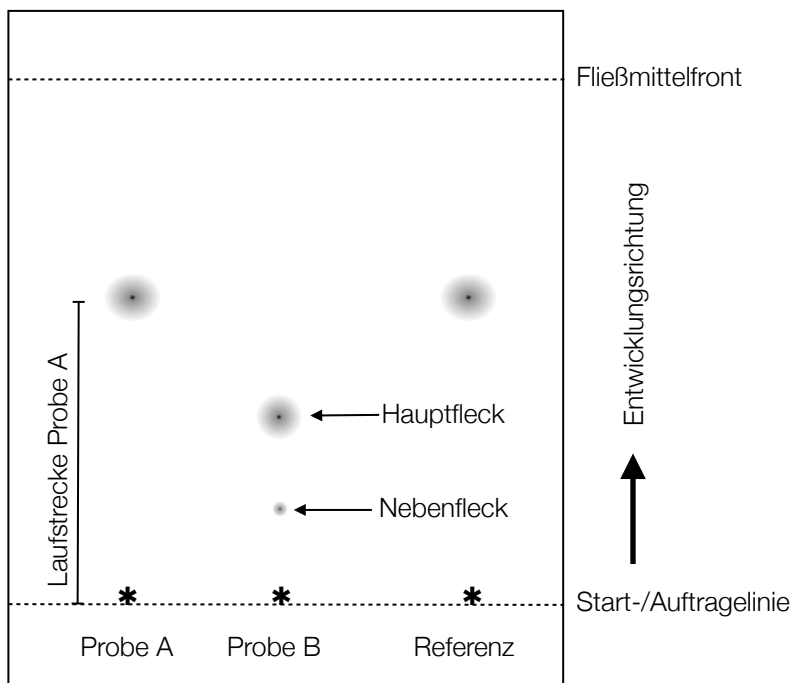
Die Ursachen für eine schlechte galenische Qualität liegen in der Regel in der Herstellung begründet und können sehr vielschichtig sein. In zahlreichen Studien wurde neben der klassischen Analytik die Bestimmung des Zerfalls- und des Freisetzungsverhaltens durchgeführt, wobei an vielen Stellen gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der untersuchten Proben die Anforderungen nur unzureichend erfüllte [78, 80-83].

### **2.4 Dünnschichtchromatographie**

Die bereits im 19. Jahrhundert von Runge entwickelte DC ist eine gut etablierte chromatographische Methode, die die Auftrennung von Stoffgemischen ermöglicht und zur Identifizierung und in gewissem Maße auch zur Quantifizierung der einzelnen Substanzen eingesetzt werden kann. Obwohl sie heute nicht mehr als Methode der Wahl gilt, ist sie dennoch in vielen Arzneibuchmonographien vorzufinden und kann, wie etwa in der Naturstoffanalytik, schnell wertvolle Informationen über die qualitative Zusammensetzung einer unbekannt Probe liefern [84].

Hervorzuheben ist, dass die DC mit einer minimalen Laborausstattung durchgeführt werden kann und dass keine komplexen technischen Geräte benötigt werden.

Alle chromatographischen Prozesse beruhen auf dem Prinzip der Verteilung einer Substanz zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, der stationären (Trägermaterial, Sorbens) und der mobilen (in der Regel flüssigen) Phase. Bei Runge waren dies noch Zellulose und Wasser, heute sind vielfältig modifizierte Kieselgelarten sowie verschiedenste organische Lösungsmittel und -gemische gebräuchlich. Für nahezu jeden Einsatzzweck ist eine breite Auswahl an Sorbentien kommerziell erhältlich und durch die industrielle Produktion immer dünnerer (Aluminiumfolie), gleichmäßigerer (enge Korngrößenverteilung) und einfach handhabbarer (zuschneidbarer) Platten wurde die Kommerzialisierung der DC enorm vorangetrieben [85].



**Abbildung 2.4-1:** Schematische Darstellung eines Dünnschichtchromatogrammes mit zwei aufgetragenen Proben (A, B).

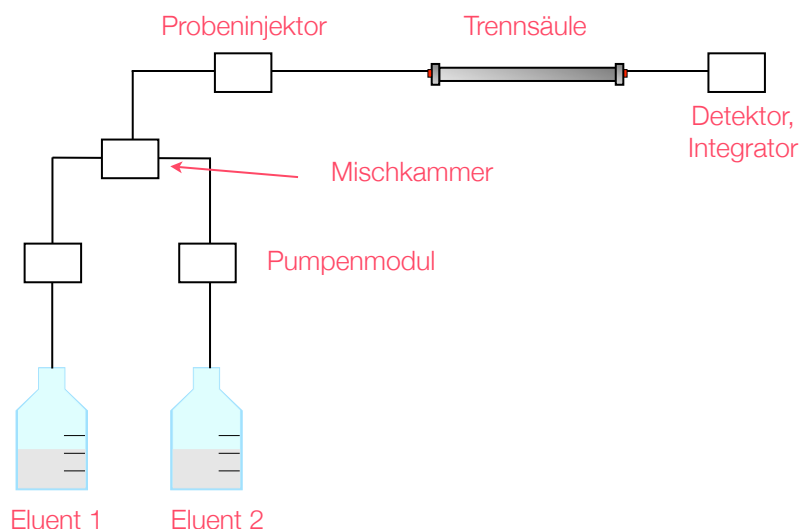
Die Anfertigung eines Dünnschichtchromatogrammes ist einfach und erfordert in der Regel wenig praktischen Aufwand. Nach dem Lösen in einem geeigneten Solvens, zumeist einem organischen Lösungsmittel, werden definierte Volumina der Lösungen an einer Startlinie auf eine DC-Platte aufgetragen (siehe Abbildung 2.4-1). Während der Entwicklung wandert das Lösungsmittelgemisch in Richtung der Plattenoberseite; sobald eine definierte Laufstrecke erreicht worden ist, wird die Platte aus der Kammer entnommen und getrocknet. Die Analyten können nun auf unterschiedliche Weise detektiert werden: (i) Betrachten der Platte unter ultraviolettem Licht, wobei die Substanzflecke eine punktuelle Löschung der Eigenfluoreszenz des in die Platten eingearbeiteten Indikators verursachen; (ii) Besprühen mit oder Eintauchen in



spezielle Reagenzien, wobei farbige Reaktionsprodukte mit den Analyten entstehen; (iii) die instrumentelle Auswertung durch Messung der Absorption ultravioletter Strahlung mit Hilfe eines Densitometers. Zur Charakterisierung der Substanzen auf einer DC-Platte dient normalerweise der  $R_f$ -Wert: Es handelt sich um den Quotienten aus Laufstrecke der betrachteten Substanz und der Gesamtlaufstrecke des Fließmittels von der Start- bis zur Endlinie [86]. Durch den Vergleich zweier  $R_f$ -Werte lässt sich die Identität eines Stoffes mit hoher Zuverlässigkeit bestimmen, denn der  $R_f$ -Wert ist eine substanzspezifische Größe, sodass gleiche Laufstrecken einer Probe- und einer Referenzsubstanz auf das Vorliegen der gleichen Verbindung hindeuten. Da zur Anfertigung und Entwicklung einer DC meist nur sehr einfache analytische Geräte benötigt werden, wird sie in vielen Entwicklungsländern noch bevorzugt zur Reinheitsanalytik von Arzneistoffen angewendet. Auch der Arbeitsaufwand bzw. die zur Durchführung erforderliche Qualifikation sind wesentlich geringer, als es für komplexere instrumentelle Verfahren der Fall ist.

## 2.5 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist ein instrumentelles Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen sowie der anschließenden qualitativen und quantitativen Bestimmung der einzelnen Analyten. Hierbei erfolgt die Trennung, analog der DC, durch spezifische Verteilungsprozesse bzw. Adsorptionsvorgänge zwischen einer stationären und einer mobilen Phase, die nicht miteinander mischbar sind. Ein typisches HPLC-System ist in Abbildung 2.5-1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2.5-1:** Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage. Nach [86].

Man unterscheidet in der Flüssigchromatographie verschiedene Trennmodi, denen unterschiedliche Trennprinzipien zugrunde liegen und die je nach analytischem Trennproblem ausgewählt werden müssen: (i) Normalphasenchromatographie unter Ausnutzen spezifischer Adsorptions- und Massenverteilungsprozesse; (ii) Chromatographie an Umkehrphasen (*reversed phase*, RP) durch spezifische Verteilungsvorgänge; (iii) Größenausschlusschromatographie durch unterschiedliche räumliche Beanspruchung der Analyten in einer entsprechenden Matrix; (iv) Ionenaustausch durch Verdrängungsprozesse an ebenfalls ionisch modifizierten stationären Phasen; (v) chirale Trennungen durch den Einsatz chiraler Selektoren bzw. Sorbentien und (vi) Ionenpaarchromatographie unter Verwendung von Tensiden, die der mobilen Phase zugesetzt werden (Ionenpaarreagenzien) [87].

Heute ist die RP-Chromatographie der am häufigsten eingesetzte Chromatographiemodus. Sie ist vor allem zur Auftrennung apolarer Analyten geeignet und ist in der Mehrzahl der Monographien des *Ph. Eur.* zur Bestimmung der *Verwandten Substanzen* vorgeschrieben. Als mobile Phase kommen wässrige Pufferlösungen, meist im Gemisch mit Acetonitril oder Methanol, zum Einsatz. Ihre Elutionskraft und die damit gesteuerte Selektivität der Trennung kann anhand der prozentualen Zusammensetzung, der Pufferstärke sowie des gewählten *pH*-Wertes gesteuert werden [88]. Die Chromatographie selbst wird entweder mit einem Eluenten konstanter Zusammensetzung (isokratische Elution) oder mit einem sich über die Zeit in der Zusammensetzung veränderndem Lösungsmittelgemisch durchgeführt (Gradientenelution). Die Detektion der Analyten kann in der HPLC auf verschiedene Weise erfolgen, am gebräuchlichsten sind neben Fluoreszenz-, Lichtstreu-, elektrochemischen sowie massen-selektiven Detektoren vor allem UV/Vis-Spektrophotometer, die nach der Trennsäule in den Fließweg der mobilen Phase geschaltet werden [87]. Sie erlauben entweder, je nach Ausstattung, die Messung bei einer diskreten oder bei mehreren Wellenlängen gleichzeitig (Diodenarray-Modul, DAD). Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines UV/Vis-Detektors ist allerdings, dass der zu erfassende Analyt über einen ausreichend großen Chromophor verfügt.

Zusammengefasst stellt die Flüssigchromatographie eine schnelle und effiziente Möglichkeit dar, im Rahmen der pharmazeutischen Qualitätskontrolle eine verlässliche Aussage zur qualitativen und, unter Verwendung von geeigneten Referenzmaterialien, über die quantitative Zusammensetzung einer Probe zu liefern. Aus diesem Grund und nicht zuletzt wegen der fast vollständigen Automatisierbarkeit wird sie in den Arzneibüchern zur dort beschriebenen Reinheits- bzw. Qualitätsanalytik bevorzugt eingesetzt.

## 2.6 Validierung analytischer Methoden und Verfahren

### 2.6.1 Überblick

Die Validierung einer analytischen Methode dient der Sicherstellung ihrer Eignungsfähigkeit für einen zuvor festgelegten Anwendungszweck [89]. Während der Validierung soll aufgezeigt und dokumentiert werden, dass durch ein Verfahren richtige und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Zudem lassen sich die Leistungsfähigkeit, die Zuverlässigkeit und die Reproduzierbarkeit überprüfen und belegen. Die Grundlagen der Methodvalidierung in der pharmazeutischen Analytik sind in den Leitlinien der *International Conference on Harmonisation* (ICH) zusammengefasst. Das Dokument „Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology“ beschreibt generelle Vorschriften und Empfehlungen zur Durchführung von Validierungsstudien und bildet somit unter anderem die Basis einer jeden Validierung in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle (siehe Tabelle 2.6.1-1) [90].

**Tabelle 2.6.1-1:** Durchzuführende Validierungsparameter nach ICH-Richtlinie Q2(R1) [90].

| Parameter                       | Qualitative Tests | Quantitative Tests | Prüfung auf Reinheit |            |
|---------------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|------------|
|                                 | Identifizierung   | Gehaltsbestimmung  | Quantifizierung      | Grenzttest |
| <b>Richtigkeit</b>              | ×                 | ✓                  | ✓                    | ×          |
| <b>Präzision:</b>               |                   |                    |                      |            |
| a) Wiederholbarkeit             | ×                 | ✓                  | ✓                    | ×          |
| b) Vergleichbarkeit             | ×                 | ✓                  | ✓                    | ×          |
| <b>Spezifität, Selektivität</b> | ✓                 | ✓                  | ✓                    | ✓          |
| <b>Nachweisgrenze (LOD)</b>     | ×                 | ×                  | ×                    | ✓          |
| <b>Bestimmungsgrenze (LOQ)</b>  | ×                 | ×                  | ✓                    | ×          |
| <b>Linearität</b>               | ×                 | ✓                  | ✓                    | ×          |
| <b>Arbeitsbereich</b>           | ×                 | ✓                  | ✓                    | ×          |

✓=Parameter ist zu bestimmen; ×=Parameter muss nicht bestimmt werden.

Durch eine Validierung können auch kritische Einflussgrößen ermittelt werden, beispielsweise die Trenntemperatur oder die Zusammensetzung der mobilen Phase in der HPLC. Hierdurch ist es später in der Routineanalytik möglich, im Rahmen von Systemeignungstests zu überprüfen, ob die eingesetzte Methode mit den aktuell verwendeten Geräten bzw. Chemikalien zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Auch fordern die jeweils zuständigen Zulassungsbehörden (z. B. die *European Medicines Agency* (EMA) in Europa oder die *Food and Drug Authority* (FDA) in den USA) den lückenlosen Nachweis der einwandfreien Qualität eines pharmazeutischen Erzeugnisses, welcher neben den Analyseergebnissen selbst auch eine ausführliche Doku-

mentation der durchgeführten Analytik und der Validierungsstudien umfasst. Diskrete Grenzwerte bzw. Spezifikationen werden in den Richtlinien in der Regel nicht genannt, hierfür wurden jedoch zusätzliche Hinweise wie beispielsweise der *Technical Guide for the Elaboration of Monographs* der Europäischen Arzneibuchkommission erarbeitet und veröffentlicht [91].

### 2.6.2 Selektivität, Spezifität

Unter Selektivität versteht man die Fähigkeit einer Methode, nebeneinander zu bestimmende, unterschiedliche Analyten ohne eine gegenseitige Beeinflussung bzw. Störung zu erfassen. Spezifität dagegen beschreibt den Umstand, dass ein Analyt bzw. eine Analytgruppe ohne Störung durch eventuell in der Probe zusätzlich vorhandene Bestandteile (z. B. Hilfsstoffe aus einer Formulierung) bestimmt werden kann. Die Begriffe „Selektivität“ und „Spezifität“ werden in der Regel nicht weiter differenziert und in der Praxis selten explizit unterschieden.

In der HPLC erfolgt die Bestimmung in der Regel durch den Vergleich der Retentionszeiten einer Substanz bzw. durch Aufstocken einer Probe mit einem Referenzstandard. Im Fall von Substanzgemischen kann auch die chromatographische Auflösung zwischen zwei Signalen zur Bewertung herangezogen werden. Sie wird über folgende Gleichung berechnet:

$$R_s = 1.18 \cdot (t_{r(2)} - t_{r(1)}) / (w_{0.5(1)} + w_{0.5(2)}); t_{r(2)} > t_{r(1)}; t_r = \text{Retentionszeit}, w_{0.5} = \text{Peakbreite auf halber Höhe.}$$

### 2.6.3 Richtigkeit

Durch den Vergleich des Messwertes mit einem als wahr angenommenen, über einen entsprechend zertifizierten Referenzstandard ermittelten Wert kann die Richtigkeit eines analytischen Verfahrens beurteilt werden. Der Grad der Übereinstimmung zwischen diesen Messwerten drückt den Grad der Richtigkeit aus. Zwei Konventionen zur Bestimmung der Richtigkeit sind zum einen der Vergleich der Ergebnisse mit einem validierten, dem selben Zweck dienenden Messverfahren und zum anderen die Ermittlung der Wiederfindung eines Analyten durch Anwendung der zu validierenden Methode.

### 2.6.4 Präzision

Zufällige Fehler während der Probenvorbereitung und der Analytik können durch die Bestimmung der Methodenpräzision ermittelt werden; man unterscheidet hierbei zwischen der Wiederholbarkeit, der laborinternen sowie der Vergleichspräzision:

- Zur Ermittlung der Wiederholbarkeit wird dieselbe Probe mehrfach vermessen, z. B. in der HPLC durch Mehrfachinjektion. Es kann hier zusätzlich die System- (wiederholte Messung

derselben Probe) von der Methodenpräzision (wiederholte Messung einer *mehrfach identisch* hergestellten Probe) unterschieden werden, allerdings spielt diese Differenzierung normalerweise keine signifikante Rolle.

- Die laborinterne Präzision wird durch Variation von Geräten, Analytikern, Chemikalien- bzw. Säulenchargen oder Arbeitstagen bestimmt und lässt gleichzeitig eine Aussage über die Methodenpräzision zu.
- Über Ringversuche lässt sich die Vergleichspräzision ermitteln, mit der Aussagen zur Übertragbarkeit der Methode auf andere Laboratorien bzw. Anwender getroffen werden können.

### 2.6.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Insbesondere in der Reinheitsanalytik ist die Bestimmung der Nachweis- (*Limit of Detection*, LOD) sowie der Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*, LOQ) von hoher Bedeutung. Die beiden Größen beschreiben, ab welcher minimalen Konzentration ein Analyt mit ausreichender Sicherheit nachgewiesen (LOD) bzw. quantifiziert (LOQ) werden kann und werden üblicherweise visuell mittels Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) aus stark verdünnten Analytlösungen ermittelt. Die Bestimmung kann alternativ über den Blindwert oder über eine im Bereich der Bestimmungsgrenze aufgestellte Kalibriergerade erfolgen. Für die Nachweisgrenze wird üblicherweise ein S/N von 3:1, für die Bestimmungsgrenze ein Wert von 10:1 gefordert [90].

### 2.6.6 Linearität

Die Linearität einer Methode bezeichnet die Fähigkeit, innerhalb eines definierten Konzentrationsbereiches Signalwerte zu liefern, die der zugrunde liegenden Konzentration direkt proportional sind. Üblicherweise wird dieser Zusammenhang über eine Geradengleichung der Form  $y=m \cdot x+t$  beschrieben, wobei  $y$  für das erhaltene Messsignal,  $x$  für die dazugehörige Konzentration und  $m$  für die Steigung der Kalibrierfunktion stehen. Über den Regressionskoeffizienten  $R^2$  lässt sich die Güte des Regressionsmodelles beschreiben; er sollte möglichst nahe bei 1 liegen ( $R^2 > 0.999$ ), um einen idealen linearen Zusammenhang anzuzeigen.

Zu Ermittlung der Linearität sollten stets mindestens fünf gleichmäßig über das Bestimmungsintervall verteilte Kalibrierpunkte erstellt werden, die vorzugsweise durch direkte Einwaagen der jeweiligen Substanzmenge erhalten werden. Die Aufstellung über eine Verdünnungsreihe einer Stammlösung wird nicht empfohlen, da sich ein anfänglicher Einwaagefehler über alle Kalibrierlösungen fortpflanzen und somit die Güte der Kalibrierung negativ beeinflussen kann. Eine bewiesene Linearität ist insbesondere notwendig, um anhand des erhaltenen Messsignales einer unbekannt Probe auf deren Konzentration an betrachtetem Analyt schließen zu können.

Dies geschieht entweder durch erneutes Aufstellen einer Kalibrierfunktion und anschließende Berechnung von  $x$  über die Regressionsgerade (Kalibriergerade), oder aber wie es im *Ph. Eur.* üblicherweise durchgeführt wird, durch eine Einpunkt-Kalibrierung mittels eines Standards bekannter Konzentration.

### **2.6.7 Robustheit**

Um den Einfluss äußerer, mitunter nicht genau kontrollierbarer Variablen auf die mit einer bestimmten Methode erhaltenen Ergebnisse zu untersuchen, wird im Rahmen der Validierung die sogenannte Robustheit bestimmt. Hierbei werden in der Regel verschiedene Parameter, die für die betrachtete analytische Methode als kritisch gelten, bewusst in geringen Grenzen variiert und der Einfluss dieser Veränderungen auf das Messergebnis dokumentiert. In der HPLC sind dies typischerweise der  $pH$ -Wert sowie die Zusammensetzung der mobilen Phase, die Trenntemperatur, die Flussrate oder die Qualität der verwendeten Chemikalien. Es kann ebenfalls die Verwendung verschiedener Geräte oder die Ausführung durch verschiedene Analytiker untersucht werden, was mit der Ermittlung der Laborpräzision vergleichbar ist (siehe Kapitel 2.6.4).

### **2.6.8 Eignungsprüfungen**

Die im Rahmen einer Validierung untersuchten Parameter einer analytischen Methode lassen die Ableitung von Systemeignungstests zu. Diese dienen der Überprüfung, ob eine Methode unter den aktuellen Bedingungen, beispielsweise unter Verwendung eines bestimmten Gerätes, einer bestimmten Säulencharge bzw. bei den aktuellen Umgebungsbedingungen zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse liefert. In der Chromatographie dienen hierzu üblicherweise die chromatographische Auflösung ( $R_s$ ) zweier als kritisch angesehener Signale oder die Symmetrie eines bestimmten Peaks als wichtige Anhaltspunkte.

Wenn alle geforderten Bedingungen erfüllt sind, kann mit der Durchführung der eigentlichen Analytik begonnen werden, in allen anderen Fällen müssen solange die erlaubten Modifizierungen am chromatographischen System vorgenommen werden, bis die geforderte Eignungsprüfung vollständig erfüllt wird. Hierzu ist in der Flüssigchromatographie insbesondere die Anpassung der Zusammensetzung der mobilen Phase, des  $pH$ -Wertes des wässrigen Bestandteiles der mobilen Phase, der Salzkonzentration im Pufferbestandteil der mobilen Phase, der Durchflussrate, der Temperatur, des Einspritzvolumens und bei Gradientenelutionen die Verkleinerung des Totvolumens vorgesehen. Die Detektionswellenlänge darf jedoch in keinem Fall verändert werden [92].

Motivation und Zielsetzung

3

### **3 Motivation und Zielsetzung**

#### **3.1 Entwicklung vereinfachter flüssigchromatographischer Methoden zur Qualitätsanalytik wichtiger Antimalariawirkstoffe**

Die Weiterentwicklungen der analytischen Verfahren innerhalb der letzten Jahrzehnte sowie die immer umfangreicheren gesetzlichen Rahmenbedingungen und Richtlinien ermöglichen es heute, von der Rohstoffgewinnung über die Produktion der eigentlichen Wirk- und Hilfsstoffe bis zu deren Weiterverarbeitung zum kommerziellen Arzneimittel eine gleichbleibend hohe Qualität der Medikamente zu gewährleisten.

Die HPLC gilt heute als Goldstandard in der pharmazeutischen Analytik und entsprechende Methoden sind mittlerweile in nahezu jeder Monographie des *Ph. Eur.* zu finden. Der Fortschritt auf diesem Gebiet und die damit verbundene Einführung immer komplexerer Protokolle führen in Entwicklungsländern oft zu ernsthaften Problemen während der praktischen Arbeit. Fehlende oder schlechte technische Ausstattung, unzureichend qualifiziertes Personal sowie eine stark eingeschränkte Verfügbarkeit vieler Chemikalien und Reagenzien sind die häufigsten Gründe, weshalb eine umfassende Qualitätskontrolle in vielen Ländern der Erde nicht durchgeführt werden kann. Unglücklicherweise ist gerade dort die Prävalenz qualitativ minderwertiger bzw. gefälschter Arzneimittel besonders hoch, sodass die nationalen Kontrollbehörden nur in sehr eingeschränktem Maße die Möglichkeit haben, dies zu kontrollieren bzw. einzudämmen [22].

Im Frühjahr 2010 veröffentlichte das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) eine Fördermöglichkeit zum Aufbau wissenschaftlicher Kooperationen und nachhaltiger Lösungen für das Gesundheitswesen in den Ländern Afrikas südlich der Sahara. Der Fokus sollte hierbei besonders auf der Zusammenarbeit zwischen akademischen und nicht-akademischen sowie zwischen staatlichen und nicht-staatlichen Institutionen (*Non-Governmental Organization*, NGO) liegen, mit dem Ziel, die Afrikanische Wissenschaft zu stärken und gleichzeitig durch die Implementierung der Forschungsarbeiten eine Verbesserung der Patientenversorgung mit qualitativ hochwertigen Medikamenten zu ermöglichen [93].

Während einer Erkundungsmission in Ghana, Tansania und Kamerun wurden zu diesem Zweck im Vorfeld verschiedene potentielle Partnerinstitutionen besucht und in einem anschließenden Workshop das eigentliche Pilotprojekt konzipiert („Implementation of Modular HPLC Systems in Existing Quality Control Laboratories in Tanzania: A Pilot Study to Improve Testing Efficiency of Essential Medicines in Africa (tesmA)“). Dies geschah in enger Zusammenarbeit mit verschiedenen Deutschen Partnerinstitutionen, wie dem Missionsärztlichen Institut in Würzburg oder action medeor in Tönisvorst.

Im Rahmen des wissenschaftlichen Aspektes des Vorhabens und somit letztendlich als Ziel



dieser Arbeit sollten sehr einfache und robuste flüssigchromatographische Methoden zur Analytik verschiedener Antimalariawirkstoffe (Amodiaquin, Proguanil, Mefloquin, Artemether/Lumefantrin) entwickelt und auf ihre Einsatzfähigkeit in tropischen Gebieten hin untersucht werden. Die Anwendung der HPLC zur Qualitätskontrolle essentieller Medikamente soll dadurch in Entwicklungsländern ermöglicht und vorangebracht werden, was bisher nur sehr eingeschränkt der Fall ist. Es sollte möglich sein, den jeweiligen Wirkstoff zu quantifizieren, charakteristische Verunreinigungen aus der Synthese bzw. aus den zugrunde liegenden Reinigungsprozessen abzutrennen sowie Verwechslungen mit ähnlichen Arzneistoffen und/oder Beimischungen anderer Substanzen erkennen zu können. Die Methoden sollten zudem zum Einsatz auf sehr simplen HPLC-Instrumenten geeignet sein und mit einer minimalen Ausstattung an günstigen, überall verfügbaren Chemikalien und Chromatographiesäulen durchgeführt werden können.

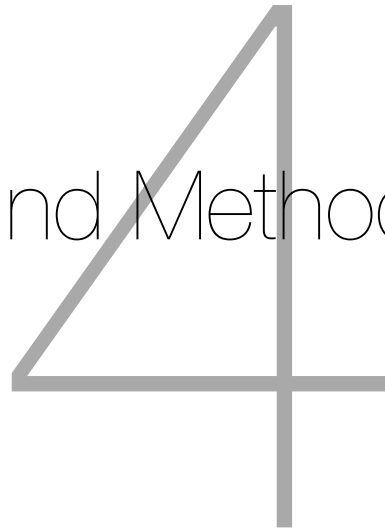
### **3.2 Stabilitätsanalytik von Noradrenalin**

Im Rahmen der Defektur individuell verdünnter, Noradrenalin-haltiger Infusionslösungen sollte beurteilt werden, ob diese bei dem entsprechenden Verdünnungsgrad eine ausreichende Stabilität über die Lagerungsdauer hinweg besitzen.

In Zusammenarbeit mit dem St. Elisabeth-Krankenhaus Köln-Hohenlind sollte die Stabilität 0.1 %iger Noradrenalin-Lösungen untersucht und mit bereits in der Literatur publizierten Daten verglichen werden. Hierbei war besonders die Frage von Interesse, inwiefern der Verdünnungsgrad einen Einfluss auf die Stabilität ausübt und ob unterschiedliche Lagerungsbedingungen einen Einfluss auf den Abbau des Wirkstoffes haben.



Material und Methoden



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Arzneistoffe

| Bezeichnung                       | CAS-Nr.     | Bezugsquelle   |
|-----------------------------------|-------------|--|
| Amodiaquindihydrochlorid-Dihydrat | 6398-98-7   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Artemether                        | 71963-77-4  | <b>TCI Deutschland GmbH</b> ,<br>Eschborn, Deutschland         |
| Chinidinhydrochlorid-Monohydrat   | 6151-40-2   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Chininhydrochlorid-Dihydrat       | 6119-47-7   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Chloroquindiphosphat              | 50-63-5     | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Isoprenalinsulfat                 | 6700-39-6   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Lidocainhydrochlorid              | 73-78-9     | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Lumefantrin                       | 82186-77-4  | <b>TCI Deutschland GmbH</b> ,<br>Eschborn, Deutschland         |
| Mefloquinhydrochlorid             | 51773-92-3  | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Moxifloxacinhydrochlorid          | 186826-86-8 | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| (±)-Noradrenalinbitartrat         | 3414-63-9   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Paracetamol                       | 103-90-2    | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Phenylephrin                      | 59-42-7     | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Primaquindiphosphat               | 63-45-6     | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |
| Proguanilhydrochlorid             | 637-32-1    | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland |

## 4.2 Verunreinigungen

| Substanz   | Bezeichnung | CAS-Nr.    | Bezugsquelle   |
|--|-------------|------------|--|
| <b>Amodiaquin (AQ)</b>                                       |             |            |  |
| 4,7-Dichlorchinolin  | AQ-VU A     | 86-98-6    | <b>TCI Deutschland GmbH</b> ,<br>Eschborn, Deutschland           |
| 4-Aminophenol  | AQ-VU B     | 123-30-8   | <b>TCI Deutschland GmbH</b> ,<br>Eschborn, Deutschland           |
| 4-[(7-Chlorchinolin-4-yl)-<br>amino]phenol                   | AQ-VU C     | 81099-86-7 | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| <i>N</i> -Desethylamodiaquin-<br>dihydrochlorid <sup>#</sup> | AQ-VU D     | 79049-30-2 | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| <b>Proguanil (PG)</b>  |             |            |  |
| 4-Chloranilin  | PG-VU A     | 106-47-8   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| 2-Cyanoguanidin  | PG-VU B     | 461-58-5   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| 4-Chlorphenyl-2-cyanoguanidin                                | PG-VU C     | 1482-62-8  | <b>BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH</b> ,<br>Eching, Deutschland |
| 1,5-Bis(4-chlorphenyl)biguanid                               | PG-VU D     | 13590-88-0 | <b>EDQM</b> ,<br>Strasbourg, Frankreich                          |
| 1,5-Bis(1-methylethyl)biguanid                               | PG-VU E     | 45095-69-0 | <b>EDQM</b> ,<br>Strasbourg, Frankreich                          |
| <b>Mefloquin (MQ)</b>  |             |            |  |
| 2-Trifluormethylanilin                                       | MQ-VU A     | 88-17-5    | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| 2,8-Bis(trifluormethyl)-4-<br>hydroxychinolin                | MQ-VU B     | 35853-41-9 | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| Pyridin-2-carboxaldehyd                                      | MQ-VU C     | 1121-60-4  | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| 7-Trifluormethylisatin                                       | MQ-VU D     | 391-12-8   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| 2-Brompyridin  | MQ-VU E     | 109-04-6   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |
| <b>Artemether (AE)</b>                                       |             |            |  |
| Dihydroartemisinin (Artenimol)                               | AE-VU A     | 71939-50-9 | <b>TCI Deutschland GmbH</b> ,<br>Eschborn, Deutschland           |
| <b>Lumefantrin (LF)</b>                                      |             |            |  |
| Fuoren   | LF-VU A     | 86-73-7    | <b>TCI Deutschland GmbH</b> ,<br>Eschborn, Deutschland           |
| 2,7-Dichlorfluoren   | LF-VU B     | 7012-16-0  | <b>TCI Deutschland GmbH</b> ,<br>Eschborn, Deutschland           |
| 4-Chlorbenzaldehyd   | LF-VU C     | 104-88-1   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland   |

<sup>#</sup>: 1 mg/ml Lösung in Methanol

### 4.3 Fertigarzneimittel

| Bezeichnung   | Hersteller   |
|---|--|
| Arterenol Injektionslösung<br>(1.0 mg/ml Noradrenalin)                        | <b>Sanofi Aventis GmbH</b> ,<br>Frankfurt, Deutschland                         |
| Isotonische Kochsalzlösung Fresenius 0,9 % (Glasflasche)                      | <b>Fresenius Kabi Deutschland GmbH</b> ,<br>Bad Homburg, Deutschland           |
| Malarone Tabletten<br>(250 mg Atovaquon, 100 mg Proguanilhydrochlorid)        | <b>Glaxo Smith Kline GmbH &amp; Co. KG</b> ,<br>München, Deutschland           |
| Malarone Junior Tabletten<br>(62.5 mg Atovaquon, 25 mg Proguanilhydrochlorid) | <b>GlaxoSmithKline GmbH &amp; Co. KG</b> ,<br>München, Deutschland             |
| Paludrine Tabletten<br>(100 mg Proguanilhydrochlorid)                         | <b>AstraZeneca GmbH</b> ,<br>Wedel, Deutschland                                |
| Lariam Tabletten<br>(274.09 mg Mefloquinhydrochlorid)                         | <b>Roche Pharma AG</b> ,<br>Grenzach-Wyhlen, Deutschland                       |
| Amodar Tabletten<br>(200 mg Amodiaquin-Base)                                  | <b>Shelys Pharmaceuticals LTD</b> ,<br>Dar es Salaam, Tansania                 |
| Coartem 20/120<br>(20 mg Artemether, 120 mg Lumefantrin)                      | <b>Novartis Pharmaceuticals Corporation</b> ,<br>East Hanover, New Jersey, USA |
| ALU (20 mg Artemether, 120 mg Lumefantrin)                                    | <b>Ipca Laboratories LTD.</b> ,<br>Mumbai, Indien                              |
| Mephaquin (250 mg Mefloquinhydrochlorid)                                      | <b>Mepha Pharma LLC</b> ,<br>Basel, Schweiz                                    |

### 4.4 Chromatographische Säulen

| Hersteller   | Bezeichnung                       | Dimensionen  | Interne Bez. |
|--|-----------------------------------|--|--------------|
| <b>KNAUER<br/>Wissenschaftliche<br/>Geräte GmbH</b> ,<br>Berlin, Deutschland | Eurospher-II<br>C18 P             | 125 x 4.6 mm;<br>5 µm Partikelgröße (integr. Vorsäule) | Säule A      |
|  | Eurospher-II<br>C18 H             | 125 x 4.6 mm;<br>5 µm Partikelgröße (integr. Vorsäule) | Säule B      |
|  | Eurospher-II<br>C18 H             | 250 x 4.6 mm;<br>5 µm Partikelgröße (integr. Vorsäule) | Säule C      |
|  | Eurospher-II<br>C18               | 125 x 4.6 mm;<br>5 µm Partikelgröße (integr. Vorsäule) | Säule D      |
| <b>Thermo Fisher<br/>Scientific</b> ,<br>Langerwehe,<br>Deutschland          | Hypersil Keystone C <sub>18</sub> | 250 x 4.6 mm;<br>5 µm Partikelgröße                    | Säule E      |
| <b>Phenomenex</b> ,<br>Aschaffenburg,<br>Deutschland                         | Synergi Max-RP                    | 150 x 4.6 mm;<br>4 µm Partikelgröße                    | Säule F      |

#### 4.5 Chemikalien, Lösungsmittel, Dünnschichtchromatographie-Folien

| Bezeichnung und Reinheit bzw. Qualität                                  | CAS-Nr.    | Bezugsquelle  |
|---|------------|---|
| Aceton p.a.   | 67-64-1    | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| Acetonitril (HPLC grade)  | 75-05-8    | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| DC-Fertigfolien „Alugram Xtra Sil G/UV <sub>254</sub> “<br>(20 x 20 cm) | -          | <b>Macherey-Nagel GmbH &amp; Co. KG</b> ,<br>Düren, Deutschland |
| Dikaliumhydrogenphosphat p.a.   | 7758-11-4  | <b>Grüssing GmbH Analytika</b> ,<br>Filsum, Deutschland         |
| Dinatriumhydrogenphosphat p.a.  | 7558-79-4  | <b>Grüssing GmbH Analytika</b> ,<br>Filsum, Deutschland         |
| Essigsäure 100 % p.a.   | 64-19-7    | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| Essigsäureethylester p.a.   | 141-78-6   | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| Ethylendiamintetraessigsäure p.a.                                       | 60-00-4    | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland  |
| Kaliumdihydrogenphosphat p.a.   | 7778-77-0  | <b>Grüssing GmbH Analytika</b> ,<br>Filsum, Deutschland         |
| konzentrierte Ammoniaklösung (25 %, p.a.)                               | 1336-21-6  | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| Methanol (HPLC grade)   | 67-56-1    | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| Natriumdihydrogenphosphat p.a.  | 7558-80-7  | <b>Grüssing GmbH Analytika</b> ,<br>Filsum, Deutschland         |
| Natriumdodecylsulfat p.a.   | 151-21-3   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland  |
| Natriumhexansulfonat p.a.   | 2832-45-3  | <b>Alfa Aesar GmbH &amp; Co. KG</b> ,<br>Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumhydrogensulfat Monohydrat p.a.                                   | 10034-88-5 | <b>Grüssing GmbH Analytika</b> ,<br>Filsum, Deutschland         |
| Natriumhydroxid p.a.  | 1310-73-2  | <b>AppliChem GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland               |
| Perchlorsäure 70 % p.a.   | 7601-90-3  | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| Phosphorsäure (85 % (W/V) in H <sub>2</sub> O) p.a.                     | 7664-38-2  | <b>Grüssing GmbH Analytika</b> ,<br>Filsum, Deutschland         |
| Schwefelsäure (96 %)  | 7664-93-9  | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland  |
| Tetraheptylammoniumbromid p.a.  | 4368-51-8  | <b>Alfa Aesar GmbH &amp; Co. KG</b> ,<br>Karlsruhe, Deutschland |
| Toluol p.a.   | 100-88-3   | <b>VWR International GmbH</b> ,<br>Darmstadt, Deutschland       |
| Triethylamin p.a.   | 121-44-8   | <b>Sigma-Aldrich Chemie GmbH</b> ,<br>Taufkirchen, Deutschland  |

## 4.6 Geräte

| Art bzw. Modell   |   | Hersteller  |
|---|---|---|
| <b>Agilent HPLC/UV-System 1100:</b>   |   |   |
| G1379A  | Vakuum-Entgaser,                        | <b>Agilent Technologies GmbH,</b><br>Waldbronn, Deutschland   |
| G1312A  | binäre Pumpe,                           |   |
| G1313A  | Autosampler mit Rheodyne 6-Wege-Ventil, |   |
| G1314A  | VWD-Detektor                            |   |
| <b>LC Säulenofen „101058“</b>   |   | <b>Beckmann Coulter GmbH,</b><br>Krefeld, Deutschland   |
| <b>Agilent HPLC/UV-System 1100:</b>   |   |   |
| G1322A  | Vakuum-Entgaser,                        | <b>Agilent Technologies GmbH,</b><br>Waldbronn, Deutschland   |
| G1312A  | binäre Pumpe,                           |   |
| G1313A  | Autosampler mit Rheodyne 6-Wege-Ventil, |   |
| G1316A  | Säulenthermostat,                       |   |
| G1315B  | Diodenarray-Detektor                    |   |
| <b>Agilent HPLC/UV-System 1200:</b>   |   |   |
| G1322A  | Vakuum-Entgaser,                        | <b>Agilent Technologies GmbH,</b><br>Waldbronn, Deutschland   |
| G1311A  | quaternäre Pumpe,                       |   |
| G1329A  | Autosampler mit Rheodyne 6-Wege-Ventil, |   |
| G1316A  | Säulenthermostat,                       |   |
| G1314B  | VWD-Detektor                            |   |
| <b>Bischoff HPLC/UV-System bestehend aus:</b>   |   |   |
| Pumpe:  | Isokratische Kompaktpumpe,              | <b>Bischoff Analysetechnik und Geräte GmbH,</b><br>Leonberg, Deutschland  |
| Injektionsventil:   | Rheodyne Switching Valve MX TitanHP,    |   |
| Detektor:   | Lambda 1010 VWD Modul                   |   |
| <b>Integrator HP3394</b>  |   | <b>Hewlett Packard GmbH,</b><br>Böblingen, Deutschland  |
| <b>DC-Plattenscanner „TLC plate scanner II“ mit dazugehöriger CATS Software</b>                         |   | <b>CAMAG,</b><br>Berlin, Deutschland  |
| <b>Magnetrührer mit Heizplatte</b>  |   | <b>Heidolph Instruments,</b><br>Schwabach, Deutschland  |
| <b>pH-Meter PHM 220 mit Glaselektrode</b>   |   | <b>Radiometer Analytical,</b><br>Villeurbanne, Frankreich   |
| <b>Pipetten:</b><br>Eppendorf Research und Reference<br>(1-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl; 1000-5000 µl) |   | <b>Eppendorf AG,</b><br>Hamburg, Deutschland  |
| <b>Zentrifuge EBA-12</b>  |   | <b>Andreas Hettich GmbH &amp; Co. KG,</b><br>Tuttlingen, Deutschland  |
| <b>Ultraschallbad Sonorex RK156</b>   |   | <b>Bandelin electronic GmbH &amp; Co. KG,</b><br>Berlin, Deutschland  |
| <b>Waagen:</b>  |   |   |
| Sartorius CPA225D-0CE<br>Kern 770<br>Mettler Toledo AB104-S/PH  |   | <b>Sartorius AG,</b> Göttingen<br><b>KERN &amp; SOHN GmbH,</b> Balingen<br><b>Mettler-Toledo GmbH,</b> Gießen<br>(alle Deutschland) |



## 4.7 Wasser für die Chromatographie

Alle wässrigen Lösungen werden unter Verwendung von Millipore®-Wasser hergestellt, welches mittels einer Milli-Q-Synthese-Anlage (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) gewonnen wird.

## 4.8 Verbrauchsmaterialien

| Artikel   | Hersteller   |
|---|--|
| Braunglasvials mit Teflondeckel (4 ml)  | <b>Wheaton Industries,</b><br>Millville, NJ, USA   |
| DC-Auftragekapillaren (2, 5, 10 µl)   | <b>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG,</b><br>Karlsruhe, Deutschland  |
| Einmalkanülen   | <b>VWR International GmbH,</b><br>Darmstadt, Deutschland;<br><b>A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und<br/>Medizintechnik mbH,</b><br>Würzburg, Deutschland  |
| Einmalspritzen „NEO-JECT“,<br>1 ml, 2 ml, 5 ml, 50 ml   | <b>Henke-Sass, Wolf GmbH,</b><br>Tuttlingen, Deutschland   |
| HPLC-Braunglasvials   | <b>YMC Europe GmbH,</b><br>Dinslaken, Deutschland;<br><b>Phenomenex,</b><br>Aschaffenburg, Deutschland   |
| Perfusor®-Spritzen 50 ml  | <b>B. Braun Meldungen AG,</b><br>Melsungen, Deutschland  |
| Pipettenspitzen   | <b>Eppendorf AG,</b><br>Hamburg, Deutschland;<br><b>VWR International GmbH,</b><br>Darmstadt, Deutschland;<br><b>A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und<br/>Medizintechnik mbH,</b><br>Würzburg, Deutschland |
| Reaktionsgefäße mit Deckel aus<br>Polypropylen (1.5 ml)   | <b>VWR International GmbH,</b><br>Darmstadt, Deutschland   |
| Spritzenvorsatzfilter,<br>0.22 bzw. 0.45 µm Porengröße<br>(Membranmaterialien: CME, PTFE, PVDF) | <b>VWR International GmbH,</b><br>Darmstadt, Deutschland;<br><b>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG,</b><br>Karlsruhe, Deutschland   |
| Transferpipetten (LDPE)   | <b>VWR International GmbH,</b><br>Darmstadt, Deutschland   |

## 4.9 Stabilitätsanalytik von Noradrenalin

### 4.9.1 Mobile Phase

3.0 g wasserfreies Natriumdihydrogenphosphat, 60.0 mg Natriumdodecylsulfat und 30.0 mg Ethylendiamintetraessigsäure werden in ca. 100 ml Millipore-Wasser gelöst. Es werden ca. 800 ml Millipore-Wasser hinzugegeben, der *pH*-Wert der Lösung durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter Phosphorsäure auf 2.8 eingestellt und anschließend das Volumen auf 1000.0 ml ergänzt.

70 Volumenteile dieser Pufferlösung werden mit 30 Volumenteilen Methanol vermischt.

### 4.9.2 HPLC-Methodenparameter

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Hypersil Keystone C-18, 250 x 4.6 mm,<br>5 µm Partikelgröße (Säule E) |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min  |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 20 µl   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)                                   |
| <b>Detektion:</b>         | UV-DAD, $\lambda=254$ und 280 nm                                      |

### 4.9.3 Untersuchungs- und Kalibrierlösungen

#### Noradrenalin-Stammlösung (NE-SL)

100.01 mg Noradrenalinbitartrat und 25.0 mg Natriumdisulfit werden in 50.0 ml Millipore-Wasser gelöst.

#### Isoprenalin-Stammlösung (ISO-SL)

41.59 mg Isoprenalinsulfat werden in 100.0 ml Millipore-Wasser gelöst. Die Lösung wird maximal 12 Stunden verwendet.

**Kalibrierlösungen externer Standard**

5.0 ml der NE- sowie 5.0 ml der ISO-Stammlösung werden mit 5.0 ml isotonischer Kochsalzlösung vermischt (NE-ISO-SL) und Aliquote dieser Lösung wie folgt verdünnt:

| NE-ISO-SL<br>[µl] | isoton. NaCl<br>[µl] | c(NE)<br>[mg/ml] | c(ISO)<br>[mg/ml] |
|-------------------|----------------------|------------------|-------------------|
| 750               | 250                  | 0.2513           | 0.2558            |
| 500               | 500                  | 0.1675           | 0.1705            |
| 250               | 750                  | 0.0838           | 0.0853            |
| 100               | 900                  | 0.0335           | 0.0342            |
| 50                | 950                  | 0.0168           | 0.0171            |

**Kalibrierlösungen interner Standard**

Die NE-Stammlösung wird mit jeweils 500 µl der ISO-Stammlösung sowie 500 µl isotonischer Kochsalzlösung vermischt:

| NE-SL<br>[µl] | ISO-SL<br>[µl] | isoton. NaCl<br>[µl] | c(NE)<br>[mg/ml] | c(ISO)<br>[mg/ml] | Mengen-<br>verhältnis<br>NE/ISO |
|---------------|----------------|----------------------|------------------|-------------------|---------------------------------|
| 500           | 500            | 500                  | 0.335            | 0.342             | 0.98                            |
| 400           | 500            | 500                  | 0.287            | 0.366             | 0.78                            |
| 300           | 500            | 500                  | 0.232            | 0.394             | 0.59                            |
| 200           | 500            | 500                  | 0.168            | 0.427             | 0.39                            |
| 100           | 500            | 500                  | 0.091            | 0.466             | 0.20                            |

**Arterenol-Testlösungen**

Arterenol® (1 mg/ml NE) wird mit der ISO-SL bzw. isotonischer Kochsalzlösung vermischt, in Perfusor®-Spritzen gefüllt und unter verschiedenen Bedingungen gelagert:

| Bezeichnung            | Arterenol®<br>[ml] | ISO-SL<br>[ml] | isoton. NaCl<br>[ml] | Lagerungs-<br>temperatur | Lichtschutz |
|------------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------------|-------------|
| Arterenol-Testlösung 1 | 5.0                | 5.0            | 40.0                 | Raumtemp.                | ja          |
| Arterenol-Testlösung 2 | 5.0                | 5.0            | 40.0                 | Raumtemp.                | nein        |
| Arterenol-Testlösung 3 | 5.0                | 5.0            | 40.0                 | 5 °C                     | ja          |
| Arterenol-Testlösung 4 | 5.0                | -              | 45.0                 | Raumtemp.                | ja          |
| Arterenol-Testlösung 5 | 5.0                | -              | 45.0                 | Raumtemp.                | nein        |
| Arterenol-Testlösung 6 | 5.0                | -              | 45.0                 | 5 °C                     | ja          |

Zu jedem Messzeitpunkt wird jeweils 1.0 ml entnommen und im Falle der Testlösungen 4-5 mit 500 µl der ISO-SL vermischt.

## **4.10 Entwicklung vereinfachter flüssigchromatographischer Methoden für Amodiaquin, Mefloquin, Proguanil, Artemether/Lumefantrin**

Alle Lösungen zur Chromatographie werden vor Verwendung durch einen Membranfilter filtriert.

### **4.10.1 Lösungen zur Einstellung des *pH*-Wertes**

#### **Verdünnte Phosphorsäure**

11.5 g Phosphorsäure (85 %) werden zu 100.0 ml in Millipore-Wasser gelöst.

#### **Natriumhydroxid-Lösung (1 mol/L)**

4.0 g Natriumhydroxid werden in 100.0 ml Millipore-Wasser gelöst.

### **4.10.2 Pufferlösungen**

Alle Pufferlösungen für die mobilen Phasen sind wässrige Lösungen von  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bzw.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , deren *pH*-Wert durch tropfenweise Zugabe von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %) bzw. NaOH-Lösung (1 mol/L) eingestellt wird.

#### **Allgemeine Vorgehensweise zur Herstellung der Pufferlösungen:**

Die für 1 Liter Pufferlösung benötigte Menge des entsprechenden Phosphatsalzes (siehe Tabelle 4.10.2-1) wird in ca. 100 ml Millipore-Wasser vollständig gelöst, diese Lösung mit Hilfe einer Einmalspritze durch einen Membranfilter (CME, 0.22  $\mu\text{m}$ ) filtriert und mit ca. 800 ml Millipore-Wasser verdünnt. Der *pH*-Wert dieser Lösung wird auf den gewünschten Endwert eingestellt und die Lösung mit Millipore-Wasser auf 1000.0 ml ergänzt. Anschließend wird der *pH*-Wert des Puffers erneut kontrolliert.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4.10.2-1: Pufferlösungen.

| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>[mol/L]   | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>[g/L] | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>[mol/L] | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>[g/L] | pH-Wert |
|---|---|--|--|---------|
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-haltige Pufferlösungen</b>                                    |   |  |  |         |
| -   | -   | 0.07                                       | 9.53                                     | 2.0     |
| -   | -   | 0.08                                       | 10.89                                    | 2.0     |
| -   | -   | 0.01                                       | 1.36                                     | 2.45    |
| -   | -   | 0.02                                       | 2.72                                     | 2.45    |
| -   | -   | 0.01                                       | 1.36                                     | 2.5     |
| -   | -   | 0.025                                      | 3.40                                     | 2.5     |
| -   | -   | 0.05                                       | 6.81                                     | 2.5     |
| -   | -   | 0.06                                       | 8.16                                     | 2.5     |
| -   | -   | 0.07                                       | 9.53                                     | 2.5     |
| -   | -   | 0.08                                       | 10.89                                    | 2.5     |
| -   | -   | 0.1  | 13.61                                    | 2.5     |
| -   | -   | 0.2  | 13.61                                    | 2.5     |
| -   | -   | 0.015                                      | 2.04                                     | 3.0     |
| -   | -   | 0.1  | 13.61                                    | 3.0     |
| -   | -   | 0.2  | 13.61                                    | 3.5     |
| -   | -   | 0.01                                       | 1.36                                     | 4.5     |
| -   | -   | 0.1  | 13.61                                    | 5.0     |
| -   | -   | 0.05                                       | 6.81                                     | 8.0     |
| -   | -   | 0.05                                       | 6.81                                     | 10      |
| -   | -   | 0.06                                       | 8.16                                     | 10      |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-haltige Pufferlösungen</b>                                   |   |  |  |         |
| 0.1   | 12.00                                     | -  | -  | 3.0     |
| 0.05  | 6.00                                      | -  | -  | 2.5     |
| 0.052   | 6.18                                      | -  | -  | 2.0     |
| 0.057   | 6.79                                      | -  | -  | 2.0     |
| 0.062   | 7.42                                      | -  | -  | 2.0     |
| 0.052   | 6.18                                      | -  | -  | 3.0     |
| 0.057   | 6.79                                      | -  | -  | 3.0     |
| 0.062   | 7.42                                      | -  | -  | 3.0     |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>- und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-haltige Pufferlösungen</b> |   |  |  |         |
| 0.07  | 8.95                                      | 0.025                                      | 3.40                                     | 2.0     |
| 0.08  | 9.85                                      | 0.027                                      | 3.74                                     | 2.0     |
| 0.09  | 10.74                                     | 0.04                                       | 4.08                                     | 2.0     |
| 0.07  | 8.95                                      | 0.025                                      | 3.40                                     | 3.0     |
| 0.08  | 9.85                                      | 0.027                                      | 3.74                                     | 3.0     |
| 0.09  | 10.74                                     | 0.04                                       | 4.08                                     | 3.0     |

**4.10.3 Stammlösungen für die HPLC**

Die in Tabelle 4.10.3-1 angeführte Menge der jeweiligen Substanz wird im angegebenen Lösungsmittel gelöst und die Lösung anschließend in einem Braunglasvial bei 5 °C im Kühlschrank gelagert.

**Tabelle 4.10.3-1:** Stammlösungen (SL).

| Verbindung                   | Menge [mg] | Volumen [ml] | Konz. [mg/ml] | Konz. [mMol/l] | Lösungsmittel | Bezeichnung |
|------------------------------|------------|--------------|---------------|----------------|---------------|-------------|
| <b>Amodiaquin (AQ)</b>       | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 2.15           | MeOH          | AQ-SL       |
| AQ-VU A                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 5.05           | MeOH          | AQ-VU A-SL  |
| AQ-VU B                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 9.16           | MeOH          | AQ-VU B-SL  |
| AQ-VU C                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 3.69           | MeOH          | AQ-VU C-SL  |
| AQ-VU D <sup>#</sup>         | -          | -            | 1.0           | 2.50           | MeOH          | AQ-VU D-SL  |
| <b>Proguanil (PG)</b>        | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 3.45           | MeOH          | PG-SL       |
| PG-VU A                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 7.84           | MeOH          | PG-VU A-SL  |
| PG-VU B                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 11.89          | MeOH          | PG-VU B-SL  |
| PG-VU C                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 5.14           | MeOH          | PG-VU C-SL  |
| PG-VU D                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 2.79           | MeOH          | PG-VU D-SL  |
| PG-VU E                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 4.51           | MeOH          | PG-VU E-SL  |
| <b>Mefloquin (MQ)</b>        | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 2.41           | MeOH          | MQ-SL       |
| MQ-VU A                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 6.12           | MeOH          | MQ-VU A-SL  |
| MQ-VU B                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 3.65           | MeOH          | MQ-VU B-SL  |
| MQ-VU C                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 9.34           | MeOH          | MQ-VU C-SL  |
| MQ-VU D                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 4.65           | MeOH          | MQ-VU D-SL  |
| MQ-VU E                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 6.33           | MeOH          | MQ-VU E-SL  |
| <b>Artemether (AE)</b>       | 100.0      | 10.0         | 10.0          | 33.52          | MeOH          | AE-SL       |
| Dihydroartemisinin (AE-VU A) | 40.0       | 10.0         | 4.0           | 10.41          | MeOH          | AE-VU A-SL  |
| <b>Lumefantrin (LF)</b>      | 50.0       | 100.0        | 0.5           | 0.95           | MeOH          | LF-SL       |
| LF-VU A                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 6.02           | MeOH          | LF-VU A-SL  |
| LF-VU B                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 4.35           | MeOH          | LF-VU B-SL  |
| LF-VU C                      | 10.0       | 10.0         | 1.0           | 7.11           | MeOH          | LF-VU C-SL  |

<sup>#</sup>: AQ-VU D lag bereits in Form einer Lösung der Konzentration 1 mg/ml in Methanol vor.

**4.10.4 Arbeitslösungen für die HPLC**

Die SL der jeweiligen Verunreinigung (VU, siehe Tabelle 4.10.3-1) werden verdünnt (siehe Tabelle 4.10.4-1).

**Tabelle 4.10.4-1:** Arbeitslösungen (AL).

| Stammlösung             | Menge [ml] | MeOH [ml] | Konz. [mg/ml] | Konz. [µMol/l] | Lösungs-<br>mittel# | Bezeichnung |
|-------------------------|------------|-----------|---------------|----------------|---------------------|-------------|
| <b>Amodiaquin (AQ)</b>  |            |           |               |                |                     |             |
| AQ-VU A-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 50.5           | MeOH                | AQ-VU A-AL  |
| AQ-VU B-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 91.6           | MeOH                | AQ-VU B-AL  |
| AQ-VU C-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 36.9           | MeOH                | AQ-VU C-AL  |
| AQ-VU D-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 25.0           | MeOH                | AQ-VU D-AL  |
| <b>Proguanil (PG)</b>   |            |           |               |                |                     |             |
| PG-VU A-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 78.4           | MeOH                | PG-VU A-AL  |
| PG-VU B-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 118.9          | MeOH                | PG-VU B-AL  |
| PG-VU C-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 51.4           | MeOH                | PG-VU C-AL  |
| PG-VU D-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 27.9           | MeOH                | PG-VU D-AL  |
| PG-VU E-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 45.1           | MeOH                | PG-VU E-AL  |
| <b>Mefloquin (MQ)</b>   |            |           |               |                |                     |             |
| MQ-VU A-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 61.2           | MeOH                | MQ-VU A-AL  |
| MQ-VU B-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 36.5           | MeOH                | MQ-VU B-AL  |
| MQ-VU C-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 93.4           | MeOH                | MQ-VU C-AL  |
| MQ-VU D-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 46.5           | MeOH                | MQ-VU D-AL  |
| MQ-VU E-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 63.3           | MeOH                | MQ-VU E-AL  |
| <b>Artemether (AE)</b>  |            |           |               |                |                     |             |
| AE-VU A-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.04          | 104.1          | MeOH                | AE-VU A-AL  |
| <b>Lumefantrin (LF)</b> |            |           |               |                |                     |             |
| LF-VU A-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 60.2           | MeOH                | LF-VU A-AL  |
| LF-VU B-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 43.5           | MeOH                | LF-VU B-AL  |
| LF-VU C-SL              | 1.0        | 100.0     | 0.01          | 71.1           | MeOH                | LF-VU C-AL  |

#### 4.10.5 Amodiaquin

##### 4.10.5.1 Mobile Phase

27.5 Volumenteile der KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Pufferlösung (0.05 mol/L, pH=8.0) werden mit 72.5 Volumenteilen Methanol vermischt.

##### 4.10.5.2 Chromatographische Parameter

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Knauer Eurospher-II C-18, 125 x 4.6 mm,<br>5 µm Partikelgröße (Säule D) |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min  |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)                                     |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=230 nm  |

##### 4.10.5.3 Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC

###### Testlösung zur Optimierung der Auftrennung

100 µl der AQ-Stammlösung sowie jeweils 100 µl der AQ-Verunreinigung A-C und 10 µl der AQ-VU D-Stammlösung werden gemischt.

###### Linearität Amodiaquin

Die AQ-Stammlösung wird mit Methanol verdünnt:

| Kalibrierpunkt<br>[µg/ml] | AQ-Stammlösung<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|---------------------------|------------------------|------------------|
| 1.0                       | 1                      | 999              |
| 10.0                      | 10                     | 990              |
| 100.0                     | 100                    | 900              |
| 250.0                     | 250                    | 750              |
| 500.0                     | 250                    | 250              |
| 1000.0                    | 1000                   | 0                |



**Linearität Verunreinigungen A-D, LOD/LOQ**

Die jeweiligen Arbeitslösung wird mit Methanol verdünnt (0.05-0.3 %):

| Kalibrierpunkt<br>[µg/ml] | AQ-Verunreinigung A, B, C bzw. D-AL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|---------------------------|---|------------------|
| 0.5                       | 50  | 950              |
| 1.0                       | 100   | 900              |
| 1.5                       | 150   | 850              |
| 2.0                       | 200   | 800              |
| 2.5                       | 250   | 750              |
| 3.0                       | 300   | 700              |

**4.10.6 Bestimmung von Amodiaquin nach USP**

**Mobile Phase**

6.8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> werden in etwa 950 ml Millipore-Wasser gelöst, 1.0 ml Perchlorsäure hinzugegeben und der pH-Wert der Lösung durch tropfenweise Zugabe von Phosphorsäure (85 %) auf 2.5 eingestellt. Die Lösung wird mit Millipore-Wasser zu 1000.0 ml ergänzt. 780 ml dieser Lösung werden mit 220 ml Methanol gemischt.

**Probe- und Kalibrierlösungen**

50.0 mg Amodiaquindihydrochlorid-Dihydrat werden in 10.0 ml Methanol gelöst und Aliquote dieser Lösung mit Methanol verdünnt:

| Konzentration<br>[mg/ml] | Amodiaquin-Lösung (5 mg/ml)<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------|
| 0.50                     | 100                                 | 900              |
| 0.56                     | 100                                 | 800              |
| 0.63                     | 100                                 | 700              |
| 0.71                     | 100                                 | 600              |
| 0.83                     | 100                                 | 500              |

Eine Tablette „Amodar®“ (200 mg Amodiaquin) wird zerrieben und in 40.0 ml Methanol suspendiert. Nach Behandlung im Ultraschallbad (15 Minuten) und anschließender Zentrifugation (20.000 rpm, zehn Minuten) werden 100 µl des Überstandes mit 700 µl Methanol vermischt.

**4.10.7 Mefloquin****4.10.7.1 Mobile Phase**

35 Volumenteile der NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Pufferlösung (0.1 mol/L, pH=3.0) werden mit 65 Volumenteilen Methanol vermischt.

**4.10.7.2 Chromatographische Parameter**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Knauer Eurospher-II C-18 P, 125 x 4.6 mm,<br>5 µm Partikelgröße (Säule A) |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min  |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)                                       |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=280 nm  |

**4.10.7.3 Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC****Testlösung zur Optimierung der Auftrennung**

100 µl der MQ-Stammlösung werden mit jeweils 100 µl der MQ-Verunreinigung A-E-Stamm-lösungen gemischt.

**Linearität Mefloquin**

Die MQ-Stammlösung wird mit Methanol wie folgt verdünnt:

| Konzentration<br>[µg/ml] | MQ-SL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|---------------|------------------|
| 25.0                     | 25            | 975              |
| 50.0                     | 50            | 950              |
| 100.0                    | 100           | 900              |
| 250.0                    | 250           | 750              |
| 500.0                    | 500           | 500              |
| 1000.0                   | 1000          | 0                |

**Linearität Verunreinigungen A-E, LOD/LOQ**

Die Arbeitslösungen der jeweiligen Verunreinigung werden mit Methanol verdünnt (0.05-0.3 %):

| Konzentration [µg/ml] | MQ-Verunreinigung A, B, C, D bzw. E-AL [µl] | Methanol [µl] |
|-----------------------|---|---------------|
| 0.5                   | 50  | 950           |
| 1.0                   | 100   | 900           |
| 1.5                   | 150   | 850           |
| 2.0                   | 200   | 800           |
| 2.5                   | 250   | 750           |
| 3.0                   | 300   | 700           |

**4.10.8 Bestimmung von Mefloquin nach Ph. Eur.**

**Mobile Phase**

1 g Tetraheptylammoniumbromid wird in einer Mischung von 200 ml Methanol, 400 ml Acetonitril sowie 400 ml einer Lösung von 1.5 g/l Natriumhydrogensulfat-Monohydrat gelöst.

**Kalibrier- und Probelösungen**

100.0 mg Mefloquinhydrochlorid werden in 10.0 ml Methanol gelöst und Aliquote dieser Lösung wie folgt mit Methanol verdünnt:

| Konzentration [mg/ml] | Mefloquin-Lösung (10 mg/ml) [µl] | Methanol [µl] |
|-----------------------|----------------------------------|---------------|
| 2.0                   | 100                              | 400           |
| 2.2                   | 100                              | 350           |
| 2.5                   | 100                              | 300           |
| 2.9                   | 100                              | 250           |
| 3.3                   | 100                              | 200           |

Eine Tablette „Mephaquin®“ (250 mg Mefloquinhydrochlorid) wird zerrieben und in 25.0 ml Methanol suspendiert. Nach 15 Minuten Behandlung im Ultraschallbad und anschließender Zentrifugation (20.000 rpm, zehn Minuten) werden 250 µl des Überstandes mit 750 µl Methanol vermischt.

**4.10.9 Proguanil****4.10.9.1 Mobile Phase**

50 Volumenteile der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung (0.05 mol/L,  $\text{pH}=3.0$ ) werden mit 50 Volumenteilen Methanol vermischt.

**4.10.9.2 Chromatographische Parameter**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Säule:</b>             | Knauer Eurospher-II C-18 P, 125 x 4.6 mm,<br>5 $\mu\text{m}$ Partikelgröße (Säule A) |
| <b>Flussrate:</b>         | 0.75 ml/min  |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 $\mu\text{l}$   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)  |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, $\lambda=232$ nm   |

**4.10.9.3 Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC****Testlösung zur Optimierung der Auftrennung**

100  $\mu\text{l}$  der PG-Stammlösung sowie jeweils 100  $\mu\text{l}$  der PG-Verunreinigungen A-E-Stammlösungen werden gemischt.

**Linearität Proguanil**

Die PG-Stammlösung wird mit Methanol verdünnt:

| Konzentration<br>[ $\mu\text{g/ml}$ ] | PG-SL<br>[ $\mu\text{l}$ ] | Methanol<br>[ $\mu\text{l}$ ] |
|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 1.0                                   | 1                          | 999                           |
| 10.0                                  | 10                         | 990                           |
| 100.0                                 | 100                        | 900                           |
| 250.0                                 | 250                        | 750                           |
| 500.0                                 | 500                        | 500                           |
| 1000.0                                | 1000                       | 0                             |

**Linearität Verunreinigungen A-E, LOD/LOQ**

Die jeweiligen Arbeitslösungen werden mit Methanol verdünnt (0.05-0.3 %):

| Konzentration<br>[µg/ml] | PG-Verunreinigung A, B, C, D bzw. E-AL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|--|------------------|
| 0.5                      | 50   | 950              |
| 1.0                      | 100  | 900              |
| 1.5                      | 150  | 850              |
| 2.0                      | 200  | 800              |
| 2.5                      | 250  | 750              |
| 3.0                      | 300  | 700              |

**4.10.10 Artemether/Lumefantrin****4.10.10.1 Mobile Phase**

22.5 Volumenteile der NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Pufferlösung (0.05 mol/L, *pH*=2.5) werden mit 50 Volumenteilen Methanol vermischt.

**4.10.10.2 Chromatographische Parameter**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Knauer Eurospher-II C-18 P, 125 x 4.6 mm,<br>5 µm Partikelgröße (Säule A) |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min  |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)                                       |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=210 nm  |

**4.10.10.3 Arbeits- und Kalibrierlösungen für die HPLC****Testlösung zur Optimierung der Auftrennung**

100 µl der Artemether-, Artemether-Verunreinigung A- und Lumefantrin-Stammlösungen sowie jeweils 100 µl der Lumefantrin-Verunreinigung A, B und C-Stammlösungen werden vermischt.

**Linearität Artemether**

Die AE-VU A-Stammlösung wird mit Methanol verdünnt:

| Konzentration<br>[µg/ml] | AE-SL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|---------------|------------------|
| 1.0                      | 100           | 900              |
| 2.5                      | 250           | 750              |
| 5.0                      | 500           | 500              |
| 7.5                      | 750           | 250              |
| 10.0                     | 500           | 0                |

**Linearität Dihydroartemisinin, LOD/LOQ**

Die AE-VU A-Arbeitslösung wird mit Methanol verdünnt (0.02-0.12 %):

| Konzentration<br>[µg/ml] | AE VU A-AL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|--------------------|------------------|
| 2.0                      | 50                 | 950              |
| 4.0                      | 100                | 900              |
| 6.0                      | 150                | 850              |
| 8.0                      | 200                | 800              |
| 10.0                     | 250                | 750              |
| 12.0                     | 300                | 700              |

**Linearität Lumefantrin**

Die LF-Stammlösung wird mit Methanol verdünnt:

| Konzentration<br>[µg/ml] | LF-SL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|---------------|------------------|
| 10.0                     | 10            | 990              |
| 50.0                     | 50            | 950              |
| 100.0                    | 100           | 900              |
| 250.0                    | 250           | 750              |
| 500.0                    | 500           | 500              |

**Linearität Verunreinigungen A-C, LOD/LOQ**

Die LF-Verunreinigung A, B und C-Arbeitslösungen werden mit Methanol verdünnt (0.05-0.3 %):

| Konzentration<br>[µg/ml] | LF-Verunreinigung A, B, C-AL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------|
| 0.25                     | 50                                   | 950              |
| 0.5                      | 100                                  | 900              |
| 0.75                     | 150                                  | 850              |
| 1.0                      | 200                                  | 200              |
| 1.25                     | 250                                  | 750              |
| 1.5                      | 300                                  | 700              |

**4.11 Dünnschichtchromatographie****4.11.1 Fließmittel und Entwicklung**

Die Entwicklung der Dünnschichtchromatographieplatten erfolgt in einer mit Filterpapier ausgekleideten Glas-Chromatographiekammer, welche zuvor mindestens 20 Minuten lang mit dem entsprechenden Fließmittel gesättigt wird:

| Arzneistoff                   | Fließmittel  |
|-------------------------------|--|
| <b>Amodiaquin</b>             | 200 ml Methanol<br>50 ml Ethylacetat<br>5 ml konzentrierte Ammoniaklösung  |
| <b>Proguanil</b>              | <b>Fließmittel A:</b><br>150 ml Aceton<br>50 ml Methanol<br>5 ml Essigsäure (100 %)<br><br><b>Fließmittel B:</b><br>3 ml konzentrierte Ammoniaklösung<br>197 ml Methanol |
| <b>Mefloquin</b>              | 160 ml Ethylacetat<br>40 ml Methanol<br>30 ml konzentrierte Ammoniaklösung   |
| <b>Artemether/Lumefantrin</b> | 40 ml Ethylacetat<br>20 ml Essigsäure (100 %)<br>180 ml Toluol   |

Als Sprühreagenz zur Detektion von Artemether wird eine Mischung aus 190 ml Methanol und 10 ml Schwefelsäure (96 %) verwendet (Schwefelsäure-Sprühreagenz).

#### 4.11.2 Allgemeine Hinweise zur Herstellung der Probe- und Kalibrierlösungen

Die Herstellung aller Probe-, Untersuchungs- bzw. Kalibrierlösungen erfolgt, soweit nicht anders angegeben, gemäß den Vorschriften des Handbuchs „A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other Medicines. Volume II on Thin Layer Chromatographic Tests“ zum GPHF-Minilab® [94]. Es werden ausschließlich die in diesen Protokollen angegebenen volumetrischen Messgeräte verwendet und die Probelösungen mit Hilfe von geeichten Kapillaren auf die Platten aufgetragen.

#### 4.11.3 Amodiaquin

##### Untersuchungslösungen

Eine Tablette des Fertigarzneimittels „Amodar®“ wird zerrieben und unter gelegentlichem Umschwenken mit 52.3 ml Methanol extrahiert, die Suspension für fünf Minuten stehen gelassen und der klare Überstand anschließend abgenommen (Amodar-DC-SL). 1 ml der so erhaltenen Lösung wird mit 7 bzw. 9 ml Methanol verdünnt (Amodar-DC-UL 1 und 2).

##### Kalibrierlösungen

50.0 mg Amodiaquindihydrochlorid-Dihydrat werden in 10 ml Methanol gelöst (AQ-DC-SL) und diese Lösung wie folgt weiter verdünnt:

| Konzentration<br>[mg/ml] | AQ-DC-SL<br>[ml] | Methanol<br>[ml] |
|--------------------------|------------------|------------------|
| 0.185                    | 1                | 26               |
| 0.250                    | 1                | 19               |
| 0.313                    | 1                | 15               |
| 0.357                    | 1                | 13               |
| 0.385                    | 1                | 12               |
| 0.417                    | 1                | 11               |
| 0.455                    | 1                | 10               |
| 0.500                    | 1                | 9                |
| 0.556                    | 1                | 8                |
| 0.625                    | 1                | 7                |



#### 4.11.4 Mefloquin

##### Untersuchungslösungen

Eine Tablette „Mephaquin®“ wird zerrieben, mit 25 ml Methanol drei Minuten lang unter gelegentlichem Umschwenken extrahiert und die Suspension für fünf Minuten stehen gelassen. Anschließend wird der klare Überstand abgenommen (Mephaquin-DC-SL) und 1 ml dieser Lösung mit 3 bzw. 4 ml Methanol verdünnt (Mephaquin-DC-UL 1 und 2).

##### Kalibrierlösungen

100.6 mg Mefloquinhydrochlorid werden in 10 ml Methanol gelöst (MQ-DC-SL) und diese Lösung mit Methanol verdünnt:

| Konzentration<br>[mg/ml] | MQ-DC-SL<br>[ml] | Methanol<br>[ml] |
|--------------------------|------------------|------------------|
| 0.774                    | 1                | 12               |
| 0.915                    | 1                | 10               |
| 1.258                    | 1                | 7                |
| 1.437                    | 1                | 6                |
| 1.677                    | 1                | 5                |
| 1.829                    | 1                | 4.5              |
| 2.012                    | 1                | 4                |
| 2.236                    | 1                | 3.5              |
| 2.515                    | 1                | 3                |

#### 4.11.5 Proguanil

##### Untersuchungslösungen

Eine Tablette des Fertigarzneimittels „Paludrine®“ wird zerstoßen und mit 20 ml Methanol drei Minuten unter gelegentlichem Umschwenken extrahiert. Die Suspension wird fünf Minuten stehen gelassen und der klare Überstand anschließend abgenommen (Paludrine-DC-SL). 1 ml dieser Lösung wird mit 7 bzw. 9 ml Methanol verdünnt (Paludrine-DC-UL 1 und 2).

##### Kalibrierlösungen

50.8 mg Proguanilhydrochlorid werden in 10 ml Methanol gelöst (PG-DC-SL) und diese Lösung wie folgt mit Methanol verdünnt:

| Konzentration<br>[mg/ml] | PG-DC-SL<br>[ml] | Methanol<br>[ml] |
|--------------------------|------------------|------------------|
| 0.186                    | 1                | 26               |
| 0.251                    | 1                | 19               |
| 0.313                    | 1                | 15               |
| 0.358                    | 1                | 13               |
| 0.385                    | 1                | 12               |
| 0.418                    | 1                | 11               |
| 0.455                    | 1                | 10               |
| 0.501                    | 1                | 9                |
| 0.557                    | 1                | 8                |
| 0.626                    | 1                | 7                |

#### 4.11.6 Artemether/Lumefantrin

##### Untersuchungslösungen

Jeweils eine Tablette „Coartem®“ sowie „ALU Artemether 20 mg & Lumefantrin 120 mg“ wird zerrieben und mit je 50 ml Aceton drei Minuten lang unter gelegentlichem Umschwenken extrahiert. Die Suspensionen werden für fünf Minuten stehen gelassen und anschließend die klaren Überstände abgenommen (Coartem- bzw. ALU-DC-SL).

Je 1 ml dieser Lösungen wird durch Zugabe von 2 ml Aceton verdünnt (Coartem- bzw. ALU-DC-UL).

**Kalibrierlösungen**

24.4 mg Lumefantrin werden in 10 ml Aceton und 50.6 mg Artemether in 25.0 ml Aceton gelöst (LF-DC- bzw. AE-DC-SL). Durch Verdünnen dieser Lösungen werden jeweils sechs Kalibrierlösungen hergestellt:

| <b>Lumefantrin</b>               |                          |                        |
|----------------------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>Konzentration<br/>[mg/ml]</b> | <b>LF-DC-SL<br/>[ml]</b> | <b>Aceton<br/>[ml]</b> |
| 0.813                            | 1                        | 2                      |
| 0.651                            | 4                        | 11                     |
| 0.610                            | 1                        | 3                      |
| 0.488                            | 1                        | 4                      |
| 0.407                            | 1                        | 5                      |
| 0.271                            | 1                        | 8                      |
| <b>Artemether</b>                |                          |                        |
| <b>Konzentration<br/>[mg/ml]</b> | <b>AE-DC-SL<br/>[ml]</b> | <b>Aceton<br/>[ml]</b> |
| 2.024                            | 1                        | 0                      |
| 1.619                            | 4                        | 1                      |
| 1.518                            | 3                        | 1                      |
| 1.349                            | 2                        | 1                      |
| 1.012                            | 1                        | 1                      |
| 0.675                            | 1                        | 2                      |

## 4.12 Flüssigchromatographie

### 4.12.1 Amodiaquin

#### Untersuchungslösungen

Eine Tablette des Fertigarzneimittels „Amodar®“ wird zerrieben und unter gelegentlichem Umschwenken mit 50.0 ml Methanol extrahiert, die Suspension für fünf Minuten stehen gelassen und der klare Überstand anschließend abgenommen (Amodar-HPLC-SL). 1.0 ml der so erhaltenen Lösung wird zu 10.0 ml mit Methanol verdünnt (Amodar-HPLC-UL).

#### Kalibrierlösungen

50.0 mg Amodiaquindihydrochlorid-Dihydrat werden in 50.0 ml Methanol gelöst (AQ-HPLC-SL) und diese Lösung wie folgt weiter verdünnt:

| Konzentration<br>[mg/ml] | AQ-HPLC-SL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|--------------------|------------------|
| 0.2                      | 200                | 800              |
| 0.3                      | 300                | 700              |
| 0.4                      | 400                | 600              |
| 0.5                      | 500                | 500              |
| 0.6                      | 600                | 400              |

### 4.12.2 Mefloquin

#### Untersuchungslösungen

Eine Tablette „Mephaquin®“ wird zerrieben, mit 25.0 ml Methanol drei Minuten lang unter gelegentlichem Umschwenken extrahiert und die Suspension für fünf Minuten stehen gelassen. Anschließend wird der klare Überstand abgenommen (Mephaquin-HPLC-SL) und 1.0 ml dieser Lösung zu 5.0 ml mit Methanol verdünnt (Mephaquin-HPLC-UL).

**Kalibrierlösungen**

Die angegebenen Mengen Mefloquinhydrochlorid werden in den jeweils angegebenen Volumina Methanol gelöst:

| Konzentration<br>[mg/ml] | Mefloquinhydrochlorid<br>[mg] | Methanol<br>[ml] |
|--------------------------|-------------------------------|------------------|
| 0.8                      | 8.04                          | 10.0             |
| 0.9                      | 9.05                          | 10.0             |
| 1.0                      | 10.05                         | 10.0             |
| 1.1                      | 11.05                         | 10.0             |
| 1.2                      | 12.01                         | 10.0             |

**4.12.3 Proguanil**

**Untersuchungslösungen**

Eine Tablette des Fertigarzneimittels „Paludrine®“ wird zerrieben und mit 20.0 ml Methanol drei Minuten unter gelegentlichem Umschwenken extrahiert. Die Suspension wird fünf Minuten stehen gelassen und der klare Überstand anschließend abgenommen (Paludrine-HPLC-SL). 1.0 ml dieser Lösung wird zu 10.0 ml mit Methanol verdünnt (Paludrine-HPLC-UL).

**Kalibrierlösungen**

50.0 mg Proguanilhydrochlorid werden in 50.0 ml Methanol gelöst (PG-HPLC-SL) und diese Lösung wie folgt mit Methanol verdünnt:

| Konzentration<br>[mg/ml] | PG-HPLC-SL<br>[µl] | Methanol<br>[µl] |
|--------------------------|--------------------|------------------|
| 0.5                      | 500                | 500              |
| 0.6                      | 600                | 400              |
| 0.7                      | 700                | 300              |
| 0.8                      | 800                | 200              |
| 0.9                      | 900                | 100              |

#### 4.12.4 Artemether/Lumefantrin

##### Untersuchungslösungen

Jeweils eine Tablette „Coartem®“ sowie „ALU Artemether 20 mg & Lumefantrin 120 mg“ wird zerrieben und mit je 50.0 ml Methanol drei Minuten lang unter gelegentlichem Umschwenken extrahiert. Die Suspensionen werden für fünf Minuten stehen gelassen und anschließend die klaren Überstände abgenommen (Coartem- bzw. ALU-HPLC-SL).

Je 1.0 ml dieser Lösungen wird durch Zugabe von 2.0 ml Methanol verdünnt (Coartem- bzw. ALU-HPLC-UL).

##### Kalibrierlösungen

10.0 mg Lumefantrin werden in 10.0 ml Methanol und 100.0 mg Artemether in 10.0 ml Methanol gelöst (LF-HPLC- bzw. AE-HPLC-SL). Durch Verdünnen dieser Lösungen werden jeweils fünf Kalibrierlösungen hergestellt:

| Lumefantrin           |                 |               |
|-----------------------|-----------------|---------------|
| Konzentration [mg/ml] | LF-HPLC-SL [µl] | Methanol [µl] |
| 0.1                   | 100             | 900           |
| 0.2                   | 200             | 800           |
| 0.3                   | 300             | 700           |
| 0.4                   | 400             | 600           |
| 0.5                   | 500             | 500           |
| Artemether            |                 |               |
| Konzentration [mg/ml] | AE-HPLC-SL [µl] | Methanol [µl] |
| 2                     | 200             | 800           |
| 4                     | 400             | 600           |
| 6                     | 600             | 400           |
| 8                     | 800             | 200           |
| 10                    | 1000            | 0             |

Ergebnisse und Diskussion



## **5 Ergebnisse und Diskussion**

### **5.1 Generelle Aspekte der Methodenentwicklung und -optimierung**

Tansania ist im Bereich der Arzneimittelkontrolle bereits sehr fortschrittlich, sodass die dort bestehenden Strukturen zur Etablierung eines Arzneimittelfälschungs-Pilotprojektes genutzt werden könnten. In Analogie zu den Empfehlungen der WHO wurde eine dreistufige Testhierarchie entwickelt, welche die verhältnismäßig eingeschränkten instrumentellen sowie infrastrukturellen Möglichkeiten berücksichtigt und verschiedene analytische Konzepte miteinander kombiniert [95]:

1. Reihenuntersuchung der im Markt befindlichen bzw. zur Anwendung am Patienten vorgesehenen Arzneimittel mit Hilfe des GPHF-Minilab®;
2. Überprüfung der Ergebnisse (Reinheit, Gehalt) aus Schritt 1 durch die Untersuchung der Proben mittels der neu entwickelten, vereinfachten HPLC-Methoden;
3. Wiederholung der Untersuchungen aller in Schritt 2 als „außerhalb der Spezifikation“ getesteten Proben mittels Arzneibuchmethoden; Durchführung durch die staatliche Kontrollbehörde und anschließendes Festlegen weiterer Maßnahmen (z. B. Chargenrückruf).

Die Entwicklung vereinfachter Methoden konnte durch folgende Strategien erreicht werden:

#### **Verzicht auf teure Reagenzien und Lösungsmittel**

In Tabelle 5.1-1 sind die chromatographischen Parameter der HPLC-Methoden des *Ph. Eur.*, der USP sowie des Internationalen Arzneibuches (*Ph. Int.*) für alle untersuchten Arzneistoffe zusammengestellt. Es ist ersichtlich, dass in nahezu jedem Fall die durch Chemikalien, Lösungsmittel und Chromatographiesäulen verursachten Kosten eine große Rolle spielen. Beispielsweise wird häufig Acetonitril als organisches Lösungsmittel verwendet, was aufgrund seines hohen Preises und der mitunter schlechten Verfügbarkeit zu einem großen Problem werden kann [96]. Zur Methodenentwicklung wurden daher einfache Phosphatpuffer-Methanol-Gemische sowie kostengünstige und robuste Chromatographiesäulen verwendet.

#### **Vermeiden von Ionenpaarbildnern und Ersatz durch einfache Phosphatpuffer**

Auch die häufig in den Arzneibüchern eingesetzten Ionenpaarreagenzien (z. B. Tetraheptylammoniumbromid oder Natriumhexansulfonat) sind im Vergleich zu einfachen Puffersalzen sehr teuer und zudem in vielen Ländern nur schwierig oder überhaupt nicht erhältlich.



## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

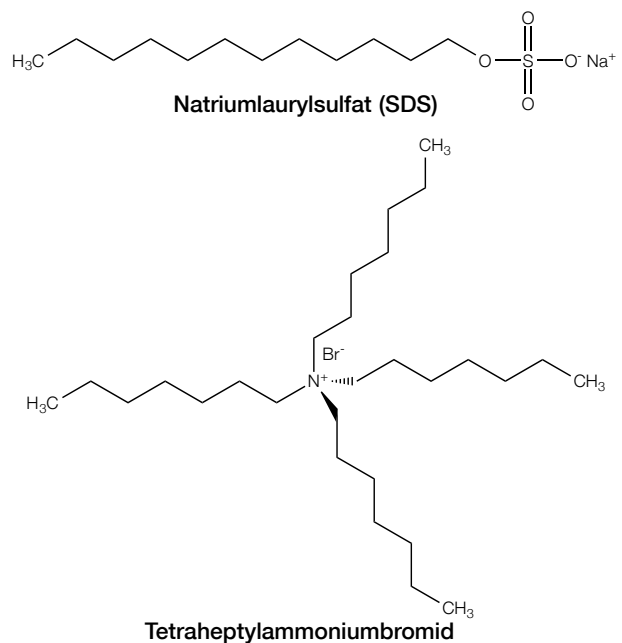
**Tabelle 5.1-1:** Übersicht der Arzneibuchmethoden für die untersuchten Arzneistoffe.

| Stoff        | Ph. Eur.   | USP  | Ph. Int.   |
|--------------|--|--|--|
| <b>MQ</b>    | <u>Säule:</u><br>RP-18 endcapped,<br>250 x 4.6 mm; 5 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>THABr <sup>#</sup> , MeOH, NaHSO <sub>4</sub> , ACN;<br>isokratische Elution     | <u>Säule:</u><br>RP-18 endcapped,<br>250 x 4.6 mm; 5 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>THABr, MeOH, NaHSO <sub>4</sub> , ACN;<br>isokratische Elution   | (keine Monographie vorhanden)  |
| <b>AQ</b>    | (keine Monographie vorhanden)  | <u>Säule:</u><br>RP-18,<br>100 x 4.6 mm<br><u>Mobile Phase:</u><br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, HClO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ;<br>isokratische Elution  | <u>Säule:</u><br>RP-18,<br>150 x 4.6 mm; 5 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , TEA <sup>##</sup> , KOH, H <sub>2</sub> O, MeOH;<br>isokratische Elution   |
| <b>PG</b>    | <u>Säule:</u><br>RP-18,<br>125 x 4.6 mm; 5 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>Na-Hexansulfonat,<br>CH <sub>3</sub> COOH, H <sub>2</sub> O, MeOH;<br>isokratische Elution | <u>Säule:</u><br>RP-18,<br>125 x 4.6 mm; 5 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>Na-Hexansulfonat,<br>CH <sub>3</sub> COOH, H <sub>2</sub> O, MeOH;<br>isokratische Elution   | <u>Säule:</u><br>RP-18,<br>100 x 5 mm; 5 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>Na-Hexansulfonat,<br>CH <sub>3</sub> COOH, H <sub>2</sub> O, MeOH;<br>isokratische Elution   |
| <b>AE/LF</b> | (keine Monographie vorhanden)  | <b>Lumefantrin:</b><br><u>Säule:</u><br>RP-18,<br>150 x 4.6 mm; 1.8 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>Na-Hexansulfonat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,<br>H <sub>2</sub> O, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , ACN,<br>Isopropanol;<br>Gradientenelution | <b>Artemether/Lumefantrin-Kombination:</b><br><u>Säule:</u><br>RP-18,<br>150 x 3.9 mm; 5 µm Partikel<br><u>Mobile Phase:</u><br>Na-Hexansulfonat,<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , ACN;<br>Gradientenelution |

#: THABr=Tetraheptylammoniumbromid; ##: TEA=Triethylamin

Es handelt sich in der Regel um anionische Tenside oder quartäre Ammoniumsalze, die der mobilen Phase zugesetzt und je nach den Eigenschaften der aufzutrennenden Analyten ausgewählt werden müssen (siehe Abbildung 5.1-1).

Neben dem hohen Preis hat ihre Verwendung den großen Nachteil, dass sie den Charakter der stationären Phase durch Einlagerung in die Alkylketten irreversibel verändern, sodass man diese nur noch für weitere ionenpaar-chromatographische Anwendungen einsetzen kann bzw. sollte. Die eigentlichen, der RP-Chromatographie zugrunde liegenden Trenn-



**Abbildung 5.1-1:** Typische Ionenpaarreagenzien.

modi gehen nahezu verloren und die Reagenzien sind selbst durch ausgiebige Spülprozesse

nur sehr schwer aus dem gesamten chromatographischen System (Pumpe, Kapillaren, Dichtungen) zu entfernen. Falls eine HPLC-Säule in der Routine für mehrere Anwendungszwecke genutzt werden soll, beispielsweise die Analytik mit verschiedenen Methoden, stellt die Verwendung von Ionenpaarreagenzien einen großen Nachteil dar.

Während der Methodenentwicklung und -optimierung wurde daher konsequent auf den Einsatz solcher Verbindungen verzichtet und statt dessen nur einfache Phosphatpuffer zur Herstellung der mobilen Phasen verwendet. Die Salzkonzentration wurde dabei so gering wie nötig bzw. möglich gewählt, um den Chemikalienverbrauch zu verringern.

### **Isokratische Elution und Verringern des Verbrauches an mobiler Phase**

Durch den Einsatz kurzer Säulen (150 mm) in Verbindung mit möglichst geringen Flussraten (0.75-1.0 ml/min) konnte der Fließmittelverbrauch minimiert und eine schnelle Analysenzeit realisiert werden. Die Optimierung der Zusammensetzung der mobilen Phasen in Bezug auf den organischen bzw. wässrigen Bestandteil konnte den Verbrauch an organischem Lösungsmittel ebenfalls senken. Der Einfluss der Zusammensetzung der mobilen Phase und der gewählten Flussrate auf den letztendlichen Verbrauch an Lösungsmittel ist exemplarisch in Tabelle 5.1-2 dargestellt: Durch geeignete Wahl der chromatographischen Parameter kann der Verbrauch beispielsweise um bis zu 40 % gesenkt werden.

Alle Methoden wurden zudem im isokratischen Elutionsmodus entwickelt. Die Analysendauer konnte gesenkt werden, da lange Äquilibrier- und Re-Äquilibrierungsphasen vermieden werden und keine teuren Pumpen mit Gradientenmischer benötigt werden. Eine weitere, in der Praxis gut umsetzbare Möglichkeit zur Reduzierung des Verbrauches an mobiler Phase kann durch „Kreislaufpumpen“ des Eluenten erreicht werden, denn bei einer isokratischen Methode kann dieser mehrmals für die Chromatographie verwendet werden.

**Tabelle 5.1-2:** Die Zusammensetzung der mobilen Phase und die gewählte Flussrate bestimmen maßgeblich den Verbrauch an organischem Lösungsmittel (exemplarische Daten).

| Methanolanteil [% V/V] | Flussrate [ml/min] | Laufzeit [min] | Verbrauch mobile Phase pro Analyse [ml] | Verbrauch Methanol pro Analyse [ml] |
|------------------------|--------------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 80                     | 1.25               | 15             | 18.75                                   | 15                                  |
|                        | 1.0                | 15             | 15.0                                    | 12                                  |
|                        | 0.75               | 15             | 11.25                                   | 9                                   |
| 75                     | 1.25               | 15             | 18.75                                   | 14                                  |
|                        | 1.0                | 15             | 15.0                                    | 11.3                                |
|                        | 0.75               | 15             | 11.25                                   | 7.9                                 |
| 70                     | 1.25               | 15             | 18.75                                   | 13.1                                |
|                        | 1.0                | 15             | 15.0                                    | 10.5                                |
|                        | 0.75               | 15             | 11.25                                   | 9                                   |

**Robustheit der Methoden: *pH*-Wert, Trenntemperatur**

In Hinblick auf den späteren Einsatzzweck muss berücksichtigt werden, dass die Analytik unter unterschiedlichsten Bedingungen durchgeführt wird, z. B. in nicht-klimatisierten Laboratorien zu unterschiedlichen Jahreszeiten und damit bei schwankenden Umgebungstemperaturen. Zudem kann es vorkommen, dass nicht ausreichend kalibrierte Geräte zur Herstellung der Lösungen und Reagenzien verwendet werden, beispielsweise *pH*-Elektroden. Im Fall einer nicht robusten Trennmethode kann somit die Retention bzw. die Auftrennung der Analyten während der Chromatographie durchaus hohen Schwankungen unterliegen, sodass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht notwendigerweise gegeben ist.

Dem *pH*-Wert der mobilen Phase kommt während der Analytik basischer und saurer Verbindungen eine wichtige Rolle zu, da er den Ladungszustand ionisierbarer Verbindungen und damit das Vorliegen geladener bzw. ungeladener Molekülspezies bestimmt. Hierdurch wird letztendlich das Retentionsverhalten erheblich beeinflusst [97]. Die *pH*-Wert-Skala ist per Definition logarithmisch angelegt, sodass eine Erhöhung bzw. Verringerung des *pH*-Wertes um  $\pm 2$  Einheiten bereits eine Veränderung der Protonenkonzentration um den Faktor 100 entspricht. Wird der *pH*-Wert der mobilen Phase zu nahe am *pK<sub>s</sub>*-Wert des Analyten gewählt, so liegt dieser bereits zu 50 % in der ionisierten Form vor, was in der RP-Chromatographie sehr ungünstig ist. Es kommt sowohl zu einer Verbreiterung der Signale (Tailing) und unter Umständen auch zu Doppelpeaks, falls mehrere Molekülspezies nebeneinander vorliegen. Für jedes Trennproblem muss daher der Effekt möglicher *pH*-Schwankungen der mobilen Phase individuell geprüft werden.

Üblicherweise erfolgt die Einstellung des *pH*-Wertes durch tropfenweise Zugabe einer geeigneten Säure oder Base, wobei allerdings ein zusätzliches Gerät (*pH*-Elektrode) benötigt wird. Zur Vereinfachung kann alternativ eine direkt dosier- bzw. wägbare Menge der jeweiligen Säure oder Base angegeben werden, sodass diese direkt abgewogen bzw. abgemessen werden kann. Der *pH*-Wert wird dann mit einer gewissen Unsicherheit erreicht, was jedoch aufgrund der hohen Robustheit gegenüber *pH*-Schwankungen ausgeglichen wird und den praktischen bzw. instrumentellen Aufwand zur Herstellung der mobilen Phase enorm verringert. Auch die Trenn- bzw. Säulentemperatur spielt in der HPLC eine wichtige Rolle, denn die Wechselwirkungen zwischen Analyten und stationärer Phase folgen dem Massenwirkungsgesetz und sind somit unter anderem abhängig von der Temperatur des Systems [98].

Alle entwickelten Methoden wurden hinsichtlich ihrer Robustheit gegenüber einer Verschiebung dieser typischen Einflussfaktoren charakterisiert, indem jeweils die Auflösungen benachbarter Signale bestimmt und nach gezielter Veränderung der Parameter mit denen der optimierten Methode verglichen wurden.

### **Identifizierung eines Wirkstoffes und Erkennung von Verwechslungen**

Durch den Vergleich der Retentionszeiten kann mit den entwickelten Methoden bestätigt werden, ob der deklarierte Arzneistoff tatsächlich vorhanden ist, oder ob es sich um ein Präparat ohne Wirkstoff handelt. Zudem können Verwechslungen bzw. Beimischungen erkannt werden, denn im Fall von Amodiaquin und Mefloquin wurde geprüft, inwiefern sich die jeweilige Methode auch zur Abtrennung fremder, dem Wirkstoff aber strukturell ähnlicher Arzneistoffe, einsetzen lässt (siehe Abschnitte 5.3 und 5.5).

Solche universellen Methoden haben zudem den Vorteil, dass mit nur einer Methode mehrere Stoffe quali- bzw. quantitativ erfasst werden können, ohne dass hierfür das chromatographische System verändert werden muss. Hierdurch kann der praktische Arbeitsaufwand ebenfalls stark reduziert und gleichzeitig Arbeitszeit und Material eingespart werden.

### **Bestimmung des Verunreinigungsmusters**

Vor der Methodenentwicklung wurden Überlegungen angestellt, welche Verunreinigungen bzw. *Verwandte Substanzen* durch die zugrunde liegenden Synthese- bzw. Reinigungsprozesse in einer Probe zu erwarten sind und anhand der in der Literatur beschriebenen Herstellungswege der Arzneistoffe ausgewählt. Zur Methodenentwicklung einer Arzneibuchmonographie wird prinzipiell analog vorgegangen. Da für Amodiaquin und die Kombination Artemether/Lumefantrin entsprechende Angaben in den Monographien bzw. die Monographie selbst fehlen, konnten so dennoch charakteristische, zu erwartende *Verwandte Substanzen* identifiziert werden.

Die untersuchten Verbindungen können jeweils vollständig vom Wirkstoff abgetrennt und bis zu einem prozentualen Anteil von 0.1 % quantitativ erfasst werden. Hierdurch ist neben der Bestimmung der Reinheit einer Substanz ebenfalls die Einordnung verschiedener Arzneimittelchargen zu unterschiedlichen Quellen möglich, denn das vorliegende Verunreinigungsmuster gilt in der Regel als sehr charakteristisch für einen Hersteller bzw. einen bestimmten Herstellungsprozess [99].

Obwohl nicht in jedem Fall eine vollständige Auftrennung aller Analyten untereinander erreicht werden konnte (beispielsweise von zwei Verunreinigungen), ist es in solchen Fällen dennoch möglich, zumindest die Summe dieser beiden Verunreinigungen anzugeben. Hierdurch werden die Grenzen einer vereinfachten Analytik aufgezeigt, allerdings konnten die Stoffe stets vollständig vom Arzneistoff abgetrennt und somit quantifiziert werden. Durch den Einsatz längerer bzw. andersartig modifizierter Chromatographiesäulen und die Verwendung komplexerer mobiler Phasen könnte dieser Umstand umgangen werden, allerdings steht dies nicht im Einklang mit den im Vorfeld definierten Zielsetzungen der Arbeit und wurde somit nicht weiter verfolgt.

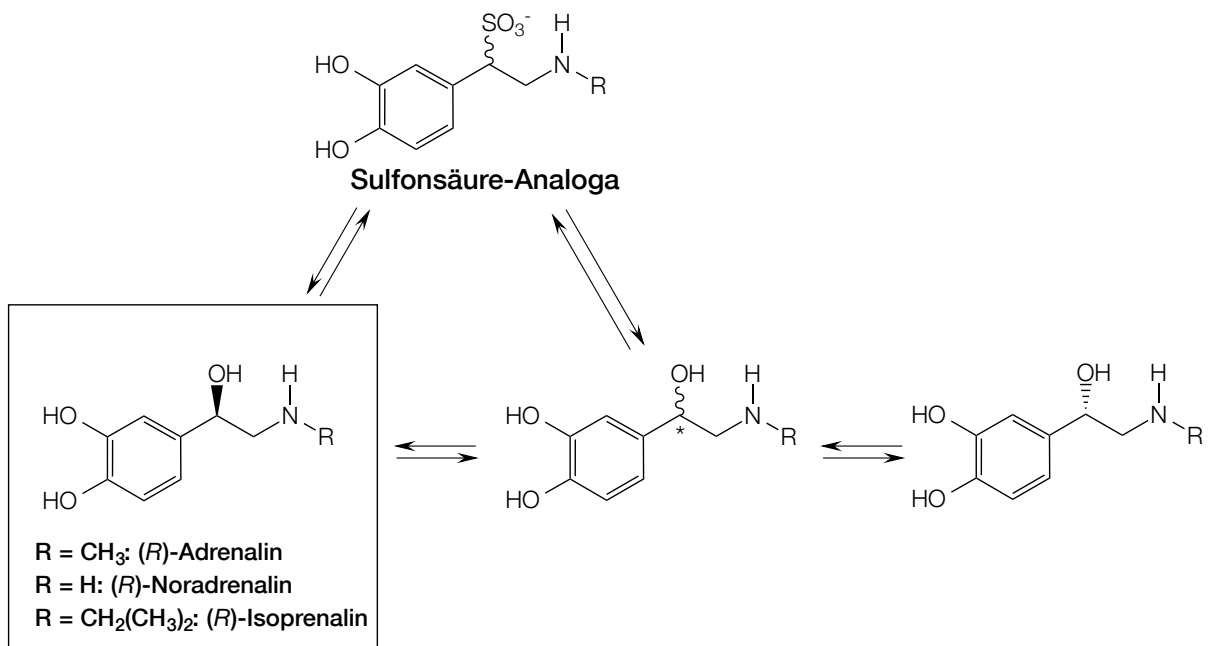
## 5.2 Stabilitätsanalytik von Noradrenalin

Während der Untersuchungen wurde insbesondere auf die folgenden Fragestellungen eingegangen:

1. Hat ein Verdünnungsgrad von 1:10 einen direkten Einfluss auf die Stabilität des Arzneimittels?
2. Wie lange sind die auf diese Weise hergestellten Verdünnungen maximal haltbar?
3. In welchem Ausmaß ist ein Wirkstoffabbau unter den untersuchten Lagerungsbedingungen zu erwarten?
4. Inwieweit können die Verdünnungen direkt in dem gewünschten Device, z. B. einer Perfusor®-Spritze, gelagert werden?
5. Inwieweit lassen sich bereits publizierte Stabilitätsdaten zu höher und/oder geringer konzentrierten Noradrenalin-Verdünnungen, beispielsweise 1:100 oder 1:1000, bestätigen?

### 5.2.1 Stabilität von Katecholaminen

Adrenalin (Epinephrin) und Noradrenalin (Norepinephrin) sind klassische Arzneistoffe aus der chemischen Gruppe der Phenylethylamine. Aufgrund des 3,4-dihydroxy-substituierten Phenylringes werden sie auch als Katecholamine bezeichnet.



**Abbildung 5.2.1-1:** Racemisierung der benzylichen Hydroxyfunktion von Adrenalin-derivaten sowie Bildung der Sulfonsäure-Analoga.

Adrenalin und Noradrenalin spielen in der Intensivmedizin, etwa zur akuten Schockbehandlung, eine überaus wichtige Rolle und sind in jedem Notarztkoffer in Form von sofort anwendbaren Notfall-Pens vorzufinden. Die physiologische Wirkung besteht in der Aktivierung spezieller G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, sogenannter Adrenozeptoren, die in den Nervenbahnen sowie an vielen inneren Organen angesiedelt sind. Beide Hormone werden im Nebennierenmark gebildet und zählen zu den Stresshormonen; die Ausschüttung löst Tachykardie, einen Anstieg des Blutdruckes sowie die Erweiterung der Pupillen und Bronchien aus [100]. In Abbildung 5.2.1-1 sind die Strukturformeln der beiden Verbindungen sowie des abgeleiteten beta-Sympathomimetikums Isoprenalin dargestellt.

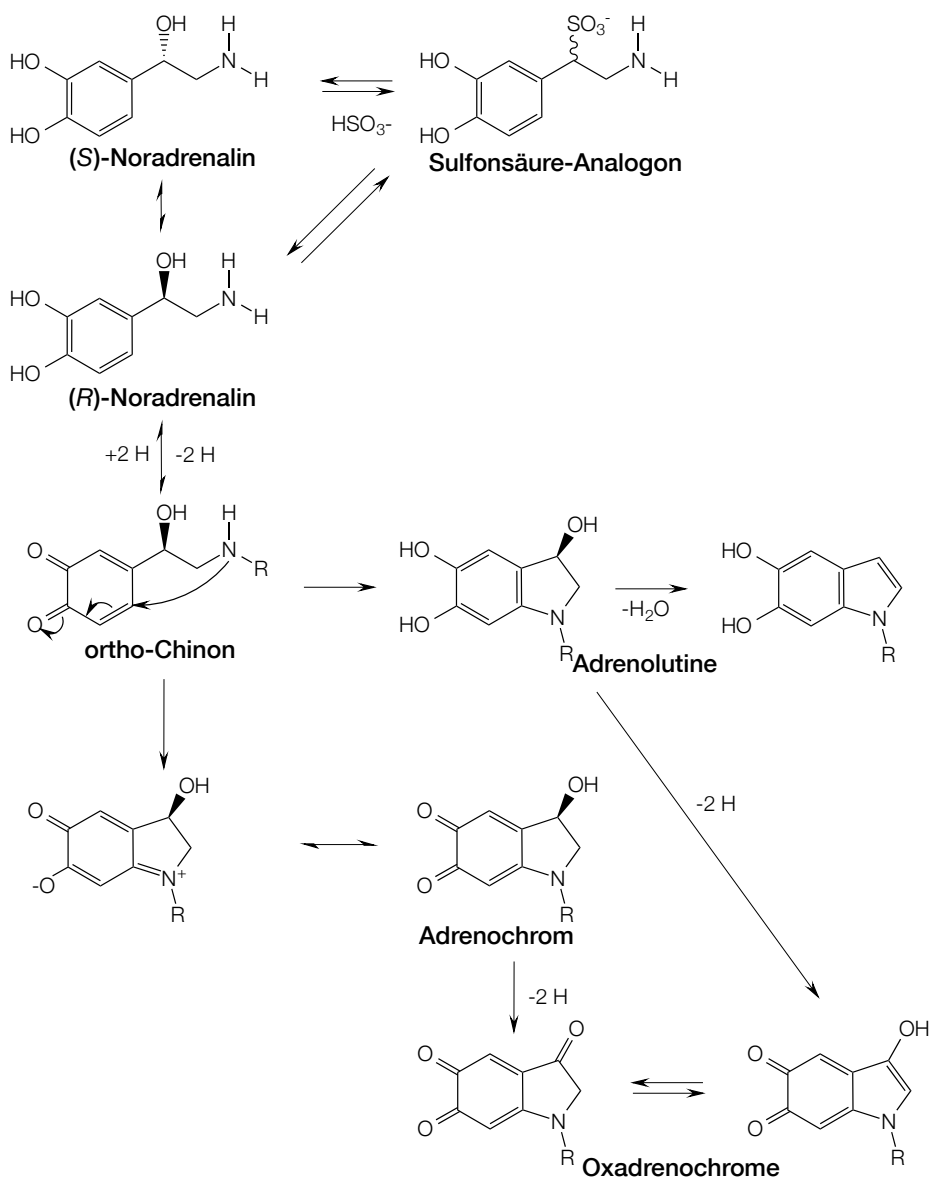


Abbildung 5.2.1-2: Abbauewege der Katecholamine.

Katecholamine, darunter auch Adrenalin und Noradrenalin, weisen im Allgemeinen keine hohe Stabilität auf [101]. Die Brenzkatechinstruktur ist überaus oxidationsempfindlich, was zur Folge hat, dass die Substanzen vor Licht, Sauerstoff, UV-Strahlung und dem Einfluss weiterer oxidativer Faktoren geschützt werden müssen. Dies ist insbesondere dann kritisch, wenn sie galenisch als Lösung formuliert sind. Aufgrund der überaus schlechten oralen Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe kann allerdings hierauf nicht verzichtet werden, weshalb Adrenalin und Noradrenalin ausschließlich in Form von Injektionslösungen bzw. Lösungen zur Inhalation erhältlich sind [62]. Man erkennt den beginnenden Abbau der Verbindungen daran, dass sich frisch hergestellte Lösungen innerhalb kürzester Zeit rosa verfärben und später schwarz-braune Partikel gebildet werden. Dieser Umstand gab dem Reaktionsweg seinen Trivialnamen: Adrenochrom-Reaktion. Die hierbei stattfindenden Prozesse lassen sich analog mit den entsprechenden Adrenalinderivaten, beispielsweise Isoprenalin, formulieren und sind in Abbildung 5.2.1-2 zusammengefasst.

Brenzkatechine können nach Oxidation zum *o*-Chinon durch Angriff des freien Elektronenpaares des Aminstickstoffes am entstandenen Michael-System zu Indolin-Derivaten cyclisieren. Es entstehen zunächst über weitere Zwischenstufen farblose Adrenolutine sowie farbige Adrenochrome und Oxadrenochrome. Diese Verbindungen sind für die Rosafärbung der Arzneistofflösungen verantwortlich, die Bildung der schwarzen Partikel ist auf eine im Anschluss stattfindende Polymerisation der Abbauprodukte zurückzuführen.

Im Fall von Adrenalin und Noradrenalin muss zudem berücksichtigt werden, dass nur das jeweilige (*R*)-Enantiomer physiologisch wirksam ist. Die Racemisierung der benzyllischen Hydroxyfunktion (siehe Abbildung 5.2.1-1) findet bevorzugt in Lösung statt und führt zu einem sofortigen Wirkverlust des Arzneistoffes [102]. Die Stabilität von Adrenalin bzw. Noradrenalin wurde vielfach untersucht und ist Gegenstand zahlreicher Publikationen (siehe Tabellen 5.2.1-1 und 5.2.1-2) [103-107].

Es ist ersichtlich, dass möglichst zielführende Strategien angewendet werden müssen, um Adrenalin- und Noradrenalin-haltige Lösungen effektiv vor dem Abbau zu schützen. Hier sind insbesondere die Abwesenheit von Oxidationsmitteln bzw. oxidierenden Umgebungsbedingungen sowie eine Unterdrückung der Racemisierung der benzyllischen Hydroxyfunktion anzuführen. Beide können idealer Weise durch die Lagerung in luftundurchlässigen Behältnissen (z. B. Glasampullen) bei niedrigen Temperaturen unter Lichtausschluss realisiert werden.

Der Zusatz geeigneter Konservierungsstoffe (siehe Abschnitt 5.2.2) ist eine gängige Praxis zur Haltbarmachung kommerzieller Fertigarzneimittel, wie etwa im Falle von Artereno<sup>®</sup>. Es handelt sich um eine wässrige Lösung von Noradrenalin, die durch den Zusatz von Natriumdisulfit konserviert wurde, sodass eine Durchstechflasche zur Entnahme mehrerer Dosen nach Anbruch

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

noch fünf Tage verwendet werden kann. In der Fachinformation zu Arterenol® ist angegeben: „Arterenol® (...) (ist) 30 Monate haltbar. Werden die Ampullen (...) innerhalb der Laufzeit aus dem Kühlschrank genommen und anschließend bei Raumtemperatur (25 °C) gelagert, verkürzt sich die Restlaufzeit auf maximal 6 Monate. (...) Zum Schutz vor Autoxidation ist Arterenol® daher mit Inertgas überlagert und enthält Sulfite als Antioxidans. (...) Der Zeitpunkt der Erstentnahme ist auf dem Etikett der Durchstechflasche zu vermerken. Angebrochene Flaschen sollten im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von fünf Tagen aufgebraucht werden. Aus Arterenol® hergestellte Lösungen sind innerhalb von 24 Stunden zu verbrauchen“ [108].

**Tabelle 5.2.1-1:** Ausgewählte Literaturdaten zur Stabilität Adrenalin-haltiger Lösungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

| Konz. [mg/ml]        | Lösungsmedium    | in/aus           | Temp. [°C] | Lichtschutz | pH          | Zeitraum | Zusätze                        | Gehalt  | Quelle |
|----------------------|------------------|------------------|------------|-------------|-------------|----------|--------------------------------|---------|--------|
| 1                    |                  | Glasamp.         |            |             |             |          |                                | -       |        |
| 0.1                  | n. a.#           | Spritze          | 23/2.5/23  | +           | n. a.       | 12 Wo.   | -                              | - 64 %  | [103]  |
| 1                    |                  | Glasamp.         |            |             |             |          |                                | -       |        |
| 0.1                  |                  | Spritze          |            |             |             |          |                                | -       |        |
| 0.1                  | n. a.            | Injektionslösung | 65         | n. a.       | n. a.       | 7 d      | -                              | - 57 %  | [102]  |
| 0.1                  |                  |                  |            |             |             | 12 Wo.   | -                              | - 76 %  |        |
| 1                    | H <sub>2</sub> O | Spritze          | 26         | +           | 3.17 - 3.23 | 12 Wo.   | -                              | -       | [105]  |
|                      | KRH#-Puffer      |                  | 22         | n. a.       | 1.96        | 90 min.  | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.04 %) | - 26 %  |        |
|                      |                  |                  |            |             | 5.81        |          | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.02 %) | - 10 %  |        |
|                      |                  |                  |            |             | 7.81        |          | -                              | - 46 %  |        |
| 5.6x10 <sup>-4</sup> | KRH-Puffer       | Wirkstoff        | 4          | n. a.       | 1.96        | 28 d     | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.04 %) | - 80 %  |        |
|                      |                  |                  |            |             | 5.81        | 2 d      | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.02 %) | - 100 % | [106]  |
|                      |                  |                  |            |             | 7.81        | 2 d      | -                              | - 100 % |        |
|                      | KRH-Puffer       |                  | - 60       | n. a.       | 1.96        | 28 d     | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.04 %) | -       |        |
|                      |                  |                  |            |             | 5.81        |          | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.02 %) | -       |        |
|                      |                  |                  |            |             | 7.81        |          | -                              | -       |        |

#: n.a.=nicht angegeben

##: KRH-Puffer=Krebs-Ringer-Hensleit-Puffer (enthält NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Glucose)

Besonders in Krankenhausapotheken ist es gängige Praxis, individuelle Adrenalin- und Noradrenalin-Injektionslösungen durch Verdünnen der entsprechenden Fertigarzneimittel herzu-



## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

stellen. Dies ist immer dann notwendig, wenn in besonderen Therapiesituationen speziell angepasste Konzentrationen der Arzneistoffe benötigt werden, die kommerziell nicht erhältlich sind (z. B. Kinder oder ältere Patienten). Die Injektionslösungen werden für gewöhnlich durch Verdünnen mit isotonischer Kochsalzlösung bzw. einer geeigneten Pufferlösung unter aseptischen Bedingungen hergestellt, direkt in Kunststoffspritzen (z. B. Perfusor®) abgefüllt und darin bis zur Anwendung aufbewahrt. Die Zubereitung erfolgt zwar in der Regel je nach Bedarf, allerdings kann die versorgende Apotheke die Rezepturen auch im Voraus herstellen, etwa wenn sie am Wochenende oder an Feiertagen benötigt werden [109]. Problematisch ist hierbei besonders, wenn die Lösungen später unkontrolliert nach Anbruch auf Station gelagert werden.

**Tabelle 5.2.1-2:** Ausgewählte Literaturdaten zur Stabilität Noradrenalin-haltiger Lösungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

| Konz. [mg/mL]        | Lösungs-medium           | in/aus            | Temp. [°C] | Licht-schutz | pH    | Zeit-raum | Zusätze                                       | Gehalt                         | Quelle |         |
|----------------------|--------------------------|-------------------|------------|--------------|-------|-----------|---|--------------------------------|--------|---------|
| 0.1                  |                          |                   | 5-8        |              |       | 26 / 36 d |   | -                              |        |         |
| 0.01                 | NaCl 0.9 %               | Injektions-lösung | 5-8        | n. a.#       | n. a. | 26 / 36 d | NaHSO <sub>3</sub>                            | -                              | [106]  |         |
| 0.1                  |                          |                   | -31        |              |       | 7 d       |   | 90-115 %                       |        |         |
| 0.01                 |                          |                   | -31        |              |       | 7 d       |   | 90-115 %                       |        |         |
| 0.004                | 5 % Glucose              | Ampulle           | 20         | n. a.        | n. a. | 168 h     | NaHSO <sub>3</sub> , NaCl, Zitronen-säure     | - 4.3 %                        | [107]  |         |
| 0.004                | Salzlösung               |                   |            |              |       |           |   | - 3.6 %                        |        |         |
| 0.016                | 5 % Glucose              |                   |            |              |       |           |   | + 4.5 %                        |        |         |
| 0.016                | Salzlösung               |                   |            |              |       |           |   | - 3.6 %                        |        |         |
| 0.004                | 0.9 % NaCl               | Ampulle           | 22         | n. a.        | n. a. | 4 h       | NaCl, NaHSO <sub>3</sub> , Metazin, Weinsäure | - 4 %                          | [104]  |         |
| 0.004                | 5.5 % Glucose            |                   |            |              |       |           |   | - 1 %                          |        |         |
| 0.0044               | 1.4 % NaHCO <sub>3</sub> |                   |            |              |       |           |   | - 4 %                          |        |         |
|                      | KRH-Puffer##             |                   | 22         | n. a.        | n. a. | 28 h      | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.04 %)                | -                              |        |         |
|                      |                          |                   |            |              |       |           |   | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.02 %) |        | -       |
|                      |                          |                   |            |              |       |           |   | -                              |        | - 34 %  |
|                      | KRH-Puffer               | Wirkstoff         | 4          | n. a.        | n. a. | 28 h      | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.04 %)                | - 50 %                         | [106]  |         |
| 5.6x10 <sup>-4</sup> |                          |                   |            |              |       |           |   | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.02 %) |        | - 100 % |
|                      |                          |                   |            |              |       |           |   | -                              |        | - 100 % |
|                      | KRH-Puffer               |                   | -60        | n. a.        | n. a. | 28 h      | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.04 %)                | -                              |        |         |
|                      |                          |                   |            |              |       |           |   | 1 M HClO <sub>4</sub> (0.02 %) |        | -       |
|                      |                          |                   |            |              |       |           |   | -                              |        | -       |

#: n.a.=nicht angegeben

##: KRH-Puffer=Krebs-Ringer-Hensleit-Puffer (enthält NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Glucose)

Es stellt sich die Frage, inwieweit hierdurch die Lagerfähigkeit und damit die pharmazeutische Qualität des ursprünglichen Fertigarzneimittels beeinflusst werden: Zwar sind vom Hersteller im

Rahmen der Zulassung des Arzneimittels umfangreiche Stabilitätsdaten ermittelt worden, diese sind jedoch nicht im Detail bekannt und zudem immer auf das unveränderte Originalprodukt bezogen. Die in den Tabellen 5.2.1-1 und 5.2.1-2 zusammengefassten Daten lassen vermuten, dass die Konzentration an Adrenalin bzw. Noradrenalin nicht maßgeblich für die Instabilität verantwortlich ist. Aus thermodynamischer Sicht müssten höher konzentrierte Lösungen eine größere Tendenz zum Wirkstoffabbau zeigen (statistisch erhöhte Wahrscheinlichkeit chemischer Interaktionen). Da allerdings das Verdünnen nicht nur zu einer Verringerung des ursprünglichen Wirkstoffgehaltes, sondern in gleichem Maße auch zu einer Konzentrationsabnahme der eingesetzten Hilfs- bzw. Konservierungsstoffe führt, bleibt unklar, in welchem Maße der Schutz des Arzneistoffes in Lösung dennoch gewährleistet ist.

### **5.2.2 Stabilisierungsmaßnahmen und Konservierungsstoffe**

Von Hamnett, Lundgren oder Morch wurden bereits in den 1960er und 70er Jahren die Möglichkeiten einer effizienten Haltbarkeitsverlängerung katecholaminhaltiger Zubereitungen berichtet, allerdings ist eine systematische Untersuchung des Zusatzes verschiedenartiger Konservierungsstoffe erst 1983 bei Wollmann und Raether zu finden [110-113]. Sie unterteilten die Substanzen in drei Gruppen: (i) Antioxidantien, wie beispielsweise Ascorbinsäure oder *N*-Acetylcystein; (ii) Chelatoren, wie z. B. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder ihrer Derivate; (iii) Inhibitoren der Verfärbung, z. B. Disulfite. Die Untersuchung der Effekte der einzelnen Stoffe bzw. ihrer Kombinationen ergab, dass Natriummetabisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) eine Schlüsselrolle in der Stabilisierung der Wirkstofflösungen einnimmt und, wenn es mit weiteren Antioxidantien kombiniert wird, eine signifikante Verlängerung der Haltbarkeit ermöglicht. Komplexbildner und Antioxidantien zeigten zwar ebenfalls einen geringen schützenden Effekt, waren allerdings nur in Kombination in der Lage, die Haltbarkeit signifikant zu erhöhen und förderten zudem die Verfärbung der untersuchten Lösungen (siehe Tabelle 5.2.2-1). Cox und Boer berichteten hierzu bereits 1975, dass EDTA nur bei niedrigen *pH*-Werten ( $<3.0$ ) protektiv wirksam ist und bei höheren Werten keinerlei Wirksamkeit zeigt [114]. Die Kombination dreier Stoffe aus jeder der Gruppen (*N*-Acetylcystein, Diethylentriaminpentaessigsäure und  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) war sogar in der Lage, bei einer Lagerungstemperatur von 40 °C die Haltbarkeit kommerzieller Zubereitungen um den Faktor 30 zu erhöhen. Obwohl gute Ergebnisse erzielt werden konnten, ist die Verwendung solcher Substanzen als Zusatz zu einem Arzneimittel dennoch nicht ohne weiteres möglich, denn Adrenalin und Noradrenalin werden ausschließlich parenteral appliziert, was die Auswahl an möglichen Hilfs- und Konservierungsstoffen stark einschränkt.

In Anwesenheit von Sulfitionen konnte ein zunächst paradox erscheinender Effekt beobachtet werden: Die benzyllische Hydroxylgruppe der Katecholamine kann nukleophil angegriffen und

durch eine Sulfonsäurefunktion substituiert werden (siehe auch Abbildung 5.2.1-1). Dies führt zu einem unmittelbaren physiologischen Wirkverlust des Moleküls, allerdings wird auch sein weiterer Abbau unterdrückt. Die Kinetik ist abhängig vom *pH*-Wert, bei *pH*>5 läuft die Reaktion vermutlich nach einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus ab, im stärker Säuren finden vermutlich S<sub>N</sub>1- und S<sub>N</sub>2-Reaktionen gleichzeitig statt [115]. Nichtsdestoweniger sind Sulfite heute in nahezu allen kommerziell erhältlichen Katecholaminzubereitungen enthalten, denn sie ermöglichen es auf elegante Weise, solche Lösungen langfristig zu stabilisieren und ihre Verwendbarkeit selbst nach Anbruch der Primärverpackung noch für eine gewisse Zeit zu gewährleisten.

**Tabelle 5.2.2-1:** Kombination verschiedener Konservierungsstoffe und Effekte auf die Haltbarkeit von Noradrenalin. Quelle: [113].

| Stoff 1                                       | Stoff 2            | Stoff 3                                       | Haltbarkeit (Braunglas, Raumtemp.) [Tage] | Haltbarkeit (Braunglas, 40 °C) [Tage] | Verfärbung |
|---|--------------------|---|---|---------------------------------------|------------|
| Ascorbinsäure                                 | DTPA <sup>#</sup>  | -   | 40  | 3                                     | +          |
| Ascorbinsäure                                 | 8-HQS <sup>#</sup> | -   | 35  | 3                                     | +          |
| Ascorbinsäure                                 | NAC <sup>#</sup>   | -   | 74  | 5.5                                   | +          |
| NAC   | DTPA               | -   | 85  | 4.5                                   | +          |
| NAC   | 8-HQS              | -   | 76  | 4                                     | +          |
| DTPA  | 8-HQS              | -   | 32  | 2                                     | +          |
| DTPA  | L-Cystein          | -   | 35  | 2                                     | +          |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | DTPA               | -   | >100                                      | 8                                     | -          |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 8-HQS              | -   | 90  | 7.5                                   | -          |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | Ascorbinsäure      | -   | 90  | 7                                     | +          |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | NAC                | -   | >100                                      | 10                                    | +          |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | L-Cystein          | -   | 19  | 1                                     | +          |
| Ascorbinsäure                                 | DTPA               | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | -   | 12                                    | +          |
| NAC   | DTPA               | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | -   | 20                                    | -          |

<sup>#</sup>: DTPA=Diethylentriaminpentaessigsäure; 8-HQS=8-Hydroxychinolinsulfat; NAC=*N*-Acetylcystein

In der Anästhesie werden Adrenalin und Noradrenalin häufig mit Lokalanästhetika kombiniert, denn sie können durch die verursachte Gefäßkontraktion und den damit verbundenen langsameren Blutabfluss ein längeres Verbleiben des Lokalanästhetikums am Wirkort ermöglichen. Grubstein und Milano untersuchten, inwiefern Adrenalin in Kombination mit Lidocainhydrochlorid zu einem vermehrten Abbau neigt. Hierzu bereiteten sie verschiedenste Lösungen zu, unter anderem unter Zusatz steigender Mengen Disulfit (0.005-0.025 %). Die Proben wurden mit 0.1 % Methylparaben konserviert und kurzzeitig bei 60 °C sowie längerfristig bei Raumtemperatur gelagert [116]. Der beste Schutz konnte bei einer Disulfitkonzentration von 0.025 % beobachtet werden, über- bzw. unterhalb dieses Levels fand ein deutlicher Abbau und zum Teil sogar eine Rosafärbung der Lösungen statt. Die Stabilität konnte zudem durch den Einsatz von EDTA signifikant verbessert werden, was durch die Komplexierung katalytisch

wirksamer Schwermetallionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) erklärt werden kann. Die Reaktion bzw. die gegenseitige Beeinflussung von Adrenalin und Lidocain durch den jeweils anderen Arzneistoff wurde nicht untersucht, allerdings wird bei Trissel empfohlen, frisch zubereitete und ungepufferte Lösungen, die Adrenalin in Kombination mit einem Lokalanästhetikum enthalten, unmittelbar zu verbrauchen [109].

Zusammengefasst beeinflussen folgende Parameter maßgeblich die Stabilität von Katecholaminen, besonders wenn sie in Lösung vorliegen:

1. Temperatur, wobei die Haltbarkeit unterhalb  $10\text{ °C}$  am höchsten ist;
2. Lichteinwirkung, hier hat UV-Licht den höchsten Einfluss auf den Abbau;
3. *pH*-Wert der Lösung, das Optimum liegt im Bereich 3-6;
4. Anwesenheit von Sauerstoff, die Aufbewahrung unter Intertgas (z. B. Stickstoff) ist zu bevorzugen;
5. Art und Menge der in der Formulierung verwendeten Konservierungsstoffe;
6. Lagerungsdauer, wobei stets die Faktoren 1-5 berücksichtigt werden müssen.

### **5.2.3 Flüssigchromatographische Methoden zur Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin**

Die ersten Arbeiten zur Stabilitätsanalytik der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin (Gehaltsbestimmung, Identifizierung von Abbauprodukten) stammen aus den 1960er und 1970er Jahren. Die Analyten wurden hier meist elektrochemisch oder fluorimetrisch erfasst [104, 117]. Obwohl ihre Instabilität, insbesondere in Lösung, bereits hinreichend bekannt war, konnten die Abbauprodukte zunächst nicht eindeutig identifiziert werden, denn man verfügte nicht über die geeigneten analytischen Methoden.

Die Abbaukinetik des Adrenalins nach Sulfid- bzw. Sauerstoffexposition war Ende der 1950er Jahre Gegenstand der Untersuchungen von Schroeter und Higuchi sowie von Sokoloski und Higuchi [118-120]. Sie konnten eine *pH*-Abhängigkeit der Reaktionen nachweisen, allerdings standen ihnen als instrumentelle Methoden lediglich die Bestimmung der optischen Drehung sowie der kolorimetrische Nachweis über ein Triacetyl-Derivat zur Verfügung. In den folgenden Jahren wurden immer selektivere und leistungsfähigere fluorimetrische, elektrochemische sowie flüssigchromatographische Verfahren publiziert [104, 121, 122]. Durch eine von Baran und Schwedt im Jahre 1993 beschriebene Methode konnte eine große Zahl an Abbauprodukten nebeneinander erfasst sowie identifiziert werden. Allerdings war hierfür die Kombination verschiedenster Detektoren (UV/Vis, ein elektrochemischer sowie ein Fluoreszenzdetektor)

notwendig, mit denen es gelang, acht verschiedene Analyten (u.A. Adrenochrome und Adrenochinone) zu erfassen [121]. Auch Tremblay *et al.* untersuchten die Stabilität verschiedener NE-Injektionslösungen mittels elektrochemischer Detektion [107]. Solche Methoden sind allerdings für die Routineanalytik weniger gut geeignet, da sie einen komplexen instrumentellen Aufbau und einen hohen Erfahrungsschatz des Analytikers erfordern. Zudem sind selbst moderne Analytiklabore oftmals nicht damit ausgestattet.

Das *Ph. Eur.* lässt den Noradrenalinegehalt durch eine wasserfreie Titration mit Perchlorsäure und die *Verwandten Substanzen* durch eine Ionenpaarchromatographie mit Gradientenelution unter Verwendung von Natriumheptansulfonat an einer monolithischen C<sub>18</sub>-Säule bestimmen [123]. In die USP wurden darüber hinaus zwei zusätzliche Fertigarzneimittelmonographien aufgenommen: „Epinephrine Injection“ und „Norepinephrine Bitartrate Injection“. Die Gehaltsbestimmung erfolgt hier ebenfalls mittels Ionenpaar-Flüssigchromatographie [124, 125]. Die Möglichkeit, die Ionenpaarbildner durch alternative Substanzen zu ersetzen, wurde für beide Stoffen eingehend durch Asmus *et al.* untersucht. Sie verwendeten anstatt eines Alkylsulfonates einfache organische und anorganische Säuren wie beispielsweise Salpeter-, Schwefel-, Trichloressig- oder Salzsäure. Mit den entwickelten Methoden konnten verschiedene Katecholamine aufgetrennt werden, allerdings wird die Analytik potentieller Abbauprodukte nicht beschrieben. Ein großer Nachteil war außerdem, dass die eingesetzten mobilen Phasen zu 100 % wässrig waren und bereits nach wenigen Probeninjektionen eine starke Säulenalterung und eine damit verbundene Verschlechterung der Trennleistung stattfand [126].

In der Mehrzahl der Untersuchungen zur Stabilität von Adrenalin und Noradrenalin konnten eine erhöhte Lagerungstemperatur sowie ein ungenügend eingestellter *pH*-Wert als Hauptgründe für die Instabilität der Verbindungen gefunden werden (siehe Tabellen 5.2.1-1 und 5.2.1-2). So ist beispielsweise bei Grunert und Wollmann der Einfluss von Licht (ultraviolett, Sonneneinstrahlung, normales Tageslicht, Kunstlicht) beschrieben, wobei erwartungsgemäß die energiereiche ultraviolette Strahlung zu den höchsten Abbauraten führte [127]. Palazzolo *et al.* führten umfangreiche Untersuchungen durch, bei denen Lösungen von Adrenalin und Noradrenalin Lösungen bei drei verschiedenen *pH*-Werten (1.96, 5.81, 7.81) sowie bei drei verschiedenen Temperaturen (-60, +4 und +22 °C) gelagert und anschließend der Abbau der Wirkstoffe untersucht wurde. Sie konnten zeigen, dass das Einfrieren der Lösungen trotz eines sauren oder basischen Milieus zu keiner signifikanten Erniedrigung der Wirkstoffgehalte führte. Erst bei höheren Temperaturen ließen sich deutliche Abnahmen (bis zu 100 % in 1.5 Stunden bei +22 °C) beobachten [106]. Der Abbau der Stoffe findet im *pH*-Bereich zwischen 3 und 4 (Adrenalin) bzw. zwischen 3.6 und 6 (Noradrenalin) im geringsten Ausmaß statt [109], sodass Lösungen der Arzneistoffe möglichst immer durch eine geeignete Maßnahme wie etwa

Pufferung, der Zugabe von Konservierungsmitteln oder durch Lagerung in lichtundurchlässigen Gefäßen, geschützt werden sollten.

#### 5.2.4 HPLC-Methodenentwicklung und Quantifizierung von Noradrenalin

Das Ziel der Methodenentwicklung bestand darin, eine zur schnellen Bestimmung von Noradrenalin geeignete flüssigchromatographische Methode zu finden, mit der die Gehaltsbestimmung der später unterschiedlich gelagerten Probelösungen möglich ist.

Ausgehend von der im *Ph. Eur.* beschriebenen Methode zur Bestimmung der *Verwandten Substanzen* von Noradrenalin wurde das dort eingesetzte Ionenpaarreagenz Natriumheptansulfonat durch Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie das organische Lösungsmittel Acetonitril durch Methanol ersetzt. Zudem wurde eine isokratische Elution gewählt, um die Methode möglichst einfach zu gestalten. Die beschriebene Methode ist hauptsächlich zur Erfassung von Ausgangs- bzw. Nebenprodukten der Synthese vorgesehen, welche allerdings zur Durchführung der Stabilitätsanalytik nicht unbedingt relevant sind, wie beispielsweise die Verbindungen Adrenalin oder der Methylether des Noradrenalin (4-[(1*R*)-2-Amino-1-methoxyethyl]benzol-1,2-diol) [123].

Die Etablierung der Auftrennung aller untersuchten Substanzen erfolgte auf Säule A. Anhand der Injektion unverdünnter Arterenol®-Lösung wurde nach einer optimalen Zusammensetzung der mobilen Phase gesucht, mit der es gleichzeitig möglich war, einen internen Standard abzutrennen und zu quantifizieren. Hierfür wurden die strukturell verwandten Arzneistoffe Phenylephrin, Lidocainhydrochlorid sowie Isoprenalinsulfat ausgewählt, die ebenfalls zur Gruppe der Phenylalkylamine gehören und ähnliche physikochemische Eigenschaften besitzen (vgl. Abbildung 5.2.4-1). Lidocain war unter allen untersuchten chromatographischen Bedingungen überhaupt nicht detektierbar (kein Signal), Phenylephrin zeigte hingegen stets ein ausgeprägtes Peak-tailing. Isoprenalin konnte letztendlich gut von Noradrenalin abgetrennt werden, sodass es als interner Standard ausgewählt wurde.

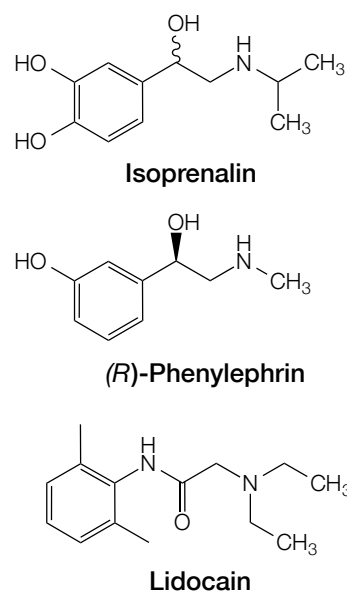


Abbildung 5.2.4-1: Interne Standards.

Die Auftrennung der beiden Analyte konnte durch die Erhöhung des Methanolanteiles der mobilen Phase verbessert werden, denn bis zu einem Anteil von etwa 25 % besaßen beide Substanzen relativ hohe Retentionszeiten (Isoprenalin:  $R_t > 20$  min.) und es war ein ausgesprochen starkes Peak-tailing zu beobachten. Bei einem Methanolanteil von 30 % konnte sowohl die beste Auftrennung als auch die beste Peakform gefunden werden. Beide Analyten

wurden mit einer genügend hohen Auflösung ( $R_s=5.1$ ) getrennt (vgl. Abbildung 5.2.4-2). Die Erhöhung des Methanolanteiles über 30 % hinaus führte allerdings zur Co-Elution beider Substanzen, sodass keine Auftrennung mehr erreicht werden konnte.

Bedingt durch den starken hydrophilen Charakter der Verbindungen konnte auf den Zusatz von Ionenpaarbildnern allerdings letztendlich nicht verzichtet werden. Ohne ein entsprechendes Tensid ließ sich keine Retention auf den verwendeten RP-18-Phasen erreichen, sodass sie stets zusammen mit dem Injektionspeak eluierten.

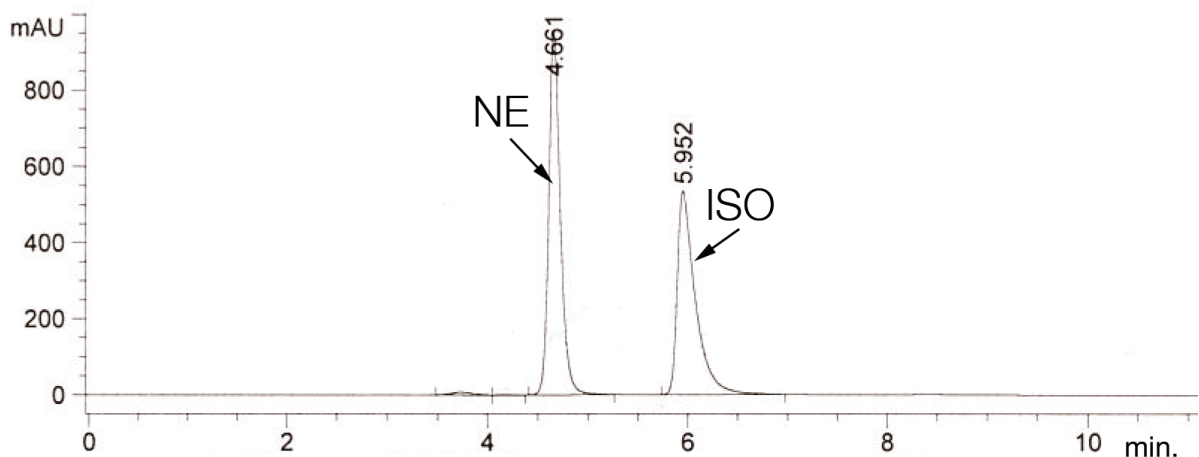


Abbildung 5.2.4-2: Chromatogramm einer Lösung von Noradrenalin (NE) und Isoprenalin (ISO) unter optimierten Bedingungen.

### 5.2.5 Methodenvalidierung

#### Linearität

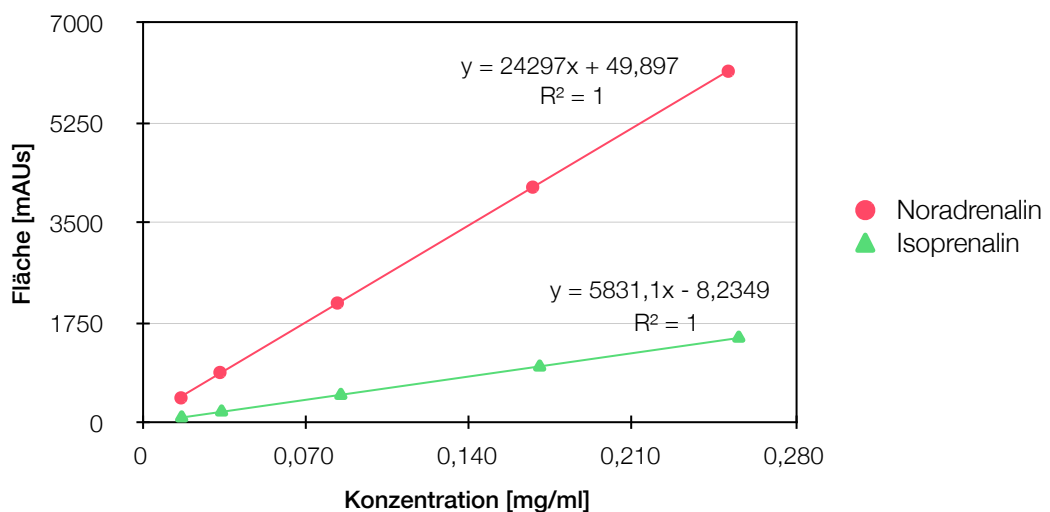


Abbildung 5.2.5-1: Bestimmung der Linearität von Noradrenalin und Isoprenalin.

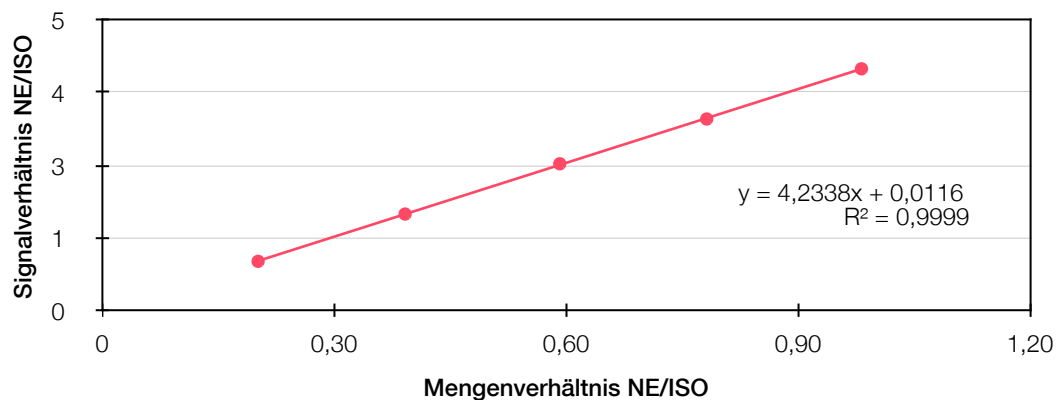
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Bestimmung der Linearität erfolgte im Konzentrationsbereich 0.0168-0.2513 mg/ml (Noradrenalin) bzw. 0.0171-0.2558 mg/ml (Isoprenalin) durch Dreifachinjektion der jeweiligen Kalibrierlösung. Anschließend wurde eine lineare Regression der Konzentration über die gemittelten Peakflächen durchgeführt, wobei für Noradrenalin und Isoprenalin ein Korrelationskoeffizient von jeweils >0.999 gefunden wurde (siehe Abbildung 5.2.5-1). In beiden Fällen konnte somit ein direkt proportionaler Zusammenhang gezeigt werden.

**Tabelle 5.2.5-1:** Linearitätsmessung von Noradrenalin und Isoprenalin.

| Noradrenalin |           |                 |            | Isoprenalin |           |                 |            |
|--------------|-----------|-----------------|------------|-------------|-----------|-----------------|------------|
| c[mg/ml]     | Injektion | Fläche NE [mAU] | Mittelwert | c[mg/ml]    | Injektion | Fläche NE [mAU] | Mittelwert |
| 0.2513       | 1         | 435.90          | 435.63     | 0.2558      | 1         | 91.53           | 91.46      |
|              | 2         | 435.36          |            |             | 2         | 91.53           |            |
|              | 3         | 435.63          |            |             | 3         | 91.33           |            |
| 0.1675       | 1         | 881.40          | 880.16     | 0.1705      | 1         | 195.56          | 195.37     |
|              | 2         | 879.85          |            |             | 2         | 195.39          |            |
|              | 3         | 879.23          |            |             | 3         | 195.17          |            |
| 0.0838       | 1         | 2094.84         | 2094.93    | 0.0853      | 1         | 485.54          | 485.93     |
|              | 2         | 2094.47         |            |             | 2         | 485.19          |            |
|              | 3         | 2095.47         |            |             | 3         | 487.05          |            |
| 0.0335       | 1         | 4120.32         | 4122.17    | 0.0342      | 1         | 980.92          | 981.64     |
|              | 2         | 4123.23         |            |             | 2         | 981.41          |            |
|              | 3         | 4122.95         |            |             | 3         | 982.58          |            |
| 0.0168       | 1         | 6152.63         | 6150.37    | 0.0171      | 1         | 1486.07         | 1486.78    |
|              | 2         | 6150.82         |            |             | 2         | 1489.47         |            |
|              | 3         | 6147.64         |            |             | 3         | 1484.80         |            |

### Kalibrierung des internen Standards Isoprenalin



**Abbildung 5.2.5-2:** Kalibrierung des internen Standards Isoprenalin.



## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Kalibrierlösungen wurden je drei mal injiziert und eine lineare Regression der Mengen- über die Signalverhältnisse durchgeführt. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von 0.999 gefunden (vgl. Abbildung 5.2.5-2 sowie Tabelle 5.2.5-2).

**Tabelle 5.2.5-2:** Bestimmung von Mengen- und Signalverhältnis des internen Standards Isoprenalin.

| Konzentrationsverhältnis (NE/ISO) | Injektion | Fläche NE [mAU] | Fläche ISO [mAU] | Mittelwert NE [mAU] | Mittelwert ISO [mAU] | Signalverhältnis (NE/ISO) |
|-----------------------------------|-----------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|---------------------------|
| <b>0.20</b>                       | 1         | 2303.33         | 2705.14          | 2304.91             | 2707.41              | <b>0.85</b>               |
|                                   | 2         | 2303.55         | 2707.57          |                     |                      |                           |
|                                   | 3         | 2307.84         | 2709.53          |                     |                      |                           |
| <b>0.39</b>                       | 1         | 4117.70         | 2474.83          | 4116.57             | 2473.41              | <b>1.66</b>               |
|                                   | 2         | 4115.72         | 2472.83          |                     |                      |                           |
|                                   | 3         | 4116.28         | 2472.56          |                     |                      |                           |
| <b>0.59</b>                       | 1         | 5768.38         | 2278.54          | 5763.83             | 2279.27              | <b>2.53</b>               |
|                                   | 2         | 5761.75         | 2280.14          |                     |                      |                           |
|                                   | 3         | 5761.35         | 2279.14          |                     |                      |                           |
| <b>0.78</b>                       | 1         | 6993.00         | 2119.80          | 6992.94             | 2119.76              | <b>3.30</b>               |
|                                   | 2         | 6992.52         | 2118.13          |                     |                      |                           |
|                                   | 3         | 6993.30         | 2121.34          |                     |                      |                           |
| <b>0.98</b>                       | 1         | 8178.12         | 1966.65          | 8183.45             | 1966.32              | <b>4.16</b>               |
|                                   | 2         | 8184.33         | 1966.03          |                     |                      |                           |
|                                   | 3         | 8187.90         | 1966.28          |                     |                      |                           |

### Wiederholpräzision

**Tabelle 5.2.5-3:** Bestimmung der Wiederholpräzision für Noradrenalin.

| Injektion                          | Retentionszeit NE [min] | Peakfläche NE [mAU] |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| 1                                  | 4.64                    | 12803.40            |
| 2                                  | 4.64                    | 12794.10            |
| 3                                  | 4.64                    | 12792.60            |
| 4                                  | 4.64                    | 12783.60            |
| 5                                  | 4.64                    | 12772.60            |
| 6                                  | 4.64                    | 12777.90            |
| 7                                  | 4.64                    | 12785.20            |
| 8                                  | 4.64                    | 12783.00            |
| 9                                  | 4.64                    | 12775.20            |
| 10                                 | 4.64                    | 12788.10            |
| <b>Mittelwert</b>                  | <b>4.64</b>             | <b>12785.57</b>     |
| <b>Standardabweichung</b>          | <b>1.52</b>             | <b>9.38</b>         |
| <b>rel. Standardabweichung [%]</b> | <b>0.03</b>             | <b>0.07</b>         |

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurde die Arterenol®-Testlösung 1 zehnfach injiziert. Es wurde eine relative Standardabweichung von 0.03 % (Retentionszeiten) sowie von 0.07 % (Peakflächen) gefunden, was eine sehr gute Wiederholbarkeit anzeigt (siehe Tabelle 5.2.5-3).

### 5.2.6 Stabilität 0.1 %iger Noradrenalin-Lösungen

Die unterschiedlich gelagerten Arterenol-Testlösungen wurden nach 24, 48, 72, 144 und 192 h vermessen und jeweils der Gehalt an Noradrenalin bestimmt. Die Auswertung wurde zum einen über den internen Standard Isoprenalin (Testlösungen 1-3), zum anderen über den externen Standard Noradrenalin (Testlösungen 4-6) durchgeführt. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in Abbildung 5.2.6-1 sowie in Tabelle 5.2.6-1 dargestellt.

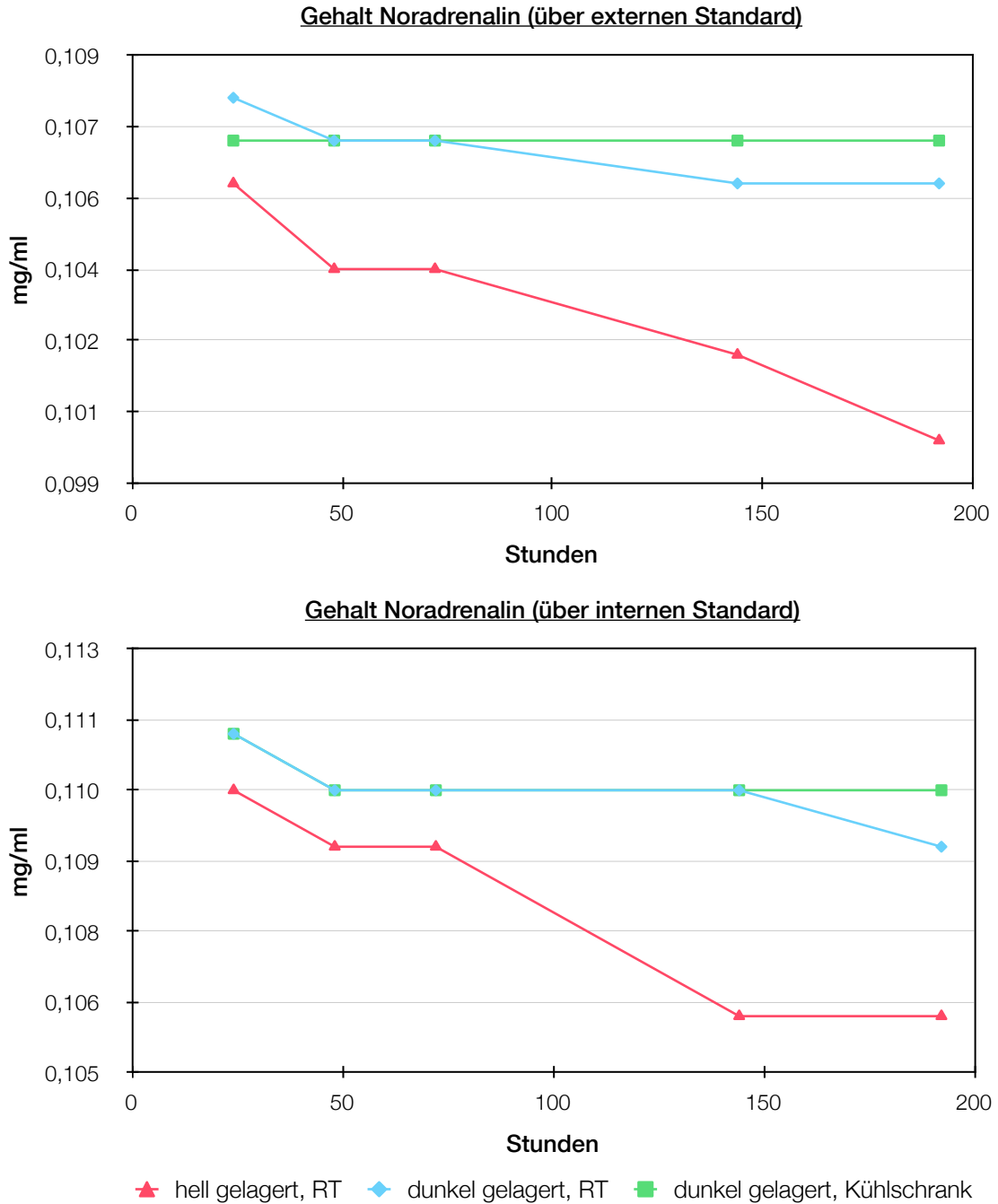
Es ist ersichtlich, dass über den gesamten Messzeitraum (8 Tage) keine signifikante Abnahme des Gehaltes an Noradrenalin festzustellen war. Die stärkste Abnahme war erwartungsgemäß bei der Lagerung ohne Lichtschutz bei Raumtemperatur zu beobachten. Trotz direkter Sonneneinstrahlung fielen die Gehalte nicht unterhalb den nominalen Gehalt von 0.1 mg/ml.

**Tabelle 5.2.6-1:** Auswertung der Stabilitätsprüfungen mittels externem und internem Standard.

| <b>Auswertung über externen Standard</b> |  |  |  |
|--|--|--|--|
| <b>Lagerungsdauer [h]</b>                | <b>Bei Tageslicht gelagert, Raumtemperatur [mg/ml]</b> | <b>Dunkel gelagert, Raumtemperatur [mg/ml]</b> | <b>Im Kühlschrank gelagert, Raumtemperatur [mg/ml]</b> |
| 24                                       | 0.106  | 0.108  | 0.107  |
| 48                                       | 0.104  | 0.107  | 0.107  |
| 72                                       | 0.104  | 0.107  | 0.107  |
| 144                                      | 0.102  | 0.106  | 0.107  |
| 192                                      | 0.100  | 0.106  | 0.107  |
| <b>Auswertung über internen Standard</b> |  |  |  |
| <b>Lagerungsdauer [Stunden]</b>          | <b>Bei Tageslicht gelagert, Raumtemperatur [mg/ml]</b> | <b>Dunkel gelagert, Raumtemperatur [mg/ml]</b> | <b>Im Kühlschrank gelagert, Raumtemperatur [mg/ml]</b> |
| 24                                       | 0.110  | 0.111  | 0.111  |
| 48                                       | 0.109  | 0.110  | 0.110  |
| 72                                       | 0.109  | 0.110  | 0.110  |
| 144                                      | 0.106  | 0.110  | 0.110  |
| 192                                      | 0.106  | 0.109  | 0.110  |

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Auswertungen mittels externem und internem Standard zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, allerdings lagen die mit Hilfe des internen Standards ermittelten Gehalte stets geringfügig über den Werten, die anhand der externen Kalibrierung berechnet wurden.



**Abbildung 5.2.6-1:** Verlauf des Noradrenalengehaltes und Auswertung mittels externem und internem Standard.

## 5.3 Amodiaquin

### 5.3.1 Syntheseweg und Pharmakologie

Nach Burckhalter *et al.* können in Position 4 substituierte Chinolinderivate, so auch Amodiaquin (4-[(7-Chlorchinolin-4-yl)amino]-2-[(diethylamino)methyl]phenol), in zwei Schritten gewonnen werden [128, 129]. Zunächst wird 4-Aminophenol (AQ-VU B) in wässriger Lösung mit 4,7-Dichlorchinolin (AQ-VU A) gekoppelt, wobei das Zwischenprodukt 4-[(7-Chlorchinolin-4-yl)amino]phenol (AQ-VU C) entsteht. Durch eine Mannich-Kondensation mit Formaldehyd und Diethylamin entsteht hieraus schließlich Amodiaquin (siehe Abbildung 5.3.1-1).

Amodiaquin kann, bedingt durch seine Säure-Base-Eigenschaften, im sauren Milieu der Nahrungsvakuole akkumulieren. Es liegt dort in geladener Form vor und kann sie aufgrund der fehlenden Membrangängigkeit nicht wieder verlassen.

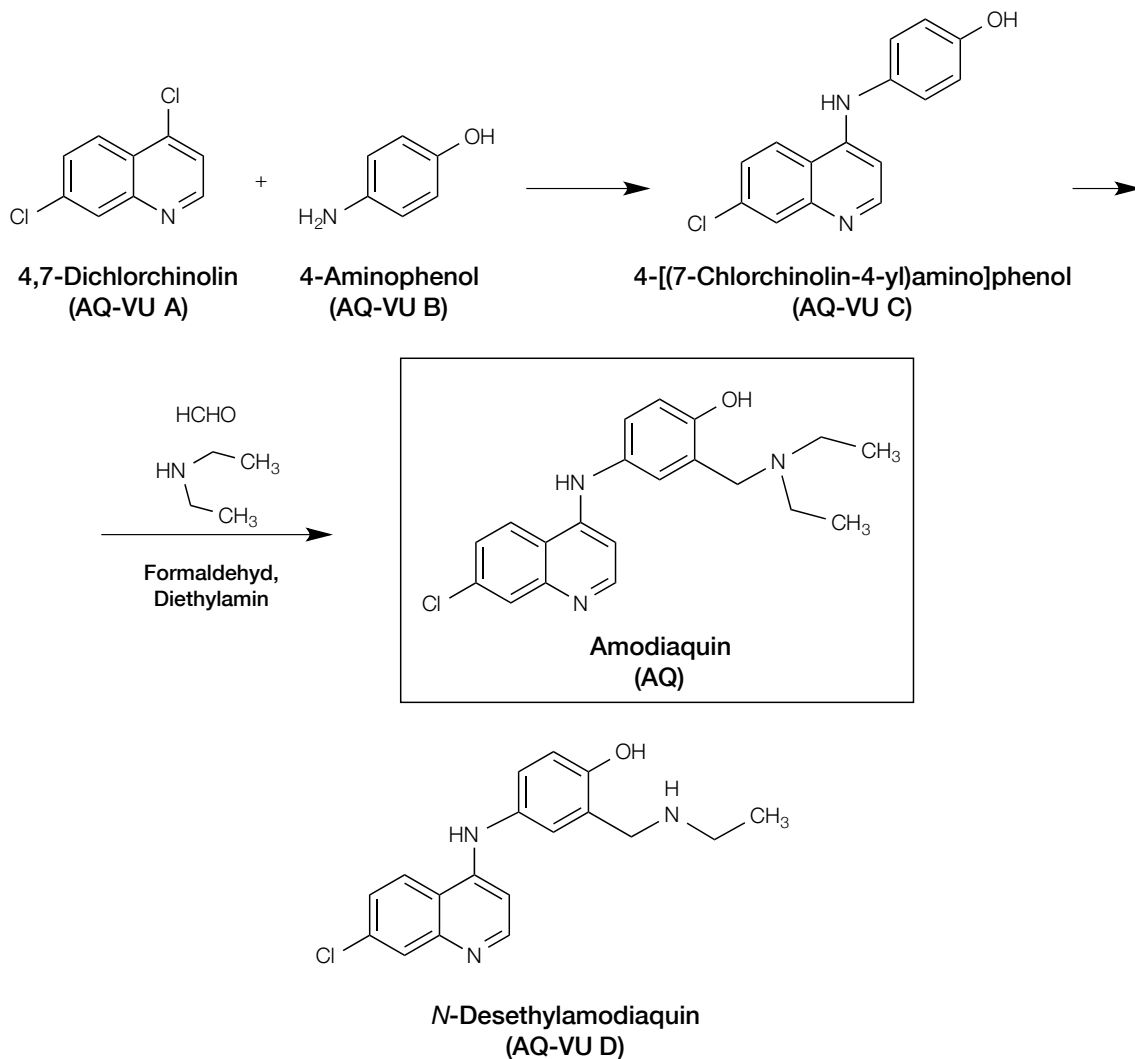


Abbildung 5.3.1-1: Syntheseweg für Amodiaquin sowie Struktur des *N*-Monoethylderivates.

4-Aminochinolone bilden mit dem FPIX stabile Komplexe aus, wodurch letztendlich die Kristallisation zum Hämозoin verhindert wird und es zu einer Vergiftung der Erreger kommt. Die genauen Zusammenhänge dieser Mechanismen sind jedoch bisher noch nicht gut verstanden [130]. Resistenzen gegenüber den Arzneistoffen entstehen insbesondere durch genetische Mutationen, z. B. durch die Exprimierung membranständiger Effluxproteine. Sind die Erreger bereits resistent gegenüber einem Arzneistoff der Gruppe, so ist dies mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch für alle anderen Vertreter zu erwarten.

### 5.3.2 Methodenentwicklung und -optimierung

Amodiaquin ist nur in der USP und im Internationalen Arzneibuch beschrieben, eine Monographie der *Ph. Eur.* fehlt dagegen. Die Gehaltsbestimmung erfolgt in der *Ph. Int.* mittels UV-Spektroskopie (Amodiaquin-Base) bzw. gravimetrisch (Amodiaquinhydrochlorid). In beiden Arzneibüchern sind keine spezifischen Verunreinigungen angeführt, allerdings wird mittels DC auf *Verwandte Substanzen* geprüft [131, 132]. Es ist keine flüssigchromatographische Methode angegeben.

Im Gegensatz hierzu lässt die USP den Gehalt an Amodiaquinhydrochlorid an einer RP-18-Phase bestimmen, als mobile Phase wird ein Phosphatpuffer-Methanol-Gemisch mit Zusatz von Perchlorsäure eingesetzt. Es wird eine definierte Messtemperatur (25 °C) sowie ein *pH*-Wert von 2.5 vorgeschrieben. Die Methode ist lediglich für die quantitative Bestimmung des Arzneistoffes vorgesehen [131].

In der Literatur sind analoge flüssigchromatographische Methoden zu finden, mit denen entweder Amodiaquin in Bulkware oder als Wirkstoff in Fertigarzneimitteln bestimmt wurde. So konnten beispielweise Dongre *et al.* verschiedene Verunreinigungen durch die Kombination von RP-HPLC (Gradientenelution, mobile Phase bestehend aus einem Phosphatpuffer, Triethylamin sowie Acetonitril) und Massenspektrometrie abtrennen und quantifizieren [133]. Minzi *et al.* setzten dagegen eine isokratische Elution ein (mobile Phase: Phosphatpuffer *pH* 3.0 unter Zusatz von Perchlorsäure und Methanol) und konnten hiermit Amodiaquin und Chloroquin sowie deren Metabolite auftrennen [134]. Bell *et al.* arbeiteten ebenfalls mit RP-Kieselgel, verwendeten jedoch als mobile Phase ein Gemisch aus Wasser, Methanol und Triethylamin bei *pH* 2.2 [135]. Weitere Untersuchungen, in denen die Qualität kommerziell erhältlicher Antimalaria-Medikamente, darunter auch Amodiaquin, untersucht wurde, orientieren sich vornehmlich an der Vorschrift der USP, beispielsweise von Tremblay *et al.* oder Kaur *et al.* [80, 135].

Ausgehend von diesen Arbeiten konnte eine Methode gefunden werden, mit der die Auftrennung von Amodiaquin sowie den Verunreinigungen A-D auf Säule D möglich ist. Die Parameter der optimierten Methode sind in Tabelle 5.3.2-1 zusammengefasst.

**Tabelle 5.3.2-1:** Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Amodiaquin.

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Säule:</b>             | Säule D  |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 27.5 % (V/V) einer 0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Pufferlösung, <i>pH</i> =8.0; 72.5 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min   |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl  |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur, unkontrolliert   |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=230 nm   |

Unter Verwendung der in den angeführten Literaturmethoden sowie der in den Arzneibüchern angegebenen chromatographischen Parameter wurde zunächst versucht, Amodiaquin und die vier Verunreinigungen A-D auf Säule A mit einer sauren mobilen Phase aufzutrennen (0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *pH*=2.5). Es wurde eine Flussrate von 1.0 ml/min sowie eine Detektionswellenlänge von λ=230 nm eingestellt, bei der alle Analyten eine gute Absorption zeigten. Hierbei wurde allerdings schnell deutlich, dass der Verzicht auf den in allen diesen Protokollen verwendeten Ionenpaarbildner Perchlorsäure dazu führte, dass nahezu keine Auftrennung der Analyten zu beobachten war. Weder durch die Veränderung des Methanol-Anteiles (70-80 % (V/V)) noch der Variation des *pH*-Wertes (2.0-3.5) konnte eine Auftrennung erreicht werden und alle Analyten eluierten zum Teil zusammen bereits nach etwa fünf Minuten (Chromatogramme nicht gezeigt). Erst durch Erhöhung des *pH*-Wertes um fünf Einheiten auf *pH*=8.0 konnte bei einem Methanolanteil von 80 % (V/V) auf Säule A allerdings die Auftrennung von Amodiaquin und den Verunreinigungen B, C und D erreicht werden; Verunreinigung A fiel jedoch mit dem Signal von Amodiaquin zusammen (siehe Abbildung 9.4.1-1). Im Zuge dieser Versuche zeigte sich, dass durch eine Erhöhung (0.06, 0.07 mol/l) der Salzkonzentration der verwendeten Pufferlösung die Auftrennung nicht positiv beeinflusst werden konnte und dass eine Erniedrigung (0.04, 0.03 mol/l) zu ausgeprägtem Tailing besonders bei Amodiaquin und den Verunreinigungen A und B führte. Für die nachfolgenden Experimente wurde somit eine Salzkonzentration von 0.05 mol/l festgelegt.

Durch eine schrittweise Erniedrigung des Methanolanteiles der mobilen Phase (77.5, 75.0, 72.5 % (V/V)) konnte schließlich eine gute Auftrennung der Analyten erreicht werden, allerdings waren nach dieser Veränderung die Analyten Amodiaquin und Verunreinigung B nicht aufgetrennt (siehe Abbildung 9.4.1-2). Dieses Problem konnte bei allen verwendeten Methanolanteilen nicht gelöst werden (siehe Abbildung 9.4.1-3).

Der Wechsel von Säule A zu Säule D unter Verwendung der Pufferlösung, die sich bisher als am geeignetsten gezeigt hatte (0.05 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, *pH*=8.0), ermöglichte die Auftrennung aller fünf Analyten innerhalb einer kurzen Analysenzeit von zehn Minuten. Die Variation des Methanolanteiles zeigte, dass sowohl Auftrennung als auch Peaksymmetrien bei einem Wert von 72.5 %

(V/V) am besten waren, sodass diese Parameter für die optimierte Methode gewählt wurden (siehe Abbildung 9.4.1-4). Höhere Anteile an organischem Lösungsmittel verschlechterten die Auflösungen deutlich und die Signale waren nicht mehr oder nur unvollständig getrennt (siehe Abbildungen 9.4.1-5 und 9.4.1-6).

Der Austausch des Puffersalzes Kaliumdihydrogenphosphat durch Natriumhydrogenphosphat war ebenso möglich, ohne dass die Auftrennung bzw. die Selektivität verändert wurde. Allerdings sollte die als optimal ermittelte Molarität der Lösung (0.05 mol/l) beibehalten werden. Ein Chromatogramm, das unter den optimierten Bedingungen aufgenommen wurde, ist in Abbildung 5.3.2-1 gezeigt. Bei seiner Betrachtung fällt auf, dass die Signalintensität der Verunreinigung D im Verhältnis sehr klein ist: Die Verbindung war kommerziell nur hochpreisig als fertige Lösung (1 mg/ml) erhältlich (Amodiaquin-Verunreinigung D-Stammlösung). Daher wurden jeweils nur geringe Mengen dieses Analyten zur Testlösung für die Optimierung der Auftrennung hinzugegeben, sodass seine Konzentration bei 0.02 mg/ml lag (übrige Verunreinigungen: 0.2 mg/ml). Sie war jedoch deutlich überhalb des Grenzwertes von 0.1 % (entsprechend 0.001 mg/ml) zur Bestimmung von Verunreinigungen.

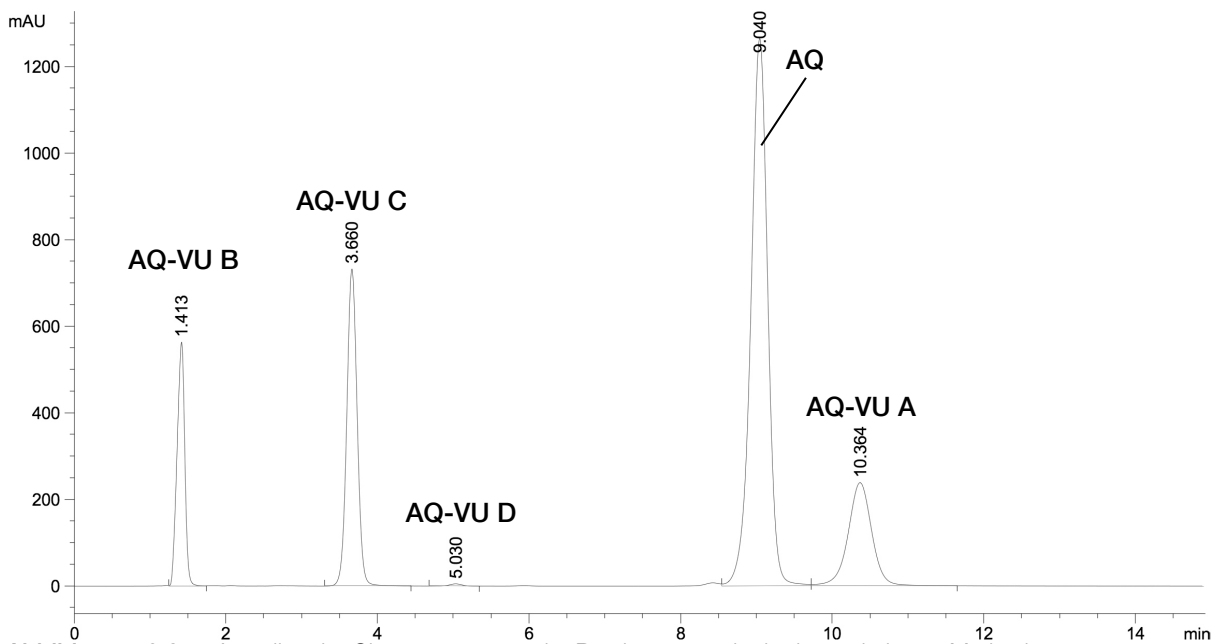


Abbildung 5.3.2-1: Amodiaquin: Chromatogramm der Bestimmung mittels der optimierten Methode.

### 5.3.3 Methodenvalidierung

#### Linearität

Die jeweiligen Kalibrierlösungen wurden vermessen und eine lineare Regression der Peakflächen über die Konzentration durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte im Konzentrationsbereich 1.0-1000.0 µg/ml (Amodiaquin) sowie 0.5-3.0 µg/ml (Verunreinigungen A-D). Die jeweiligen Regressionen sind in Abbildung 5.3.3-1 dargestellt.

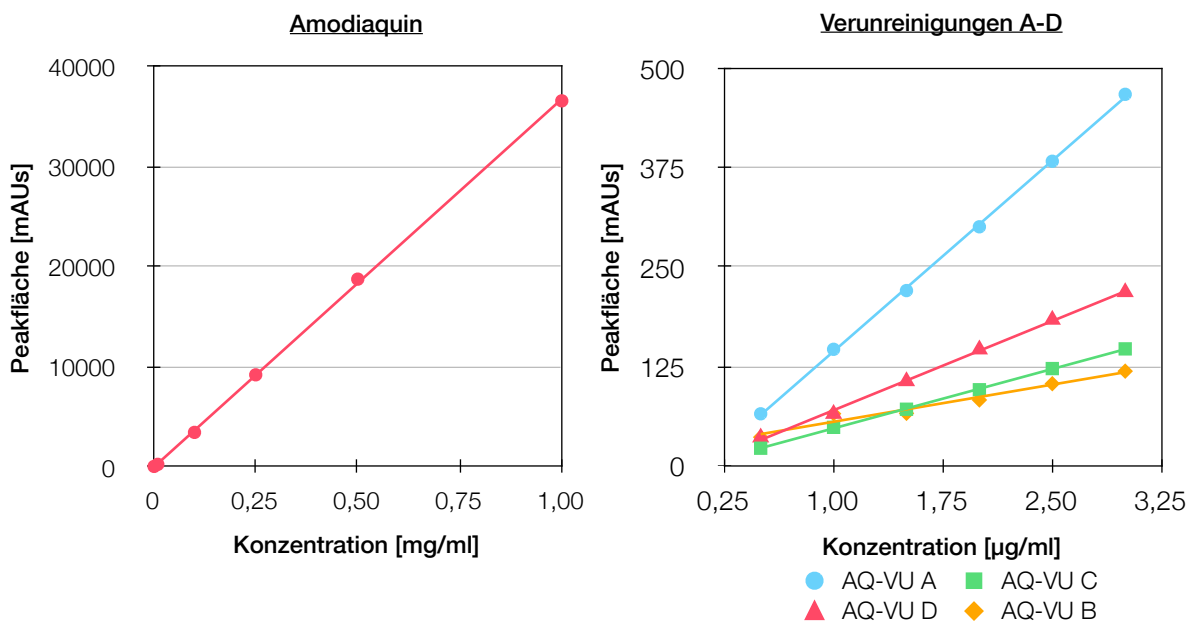


Abbildung 5.3.3-1: Regressionsplots für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.

Tabelle 5.3.3-1: Daten der Linearitätsbestimmung für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.

| Konz. [µg/ml] | AQ                | AQ-VU A | AQ-VU B | AQ-VU C | AQ-VU D |
|---------------|-------------------|---------|---------|---------|---------|
|               | Peakflächen [mAU] |         |         |         |         |
| 0.5           | -                 | 65.28   | 35.90   | 22.00   | 35.50   |
| 1.0           | -                 | 146.43  | 65.42   | 48.27   | 65.21   |
| 1.5           | -                 | 220.31  | 65.89   | 71.04   | 106.32  |
| 2.0           | -                 | 300.55  | 82.70   | 95.54   | 146.25  |
| 2.5           | -                 | 382.99  | 103.18  | 122.19  | 183.62  |
| 3.0           | -                 | 467.55  | 118.94  | 146.97  | 218.36  |
| 1.0           | 75.46             | -       | -       | -       | -       |
| 10.0          | 283.86            | -       | -       | -       | -       |
| 100.0         | 3476.78           | -       | -       | -       | -       |
| 250.0         | 9231.77           | -       | -       | -       | -       |
| 500.0         | 18796.20          | -       | -       | -       | -       |
| 1000.0        | 36621.50          | -       | -       | -       | -       |



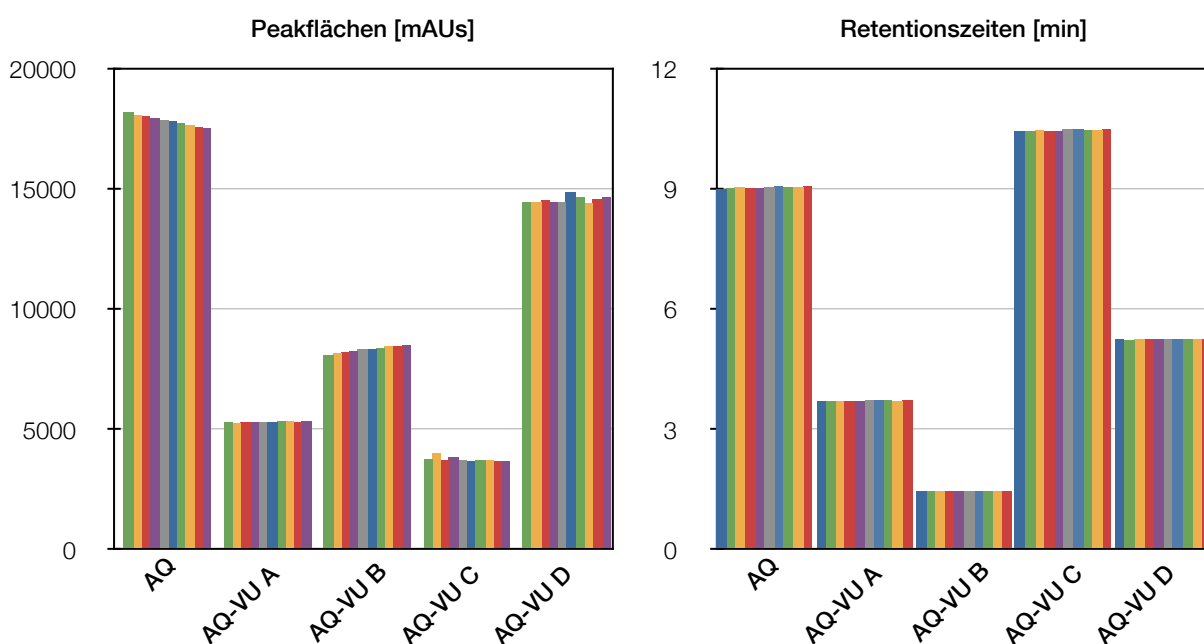
**Tabelle 5.3.3-2:** Regressionsdaten für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.

| Analyt     | Bereich [µg/ml] | Regressionsgleichung  | R <sup>2</sup> | LOD [µg/ml] | LOQ [µg/ml] |
|------------|-----------------|-----------------------|----------------|-------------|-------------|
| Amodiaquin | 1.0-1000.0      | $y = 36808x - 2.44$   | 0.9997         | -           | -           |
| AQ-VU A    | 0.5-3.0         | $y = 159.97x - 16.16$ | 0.9996         | 0.1         | 0.2         |
| AQ-VU B    | 0.5-3.0         | $y = 31.16x + 24.14$  | 0.9639         | 0.7         | 2.0         |
| AQ-VU C    | 0.5-3.0         | $y = 74.83x - 5.07$   | 0.9996         | 0.1         | 0.2         |
| AQ-VU D    | 0.5-3.0         | $y = 49.78x - 2.78$   | 0.9985         | 0.1         | 0.4         |

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden für die Verunreinigungen A-D aus der jeweiligen Regressionsgeraden ermittelt; die Regressionskoeffizienten lagen, mit Ausnahme der Verunreinigungen B und D, bei einem Wert von jeweils  $R^2 > 0.999$  (siehe Tabelle 5.3.3-2). Die gefundenen Werte für die Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 0.01 und 0.2 %, sodass die entsprechenden Berichtsgrenzen des *Ph. Eur.* erfüllt werden [79].

### Wiederholpräzision

Die Amodiaquin-Testlösung wurde zehn Mal injiziert. Die relativen Standardabweichungen lagen im Bereich 0.145-0.308 % (Retentionszeiten) bzw. 0.33-2.66 % (Peakflächen; siehe Tabelle 5.3.3.-3 und Abbildung 5.3.3.-2). Außer im Fall der Peakflächen der Verunreinigung B lagen die ermittelten Werte deutlich unterhalb von 2 % und zeigen somit eine sehr gute Wiederholbarkeit an [136, 137].



**Abbildung 5.3.3-2:** Amodiaquin: Wiederholpräzision.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 5.3.3-3:** Wiederholpräzision für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.

|                           | <b>AQ</b>                     | <b>AQ-VU A</b> | <b>AQ-VU B</b> | <b>AQ-VU C</b> | <b>AQ-VU D</b>  |
|---------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| <b>Injektion</b>          | <b>Retentionszeiten [min]</b> |                |                |                |                 |
| <b>1</b>                  | 1.436                         | 3.684          | 8.998          | 10.436         | 5.246           |
| <b>2</b>                  | 1.436                         | 3.692          | 9.011          | 10.443         | 5.231           |
| <b>3</b>                  | 1.438                         | 3.703          | 9.032          | 10.47          | 5.252           |
| <b>4</b>                  | 1.436                         | 3.741          | 9.025          | 10.451         | 5.253           |
| <b>5</b>                  | 1.438                         | 3.713          | 9.029          | 10.455         | 5.255           |
| <b>6</b>                  | 1.441                         | 3.715          | 9.052          | 10.488         | 5.255           |
| <b>7</b>                  | 1.442                         | 3.722          | 9.056          | 10.492         | 5.243           |
| <b>8</b>                  | 1.437                         | 3.711          | 9.043          | 10.474         | 5.241           |
| <b>9</b>                  | 1.437                         | 3.705          | 9.035          | 10.463         | 5.249           |
| <b>10</b>                 | 1.438                         | 3.714          | 9.058          | 10.494         | 5.243           |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>1.438</b>                  | <b>3.705</b>   | <b>9.034</b>   | <b>10.467</b>  | <b>5.247</b>    |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>0.002</b>                  | <b>0.011</b>   | <b>0.019</b>   | <b>0.021</b>   | <b>0.008</b>    |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b> | <b>0.145</b>                  | <b>0.308</b>   | <b>0.215</b>   | <b>0.196</b>   | <b>0.145</b>    |
| <b>Injektion</b>          | <b>Peakflächen [mAUs]</b>     |                |                |                |                 |
|                           | <b>AQ</b>                     | <b>AQ-VU A</b> | <b>AQ-VU B</b> | <b>AQ-VU C</b> | <b>AQ-VU D</b>  |
| <b>1</b>                  | 18182.9                       | 8094.71        | 3730.03        | 5264.39        | 14451.12        |
| <b>2</b>                  | 18083.7                       | 8136.54        | 3979.95        | 5258.88        | 14452.52        |
| <b>3</b>                  | 18028.9                       | 8207.17        | 3719.20        | 5288.51        | 14523.47        |
| <b>4</b>                  | 17954.2                       | 8261.38        | 3810.20        | 5299.67        | 14440.23        |
| <b>5</b>                  | 17864.9                       | 8306.18        | 3705.08        | 5297.86        | 14451.87        |
| <b>6</b>                  | 17814.1                       | 8335.69        | 3669.20        | 5299.81        | 14845.12        |
| <b>7</b>                  | 17734.1                       | 8373.89        | 3684.58        | 5307.15        | 14652.45        |
| <b>8</b>                  | 17670.1                       | 8437.32        | 3680.94        | 5306.65        | 14420.78        |
| <b>9</b>                  | 17574.2                       | 8448.01        | 3661.12        | 5296.54        | 14574.21        |
| <b>10</b>                 | 17545.4                       | 8505.70        | 3653.84        | 5310.43        | 14674.38        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>17845.25</b>               | <b>8310.66</b> | <b>3729.41</b> | <b>5292.99</b> | <b>14548.62</b> |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>217.11</b>                 | <b>136.50</b>  | <b>99.08</b>   | <b>17.70</b>   | <b>138.24</b>   |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b> | <b>1.22</b>                   | <b>1.64</b>    | <b>2.66</b>    | <b>0.33</b>    | <b>0.95</b>     |

### **Robustheit: Trenntemperatur**

Die Säulentemperatur wurde im Bereich 22.5-37.5 °C variiert und die Auflösungen zwischen den in ihrer Auftrennung kritischen Peakpaaren der Verunreinigungen B/C sowie zwischen Amodiaquin und Verunreinigung A bestimmt.

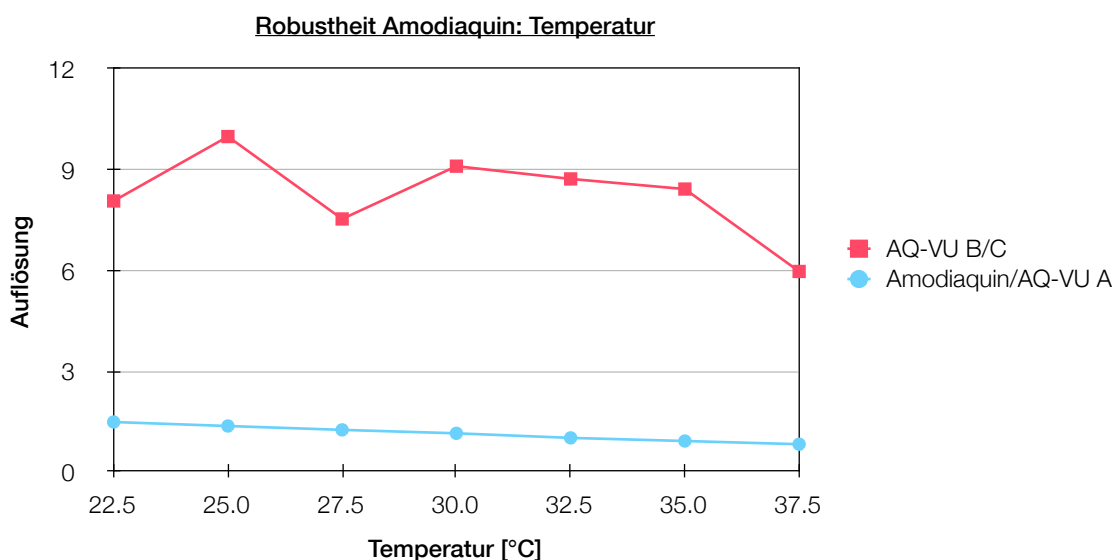
Die Auftrennung zwischen Amodiaquin und Verunreinigung A wurde ab einer Temperatur von 25 °C deutlich schlechter ( $R_s < 1.5$ ), wohingegen in den übrigen Fällen die Auflösungen stets deutlich über einem Wert von 1.5 lagen. Dies beeinflusst besonders die Quantifizierung der Verunreinigung A, deren Signal bei sehr niedrigen Konzentrationen durch den Amodiaquin-Peak überlagert werden kann. Die Veränderung der Temperatur hatte jedoch zusammengefasst einen

nur sehr geringen Effekt auf die Trennleistung (vgl. Tabelle 5.3.3.-4 und Abbildung 5.3.3.-3). Die Retention von Verunreinigung D blieb nahezu unverändert.

**Tabelle 5.3.3-4:** Amodiaquin: Robustheit gegenüber der Temperatur.

| Temperatur [°C]   | $R_s$ AQ-VU B/C | $R_s$ AQ/AQ-VU A |
|-------------------|-----------------|------------------|
| 22.5              | 8.1             | 1.5              |
| 25.0 <sup>#</sup> | 10.0            | 1.4              |
| 27.5              | 7.5             | 1.2              |
| 30.0              | 9.1             | 1.1              |
| 32.5              | 8.7             | 1.0              |
| 35.0              | 8.4             | 0.9              |
| 37.5              | 6.0             | 0.8              |

#: Entspricht der Durchführung der Chromatographie bei Raumtemperatur.



**Abbildung 5.3.3.-3:** Amodiaquin: Abhängigkeit der Auftrennung von der Säulentemperatur.

### **Robustheit: pH-Wert der mobilen Phase**

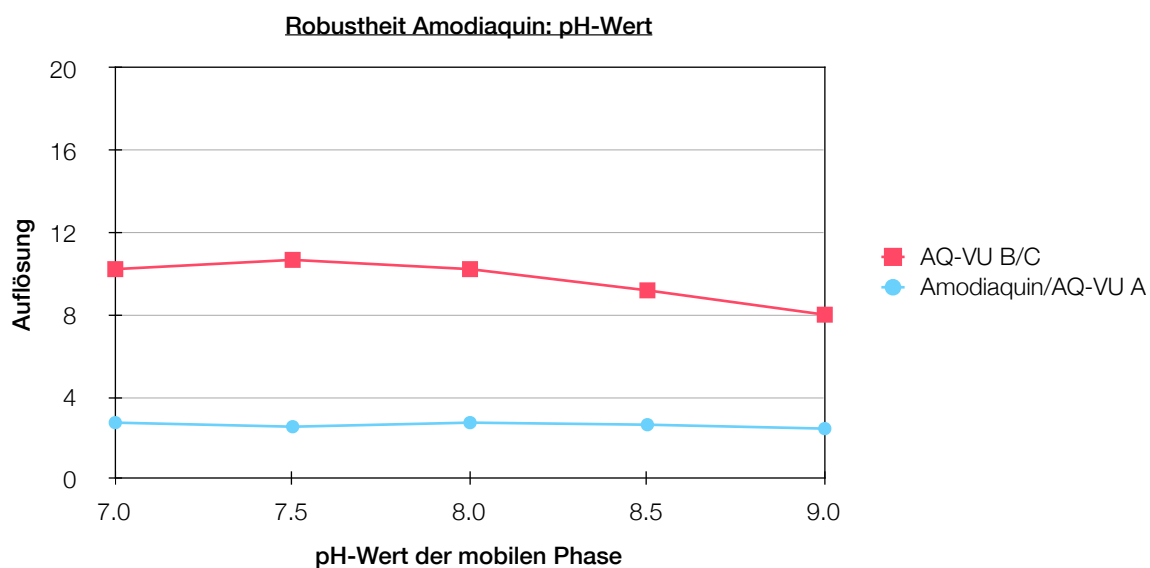
Analog zur Untersuchung der Säulentemperatur wurde der *pH*-Wert der mobilen Phase im Bereich 7.0-9.0 variiert und die Auflösungen zwischen den Verunreinigungen B und C und zwischen Amodiaquin und der Verunreinigung A bestimmt.

Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der Trennleistung des chromatographischen Systems, die Auflösungen der betrachteten Peakpaare lagen stets bei Werten über 2.0 (siehe Tabelle 5.3.3-5 und Abbildung 5.3.3-4), womit eine Basislinientrennung gewährleistet ist.

**Tabelle 5.3.3-5:** Amodiaquin: Robustheit gegenüber dem *pH*-Wert der mobilen Phase.

| <i>pH</i> -Wert  | $R_s$ AQ-VU B/C | $R_s$ AQ-VU C/AQ | $R_s$ AQ-VU B/C |
|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 7.0              | 10.2            | 16.5             | 2.7             |
| 7.5              | 10.7            | 15.9             | 2.6             |
| 8.0 <sup>#</sup> | 10.2            | 16.5             | 2.7             |
| 8.5              | 9.2             | 17.3             | 2.6             |
| 9.0              | 8.0             | 18.0             | 2.5             |

#: Entspricht dem *pH*-Wert der optimierten Endmethode.



**Abbildung 5.3.3-4:** Amodiaquin: Abhängigkeit der Auftrennungen vom *pH*-Wert.

## 5.4 Proguanil

### 5.4.1 Syntheseweg und Pharmakologie

Das Biguanid Proguanil (1-(4-Chlorphenyl)-5-(1-methylethyl)biguanid) ist sowohl im *Ph. Eur.* als auch in der USP und im *Ph. Int.* in Form des Hydrochlorids monographiert [138-140]. Curd und Rose stellten Proguanil durch die Kopplung diazotierten *p*-Chloranilins (Verunreinigung A) mit Dicyandiamid (Verunreinigung B) und anschließender Kondensation des entstandenen 4-Chlorphenyldicyandiamids (Verunreinigung C) mit Isopropylamin dar (siehe Abbildung 5.4.1-1) [141]. Neben der Zielverbindung können hierbei auch die Verbindungen 1,5-Bis(4-chlorphenyl)biguanid (Verunreinigung D) sowie 1,5-Bis(1-methylethyl)biguanid (Verunreinigung E) entstehen, die unter anderem im *Ph. Eur.* beschrieben sind. Es führt zudem das 1-Cyan-3-(1-methylethyl)-guanidin an [138].

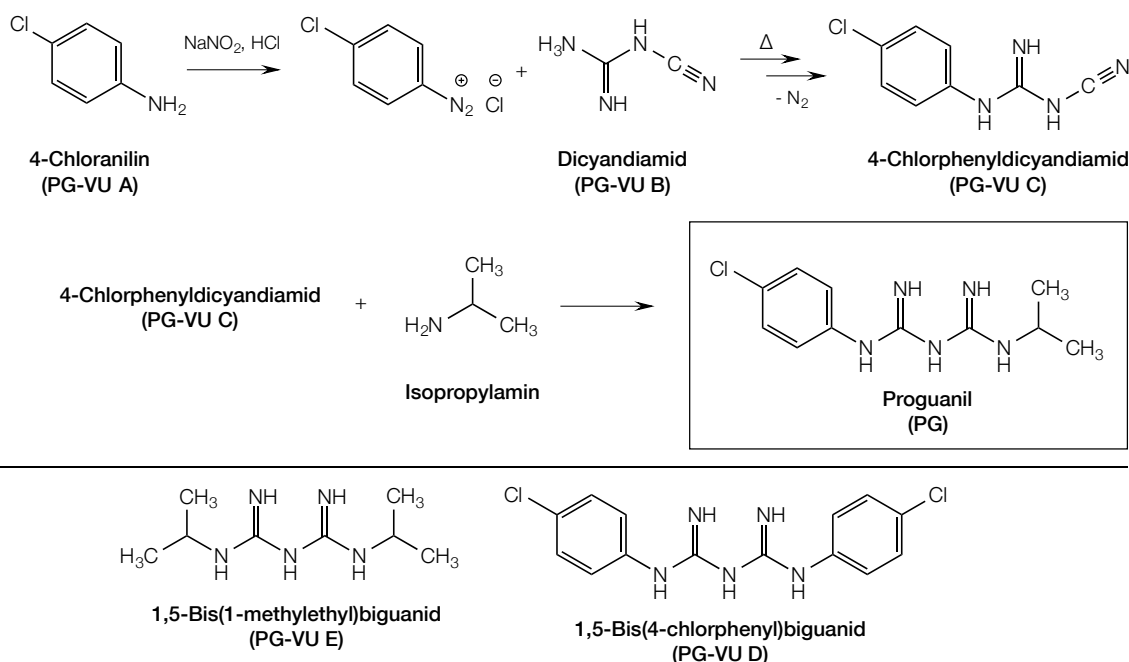


Abbildung 5.4.1-1: Syntheschema zur Darstellung von Proguanil und Strukturformeln zweier weiterer Verunreinigungen des *Ph. Eur.*

Proguanil ist ein Prodrug und wird im menschlichen Körper zunächst zu seinem aktiven Metaboliten Cycloguanil metabolisiert, welches anschließend, wie in Kapitel 1.3.6 beschrieben, in den Folsäuremetabolismus der Plasmodien eingreift und deren Synthese hemmt.

### 5.4.2 Methodenentwicklung und -optimierung

Proguanilhydrochlorid wird im *Ph. Eur.* mittels Ionenpaarchromatographie an einer RP-18-Phase bestimmt. Zwar ist die Verwendung einer kurzen Säule (Länge: 125 mm) vorgeschrieben, aller-

dings wird zur Herstellung der mobilen Phase das Ionenpaarreagenz Natriumhexansulfonat verwendet und es wird bei zwei Wellenlängen gleichzeitig ( $\lambda=230$  und  $254$  nm) detektiert [138]. Dies kann nur mit einem entsprechenden DAD-Modul oder, sofern keines zur Verfügung steht, durch zwei aufeinander folgende Injektionen der Probelösung erreicht werden. Auch die Methode des Internationalen Arzneibuches kommt nicht ohne den Einsatz eines Ionenpaarbildners aus (siehe Tabelle 5.1-1).

In weiteren Literaturmethoden, beispielsweise von Moody *et al.* oder Taylor *et al.*, wurden zwar bereits einfache Phosphatpuffer zur Bestimmung verwendet, allerdings konnte auf den Zusatz eines Ionenpaarbildners wie Natriumlaurylsulfat bzw. Natriumdodecylsulfat auch hier nicht verzichtet werden [142-146]. Zudem wird als organisches Lösungsmittel Acetonitril verwendet, sodass diese Methoden keinen Vorteil gegenüber denen der Arzneibücher darstellen. Protokolle, bei denen kein Ionenpaarreagenz benötigt wird, sind zwar ebenfalls beschrieben worden, bieten aber im Vergleich zu den bisher genannten Methoden ebenfalls keinen Vorteil: Bei Chaulet *et al.* wurde die mobile Phase unter Verwendung von Ammoniumformiat bzw. Perchlorsäure hergestellt (Notwendigkeit zusätzlicher Reagenzien), bei de Aguiar *et al.* [147] erfolgte die Elution mit einer Flussrate von  $3$  ml/min (sehr hoher Fließmittelverbrauch) und Kelly und Fletcher verwendeten eine sehr spezielle stationäre Phase mit Nitrilgruppen als Säulenmaterial [147-149].

Ausgehend von diesen Publikationen erfolgte die Methodenentwicklung und -vereinfachung zur Bestimmung von Proguanil auf Säule A, wobei die in Tabelle 5.4.2-2 angeführten Pufferlösungen zur Herstellung der verschiedenen mobilen Phasen verwendet wurden. Die Flussrate wurde auf  $1.0$  ml/min eingestellt und es wurde eine Detektionswellenlänge von  $\lambda=232$  nm gewählt. Zu Beginn der Experimente wurden neben Proguanil selbst die Verunreinigungen A, B und C, ab einem späteren Zeitpunkt zusätzlich die Verunreinigungen D und E berücksichtigt, da sie zuvor kommerziell nicht erhältlich waren (siehe unten).

Unter Verwendung einer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung ( $0.05$  mol/l), in verschiedenen Verhältnissen mit Methanol vermischt und auf unterschiedliche *pH*-Werte eingestellt (siehe Tabelle 5.4.2-2), wurde zunächst versucht, eine Auftrennung von Proguanil und den Verunreinigungen A, B und C zu erreichen. Bei *pH* 4.5 sowie einem Methanolanteil von  $75$  % (V/V) konnten vier einzelne Signale erhalten werden, die allerdings nicht gut getrennt waren. Proguanil und Verunreinigung B sowie die Verunreinigungen A und C eluierten unter diesen Bedingungen jeweils kurz nacheinander und im entsprechenden Chromatogramm können zwei Peakgruppen differenziert werden (siehe Abbildung 9.4.2-1). Die Erniedrigung des *pH*-Wertes auf  $2.5$  änderte zwar die Elutionsreihenfolge und verbesserte die Auftrennung zwischen Proguanil und der Verunreinigung A (siehe Abbildung 9.4.2-2), allerdings verschlechterte sich die Auflösung zwischen Verunreinigung C und B stark, sodass für die weiteren Experimente wieder ein *pH*-Wert von  $4.5$  ge-

wählt wurde. Durch Erhöhen des Methanolanteiles auf 80 % (V/V) konnte bei  $pH$  4.5 ebenfalls keine signifikante Verbesserung der Auftrennung erreicht werden (siehe Abbildung 9.4.2-3), die Erniedrigung auf 65 % (V/V) führte hingegen zum Zusammenfallen der Signale von Proguanil und Verunreinigung A (siehe Abbildung 9.4.2-4). Hieraus wurde gefolgert, dass eine weitere Verringerung womöglich eine vollständige Auftrennung ermöglichen könnte, was später mit einem Anteil von 55 % (V/V) realisiert wurde.

Die Molarität der  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung wurde zudem einerseits auf 0.06 mol/l erhöht ( $pH=2.5$  bzw. 4.5, siehe Abbildungen 9.4.2-5 und 9.4.2-6) sowie andererseits auf 0.04 mol/l erniedrigt ( $pH=2.5$  bzw. 4.5, siehe Abbildungen 9.4.2-7 und 9.4.2-8). Eine Pufferkonzentration oberhalb 0.6 mol/l führte zu keiner Verbesserung der Auftrennung und der Peaksymmetrien, wohingegen bei einer Erniedrigung ein stärkeres Peak tailing auftrat. In beiden Fällen hatte der  $pH$ -Wert keinen Einfluss auf die Auftrennung der Analyten.

Der Ersatz der  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung durch eine äquimolare  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung ( $pH=2.5$  bzw. 4.5) führte zu leicht verbesserten Peakformen, beeinflusste aber die Auftrennung kaum (siehe Abbildungen 9.4.2-9 und 9.4.2-10). Durch weiteres Verringern der Methanolkonzentration auf 55 % (V/V) wurden schließlich alle vier Analyten bei  $pH$  2.5 basisliniengetrennt (siehe Abbildung 9.4.2-11). Der zu Proguanil gehörende Peak zeigte jedoch ein starkes Tailing, was sich durch eine weitere Verringerung des organischen Lösungsmittels auf 50 % (V/V) nicht signifikant verschlechterte. Noch geringere Methanolanteile führten allerdings zu einem wesentlich stärker ausgeprägtem Tailing sowie zu einer starken Verlängerung der Retentionszeit von Proguanil.

Die bis zu diesem Zeitpunkt nicht berücksichtigten Verbindungen Verunreinigung D und Verunreinigung E wurden an dieser Stelle in die Methodenentwicklung mit einbezogen und konnten unter Verwendung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung (0.05 mol/l,  $pH=3.0$ ) und einem Methanolanteil von 50 % (V/V) ebenfalls von den restlichen Analyten abgetrennt werden (siehe Abbildung 5.4.2-1). Der gewählte  $pH$ -Wert und der Anteil des organischen Lösungsmittels erwiesen sich als gut geeignet, um alle Substanzen voneinander zu trennen und innerhalb von 30 min zu bestimmen. Verunreinigung C und Verunreinigung E eluieren kurz nacheinander und das Peakpaar wies stets eine Auflösung unterhalb eines Wertes von  $R_s=1.5$  auf.

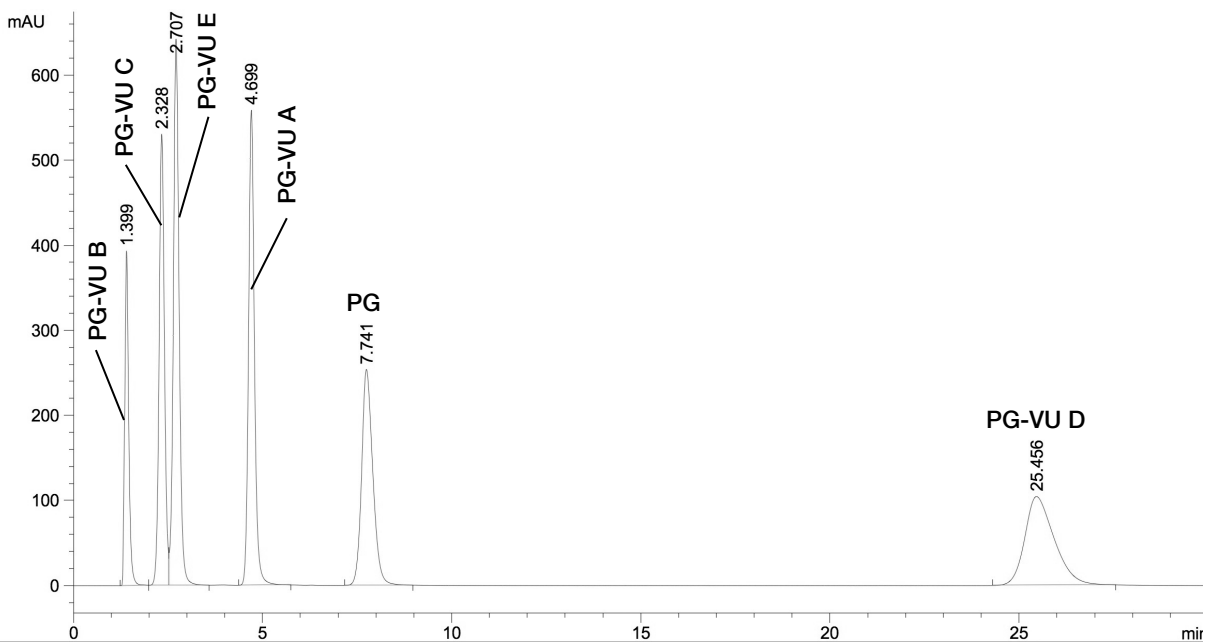
Die im Vergleich zu den übrigen Analyten sehr lange Retentionszeit von Verunreinigung D (25 min) ist durch die offensichtlich hohe Lipophilie des Moleküls bedingt (4-Chlorphenyl-Substituenten) und könnte durch eine entsprechende Erhöhung des Methanolanteiles in der mobilen Phase verkürzt werden. Allerdings ist dann die Auftrennung der übrigen Analyten nicht mehr möglich, sodass dies einen Kompromiss zwischen einer guten Trennleistung und einem minimierten Methanolverbrauch darstellt. Zugleich konnte die Flussrate auf 0.75 ml/min gesenkt werden, ohne dass die Auftrennung negativ beeinflusst wurde. Alternativ zur Erhöhung des

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Methanolanteiles könnte auch nach der Elution von Proguanil (ca. 10 min) ein Eluent mit höherer Elutionskraft, bzw. höherem Methanolanteil, verwendet werden, um die Retentionszeit von Verunreinigung D entsprechend zu verkürzen. Die chromatographischen Parameter der optimierten Methode sind in Tabelle 5.4.2-1 zusammengefasst und ein entsprechendes Chromatogramm ist in Abbildung 5.4.2-1 dargestellt.

**Tabelle 5.4.2-1:** Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Proguanil.

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Säule A   |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 50 % (V/V) einer 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung, $\text{pH}=3.0$ ; 50 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 0.75 ml/min   |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 $\mu\text{l}$  |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur, unkontrolliert  |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, $\lambda=232$ nm  |



**Abbildung 5.4.2-1:** Proguanil: Säule A, 0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=3.0$ ,  $\text{MeOH}=50$  %, 0.75 ml/min; UV/Vis bei 232 nm.



5.4.3 Methodenvalidierung

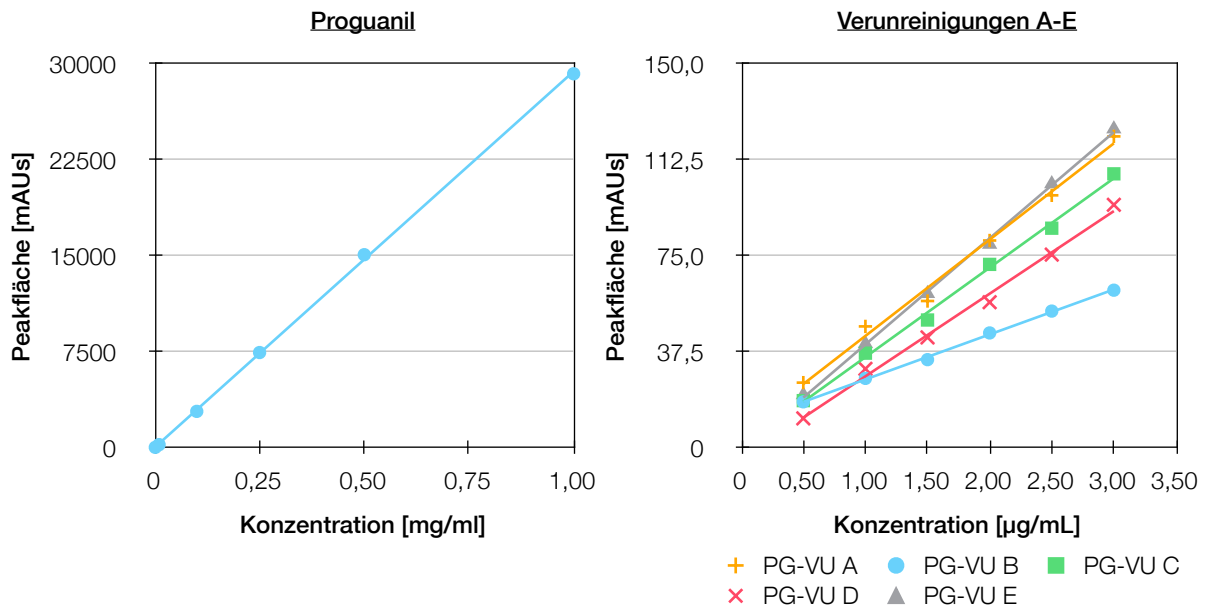
Linearität

Die Bestimmung der Linearität erfolgte im Konzentrationsbereich 1.0-1000.0 µg/ml (Proguanil, Einfachinjektion) sowie 0.5-3.0 µg/ml (Verunreinigungen A-E, Dreifachinjektion; siehe Tabellen 5.4.3-1 und 5.4.3-2 sowie Abbildung 5.4.3.-1). Hierzu wurden die Kalibrierlösungen vermessen und eine lineare Regression der Peakflächen über die Konzentration durchgeführt.

Für die Verunreinigungen A-E wurden die Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gemäß den Angaben der ICH-Richtlinie Q2(R1) aus den jeweiligen Kalibriergeraden berechnet und erfüllen mit Werten zwischen 0.01 und 0.09 % die entsprechende Berichtsschwelle des *Ph. Eur.* (siehe Tabelle 5.4.3-1) [79, 90].

**Tabelle 5.4.3-1:** Proguanil: Regressionsdaten für PG und die Verunreinigungen A-E.

| Analyt    | Bereich [µg/ml] | Regressionsgleichung | R <sup>2</sup> | LOD [µg/ml] | LOQ [µg/ml] |
|-----------|-----------------|----------------------|----------------|-------------|-------------|
| Proguanil | 1.0-1000.0      | y = 29359x + 24.15   | 0.9996         | -           | -           |
| PG-VU A   | 0.5-3.0         | y = 37.6x + 6.02     | 0.9919         | 0.3         | 0.9         |
| PG-VU B   | 0.5-3.0         | y = 17.56x + 9.08    | 0.9987         | 0.1         | 0.4         |
| PG-VU C   | 0.5-3.0         | y = 34.91x + 0.44    | 0.9962         | 0.2         | 0.6         |
| PG-VU D   | 0.5-3.0         | y = 32.26x - 4.41    | 0.9940         | 0.3         | 0.8         |
| PG-VU E   | 0.5-3.0         | y = 41.46x - 1.19    | 0.9988         | 0.1         | 0.4         |



**Abbildung 5.4.3-1:** Proguanil: Regressionsplots für Proguanil und die Verunreinigungen A-E.

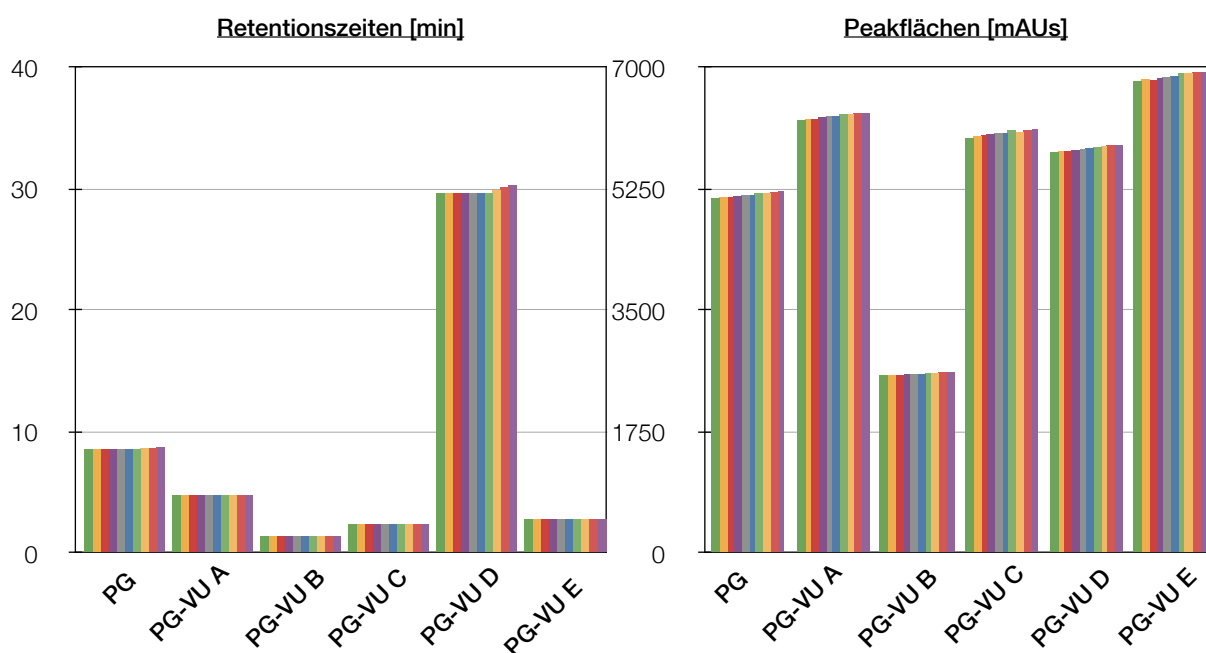
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 5.4.3-2:** Proguanil: Chromatographische Daten der Linearitätsbestimmung.

| Konz. [µg/ml] | PG                        | PG-VU A | PG-VU B | PG-VU C | PG-VU D | PG-VU E |
|---------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|               | <b>Peakflächen [mAUs]</b> |         |         |         |         |         |
| 0.5           | -                         | 25.38   | 17.88   | 18.53   | 11.43   | 20.63   |
| 1.0           | -                         | 20.63   | 27.04   | 36.89   | 30.78   | 40.61   |
| 1.5           | -                         | 57.26   | 34.36   | 49.85   | 43.04   | 60.16   |
| 2.0           | -                         | 80.89   | 44.79   | 71.56   | 56.78   | 79.38   |
| 2.5           | -                         | 98.53   | 53.32   | 85.69   | 75.38   | 103.02  |
| 3.0           | -                         | 121.54  | 61.48   | 106.92  | 94.83   | 124.44  |
| 1.0           | 29198.80                  | -       | -       | -       | -       | -       |
| 10.0          | 15068.70                  | -       | -       | -       | -       | -       |
| 100.0         | 7427.02                   | -       | -       | -       | -       | -       |
| 250.0         | 2831.63                   | -       | -       | -       | -       | -       |
| 500.0         | 234.36                    | -       | -       | -       | -       | -       |
| 1000.0        | 21.82                     | -       | -       | -       | -       | -       |

### Wiederholpräzision

Die Proguanil-Testlösung wurde zehn Mal injiziert und die Standardabweichungen bzw. relativen Standardabweichungen bestimmt. Die relative Standardabweichung der Retentionszeiten lag im Bereich 0.084-0.856 %, bzw. im Falle der Peakflächen zwischen 0.586 und 0.709 % (siehe Tabellen 5.4.3-3 und Abbildung 5.4.3-2). Die Werte sind stets geringer als 2 % und zeigen somit eine sehr gute Wiederholpräzision an [136, 137].



**Abbildung 5.4.3-2:** Proguanil: Wiederholpräzision.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 5.4.3-3: Proguanil: Wiederholpräzision.

|                           | PG                            | PG-VU A        | PG-VU B        | PG-VU C        | PG-VU D        | PG-VU E        |
|---------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Injektion</b>          | <b>Retentionszeiten [min]</b> |                |                |                |                |                |
| 1                         | 85.9                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 29.66          | 2.80           |
| 2                         | 8.58                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 26.62          | 2.79           |
| 3                         | 8.58                          | 4.78           | 1.37           | 2.40           | 29.62          | 2.78           |
| 4                         | 8.58                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 29.65          | 2.78           |
| 5                         | 8.59                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 29.64          | 2.79           |
| 6                         | 8.58                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 29.67          | 2.78           |
| 7                         | 8.59                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 29.69          | 2.79           |
| 8                         | 8.60                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 29.88          | 2.79           |
| 9                         | 8.65                          | 4.79           | 1.37           | 2.41           | 30.15          | 2.79           |
| 10                        | 8.69                          | 4.79           | 1.37           | 2.42           | 30.34          | 2.79           |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>8.60</b>                   | <b>4.79</b>    | <b>1.37</b>    | <b>2.41</b>    | <b>29.79</b>   | <b>2.79</b>    |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>0.039</b>                  | <b>0.004</b>   | <b>0.002</b>   | <b>0.003</b>   | <b>0.255</b>   | <b>0.002</b>   |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b> | <b>0.452</b>                  | <b>0.091</b>   | <b>0.125</b>   | <b>0.140</b>   | <b>0.856</b>   | <b>0.084</b>   |
|                           | PG                            | PG-VU A        | PG-VU B        | PG-VU C        | PG-VU D        | PG-VU E        |
| <b>Injektion</b>          | <b>Peakflächen [mAUs]</b>     |                |                |                |                |                |
| 1                         | 5114.75                       | 6237.34        | 2557.21        | 5974.40        | 5775.77        | 6807.66        |
| 2                         | 5129.27                       | 6254.80        | 2569.60        | 6014.76        | 5792.79        | 6832.16        |
| 3                         | 5130.82                       | 6260.91        | 2568.66        | 6027.69        | 5791.53        | 6821.11        |
| 4                         | 5149.16                       | 6282.05        | 2576.09        | 6044.17        | 5810.71        | 6846.21        |
| 5                         | 5154.71                       | 6292.20        | 2578.21        | 6054.34        | 5816.82        | 6857.23        |
| 6                         | 5164.89                       | 6299.44        | 2582.73        | 6052.90        | 5830.62        | 6875.88        |
| 7                         | 5182.79                       | 6332.37        | 2593.18        | 6092.36        | 5851.88        | 6913.27        |
| 8                         | 5192.36                       | 6327.07        | 2596.88        | 6072.03        | 5861.52        | 6924.17        |
| 9                         | 5207.99                       | 6338.99        | 2601.46        | 6101.11        | 5882.03        | 6932.13        |
| 10                        | 5210.95                       | 6335.16        | 2602.77        | 6114.25        | 5883.25        | 6936.06        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>5163.77</b>                | <b>6296.03</b> | <b>2582.68</b> | <b>6054.80</b> | <b>5829.69</b> | <b>6874.59</b> |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>33.888</b>                 | <b>36.908</b>  | <b>15.448</b>  | <b>42.564</b>  | <b>38.538</b>  | <b>48.64</b>   |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b> | <b>0.656</b>                  | <b>0.586</b>   | <b>0.598</b>   | <b>0.709</b>   | <b>0.661</b>   | <b>0.708</b>   |

**Robustheit: Trenntemperatur**

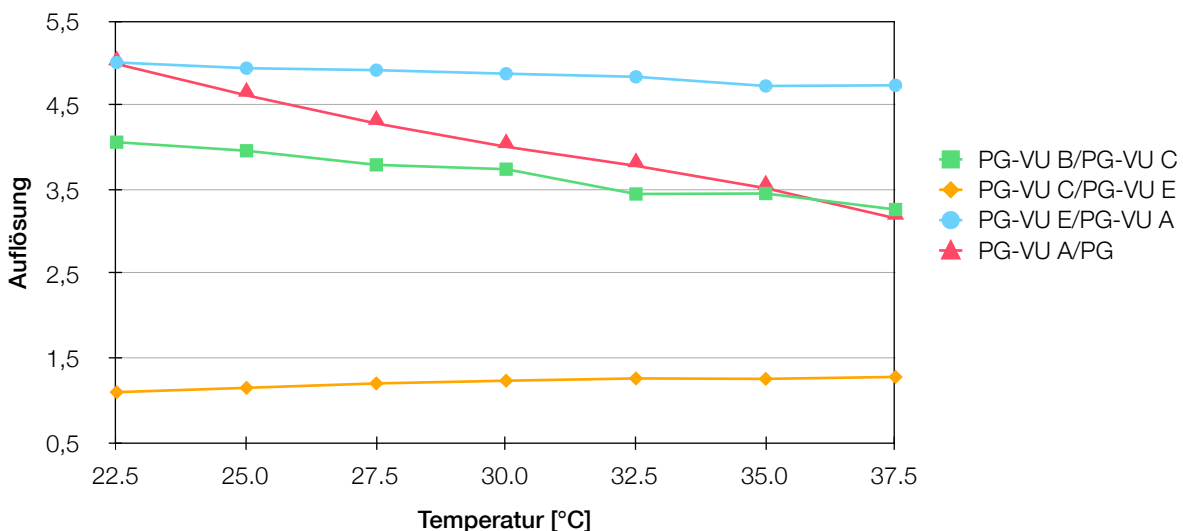
**Tabelle 5.4.3-4:** Proguanil: Robustheit gegenüber der Trenntemperatur.

| Temperatur [°C]   | $R_s$ PG-VU B/C | $R_s$ PG-VU C/E | $R_s$ PG-VU E/A | $R_s$ PG-VU A/PG |
|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 22.5              | 4.06            | 1.09            | 5.01            | 4.99             |
| 25.0 <sup>#</sup> | 3.96            | 1.15            | 4.94            | 4.62             |
| 27.5              | 3.79            | 1.20            | 4.91            | 4.28             |
| 30.0              | 3.74            | 1.23            | 4.87            | 4.01             |
| 32.5              | 3.45            | 1.26            | 4.84            | 3.78             |
| 35.0              | 3.45            | 1.25            | 4.73            | 3.51             |
| 37.5              | 3.26            | 1.28            | 4.73            | 3.16             |

<sup>#</sup>: Entspricht der Durchführung der Chromatographie bei Raumtemperatur.

Der Einfluss der Trenntemperatur auf die Auflösung zwischen den Signalen von Verunreinigung B und Verunreinigung C, von Verunreinigung C und Verunreinigung E, von Verunreinigung E und Verunreinigung A sowie zwischen Verunreinigung A und Proguanil wurde im Bereich 22.5-37.5 °C untersucht.

Bis auf ein Substanzpaar (Verunreinigung C und Verunreinigung E) konnte in keinem Fall eine signifikante Veränderung der Trennleistung beobachtet werden. Die ermittelten Werte für  $R_s$  nahmen zwar erwartungsgemäß mit steigender Temperatur ab, lagen aber dennoch stets deutlich über 1.5 (siehe Abbildung 5.4.3-3). Die Auflösung zwischen Verunreinigung C und Verunreinigung E wurde zwar durch die Trenntemperatur ebenfalls kaum beeinflusst, lag allerdings zu keinem Zeitpunkt oberhalb von 1.5 (1.09-1.28).



**Abbildung 5.4.3-3:** Proguanil: Einfluss der Trenntemperatur auf die Auflösung verschiedener Substanzpaare.

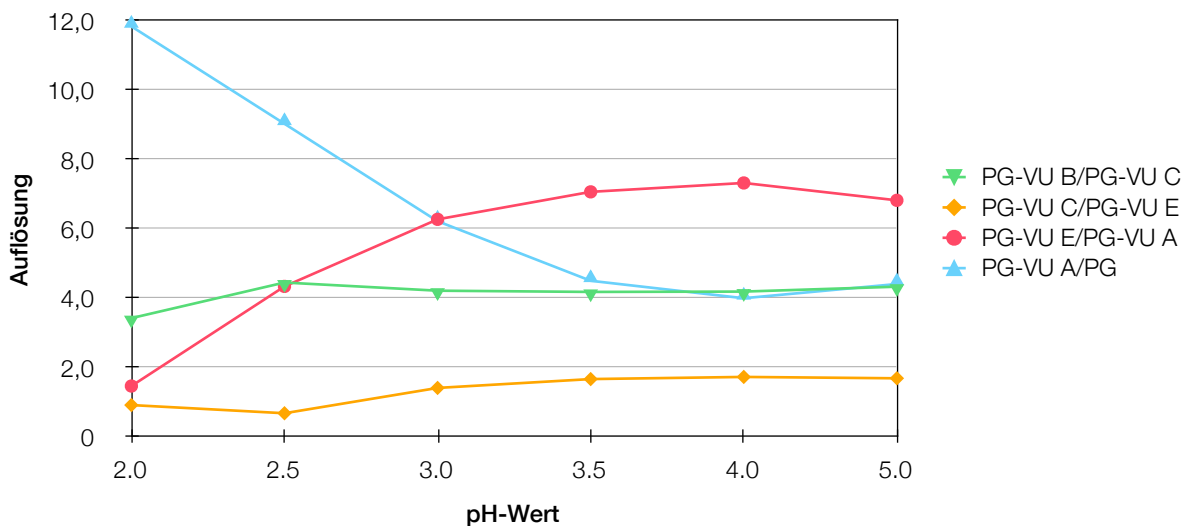
**Robustheit: *pH*-Wert der mobilen Phase**

Der *pH*-Wert der verwendeten Pufferlösung wurde im Bereich 2.0-5.0 variiert. Der Einfluss auf die Auflösungen der Signale ist in Tabelle 5.4.3-5 sowie in Abbildung 5.4.3-4 dargestellt.

**Tabelle 5.4.3-5:** Proguanil: Robustheit der Trennung gegenüber dem *pH*-Wert.

| Temperatur [°C]  | $R_s$<br>PG-VU B/C | $R_s$<br>PG-VU C/E | $R_s$<br>PG-VU E/A | $R_s$<br>PG-VU A/PG |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 2.0              | 3.42               | 0.91               | 1.46               | 11.83               |
| 2.5              | 4.45               | 0.68               | 4.33               | 9.02                |
| 3.0 <sup>#</sup> | 4.21               | 1.41               | 6.27               | 6.21                |
| 3.5              | 4.18               | 1.66               | 7.06               | 4.50                |
| 4.0              | 4.19               | 1.72               | 7.32               | 3.99                |
| 5.0              | 4.33               | 1.68               | 6.82               | 4.40                |

<sup>#</sup>: Entspricht dem ursprünglichen *pH*-Wert der optimierten Methode.



**Abbildung 5.4.3-4:** Proguanil: Einfluss des *pH*-wertes auf die Auflösung verschiedener Peakpaare.

Im Fall von Verunreinigung B und Verunreinigung C sowie Verunreinigung C und Verunreinigung E veränderten sich die Auflösungen mit steigendem *pH*-Wert kaum, wohingegen bei den Peakpaaren Verunreinigung E/Verunreinigung A (Zunahme) und Verunreinigung A/Proguanil (Abnahme) eine deutliche Veränderung beobachtet werden konnte. Die geringsten Auflösungen wurden für das Paar Verunreinigung C/Verunreinigung E bei den *pH*-Werten 2.0 und 2.5 erhalten ( $R_s=0.91$  bzw. 0.68).

Aus den ermittelten Daten kann eine hohe Robustheit gegenüber der *pH*-Wert-Schwankung sowie der Trenntemperatur in den untersuchten Bereichen abgeleitet werden. Durch die schlechte Auftrennung der Verunreinigungen C und E kann unter Umständen nur die Summe der beiden

Verbindungen angegeben werden, wenn sie gleichzeitig in einer Probe vorhanden sind. Ihre Auftrennung könnte vorab im Rahmen eines Systemeignungstestes überprüft und die Auflösung der Signale ermittelt werden.

## 5.5 Mefloquin

### 5.5.1 Syntheseweg und Pharmakologie

Mefloquin (2,8-Bis(trifluormethyl)chinolin-4-yl)-(piperidin-2-yl)-methanol) ist ein Vertreter der Arylaminoalkohole und wurde in den 1970er Jahren von Ohnmacht *et al.* in Zusammenarbeit mit dem Amerikanischen Verteidigungsministerium entwickelt [150]. Wie auch bei den 4- und 8-Aminochinolinen ist der genaue Wirkmechanismus der Arylaminoalkohole nicht bekannt, die Substanzen greifen aber ebenfalls in die Hämoglobinverwertung der Plasmodien ein. Von Schlitzer wird zudem eine Störung der Calciumhomöostase vermutet [151]. Mefloquin und das in Kapitel 5.6 behandelte Lumefantrin stellen wichtige Stoffe zur Therapie der Malaria dar, sind aber aufgrund ihres hohen Nebenwirkungs- und Toxizitätspotentials oftmals nicht Mittel der ersten Wahl. Das *Ph. Eur.* beschreibt das Hydrochlorid des Racemates der (*RS*, *SR*) und (*SR*, *RS*) konfigurierten Stereoisomeren [152].

Mefloquin kann über drei unterschiedliche Synthesewege hergestellt werden, die in der industriellen Produktion eine Rolle spielen. Die Herstellungswege stehen zum Teil über identische Zwischenprodukte miteinander in Verbindung (siehe Abbildung 5.5.1-1) [153]:

#### Synthese nach Ohnmacht *et al.*

Der klassische sechsstufige Syntheseweg geht von 2-Trifluoranilin (Verunreinigung A) aus, welches mit Ethyl-4,4,4-trifluoracetoacetat zum 2,8-Bis(trifluormethyl)-3-hydroxychinolin (Verunreinigung B) cyclisiert wird. Die Umsetzung mit Phosphoroxylbromid liefert das 4-Bromderivat, welches mit *n*-Butyllithium zum 2,8-Bis(trifluormethyl)-4-chinolyllithium reagiert.

Durch Carboxylierung wird die 2,8-Bis(trifluormethyl)chinolin-4-carbonsäure gebildet, die nach der Kopplung mit 2-Pyridyllithium zum [2,8-Bis-(trifluormethyl)chinolin-4-yl](pyridin-2-yl)-methanon reagiert. Durch Hydrierung des Pyridylsubstituenten wird schließlich Mefloquin erhalten [150].

#### Synthese nach Grethe und Mitt

Grethe gelang es, über Kopplung des 2,8-Bis(trifluormethyl)-4-chinolyllithium mit Pyridin-2-carboxaldehyd (Verunreinigung C) direkt den Alkohol [2,8-Bis-(trifluormethyl)chinolin-4-yl]-(pyridin-2-yl)methanol zu erhalten. Die Verbindung kann, analog zu Ohnmacht, leicht mit Wasserstoff in Gegenwart eines Edelmetallkatalysators zu Mefloquin hydriert werden [154].

Synthese nach Hickmann *et al.*

Das Chinolingrundgerüst wird analog zu Weg 1 ausgehend von 2-Trifluoranilin aufgebaut, allerdings durch die Reaktion mit Chloralhydrat und Hydroxylaminhydrochlorid zum 2-Trifluormethylloximinoacetanilid. Dieses cyclisiert im Schwefelsauren zum 7-Trifluormethylisatin (Verunreinigung D), welches durch Umsetzung mit 1,1,1-Trifluoraceton unter Ringerweiterung in die 2,8-Bis(trifluormethyl)chinolin-4-carbonsäure überführt werden kann [155].

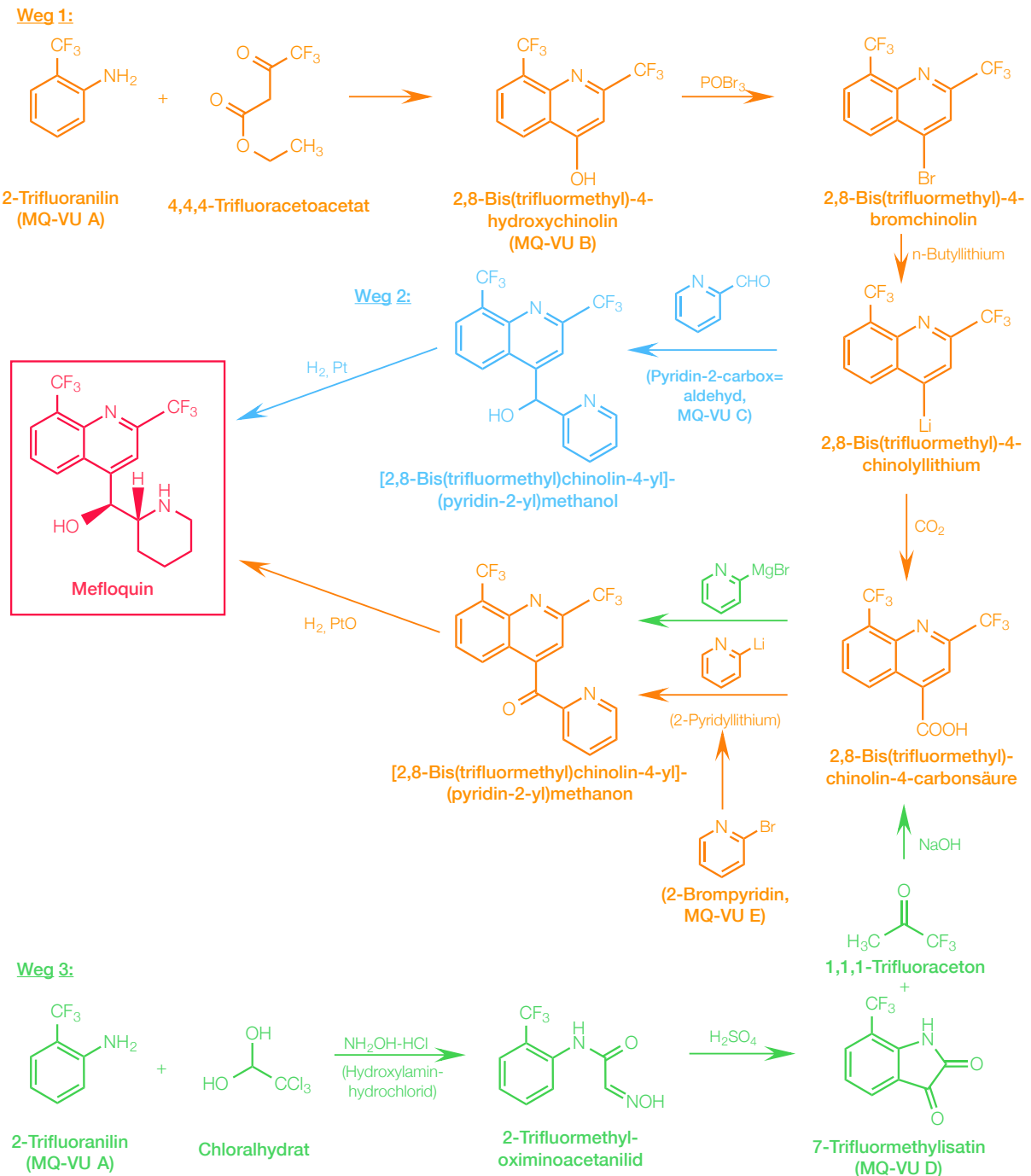


Abbildung 5.5.1-1: Verschiedene Möglichkeiten, Mefloquin ausgehend von 2-Trifluoranilin zu synthetisieren. Orange: Nach Ohnmacht *et al.*; blau: Nach Grethe und Mitt; grün: Nach Hickmann *et al.*

Das Verfahren hat nach Angaben der Autoren den großen Vorteil, dass weitere lithiumorganische Zwischenstufen vermieden werden, da das [2,8-Bis-(trifluormethyl)chinolin-4-yl](pyridin-2-yl)methanon direkt mittels einer Grignard-Reaktion mit 2-Pyridylmagnesiumbromid (aus 2-Brompyridin, Verunreinigung E) erhalten werden kann. Die anschließende Hydrierung des Pyridylsubstituenten erfolgt analog zum Verfahren nach Grethe *et al.*

### 5.5.2 Methodenentwicklung und -optimierung

Das Europäische Arzneibuch lässt Mefloquin und drei dort beschriebene Verunreinigungen mittels Ionenpaarchromatographie an einer RP-18-Phase bestimmen; als mobile Phase dient hierbei ein Gemisch aus Methanol, Wasser und Acetonitril, dem Tetraheptylammoniumbromid sowie Natriumhydrogensulfat zugesetzt werden [152]. Die Methode der USP gleicht der im *Ph. Eur.* beschriebenen, die *Ph. Int.* schreibt zur Bestimmung der *Verwandten Substanzen* noch die Durchführung einer DC vor [156, 157].

Die Verunreinigungen, die zur Monographie des *Ph. Eur.* hinzugefügt wurden, sind zum einen das [2,8-Bis(trifluormethyl)-chinolin-4-yl](pyridin-2-yl)methanon sowie die beiden Alkohole (*RS*)-[2,8-Bis(trifluormethyl)chinolin-4-yl](pyridin-2-yl)methanol und (*RS*)-[2,8-Bis(trifluor-methyl)-chinolin-4-yl][(2*RS*)-piperidin-2-yl]methanol. Das Keton stellt hierbei in den Synthesen nach Ohnmacht *et al.* und Hickmann *et al.* (siehe Abbildung 5.5.1-1) die Verbindung dar, die im letzten Schritt zum Mefloquin hydriert wird; die beiden Alkohole sind zum einen dadurch gekennzeichnet, dass der Piperidinring noch in Form des ungesättigten Pyridinringes vorliegt, bzw. dass es sich um ein weiteres Diastereomer mit der falschen Konfiguration der Stereozentren handelt. Da die angeführten Verunreinigungen des *Ph. Eur.* kommerziell nicht verfügbar waren, wurden lediglich die in Kapitel 5.5.1 und Abbildung 5.5.1-1 dargestellten weiteren potentiellen Verunreinigungen ausgewählt und im Rahmen der Methodenentwicklung berücksichtigt. Sie stellen jedoch trotz allem wichtige Zwischenprodukte zur eindeutigen Identifizierung der unterschiedlichen Synthesestrategien dar.

Neben den Arzneibuchmethoden sind in der Literatur zahlreiche Methoden zu finden, mit denen Mefloquin auf unterschiedliche Weise bestimmt wurde. Komplexere Methoden verwenden zumeist entweder ein Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Methanol in Verbindung mit einer Pufferlösung oder ein Ionenpaarreagenz, beispielsweise bei Bergquist *et al.*, Gbotosho *et al.*, Lai *et al.*, Kapetanovic *et al.*, Tembhurkar *et al.*, Edstein *et al.*, Qiu *et al.* oder Gaudiano *et al.* [28, 158-164]. Im Gegensatz hierzu sind auch Methoden beschrieben, die nur mit einem Lösungsmittel (Methanol oder Acetonitril) im Gemisch mit einfachen Pufferlösungen arbeiten, z. B. in Arbeiten von Nogueira *et al.*, Grindel *et al.*, Guenzi *et al.*, Green *et al.*, Arayne und Sultana oder Bergquist *et al.* [165-170]. In nahezu allen dieser Methoden wird bevorzugt Acetonitril als



organisches Lösungsmittel eingesetzt. Trotz der zum Teil sehr unterschiedlichen eingesetzten Chemikalien und Reagenzien (z. B. Triethylamin, *N,N*-Dimethyloctylamin oder Octansulfonsäure) bzw. divergierenden chromatographischen Parametern haben die Methoden stets die Verwendung von RP-18-Material sowie einen sauer eingestellten *pH*-Wert der mobilen Phase gemeinsam.

Die Entwicklung sowie Vereinfachung einer Bestimmungsmethode für Mefloquin und die beschriebenen Verunreinigungen A-E konnte unter Verwendung von Säule A mit den in Tabelle 5.5.2-1 angeführten chromatographischen Parametern realisiert werden.

**Tabelle 5.5.2-1:** Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Mefloquin.

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Säule:</b>             | Säule A  |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 27.5 % (V/V) einer 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Pufferlösung, <i>pH</i> =3.0; 65 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min   |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl  |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur, unkontrolliert   |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=280 nm   |

Zu Beginn wurde versucht, die Auftrennung zwischen Mefloquin und den Verunreinigungen A, B, C und E zu erreichen. Hierzu wurde die Molarität der Pufferlösung schrittweise von 0.05 mol/l an erhöht und dabei ein *pH*-Wert von 2.0 bzw. 2.5 eingestellt. Es zeigte sich, dass bis zu einer Pufferkonzentration von 0.07 mol/l keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten werden konnten, denn die Analyten waren entweder überhaupt nicht aufgetrennt oder besaßen, beispielsweise bei Verwendung einer 0.06-molaren Pufferlösung, noch eine sehr schlechte Peakform (starkes Fronting, Chromatogramme nicht abgebildet). Auch die Variation des *pH*-Wertes und die Veränderung des organischen Anteiles der mobilen Phase konnte dies nicht verbessern, allerdings verschlechterten sich die Peakformen bei steigenden *pH*-Werten weiter sodass für alle weiteren Versuche der Bereich 2.0-3.0 beibehalten wurde. Die Auftrennung der Analyten an sich schien ebenfalls stark von der verwendeten Methanol-Menge abhängig zu sein und unterhalb eines Anteils von 60 % (V/V) war eine signifikante Erhöhung der Retentionszeiten, v.a. von Mefloquin und Verunreinigung B, zu beobachten.

Bei Verwendung einer 0.07-molaren KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Pufferlösung (*pH* 2.5) konnten erstmals Signale mit einer verbesserten Symmetrie erhalten werden, allerdings waren die Verunreinigungen A und E nicht aufgetrennt und Verunreinigung B besaß eine Retentionszeit deutlich über 20 Minuten (siehe Abbildung 9.4.3-1). Dies konnte durch Erhöhen des Methanolanteiles auf 65 % (V/V) zwar verhindert werden und es wurden vier separate Signale erhalten. Allerdings waren die Peaks von Verunreinigung A und E immer noch nicht getrennt (siehe Abbildung 9.4.3-2) und das zu

Verunreinigung B gehörige Signal (11.54 min) wies eine sehr schlechte Peaksymmetrie auf. Die Auftrennung der Analyten konnte durch die Erhöhung der Molarität des Phosphatpuffers auf 0.08 mol/l sowie durch einen Methanolanteil von 65 % (V/V) deutlich verbessert werden (siehe Abbildungen 9.4.3-3 und 9.4.3-4). Es konnten hier fünf separate Signale erhalten werden, wobei Verunreinigung A und Mefloquin nur angetrennt wurden (siehe Abbildung 9.4.3-4). Hier zeigte sich erneut, dass der Methanolanteil der mobilen Phase die Auftrennung der Substanzen stark beeinflusst, denn bereits bei 70 % (V/V) verkürzten sich alle Retentionszeiten der Signale stark und eluierten zum Teil sehr kurz aufeinander (siehe Abbildung 9.4.3-5). Eine Erhöhung der Molarität des Puffers auf 0.09 mol/l konnte unter diesen Bedingungen die Auftrennung der Verbindungen jedoch nicht verbessern (siehe Abbildung 9.4.3-6). Der Wechsel von  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  zu  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  führte sowohl zu einer signifikanten Verbesserung der Auftrennung als auch zu einer wesentlich besseren Peaksymmetrie. Die zunächst verwendeten Pufferlösungen ( $\text{pH}=2.0$ ) enthielten zum einen  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0.07 mol/l) und zum anderen einen geringen Anteil  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.027 mol/l). Zudem wurde ab diesem Zeitpunkt die Verunreinigung D mit in die Methodenentwicklung einbezogen. Es konnten fünf separate Signale erhalten werden, wobei die Verunreinigungen D und E komplett zu einem Signal zusammenfielen (siehe Abbildung 9.4.3-7). Die beiden Verbindungen konnten allerdings zu keinem weiteren Zeitpunkt der Methodenentwicklung getrennt werden und eluierten stets zusammen.

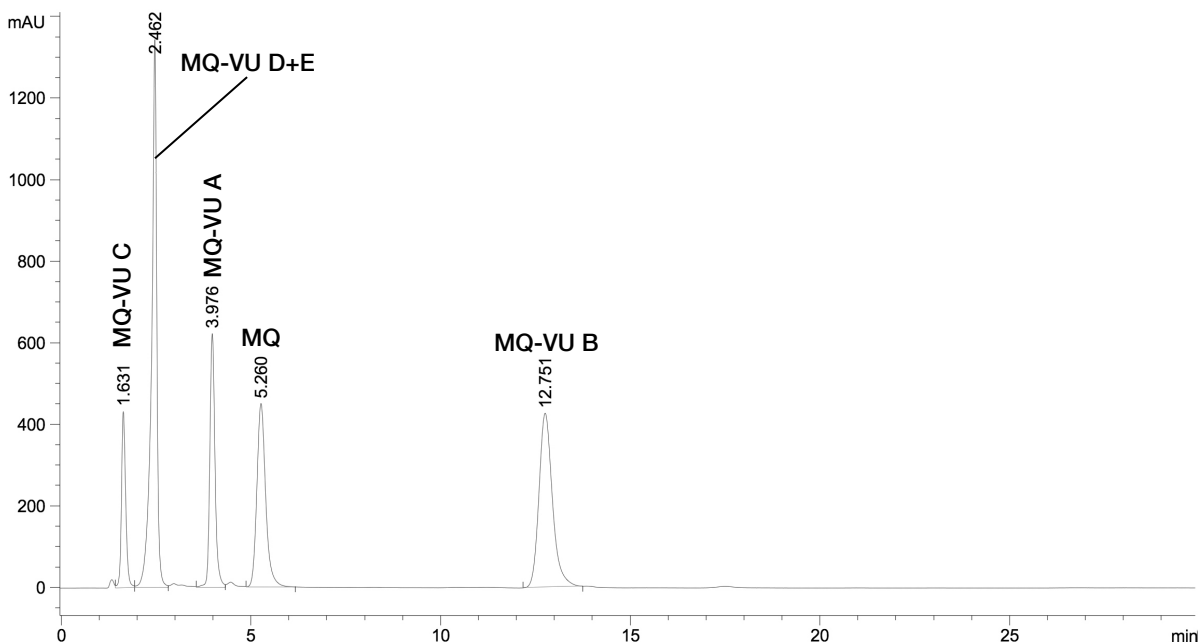


Abbildung 5.5.2-1: Bestimmung von Mefloquin unter Verwendung der optimierten Methode.

Die weitere Erhöhung der Puffermolarität auf 0.08 ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ) und 0.027 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) mol/l verbesserte die Auftrennung nochmals deutlich (siehe Abbildung 9.4.3-8) und die anschließende Erhöhung des  $\text{pH}$ -Wertes auf 3.0 führte zu sehr guten Peaksymmetrien. Der Anteil an Methanol

(65 sowie 67.5 % (V/V)) beeinflusste hier die Auftrennung kaum und bei 65 % (V/V) konnten alle Verbindungen, mit Ausnahme der Verunreinigungen D und E, innerhalb von 15 Minuten voneinander getrennt werden (siehe Abbildungen 9.4.3-9 und 9.4.3-10).

Als letzter Schritt wurde der Puffer dahingehend vereinfacht, dass nur Natriumdihydrogenphosphat (0.1 mol/l,  $pH=3.0$ ) verwendet wurde, sodass zur Herstellung der mobilen Phase nur noch dieses notwendig ist. Ein unter Verwendung dieser Pufferlösung (MeOH 65 % (V/V)) erhaltenes Chromatogramm ist in Abbildung 5.5.2-1 dargestellt.

### 5.5.3 Methodenvvalidierung

#### Linearität

Die Bestimmung der Linearität erfolgte im Konzentrationsbereich 10.0-1000.0  $\mu\text{g/ml}$  (Mefloquin, Einfachinjektion) sowie 0.5-3.0  $\mu\text{g/ml}$  (Verunreinigungen A-E, Dreifachinjektion; siehe Tabellen 5.5.3-1 und 5.5.3-2 sowie Abbildung 5.5.3.-1). Es erfolgte eine lineare Regression der Peakflächen über die Konzentration.

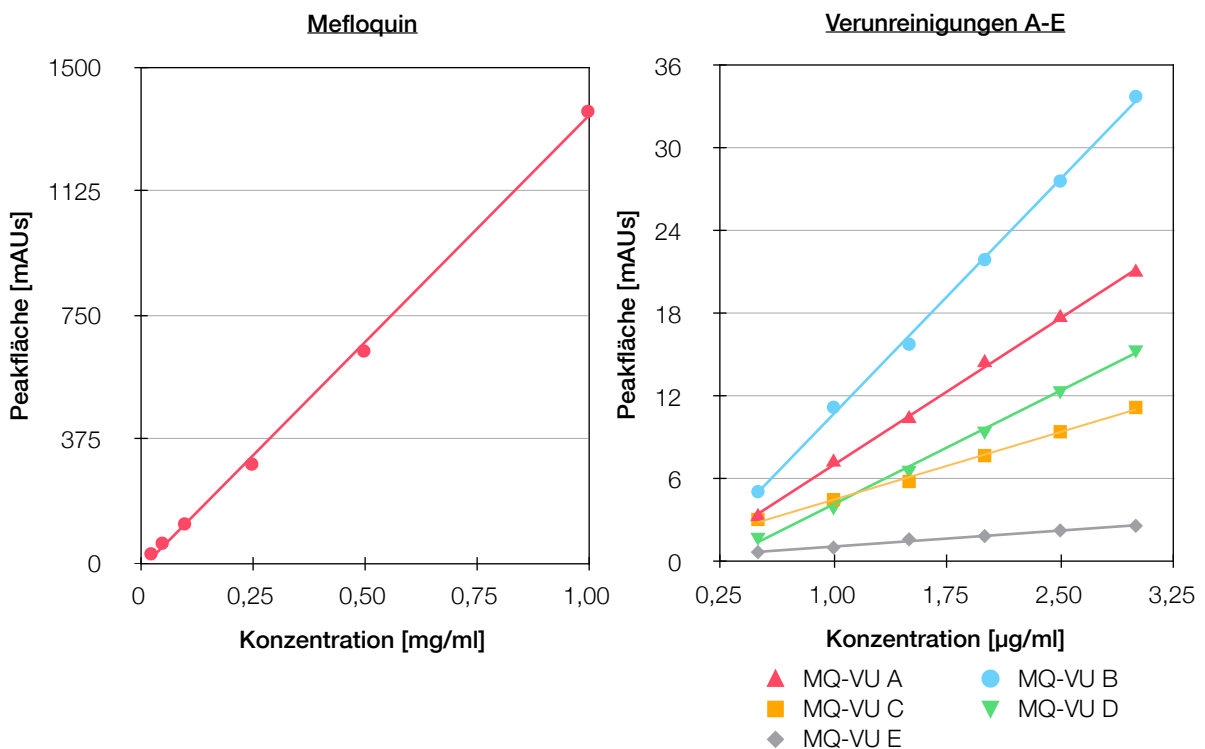


Abbildung 5.5.3-1: Regressionsplots für Mefloquin und die Verunreinigungen A-E.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 5.5.3-1:** Mefloquin: Daten der Linearitätsbestimmung.

| Konz. [µg/ml]      | MQ      | MQ-VU A | MQ-VU B | MQ-VU C | MQ-VU D | MQ-VU E |
|--------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Peakflächen [mAUs] |         |         |         |         |         |         |
| 0.5                | -       | 3.27    | 5.07    | 3.06    | 1.77    | 0.68    |
| 1.0                | -       | 7.21    | 11.20   | 4.49    | 3.98    | 1.01    |
| 1.5                | -       | 10.37   | 15.77   | 5.81    | 6.63    | 1.62    |
| 2.0                | -       | 14.43   | 21.91   | 7.69    | 9.47    | 1.85    |
| 2.5                | -       | 17.70   | 27.61   | 9.42    | 12.40   | 2.26    |
| 3.0                | -       | 20.99   | 33.75   | 11.18   | 15.37   | 2.59    |
| 10.0               | 8.70    | -       | -       | -       | -       | -       |
| 25.0               | 26.40   | -       | -       | -       | -       | -       |
| 50.0               | 58.40   | -       | -       | -       | -       | -       |
| 100.0              | 116.76  | -       | -       | -       | -       | -       |
| 250.0              | 297.50  | -       | -       | -       | -       | -       |
| 500.0              | 639.57  | -       | -       | -       | -       | -       |
| 1000.0             | 1363.98 | -       | -       | -       | -       | -       |

**Tabelle 5.5.3-2:** Mefloquin: Regressionsdaten für Mefloquin und die Verunreinigungen A-E.

| Analyt    | Bereich [µg/ml] | Regressionsgleichung | R <sup>2</sup> | LOD [µg/ml] | LOQ [µg/ml] |
|-----------|-----------------|----------------------|----------------|-------------|-------------|
| Mefloquin | 10.0-1000.0     | $y = 1.36x - 18.49$  | 0.9987         | -           | -           |
| MQ-VU A   | 0.5-3.0         | $y = 7.09x - 0.09$   | 0.9988         | 0.1         | 0.4         |
| MQ-VU B   | 0.5-3.0         | $y = 11.36x - 0.66$  | 0.9986         | 0.1         | 0.4         |
| MQ-VU C   | 0.5-3.0         | $y = 3.27x + 1.21$   | 0.9965         | 0.2         | 0.6         |
| MQ-VU D   | 0.5-3.0         | $y = 5.49x - 1.34$   | 0.9976         | 0.2         | 0.5         |
| MQ-VU E   | 0.5-3.0         | $y = 0.77x + 0.32$   | 0.99895        | 0.4         | 1.1         |

### Wiederholpräzision

Die Wiederholpräzision wurde durch eine Zehnfachinjektion der Mefloquin-Testlösung bestimmt und die Standardabweichungen bzw. relativen Standardabweichungen der jeweiligen Retentionszeiten und Peakflächen berechnet. Es wurden Werte im Bereich 0.177-0.613 %, bzw. im Falle der Peakflächen, zwischen 0.217 und 0.797 % (relative Standardabweichung) gefunden (siehe Tabelle 5.5.3-3 und Abbildung 5.5.3-2). Die Werte zeigen eine sehr gute Wiederholbarkeit an, da sie deutlich unterhalb von 2 % liegen [136, 137].

**Tabelle 5.5.3-3:** Mefloquin: Wiederholpräzision.

|                           | MQ                            | MQ-VU A       | MQ-VU B        | MQ-VU C       | MQ-VU D+E      |
|---------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| <b>Injektion</b>          | <b>Retentionszeiten [min]</b> |               |                |               |                |
| 1                         | 5.60                          | 4.00          | 14.02          | 1.65          | 2.44           |
| 2                         | 5.66                          | 4.03          | 14.06          | 1.66          | 2.49           |
| 3                         | 5.66                          | 4.03          | 14.07          | 1.65          | 2.49           |
| 4                         | 5.67                          | 4.04          | 14.10          | 1.66          | 2.49           |
| 5                         | 5.66                          | 4.03          | 14.07          | 1.65          | 2.49           |
| 6                         | 5.67                          | 4.04          | 14.08          | 1.66          | 2.49           |
| 7                         | 5.67                          | 4.04          | 14.08          | 1.66          | 2.49           |
| 8                         | 5.67                          | 4.04          | 14.09          | 1.66          | 2.49           |
| 9                         | 5.68                          | 4.04          | 14.10          | 1.66          | 2.49           |
| 10                        | 5.68                          | 4.04          | 14.09          | 1.66          | 2.49           |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>5.66</b>                   | <b>4.03</b>   | <b>14.08</b>   | <b>1.66</b>   | <b>2.48</b>    |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>0.022</b>                  | <b>0.012</b>  | <b>0.025</b>   | <b>0.003</b>  | <b>0.015</b>   |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b> | <b>0.387</b>                  | <b>0.296</b>  | <b>0.177</b>   | <b>0.198</b>  | <b>0.613</b>   |
|                           | MQ                            | MQ-VU A       | MQ-VU B        | MQ-VU C       | MQ-VU D+E      |
| <b>Injektion</b>          | <b>Peakflächen [mAU]</b>      |               |                |               |                |
| 1                         | 1299.06                       | 181.95        | 1932.59        | 637.77        | 2813.24        |
| 2                         | 1324.61                       | 182.77        | 1935.82        | 651.75        | 2874.63        |
| 3                         | 1323.63                       | 183.56        | 1936.33        | 652.09        | 2876.11        |
| 4                         | 1323.59                       | 184.43        | 1938.07        | 651.86        | 2875.86        |
| 5                         | 1326.00                       | 184.08        | 1938.66        | 652.82        | 2872.29        |
| 6                         | 1326.22                       | 186.40        | 1946.97        | 655.60        | 2884.62        |
| 7                         | 1322.03                       | 184.33        | 1938.02        | 654.00        | 2877.54        |
| 8                         | 1324.25                       | 184.01        | 1940.70        | 654.64        | 2880.93        |
| 9                         | 1324.05                       | 184.62        | 1943.10        | 654.15        | 2881.05        |
| 10                        | 1326.87                       | 184.69        | 1943.14        | 655.39        | 2884.57        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>1322.03</b>                | <b>184.08</b> | <b>1939.34</b> | <b>652.01</b> | <b>2872.09</b> |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>8.200</b>                  | <b>1.191</b>  | <b>4.209</b>   | <b>5.198</b>  | <b>21.085</b>  |
| <b>rel. Std.-Abw.</b>     | <b>0.620</b>                  | <b>0.647</b>  | <b>0.217</b>   | <b>0.797</b>  | <b>0.734</b>   |

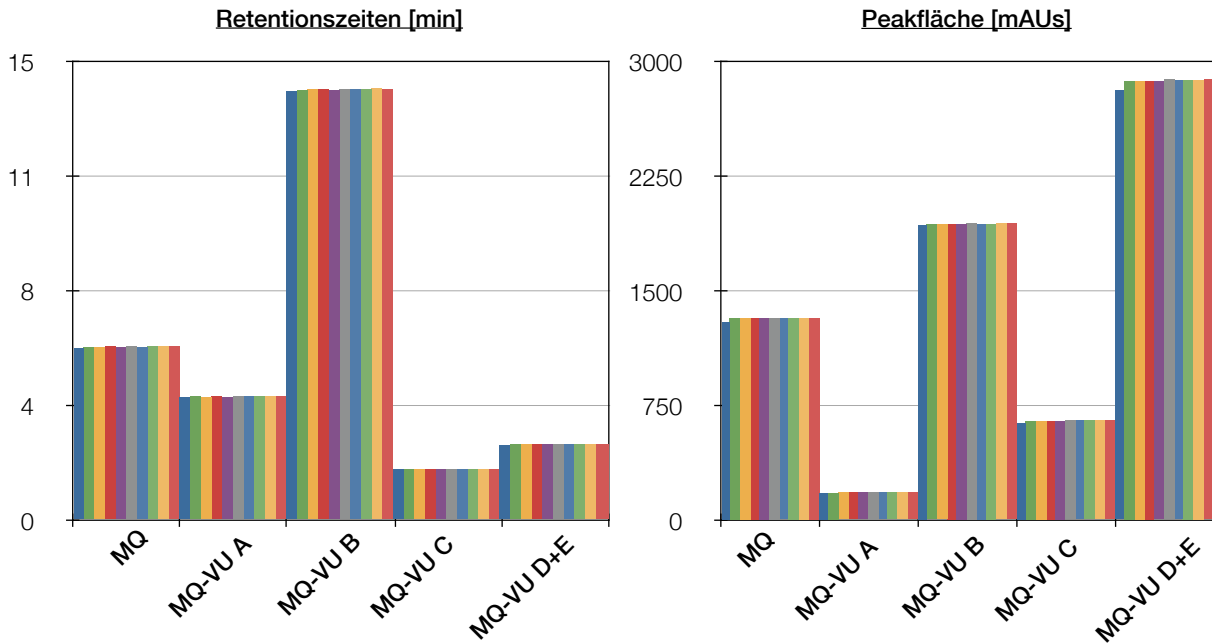


Abbildung 5.5.3-2: Mefloquin: Wiederholpräzision.

**Robustheit: Trenntemperatur**

Der Einfluss der Trenntemperatur auf die Auflösung zwischen den Signalen der Verunreinigungen C und E sowie zwischen Verunreinigung A und Mefloquin wurde im Bereich 25.0-45.0 °C untersucht.

Es zeigte sich, dass die Temperatur nur einen sehr geringen Einfluss auf die Trennung der Analyten ausübt, denn in jedem Fall waren die Auflösungen deutlich überhalb einem Wert von jeweils 1.5 (siehe Tabelle 5.3.3-4 sowie Abbildung 5.5.3-3).

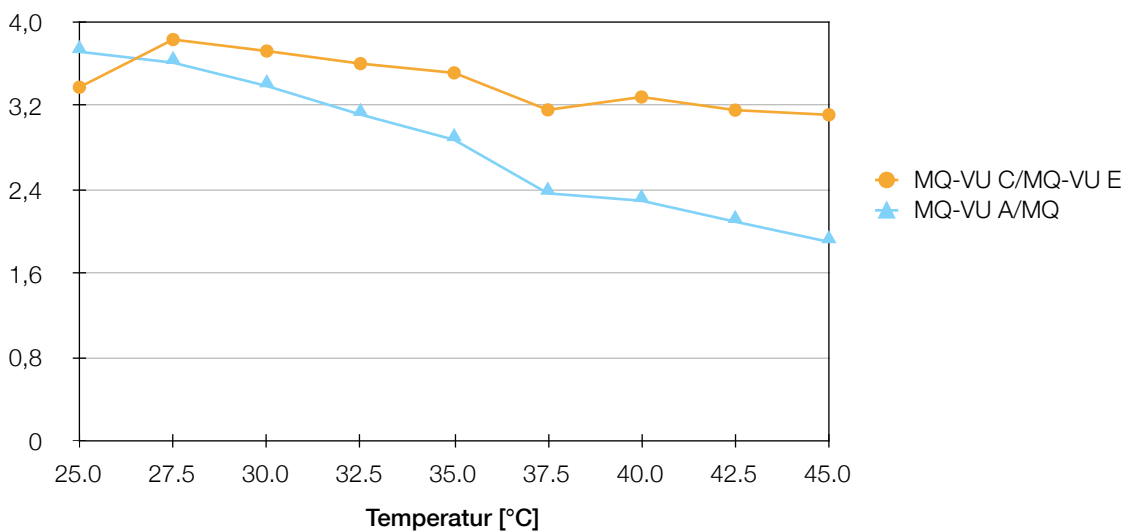


Abbildung 5.5.3-3: Mefloquin: Einfluss der Trenntemperatur auf die Auflösung verschiedener Substanzpaare.

**Tabelle 5.5.3-4:** Mefloquin: Robustheit gegenüber der Trenntemperatur.

| Temperatur [°C]   | $R_s$<br>MQ-VU C/E | $R_s$<br>MQ-VU A/MQ |
|-------------------|--------------------|---------------------|
| 25.0 <sup>#</sup> | 3.38               | 3.71                |
| 27.5              | 3.83               | 3.61                |
| 30.0              | 3.72               | 3.39                |
| 32.5              | 3.60               | 3.11                |
| 35.0              | 3.51               | 2.87                |
| 37.5              | 3.16               | 2.36                |
| 40.0              | 3.28               | 2.29                |
| 42.5              | 3.16               | 2.09                |
| 45.0              | 3.11               | 1.90                |

<sup>#</sup>: Entspricht der Durchführung der Chromatographie bei Raumtemperatur.

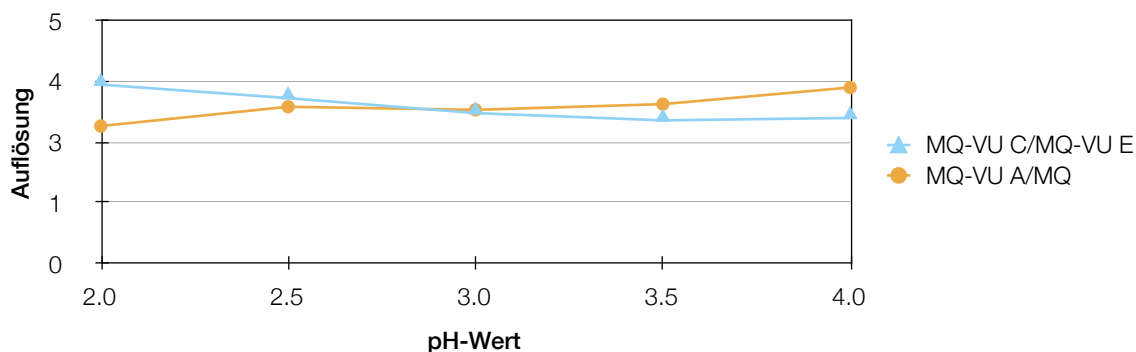
**Robustheit: *pH*-Wert der mobilen Phase**

Der *pH*-Wert der mobilen Phase wurde im Bereich 2.0-4.0 variiert und der Einfluss auf die Auftrennung der Signalpaare Verunreinigung C und E bzw. Verunreinigung A und Mefloquin beobachtet. In beiden Fällen konnte keine signifikante Verschlechterung der Trennleistung festgestellt werden, denn die Auflösungen lagen auch hier in jedem Fall deutlich über einem Wert von 3.0 (siehe Tabelle 5.5.3-5 sowie Abbildung 5.5.3-4).

**Tabelle 5.5.3-5:** Mefloquin: Robustheit gegenüber dem *pH*-Wert der mobilen Phase.

| <i>pH</i> -Wert  | $R_s$<br>MQ-VU C/E | $R_s$<br>MQ-VU A/MQ |
|------------------|--------------------|---------------------|
| 2.0              | 3.68               | 2.82                |
| 2.5              | 3.40               | 3.20                |
| 3.0 <sup>#</sup> | 3.09               | 3.16                |
| 3.5              | 2.94               | 3.28                |
| 4.0              | 2.99               | 3.62                |

<sup>#</sup>: Entspricht dem *pH*-Wert der optimierten Endmethode.



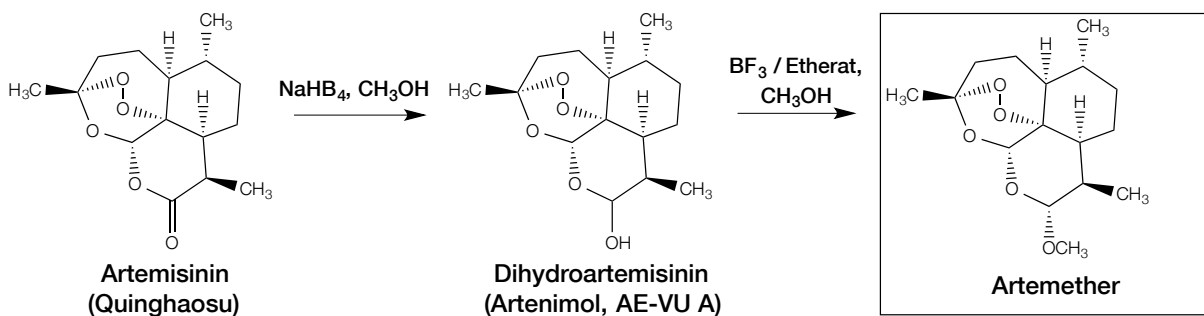
**Abbildung 5.5.3-4:** Mefloquin: Einfluss des *pH*-wertes auf die Auflösung verschiedener Substanzpaare.

## 5.6 Artemether/Lumefantrin

### 5.6.1 Gewinnungs- bzw. Synthesewege und Pharmakologie

#### Artemether

Artemether ((3*R*, 5*aS*, 6*R*, 8*aS*, 9*R*, 10*S*, 12*R*, 12*aR*)-Decahydro-10-methoxy-3,6,9-trimethyl-3,12-epoxy-12*H*-pyrano[4,3-*j*]-1,2-benzodioxepin, siehe Abbildung 1.3.3.5-1) ist der Methyl-ether des Artemisinin (*Qinghaosu*). Es kann aus diesem durch Reduktion mit Natriumborhydrid in Methanol sowie Umsetzung mit Bortrifluorid-Etherat hergestellt werden [171, 172].



**Abbildung 5.6.1-1:** Darstellung von Artemether ausgehend von Artemisinin.

Artemisinin selbst wird durch Extraktion aus den Blättern und Blüten der Pflanze *Artemisia annua* L. gewonnen. Zwar sind Total- und partialsynthetische Darstellungen beschrieben, allerdings sind sie in der Regel sehr aufwändig und mit geringen Ausbeuten verbunden [173-177]. Auch die biotechnologische Herstellung wird an mehreren Stellen diskutiert [178, 179].

Alle Artemisinin-derivate haben ein Endoperoxid in Form eines 1,2,4-Trioxans gemeinsam, welches den eigentlichen Pharmakophor darstellt. Der genaue Wirkmechanismus der Verbindungen konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden, man vermutet jedoch zum einen den Eisen-(II)-katalysierten Aufbruch des Endoperoxids unter Bildung von Kohlenstoffradikalen und die anschließende unselektive Schädigung der parasitären Zellproteine bzw. -strukturen. Neueren Erkenntnissen von Golenser *et al.* zur Folge findet zusätzlich eine Blockade membranständiger Calciumtransportproteine des endoplasmatischen Retikulums statt [180]. Resistenzen gegenüber den Substanzen sind beschrieben worden, allerdings treten sie bisher in einem wesentlich geringeren Ausmaß auf, als es bei den Chinolinderivaten der Fall ist. Artemisinin-derivate sind nach wie vor, insbesondere in Kombination mit anderen antiplasmodial wirksamen Substanzen, wichtige Wirkstoffe zur Behandlung der Malaria.



**Lumefantrin**

Der Arylaminoalkohol Lumefantrin ((*RS*)-2-(Dibutylamino)-1-[(*9E*)-2,7-dichlor-9-[(4-chlorphenyl)-methyliden]-fluoren-4-yl]ethanol) kann nach Deng *et al.* und Zhong *et al.* wie folgt dargestellt werden (siehe Abbildung 5.6.1-2): Fluoren (LF-VU A) wird zu 2,7-Dichlorfluoren (LF-VU B) umgesetzt und dieses anschließend in einer Friedel-Crafts-Reaktion zu 2,7-Dichlor-4-chloracetylfluoren acetyliert. Nach Reduktion mit Kaliumborhydrid und Kopplung mit Dibutylamin wird der Dibutylaminomethyl-(2,7-Dichlorfluoren-4-yl)methanol gebildet und anschließend mit 4-Chlorbenzaldehyd (LF-VU C) zu Lumefantrin kondensiert [181, 182].

Der Arzneistoff wird auch als Benflumetol bezeichnet. In Analogie zu Mefloquin ist beim Lumefantrin der genaue Wirkmechanismus ebenfalls noch nicht aufgeklärt worden, vermutlich stört der Stoff jedoch, ähnlich den anderen Vertretern der Arzneistoffgruppe, den Hämoglobinstoffwechsel der Parasiten.

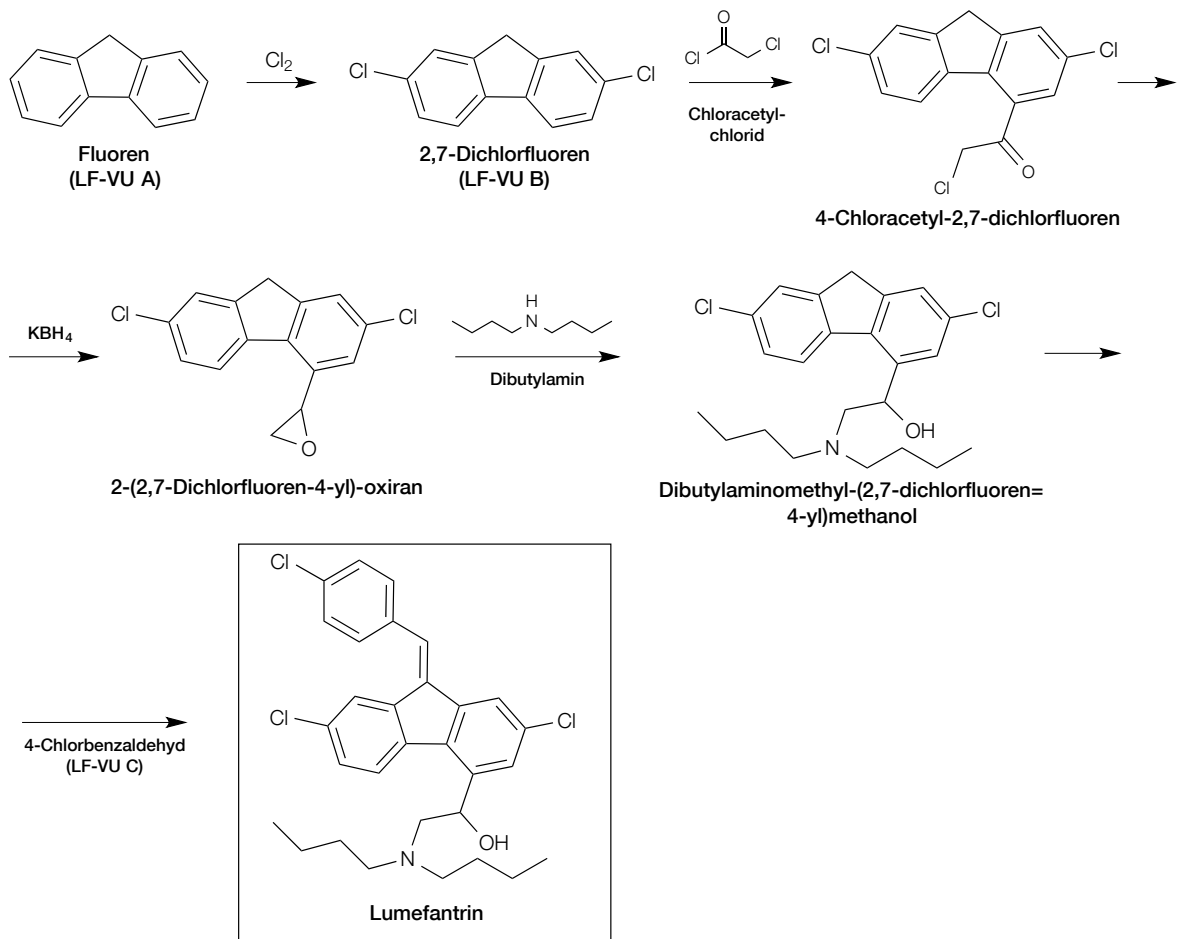


Abbildung 5.6.1-2: Syntheseweg und daraus abgeleitete, potentielle Verunreinigungen für Lumefantrin.

### 5.6.2 Methodenentwicklung und -optimierung

Die Arzneistoffe Artemether und Lumefantrin sind in der Regel als Kombinationspräparat kommerziell erhältlich, sodass eine Methode entwickelt wurde, mit der beide Substanzen gleichzeitig erfasst werden können. Artemether und seine mögliche Verunreinigung Dihydroartemisinin verfügen über keinen Chromophor, das die Detektion mit einem UV/Vis-Spektrometer bei Standardwellenlängen (z. B.  $\lambda=254$  nm) erlaubt, sodass hier besondere Anforderungen an die Analytik gestellt werden. Zudem ist in den Fertigarzneimitteln die Lumefantrin-Konzentration sechsfach höher als die von Artemether (120 versus 20 mg), sodass nach einem Kompromiss zwischen einem genügend hohem Verdünnungsgrad der Probelösungen zur Detektion von Lumefantrin und einer ausreichend hohen Konzentration an Artemether in derselben Lösung gesucht werden muss [62].

Monographien für beide Arzneistoffe fehlen im Europäischen Arzneibuch, die USP enthält eine entsprechende Vorschrift für Lumefantrin, wohingegen im Internationalen Arzneibuch eine Methode zur Bestimmung beider Substanzen in Tabletten zu finden ist. In der USP und der *Ph. Int.* ist jeweils eine Ionenpaarchromatographische Methode an einer RP-18-Säule beschrieben, als Reagenz hierfür wird Natriumhexansulfonat und als organisches Lösungsmittel Isopropanol bzw. Acetonitril in Verbindung mit einer Gradientenelution verwendet. Im Internationalen Arzneibuch wird lediglich die Reinheit von Artemether mittels DC bestimmt, die Gehaltsbestimmung erfolgt für beide Analyten gleichzeitig anhand der oben genannten HPLC-Methode. Die *Verwandten Substanzen* von Lumefantrin bleiben unberücksichtigt. Zur Detektion der Analyten ist vorgesehen, innerhalb der ersten 30 Minuten eine Wellenlänge von  $\lambda=210$  nm, danach von  $\lambda=380$  nm zu verwenden [183, 184].

Literaturmethoden beschreiben ebenfalls die Bestimmung von Artemether bzw. Lumefantrin alleine oder ihrer Kombination, dann meist aus Fertigarzneimitteln oder aus Blutplasma. So sind beispielsweise bei Thomas *et al.*, Yao *et al.*, Muhia *et al.*, Cesar *et al.* oder Atemnkeng *et al.* flüssigchromatographische Protokolle zu finden, mit denen Artemether auf RP-18-Säulen unter Verwendung von Acetonitril-Wasser-Gemischen bestimmt wird [185-189]. Karbwang *et al.* setzten zur Bestimmung eine stationäre Phase mit Nitril-Substitution ein und Navaratnam *et al.* konnten Artemether auf die gleiche Weise in Verbindung mit einer elektrochemischen Detektion bestimmen [190, 191]. Untersuchungen zu Lumefantrin sind bei Lindegardh *et al.*, Zeng *et al.* und Mansor *et al.* beschrieben. Der Stoff wurde hier entweder auf RP-18-Säulen in Verbindung mit sauren mobilen Phasen unter Verwendung von Acetonitril, oder, in Analogie zu den Methoden von Karbwang *et al.* und Navaratnam *et al.*, auf einer Nitrilsäule in Verbindung mit einem ebenfalls sauren Phosphatpuffer als mobile Phase bestimmt [192-194]. Die Methoden wurden sowohl dazu entwickelt, um lediglich Lumefantrin zu bestimmen (z. B. in Blutplasma),

als auch verschiedene Verunreinigungen abzutrennen und zu bestimmen.

Arbeiten zur Auftrennung beider Arzneistoffe sind bei Kalyankar *et al.*, Sunil *et al.*, Cesar *et al.* oder Arun *et al.* zu finden. Hier werden ebenfalls vornehmlich saure, Acetonitril-haltige mobile Phasen verwendet, um die Analyten an RP-18-Säulen aufzutrennen und zu bestimmen [195-198]. Kalyankar *et al.* und Cesar *et al.* fügten noch Trifluoressigsäure hinzu, die ebenfalls als schwaches Ionenpaarreagenz eingesetzt werden kann und gleichzeitig einen sauren *pH*-Wert der mobilen Phase gewährleistet.

Unter Berücksichtigung der angeführten Methoden wurde versucht, die Arzneistoffe Artemether und Lumefantrin sowie insgesamt vier potentielle Verunreinigungen (siehe Kapitel 5.6.1) aufzutrennen. Zunächst wurde anhand des Fertigarzneimittels „Riamet“, welches Artemether und Lumefantrin im genannten Konzentrationsverhältnis enthält, versucht, eine Auftrennung unter einfachsten Bedingungen zu etablieren. Hierbei zeigte sich, dass Säule D in Verbindung mit einer mobilen Phase bestehend aus einer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung (0.02 mol/l, *pH*=2.5) und einem Methanolanteil von 80-85% (V/V) hierfür gut geeignet ist (siehe Abbildung 9.4.4-1). Bei der gewählten Detektionswellenlänge von  $\lambda=210$  nm zeigte sich bereits hier der große Unterschied in der Signalintensität zwischen Lumefantrin und Artemether, der nicht zuletzt durch die schwache UV-Absorption des Artemisininderivates begründet ist. Der Ersatz des Phosphatpuffers durch reines Wasser, das lediglich mit Phosphorsäure auf einen *pH*-Wert von 2.50 eingestellt wurde, verschlechterte die Trennung nicht und die Trennung beider Analyten war stets gewährleistet (siehe Abbildungen 9.4.4-2 bis 9.4.4-4).

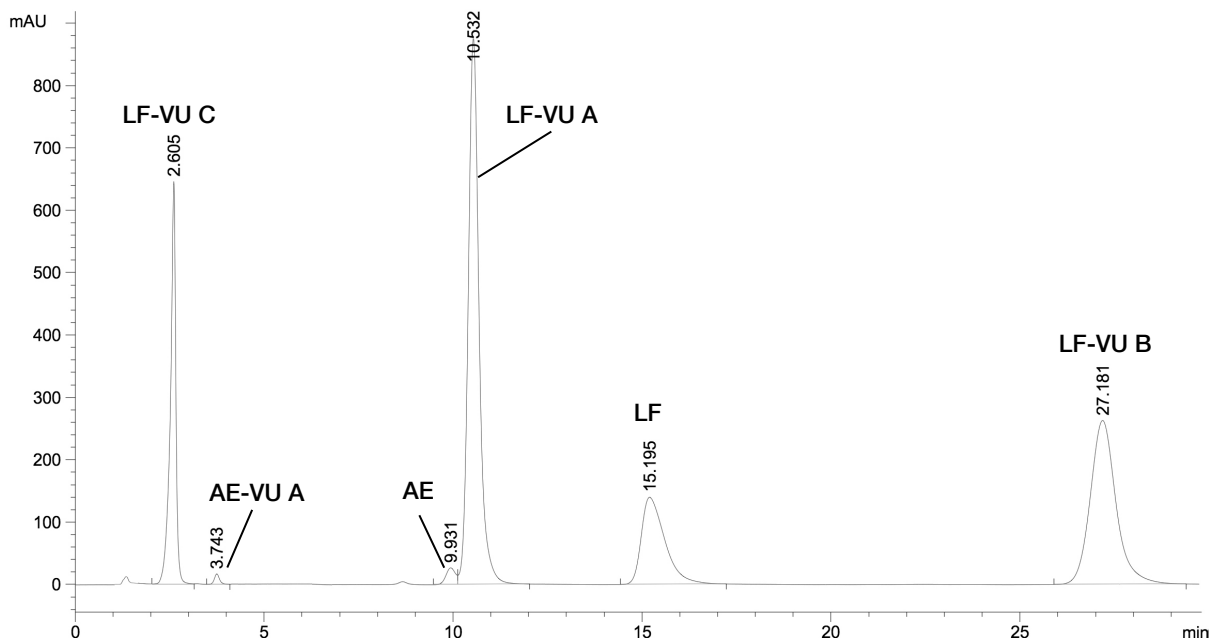
Die Berücksichtigung der beschriebenen möglichen Verunreinigungen führte jedoch dazu, dass unter den sehr einfachen Bedingungen keine zufriedenstellende Auftrennung erreicht werden konnte, auch nicht durch Anpassung des Methanolanteiles in der mobilen Phase. Wie in den Abbildungen 9.4.4-5 und 9.4.4-6 ersichtlich, fallen entweder die Signale der Artemether-Verunreinigung A und der Lumefantrin-Verunreinigung C oder der Lumefantrin-Verunreinigung C und Lumefantrin selbst zusammen. Dieser Umstand konnte auch durch die Erhöhung des *pH*-Wertes auf 3.0 bzw. 3.5 nicht gelöst werden (siehe Abbildungen 9.4.4-7 und 9.4.4-8).

Durch den Wechsel zur wesentlich hydrophoberen Säule A konnte eine verbesserte Auftrennung aller untersuchten Substanzen erreicht werden (siehe Abbildung 9.4.4-9): Obwohl der zu Lumefantrin gehörende Peak noch ein starkes Tailing zeigte und die Elutionsreihenfolge der Analyten verändert wurde, war das Signalmuster dennoch wesentlich besser als bei den zuvor durchgeführten Experimenten. Auch hier wurde immer noch eine mobile Phase bestehend aus angesäuertem Wasser (*pH*=2.5) und Methanol verwendet und alle Verbindungen wurden nach 20 Minuten eluiert. Eine weitere Erniedrigung des Methanolanteiles von 80 auf 77.5 % (V/V) verbesserte die Selektivität signifikant, allerdings zeigten viele Signale weiterhin ein ausge-

prägtes Tailing. Dies konnte verhindert werden, indem wieder eine Phosphat-Pufferlösung (0.05 mol/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) verwendet wurde, sodass diese für die mobile Phase der optimierten Endmethode ausgewählt wurde. Alle Analyten, mit Ausnahme von Artemether und der Lumefantrin-Verunreinigung A, konnten basisliniengetrennt werden ( $R_s=1.2$ , siehe Abbildung 9.4.4-10) und die Gesamtlaufzeit der Chromatographie betrug 30 Minuten. Die hohe Lipophilie der Lumefantrin-Verunreinigung C, einem substituierten aromatischen Polyzyklus, ist hier in Analogie zur Proguanil-Verunreinigung D maßgeblich für die lange Retentionszeit des Analyten verantwortlich.

**Tabelle 5.6.2-1:** Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Artemether und Lumefantrin.

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Säule:</b>             | Säule A  |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 22.5 % (V/V) einer 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung, $\text{pH}=2.5$ ; 77.5 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min   |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 $\mu\text{l}$   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur, unkontrolliert   |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, $\lambda=210$ nm   |



**Abbildung 5.6.2-1:** Bestimmung von Artemether und Lumefantrin unter Verwendung der optimierten Methode.

### 5.6.3 Methodenvalidierung

#### Linearität

Die Linearität wurde für die untersuchten Verbindungen in folgenden Konzentrationsbereichen bestimmt: Artemether 1.0-10.0 mg/ml (Einfachinjektion), Lumefantrin 0.01-0.5 mg/ml (Einfachinjektion), Artemether-Verunreinigung A 20-120 µg/ml (Dreifachinjektion), Lumefantrin-Verunreinigungen A-C 0.5-3 µg/ml (Dreifachinjektion). Nachweis- und Bestimmungsgrenze der untersuchten Verunreinigungen wurden jeweils gemäß den Angaben der ICH-Richtlinie Q2(R1) aus den Kalibriergeraden berechnet (siehe Tabellen 5.6.3-1 und 5.6.3-2) [90]. Die Werte für Nachweis- und Bestimmungsgrenze lagen im Fall der Lumefantrin-Verunreinigungen A-C unterhalb von 1.5 %; im Fall der Artemether-Verunreinigung A bei 0.6 % (LOD) bzw. 1.84 % (LOQ). Diese hohen Werte liegen in der geringen UV-Aktivität der Artemisinin-derivate begründet.

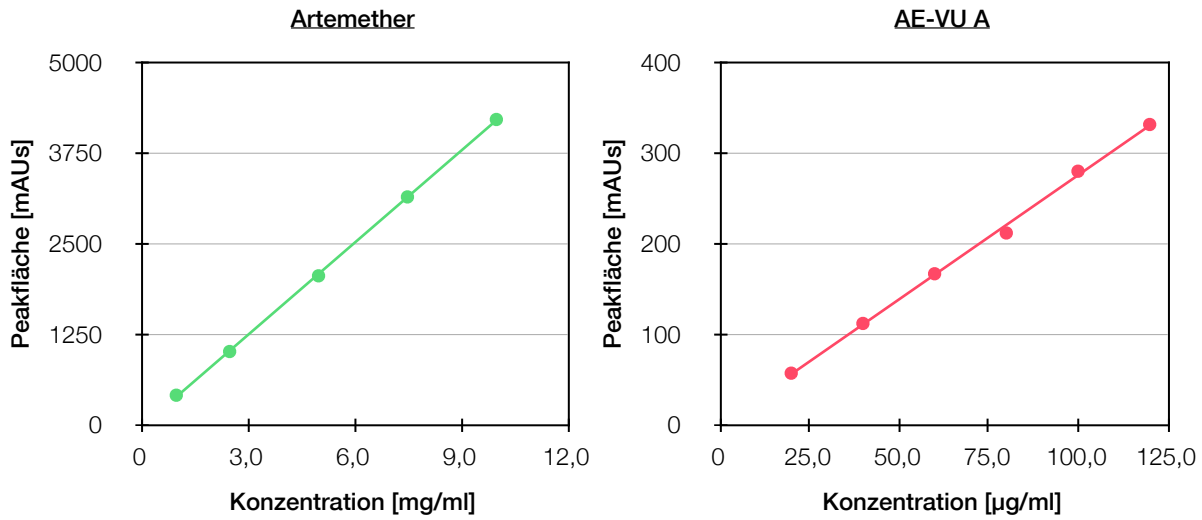
**Tabelle 5.6.3-1:** Artemether/Lumefantrin: Daten der Linearitätsbestimmung.

| Konz. [µg/ml]                        | AE bzw. LF | AE-VU A | LF-VU A | LF-VU B | LF-VU C |
|--------------------------------------|------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Peakflächen Artemether [mAU]</b>  |            |         |         |         |         |
| 1000.0                               | 398.8      | -       | -       | -       | -       |
| 2500.0                               | 1000.99    | -       | -       | -       | -       |
| 5000.0                               | 2044.23    | -       | -       | -       | -       |
| 7500.0                               | 3131.74    | -       | -       | -       | -       |
| 10000.0                              | 4199.07    | -       | -       | -       | -       |
| <b>Peakflächen Lumefantrin [mAU]</b> |            |         |         |         |         |
| 10.0                                 | 176.84     | -       | -       | -       | -       |
| 50.0                                 | 1673.92    | -       | -       | -       | -       |
| 100.0                                | 3339.33    | -       | -       | -       | -       |
| 250.0                                | 8249.28    | -       | -       | -       | -       |
| 500.0                                | 16262.07   | -       | -       | -       | -       |
| <b>Peakflächen AE-VU A [mAU]</b>     |            |         |         |         |         |
| 20.0                                 | -          | 56.21   | -       | -       | -       |
| 40.0                                 | -          | 111.04  | -       | -       | -       |
| 60.0                                 | -          | 165.82  | -       | -       | -       |
| 80.0                                 | -          | 210.80  | -       | -       | -       |
| 100.0                                | -          | 278.88  | -       | -       | -       |
| 120.0                                | -          | 330.40  | -       | -       | -       |
| <b>Peakflächen LF-VU A-C [mAU]</b>   |            |         |         |         |         |
| 0.5                                  | -          | -       | 66.12   | 34.09   | 95.28   |
| 1.0                                  | -          | -       | 127.96  | 78.78   | 122.51  |
| 1.5                                  | -          | -       | 185.53  | 114.19  | 129.81  |
| 2.0                                  | -          | -       | 250.92  | 154.25  | 153.75  |
| 2.5                                  | -          | -       | 315.46  | 215.63  | 174.98  |
| 3.0                                  | -          | -       | 398.01  | 240.35  | 198.73  |

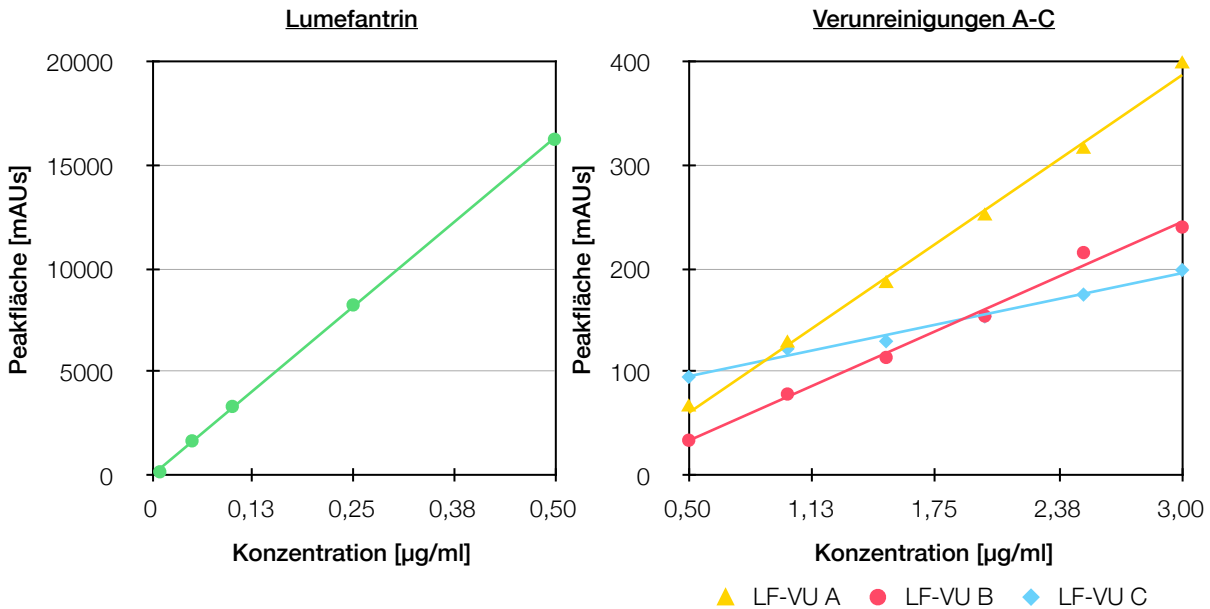
## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 5.6.3-2:** Artemether/Lumefantrin: Regressionsdaten für Artemether, Lumefantrin und die Verunreinigungen AE-VU A sowie LF-VU A-C.

| Analyt             | Bereich [µg/ml]       | Regressionsgleichung       | R <sup>2</sup> | LOD [µg/ml] | LOQ [µg/ml] |
|--------------------|-----------------------|----------------------------|----------------|-------------|-------------|
| <b>Artemether</b>  | <b>1000.0-10000.0</b> | <b>y = 423.49x - 47.18</b> | <b>0.99985</b> | -           | -           |
| AE-VU A            | 20.0-120.0            | y = 2.74x + 0.24           | 0.99806        | 6.1         | 18.4        |
| <b>Lumefantrin</b> | <b>10.0-500.0</b>     | <b>y = 32650x - 2.09</b>   | <b>0.99976</b> | -           | -           |
| LF-VU A            | 0.5-3.0               | y = 130.71x - 4.73         | 0.99657        | 0.2         | 0.6         |
| LF-VU B            | 0.5-3.0               | y = 84.681x - 8.64         | 0.99207        | 0.3         | 0.9         |
| LF-VU C            | 0.5-3.0               | y = 39.92x + 75.98         | 0.98662        | 0.4         | 1.2         |



**Abbildung 5.6.3-1:** Artemether: Bestimmung der Linearität.



**Abbildung 5.6.3-2:** Lumefantrin: Bestimmung der Linearität.

### Wiederholpräzision

Durch Injektion einer Testlösung, die alle zu bestimmenden Analyten enthielt (zehnfach), wurde die Wiederholpräzision der Methode überprüft. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 5.6.3-3 sowie Abbildung 5.6.3-3 dargestellt und die relativen Standardabweichungen lagen im Bereich 0.193-1.025 % (Retentionszeiten) sowie 0.487-5.353 % (Peakflächen). Die Werte für die Retentionszeiten liegen alle deutlich unter 2.0 %, bei den Peakflächen wurde für die Artemether-Verunreinigung A ein schlechter Wert von 5.35 % gefunden.

**Tabelle 5.6.3-3:** Artemether/Lumefantrin: Wiederholpräzision.

| Injektion                     | AE            | AE-VU A       | LF             | LF-VU A         | LF-VU B         | LF-VU C        |
|-------------------------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <b>Retentionszeiten [min]</b> |               |               |                |                 |                 |                |
| 1                             | 9.84          | 3.72          | 14.99          | 10.40           | 26.63           | 2.60           |
| 2                             | 9.82          | 3.72          | 14.98          | 10.40           | 26.61           | 2.60           |
| 3                             | 9.85          | 3.73          | 15.05          | 10.43           | 26.90           | 2.60           |
| 4                             | 9.90          | 3.73          | 15.17          | 10.48           | 26.99           | 2.61           |
| 5                             | 9.92          | 3.74          | 15.23          | 10.51           | 27.09           | 2.60           |
| 6                             | 9.93          | 3.75          | 15.25          | 10.53           | 27.14           | 2.61           |
| 7                             | 9.95          | 3.75          | 15.30          | 10.55           | 27.22           | 2.61           |
| 8                             | 9.96          | 3.76          | 15.33          | 10.56           | 27.28           | 2.61           |
| 9                             | 9.97          | 3.76          | 15.36          | 10.57           | 27.32           | 2.61           |
| 10                            | 9.98          | 3.76          | 15.37          | 10.58           | 27.36           | 2.61           |
| <b>Mittelwert</b>             | <b>9.91</b>   | <b>3.74</b>   | <b>15.20</b>   | <b>10.50</b>    | <b>27.044</b>   | <b>2.605</b>   |
| <b>Std.-Abw.</b>              | <b>0.057</b>  | <b>0.014</b>  | <b>0.150</b>   | <b>0.069</b>    | <b>0.277</b>    | <b>0.005</b>   |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b>     | <b>0.577</b>  | <b>0.379</b>  | <b>0.990</b>   | <b>0.656</b>    | <b>1.025</b>    | <b>0.193</b>   |
| Injektion                     | AE            | AE-VU A       | LF             | LF-VU A         | LF-VU B         | LF-VU C        |
| <b>Peakflächen [mAU]</b>      |               |               |                |                 |                 |                |
| 1                             | 471.68        | 180.21        | 6308.18        | 18203.30        | 12952.90        | 6799.01        |
| 2                             | 466.46        | 176.03        | 6333.89        | 18234.00        | 13016.30        | 6813.89        |
| 3                             | 467.28        | 169.46        | 6369.04        | 18277.70        | 13064.60        | 6831.50        |
| 4                             | 472.48        | 179.69        | 6366.67        | 18342.60        | 13084.60        | 6864.49        |
| 5                             | 469.41        | 179.53        | 6357.74        | 18312.20        | 13188.30        | 6877.85        |
| 6                             | 472.82        | 186.12        | 6343.80        | 18356.20        | 13228.20        | 6896.61        |
| 7                             | 475.88        | 197.97        | 6346.16        | 18359.60        | 13010.30        | 6910.74        |
| 8                             | 479.54        | 189.16        | 6430.60        | 18437.10        | 13094.50        | 6888.34        |
| 9                             | 476.63        | 179.68        | 6402.90        | 18442.80        | 13259.10        | 6889.38        |
| 10                            | 475.33        | 201.30        | 6371.36        | 189469.10       | 13207.60        | 6948.70        |
| <b>Mittelwert</b>             | <b>472.75</b> | <b>183.91</b> | <b>6363.03</b> | <b>18343.46</b> | <b>13110.64</b> | <b>6872.05</b> |
| <b>Std.-Abw.</b>              | <b>4.210</b>  | <b>9.844</b>  | <b>34.664</b>  | <b>89.302</b>   | <b>104.457</b>  | <b>45.938</b>  |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b>     | <b>0.891</b>  | <b>5.353</b>  | <b>0.545</b>   | <b>0.487</b>    | <b>0.797</b>    | <b>0.668</b>   |

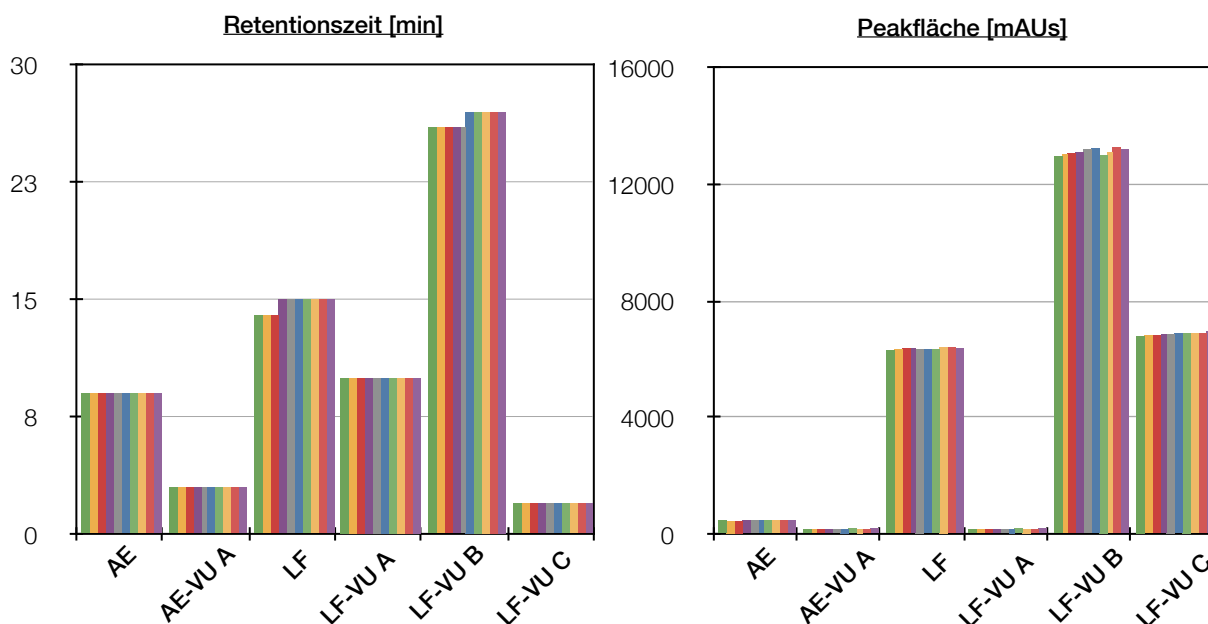


Abbildung 5.6.3-3: Artemether/Lumefantrin: Wiederholpräzision.

### Robustheit: Trenntemperatur

Der Einfluss der Trenntemperatur auf die Auflösung zwischen den Signalen der Lumefantrin-Verunreinigung C und der Artemether-Verunreinigung A, zwischen Artemether und der Lumefantrin-Verunreinigung A sowie zwischen Lumefantrin und der Lumefantrin-Verunreinigung B wurde im Bereich 22.5-40.0 °C untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.6.3-4 und Abbildung 5.6.3-4 dargestellt, wobei ersichtlich ist, dass außer im Falle des Signalpaares Artemether/Lumefantrin-Verunreinigung C keine Veränderung der Trennleistung festzustellen war.

Tabelle 5.6.3-4: Artemether/Lumefantrin: Robustheit gegenüber der Trenntemperatur.

| Temperatur [°C]   | $R_s$<br>LF-VU C/AE-VU A | $R_s$<br>AE/LF-VU A | $R_s$<br>LF/LF-VU B |
|-------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| 22.5              | 4.49                     | 1.24                | 10.17               |
| 25.0 <sup>#</sup> | 4.34                     | 1.22                | 10.5                |
| 27.5              | 4.25                     | 1.19                | 10.48               |
| 30.0              | 4.02                     | 1.16                | 10.44               |
| 32.5              | 3.93                     | 1.13                | 10.18               |
| 35.0              | 4.01                     | 0.00                | 10.01               |
| 37.5              | 4.02                     | 0.00                | 9.93                |
| 40.0              | 3.78                     | 0.00                | 9.66                |

<sup>#</sup>: Entspricht der Durchführung der Chromatographie bei Raumtemperatur.



Ab einer Temperatur von 35 °C fallen diese Signale jedoch zu einem zusammen, sodass eine differenzierte Bestimmung der beiden Analyten bei der gewählten Wellenlänge von  $\lambda=210$  nm nicht mehr möglich ist. Dies ist besonders im Zusammenhang mit dem sehr schwach UV-aktiven Artemether problematisch, da das Signal sehr schnell bereits von geringen Mengen der Lumefantrin-Verunreinigung A überdeckt bzw. vergrößert werden kann. Eine Verbesserung der Auftrennung beider Substanzen unter gleichzeitigem Erhalt der Selektivität gegenüber den übrigen Analyten gelang jedoch nicht, sodass dies als Einschränkung dieser Methode gesehen werden muss. Eine Lösung wäre die Durchführung der Chromatographie bei höheren Wellenlängen, bei denen Artemether nicht mehr, die Lumefantrin-Verunreinigung A jedoch noch ausreichend UV-aktiv ist. In diesem Fall ist aber zwingend die Durchführung zweier separater Chromatographie-Läufe erforderlich, außer es wird ein Diodenarray-Detektionsmodul verwendet.

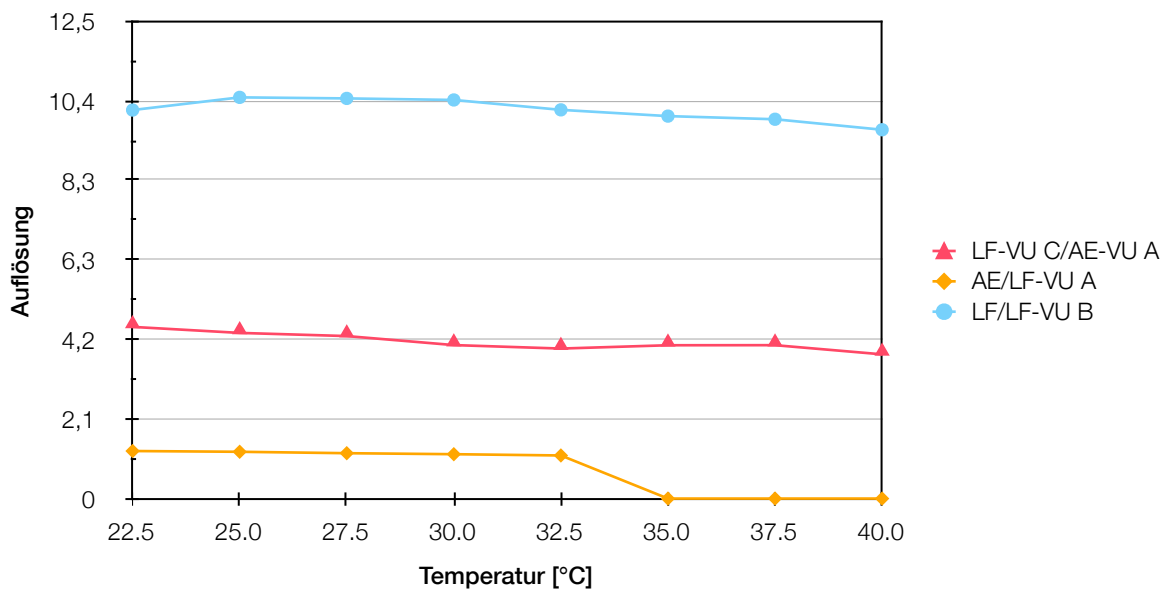


Abbildung 5.6.3-4: Artemether/Lumefantrin: Einfluss der Trenntemperatur.

**Robustheit: *pH*-Wert der mobilen Phase**

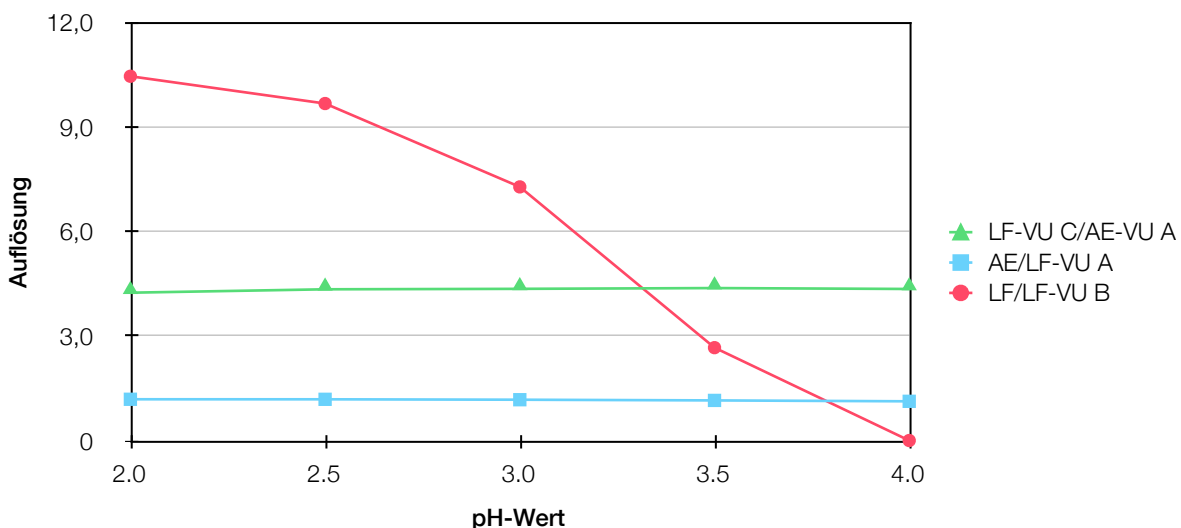
In Tabelle 5.6.3-5 und in Abbildung 5.6.3-5 ist die Beeinflussung der Signaltrennung vom *pH*-Wert der mobilen Phase dargestellt.

**Tabelle 5.6.3-5:** Artemether/Lumefantrin: Robustheit gegenüber dem *pH*-Wert der mobilen Phase.

| <i>pH</i> -Wert  | $R_s$<br>LF-VU C/AE-VU A | $R_s$<br>AE/LF-VU A | $R_s$<br>LF/LF-VU B |
|------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| 2.0              | 4.20                     | 1.18                | 10.44               |
| 2.5 <sup>#</sup> | 4.33                     | 1.18                | 9.66                |
| 3.0              | 4.35                     | 1.17                | 7.27                |
| 3.5              | 4.37                     | 1.15                | 2.66                |
| 4.0              | 4.34                     | 1.12                | 0.00                |

<sup>#</sup>: Entspricht dem *pH*-Wert der optimierten Bestimmungsmethode.

Die Untersuchungen erfolgten analog für die unter „Trenntemperatur“ angeführten Peakpaare. Während der Experimente zeigte sich deutlich, dass die Methode sehr robust gegenüber Schwankungen im *pH*-Bereich von 2.0-4.0 ist, einzig das Peakpaar Lumefantrin/Lumefantrin-Verunreinigung B konnte bei einem *pH*-Wert von 4.0 nicht mehr aufgelöst werden. Das entspricht allerdings bereits einer Differenz von zwei *pH*-Stufen und somit einer Erhöhung der Protonenkonzentration in der Lösung um den Faktor 100. Die Trennungen der übrigen Signalpaare wurden weder durch einen geringeren (2.0), noch durch einen erhöhten (4.0) *pH*-Wert signifikant beeinflusst.



**Abbildung 5.6.3-5:** Artemether/Lumefantrin: Einfluss des *pH*-Wertes der mobilen Phase auf die Selektivität.

## 5.7 Quantifizierung der Wirkstoffe aus Fertigarzneimitteln und Methodenvergleich

Der Gehalt verschiedener genuiner Arzneimittelproben aus Tansania (Amodiaquin: Amodar<sup>®</sup>, Mefloquin: Mephaquin<sup>®</sup>, Artemether/Lumefantrin: Coartem<sup>®</sup>, ALU<sup>®</sup>) bzw. Deutschland (Proguanil: Paludrine<sup>®</sup>) wurde mittels Dünnschichtchromatographie und Flüssigchromatographie untersucht. Im Fall der Dünnschichtchromatographie wurden die Chromatogramme rein visuell sowie unter Verwendung eines Plattenscanners ausgewertet, die Bestimmung mittels HPLC erfolgte unter Anwendung der entwickelten, vereinfachten Methoden sowie nach Protokollen der Arzneibücher. Im Anschluss wurden die Ergebnisse miteinander verglichen.

### 5.7.1 Dünnschichtchromatographie

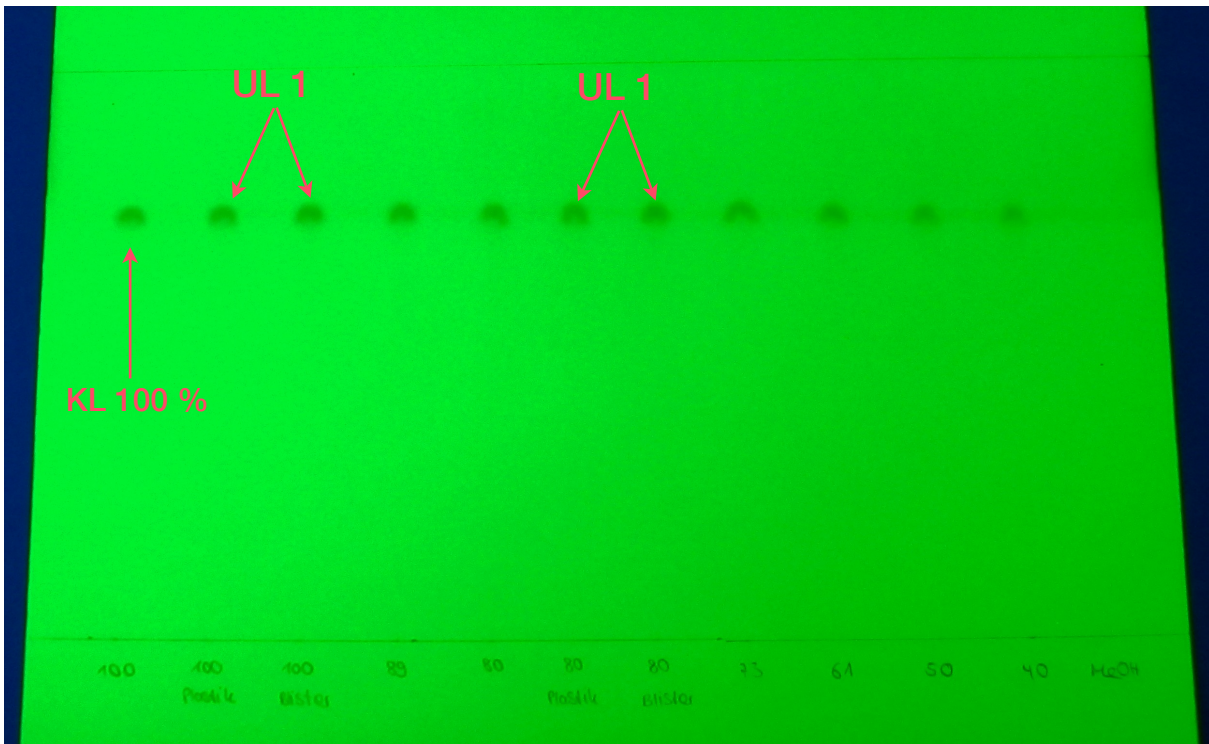
Der Gehalt der Fertigarzneimittel wurde in Anlehnung an die Vorschriften des GPHF-Minilab<sup>®</sup> untersucht [94]. Probelösungen des jeweiligen Präparates wurden neben Kalibrierlösungen des entsprechenden Arzneistoffes auf eine DC-Platte aufgetragen. Zur Auswertung mittels eines Plattenscanners wurde jeweils eine Regressionsgerade aus den Kalibrierpunkten erstellt und hieraus der Gehalt der Tablettenproben errechnet. Zudem wurde überprüft, inwiefern die Auswertung mittels Plattenscanner reproduzierbare Ergebnisse liefert, indem dieselbe Platte mehrfach ausgewertet und die entsprechenden Absorptionswerte hinsichtlich ihrer relativen Standardabweichung bewertet wurden.

### Visuelle Auswertung der Dünnschichtchromatographie-Platten

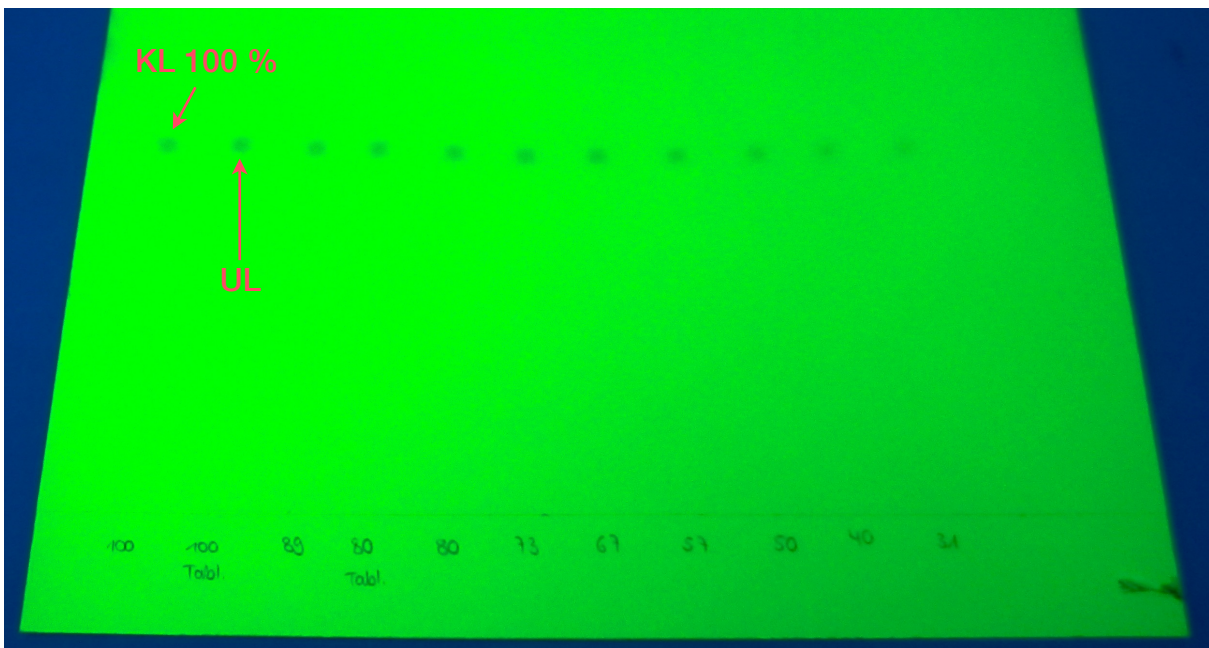
Der visuelle Vergleich der Fleckgröße bzw. -intensität in der Dünnschichtchromatographie ist eine gängige Praxis und wird zum Teil auch im Europäischen Arzneibuch zur prozentualen Begrenzung von *Verwandten Substanzen* durchgeführt. Hierbei werden verdünnte Referenzlösungen neben der eigentlichen Probe auf die Platte aufgetragen und die erhaltenen Flecke hinsichtlich der Größe und der Intensität (unter UV-Licht) verglichen. Dieses Vorgehen ist allerdings nicht immer problemlos, denn im Fall sehr ähnlicher Fleckgrößen bzw. -intensitäten ist es für das menschliche Auge äußerst schwierig, besonders feine Unterschiede zu erkennen.

In den Vorschriften des GPHF-Minilab<sup>®</sup> ist vorgesehen, dass neben der zu bestimmenden Probelösung zwei Referenzlösungen aufgetragen werden, die einem Gehalt von 100 bzw. 80 % der zu erwartenden Konzentration der Untersuchungslösung entsprechen. Somit ist eine grobe Einordnung der Probe innerhalb dieses Bereiches möglich, es kann allerdings keine genaue Aussage über den tatsächlichen Gehalt getroffen werden. Ob der deklarierte Arzneistoff tatsächlich enthalten ist, wird durch den Vergleich der  $R_f$ -Werte der Flecke überprüft; dieser darf laut der

Vorschrift um nicht mehr als  $\pm 10\%$  vom Wert der Referenzlösung abweichen. Die Probe ist ansonsten als „zweifelhaft“ zu beurteilen [94].



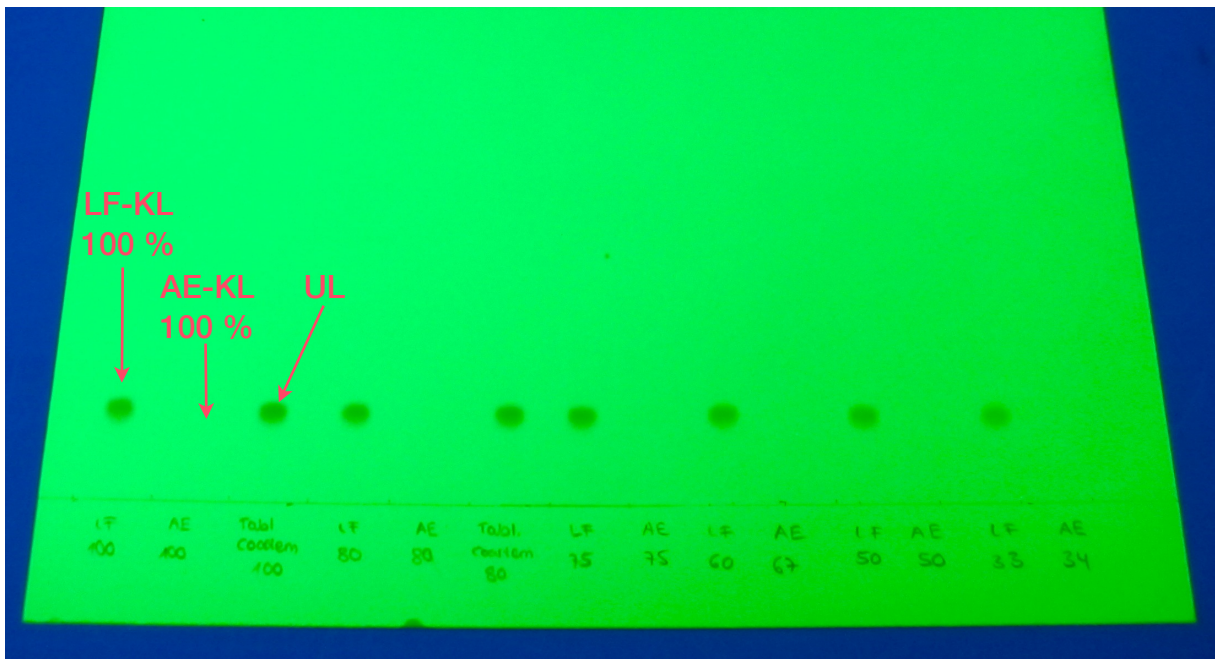
**Abbildung 5.7.1-1:** Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Amodar“ unter UV-Licht bei  $\lambda=254\text{ nm}$ ; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung.



**Abbildung 5.7.1-2:** Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Mephaquin“ unter UV-Licht bei  $\lambda=254\text{ nm}$ ; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung.



**Abbildung 5.7.1-3:** Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Paludrine“ unter UV-Licht bei  $\lambda=254$  nm; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung.



**Abbildung 5.7.1-4:** Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Coartem“ unter UV-Licht bei  $\lambda=254$  nm; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung, LF=Lumefantrin, AE=Artemether.

In den Abbildungen 5.7.1-1 bis 5.7.1-4 sind Chromatogramme für Amodiaquin, Proguanil, Mefloquin und die Kombination Artemether/Lumefantrin gezeigt. Es wird deutlich, dass die Flecke der jeweiligen Untersuchungslösung nur sehr schwer einem entsprechenden Fleck der Kalibrierlösungen (z. B. 80/90/100 %) zugeordnet werden können und somit in vielen Fällen die Angabe eines Gehaltes nicht möglich ist.

**Auswertung mittels Plattenscanner und Bestimmung der Wirkstoffgehalte**

Die Absorptionsintensitäten der Substanzflecke der Kalibrierlösungen auf den Chromatogrammen wurden mit Hilfe eines Plattenscanners ermittelt (siehe Beispielchromatogramm für Amodiaquin in Abbildung 5.7.1-6), gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen und die Gehalte der Tablettenproben hieraus berechnet. Die aufgestellten Regressionsgeraden sind in Abbildung 5.7.1-5 dargestellt und Tabelle 5.7.1-1 fasst die daraus bestimmten Gehalte zusammen.

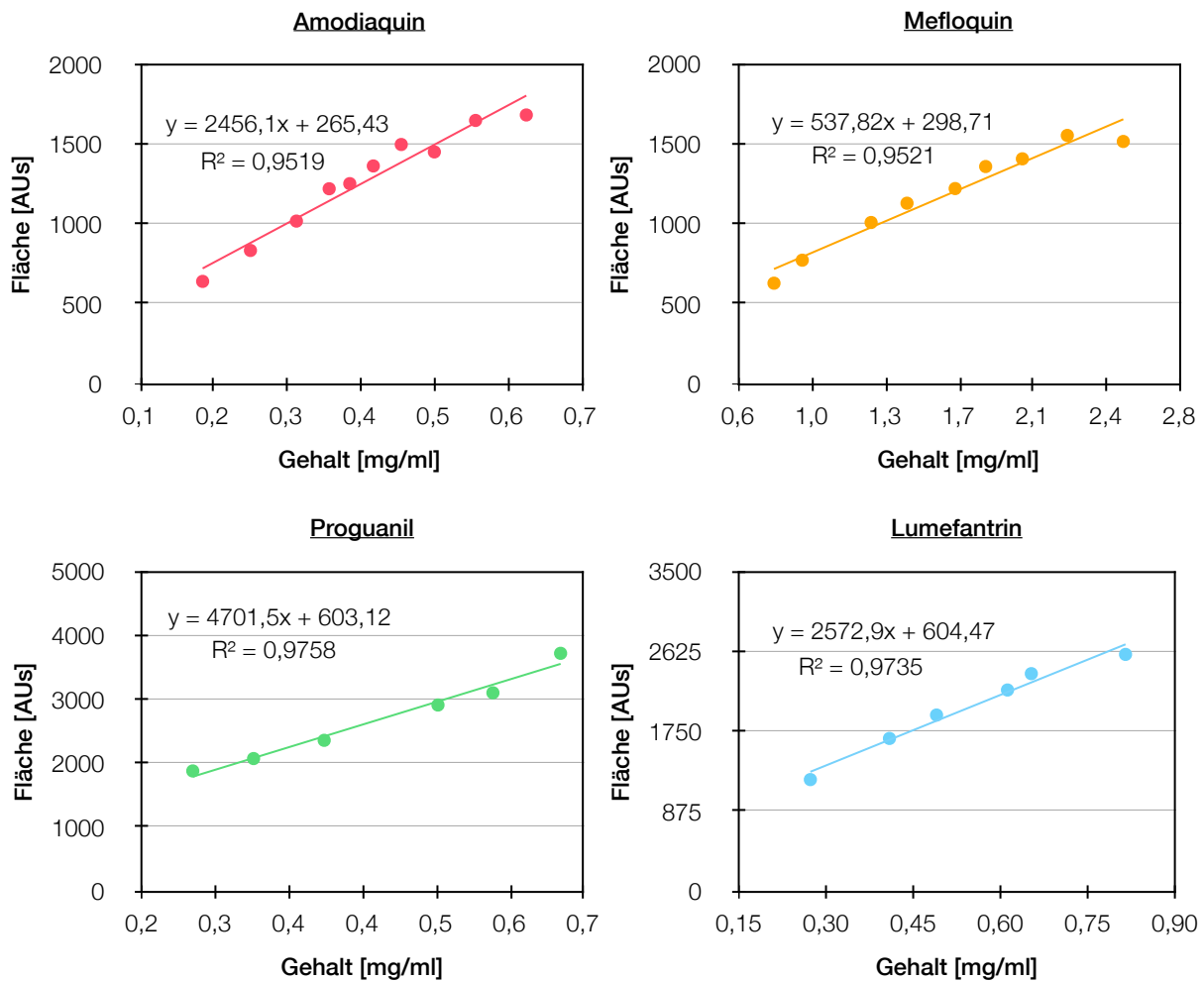


Abbildung 5.7.1-5: Regressionsgeraden der Bestimmung von Amodiaquin, Mefloquin, Proguanil und Lumefantrin mittels DC-Scanner.

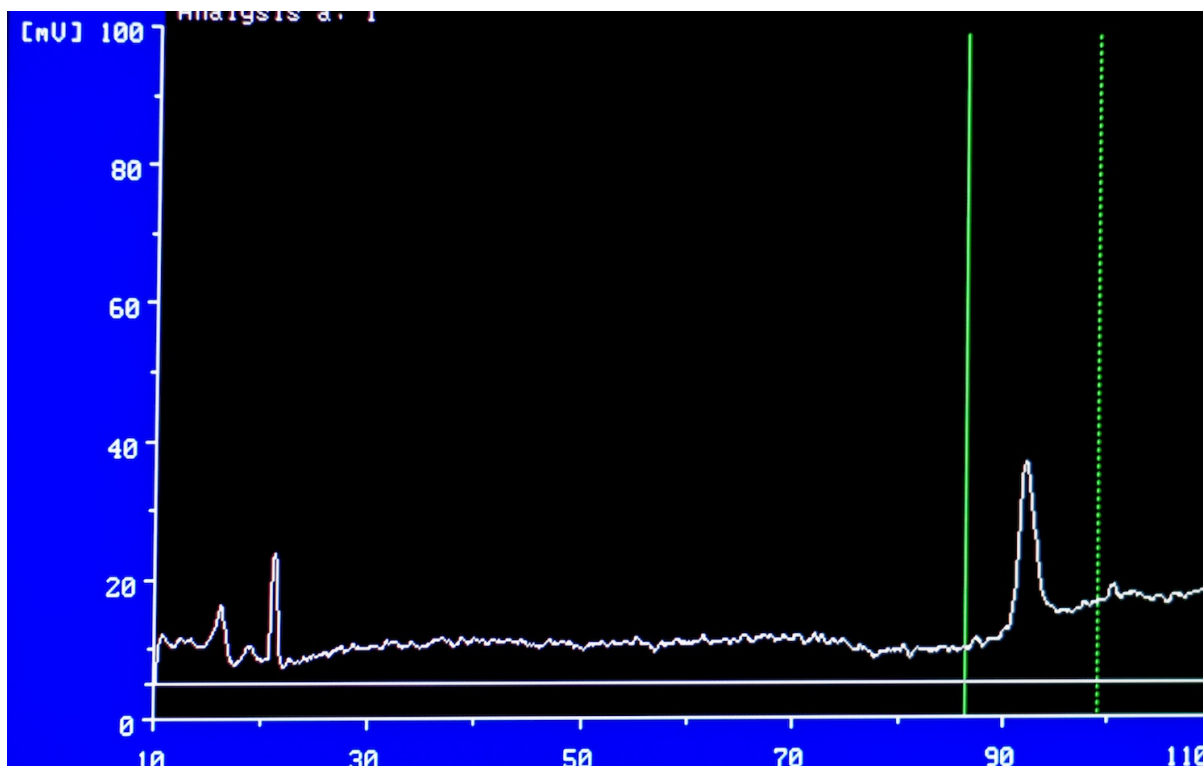
Artemether konnte, aufgrund der ungenügenden Absorption bei den am eingesetzten Plattenscanner einstellbaren Wellenlängen, nicht bestimmt werden. Auch unter UV-Licht ließ sich die Substanz nicht detektieren (siehe Abbildung 5.7.1-4: An der Stelle der Artemether-Untersuchungslösung ist kein Fleck erkennbar). Erst nach dem Besprühen der Platte mit dem Schwefelsäure-Sprühreagenz konnte Artemether in Form von braunen Flecken sichtbar gemacht werden. Zur visuellen Quantifizierung stellten sich hierbei allerdings dieselben Probleme

wie bereits oben beschrieben. Zusätzlich zur schweren Differenzierbarkeit der Flecke muss das Besprühen einer Dünnschichtchromatographie-Platte sehr sorgfältig erfolgen, da es sonst zu einem unregelmäßigen Auftragen des Reagenzes kommt und somit besonders die quantitative Auswertung weiter beeinträchtigt wird. Die Auswertung mittels eines Plattenscanners ist nach dem Besprühen nicht mehr möglich.

**Tabelle 5.7.1-1:** Mittels Dünnschichtchromatographie und Plattenscanner ermittelte Gehalte verschiedener Fertigarzneimittel (jeweils Doppelbestimmung).

| Arzneimittel | Wirkstoff               | Deklariertes Gehalt [mg/Tablette] | Gefundener Gehalt [mg/Tablette] | Abweichung [%] |
|--------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Amodar®      | Amodiaquin              | 200                               | 191.9                           | -4.1           |
|              |                         | 200                               | 206.4                           | +3.2           |
| Mephaquin®   | Mefloquin               | 250                               | 273.8                           | +9.5           |
|              |                         | 250                               | 269.0                           | +7.6           |
| Paludrine®   | Proguanil               | 100                               | 90.7                            | -9.3           |
|              |                         | 100                               | 84.3                            | -15.7          |
| Coartem®     | Artemether/Lumefantrin# | 20/120                            | 124.1#                          | +4.1           |
| ALU®         | Artemether/Lumefantrin# | 20/120                            | 120#                            | ±0             |

#: Nur Lumefantrin konnte bestimmt werden.



**Abbildung 5.7.1-6:** Bildschirmfoto eines Chromatogrammes der dünn-schichtchromatographischen Bestimmung von Amodiaquin, das mittels des Plattenscanners erhalten wurde.

Es ist ersichtlich, dass mit der Dünnschichtchromatographie per se keine ungenauen Ergebnisse erhalten werden. Entscheidend ist jedoch die Art und Weise der quantitativen Auswertung: Falls die Gehalte, wie in den vorliegenden Fällen, nur wenige Prozent vom deklarierten Gehalt abweichen, so kann dies nur durch eine instrumentelle Auswertung der Chromatographieplatten bestimmt werden. Der Fall, dass überhaupt kein oder ein völlig anderer Wirkstoff in den Tabletten enthalten ist, kann hingegen mit einer wesentlich höheren Sicherheit bestimmt werden.

**Reproduzierbarkeit des Plattenscanners**

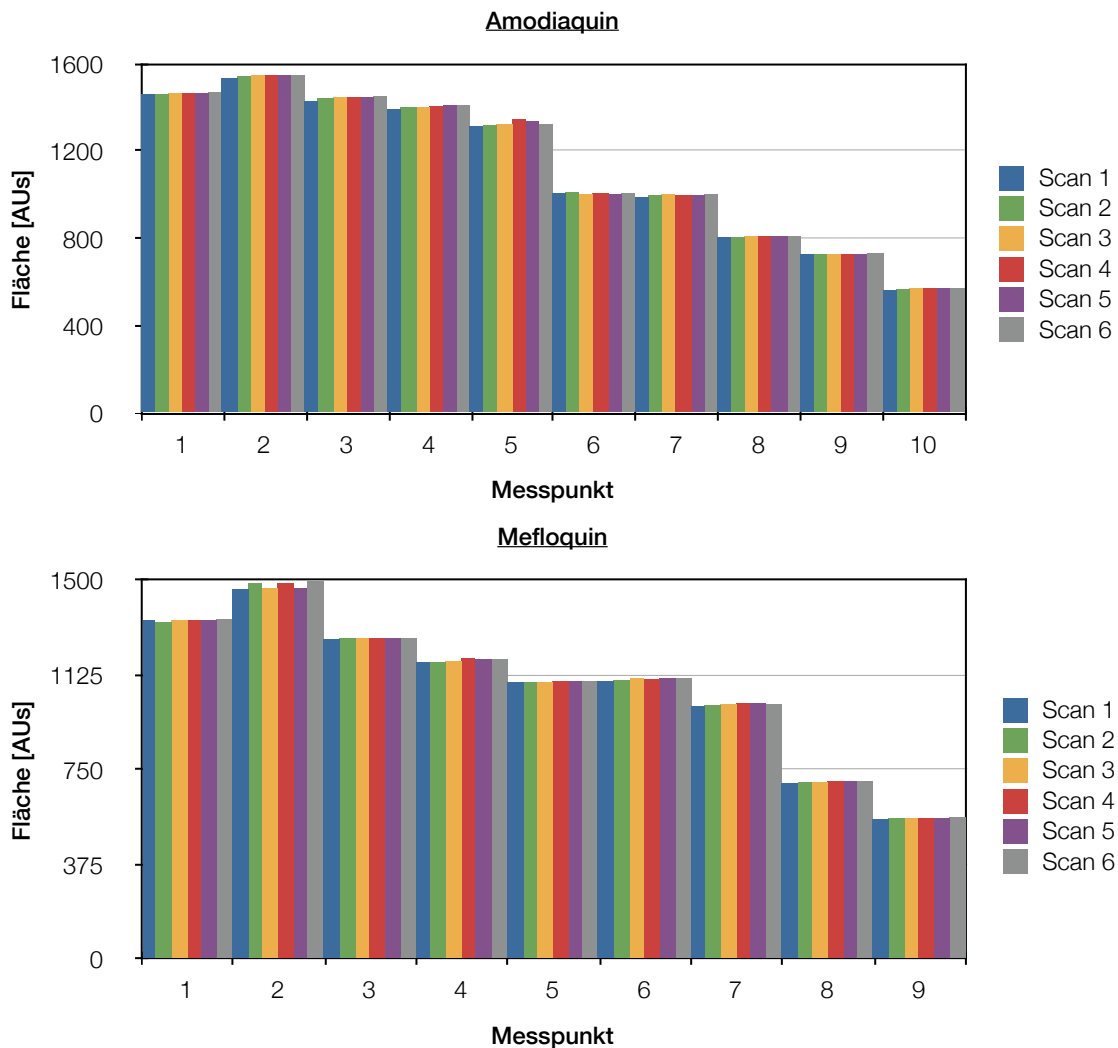


Abbildung 5.7.1-7: Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Scan-Vorgänge bei einem DC-Scanner.

Eine weitere interessante Frage während der Auswertung mittels des Plattenscanners war, ob der Scanvorgang reproduzierbare Ergebnisse liefert und inwieweit diese voneinander abweichen. Hierfür wurden die Substanzflecke auf Chromatogrammen der Arzneistoffe Amodiaquin und Mefloquin jeweils sechsfach gescannt und aus den ermittelten Werten die Standard-



## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

abweichungen bzw. relativen Standardabweichungen bestimmt (siehe Abbildung 5.7.1-7 und Tabellen 5.7.1-2 und 5.7.1-3). Die Werte für die relative Standardabweichung lagen im Bereich 0.28-0.92 % (Amodiaquin) sowie 0.14-0.95 % (Mefloquin) und somit deutlich unter 1 %, was eine gute Reproduzierbarkeit anzeigt [136, 137]. Sie sind mit den Werten, die während der Methodenentwicklung für flüssigchromatographische Verfahren ermittelt wurden, vergleichbar. Üblicherweise müssen die Probelösungen zu quantitativen Bestimmungen mit einem Auftragegerät („Linomat“) auf die Platten aufgebracht werden, da hierdurch eine wesentlich höhere Präzision und Genauigkeit in Bezug auf die aufgetragene Probenmenge erreicht wird (vgl. automatisierte vs. manuelle Injektion in der HPLC).

**Tabelle 5.7.1-2:** Wiederholpräzision für die Bestimmung von Amodiaquin mittels DC-Scanner.

| Messpunkt                 | 1             | 2             | 3             | 4             | 5             | 6             | 7            | 8            | 9            | 10           |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| c [mg/ml]                 | 0.625         | 0.556         | 0.500         | 0.455         | 0.417         | 0.385         | 0.357        | 0.313        | 0.250        | 0.185        |
| Scan Nr.                  |               |               |               |               |               |               |              |              |              |              |
| 1                         | 1460.3        | 1532.2        | 1427.5        | 1390.7        | 1314.4        | 1008.3        | 988.9        | 803.9        | 726.3        | 564.3        |
| 2                         | 1460.6        | 1541.7        | 1439.5        | 1401.7        | 1317.5        | 1009.9        | 997.8        | 806.7        | 725.4        | 567.7        |
| 3                         | 1462.8        | 1544.7        | 1445.6        | 1402.3        | 1320.6        | 1002.5        | 1003.5       | 809.1        | 728.7        | 570.2        |
| 4                         | 1466.4        | 1546.1        | 1445.2        | 1404.6        | 1345.4        | 1005.9        | 997.1        | 811.5        | 729.2        | 570.6        |
| 5                         | 1466.2        | 1548.3        | 1447.1        | 1407.6        | 1337.7        | 1003.7        | 996.6        | 811.9        | 726.7        | 571.4        |
| 6                         | 1469.1        | 1548.4        | 1450.4        | 1408.1        | 1324.7        | 1004.9        | 1002.5       | 811.3        | 732.2        | 572.4        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>1464.2</b> | <b>1543.6</b> | <b>1442.6</b> | <b>1402.5</b> | <b>1326.7</b> | <b>1005.9</b> | <b>997.7</b> | <b>809.1</b> | <b>728.1</b> | <b>569.4</b> |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>3.5</b>    | <b>6.1</b>    | <b>8.2</b>    | <b>6.4</b>    | <b>12.2</b>   | <b>2.8</b>    | <b>5.2</b>   | <b>3.2</b>   | <b>2.5</b>   | <b>3.0</b>   |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b> | <b>0.24</b>   | <b>0.40</b>   | <b>0.57</b>   | <b>0.45</b>   | <b>0.92</b>   | <b>0.28</b>   | <b>0.52</b>  | <b>0.40</b>  | <b>0.34</b>  | <b>0.52</b>  |

**Tabelle 5.7.1-3:** Wiederholpräzision für die Bestimmung von Mefloquin mittels DC-Scanner.

| Messpunkt                 | 1             | 2             | 3             | 4             | 5             | 6             | 7             | 8            | 9            |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| c [mg/ml]                 | 2.515         | 2.236         | 2.012         | 1.829         | 1.677         | 1.437         | 1.258         | 915          | 774          |
| Scan Nr.                  |               |               |               |               |               |               |               |              |              |
| 1                         | 1341.8        | 1462.8        | 1268          | 1177          | 1096.8        | 1101.4        | 1000.5        | 697.5        | 555.3        |
| 2                         | 1333.2        | 1489.2        | 1268.9        | 1177.1        | 1095.7        | 1105.9        | 1006.7        | 701.6        | 556.8        |
| 3                         | 1340.3        | 1467.3        | 1271.8        | 1179.9        | 1097.7        | 1111          | 1010.5        | 700.4        | 557.2        |
| 4                         | 1339.9        | 1490          | 1271.6        | 1191.2        | 1098.5        | 1109.6        | 1012          | 705.2        | 557.4        |
| 5                         | 1340.7        | 1469.7        | 1272.1        | 1188.0        | 1101.8        | 1110.6        | 1011.9        | 705.3        | 558.1        |
| 6                         | 1344.0        | 1495.8        | 1271.9        | 1187.9        | 1100.9        | 1112.1        | 1009.7        | 704.2        | 562.1        |
| <b>Mittelwert</b>         | <b>1340.0</b> | <b>1479.1</b> | <b>1270.7</b> | <b>1183.5</b> | <b>1098.6</b> | <b>1108.4</b> | <b>1008.6</b> | <b>702.4</b> | <b>557.8</b> |
| <b>Std.-Abw.</b>          | <b>3.6</b>    | <b>14.1</b>   | <b>1.8</b>    | <b>6.2</b>    | <b>2.4</b>    | <b>4</b>      | <b>4.4</b>    | <b>3.1</b>   | <b>2.3</b>   |
| <b>rel. Std.-Abw. [%]</b> | <b>0.27</b>   | <b>0.95</b>   | <b>0.14</b>   | <b>0.53</b>   | <b>0.2</b>    | <b>0.37</b>   | <b>0.44</b>   | <b>0.44</b>  | <b>0.41</b>  |

### 5.7.2 Flüssigchromatographie

Die Fertigarzneimittel wurden neben den dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen auch mittels HPLC untersucht; hierbei wurden die entwickelten, vereinfachten Methoden angewendet. Eine Übersicht der ermittelten Gehalte ist in Tabelle 5.7.2-1 dargestellt, Abbildung 5.7.2-1 zeigt die jeweils ermittelten Regressionen der vorab durchgeführten Kalibrierungen.

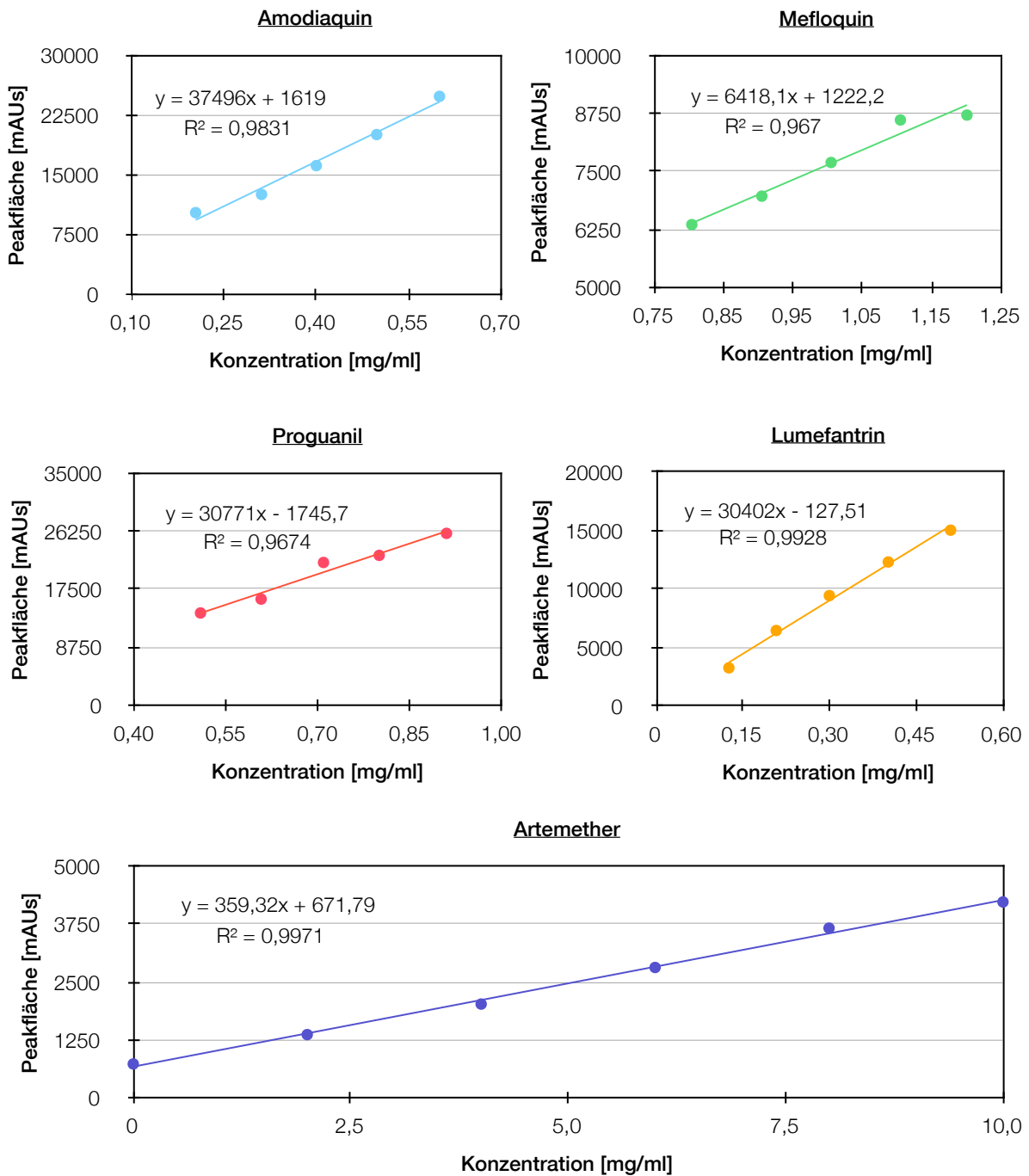


Abbildung 5.7.2-1: Kalibriergeraden für die Quantifizierung von Fertigarzneimittel-Proben aller fünf untersuchten Arzneistoffe unter Verwendung der entwickelten, vereinfachten HPLC-Methoden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

**Tabelle 5.7.2-1:** Mittels vereinfachter HPLC-Methoden ermittelte Gehalte verschiedener Fertigarzneimittel (jeweils Einfachbestimmung).

| Arzneimittel      | Wirkstoff              | Deklariertes Gehalt [mg/Tablette] | Gefundener Gehalt [mg/Tablette] | Abweichung [%] |
|-------------------|------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------|
| <b>Amodar®</b>    | Amodiaquin             | 200                               | 210.4                           | +5             |
| <b>Mephaquin®</b> | Mefloquin              | 250                               | 279.7                           | +11.9          |
| <b>Paludrine®</b> | Proguanil              | 100                               | 97.9                            | -2.1           |
| <b>Coartem®</b>   | Artemether/Lumefantrin | 20/120                            | 18.7/124.0                      | -6.5/+3.3      |
| <b>ALU®</b>       | Artemether/Lumefantrin | 20/120                            | 19.1/132.2                      | -4.3/+10.2     |

Durch den Vergleich mit den mittels Dünnschichtchromatographie und DC-Scanner ermittelten Gehalten wird deutlich, dass beide analytische Methoden durchaus vergleichbare Ergebnisse liefern (siehe Tabelle 5.7.2-2). Die mittels HPLC-Analytik erhaltenen Ergebnisse weisen jedoch einen jeweils höheren Wert auf. Diese Unstimmigkeit könnte zum einen durch die Art und Weise der Probenherstellung begründet sein, denn zur Durchführung der dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen wurden, wie in Kapitel 4.11 angegeben, lediglich Mess- statt Vollpipetten verwendet und das Auftragen der Probelösungen auf die Chromatographieplatten erfolgte manuell. Dies kann auch die Ursache für die hohe Abweichung zweier nacheinander bestimmter Proben sein (siehe Tabellen 5.7.2-1).

**Tabelle 5.7.2-2:** Vergleich der mittels DC und HPLC ermittelten Gehalte verschiedener Fertigarzneimittel.

| Arzneimittel      | Wirkstoff                            | Deklariertes Gehalt [mg/Tablette] | Gefundener Gehalt [mg/Tablette] DC-Scanner <sup>#</sup> | Gefundener Gehalt [mg/Tablette] HPLC |
|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---|--------------------------------------|
| <b>Amodar®</b>    | Amodiaquin                           | 200                               | 199.2   | 210.4                                |
| <b>Mephaquin®</b> | Mefloquin                            | 250                               | 271.4   | 279.7                                |
| <b>Paludrine®</b> | Proguanil                            | 100                               | 87.5  | 97.9                                 |
| <b>Coartem®</b>   | Artemether/Lumefantrin <sup>##</sup> | 20/120                            | 124.1   | 18.7/124.0                           |
| <b>ALU®</b>       | Artemether/Lumefantrin <sup>##</sup> | 20/120                            | 120.0   | 19.1/132.2                           |

<sup>#</sup>: Mittelwerte bei Zweifachbestimmung

<sup>##</sup>: Nur Lumefantrin konnte mittels DC-Scanner bestimmt werden.

In keiner der untersuchten Arzneimittel-Proben konnten die für den jeweiligen Arzneistoff untersuchten Verunreinigungen nachgewiesen werden, außer im Falle der Artemether/Lumefantrin-Probe „Coartem“, in der die Lumefantrin-Verunreinigung A zu 0.8 % gefunden wurde. Allerdings war diese auch in der verwendeten Lumefantrin-Referenzsubstanz in einer Menge von bis zu 1.0 % enthalten.

## 5.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Vereinfachung flüssigchromatographischer Methoden steht an sich im Gegensatz zum heutigen Bestreben, immer selektivere, sensitivere und genauere analytische Prozesse bzw. Protokolle zu entwickeln. An der Entwicklung der Monographien der wichtigsten Arzneibücher innerhalb der letzten Jahrzehnte ist deutlich nachzuvollziehen, dass einfache bzw. als obsolet geltende Methoden sukzessive durch immer komplexere, automatisierbare Verfahren ergänzt oder völlig durch diese ersetzt wurden. Der Hintergrund solcher Änderungen ist oftmals die Notwendigkeit, dass im Rahmen der Qualitätskontrolle neu erkannte Verunreinigungen oder zuvor nicht bekannte *Verwandte Substanzen* durch die analytische Methode erfasst werden sollen. Zudem ermöglicht es die Entwicklung immer sensitiverer Verfahren, dass sich pharmazeutische Hersteller innerhalb des wirtschaftlichen Wettbewerbes von ihren Konkurrenten abgrenzen können, was allerdings im Rahmen der Qualitätsanalytik der Arzneistoffe nur eine untergeordnete Rolle spielt.

### Nutzen der Vereinfachung flüssigchromatographischer Verfahren

Wie bereits zuvor beschrieben, können Arzneibuchmethoden für Laboratorien in infrastrukturell schwachen Ländern durchaus ein großes Problem darstellen, da die jeweiligen Protokolle nicht oder nur unter großen Anstrengungen umgesetzt werden können. Die Entwicklung vereinfachter Methoden zur Analytik der Arzneistoffe Amodiaquin, Proguanil, Mefloquin sowie Artemether/Lumefantrin gelang in der Art, dass nur noch sehr simple Chemikalien (einfache Phosphatsalze, Methanol, Wasser) und kommerziell günstig erhältliche RP-18-Säulen benötigt werden. Hierdurch ist es möglich, dass mit einem relativ kleinen Inventar an Chemikalien verschiedenste Analysen durchgeführt werden können, was im Vergleich bei der Anwendung der in den Arzneibüchern vorgeschriebenen Methoden oftmals nicht möglich ist. Bereits die eingeschränkte Anzahl an verschiedenartigen chromatographischen Säulen ermöglicht es, sehr breit gefächert mit diesen zu arbeiten und nicht für jeden Anwendungszweck eine eigene stationäre Phase bereithalten zu müssen. An die Stelle von Ionenpaarbildnern treten einfache Phosphat-Pufferlösungen, die zum einen den großen Vorteil haben, die stationäre Phase nicht irreversibel zu verändern, und zum anderen sehr einfach wieder aus dem chromatographischen System entfernt werden können. Somit kann Prüflaboratorien in Entwicklungsländern die Möglichkeit gegeben werden, die Qualität der im Umlauf befindlichen Arzneimittel auf einfache Weise unter Zuhilfenahme der HPLC zu bestimmen.

Während der Methodenentwicklung bzw. -validierung zeigte sich, dass die Vereinfachung flüssigchromatographischer Protokolle sehr gut möglich ist und dass durch die Anpassung kritischer Größen wie der Pufferkonzentration und dem Anteil eines organischen Lösungsmittels

in der mobilen Phase die Selektivität der Methode gut eingestellt werden konnte. Hierbei muss allerdings stets ein Kompromiss zwischen einem minimalen Verbrauch an Fließmittel (z. B. durch niedrige Flussraten, kurze Analysenzeiten oder hohe Anteile von Pufferlösungen) und einer ausreihenden Selektivität gefunden werden, denn die Methoden sollen dennoch so leistungsfähig sein, dass sie die entsprechenden Analyten sicher bestimmen können.

### **Einfluss schwankender Trenntemperaturen und *pH*-Werte**

Da die an dieser Stelle vorgestellten flüssigchromatographischen Methoden für den Einsatz in tropischen Ländern konzipiert wurden, ist es wichtig, dass sie Temperaturschwankungen ebenso gut tolerieren können, wie durch ungenaue Herstellungsweise bedingte Schwankungen des *pH*-Wertes der mobilen Phase. In hierzu durchgeführten Untersuchungen zur Robustheit konnte gezeigt werden, dass die Methoden zu einem großen Teil nur sehr wenig von diesen Einflussfaktoren abhängig sind und dass diese Parameter somit während der Durchführung der eigentlichen Analytik nicht genau kontrolliert werden müssen. In Bezug auf die Temperatur bedeutet dies, dass kein Säulenofen zur Thermostatisierung der Trennsäule benötigt wird und dass die Methoden auch in Laboratorien angewendet werden können, die beispielsweise über keine Klimatisierung verfügen.

Die Einstellung des *pH*-Wertes erfolgt in der Regel durch tropfenweise Zugabe einer geeigneten Säure bzw. Base zu der einzustellenden Pufferlösung unter ständiger Kontrolle mittels einer *pH*-sensitiven Glaselektrode. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass solch ein *pH*-Meter vorhanden ist und im Vorfeld kalibriert wurde. Da auch dies nicht immer der Realität entspricht, wurde es als essentiell angesehen, dass die entwickelten Methoden in einem breiten *pH*-Bereich um das ermittelte Optimum herum zuverlässig arbeiten und nur wenig hierdurch beeinflusst werden. Es konnte auch hier im Rahmen der Validierung gezeigt werden, dass die Einhaltung eines diskreten *pH*-Wertes nicht zwangsweise notwendig ist. Lediglich im Falle von Proguanil und den Verunreinigungen A und E sowie von Lumefantrin und der Verunreinigung D wurde deutlich, dass die Auftrennung der Analyten nicht immer gewährleistet ist, sofern der *pH*-Wert um einen zu großen Betrag vom Optimum abweicht. Neben der Einstellung der Pufferlösungen durch Zugabe einer entsprechenden Säure bzw. Base ist somit auch die direkte Zugabe während der Herstellung denkbar, im Falle einer 0.05-molaren Pufferlösung mit einem Ziel-*pH*-Wert von 8 also das direkte Einwiegen festen Natriumhydroxids zusammen mit dem jeweiligen Puffersalz, oder das direkte volumetrische Dosieren der entsprechenden Menge an Phosphorsäure im Fall von sauer einzustellenden Lösungen. Auch im Europäischen Arzneibuch ist dieses Vorgehen häufig beschrieben, beispielsweise durch direkte Einwaage fester Puffersalze oder die Angabe zu mischender Volumina bestimmter Lösungen [199]. So könnte

etwa die Vorschrift zur Herstellung der  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Pufferlösung (0.05 mol/l,  $\text{pH}=8$ ) wie folgt lauten: „6.8 g Kaliumdihydrogenphosphat und 1.87 g Natriumhydroxid-Plätzchen werden in 1000.0 ml Wasser zur Chromatographie gelöst“. Hierbei wird, durch die Mengen bzw. die Reinheit der verwendeten Chemikalien bestimmt, automatisch ein  $\text{pH}$ -Wert von ungefähr 8 erreicht. Es muss keine Einstellung unter Zuhilfenahme eines  $\text{pH}$ -Meters erfolgen. Analog kann bei einer sauer einzustellenden Pufferlösung durch die Angabe eines bestimmten Volumens an Phosphorsäure verfahren werden. Zudem könnte auch eine Einstellung bzw. Kontrolle des  $\text{pH}$ -wertes mit Hilfe von geeignetem  $\text{pH}$ -Indikatorpapier erfolgen. Da die HPLC-Methoden entsprechend robust auf Schwankungen des  $\text{pH}$ -wertes reagieren, stellen diese Vorgehen keinen Nachteil dar und erleichtern die praktische Arbeit in hohem Maße.

### **Quantifizierung des Arzneistoffes**

Neben der eigentlichen Methode spielt die Verfügbarkeit von Referenzmaterialien in der Durchführung quali- bzw. quantitativer Bestimmungen eine wichtige Rolle. Da sie allerdings nicht immer in ausreichender Reinheit bzw. Menge vorhanden sein können, ist es eine durchaus gängige Praxis, bekannte Verunreinigungen durch den Vergleich ihrer relativen Retentionszeiten zu identifizieren. Eine Abschätzung des prozentualen Gehaltes kann dann beispielsweise über das Normalisierungsverfahren durchgeführt werden. Für die Gehaltsbestimmung des Wirkstoffes wird jedoch immer eine geeignete Referenzsubstanz benötigt, diese muss nicht zwangsweise ein primärer Standard sein. Es ist durchaus denkbar, Bulkware des jeweiligen Stoffes einmalig gegen einen solchen Standard zu qualifizieren und ihn somit in großer Menge zu einem günstigen Preis verfügbar zu halten.

Insofern die Quantifizierung des Wirkstoffes in einem Medikament von primärem Interesse ist und die Frage nach der Anwesenheit eventuell vorhandener Verunreinigungen zunächst in den Hintergrund rückt, so könnte es die Entwicklung einer universell konzipierten Analysenmethode ermöglichen, gleichzeitig mehrere Wirkstoffe nebeneinander zu bestimmen. Dies ist vor allem in Bezug auf die Routineanalytik interessant, da dann zwischen den einzelnen Analyten das HPLC-System nicht entsprechend neu eingespült bzw. äquilibriert werden muss und die Proben nacheinander in Serie bearbeitet werden können.

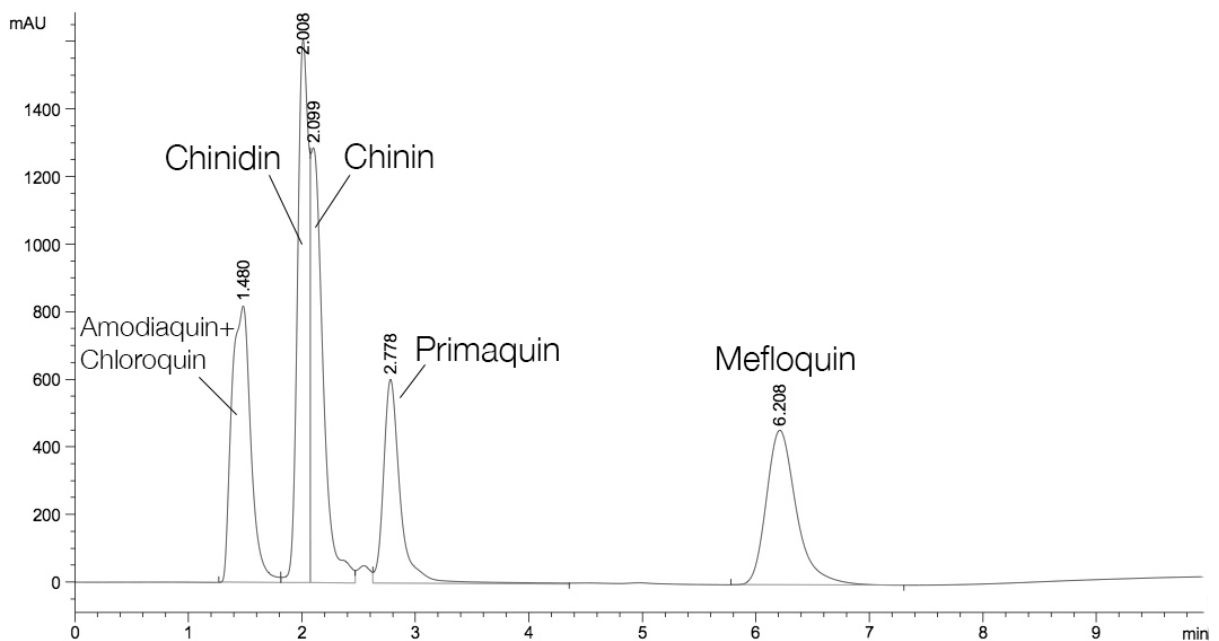
### **Bestimmen von Verunreinigungen und Erkennen von Verwechslungen**

Im Rahmen der Methodenentwicklungen von Proguanil und Mefloquin zeigte sich zudem, dass es nicht immer möglich ist, zwei Analyten (in beiden Fällen handelte es sich um jeweils zwei Verunreinigungen der Arzneistoffe) vollständig aufzutrennen, sodass hier die Grenzen der Basis-Analytik deutlich werden. Es ist allerdings möglich, zumindest ihre Summe anzugeben, insofern

sie beide enthalten sind, sodass trotz allem eine Aussage über die qualitative Zusammensetzung einer Probe gemacht werden kann. Da allerdings die Arzneistoffe schon sehr lange zugelassen und kommerziell erhältlich sind, kann ihre Anwesenheit mitunter als *qualified by use* angesehen werden [200].

Durch den Einsatz weiterer, andersartiger stationärer Phasen (beispielsweise mit spezieller Modifikation, geringerer Partikelgröße oder größerer Länge) könnten solche Unzulänglichkeiten umgangen werden, allerdings hätte dies nicht das vorab definierten Ziel der Entwicklung einfacher Methoden unter Verwendung einer simplen Basis-Ausstattung verfolgt. Hier muss auch stets ein vernünftiger Kompromiss zwischen Vereinfachung und Leistungsfähigkeit gefunden werden, denn die Bestimmung von *Verwandten Substanzen* zählt nach wie vor zu den wichtigsten Reinheitskriterien eines Arzneistoffes.

Ein hohes Maß an Selektivität ist zudem auch notwendig, um mit einer Methode Arzneistoffverwechslungen sicher erkennen zu können, was am Beispiel der für Mefloquin entwickelten Methode gezeigt werden konnte: Die strukturell verwandten Arzneistoffe Amodiaquin, Chloroquin, Chinidin, Chinin und Primaquin können vom eigentlichen Analyten Mefloquin abgetrennt werden und machen somit das Erkennen von Verwechslungen bzw. Beimischungen möglich (siehe Abbildung 5.8-1). Zwar gelang auch hier keine vollständige Auftrennung aller Arzneistoffe untereinander und die Signale weisen keine idealen Symmetrien auf. Allerdings wurde die Methode nicht für diesen Zweck konzipiert und die jeweiligen Arzneistoffe sind dennoch deutlich vom Hauptsignal abgetrennt.

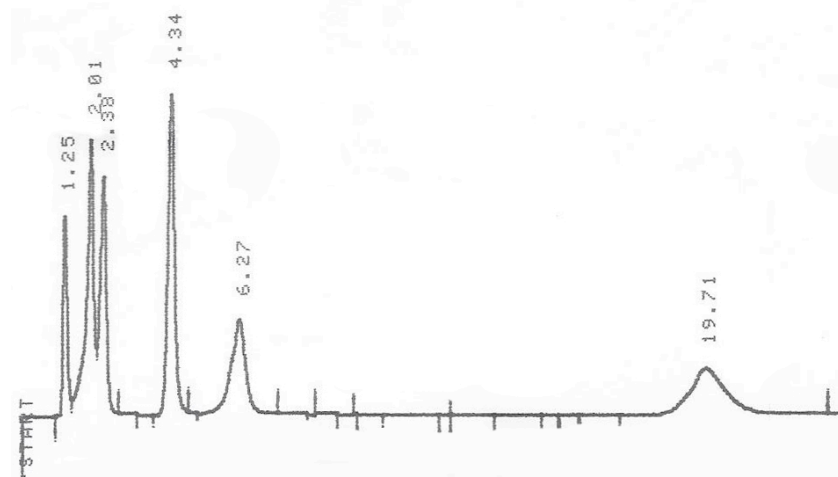


**Abbildung 5.8-1:** Abtrennung von Amodiaquin, Chloroquin, Chinidin, Chinin und Primaquin vom eigentlichen Analyten Mefloquin unter Verwendung der für Mefloquin entwickelten Methode.

Die Auswahl der Arzneistoffe beschränkte sich in dieser Arbeit auf das Indikationsgebiet Malaria, sodass für fortführende Arbeiten über diese Thematik andere Stoffklassen (Antibiotika, HIV-Therapeutika oder Arzneimittel zur Behandlung nicht-infektiöser Krankheiten) berücksichtigt werden sollten. Die *WHO Essential Medicines List* kann ebenso wie die Substanzauswahl des GPHF-Minilab® als guter Anhaltspunkt für die Auswahl dieser Stoffe dienen [201, 202].

### **Anwendbarkeit auf sehr einfachen, modularen Systemen**

Die vereinfachten Methoden wurden auf modernen HPLC-Geräten entwickelt, die mit den heute üblichen Modulen wie einem Säulenofen, einem online-Entgaser oder einem automatischen Probeninjektor ausgestattet waren. Da die Methoden jedoch auf Geräten angewendet werden sollen, die nur über eine kostengünstige Basiskonfiguration verfügen, wurden sie auf älteren HPLC-Geräten getestet. Abbildung 5.8-2 zeigt ein Chromatogramm der Bestimmung von Proguanil, welches so erhalten werden konnte. In Tabelle 5.8-1 sind die Retentionszeiten sowie die relativen Retentionen der Analyten dargestellt, die mit beiden Geräten erhalten wurden.



**Abbildung 5.8-2:** Chromatogramm der Bestimmung von Proguanil mittels einer simplen, modularen HPLC-Anlage unter Anwendung der vereinfachten Methode.

**Tabelle 5.8-1:** Proguanil: Retentionszeiten und relative Retentionen zu Proguanil nach der Bestimmung mittels zweier unterschiedlicher HPLC-Geräte.

| Analyt  | $R_t$ Agilent-Anlage [min] | $R_t$ Bischoff-Anlage [min] | relative Retention (Agilent-Anlage) | relative Retention (Bischoff-Anlage) |
|---------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| PG-VU B | 1.40                       | 1.25                        | 0.18                                | 0.20                                 |
| PG-VU C | 2.33                       | 2.01                        | 0.30                                | 0.32                                 |
| PG-VU E | 2.71                       | 2.38                        | 0.35                                | 0.38                                 |
| PG-VU A | 4.70                       | 4.34                        | 0.61                                | 0.69                                 |
| PG      | 7.74                       | 6.27                        | 1.00                                | 1.00                                 |
| PG-VU D | 25.46                      | 19.71                       | 3.29                                | 3.14                                 |



Bei dieser Anlage handelte es sich um ein simples, modulares System der Firma Bischoff mit einem manuellen Injektionsventil, einer isokratischen Pumpe mit einem Pumpenkopf sowie einem UV/Vis-Detektionsmodul und einem externen Integrator der Firma Hewlett Packard. Die stationäre Phase sowie die übrigen chromatographischen Parameter wurden entsprechend der optimierten Methoden gewählt. Bedingt durch die Bauweise des Pumpenmodules konnte die mobile Phase nicht, wie heute üblich, automatisch aus dem Puffer und dem organischen Lösungsmittel gemischt werden, sondern musste vorab im jeweiligen Mischungsverhältnis hergestellt und unmittelbar vor der Verwendung ausreichend entgast werden (Ultraschallbad, 15 Minuten). Die relativen Retentionen der betrachteten Analyten stimmen sehr gut überein, was unter Berücksichtigung der Verwendung einer sehr simplen HPLC-Anlage bestehend aus Modulen verschiedener Hersteller bzw. dem vorgesehenen Einsatzzweck besondere Relevanz zeigt. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die neu entwickelten Methoden auch zur Anwendung auf solchen einfachen, modularen Systemen geeignet sind.

#### **Vergleich mit konventionellen Arzneibuchmethoden**

In den durchaus komplexeren Methoden des *Ph. Eur.* oder der USP werden häufig Ionenpaarreagenzien oder organische Zusätze, sogenannte *organic modifiers*, zur Chromatographie verwendet. Sie kommen immer dann zum Einsatz, wenn normalerweise schlecht trennbare, ionisierbare Analyten (z. B. Arzneistoffe mit sauren oder basischen Funktionen) möglichst selektiv mit einer guten Peaksymmetrie aufgetrennt werden sollen [203]. In vielen Fällen ist dies nicht trivial und kann nur durch Zusatz eines entsprechenden Reagenzes erreicht werden, hierbei handelt es sich in der Regel um die bereits beschriebenen Alkylsulfonate bzw. Tetraalkyl-Ammoniumsalze. Die selten eingesetzten Alkylsulfate und Perchlorate haben nur eine geringe Bedeutung und ihnen wird kein signifikant höherer Nutzen zugeschrieben [204].

Der Verzicht auf solche Reagenzien und somit auch der Wechsel von der Ionenpaar- zur gewöhnlichen Umkehrphasenchromatographie zeigte im Vergleich, dass hierdurch mitunter die Selektivität als auch in vielen Fällen eine ideale Peaksymmetrie verloren gingen oder nur in etwa erreicht werden konnten. Dies konnte vor allem bei Proguanil beobachtet werden. Hier sind Arzneibuchmethoden, in denen eine wesentlich breitere Auswahl an Reagenzien und stationären Phasen zur Anwendung kommt, eindeutig überlegen. Im Fall von Mefloquin muss der direkte Vergleich mit den im *Ph. Eur.* angeführten Methoden zudem unter der Einschränkung erfolgen, dass die untersuchten Verunreinigungen nicht Bestandteil der Monographie sind. Für die Gehaltsbestimmung der meisten Arzneistoffe ist zudem in der Regel eine Titration in der jeweiligen Monographie vorgesehen.

Die Bestimmung von Verunreinigungen bzw. den *Verwandten Substanzen* ist mit den neu entwickelten, vereinfachten Methoden bis zu den im *Ph. Eur.* bzw. in den ICH-Richtlinien geforderten Grenzen (0.1 %) möglich. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um die Reinheit und somit die Qualität der zu untersuchenden Substanzen sicher charakterisieren zu können [65].

Abschließend muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass nur Analysenergebnisse regulatorische bzw. gesetzliche Gültigkeit besitzen, die durch akkreditierte Arzneibuchmethoden erhalten wurden, und dass solche, die mit anderen Methoden ermittelt wurden, stets noch einmal verifiziert werden müssen. Die neu entwickelten Methoden können auch gegebenenfalls gegen etablierte Arzneibuchmethoden validiert werden. Allerdings kann anhand andersartiger, aber dennoch geeigneter Verfahren bereits eine gute erste Einschätzung zu Reinheit und Gehalt eines Arzneimittels bzw. eines Arzneistoffes erhalten werden.

# Zusammenfassung

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sehr einfache, flüssigchromatographische Methoden zur Qualitätsanalytik gebräuchlicher Antimalaria-Medikamente (Amodiaquin, Mefloquin, Proguanil sowie die Kombination Artemether/Lumefantrin) entwickelt, die nur wenige, günstig erhältliche Chemikalien (Phosphatpuffer, Methanol) sowie gewöhnliche, kommerzielle RP-18-Säulen benötigen. Sie sind insbesondere zur Anwendung in Laboratorien in Entwicklungsländern geeignet und erfordern keine komplexen HPLC-Instrumente wie beispielsweise Gradientenpumpen oder Säulenthmostate. Der Verzicht auf Ionenpaarreagenzien ermöglicht es, dass eine stationäre Phase für mehr als nur einen einzigen Einsatzzweck verwendet werden kann und dass langwierige Äquilibrier- bzw. Spülschritte nicht notwendig sind. Alle Methoden arbeiten im isokratischen Elutionsmodus und durch die Verwendung kurzer Säulen (125 mm) konnten die jeweiligen Analysenzeiten zusätzlich verringert werden. Hierdurch ist zudem eine Reduzierung des Fließmittelverbrauches möglich.

Während der Methodenentwicklung wurden charakteristische, aus dem Herstellungsweg des jeweiligen Arzneistoffes stammende potentielle Verunreinigungen berücksichtigt. Ihre Bestimmung erlaubt eine Aussage über die Herkunft eines Wirkstoffes bzw. eines Arzneimittels, da das Verunreinigungsmuster einer Substanz oftmals die Zuordnung zu einem bestimmten Herstellungs- bzw. Reinigungsprozess ermöglicht.

Alle Methoden wurden hinsichtlich der Linearität innerhalb des Arbeitsbereiches sowie der Wiederholpräzision charakterisiert. Es wurde eine gute Reproduzierbarkeit gefunden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der untersuchten Verunreinigungen lagen bei einem Level von je 0.1 %. Durch gezielte Variation wurde der Einfluss wechselnder Trenntemperaturen sowie schwankender *pH*-Werte der jeweiligen mobilen Phase und die hieraus resultierenden Effekte untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Methoden sehr robust gegenüber diesen Einflussgrößen sind und somit für die Anwendung mit einfach ausgestatteten HPLC-Systemen sowie besonders für den Einsatz in tropische Gebieten mit wechselnden klimatischen Bedingungen gut geeignet sind.

Flüssigchromatographische Methoden spielen heute in der pharmazeutischen Analytik vor allem zur Bestimmung der Reinheit eines Arzneistoffes eine herausragende Rolle und sind in nahezu jeder Monographie der wichtigsten Arzneibücher (z. B. im *Ph. Eur.*) zu finden. Einfach durchführbare Untersuchungsmethoden, wie beispielsweise die im GPHF-Minilab® angewandte Dünnschichtchromatographie, erfordern im Vergleich zur HPLC weniger komplexe und teure Instrumente und können selbst in entlegenen Gebieten ohne Laboratorium durchgeführt werden. Sie verfügen allerdings über eine nur sehr geringe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit, da sowohl die praktische Durchführung als auch die anschließende Auswertung rein manuell bzw.

visuell erfolgt und somit in hohem Maße einer Beeinflussung durch den jeweiligen Analytiker unterworfen ist. Die entwickelten HPLC-Methoden wurden mit dünn-schichtchromatographischen Verfahren verglichen, hierbei besonders unter dem Aspekt der visuellen und der instrumentellen Auswertung der Chromatogramme zur Bestimmung des Gehaltes einer unbekannt Probe. Hierbei konnte aufgezeigt werden, dass die Dünnschichtchromatographie der Flüssigchromatographie eindeutig unterlegen ist, insbesondere wenn die Auswertung nicht mittels eines entsprechenden Scanners sondern rein visuell erfolgt: Nur in den wenigsten Fällen ist es möglich, eine annähernd präzise Aussage über den Gehalt zu treffen und zudem ist die Bestimmung der *Verwandten Substanzen* nur sehr bedingt möglich. Durch den Einsatz von Auftragegeräten bzw. Plattenscannern kann die Genauigkeit zwar signifikant erhöht werden, allerdings sind solche Instrumente im Verhältnis wesentlich teurer als einfache, modulare HPLC-Systeme und zählen heute in den wenigsten Laboratorien zum Standardinventar.

Vereinfachte chromatographische Methoden können ein wichtiges Hilfsmittel für Kontrolllaboratorien in Entwicklungsländern sein, wenn komplexe, etablierte Protokolle nur eingeschränkt angewendet werden können. Durch die Kombination aus dünn-schichtchromatographischer Basisanalytik und einer flächendeckenden Untersuchung mittels HPLC lässt sich die Arzneimittelqualität sehr gut überprüfen, die regulatorischen Organe eines Landes entsprechend zu entlasten und die Versorgung der Bevölkerung mit qualitativ einwandfreien Medikamenten zu gewährleisten.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasst sich mit der Stabilitätsanalytik individuell hergestellter, Noradrenalin-haltiger Injektionslösungen. Solche Rezepturen werden oftmals in Krankenhausapotheken im Rahmen der Defektur auf Vorrat durch Verdünnen der entsprechenden kommerzieller Fertigarzneimittel mit isotonischer Kochsalzlösung zubereitet, um z. B. für Notfallsituationen am Wochenende die Rezepturen vorrätig zu haben. Durch die Untersuchungen wurde geprüft, inwieweit der übliche Verdünnungsgrad von 0.1 % einen Einfluss auf die Stabilität des Noradrenalins hat und welche Lagerungsbedingungen für die Zubereitungen empfohlen werden können. Nach der Lagerung unter verschiedenen Bedingungen (gekühlt, bei Raumtemperatur sowie jeweils mit bzw. ohne Lichtschutz) konnte gezeigt werden, dass die Gehalte an Noradrenalin bei keiner der untersuchten Lagerungsbedingungen unter einen Wert von 99.0 % fielen. Individuell hergestellte Noradrenalin-Injektionslösungen können somit bis zu sieben Tage im Voraus hergestellt und für die Anwendung am Patienten bereit gehalten werden. Die Lösungen sollten dennoch gekühlt und unter Lichtschutz aufbewahrt werden, um den Abbau des Arzneistoffes und eine mikrobielle Kontamination zu minimieren.





Summary

## 7 Summary

This work focuses on the development of simple, liquid chromatographic methods for the quality analysis of common antimalarial medicines, i.e. amodiaquine, mefloquine, proguanil and the fix-dose combination of artemether and lumefantrine. They require a minimum of readily available, cheap chemicals (e.g. phosphate buffers or methanol) and commercially available RP-18 columns. They were designed for use in quality control laboratories in resource-restraint environments, e.g. in laboratories in the developing world, and do not require complex HPLC instrumentation which are either not available or affordable, e.g. with expensive gradient pumps or column ovens. Ion-pairing reagents were strictly avoided during method development which is a great advantage for routine application: long equilibration and flushing procedures are not necessary and a column can be used for more than one single method. An isocratic elution mode was applied and using short analytical columns (125 mm) allows reducing the analysis time and eluent consumption, respectively, to a minimum.

During method development impurities being characteristic for the respective synthesis pathway(s) of the active substances were considered. Thus, determining the quality of a compound with regard to its content and purity is possible and distinct manufacturers or sources can be identified.

Linearity and repeatability were assessed and a good reproducibility was found. Limits of detection and quantitation, respectively, were measured and the respective impurities can be determined to a level of 0.1 %. By varying the separation temperature and the *pH*-value of the respective mobile phases method ruggedness was investigated. A high grade of robustness towards these parameters could be confirmed, indicating that the methods are suitable for being used in tropical environments.

Liquid chromatographic methods play an important role in pharmaceutical analysis today and they are widely applied for determining the purity of a compound. Respective protocols have been added to almost every monograph of the most important pharmacopoeias, e.g. the European Pharmacopoeia. Of note, those protocols may not be applied in every laboratory without limitations. Although very simple methods of analysis, e.g. thin-layer chromatography which is described in the manuals of the GPHF-Minilab<sup>®</sup>, require less expensive instruments and may even be applied in resource-restraint environments, they exhibit a poor accuracy and reproducibility. Preparing and evaluating the plates manually may strongly bias the results, and in addition this highly depends from the respective analyst who performs the tests. The comparison of thin-layer chromatographic assays applying a manual and an instrumental evaluation to results obtained from liquid chromatographic tests clearly exhibited the disadvantages particularly for determining the quality of a compound. It is almost impossible to



## SUMMARY

exactly determine the content of a sample, and a comprehensive test for related substances cannot be carried out. Using application devices and plate readers may increase the accuracy, however such instruments are a lot more expensive than simple, modular HPLC systems and normally do not belong to the standard inventory of a quality control laboratory.

Simplified HPLC methods may serve as helpful instruments for the regulatory infrastructure of developing countries. Combining them with basic thin-layer chromatographic tests and applying them comprehensively may enable the respective quality control laboratories to ensure the nationwide supply with immaculate medicines.

In the second part of this work the stability of individually prepared dilutions of commercially available norepinephrine injectable solutions was investigated and recommendations for storage conditions were derived. In hospital pharmacies it is a common practice to prepare such solutions from proprietary products by diluting them with isotonic sodium chloride solution or other suitable buffer solutions, respectively, to a concentration of 0.01 mg/ml (1:100). This is important particularly in case of emergencies, e.g. on the weekend or during holidays, because the respective medication can be held in stock even when the pharmacy is closed.

Within the framework of the experiments the influence on the stability of norepinephrine after diluting the respective proprietary product with sodium chloride solution was investigated. The samples were stored with and without refrigeration, and unprotected and protected from sunlight. The results showed that under none of the investigated storing conditions the content of norepinephrine decreased significantly. The lowest content which was found was 99.0 %. Thus, individual norepinephrine injectable solutions can be prepared in advance and storing them is possible for at least seven days. Although a degradation of the active ingredient or a diffusion in the primary packaging material (e.g. a syringe made from polyethylene) could not be observed, it is recommended to store the preparations in the refrigerator and protected from light. A microbial contamination may also be avoided like this.





# Literaturverzeichnis

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] P. Ambroise-Thomas, *The tragedy caused by fake antimalarial drugs*, *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, **2012**, 4 (1): e2012027
- [2] B. D. Glass, *Counterfeit drugs and medical devices in developing countries*, *Res. Rep. Trop. Med.*, **2014**, 5 11-22
- [3] Interpol, Operation Pangea, verfügbar unter: <http://www.interpol.int/Crime-areas/Pharmaceutical-crime/Operations/Operation-Pangea> (aufgerufen am: 23.05.2014)
- [4] World Health Organization, International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce (IMPACT), verfügbar unter: <http://www.who.int/impact/en/> (aufgerufen am: 23.05.2014)
- [5] World Health Organization, Fact sheet N° 275: Counterfeit medicines, verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/index.html> (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [6] World Health Organization, Fact sheet N° 275: Substandard and counterfeit medicines, verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs275/en/> (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [7] World Health Organization, Fact sheet N°275: Medicines: spurious/false-labelled/ falsified/ counterfeit (SFFC) medicines, verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/> (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [8] World Health Organization, Frequently Asked Questions, verfügbar unter: <http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/faqs/QACounterfeit-October2009.pdf> (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [9] World Health Organization, Counterfeit drugs: Report of a WHO/IFPMA Workshop. 1.-3. April 1992, verfügbar unter: [http://whqlibdoc.who.int/hq/1992/WHO\\_DMP\\_CFD\\_92.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1992/WHO_DMP_CFD_92.pdf) (aufgerufen am: 15.01.2015)
- [10] Committee on D. American Academy of Pediatrics, *Acetaminophen toxicity in children*, *Pediatrics*, **2001**, 108 (4): 1020-1024
- [11] International Federation of Pharmaceutical Manufacturers & Associations, The IFPMA Ten Principles on Counterfeit Medicines, verfügbar unter: [http://www.ifpma.org/fileadmin/content/Global%20Health/Counterfeits/IFPMA\\_Ten\\_Principles\\_Counterfeit\\_Medicines\\_12\\_May\\_2010.pdf](http://www.ifpma.org/fileadmin/content/Global%20Health/Counterfeits/IFPMA_Ten_Principles_Counterfeit_Medicines_12_May_2010.pdf) (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [12] International Pharmaceutical Federation, International Pharmaceutical Federation: FIP statement of policy on counterfeit medicines, verfügbar unter: [https://www.fip.org/www/uploads/database\\_file.php?id=164&table\\_id=](https://www.fip.org/www/uploads/database_file.php?id=164&table_id=) (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [13] Médecins Sans Frontières, Médecins Sans Frontières: Counterfeit, Substandard and Generic Drugs, verfügbar unter: <http://www.msfaaccess.org/content/counterfeit-substandard-and-generic-drugs> (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [14] World Health Organization, Third IMPACT General Meeting 3-5 December 2008 Hammamet, Tunisia Summary report, verfügbar unter: [http://www.who.int/impact/resources/IMPACTthirdgeneralmeeting\\_%20report.pdf](http://www.who.int/impact/resources/IMPACTthirdgeneralmeeting_%20report.pdf) (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [15] World Medical Association, Counterfeit Medical Products, verfügbar unter: <http://www.wma.net/en/20activities/30publichealth/50counterfeits/> (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [16] World Trade Organization, World Trade Organization: TRIPS Agreement, Annex 1C: Agreement on Trade-Related Aspects of Intellectual Property Rights, verfügbar unter: [http://www.wto.org/english/docs\\_e/legal\\_e/27-trips.pdf](http://www.wto.org/english/docs_e/legal_e/27-trips.pdf) (aufgerufen am: 10.05.2013)
- [17] K. Degardin, Y. Roggo, P. Margot, *Understanding and fighting the medicine counterfeit market*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 87 167-175
- [18] U. Grossmann, *Gefahren aus dem Internet*, *Pharm. Ztg.*, **2008**, (18): 42
- [19] U. Holzgrabe, *Von wirkungslos bis gefährlich*, *Pharm. Ztg.*, **2013**, 158 (3): 18-19
- [20] U. Holzgrabe, *Biologika ohne Wirkstoff*, *Pharm. Ztg.*, **2014**, 159 (37): 20-21

- [21] I. D. Montoya, E. Jano, *Online pharmacies: safety and regulatory considerations*, Int. J. Health Serv., **2007**, 37 (2): 279-289
- [22] F. M. Fernandez, D. Hostetler, K. Powell, H. Kaur, M. D. Green, D. C. Mildenhall, P. N. Newton, *Poor quality drugs: grand challenges in high throughput detection, countrywide sampling, and forensics in developing countries*, The Analyst, **2011**, 136 (15): 3073-3082
- [23] P. N. Newton, M. D. Green, F. M. Fernandez, *Impact of poor-quality medicines in the 'developing' world*, Trends Pharmacol. Sci., **2010**, 31 (3): 99-101
- [24] Y. A. Abdi, G. Rimoy, O. Ericsson, C. Alm, A. Y. Masele, *Quality of chloroquine preparations marketed in Dar es Salaam, Tanzania*, Lancet, **1995**, 346 (8983): 1161
- [25] A. A. Amin, G. O. Kokwaro, *Antimalarial drug quality in Africa*, J. Clin. Pharm. Ther., **2007**, 32 (5): 429-440
- [26] A. A. Amin, R. W. Snow, G. O. Kokwaro, *The quality of sulphadoxine-pyrimethamine and amodiaquine products in the Kenyan retail sector*, J. Clin. Pharm. Ther., **2005**, 30 (6): 559-565
- [27] L. K. Basco, *Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XIX. Quality of antimalarial drugs used for self-medication*, Am. J. Trop. Med. Hyg., **2004**, 70 (3): 245-250
- [28] M. C. Gaudiano, E. Antoniella, P. Bertocchi, L. Valvo, *Development and validation of a reversed-phase LC method for analysing potentially counterfeit antimalarial medicines*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2006**, 42 (1): 132-135
- [29] M. C. Gaudiano, A. Di Maggio, E. Cocchieri, E. Antoniella, P. Bertocchi, S. Alimonti, L. Valvo, *Medicines informal market in Congo, Burundi and Angola: counterfeit and sub-standard antimalarials*, Malar. J., **2007**, 6 22
- [30] P. C. Kayumba, P. G. Risha, D. Shewiyo, A. Msami, G. Masuki, D. Ameye, G. Vergote, J. D. Ntawukuliryayo, J. P. Remon, C. Vervaet, *The quality of essential antimicrobial and antimalarial drugs marketed in Rwanda and Tanzania: influence of tropical storage conditions on in vitro dissolution*, J. Clin. Pharm. Ther., **2004**, 29 (4): 331-338
- [31] O. M. Minzi, M. J. Moshi, D. Hipolite, A. Y. Masele, G. Tomson, O. Ericsson, L. L. Gustafsson, *Evaluation of the quality of amodiaquine and sulphadoxine/pyrimethamine tablets sold by private wholesale pharmacies in Dar Es Salaam Tanzania*, J. Clin. Pharm. Ther., **2003**, 28 (2): 117-122
- [32] J. W. Ogwal-Okeng, D. O. Okello, O. Odyek, *Quality of oral and parenteral chloroquine in Kampala*, East Afr. Med. J., **1998**, 75 (12): 692-694
- [33] R. B. Taylor, O. Shakoor, R. H. Behrens, M. Everard, A. S. Low, J. Wangboonskul, R. G. Reid, J. A. Kolawole, *Pharmacopoeial quality of drugs supplied by Nigerian pharmacies*, Lancet, **2001**, 357 (9272): 1933-1936
- [34] R. B. Taylor, O. Shakoor, R. H. Behrens, *Drug quality, a contributor to drug resistance?*, Lancet, **1995**, 346 (8967): 122
- [35] World Health Organization, WHO List of Prequalified Quality Control Laboratories, verfügbar unter: [http://apps.who.int/prequal/lists/PQ\\_QCLabsList.pdf](http://apps.who.int/prequal/lists/PQ_QCLabsList.pdf) (aufgerufen am: 20.01.2014)
- [36] S. Bagcchi, *Indian generic drugs debate heats up*, Lancet, **2014**, 384 (9951): 1334
- [37] European Commission, Summary of Community Customs Activities on Counterfeit and Piracy, verfügbar unter: [http://ec.europa.eu/taxation\\_customs/resources/documents/customs/customs\\_controls/counterfeit\\_piracy/statistics/counterf\\_comm\\_2006\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/taxation_customs/resources/documents/customs/customs_controls/counterfeit_piracy/statistics/counterf_comm_2006_en.pdf) (aufgerufen am: 07.07.2014)
- [38] Global Pharma Health Fund, GPHF-Minilab® - Fact Sheet, verfügbar unter: <http://www.gphf.org/web/de/minilab/factsheet.htm> (aufgerufen am: 28.03.2012)
- [39] R. W. O. Jahnke, G. Kusters, K. Fleischer, *Lo-cost quality assurance of medicines using the GPHF-Minilab*, Drug Inf. J., **2001**, 35 941-945

## LITERATURVERZEICHNIS

- [40] P. G. Risha, Z. Msuya, M. Clark, K. Johnson, M. Ndomondo-Sigonda, T. Layloff, *The use of Minilabs to improve the testing capacity of regulatory authorities in resource limited settings: Tanzanian experience*, Health Policy, **2008**, 87 (2): 217-222
- [41] S. Kovacs, S. E. Hawes, S. N. Maley, E. Mosites, L. Wong, A. Stergachis, *Technologies for detecting falsified and substandard drugs in low and middle-income countries*, PLoS One, **2014**, 9 (3): e90601
- [42] World Health Organization, *Survey of the Quality of Selected Antimalaria Medicines Circulating in Six Countries of Sub-Saharan Africa*, verfügbar unter: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO\\_QAMSA\\_report.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO_QAMSA_report.pdf) (aufgerufen am: 09.03.2011)
- [43] E. Deconinck, P. Y. Sacre, P. Courselle, J. O. De Beer, *Chromatography in the detection and characterization of illegal pharmaceutical preparations*, J. Chromatogr. Sci., **2013**, 51 (8): 791-806
- [44] P. Y. Sacre, E. Deconinck, M. Daszykowski, P. Courselle, R. Vancauwenberghe, P. Chiap, J. Crommen, J. O. De Beer, *Impurity fingerprints for the identification of counterfeit medicines - a feasibility study*, Anal. Chim. Acta, **2011**, 701 (2): 224-231
- [45] World Health Organization, *World Health Report 2008*, verfügbar unter: <http://www.who.int/whr/2008/en/> (aufgerufen am: 16.01.2015)
- [46] Robert Koch Institut, *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2013*, Berlin, **2013**
- [47] Robert Koch Institut, *Reiseassoziierte Infektionskrankheiten 2013*, Epid. Bull., **2014**, 42 407-410
- [48] Robert Koch Institut, *Epidemiologisches Bulletin*, Berlin, **2008**
- [49] A. Stich, K. Fischer, M. Lanzer, *Die Überlebensstrategie des Malaria-Erregers*, Biologie i.u. Zeit, **2000**, 30 194-201
- [50] N. J. White, *Antimalarial drug resistance*, J Clin Invest, **2004**, 113 (8): 1084-1092
- [51] M. Schlitzer, *Antimalarial drugs - what is in use and what is in the pipeline*, Arch Pharm (Weinheim), **2008**, 341 (3): 149-163
- [52] G. D. Shanks, A. J. Oloo, G. M. Aleman, C. Ohrt, F. W. Klotz, D. Braitman, J. Horton, R. Brueckner, *A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against Plasmodium falciparum malaria*, Clin. Infect. Dis., **2001**, 33 (12): 1968-1974
- [53] S.-Z. Steinhilber, Roth, *Medizinische Chemie*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **2010**
- [54] T. S. Kaufman, E. A. Ruveda, *The quest for quinine: those who won the battles and those who won the war*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **2005**, 44 (6): 854-885
- [55] J. I. Seeman, *The Woodward-Doering/Rabe-Kindler total synthesis of quinine: setting the record straight*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **2007**, 46 (9): 1378-1413
- [56] Y. Li, Y. L. Wu, *How Chinese scientists discovered qinghaosu (artemisinin) and developed its derivatives. What are the future perspectives?*, Med. Trop., **1998**, 58 (3 Suppl): 9-12
- [57] N. Kumar, M. Sharma, D. S. Rawat, *Medicinal chemistry perspectives of trioxanes and tetraoxanes*, Curr. Med. Chem., **2011**, 18 (25): 3889-3928
- [58] H. C. Carrington, A. F. Crowther, D. G. Davey, A. A. Levi, F. L. Rose, *A metabolite of paludrine with high antimalarial activity*, Nature, **1951**, 168 (4288): 1080
- [59] R. Michel, *Comparative study of the association of sulfalene and pyrimethamine and of sulfalene alone in mass chemoprophylaxis of malaria*, Med. Trop., **1968**, 28 (4): 488-494
- [60] I. B. Muller, J. E. Hyde, *Antimalarial drugs: modes of action and mechanisms of parasite resistance*, Future Microbiol., **2010**, 5 (12): 1857-1873
- [61] G. Carrasquilla, C. Baron, E. M. Monsell, M. Cousin, V. Walter, G. Lefevre, O. Sander, L. M. Fisher, *Randomized, prospective, three-arm study to confirm the auditory safety and efficacy of artemether-lumefantrine in Colombian patients with uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*, Am. J. Trop. Med. Hyg., **2012**, 86 (1): 75-83
- [62] *Rote Liste 2014*, Rote Liste Service GmbH, Frankfurt am Main, **2014**

- [63] E. Nürnberg, P. Surmann, J. Bertram, *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Springer Verlag, 5, Berlin, Heidelberg, New York, **1991**
- [64] S. Belz, *Das Arzneibuch*, Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, **2006**, 49 (12): 1205-1211
- [65] International Conference on Harmonisation, *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities In New Drug Substances Q3A(R2)*, **2006**
- [66] E. A. Belongia, C. W. Hedberg, G. J. Gleich, K. E. White, A. N. Mayeno, D. A. Loegering, S. L. Dunnette, P. L. Pirie, K. L. MacDonald, M. T. Osterholm, *An investigation of the cause of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with tryptophan use*, N Engl J Med, **1990**, 323 (6): 357-365
- [67] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Monographie Tryptophan, Nr. 8.0/1272*, Straßburg, Frankreich, **2014**
- [68] T. Beyer, B. Diehl, G. Randel, E. Humpfer, H. Schafer, M. Spraul, C. Schollmayer, U. Holzgrabe, *Quality assessment of unfractionated heparin using 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2008**, 48 (1): 13-19
- [69] T. Beyer, M. Matz, D. Brinz, O. Radler, B. Wolf, J. Norwig, K. Baumann, S. Alban, U. Holzgrabe, *Composition of OSCS-contaminated heparin occurring in 2008 in batches on the German market*, Eur. J. Pharm. Sci., **2010**, 40 (4): 297-304
- [70] J. Norwig, T. Beyer, D. Brinz, U. Holzgrabe, M. Diller, D. Manns, *Prediction of the oversulphated chondroitin sulphate contamination of unfractionated heparin by ATR-IR spectrophotometry*, Pharmeur Sci Notes, **2009**, 2009 (1): 17-24
- [71] P. N. Newton, M. D. Green, D. C. Mildenhall, A. Plancon, H. Nettey, L. Nyadong, D. M. Hostetler, I. Swamidoss, G. A. Harris, K. Powell, A. E. Timmermans, A. A. Amin, S. K. Opuni, S. Barbereau, C. Faurant, R. C. Soong, K. Faure, J. Thevanayagam, P. Fernandes, H. Kaur, B. Angus, K. Stepniewska, P. J. Guerin, F. M. Fernandez, *Poor quality vital anti-malarials in Africa - an urgent neglected public health priority*, Malar. J., **2011**, 10 352
- [72] World Health Organization, Tool for visual inspection of medicines, verfügbar unter: [http://www.whpa.org/toolkit\\_beaware\\_inspection.pdf](http://www.whpa.org/toolkit_beaware_inspection.pdf) (aufgerufen am: 16.01.2015)
- [73] R. Martino, M. Malet-Martino, V. Gilard, S. Balayssac, *Counterfeit drugs: analytical techniques for their identification*, Analytical and bioanalytical chemistry, **2010**, 398 (1): 77-92
- [74] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Kapitel 2.3.1: Identitätsreaktionen auf Ionen und funktionelle Gruppen*, Straßburg, Frankreich, **2014**
- [75] R. W. O. Jahnke, *Manual Accompanying The GPHF-Minilab®: A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other Medicines. Volume I on Colour Reaction Tests*, Global Pharma Health Fund, Darmstadt, **2008**
- [76] A. A. Weaver, H. Reiser, T. Barstis, M. Benvenuti, D. Ghosh, M. Hunckler, B. Joy, L. Koenig, K. Raddell, M. Lieberman, *Paper analytical devices for fast field screening of beta lactam antibiotics and antituberculosis pharmaceuticals*, Anal Chem, **2013**, 85 (13): 6453-6460
- [77] R. Bate, P. Coticelli, R. Tren, A. Attaran, *Antimalarial Drug Quality in the Most Severely Malarious Parts of Africa – A Six Country Study*, PLoS one, **2008**, 3 (5): e2132
- [78] P. N. Newton, F. M. Fernandez, A. Plancon, D. C. Mildenhall, M. D. Green, L. Ziyong, E. M. Christophel, S. Phanouvong, S. Howells, E. McIntosh, P. Laurin, N. Blum, C. Y. Hampton, K. Faure, L. Nyadong, C. W. Soong, B. Santoso, W. Zhiguang, J. Newton, K. Palmer, *A collaborative epidemiological investigation into the criminal fake artesunate trade in South East Asia*, PLoS Med, **2008**, 5 (2): e32
- [79] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Grundwerk 2014* Straßburg, Frankreich, **2014**

- [80] H. Kaur, C. Goodman, E. Thompson, K. A. Thompson, I. Masanja, S. P. Kachur, S. Abdulla, *A nationwide survey of the quality of antimalarials in retail outlets in Tanzania*, PloS one, **2008**, 3 (10): e3403
- [81] O. Onwujekwe, H. Kaur, N. Dike, E. Shu, B. Uzochukwu, K. Hanson, V. Okoye, P. Okonkwo, *Quality of anti-malarial drugs provided by public and private healthcare providers in south-east Nigeria*, Malar. J., **2009**, 8 22
- [82] P. G. Risha, D. Shewiyo, A. Msami, G. Masuki, G. Vergote, C. Vervaet, J. P. Remon, *In vitro evaluation of the quality of essential drugs on the Tanzanian market*, Trop. Med. Int. Health, **2002**, 7 (8): 701-707
- [83] R. Bate, K. Hess, *Anti-malarial drug quality in Lagos and Accra - a comparison of various quality assessments*, Malar. J., **2010**, 9: 157
- [84] K. Ferenczi-Fodor, Z. Vegh, B. Renger, *Impurity profiling of pharmaceuticals by thin-layer chromatography*, J. Chromatogr. A, **2011**, 1218 (19): 2722-2731
- [85] H. Halpaap, *Standardization of thin-layer chromatography using prefabricated layers*, J. Chromatogr., **1968**, 33 144-164
- [86] G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems, *Instrumentelle Pharmazeutische Analytik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 3, Stuttgart, **2001**
- [87] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Kapitel 2.2.29: Flüssigchromatographie*, Straßburg, Frankreich, **2014**
- [88] J. A. Lippert, T. M. Johnson, J. B. Lloyd, J. P. Smith, B. T. Johnson, J. Furlow, A. Proctor, S. J. Marin, *Effects of elevated temperature and mobile phase composition on a novel C18 silica column*, J. Sep. Sci., **2007**, 30 (8): 1141-1149
- [89] S. Kromidas, *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim, **2011**
- [90] International Conference on Harmonisation, *Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, **2005**
- [91] EDQM, Technical Guide for the elaboration of monographs, 6th edition, verfügbar unter: [https://www.edqm.eu/site/technical\\_guide\\_for\\_the\\_elaboration\\_of\\_monographs\\_pdf-en-30724-2.html](https://www.edqm.eu/site/technical_guide_for_the_elaboration_of_monographs_pdf-en-30724-2.html) (aufgerufen am: 12.12.2014)
- [92] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Kapitel 2.2.46: Chromatographische Trennmethoden*, Straßburg, Frankreich, **2014**
- [93] Bundesministerium für Bildung und Forschung, Bekanntmachung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung: "Partnerschaften für nachhaltige Problemlösungen in Entwicklungsländern": Sondierungs-, Anbahnungsmaßnahmen für Partnerschaften in Wissenschaft, Forschung und Bildung, Pilotmaßnahme mit Afrika, verfügbar unter: <http://www.bmbf.de/foerderungen/14683.php> (aufgerufen am: 27.04.2010)
- [94] R. W. O. Jahnke, *Manual Accompanying The GPHF-Minilab®: A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other Medicines. Volume II on Thin Layer Chromatographic Tests*, Global Pharma Health Fund, Darmstadt, **2008**
- [95] T. Layloff, Quality Assurance for Pharmaceuticals. MDS-3: Managing Access to Medicines and Health Technologies, Chapter 19, verfügbar unter: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19596en/s19596en.pdf> (aufgerufen am: 05.12.2014)
- [96] S. Kueppers, A. Brandt, *Practical aspects of preparative HPLC in pharmaceutical development production*, LC-GC Europe, **2002**, 20 (1): 147-151
- [97] L. R. Snyder, J. W. Dolan, *Optimizing selectivity during reversed-phase high performance liquid chromatography method development: prioritizing experimental conditions*, J. Chromatogr. A, **2013**, 1302 45-54



- [98] R. G. Wolcott, J. W. Dolan, L. R. Snyder, S. R. Bakalyar, M. A. Arnold, J. A. Nichols, *Control of column temperature in reversed-phase liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, **2000**, 869 (1-2): 211-230
- [99] S. Gorog, M. Babjak, G. Balogh, J. Brlík, A. Csehi, F. Dravec, M. Gasdag, P. Horvath, A. Lauko, K. Varga, *Drug impurity profiling strategies*, Talanta, **1997**, 44 (9): 1517-1526
- [100] J. A. Mollica, S. Ahuja, J. Cohen, *Stability of pharmaceuticals*, J. Pharm. Sci., **1978**, 67 (4): 443-465
- [101] P. N. Patil, J. B. LaPidus, D. Campbell, A. Tye, *Steric aspects of adrenergic drugs. II. Effects of DL isomers and desoxy derivatives on the reserpine-pretreated vas deferens*, J. Pharmacol. Exp. Ther., **1967**, 155 (1): 13-23
- [102] W. H. Church, S. S. Hu, A. J. Henry, *Thermal degradation of injectable epinephrine*, Am. J. Emerg. Med., **1994**, 12 (3): 306-309
- [103] T. A. Grant, R. G. Carroll, W. H. Church, A. Henry, N. H. Prasad, A. A. Abdel-Rahman, E. J. Allison, Jr., *Environmental temperature variations cause degradations in epinephrine concentration and biological activity*, The American journal of emergency medicine, **1994**, 12 (3): 319-322
- [104] J. Haggendal, G. Johnsson, *The stability of noradrenaline in infusion solutions*, Acta pharmacologica et toxicologica, **1967**, 25 (4): 461-464
- [105] S. Kerddonfak, W. Manuyakorn, W. Kamchaisatian, C. Sasisakulporn, W. Teawsomboonkit, S. Benjaponpitak, *The stability and sterility of epinephrine prefilled syringe*, Asian Pac. J. Allergy Immunol., **2010**, 28 (1): 53-57
- [106] D. L. Palazzolo, S. K. Quadri, *Optimal conditions for long-term storage of biogenic amines for subsequent analysis by column chromatography with electrochemical detection*, J. Chromatogr., **1990**, 518 258-263
- [107] M. Tremblay, M. R. Lessard, C. A. Trepanier, P. C. Nicole, L. Nadeau, G. Turcotte, *Stability of norepinephrine infusions prepared in dextrose and normal saline solutions*, Can. J. Anaesth., **2008**, 55 (3): 163-167
- [108] Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, *Fachinformation "Arterenol 1 und 25 ml"*, **2010**,
- [109] L. A. Trissel, *Handbook on Injectable Drugs*, Dt. Apotheker-Verlag, Stuttgart, **2007**
- [110] M. Hamnett, *Formulation and stability of neutral adrenaline eye drops*, J. Hosp. Pharm., **1975**, 33 70-75
- [111] P. Lundgren, S. Strom, *Stability of adrenaline in 0.1 per cent solutions. Experience from production control*, Acta Pharm. Suec. , **1966**, 3 (4): 273-280
- [112] J. Morch, K. Morch, *Studies on the Stability of Drugs. 13. The Stability of Adrenaline Eye-Drops*, Dan. Tidsskr. Farm., **1965**, 39 117-125
- [113] H. Wollmann, G. Raether, *On the Testing of Stabilizers for Efficiency in Epinephrine Model Solutions; Part 19: Stability of Drugs and Pharmaceutical Preparations*, Pharmazie, **1983**, 38 (1): 37-42
- [114] H. Cox, Y. Boer, *Toelichting bij aanvulling 9 van het FNA*, Pharm. Weekbl., **1975**, 110 113-117
- [115] L. C. Schroeter, T. Higuchi, *Kinetics and Mechanism of Formation of Sulfonate from Epinephrine and Bisulfite*, J. Am. Chem. Soc., **1960**, 82 1904-1907
- [116] B. Grubstein, E. A. Milano, *Stabilization of Epinephrine in a Local Anesthetic Injectable Solution using reduced Levels of Sodium Metabisulfite and EDTA*, Drug Develop. Ind. Pharm., **1992**, 18 1549-1566
- [117] R. Bonevski, J. Momirovic-Culjat, L. Balint, *Inhibition of epinephrine oxidation in weak alkaline solutions*, J. Pharm. Sci., **1978**, 67 (10): 1474-1476
- [118] L. C. Schroeter, T. Higuchi, E. E. Schuler, *Degradation of epinephrine induced by bisulfite*, J. Am. Pharmaceut. Assoc., **1958**, 47 (10): 723-728

## LITERATURVERZEICHNIS

- [119] T. D. Sokoloski, T. Higuchi, *Kinetics of degradation in solution of epinephrine by molecular oxygen*, Journal of pharmaceutical sciences, **1962**, 51 172-177
- [120] S. M. Waraszkievicz, E. A. Milano, R. DiRubio, *Stability-indicating high-performance liquid chromatographic analysis of lidocaine hydrochloride and lidocaine hydrochloride with epinephrine injectable solutions*, J. Pharm. Sci., **1981**, 70 (11): 1215-1218
- [121] H. Baran, G. Schwedt, *Identifizierung von Epinephrin (Adrenalin)-Zersetzungsprodukten in Infusionslösungen mittels HPLC und Multidetektion*, Pharmazie, **1993**, 48 (4): 273-275
- [122] A. Zarghi, M. Amini, S. Alesahbafosul, *An ion-pair high-performance liquid chromatography method for stability studies of epinephrine acid tartrate in injectable solution*, Boll. Chim. Farm., **2001**, 140 (2): 115-118
- [123] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Monographie Noradrenalin tartrat, Nr. 01/2008:0285*, Straßburg, Frankreich **2014**
- [124] US Pharmacopoeial Convention, *USP 37 - NF 32, Monograph "Epinephrine Injection"*, Rockeville, Maryland, USA, **2014**
- [125] US Pharmacopoeial Convention, *USP 37 - NF 32, Monograph "Norepinephrine Bitartrate Injection"*, Rockeville, Maryland, USA, **2014**
- [126] P. A. Asmus, C. R. Freed, *Reversed-phase high-performance liquid chromatography of catecholamines and their congeners with simple acids as ion-pairing reagents*, J. Chromatogr., **1979**, 169 303-311
- [127] R. Grunert, H. Wollmann, *[Effect of ultraviolet and visible light on drugs of the phenylalkylamine series with a view toward their stability in plastic containers. 17. Stability of drugs and preparations. 83. Problems of the use of plastic containers for liquid pharmaceuticals]*, Pharmazie, **1982**, 37 (11): 798-799
- [128] J. E. M. Burckhalter J.H., Rawlins L., Tendick F. H., Holcomb W. F. , *Quinoline Compounds and Process of making same*, **1949**
- [129] J. H. Burckhalter, F. H. Tendick, et al., *Aminoalkylphenols as antimalarials; simple substituted alpha-aminocresols*, J. Am. Chem. Soc., **1946**, 68 (10): 1894-1901
- [130] C. D. Fitch, *Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs*, Life Sci., **2004**, 74 (16): 1957-1972
- [131] US Pharmacopoeial Convention, *USP 37 - NF 32, Monographie "Amodiaquine Hydrochloride"*, Rockeville, Maryland, USA, **2014**
- [132] World Health Organization, *The International Pharmacopoeia, Fourth Edition*, verfügbar unter: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/> (aufgerufen am: 16.01.2015)
- [133] V. G. Dongre, P. P. Karmuse, P. D. Ghugare, S. K. Kanojiya, S. Rawal, *Investigation of amodiaquine bulk drug impurities by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., **2008**, 22 (14): 2227-2233
- [134] O. M. Minzi, M. Rais, J. O. Svensson, L. L. Gustafsson, O. Ericsson, *High-performance liquid chromatographic method for determination of amodiaquine, chloroquine and their monodesethyl metabolites in biological samples*, J. Chromatogr. B. Analyt. Techno. Biomed. Life Sci., **2003**, 783 (2): 473-480
- [135] D. J. Bell, S. K. Nyirongo, M. E. Molyneux, P. A. Winstanley, S. A. Ward, *Practical HPLC methods for the quantitative determination of common antimalarials in Africa*, J. Chromatogr. B. Analyt. Techno. Biomed. Life Sci., **2007**, 847 (2): 231-236
- [136] H. Hsu, C. Chien, *Validation of Analytical Methods: A Simple Model for HPLC Assay Methods*, J. Food Drug Anal., **1994**, 2 (3): 161-176
- [137] C. f. D. E. a. R. U.S. Food and Drug Administration, *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, Rockville, MD, **1994**

- [138] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Monographie Proguanilhydrochlorid, Nr. 01/2008:2002*, Straßburg, Frankreich, **2014**
- [139] US Pharmacopoeial Convention, *USP 37 - NF 32, Monographie "Proguanil Hydrochloride"*, Rockville, Maryland, USA, **2014**
- [140] World Health Organization, *The International Pharmacopoeia: Monographs: Pharmaceutical Substances: Proguanil hydrochloride*, **2013**
- [141] F. H. Curd, F. L. Rose, *Synthetic antimalarials; some aryl-diguanide ("-biguanide") derivatives*, J. Chem. Soc., **1946**, 729-737
- [142] R. R. Moody, A. B. Selkirk, R. B. Taylor, *High-performance liquid chromatography of proguanil, cycloguanil and 4-chlorophenylbiguanide using hydrophobic pairing ion and its application to serum assay*, Journal of chromatography, **1980**, 182 (3-4): 359-367
- [143] R. R. Moody, R. B. Taylor, *An HPLC assay for the determination of proguanil hydrochloride in tablets*, Int. J. Pharm., **1980**, 7 (2): 177-178
- [144] R. B. Taylor, R. R. Moody, N. A. Ocheke, *Determination of proguanil and its metabolites cycloguanil and 4-chlorophenylbiguanide in plasma, whole blood and urine by high-performance liquid chromatography*, J Chromatogr, **1987**, 416 (2): 394-399
- [145] R. B. Taylor, R. R. Moody, N. A. Ocheke, A. S. Low, M. I. A. Harper, *A chemical stability study of proguanil hydrochloride*, Int. J. Pharm., **1990**, 60 (3): 185-190
- [146] R. B. Taylor, C. Alexander, D. nathwani, N. Zimble, *Determination of proguanil, cycloguanil and 4-chlorophenylbiguanide in saliva and plasma by ion-pairing column switching HPLC*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., **1996**, 19 (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 1317-1328
- [147] P. F. de Aguiar, Y. V. Vander Heyden, Y. Van Oost, T. J. Coomber, D. L. Massart, *Optimisation of the reversed phase liquid chromatographic separation of atovaquone, proguanil and related substances*, J Pharm Biomed Anal, **1997**, 15 (11): 1781-1787
- [148] J. F. Chaulet, G. Grelaud, P. Bellemin-Magninot, C. Mounier, J. L. Brazier, *Simultaneous determination of chloroquine, proguanil and their metabolites in human biological fluids by high-performance liquid chromatography*, Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, **1994**, 12 (1): 111-117
- [149] J. A. Kelly, K. A. Fletcher, *High-performance liquid chromatographic method for the determination of proguanil and cycloguanil in biological fluids*, Journal of chromatography, **1986**, 381 (2): 464-471
- [150] C. J. Ohnmacht, A. R. Patel, R. E. Lutz, *Antimalarials. 7. Bis(trifluoromethyl)-(2-piperidyl)-4-quinolinemethanols*, J. Med. Chem., **1971**, 14 (10): 926-928
- [151] M. Schlitzer, *Malaria chemotherapeutics part I: History of antimalarial drug development, currently used therapeutics, and drugs in clinical development*, ChemMedChem, **2007**, 2 (7): 944-986
- [152] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Monographie Mefloquinhydrochlorid, No. 01/2008:1241*, Straßburg, Frankreich, **2014**
- [153] A. E. Kleemann, J., *Pharmaceutical substances*, Thieme, Stuttgart, New York, **1999**
- [154] G. Grethe, T. Mitt, *Verfahren zur Herstellung von Mefloquin*, DE 2806909 A1; **1978**
- [155] E. Hickmann, H. G. Oeser, L. Moebius, *Verfahren zur Herstellung von erythro-alpha-2-Piperidyl-2,8-bis-(trifluormethyl)-4-chinolin-methanol*, EP 0 026 894 A1; **1981**
- [156] US Pharmacopoeial Convention, *USP 37 - NF 32, Monographie "Mefloquine Hydrochloride"*, Rockville, Maryland, USA, **2014**
- [157] World Health Organization, *The International Pharmacopoeia: Monographs: Pharmaceutical Substances: Mefloquine hydrochloride*, **2013**
- [158] Y. Bergqvist, J. al Kabbani, B. Krysen, I. Berggren Palme, L. Rombo, *High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of mefloquine and its carboxylic*

- metabolite in 100-microliters capillary blood samples dried on paper*, J. Chromatogr., **1993**, 615 (2): 297-302
- [159] M. D. Edstein, I. D. Lika, T. Chongsuphajaisiddhi, A. Sabchareon, H. K. Webster, *Quantitation of Fansimef components (mefloquine + sulfadoxine + pyrimethamine) in human plasma by two high-performance liquid chromatographic methods*, Therapeutic drug monitoring, **1991**, 13 (2): 146-151
- [160] G. O. Gbotosho, C. T. Happi, O. Lawal, A. Sijuade, A. Sowunmi, A. Oduola, *A high performance liquid chromatographic assay of mefloquine in saliva after a single oral dose in healthy adult Africans*, Malar. J., **2012**, 11 59
- [161] I. M. Kapetanovic, J. D. DiGiovanni, J. Bartosevich, V. Melendez, B. J. Von, M. Heiffer, *Analysis of the antimalarial, mefloquine, in blood and plasma using high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **1983**, 277 209-215
- [162] C. S. Lai, N. K. Nair, S. M. Mansor, P. L. Olliaro, V. Navaratnam, *An analytical method with a single extraction procedure and two separate high performance liquid chromatographic systems for the determination of artesunate, dihydroartemisinin and mefloquine in human plasma for application in clinical pharmacological studies of the drug combination*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **2007**, 857 (2): 308-314
- [163] Y. Qiu, S. Kitamura, J. K. Guillory, *A high-performance liquid chromatographic method for the quantitative enantioselective analysis of mefloquine stereoisomers*, Pharm. Res., **1992**, 9 (12): 1640-1643
- [164] N. B. Tembhurkar, V. V. Chopade, S. B. Jadhav, P. D. Chaudhari, *Development and validation of stability indicating HPLC assay method for determination of mefloquine HCl in bulk and pharmaceutical formulations*, J. Pharm. Res., **2012**, 5 (9): 4929-4933
- [165] M. S. Arayne, N. Sultana, F. A. Siddiqui, S. Naseem, F. Qureshi, *Simultaneous determination of pyrimethamine, sulfadoxine, mefloquine, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by RP-HPLC*, Med. Chem. Res., **2010**, 19 1043-1054
- [166] Y. Bergqvist, S. Eckerbom, H. Larsson, M. Malekzadeh, *Reversed-phase liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the antimalarial drugs sulfadoxine, pyrimethamine, mefloquine and its major carboxylic metabolite in plasma*, J. Chromatogr., **1991**, 571 (1-2): 169-177
- [167] M. D. Green, Y. Bergqvist, D. L. Mount, S. Corbett, M. J. D'Souza, *Improved validated assay for the determination of mefloquine and its carboxy metabolite in plasma, serum and whole blood using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **1999**, 727 (1-2): 159-165
- [168] J. M. Grindel, P. F. Tilton, R. D. Shaffer, *Quantitation of the antimalarial agent, mefloquine, in blood, plasma, and urine using high-pressure liquid chromatography*, J. Pharm. Sci., **1977**, 66 (6): 834-837
- [169] A. Guenzi, G. Cappelletti, A. Scala, M. Zanetti, *Simultaneous determination of pyrimethamine and mefloquine in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, J. Chromatogr., **1989**, 494 219-230
- [170] F. H. Nogueira, P. Goulart Lde, C. Cesar Ida, L. M. de Campos, G. A. Pianetti, *Development and validation of an HPLC method for mefloquine hydrochloride determination in tablet dosage form*, J. AOAC Int., **2011**, 94 (4): 1089-1093
- [171] A. J. Lin, M. Lee, D. L. Klayman, *Antimalarial activity of new water-soluble dihydroartemisinin derivatives. 2. Stereospecificity of the ether side chain*, J. Med. Chem., **1989**, 32 (6): 1249-1252
- [172] X. D. Luo, H. J. C. Yeh, A. Brossi, J. L. Flippen-Anderson, R. Gilardi, *The chemistry of drugs. Part IV. Configurations of antimalarials derived from qinghaosu: dihydroqinghaosu, artemether, and artesunic acid*, Helv. Chim. Acta, **1984**, 67 (6): 1515-1522

- [173] M. A. Avery, C. Jennings-White, W. K. M. Chong, *Total synthesis of (+)-artemisinin and (+)-9-demethylartemisinin*, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28 (40): 4629-4632
- [174] J. B. Bhonsle, B. Pandey, V. H. Deshpande, T. Ravindranathan, *New synthetic strategies towards (+)-artemisinin*, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35 (30): 5489-5492
- [175] G. Schmid, W. Hofheinz, *Total synthesis of qinghaosu*, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105 (3): 624-625
- [176] J. S. Yadav, R. S. Babu, G. Sabitha, *Total synthesis of (+)-artemisinin*, *ARKIVOC* (Gainesville, FL, USA), **2003**, (3): 125-139
- [177] W.-S. Zhou, X.-X. Xu, *Total Synthesis of the Antimalarial Sesquiterpene Peroxide Qinghaosu and Yingzhaosu A*, *Acc. Chem. Res.*, **1994**, 27 (7): 211-216
- [178] C. J. Paddon, P. J. Westfall, D. J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. D. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, D. R. Polichuk, K. H. Teoh, D. W. Reed, T. Treynor, J. Lenihan, M. Fleck, S. Bajad, G. Dang, D. Diola, G. Dorin, K. W. Ellens, S. Fickes, J. Galazzo, S. P. Gaucher, T. Geistlinger, R. Henry, M. Hepp, T. Horning, T. Iqbal, H. Jiang, L. Kizer, B. Lieu, D. Melis, N. Moss, R. Regentin, S. Secrest, H. Tsuruta, R. Vazquez, L. F. Westblade, L. Xu, M. Yu, Y. Zhang, L. Zhao, J. Lievense, P. S. Covello, J. D. Keasling, K. K. Reiling, N. S. Renninger, J. D. Newman, *High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin*, *Nature*, **2013**, 496 (7446): 528-532
- [179] D.-K. Ro, E. M. Paradise, M. Ouellet, K. J. Fisher, K. L. Newman, J. M. Ndungu, K. A. Ho, R. A. Eachus, T. S. Ham, J. Kirby, M. C. Y. Chang, S. T. Withers, Y. Shiba, R. Sarpong, J. D. Keasling, *Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast*, *Nature*, **2006**, 440 (7086): 940-943
- [180] J. Golenser, J. H. Waknine, M. Krugliak, N. H. Hunt, G. E. Grau, *Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins*, *Int. J. Parasitol.*, **2006**, 36 (14): 1427-1441
- [181] R. Deng, J. Zhong, D. Zhao, J. Wang, *Synthesis of antimalarial drug benflumetol*, *Yaoxue Xuebao*, **2000**, 35 (1): 22-25
- [182] J. Zhong, R. Deng, J. Wang, Q. Zheng, K. Jiao, *Crystal and molecular structure of the antimalarial agent  $\alpha$ -(dibutylaminomethyl)-2,7-dichloro-9-(p-chlorobenzylidene)-4-fluorene-methanol (benflumetol)*, *Yaoxue Xuebao*, **1997**, 32 (11): 824-829
- [183] US Pharmacopoeial Convention, *USP 34 - NF 29, Monographie "Lumefantrine"*, Rockville, Maryland, USA, **2011**
- [184] World Health Organization, *The International Pharmacopoeia: Monographs: Dosage Forms: Specific Monographs: Artemether and lumefantrine tablets*, **2013**
- [185] M. A. Atemnkeng, E. Marchand, J. Plaizier-Vercammen, *Assay of artemether, methylparaben and propylparaben in a formulated paediatric antimalarial dry suspension*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43 (2): 727-732
- [186] I. d. C. Cesar, G. A. Pianetti, *Quantitation of artemether in pharmaceutical raw material and injections by high performance liquid chromatography*, *Braz. J. Pharm. Sci.*, **2009**, 45 (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 737-742
- [187] D. K. Muhia, E. K. Mberu, W. M. Watkins, *Differential extraction of artemether and its metabolite dihydroartemisinin from plasma and determination by high-performance liquid chromatography*, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **1994**, 660 (1): 196-199
- [188] C. G. Thomas, S. A. Ward, G. Edwards, *Selective determination, in plasma, of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, *J. Chromatogr.*, **1992**, 583 (1): 131-136
- [189] J. Yao, Q. Cheng, Q. Zhang, S. Jin, *HPLC determination of artemether injection*, *Yaowu Fenxi Zazhi*, **2008**, 28 91-92
- [190] J. Karbwang, K. Na-Bangchang, P. Molunto, V. Banmairui, K. Congpuong, *Determination of artemether and its major metabolite, dihydroartemisinin, in plasma using high-performance liquid*

- chromatography with electrochemical detection*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **1997**, 690 (1-2): 259-265
- [191] V. Navaratnam, S. M. Mansor, L. K. Chin, M. N. Mordi, M. Asokan, N. K. Nair, *Determination of artemether and dihydroartemisinin in blood plasma by high-performance liquid chromatography for application in clinical pharmacological studies*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **1995**, 669 (2): 289-294
- [192] N. Lindegardh, A. Annerberg, D. Blessborn, Y. Bergqvist, N. Day, N. J. White, *Development and validation of a bioanalytical method using automated solid-phase extraction and LC-UV for the simultaneous determination of lumefantrine and its desbutyl metabolite in plasma*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2005**, 37 (5): 1081-1088
- [193] S. M. Mansor, V. Navaratnam, N. Yahaya, N. K. Nair, W. H. Wernsdorfer, P. H. Degen, *Determination of a new antimalarial drug, benflumetol, in blood plasma by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **1996**, 682 (2): 321-325
- [194] M. Y. Zeng, Z. L. Lu, S. C. Yang, M. Zhang, J. Liao, S. L. Liu, X. H. Teng, *Determination of benflumetol in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., **1996**, 681 (2): 299-306
- [195] R. Arun, S. A. Anton, *Simultaneous HPLC-UV method for the estimation of artemether and lumefantrine in tablet dosage form*, Int. J. Pharm. Biomed. Res., **2011**, 2 (Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): 201-205
- [196] I. d. C. Cesar, F. H. Andrade Nogueira, G. Antonio Pianetti, *Simultaneous determination of artemether and lumefantrine in fixed dose combination tablets by HPLC with UV detection*, J. Pharm. Biomed. Anal., **2008**, 48 (3): 951-954
- [197] T. M. Kalyankar, R. B. Kakde, *Reversed-phase liquid chromatographic method for simultaneous determination of artemether and lumefantrine in pharmaceutical preparation*, Int. J. Chem. Tech. Res., **2011**, 3 1722-1727
- [198] J. Sunil, N. M. Sanjith, M. U. Samba, *HPLC method development and validation for simultaneous estimation of artemether and lumefantrine in pharmaceutical dosage forms*, Int. J. Pharm. Pharm. Sci., **2010**, 2 93-96
- [199] EDQM, *Europäisches Arzneibuch 8.0, Kapitel 4.1.3: Reagenzien*, Straßburg, Frankreich, **2014**
- [200] European Medicines Agency, *Assessment of the quality of medicinal products containing existing/known active substances*, verfügbar unter: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Regulatory\\_and\\_procedural\\_guideline/2009/11/WC500014312.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2009/11/WC500014312.pdf) (aufgerufen am: 02.03.2015)
- [201] World Health Organization, *WHO Model List of Essential Medicines for Adults*, verfügbar unter: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf) (aufgerufen am: 29.03.2012)
- [202] World Health Organization, *WHO Model List of Essential Medicines for Children*, verfügbar unter: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95054\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95054_eng.pdf) (aufgerufen am: 29.03.2012)
- [203] M. T. W. Hearn, *Ion-Pair Chromatography: Theory and Biological and Pharmaceutical Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1985**
- [204] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, John Wiley & Sons, Inc., 2, New York, **1997**

# 9

Anhang

## 9 Anhang

### 9.1 Publikationsverzeichnis

#### 9.1.1 Originalarbeiten

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Form veröffentlicht:

- N. Bah-Traore, **L. Höllein**, J. Baeumert, H. Schweim, U. Holzgrabe  
Poor manufacturing practices and the problem of substandard medicines in  
sub-Saharan Africa.  
Scrip Regulatory Affairs, **November 2011**.
- L. Höllein**, U. Holzgrabe  
Facts and Facts of Epinephrine and Norepinephrine Stability in Injectable Solutions.  
International Journal of Pharmaceutics **2012**, 434, 468-480.
- L. Höllein**, E. Bennack, U. Holzgrabe  
Stabilität, Qualität und Analytik individueller Noradrenalin-Zubereitungen.  
Krankenhauspharmazie **2012**, 33, 427-430.
- L. Höllein**, U. Holzgrabe  
Development of Simplified HPLC Methods for the Detection of Counterfeit Antimalarials  
in Resource-Restrained Environments.  
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **2014**, 98, 434-445.
- E. Kaale, **L. Höllein**, U. Holzgrabe  
Development and Validation of a Generic Stability-Indicating MEEKC Method for Five  
Fluoroquinolone Antibiotics.  
Electrophoresis, Manuskript in Revision.



### 9.1.2 Posterbeiträge

**L. Höllein**, U. Holzgrabe

Development of simplified HPLC methods for the detection of counterfeit antimalarials in resource-restraint settings.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Freiburg i. Breisgau **2013**.

**L. Höllein**, M. H. Schulze, U. Holzgrabe

Are simple field assays for routine quality control still appropriate for the detection of counterfeit, substandard and poor-quality medicines in resource-limited environments?

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit, Düsseldorf **2014**.

**L. Höllein**, U. Holzgrabe

Simplified liquid chromatographic methods for the analysis of essential medicines - a promising tool for enabling routine pharmaceutical quality control in developing countries.

Drug Analysis 2014, Liège, Belgien **2014**.

**L. Höllein**, U. Holzgrabe

Analytical technologies for the detection of counterfeit medicines: Are simple field assays still suitable for the routine quality control of pharmaceuticals in developing countries?

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Frankfurt am Main **2014**.

### 9.1.3 Vorträge

**L. Höllein**

„WHO-präqualifizierte Laboratorien und staatliche Arzneimittel-Kontrollbehörden zur Sicherstellung einer Versorgung mit essentiellen Medikamenten?“

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit, Sitzung „Global priorities versus local needs in prevention and clinical care“, Düsseldorf **2014**.

## 9.2 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellen

| Tabellen-Nummer   | Bezeichnung   |
|-------------------|---|
| Tabelle 1.1-1     | Entwicklung der WHO-Definition des Begriffes „Arzneimittelfälschung“ von 1992 bis heute.  |
| Tabelle 1.1-2     | Definition des Begriffes „Counterfeit Medicines“ verschiedener Organisationen.  |
| Tabelle 1.1-3     | Fälle von Arzneimittelfälschungen in Europa bzw. den USA. Quelle: [19, 20].   |
| Tabelle 1.2.1-1   | Verschiedene Studien zur Arzneimittelqualität in Afrika.  |
| Tabelle 1.2.4.1-1 | Wirkprinzipien der aktuell verfügbaren Malariamedikamente.  |
| Tabelle 2.6.1-1   | Durchzuführende Validierungsparameter nach ICH-Richtlinie Q2(R1).   |
| Tabelle 4.10.2-1  | Pufferlösungen.   |
| Tabelle 4.10.3-1  | Stammlösungen (SL).   |
| Tabelle 4.10.4-1  | Arbeitslösungen (AL).   |
| Tabelle 5.1-1     | Übersicht der Arzneibuchmethoden für die untersuchten Arzneistoffe.   |
| Tabelle 5.1-2     | Die Zusammensetzung der mobilen Phase und die gewählte Flussrate bestimmen maßgeblich den Verbrauch an organischem Lösungsmittel (exemplarische Daten). |
| Tabelle 5.2.1-1   | Ausgewählte Literaturdaten zur Stabilität Adrenalin-haltiger Lösungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.   |
| Tabelle 5.2.1.-2  | Ausgewählte Literaturdaten zur Stabilität Noradrenalin-haltiger Lösungen unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.                                      |
| Tabelle 5.2.2-1   | Kombination verschiedener Konservierungsstoffe und Effekte auf die Haltbarkeit von Noradrenalin. Quelle: [113].   |
| Tabelle 5.2.5-1   | Linearitätsmessung von Noradrenalin und Isoprenalin.  |
| Tabelle 5.2.5-2   | Bestimmung von Mengen- und Signalverhältnis des internen Standards Isoprenalin.   |
| Tabelle 5.2.5-3   | Bestimmung der Wiederholpräzision für Noradrenalin.   |
| Tabelle 5.2.6-1   | Auswertung der Stabilitätsprüfungen mittels externem und internem Standard.   |
| Tabelle 5.3.2-1   | Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Amodiaquin.   |
| Tabelle 5.3.3-1   | Daten der Linearitätsbestimmung für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.  |
| Tabelle 5.3.3-2   | Regressionsdaten für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.   |
| Tabelle 5.3.3-3   | Wiederholpräzision für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.   |
| Tabelle 5.3.3-4   | Amodiaquin: Robustheit gegenüber der Temperatur.  |
| Tabelle 5.3.3-5   | Amodiaquin: Robustheit gegenüber dem <i>pH</i> -Wert der mobilen Phase.   |
| Tabelle 5.4.2-1   | Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Proguanil.  |
| Tabelle 5.4.3-1   | Proguanil: Regressionsdaten für PG und die Verunreinigungen A-E.  |

## ANHANG

| Tabellen-Nummer | Bezeichnung   |
|-----------------|---|
| Tabelle 5.4.3-2 | Proguanil: Chromatographische Daten der Linearitätsbestimmung.  |
| Tabelle 5.4.3-3 | Proguanil: Wiederholpräzision.  |
| Tabelle 5.4.3-4 | Proguanil: Robustheit gegenüber der Trenntemperatur.  |
| Tabelle 5.3.3-5 | Proguanil: Robustheit der Trennung gegenüber dem <i>pH</i> -Wert.   |
| Tabelle 5.5.2-1 | Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Mefloquin.  |
| Tabelle 5.5.3-1 | Mefloquin: Daten der Linearitätsbestimmung.   |
| Tabelle 5.5.3-2 | Mefloquin: Regressionsdaten für Mefloquin und die Verunreinigungen A-E.   |
| Tabelle 5.5.3-3 | Mefloquin: Wiederholpräzision.  |
| Tabelle 5.5.3-4 | Mefloquin: Robustheit gegenüber der Trenntemperatur.  |
| Tabelle 5.5.3-5 | Mefloquin: Robustheit gegenüber dem <i>pH</i> -Wert der mobilen Phase.  |
| Tabelle 5.6.2-1 | Chromatographische Parameter der optimierten Methode zur Bestimmung von Artemether und Lumefantrin.                                   |
| Tabelle 5.6.3-1 | Artemether/Lumefantrin: Regressionsdaten für Artemether, Lumefantrin und die Verunreinigungen AE-VU A sowie LF-VU A-C.                |
| Tabelle 5.6.3-2 | Artemether/Lumefantrin: Daten der Linearitätsbestimmung.  |
| Tabelle 5.6.3-3 | Artemether/Lumefantrin: Wiederholpräzision.   |
| Tabelle 5.6.3-4 | Artemether/Lumefantrin: Robustheit gegenüber der Trenntemperatur.   |
| Tabelle 5.6.3-5 | Artemether/Lumefantrin: Robustheit gegenüber dem <i>pH</i> -Wert der mobilen Phase.   |
| Tabelle 5.7.1-1 | Mittels Dünnschichtchromatographie und Plattenscanner ermittelte Gehalte verschiedener Fertigarzneimittel (jeweils Doppelbestimmung). |
| Tabelle 5.7.1-2 | Wiederholpräzision für die Bestimmung von Amodiaquin mittels DC-Scanner.  |
| Tabelle 5.7.1-3 | Wiederholpräzision für die Bestimmung von Mefloquin mittels DC-Scanner.   |
| Tabelle 5.7.2-1 | Mittels vereinfachter HPLC-Methoden ermittelte Gehalte verschiedener Fertigarzneimittel (jeweils Einfachbestimmung).                  |
| Tabelle 5.7.2-2 | Vergleich der mittels DC und HPLC ermittelten Gehalte verschiedener Fertigarzneimittel.   |
| Tabelle 5.8-1   | Proguanil: Retentionszeiten und relative Retentionen zu Proguanil nach der Bestimmung mittels zweier unterschiedlicher HPLC-Geräte.   |

## Abbildungen

| Abbildungs-<br>Nummer | Bezeichnung   |
|-----------------------|---|
| Abbildung 1.1-1       | Anteile der verschiedenen Arten von Arzneimittelfälschungen. Quelle: WHO (2014).  |
| Abbildung 1.2.2-1     | Zentralisierte Organisationsstruktur der Tansanischen Arzneimittelbehörde TFDA mit den „Zone Offices“.  |
| Abbildung 1.2.2-2     | Sehr einfach ausgestatteter HPLC-Arbeitsplatz in einem Labor in Tansania (Foto: Privat).  |
| Abbildung 1.2.3-1     | Die zwei Koffer des GPHF-Minilab® (Foto: Privat).   |
| Abbildung 1.3.2-1     | Strukturformeln der 4-Aminochinoline Chloroquin, Amodiaquin und Piperaquin.   |
| Abbildung 1.3.3-1     | Strukturformeln der 8-Aminochinoline Pamaquin, Primaquin und Tafenoquin.  |
| Abbildung 1.3.4-1     | Strukturformeln der Arylaminoalkohole Mefloquin, Lumefantrin und Halofantrin sowie des Strukturverwandten Alkaloids Chinin.   |
| Abbildung 1.3.5-1     | Strukturformeln von Artemisinin, Dihydroartemisinin, Artemether und Artesunat.  |
| Abbildung 1.3.6-1     | Der Folsäure-Metabolismus.  |
| Abbildung 1.3.6-2     | Strukturformeln von Sulfadoxin, Pyrimethamin und Proguanil.   |
| Abbildung 1.3.6-3     | Strukturformel von Atovaquon.   |
| Abbildung 2-1         | Einflussfaktoren auf die Entstehung von Verunreinigungen in Wirk- und Hilfsstoffen (modifiziert nach [64]).   |
| Abbildung 2.1-1       | Original (links) und Fälschung (rechts) eines Eisen-Folsäure-Präparates in Afrika. Die unterschiedliche Farbe der Tabletten ist deutlich zu erkennen.   |
| Abbildung 2.4-1       | Schematische Darstellung eines Dünnschichtchromatogrammes mit zwei aufgetragenen Proben (A, B).   |
| Abbildung 2.5-1       | Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage.   |
| Abbildung 5.1-1       | Typische Ionenpaarreagenzien.   |
| Abbildung 5.2.1-1     | Racemisierung der benzylichen Hydroxyfunktion von Adrenalinderivaten sowie Bildung der Sulfonsäure-Analoga.   |
| Abbildung 5.2.1-2     | Abbauwege der Katecholamine.  |
| Abbildung 5.2.4-1     | Interne Standards.  |
| Abbildung 5.2.4-2     | Chromatogramm einer Lösung von Noradrenalin (NE) und Isoprenalin (ISO) unter optimierten Bedingungen.   |
| Abbildung 5.2.5-1     | Bestimmung der Linearität von Noradrenalin und Isoprenalin.   |
| Abbildung 5.2.5-2     | Kalibrierung des internen Standards Isoprenalin.  |
| Abbildung 5.2.6-1     | Verlauf des Noradrenaliningehaltes und Auswertung mittels externem und internem Standard.   |
| Abbildung 5.3.1-1     | Syntheseweg für Amodiaquin sowie Struktur des <i>N</i> -Monoethylderivates.   |
| Abbildung 5.3.2-1     | Amodiaquin: Säule D, 0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=8.0; MeOH=72.5 %, 1 ml/min, UV/Vis bei 230 nm, Injektion: 10 µl; 1.41 min=AQ-VU B, 3.66 min=AQ-VU C, 5.03 min=AQ-VU D, 9.04 min=AQ, 10.36 min=AQ-VU A. |
| Abbildung 5.3.3-1     | Regressionsplots für Amodiaquin und die Verunreinigungen A-D.   |

## ANHANG

| Abbildungs-<br>Nummer    | Bezeichnung  |
|--------------------------|--|
| <b>Abbildung 5.3.3-2</b> | Amodiaquin: Wiederholpräzision   |
| <b>Abbildung 5.3.3-3</b> | Amodiaquin: Abhängigkeit der Auftrennung von der Säulentemperatur.   |
| <b>Abbildung 5.3.3-4</b> | Amodiaquin: Abhängigkeit der Auftrennung vom <i>pH</i> -Wert.  |
| <b>Abbildung 5.4.1-1</b> | Syntheschema zur Darstellung von Proguanil und Strukturformeln zweier weiterer Verunreinigungen des <i>Ph. Eur.</i>  |
| <b>Abbildung 5.4.2-1</b> | Proguanil: Säule A, 0.05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , <i>pH</i> =3.0; MeOH=50 %; 0.75 ml/min; 232 nm., 1.40 min=PG-VU B, 2.33 min=PG-VU C, 2.71 min=PG-VU E, 4.70 min=PG-VU A, 7.74 min=PG, 25.46 min=PG-VU D. |
| <b>Abbildung 5.4.3-1</b> | Proguanil: Regressionsplots für Proguanil und die Verunreinigungen A-E.  |
| <b>Abbildung 5.4.3-2</b> | Proguanil: Wiederholpräzision.   |
| <b>Abbildung 5.4.3-3</b> | Proguanil: Einfluss der Trenntemperatur auf die Auflösung verschiedener Substanzpaare.   |
| <b>Abbildung 5.4.3-4</b> | Proguanil: Einfluss des <i>pH</i> -Wertes auf die Auflösung verschiedener Peakpaare.   |
| <b>Abbildung 5.5.1-1</b> | Verschiedene Möglichkeiten, Mefloquin ausgehend von 2-Trifluoranilin zu synthetisieren. Orange: Weg nach Ohnmacht et al.; blau: Weg nach Grethe und Mitt ; grün: Weg nach Hickmann et al.                              |
| <b>Abbildung 5.5.2-1</b> | Mefloquin: Säule A, 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , <i>pH</i> =3.0; MeOH=65 %, 280 nm; 1.63 min=MQ-VU C, 2.46 min=MQ-VU D+E, 3.52 min=MQ-VU A, 5.26 min=MQ, 12.75=MQ-VU B.                                    |
| <b>Abbildung 5.5.3-1</b> | Regressionsplots für Mefloquin und die Verunreinigungen A-E.   |
| <b>Abbildung 5.5.3-2</b> | Mefloquin: Wiederholpräzision.   |
| <b>Abbildung 5.5.3-3</b> | Mefloquin: Einfluss der Trenntemperatur auf die Auflösung verschiedener Substanzpaare.   |
| <b>Abbildung 5.5.3-4</b> | Mefloquin: Einfluss des <i>pH</i> -Wertes auf die Auflösung verschiedener Substanzpaare.   |
| <b>Abbildung 5.6.1-1</b> | Darstellung von Artemether ausgehend von Artemisinin.  |
| <b>Abbildung 5.6.1-2</b> | Syntheseweg und daraus abgeleitete, potentielle Verunreinigungen für Lumefantrin.  |
| <b>Abbildung 5.6.3-1</b> | Artemether: Bestimmung der Linearität.   |
| <b>Abbildung 5.6.3-2</b> | Lumefantrin: Bestimmung der Linearität.  |
| <b>Abbildung 5.6.3-3</b> | Artemether/Lumefantrin: Wiederholpräzision.  |
| <b>Abbildung 5.6.3-4</b> | Artemether/Lumefantrin: Einfluss der Trenntemperatur.  |
| <b>Abbildung 5.6.3-5</b> | Artemether/Lumefantrin: Einfluss des <i>pH</i> -Wertes der mobilen Phase auf die Selektivität.   |
| <b>Abbildung 5.7.1-1</b> | Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Amodar“ unter UV-Licht bei $\lambda=254$ nm; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung.  |
| <b>Abbildung 5.7.1-2</b> | Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Mephaquin“ unter UV-Licht bei $\lambda=254$ nm; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung.   |
| <b>Abbildung 5.7.1-3</b> | Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Paludrine“ unter UV-Licht bei $\lambda=254$ nm; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung.   |
| <b>Abbildung 5.7.1-4</b> | Dünnschichtchromatogramm der Bestimmung des Fertigarzneimittels „Coartem“ unter UV-Licht bei $\lambda=254$ nm; UL=Untersuchungslösung, KL=Kalibrierlösung, LF=Lumefantrin, AE=Artemether.                              |

## ANHANG

| Abbildungs-<br>Nummer     | Bezeichnung  |
|---------------------------|--|
| <b>Abbildung 5.7.1-5</b>  | Regressiongeraden der Bestimmung von Amodiaquin, Mefloquin, Proguanil und Lumefantrin mittels DC-Scanner.  |
| <b>Abbildung 5.7.1-6</b>  | Bildschirmfoto eines Chromatogrammes der dünn-schichtchromatographischen Bestimmung von Amodiaquin, das mittels des Plattenscanners erhalten wurde.                        |
| <b>Abbildung 5.7.1-7</b>  | Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Scan-Vorgänge bei einem DC-Scanner.  |
| <b>Abbildung 5.7.2-1</b>  | Kalibriergeraden für die Quantifizierung von Fertigarzneimittelproben aller fünf untersuchten Arzneistoffe unter Verwendung der entwickelten, vereinfachten HPLC-Methoden. |
| <b>Abbildung 5.8-1</b>    | Abtrennung von Amodiaquin, Chloroquin, Chinidin, Chinin und Primaquin vom eigentlichen Analyten Mefloquin unter Verwendung der für Mefloquin entwickelten Methode.         |
| <b>Abbildung 5.8-2</b>    | Chromatogramm der Bestimmung von Proguanil mittels einer simplen, modularen HPLC-Anlage unter Anwendung der vereinfachten Methode.   |
| <b>Abbildung 9.4.1-1</b>  | Amodiaquin: Säule A, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.1-2</b>  | Amodiaquin: Säule A, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=80 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.1-3</b>  | Amodiaquin: Säule A, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=77.5 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.1-4</b>  | Amodiaquin: Säule D, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=72.5 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.1-5</b>  | Amodiaquin: Säule D, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.1-6</b>  | Amodiaquin: Säule D, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=80 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-1</b>  | Proguanil: Säule A, 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=4.5$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-2</b>  | Proguanil: Säule A, 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-3</b>  | Proguanil: Säule A, 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=4.5$ ; MeOH=80 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-4</b>  | Proguanil: Säule A, 0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=4.5$ ; MeOH=65 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-5</b>  | Proguanil: Säule A, 0.06 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-6</b>  | Proguanil: Säule A, 0.06 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=4.5$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-7</b>  | Proguanil: Säule A, 0.04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=4.5$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-8</b>  | Proguanil: Säule A, 0.04 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=75 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.2-9</b>  | Proguanil: Säule A, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=4.5$ ; MeOH=75 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.2-10</b> | Proguanil: Säule A, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=75 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.2-11</b> | Proguanil: Säule A, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=55 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-1</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=50 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-2</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.07 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=60 %, $\lambda=210$ nm.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-3</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.08 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.0$ ; MeOH=60 %, $\lambda=210$ nm.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-4</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.08 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.0$ ; MeOH=65 %, $\lambda=210$ nm.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-5</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.08 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=70 %, $\lambda=210$ nm.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-6</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.09 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , $\text{pH}=2.0$ ; MeOH=65 %, $\lambda=210$ nm.   |

## ANHANG

| Abbildungs-<br>Nummer     | Bezeichnung   |
|---------------------------|---|
| <b>Abbildung 9.4.3-7</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.07 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0.025 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=2.0, MeOH=65 %; λ=210 nm.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-8</b>  | Mefloquin: Säule C, 0.08 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0.027 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=2.0, MeOH=65 %; λ=210 nm.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-9</b>  | Mefloquin: Säule A, 0.08 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0.027 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=3.0; MeOH=65 %, λ=210 nm.   |
| <b>Abbildung 9.4.3-10</b> | Mefloquin: Säule A, 0.08 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0.027 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=3.0, MeOH=67.5 %; λ=210 nm. |
| <b>Abbildung 9.4.3-11</b> | Mefloquin: Säule A, 0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=3.0; MeOH=65 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-1</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, 0.02 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=2.5, MeOH=80 %.  |
| <b>Abbildung 9.4.4-2</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, H <sub>2</sub> O, pH=2.5, MeOH=80 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-3</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, H <sub>2</sub> O, pH=2.5, MeOH=82.5 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-4</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, H <sub>2</sub> O, pH=2.5, MeOH=85 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-5</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, H <sub>2</sub> O, pH=2.5, MeOH=82.5 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-6</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, H <sub>2</sub> O, pH=2.5, MeOH=80 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-7</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, H <sub>2</sub> O, pH=3.0, MeOH=80 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-8</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule D, H <sub>2</sub> O, pH=3.5, MeOH=80 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-9</b>  | Artemether/Lumefantrin: Säule A, H <sub>2</sub> O, pH=2.5, MeOH=80 %.   |
| <b>Abbildung 9.4.4-10</b> | Artemether/Lumefantrin: Säule A, 0.05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=2.5, MeOH=77.5 %.                                       |

### 9.3 Abkürzungen

|                       |  |
|-----------------------|--|
| <b>ACN</b>            | Acetonitril  |
| <b>AE</b>             | Artemether   |
| <b>AL</b>             | Arbeitslösung  |
| <b>AQ</b>             | Amodiaquin   |
| <b>EDQM</b>           | European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare |
| <b>ES</b>             | Externer Standard  |
| <b>FDA</b>            | Food and Drug Administration                                   |
| <b>ICH</b>            | International Conference on Harmonisation                      |
| <b>IS</b>             | Interner Standard  |
| <b>KL</b>             | Kalibrierlösung  |
| <b>LF</b>             | Lumefantrin  |
| <b>MeOH</b>           | Methanol   |
| <b>MQ</b>             | Mefloquin  |
| <b>NGO</b>            | Non-Governmental Organization, Nicht-Regierungs-Organisation   |
| <b>OMCLs</b>          | Official Medicines Control Laboratories                        |
| <b>PG</b>             | Proguanil  |
| <b>Ph. Eur.</b>       | Europäisches Arzneibuch  |
| <b>Ph. Int.</b>       | Internationales Arzneibuch                                     |
| <b>rel. Std.-Abw.</b> | relative Standardabweichung                                    |
| <b>RP</b>             | Reversed Phase   |
| <b>R<sub>s</sub></b>  | Chromatographische Auflösung                                   |
| <b>SL</b>             | Stammlösung  |
| <b>Std.-Abw.</b>      | Standardabweichung   |
| <b>TFDA</b>           | Tanzania Food and Drugs Authority                              |
| <b>USP</b>            | United States  |
| <b>VU</b>             | Verunreinigung   |



## 9.4 Chromatogramme und Methodenübersichten

Die hier abgebildeten Chromatogramme wurden, sofern nicht bei der jeweiligen Abbildung anderweitig angegeben, mit den folgenden chromatographischen Parametern aufgezeichnet:

| Methode bzw. Arzneistoff   | Flussrate [ml/min] | Wellenlänge $\lambda$ [nm] | Injektionsvolumen [ $\mu$ l] | Temperatur [ $^{\circ}$ C]      |
|----------------------------|--------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Amodiaquin                 | 1.0                | 230                        | 10                           | Raumtemperatur (unkontrolliert) |
| Proguanil                  | 0.75               | 232                        | 10                           | Raumtemperatur (unkontrolliert) |
| Mefloquin                  | 1.0                | 280                        | 10                           | Raumtemperatur (unkontrolliert) |
| Artemether/<br>Lumefantrin | 1.0                | 210                        | 10                           | Raumtemperatur (unkontrolliert) |

### 9.4.1 Amodiaquin

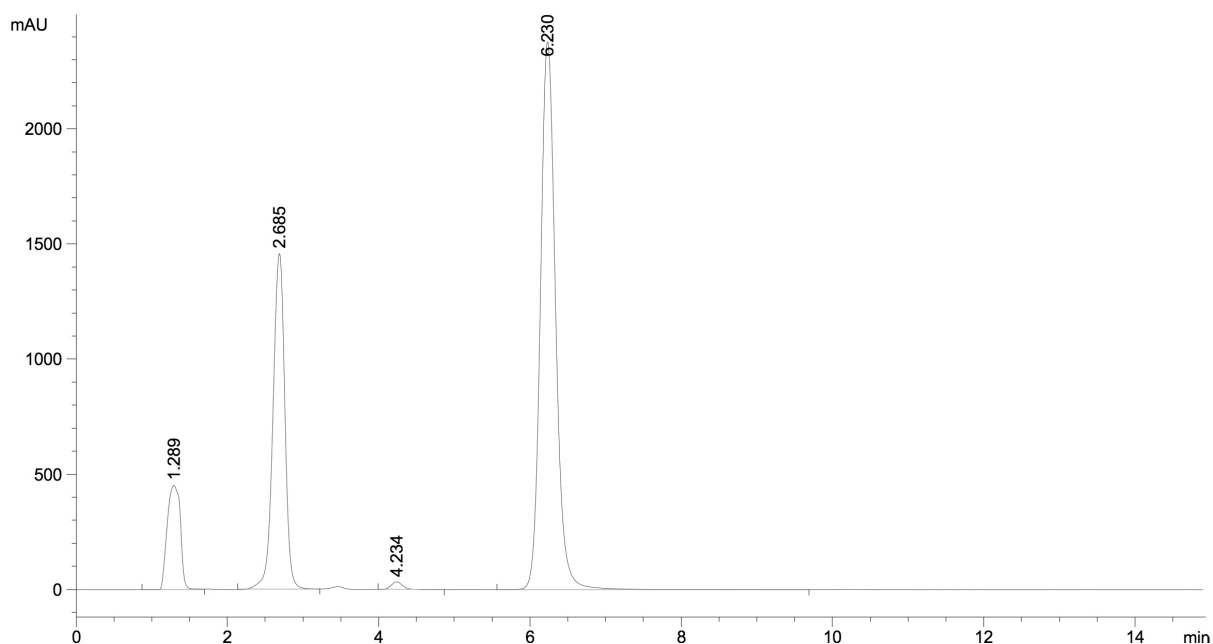
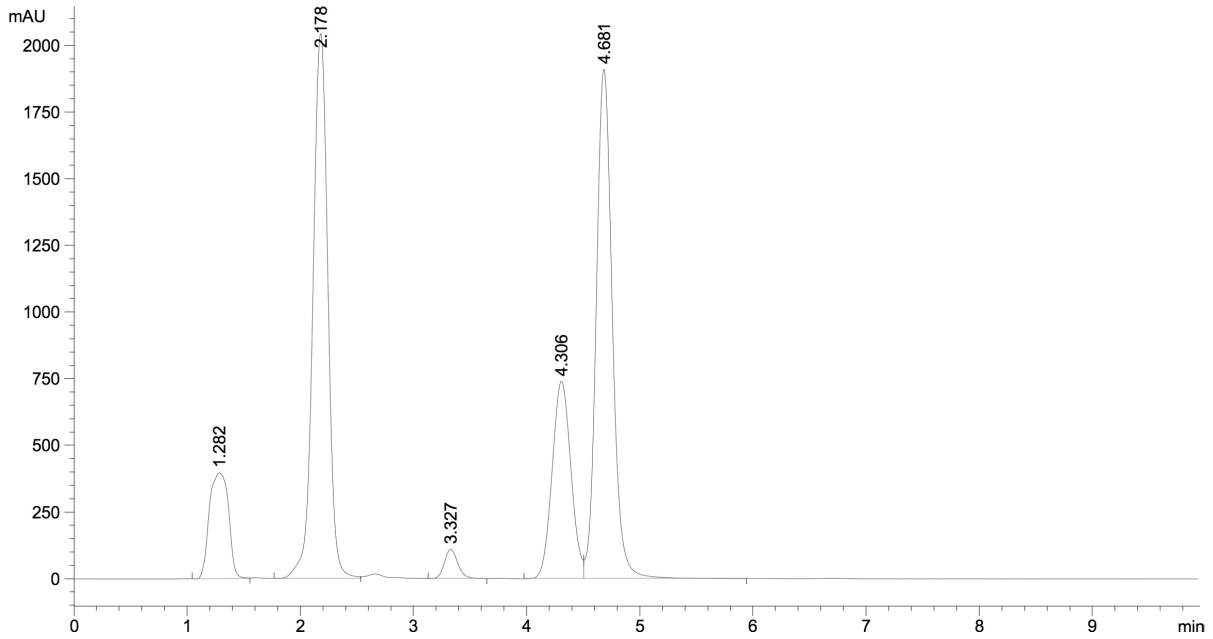
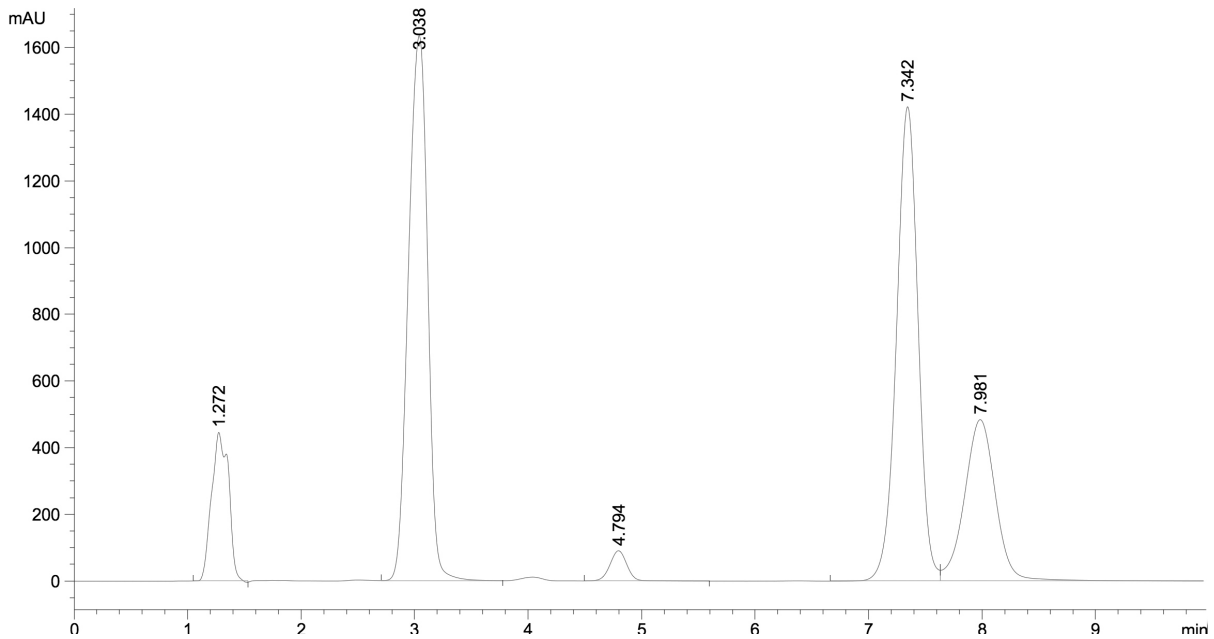


Abbildung 9.4.1-1: Amodiaquin: Säule A, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=8.0$ ;  $\text{MeOH}=75\%$ . 1.08 min=AQ-VU B, 3.49 min=AQ-VU C, 5.53 min=AQ-VU D, 8.79 min=AQ, 10.86 min=AQ-VU A.

# ANHANG

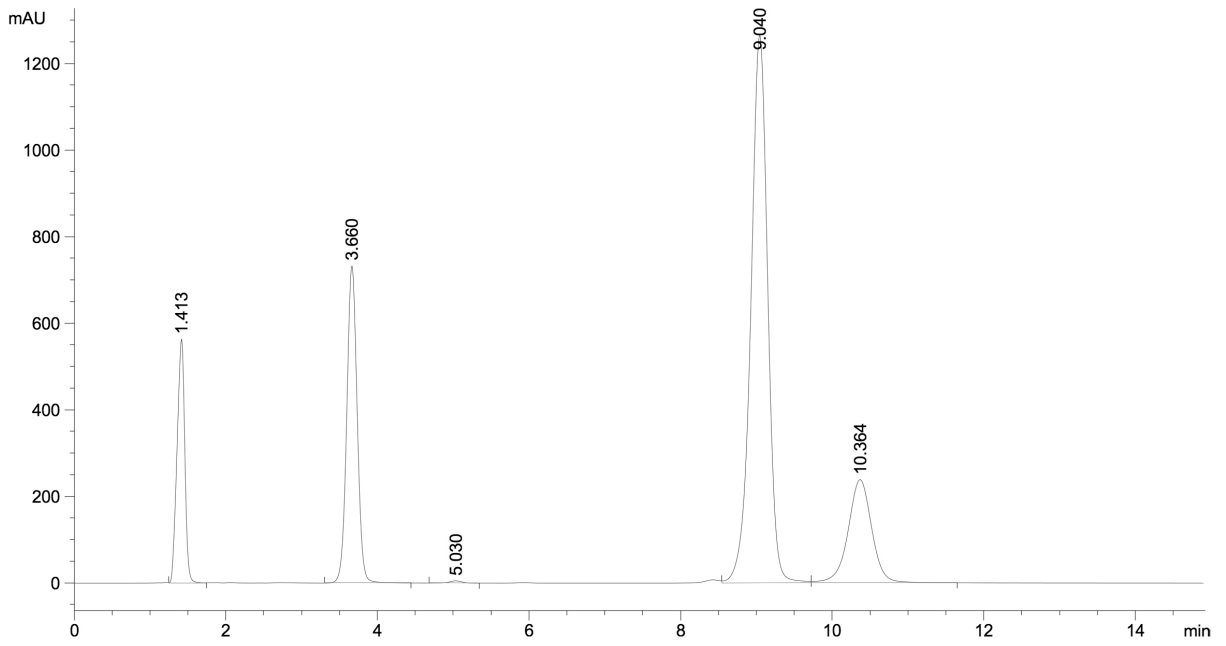


**Abbildung 9.4.1-2:** Amodiaquin: Säule A, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=80 %; 1.28 min=AQ-VU B, 2.18 min=AQ-VU C, 3.33 min=AQ-VU D, 4-31 min=AQ-VU A, 4.68 min=AQ.

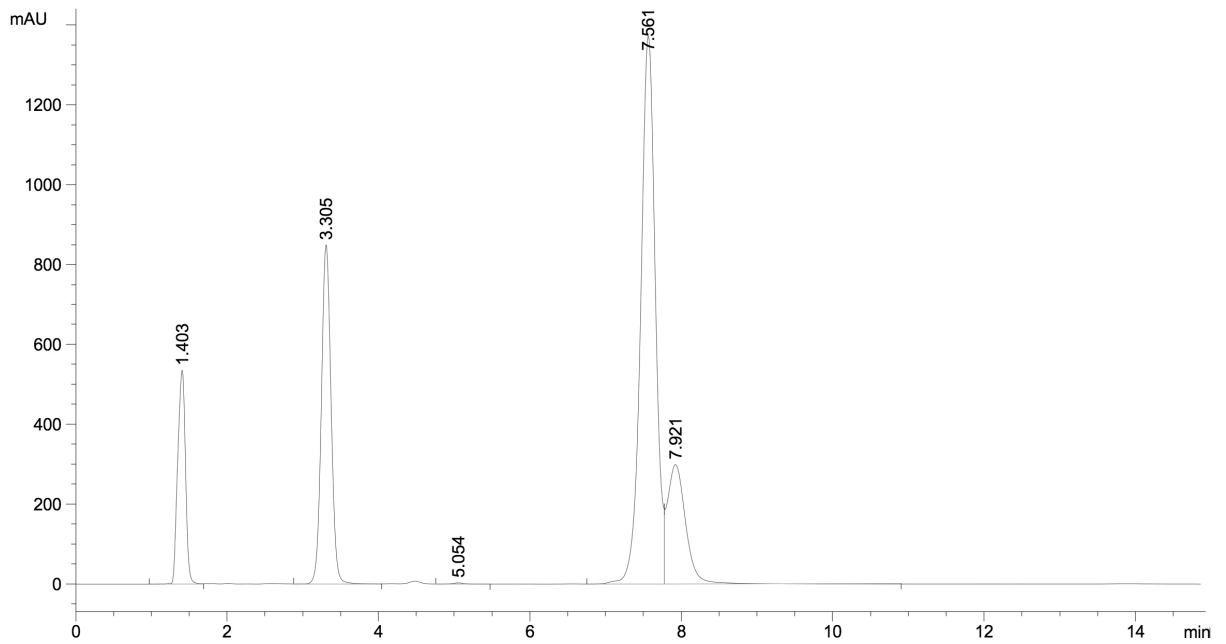


**Abbildung 9.4.1-3:** Amodiaquin: Säule A, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=8.0$ ; MeOH=77.5 %; 1.28 min=AQ-VU B, 3.04 min=AQ-VU C, 4.79 min=AQ-VU D, 7.34 min=AQ, 7.98 min=AQ-VU A.

# ANHANG

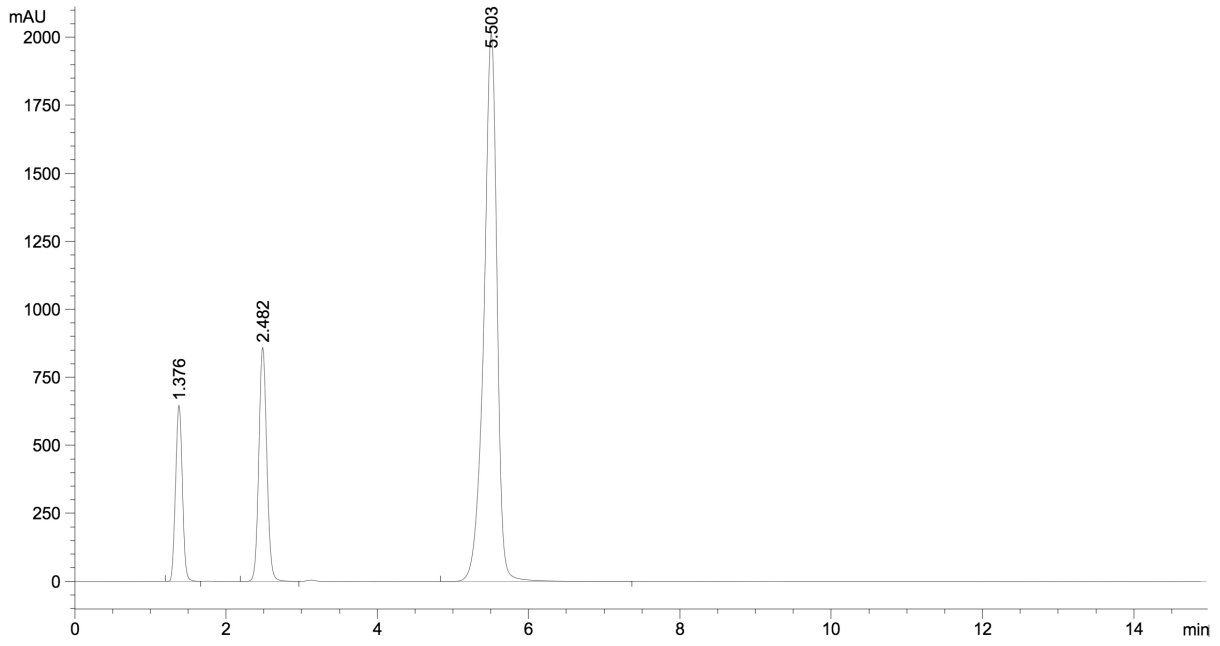


**Abbildung 9.4.1-4:** Amodiaquin: Säule D, 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=8.0; MeOH=72.5 %; 1.418 min=AQ-VU B, 3.66 min=AQ-VU C, 5.03 min=AQ-VU D, 9.04 min=AQ, 10.36 min=AQ-VU A.



**Abbildung 9.4.1-5:** Amodiaquin: Säule D, 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=8.0; MeOH=75 %; 1.40 min=AQ-VU B, 3.31 min=AQ-VU C, 5.05 min=AQ-VU D, 7.56 min=AQ, 7.92 min=AQ-VU A.

ANHANG



**Abbildung 9.4.1-6:** Amodiaquin: Säule D, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=8.0$ ;  $\text{MeOH}=80\%$ ; **1.38 min**=AQ-VU B, **2.48 min**=AQ-VU C, **5.50 min**=AQ-VU D+AQ-VU A+AQ.

9.4.2 Proguanil

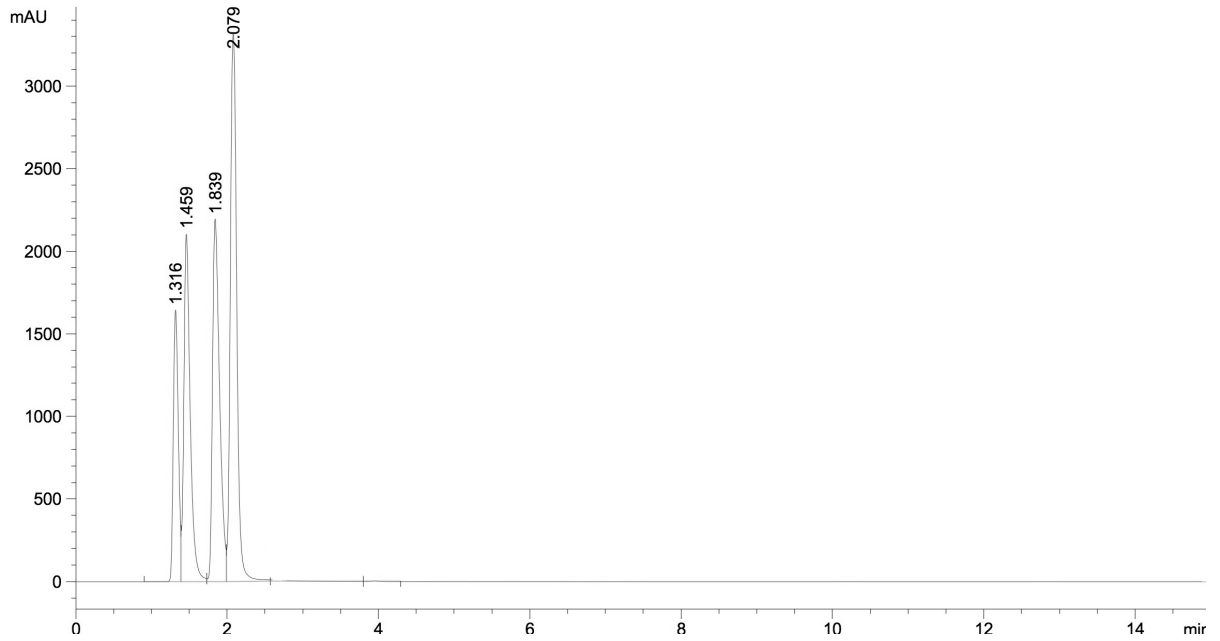


Abbildung 9.4.2-1: Proguanil: Säule A, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=4.5; MeOH=75 %; 1.32 min=PG-VU B, 1.46 min=PG-VU C, 1.84 min=PG, 2.08 min=PG-VU A.

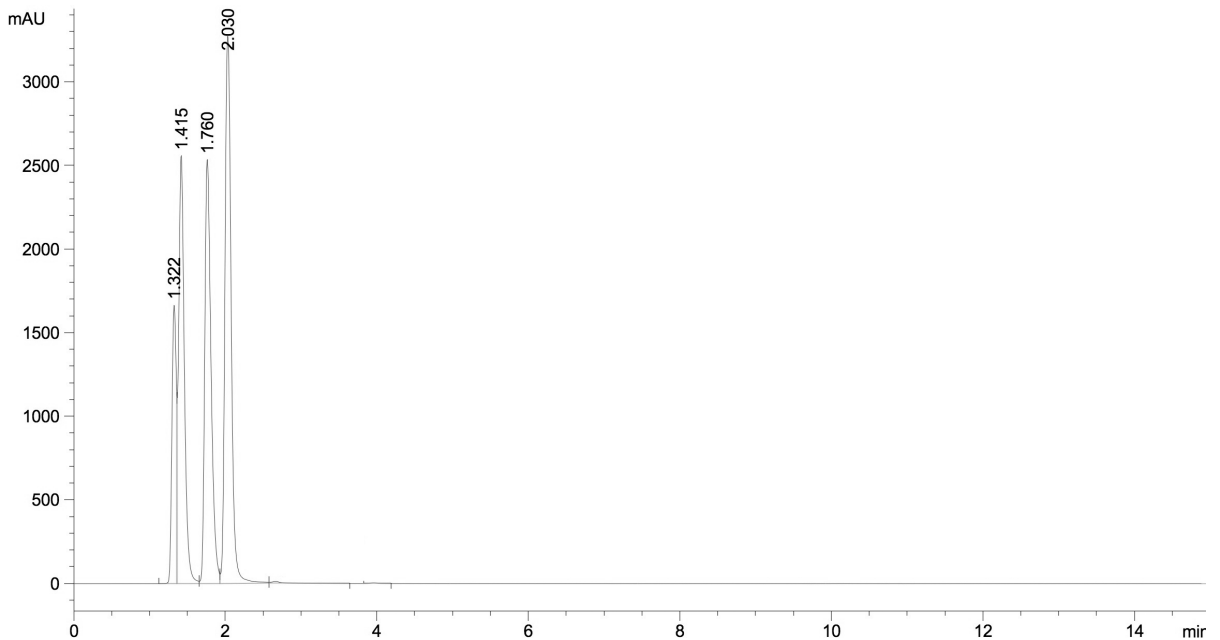
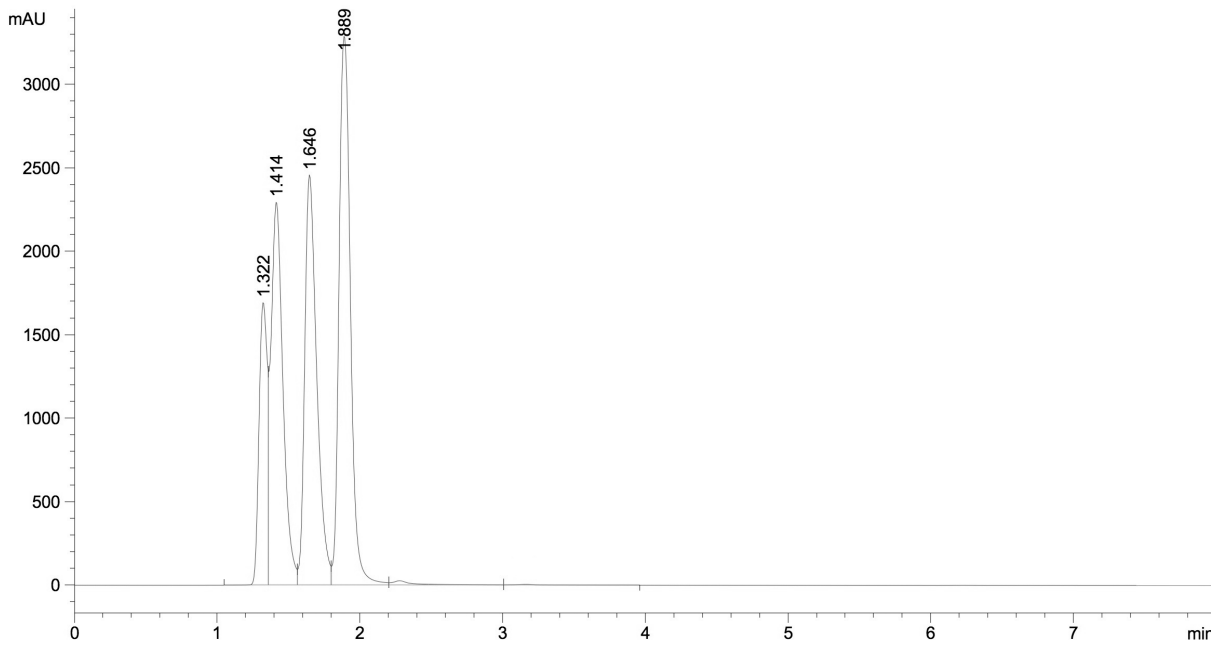
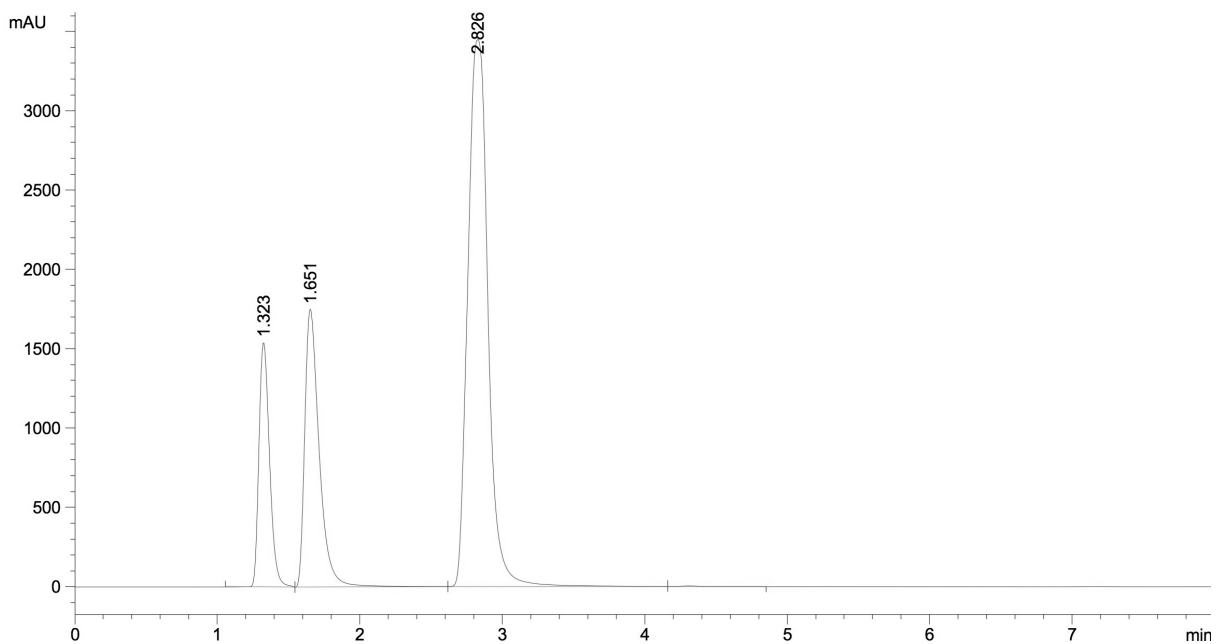


Abbildung 9.4.2-2: Proguanil: Säule A, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=2.5; MeOH=75 %; 1.32 min=PG-VU B, 1.42 min=PG-VU C, 1.76 min=PG, 2.03 min=PG-VU A.

# ANHANG

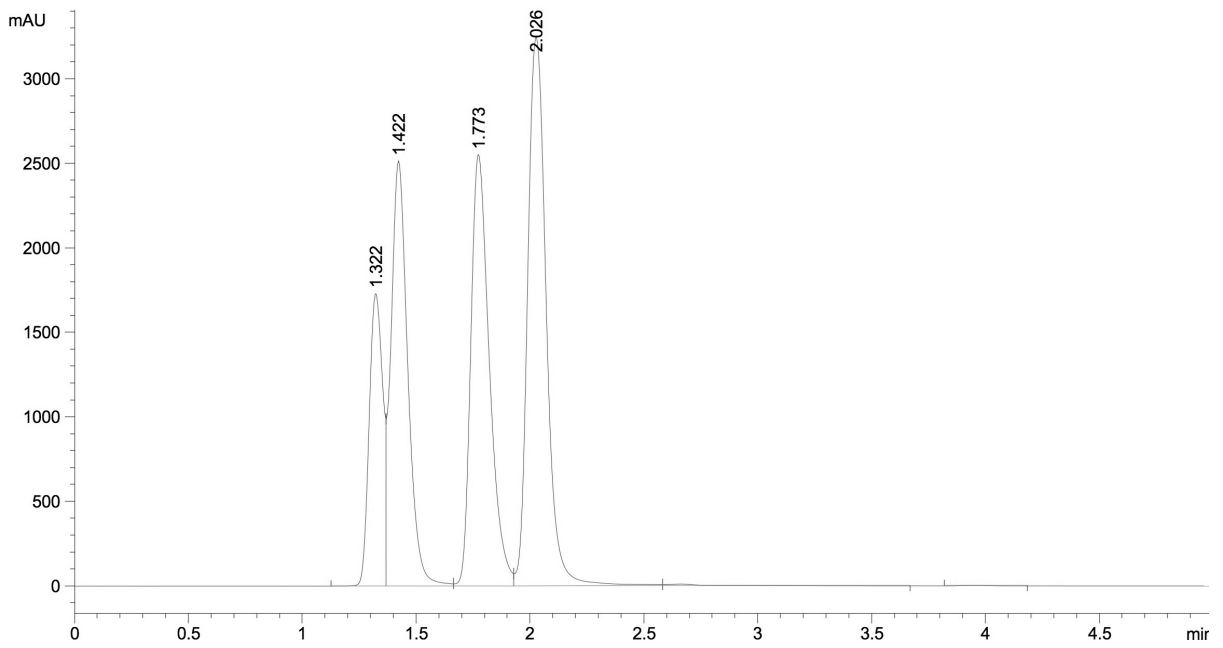


**Abbildung 9.4.2-3:** Proguanil: Säule A, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=4.5; MeOH=80 %; **1.32 min=PG-VU B**, **1.41 min=PG-VU C**, **1.65 min=PG**, **1.89 min=PG-VU A**.

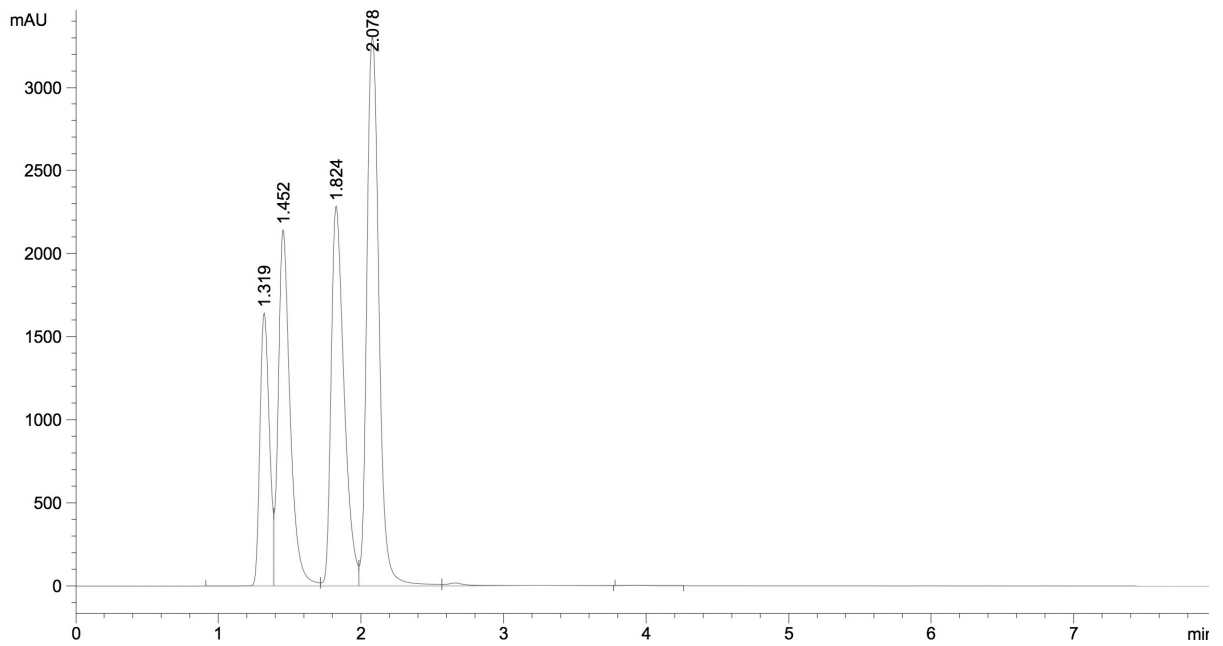


**Abbildung 9.4.2-4:** Proguanil: Säule A, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=4.5; MeOH=65 %; **1.32 min=PG-VU B**, **1.65 min=PG-VU C**, **2.83 min=PG + PG-VU A**.

# ANHANG

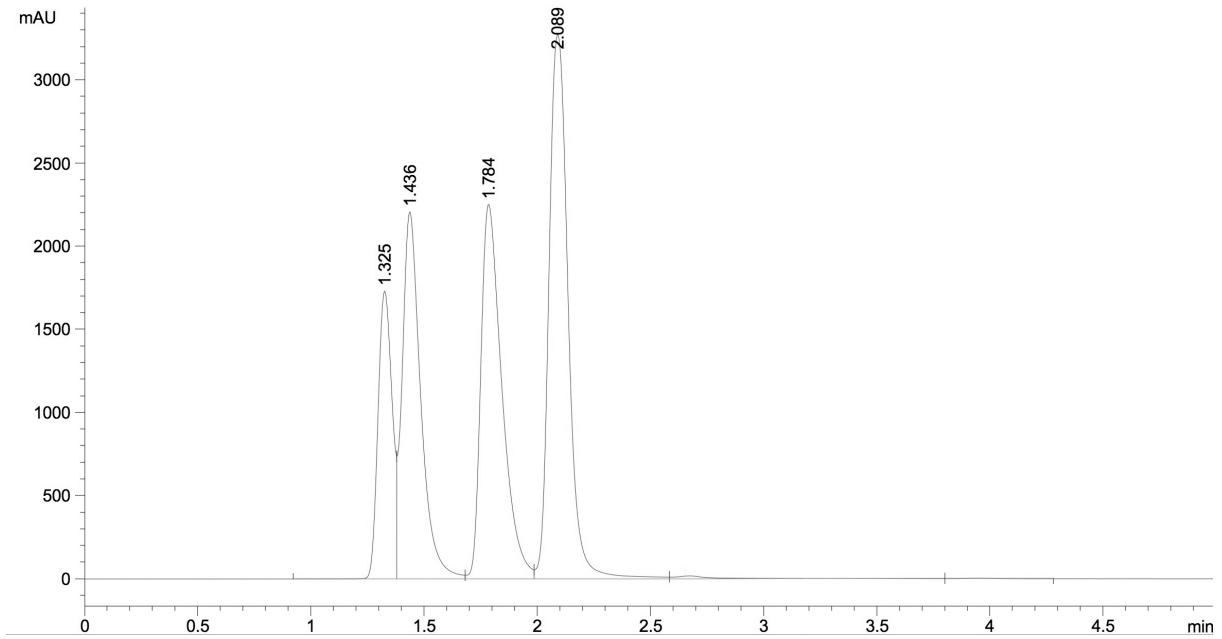


**Abbildung 9.4.2-5:** Proguanil: Säule A, 0.06 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ;  $\text{MeOH}=75\%$  ; 1.32 min=PG-VU B, 1.42 min=PG-VU C, 1.73 min=PG, 2.03 min=PG-VU A.

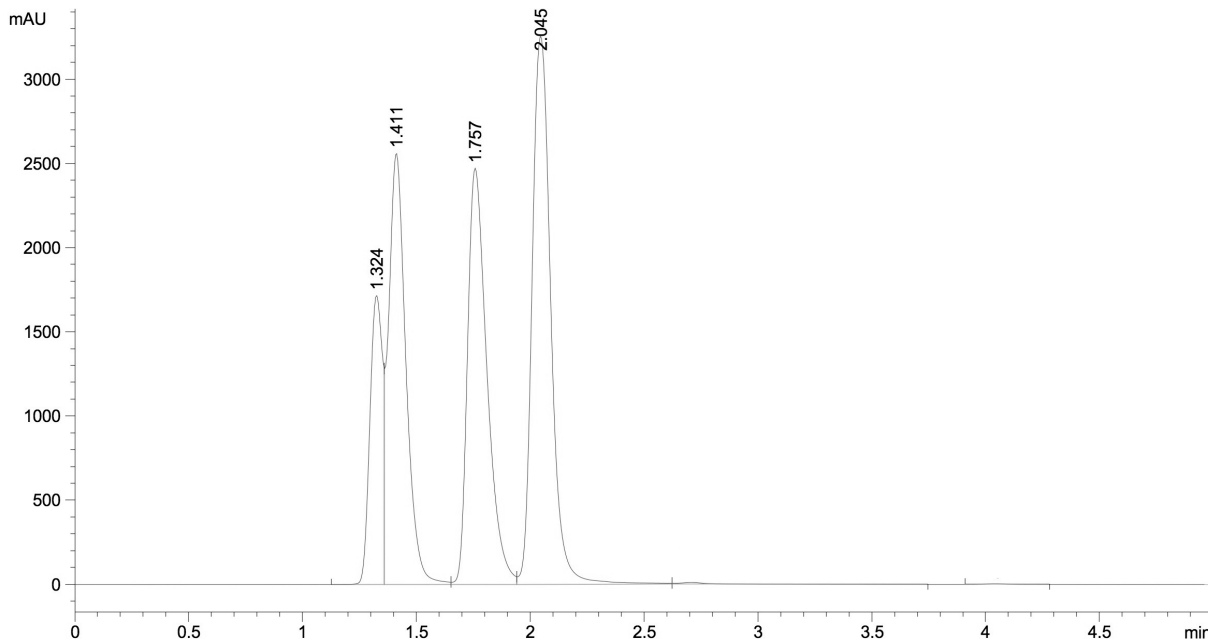


**Abbildung 9.4.2-6:** Proguanil: Säule A, 0.06 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=4.5$ ;  $\text{MeOH}=75\%$  ; 1.32 min=PG-VU B, 1.42 min=PG-VU C, 1.82 min=PG, 2.08 min=PG-VU A.

# ANHANG



**Abbildung 9.4.2-7:** Proguanil: Säule A, 0.04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=4.5$ ; MeOH=75 %; 1.33 min=PG-VU B, 1.44 min=PG-VU C, 1.78 min=PG, 2.09 min=PG-VU A.



**Abbildung 9.4.2-8:** Proguanil: Säule A, 0.04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=75 %; 1.32 min=PG-VU B, 1.41 min=PG-VU C, 1.76 min=PG, 2.05 min=PG-VU A.



ANHANG

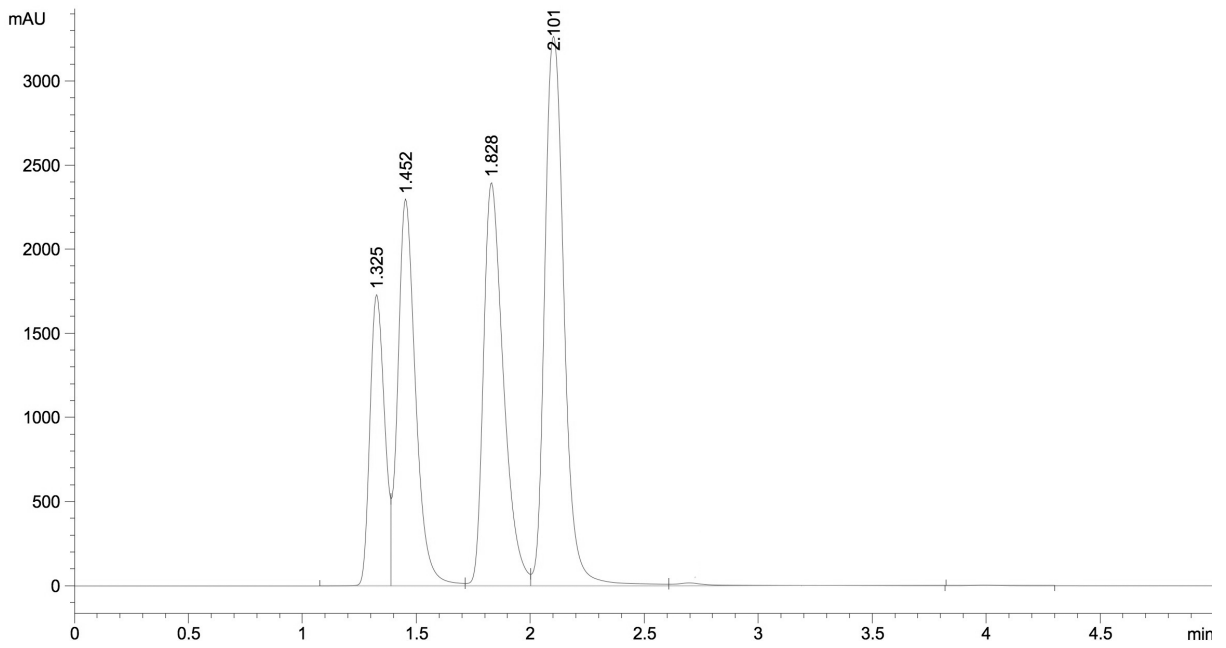


Abbildung 9.4.2-9: Proguanil: Säule A, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=4.5$ ;  $\text{MeOH}=75\%$ ; 1.33 min=PG-VU B, 1.45 min=PG-VU C, 1.83 min=PG, 2.10 min=PG-VU A.

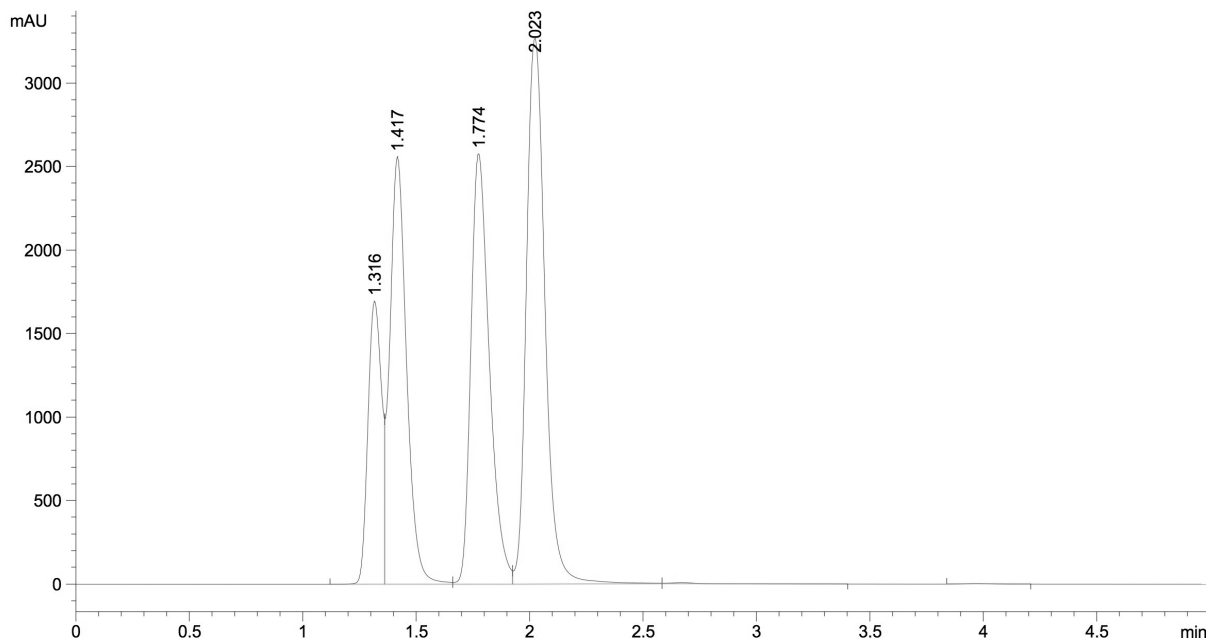
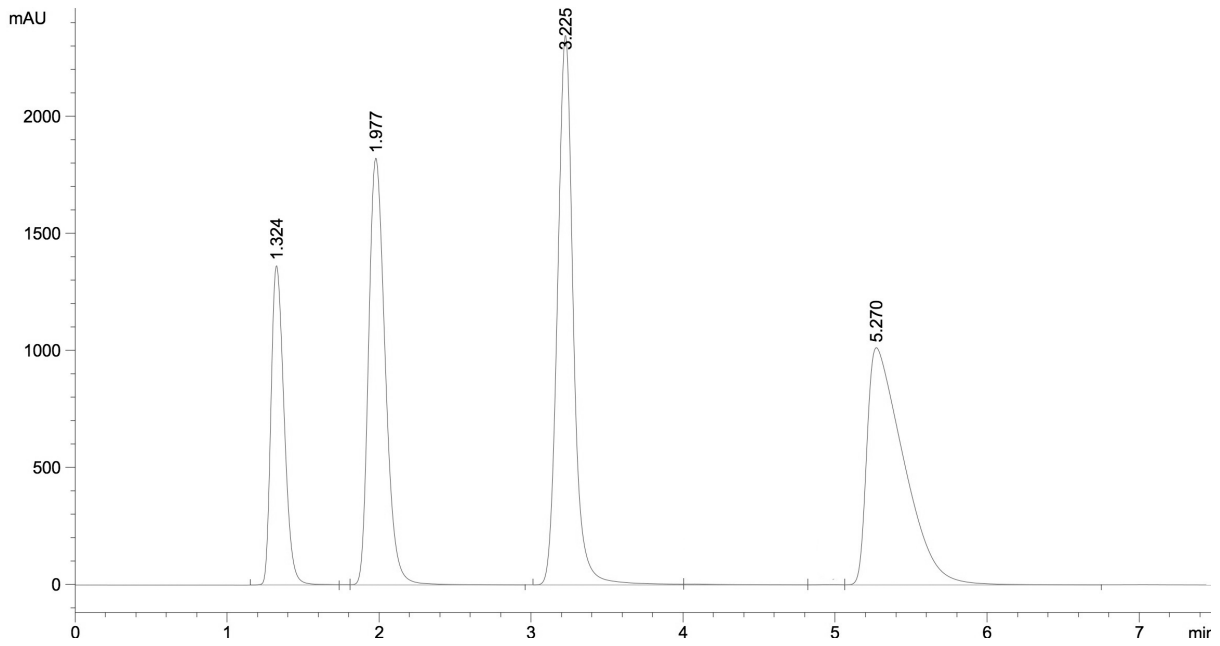
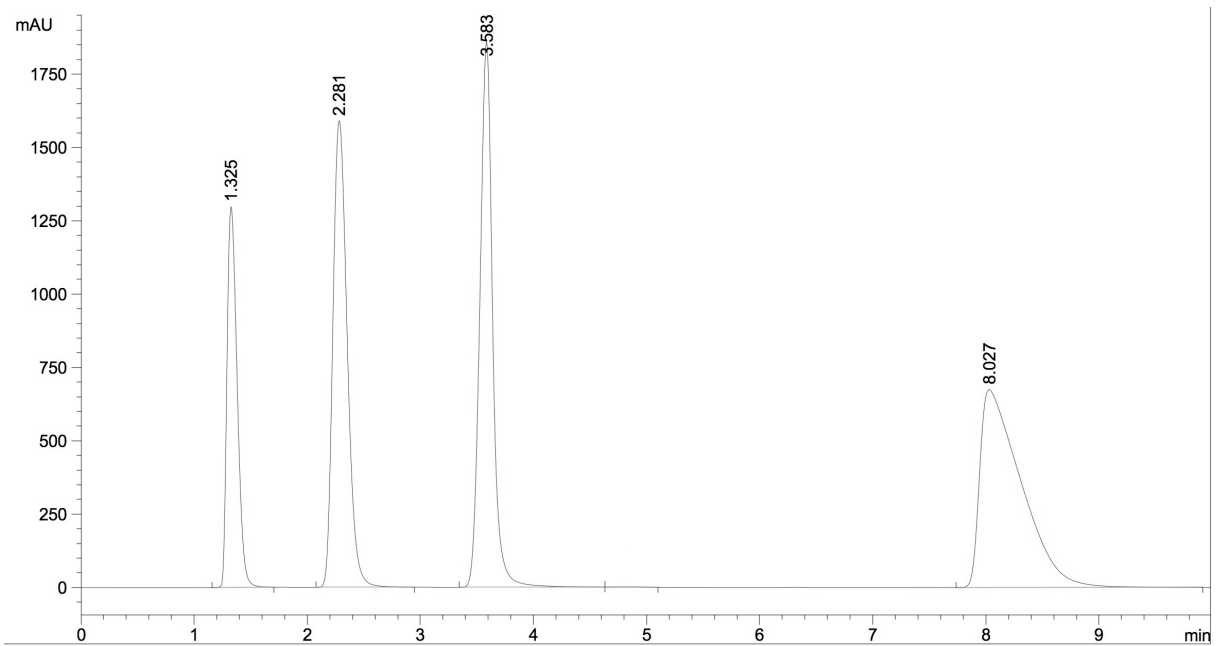


Abbildung 9.4.2-10: Proguanil: Säule A, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ;  $\text{MeOH}=75\%$ ; 1.32 min=PG-VU B, 1.42 min=PG-VU C, 1.77 min=PG, 2.02 min=PG-VU A.

# ANHANG



**Abbildung 9.4.2-11:** Proguanil: Säule A, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ;  $\text{MeOH}=55\%$ ; 1.32 min=PG-VU B, 1.98 min=PG-VU C, 2.23 min=PG-VU A, 5.27 min=PG.



**Abbildung 9.4.2-11:** Proguanil: Säule A, 0.05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ;  $\text{MeOH}=50\%$ ; 1.33 min=PG-VU B, 2.28 min=PG-VU C, 3.58 min=PG-VU A, 8.03 min=PG.

### 9.4.3 Mefloquin

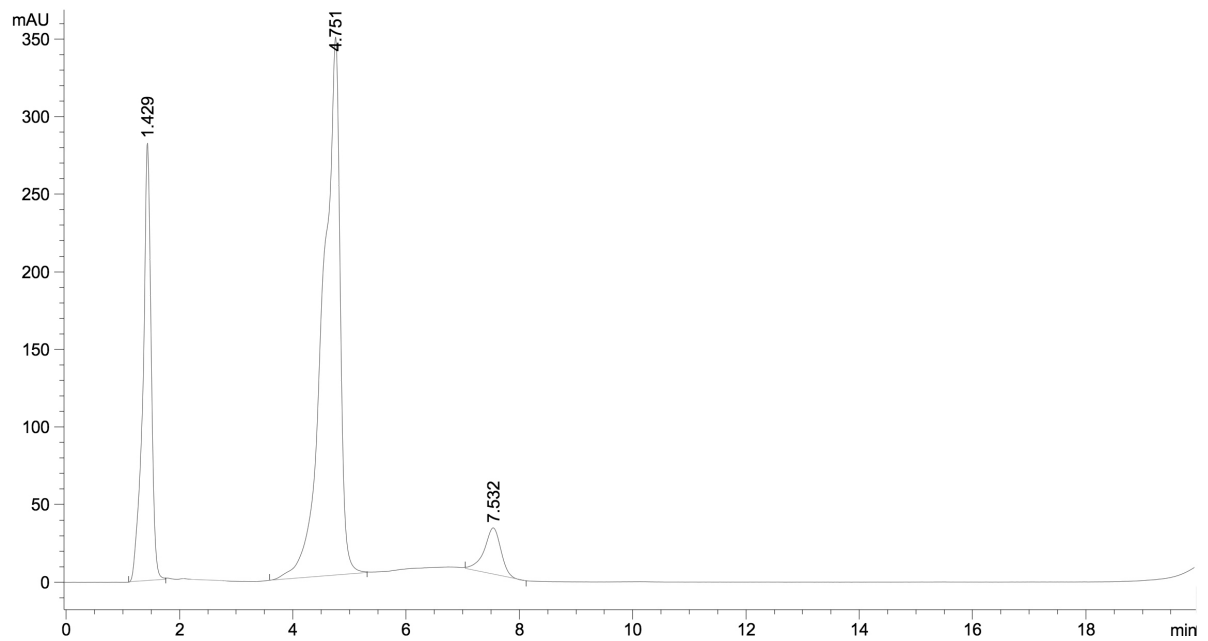


Abbildung 9.4.3-1: Mefloquin: Säule A, 0.07 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=60 %,  $\lambda=210$  nm; 1.43 min=MQ-VU C, 4.75 min=MQ-VU A+E, 7.53 min=MQ; MQ-VU B:  $R_t > 20$  min.

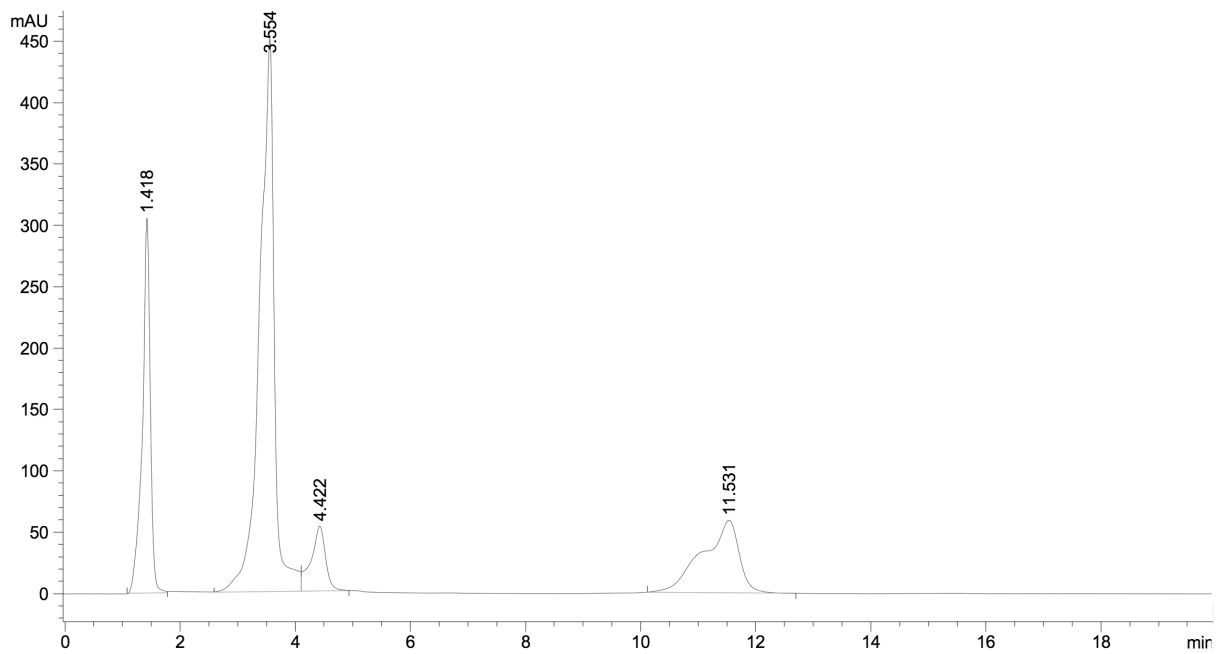


Abbildung 9.4.3-2: Mefloquin: Säule A, 0.07 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=65 %,  $\lambda=210$  nm; 1.42 min=MQ-VU C, 3.55 min=MQ-VU A+E, 4.42 min=MQ; 11.53 min=MQ-VU B.

ANHANG

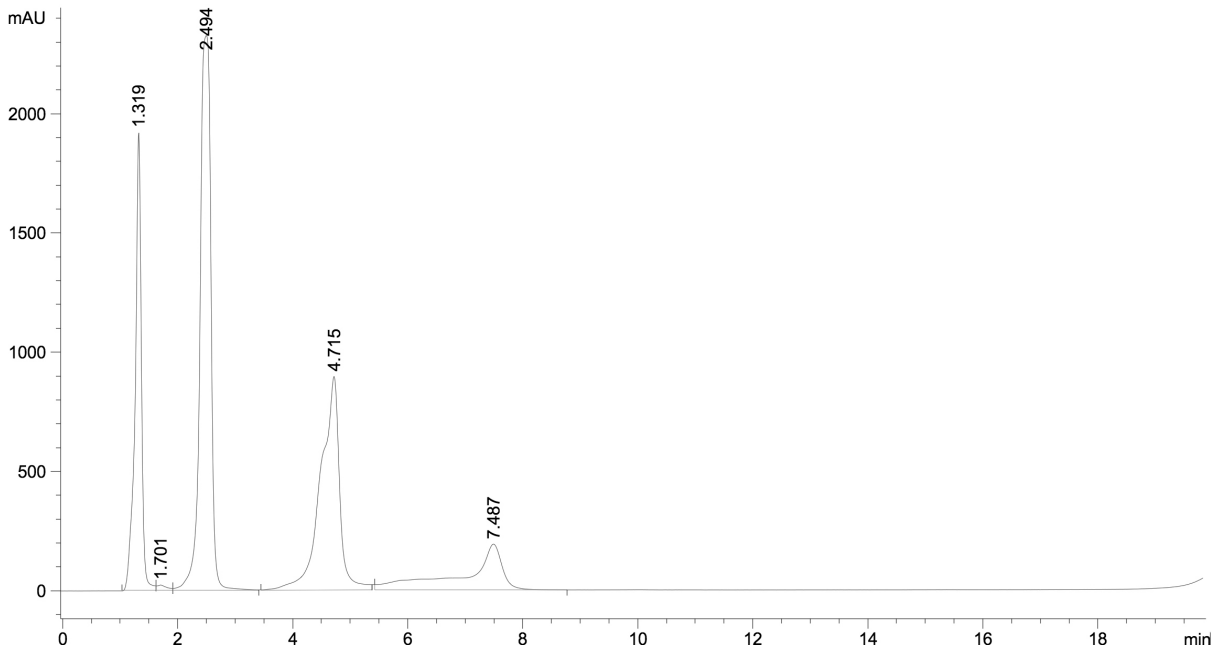


Abbildung 9.4.3-3: Mefloquin: Säule A, 0.08 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.0$ ; MeOH=60 %,  $\lambda=210$  nm; 1.32 min=MQ-VU C, 2.45 min=MQ-VU E, 4.72 min=MQ-VU A, 7.48 min=MQ; MQ-VU B:  $R_t > 20$  min.

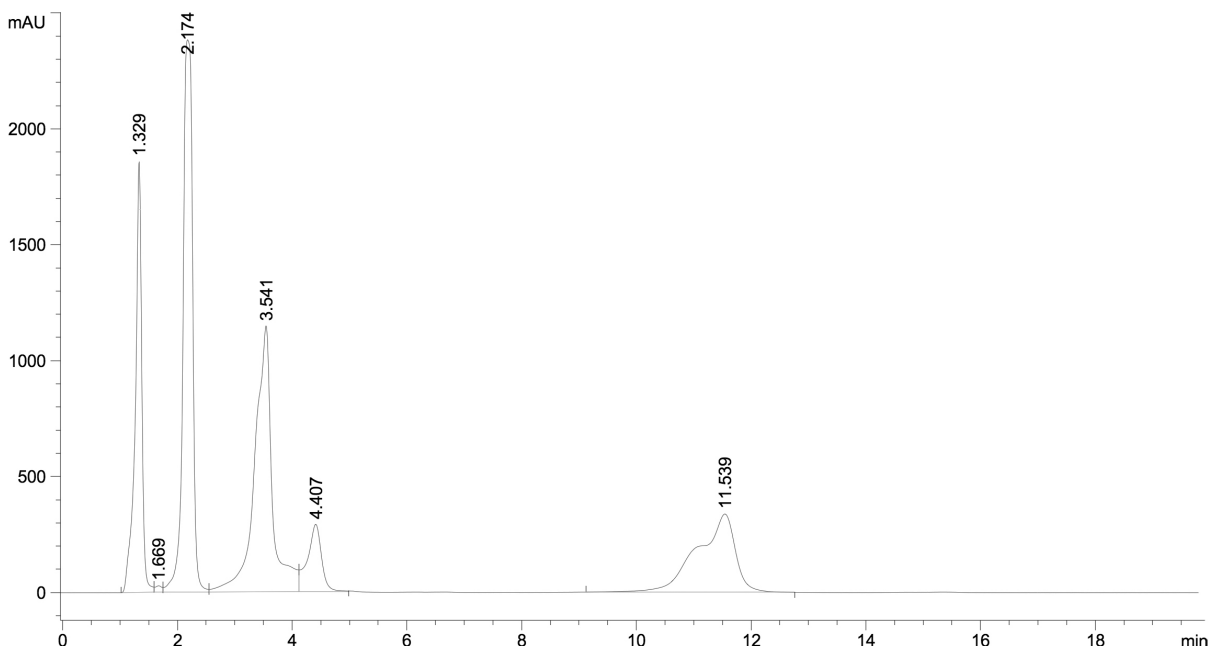
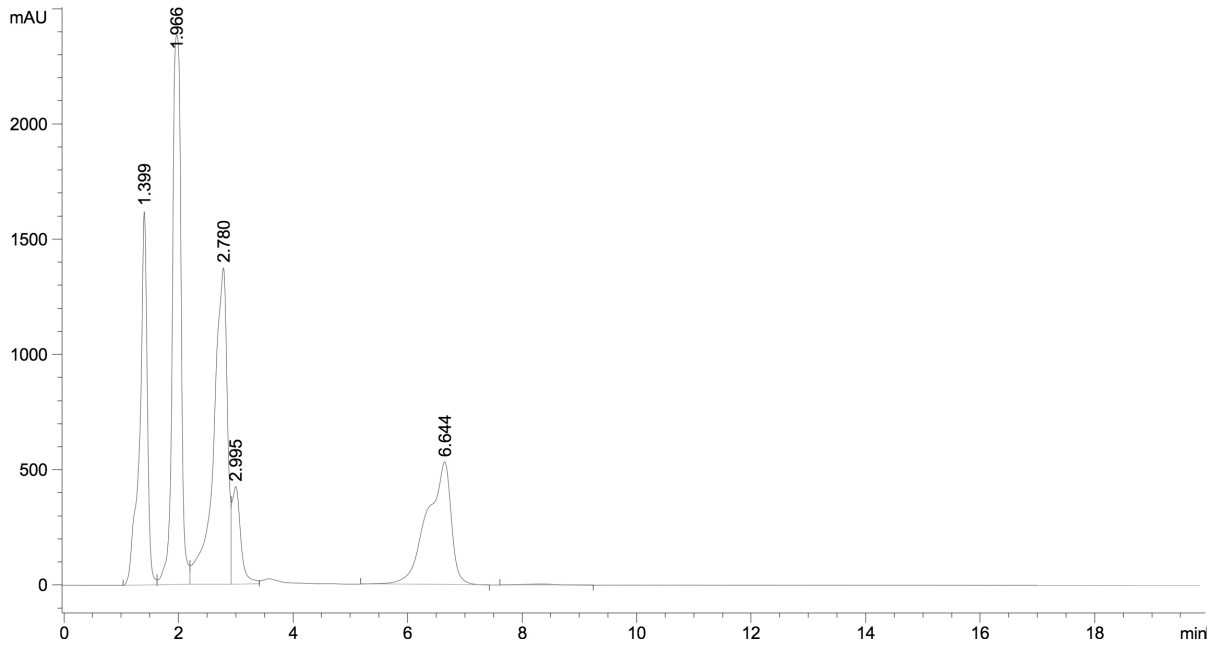
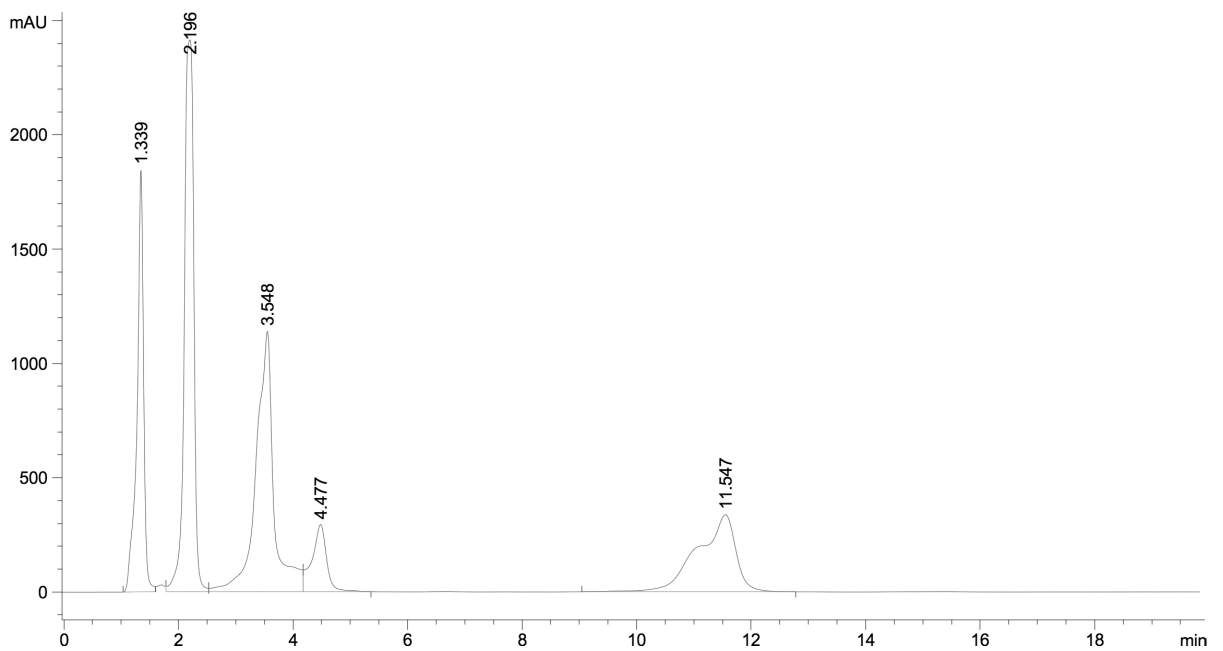


Abbildung 9.4.3-4: Mefloquin: Säule A, 0.08 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.0$ ; MeOH=65 %,  $\lambda=210$  nm; 1.33 min=MQ-VU C, 2.17 min=MQ-VU E, 3.54 min=MQ-VU A, 4.41 min=MQ; 11.54 min=MQ-VU B.

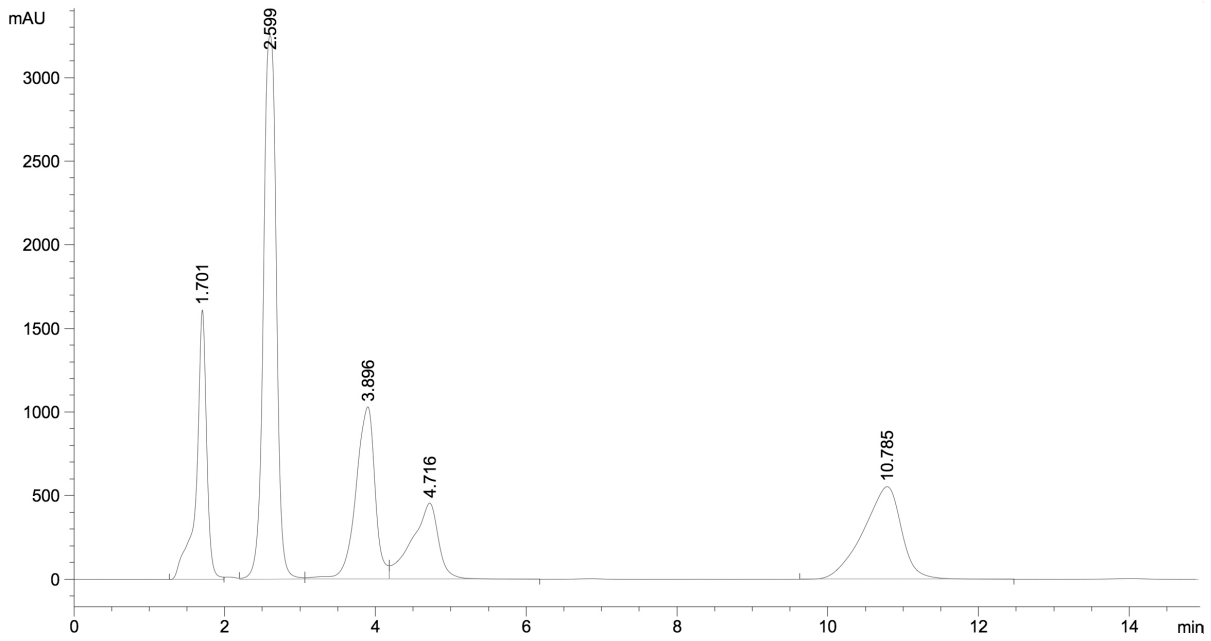


**Abbildung 9.4.3-5:** Mefloquin: Säule A, 0.08 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ; MeOH=70 %,  $\lambda=210$  nm; **1.40 min=MQ-VU C**, **1.97 min=MQ-VU E**, **2.78 min=MQ-VU A**, **3.00 min=MQ**; **6.64 min=MQ-VU B**.

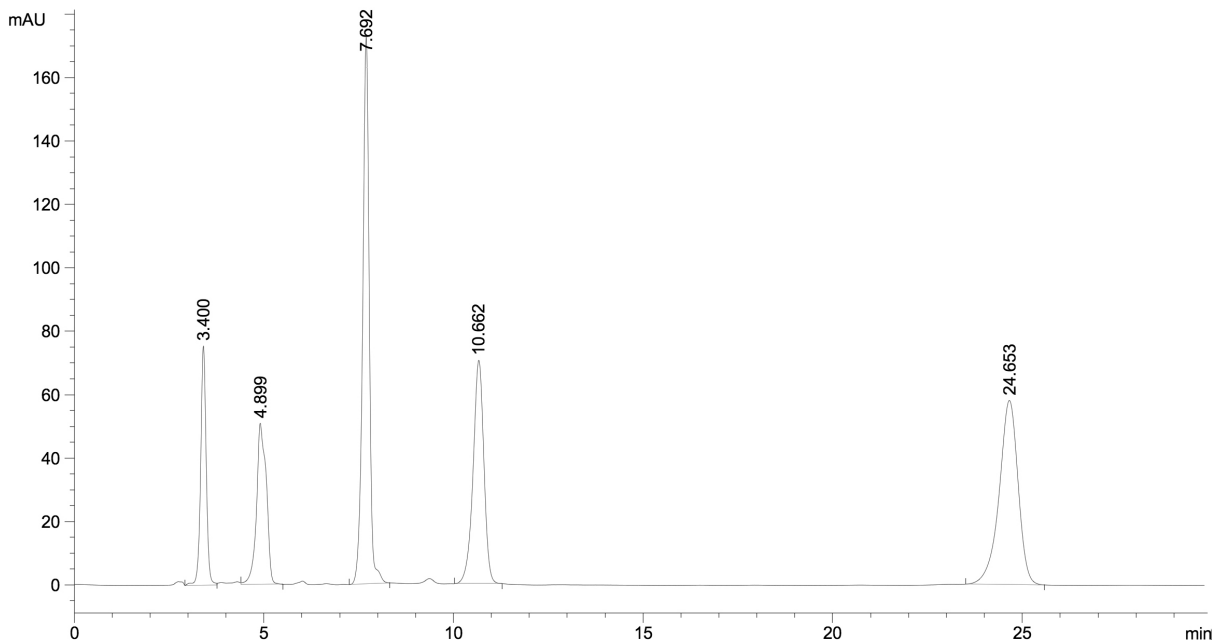


**Abbildung 9.4.3-6:** Mefloquin: Säule A, 0.09 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.0$ ; MeOH=65 %,  $\lambda=210$  nm; **1.34 min=MQ-VU C**, **2.20 min=MQ-VU E**, **3.55 min=MQ-VU A**, **4.48 min=MQ**; **11.55 min=MQ-VU B**.

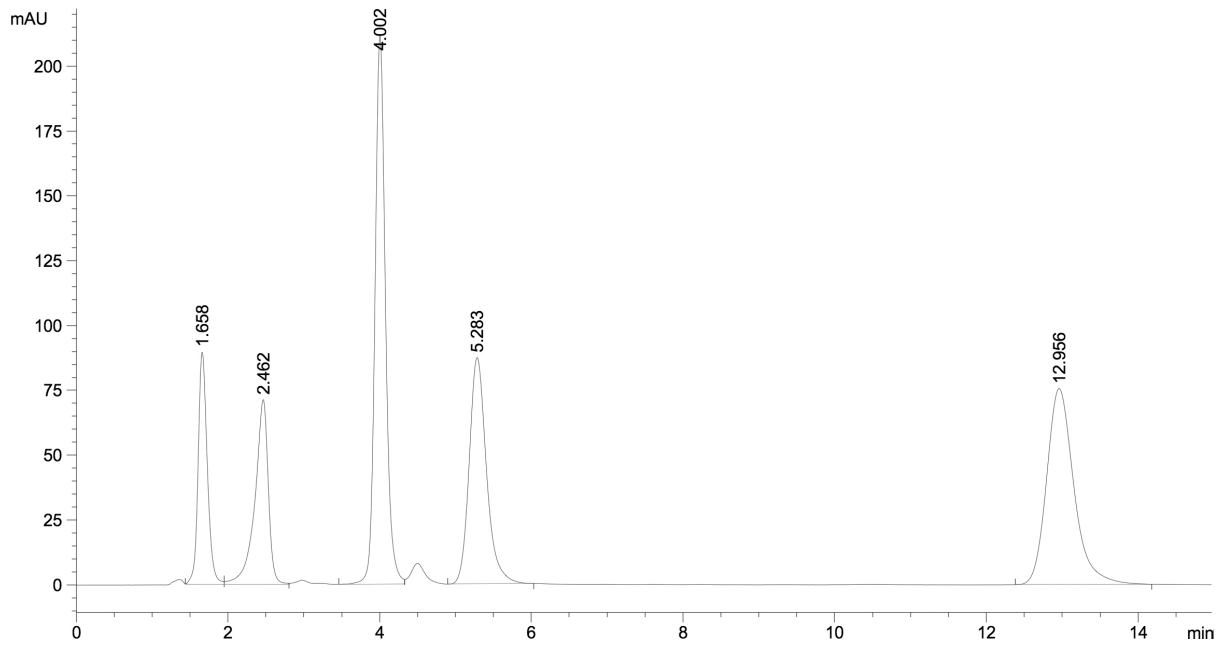
# ANHANG



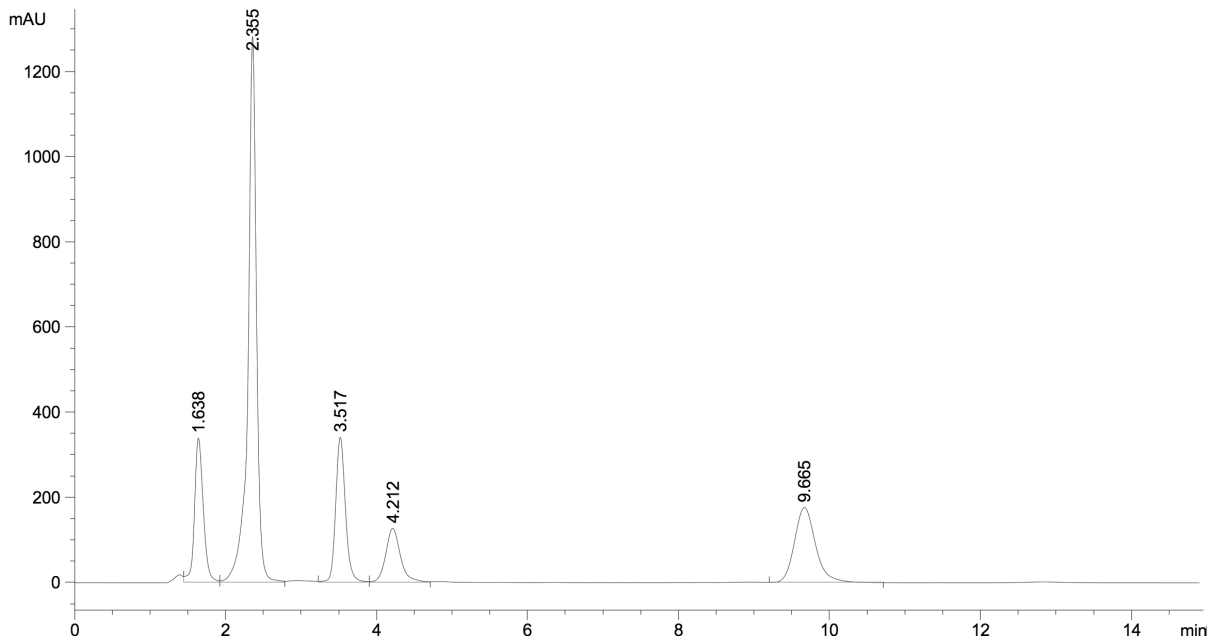
**Abbildung 9.4.3-7:** Mefloquin: Säule A, 0.07 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /0.025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.0$ ,  $\text{MeOH}=65\%$ ,  $\lambda=210\text{ nm}$ ;  
**1.70 min=MQ-VU C, 2.60 min=MQ-VU D+E, 3.90 min=MQ-VU A, 4.72 min=MQ;**  
**10.79 min=MQ-VU B.**



**Abbildung 9.4.3-8:** Mefloquin: Säule C, 0.08 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ /0.027 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.0$ ,  $\text{MeOH}=65\%$ ; 210 nm;  
**3.40 min=MQ-VU C, 4.90 min=MQ-VU D+E, 7.69 min=MQ-VU A, 10.66 min=MQ;**  
**24.65 min=MQ-VU B.**

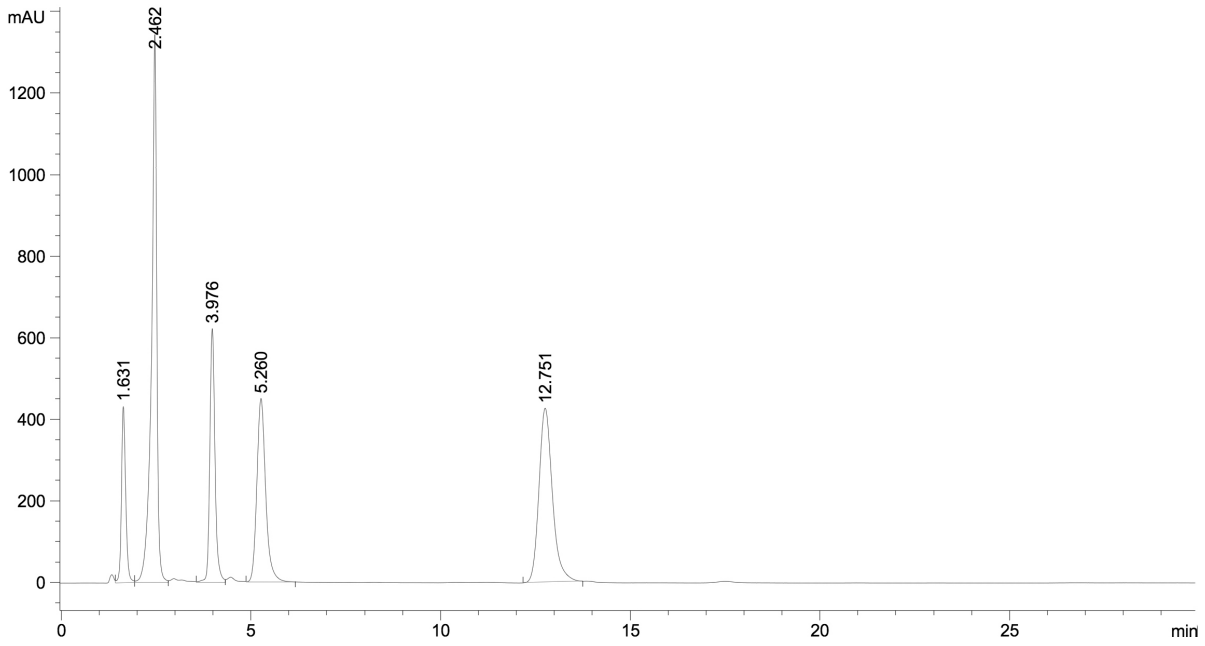


**Abbildung 9.4.3-9:** Mefloquin: Säule A, 0.08 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.027 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=3.0; MeOH=65 %, 210 nm;  
**1.66 min=MQ-VU C, 2.46 min=MQ-VU D+E, 4.00 min=MQ-VU A, 5.28 min=MQ,**  
**12.96 min=MQ-VU B.**



**Abbildung 9.4.3-10:** Mefloquin: Säule A, 0.08 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/0.027 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=3.0, MeOH=67.5 %, 210 nm;  
**1.64 min=MQ-VU C, 2.36 min=MQ-VU D+E, 3.52 min=MQ-VU A, 4.21 min=MQ,**  
**9.67 min=MQ-VU B.**

# ANHANG



**Abbildung 9.4.3-11:** Mefloquin: Säule A, 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=3.0$ ;  $\text{MeOH}=65\%$ ; **1.63 min**=MQ-VU C, **2.46 min**=MQ-VU D+E, **3.52 min**=MQ-VU A, **5.26 min**=MQ, **12.75 min**=MQ-VU B.



#### 9.4.4 Artemether/Lumefantrin

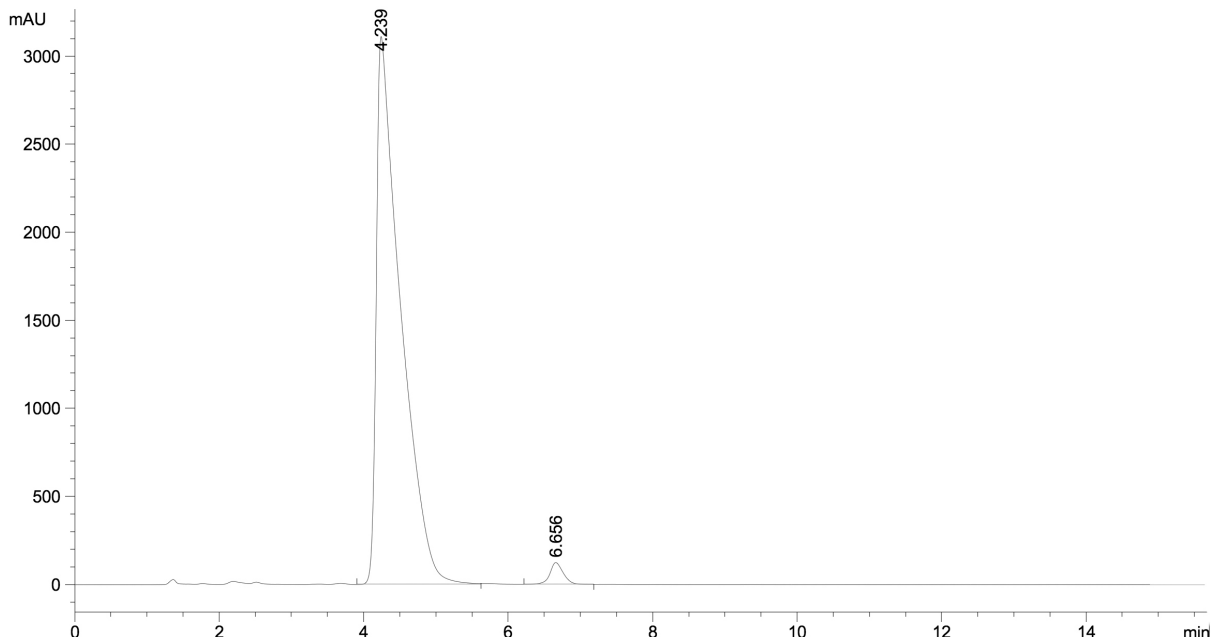


Abbildung 9.4.4-1: Artemether/Lumefantrin: Säule D, 0.02 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH}=2.5$ ,  $\text{MeOH}=80\%$ ; 4.24 min=LF, 6.66 min=AE.

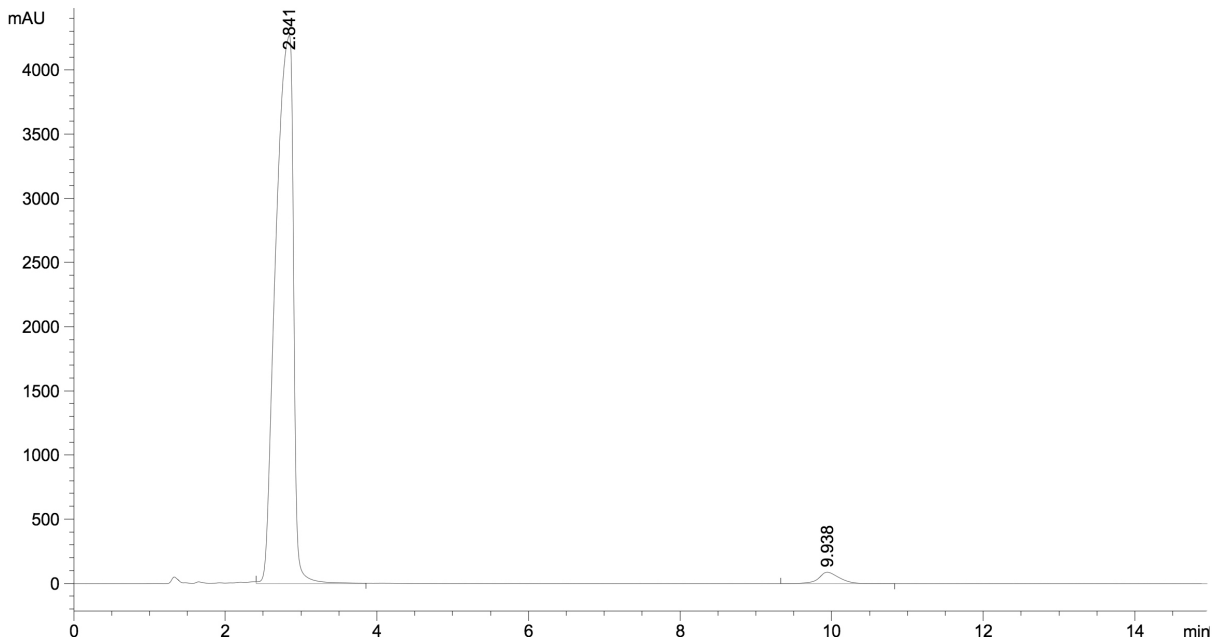


Abbildung 9.4.4-2: Artemether/Lumefantrin: Säule D,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{pH}=2.5$ ,  $\text{MeOH}=80\%$ ; 2.84 min=LF, 9.94 min=AE.

# ANHANG

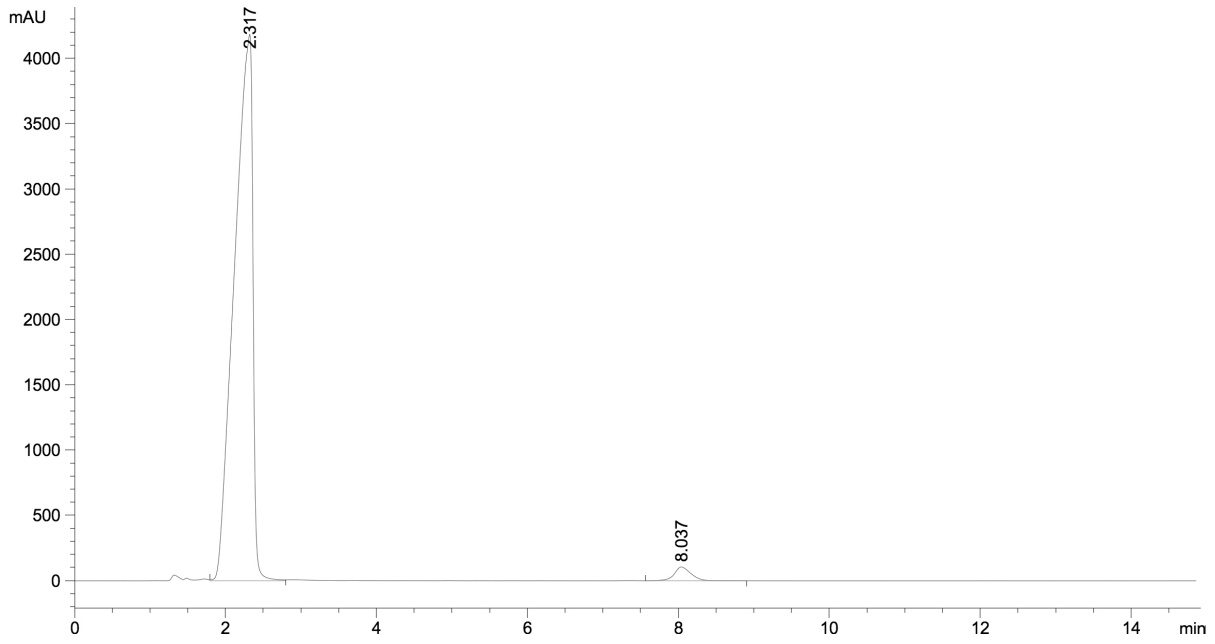


Abbildung 9.4.4-3: Artemether/Lumefantrin: Säule D, H<sub>2</sub>O, pH=2.5, MeOH=82.5 %; 2.31 min=LF, 8.04 min=AE.

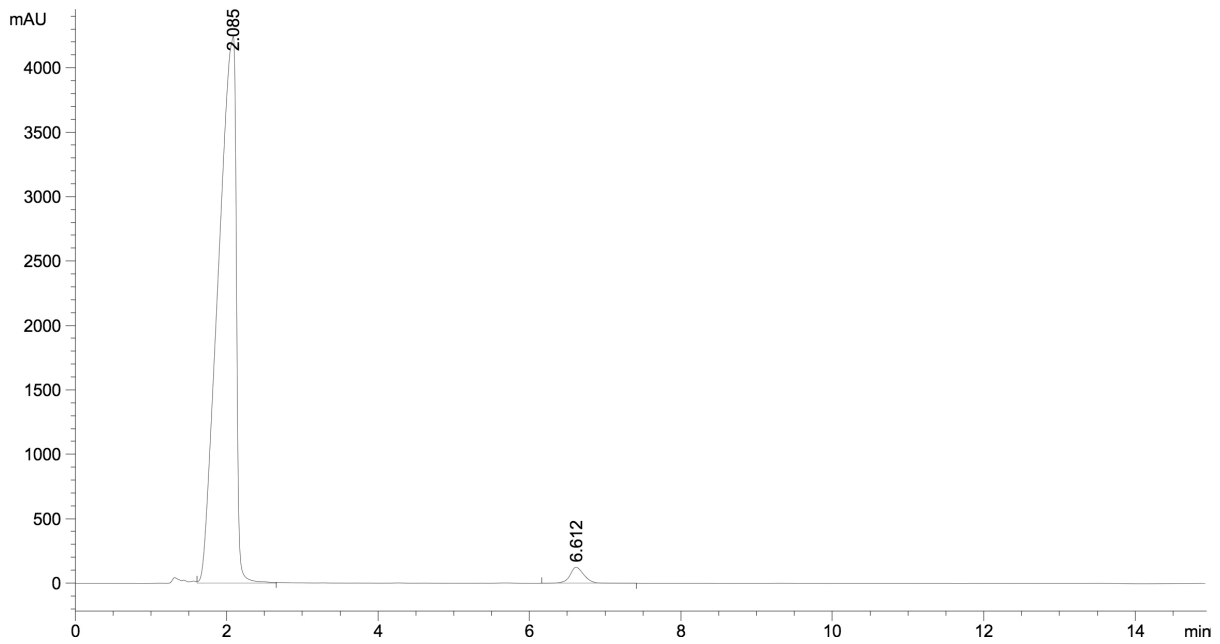
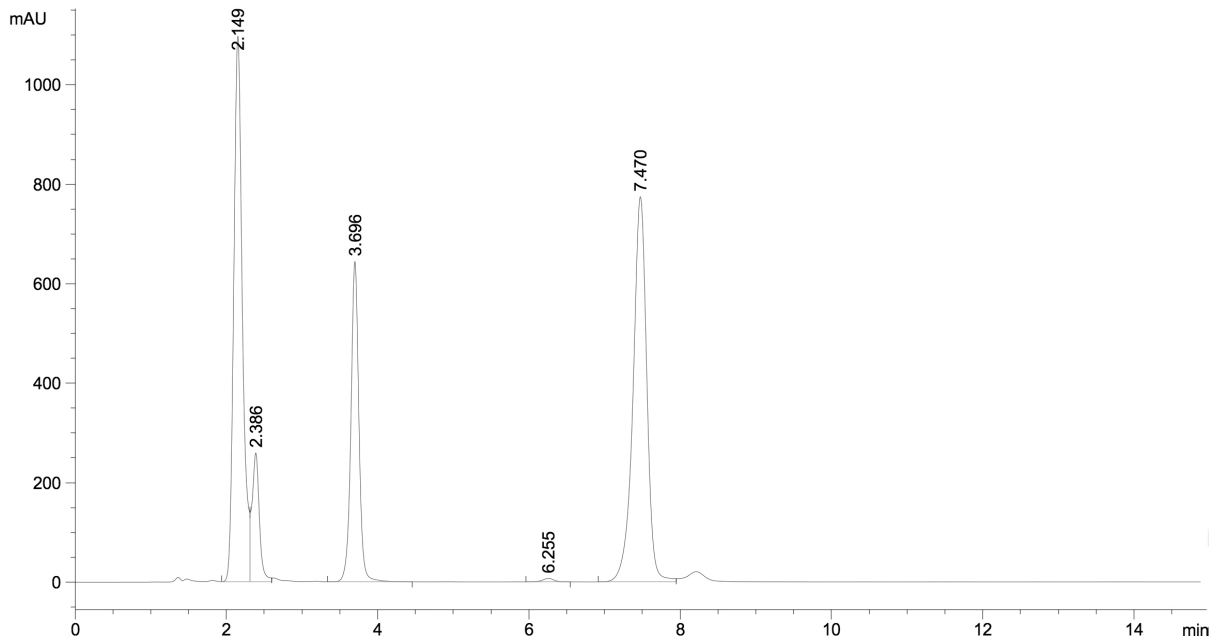
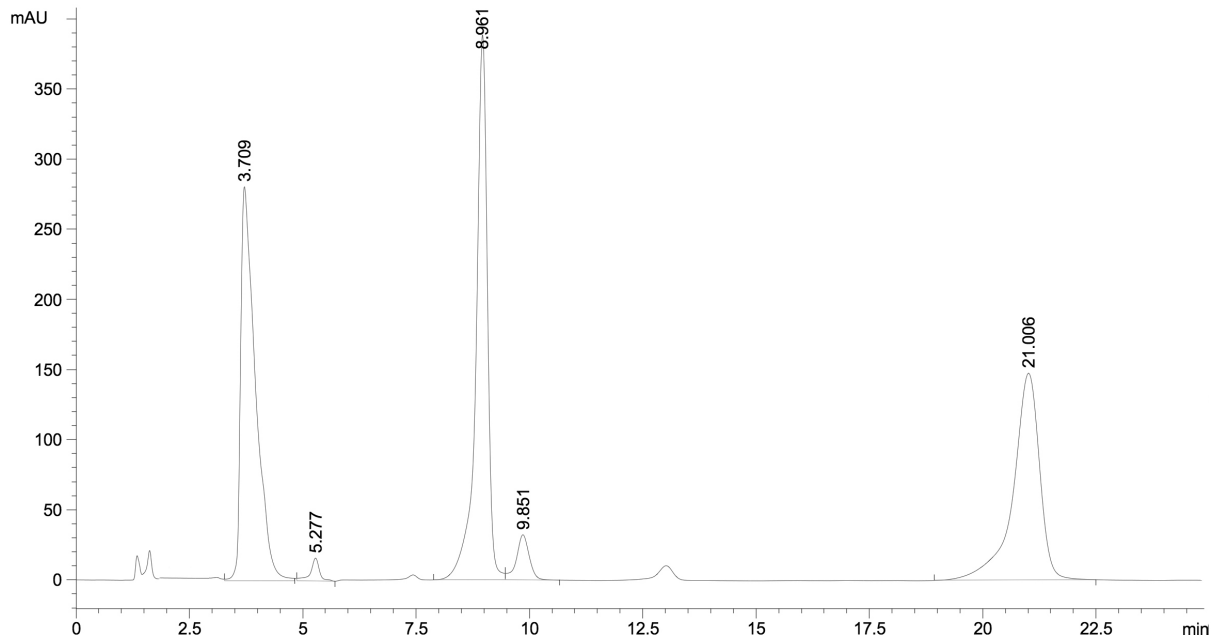


Abbildung 9.4.4-4: Artemether/Lumefantrin: Säule D, H<sub>2</sub>O, pH=2.5, MeOH=85 %; 2.10 min=LF, 6.61 min=AE.

# ANHANG

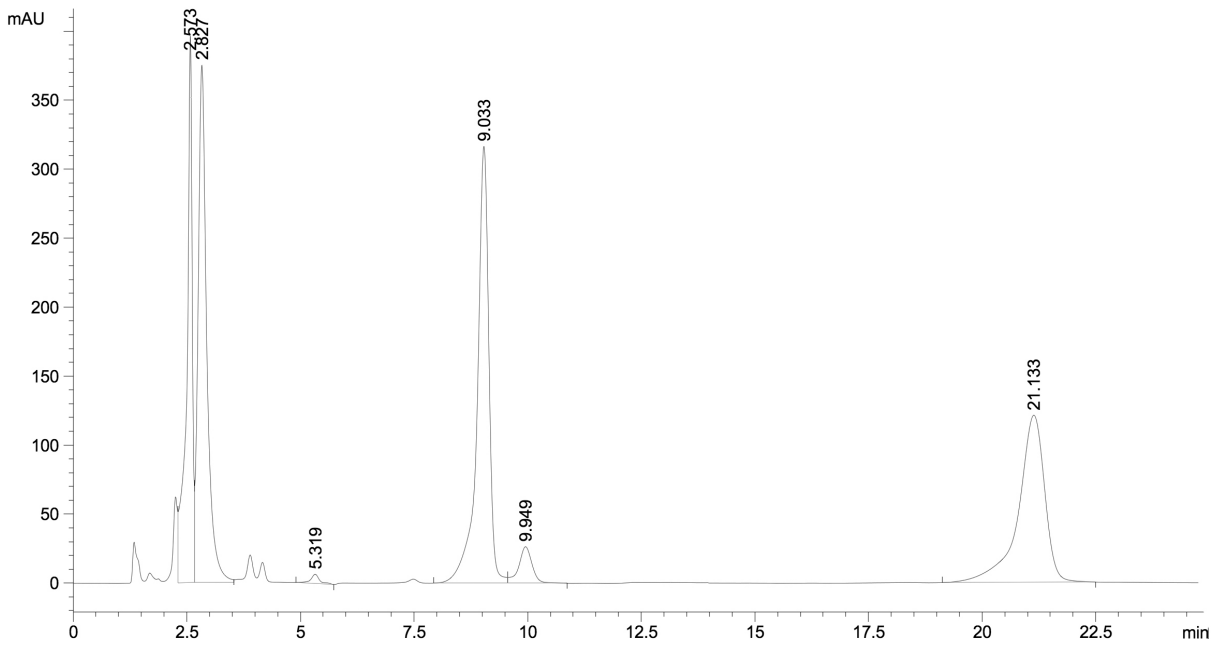


**Abbildung 9.4.4-5:** Artemether/Lumefantrin: Säule D, H<sub>2</sub>O, pH=2.5, MeOH=82.5 %; 2.15 min=LF-VU C, 3.70 min=LF, 6.26 min=AE, 7.47 min=LF-VU C.

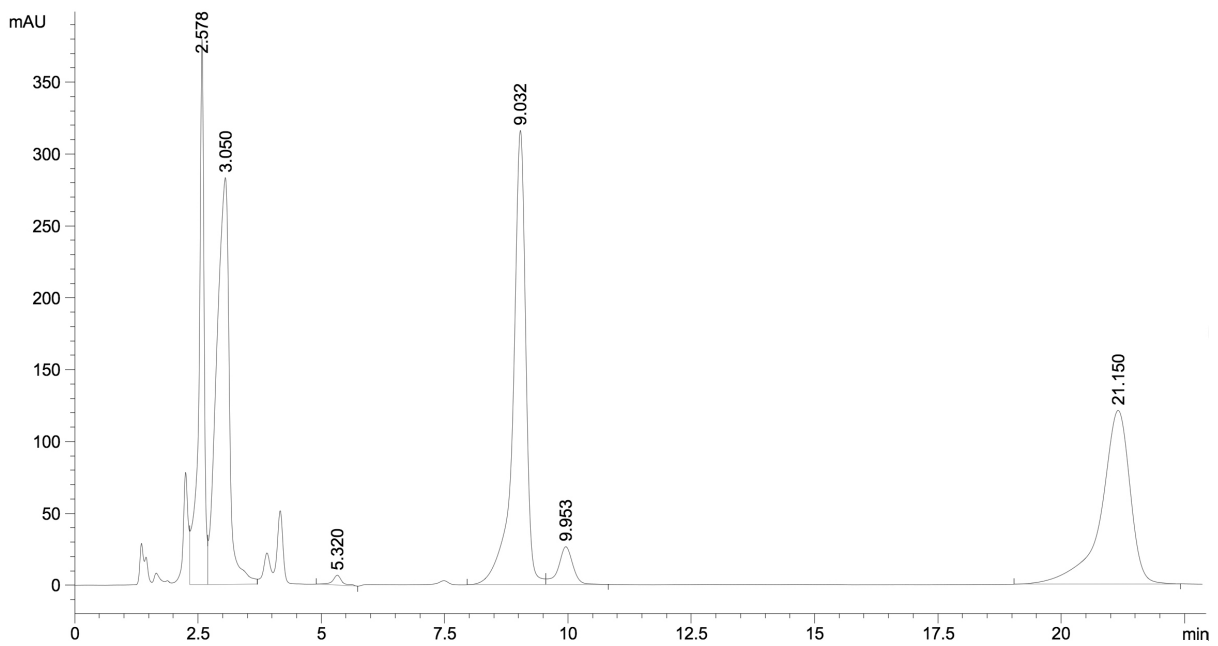


**Abbildung 9.4.4-6:** Artemether/Lumefantrin: Säule D, H<sub>2</sub>O, pH=2.5, MeOH=80 %; 3.71 min=LF+LF-VU C, 5.28 min=AE-VU A, 8.96 min=LF-VU A, 9.85 min=AE, 21.01 min=LF-VU B.

# ANHANG

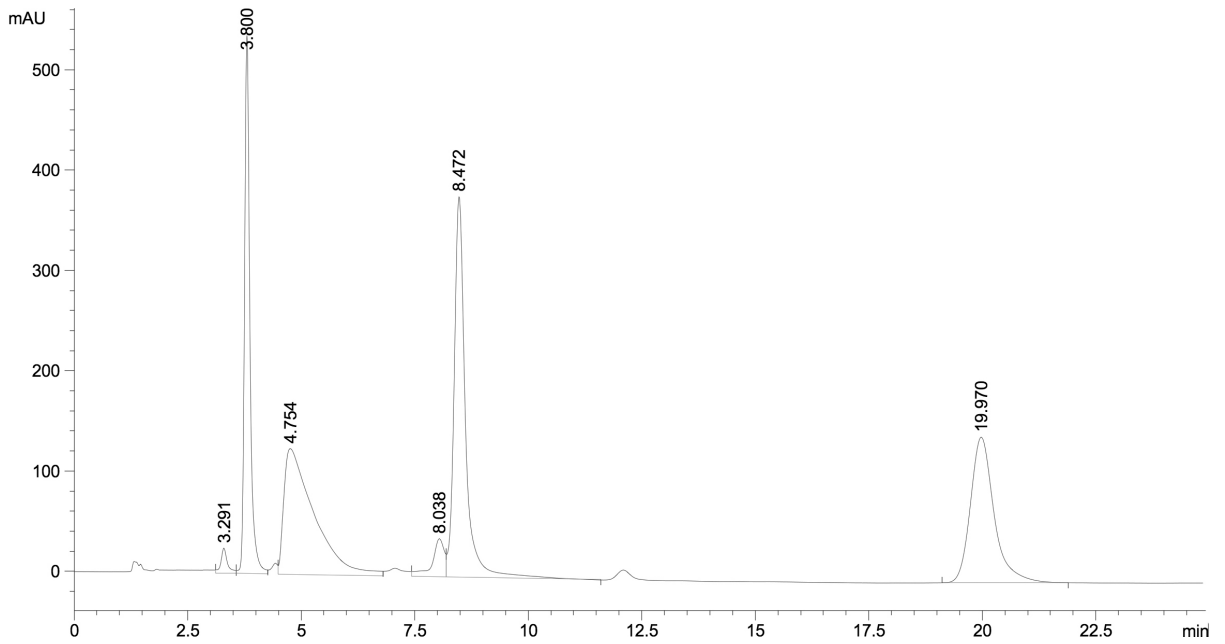


**Abbildung 9.4.4-7:** Artemether/Lumefantrin: Säule D, H<sub>2</sub>O, pH=3.0, MeOH=80 %;  
2.57 min=LF-VU C, 2.83 min=LF, 5.32 min=AE-VU A, 9.03 min=AE-VU A, 9.95 min=AE,  
21.13 min=LF-VU B.

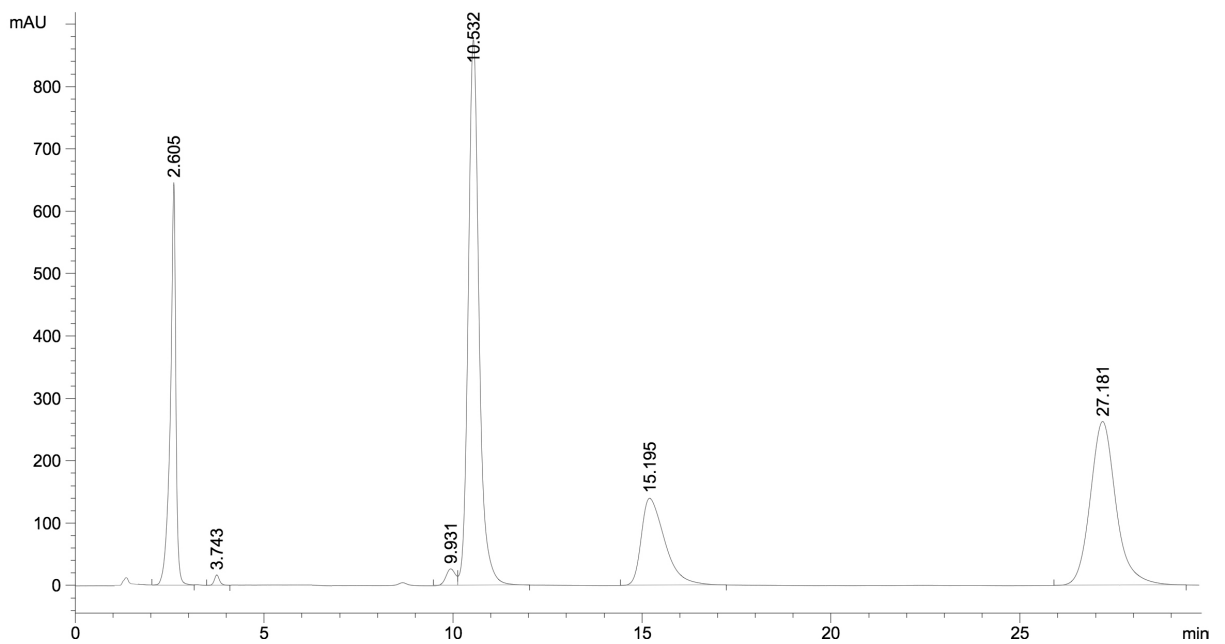


**Abbildung 9.4.4-8:** Artemether/Lumefantrin: Säule D, H<sub>2</sub>O, pH=3.5, MeOH=80 %;  
2.58 min=LF-VU C, 3.05 min=LF, 5.32 min=AE-VU A, 9.03 min=AE-VU A, 9.95 min=AE,  
21.15 min=LF-VU B.

# ANHANG

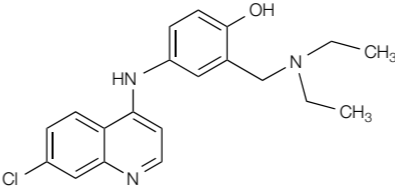
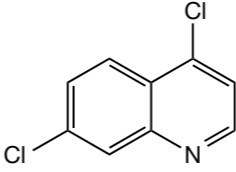
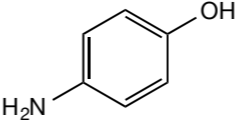
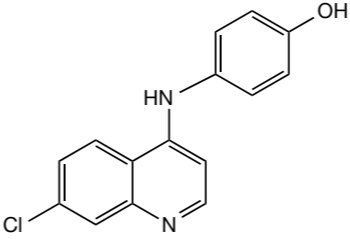
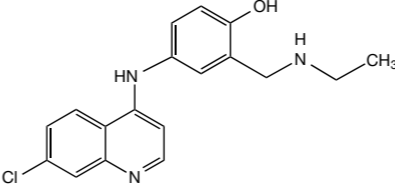


**Abbildung 9.4.4-9:** Artemether/Lumefantrin: Säule A, H<sub>2</sub>O, pH=2.5, MeOH=80 %; 3.29 min=AE-VU A, 3.80 min=LF-VU C, 4.75 min=LF, 8.04 min=AE, 8.47 min=LF-VU A, 19.97 min=LF-VU B.



**Abbildung 9.4.4-10:** Artemether/Lumefantrin: Säule A, 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=2.5, MeOH=77.5 %; 2.61 min=LF-VU C, 3.74min=AE-VU A, 9.93 min=AE, 10.53 min=LF-VU A, 15.20 min=LF, 27.18 min=LF-VU B.

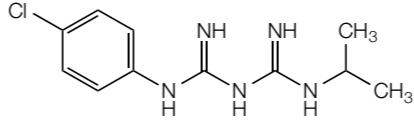
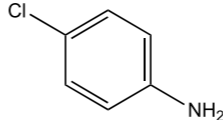
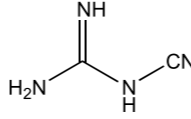
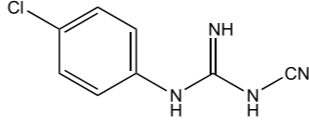
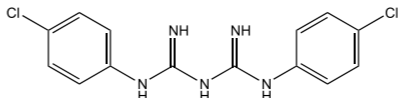
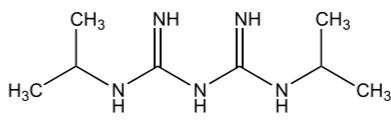
**Amodiaquin**

| Strukturformel  | Name                                   | Bezeichnung | Retentionszeit [min] |
|---|--|-------------|----------------------|
|    | <b>Amodiaquin</b>                      | <b>AQ</b>   | <b>10.38</b>         |
|    | 4,7-Dichlorchinolin                    | AQ-VU A     | 12.56                |
|    | 4-Aminophenol                          | AQ-VU B     | 1.41                 |
|   | 4-[(7-Chlorchinolin-4-yl)-amino]phenol | AQ-VU C     | 4.21                 |
|  | N-Desethylamodiaquin                   | AQ-VU D     | 5.98                 |

**Chromatographische Parameter der optimierten Methode**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Säule D   |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 27.5 % (V/V) der KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Pufferlösung (0.05 mol/l, pH=8.0);<br>72.5 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min  |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)   |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=230 nm  |

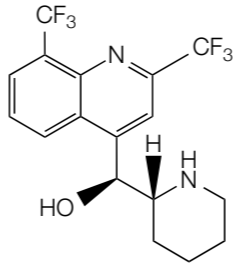
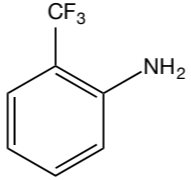
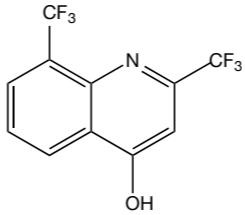
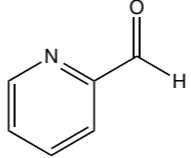
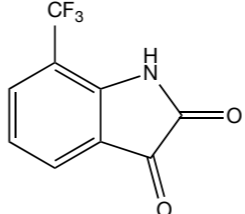
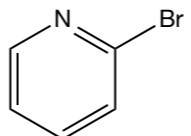
**Proguanil**

| Strukturformel  | Name                            | Bezeichnung | Retentionszeit [min] |
|---|---------------------------------|-------------|----------------------|
|    | <b>Proguanil</b>                | PG          | 7.74                 |
|    | 4-Chloranilin                   | PG-VU A     | 4.70                 |
|    | 2-Cyanoguanidin                 | PG-VU B     | 1.40                 |
|    | 4-Chlorophenyl-2-cyanoguanidin  | PG-VU C     | 2.33                 |
|  | 1,5-Bis(4-chlorophenyl)biguanid | PG-VU D     | 25.46                |
|  | 1,5-Bis(1-methylethyl)biguanid  | PG-VU E     | 2.71                 |

**Chromatographische Parameter der optimierten Methode**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Säule A   |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 50 % (V/V) der KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Pufferlösung (0.05 mol/l, pH=3.0);<br>50 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 0.75 ml/min   |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)   |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=232 nm  |

**Mefloquin**

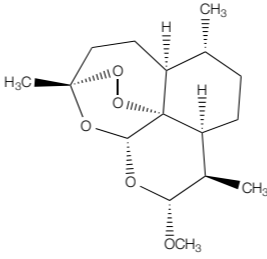
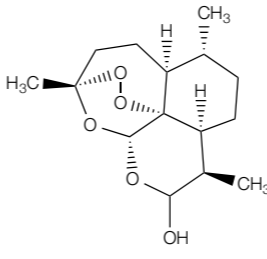
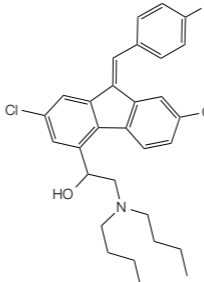
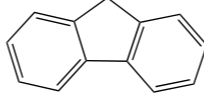
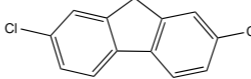
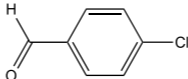
| Strukturformel  | Name                                       | Bezeichnung | Retentionszeit [min] |
|---|--|-------------|----------------------|
|    | <b>Mefloquin</b>                           | <b>MQ</b>   | <b>5.28</b>          |
|    | 2-Trifluormethylanilin                     | MQ-VU A     | 4.00                 |
|    | 2,8-Bis(trifluoromethyl)-4-hydroxychinolin | MQ-VU B     | 12.96                |
|   | Pyridin-2-carboxaldehyd                    | MQ-VU C     | 1.66                 |
|  | 7-Trifluormethylisatin                     | MQ-VU D     | 2.46                 |
|  | 2-Bromopyridin                             | MQ-VU E     | 2.46                 |

**Chromatographische Parameter der optimierten Methode**

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>Säule:</b>             | Säule A   |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 35 % (V/V) der NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Pufferlösung (0.1 mol/l, pH=3.0);<br>65 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min  |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl   |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)   |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=280 nm  |



**Artemether/Lumefantrin**

| Strukturformel  | Name               | Bezeichnung | Retentionszeit [min] |
|---|--------------------|-------------|----------------------|
|    | Artemether         | AE          | 9.93                 |
|    | Dihydroartemisinin | AE-VU A     | 3.74                 |
|   | Lumefantrin        | LF          | 15.20                |
|  | Fluoren            | LF-VU A     | 10.53                |
|  | 2,7-Dichlorfluoren | LF-VU B     | 27.18                |
|  | 4-Chlorbenzaldehyd | LF-VU C     | 2.61                 |

**Chromatographische Parameter der optimierten Methode**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>Säule:</b>             | Säule A  |
| <b>Mobile Phase:</b>      | 22.5 % (V/V) der NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Pufferlösung (0.05 mol/l, pH=2.5);<br>77.5 % (V/V) Methanol |
| <b>Flussrate:</b>         | 1.0 ml/min   |
| <b>Injektionsvolumen:</b> | 10 µl  |
| <b>Trenntemperatur:</b>   | Raumtemperatur (nicht kontrolliert)  |
| <b>Detektion:</b>         | UV/Vis, λ=210 nm   |